

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLID TÜMÖRLERDEKİ FARKLI HÜCRE
POPULASYON KİNETİKLERİNİN *İN VİTRO*
TÜMÖR HETEROJENİTE MODELİNDE
İNCELENMESİ**

ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970109

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SOLİD TÜMÖRLERDEKİ FARKLI HÜCRE
POPULASYON KİNETİKLERİNİN *İN VİTRO*
TÜMÖR HETEROJENİTE MODELİNDE
İNCELENMESİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK

Danışman Öğretim Üyesi: Doç.Dr.Zeynep Yüce

2.Danışman: Dr.Thomas Ried

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 116Z300 proje no.lu 1001 programı ile, aday
1059B141600920 bursiyer no.lu 2214/A programı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970109

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Doktora programı öğrencisi Öykü GÖNÜL GEYİK 'Solid Tümörlerdeki Farklı Hücre
Populasyon Kinetiklerinin *in vitro* Tümör Heterojenite Modelinde İncelenmesi'
konulu Doktora tezini 27.01.2020 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Doç.Dr. Zeynep YÜCE
Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyoloji AD

BAŞKAN

Prof.Dr. İlknur BİLKAY GÖRKEN

Dokuz Eylül Üniversitesi
Radyasyon Onkolojisi AD

ÜYE



Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM
Ege Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji AD

ÜYE

Prof.Dr. Ogün SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyoloji AD

YEDEK ÜYE

Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE



Dr.Öğr.Üyesi Melek DEMİRTAŞ PEHLİVAN
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri MYO
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

ÜYE

Dr.Öğr.Üyesi Sevcan ATAY

Ege Üniversitesi
Tıbbi Biyokimya AD

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Araştırmanın Tipi	21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	21
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	21
3.4. Çalışma Materyali.....	21
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	21
3.6. Veri Toplama Araçları.....	22
3.6.1. Ön Çalışmalar	22
3.6.2. Hücre Kültürü, Mikoplazma Testi, STR ve Karyotip Analizi	25
3.6.3. Stabil Floresan İşaretleme ve Kokültür Modelinin Oluşturulması.....	27
3.6.4. Populasyon Davranışlarının Değerlendirilmesi	34
3.6.4.1. Canlılık tayini	34
3.6.4.2. Proliferasyon yeteneklerinin belirlenmesi	36
3.6.4.3. Migrasyon yeteneklerinin değerlendirilmesi.....	37
3.6.4.4. İnvazyon yeteneklerinin değerlendirilmesi.....	38

3.6.4.5. Diferansiyasyon düzeylerinin belirlenmesi	39
3.6.5. Kokültürlere Uygulanan Terapötiklerin Populasyon Üzerine Etkilerinin Fluoresan Sinyalin Takibi Yoluyla İncelenmesi.....	40
3.6.6. Genomik Analizler ve Populasyon Verileriyle Karşılaştırılması.....	40
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	45
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	46
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	46
3.10. Etik Kurul Onayı	46
4. BULGULAR	47
4.1. Hücre Görüntüleme, Mikoplazma Testi, STR ve Karyotip Analizi.....	47
4.2. Stabil Fluoresan İşaretleme ve Kokültür Modelinin Oluşturulması.....	49
4.3. Populasyon Davranışlarının Değerlendirilmesi.....	70
4.3.1. Canlılık tayini	70
4.3.2. Proliferasyon yeteneklerinin belirlenmesi	77
4.3.3. Migrasyon yeteneklerinin değerlendirilmesi.....	80
4.3.4. İnvazyon yeteneklerinin değerlendirilmesi	82
4.3.5. Diferansiyasyon düzeylerinin belirlenmesi.....	93
4.4. Kokültürlere Uygulanan Terapötiklerin Populasyon Üzerine Etkilerinin Fluoresan Sinyalin Takibi Yoluyla İncelenmesi	101
4.5. Genomik Analizler ve Populasyon Verileriyle Karşılaştırılması.....	107
5. TARTIŞMA	114
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	122
7. KAYNAKLAR.....	124
8. EKLER.....	145
9. KATKI.....	146

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Proteinlerin eksitasyon ve emisyon dalgaboyları	28
Tablo 2. Stabil fluoressan işaretli DLD-1 altklonlarının ile oluşturulan karışımların şeması.....	34
Tablo 3. DLD-1 klonlarının miFISH deneyleri için seçilmiş olan FISH problemlerinin bağlandığı genler ve pozisyonları	44
Tablo 4. Atasal DLD-1 hücre hattı ve altklonların STR analiz sonuçları	49
Tablo 5. Altklonların enfeksiyöz parçacık miktarları.....	52
Tablo 6. Kemoterapötikler ve radyoterapinin 24, 72 ve 144 saat inkübasyon zamanlarında IC ₅₀ değerleri ve kullanıldıkları denemeler	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Atasal DLD1 hücre hattından akım sitometrisiyle ayrıştırılan klonlar	23
Şekil 2. Farklı 2N ve 4N klonlarında izlenen kromozom düzeyindeki farklılıklar	24
Şekil 3. Array-CGH yöntemiyle iki tetraploid altklonunda izlenen farklı genetik anomaliler.....	24
Şekil 4. A) Hücre bölünmesi sırasında “cytochalasin B” kullandıktan sonra mikronükleus oluşumunun değerlendirilmesi. Near-tetraploid (4N) hücrelerde mikronükleus oluşumu daha yüksek oranda izlenmektedir B) Mitoz bölünme sırasında aksayan kromozom izlenme oranı yine 4N klonlarda daha yüksek	25
Şekil 5. Virüs titrasyon plate dizaynı	29
Şekil 6. Seçilen floresan proteinlerin eksitasyon ve emisyon spektrasının gösterimi	31
Şekil 7. Floresan işaretlemeye kullanılan plazmid DNA'ların tam sekans haritaları. a) mCerulean3-N1, b) mCitrine-N1, c) tdTomato-N1, d) mCherry2-N1, e) pmiRFP670-N1.....	32
Şekil 8. G418 konsantrasyon titrasyon plakası (145)	33
Şekil 9. CGH genel prensibi (162)	42
Şekil 10. Akış şeması	45
Şekil 11. EVOS mikroskobunda 10x objektifte alınan DLD-1 klonlarına ait faz kontrast mikroskopi görüntüleri	47
Şekil 12. DLD-1 klonlarının mikoplazma testinin jel görüntüsü	48
Şekil 13. Her bir DLD-1 klonunun metafaz kromozom sayısını gösteren grafik.....	49
Şekil 14. B9 altklonuna ait hücrelerin transfeksiyon sonrası ters floresan mikroskopta alınmış görüntüleri. a, d ve g aydınlık alan, b, e ve h GFP-mCAT ekspresyonunu, c, f ve i ise mCherry ekspresyonunu göstermektedir (ölçek çubuğu: 200 µm).	50
Şekil 15. Stabil transfekte edilmiş mCherry işaretli B9 altklon hücrelerine ait ters floresan mikroskop görüntüleri. a ve c aydınlık alan, b ve d mCherry ekspresyonunu göstermektedir.....	51
Şekil 16. Lentiviral işaretleme sonrası elde edilen akış sitometrisi sonuç grafikleri ...	54

Şekil 17. İşaretlenen altklonların floresan mikroskopi görüntüleri	54
Şekil 18. a) mCitrine'in eksizyonu b) Boş vektör pDNA'nın diyagnostik kesimi c) Transforme edilen kolonilerden izole edilen pDNA'nın spektrofotometrik ölçümü	56
Şekil 19. Transfekte klonların ters floresan mikroskop görüntüsü	56
Şekil 20. Floresan DLD-1 klonlarının akış sitometrisi histogramları ve yüzdeleri.....	61
Şekil 21. FACS yöntemi ile floresan sinyale sahip altklon hücrelerinin seçimi.....	63
Şekil 22. DLD-1 altklonlarının floresan işaretlenmesi sonucu elde edilen konfokal floresan mikroskopi görüntüleri.....	64
Şekil 23. Stabil floresan DLD-1 altklonlarından oluşturulan a) M1 b) M2 c) M3 d) M4 karışımlarına ait kokültürlerin zamana bağlı olarak alınan konfokal mikroskopi görüntüleri	66
Şekil 24. Stabil floresan DLD-1 altklonlarından oluşturulan a) M1 b) M2 c) M3 d) M4 kokültürlerin zamana bağlı olarak gerçekleştirilen akış sitometrisi verileri	70
Şekil 25. Altklonlara ait hücrelerin zamana bağlı % canlılık değişimi.....	71
Şekil 26. Tripin mavisi 24, 48 ve 72 saat hücre canlılık grafikleri	72
Şekil 27. DLD-1 altklonlarının a) 24 saat b) 72 saat c) 144 saat zaman noktalarında kemoterapötikler ve hipoksi etkisi d) 24 saat e) 72 saat f) 144 saat zaman noktalarında radyasyon etkisi altında MTT canlılık tayini sonuçları	76
Şekil 28. DLD1 altklonlarıyla gerçekleştirilen BrdU hücre proliferasyon denemesi sonucu.....	78
Şekil 29. DLD-1 altklonlarının a) terapi etkisinin olmadığı durumda oluşan kolonileri gösteren plaka görüntüsü b) kemoterapötikler, radyasyon ve hipoksi etkisi altında oluşturduğu kolonilerin 3 bağımsız deneme ortalamasını gösteren grafik.....	80
Şekil 30. DLD-1 altklonlarının a) terapi uygulanmadan (NT: No Treatment) gerçekleştirilen yara kapama testi görüntüleri b) terapi uygulanmadan gerçekleştirilen yara kapama testi sonuçlarına ait grafik ve c) terapilerin etkisi altında gerçekleştirilen yara kapama testi sonuçlarına ait grafik	82
Şekil 31. DLD-1 klonlarının invazyon ve dikey migrasyon yeteneklerinin Boyden chamber yöntemiyle belirlenmesi. a) Boyden Chamber plakalarının Azure görüntüleme sistemi ve EVOS ters mikroskop görüntüleri b) Terapi etkisinin olmadığı durumda altklonların c) 2N altklonlara karşı 4N altklonların dikey migrasyon ve	

invazyon yüzdeleri. d) Altklonların kemoterapötikler, radyoterapi ve hipoksi etkisi altında dikey migrasyon ve e) invazyon yeteneklerini gösteren grafikler.	92
Şekil 32. Sferoid oluşturma denemesi a) klonların oluşturduğu sferoidlerin ters mikroskop görüntüleri b) klonların sferoid oluşturma yeteneklerini gösteren grafikler	95
Şekil 33. DLD-1 altklonlarında KRK kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin akış sitometrisi ile gösterimi a) CD44 ve CD133 b) CD29 ve CD166 c) CD326 d) CD24 antikorları ile gerçekleştirilen denemelerin histogram grafikleri	100
Şekil 34. DLD-1 altklonları kullanılarak oluşturulan M1, M2, M3 ve M4 kokültürlerinin a) 5-FU b) OXP c) IRI d) PTX e) GTB etkisi altında populasyon kinetiklerindeki değişimlerin konfokal mikroskopi ile izlenmesi	102
Şekil 35. DLD-1 altklonları kullanılarak oluşturulan kokültürlerin 5-FU, OXP, IRI, PTX ve GTB etkisi altında a) M1 b) M2 c) M3 ve d) M4 populasyon kinetiklerindeki değişimlerin akış sitometrisi ile izlenmesi	106
Şekil 36. DLD-1 klonlarının CGH array sonuçları. Kopya sayısı kazançları mavi, kayıpları kırmızı olarak gösterilmektedir.	107
Şekil 37. DLD-1 klonlarının SKY analiz sonuçları	110
Şekil 38. DLD-1 altklonlarının 15 gen-spesifik prob ile miFISH analiz sonuçları a) Sırasıyla near-diploid C3 ve C34 ile near-tetraploid C28, B9 ve B12'ye ait klonal imbalans özeti. Yeşil kazanımları, kırmızı kayıpları, mavi değişim olmadığını göstermektedir. b) 4N B9 klonunun 15 ayrı prob ile kompozit görüntüsü.	113

KISALTMALAR

- 2N: “near-diploid”(diploid kromozom setine yakın sayıda kromozoma sahip)
4N: “near-tetraploid”(tetraploid kromozom setine yakın sayıda kromozoma sahip)
5-FU: “5-Fluorouracil”
ABD: Amerika Birleşik Devletleri
aCGH: “array Comparative Genomic Hybridization” (Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon dizisi)
ANOVA: “Analysis of variance” (Varyans Analizi)
ATCC: “The American Type Culture Collection” (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
BAC: “Bacterial Artifical Chromosome” (Bakteriyel Yapay Kromozom)
BFP: “Blue Fluorescent Protein” (Mavi Floresan Protein)
BrdU: 5-bromo-2'-deoksiüridin
BSA: “Bovine Serum Albumin” (Sığır Serum Albumini)
BSL-2: “Bio-Safety Level-2” (Biyo-Güvenlik Seviyesi-2)
CCD: Charge-coupled device (Yükle Çalışan Cihaz)
CFA: “Colony Formation Assay” (Koloni Oluşturma Deneyi)
CGH: “Comparative Genomic Hybridization” (Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon)
CIMP: “CpG Island Methylator Phenotype” (CpG Adası Metile Edici Fenotip)
CIN: “Chromosome instability” (Kromozom instabilitesi)
CSC: “Cancer Stem Cell” (Kanser Kök Hücresi)
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEÜ: Dokuz Eylül Üniversitesi
DEÜTF: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
DLD-1: D.L. Dexter tarafından izole edilmiş bir kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
E.coli: Escherichia coli
EHS: Engelbreth-Holm-Swarm
EtOH: Etanol
FACS: “Fluorescence-Activated Cell Sorting” (Fluoresan-Aktive Hücre Ayırıştırma)
FBS: “Fetal Bovine Serum” (Fetal Sığır Serumu)
FDR: “False Discovery Rate” (Yanlış Bulgu Oranı)

FISH: “Fluorescent in situ Hybridization” (Fluoresan in situ Hibridizasyon)
GFP: “Green Fluorescent Protein” (Yeşil Fluoresan Protein)
GLOBOCAN: “Global Cancer Observatory” (Küresel Kanser Gözlemevi)
GSEA: “Gene Set Enrichment Analysis” (Gen Seti Zenginleştirme Analizi)
GTB: “Gemcitabine”
HCl: Hidroklorik asit
HRP: Horse Radish Peroxidase (Turp Peroksidazı)
IA: “Invasion Assay” (İnvazyon Deneyi)
IC50: “Inhibitory Concentration 50” (İnhibitör Doz 50)
IgG: İmmünoglobulin G
iRFP: “infra-Red Fluorescent Protein” (Kızıl ötesi Fluoresan Protein)
IRI: “Irinotecan”
KML: Kronik Miyeloid Lösemi
KRK: Kolorektal karsinoma
LeGo: “Lentiviral Gene Ontology Vector” (Lentiviral Gen Ontoloji Vektörü)
L-Gln: L-Glutamin
M1: “Mix 1” (Karışım 1)
M2: “Mix 2” (Karışım 2)
M3: “Mix 3” (Karışım 3)
M4: “Mix 4” (Karışım 4)
MCS: “Multiple Cloning Site” (Çoklu Klonlama Bölgesi)
miFISH: “Multicolor Interphase Fluorescence in situ Hybridization” (Çok renkli İnterfaz Fluoresan in situ Hibridizasyon)
miRNA: mikroRNA
MMCT: Mikrohücre Aracılı Kromozom Transferi
MOI: “Multiplicity Of Infection” (Enfeksiyon Oranı: Enfektif ajanın enfekte edilen organizmaya oranı)
MIN: “Microsatellite Instability” (Mikrosatellit İnstabilitesi)
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NA: “Numerical Aperture” (Sayısal Açıklık)
NCI: “National Cancer Institute” (Ulusal Kanser Enstitüsü)
NIH: “National Institutes of Health” (Ulusal Sağlık Enstitüleri)

NT: “No Treatment” (Terapi Uygulanmamış)
OXP: “Oxaliplatin”
PBS: “Phosphate Buffer Saline” (Fosfat Tuzu Tamponu)
PCA: “Principal Component Analysis” (Temel Bileşen Analizi)
pDNA: plazmid DNA’sı
P/S: Penisilin/Streptomisin
PTX: “Paclitaxel”
RNA: Ribonükleik asit
RPMI-1640: “Roswell Park Memorial Institute-1640” (Roswell Park Memorial Enstitüsü-1640)
SA: “Scratch Assay” (Yara Kapama Deneyi)
SFA: “Spheroid Formation Assay” (Sferoid Oluşturma Deneyi)
SKY: “Spectral Karyotyping” (Spektral Karyotipleme)
STR: “Short Tandem Repeat” (Kısa Dizi Tekrarı)
TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
VC: “Vehicle Control” (Taşıyıcı Kontrolü)
WGD: “Whole Genome Duplication” (Tüm Genom Duplikasyonu)
WHO: “World Health Organization” (Dünya Sağlık Örgütü)

TEŞEKKÜR

Öncelikle sevgili ve saygıdeğer danışmanım Doç.Dr.Zeynep YÜCE'ye, bana bir danışmanın tez çalışmalarını takip edip yol göstermekten çok daha fazlası olduğunu gösterdiği, yaşadığım her çıkmazda beni motive edip olumlu olmaya yönlendirdiği, bana benden daha fazla güvendiği ve bugün yetkin bir bilim insanı hâline gelmemi sağladığı için çok teşekkür ederim. Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH), Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) öğretim üyesi ve aynı zamanda doktora tezi 2. danışmanım Dr.Thomas RIED'e bana laboratuvarının tüm olanaklarını açtığı ve 1 yıl boyunca tez çalışmalarımı ABD'de gerçekleştirmemi, en modern bilimsel araştırma yöntemlerini öğrenip uygulayabilmemi, bir bilim insanı olarak vizyonumu genişletmemi sağladığı için ve bana karşı her zaman çok kibar davrandığı için çok teşekkür ederim. Dr.RIED'in laboratuvarında çalışan, başta Darawalee WANGSA olmak üzere, Markus BROWN, Rachel LOKANGA, Danny WANGSA, Wei-Dong CHEN, Kerstin HESELMAYER-HADDAD, Daniela HIRSCH'e bana verdikleri tüm destekler için teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim boyunca verdikleri emekler için başta Anabilim Dalı başkanı Prof.Dr.Ogün SERCAN ve Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU olmak üzere, DEÜTF Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyeleri Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ, Prof.Dr.Oğuz ALTUNGÖZ, Prof.Dr.Sultan CİNGÖZ ve Prof.Dr.Esra ERDAL'a, Öğr.Gör.Şenay ÇAKMAKOĞLU'na, AD Sekreterimiz Nevin ÇELİK'e ve AD Görevlimiz Adalet ÖZDEMİR'e teşekkür ederim. Ayrıca, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi öğretim üyesi Prof.Dr.Neşe ATABEY'e akademik bilgime katkılarından dolayı teşekkür ederim. Doktora başvurusu için geldiğim ilk günden beri ellerinden gelen hiçbir yardımı esirgemeyen, başta Beyhan GÜRKAN ve Fulya YAŞARSOY KÜÇÜK olmak üzere, çok sevgili DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri Birimi'ne teşekkür ederim. Gerek araştırma yöntemleri, gerekse akademik bilgi düzeyinde şu anki hâle gelmemde büyük payı olan, hem bilimsel hem de sosyal hayatımızdaki sohbetlerinden çok keyif aldığım sevgili arkadaşım ve akıl hocam Seda BAYKAL KÖSE'ye emekleri ve bu süreçte bana karşı gösterdiği sabır ve hoşgörü için minnetlerimi sunarım. Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü'nde lisans eğitimimizi almaya başlarken tanışmamızdan bu yana ayrılmadığımız, bu dostluğumuzun aynı grupta çalışma arkadaşlığıyla taçlandığı, tanıdığım en özverili insan ve doktora çalışmalarım sırasında bana yoldaş olan, biricik arkadaşım Hande

EFE'ye tüm emekleri ve sabrı için teşekkür ederim. Tek bir isteğimi reddetmeyen, beni her zaman öncelikleri yapan, beni eğiten, güzel bir eğitim alabilmem için tüm imkanlarını sunan, her zaman ve her durumda yanımda olmaya devam edeceklerine güvenimin sonsuz olduğu canım annem Melek GÖNÜL ve canım babam Asil GÖNÜL'e en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Doktoramı tamamlayabilmemde en büyük payı olan, her vazgeçişimde beni yüreklendiren, kendimde göremediğim özgüveni bulmamı sağlayan, doğruysam doğru yanlışsam yanlış olduğumu söyleyeceğine her zaman güvendiğim, hayat arkadaşım ve bilimsel ekürim, sevgili Caner GEYİK'e sonsuz sevgimi ve minnetimi sunarım. Hem bilimsel, hem sosyal yaşantımda bana her zaman destek olan, gerçek bir bilim insanı olmamda en büyük etkilerden birine sahip olan, çok saygı ve sevgi duyduğum, İzmir Ekonomi Üniversitesi Dr.Öğr.Üyesi Ali Burak ÖZKAYA'ya her şey için teşekkür ederim. Ayrıca çalışma arkadaşlarım Belma NALBANT, Merve SOĞANCI, Özge UYSAL YOCA, Pelin KARADAĞ ve tüm DEÜ Tıbbi Biyoloji AD lisansüstü öğrencilerine arkadaşlıkları ve yardımları için teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim DEÜ ARLAB (Araştırma Laboratuvarı) ve İBG (İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi) bünyesinde görevli tüm çalışanlara teşekkür ederim. Son olarak, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (116Z300) ve 2214-A Yurt Dışı Doktora Burs Programı (1059B141600920) aracılığıyla bu araştırmayı gerçekleştirmemi sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 'na teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR, 2020

Öykü GÖNÜL GEYİK

SOLID TÜMÖRLERDEKİ FARKLI HÜCRE POPULASYON KİNETİKLERİNİN *İN VİTRO* TÜMÖR HETEROJENİTE MODELİNDE İNCELENMESİ

 yk  Gönül Geyik, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Narlıdere/ ZMİR

ÖZET

Amaç ve Hipotez: Bu çalışmada, aynı tümörden türemiş, farklı genetik profillere sahip altklonların fluoresan ile işaretlenerek bir arada üretildiği ve değişik koşullara maruziyet sonrasında bu klonların kinetik davranışlarının araştırıldığı tümör heterojenitesinin *in vitro* bir modelinin oluşturulması hedeflenmektedir. Tez çalışmasının hipotezi, intratümöral anöploid farklanmalarının kanser progresyonunu farklı düzeylerde etkilemekte olduğudur.

Yöntem: İlk olarak DLD-1 kolon kanseri hücre hattından izogenik near-diploid ve near-tetraploid altklonlar, akım sitometrisi yöntemiyle ayrıştırılmıştır. Bu altklonlar önce farklı renkteki fluoresan proteinlerle işaretli vektörlerle enfekte edilerek işaretlenmiş; sonra eşit oranlarda bir arada üretilerek bir *in vitro* tümör heterojenite modeli oluşturulmuştur. Genetik profilleri tanımlanan bu klonların, yaratılan farklı mikroçevre koşulları karşısında (kemoterapötikler, radyasyon ve hipoksi), aralarındaki davranış farklılıkları karşılaştırılarak, hangi koşulda hangi varyasyonun avantaj sağladığı ve farklı koşullardaki dirençten sorumlu olabilecek genetik varyasyonlar belirlenmiştir.

Bulgular: DLD-1 altklonlarının karakterizasyonu ve stabil fluoresan işaretlemeleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan *in vitro* intratümöral heterojenite modelleri zamana bağlı olarak ve çeşitli terapi etkileri altında izlenmiştir. Altklonlar üzerinde gerçekleştirilen populasyon davranışlarının belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen deney sonuçları, NIH Ried Lab'da gerçekleştirilen genomik analizlerle karşılaştırılarak kanserde ilaç direncine neden olabilecek moleküler düzeydeki mekanizmalar işaret edilmiştir.

Sonuç: Kanser terapi direncinin altında yatan temel nedenlerden biri de tümör içi hücresel heterojenitedir. Özellikle uygulanan tedavi yöntemlerinin yarattığı değişik mikroortam koşullarına uyumda avantaja yol açabilecek mutasyon ve epigenetik desenleri barındıran klonal kanser hücre populasyonlarının, tedaviye dirençten sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu altklonların tanımlanması ve bu kanser hücrelerine karşı etkili tedavi yöntemlerini geliştirmesi elzemdir. Bu çalışma ile, kanserde ilaç direncine neden olabilecek mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik büyük adımlar atılması sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Klonal evrim, intratümöral heterojenite, tedaviye direnç, kolon kanseri, DLD-1



INVESTIGATING DIFFERENT CELL POPULATION KINETICS IN SOLID TUMORS ON AN *IN VITRO* TUMOR HETEROGENEITY MODEL

Öykü Gönül Geyik, Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences,
Department of Medical Biology, Narlıdere/İZMİR

ABSTRACT

Aim and Hypothesis: In this study, we aimed to generate an *in vitro* intratumoral heterogeneity model by fluorescent tagging isogenic subclones derived from the same cancer cell line. Hypothesis of this thesis is that intratumoral aneuploidy alterations affect cancer progression at different levels.

Methods: Isogenic near-diploid and near-tetraploid cell lines were established from the colon cancer DLD-1 cell line via FACS-sorting and confirmed by genetic analyses. We tagged these subclones with different fluorescent labeled vectors. Correlation between individual genetic profiles and functional assays under different microenvironmental conditions (chemotherapy, radiation, and hypoxia) were examined. We have identified cellular kinetics and genetic variations that could possibly lead to drug resistance in tumors.

Results: DLD-1 subclones were characterized and stable fluorescence-tagged successfully. Generated *in vitro* intratumoral heterogeneity models were monitored time-wise and under the effects of various therapeutics. Results obtained from the experiments performed in order to determine population behaviours of subclones were compared to genomic analyses data performed at Ried Lab in NIH to designate cancer drug resistance mechanisms at molecular level.

Conclusion: One of the major underlying reasons for cancer therapy resistance is intratumoral cellular heterogeneity. It is now known that clones that harbour mutations and/or epigenetic patterns that provide a survival advantage under changing microenvironment conditions are the main culprits of therapy resistance. Therefore it is very important to define the genotype of these clones to overcome the problem of resistance. By means of this study, a big step towards illuminating mechanisms related to cancer drug resistance was taken.

Keywords: Clonal evolution, intratumoral heterogeneity, drug resistance, colorectal cancer, DLD-1



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tümör hücre popülasyonunda izlenen genetik ve fenotipik heterojenite son yılların önemli konularındandır. Hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş tıbbın gelişimiyle, kanser hücrelerinde izlenen genetik heterojenite, özellikle tedaviye direnç ve hastalık nüksü konularında önem kazanmış durumdadır. Tümör hücreleri bulundukları mikroortamlarında kaynak yarışı (glukoz, oksijen, büyüme faktörleri, endokrin/parakrin/otokrin salgılar vs.) içerisinde yer almaktadır. Yaşamsal kaynaklara ulaşım eşit değildir. Örneğin tümör içi bölgeler daha hipoksik/anoksikken; kan damarları yanındaki hücrelerin oksijenlenmesi normal düzeylerde yer almaktadır. Kaynaklara ulaşımın yanı sıra, çevre koşullarındaki değişiklikler de -ki bunların arasında fizyolojik koşullardaki değişiklikler olduğu kadar radyoterapi, kemoterapi gibi tedaviye yönelik uygulamaların yarattığı değişiklikler de bulunmaktadır- tümör hücre popülasyonunu homojen bir şekilde, eşit olarak etkilememektedir. Tüm bu etkenler tümör içi hücre popülasyonunda koşullara uygun şekilde adapte olabilen hücrelerin doğal seçilimi ile sonuçlanmaktadır (1). Sürekli olarak değişen koşullar sonucu monoklonal olarak başlayan tümörler bir süre sonra klonal evrimle popülasyon içerisinde daha saldırgan alt popülasyonların oluşmasına, çoğalmasına ve dolayısıyla da tümör içerisinde heterojeniteye (tümör içerisinde farklı mutasyonlara ve/veya epigenetik değişikliklere uğramış hücre grupları bulunması) yol açar (2). Tümörlerin çok heterojen bir hücre popülasyonu barındırması sonucu çeşitli tedavi yöntemlerine karşı dayanıklı hücre klonları popülasyon içerisinde gelişmektedir. Yapılmış olan çalışmalarda, tümör içi klonal popülasyonların bazı mutasyon ve epigenetik desenleri paylaştığı görülmüştür (3). Farklı kanser türlerinde izlenen bu seçilmiş/ortak genetik değişikliklerin klonal evrim sürecinde korunmuş olması, kanser biyolojisinin anlaşılmasına ışık tutmuştur. Öte yandan ortak olmayan genetik değişikliklerin farklı klonlara nasıl bir avantaj sağladığı ancak son yıllarda sorgulanmaya başlanmıştır. Farklı bireylerin benzer tedavilere farklı yanıtlar vermesinin bir nedeni, izlenen bu tümör içi heterojenitedir. Özellikle uygulanan tedavi yöntemlerinin yarattığı değişik mikroortam koşullarına uyumda avantaj sağlayan mutasyon ve epigenetik desenleri barındıran klonal kanser hücre popülasyonlarının tedaviye dirençten sorumlu olduğu bilinmektedir (4). Bu nedenle, söz konusu altklonların tanımlanması ve bu kanser hücrelerine karşı etkili tedavi yöntemlerini geliştirmesi elzemdir.

Bu tez çalışmasında amacımız, değişen koşullarda ve özellikle tedavi sürecinde tümör içi hücre populasyonlarının davranış şekillerinin ortaya çıkarılması, değişik koşullarda tümör içindeki bazı hücre gruplarına avantaj sağlayan genomik düzeydeki farklılıkların tanımlanması ve tanımlanan farklı genotipleri barındıran hücre populasyonlarının tedavi direnci oluşum sürecine etkisinin araştırılmasıdır. Araştırmanın bağımlı değişkeni tümör alt populasyonlarına ait kinetikler, bağımsız değişkeni ise, başta anöploidi olmak üzere, bu alt populasyonları birbirinden farklı kılan genetik etmenlerdir.

Bu amaçlara yönelik olarak öncelikle tek bir tümörden köken alan ve farklı genetik profillere sahip altklonların, işaretlenerek bir arada üretildiği ve değişik koşullara maruziyet sonrasında bu klonların davranışlarının araştırıldığı tümör heterojenitesinin *in vitro* bir modelinin oluşturulması hedeflenmiştir. Bu modelin oluşturulması için DLD-1 kolorektal kanser hücre hattı kullanılmıştır. Yıllarca pasajlanmış olmaları nedeniyle genellikle homojen ve aynı özelliklere sahip bir hücre populasyonu olarak kabul edilen kanser hücre hatlarının, özellikle son 10 yıldaki araştırmalar sonucu genotip ve fenotip olarak farklı altklonları barındırdıkları ortaya çıkmıştır. Örneğin kanser hücre hatlarından kök hücre belirteçleri kullanarak, kanser kök hücrelerini ayırtmak artık rutin bir uygulamaya dönüşmüştür. Benzer şekilde kanser hücre hatlarında migrasyon ve invazyon deneyleri yapılarak, metastatik potansiyel taşıyan hücreler ayırtılabilmiş ve kalan populasyondan farklı genotip ve ekspresyon düzeyindeki özellikleri tanımlanabilmiştir. Araştırmamızda kullanılmış olan DLD-1 hücre hattından, atasal DLD-1 hücre hattı içerisinde klonal evrimle gelişmiş, farklı anöploidi ve gen düzeyindeki mutasyonlara sahip altklonlar elde edilmiştir. Bu altklonlardan, çalışmamızda kullanılmak üzere 4 farklı altklon (ikisi near-diploid, ikisi near-tetraploid) farklı floresan işaretli plazmidler (mCerulean, mCitrine, tdTomato, mCherry) ile enfekte edilmiştir. Bu şekilde aynı atasal hücre hattından (tümörden) türemiş ancak farklı genotiplere sahip bu 4 altklon, farklı dalga boylarında ışımaya verdiklerinden dolayı konfokal mikroskopisi ve akış sitometrisi yöntemleriyle izlenebilmiştir. Bu dört farklı altklon eşit oranlarda karıştırılarak birlikte üretildiklerinde topluluk içerisindeki oranları, proliferasyon, migrasyon, invazyon hızları, diferansiyasyon düzeyleri ve hücre canlılıkları ayrı ayrı takip edilebilmiştir. Oluşturulan bu *in vitro* heterojenite modeline farklı kemoterapötik ajanlar, radyasyon

ve hipoksik koşullar uygulanarak, aralarındaki kromozomal düzeyde farklılıkları bilinen bu altklonların zaman içerisinde populasyon kinetiğindeki değişiklikler izlenebilmiş, hangi altklonun hangi koşulda avantajlı olduğu saptanabilmiştir. Farklı koşullarda altklonlara yaşamsal ve proliferatif avantaj sağlayan kromozomal anöploidilerin ve genetik mutasyonların ortaya çıkarılmasıyla, klinikte kullanılabilecek prognoz, progresyon ve prekanseröz lezyondan karsinoma geçiş ile ilgili önemli yeni önermeler ileri sürme olanağı olmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

Bulaşıcı olmayan hastalıklar, küresel olarak ölümlerin çoğunluğundan sorumludur ve kanser en başta gelen neden ve içinde bulunduğumuz yüzyılda dünyadaki her ülkede yaşam süresi beklentisini artırmada en büyük bariyerdir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılında yaptığı tahminlere göre kanser, 172 ülkeden 91'inde 70 yaşından gençlerde ilk veya ikinci ölüm nedenidir ve 22 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada gelmektedir (5). Dünya çapında kanser insidansı ve mortalitesi giderek artmaktadır. Bunun nedenleri kompleks olmakla birlikte, popülasyonun yaşlanması ve çoğu sosyoekonomik gelişimle ilişkili olan kanserin temel risk faktörlerinin prevalansı ve dağılımındaki değişimler burada büyük rol oynamaktadır (6,7). Kolorektal kanser verilerine bakılacak olursa, insidans bakımından dünyada üçüncü, mortalite bakımından ise ikinci sırada gelmektedir ve kanser hastası her 10 kişiden 1'i kolorektal kanserden ölmektedir. Erkeklerde ve kadınlarda kanser insidansı açısından ikinci sırada yer alan kolorektal kanserler, mortalite açısından kadınlarda üçüncü sırada yer almaktadır (8,9).

Kanser, hücrelerin anormal şekilde ve kontrolsüz olarak büyüme ve yayılma özelliklerine sahip olduğu sistemik bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin normal hücre proliferasyonunu ve homeostazını sağlayan regülatör devrelerinde defektler bulunmaktadır (10). Belirli mutant genotipler, hücre altklonlarına seçici avantaj sağlamaktadır. Bu mutasyon profillerine sahip hücreler aşırı büyüyerek yerel doku ortamında hakim olur. Çok aşamalı tümör gelişimi, klonal genişlemenin bir uzantısı olarak düşünülebilir. Her bir aşama, kolaylaştırıcı mutant bir genotipin tesadüfen kazanılmasıyla tetiklenir. Tümörigenez için gerekli olan gen mutasyonlarını biriktirme yolunda kanser hücreleri genellikle giderek mutasyon oranlarını artırır (3,11). Bu mutasyona açık durum, genomik idame mekanizmasının bir veya daha fazla bileşeninin bozulması yoluyla mutajenik ajanlara karşı artmış duyarlılık ile sağlanır. Ek olarak, mutasyonların birikimi, normalde genomik bütünlüğü denetleyen ve genetik olarak hasarlı hücreleri senesens ya da apoptoza girmeye zorlayan gözetim sistemlerinin bozulması yoluyla hızlandırılabilir (12–14). Genomun idamesi ve tamirindeki defektler selektif olarak avantajlıdır ve bu nedenle de tümör progresyonu için olmazsa olmazdır. Çünkü bu sayede evrim geçiren premalignant hücreler,

işlerine yarayacak genotipleri biriktirme hızlarını artırmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı genom instabilitesi, kanser özelliklerini kazanmayla nedensel olarak ilişkili olan kolaylaştırıcı bir karakteristiktir (15).

Poliploidi, ökaryotlarda sıklıkla karşılaşılan bir fenomen olmasına rağmen, poliploid hücrelerin biyolojik özellikleri iyi anlaşılmış değildir. Evrim sırasında, poliploidinin türleşmeye katkı sağlayan önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Normalde diploid olan organizmalarda, poliploid ve genellikle bölünmeyen hücreler gelişimde oluşur. Artmakta olan kanıtlar, poliploid hücrelerin çeşitli patolojik durumlar sırasında da meydana geldiğine işaret etmektedir (16,17). Bu hücrelerdeki genetik kararsızlık anöploidiye yol açabilir ve böylece kanser gelişimine katkı sağlayabilir. Kanser hücreleri genellikle bozulmuş ploidiye sahip bir hücre sınıfını temsil etmektedir. Epitelyal tümörlerde genellikle triploide yakın DNA içeriği bulunur ve tetraploide yakın DNA içeriği de görülebilir (18). (Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer | University Library). Bununla beraber kanser hücreleri poliploid olmaktan ziyade anöploiddir. Yani, toplam kromozom sayısındaki değişimlere ilave olarak, amplifikasyonlar, delesyonlar ve resiprokal olmayan translokasyonlar gibi diğer büyük kromozomal düzenlemeleri içerirler (19).

Bazı tümör tiplerinde, geçici bir 4N durumundan anöploidi gelişimi için doğrudan kanıt vardır. Özofagus adenokarsinomunun gelişimine yatkınlığa neden olan olan Barrett's özofagusunda, tetraploid hücreler daha fazla anöploidi gelişiminden önce gelir (20,21). Tetraploid durumu, yüksek frekanstaki kromozomları kaybeden geçici tetraploid hücrelerle tutarlı olarak 1-2 yıl içinde kaybolur (20). Benzer şekilde, servikal, meme ve mesane kanserinin evrimi sırasında, tüm genom duplikasyonu (WGD: Whole Genome Duplication) ve ardından kromozom kayıpları için kanıt vardır (22–25). Tetraploidizasyon ayrıca pankreasın hiperplastik lezyonlarında (26), lokalize prostat kanserinde (27–29) ve bazı kolon adenomalarında meydana gelmektedir (30,31). Toplu olarak, bu gözlemler, tümör oluşumunun erken evrelerinde tetraploidizasyonun nadir bir fenomen olmadığını göstermektedir (32).

Kromozomal anomaliler ve kanser arasındaki bağ ilk olarak Alman botanikçi Theodor Boveri tarafından, yüz yıldan daha eski bir zamanda önerilmiştir (33). O

günden bu yana, biriken kanıtlar sayısal ve yapısal kromozomal anomalileri agresif tümör davranışlarıyla ilişkilendirmiştir. Bu anomalileri mümkün kılan genetik instabilitenin uzun zamandır kanserin temel bir özelliği olduğu varsayılmaktadır. Son çalışmalar, instabilite kazandıran mutasyonel değişikliklerin tümör oluşumu sırasında erken ortaya çıkma önerisini güçlendirmiştir (34). Bunu müteakip genetik dengesizlik, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar üreterek tümör ilerlemesini tetikler. Bu mutant genler kanser hücrelerine seçici bir büyüme avantajı sağlar, böylece bir tümörün klonal büyümesine yol açar.

Bununla birlikte Duesberg, anöploidinin, gen mutasyonundan bağımsız olarak, kanser hücrelerindeki genetik kararsızlık ve bunun sonucundaki karyotipik ve fenotipik heterojeniteyi açıklamakta yeterli olduğu sonucuna varmıştır (35). Kromozomların simetrik ayrımı, tam olarak mitoz genlerinin iki kopyasına dayandığından, mitoz genlerini taşıyan kromozomları içeren anöploidi, karyotipi destabilize edecektir. Duesberg'e göre, genetik kararsızlık derecesi, anöploidi derecesi ile orantılı olmalıdır. Böylece, klonal yayılımda olan yüksek anöploid kanser hücrelerinin belirli bir karyotipini sürdürmek imkansızla yakın derecede zor olacaktır.

Her durumda kanserler, ya sekans seviyesinde (MIN) ya da kromozomal seviyede (CIN) instabilite geliştirir, ancak genellikle her iki seviyede birden geliştirmez. Bu görüşe göre, anöploid karyotip, altta yatan bir kromozomal instabilitenin tezahürüdür. Bu dengesizliklerin nadiren tümörlerde bir arada bulunduğu tespit edildiğinden, bir instabilite formunun tümör oluşumunu tetiklemek için yeterli olduğu görülmektedir (36). Kromozomal instabilite (CIN), kanserin en temel özelliklerinden biridir ve kötü prognoz, metastaz ve terapötik dirençle ilişkilidir. CIN mitoz sırasında kromozom ayrılmasındaki hatalardan kaynaklanır ve hem yapısal, hem de sayısal kromozom anomalilerine yol açar. Bu çok yönlü etkiler, CIN'yi, immün düzenleme ve kaçış yolunda, tümör evriminin ana etmeni ve tümör ile mikroçevresi arasındaki etkileşimin genomik kaynağı olarak öne çıkarır.

Bu aşamada CIN ve anöploidinin arasındaki fark belirgin bir şekilde açıklanmalıdır. Anöploidi anormal (non-öploid) kromozom sayısına işaret ederken, CIN birbirini izleyen hücre bölünmeleri sırasında devam eden kromozom ayrılma hatalarını kastetmektedir (37). Bu ikisi insan kanserlerinde çoğunlukla aynı anda

meydana gelir. Yüksek düzeyde kromozom kopya sayısı anomalilerine sahip tümörler aynı zamanda devamlı bir kromozom ayrılmasına dair kanıtlar sergiler (38). Bununla birlikte, bazı hematolojik malignansilerde gözlemlendiği gibi, CIN varlığında stabil anöploidiler de var olabilir (39).

İnsan tümörlerinin %60 ila %80'inde CIN'yi düşündüren kromozomal anomaliler olduğu tahmin edilmektedir (40,41). CIN, tümör evresi ile pozitif korelasyon gösterir ve gerek relaps olan, gerekse metastatik tümör örneklerinde yüksek düzeydedir (42–44). Ayrıca, tüm genomun duplikasyonundan kaynaklanan karmaşık anöploidiler ve poliploid durum; metastatik, tedaviye dirençli ve üçlü negatif meme kanseri, pankreatik ve hepatobiliyer kanserler, akciğer kanseri, anaplastik tiroid kanseri, kastrasyona dirençli prostat kanseri, zayıf diferansiye sarkomalar, seröz histolojileri olan jinekolojik tümörler, glioblastoma, özofagogastrik kanserler ve mikrosatellit stabil kolorektal kanserler gibi düşük genel sağkalıma sahip tümör tiplerinin özellikleridir (41,45,46). CIN prevalansı, deregülasyonunun mitotik kromozom segregasyonunu etkilediği belirtilen kanserle ilişkili çok sayıda yolağı işaret eder (47).

Onkogenik sinyalizasyon, pre-mitotik replikasyon stresi ve sentrozom replikasyonu, kardeş kromatid kohezyonu, iğ iplikleri düzenlenmesi kontrol noktası sinyalizasyonu veya kromozomlara mikrotübüllerin tutunmalarındaki bozuklukların hepsinin CIN'yi indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, ilk tedavide veya metastatik durumda kullanılan büyük bir anti-neoplastik terapi grubu, anafaz sırasında kromozom segregasyonunun doğruluğunu bozabilir (48,49). Kanserdeki diğer yaygın kromozom kopya sayısı değişiklik kaynakları arasında homolog rekombinasyon kusurları ve kırılma-füzyon-köprü döngüsüne yol açan telomer disfonksiyonu bulunur (50,51). Kanserde CIN'yi indükleyen kusurların önemli bir kısmı mitotik bir fenotipte toplanır, bu şekilde anafaz geçiren hücreler iğ iplikleri orta bölgesinde “lagging” (geciken/uzayan) kromozomlar sergiler (52). Bu kromozomlara geciken kromozomlar denir ve bunlar kinetokorlardaki mikrotübüllere hatalı bağlanmalarının sonucudur. Mitoz sırasında kromozom yanlış ayrılmasının diğer belirtileri arasında kromatin köprüleri, ultra ince DNA köprüleri ve iğ mikrotübüllerine doğrudan bağlantı kuramayan asentrik fragmanlar bulunur.

Kromozomal instabilitenin nedenleri konusunda bir teori, kanserde CIN'nin, büyümeyi kontrol eden onkogenlerde ve RAS ve TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerde önceki mutasyonların neden olduğu malign dönüşüm sürecinin doğal bir yan etkisi olduğunu öne sürmektedir. Bu teori, RAS veya MYC onkogenlerinin hücrelere sokulmasının genomik aberasyonlarda bir artışa neden olabileceğine dair kanıtlarla desteklenmektedir (53,54). Benzer şekilde, tümör baskılayıcı gen TP53'teki değişiklikler genetik dengesizliği şiddetlendirebilir (55). Karyotipik olarak stabil MIN tümörlerinin varlığı, CIN gelişiminde bu genlerin nedensel bir rolü olduğu iddiasına karşıdır. Bu tümörler, CIN tümörleri ile aynı onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara sahiptir ve benzer aşamaya özgü büyüme ve ilerleme özelliklerine sahiptir - ancak anöploid değildir.

Bir başka teori, anöploidinin genetik değişiklikler ile belirlenmediğini, bunun yerine hücrelerde anormal bir kromozom bileşeni olduğunda ortaya çıkan değiştirilmiş hücresel mimariden kaynaklandığını varsaymaktadır (56). Bu senaryoda, normal bir hücrenin tesadüfen anormal bölünmesi, komşularına kıyasla seçici bir büyüme avantajına sahip, karyotipik olarak anormal bir yavru hücrenin ortaya çıkmasına yol açar. Bu hücredeki anormal sayıda kromozom, segregasyon mekanizmasını destabilize eder, kromozom yanlış ayrışmasını ve daha yüksek düzeyde bir anöploidiyi otokatalize eder (35).

Bu hipotezlere bir alternatif, mikrosatellit instabilitesinden alınan derslerden çıkarılmaktadır. Belki de anöploid tümörler, MIN tümörleri ile aynı şekilde ortaya çıkmaktadır: kromozomal instabiliteye (mikrosatellit instabilitesi yerine) neden olan, bir kromozom stabilite geninde ("mismatch" onarım geni yerine) gerçekleşen erken mutasyonel bir olaya maruz kalmışlardır. Bu olayları aydınlatabilmek amacıyla, geçmiş yıllarda CIN genlerindeki mutasyonlar belirlenmeye başlanmıştır (57) ve anöploidinin moleküler mekanizmalarındaki rollerini kanıtlamak için hâlâ deneylere ihtiyaç vardır.

Çoğu kolorektal kanser, adenoma-karsinoma sekansı olarak tanımlanan bir süreçle, adenomlardan köken alır (58). Diğer kanserler gibi, KRK'nin başlaması ve ilerlemesi, anahtar düzenleyici genlerin ve genetik instabilitenin işlevindeki değişikliklerin birikimi ile ilişkilidir. Kolon kanseri gelişimi genellikle büyük DNA

segmentlerinin amplifikasyonlarına ve silinmelerine yol açan kromozomal instabilite (CIN) içerir. (59). KRK vakalarının yaklaşık %13'ünde uyumsuzluk onarım eksikliği (mismatch repair deficiency) mikrosatellit instabilitesine yol açar (MIN) (60). KRK tümörlerinin yaklaşık %40'ı, CpG Adaları Metilatör Fenotipi (CIMP) olarak adlandırılan bir fenomen olan epigenetik değişiklikler, özellikle DNA metilasyonu ile karakterizedir (61,62). KRK'lerin geri kalan %47'sinde kromozomal instabilite, büyük kromozom segmentlerinin kazanımlarına ve kayıplarına yol açar (37). CIN kategorisi, anöploid veya poliploid karyotipleri olan kanserleri ve çoklu kromozomal kol kazanımları/delesyonları veya çoklu translokasyonları olan kanserleri içerir. CIN, spesifik mutasyonların ve/veya genlerin susturulmasından kaynaklanır ve sentromer veya sentrozom, mikrotübül disfonksiyonu, telomer erozyonu, kromozom kırılması ve hücre döngüsü kontrol noktalarının başarısızlığı gibi yapısal kusurlardan kaynaklanabilir (63). Yüksek dereceli adenomlardan invazif karsinomlara ilerleme sırasında tekrarlayan kromozomal kazanç ve kayıpların elde edilmesi KRK tümörlerinde görülmektedir (64). KRK progresyonu sırasında en erken edinilmiş genetik anomalilerden biri, bazı kolon adenomlarında da görülen kromozom 7 amplifikasyonudur (65). Daha sonraki aşamalarda, 8q, 20q (66), 7, 13 (67,68) kazançları ve 8p, 17p, 18q (67,69), 15q ve 20q (70) kayıpları gibi diğer spesifik kromozomal aberasyonlar yaygınlaşır.

CIN'in insan kanserinde yaygınlığına rağmen, tümör evrimindeki rolü karmaşık ve paradoksal görünmektedir (71). Bir yandan, CIN ve kompleks anöploidiler, hem tümör kaynaklı hücre hatlarında hem de klinik tedavide taksol gibi antineoplastik ajanlara karşı dirençle ilişkilidir (72–74). Metastatik lezyonlar ve dolaşımdaki tümör hücreleri, CIN ve artan kromozom kopya sayısı heterojenitesi için kanıt sergiler (42,75–77). Primer tümörlerde kromozom yanlış ayrılmasının varlığı, meme, akciğer ve diffüz B hücreli lenfoma (DLBCL) kanserlerinde uzak yayılma, relaps ve onkogen bağımsızlığının daha yüksek olma olasılığı ile ilişkilidir (42,72,78). Tersine, aşırı CIN seviyeleri over, rektal ve meme kanserlerinde cisplatin ve 5-Fluorourasil (5-FU) gibi sitotoksik terapilere duyarlılığı artırmıştır (74,79–81). Tüm kromozomun yanlış ayrılmasının indüklenmesi, nakledilen insan glioblastoma tümörlerini radyasyon tedavisine duyarlı hale getirmiştir (82). Bu görünüşte paradoksal ilişki, CIN tarafından sadece kanser hücrelerinde değil, aynı zamanda tümör mikroçevresinde de ortaya

Çıkarılan fenotiplerin karmaşıklığından kaynaklanmaktadır. CIN, tümörün adaptasyonunu artıran ve immün kaçış, ilaç direnci ve metastazı kolaylaştıran doğal seleksiyon için bir substrat görevi gören kromozom kopya sayısı heterojenitesini meydana getirir (83–89).

Kanser hücrelerinin klonal evrimi, tümör hücre populasyonunda izlenen genetik ve fenotipik heterojenite önemle üzerinde durulan araştırma alanlarıdır (1,2,90). Hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş tıbbın gelişimiyle kanser hücrelerinde izlenen genetik heterojenite, özellikle tedaviye direnç ve hastalık nüksü konularında önem kazanmış durumdadır. Tümör mikroçevresinin etkisiyle gelişen doğal seçilim sonucu, farklı anöploidilere sahip intratümöral klonlar gelişmektedir (3,4).

Tümörler, tek bir progenitör hücrede tek bir gende gelişen mutasyonların sonucunda başlar. Bu hücrenin yavrularında takip eden mutasyonlar ve klonal genişleme dalgaları, kansere özgü büyüme avantajına sahip yavru hücrelerin oluşumuna yol açar. Klonal seçilim bu süreci yönlendirir (2). Bu çok aşamalı progresyonun mutasyonal hedefleri, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler - mutasyona uğrayan ve daha sonra doğrudan hücre büyümesi veya hücre ölümü oranını etkileyen genlerdir (91). Tümör sadece bir tümör içindeki tüm hücrelerin aynı kök hücre öncülünden türemiş olması anlamında klonaldır. Genetik instabilite, tümörün kendisini değişim altındaki bir populasyon haline getirir - her biri seçici baskılar karşısında değişiklikler geçirme potansiyeline sahip, devasa bir birlikte var olan altklonlar koleksiyonu (92).

Bu seçici baskılar nelerdir? Anoksi, malnütrisyon, dalgalanan hormonal etkiler ve bağışıklık sisteminin çok sayıda kolu tarafından potansiyel saldırı dönemlerine maruz kalan tümörlerde oldukça anormal mikroçevreler vardır. Bir mutator fenotipi için daha verimli bir üreme alanı düşünmek zordur. Gerçekten de, tümörlerde hem anöploidi hem de karyotipik heterojenliğin yaygınlığı, kanserlerin ilk benign aşamaların ötesine ilerlemesi için genomik instabiliteye neden olan erken bir mutasyonal olayın gerekli olabileceği fikri ile uyumludur.

Çoğu neoplazmın tek bir hücreden köken aldığı ve tümör progresyonunun, daha agresif alt türlerin ardışık seçimine izin veren orijinal klon içinde kazanılmış genetik

çeşitlilikten kaynaklandığı öne sürülmüştür. Tümör hücre popülasyonları, olasılıkla neoplazm içinde spesifik gen lokuslarının aktivasyonuna, bir karsinogenin süregelen varlığına ya da tümör içindeki besinsel eksiklere bağlı olarak normal hücrelerden genetik olarak daha kararsızdır. En kolaylıkla sitogenetik olarak tanınan kazanılmış genetik kararsızlık ve buna bağlı seçim süreci, karyotipik ve biyolojik olarak yüksek ölçüde bireyselleşmiş insan malignitelerine yol açmaktadır. Dolayısıyla, her bir hastanın kanseri, spesifik bireysel tedavi gerektirebilir ve bu tedavi bile tedaviye dirençli bir varyant alt türün belirmesiyle sonuç vermeyebilir. Genellikle klinik kanserlerde görülen son evreye ulaşmadan önce, tümörler içindeki evrimsel süreci anlamaya ve kontrol etmeye yönelik daha çok araştırma yapılmalıdır (2).

CIN'in, gen dozaj seviyesinde heterojeniteye neden olarak tedavi direncini kolaylaştırdığı uzun zamandır düşünülmektedir. Bununla birlikte, genomik kaos ile heterojenitenin kazanılması arasındaki dengeyi korumak için, kanser hücreleri, canlılıklarını en üst düzeyde tutan sınırlı bir aralıkta kromozom yanlış ayrışma oranlarını kısıtlamalıdır (85,93). Bu düşünce, kısmen, CIN'i destekleyen terapilerin anti-neoplastik etkilerinin temelini oluşturmaktadır. Örneğin, taksol, PARP inhibitörleri ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi yaygın olarak kullanılan antikanser ajanlar, kromozom ayrışma hatalarının en güçlü indükleyicileri arasındadır (49,82).

İlaç direnci kemoterapinin başarısında önemli bir engeldir ve inhibe edilen ilaç taşınması, hedefin değiştirilmesi, metabolik değişiklikler gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanır (94). Kemoterapiye direnç, anti-kanser ilaç tedavisinin etkinliğini sınırlar. Tümörler kendiliğinden ilaca dirençli olabilir veya tedavi sırasında kemoterapiye direnç geliştirebilir. Kazanılmış direnç önde gelen bir sorundur, çünkü tümörler sadece başlangıçta onları tedavi etmek için kullanılan ilaçlara değil, aynı zamanda farklı etki mekanizmalarına sahip ilaçlara karşı da çapraz dirençli hâle gelebilir. Kemoterapiye direncin, metastatik kanserli hastaların% 90'ından fazlasında tedavi başarısızlığına neden olduğuna inanılmaktadır ve dirençli mikrometastatik tümör hücrelerinin, adjuvan terapide kemoterapinin etkinliğini azaltabileceği düşünülmektedir. Açıkça görülmektedir ki, eğer ilaç direncinin üstesinden gelinebilirse, sağkalım üzerindeki etkisi oldukça önemli olacaktır. Longley, Johnston ve Meyerhardt, gelecekte sitotoksik ilaçlara tümör ve hasta cevabını tahmin etme ve

bu cevabı hedefli tedavilerle modüle edebilme gücünün, her bir hasta için en iyi kombine tedavinin seçilmesine izin vereceğini öngörmüşlerdir (95,96).

Kolorektal kanser en yaygın üçüncü viseral malignitedir ve terapi direnci nedeniyle kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen sebeplerden birisi olmaya devam etmektedir (97). KRK çalışmaları, tümör heterojenitesinin tüm tümörlerde mevcut olduğunu gösteren erken bir gözleme öncelik etmiştir. Heterojenite, tümör genomik instabilitesi ve mikro-çevresel faktörlerin arasındaki etkileşimin bir sonucu olan çeşitli fenotipik özellikler ile tanımlanır (98). Bu modele göre, kanser hücreleri, sürekli değişim içinde olan bir hücre popülasyonu oluşturacak birçok mutasyonun sonucunu temsil eder. Bu hücreler heterojenite, spesifik koşullar altında farklı klonların sağkalımını ve büyümesini sağlar ve böylece tümör relapsına, metastaza ya da radyo-kemoterapi direncine sebep olur (99).

Kanserlerde mutasyon prevalansı yüksek olan genlerin hücreler adezyon, motilite, sinyal iletimi, transkripsiyonel regülasyon, transport, hücreler metabolizma, invazyon gibi önemli yolları etkilediğini biliyoruz (100–104). Kanser hücrelerine ait genomların moleküler ve genetik analizindeki ilerlemeler, fonksiyon değiştirici mutasyonların ve tümör progresyonu sırasında devam eden genomik instabilitenin en ikna edici şekilde gösterimini sağlamıştır. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi (CGH), hücre genomundaki tüm genlerin kopya sayısındaki kazanım ve kayıpları gösterir. Birçok tümörde CGH tarafından ortaya çıkarılan yaygın genomik aberasyonlar, genom bütünlüğünün kontrolündeki kaybın kanıtını sunmaktadır. Genomda belirli bölgelerde spesifik aberasyonların tekrarı (amplifikasyon ve delesyonlar), bu bölgelerin, değişimi neoplastik progresyonu destekleyecek genleri içerdiğine işaret etmektedir (105). Bu nedenle, tekrarlayan genetik değişimler tümör patogeneğinde nedensel rol oynayan özel mutasyonları gösterebilir.

Epitel kaynaklı solid tümörlerde somatik olarak edinilen kopya sayısı değişimleri bütün kromozomları, kromozom kollarını ya da fokal amplifikasyonları ve delesyonları kapsamaktadır (106–108). Tüm kol ya da tüm kromozomdaki kazanım ve kayıpların dağılımı belirli tümörler çok patognomoniktir. Ayırıcı tanıda dahi kullanılabilir. Öte yandan fokal amplifikasyon ve delesyonlarda durum bu kadar net değildir (108). Örneğin sporadik kolorektal karsinomalar (KRK) sıklıkla 7, 8q, 13 ve 20. kromozom

ve kromozom kollarında kopya sayısı artışları gösterirken, kayıplar 8p, 17p ve 18q kromozom kollarında izlenmektedir (64,67). Öte yandan servikal karsinomların neredeyse tümü 3. kromozom uzun kolunda fazladan kopyalar taşırlar; oysa bu kromozom kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaz(109). Hematolojik kanserlerde özellikle bir translokasyon tarafından tetiklenen tümörigenez paradigması yaygın kabul görmektedir. Örneğin, kronik miyeloid lösemi (KML) etiyopatogenezinin temelinde, Philadelphia kromozomu olarak adlandırılan derive 22. kromozoma yol açan t(9;22) translokasyonu bulunmaktadır. Bu translokasyon KML için tanı koydurucudur. Solid tümörlerin ise bu şekilde spesifik kromozomal anomaliler ile ilişkilendirilmesi daha nadirdir. Örneğin yukarıda da bahsedilen servikal karsinomlarda, kromozom 3q'daki kazanımlar en az KML'deki Philadelphia kromozomu kadar patognomiktir ama bu sitogenetik aberasyonun tümörigenezdeki rolü daha az belirgindir. Kolorektum ve servikte tümörigenez sürecinde artan hücresel displazi aşamalarının sırasının incelenmesiyle, invazif hastalığa geçişten önce dokuya özel kopya sayısı değişikliklerinin gerçekleştiği daha önce gösterilmiştir (64,106,109,110). Premalign lezyonların klonal genişlemesi sırasında tespit edilebilen genetik anormallikler genellikle kromozomal dengesizlikler olmaktadır. Bu dokuya özel kromozomal anomaliler yerel ve uzak metastazlarda (111,112) ve aynı zamanda primer tümörlerden elde edilen hücre hatlarında da korunmaktadır (113,114). Solid tümörlerde izlenen kromozomal dengesizlik, sentrozom amplifikasyonu, kromozomların hatalı ayrılması ve altklonlarda farklı anöploidlerin gelişimine rağmen, serviks kanserindeki 3q kazanımı gibi kanser tipine özel anomalilerin korunması, tümöre özgü süregelen seçici bir baskıya işaret etmektedir. Kromozomal anöploidiler kromozom genelinde genlerin ekspresyon seviyelerini etkilerler ve bu nedenle kanser hücrelerinin transkriptomunda büyük düzeyde değişimine neden olurlar (115). Hem fare hem insan kanser hücrelerinde, hem de mikrohücre aracılı kromozom transferi (MMCT) ile deneysel olarak yapay bir trizominin meydana getirildiği hücrelerde bu ekspresyon değişimi gösterilmiştir (116). Ayrıca birçok çalışma da, düşük seviyede kopya sayısı artışları ile regülasyonu bozulan genlerin büyük çoğunluğunun RNA ve hücresel metabolizma ile ilişkili olduğunu göstermiştir (117,118). Bu nedenle bu genlerin artmış ekspresyonu hücrelere erken bir proliferatif avantaj sağlayabilir. Anöploidinin sağlayacağı bu

avantaj, düşük seviyede kopya sayısı artışlarının tümörigenezin erken aşamalarında gerçekleşmesi gözlemleriyle uyumludur (106,119).

Tümör hücrelerinde izlenen bu kromozomal kararsızlık, tümör içinde farklı genotiplere sahip klonların gelişimine yol açar. Solid tümörlerde izlenen kromozomal kararsızlığa ve ileri derecedeki intratümör heterojeniteye rağmen tümör kitlesi analiz edildiğinde, bazı kromozomal kayıp ve kazançların dağılımının korunmuş olduğu bilinmektedir (120). Bu tür korunmuş kromozomal anomalileri, tümör oluşumunun kaynağı olarak değerlendirme eğilimi bulunmaktadır. Son on yılda değişik tümörlerin CGH ile profilendirilmesiyle bu görüş oldukça destek bulmuştur (108). Buna ek olarak stres altındaki dokuların genomlarını tetraploid, oktaploid vb. olacak şekilde - kromozomal kopya sayısının göreceli dengesini bozmadan- çoğaltarak tepki verdiklerini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (32,121). Her ne kadar kanser hücrelerinde sıklıkla bulunan Philadelphia kromozomu ya da KRAS ve TP53 mutasyonları gibi gen seviyesindeki değişikliklerin kanser oluşumunu başlattığı genel olarak kabul görse de; epiteliyel tümörigenezin erken aşamalarında izlenen tekrarlayıcı ve spesifik kromozomal dengesizliklerin tümör gelişimi için gerekli iç koşulları sağlayabileceği göz önünde tutulmalıdır.

Bu görüş bir araba benzetmesiyle açıklanabilir: eğer amaç bir otomobilin daha hızlı gitmesini sağlamaksa, bu motorun boyutu artırılarak yapılabilir (tetraploidizasyon). Ancak bazen beygir gücünü arttırmak için motorun tüm parçaları gerekmebilir, sadece silindir sayısı (serviks kanserinde kromozom 3) ya da yakıt enjeksiyon pompası (kolon kanserinde kromozom 7) yeterli olabilir. Bu tür durumlarda başka parçaların değişimi (ilgili dokuya avantaj sağlamayan bir kromozom) anlamsız olur. Bu görüş kromozomal dengesizliklerin dokuya özel olarak korunumunu açıklamaktadır (107,108). Hastalık ilerledikçe ve tümör büyüdükçe popülasyondaki heterojenite artmakta; oluşan her bir altklonda atasal klonda bulunan spesifik anomalinin yanı sıra ek anomaliler ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan yeni anomaliler yine o klonun ortama uyum sağlamada atasal klondan farklılıklarını belirlemektedir. Uzun yıllardır ana etiyopatogeneizde yer alan anomalilerin çalışılmasıyla, farklı kanser türlerinin biyolojileri aydınlatılabilmiş ve altında yatan biyolojiye özgü tedavi stratejileri geliştirilebilmiştir. Ancak bireylere özgü farklılıklar ve tedavilere direnç

gelişimi, sonradan eklenen anomalilerin ve tümör içi hücrel heterojenitenin önemini ortaya koymaktadır (120).

Klonal evrim ve tümör heterojenitesi ile ilgili 1970'li yıllardan itibaren pek çok yayın ve çalışma bulunsa da bunların neredeyse hepsi bu olguların varlığının saptanmasına yöneliktir. Klonal evrimde izlenen spesifik genetik değişikliklerin tanımlandığı ve bunların klinik korelasyonlarının en başarılı şekilde kurulabildiği hastalık grubu lösemilerdir; ve lösemiler içerisinde bugün dahi geçerliliğini koruyan ve tedaviyi yönlendirme, evrelendirme ve prognostik değeri olan en başarılı tanımlamalar kronik miyeloid lösemide (KML – majör sitogenetik evrim ve minör sitogenetik evrim) yapılmıştır. Kolon kanseri başta olmak üzere kimi solid tümörler için de multistep karsinogenez basamakları tanımlanmış, klonal evrimin nasıl gelişebildiği belirlenmiştir. Ancak solid tümörlerde tanımlanan klonal evrimin klinik korelasyonları ve tedavi sürecinde (ilaç/yaklaşım seçimi, evrelendirme, prognostik değer vs.) kullanımı lösemiler kadar başarılı olmamıştır. İki hastalık grubunda yapılmış olan klonal evrim araştırmaları arasındaki temel fark, lösemilerde anöploidik değişiklikler ve kromozom düzeyindeki anomalilere yoğunlaşılırken, solid tümörlerde gen düzeyindeki mutasyonlara ağırlık verilmesidir.

Kolon kanserinde de intratümör genetik heterojenite tedaviye direnç gelişimine önemli oranda katkı sağlamaktadır. Kolorektal kanserlerde tedaviye cevabın tahmini için günümüze dek pek çok çalışma yapılmıştır. Yeni biyobelirteçler tanımlayabilmek amacıyla gen ekspresyon profili, miRNA profili, RAS mutasyon analizi, tedavi öncesi aCGH biyopsisi ve germ hattı SNP analizleri gerçekleştirilmiştir. Ancak bu platformlar rutin klinik kullanım için hem çok maliyetlidir, hem de güvenilir yanıt sınıflandırmasını sağlayamamıştır. Ayrıca bahsedilen tüm bu yöntemler tedavi öncesi biyopsiler ve/veya cerrahi rezeksiyon örneklerinde yapılan analizlere dayanır. Bu nedenle intratümör heterojenitesini ve bu alt populasyonların tedavi sürecindeki kinetiğini hesaba katmaz. Tedavi süreci, farklı klonların tümör populasyonu içerisindeki dinamik dağılımını değiştirmektedir. İzlenen genomik heterojenite spesifik kopya sayısı ve spesifik mutasyon spektrumu veya her ikisinin de sebebiyle olabilir (120,122).

Tüm bu modellemeler kanserde izlenen çok heterojen ve genetik imzası farklı kanser hücre klonların varlığını ihmal etmektedir. Bu altklonların, değişen koşullarda

(özellikle tedavi sürecinde) tümör içi davranış şekillerinin ortaya çıkarılması tedavi direnci oluşum sürecinin anlaşılmasına ve spesifik moleküler hedefler belirlenmesine büyük katkı sağlayacaktır. Klonal evrim sürecinde bu farklı altklonların tümör içi kinetiğini inceleyen araştırma sayısı yok denecek kadar azdır. Çalışmamızda tek bir tümörden türemiş, farklı genetik profillere sahip altklonların işaretlenerek bir arada üretildiği ve değişik koşullara maruziyet sonrasında bu klonların davranışlarının araştırıldığı tümör heterojenitesinin *in vitro* bir modelinin oluşturulması hedeflenmiştir.

Bu amaçla DLD-1 insan hücre hattına ait altklonlar kullanılmıştır. DLD-1 hücre hattı, kompleks olmayan anöploidiye sahip, erişkin erkek hastadan izole edilmiş, epitelyal kökenli bir "Dukes' type C" kolorektal adenokarsinomadır. D.L. Dexter ve çalışma arkadaşları tarafından 1977-1979 yılları arasında izole edilmiştir (123). Psödodiploid olan bu hattın modal kromozom sayısı, hücrelerinin %86'sında görülen 46 kromozomdur. Yüksek bir poliploidi oranına sahiptir (%17,1). Karyotipi: 46,XY,-2,+dir dup(2)(p13-p23) şeklindedir. Y kromozomu N22'den biraz daha uzundur ve büyük bir heterokromatik distal q koluna sahiptir (124).

DLD-1 hücrelerinde yüksek genomik instabilite olduğu bilinmektedir. Bunun nedenlerinden biri, bu hücrelerde MSH6 geninde bozukluk olmasıdır. Ek olarak, KRAS (G13D mutasyonu), TP53 (S241F mutasyonu), PIK3CA (E545K ve D549N mutasyonu) gibi kritik kanser genlerinden bazılarında mutasyonlar belirlenmiştir. Ayrıca, CIMP (CpG island methylator phenotype: CpG adası metile edici fenotip) ve mikrosatellit instabilitesine sahiptir (MIN). Tüm bunlar DLD-1 hücrelerinde daha yüksek genetik instabilitiye ve dolayısıyla anöploidi olasılığına yol açmaktadır (125) ve çalışmamızda tercih edilme nedenlerindendir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma, DLD-1 kolorektal adenokarsinoma hücre hattında, intratümöral heterojeniteye bağlı olarak gelişen ait altklonlarda anöploidiyle ilişkili populasyon kinetiklerinin incelendiği, *in vitro* deneysel bir çalışmadır..

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD'de, 2013 Ekim ile 2020 Şubat arasında gerçekleştirilmiştir. 2018 Şubat-2019 Şubat arasında yapılan çalışmalar, ABD NIH (National Institutes of Health, Ulusal Sağlık Enstitüleri) NCI (National Cancer Institute, Ulusal Kanser Enstitüsü)'de, doktora tezi ikinci danışmanı Dr.Thomas Ried'in laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Çalışmalar *in vitro* olarak, insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı DLD-1 (ATCC® CCL-221™)'e ait "near-diploid"(diploid kromozom setine yakın sayıda kromozoma sahip) ve "near-tetraploid"(tetraploid kromozom setine yakın sayıda kromozoma sahip) altklonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışma materyali olarak DLD-1 kolon kanseri hücre hattı ve altklonları kullanılmıştır. Hücreler doktora tez danışmanı Doç.Dr.Zeynep Yüce tarafından TÜBİTAK-2219 programı kapsamında, ABD Ulusal Kanser Enstitüsü Genetik Bölümü'nden doktora tez ikinci danışmanı olan Dr. Thomas Ried'in laboratuvarında izole edilmiş ve Dr.Ried tarafından Türkiye Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD laboratuvarına gönderimi sağlanmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın bağımlı değişkeni tümör alt populasyonlarına ait kinetikler, bağımsız değişkeni ise, başta anöploidi olmak üzere, bu alt populasyonları birbirinden farklı kılan genetik etmenlerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

Araştırmada seçilen 4 farklı altklon (ikisi 2N, ikisi 4N) farklı floresan renklerde stabil olarak işaretlenmiştir. Bu şekilde altklonlar karıştırılarak birlikte üretilmeleri hâlinde topluluk içerisindeki oranları, proliferasyon, migrasyon, invazyon hızları, diferansiyasyon düzeyleri ve hücre canlılıkları ayrı ayrı takip edilebilmiştir. Oluşturulan bu *in vitro* intratümöral heterojenite modeline farklı kemoterapötik ajanlar, radyasyon ve hipoksik koşullar uygulanarak, izogenik olan ancak aralarında genetik düzeyde farklılıkları ortaya koyulan bu altklonların zaman içerisinde popülasyon kinetiğindeki değişimler izlenmiştir.

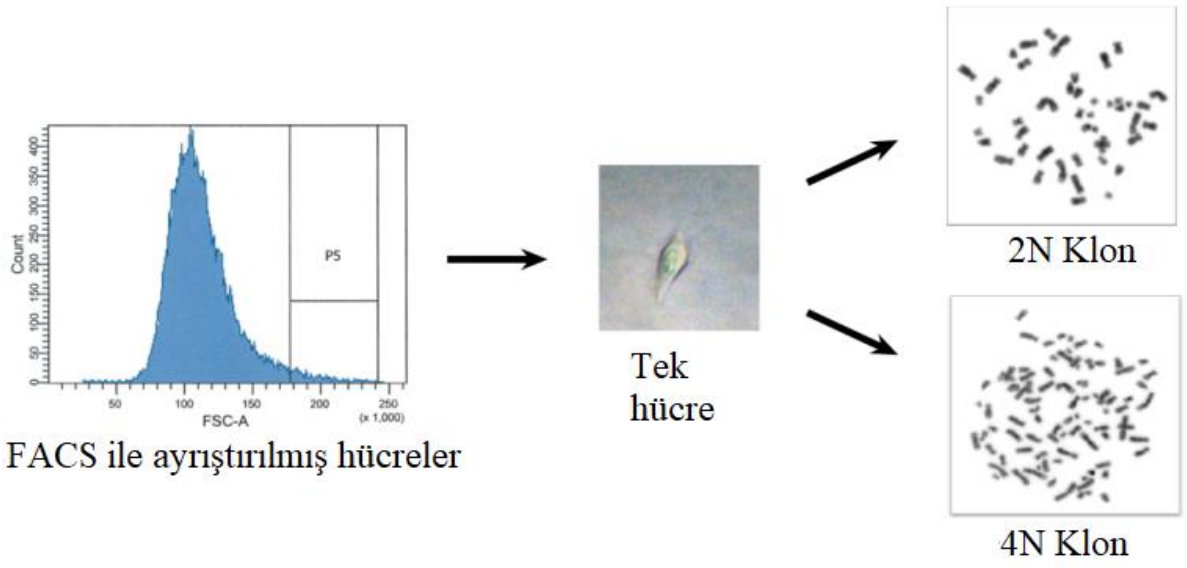
Çalışma genel olarak 5 aşamadan oluşmaktadır:

- 1) DLD-1 altklonlarının idamesi, karakterizasyonu ve uygun altklonların seçilmesi
- 2) Altklonların stabil floresan işaretlemelerinin gerçekleştirilmesi ve kökültür modelinin oluşturulması
- 3) Altklonlarda, normal durumda ve farklı terapötiklerin etkisi altında canlılık, proliferasyon, migrasyon, invazyon ve diferansiyasyon karakteristiklerinin değerlendirilmesi
- 4) Kökültürlerde normal durumda ve farklı terapötiklerin etkisi altında, floresan sinyallerin takibi yoluyla popülasyonların izleminin gerçekleştirilmesi
- 5) Bulguların, Ried laboratuvarında gerçekleştirilen, altklonların genomik bulgularıyla karşılaştırılması

Araştırmada kullanılan yöntemler aşağıda belirtilmiştir:

3.6.1. Ön Çalışmalar

Araştırmamızın ön çalışmalarında DLD-1 kolon kanseri hücre hattından izogenik near-diploid ve near-tetraploid altklonlar, ABD Ulusal Kanser Enstitüsü Genetik Bölümünden Dr. Thomas RIED'in laboratuvarında, akım sitometrisi yöntemiyle ayrıştırılmıştır (Şekil1).



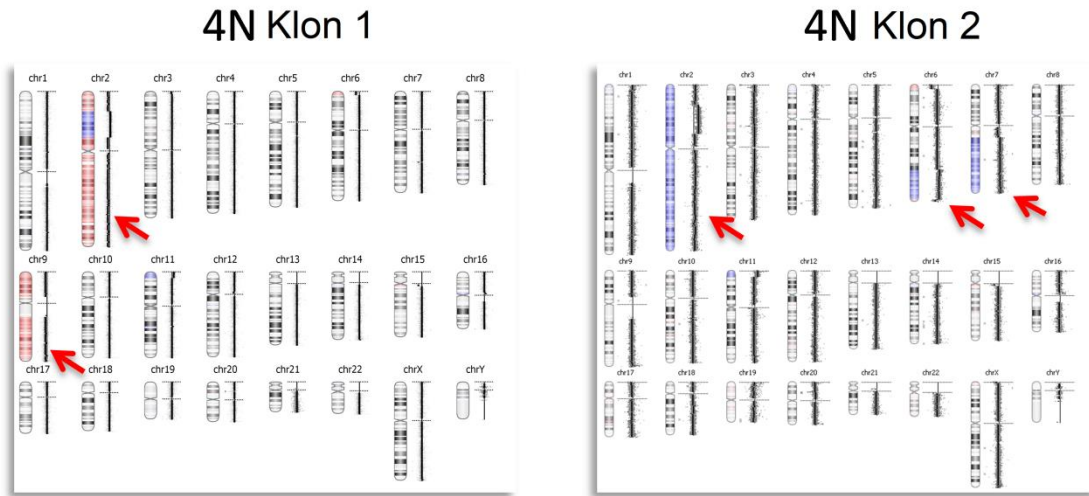
Şekil 1. Atasal DLD1 hücre hattından akım sitometrisiyle ayrıştırılan klonlar

Bu şekilde Bu şekilde yarısı near-diploid yarısı near- tetraploid yaklaşık 20 farklı klon elde edilmiştir. Klonlar arasında çeşitli kromozomal kazanımlar, kayıplar, translokasyonların izlenmesi gerçekten de bir kanser hücre hattında dahi çok heterojen bir hücre popülasyonunun varlığını göstermiştir (Şekil 2 ve 3).

	2N			4N											
Klon	1	2	3	B3	B4	B6	B7	B8	B9	B11	B12	B16	B19	B21	28
CNA	Erken pasaj														
	-Y	-Y	-Y	None	-2	-21	None	-6q	+20	-3qter	-12	None	+2	-5	+6
					-9			+8		+5p	-15		+6q		-7p
								-9pter-q21		-5q			+7q		-17
								-17							-Y
CNA	Geç pasaj														
	N.D.	-Y	-Y	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-6q	+20	N.D.	-15	N.D.	N.D.	N.D.	+6
								+8							-7p
								-9pter-q21							-17
								-17							-Y

Erken pasajdan geç pasaja kopya sayısı değişiklikleri kırmızı belirtilmiştir.

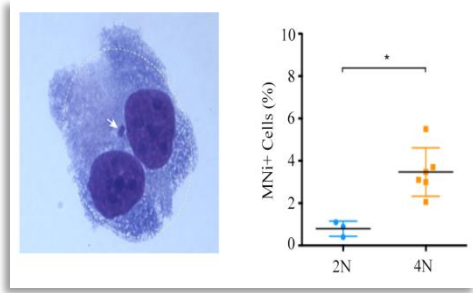
Şekil 2. Farklı 2N ve 4N klonlarında izlenen kromozom düzeyindeki farklılıklar



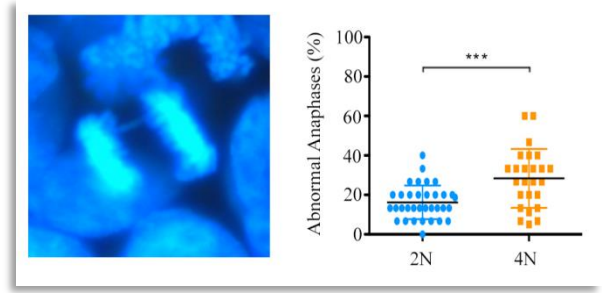
Şekil 3. Array-CGH yöntemiyle iki tetraploid altklonunda izlenen farklı genetik anomaliler

Bunlara ek olarak diploid ve tetraploid klonlar arasında mikro-nükleus ve mitoz sırasında geride kalan (lagging) kromozom oranlarına bakarak genomik instabilite varlığı karşılaştırılmış ve 4N hücrelerinde genomik instabilitenin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 4).

A)



B)



Şekil 4. A) Hücre bölünmesi sırasında “cytochalasin B” kullandıktan sonra mikronükleus oluşumunun değerlendirilmesi. Near-tetraploid (4N) hücrelerde mikronükleus oluşumu daha yüksek oranda izlenmektedir B) Mitoz bölünme sırasında aksayan kromozom izlenme oranı yine 4N klonlarda daha yüksek

Sonuç olarak tek bir atasal hücre hattından elde edilen 2N ve 4N klonların birbirlerinden çok farklı oldukları ve bu iki grubun kendi içerisinde de genomik düzeyde farklılıklar bulunduğu gösterilmiştir. Elde edilmiş olan bu klonlardan, ikisi near-diploid (2N; C3 ve C34) üçü near-tetraploid (4N; C28, B9 ve B12) olmak üzere 5 altklon, çalışmamızda kullanılmak üzere seçilmiştir. ABD’den gönderilen DLD-1 kolon kanseri hücre hattı ve altklonları, hücre kültürü laboratuvarımızda aseptik koşullarda üretilmiştir.

3.6.2. Hücre Kültürü, Mikoplazma Testi, STR ve Karyotip Analizi

İntratümöral heterojenitenin modellenmesi için, aynı tümörden köken alan ve kompleks olmayan anöplöidiye sahip hücreleri içerdiği için bir kolorektal adenokarsinoma hücre hattı olan DLD-1 (ATCC® CCL-221™) ve altklonları kullanılmıştır (126). DLD-1 hücreleri ve altklonları 25 ve 75 cm² yüzey alanına sahip flasklarda, %10 fetal bovin serum (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco) ve 2 mM L-glutamin (Gibco) içeren RPMI-1640 besiyerinde (Gibco)(bundan sonra tam RPMI-1640 olarak anılacaktır) ve 37°C ve %5 CO₂ basıncına sahip inkübatörde (Thermo Scientific) idame edilmiştir. Yüzeyin %70-80 konfluentlik durumunda hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak pasajlanmıştır (127). Santrifüjler, aksi belirtilmedikçe (Beckman Coulter) 300g ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hücre dondurma ortamı olarak %90 FBS, %10 DMSO (Applichem) kullanılmıştır. Tüm manipülasyonlar

BSL 2 laminar flow kabinde gerçekleştirilmiştir. Her bir deneme için ilgili başlıkta belirtilen sayılarda hücre, steril 6 kuyulu plaka, 12 kuyulu plaka, 24 kuyulu plaka, 96 kuyulu plaka (Corning) ya da cam tabanlı petriler (Ibidi #81156) üzerinde yetiştirilmiştir. Altklonların morfolojik incelemelerini gerçekleştirmek amacıyla ters ışık mikroskopunda (EVOS, Life Technologies) görüntüleri alınmıştır.

Çalışmada kullanılmasına karar verilen antikanser terapötikler, literatürde KRK'lerde en yaygın kullanılan terapi stratejileri göz önüne alınarak seçilmiştir (96,128–136). Sigma'dan satın alınan kemoterapötikler (5-Fluorouracil CAS ID:51-21-8 [Sigma #F6627], Oxaliplatin CAS ID:61825-94-3 [Sigma #O9512], Irinotecan CAS ID:100286-90-6 [Sigma #11406], Gemcitabine CAS ID:122111-03-9 [Sigma #G6423], Paclitaxel CAS ID:33069-62-4 [Sigma #T7191]) imalatçının talimatlarına göre çözülmüştür ve sterilize edilmiştir. Gamma-irradiyasyonunu sağlamak amacıyla ¹³⁷Cs Mark 1 (JL Shepherd) cihazı ile radyasyon uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Terapötik olarak olmasa da, tümör içi heterojeniteden sorumlu olabilecek bir faktör olan hipoksinin *in vitro* kültürlerde mimik edilebilmesi amacıyla, hücreler %2 O₂, %7 CO₂ basıncına sahip trigas inkübatöründe (Thermo Scientific) inkübe edilmiştir.

Deney sonuçlarını etkileyebilecek mikoplazma kontaminasyonu olasılığını ortadan kaldırmak için mikoplazma tespit kiti (Genlantis) kullanılmıştır.

DLD-1 altklonlarının atasal DLD-1 hücre hattından köken aldığını doğrulamak amacıyla Kısa Tekrar Dizi analizi (STR: Short Tandem Repeat) gerçekleştirilmiştir (137). Bu amaçla DLD-1 altklonlarına ait hücreler T75 flasklarda %80 konfluent oluncaya kadar kültüre edilmiştir. Ardından tripsinize edilerek Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen) ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve Nanodrop 1000 cihazı ile konsantrasyon ve saflıkları belirlenmiştir. STR analizleri Ulusal Kanser Enstitüsü Ana Genotipleme Tesisi, SAIC, Frederick'te (NCI Core Genotyping Facility, SAIC-Frederick, Inc.) gerçekleştirilmiştir.

Near-diploid ve near-tetraploid karyotipe sahip DLD-1 altklonları T75 flasklarda, deney gününde % 60-80 konfluent olacak şekilde kültüre edilmiş ve bir gün öncesinde pasajlanmıştır. Metafaz alanları Ried laboratuvar protokollerine göre hazırlanmıştır (Thomas Ried, M.D. | Center for Cancer Research - National Cancer

Institute). Slaytlar DAPI (Vectashield) ile boyanmış ve 40x objektif ile Leica ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir. Her bir klon için yaklaşık 100 metafaz sayılmıştır. Ortalamalar hesaplanmış ve grafikler GraphPad Prism (Versiyon 7.00) kullanılarak çizilmiştir.

3.6.3. Stabil Fluoresan İşaretleme ve Kokültür Modelinin Oluşturulması

DLD-1 altklonlarının fluoresan olarak ışımaya sağlayabilmesi için her bir altklon genomuna farklı renkte fluoresan protein kodlayan gen dizisi entegre edilmiştir. Bu entegrasyonun ilk olarak retroviral transdüksiyon (139) yoluyla gerçekleştirilmesi planlanmış, ancak ön denemelerde düşük stabil ekspresyon etkinliği sonucu, çalışmamıza ait 1001 projesinin danışmanı Prof.Dr.Batu Erman'ın önerisiyle daha etkin olan lentiviral yöntemle geçiş yapılmıştır (140). Bu yöntemde de ancak 2 renk fluoresan işaretleme gerçekleştirilebilmiş ve diğer 2 renk için satın alma yapılmış, ancak lentiviral partiküllerin laboratuvarımıza ulaşma süresinin çok gecikmesinden dolayı konvansiyonel bakteriyel transfeksiyon gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu bölümde sırasıyla retroviral, lentiviral ve konvansiyonel işaretleme yöntemleri anlatılmıştır.

Viral vektörler ökaryotik hücrelerin modifikasyonu için etkili bir yol sağlar ve bunların kullanımı hem araştırma hem de klinik gen terapisi uygulamaları için akademik laboratuvarlarda ve endüstride yaygındır (141).

Retroviral transdüksiyon için öncelikle viral partiküllerin eldesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, pCL-Eco Retrovirus Packaging Vector MCS bölgesine, uygun restriksiyon enzimleri (NEB) aracılığıyla GFP ve mCherry fluoresan proteinlerinin DNA dizileri entegre edilmiştir. Bu vektörler elektrokompeten *E. coli* bakteri hücrelerinde amplifiye edildikten sonra plazmid izolasyonu (Qiagen) gerçekleştirilmiştir. Vektörler İnsan embriyonik böbrek kökenli (HEK 293T/17'ten türevlendirilmiş) Phoenix-ECO (ATCC® CRL-3214™) hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle transfekte edilmiş ve plazmidin viral paketlemesi sağlanmıştır (142). Elde edilen viral partiküller transfeksiyonla mCAT-1 eksprese eden altklonlara verilmiştir. Bu işlem, viral vektörler ekotropik olduğu ve insanda fare viral reseptörü mCAT-1 eksprese edilmediği için BSL-2 kabinde çalışma imkanı sağlamaktadır. Retroviral

transfeksiyonda kullanılan viral vektörler insan hücrelerini enfekte edememektedir. Bu çalışan biyogüvenliği için elzemdir. Daha sonra, elde edilen bu retroviral partiküller kullanılarak DLD-1 altklonlarının, transdüksiyonu sağlanmış ve eksprese olan floresan proteinler görüntülenmiştir (Olympus).

Stabil transfeksiyonda, geçici transfeksiyonun tersine hücre bölünme sayısından bağımsız olarak floresans protein ekspresyonu gerçekleşmektedir. Böylece altklonlar uzun vadeli olarak, floresans mikroskop altında, aynı kültürde farklı renk floresans ışımaları şeklinde takip edilebilmektedir. Ancak yukarıda bahsedilen nedenlerle stabil transfeksiyon etkinliğindeki yetersizlik nedeniyle lentiviral işaretleme yöntemine geçiş yapılmıştır.

İnsan immün yetmezlik virüsünden türevlendirilmiş olan lentiviral vektörler, son yirmi yılda kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve optimize edilmiştir. Üçüncü nesil, kendi kendini inaktive eden lentiviral vektörler, son zamanlarda, hücrelere genlerin sokulması için çok sayıda klinik çalışmada kullanılmıştır (141). Lentiviral transdüksiyonu gerçekleştirmek amacıyla floresan proteinlerin eksitasyon ve emisyon dalgaboyları karşılaştırılarak, birbiriyle çakışmayan 4 adet proteinin kullanılmasına karar verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Proteinlerin eksitasyon ve emisyon dalgaboyları

Floresan protein	Eksitasyon dalgaboyu	Emisyon dalgaboyu	Lazer
GFP	488	507	488
tdTomato	554	581	561
BFP	402	457	405
iRFP	690	713	633

Bu amaçla LeGo lentiviral vektörleri kullanılmıştır (143,144). Halihazırda mevcut olan LeGo G2 puro kullanılarak üretilen lentivirüsle C3 (2N) altklonunun, LeGo T2 puro kullanılarak üretilen lentivirüsle B9 (4N) altklonunun işaretlenmesine karar verilmiştir. Plazmidlerin daha önceden transformasyonunun yapıldığı DH5a hücrelerini içeren gliserol stoktan midi üretim ve izolasyon gerçekleştirilmiştir. Nanodrop 2000 cihazında DNA konsantrasyonu belirlenmiştir. Paralel olarak SUNUM (Sabancı University Nanotechnology Research and Application Center) tesisinde CS Hek293FT hücre hattı kültüre edilmiştir. 15 cm petriler poli-L-lizin ile kaplanarak petri başına $7,5 \times 10^6$ hücre ekilmiştir. 16 saat sonra LeGo pDNA ile paketleme DNA'ları CaCl_2 ve klorokin varlığında «baloncuklama» yapılarak karıştırılmış ve Hek hücrelerine verilmiştir. 24 ve 36 saat sonra virüs partikülleri 0,45 mm filtre ile toplanıp 10'ar mL alikotlar halinde dondurulmuş ve -80°C 'ye kaldırılmıştır. Virüs titrasyonu için 50×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu plakaya Hek hücreleri ekilmiştir. 6 saat sonra virüs uygulanmıştır (G2&T2). Virüs uygulaması $\%0.1$ protamin sülfat varlığında gerçekleştirilmiştir (Şekil 5).

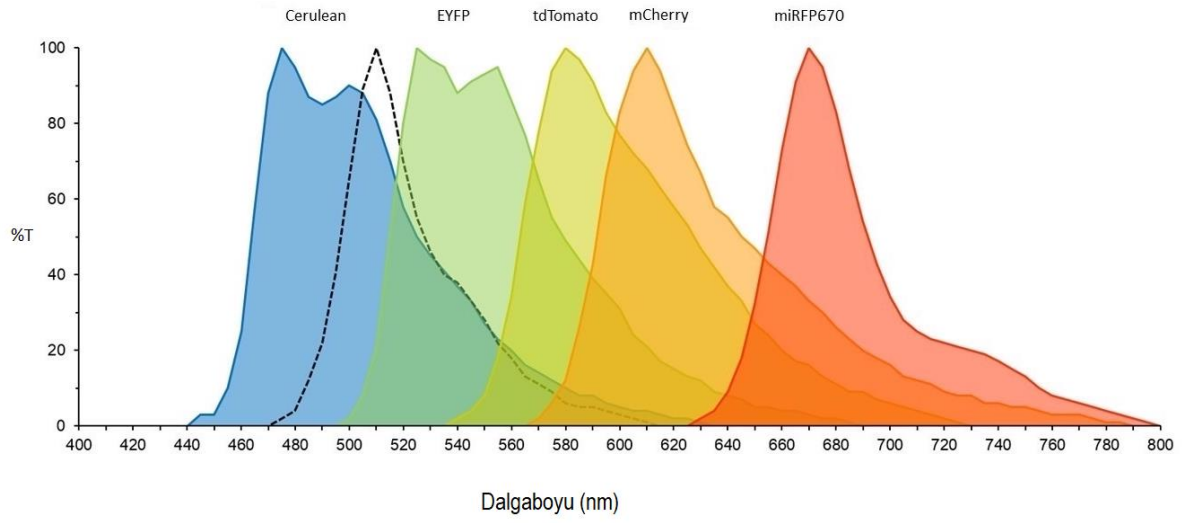
Virus						
	0,1	0,5	1	5	10	
G2-24h	1	2	3	4	5	6
	A					
G2-36h	1	2	3	4	5	6
	B					
T2-24h	1	2	3	4	5	6
	C					
T2-36h	1	2	3	4	5	6
	D					

Şekil 5. Virüs titrasyon plate dizaynı

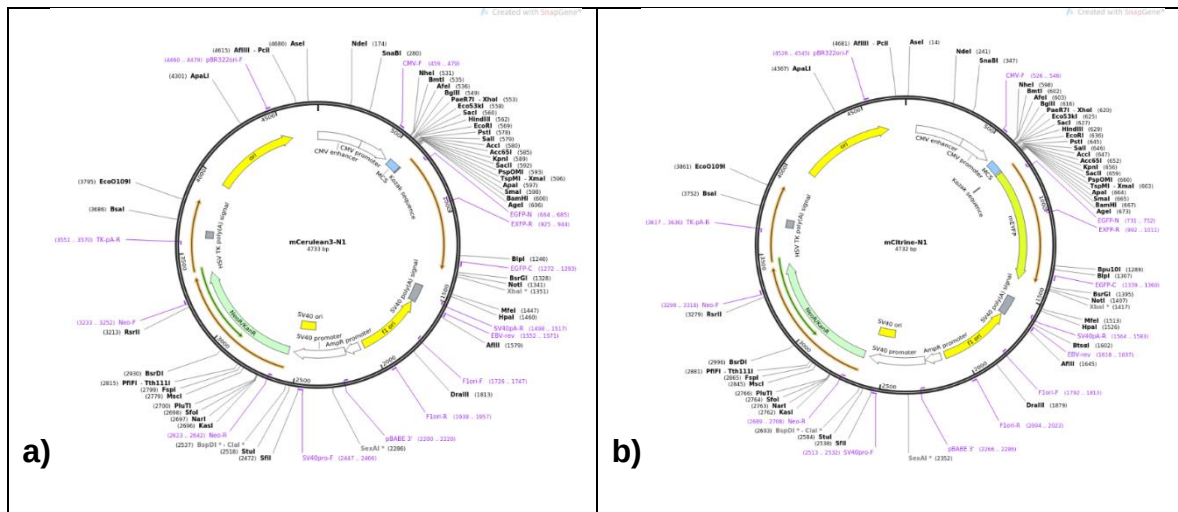
48 saat sonra akış sitometresi ile kontrol gerçekleştirilmiştir. 2xT25'e 300.000'er C3 ve B9 altklonlarına ait hücreler ekilmiştir. 16 saat sonra MOI=20 olacak şekilde %1 protamin sülfat varlığında transdüksiyon gerçekleştirilmiştir. 6 saat sonra ortam değiştirilmiştir. 48 saat sonra ortamlar puromisin 1,5 mg/mL olacak şekilde selektif ortamlarla değiştirilmiştir. 1 hafta boyunca hücre pasajlamalarda selektif ortam kullanılmıştır. 1 haftanın sonunda hücrelerdeki floresan sinyalin yoğunluğunu belirlemek amacıyla akış sitometri analizi gerçekleştirilmiştir.

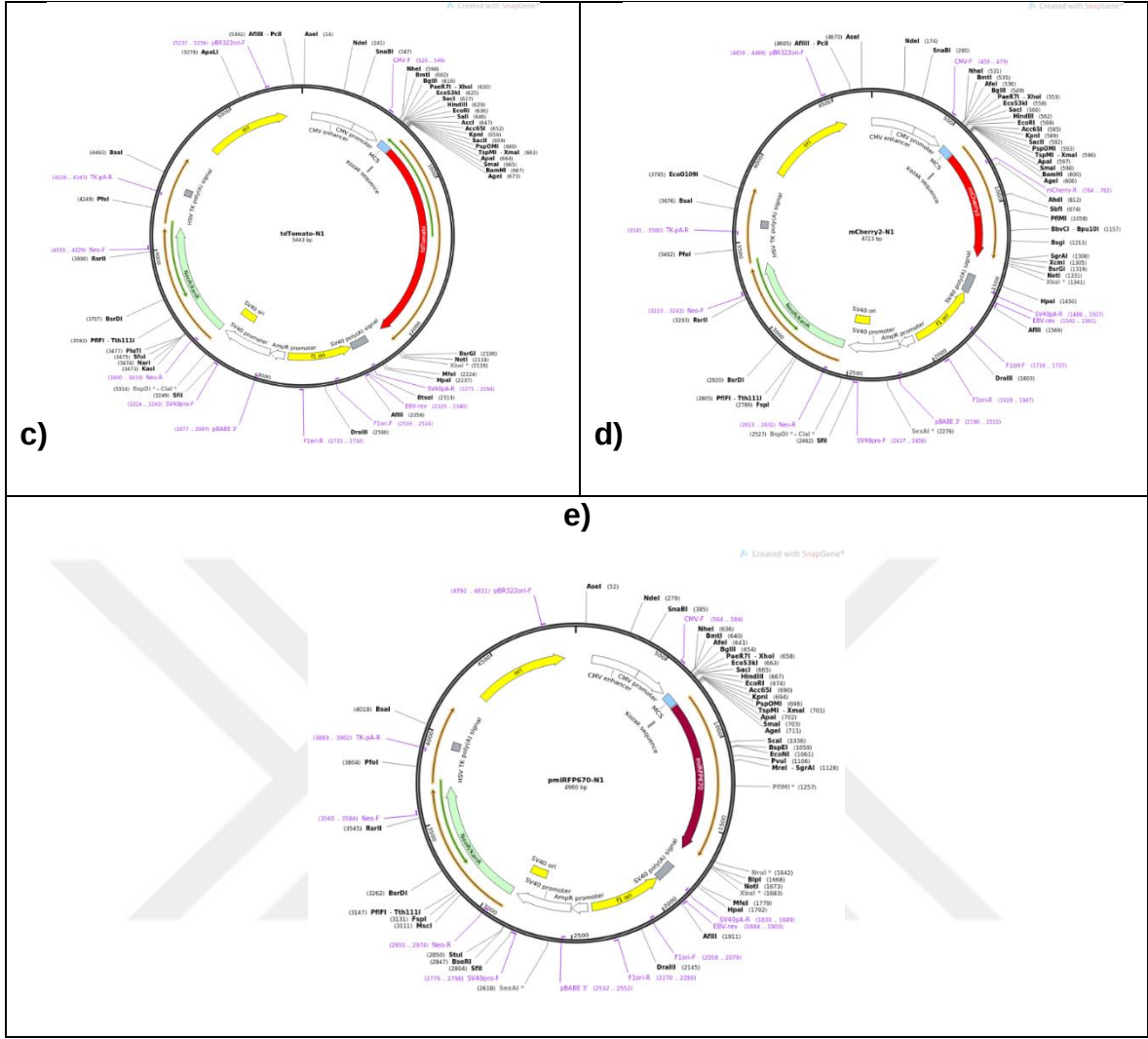
Sabancı Üniversitesi'nde gerçekleştirilen lentiviral transdüksiyon çalışmalarının başarılı olması sonucunda, diğer iki renk için hazır plazmidlerin (LeGo C2 puro ve LeGo V2 puro) sipariş edilmesine karar verildi. Ancak plazmidler planlanan zamanda laboratuvarımıza ulaşmadığı için konvansiyonel bakteriyel transfeksiyon yöntemiyle işaretlemeye geçilmesine karar verilmiştir. Lentiviral işaretleme için virüslerin ticari olarak satın alınmasına karar verilmiştir.

Altklonların konvansiyonel yöntemle floresan işaretlemesini gerçekleştirmek amacıyla, floresan proteinlerin eksitasyon ve emisyon dalgaboyları karşılaştırılarak, birbiriyle çakışmayan 5 adet floresan protein seçilmiştir (Şekil 6). mCerulean3-N1 (#54730)(Şekil 7a), mCitrine-N1 (#54594)(Şekil 7b), tdTomato-N1 (#54642)(Şekil 7c), mCherry2-N1 (#54517)(Şekil 7d) ve pmRFP670-N1 (#79987)(Şekil 7e) plazmidleri (Addgene) kullanılarak, altklonlar lipozom temelli transfeksiyon yöntemi (Lipofectamine 3000, Invitrogen) ile işaretlenmiştir.



Şekil 6. Seçilen fluoresan proteinlerin eksitasyon ve emisyon spektrasının gösterimi



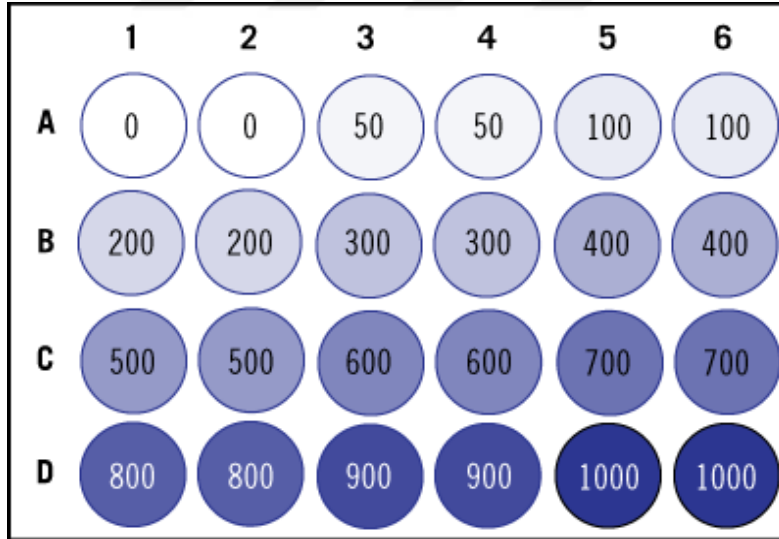


Şekil 7. Floresan işaretlemede kullanılan plazmid DNA'ların tam sekans haritaları. a) mCerulean3-N1, b) mCitrine-N1, c) tdTomato-N1, d) mCherry2-N1, e) pmIRFP670-N1.

mCitrine kodlayan bölge, mCitrine-N1 plazmidinden EcoRI and MfeI (NEB) enzimleri kullanılarak çıkarılmış ve sirkülerize edilmiştir. Bu plazmid DNA, transfeksiyon işleminde boş vektör kontrolü olarak kullanılmıştır. Jel temizleme için spin kolon temelli kit (MN) kullanılmıştır. Nükleik asit konsantrasyon ve saflığı Nanodrop 1000 kullanılarak belirlenmiştir. Ligasyon Hızlı Ligasyon Kiti (NEB) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kompetan *E. coli* DH5a hücrelerine transforme edilmiştir (NEB). Transforme hücreler 50 mg/mL kanamisin içeren LB agar petrilere inoküle edilmiştir ve gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün koloniler seçilmiş ve 50 mg/mL kanamisin içeren LB broth'a inoküle edilmiştir. Gece boyu 37°C'de 250 rpm rotasyon ile inkübe edilmiş ve Miniprep plazmid izolasyon kiti (Qiagen)

kullanılarak plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Eksizyonun confirmasyonu için diyagnostik kesim, NotI and XhoI (NEB) enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

DLD-1 altklonları 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. %70-80 konfluensiye ulaştıklarında her bir altklon farklı bir floresan proteini kodalayan geni içeren plazmid ile transfekte edilmiştir. Bu amaçla Lipofectamine 3000 (Invitrogen) transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Tüm altklonlar, ek olarak, yukarıda açıklanan boş kontrol vektörü ile de transfekte edilmiştir. Arka plan kontrolü olarak Opti-MEM (Gibco) ortamı (mock transfeksiyon kontrolü) kullanılmıştır. Lipofeksiyon işlemi boyunca ve transfeksiyondan sonraki ilk 48 saat, hücreler tam RPMI-1640 yerine Opti-MEM ortamı ile inkübe edilmiştir. Transfekte olmayan hücreleri elimine edip stabil floresan protein ekspresyonu elde edilebilmek için 48 saatin ardından ortam, 1 hafta boyunca artan G418 konsantrasyonlarıyla muamele edilen hücrelerin kristal viyole yöntemiyle boyanıp fikse edildiği ve tamamının öldüğü en düşük dozu belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen antibiyotik ölüm eğrisi kullanılarak belirlenmiş olan 0,2 mg/mL G418 antibiyotik konsantrasyonuna sahip tam RPMI-1640'la değiştirilmiştir (Şekil 8). Mock transfeksiyon kontrol hücrelerine tam RPMI-1640 verilmiştir.



Şekil 8. G418 konsantrasyon titrasyon plakası (145)

Hücrelerin seçilimi bir ay boyunca sürdürülmüştür. Bir ay sonunda hücreler ters floresan mikroskop ve C600 görüntüleme sistemi (Azure Biosystems) ile görüntülenmiştir. Floresan hücre sayıları akım sitometrisi ile ölçülmüştür (SA3800

Spectral Cell Analyzer, Sony). Bir sonraki adımda, floresan populasyonlar Beckman Coulter Astrios Cell Sorter kullanılarak izole edilip kültüre edilmiştir. Floresan-Aktive Hücre Ayırıştırma (FACS) yöntemi ile floresan sinyale sahip hücrelerin seçimi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle stabil transfekte floresan protein ekspresyonuna sahip altklonlar elde edilmiştir. Bu hücrelerin kültür idameleri daima 0,2 mg/mL G418 içeren tam ortamla (RPMI-1640, %10 FBS, %1 P/S, %1 L-Gln) gerçekleştirilmiştir. Stabil transfekte altklonların konfokal mikroskopi görüntüleri LSM 880, Zeiss ile elde edilmiştir.

Stabil floresan ekspresyonu sağlanan altklonların Neubauer lamında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Farklı kombinasyonlarda klonlar eşit sayıda karıştırılarak kokültüre edilmiştir. Bu kombinasyonlar, Tablo 2’de gösterildiği şekilde, M1, M2, M3 ve M4 olarak elde edilmiştir ve zamana bağlı olarak, konfokal mikroskopi ve akış sitometrisi kullanılarak izlenmiştir.

Tablo 2. Stabil floresan işaretli DLD-1 altklonlarının ile oluşturulan karışımların şeması

M1	M2	M3	M4
C3-Cerulean	C3-Cerulean	C3-Cerulean	C3-Cerulean
C34-Citrine	C34-Citrine	C34-Citrine	C34-Citrine
C28-Tomato		C28-Tomato	
B9-Cherry	B9-Cherry	B9-Cherry	B9-Cherry
B12-iRFP	B12-iRFP		
			B12-Tomato

Elde edilen bu *in vitro* tümör heterojenite modellerinde zamana bağlı olarak ve terapi koşulları altında populasyon kinetiklerindeki değişimlerin izlenmesine ilişkin yöntemler bir sonraki bölümde açıklanmıştır.

3.6.4. Populasyon Davranışlarının Değerlendirilmesi

3.6.4.1. Canlılık tayini

Yüzde canlılık (yüz hücreden kaçının canlı olduğu) belirlenmesi amacıyla, öncelikle tripan mavisi canlılık testi yapılmıştır (146). 6 kuyucuklu plakalara 5 altklon

için 300.000'er hücre ekilmiştir. 24 saat sonra kuyucuklar steril kazıyıcı ile kaldırılıp tripan mavisi ile boyanmış ve Neubauer lamında sayılmıştır. Her bir sayım için lamda sayılan 4 alanın ortalaması alınmıştır. Canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak her bir altklon için yüzde canlılık değeri hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir. İlgili grafikler Excel Professional Plus 2010 (Microsoft) programı kullanılarak çizilmiştir.

DLD-1 altklonlarının populasyon çalışmalarında kullanılacak terapötik dozları hücrelerdeki oksidatif metabolizmanın ölçümü aracılığıyla canlılığın belirlenmesini sağlayan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) canlılık tayin yöntemi ile belirlenmiştir (147). Bu amaçla hücreler tripsinize edilmiş ve tam RPMI-1640 ortamında (%10 FBS, %1 P/S, %1 L-Gln) resüspanse edilerek sayılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara; 24 saat zaman noktası için 10.000 hücre/kuyucuk, 72 saat zaman noktası için 1000 hücre/kuyucuk, 144 saat zaman noktası için 500 hücre/kuyucuk olacak şekilde, 6 tekrarlı olarak ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelere ¹³⁷Cs Mark 1 (JL Shepherd) cihazı ile artan dozlarda radyasyon uygulamaları ve artan dozlarda kemoterapötik uygulamaları gerçekleştirilmiştir. 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan, Gemcitabine ve Paclitaxel kemoterapötikleri kullanılmıştır. Ardından plakalar belirtilen süreler boyunca inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda kuyucuklardaki ortamlar aspire edilmiştir. Her bir kuyuya 100 µL 500 µg/mL MTT çözeltisi (RPMI-1640 ortamında) eklenmiş ve 3 saat CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Oluşan formazan kristallerinin çözdürülmesi amacıyla plakalara 100 µL/kuyucuk SDS çözeltisi (0,01 M HCl çözeltisinde) eklenmiş ve gece boyu inkübe edilmiştir. 570 nm ve 630 nm'lerde Spectramax (Molecular Devices) cihazı kullanılarak spektrofotometrik deteksiyon gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri arka plan sinyali çıkarılarak hesaplanmış ve herhangi bir uygulama gerçekleştirilmemiş olan hücrelerin (NT) canlılık değerleri %100 kabul edilerek, her bir uygulamanın en yüksek dozda içerdiği miktarda çözgeni (DMSO) içeren kontrolün (VC) ve ilaç dozlarının uygulandığı hücrelerin % canlılık değerleri hesaplanmıştır ve absorbansların ortalamaları grafiğe geçirilmiştir. İlgili grafikler Excel Professional Plus 2010 (Microsoft) programı kullanılarak çizilmiştir. Canlılık tayini verilerine dayanarak her bir kemoterapötik için, alt akım deneylerde kullanılmak üzere, en az dirençli (en

duyarlı) altklonun %50 veya daha fazla ölümüne neden olan doz (IC_{50}) değerleri belirlenmiştir.

3.6.4.2. Proliferasyon yeteneklerinin belirlenmesi

Altklonlara ait proliferatif yetenek düzeyleri BrdU inkorporasyonu ile hücre proliferasyon testi ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla ticari kit (Millipore #2750) üretici talimatlarına göre kullanılmıştır. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) bir pirimidin analogudur ve yeni sentezlenen DNA'da timidinin yerine kullanılabilir. Dolayısıyla hücreler prolifer ederken DNA'larının yapısına daha fazla BrdU katılmaktadır. Hücrelerin fiksasyonu ve DNA'nın denatürasyonunun ardından ortama eklenen fare BrdU antikoruna DNA'ya inkorpore olan BrdU moleküllerine bağlanır ve sonrasında eklenen anti-fare HRP (horse radish peroxidase) bağlı IgG antikoruna, fare BrdU antikoruna bağlanır. Ortama HRP substratının eklenmesiyle BrdU konsantrasyonu ile doğru orantılı şekilde artan bir renk oluşumu meydana gelir. Bu rengin şiddeti 450 nm'de spektrofotometrik tayin ile belirlenir (148). Bu yöntemle hangi DLD-1 altklonunun daha proliferatif özelliğe sahip olduğu, absorbanslarının karşılaştırılması yoluyla belirlenmiştir. Deney 96 kuyucuklu plakada, 3'er tekrarlı olacak şekilde artan hücre sayılarında ekim gerçekleştirilmiştir. Hücreler plakaya ekildikten 24 saat sonra BrdU eklenmiş, 48. saatte hücreler fikse edilmiş ve anti-BrdU antikor ile işaretlenmiştir. 450 nm dalgaboyunda spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir ve grafiğe geçirilmiştir. Bu amaçla Excel Professional Plus 2010 (Microsoft) yazılımı kullanılmıştır.

Altklonların proliferasyon kapasitelerini belirlemek amacıyla kullanılan bir diğer yöntem de koloni oluşum denemesi (Colony Formation Assay, CFA) olmuştur (149). Kuyucuk başına 100 hücre, 1. günde üç tekrarlı olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Radyoterapi plakalarına ekilen hücrelere, öncesinde ^{137}Cs Mark 1 (JL Shepherd) cihazı ile radyasyon uygulanmıştır. Kemoterapötikler 2. günde uygulanmıştır. Uygulanan kemoterapötik ve radyasyon dozları 4.2.1.'de belirtilmiştir. Hipoksi plakaları %2 O_2 basıncına sahip trigas inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler, ilgili uygulamaların başlatılmasından itibaren 144 saat inkübe edilmiş ve ardından %0,2 kristal viyole (Sigma-Aldrich) çözeltisi (%2 EtOH'de) ile fikse edilip boyanmıştır. C600 görüntüleme sistemi (Azure Biosystems) ile görüntü alınmıştır.

Analizler FIJI (ImageJ) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Koloniler sayıldıktan sonra hesaplamalar yapılmış ve GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak grafikler çizilmiştir. Bu değerlendirme 3 bağımsız deneme ile, radyoterapi, hipoksi ve kemoterapötiklerin etkisi altında gerçekleştirilmiştir.

3.6.4.3. Migrasyon yeteneklerinin değerlendirilmesi

Altklonların migratuar özelliklerinin karşılaştırılması “scratch test” (yara kapama) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (150). Yara kapama yöntemi, birçok farklı deneysel koşulun memeli hücre migrasyonu ve proliferasyonuna etkisinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu testte, hücrelerin oluşturduğu tabaka pipet ucu gibi steril bir cisim yardımıyla çizilerek yara oluşturulur ve bu yaranın, hücrelerin boş alana migrasyonu ve proliferasyonu ile kapanması izlenir. Hücrelerin motilite ve/veya büyümelerini etkileyen faktörler artan veya azalan yara kapama hızına yol açarlar (151). Çalışmamızda, genomik açıdan farklı altklonların yara kapama hızları karşılaştırılarak migrasyon yetenekleri değerlendirilmiştir. Deneysel aşamalar literatürde daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmalar referans alınarak planlanmıştır (150,152,153) Bu amaçla, hücreler tripsinize edilmiş, tam RPMI-1640 ile resüspanse edilmiştir. 24 kuyulu plakaya her kuyuya 300.000 hücre (0.5 mL’de) denk gelecek şekilde sayılıp 3 tekrarlı olarak ekilmiştir. Ekilen hücreler 37°C nemli CO₂ inkübatöründe gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün, 200 µL pipet ucu ile kuyular artı şeklinde çizilerek yara oluşturulmuştur. Hücrelerin ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler 1xPBS ile yıkanmıştır. Kemoterapötikler, 72 saat IC₅₀ konsantrasyonlarında taze ortam ile hücrelere verilmiştir. Kemoterapötikler verildiği anda (0.gün) EVOS ters ışık mikroskobu ile fotoğrafları çekilmiştir. Hücreler inkübasyonda tutulmaya devam edilip her gün görüntüleri alınmış ve yaraların zamanla, hücrelerin boş alana migrasyonu ve proliferasyonu ile kapanması 3 gün boyunca izlenmiştir. Kemoterapi, hipoksi ve radyoterapi uygulaması sonrasında elde edilen sonuçların analizi FIJI (ImageJ) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Grafikler ise GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak çizilmiştir.

3.6.4.4. İnvazyon yeteneklerinin değerlendirilmesi

Altklonların invazif özelliklerinin karşılaştırılması Matrigel'e (Corning) geçiş yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Boyden chamber temelli Corning marka ticari kit kullanılmıştır. Bu yöntem hücrelerin invazyon yeteneklerinin belirlenmesini sağlayan *in vitro* bir sistemdir (154). Matrigel matriks, EHS sarkom tarafından üretilen ve *in vitro* bazal membran işlevi gören bir yapıdır. İnvazif olmayan hücreler bu membrandan geçemezken invazif hücreler ekstraselüler ortama proteazlar salgılayarak matriksi enzimatik olarak degrade ederler ve membrandan geçebilirler. Bu invazif hücreler fikse edildikten sonra mikroskop altında sayılarak hangi altklonun diğerlerine göre daha invazif karakterde olduğu belirlenebilmektedir.

İnvazyon deneyi için, steril 8 µm Boyden chamber insertleri (Corning #3422) steril 24 kuyulu plakaya otoklavlanmış pens ile laminar kabinde yerleştirilmiştir. Justus ve arkadaşlarının invazyon testi protokolü kullanılmıştır (155). Stok Matrigel (Corning #356234), serum (FBS) içermeyen soğuk RPMI-1640 ortamında son konsantrasyonları 1,2, 0,6 ve 0,3 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmış, bir tüpe ise hiç Matrigel konmamış, yalnızca RPMI-1640 pipetlenmiştir (0 mg/mL Matrigel). Pozitif kontrol olarak Matrigel kaplama yapılmayan, dikey migrasyonun test edildiği bu kuyucuklar kullanılmıştır. Bu aşama buz üzerinde laminar kabinde yapılmış, ayrıca Matrigel ile temasa geçecek tüm plastik malzemeler de deneye başlamadan önce +4°C'de soğutulmuştur. Seyreltilmiş Matrigel, her bir inserte 40 µL hacimde pipetlenmiştir. 10 dakika plakanın kapağı az açık şekilde kabinde, ardından plakaların kapağı kapatılarak 37°C, nemli CO₂ inkübatöründe 2 saat bekletilmiştir. Bu sırada hücreler ekim için hazırlanmıştır. İnvazyon deneyinde kullanılacak hücreler insertlere ekilmeden önce 24 saat starve edilmiştir. Bu amaçla ihtiyaç olan hücre miktarının 2 katı kadarı flaska tam RPMI-1640 (10% FBS, 1% L-Glutamin, 1% Penisillin/Streptomisin) kullanılarak ekilmiştir. Ertesi gün tam ortam uzaklaştırılmış, hücreler 1X PBS ile iki kez yıkanmış ve FBS'siz RPMI-1640 pipetlenmiştir. 24 saat starvasyon sonrası hücreler tripsinize edilmiş, %0,1 BSA içeren, serum içermeyen ortamda resuspanse edilmiş, 0,5x10⁶ hücre/mL olacak şekilde sayılmıştır. 2 saatin sonunda inkübatörde donan Matrigelle sahip insertlerin her birine 100 mL'de 5x10⁴ hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve plakalar hücrelerin oturması için

10 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Sürenin sonunda plakalar inkübatörden alınmış, alıcı kuyulara (receiver well, insertün oturtulduğu kuyu) tam ortam pipetlenmiştir. Alt kuyucuklara verilen kemoterapötik dozları, kemoatraktan vazifesi gören %10 FBS içeren ortamda hazırlanarak eklenmiştir. Her bir alt kuyuda (receiver well) %10 FBS var iken, üst kuyuda (insert) FBS yoktur. Plakalar 24 saat 37°C, nemli CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda alıcı kuyulardaki ortam uzaklaştırılmıştır. İnsertlerin içi kulak pamuğu ile nazikçe temizlenmiştir. Porlardan geçen hücreleri boyamak ve fikse etmek için 600 µL %2 etanolde %0,2 Kristal viyole çözeltisi alıcı kuyulara pipetlenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. 10 dakika inkübasyonun sonunda fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla insertler su dolu 3'lü kova serisine (2 adet çeşme, son olarak distile su) daldırılarak yıkanmıştır. Ardından insertler yeni 24 kuyulu plakaya yerleştirilmiş ve gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Matrigelle kaplanan (invazyonun belirlenmesi) ve kaplanmayan (dikey migrasyonun belirlenmesi, pozitif kontrol) insertler, EVOS ters ışık mikroskobu ile aynı ışık gücünde (%20) ve aynı objektif ile (4x) görüntülenmiştir. Piksel yoğunlukları FIJI (ImageJ) kullanılarak analiz edilmiştir (156). Bu deney 3 bağımsız tekrarla, 144 saat IC₅₀ dozlarında radyoterapi ve kemoterapötikler verilerek ve %2 O₂ basıncına sahip trigas inkübatörle hipoksi sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Grafikler GraphPad Prism 7 programı kullanılarak çizilmiştir.

3.6.4.5. Diferansiyasyon düzeylerinin belirlenmesi

Altıklonların diferansiyasyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla sferoid oluşturma denemesi (Sferoid Formation Assay, SFA) gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler, daha önce gerçekleştirilmiş çalışmaların protokolüne göre planlanmıştır (157). %3 Select agar (Invitrogen #30391-023) saf su kullanılarak hazırlanmış, otoklavlanmış ve 60°C'ye soğutulmuştur. Tam RPMI-1640, 40°C'ye ısıtılmıştır. Agar ve ortam kullanılarak 1:4 (agar:ortam) karışım hazırlanmıştır. Bu karışım 24 kuyulu plakaya her kuyuya 250 µL hacimde pipetlenmiş ve yaklaşık 10-15 dakika, katılaşana kadar beklenmiştir. Hücreler tripsinize edilmiş, tam RPMI-1640 ile resüspanse edilmiştir. 24 kuyulu plakaya her kuyuya 300.000 hücre (0,5 mL'de) denk gelecek şekilde sayılmış ve ekilmiştir. Kemoterapötikler ve radyasyon 4.2.1.'de belirtilen dozlarda uygulanmıştır. Hipoksi ise %2 O₂ içeren trigas inkübatör ile sağlanmıştır.

Ekilen hücreler 37°C nemli CO₂ inkübatöründe gece boyu inkübe edilmiştir. Hücreler sferoid oluşum açısından izlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. İlk görüntüleme 1. gün EVOS ters ışık mikroskopunda elde edilmiştir. 15 gün boyunca, her 3 günde bir görüntüler alınmaya devam edilmiştir. Sonuçlar FIJI (ImageJ) ile analiz edilmiştir.

Ek olarak, DLD-1 altklonlarında kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri de belirlenmiştir (158). Bu belirteçler, literatüre göre kolorektal karsinomalarda, normal dokuya kıyasla ekspresyonu en fazla artan belirteçler olmalarına göre seçilmişlerdir (99,159–161).

3.6.5. Kokültürlere Uygulanan Terapötiklerin Populasyon Üzerine Etkilerinin Fluoresan Sinyalin Takibi Yoluyla İncelenmesi

3.6.3.'te açıklanan kokültür ile oluşturulan *in vitro* heterojenite modeline farklı kemoterapötik ajanlar (5-Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan, Gemcitabine ve Paclitaxel), radyasyon ve hipoksik koşullar uygulanarak, altklonların zaman içerisindeki populasyon kinetiğindeki değişiklikler izlenebilmiştir. 3.6.4.1. başlığında açıklanan şekilde belirlenen IC₅₀ dozları uygulanmıştır.

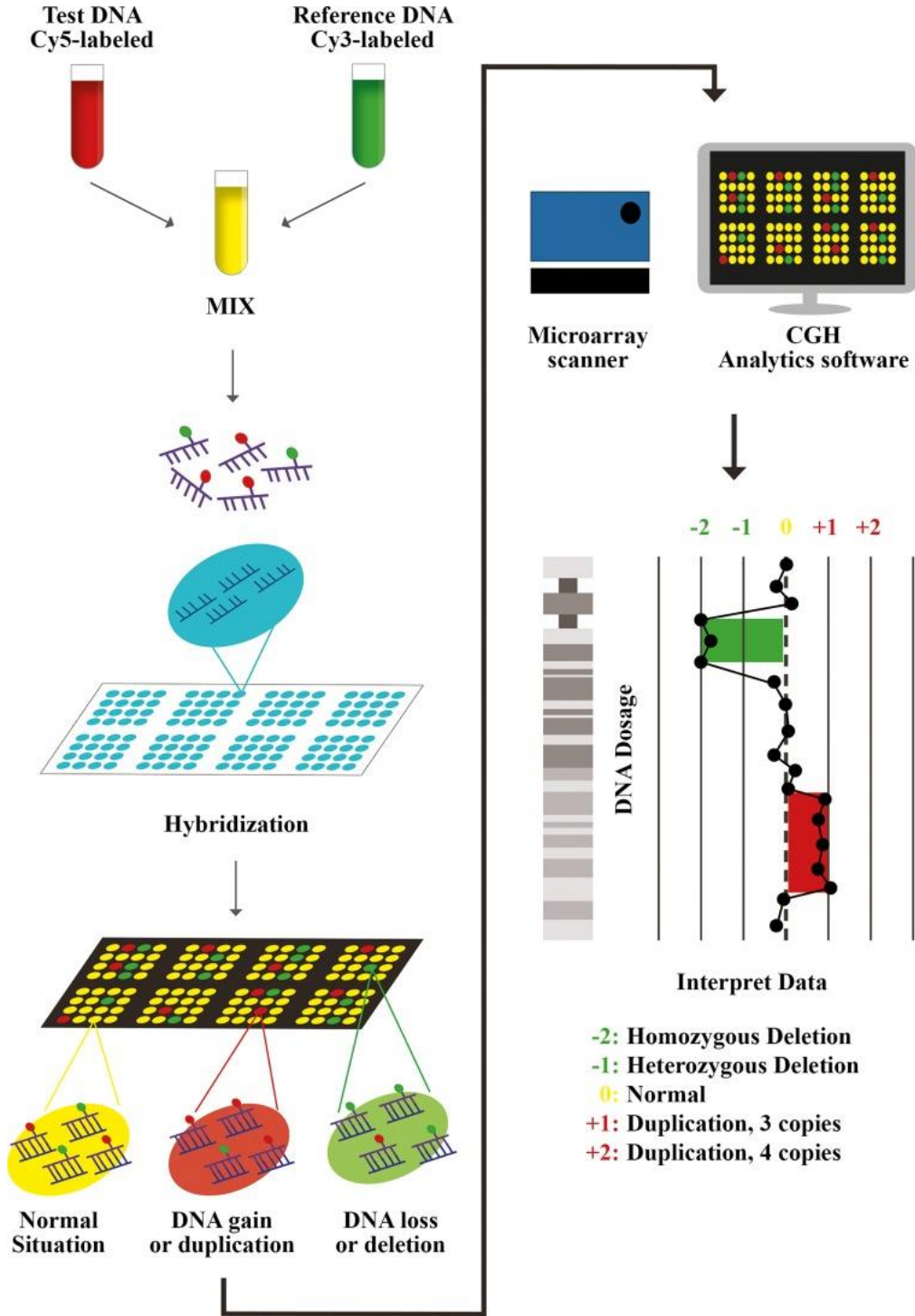
Stabil fluoresan işaretli DLD-1 altklonlarının kokültür içerisindeki yüzdeleri BD LSR Fortessa akış sitometresi kullanılarak belirlenmiştir. Stabil transfekte fluoresan hücreler her zaman 0,2 mg/mL G418 memeli antibiyotiği içeren tam RPMI-1640 ortamında kültüre edilmiştir.

Fluoresan altklonlardan oluşturulan kokültürler, çeşitli zaman noktalarında Zeiss LSM880 (405, 458, 488, 514, 543, 594, 633 nm dalgaboylarında lazerler ile donatılmış) konfokal mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir.

3.6.6. Genomik Analizler ve Populasyon Verileriyle Karşılaştırılması

Bu çalışmada kullanılan altklonların ileri genomik analizleri, tarafımdan, TÜBİTAK 2214/A-Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı sayesinde 12 ay süreyle, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü çatısı altında yer alan Ulusal Kanser Enstitüsü'nde çalışmalarını sürdüren Dr. Thomas Ried'in laboratuvarında gerçekleştirmiştir.

CGH analizleri için klonlar T75 flasklarda kültüre edilmiştir ve %80-90 doluluğa ulaştıklarında toplanmıştır. DNA ekstraksiyonu Gentra DNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır. DNA konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 1000 ile belirlenmiştir. Test ve referans DNA'nın etiketlenmesi için SureTag DNA etiketleme kiti (Agilent) kullanılmıştır. Referans DNA olarak insan genomik DNA-dişi ve erkek (Promega) kullanılmıştır. Protokolün genel akışı Şekil 9'da verilmiştir. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon dizileri (aCGH), üreticinin protokolüne (oligonükleotid dizisi tabanlı CGH, protokol versiyon 4.0, Haziran 2006 ve One-Color Microarray Tabanlı Gen Ekspresyon Analizi, protokol versiyonu 6.9) göre insan 4x180K oligonükleotid bazlı slaytlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler Nexus 9.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 9. CGH genel prensibi (162)

Spektral karyotipleme (SKY), tüm insan kromozomlarının, her bir kromozom çiftinin farklı flouresan renk ile hibridize edilmesi sayesinde tek bir seferde görüntülenebilmesini sağlayan bir tekniktir (163). SKY metodunu uygulamak için tek iplikli kısa DNA dizilerinden bir kütüphane hazırlanmalıdır. Bu kütüphanedeki her bir

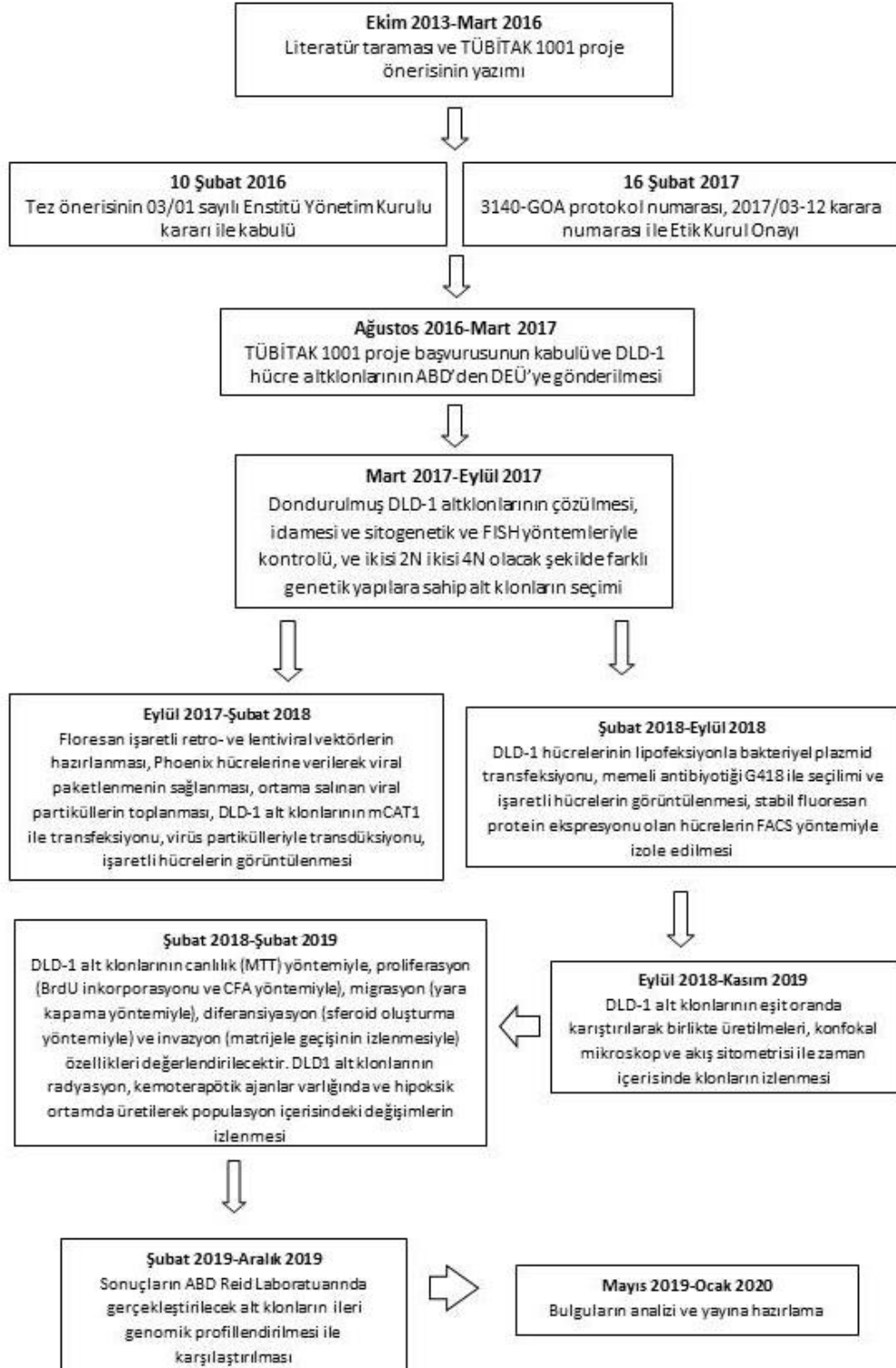
prob, bir kromozomun belirli bir bölgesine komplementerdir. Bu prob, insan genomundaki tüm kromozomlara komplementer olan ve her biri farklı bir floresan renk ile işaretli bir kütüphane oluşturur. Bir insan hücresinden elde edilen kromozomlarla hibridize edildiğinde bu prob, tüm kromozom setini seçici olarak gökkuşağı renkleriyle işaretler. Daha sonra, işaretlenmiş kromozomlardan elde edilen görüntüler, özel translokasyonlar ya da diğer yapısal anomaliler gösterip göstermediklerini belirlemek için analiz edilir. DLD-1 klonları T75 flasklarda %60-80 doluluk oranı görülene kadar büyütülmüş ve hücreler toplanmasından bir gün önce pasajlanmıştır. SKY için slaytların hazırlanması, hibridizasyon ve deteksiyon işlemleri Ried laboratuvar protokollerine göre yapılmıştır (Ried Lab Protocols). Görüntüler, 60X immersiyon yağı lensi, spektral küp (Applied Spectral Imaging) ve CCD kameralı bir modül ile donatılmış bir Leica mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir. Spektral karyotipler; SKY View yazılımı (Applied Spectral Imaging) kullanılarak yapılmıştır.

Çok-renkli İnterfaz Floresan *in situ* Hibridizasyon (Multicolor Interphase Fluorescence *in situ* Hybridization, miFISH) denemeleri Ried lab protokolleri uyarınca gerçekleştirilmiştir (Ried Lab Protocols). DLD-1 klonlarına ait kromozomlardaki genlerin kopya sayısı değişimlerini belirlemek amacıyla, 15 gene [CDX2 (13q12.3), ZNF217 (20q13.2), SMAD4 (18q21.2), DBC2 (8p21.3), MYC (8q24.21), HER2 (17q12), p53 (17p13.1), APC (5q22.2), CCP10 (10), EGFR (7p11.2), COX2 (1q31.1), CDKN2C (1p32.3), KRAS (12p12.1), PIK3CA (3q26.32), BRAF (7q34)] karşılık gelen bakteriyel yapay kromozom (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) klon “contig”leri kullanılmıştır (165) (Tablo 3). FISH problemleri, KRK’de etkili olduğu bilinen tümör baskılayıcılar ve onkogenlerden seçilmiştir. İnterfaz FISH görüntüleri, 340/1.30 NA objektife sahip Olympus mikroskopun kullanıldığı Metafer (Meta-Sytems) tarama sistemi ile elde edilmiştir. Her bir tek hücreden elde edilmiş altklon için 300 hücre nükleusu analiz edilmiştir. İnstabilite skorları ve indeksleri, miFISH paterni sayısını analiz edilen hücre sayısına bölüp 100 ile çarparak hesaplanmıştır.

Tablo 3. DLD-1 klonlarının miFISH deneyleri için seçilmiş olan FISH problemlerinin bağlandığı genler ve pozisyonları

Panel	Gene	Chr	Arm	Gene location
I	CDX2	13	q12.3	28,536,274-28543,505
	ZNF217	20	q13.2	51,617,017-51,633,043
	SMAD4	18	q21.2	48,494,387-48,584,614
	DBC2	8	p21.3	
	MYC	8	q24.21	128,748,315-128,753,680
II	HER2	17	q12	37,844,393-37,884,915
	p53	17	p13.1	7,512,469-7,531,642
	APC	5	q22.2	112,043,202-112,181,936
	CCP 10	10		
	EGFR	7	p11.2	55,086,725-55,275,031
III	COX2	1	q31.1	186,640,944-186,649,559
	CDKN2C	1	p32.3	
	KRAS	12	p12.1	
	PIK3CA	3	q26.32	178,866,311-178,952,497
	BRAF	7	q34	

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



Şekil 10. Akış şeması

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmada seçilen 5 farklı altklonla yapılan denemelerde çıkan sonuçlar, alt gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu altklonların farklı oranlarda bir araya getirilmesiyle elde edilen örneklerle gerçekleştirilen denemeler de göz önüne alındığında, sonuçların 3'ten fazla grup arasında istatistiksel karşılaştırılmasının yapılması gerekmiştir. Bu amaçla, non-parametrik ANOVA testi olan Kruskal-Wallis istatistiksel analiz yöntemi kullanılmıştır.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Fluoresan işaretli retro ve lentiviral vektörlerin hazırlanması ve kullanımı ile ilgili maddelerdir. Bu aşamalarda bu vektörlerin oluşturulamaması veya transdükte edebilir özellikte paketlenememeleri ve efektif ışına sağlamamaları en önemli problem olmuştur. Bu yöntemle istenilen sürede işaretlemeler gerçekleştirilemediği için, altklonlar fluoresan protein kodlama bölgesi içeren memeli ekspresyon vektörlerinin konvansiyonel yöntemle stabil tranfeksiyonu ile işaretlenmiştir.

Fluoresan işaretli altklonların eşit oranlarda karıştırılarak yapılan deneylerde fluoresan işaretlerin interferansı da araştırmada bir sınırlılık yaratmaktadır. Görünür bölgede birbiriyle çakışmayan 5 adet fluoresan işaretli protein seçilmiş, ancak kızıl ötesi proteinden (piRFP670) yeterince verim alınamamış ve kokültür denkleminde çıkarılmıştır.

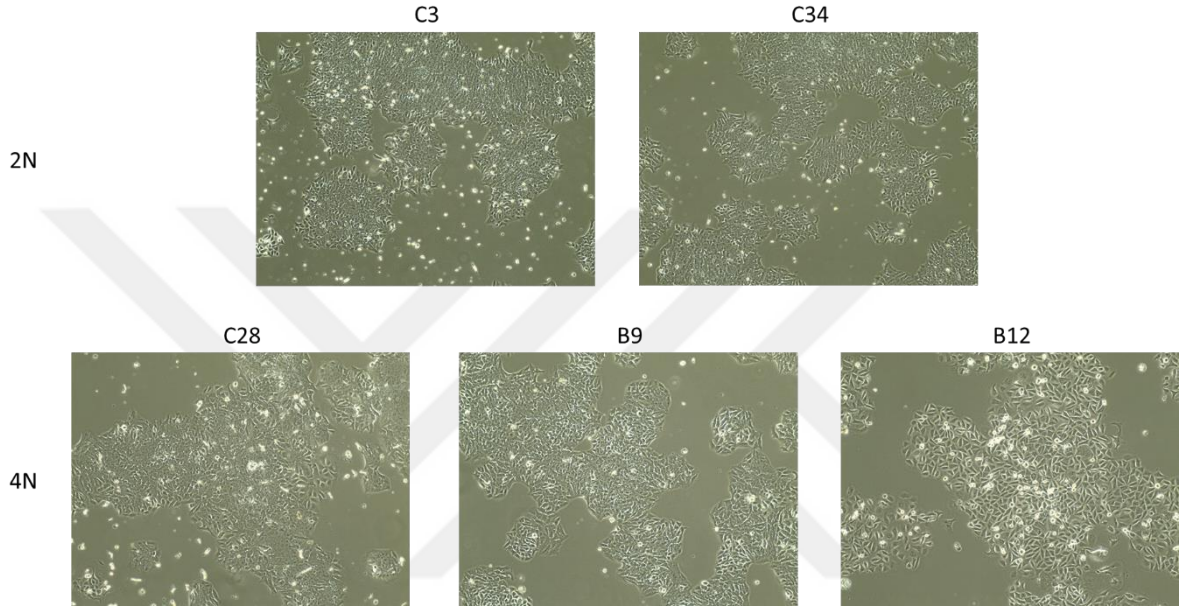
3.10. Etik Kurul Onayı

Tez çalışmalarına dair etik kurul onayı, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 1176 sayılı ve 17.02.2017 tarihli belge ile verilmiştir.

4. BULGULAR

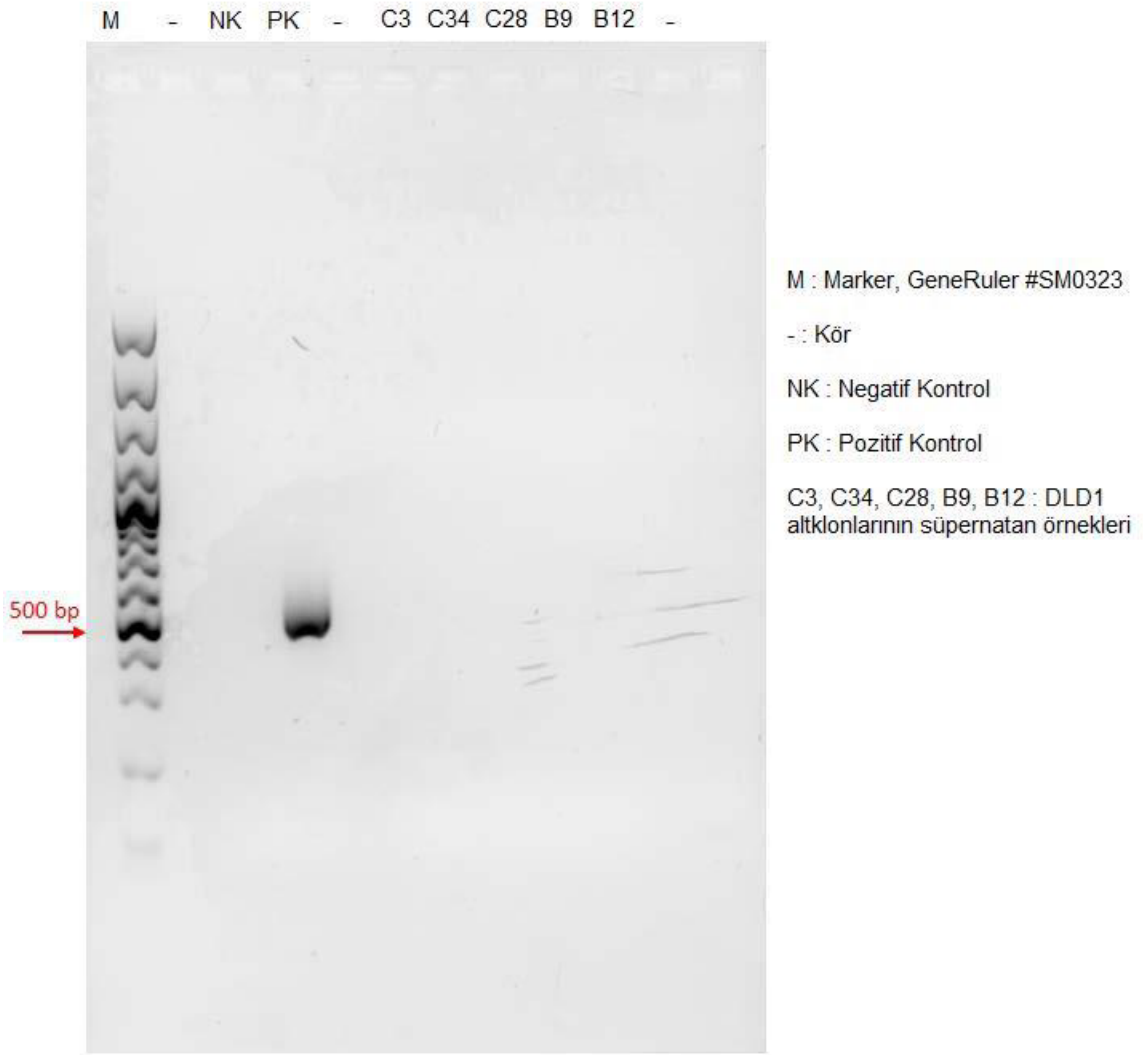
4.1. Hücre Görüntüleme, Mikoplazma Testi, STR ve Karyotip Analizi

DLD-1 kolorektal karsinoma hücre hattından köken alan iki 2N altklon (C3 ve C34) ile üç 4N altklonun (C28, B9 ve B12) EVOS ters ışık mikroskopunda görüntülemeleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. EVOS mikroskopunda 10x objektifte alınan DLD-1 klonlarına ait faz kontrast mikroskopi görüntüleri

DLD-1 altklonlarıyla gerçekleştirilen mikoplazma testinde mikoplazma DNA'sının pozitif kontrolü 500 baz çiftinde bir bant vermiştir. Tüm DLD-1 altklonları ve negatif kontrol, mikoplazma kontaminasyonu için negatif sonuç vermiştir (Şekil 12).



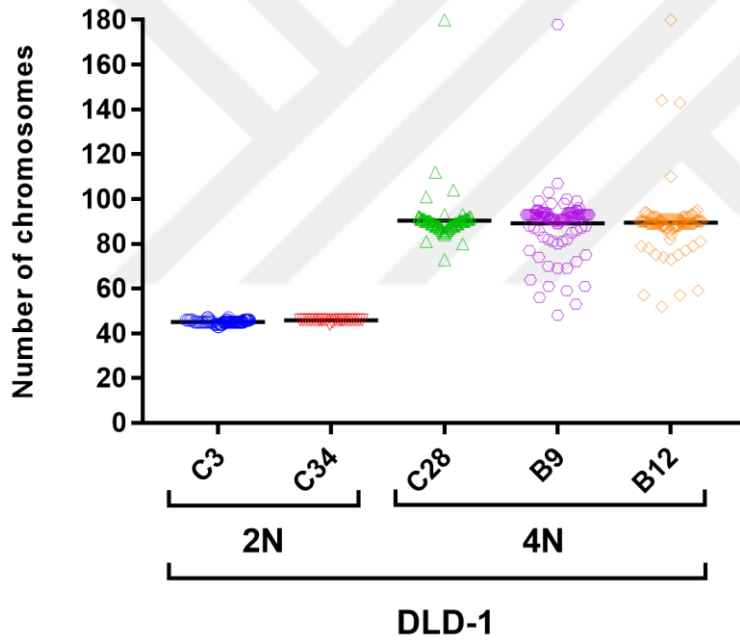
Şekil 12. DLD-1 klonlarının mikoplazma testinin jel görüntüsü

STR sonuçlarına göre altklonlarda, atasal DLD-1 genomunda bulunan kısa tekrar dizilerinin büyük çoğunluğu örtüşmektedir. Farklılıklar sarı ile işaretlenmiştir. 5. kromozom üzerinde bulunan CSF1PO1 lokusunun tekrar sayısı altklonlarda, atasal DLD-1 hattındakine göre daha fazla bulunmaktadır. Amelogenin lokusu ise 2N altklonlarda Y kromozomlarının eksik olduğuna işaret etmektedir (Tablo 4).

Tablo 4. Atasal DLD-1 hücre hattı ve altklonların STR analiz sonuçları

	D5S818_1	D5S818_2	D13S317_1	D13S317_2	D7S820_1	D7S820_2	D16S539_1	D16S539_2	vWA_1	vWA_2	TH01_1	TH01_2	AMEL_1	AMEL_2	TP0X_1	TP0X_2	CSF1PO_1	CSF1PO_2
DLD-1 (ATCC: #CCL-221)	13	13	8	11	10	12	12	13	18	19	7	9.3	X	Y	8	11	11	12
C3	13	13	8	11	10	12	12	13	18	19	7	9.3	X	X	8	11	12	12
C34	13	13	8	11	10	12	12	13	18	19	7	9.3	X	X	8	11	12	12
C28	13	13	8	11	10	12	12	13	18	19	7	9.3	X	Y	8	11	12	12
B9	13	13	8	11	10	12	12	13	18	19	7	9.3	X	Y	8	11	12	12
B12	13	13	8	11	10	12	12	13	18	19	7	9.3	X	Y	8	11	12	12

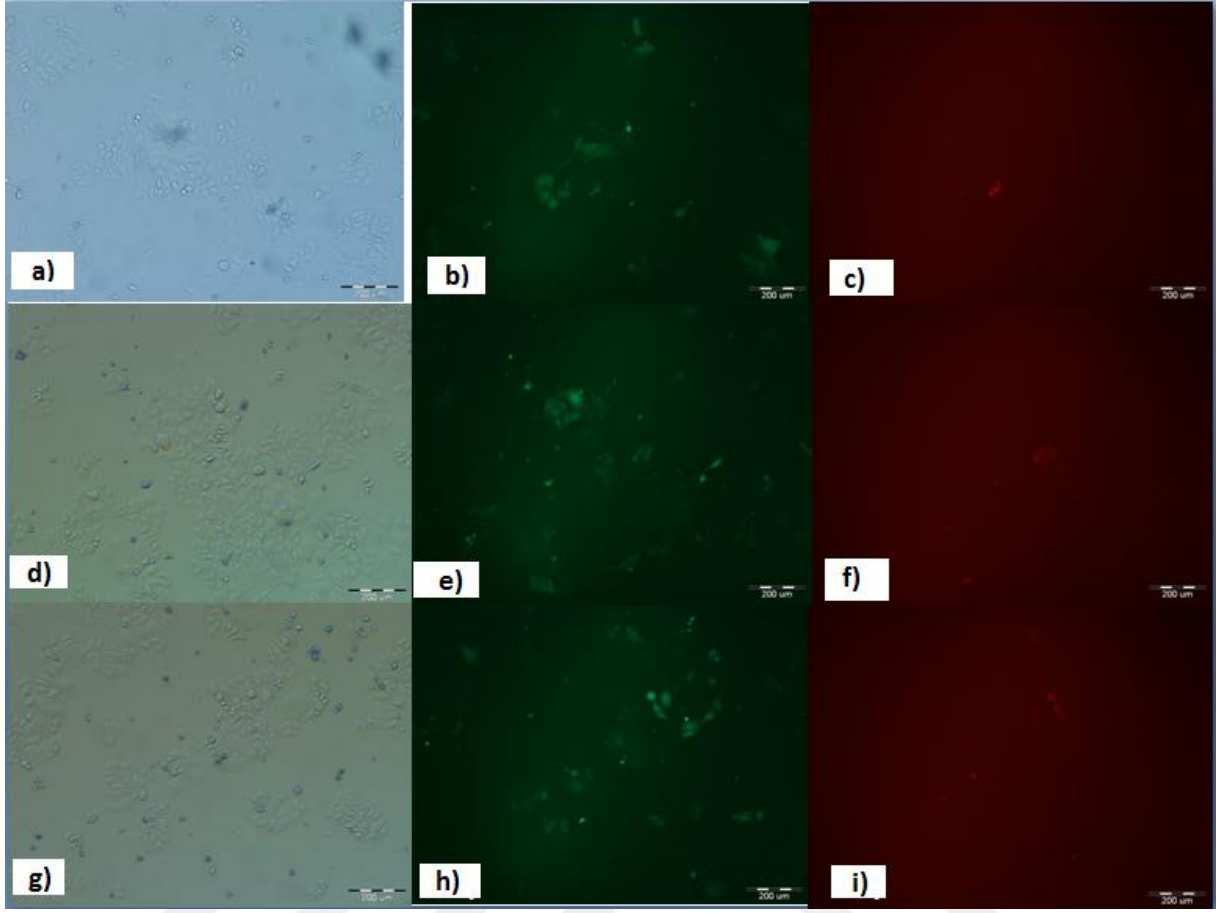
Altklonların metafaz incelemeleri sonucunda, 2N klonlar kararlı bir kromozom içeriği sergilerken (hücre popülasyonunun %50sinde modal kromozom sayısı 45 veya 46) 4N klonların çok çeşitli kromozom sayılarına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, üç 4N klon için de geçerlidir (Şekil 13).



Şekil 13. Her bir DLD-1 klonunun metafaz kromozom sayısını gösteren grafik

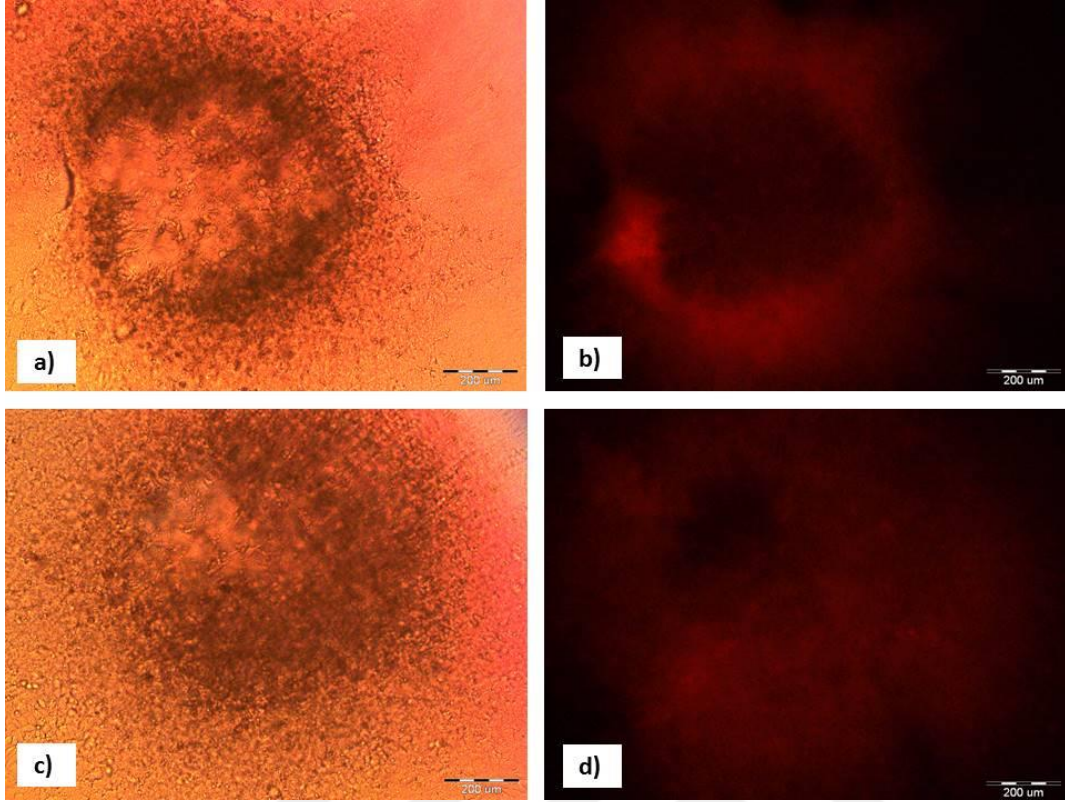
4.2. Stabil Fluoresan İşaretleme ve Kokültür Modelinin Oluşturulması

Altklonlardan biri (B9) seçilerek önce mCAT-1 reseptörünü kodlayan geni içeren plazmidle (GFP etiketli), ertesi gün (mCAT protein ekspresyonu fluoresan olarak gözlemlendikten sonra) retroviral vektörle (mCherry etiketli) transfecte edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. B9 altklonuna ait hücrelerin transfeksiyon sonrası ters fluoresan mikroskopta alınmış görüntüleri. a, d ve g aydınlık alan, b, e ve h GFP-mCAT ekspresyonunu, c, f ve i ise mCherry ekspresyonunu göstermektedir (ölçek çubuğu: 200 µm).

mCherry ekspresyonuna sahip hücrelerin seçilebilmesi amacıyla seri dilüsyon gerçekleştirilmiştir ve mCherry ekspresyonu elde edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Stabil transfekte edilmiş mCherry işaretli B9 altklon hücrelerine ait ters fluoresan mikroskop görüntüleri. a ve c aydınlık alan, b ve d mCherry ekspresyonunu göstermektedir.

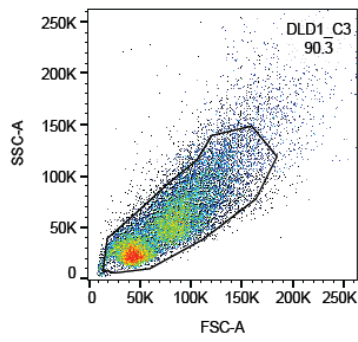
Bununla birlikte, izleyen haftalarda fluoresan sinyalde düşüş gözlenmiştir. Daha etkin bir etiketlemenin sağlanabilmesi amacıyla 1001 projemizin danışmanı Prof.Dr.Batu Erman ile iletişime geçilmiş ve lentiviral işaretleme yöntemine geçilmesine karar verilmiştir. Bir adet 2N (C3) ve bir adet 4N (B9) altklon Sabancı Üniversitesi'nde lentiviral yöntemle işaretlenmiştir.

Lentivirüs üretimi sonrasında virüs partikülü miktarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen titrasyon akış sitometri testi sonucunda elde edilen değerler Tablo 5'te verilmiştir.

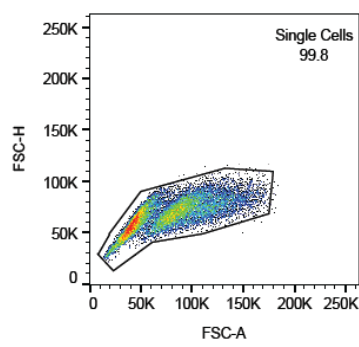
Tablo 5. Altklonların enfeksiyöz parçacık miktarları

Örnek	Enfeksiyöz parçacık/mL
G2 24 saat	1 160 000
G2 36 saat	2 481 667
T2 24 saat	935 500
T2 36 saat	888 500

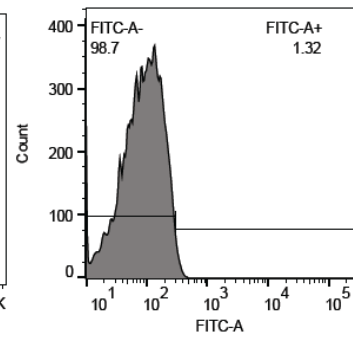
Lentiviral işaretleme sonrası gerçekleştirilen akış sitometri analizi sonucunda sinyal yoğunluklarının yüksek olmasından dolayı selektif ortamın kesilmesine karar verilmiştir (Şekil 16).



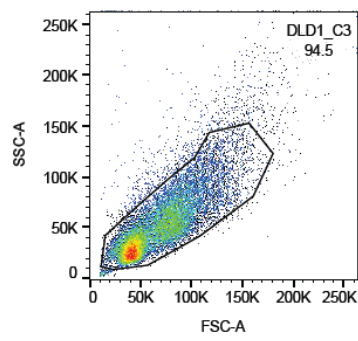
DLD1_C3_C3_WT1.fcs
Ungated
19601



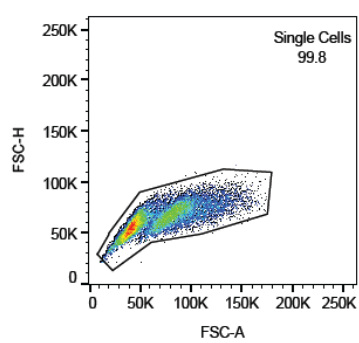
DLD1_C3_C3_WT1.fcs
DLD1_C3
18025



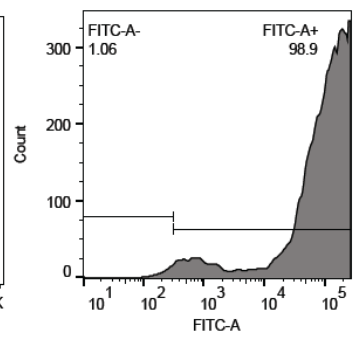
DLD1_C3_C3_WT1.fcs
Single Cells
17685



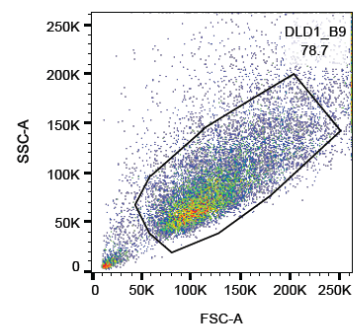
DLD1_C3_C3_LegoG2puro1.fcs
Ungated
23114



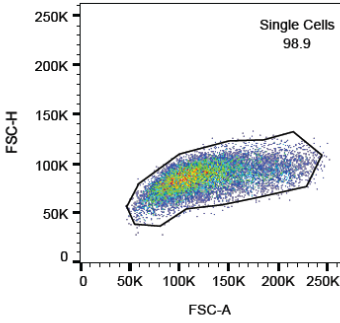
DLD1_C3_C3_LegoG2puro1.fcs
DLD1_C3
21850



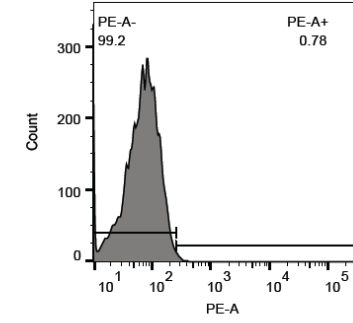
DLD1_C3_C3_LegoG2puro1.fcs
Single Cells
21817



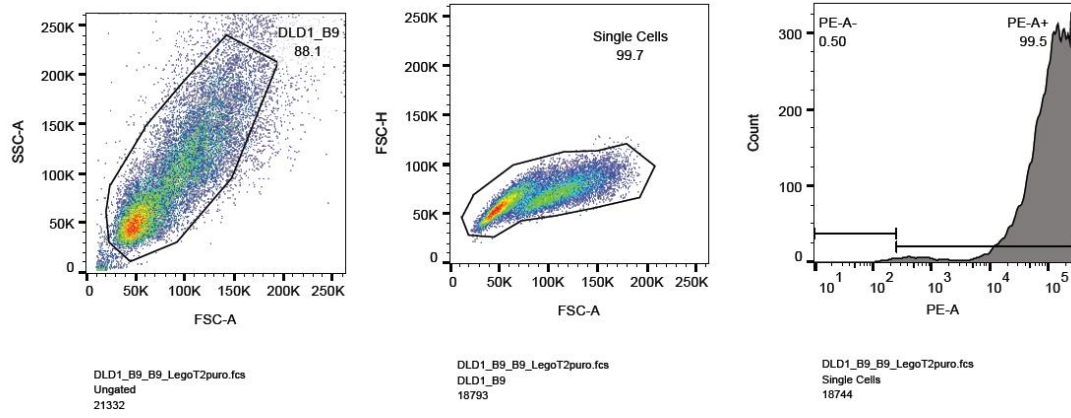
DLD1_B9_B9_WT.fcs
Ungated
13869



DLD1_B9_B9_WT.fcs
DLD1_B9
10917

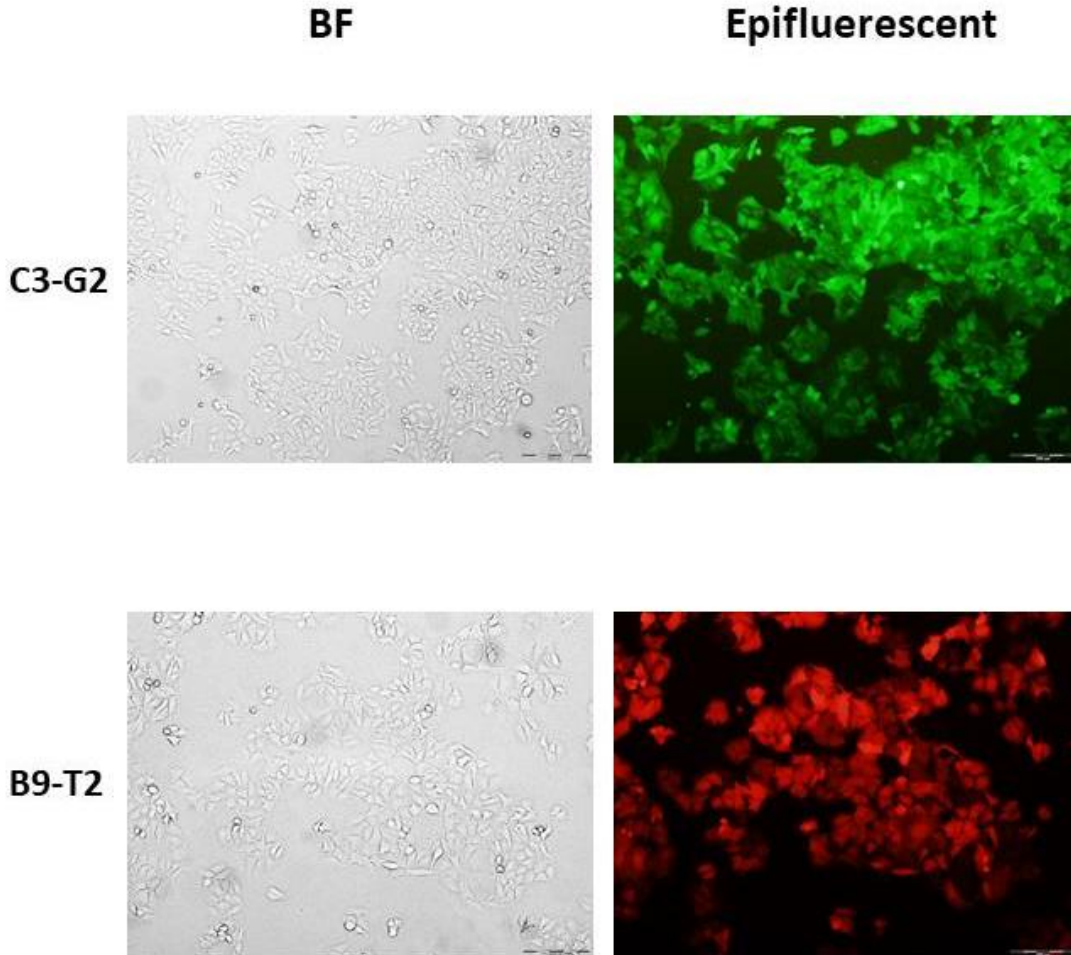


DLD1_B9_B9_WT.fcs
Single Cells
10794



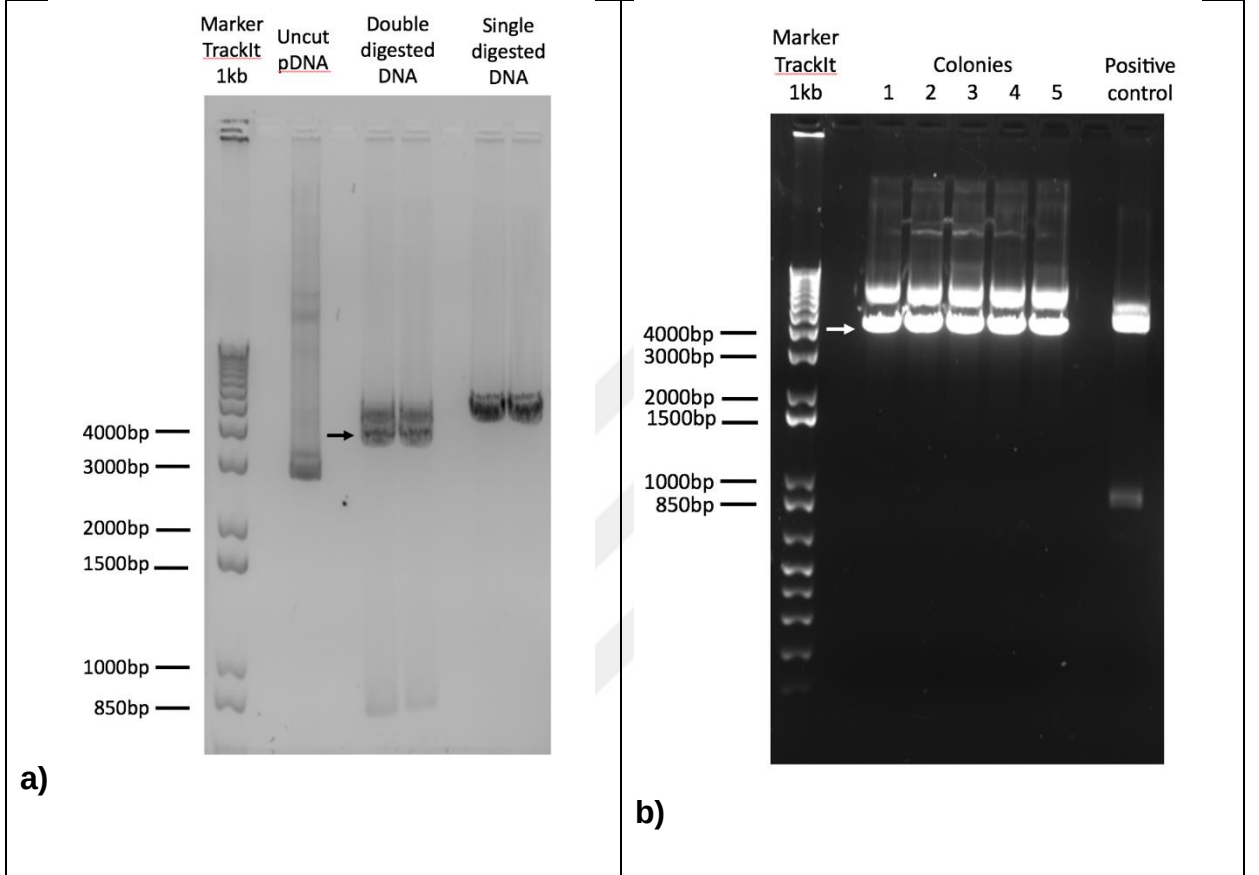
Şekil 16. Lentiviral işaretleme sonrası elde edilen akış sitometrisi sonuç grafikleri

Ters fluoresan mikroskopta, işaretli altklonların görüntüleri alınmıştır (Şekil 17).



Şekil 17. İşaretlenen altklonların fluoresan mikroskopi görüntüleri

Mavi ve sarı lentiviral partiküllerin laboratuvarımıza tesliminin gecikmesi üzerine, altklonların konvansiyonal bakteriyel transfeksiyon yöntemiyle işaretlenmesine karar verilmiştir. Bu amaca yönelik olarak, transfeksiyon kontrolü olarak hazırlanan boş vektörün konfirmasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 18).

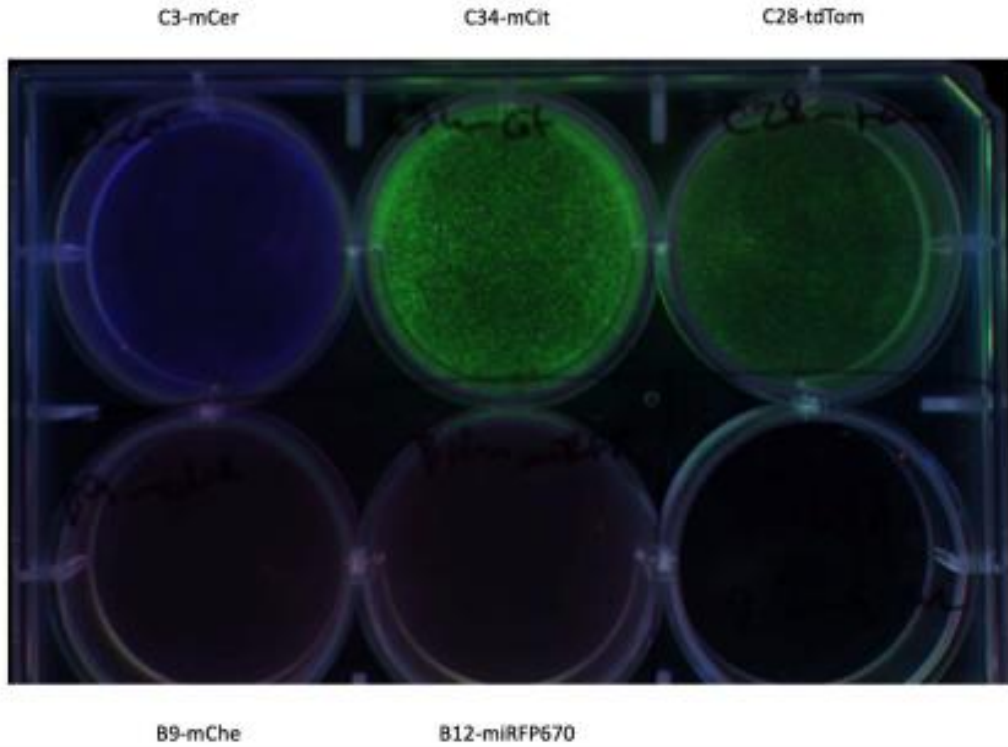


c)

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
empty vector 1	Default	6/21/2018	1:09 PM	451.91	9.038	4.790	1.89	2.21	50.00	229	4.084	0.088
empty vector 1-2	Default	6/21/2018	1:10 PM	451.14	9.023	4.796	1.88	2.20	50.00	229	4.107	0.115
empty vector 2	Default	6/21/2018	1:11 PM	492.42	9.848	5.231	1.88	2.20	50.00	229	4.467	0.121
empty vector 2-2	Default	6/21/2018	1:11 PM	491.31	9.826	5.190	1.89	2.19	50.00	229	4.479	0.109
empty vector3	Default	6/21/2018	1:12 PM	505.92	10.118	5.382	1.88	2.20	50.00	229	4.594	0.155
empty vector3-2	Default	6/21/2018	1:12 PM	502.69	10.054	5.343	1.88	2.21	50.00	229	4.556	0.168
empty vector 4	Default	6/21/2018	1:13 PM	494.82	9.896	5.236	1.89	2.19	50.00	229	4.518	0.062
empty vector 4-2	Default	6/21/2018	1:13 PM	494.78	9.896	5.252	1.88	2.16	50.00	229	4.576	0.134
empty vector 5	Default	6/21/2018	1:14 PM	514.76	10.295	5.479	1.88	2.14	50.00	229	4.821	0.093
empty vector 5-2	Default	6/21/2018	1:15 PM	517.31	10.346	5.508	1.88	2.16	50.00	229	4.804	0.093

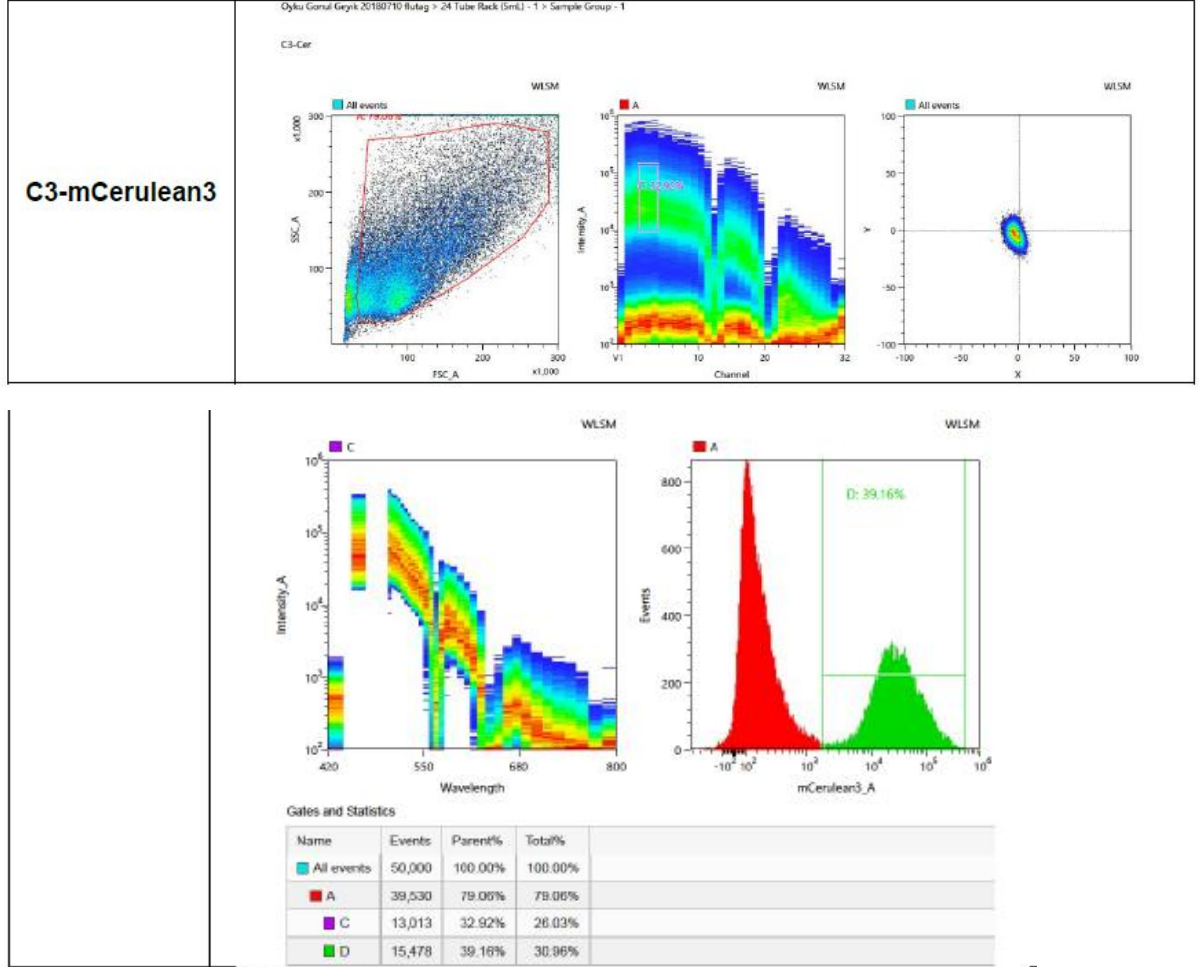
Şekil 18. a) mCitrine'in eksizyonu b) Boş vektör pDNA'nın diyagnostik kesimi c) Transforme edilen kolonilerden izole edilen pDNA'nın spektrofotometrik ölçümü

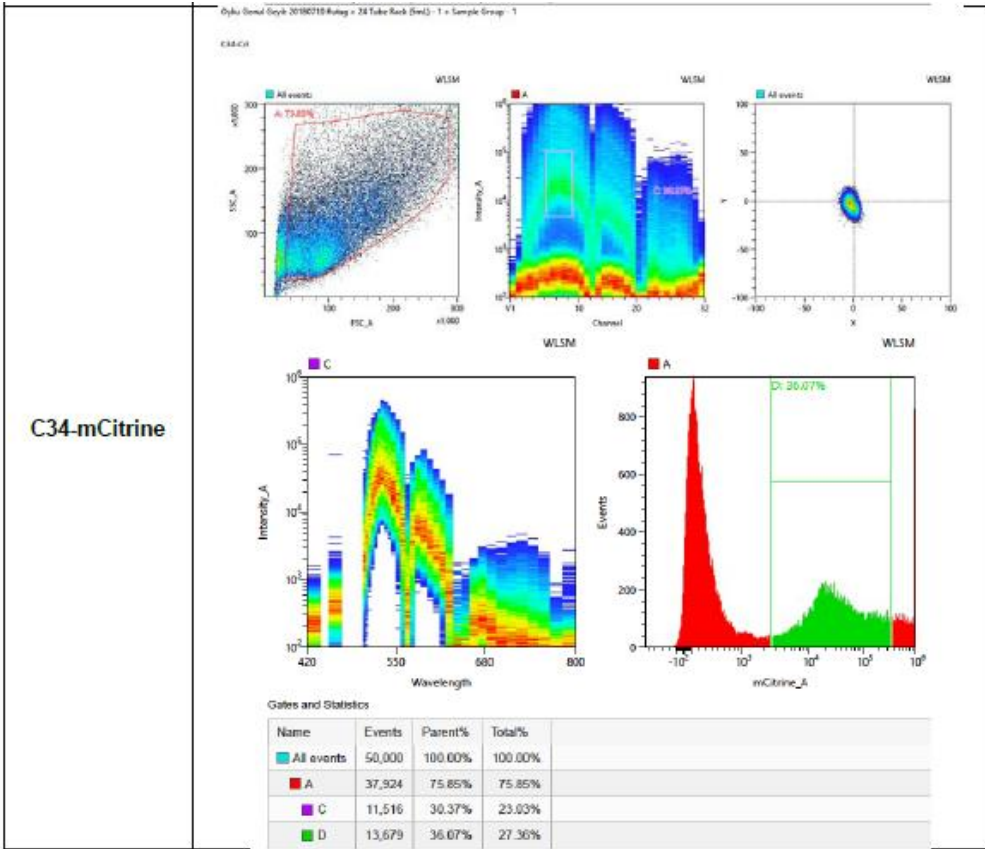
Transfeksiyon sonrası hücrelerin seçilimi bir ay boyunca sürdürülmüş ve ayın sonunda hücrelerin ters fluoresan mikroskop ve C600 görüntüleme sistemi ile görüntüleri alınmıştır (Şekil 19).

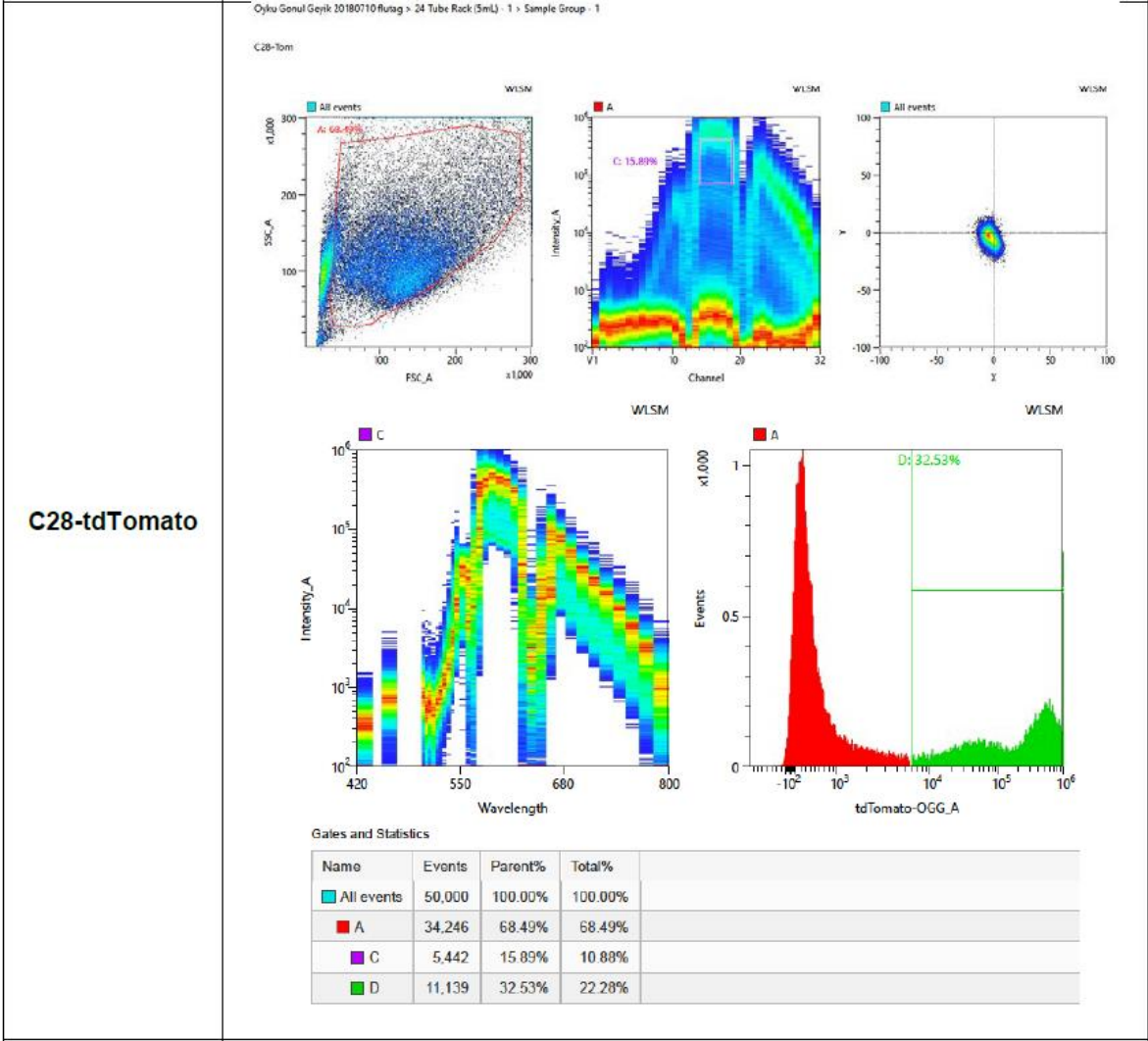


Şekil 19. Transfekte klonların ters fluoresan mikroskop görüntüsü

Fluoresan hücre sayıları akım sitometrisi ile ölçülmüştür (Şekil 20).



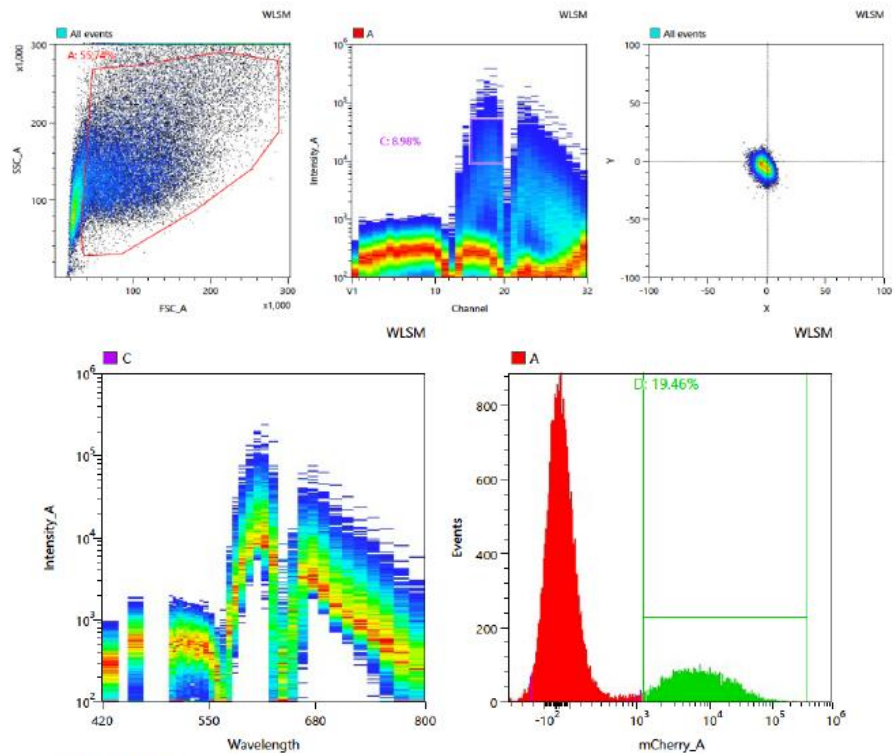




B9-mCherry2

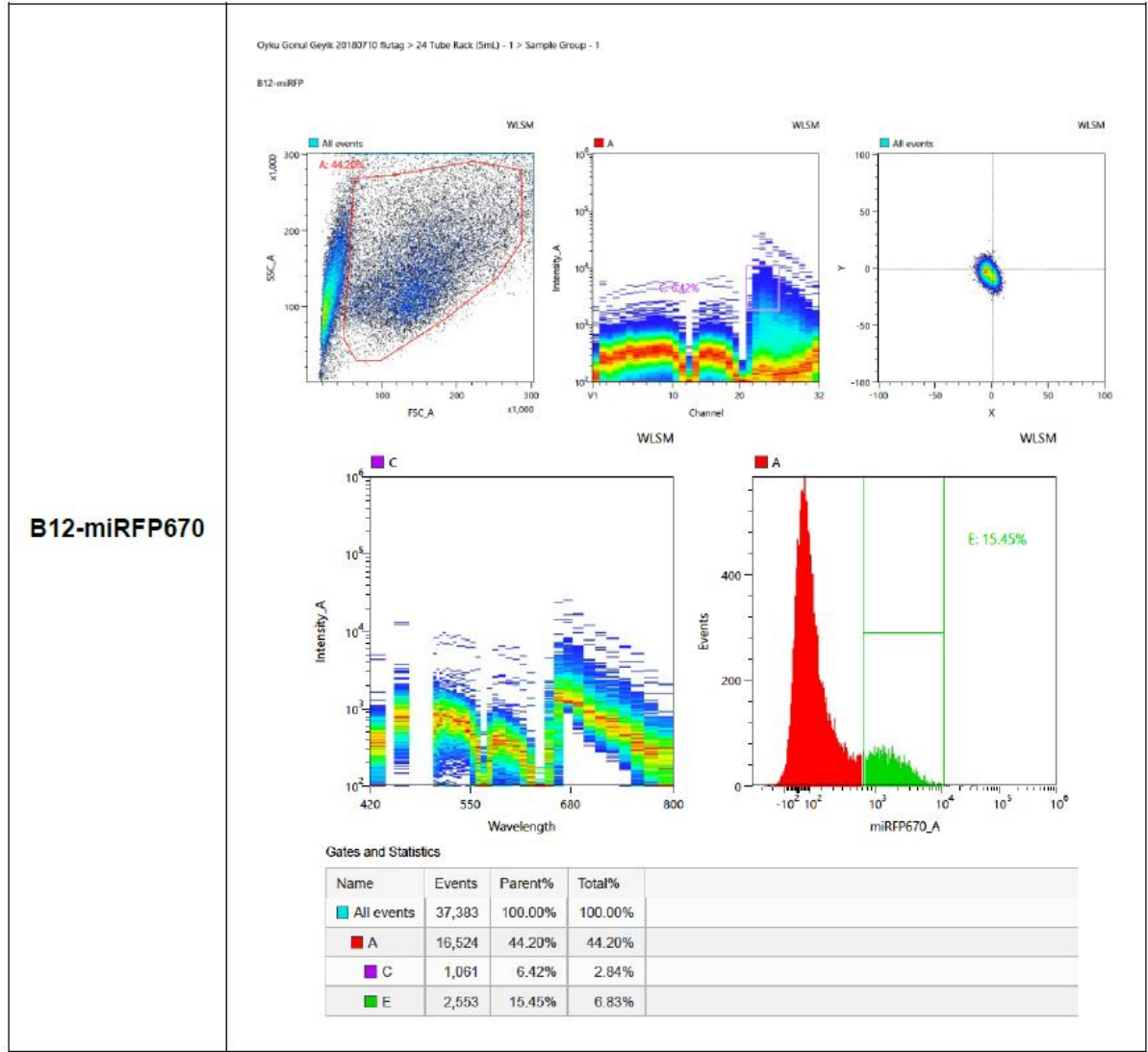
Oyku Gonul Geyik 20180710 flutag > 24 Tube Rack (Sml) - 1 > Sample Group - 1

B9-Che



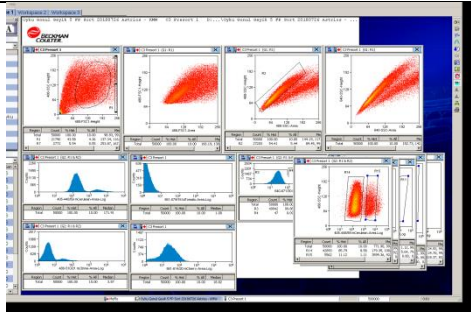
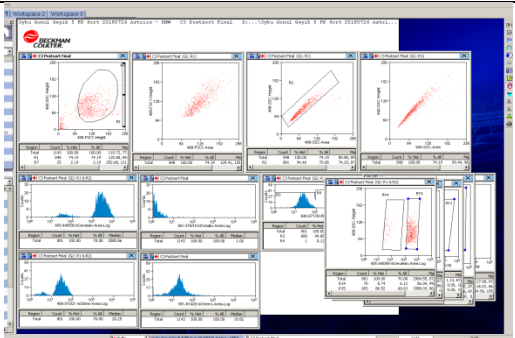
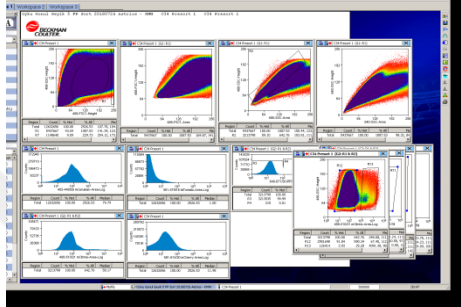
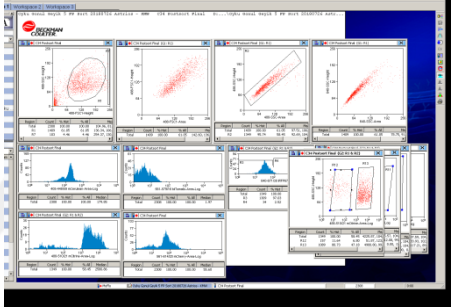
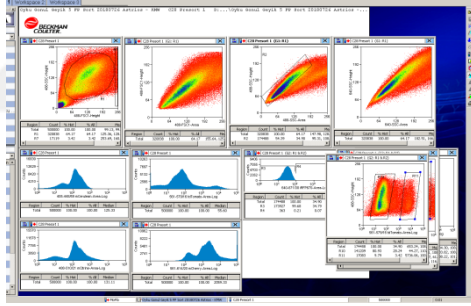
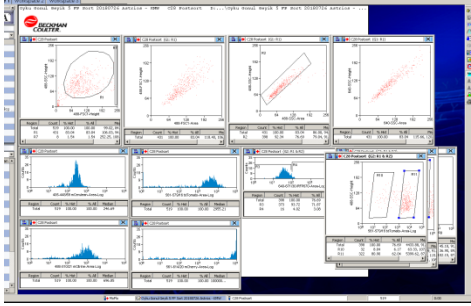
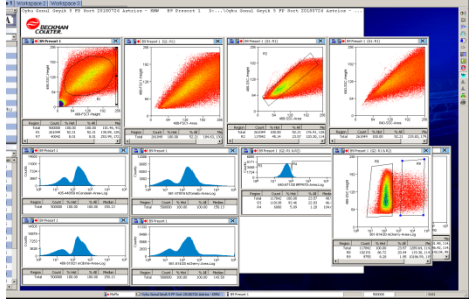
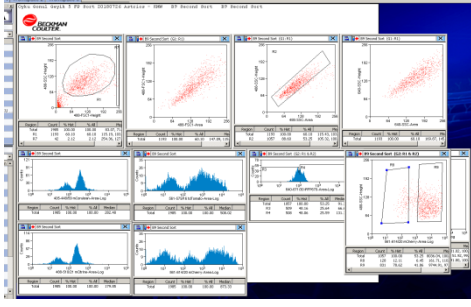
Gates and Statistics

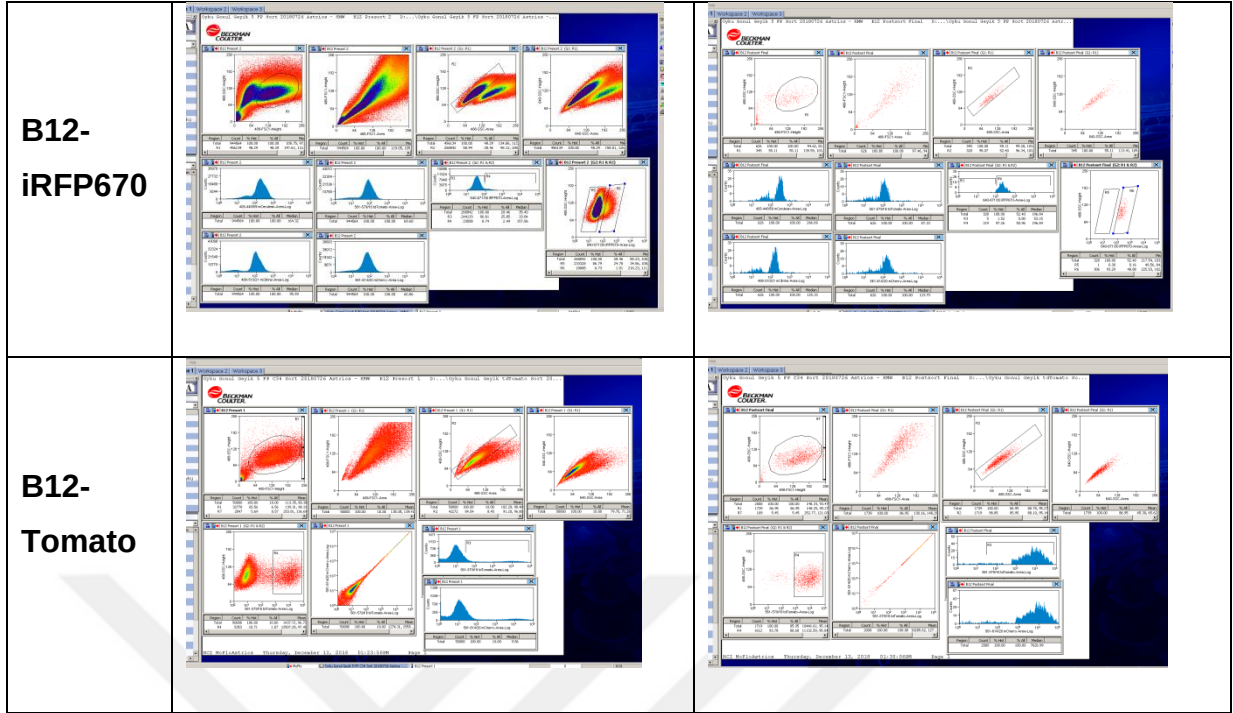
Name	Events	Parent%	Total%	
All events	50,000	100.00%	100.00%	
A	27,872	55.74%	55.74%	
C	2,504	8.98%	5.01%	
D	5,425	19.46%	10.85%	



Şekil 20. Floresan DLD-1 klonlarının akış sitometrisi histogramları ve yüzdeleri

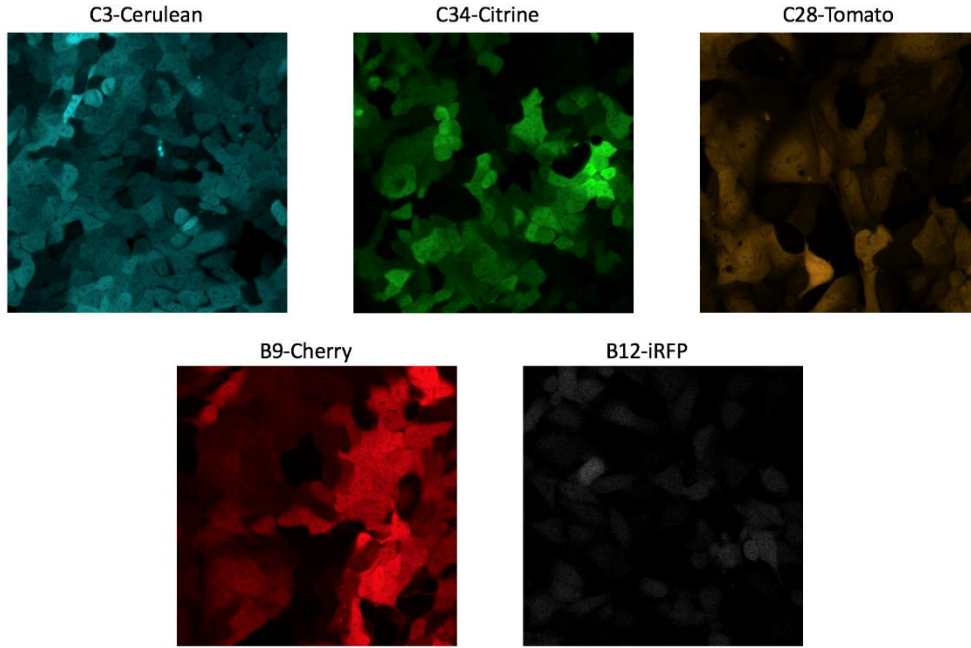
Akış sitometri sonuçlarına göre tüm DLD-1 klonlarında floresan genlerin stabil transfeksiyonunun gerçekleştiği bir grup hücre bulunmaktadır. Bir sonraki adımda, bu floresan populasyonlar Floresan-Aktive Hücre Ayırıştırma (FACS) yöntemi ile izole edilip kültüre edilmiştir (Şekil 21). Böylelikle stabil transfekte floresan protein ekspresyonuna sahip altklonlar elde edilmiştir. Bu hücrelerin kültür idameleri daima 0,2 mg/mL G418 içeren tam RPMI-1640 ile gerçekleştirilmiştir.

	Ayrıştırma öncesi (Presort)	Ayrıştırma sonrası (Postsort)
C3- Cerulean		
C34- Citrine		
C28- Tomato		
B9- Cherry		



Şekil 21. FACS yöntemi ile fluoresan sinyale sahip altklon hücrelerinin seçimi

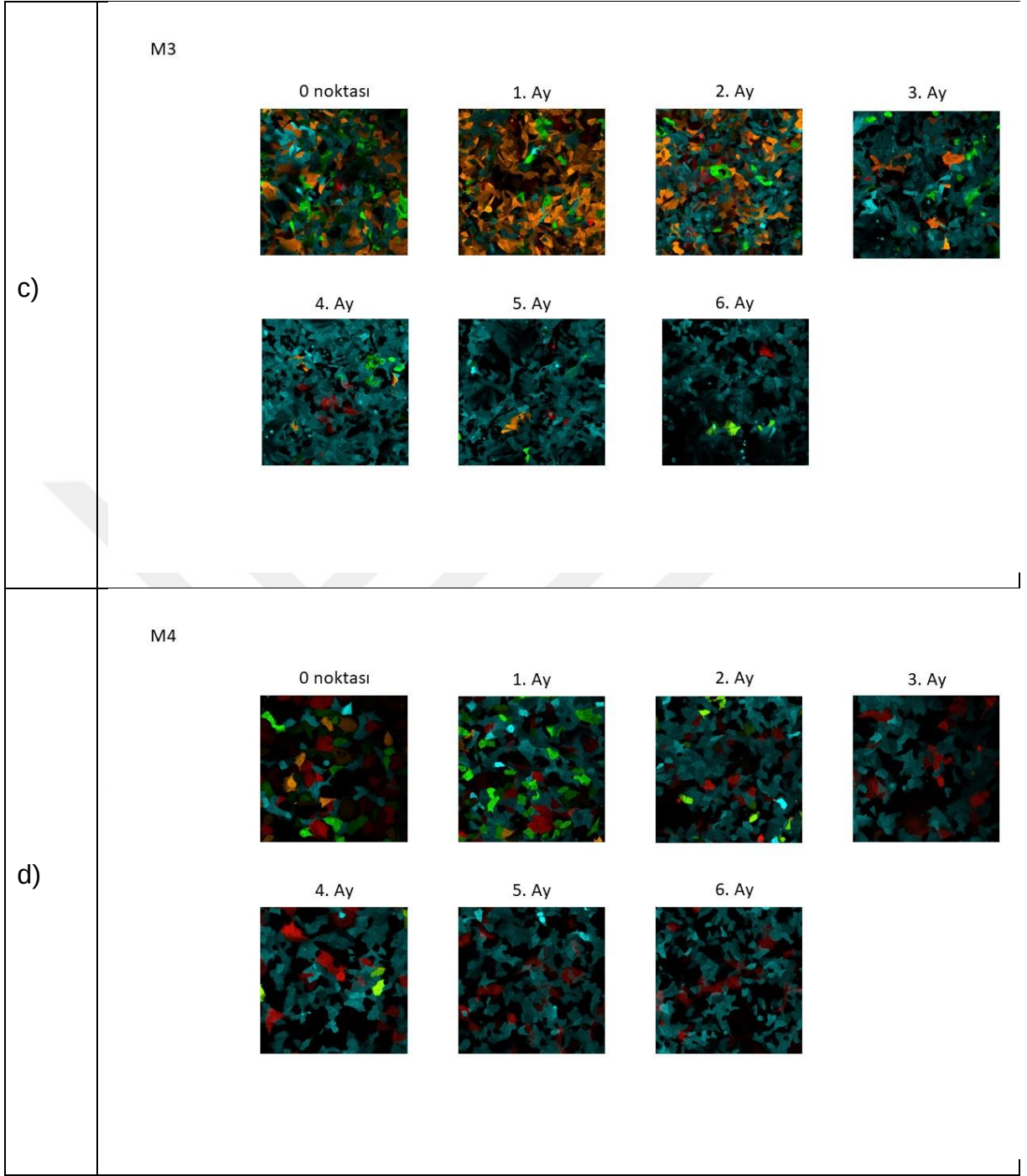
Elde edilen stabil transfekte altklonların konfokal mikroskopi görüntüleri Şekil 22’de verilmiştir.



Şekil 22. DLD-1 altklonlarının fluoressan işaretlenmesi sonucu elde edilen konfokal fluoressan mikroskopi görüntüleri

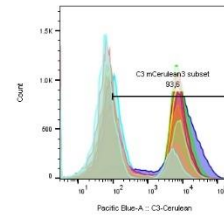
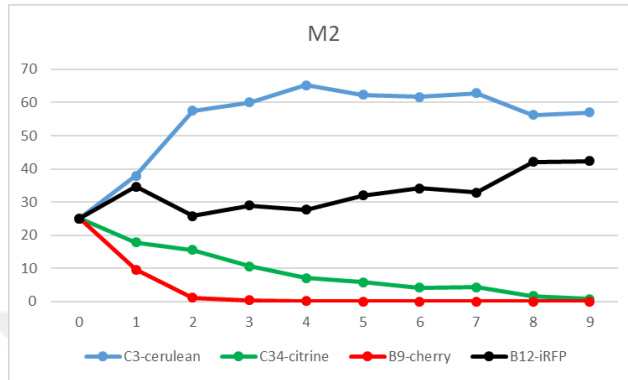
Stabil fluoressan ekspresyonu sağlanan altklonların eşit sayıda karıştırılarak kokültüre edildiği kombinasyonlar zamana bağlı olarak, konfokal mikroskopi (Şekil 23) ve akış sitometrisi (Şekil 24) kullanılarak izlenmiştir. miRFP670 kızılötesi proteininin ışım gücü çok düşük olduğundan 2 adet 2N+2 adet 4N karışımında (M4) kullanmak üzere, B12 altklonu tdTomato ile de işaretlenmiştir. Bu karışımında C28 yerine B12 altklonun kullanılma nedeni, CGH sonuçları göz önüne alındığında B12 altklonunun kolorektal kanserleri C28’den daha iyi temsil ediyor olmasıdır. Kolorektal karsinomalarda genellikle 7p kazanımı varken, C28 altklonunda 7p kaybı bulunmaktadır.

a)	M1 0 noktası 1. Ay 2. Ay 3. Ay 4. Ay 5. Ay 6. Ay 7. Ay
b)	M2 0 noktası 1. Ay 2. Ay 3. Ay 4. Ay 5. Ay 6. Ay

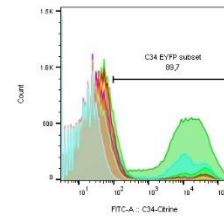


Şekil 23. Stabil fluoresan DLD-1 altklonlarından oluşturulan a) M1 b) M2 c) M3 d) M4 karışımlarına ait kokültürlerin zamana bağlı olarak alınan konfokal mikroskopi görüntüleri

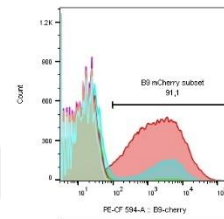
b)



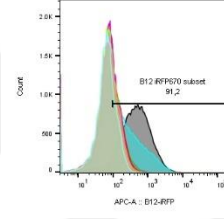
Sample Name	
7-11-19 MG MG-Imm_911.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_910.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_909.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_908.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_907.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_906.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_905.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_904.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_903.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_902.fcs	
Cooperatative Controls_C3 mCerulean3 Pacific Blue Stained Control_902.fcs	



Sample Name	
7-11-19 MG MG-Imm_911.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_910.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_909.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_908.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_907.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_906.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_905.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_904.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_903.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_902.fcs	
Cooperatative Controls_C34 EYFP FITC Stained Control_902.fcs	

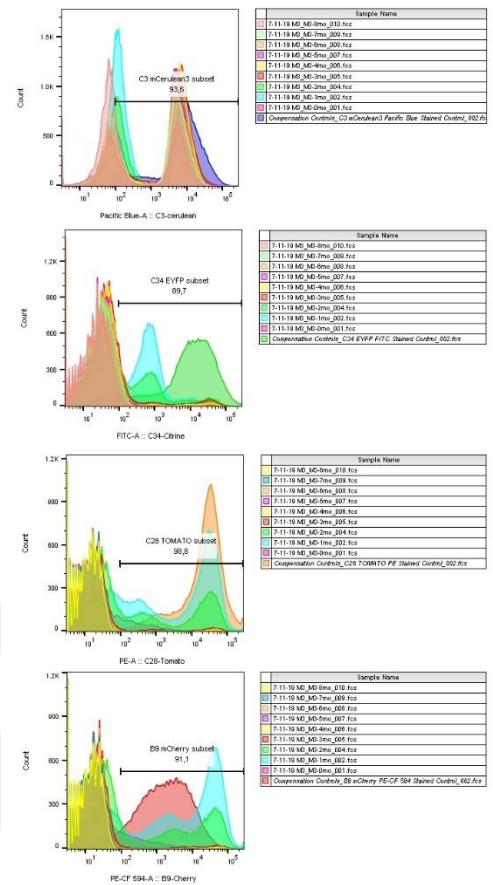
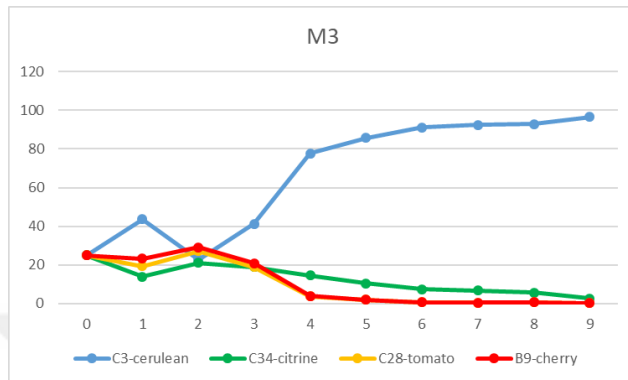


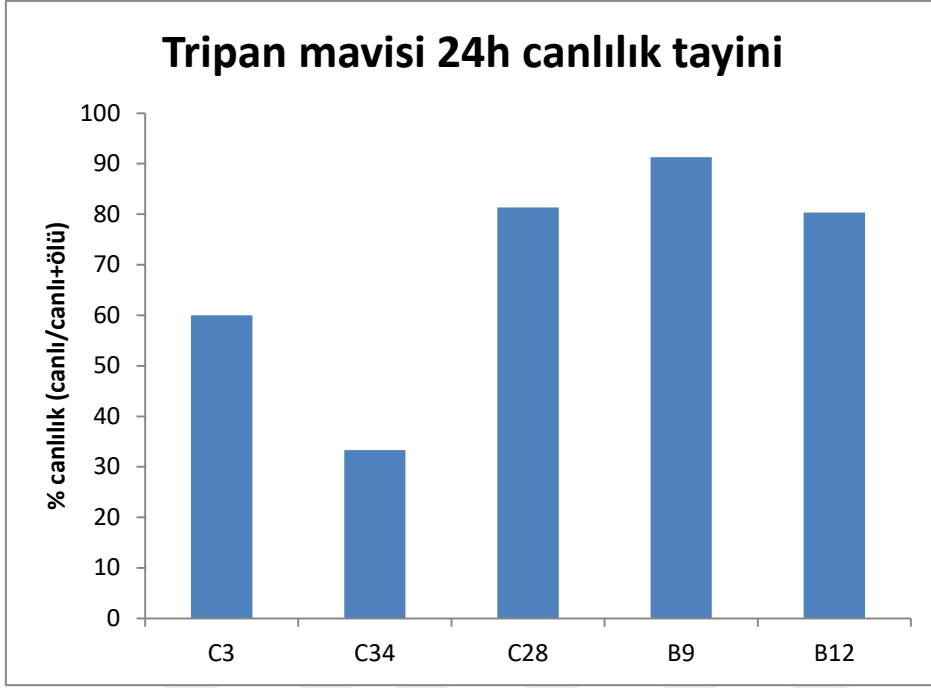
Sample Name	
7-11-19 MG MG-Imm_911.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_910.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_909.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_908.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_907.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_906.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_905.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_904.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_903.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_902.fcs	
Cooperatative Controls_B9 mCherry PE-CF 594 Stained Control_902.fcs	



Sample Name	
7-11-19 MG MG-Imm_911.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_910.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_909.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_908.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_907.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_906.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_905.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_904.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_903.fcs	
7-11-19 MG MG-Imm_902.fcs	
Cooperatative Controls_B12-RFP APC Stained Control_902.fcs	

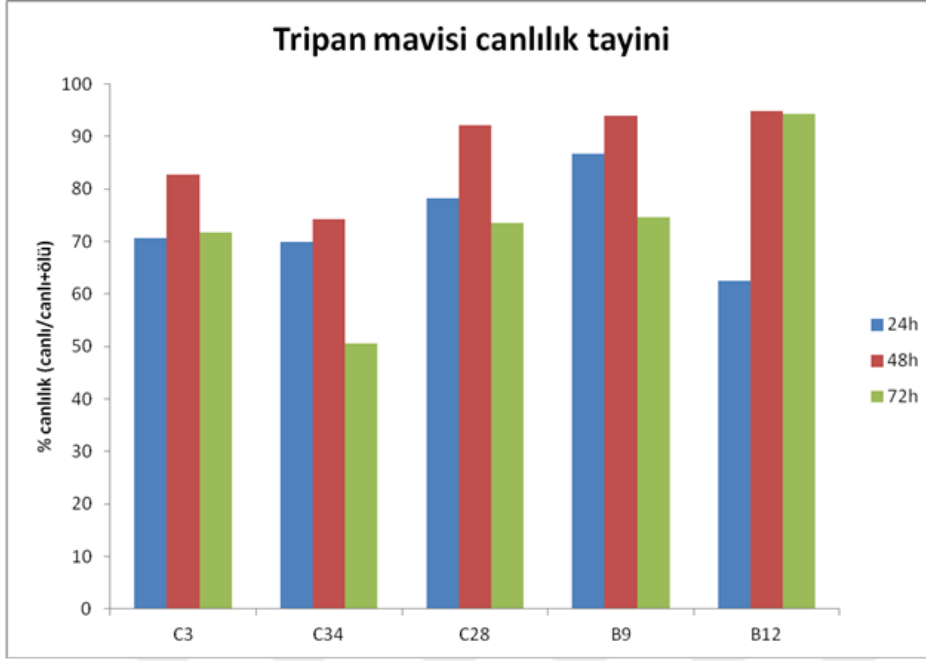
c)





Şekil 25. Altklonlara ait hücrelerin zamana bağlı % canlılık değişimi

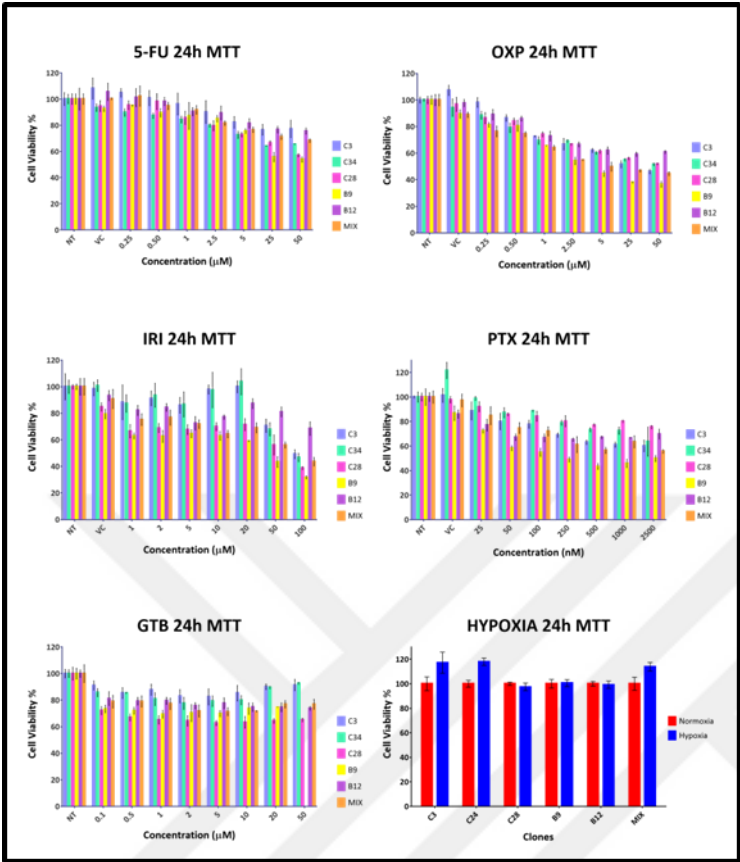
Tripan mavisi ile hücre canlılık testleri 48. ve 72. saatler için tekrarlanmıştır. Sonuçların 24 saat verileriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir ($4N > 2N$). İlgili grafik Şekil 26'da verilmiştir.



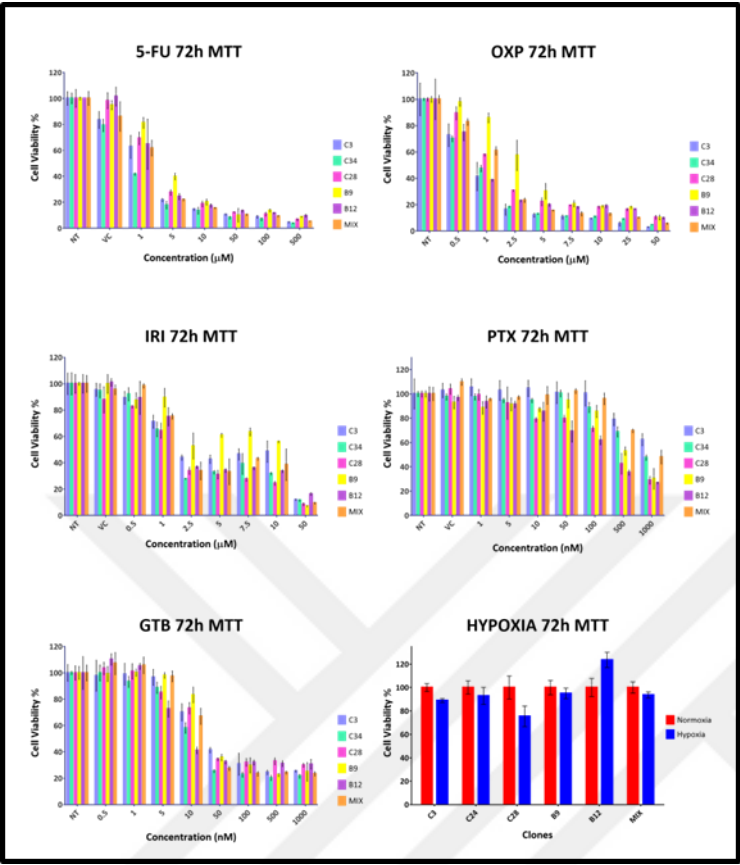
Şekil 26. Tripın mavisi 24, 48 ve 72 saat hücre canlılık grafikleri

DLD-1 altklonlarının, normal koşullarda ve terapi etkisinde canlılık tayini MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 27). Genel olarak, aynı terapötik konsantrasyonu altında 4N klonlar, 2N klonlara göre daha yüksek canlılığa sahiptir. Özellikle B9 klonu 5-FU, OXP, IRI ve GTB'ye karşı oldukça dirençli olarak öne çıkmaktadır. PTX'in ise 4N klonları 2N klonlardan daha çok etkilediği görülmektedir. C3, C34 ve B9 klonlarının hücre canlılıkları, hipoksiden yüksek düzeyde etkilenmemiştir. C28 ve B12 ise farklı yanıtlar vermiştir. Radyasyon 24 saatte belirgin bir etkiye neden olmazken 72 saat ve 144 saat inkübasyon sonucunda 4N altklonları daha az etkilediği gözlenmiştir.

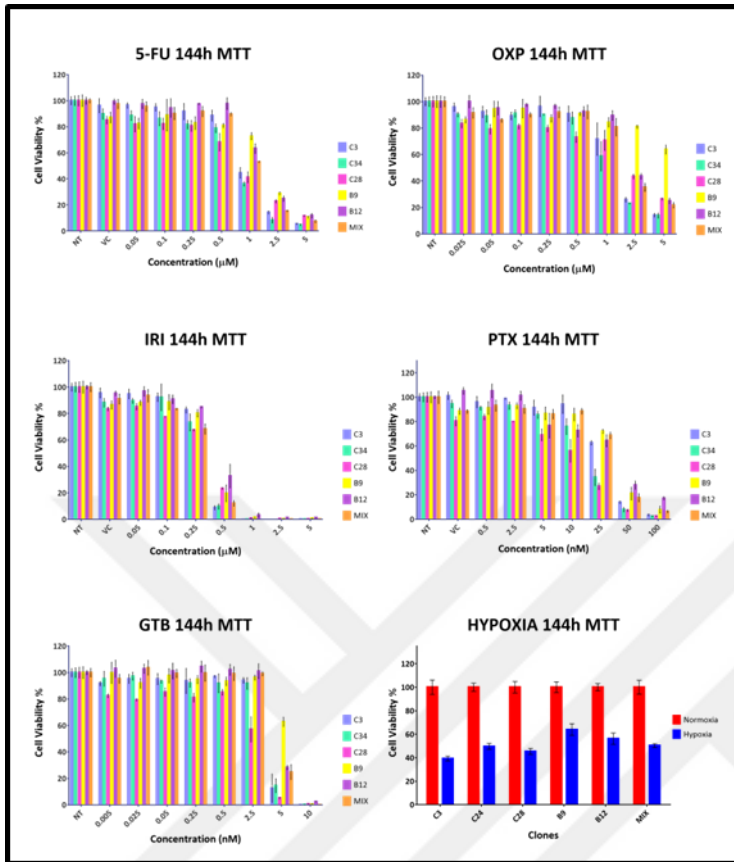
a)



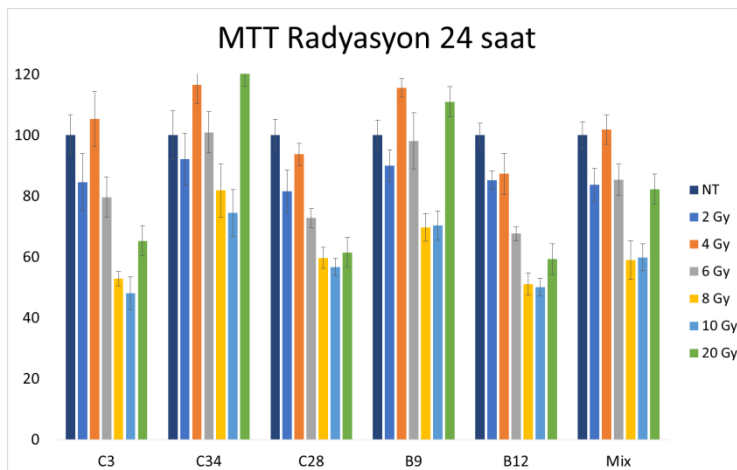
b)



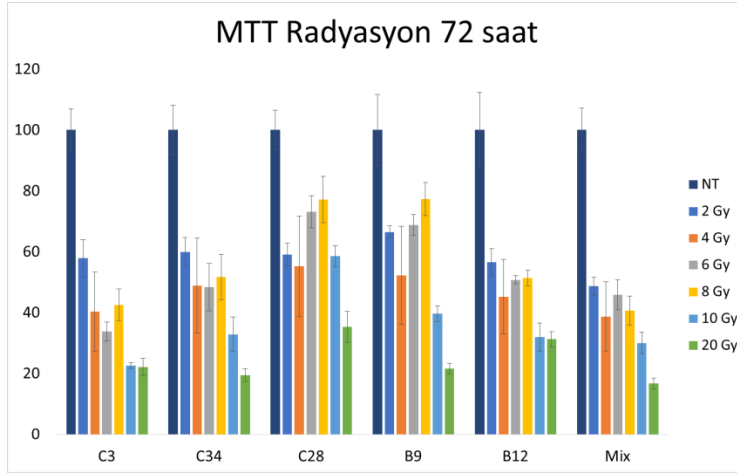
c)



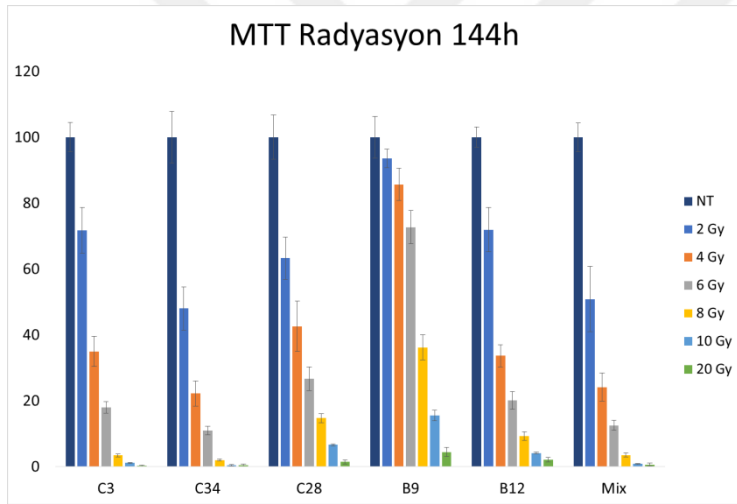
d)



e)



f)



Şekil 27. DLD-1 altklonlarının a) 24 saat b) 72 saat c) 144 saat zaman noktalarında kemoterapötikler ve hipoksi etkisi d) 24 saat e) 72 saat f) 144 saat zaman noktalarında radyasyon etkisi altında MTT canlılık tayini sonuçları

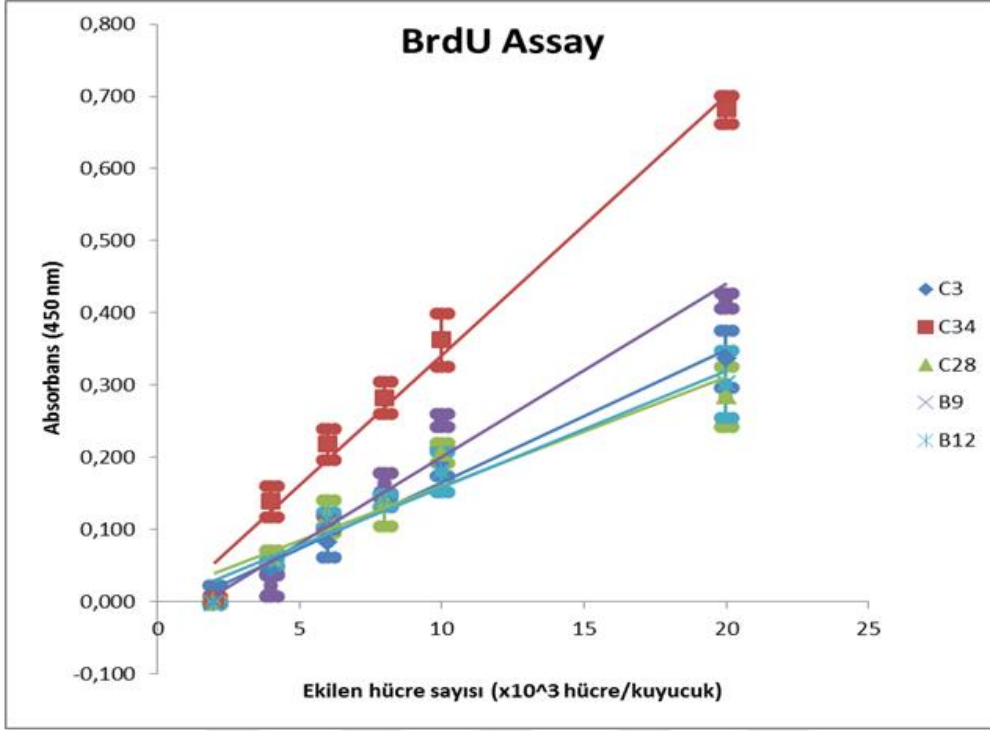
Canlılık tayini verilerine dayanarak her bir ilaç için, alt akım deneylerde kullanılmak üzere, en hassas klona göre IC_{50} değerleri belirlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Kemoterapötikler ve radyoterapinin 24, 72 ve 144 saat inkübasyon zamanlarında IC₅₀ değerleri ve kullanıldıkları denemeler

	IC ₅₀		
	24 saat	72 saat	144 saat
5-FU	50 µM	2 µM	1 µM
OMP	5 µM	2 µM	2 µM
IRI	50 µM	2,5 µM	0,35 µM
PTX	200 nM	600 nM	15 nM
GTB	100 µM	20 nM	3,5 nM
Radyasyon	10 Gy	3 Gy	2 Gy
Kullanıldığı deneme	Invazyon	Yara kapama	Koloni oluşturma, Sferoid oluşturma

4.3.2. Proliferasyon yeteneklerinin belirlenmesi

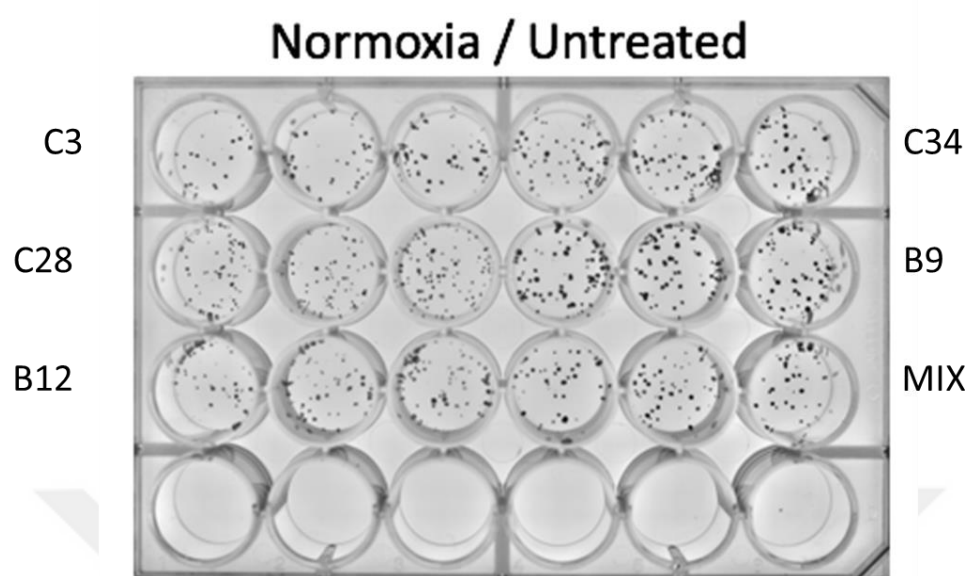
BrdU inkorporasyon denemesine göre altklonların proliferasyon hızları; C34>B9>C3>B12>C28 şeklindedir. B9 altklonu hariç, 2N altklonların 4N altklonlardan daha yüksek proliferasyon hızına sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 28).



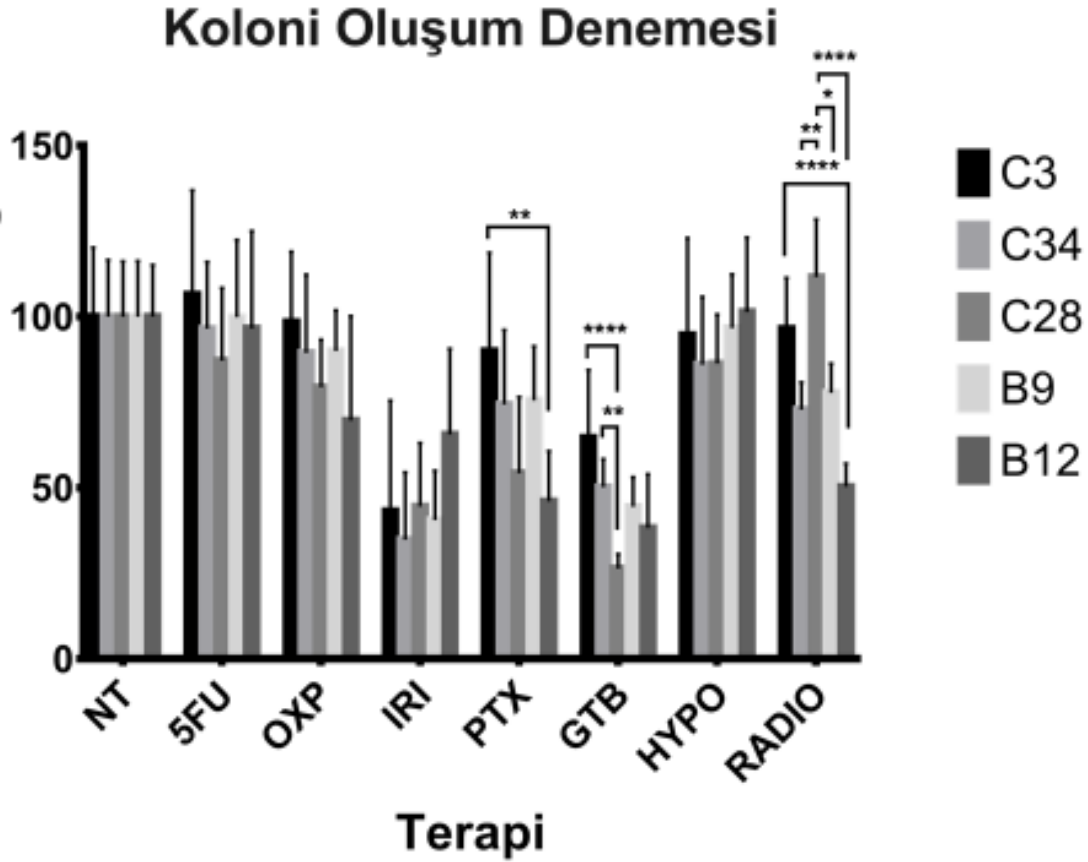
Şekil 28. DLD1 altklonlarıyla gerçekleştirilen BrdU hücre proliferasyon denemesi sonucu

DLD-1 altklonlarının klonojenik yeteneklerinin belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen koloni oluşturma denemelerinin plaka görüntüleri ve koloni sayım sonuçları Şekil 29'da verilmiştir.

a)



b)



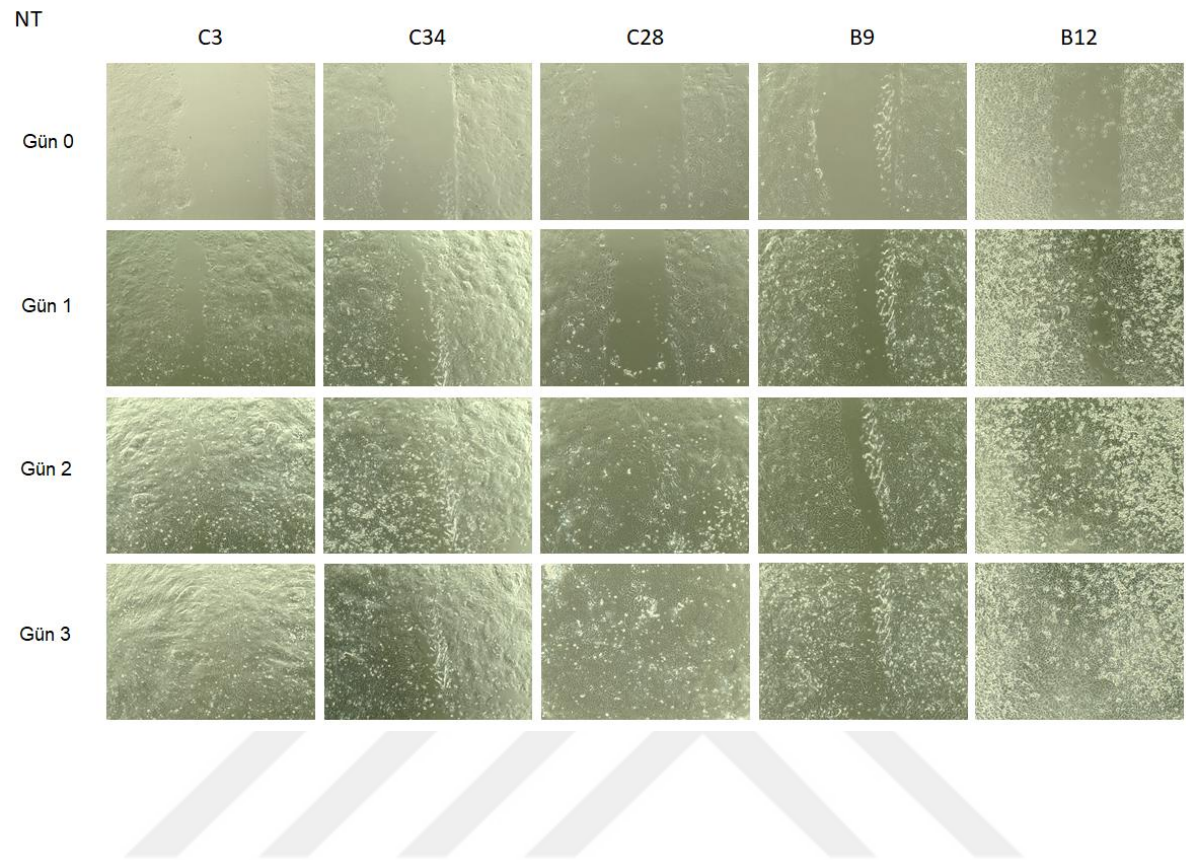
Şekil 29. DLD-1 altklonlarının a) terapi etkisinin olmadığı durumda oluşan kolonileri gösteren plaka görüntüsü b) kemoterapötikler, radyasyon ve hipoksi etkisi altında oluşturduğu kolonilerin 3 bağımsız deneme ortalamasını gösteren grafik

CFA deney sonuçları, stresörlerin olmadığı durumda 4N altklonların daha büyük koloniler oluştururken stresörlerden (kemoterapi, radyoterapi ve hipoksi) 2N altklonlara göre daha çok etkilendiklerini ve genel olarak daha az sayıda koloni oluşturduklarını göstermektedir. Irinotekan etkisi ve hipoksi etkisi altında B12 altklonunun verdiği sonuçlar bu durumlara istisnadır, bununla birlikte bu farklanmalar anlamlı düzeyde değildir.

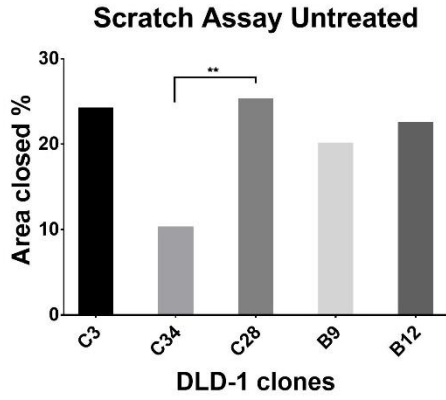
4.3.3. Migrasyon yeteneklerinin değerlendirilmesi

Klonların migrasyon yetenekleri, çizik kapama yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 30a). Normal koşullar altında 4N klonlar, 2N klonlardan daha migratuardır (30b). Terapi etkileri altında ise en migratuar klon C28'dir (30c).

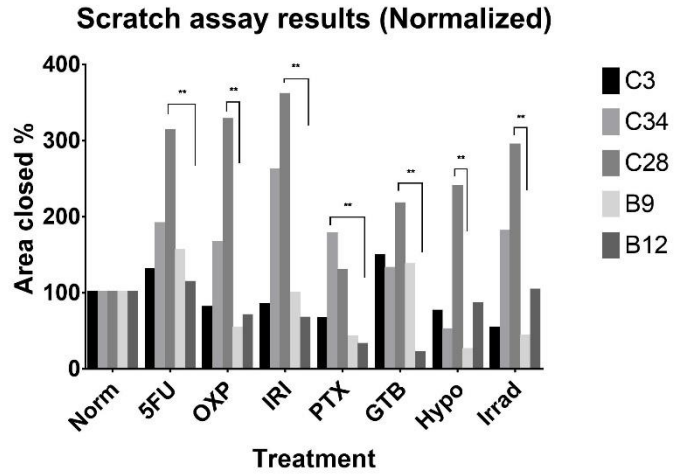
a)



b)



c)

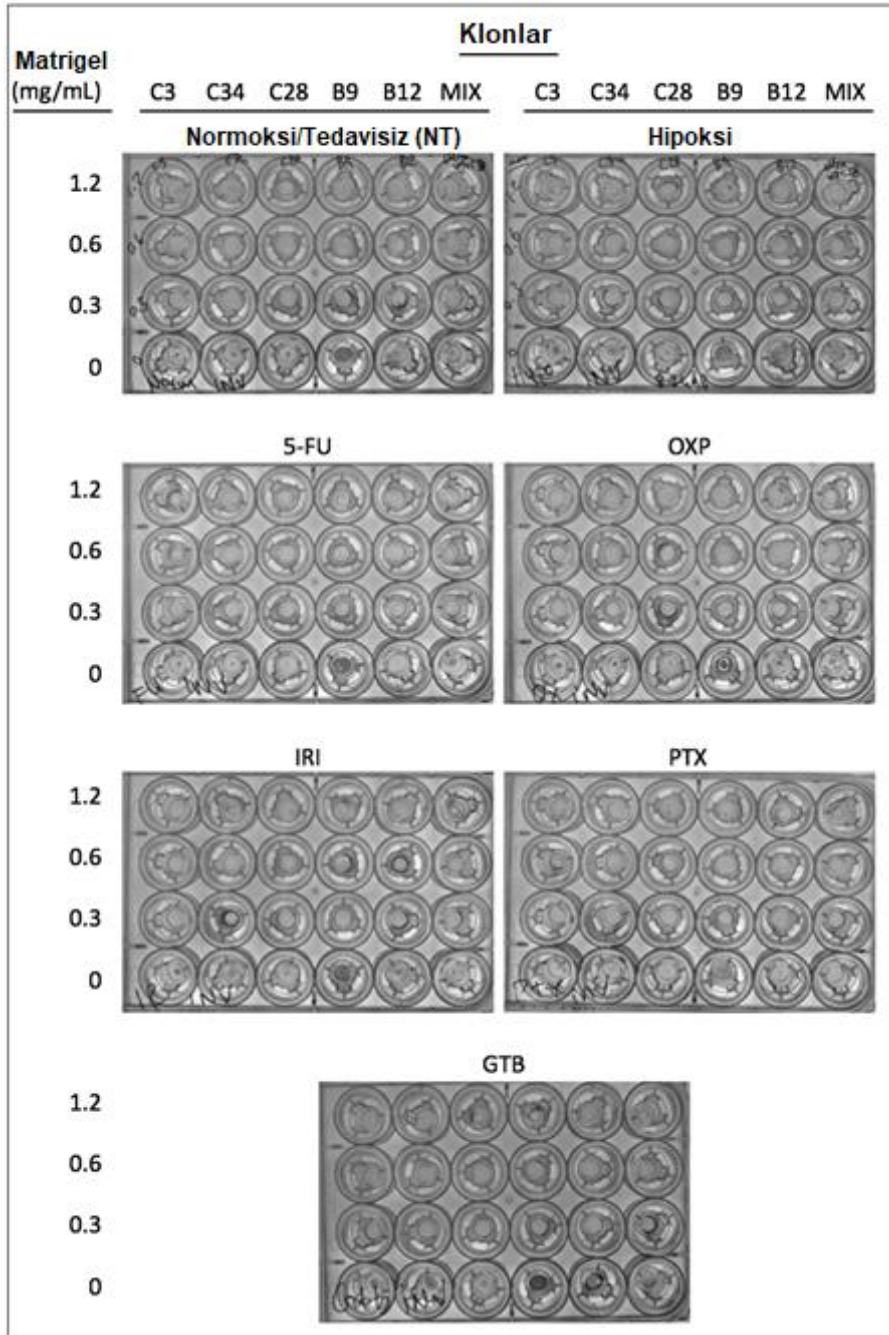


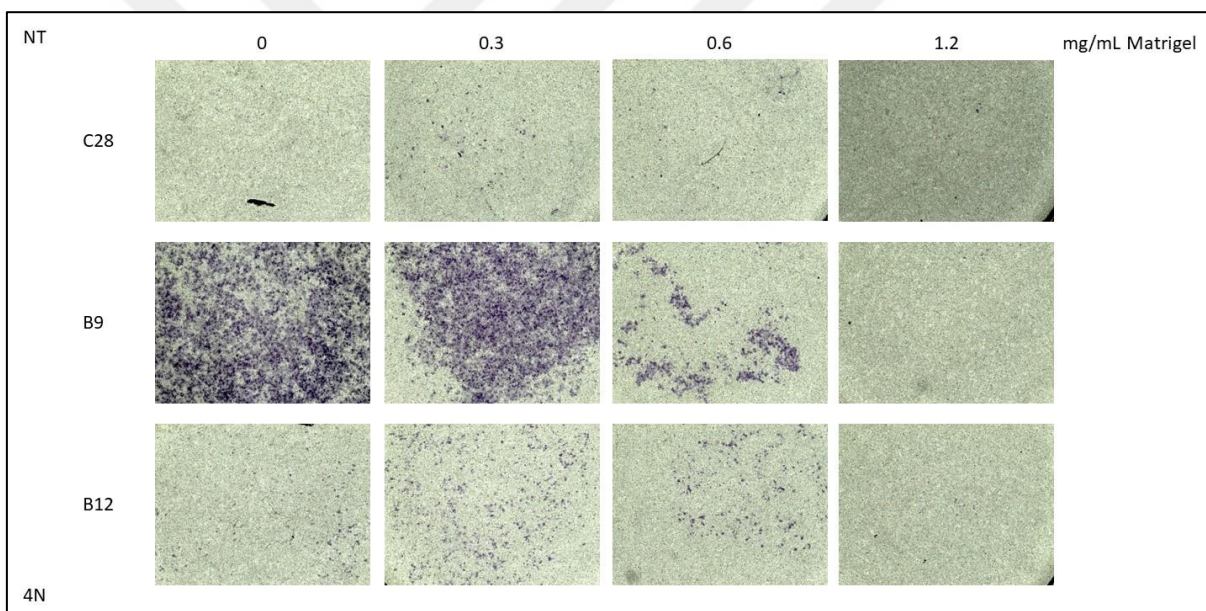
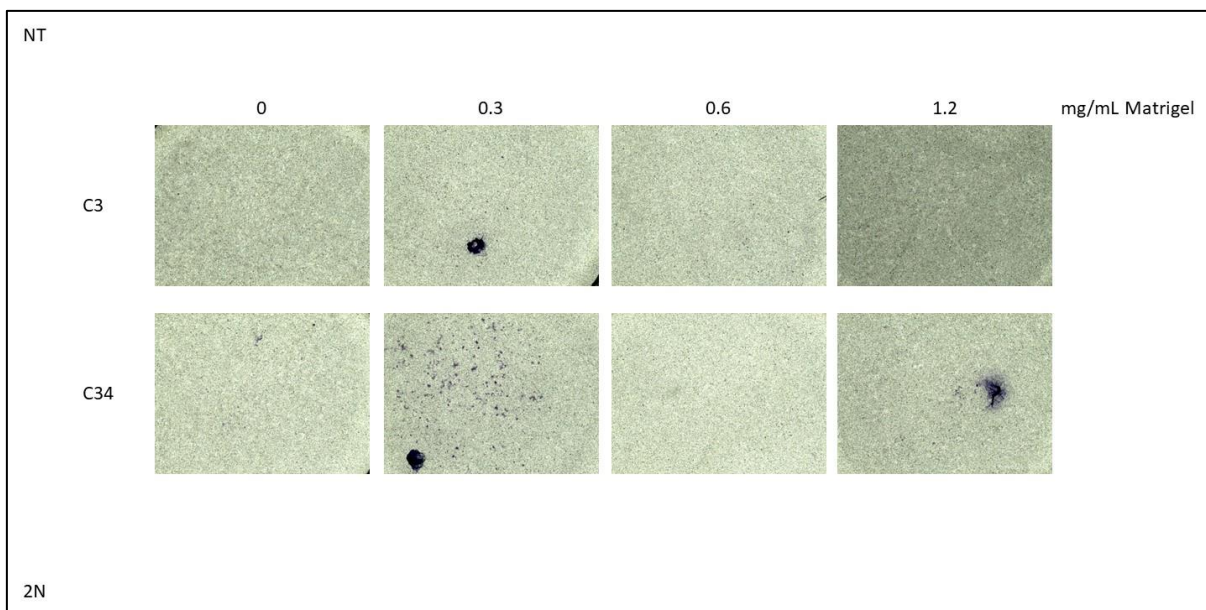
Şekil 30. DLD-1 altklonlarının a) terapi uygulanmadan (NT: No Treatment) gerçekleştirilen yara kapama testi görüntüleri b) terapi uygulanmadan gerçekleştirilen yara kapama testi sonuçlarına ait grafik ve c) terapilerin etkisi altında gerçekleştirilen yara kapama testi sonuçlarına ait grafik

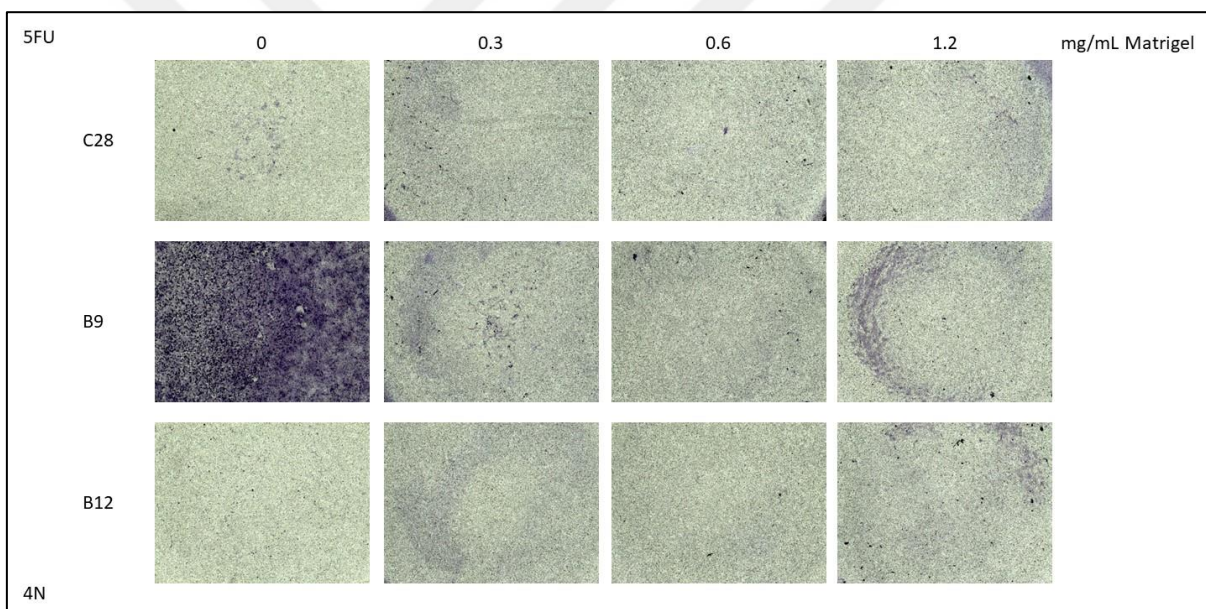
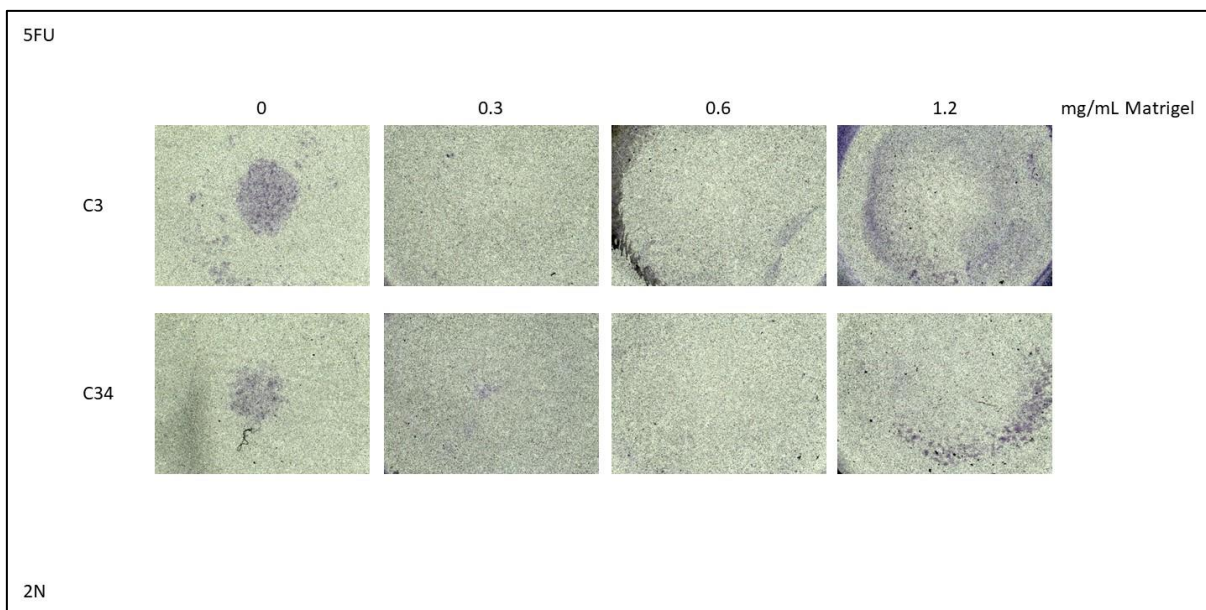
4.3.4. İnvazyon yeteneklerinin değerlendirilmesi

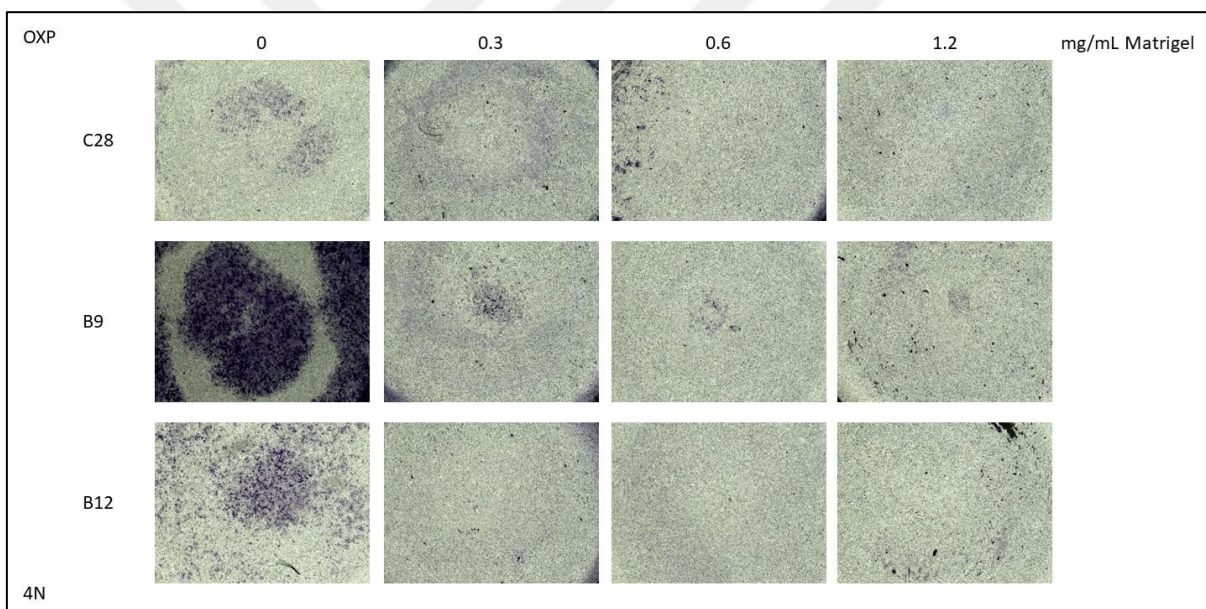
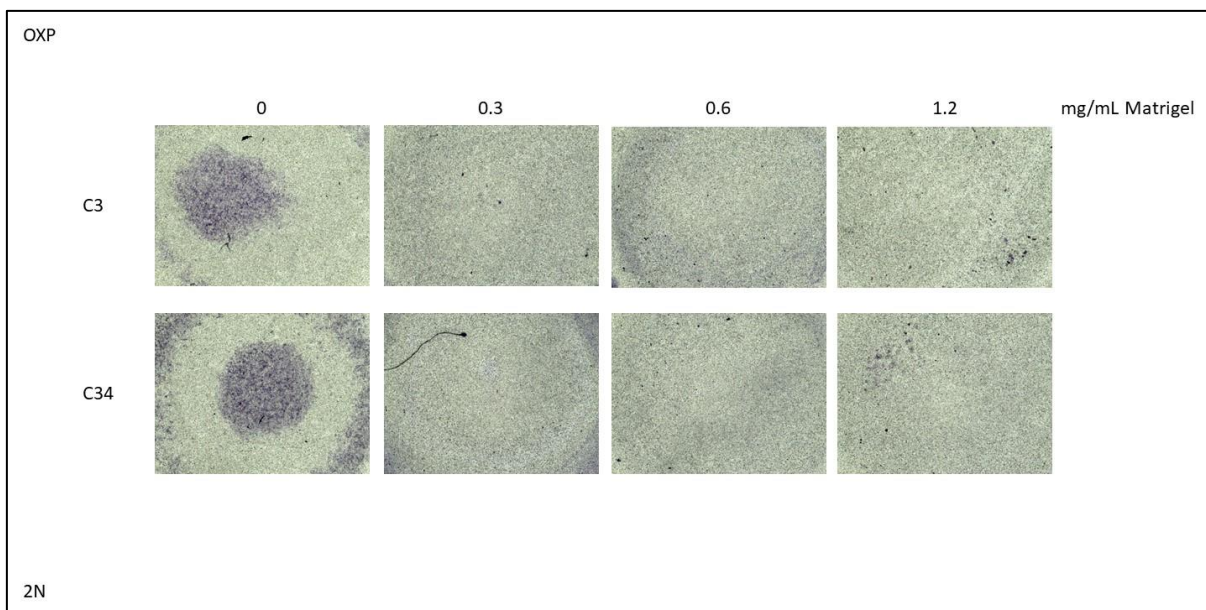
Klonların invazif yeteneklerini belirlemek amacıyla Transwell Matrigel invasion assay kullanılmıştır (Şekil 31).

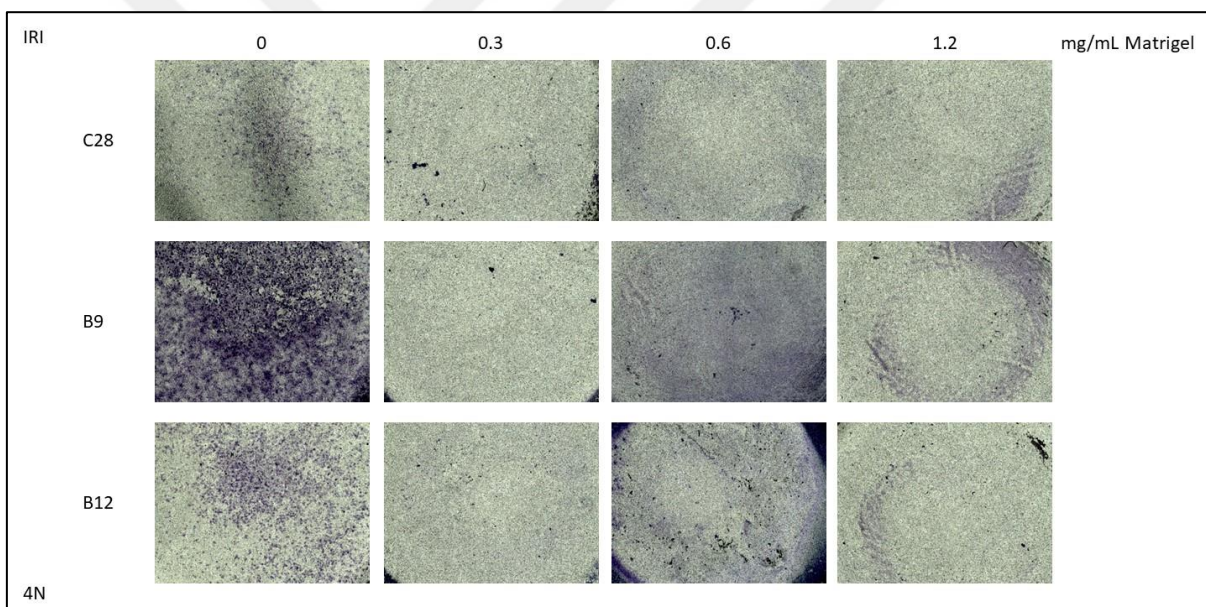
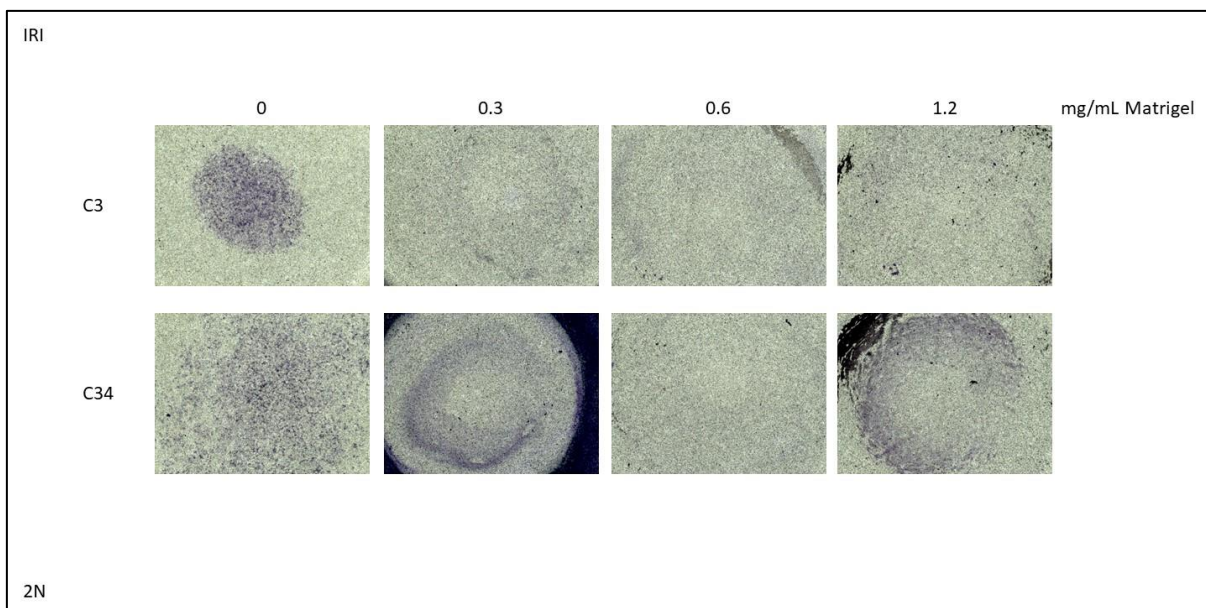
a)

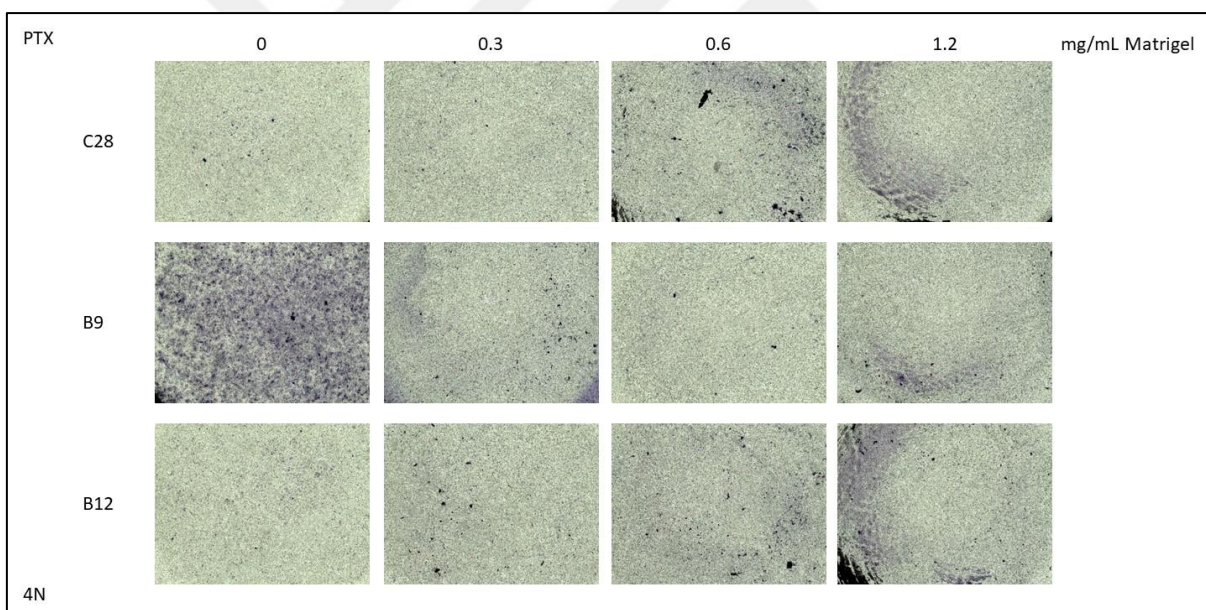
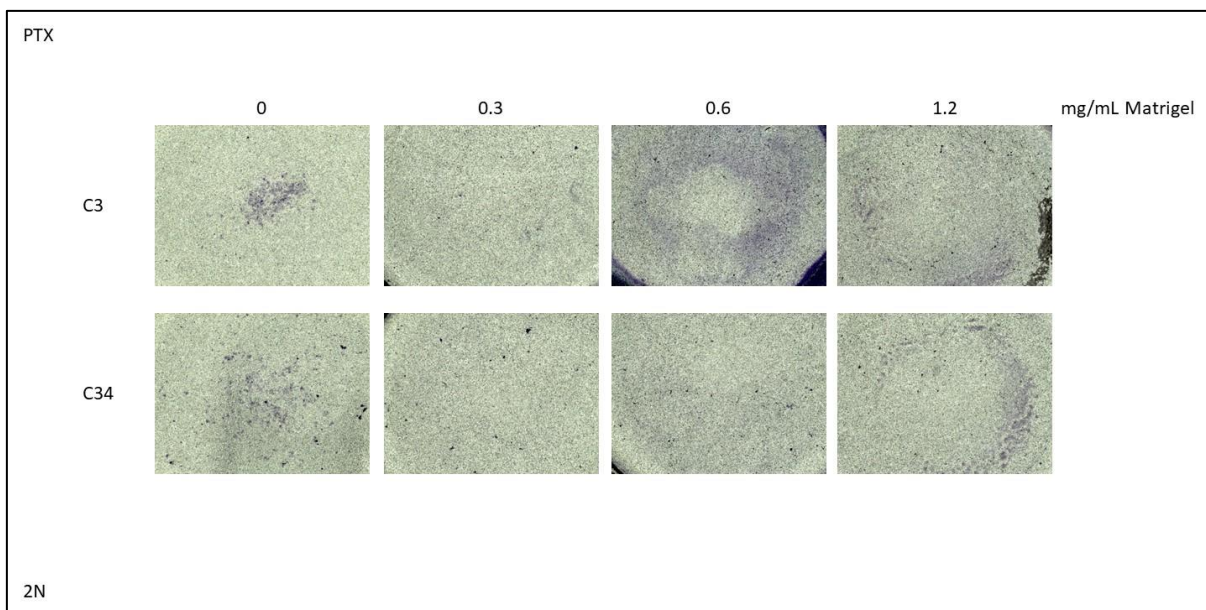


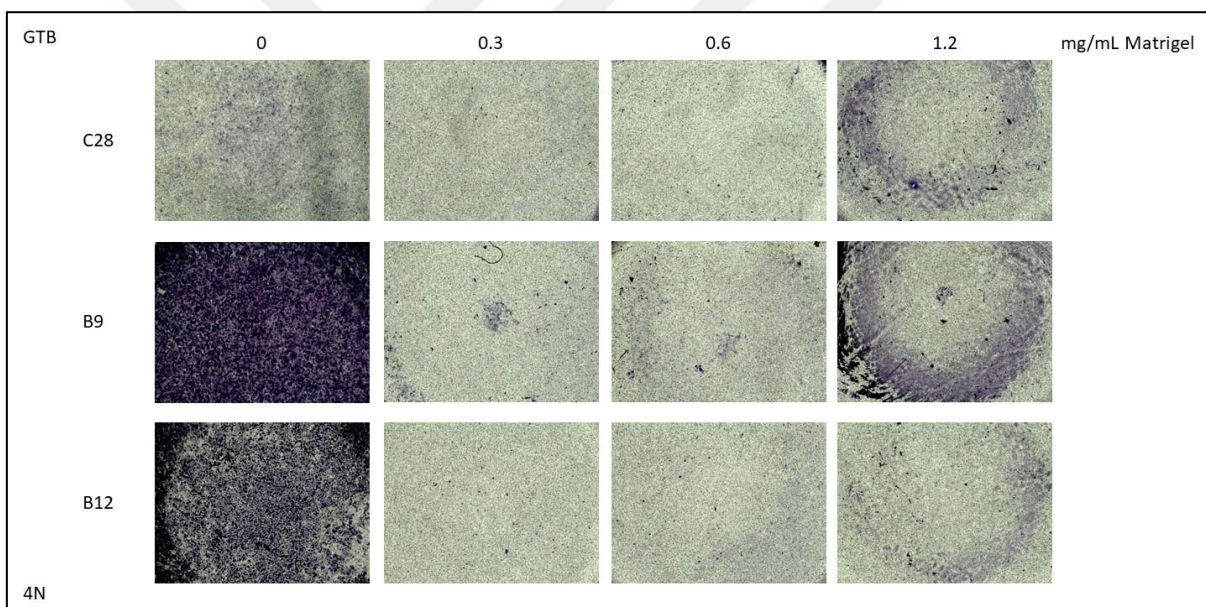
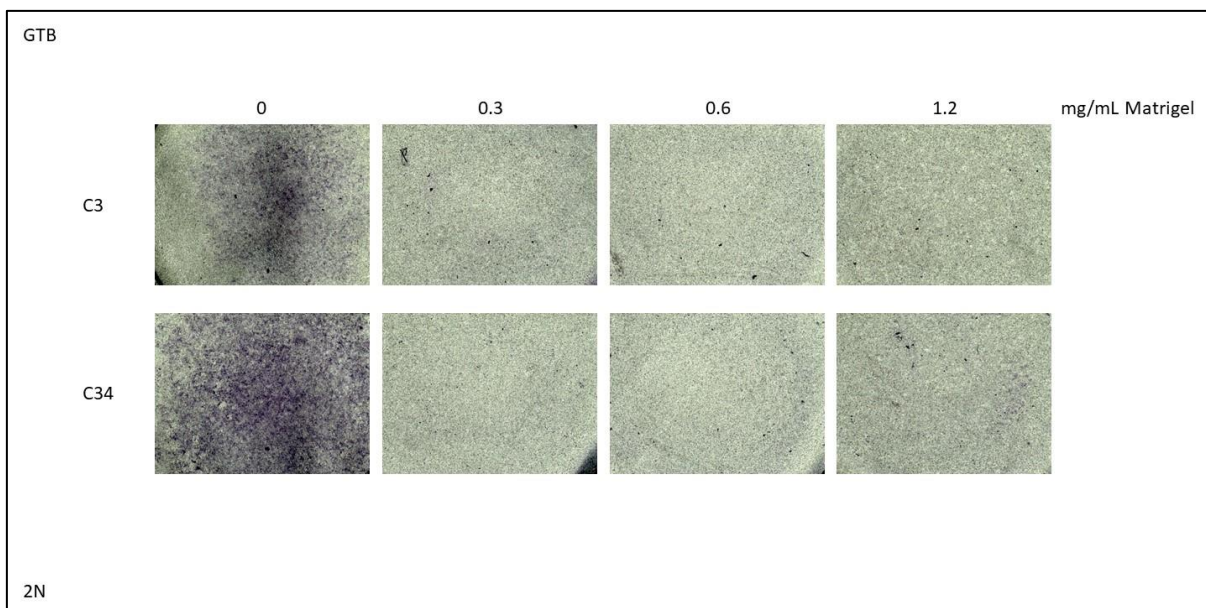


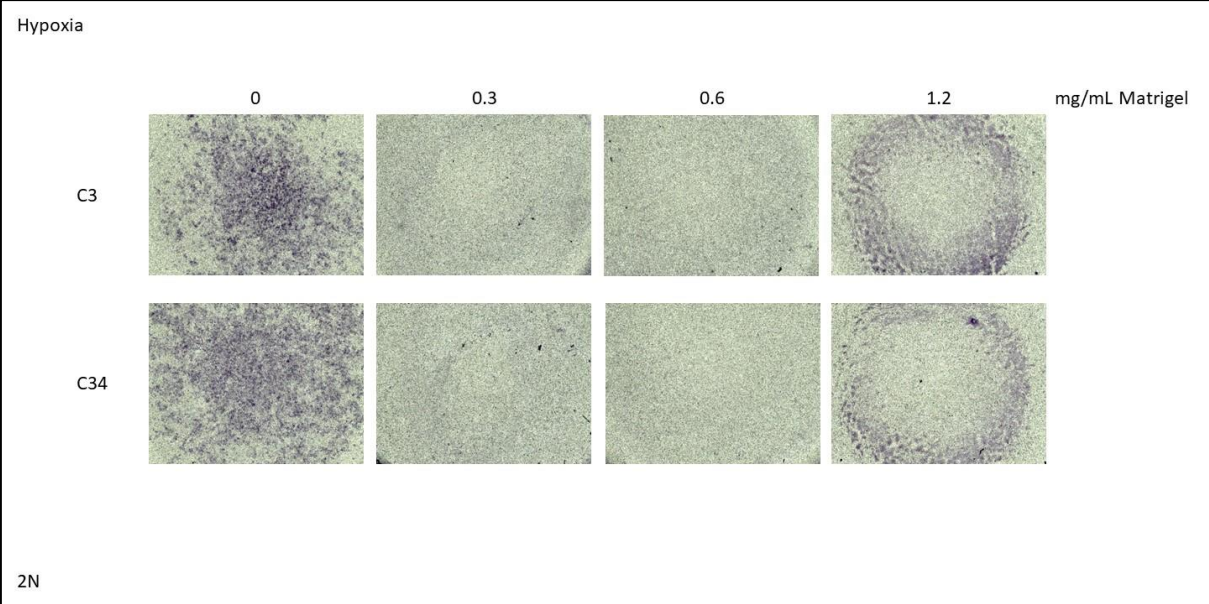
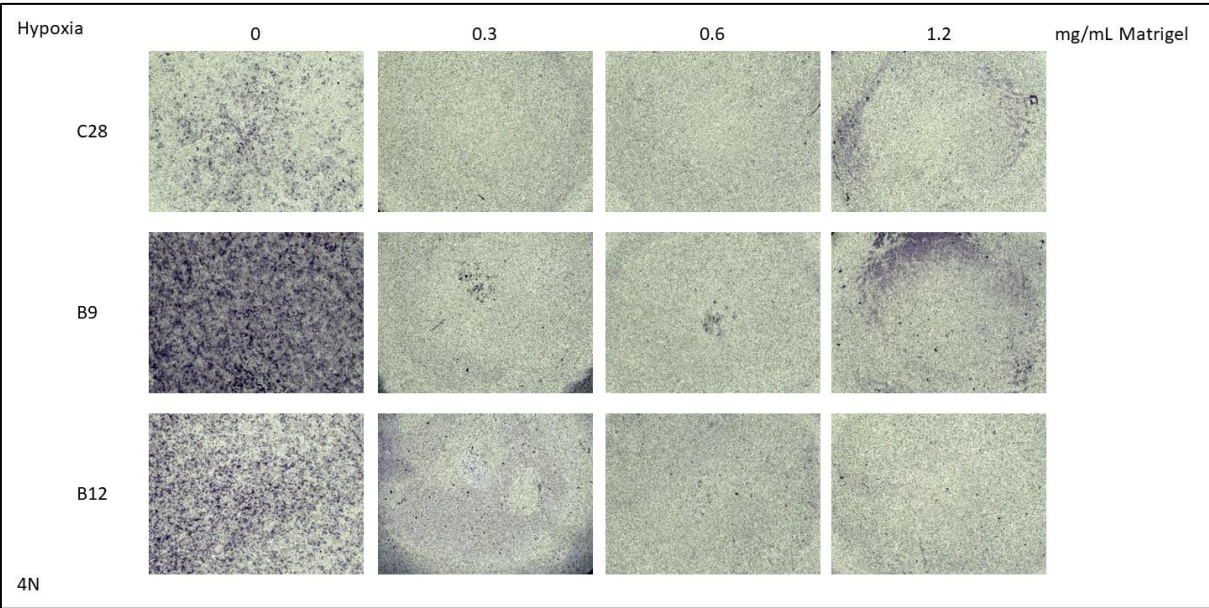


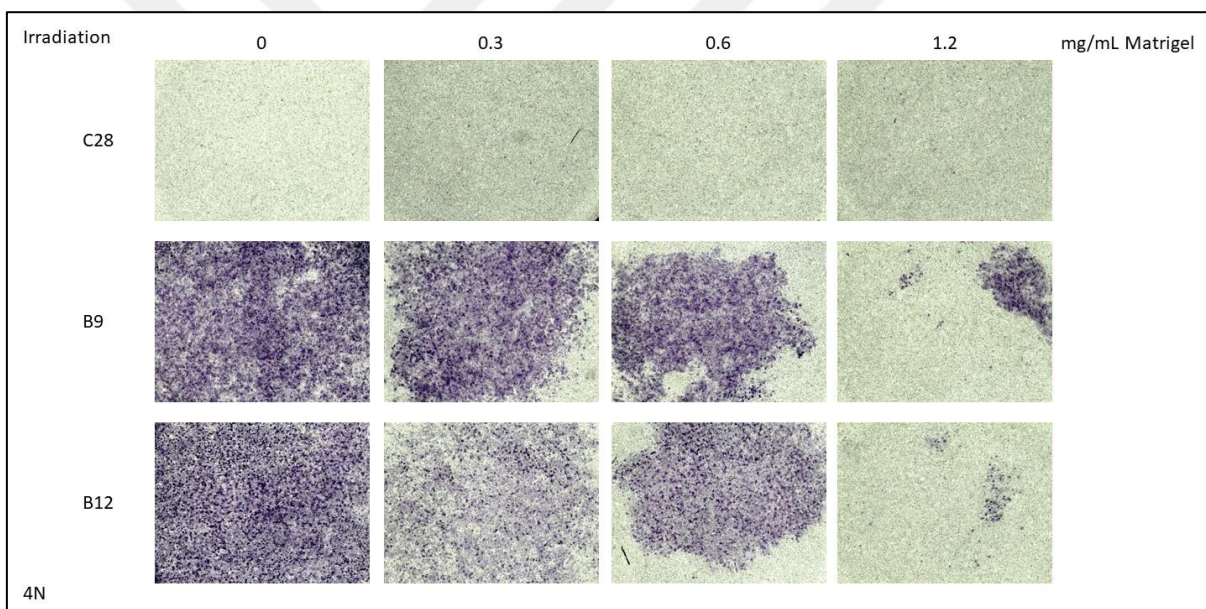
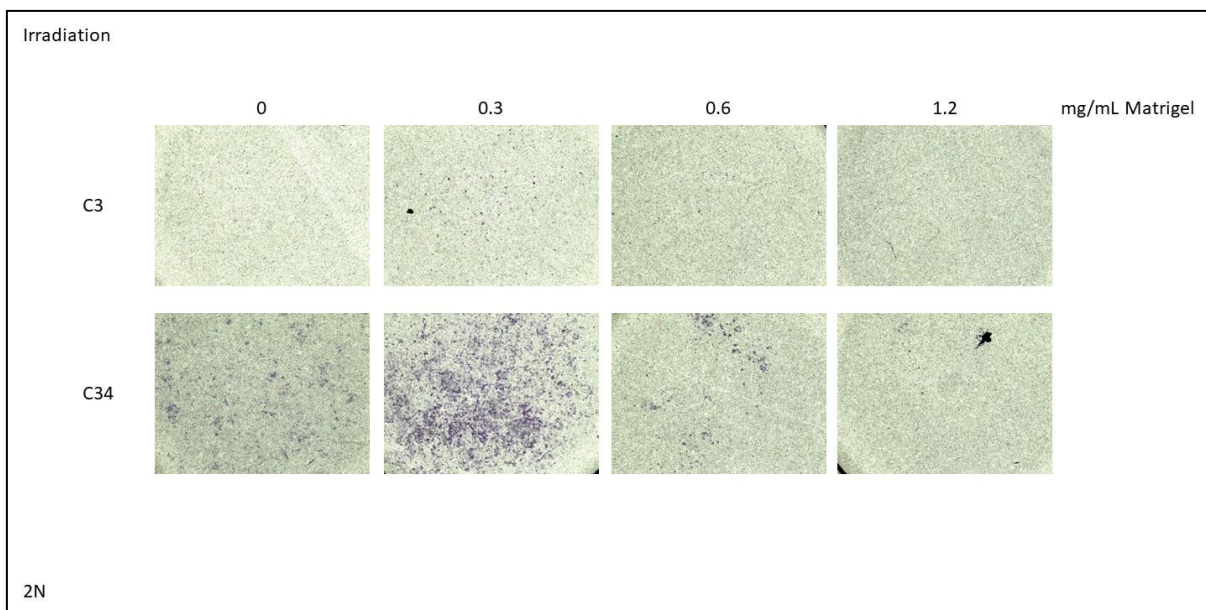




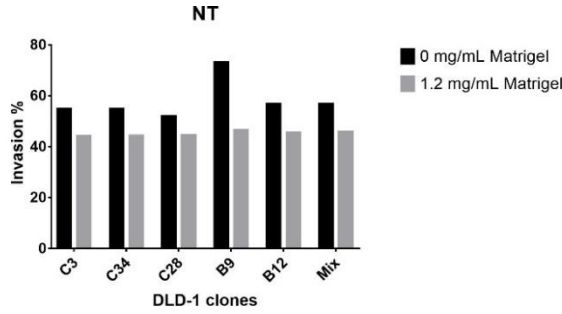




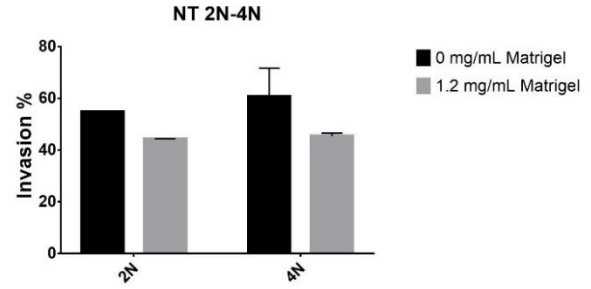




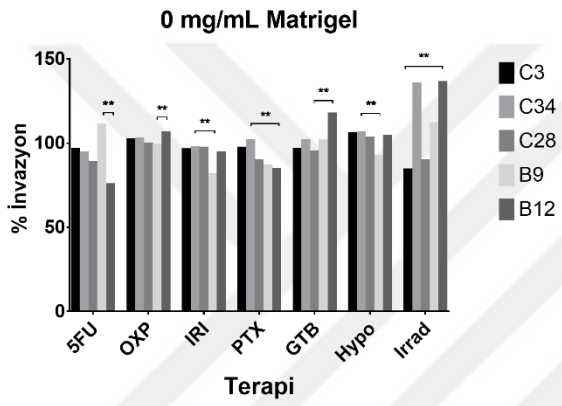
b)



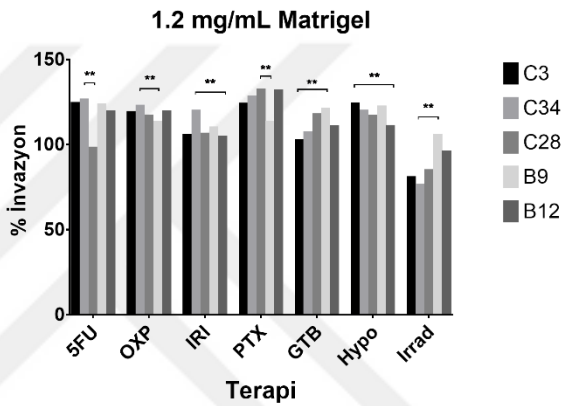
c)



d)



e)



Şekil 31. DLD-1 klonlarının invazyon ve dikey migrasyon yeteneklerinin Boyden chamber yöntemiyle belirlenmesi. a) Boyden Chamber plakalarının Azure görüntüleme sistemi ve EVOS ters mikroskop görüntüleri b) Terapi etkisinin olmadığı durumda altklonların c) 2N altklonlara karşı 4N altklonların dikey migrasyon ve invazyon yüzdeleri. d) Altklonların kemoterapötikler, radyoterapi ve hipoksi etkisi altında dikey migrasyon ve e) invazyon yeteneklerini gösteren grafikler.

Terapi etkisi olmadığında, B9 klonu diğer klonlardan daha migratuardır. Bununla birlikte, invazif yetenek klonlar arasında çok fazla değişim göstermemektedir. 4N klonlar 2N klonlardan anlamlı olmayan düzeyde daha migratuardır, ancak daha invazif değildir. 4N klonların invazif yetenekleri, 5-FU, OXP, IRI ve hipoksi uygulamalarına karşı daha duyarlıdır. PTX, B9'un invazifliği üzerinde azaltıcı etkiye sahiptir. GTB ve radyasyon etkileri altında 4N klonlar 2N klonlardan daha invaziftir.

Transwell invazyon denemeleri genel bir fikir vermekle birlikte, hayvan çalışmalarıyla konfirme edilmelidir. Buna yönelik olarak, daha önce belirtildiği üzere fluoresan DLD-1 klonlarının *in vivo* invazif yetenekleri ve dağılımlarının aydınlatılması amacıyla fare çalışmaları Ried Lab (NIH)'da gerçekleştirilmektedir.

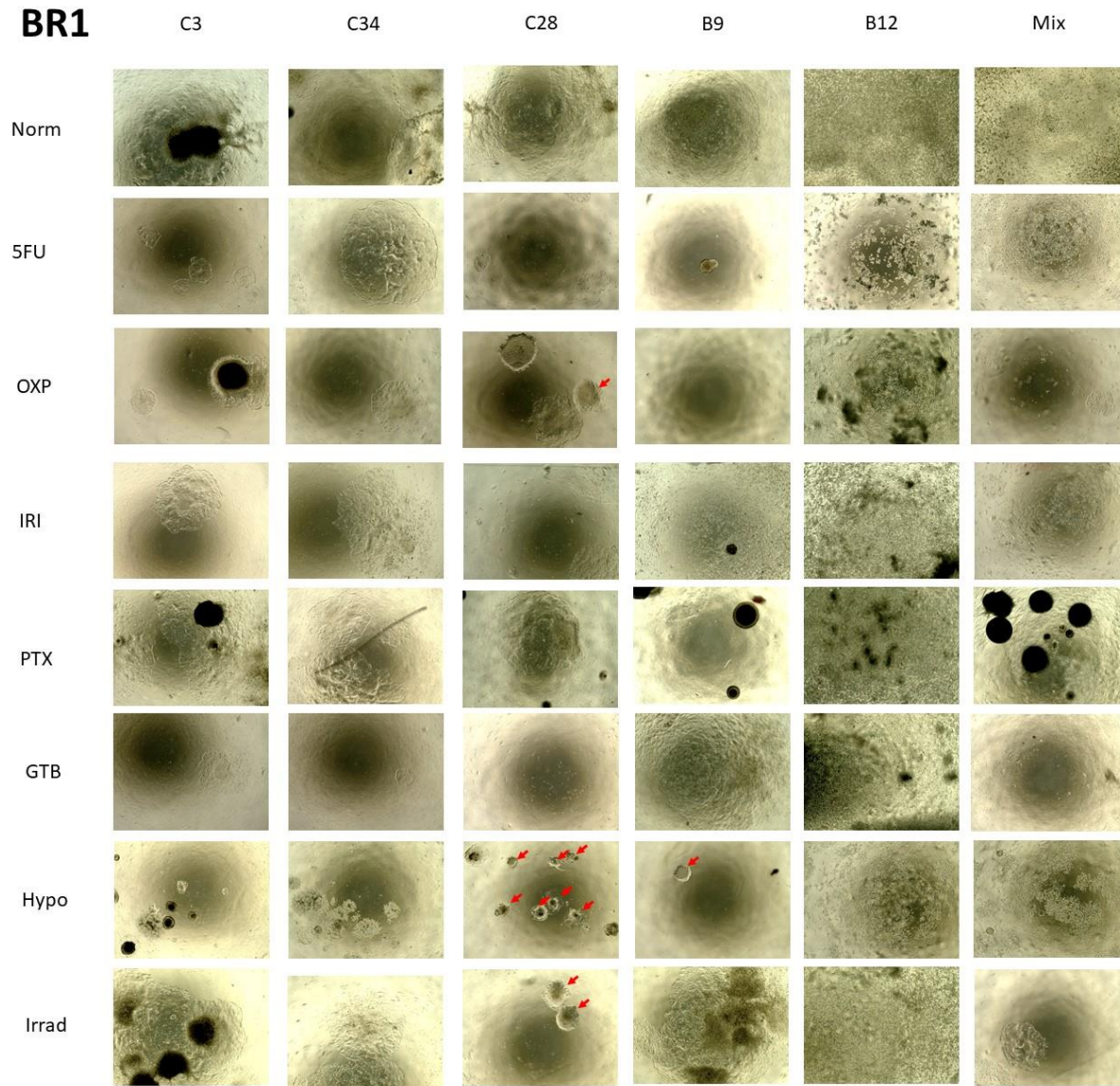
4.3.5. Diferansiyasyon düzeylerinin belirlenmesi

DLD-1 klonlarının diferansiyasyon düzeyleri, sferoid oluşturma deneyi ve kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi yöntemleriyle belirlenmiştir.

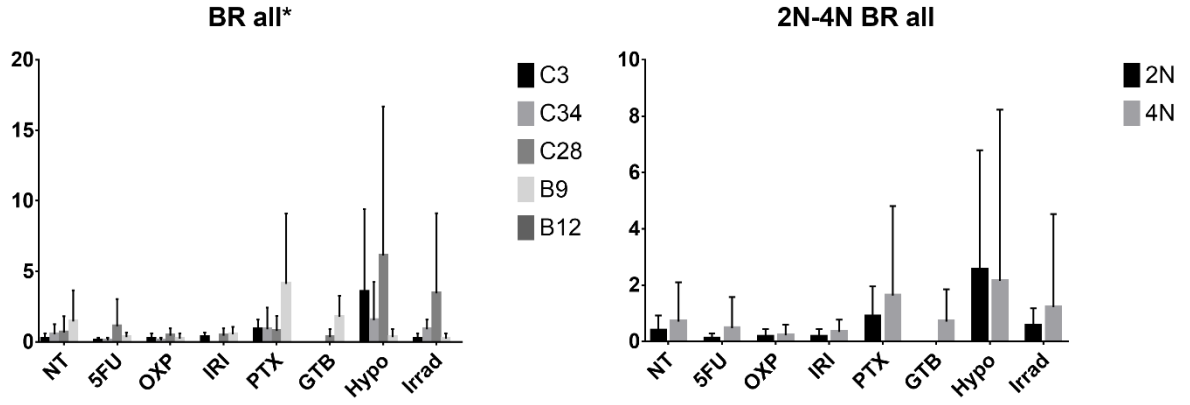
SFA denemesine göre genel olarak, 4N klonların 2N klonlardan daha dediferansiye olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 32). Özellikle C28 ve B9 klonları öne çıkmaktadır. B12 hücreleri hızlı ve sağlam adhere olmalarına rağmen sferoid oluşturmamaktadırlar, daha çok tek tabaka olarak büyümektedirler, uzun süre kültüre edildiklerinde odaklar oluşturabilmektedirler. C3 de sferoid benzeri yapılar oluşturmakla birlikte, bunlar genellikle agardan kopmuş hücre agregatlarıdır. Hipoksi etkisi altında altklonların sferoid oluşturma yeteneğinin arttığı görülmektedir.

a)

BR1



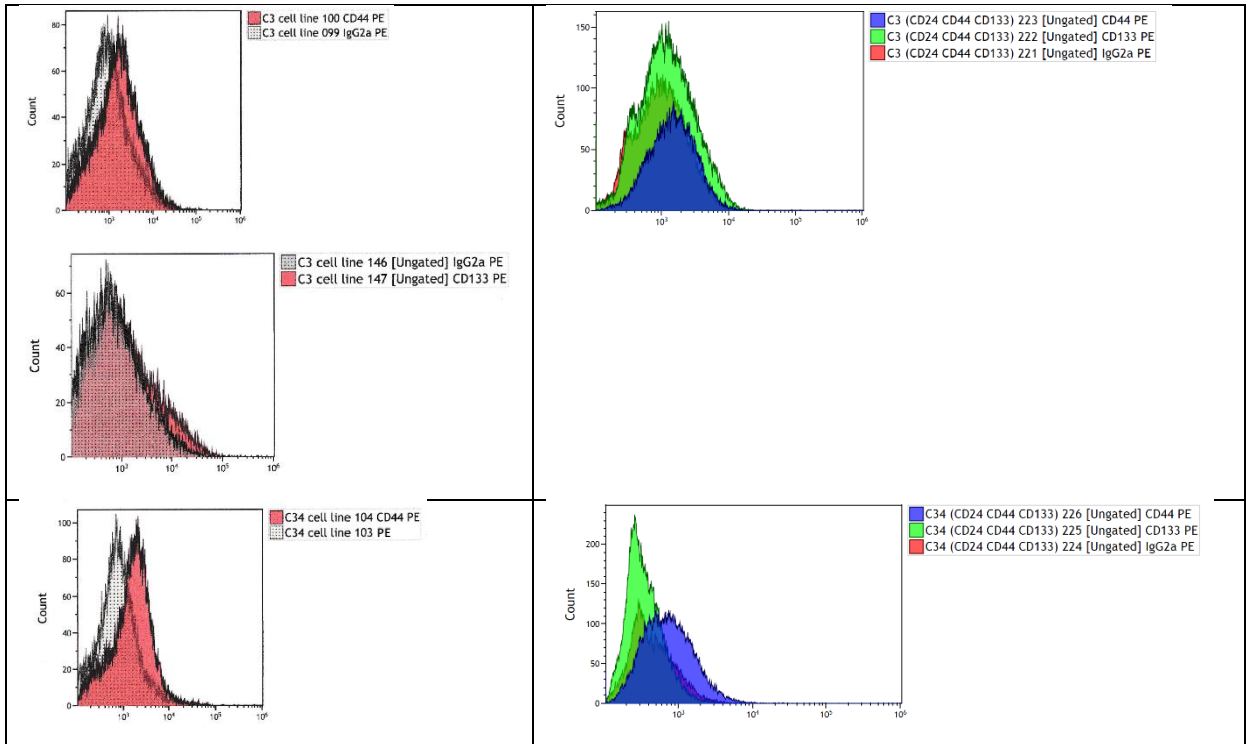
b)

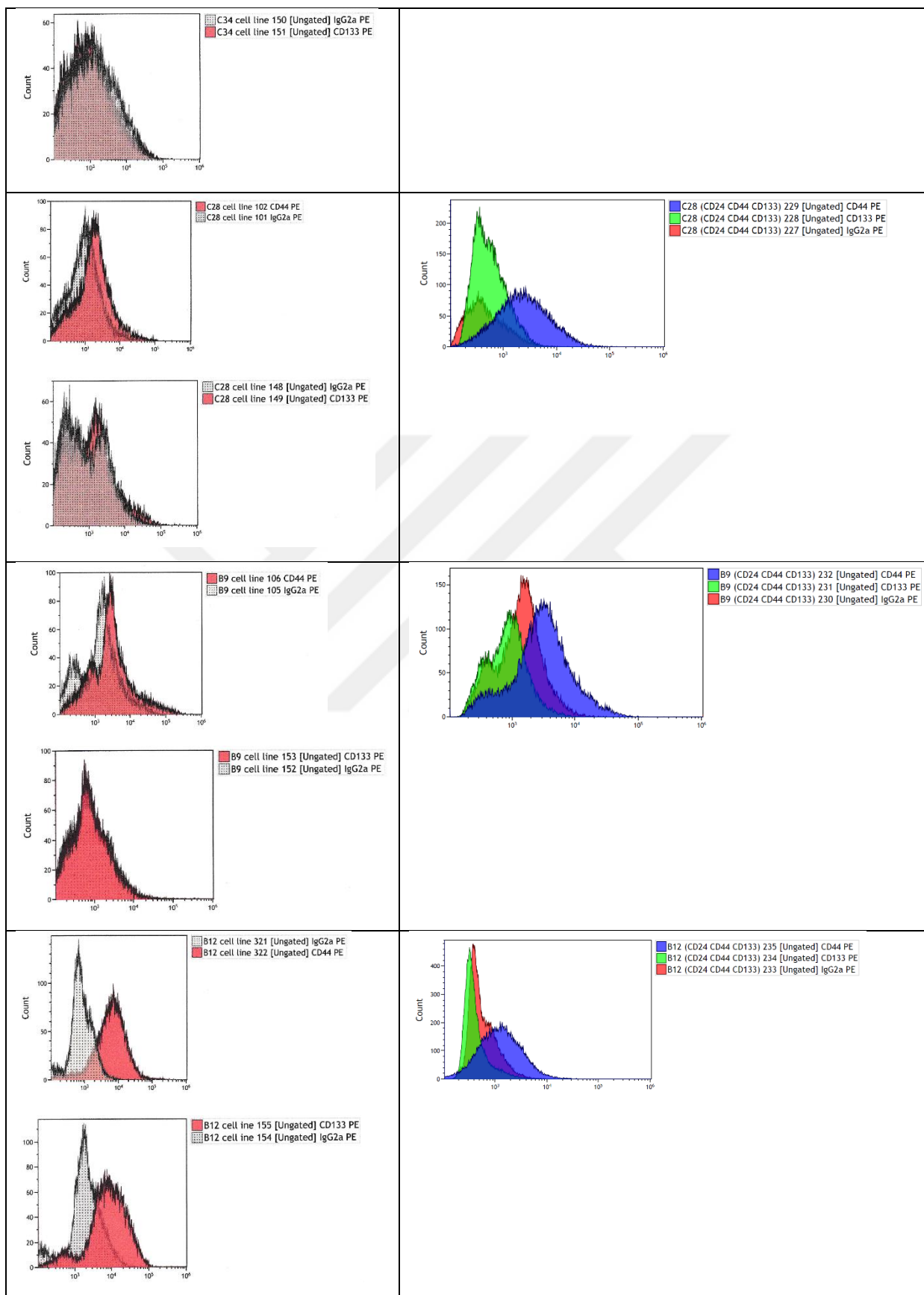


Şekil 32. Sferoid oluşturma denemesi a) klonların oluşturduğu sferoidlerin ters mikroskop görüntüleri b) klonların sferoid oluşturma yeteneklerini gösteren grafikler

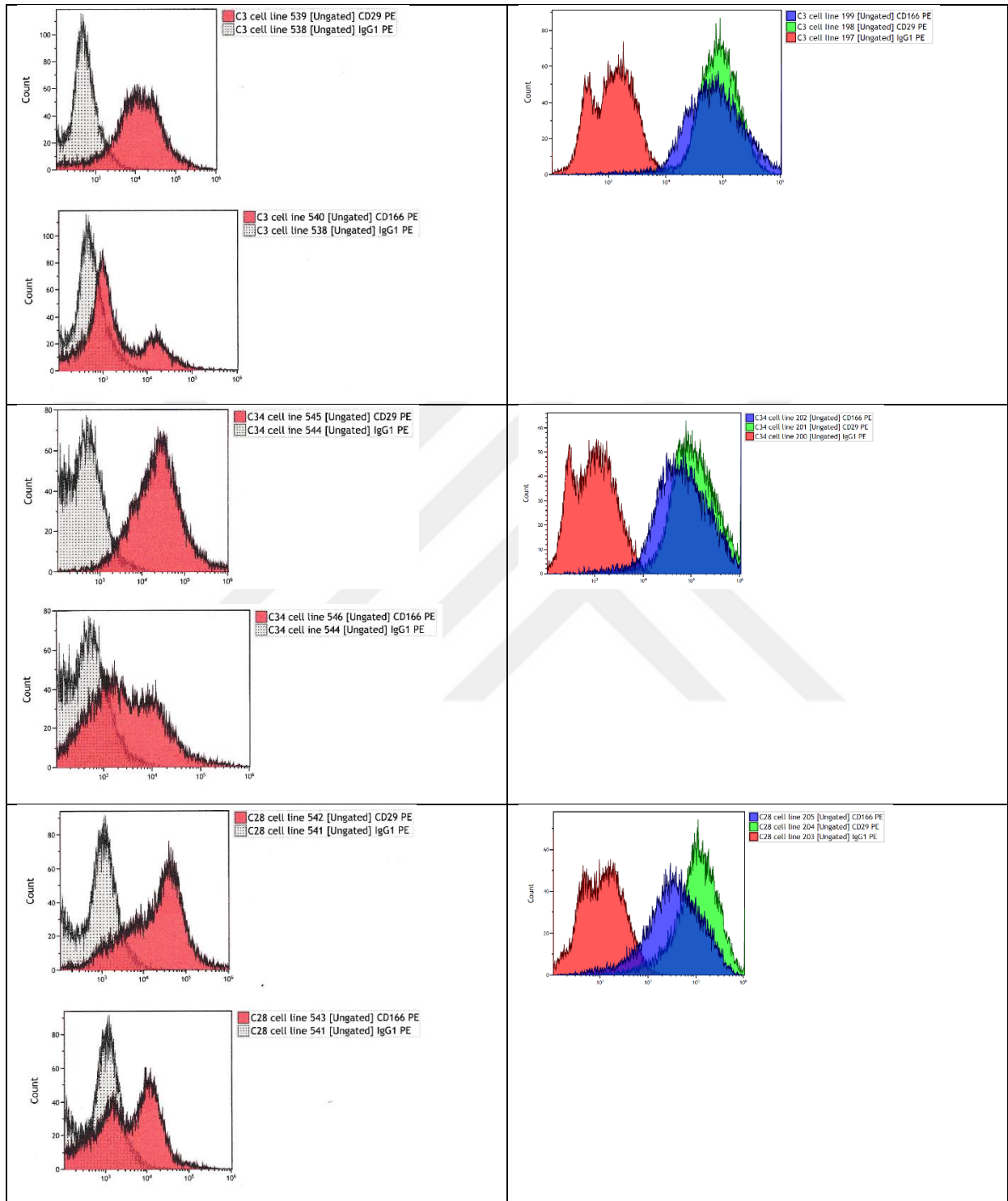
Altklonların diferansiyasyon düzeylerinin bir başka yöntemle gösterilmesi amacıyla, KRK kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri akış sitometrik yöntemle incelenmiştir (Şekil 33).

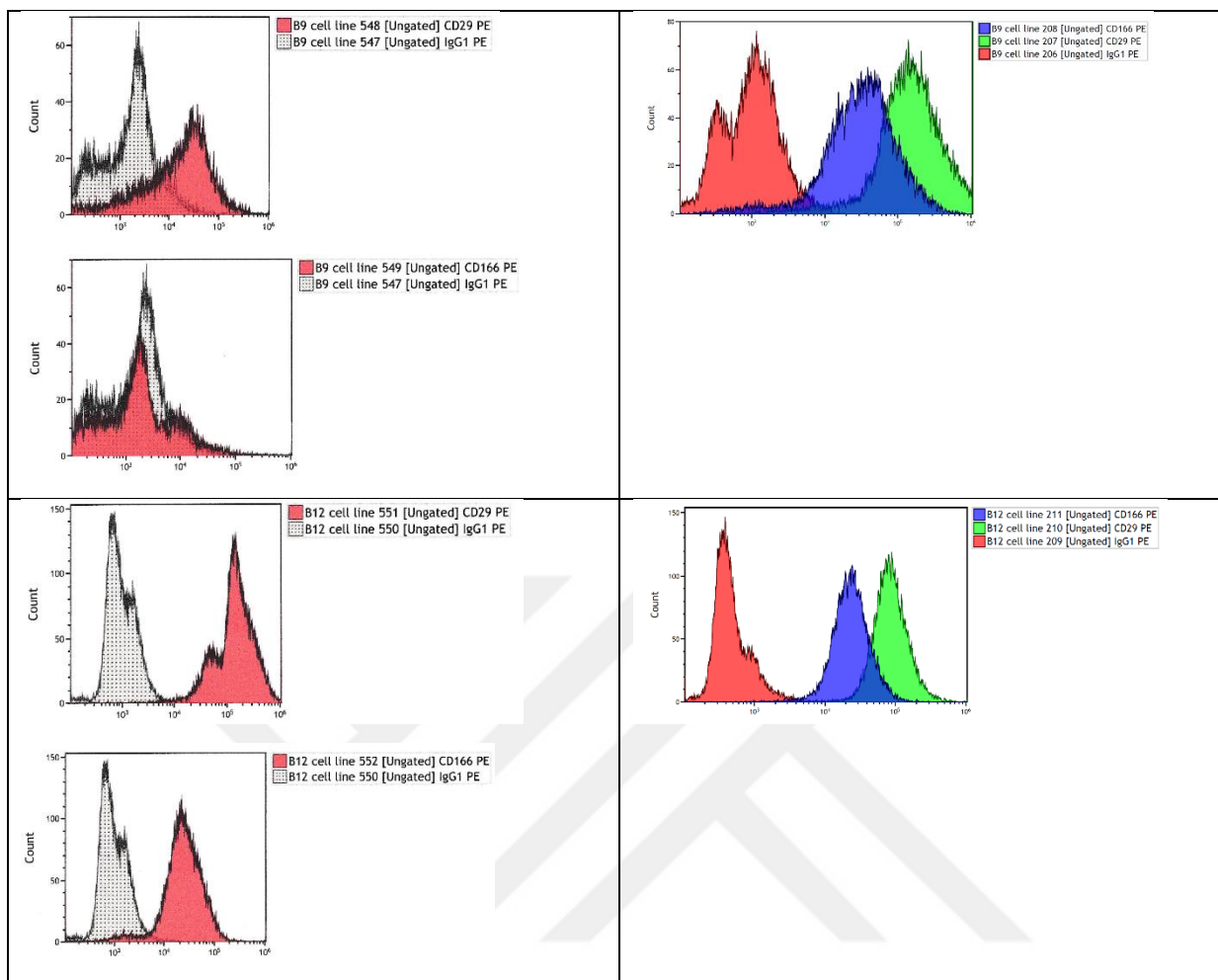
a)



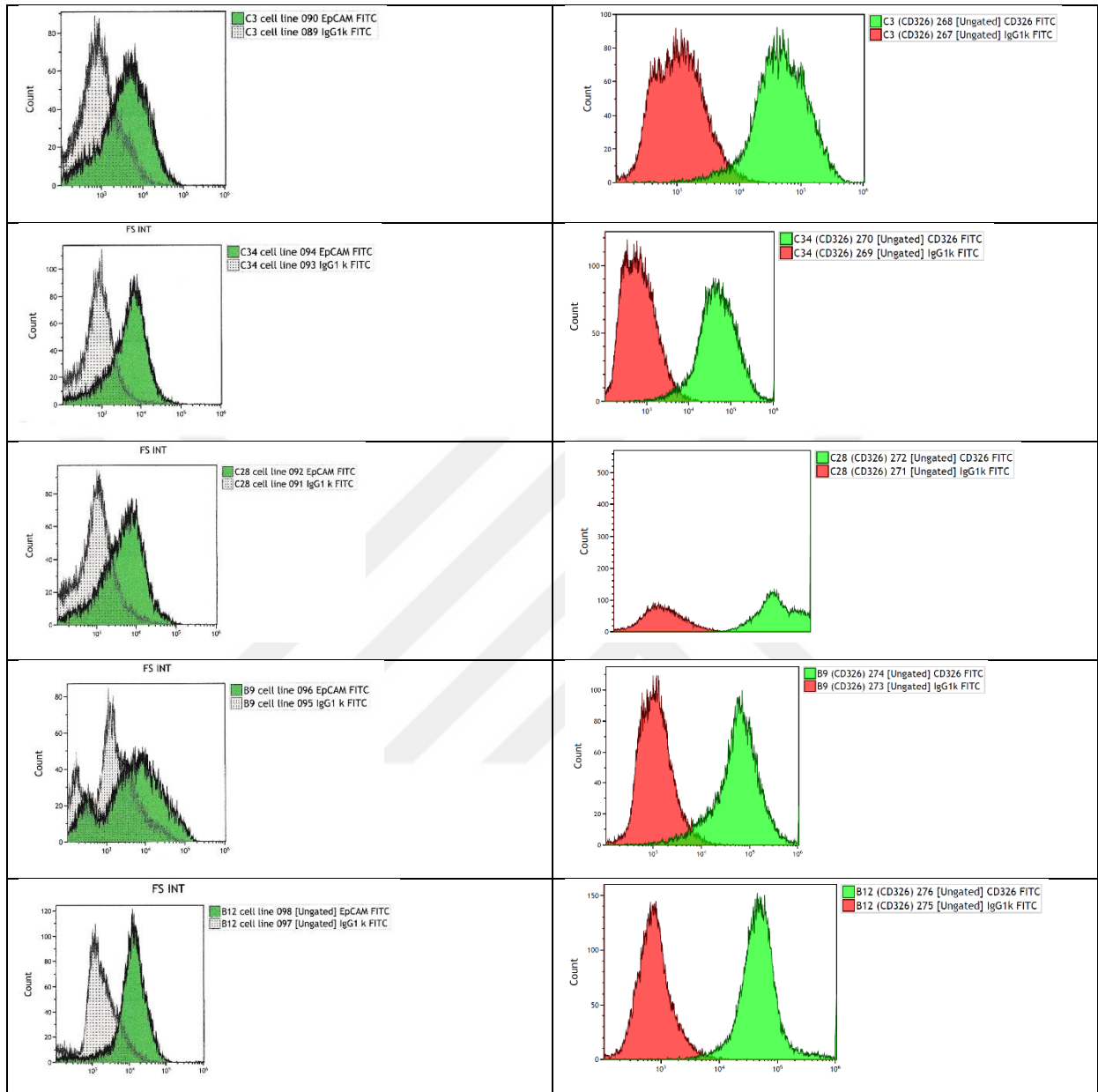


b)

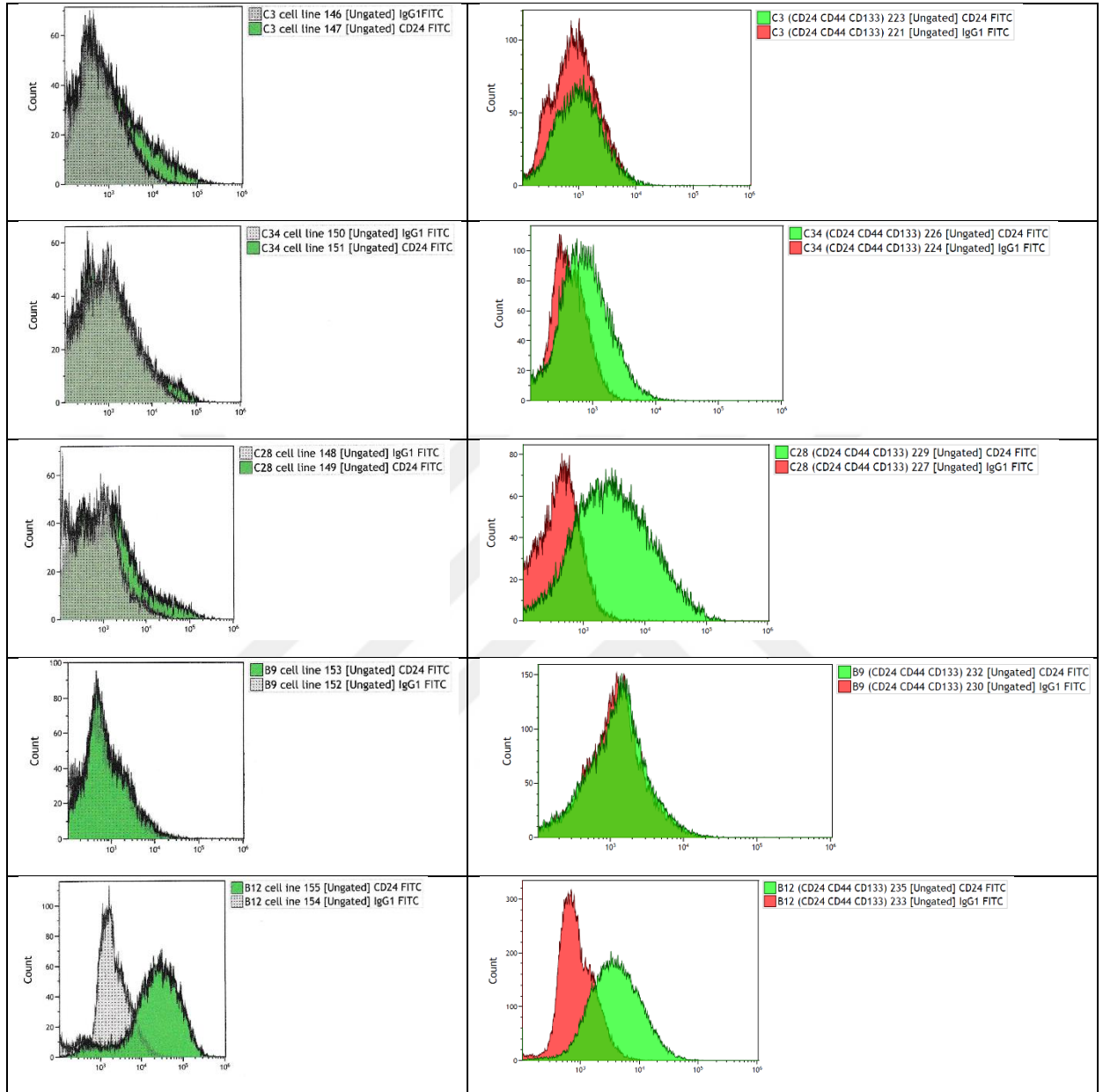




c)



d)



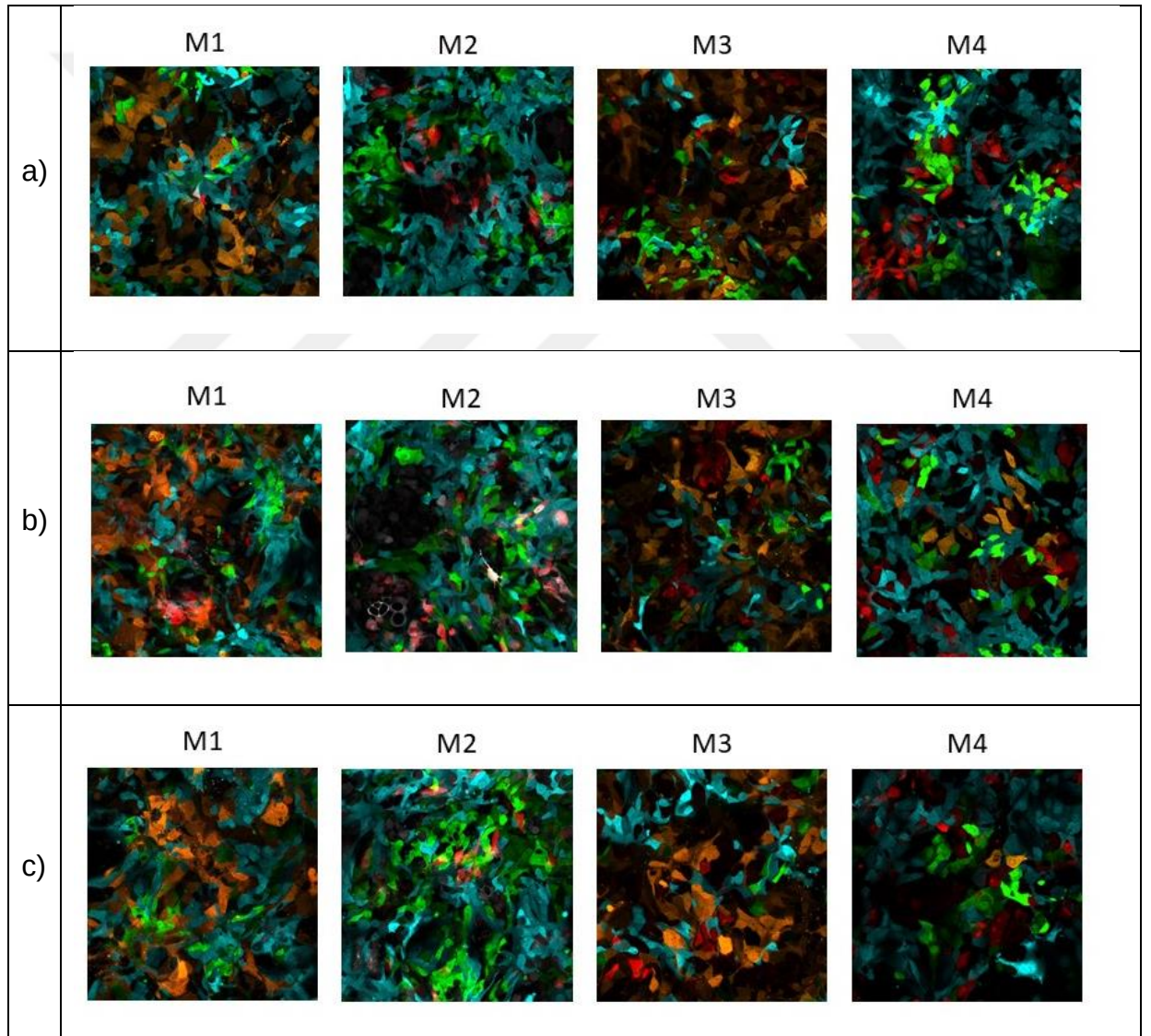
Şekil 33. DLD-1 altklonlarında KRK kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin akış sitometrisi ile gösterimi a) CD44 ve CD133 b) CD29 ve CD166 c) CD326 d) CD24 antikorları ile gerçekleştirilen denemelerin histogram grafikleri

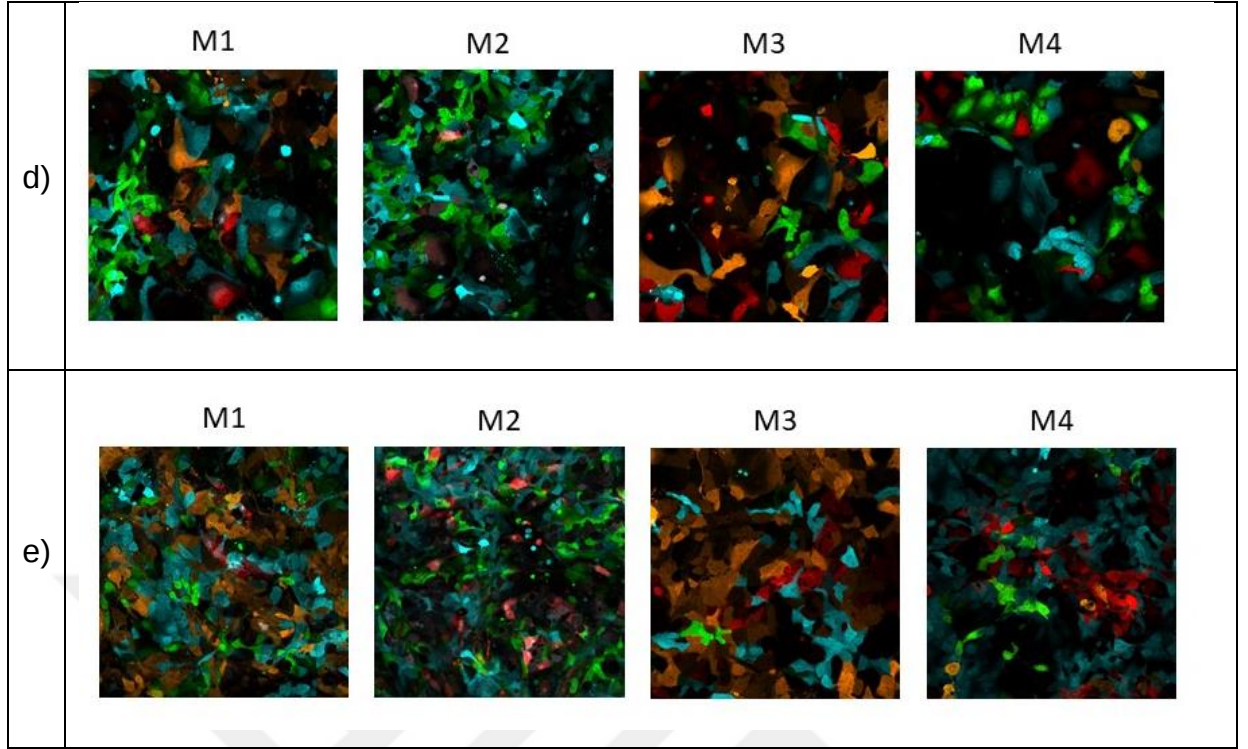
Buna göre, CD44 için 4N altklonlar 2N altklonlardan daha pozitif ve özellikle B12'de yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. CD133 belirteci için altklonlar arasında genel olarak bir fark yoktur. CD29 için tüm altklonlar pozitif olmakla birlikte, özellikle B12 olmak üzere 4N altklonlar daha yüksek ekspresyona sahiptir. CD166 ve CD326 (EpCAM) için de benzer şekilde tüm altklonlar pozitif olmakla birlikte B12'deki

ekspresyon düzeyi diğer altklonlara göre daha yüksektir. CD24 için ise, C34'te az da olsa diğer 2N altklonlara göre daha yüksek, C28 ve B12'de ise oldukça yüksek bir pozitiflik izlenmektedir.

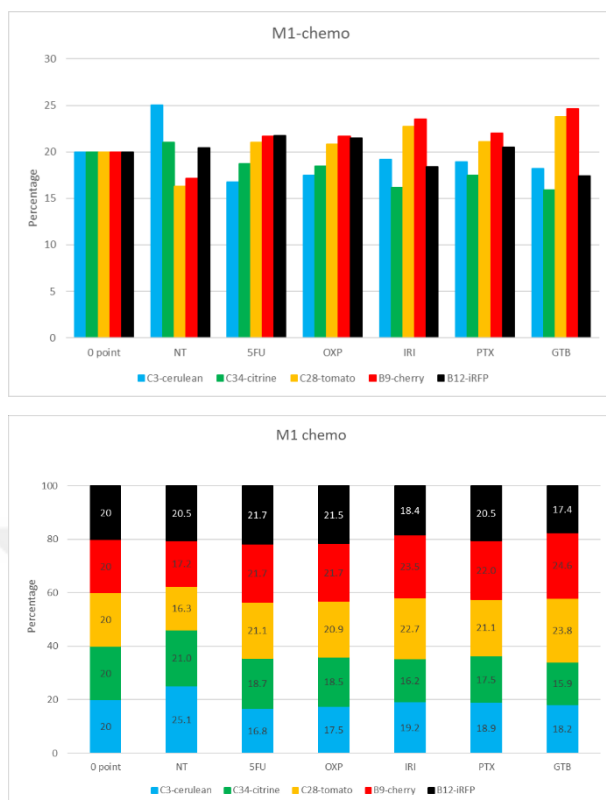
4.4. Kokültürlere Uygulanan Terapötiklerin Populasyon Üzerine Etkilerinin Fluoresan Sinyalin Takibi Yoluyla İncelenmesi

Oluşturulan *in vitro* tümör heterojenite modellerinde zamana bağlı olarak ve terapi koşulları altında populasyon kinetiklerindeki değişimlerin izlenmesi amacıyla konfokal mikroskopi (Şekil 34) ve akış sitometrisi (Şekil 35) yöntemleri kullanılmıştır.

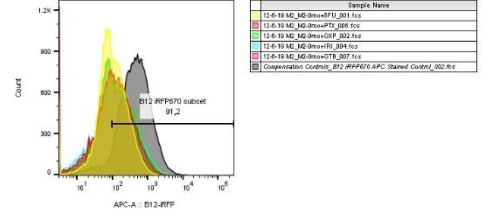
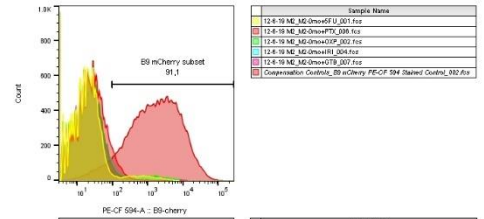
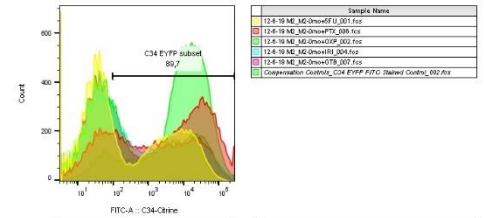
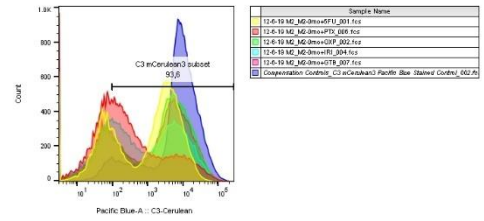
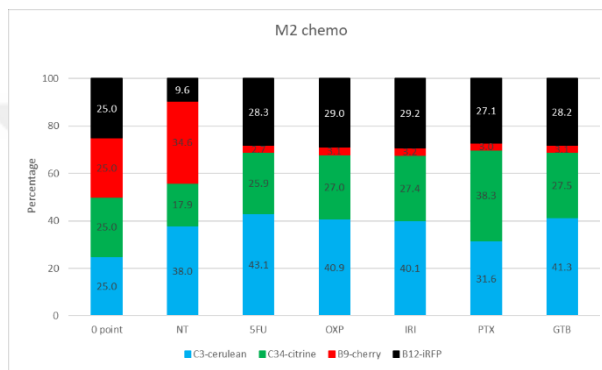
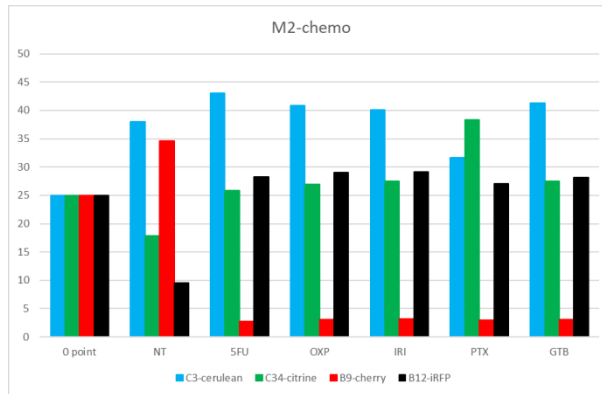




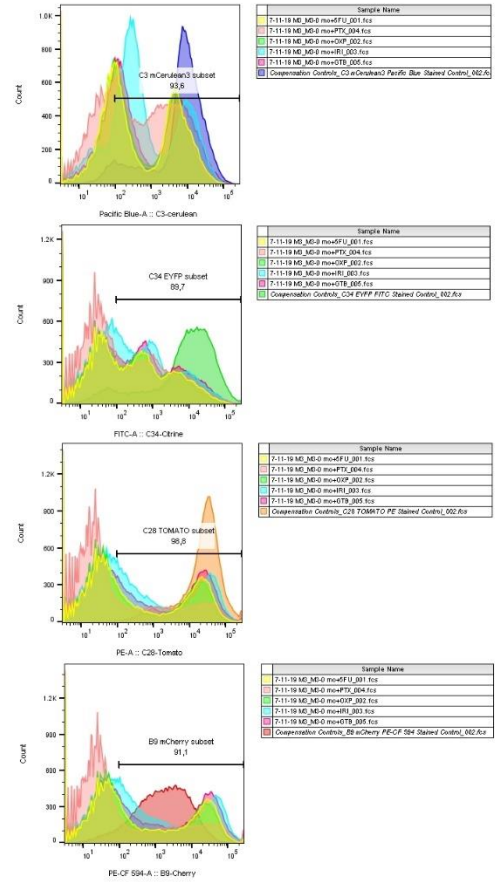
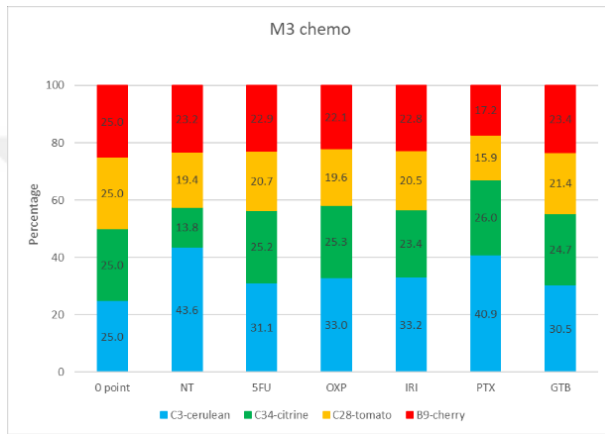
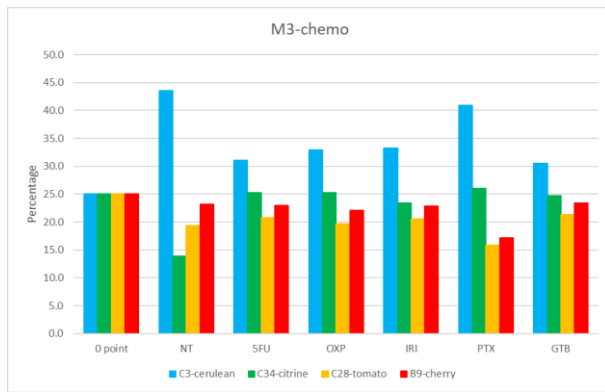
Şekil 34. DLD-1 altklonları kullanılarak oluşturulan M1, M2, M3 ve M4 kokültürlerinin a) 5-FU b) OXP c) IRI d) PTX e) GTB etkisi altında populasyon kinetiklerindeki değişimlerin konfokal mikroskopi ile izlenmesi

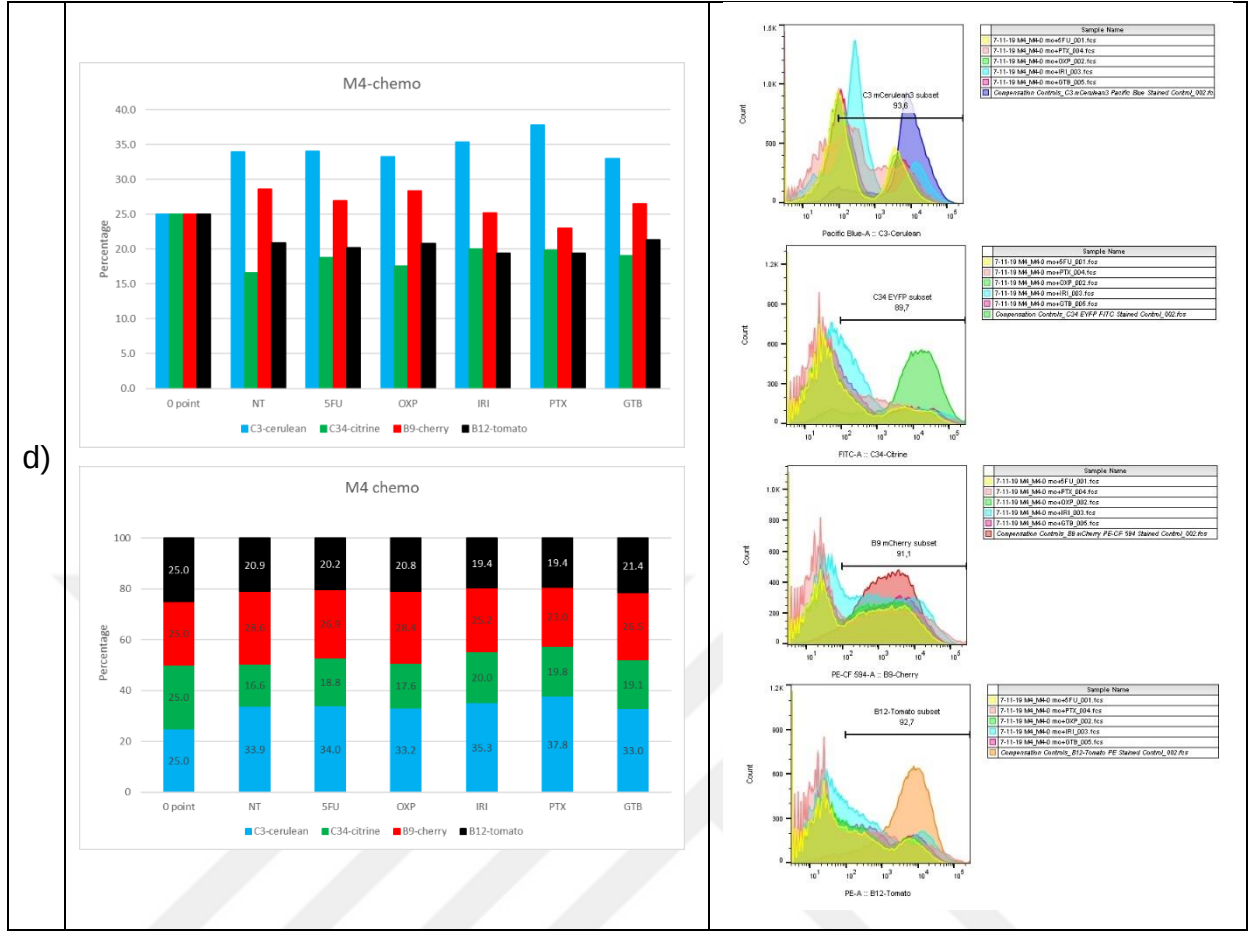


b)



c)



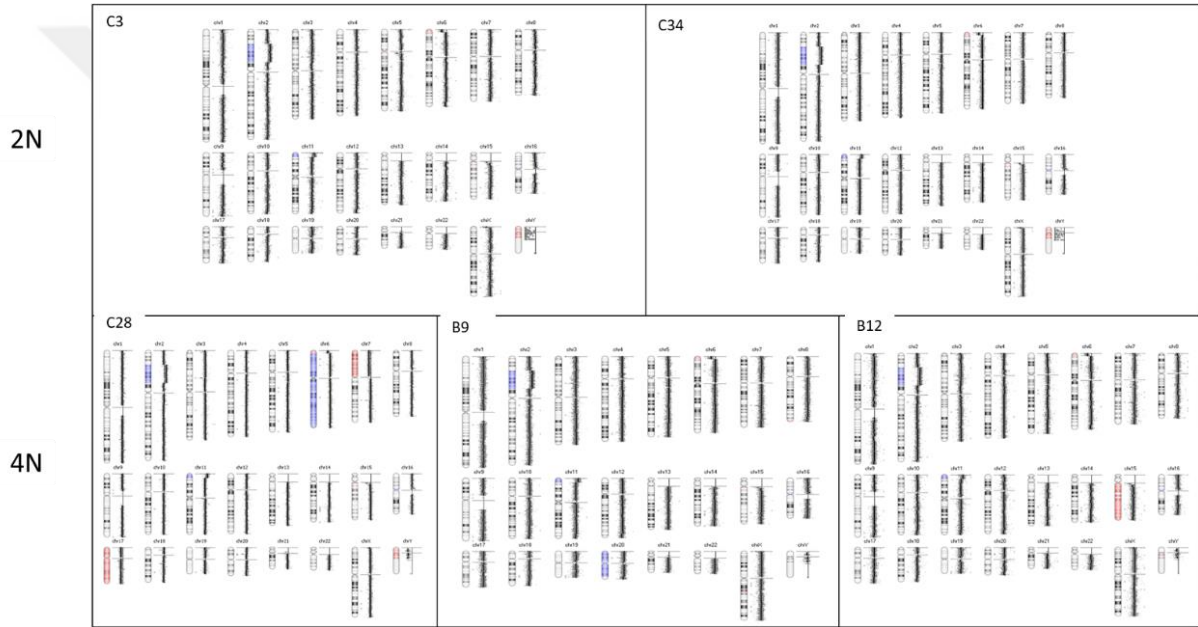


Şekil 35. DLD-1 altklonları kullanılarak oluşturulan kokültürlerin 5-FU, OXP, IRI, PTX ve GTB etkisi altında a) M1 b) M2 c) M3 ve d) M4 populasyon kinetiklerindeki değişimlerin akış sitometrisi ile izlenmesi

Bu sonuçlara göre, M1 kokültüründe normal koşullarda 2N altklonlar 4N altklonlara göre daha fazla sayıdayken terapi koşulları altında 4N altklonlar kokültür ortamını ele geçirmektedir. M2 kokültüründe 2N ve 4N altklonlar arasında genel olarak dengeli bir dağılım olmakla birlikte, C28 yokluğunda B9 terapötiklerden daha fazla etkileniyor şeklinde görünmektedir. M3 kokültüründe normal koşullarda dengeli bir dağılım izlenmekteyken, terapi koşulları altında 2N altklonlar 4N altklonlara göre daha fazla sayıya ulaşmaktadır. C28 altklonunu içermeyen bir diğer karışım olan M4 kokültüründe altklonlar, normal koşullar altında genel olarak dengeli bir dağılımdadır ve terapi koşulları altında da bu şekilde devam etmektedir.

4.5. Genomik Analizler ve Populasyon Verileriyle Karşılaştırılması

CGH array kullanılarak yapılan genomik karşılaştırmada 2N klonların atasal DLD-1 hücre hattı ile aynı genomik dengesizliklere sahip oldukları bulunmuştur (*DLD-1 ATCC® CCL-221TM*). Atasal hatta 2p'de bir kazanım, 6p'de bir kayıp ve 11p'de bir kazanç vardır. Klonların bir kısmında, aynı zamanda atasal populasyondaki bazı metafazlarda kromozom Y de kaybedilmişti. Bu analiz tüm 4N klonlarda yeni genomik dengesizlikler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yeni genomik dengesizlikler: kromozom 6 kazanımı, 7p kaybı, kromozom 17 kaybı (C28), kromozom 20 kazanımı (B9) ve kromozom 15q kaybı (B12) (Şekil 36).



Şekil 36. DLD-1 klonlarının CGH array sonuçları. Kopya sayısı kazançları mavi, kayıpları kırmızı olarak gösterilmektedir.

Altklonların kromozomal düzeydeki farklılıklarını belirlemek amacıyla SKY analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 37). Buna göre, 2N klonlar atasal DLD-1 hücrelerine çok benzer kromozomal profillere sahipken, 4N klonlar çeşitli *de novo* yapısal kromozomal aberasyonlara sahiptir:

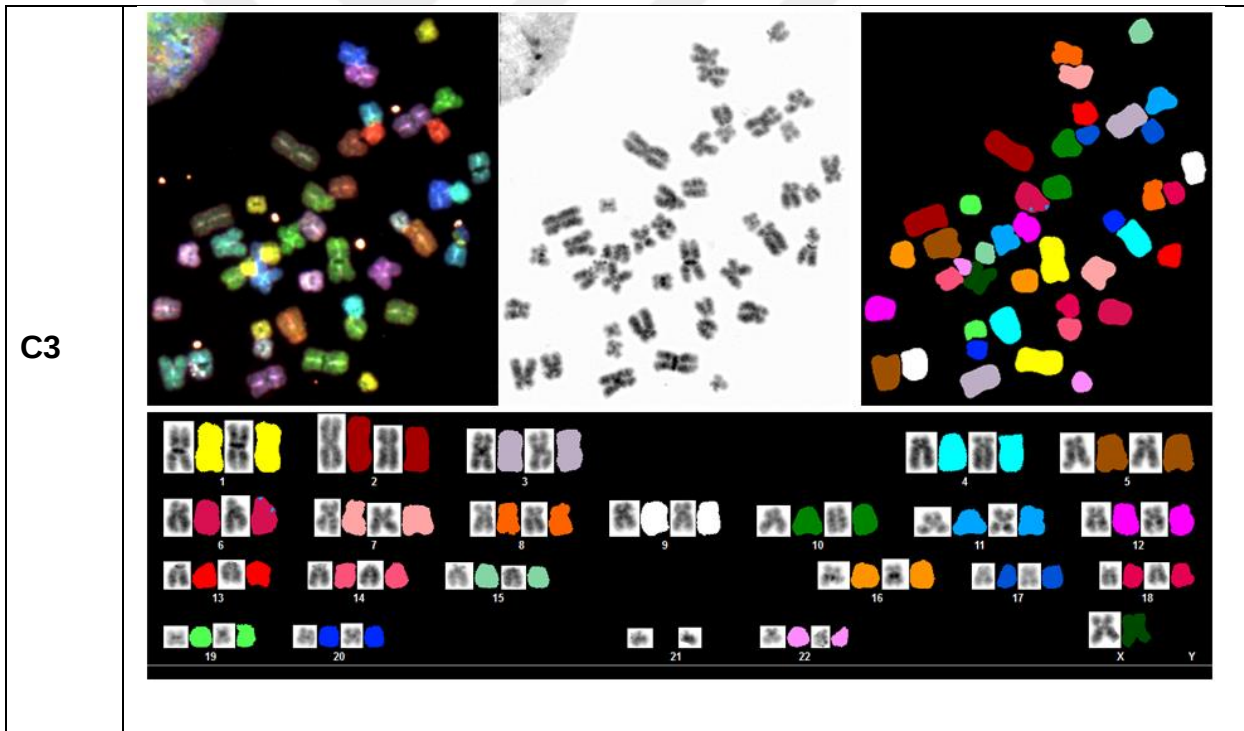
C3: Metafazlar 33-51 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 45. Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, t(6;11) ve Y kromozomu kaybı.

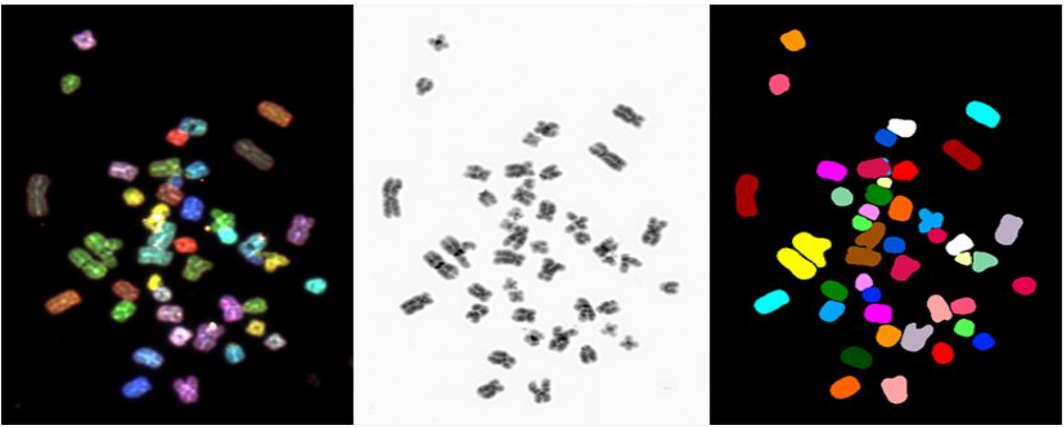
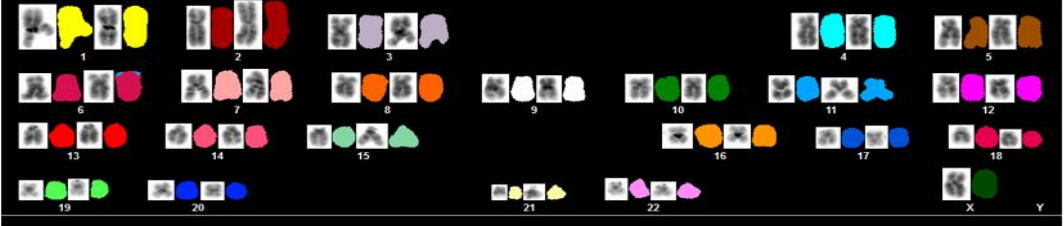
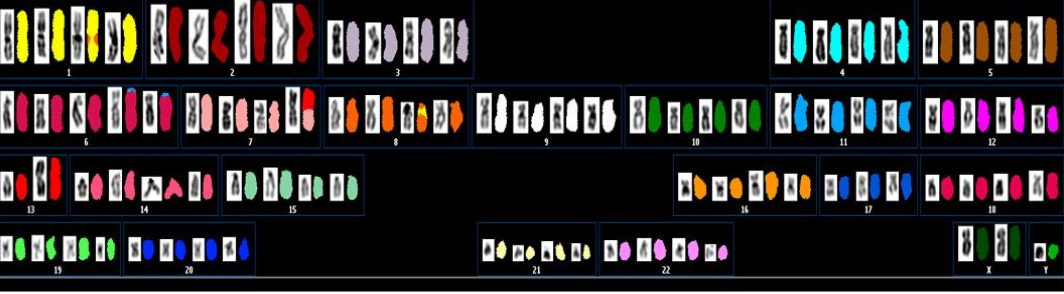
C34: Metafazlar 45-62 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 45.
Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, t(6;11) ve Y kromozomu kaybı.

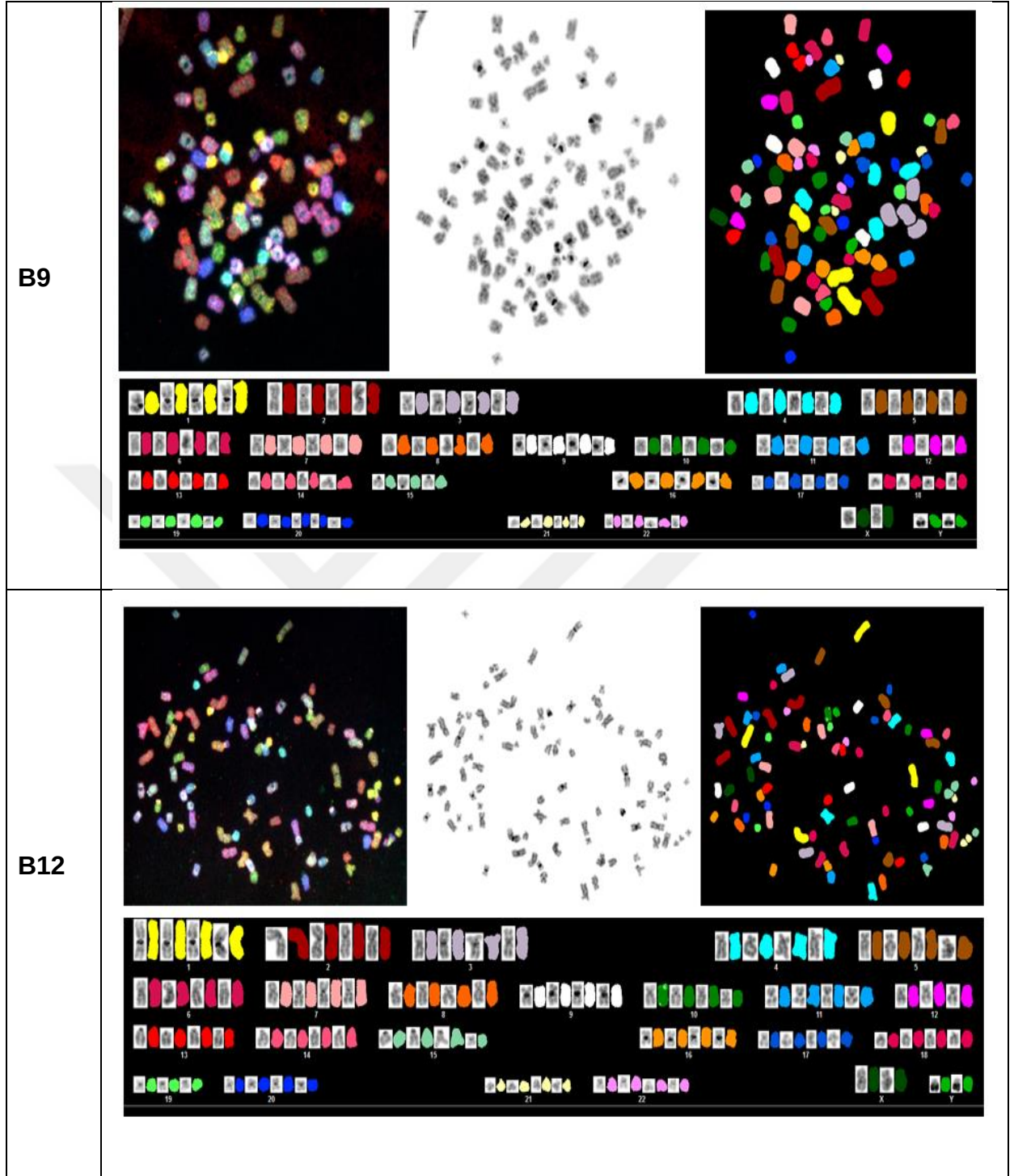
C28: Metafazlar 86-92 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 88.
Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, 6. kromozom kazanımı, 7p kaybı, 17. ve Y kromozomu kaybı, t(6;11), t(7;13), Rb(13).

B9: Metafazlar 86-116 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 91.
Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, kromozom 20 kazanımı, t(6;11), t(8;12), t(8;6), t(19;1).

B12: Metafazlar 77-98 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 89.
Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 12. ve 15. kromozom kaybı, t(6;11).



C34	 
C28	 



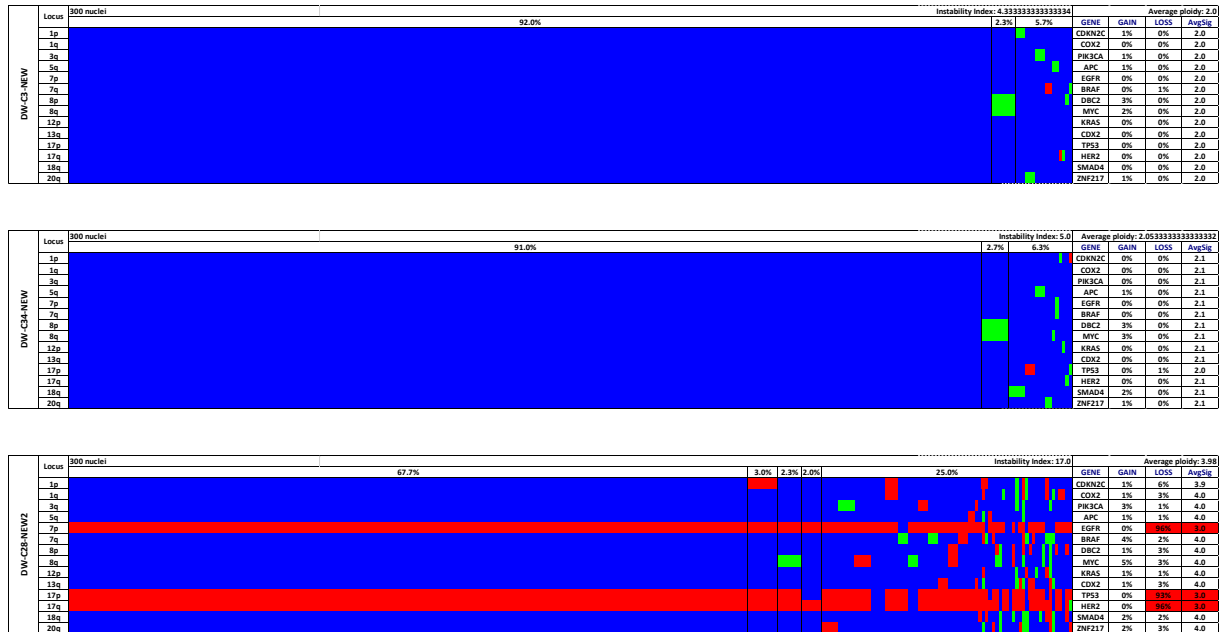
Şekil 37. DLD-1 klonlarının SKY analiz sonuçları

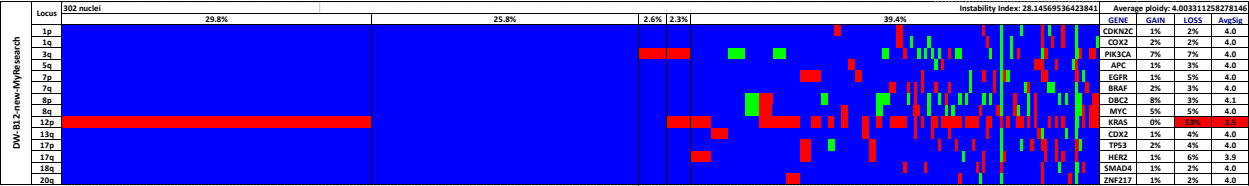
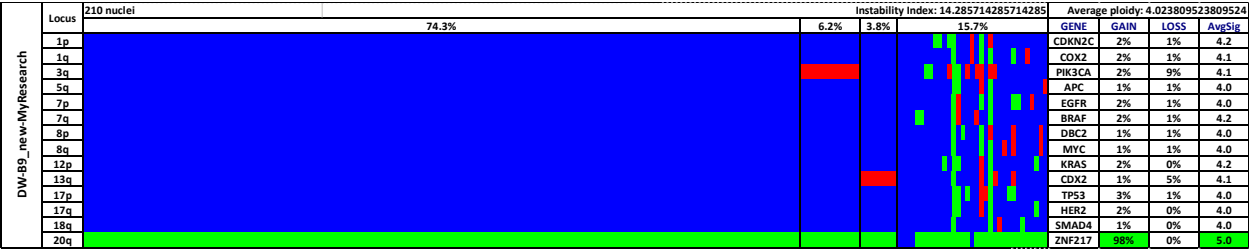
miFISH deneyleri, kopya sayısı değişimi açısından 4N klonların, 2N klonlardan daha fazla heterojeniteye sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 38a). Kopya sayısı kazanımları yeşil, kayıpları kırmızı ve değişim olmayan durumlar mavi olarak gösterilmiştir. Buna göre: C3 hücrelerinin %92'si tüm problemler için 2 kopya sayısına,

%2,3'ü kromozom 8 kazanımına ve %5,7'si ise aberant bir paterne sahiptir. İnstabilite indeksi 4,3'tür ve ortalama ploidi 2,0'dır. C34, C3 ile çok benzer bir profile sahiptir ve hücrelerinin %91'i söz konusu genler için normal kopya sayısına, %2,7'si kromozom 8 kazanımına ve %6,3'ü aberant paterne sahiptir. İnstabilite indeksi 5'tir ve ortalama ploidi 2,05'tir. Bununla birlikte, 4N klonlar 2N klonlardan çok farklı profillere sahiptir. C28 hücrelerinin %69,7'sinde homojen şekilde 7p ve 17. kromozom kaybı vardır. %3'ü 7p ve 17. kromozom kaybına ek olarak 1p'yi de kaybetmiş, %2,3'ü 8q kazanımına sahip olmuştur. %25'i ise aberant bir paterne sahiptir. İnstabilite indeksi 17, ortalama ploidi 3,98'dir. B9 hücrelerinin %74,3'ü 20q kazanımına sahiptir. %6,2'sinde ek olarak 3q kaybı, %3,8'inde ise 13q kaybı vardır. %15,7'si ise aberant bir paterne sahiptir. İnstabilite indeksi 14,3'tür ve ortalama ploidi 4,0'dır. B12 hücrelerinin %29,8'inde 12p kaybı vardır, %25,8'i ise söz konusu genler için normal kopya sayısına sahiptir. %2,6'sında 3q kaybı, %2,3'ünde ise ek olarak 12p kaybı vardır. %39,4'ü ise aberant bir paterne sahiptir. İnstabilite indeksi 28,1'dir ve ortalama ploidi 4,0'dır.

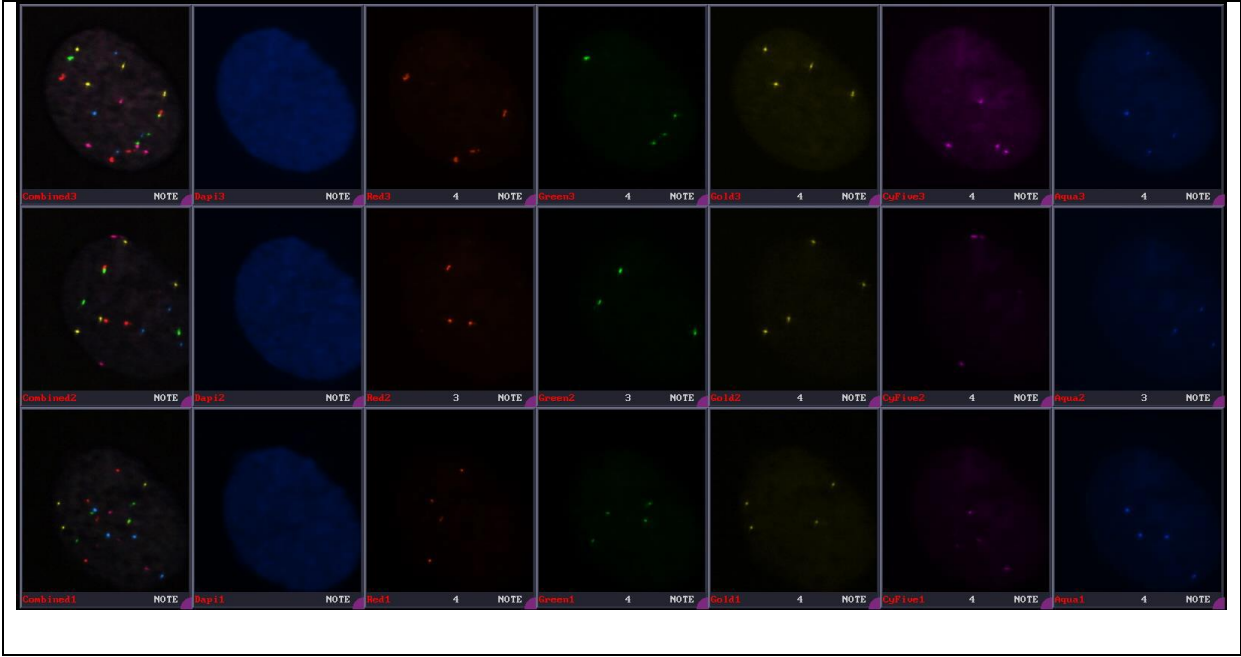
B9 altklonuna ait miFISH slaytlarının görüntüleri Şekil 38b'de verilmiştir. Bu görüntüler, 4N bir altklon olan B9'un, incelenen tüm genler açısından aberant bir kopya sayısı profiline sahip olduğunu göstermektedir.

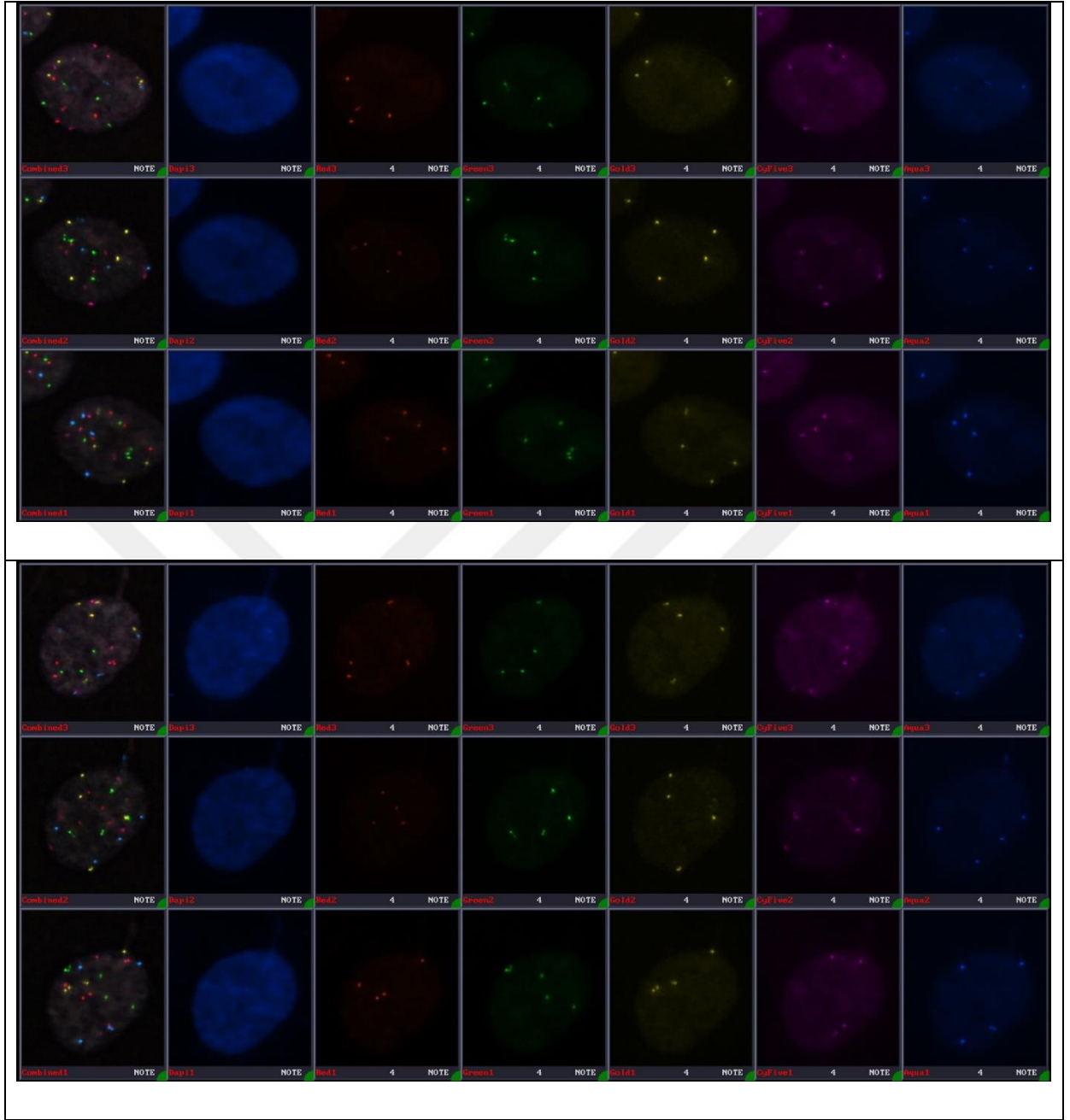
a)





b)





Şekil 38. DLD-1 altklonlarının 15 gen-spesifik prob ile miFISH analiz sonuçları a) Sırasıyla near-diploid C3 ve C34 ile near-tetraploid C28, B9 ve B12'ye ait klonal imbalans özeti. Yeşil kazanımları, kırmızı kayıpları, mavi değişim olmadığını göstermektedir. b) 4N B9 klonunun 15 ayrı prob ile kompozit görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Çalışmaların ilk aşaması olarak, DLD-1 kolorektal karsinoma hücre hattından köken alan iki 2N altklon (C3 ve C34) ile üç 4N altklonun (C28, B9 ve B12) EVOS ters ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiş olan görüntülemelerine göre, 4N altklonların 2N altklonlara göre daha büyük boyutta olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 11). Daha sonra DLD-1 altklonlarıyla gerçekleştirilen mikoplazma testinde DLD-1 altklonlarında mikoplazma kontaminasyonu olmadığı doğrulanmıştır (Şekil 12).

STR analizi sonuçlarına göre altklonlarda, atasal DLD-1 genomunda bulunan kısa tekrar dizilerinin büyük çoğunluğu örtüşmektedir (Tablo 4)(124). 5. kromozom üzerinde bulunan CSF1PO1 lokusunun tekrar sayısı altklonlarda, atasal DLD-1 hattındakine göre daha fazla bulunmaktadır. Amelogenin lokusu ise 2N altklonlarda Y kromozomlarının eksik olduğuna işaret etmektedir. Bu sonuçlar, gerçekleştirmiş olduğumuz kromozomal analizlerle uyumludur. STR deney sonuçları, kullanılan altklonların DLD-1 hücre hattına ait olduğunu doğrulamaktadır.

Yaptığımız çalışmalarda 2N klonlar kararlı bir kromozom içeriği sergilerken 4N klonlar çok çeşitli kromozom sayılarına sahiptir (Şekil 13). Bu durum, üç 4N klon için de daha yüksek bir heterojenite derecesine işaret etmektedir.

Daha sonra populasyon davranışlarının değerlendirilmesi aşamasına geçilmiştir. İlk olarak, DLD-1 altklonlarında canlılık tayini gerçekleştirilmiştir. Tripan mavisi ile canlılık testi denemeleri sonucunda 4N altklonların canlılığının daha yüksek olduğu ve normal kültür koşullarına 2N altklonlardan daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 25 ve 26). Ardından DLD-1 altklonlarının, normal koşullarda ve terapi etkisinde canlılık tayini MTT yöntemi kullanılarak da gerçekleştirilmiştir (Şekil 27). Genel olarak, aynı terapötik konsantrasyonu altında 4N klonlar, 2N klonlara göre daha yüksek canlılığa sahiptir. Özellikle B9 klonu 5-FU, OXP, IRI ve GTB'ye karşı oldukça dirençli olarak öne çıkmaktadır. Her ne kadar rektal neoadjuvan tedavide anlamlı bir faydaya neden olmadığı için tavsiye edilmese de, buradaki gibi spesifik özellikleri olan altklonların seçimli yok edilmesinde diğer terapötiklerle birlikte OXP'nin kullanımı yararlı olabilir (166). B9 altklonunun yüksek ilaç direncine sahip doğası, daha önce gerçekleştirilen, aynı hastadan alınan tümörden oluşturulan sferoidlerde

farklı antikanser ilaç cevaplarının gözlemlendiği çalışmayla benzerdir (167). Halihazırda DLD-1 hücrelerinin MIN olması onları kemoterapötiklere daha dirençli kılmaktadır (168). Ancak, bulgular kısmında bahsedildiği gibi özellikle B9 altklonunu diğerlerinden farklı kılan 20. kromozom kazanımı mevcuttur. 20. kromozom genlerinin incelenmesi, gen dozajı ve ekspresyon düzey korelasyonlarının çalışılması, kemoterapötiklere karşı oluşan dirençte etkili olabilecek yeni gen ürünlerinin tanımlanması için önemli olabilir. PTX'in ise 4N klonları 2N klonlardan daha çok etkilediği görülmektedir. Bu durum kemoterapötüğün kimyasal özelliğiyle ilgili olabilir. 5-FU ve GTB nükleozid analoglarıken (169,170), OXP DNA çapraz bağlayıcı (171) ve IRI topoizomeraze I inhibitörüdür (172). Hücre canlılığı bu ilaçlardan DNA dozajıyla korele etkileniyor olabilir (aynı konsantrasyonda ilaç daha fazla 2N hücre öldürüyor olabilir). Bununla birlikte PTX bir mitotik ağ stabilize edici ajandır (173) ve DNA dozajından direkt olarak etkilenmiyor olabilir. Ek olarak, 4N hücrelerde halihazırda yüksek seviyede genomik instabilite mevcuttur ve birçok anti-neoplastik terapi ilacı, anafaz sırasında kromozom segregasyonunun doğruluğunu bozabilir (48,49) ve daha yüksek bir genomik instabiliteye yol açarak Duesberg'in açıkladığı dengeli anöploidi/instabilite oranı bozularak (35) PTX aracılı olarak hücre döngüsü arrestine ve dolayısıyla apoptoza girmeye, 2N hücrelerden daha yatkın olabilirler (74,174,175).

C3, C34 ve B9 klonlarının hücre canlılıkları, hipoksiden yüksek düzeyde etkilenmemiştir. C28 ve B12 ise farklı yanıtlar vermiştir; C28'in canlılığında azalmaya neden olurken B12'nin canlılığında artışa neden olmuştur. Bu durum, C28 altklonunun tümörün daha fazla oksijenlenen periferine yakın lokalizeyken B12'nin tümörün merkezine yakın olan hipoksik bir bölgede lokalize olduğunu düşündürmektedir. Hücrelerin lokalizasyon ve in vivo dağılımlarını takip edebilmek amacıyla, aşağıda bahsedildiği şekilde floresan işaretlenen altklonlara ait kokültürler kullanılarak Ried Lab'da (NIH) "nude" fare çalışmaları gerçekleştirilecektir. Ek olarak, B9 gibi bu iki klon da 4N olduğu için bu durum DNA dozajından çok, kromozom veya genlerdeki spesifik farklılıklardan kaynaklandığı izlenimini uyandırmaktadır. Daha önceki çalışmalar hipoksinin anöploidi ve tümör gelişimini artırdığını göstermektedir (176). Dolayısıyla, B12'de gözlemlendiği gibi, hipoksiye daha toleranslı bir profil, daha ileri bir malignant fenotipe işaret ediyor olabilir. Radyasyon 24 saatte belirgin bir etkiye neden olmazken 72 saat ve 144 saat inkübasyon sonucunda 4N altklonları

daha az etkilediği gözlenmiştir. Bu durum literatürle örtüşmektedir (13,49). Ayrıca Castedo ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada da tetraploid hücrelerin DNA hasarı oluşturan ajanlara (cisplatin, oxaliplatin ve camptothecin) ve UVC ile γ -radyasyona diploid hücrelerden daha dirençli olduğunu bulmuşlardır (177).

BrdU denemesinde genel olarak 2N altklonların 4N altklonlardan daha proliferatif olduğu bulunmuştur (Şekil 28). B9 altklonunun diğer 4N altklonlardan farklı şekilde davrandığı ve çok daha agresif olduğu gösterilmiştir. DLD-1 hücrelerinin hızlı büyüyen hücreler oldukları bilinmektedir [“doubling time” (iki katına çıkma süresi) 20–24 saat] (125). Konvansiyonel kemoterapötik ajanlar aktif olarak proliferen hücreleri öldürür, ancak bu ajanlar tamamen iyileştirici değildir çünkü kanser kök hücreleri görece yavaş çoğalır. Kök hücreler, daha ileri tümörlerde sayıca daha fazla olma ve olgun kanser hücrelerine göre kemoterapötik ajanlara karşı daha dirençli olma eğilimindedir (178–180). CSC’lerin, ABC transport proteinlerinin yüksek ekspresyon seviyeleri, aktif DNA tamir kapasiteleri ve apoptoz direncinden dolayı toksik çevresel ajanlara inert oldukları öne sürülmektedir (181). Diferansiyasyon denemelerinde de belirtildiği üzere, 4N altklonlar daha kök hücre-benzeri bir profil sergilemektedir. Dolayısıyla, 2N altklonlara göre daha az proliferatif olmaları ve konvansiyonel terapötiklere daha dirençli olmaları literatürle uyumludur.

Klonların klonojenik yetenekleri, koloni oluşum denemesi ile belirlenmiştir. CFA deney sonuçları, stresörlerin olmadığı durumda 4N altklonların daha büyük koloniler oluştururken stresörlerden (kemoterapi, radyoterapi ve hipoksi) 2N altklonlara göre daha çok etkilendiklerini ve genel olarak daha az sayıda koloni oluşturduklarını göstermektedir (Şekil 29). Irinotekan etkisi ve hipoksi etkisi altında B12 altklonunun verdiği sonuçlar bu durumlara istisnadır, bununla birlikte bu farklanmalar anlamlı düzeyde değildir. Bununla birlikte, klonojenik deneme, hem sağkalım, hem de proliferasyon hakkında bilgi vermektedir. CFA denemesi sadece koloniler sayılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, kolonilerin çaplarının ölçülmesi de ek bilgi sağlayabilir.

Klonların migrasyon yetenekleri, çizik kapama yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 30a). Normal koşullar altında 4N klonlar, 2N klonlardan daha migratuardır (30b). Terapi etkileri altında ise en migratuar klon C28’dir (30c). Hücresel motilite

bağlamında bu altklon diğer 4N altklonlardan daha yeteneklidir. Bu durum yine 4N klonların, 2N klonlardan daha fazla migrasyona yatkın olduklarını göstermekle beraber, kendi içlerinde bu yetenekleri –değişik genomik profillerinden kaynaklanan- farklılıklar göstermektedir.

Klonların invazif yeteneklerini belirlemek amacıyla Transwell Matrigel invasion assay kullanılmıştır (Şekil 31). Terapi etkisi olmadığında, B9 klonu diğer klonlardan daha migratuardır (0 mg/mL Matrigel varlığında). Bununla birlikte, invazif yetenek klonlar arasında çok fazla değişim göstermemektedir. 4N klonlar 2N klonlardan anlamlı olmayan düzeyde daha migratuardır, ancak daha invazif değildir. Ek olarak, 4N klonların invazif yetenekleri, 5-FU, OXP, IRI ve hipoksi uygulamalarına karşı daha duyarlıdır. PTX, B9'un invazifliği üzerinde azaltıcı etkiye sahiptir. GTB ve radyasyon etkileri altında 4N klonlar 2N klonlardan daha invaziftir. Kromozomal düzeyde farklılıkları bilinen bu altklonların, “gross” seviyede farklılaşan bölgelerde invazyonla ilişkili genlerin araştırılması ve ekspresyon artış/azalışlarının doğrulanması bir sonraki aşamada gerçekleştirilmesi gereken hedeftir. Transwell invazyon denemeleri genel bir fikir vermekle birlikte, hayvan çalışmalarıyla konfirme edilmelidir. Buna yönelik olarak, daha önce belirtildiği üzere floresan DLD-1 klonlarının *in vivo* invazif yetenekleri ve dağılımlarının aydınlatılması amacıyla fare çalışmaları Ried Lab (NIH) 'da gerçekleştirilmektedir.

DLD-1 klonlarının diferansiyasyon düzeyleri, sferoid oluşturma deneyi ve kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi yöntemleriyle belirlenmiştir. SFA denemesine göre genel olarak, 4N klonların 2N klonlardan daha dediferansiye olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 32). Özellikle C28 ve B9 klonları öne çıkmaktadır. B12 hücreleri hızlı ve sağlam adhere olmalarına rağmen sferoid oluşturmamaktadırlar, daha çok tek tabaka olarak büyümektedirler, uzun süre kültüre edildiklerinde odaklar oluşturabilmektedirler. C3 de sferoid benzeri yapılar oluşturmakla birlikte, bunlar genellikle agardan kopmuş hücre agregatlarıdır. Hipoksi etkisi altında altklonların sferoid oluşturma yeteneğinin arttığı görülmektedir. Altklonların diferansiyasyon düzeylerinin bir başka yöntemle gösterilmesi amacıyla, KRK kök hücre belirteçleri akış sitometrik yöntemle incelenmiştir (Şekil 33). Bu deneme sonucunda; 4N altklonların, özellikle B12'nin daha yüksek CD44 ve CD29

ekspresyonuna sahip olduğu, CD133 için tüm altklonların benzer ekspresyon düzeyine sahip olduğu, B12 altklonunun diğer altklonlara göre daha yüksek CD166 ve CD326 ekspresyonuna sahip olduğu, C28 ve B12'nin yüksek, C34'ün düşük düzeyde diğer altklonlardan daha fazla CD24 ekspresyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar SFA denemelerinden alınan sonuçları doğrulamakta ve 4N altklonların 2N altklonlara göre daha dediferansiye olduğuna işaret etmektedir. Bu sonuç, daha ileri düzeydeki ve daha agresif tümörlerin daha dediferansiye olduğu ve ilaç direncine sahip olduğu bilgisiyle uyumludur (99,159,182).

Oluşturulan *in vitro* tümör heterojenite modellerinde zamana bağlı olarak ve terapi koşulları altında populasyon kinetiklerindeki değişimlerin izlenmesi amacıyla konfokal mikroskopi (Şekil 23 ve 34) ve akış sitometrisi (Şekil 24 ve 35) yöntemleri kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre, M1 kokültüründe normal koşullarda 2N altklonlar 4N altklonlara göre daha fazla sayıdayken terapi koşulları altında 4N altklonlar kokültür ortamını ele geçirmektedir. M2 kokültüründe 2N ve 4N altklonlar arasında genel olarak dengeli bir dağılım olmakla birlikte, C28 yokluğunda B9 terapötiklerden daha fazla etkileniyor şeklinde görünmektedir. M3 kokültüründe normal koşullarda dengeli bir dağılım izlenmekteyken, terapi koşulları altında 2N altklonlar 4N altklonlara göre daha fazla sayıya ulaşmaktadır. C28 altklonunu içermeyen bir diğer karışım olan M4 kokültüründe altklonlar, normal koşullar altında genel olarak dengeli bir dağılımdadır ve terapi koşulları altında da bu şekilde devam etmektedir.

Altklonların genomik özelliklerinin belirlenmesine yönelik olarak aCGH, SKY ve miFISH denemeleri gerçekleştirilmiştir. CGH array kullanılarak yapılan genomik karşılaştırmada 2N altklonların atasal DLD-1 hücre hattı ile aynı genomik dengesizliklere sahip oldukları bulunmuştur (Şekil 36) (124). Atasal hatta 2p'de bir kazanım, 6p'de bir kayıp ve 11p'de bir kazanım vardı. Klonların bir kısmında, aynı zamanda atasal popülasyondaki bazı metafazlarda kromozom Y de kaybedilmişti. Bu analiz tüm 4N klonlarda yeni genomik dengesizlikler olduğunu ortaya çıkardı. Yeni genomik dengesizlikler: kromozom 6 kazanımı (183), 7p kaybı, kromozom 17 kaybı (C28) (184,185), kromozom 20 kazanımı (B9) (59,184,185) ve kromozom 15q kaybı (B12) (185,186) (Şekil 39).

Altklonların kromozomal düzeydeki farklılıklarını belirlemek amacıyla SKY analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 37). Buna göre karyotipler; C3: Metafazlar 33-51 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 45. Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, t(6;11) ve Y kromozomu kaybı. C34: Metafazlar 45-62 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 45. Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, t(6;11) ve Y kromozomu kaybı. C28: Metafazlar 86-92 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 88. Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, 6. kromozom kazanımı, 7p kaybı, 17. ve Y kromozomu kaybı, t(6;11), t(7;13), Rb(13). B9: Metafazlar 86-116 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 91. Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 6p25 kaybı, kromozom 20 kazanımı, t(6;11), t(8;12), t(8;6), t(19;1). B12: Metafazlar 77-98 kromozom aralığındadır. Modal kromozom sayısı: 89. Karyotip: 2p14-22 ve 11p15.3-15.5 kazanımı, 12. ve 15. kromozom kaybı, t(6;11).

miFISH deneyleri, kopya sayısı değişimi açısından 4N klonların, 2N klonlardan daha fazla heterojeniteye sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 38a). Genel bilgiler kısmında da belirtildiği üzere, tüm genomun duplikasyonundan kaynaklanan karmaşık anöploidiler ve poliploid durum; metastatik, tedaviye dirençli ve düşük genel sağkalıma sahip tümör tiplerinin özellikleridir (41,45,46). Bu bağlamda 4N altklonların yüksek instabiliteye sahip bulunması anlamlıdır. Altklonların kromozomal düzeydeki farklılıklarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen SKY denemesine göre, 2N klonlar atasal DLD-1 hücrelerine çok benzer kromozomal profillere sahipken, 4N klonlar çeşitli *de novo* yapısal kromozomal aberasyonlara sahiptir. Altklonların 2p ve 11p kazanımı, 6p kaybı ve kromozom Y kaybı içeren SKY profillerine sahip olmaları, CGH sonuçlarımızla uyumludur. Y kromozomunun C3, C34 ve C28 klonlarında kayıp olması, CGH ve STR denemelerimizin sonuçlarıyla desteklenmektedir. Özellikle ileri yaşta erkek KRK hastalarında Y kromozomu kaybı olduğu literatürde yer almaktadır (59). C28 klonunda 7p kaybı olması ilgi çekicidir, çünkü genellikle CRC'lerde 7p kazanılmaktadır (184). Daha fazla veriye ihtiyaç olmakla birlikte, C28 klonuna spesifik fenotipik özelliklerin bazılarında bu değişiklik sorumlu olabilir. B9 klonu, diğer klonlarda görülmeyen, spesifik bir kromozom 20 kazanımına sahiptir. Bu veri CGH ile desteklenmektedir. B12 klonunda spesifik bir kromozom 12 ve kromozom 15 kaybı olduğu gözlenmektedir. Bunlara ek olarak, 4N klonlar farklı translokasyonlara da

sahiptir. Tüm bu kromozomal değişimler terapi direncine yol açabilecek moleküler mekanizmalar üzerinde etkili olabilir. Bu özel aberasyonlardan faydalanılarak yeni terapötik hedefler geliştirilmesine yönelik olarak planlanan çalışma bir sonraki bölümde açıklanmıştır.

Altklonların, değişen koşullarda (özellikle tedavi sürecinde) tümör içi davranış şekillerinin ortaya çıkarılması tedavi direnci oluşum sürecinin anlaşılmasına büyük katkı sağlayacaktır. Çalışmamızın kapsamı, kanser alanındaki tüm gelişmelere rağmen çok önemli bir sorun olan tedavi direncinin biyolojisinin araştırılmasıdır. Bu nedenle sağlık alanında sonuçların yaygın etkisi olmuştur ve olacaktır. Tümörlere özgü kromozomal anöploidilerin ortaya çıkarılmasıyla klinikte kullanılabilecek prognoz, progresyon ve prekanseröz lezyondan karsinoma geçiş ile ilgili önemli önermeler ileri sürme olanağımız olmuştur. Bunlardan en önemlisi tedavi sürecinin kendisinin tümör hücre popülasyonunu etkilediği ve dolayısıyla tümör biyolojisinin etkilendiğini göstermek olmuştur. Kişiselleştirilmiş tıbbın önem kazandığı günümüzde, tanı anındaki spesifik genomik özellikleri hedefleyen tedavi stratejileri uygulanmaktadır. Oysa sadece tanı anında değil, tedavi süresince belirlenecek aralıklarla tümör popülasyonunun incelenmesi, öne çıkan popülasyon kaymaları göz önüne alınarak tedavi sürecinin yeniden yapılandırılması daha etkin sonuçlar verebileceği ve izlenen terapi direncini önemli oranda düşürebileceğini ileri sürmekteyiz. Bunun için aynı tanı anındaki gibi, seçilecek tedavi için yönlendirecek genomik belirteçlere ihtiyaç vardır. Çalışmamızda tedavi için önemli olabilecek önemli bir genomik belirtecin kromozomal ploidi olduğu ortaya konmuştur. Atasal hücre hattının çoğunluğunu 2N klonlar oluşturmakla beraber KRK tedavisinde kullanılan çoğu kemoterapötikler ve radyasyonun 4N klonların lehine bir seçimle sonuçlandığını ve bu altklonların diğerlerine göre daha agresif ve dediferansiye olduğunu gösterdik. Bu durum literatürde belirtilen ilaç direnci geliştirmiş kanser hücresi özellikleriyle paraleldir ref. Bu klonlar genomik kararsızlıklarından dolayı özellikle paclitaxel (taxol, taxane, taxotere) ve mitotik iğ üzerine etkili diğer antineoplastik ilaçlar yanında hipoksiye duyarlılık göstermektedir. Bu bilgi literatürde CIN tümörleri için verilen bilgiyle terstir. Bununla birlikte bir MIN tümöründen köken alan DLD-1 hücrelerinin, özellikle daha yüksek genomik instabiliteye sahip olan altklonlarının PTX'e duyarlı olması, bize CIN ve MIN tümörler arasındaki temel

biyolojik farklardan birini işaret ediyor olabilir (72–74). Tedavi sürecinde ya da relapsta 4N hücrelere yönelik bir kaymanın saptanması halinde, bu tür kemoterapötiklere ve hipoksiyi destekleyebilecek anti-neovasküler tedavilere yönelmek daha etkili sonuçlar verebilecektir. Çalışmamızın bir diğer önemli verisi, farklı fenotipik davranış gösteren klonlar arası genomik farklılıkları da kromozomal lokuslar düzeyinde tanımlamış olmamızdır. Bu lokuslardaki genlerin ve ilgili moleküler mekanizmaların çalışılması, yeni tedavi hedeflerinin tanımlanması yolunda önemli bir adımdır. Araştırmanın devamında bu kromozomal lokuslarda yer alan genlerin tanımlanması ve tedavi direncindeki olası moleküler mekanizmaların çalışılması hedeflenmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında tek bir tümörden türemiş bir hücre hattına ait, farklı genetik profillere sahip altklonların farklı renklerde fluoresan ile işaretlenerek bir arada üretildiği ve değişik koşullara maruziyet sonrasında bu klonların kinetik davranışlarının araştırıldığı tümör heterojenitesinin *in vitro* bir modelinin oluşturulması amaçlanmıştır. Genetik profilleri tanımlanan tümör altklonların, yaratılan farklı mikroçevre koşulları karşısında (kemoterapötikler, radyasyon ve hipoksi), aralarındaki davranış farklılıkları karşılaştırılarak, hangi koşulda hangi varyasyonun avantaj sağladığı ve farklı koşullardaki dirençten sorumlu olabilecek genetik varyasyonlar belirlenmiştir.

DLD-1 altklonlarının karakterizasyonunun ardından stabil fluoresan işaretlemeleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan *in vitro* intratümöral heterojenite modelleri zamana bağlı olarak ve çeşitli terapi etkileri altında izlenmiştir. Altklonlar üzerinde, populasyon davranışlarının belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen deney sonuçları NIH Ried Lab'da gerçekleştirilen genomik analizlerle karşılaştırılarak kanserde ilaç direncine neden olan moleküler düzeydeki mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik büyük adımlar atılmasını sağlamıştır.

Çalışmamız, tedavi için önemli olabilecek önemli bir genomik belirtecin kromozomal ploidi olduğunu ortaya koymuştur. Tümör içi farklı fenotipik davranış gösteren klonlar arasındaki genomik farklılıklar, kromozomal lokuslar düzeyinde tanımlanmıştır. Bu lokuslardaki genlerin ve ilgili moleküler mekanizmaların çalışılması, yeni tedavi hedeflerinin tanımlanması yolunda önemli bir adımdır. Tümör içi genetik heterojenitenin derecesinin prognoz ile tedavi yanıtını nasıl etkilediği ile ilgili önemli veriler elde etmemiz, gelecekte tümör içi heterojenite ve genomik instabilitenin derecesini ölçebilecek yöntem ve analitik araçların kombinasyonu ve geliştirilmesine temel olabilecektir. Bu çalışmada oluşturmuş olduğumuz *in vitro* intratümöral heterojenite modelinin pek çok çalışmaya temel olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda belirlenen antikanser hedeflerin ayrıntılandırılabilmesi amacıyla, tümör altklonlarındaki ekspresyon farklılıklarının ve nokta mutasyon düzeyindeki farklılıklarının saptanması, anöploidiye bağlı intratümöral heterojenite sonucunda

gelişen terapi direncinin önüne geçilebilmesi yolunda bir sonraki aşama olmalıdır. Bunlara ek olarak, hasta örneklerinde de bu hedeflerin belirlenmesi ve fare çalışmalarında *in vivo* olarak test edilmesi tümör içi heterojenitenin prognostik belirteçlerini saptamada atılması gereken adımlardır.

Bu amaçla bir sonraki aşamada, genomik ve biyolojik özellikleri tarafımızdan belirlenmiş olan DLD-1 kolon kanseri hücre hattının izotipik anöploid altklonlarının tüm genom genotipleme, gen ve miRNA ekspresyon ile DNA metilasyon analizi verilerinin elde edilmesi ve daha önce elde edilen genomik ve fenotipik verilerle birlikte değerlendirilmesi sonucu kemoradyoterapi direncine neden olabileceği düşünülen genlerin belirlenmesi planlanmaktadır. Daha sonra ise patoloji arşivindeki, klinik seyir ve tümörün patolojik özellikleri açısından sınıflandırılmış hasta doku preparatları kullanılarak bu genlerle ilgili öngörümüzün doğruluğunun araştırılması, terapi direncinde etkili olabilecek hedeflerin tanımlanması gerçekleştirilecektir.

Aynı atasal hücreden köken alan ve farklı genetik profillere sahip altklonların, ilaç direnci bağlamında genetik ve fenotipik özelliklerinin aydınlatılmasına yönelik gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmalarımızın devamı niteliğinde olan bu araştırma planı, kolon kanserinde izlenen terapi direncinde etkili tümör içi heterojenitenin etiyopatolojisinde rol oynayan gen ve proteinlerin araştırılmasını hedeflemektedir.

Elde edilecek veriler sayesinde, genetik/epigenetik düzeydeki hangi farklanmaların kolon kanserinde izlenen terapi direnciyle ilişkili olabileceği belirlenecek, bu sayede, benzer terapiler almış olmalarına rağmen farklı klinik tablo sergileyen hastalardaki gen ve protein düzeyindeki farklılıklar, kemoradyoterapi direncine neden olabilecek hedefleri işaret edecektir. Böylelikle etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılabilecek özgün hedefler tanımlanacaktır. Bulunacak bu hedef genlerin farklı kanser türlerine uygulanma potansiyeli yüksek bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Ruiz C, Lenkiewicz E, Evers L, Holley T ve ark. Advancing a clinically relevant perspective of the clonal nature of cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;
2. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* (80-). 1976;
3. Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA. Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2009;
4. Masramon L, Vendrell E, Tarafa G, Capella G ve ark. Genetic instability and divergence of clonal populations in colon cancer cells in vitro. *J Cell Sci*. 2006;
5. WHO | The data repository [Internet]. [cited 2020 Jan 12]. Available from: <https://www.who.int/gho/database/en/>
6. Omran AR. The epidemiologic transition. A theory of the Epidemiology of population change. 1971. *Bull World Health Organ*. 2001;79(2):161–70.
7. Gersten O, Wilmoth JR. The cancer transition in Japan since 1951. Vol. 7, *Demographic Research*. Max Planck Institute for Demographic Research; 2002. p. 271–306.
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL ve ark. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
9. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2020 Jan 10];69(1):7–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21551>
10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Vol. 100, *Cell*. 2000. p. 57–70.
11. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. Vol. 11, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. p. 220–8.

12. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Vol. 461, *Nature*. 2009. p. 1071–8.
13. Kastan MB. DNA damage responses: Mechanisms and roles in human disease 2007 - G.H.A. Clowes Memorial Award lecture. *Mol Cancer Res*. 2008 Apr 1;6(4):517–24.
14. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. Vol. 60, *Cancer Research*. 2000. p. 6788–93.
15. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
16. Hsu S, Duncan AW. Pathological polyploidy in liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2015 Sep [cited 2020 Jan 13];62(3):968–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27908>
17. Monte U Del, Ugo DM. *Caryologia International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics Focusing experimentally on polyploidy in physiology and pathology of mammals Focusing experimentally on polyploidy in physiology and pathology of mammals*. 2007 [cited 2020 Jan 13];60(3):226–32. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tcar20>
18. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer | University Library [Internet]. [cited 2020 Jan 13]. Available from: <https://ulib.iupui.edu/databases/mitelman-database-chromosome-aberrations-and-gene-fusions-cancer>
19. Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. Vol. 5, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004. p. 45–54.
20. Galipeau PC, Cowan DS, Sanchez CA, Barrett MT ve ark. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1996 Jul 9 [cited 2020 Jan

13];93(14):7081–4. Available from:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.14.7081>

21. Reid BJ, Barrett MT, Galipeau P, Sanchez CA ve ark. Barrett's esophagus: ordering the events that lead to cancer. *Eur J Cancer Prev* [Internet]. 1996 Dec [cited 2020 Jan 13];5:57–65. Available from:
<https://insights.ovid.com/crossref?an=00008469-199612002-00009>

22. Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Remvikos Y, Zafrani B ve ark. Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1991 Nov [cited 2020 Jan 13];19(3):245–55. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/BF01961161>

23. Kirkland JA, Stanley MA, Cellier KM. Comparative study of histologic and chromosomal abnormalities in cervical neoplasia. *Cancer* [Internet]. 1967 Nov [cited 2020 Jan 13];20(11):1934–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%28196711%2920%3A11%3C1934%3A%3AAID-CNCR2820201122%3E3.0.CO%3B2-4>

24. Olaharski AJ, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt ME ve ark. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2020 Jan 13];27(2):337–43. Available from: <http://academic.oup.com/carcin/article/27/2/337/2476092/Tetraploidy-and-chromosomal-instability-are-early>

25. Ottesen GL. Carcinoma in situ of the female breast. A clinico-pathological, immunohistological, and DNA ploidy study. *APMIS Suppl* [Internet]. 2003 [cited 2020 Jan 13];(108):1–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874968>

26. Tanaka T, Mori H, Takahashi M, Williams GM. DNA content of hyperplastic and neoplastic acinar cell lesions in rat and human pancreas. *J Exp Pathol* [Internet]. 1984 [cited 2020 Jan 13];1(4):315–26. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6599941>

27. Deitch AD, Miller GJ, deVere White RW. Significance of abnormal diploid DNA histograms in localized prostate cancer and adjacent benign prostatic tissue. *Cancer*

[Internet]. 1993 Sep 1 [cited 2020 Jan 13];72(5):1692–700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688657>

28. Montgomery BT. Stage B Prostate Adenocarcinoma. Arch Surg [Internet]. 1990 Mar 1 [cited 2020 Jan 13];125(3):327. Available from: <http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archsurg.1990.01410150049010>

29. Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. Cancer Res [Internet]. 2003 Mar 15 [cited 2020 Jan 13];63(6):1398–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649205>

30. Hamada S, Itoh R, Fujita S. Dna distribution pattern of the so-called severe dysplasias and small carcinomas of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression. Cancer [Internet]. 1988 Apr 15 [cited 2020 Jan 13];61(8):1555–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%2819880415%2961%3A8%3C1555%3A%3AAID-CNCR2820610812%3E3.0.CO%3B2-W>

31. Levine DS, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Blount PL et al. Distribution of aneuploid cell populations in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. Gastroenterology [Internet]. 1991 Nov [cited 2020 Jan 13];101(5):1198–210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1936790>

32. Davoli T, de Lange T. The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011 Nov 10;27(1):585–610.

33. CALKINS GN. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Science (80-). 1914 Dec 11;40(1041):857–9.

34. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. Vol. 9, Trends in Cell Biology. 1999.

35. Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13692–7.
36. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997 Apr 10;386(6625):623–7.
37. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Vol. 396, *Nature*. 1998. p. 643–9.
38. Bakhom SF, Cantley LC. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. Vol. 174, *Cell*. Cell Press; 2018. p. 1347–60.
39. Paulsson K, Johansson B. Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol*. 2007 Feb;55(1):37–48.
40. Cimini D. Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. Vol. 1786, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2008. p. 32–40.
41. Carter SL, Cibulskis K, Helman E, McKenna A ve ark. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol*. 2012 May;30(5):413–21.
42. Bakhom SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA ve ark. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*. 2018 Jan 25;553(7689):467–72.
43. Goh JY, Feng M, Wang W, Oguz G ve ark. Chromosome 1q21.3 amplification is a trackable biomarker and actionable target for breast cancer recurrence. *Nat Med*. 2017 Nov 1;23(11):1319–30.
44. Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A ve ark. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell*. 2018 Apr 19;173(3):581-594.e12.

45. Bielski CM, Zehir A, Penson A V., Donoghue MTA ve ark. Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers. *Nat Genet.* 2018 Aug 1;50(8):1189–95.
46. Taylor AM, Shih J, Ha G, Gao GF ve ark. Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy. *Cancer Cell.* 2018 Apr 9;33(4):676-689.e3.
47. Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA. Mechanisms of Chromosomal Instability. Vol. 20, *Current Biology.* 2010.
48. Bakhoum SF, Kabeche L, Murnane JP, Zaki BI ve ark. DNA-damage response during mitosis induces whole-chromosome missegregation. *Cancer Discov.* 2014 Nov 1;4(11):1281–9.
49. Lee HS, Lee NCO, Kouprina N, Kim JH ve ark. Effects of anticancer drugs on chromosome instability and new clinical implications for tumor-suppressing therapies. *Cancer Res.* 2016 Feb 15;76(4):902–11.
50. Maciejowski J, Li Y, Bosco N, Campbell PJ ve ark. Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell.* 2015 Dec 17;163(7):1641–54.
51. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. Vol. 13, *Nature Reviews Genetics.* 2012. p. 795–806.
52. Cimini D, Howell B, Maddox P, Khodjakov A ve ark. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol.* 2001 Feb 5;152(3):517–27.
53. Denko NC, Giaccia AJ, Stringer JR, Stambrook PJ. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 1994 May 24 [cited 2020 Jan 14];91(11):5124–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.11.5124>
54. Felsher DW, Bishop JM. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 1999 Mar 30 [cited 2020

Jan 14];96(7):3940–4. Available from:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.7.3940>

55. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E ve ark. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* [Internet]. 1992 Sep [cited 2020 Jan 14];70(6):923–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867492902436>

56. Rasnick D, Duesberg PH. How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer. *Biochem J* [Internet]. 1999 Jun 15 [cited 2020 Jan 14];340 (Pt 3):621–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359645>

57. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ ve ark. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):300–3.

58. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* [Internet]. 1990 Jun 1 [cited 2020 Jan 14];61(5):759–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188735>

59. Ashktorab H, Schäffer AA, Daremipouran M, Smoot DT ve ark. Distinct Genetic Alterations in Colorectal Cancer. Zanger U, editor. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan 26 [cited 2019 Apr 1];5(1):e8879. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008879>

60. Markowitz S. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J Clin Oncol* [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2020 Jan 14];18(21 Suppl):75S-80S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060332>

61. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa J-PJ. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2000 Jan 18 [cited 2020 Jan 14];97(2):710–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.97.2.710>

62. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J ve ark. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly

associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Jul 25 [cited 2020 Jan 14];38(7):787–93. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng1834>

63. Wang Z, Cummins JM, Shen D, Cahill DP ve ark. Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2020 Jan 14];64(9):2998–3001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126332>

64. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H ve ark. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 1996 Apr [cited 2019 Oct 31];15(4):234–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703849>

65. Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C ve ark. Clonal karyotypic abnormalities in colorectal adenomas: Clues to the early genetic events in the adenoma-carcinoma sequence. *Genes, Chromosom Cancer* [Internet]. 1994 Jul [cited 2020 Jan 14];10(3):190–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.2870100307>

66. He Q-J, Zeng W-F, Sham JST, Xie D ve ark. Recurrent genetic alterations in 26 colorectal carcinomas and 21 adenomas from Chinese patients. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2003 Jul 15 [cited 2020 Jan 14];144(2):112–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850373>

67. Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C ve ark. Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes, Chromosom Cancer*. 1995;12(2):97–109.

68. Tsafrir D, Bacolod M, Selvanayagam Z, Tsafrir I ve ark. Relationship of Gene Expression and Chromosomal Abnormalities in Colorectal Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Feb 15 [cited 2020 Jan 14];66(4):2129–37. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-2569>

69. Muleris M, Dutrillaux AM, Olschwang S, Salmon RJ ve ark. Predominance of normal karyotype in colorectal tumors from hereditary non-polyposis colorectal

cancer patients. *Genes, Chromosom Cancer* [Internet]. 1995 Nov [cited 2020 Jan 14];14(3):223–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.2870140312>

70. Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ ve ark. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. *Carcinogenesis* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2020 Jan 14];27(3):419–28. Available from: <http://academic.oup.com/carcin/article/27/3/419/2476132/Genomewide-differences-between-microsatellite>

71. Birkbak NJ, Eklund AC, Li Q, McClelland SE ve ark. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res*. 2011 May 15;71(10):3447–52.

72. Bakhoun SF, Danilova O V., Kaur P, Levy NB ve ark. Chromosomal instability substantiates poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 15;17(24):7704–11.

73. Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, Harris LN ve ark. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet*. 2006 Sep 4;38(9):1043–8.

74. Swanton C, Nicke B, Schuett M, Eklund AC ve ark. Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8671–6.

75. Gutenberg A, Gerdes JS, Jung K, Sander B ve ark. High chromosomal instability in brain metastases of colorectal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Apr;198(1):47–51.

76. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P ve ark. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015 Jul 1;26(7):1408–15.

77. Warth A, Herpel E, Krysa S, Hoffmann H ve ark. Chromosomal instability is more frequent in metastasized than in non-metastasized pulmonary carcinoids but is

not a reliable predictor of metastatic potential. *Exp Mol Med*. 2009 May 31;41(5):349–53.

78. Sotillo R, Schwartzman JM, Socci ND, Benezra R. Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal. *Nature*. 2010 Mar 18;464(7287):436–40.

79. Jamal-Hanjani M, A'Hern R, Birkbak NJ, Gorman P ve ark. Extreme chromosomal instability forecasts improved outcome in ER-negative breast cancer: A prospective validation cohort study from the TACT trial. *Ann Oncol*. 2015 Jul 1;26(7):1340–6.

80. Roylance R, Endesfelder D, Gorman P, Burrell RA ve ark. Relationship of extreme chromosomal instability with long-term survival in a retrospective analysis of primary breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Oct;20(10):2183–94.

81. Zaki BI, Suriawinata AA, Eastman AR, Garner KM ve ark. Chromosomal instability portends superior response of rectal adenocarcinoma to chemoradiation therapy. *Cancer* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2020 Jan 14];120(11):1733–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.28656>

82. Bakhoum SF, Kabeche L, Wood MD, Laucius CD ve ark. Numerical chromosomal instability mediates susceptibility to radiation treatment. *Nat Commun*. 2015 Jan 21;6.

83. Chen G, Bradford WD, Seidel CW, Li R. Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature*. 2012 Feb 9;482(7384):246–50.

84. Davoli T, Uno H, Wooten EC, Elledge SJ. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science* (80-) [Internet]. 2017 Jan 20 [cited 2020 Jan 14];355(6322):eaaf8399. Available from: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaf8399>

85. Laughney AM, Elizalde S, Genovese G, Bakhoum SF. Dynamics of Tumor Heterogeneity Derived from Clonal Karyotypic Evolution. *Cell Rep*. 2015 Aug 4;12(5):809–20.
86. Mueller S, Engleitner T, Maresch R, Zukowska M ve ark. Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature*. 2018 Feb 1;554(7690):62–8.
87. Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, Li Y ve ark. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature*. 2016;538(7625):378–82.
88. Pavelka N, Rancati G, Zhu J, Bradford WD ve ark. Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):321–5.
89. Potapova TA, Zhu J, Li R. Aneuploidy and chromosomal instability: A vicious cycle driving cellular evolution and cancer genome chaos. *Cancer Metastasis Rev*. 2013 Dec;32(3–4):377–89.
90. Naugler CT. Population genetics of cancer cell clones: possible implications of cancer stem cells. *Theor Biol Med Model* [Internet]. 2010 Nov 9 [cited 2019 Oct 31];7:42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062473>
91. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Vol. 87, *Cell*. Cell Press; 1996. p. 159–70.
92. Tsao JL, Tavaré S, Salovaara R, Jass JR ve ark. Colorectal adenoma and cancer divergence: Evidence of multilineage progression. *Am J Pathol*. 1999;154(6):1815–24.
93. Burkard ME, Weaver BA. Tuning chromosomal instability to optimize tumor fitness. *Cancer Discov*. 2017 Feb 1;7(2):134–6.
94. Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2000 Jan [cited

2020 Jan 13];25(1):1–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637601>

95. Longley D, Johnston P. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2020 Jan 14];205(2):275–92. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/path.1706>

96. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Drug therapy: Systemic therapy for colorectal cancer. Vol. 352, *New England Journal of Medicine*. 2005. p. 476–87.

97. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2020 Jan 13];51(1):15–36. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.51.1.15>

98. Vries RGJ, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2020 Jan 13];4(5):373–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.molonc.2010.05.001>

99. Cherciu I, Bărbălan A, Pirici D, Mărgăritescu C ve ark. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations. *Curr Heal Sci J*. 2014;40(3):153–15361.

100. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW ve ark. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* (80-). 2006 Oct 13;314(5797):268–74.

101. Sack LM, Davoli T, Li MZ, Li Y ve ark. Profound Tissue Specificity in Proliferation Control Underlies Cancer Drivers and Aneuploidy Patterns. *Cell*. 2018 Apr 5;173(2):499-514.e23.

102. Tiong KL, Yeang CH. Explaining cancer type specific mutations with transcriptomic and epigenomic features in normal tissues. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).

103. Wangsa D, Braun R, Schiefer M, Gertz EM ve ark. The evolution of single cell-derived colorectal cancer cell lines is dominated by the continued selection of tumor-specific genomic imbalances, despite random chromosomal instability. *Carcinogenesis*. 2018;

104. Zhang W, Long H, He B, Yang J. DECtp: Calling Differential Gene Expression Between Cancer and Normal Samples by Integrating Tumor Purity Information. *Front Genet* [Internet]. 2018 Aug 28 [cited 2020 Jan 10];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00321/full>
105. Korkola J, Gray JW. Breast cancer genomes - form and function. Vol. 20, *Current Opinion in Genetics and Development*. 2010. p. 4–14.
106. Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schröck E ve ark. Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: A phenotype/genotype correlation. Vol. 25, *Genes Chromosomes and Cancer*. 1999. p. 195–204.
107. Ried T. Homage to Theodor Boveri (1862-1915): Boveri's theory of cancer as a disease of the chromosomes, and the landscape of genomic imbalances in human carcinomas. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Oct 31];50(8):593–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19739242>
108. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G ve ark. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010 Feb 18;463(7283):899–905.
109. Heselmeyer K, Schröck E, Du Manoir S, Blegen H ve ark. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9;93(1):479–84.
110. Habermann JK, Paulsen U, Roblick UJ, Upender MB ve ark. Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2007 Jan [cited 2019 Oct 31];46(1):10–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17044061>
111. Schwendel A, Langreck H, Reichel M, Schröck E ve ark. Primary small-cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations. *Int J cancer* [Internet]. 1997 Feb 20 [cited 2019 Oct 31];74(1):86–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036875>

112. P. P, M.B. U, K. W, J. W ve ark. Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2002 Feb [cited 2019 Oct 31];62(4):1134–8. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L34160299>
113. Ghadimi BM, Schröck E, Walker RL, Wangsa D ve ark. Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol*. 1999;154(2):525–36.
114. Knutsen T, Padilla-Nash HM, Wangsa D, Barenboim-Stapleton L ve ark. Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2010 Mar [cited 2019 Oct 31];49(3):204–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19927377>
115. Ried T, Hu Y, Difilippantonio MJ, Ghadimi BM ve ark. The consequences of chromosomal aneuploidy on the transcriptome of cancer cells. Vol. 1819, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2012. p. 784–93.
116. Upender MB, Habermann JK, McShane LM, Korn EL ve ark. Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2019 Oct 31];64(19):6941–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466185>
117. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT ve ark. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* [Internet]. 2006 Dec [cited 2019 Oct 31];10(6):529–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157792>
118. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J ve ark. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):515–27.
119. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*. Wiley; 2015. 645 p.

120. Heselmeyer-Haddad K, Berroa Garcia LY, Bradley A, Ortiz-Melendez C ve ark. Single-cell genetic analysis of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer reveals enormous tumor heterogeneity yet conserved genomic imbalances and gain of MYC during progression. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1807–22.
121. Pandit SK, Westendorp B, De Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. Vol. 23, *Trends in Cell Biology*. 2013. p. 556–66.
122. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A ve ark. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol*. 2013 Mar;31(3):213–9.
123. Dexter DL, Spremulli EN, Fligiel Z, Barbosa JA ve ark. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am J Med*. 1981;71(6):949–56.
124. DLD-1 ATCC® CCL-221™ Homo sapiens colon Dukes' type C, col [Internet]. [cited 2020 Jan 12]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-221.aspx?geo_country=tr#generalinformation
125. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA ve ark. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2.
126. Chen TR, Hay RJ, Macy ML. Intercellular karyotypic similarity in near-diploid cell lines of human tumor origins. *Cancer Genet Cytogenet*. 1983;10(4):351–62.
127. Freshney RI. Culture of Specific Cell Types. In: *Culture of Animal Cells* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005 [cited 2019 Dec 24]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471747599.cac023>
128. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. Vol. 134, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2008.
129. Carethers JM. Review: Systemic treatment of advanced colorectal cancer: Tailoring therapy to the tumor. Vol. 1, *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2008. p. 33–42.

130. Kennedy AS, Harrison GH, Mansfield CM, Zhou XJ ve ark. Survival of colorectal cancer cell lines treated with paclitaxel, radiation, and 5-FU: Effect of TP53 or hMLH1 deficiency. *Int J Cancer* [Internet]. 2000 Aug 20 [cited 2020 Jan 14];90(4):175–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0215%2820000820%2990%3A4%3C175%3A%3AAID-IJC1%3E3.0.CO%3B2-W>
131. Vanhoefer U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S ve ark. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: Clinical overview. Vol. 19, *Journal of Clinical Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1501–18.
132. Becouarn Y, Rougier P. Clinical efficacy of oxaliplatin monotherapy: Phase II trials in advanced colorectal cancer. Vol. 25, *Seminars in Oncology*. 1998. p. 23–31.
133. Gemcitabine in Treating Patients With Advanced Colorectal Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2020 Jan 14]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00007943>
134. Jiménez-Fonseca P, Solís MP, Garrido M, Faez L ve ark. Gemcitabine plus capecitabine (Gem–Cape) biweekly in chemorefractory metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2015 May 1;17(5):384–92.
135. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Andersen RF, Ploen J ve ark. Gemcitabine and capecitabine for heavily pre-treated metastatic colorectal cancer patients--a phase II and translational research study. *Anticancer Res* [Internet]. 2014 Feb [cited 2020 Jan 14];34(2):845–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511021>
136. Hanauske AR, Degen D, Hilsenbeck SG, Bissery MC ve ark. Effects of Taxotere and taxol on in vitro colony formation of freshly explanted human tumor cells. *Anticancer Drugs* [Internet]. 1992 Apr [cited 2020 Jan 14];3(2):121–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1356030>
137. Reid Y, Storts D, Riss T, Minor L. Authentication of Human Cell Lines by STR DNA Profiling Analysis [Internet]. *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [cited 2019 Mar 31]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805434>

138. Thomas Ried, M.D. | Center for Cancer Research - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2019 Dec 26]. Available from: <https://ccr.cancer.gov/Genetics-Branch/thomas-ried>
139. Cepko C, Pear W. Overview of the Retrovirus Transduction System. In: Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
140. Elegheert J, Behiels E, Bishop B, Scott S ve ark. Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. *Nat Protoc*. 2018 Dec 1;13(12):2991–3017.
141. Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. Vol. 32, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2018. p. 1529–41.
142. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8392–6.
143. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral “gene ontology” (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther*. 2008;16(4):698–706.
144. Weber K, Mock U, Petrowitz B, Bartsch U ve ark. Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: New building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther*. 2010 Apr;17(4):511–20.
145. Mirus Bio. www.mirusbio.com/applications/stable-cell-line-generation/antibiotic-kill-curve [Internet]. [cited 2019 Mar 29]. Available from: <https://www.mirusbio.com/applications/stable-cell-line-generation/antibiotic-kill-curve>
146. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015 Nov 1;111(1):A3.B.1-A3.B.3.
147. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S ve ark. Cell Viability Assays [Internet]. Assay Guidance Manual. 2004 [cited 2020 Jan 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>

148. Darzynkiewicz Z, Juan G. Analysis of DNA Content and BrdU Incorporation. *Curr Protoc Cytom*. 1997 Oct;2(1):7.7.1-7.7.9.
149. Rafehi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K ve ark. Clonogenic assay: Adherent cells. *J Vis Exp*. 2011;(49).
150. Chen Y. Scratch Wound Healing Assay. *BIO-PROTOCOL*. 2016;
151. Lampugnani MG. Cell migration into a wounded area in vitro. Vol. 96, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1999. p. 177–82.
152. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;
153. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z ve ark. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. Vol. 137, *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier B.V.; 2017. p. e11–6.
154. Mierke CT. Role of the Endothelium during Tumor Cell Metastasis: Is the Endothelium a Barrier or a Promoter for Cell Invasion and Metastasis? *J Biophys*. 2008;2008:1–13.
155. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L V. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp [Internet]*. 2014 Jun 1 [cited 2019 Mar 29];(88). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962652>
156. Fiji - ImageJ [Internet]. [cited 2020 Jan 13]. Available from: <https://imagej.net/Fiji>
157. OKTEM G, BILIR A, USLU R, INAN S V. ve ark. Expression profiling of stem cell signaling alters with spheroid formation in CD133high/CD44high prostate cancer stem cells. *Oncol Lett [Internet]*. 2014 [cited 2019 Mar 29];7(6):2103. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4049671/>
158. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT ve ark. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. Vol. 81 A, *Cytometry Part A*. 2012. p. 284–93.

159. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. Vol. 68, Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson SAS; 2014. p. 911–6.
160. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST ve ark. Cancer stem cells in colorectal cancer: A review. Vol. 71, Journal of Clinical Pathology. BMJ Publishing Group; 2018. p. 110–6.
161. Hatano Y, Fukuda S, Hisamatsu K, Hirata A ve ark. Multifaceted interpretation of colon cancer stem cells. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2017.
162. Colaianni V, Mazzei R, Cavallaro S. Copy number variations and stroke. *Neurol Sci* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Mar 22];37(12):1895–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27393281>
163. Imataka G, Arisaka O. Chromosome Analysis Using Spectral Karyotyping (SKY). Vol. 62, Cell Biochemistry and Biophysics. 2012. p. 13–7.
164. Ried T. Thomas Ried, M.D. | Center for Cancer Research - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2019 Mar 22]. Available from: <https://ccr.cancer.gov/Genetics-Branch/thomas-ried>
165. Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Camps J ve ark. Cancer Cytogenetics. In: The Molecular Basis of Human Cancer [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cited 2019 Mar 31]. p. 65–82. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-458-2_4
166. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Beart RW ve ark. Neoadjuvant 5-FU or capecitabine plus radiation with or without oxaliplatin in rectal cancer patients: A phase III randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(11).
167. Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, Young MD ve ark. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature.* 2018 Apr 26;556(7702):437–62.

168. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer: Prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 15;18(6):1506–12.
169. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003.
170. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I ve ark. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol*. 2006;
171. Graham J, Muhsin M, Kirkpatrick P. Fresh from the pipeline: Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;
172. Pommier Y. Drugging topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS Chemical Biology*. 2013.
173. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2004.
174. Bharadwaj R, Yu H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*. 2004.
175. Swanton C, Tomlinson I, Downward J. Chromosomal instability, colorectal cancer and taxane resistance. Vol. 5, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2006. p. 818–23.
176. Kondoh M, Ohga N, Akiyama K, Hida Y ve ark. Hypoxia-induced reactive oxygen species cause chromosomal abnormalities in endothelial cells in the tumor microenvironment. *PLoS One*. 2013;
177. Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I ve ark. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J*. 2006 Jul 7;25(11):2584–95.
178. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P ve ark. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 14 [cited 2020 Jan 13];449(7165):1003–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature06196>

179. McClanahan T, Koseoglu S, Smith K, Grein J ve ark. Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2006 Apr 28 [cited 2020 Jan 13];5(4):419–26. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.5.4.2521>
180. Boman BM, Wicha MS, Fields JZ, Runquist OA. Symmetric Division of Cancer Stem Cells – a Key Mechanism in Tumor Growth that should be Targeted in Future Therapeutic Approaches. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2007 Jun 25 [cited 2020 Jan 13];81(6):893–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.clpt.6100202>
181. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2005 Apr [cited 2020 Jan 13];5(4):275–84. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc1590>
182. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P ve ark. Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*. 2007 Oct 11;1(4):389–402.
183. Santos GC, Zielenska M, Prasad M, Squire JA. Chromosome 6p amplification and cancer progression. *Journal of Clinical Pathology*. 2007.
184. Jasmine F, Rahaman R, Dodsworth C, Roy S ve ark. A genome-wide study of cytogenetic changes in colorectal cancer using SNP microarrays: Opportunities for future personalized treatment. *PLoS One*. 2012;
185. Sheffer M, Bacolod MD, Zuk O, Giardina SF ve ark. Association of survival and disease progression with chromosomal instability: A genomic exploration of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;
186. Muleris M, Chalastanis A, Meyer N, Lee M ve ark. Chromosomal instability in near-diploid colorectal cancer: A link between numbers and structure. *PLoS One*. 2008;

8. EKLER

Etik Kurul Raporu

Arbis formatında özgeçmiş ve yayın listesi

Doktora tezleri için makale örneği ve dergiden alınmış kabul yazısı



9. KATKI

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi, TÜBİTAK 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (116Z300) ve 2214-A Yurt Dışı Doktora Burs Programı (1059B141600920) destekleri ile sağlanmıştır.



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.
Sayı: 1176

17.02.2017

Sayın Doç.Dr.Zeynep YÜCE,

Kurulumuz tarafından 16.02.2017 tarih ve 3140-GOA protokol numaralı 2017/03-12 karar numarası ile görüşülen “Solid Tümörlerdeki Farklı Hücre Populasyon Kinetiklerinin in Vitro Tümör Heterojenite Modelinde İncelenmesi” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3140-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Solid Tümörlerdeki Farklı Hücre Populasyon Kinetiklerinin in Vitro Tümör Heterojenite Modelinde İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Zeynep YÜCE Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/03-12	Tarih:16.02.2017
	Doç.Dr.Zeynep YÜCE'nin sorumlusu olduğu "Solid Tümörlerdeki Farklı Hücre Populasyon Kinetiklerinin in Vitro Tümör Heterojenite Modelinde İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	



ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi	08/08/1989
İletişim Adresi	Akın Simav Mah. Şehit Nihatbey Cd. No:182 D:9 Konak Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Mithatpaşa Cad. No:1606 Inciraltı Sağlık Yerleşkesi
Telefon	(232) 412 46 24 (554) 812 46 18
E-posta	oykugonul@hotmail.com oykugonul89@gmail.com
Web Adresi	

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2013 - Şu Anda (6 yıl 5 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLÖJİ VE GENETİK (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.88 / 4.0

01 Eylül 2011 - 01 Haziran 2013 (1 yıl 10 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOKİMYA (YL)
Tez Başlığı: Ganoderma Lucidum Ekstraktlarının Mcf-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Mirna Profiline Ve Telomeraz Aktivitesine Etkisi
Tez Konusu: G.lucidum Basidiomiset Grubu Bir Fungus Olup Kemoterapötik Etkiye Sahip Komponentler İçerdiği Ve Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Etkili Olduğu Daha Önce Yapılan Çalışmalarla Belirlenmiştir. Bununla Beraber, G.lucidum' Un Antikarsinojenik Etki Mekanizmaları Tam Olarak Aydınlatılamamıştır. Bu Çalışmada, G.lucidum Ekstraktlarının Mcf-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Mirna Profiline Ve Telomeraz Aktivitesine Etkileri Araştırılmıştır. Mcf-7 Hücrelerinde G.lucidum Ekstraktlarının Farklı Dozları Ve Inkübasyon Süreleri Denenerek Ic50 Dozunun Belirlendiği Hücre Kültürü Denemeleri Gerçekleştirilmiştir. Yapılan Hücre Kültürü Denemelerinde En Düşük Dozda Etkili Ekstraktın Eter Ekstraktı Olduğu Saptanmıştır (100 Ug/ml). Daha Sonra Mcf-7 Hücrelerinde Mirna Profil Analizi Ve Telomeraz Aktivite Tayini Yapılmıştır. 100 Ug/ml Ic50 Dozunda Mcf-7 Hücrelerinde Telomeraz Aktivitesinin Ekstrakt Uygulanmayan Hücrelere Göre Düşük Olduğu Ve Mirna Ekspresyon Profiline Farklılıklar Bulunduğu Tespit Edilmiştir.

Tarih: 2013
Tez Danışmanı: HANDAN AK
Diploma Numarası: 4079
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 87.7 / 100.0

01 Eylül 2007 - 10 Haziran 2011 (3 yıl 10 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 17407
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.38 / 4.0

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Tıbbi Biyoloji

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- Tıbbi Genetik

Sağlık Bilimleri -- Diş Hekimliği -- Temel Bilimler -- Biyokimya

Anahtar Kelimeler

Antikanser İlaç Direnci

Kolorektal Karsinoma

Telomeraz Aktivitesi

MikroRNA Profili

Yönlendirilmiş Mutagenез

Anöploidi

Tümör Biyolojisi

Tümör Modelleme

Kanser Araştırmaları

Kanser Biyobelirteçleri

Kolorektal Kanser

Kanser Genetiği

Hücre Kültürü Teknikleri

Tıbbi Biyokimya

Biyokimya

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

Ö. GÖNÜL GEYİK, B. NALBANT, R. B. HÜSEMOĞLU, Z. YÜCE, T. ÜNEK & H. HAVİTÇIOĞLU, Investigation of Surface Adhesion of MCF-7 Cells in 3D Printed PET and PLA Tissue Scaffold Models, Journal of Medical Innovation and Technology, 2019, 2667-8977, 1, 2, 45.

Ö. GÖNÜL GEYİK, Ö. GÖNÜL, Ö. GÖNÜL, H. H. AYDIN, H. H. AYDIN, E. KALMIŞ, E. KALMIŞ, H. KAYALAR, H. KAYALAR, A. B. ÖZKAYA, A. B. ÖZKAYA, S. ATAY, S. ATAY, H. AK & H. AK, Effects of Ganoderma lucidum (Higher Basidiomycetes) Extracts on the miRNA Profile and Telomerase Activity of the MCF-7 Breast Cancer Cell Line, INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICINAL MUSHROOMS, 2015, 1521-9437, 17, 3, 231-239.

Bildiriler

R. B. HÜSEMOĞLU, B. NALBANT, Ö. GÖNÜL GEYİK, T. ÜNEK, Z. YÜCE & H. HAVİTÇIOĞLU, Investigation of Surface Adhesion Abilities of MCF-7 Cells on 3D Printed PCL and PLA Scaffold Models, Tam Metin Bildiri, 2nd International Cancer and Ion Channels Congress, 22 Eylül 2019, 24 Eylül 2019, 0250-4685, 44, s2, 24 - 64.

R. B. HÜSEMOĞLU, B. NALBANT, Ö. GÖNÜL GEYİK, T. ÜNEK, Z. YÜCE & H. HAVİTÇIOĞLU, Investigation of Surface Adhesion Abilities of MCF-7 Cells on 3D Printed PCL and PLA Scaffold Models, Sözlü Sunum, 2nd International Cancer and Ion Channels Congress, 22 Eylül 2019, 24 Eylül 2019, 0250-4685, 44, s2, 24 - 64.

Ö. GÖNÜL GEYİK, D. WANGSA, T. RİED & Z. YÜCE, Investigation of cell populations in an in vitro intratumoral heterogeneity model of solid tumors, Sözlü Sunum, 2nd International Cancer and Ion Channels Congress, 22 Eylül 2019, 24 Eylül 2019, 0250-4685, 44, s2, 24 - 64.

S. BAYKAL KÖSE, A. S. YAVUZ, E. AÇIKGÖZ, Ö. GÖNÜL GEYİK, H. ATEŞ, O. U. SEZERMAN, G. H. ÖZSAN & Z. YÜCE, Investigation of the relationship between cellular adaptation and therapeutic resistance in chronic myeloid leukemia cells under imatinib pressure, Sözlü Sunum, 1st INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY CANCER RESEARCH CONGRESS, 18 Eylül 2019, 22 Eylül 2019.

Z. YÜCE, S. BAYKAL KÖSE, Ö. GÖNÜL GEYİK, A. S. YAVUZ, E. AÇIKGÖZ, H. ATEŞ, O. U. SEZERMAN & G. H. ÖZSAN, AN ADAPTIVE PHENOTYPIC SHIFT LEADS TO TKI RESISTANCE BY ACQUISITION OF LEUKEMIC STEM CELL-LIKE PROPERTIES IN CML CELLS, Sözlü Sunum, 2nd İstanbul Immunohematology Summit, 02 Mayıs 2019, 04 Mayıs 2019, 1308-5263, 36, 1, 31 - 32.

Ö. GÖNÜL GEYİK, H. EFE, S. BAYKAL KÖSE, Ö. UYSAL YOCA, D. W. ZONG, T. RİED & Z. YÜCE, In Vitro Tümör Heterojenite Modelinde Farklı Tümör Hücre Popülasyonlarının Genetik Ve Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi, Poster Sunumu, 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018.

Ö. GÖNÜL GEYİK, D. W. ZONG, Z. YÜCE & T. RİED, Role Of Whole Genome Duplication In Chromosomal Instability, Poster Sunumu, Nih Research Festival 2018, 12 Eylül 2018, 14 Eylül 2018.

R. COHEN, D. W. ZONG, Ö. GÖNÜL GEYİK & T. RİED, DNA Ploidy Correlates With Response To Chemotherapeutics, Poster Sunumu, NIH Summer Research Program Poster Day, 09 Ağustos 2018, 09 Ağustos 2018.

S. BAYKAL KÖSE, Ö. GÖNÜL GEYİK, H. ATEŞ, H. EFE & Z. YÜCE, Effects of tyrosine kinase inhibitor Imatinib on autophagy in BCR-ABL positive leukemia cells, Poster Sunumu, 41st FEBS Congress, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016, 283, s1, 429 - 440.

T. RRÜSTEMİ, Ö. GÖNÜL GEYİK, A. B. ÖZKAYA, T. K. ÖZTÜRK, Z. YÜCE & A. KILINÇ, Synthesis of single glucose oxidase nanoparticles and their potential use in cancer therapy, Poster Sunumu, 41st FEBS Congress, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016, 283, s1, 429 - 440.

Ö. GÖNÜL GEYİK, EFFECTS OF G.LUCIDUM EXTRACTS ON miRNA PROFILE&TELOMERASE ACTIVITY IN MCF7 BREAST CANCER CELL LINE, Sözlü Sunum, 25.ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, 03 Eylül 2013, 03 Eylül 2013, 38, 1, 84 - 84.

Ö. GÖNÜL GEYİK, MUTATIONAL ANALYSIS OF THE EVOLUTIONARY CONSERVED TYROSINE 294 RESIDUE ON 6-PHOSPHO-BETA-GLUCOSIDASE, Poster Sunumu, INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOINFORMATICS AND BIOMICS, 18 Mayıs 2011, 18 Mayıs 2011.

TEMEL ARAŞTIRMA, BURSİYER, Oluşturulacak in-vitro Tümör Heterojenite Modelinde Solid Tümörlerdeki Farklı Hücre Popülasyon Kinetiklerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK 1001 (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Mart 2017, 01 Ocak 2020.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı bünyesinde hücre hattı koleksiyonu kurulması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2016, 01 Eylül 2019.

ABD, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Investigating the aneuploidy related genetic heterogeneity on therapeutic resistance in colon cancer model, Yürütülen Kuruluş: National Institutes of Health (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK 2214/A (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Şubat 2018, 01 Şubat 2019.

TEMEL ARAŞTIRMA, BURSİYER, Metastatik MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Matriks Metalloproteinaz-9'un Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı Nav1.5 ve $\beta 1$ Regülasyonu Üzerindeki Fonksiyonel Etkilerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK 1001 (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Mart 2014, 01 Mart 2017.

TÜBİTAK, ARAŞTIRMACI, 6-fosfo- β -glukozidaz Enziminde Evrimsel Olarak Korunmuş Arg289 Ve Tyr294 Amino Asitlerinin Fonksiyonel Öneminin Nokta Mutasyonları Yoluyla İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: EGE ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) , 01 Eylül 2010, 01 Haziran 2011.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

213S001, Nöroblastomada Gözlenen İlaç Direncinde, MYCN Varlığında Wnt Sinyal İleti Yolağının Rolünün İncelenmesi, 1002 - Hızlı Destek, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.10.2014 - 15.03.2015, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.03.2014 - 15.03.2015.

116Z300, Oluşturulacak in-vitro Tümör Heterojenite Modelinde Solid Tümörlerdeki Farklı Hücre Populasyon Kinetiklerinin İncelenmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.04.2017 - 01.02.2018, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.03.2017 - 01.01.2020.

BİDEB Destekleri

ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Ön İncelemede Elendi, 2016 - 1.

ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2011 - 3, 01.10.2011 - 31.08.2013.

ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2013 - 2, 01.10.2013 - 30.09.2018.

ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2014 - 1, 01.03.2014 - 30.09.2018.

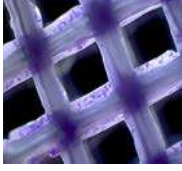
ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2014 - 2, 01.10.2014 - 30.09.2018.

ÖYKÜ GÖNÜL GEYİK, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Türkiye'ye Döndü, 2016 - 2, 01.11.2017 - 01.11.2018.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0





Investigation of Surface Adhesion of MCF-7 Cells in 3D Printed PET and PLA Tissue Scaffold Models

3B Baskılı PET ve PLA Doku İskele Modellerinde MCF-7 Hücrelerinin Yüzey Adezyonlarının Araştırılması

¹Oyku Gonul Geyik, ²Belma Nalbant, ³R. Bugra Husemoglu, ¹Zeynep Yuce, ⁴Tarkan Unek, ⁵Hasan Havitcioglu

¹Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Izmir/Turkey

²Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, Izmir, Turkey

³Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Biomechanics, Izmir, Turkey

⁴Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Surgery Medicine, Department of General Surgery, Izmir/Turkey

⁵Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Orthopedics and Traumatology, Izmir, Turkey

Abstract: Tissue scaffolds with a wide range of applications are usually rigid structures made of polymeric materials. Biocompatibility and biodegradability are important properties for scaffold materials to possess, ensuring they support for cell growth and are extremely useful in *in vitro* three-dimensional (3D) cell cultures. Cancer is a disease caused by mutations or abnormal changes in genes responsible for regulating the growth of cells and keeping them healthy. Breast cancer is the most common type of invasive cancer and the second cause of cancer death among women. Two-dimensional (2D) cell cultures have helped to attain important knowledge about cell biology and biochemistry. However, they are not suitable for clinical use. 2D *in vitro* studies do not provide the desired success in *in vivo* applications. The formation of the tumor microenvironment is challenging. Tissue scaffolds are 3D cell culture systems that eliminate this problem with breast cancer cell culture. Cell culture models with 3D tissue scaffold are thought to be more successful in representing *in vivo*. The main objective of this study was to produce biocompatible and suitable porosity scaffolds from polylactic acid (PLA) and polyethylene terephthalate (PET) materials, which enables MCF-7 breast cancer cells to proliferate in three dimensions. Polyethylene terephthalate (PET) and polylactic acid (PLA) are biocompatible, non-toxic dye-free polymers and are used for the production of scaffolds that are rigid structures suitable for 3D cancer cell culture. A custom 3D printer and 1.75 mm PET and PLA filaments were used for the production of tissue scaffolds. Tissue scaffolds are produced with two different filling rates (20% and 40%). The design and production parameters of the scaffolds are defined and optimized by SolidWorks and Slic3r softwares to set the correct printing procedure. Biomechanical tests for mechanical characterization of all scaffolds were performed. MCF-7 breast cancer cell line was used to evaluate tissue scaffolds for 3D cell culture. The ability of the cells to adhere to the scaffold surface was determined by crystal violet fixation and staining method detecting viable cells. 3D cell culture with PET and PLA tissue scaffolds is useful to improve cancer cell culture applications and enhance cell proliferation. 3D tissue scaffolds have shown that MCF-7 cells are more compatible with surface adhesion than 2D cultures. As a result, the data obtained show that porous PET and PLA tissue scaffolds are supportive of the 3D culture and proliferation of MCF-7 breast cancer cells by providing a micro-environment *in vivo* mimic.

Keywords: Breast cancer, MCF-7, PLA, PET, 3-dimensional, scaffold, cell culture

Geyik O.G, Nalbant B, Husemoglu R.B, Yuce Z, Unek T, Havitcioglu H, 2019. Investigation of Surface Adhesion of MCF-7 Cells in 3D Printed PET and PLA Tissue Scaffold Models, *Journal of Medical Innovation and Technology*

Yazışma Adresi / Correspondence Address

R. Bugra HÜSEMOĞLU

mail: bugrahusem@gmail.com

Özet: Doku iskeleleri genellikle, geniş bir uygulama alanına sahip polimerik malzemelerden yapılmış sert yapılardır. Biyouyumlulukları ve biyolojik olarak degradasyonları sayesinde üç boyutlu (3B) hücre büyümesi için gerekli desteği sağlar ve *in vitro* 3B hücre kültürlerinde son derece faydalıdır. Kanseri; hücrelerin büyümesini düzenleyen ve onları sağlıklı tutmaktan sorumlu olan genlerin mutasyonları veya anormal değişikliklerinden kaynaklanan bir hastalıktır. Meme kanseri, en yaygın invazif kanser türüdür ve kadınlar arasında ikinci kanser ölüm nedenidir. İki boyutlu (2B) hücre kültürü, hücre biyolojisi ve biyokimyası hakkında önemli bilgiler edinilmesine yardımcı olmuştur. Ancak, klinik kullanım için uygun değildir. 2B *in vitro* çalışmalar, *in vivo* uygulamalar da istenilen başarıyı sağlayamamaktadır. Tümör mikro-ortamının oluşturulması zordur. Doku iskeleleri, meme kanseri hücre kültürü ile ilgili bu problemi ortadan kaldıran 3B hücre kültürü sistemleridir. 3B hücre kültürü modellerinde gerçekleştirilecek çalışmalar, *in vivo*'yu taklit etmede daha başarılı olacaktır. Bu çalışmanın temel amacı, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin üç boyutta proliferasyonunu sağlayan polilaktik asit (PLA) ve polietilen tereftalat (PET) materyallerden biyouyumlu ve uygun gözenekli doku iskeleleri oluşturmaktır. Polietilen tereftalat (PET) ve polilaktik asit (PLA), biyolojik olarak uyumlu, toksik boya içermeyen polimer olup, 3B kanser hücre kültürü için uygun rijit yapılar olan doku iskelelerinin üretimi için kullanılmaktadır. Doku iskelelerinin üretimi için özel yapım 3B yazıcı ve 1.75 mm PET ve PLA filamentleri kullanılmıştır. Doku iskeleleri iki farklı doluluk oranı (%20 ve %40) ile üretilmiştir. Doku iskelelerin tasarım ve üretim parametreleri, doğru baskı prosedürünü ayarlamak için SolidWorks ve Slic3r yazılımları tarafından oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Tüm doku iskelelerin mekanik karakterizasyonu için biyomekanik testler gerçekleştirilmiştir. 3B hücre kültürü için doku iskelelerinin değerlendirilmesi amacıyla MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin iskele yüzeyine adezyon kabiliyeti, canlı hücreleri tespit etmeye yönelik olarak kullanılan kristal viyole ile fiksasyon ve boyama yöntemiyle belirlenmiştir. PET ve PLA doku iskeleleriyle 3B hücre kültürü, kanser hücre kültürü uygulamalarını geliştirmek ve hücre proliferasyonunu zenginleştirmek için faydalı olmaktadır. 2B hücre kültürüne kıyasla 3B doku iskeleleri, MCF-7 hücrelerinin yüzeye tutunma düzeylerinde anlamlı bir artış göstermiştir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler gözenekli PET ve PLA doku iskelelerinin, *in vivo* mimiği bir mikro-ortam sağlayarak MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 3B kültüre edilmesi ve proliferasyonu için destekleyici olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, MCF-7, PLA, PET, üç boyutlu, doku iskelesi, hücre kültürü

Hüsemoglu R.B, Geyik Ö.G, Nalbant B, Yüce Z, Ünek T, Havıtcıoğlu, 2019. 3B Baskılı PET ve PLA Doku İskele Modellerinde MCF-7 Hücrelerinin Yüzey Adezyonlarının Araştırılması, *Medikal İnovasyon ve Teknoloji Dergisi*

ORCID ID of the authors: O.G.G0000-0003-3014-1253, B.N 0000-0002-2288-6979, R.B.H 0000-0003-1979-160X
Z.Y 0000-0001-5417-2471, T.U 0000-0002-6235-9903, H.H0000-0001-8169-3539

1. Introduction

In vitro cell culture is a basic technique for the research of cell behavior mechanisms [1]. By this method, we are able to study various cellular properties such as migration, differentiation, proliferation, and mechanics in biochemical and biomechanical micro-environments. Even though conventionally performed 2D (two dimensional) cell cultures yield useful outcomes for cellular mechanisms, studies failed to reflect the *in vivo* responses. The inability to appropriately model certain types of cancers in 2D is one of the reasons accounts for this problem [2].

Additionally, 2D cell cultures cannot reflect the differentiation and characteristics of cancer

cells in vivo [3]. Since the cells exist in an organism embedded in a 3D (three dimensional) ECM (extracellular matrix) that contains various proteins and molecules, it is vital to mimic the *in vivo* environment in order to obtain accurate results. Therefore, 3D cell culture systems equipped with scaffolds have begun to be used. These systems provide more reliable results. There are many 3D cell scaffolds. One of the most widely used materials are biopolymers. Its porous structure allows cells to interact with each other better in terms such as their natural morphology and *in vivo* environment [4]. 3D polymeric cell scaffolds are an increasingly innovative method for

reconstructing tumor microenvironment in the culture medium [5].

Our aim is to determine the optimal three-dimensional cell scaffold characteristics to ensure adhesion and proliferation of the breast cancer cell line MCF-7. For this purpose, we produced cell scaffolds in a 3D printer using polyethylene terephthalate (PET) and polylactic acid (PLA) materials.

PET is a non-toxic, biocompatible, non-carcinogenic biostable linear polymer with good mechanical properties. PET use in cell culture applications and medical applications [6]

PLA is a thermoplastic aliphatic polyester suitable for biomedical and cell culture applications due to its biocompatibility, high strength and biodegradable properties [1,4]. PLA has been found to be beneficial because of the porous scaffold structure that enriches the cell microenvironment and also of increasing the viability and proliferation of breast cancer cells [4].

Here we present an *in vitro* investigation of adhesion levels of human breast cancer MCF-7 cell line cultures on PET scaffolds with different densities in comparison with PLA. The results obtained here are important for understanding *in vivo* procedures.

An *in vitro* investigation of adhesion levels of human breast cancer cell line on PLA and PET scaffolds with different densities was performed previously by our team. Here we have continued to test scaffolds made of biopolymers with different characteristics in order to determine the optimum material and density for breast cancer cell adhesion *in vitro*.

2. Materials and Methods

2.1. Design and Manufacturing of Scaffolds

Scaffolds were prepared with the PLA / PET filaments using a custom-made fused deposition modeling (FDM) printer. Scaffolds were fabricated according to the FDM method in a single extruder 3D printer, which uses hot end extruder for printing PLA/PET filaments. This printer has a mechanical precision of 100-100-100 μm in the X-Y-Z axis. 0.3 mm nozzle and 1.75 mm filaments were used for the production of tissue scaffolds. Tissue scaffolds are produced with two different filling rates

(20% and 40%). The nozzle temperature was set to 230°C for each materials.

The design and production parameters of the scaffolds are defined and optimized by SolidWorks and Slic3r software to set the correct printing procedure. Scaffolds template ($\varnothing = 4$ mm, thickness = 2 mm) were designed using SolidWorks 2017 software and subsequently filled and sliced using and Slic3r 1.2.9 software to obtain cylindrical STL models. Briefly, clump generator software was used to create squared pores into a 3D object in a "stl" file format. The printing head was computer-controlled in three axes (X, Y, Z) while extruding the PLA and PET filaments using the Slic3r software.

The melted PLA and PET was then extruded through a 0.3 mm diameter stainless-steel nozzle on to a printing plate heated at 40°C. Porous scaffolds were printed layer-by-layer in the form of squares surrounded by a dense PLA perimeter. We determined the optimal speed of 15 mm/s for the filling speed and 25 mm/s for the gap speed. The travel speed of extruder was set to be 100 mm/s. We fabricated scaffolds with two different pore sizes (20%-40%).

After printing, the scaffolds were carefully removed from the printing bed. Prior to biological evaluations, printed scaffolds were sterilized by ethylene oxide (EtO).

2.2. Mechanical Characterization

To investigate the possible influence of pore dimensions on mechanical properties of the printed PET and PLA structure, a uniaxial compression test was performed on scaffolds. Five scaffolds were tested for each pore size (20%-40%) for each group. Scaffolds were tested by universal compression test machine (Shimadzu Autograph AG-IS 5kN). Scaffolds were compressed at a speed of 10 mm/min until 1 mm thickness. Maximal strength (F max) was then recorded simultaneously using the Trapezium software.

2.3. Cell Culture and Staining

MCF-7 breast adenocarcinoma cells were used in order to assess the optimum scaffold type and filling rate. MCF-7 cells were cultured in complete RPMI-1640 (10% FBS, 2 mM L-Gln, 1% 10,000 U/mL Penicillin/Streptomycin) (Gibco/Thermo Fisher, MA, USA) and incubated in humidified chamber with 5% CO₂ at 37°C.

After PET and PLA scaffolds with 20% and 40% filling rates were printed, scaffold tablets were placed in 96 well plates under sterile conditions. 150,000 cells were seeded on each sterilized scaffold tablets in 50 μ L complete growth medium and cultured overnight. Following the incubation period, media were removed from the wells, rinsed with PBS (Gibco/Thermo Fisher, MA, USA) and adhered cells on scaffolds were detected by crystal violet staining. Images were obtained using Olympus CKX41 microscope mounted with UIS2 camera. Cell counts were determined using ImageJ. Graphs were plotted using GraphPad Prism 7.

3. Results

3.1. Mechanical Characterization of Scaffolds

The mean maximum compression strengths for groups PET 20%, PET 40%, PLA 20%, and PLA 40% were 179.22 N, 455.00 N, 199.82 N, and 732.37 N, respectively. When PLA and PET scaffolds were compared, it was found that PLA had better strength than PET scaffolds (Figure 1).

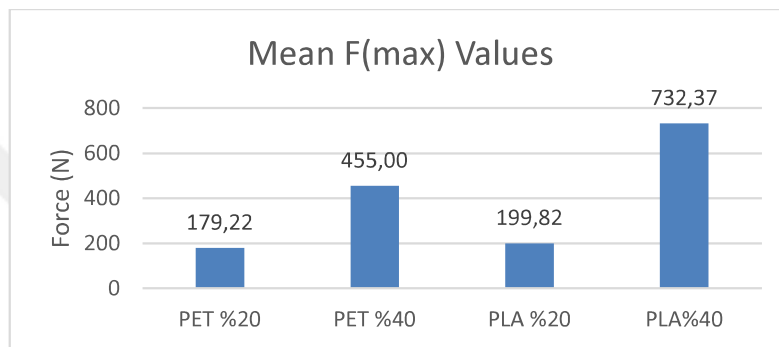


Figure 1.

The mean values of maximum compressive strength of PET and PLA scaffolds in all the groups.

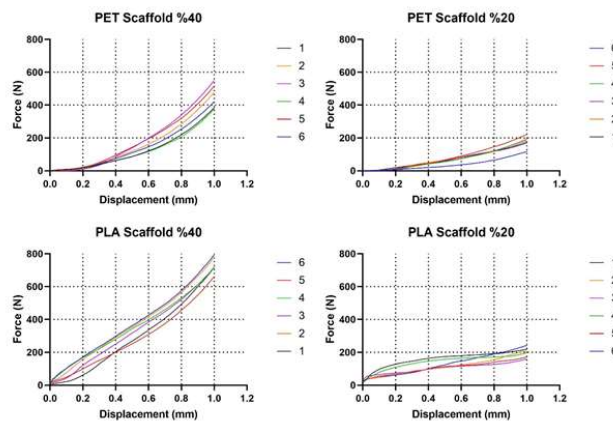


Figure 2.

Curves resulting from the equations for the force-displacement ratio, Force-displacement curves for all groups (n=24) with a displacement rate of 10 mm/min.

3.2. Cell Culture and Staining

This experiment was performed with scaffolds in three replicates. Five different regions and two different layers were captured for each scaffold tablet. Images of all regions of the lower and upper layers of scaffolds were taken with inverted microscope. PLA material showed

higher number of stained cells than PET material (Figure 3)

Cell count analysis by ImageJ showed that higher filling rate enabled more cells to adhere on and also showed that the number of cells adhered on the PLA scaffold is higher than the PET scaffold (Figure 4)

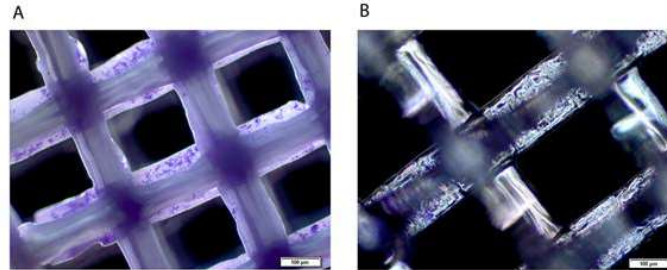


Figure 3.

Images of crystal violet stained MCF-7 cells on **A)** PLA 20% lower layer **B)** PET 20% lower layer

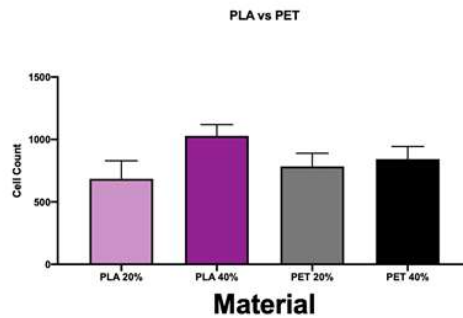


Figure 4.

Cell numbers determined using ImageJ for PLA and PET scaffolds. A significant difference wasn't found between them (n=3, Bars: SD).

4. Discussion

Previously, our group has studied adhesion properties of MCF-7 in cell culture with 3D printed scaffold models including PLA and PCL materials. As a result of this study which was accepted by the Turkish Journal of Biochemistry in October 2019, we found that the PLA scaffold was more preferable than PCL scaffold.

Our aim as the study group is to determine the optimum material to be used in cell culture and also *in vivo* by experimenting with different biomaterials. In this study, we compared PLA and PET scaffolds.

In cancer biology studies, the limitations of 2D cell culture were exceeded by 3D cell culture techniques. These limitations are a hindrance to understanding the mechanisms of cancer. So,

we need platforms that provide the closest mimic to the natural environment of cancer cells. For this purpose, various 3D cell culture systems have been developed to overcome the limits of 2D cultures [7].

Diomedea et al. showed that 3D printed porous PLA scaffolds enrich the physical and chemical properties for cell culture [8]. Compared to 2D cell culture, in 3D cell culture cells proliferate slower but they have been proven to survive longer. Emma et al. showed that PLA scaffolds make the optimal device for *in vitro* 3D cell culture [9].

Rimington et al., proved that cells cultured on PET and PLA supply a viable metabolic phenotype within a cell culture. They observed no difference in terms of cell viability between

scaffolds [10]. Similar to these studies, we found no significant difference between PET and PLA scaffolds. Both scaffolds provide an appropriate culture environment for breast cancer cells.

5. Conclusion

In conclusion, the data obtained showed that porous PET and PLA tissue scaffolds can be supportive of the 3D culture and for adhesion of MCF-7 breast cancer cells by providing a micro-environment *in vivo* mimic. PLA is a more preferable polymer when compared to PET and a more porous (40% fill rate) surface is better in terms of adhesion than a less porous surface (20% fill rate).

Progress on testing of different biocompatible polymers in vitro would be great contribution in this field.

For developing cell-type specific, optimum for cell adhesion, proliferation, and other growth properties and taking research for a better implantation in patients to a next level, we will continue to our studies with different biopolymers in the market and different cell lines. That way we will accumulate information for the best conditions to study each cell line in vitro and also best polymer to use in a patient.

REFERENCES

1. Rabionet M, Polonio E, Guerra AJ, Martin J, Puig T, Ciurana J. Design of a scaffold parameter selection system with additive manufacturing for a biomedical cell culture. *Materials*. MDPI AG; 2018;11.
2. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. American Physiological Society; 2017. p. 266–77.
3. Palomeras S, Rabionet M, Ferrer I, Sarrats A, Garcia-Romeu ML, Puig T, et al. Breast Cancer Stem Cell Culture and Enrichment Using Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffolds. *Molecules*. MDPI AG; 2016;21.
4. Polonio-Alcalá E, Rabionet M, Guerra AJ, Yeste M, Ciurana J, Puig T. Screening of additive manufactured scaffolds designs for triple negative breast cancer 3D cell culture and stem-like expansion. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018;19.
5. Pathi SP, Kowalczewski C, Tadipatri R, Fischbach C. A novel 3-D mineralized tumor model to study breast cancer bone metastasis. *PLoS ONE*. 2010;5.
6. Düzyer S. Fabrication of electrospun poly (ethylene terephthalate) scaffolds: Characterization and their potential on cell proliferation in vitro. *Tekstil ve Konfeksiyon*. 2017;27:334–41.
7. Rijal G, Bathula C, Li W. Application of Synthetic Polymeric Scaffolds in Breast Cancer 3D Tissue Cultures and Animal Tumor Models [Internet]. *International Journal of Biomaterials*. 2017 [cited 2019 Nov 5]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijbm/2017/8074890/>
8. Diomedede F, Gugliandolo A, Cardelli P, Merciaro I, Ettore V, Traini T, et al. Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: a new tool for bone defect repair. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 [cited 2019 Nov 5];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5899396/>
9. PLA Electrospun Scaffolds for Three-Dimensional Triple-Negative Breast Cancer Cell Culture [Internet]. [cited 2019 Nov 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6572693/>
10. Rington RP, Capel AJ, Christie SDR, Lewis MP. Biocompatible 3D printed polymers via fused deposition modelling direct C2C12 cellular phenotype in vitro. *Lab on a chip*. 2017;17:2982–93.



Öykü Gönül Geyik <oykugonul89@gmail.com>

[js] Editor Decision

1 message

Journal of Medical Innovation and Technology <jomit@jomit.org>

15 November 2019 at 12:01

To: Öykü Gönül Geyik <oykugonul89@gmail.com>, Belma Nalbant <belmanlbnt@gmail.com>, Resit Bugra Husemoglu <rbhusem@gmail.com>, Zeynep Yüce <zeynyuce@gmail.com>, Tarkan Ünek <bugrahusem@gmail.com>, Hasan Havıtcıoğlu <hhvtci@gmail.com>

Öykü Gönül Geyik, Belma Nalbant, Resit Bugra Husemoglu, Zeynep Yüce, Tarkan Ünek, Hasan Havıtcıoğlu:

We have reached a decision regarding your submission to Journal of Medical Innovation and Technology, "Investigation of Surface Adhesion of MCF-7 Cells in 3D Printed PET and PLA Tissue Scaffold Models".

Our decision is to: Accept Submission

Journal of Medical Innovation and Technology
jomit@jomit.org

[Journal of Medical Innovation and Technology](#)