

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**APC MUTANT FARE İNTESTİNAL ORGANOİDLERİNDE WNT
YOLAK MODÜLASYONUNUN KÖK HÜCRELER ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem BAKIR

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

APC MUTANT FARE İNTESTİNAL ORGANOİDLERİNDE WNT YOLAK
MODÜLASYONUNUN KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Sinem BAKIR

Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Aytekin AKYOL

ANKARA
2022

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ****SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****APC MUTANT FARE İNTESTİNAL ORGANOİDLERİNDE WNT YOLAK
MODÜLASYONUNUN KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI****Öğrenci: Sinem BAKIR****Danışman: Prof. Dr. Aytekin AKYOL**

Bu tez çalışması 09/09/2022 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ayşen ÖZCAN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Aytekin AKYOL*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Fatma Visal OKUR*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Fatima AERTS KAYA*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Parisa SHARAFI*
(TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

14 Eylül 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

14 / 09 / 2022

Sinem BAKIR

¹“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilişkin patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

(2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metodların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarılan veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine Üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Aytekin AKYOL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Sinem BAKIR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bana her konuda destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. Aytekin AKYOL'a teşekkürlerimi sunuyorum. Bizlerle gerek bilime gerekse hayata dair tecrübelerini paylaşan Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR'a teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarım Uzm. Biyo. Aynur IŞIK, Dr. Sarp UZUN, Uzm. Vet. Hek. Ayşenur GÖK ve Uzm. Biyo. Özge ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın floresan mikroskop ile görüntüleme aşamalarında destek olan Kök Hücre Anabilim Dalı öğretim görevlisi Özge Burcu ŞAHAN'a ve doktora öğrencisi Vet. Hek. Özgür Doğuş EROL'a teşekkür ediyorum.

Aldığım her kararda beni sonsuz destekleyen ve sevgileriyle beni her gün büyütmeye devam eden annem Filiz BAKIR ve babam Abdullah BAKIR'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum. Tüm zor zamanlarımda büyük bir sabır ve şefkatle beni destekleyen Cemre AKTEMUR'a teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, 120S967 proje numarası ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

BAKIR S. Apc Mutant Fare İntestinal Organoidlerinde Wnt Yolak Modülasyonunun Kök Hücreler Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Kolorektal kanser (KRK) gelişiminin en önemli nedenlerinden bir tanesi WNT sinyal yolağında rol alan genlerin mutasyonlarıdır. Vakaların büyük çoğunluğunda WNT sinyal yolağı yıkım kompleksinde negatif düzenleyici olarak görev almakta olan *APC* tümör baskılayıcı gen mutasyonlarına rastlanmaktadır. Çok hızlı bir çoğalma ve yenilenme sürecine sahip olan intestinal epitel hücrelerde WNT sinyal yolağı yüksek aktivite göstererek intestinal kök hücrelerin ve doku homeostazının düzenlenmesinde aktif görev almaktadır. *APC* genine ait mutasyonların çoğunluğu yıkım kompleksinin bir diğer elemanı olan *AXIN* bağlanma bölgesinde gerçekleşmektedir. Yıkım kompleksi elemanlarında oluşan çeşitli *mutasyonlar* nedeniyle görevini tam olarak yerine getirememektedir. B-catenin proteini yıkım kompleksi tarafından sitoplazmik bölgede proteozomal degradasyona uğrayamadığında çekirdeğe translokasyonu gerçekleşmekte ve böylece TCF/LEF transkripsiyon faktörünün düzenlenmesinde görev aldığı WNT hedef genlerinin transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında laboratuvarıma özgü mutant *Apc*^{Δ750} fare ince bağırsak dokularından üretilen olan intestinal organoidlerde WNT ilişkili genlerden *Ctnnb1*, *Axin2* ve *Lgr5* RNA düzeyinde incelenmiştir. Analizlerin sonucunda bu genlerin ifadelerinin *Apc*^{Δ750} intestinal organoidlerde yüksek olduğu ispatlanmıştır. Tez çalışmasının birincil amacı olarak, anti-kanser etkisi olduğu bilinen XAV939 ve Niklozamid ilaçlarının *Apc*^{Δ750} organoidlere uygulandığında *Ctnnb1*, *Axin2* ve *Lgr5* gen ifadelerinin RNA düzeyinde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca immünfloresan boyama tekniği uygulanarak kript ve villus domeynlerindeki *Ctnnb1* protein seviyesi incelenmiştir. Böylece XAV939 ve Niklozamidin KRK oluşumu öncülü organoidlerdeki Wnt sinyal yolağını inhibe ettiği ve bununla ilişkili olarak İKH aktivasyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Çalışmanın ikincil bir amacı ise laboratuvarımızda üretilen *Apc*^{Δ750} fare modelinin *in vitro* çalışmalarda da başarı sağladığını gösterebilmektir.

Anahtar Kelimeler: Wnt Sinyali, Kolorektal Kanser, İntestinal Organoid, İntestinal Kök Hücre

Bu çalışma, TÜBİTAK-1001 projesi kapsamında (Proje No: 120S967) desteklenmiştir.

ABSTRACT

BAKIR S. Investigation of Wnt Signaling Modulation on Intestinal Stem Cell Dynamics in Apc Mutant Intestinal Organoids, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2022. One of the most important causes of colorectal cancer development is mutations of genes involved in the WNT signaling pathway. In the vast majority of cases, *APC* tumor suppressor gene mutations, which act as negative regulators of the WNT signaling pathway degradation complex, are encountered. In intestinal epithelial cells, which have a very rapid proliferation and regeneration process, the WNT signaling pathway shows high activity and takes an active role in the regulation of intestinal stem cells and tissue homeostasis. Most of the mutations of the *APC* gene occur at the AXIN binding site, which is another element of the degradation complex. Due to various mutations in the components of the destruction complex, it cannot fully function its task. When the β -catenin protein cannot be proteosomally degraded in the cytoplasmic region by the degradation complex, it translocates to the nucleus and thus increases the transcriptional activity of WNT target genes, which are involved in the regulation of the TCF/LEF transcription factor. In this thesis study, intestinal organoids produced from mutant *Apc* ^{Δ 750} mouse small intestine tissues specific to our laboratory were investigated at the RNA level of WNT-related genes *Ctnnb1*, *Axin2* and *Lgr5*. As a result of the analysis, it was proved that the expression of these genes is high in *Apc* ^{Δ 750} intestinal organoids. As the primary aim of the thesis study, it has been shown that *Ctnnb1*, *Axin2* and *Lgr5* gene expressions are decreased at the RNA level when XAV939 and Niclosamide drugs, which are known to have anti-cancer effects, are applied to *Apc* ^{Δ 750} organoids. In addition, the level of *Ctnnb1* protein in the crypt and villus domains was examined by applying the immunofluorescent staining technique. Thus, it was observed that XAV939 and niclosamide inhibited the Wnt signaling pathway in organoids that are precursors of CRC formation, and thus suppressed ICH activation. A secondary aim of the study is to show that the *Apc* ^{Δ 750} mouse model produced in our laboratory is also successful in *in vitro* studies.

Keywords: Wnt Signaling, Colorectal Cancer, Intestinal Organoid, Intestinal Stem Cell

The thesis project was supported by a grant from TUBITAK-1001 (Project No: 120S967).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Organoid Teknolojisi	3
2.2. Organoidlerin Tarihçesi	3
2.3. Organoidlerin Avantajları ve Dezavantajları	4
2.4. Organoidlerin Kullanım Alanları	5
2.5. İntestinal Kök Hücreler	7
2.6. Wnt Sinyal Yolağı, Aktivatör ve İnhibitörleri	9
2.7. İn vivo Hastalık Modeli Olarak <i>Apc</i> Mutant Fare Tümör Modelleri	14
2.8. İntestinal Tümör Gelişiminde Kök Hücre Dinamikleri	15
2.9. <i>Apc</i> ^{Δ750} Fare İntestinal Tümör Modeli	17
2.10. Hedeflerimiz	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Organoid Kültürü	20
3.2. İlaç Muamalesi	21
3.3. RNA İzolasyonu	22
3.4. Komplementer DNA Sentezi	23
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi	24
3.6. İmmünfloresan Boyama	25

3.7. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	26
4. BULGULAR	28
4.1. Apc +/- Mutant Organoidlerin Gelişimi	28
4.2. Apc +/- İntestinal Organoidlerin Genotiplerinin Doğrulanması	29
4.3. Wnt İlişkili Genlerin İfadelerinin qPCR ile İncelenmesi	31
4.4. β -catenin İfadesinin İmmünfloresan Boyama ile İncelenmesi	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR	44
8. EKLER	53
Ek-1. Etik Kurul Yazısı	
Ek-2. Tez çalışması orijinallik raporu	
Ek-3. Dijital Makbuz	
Ek-4. qPCR Analizlerine Ait Amplifikasyon Eğrileri	
Ek-5. Tüm Grupların Ortalama Ct ve Standart Sapma Değerleri	
9. ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER ve KISALTMALAR

2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
ACTB	β -actin
APC	Adenomatöz polipozis koli
AXIN	<i>Axis inhibition protein</i>
BÇ	Baz Çifti
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
BSA	Siğır Serum Albümini
CBC	<i>Crypt-base columnar cells</i>
cDNA	Komplementer DNA
CK1	Kazein Kinaz-1
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
ddH2O	Çift Distile Edilmiş Su
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DSC	<i>Deep Secretory Cells</i>
Dvl	<i>Dishevelled</i>
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FAP	Familyal Adenomatöz Polipozis
FGF4	Fibroblastik Büyüme Faktörü-4
Fzd	<i>Frizzled</i>
GSK3	Glikojen Sentaz Kinaz 3
İKH	İntestinal kök hücre
Kb	Kilobaz
KKH	Kanser Kök Hücresi
KRK	Kolorektal Kanser
LGR5	Leucine-rich repeat containin G protein-coupled receptor 5
Lrp6	LDL Reseptör İlişkili Protein 6
Min	Multiple Intestinal Polyposis

MKH	Mezenkimal Kök Hücre
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
PARP	Poli-Adenozin Difosfat-Riboz
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate-Buffered Saline-Tween20</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDTX	Hasta Kökenli Tümör Ksenograft
PFA	Paraformaldehit
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TCF/LEF	T-hücre Faktörü/Lenfoid Geliştirici Faktör
TNKS	Tankiraz Proteinleri
UPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
WT-İKH	Yabani Tip İntestinal Kök Hücre
ZNRF3	<i>Zinc and Ring Finger 3</i>

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Organoid teknolojisinin gelişiminin zaman çizelgesinde gösterimi.	4
2.2.	Organoid üretiminde kullanılan hücre kökenine göre kültür ortamına eklenecek niş komponentleri.	6
2.3.	İntestinal hücreler ve düzenleyici sinyalleri.	8
2.4.	Wnt/ β -catenin Sinyal Yolağı.	10
2.5.	Kanonikal Wnt Sinyal Yolağı İnhibitörleri.	12
2.6.	<i>Apc</i> ^{Δ750} sekansı.	17
2.7.	Fare soylarına göre polip sayıları.	18
2.8.	B6 ve FVB- <i>Apc</i> ^{Δ750} farelerin çaprazlanmasından elde edilen bağırsak ve proksimal kolon polipleri.	19
4.1.	<i>Apc</i> +/- mutant fare hücrelerinden üretilen intestinal organoidin 10 günlük gelişim periyodu.	28
4.2.	<i>Apc</i> +/- bir intestinal organoidin bölümlerinin gösterimi.	29
4.3.	Kontrol gruplarından izole edilen cDNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	30
4.4.	XAV939 uygulanan ve ilaç uygulanmayan gruplardan 48 saatlik inkübasyonun sonunda sentezlenen cDNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	31
4.5.	Niklozamid uygulanan ve ilaç uygulanmayan gruplardan 48 saatlik inkübasyonun sonunda sentezlenen cDNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	31
4.6.	48 saatlik XAV939 muamelesi sonrası <i>Ctnnb1</i> , <i>Axin2</i> ve <i>Lgr5</i> ifadenme seviyeleri.	33
4.7.	48 saatlik Niklozamid muamelesi sonrası <i>Lgr5</i> , <i>Axin2</i> ve <i>Ctnnb1</i> ifadenme seviyeleri.	34
4.8.	İmmünfloresan boyama ile kripte ve villus yapılarındaki çekirdek, hücre iskeleti ve β -catenin ifadelerinin gösterimi.	35
4.9.	1 μ M Niklozamid, 10 μ M XAV939 ve kontrol DMSO gruplarının immünfloresan görüntüleri.	35

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	2X Ters Transkriptaz İçeriği	23
3.2.	cDNA PCR Döngüsü	23
3.3.	1X PCR İçeriği	24
3.4.	PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primer Sekansları	25
3.5.	PCR Döngüsü	25
3.6.	qPCR Döngüsü	26
3.7.	qPCR İçeriği	27
3.8.	qPCR reaksiyonlarında kullanılan primer sekansları	27

1. GİRİŞ

Kolorektal kanserler (KRK), Wnt sinyal yolağı mutasyonlarının en sık rastlandığı kanser türüdür. Adenomatöz Polipozis Koli (*APC*) gen mutasyonlarına bağlı oluşan fonksiyon kaybı sebebiyle KRK gelişimi vakalarda sıklıkla gözlenmektedir(1,2). *APC* geninin KRK'lerde sıklıkla mutasyona uğrayan bir gen olduğu ilk olarak familial adenomatöz polipozis (FAP) hastalarında saptanmıştır. Bu hastaların çok sayıda intestinal polip geliştirmelerinin, *APC* geninin bir kopyasındaki *truncating* mutasyondan kaynaklandığı açıklanmıştır (3–5). Yüksek aktivitesi olan Wnt sinyal yolağını inhibe edebilecek birçok negatif geri bildirim döngülerinden bir tanesi, WNT hedef genlerinden *AXIN 1* ve *2*'nin yıkım kompleksinde görev alarak β -catenin destabilizasyonuna katkı sağlamasıdır (6). *APC* geni mutasyonlarının büyük bir bölümü AXIN bağlanma motifleri bölgesinde olmakta ve bu nedenle β -catenin proteini yıkıma uğrayamamaktadır (7). Ayrıca *APC* mutasyonlarının intestinal epiteldeki mutant hücrelerin kript-villus aksisindeki migrasyonunu engellediği ve bu hücrelerin apoptoza uğrayarak lümeneye dökülemediği saptanmıştır (8). İntestinal kök hücreler (İKH) incelendiğinde, *APC* mutasyonuna sahip olan İKH'lerin yabancı tipteki İKH'lere göre kript tabanlarındaki yaşam döngülerinin daha uzun olduğu görülmüştür (9). Bununla birlikte *Apc* mutasyonuna sahip *Lgr5* ifade eden İKH'lerin tümör oluşumuna sebep oldukları da bulgular arasındadır (10). Diğer tüm kanser türlerinin arasında Wnt sinyal yolağının KRK gelişimindeki yüksek oranda görülmesi sebebiyle Wnt hedefli terapötik araştırmaları güncelliğini korumaktadır (1).

Kanser araştırmalarında kullanılmakta olan hücre hatları, primer hasta dokularından üretilmektedir (11). Fakat iki boyutlu (2B) kültür ortamında bu hücreler, adaptasyonları ve seçilimleri konusunda avantajlı bulunmamaktadırlar. Yalnızca çok az sayıdaki hücre kolonileri orijinal primer dokunun genetik özelliklerini yansıtabilmektedir. Hücre pasajlamaları devam ettikçe köken aldıkları tümör hücrelerinin genetik heterojenitesini kaybetmektedirler. Bir diğer dezavantajı ise bu hücrelerin aktivitelerinin kıyaslanabileceği bir sağlıklı dokudan elde edilmiş hücre hatlarının olmayışı ve stromal komponentlerin kültür ortamındaki yoksunluğudur. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırabilmek için hasta kökenli tümör ksenograft (PDX)

modelleri fareler aracılığıyla üretilmişlerdir. Fakat, PDTX'ler zaman içerisinde fareye özgü tümör gelişimi gösterdikleri için hastalığın araştırılmasında yanılsamalara neden olmaktadır. Ayrıca bu sürecin oldukça zaman alıcı ve maliyeti yüksek bir metodoloji olması da dezavantajlarından(11–13).

Son yıllarda geliştirilen üç boyutlu (3B) kültür teknolojileri sayesinde insana ait sağlıklı doku ve tümörlerden etkili kanser araştırma modelleri oluşturulmuştur. Doku kökenli erişkin kök hücreler, 3B matrikse gömülerek kendi için organize olabilen organotipik yapıların oluşması sağlanmıştır(11). Doku kökenli kök hücrelerin yanı sıra *Lgr5* pozitif İKH'lerden 3B epitelyal organoidlerin oluşturulması, 3B hücre kültürü uygulamaları için önemli bir gelişme olmuştur (14). Üretilen organoidler, orijinal dokunun heterojenitesini yansıtmakla birlikte, uzun süre kültürlenebilmeleri, genetik modifikasyon uygulanabilmesi, kriyoprezervasyon ile uzun yıllar saklanabilmeleri, genotipik ve fenotipik özellikler açısından stabil kalabilmeleri noktalarında araştırmacılara katkı sağlamaktadırlar (11,15).

KRK batılı ülkelerde en çok rastlanan üçüncü kanser ve her iki cinsiyet için de kansere bağlı ölüme neden olan ikinci kanser türü olmaya devam etmektedir (16). KRK hastalarının 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık %50 iken (17); metastatik KRK hastalarının %10'a kadar gerilemektedir. Bu kötü prognoza göre, KRK tedavisi için yeni anti-kanser ajanlarının bulunmasına ve etkili terapötiklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bilgiler ışığında, Wnt sinyal yolağının KRK gelişimindeki yüksek aktivitesine yönelik olarak yeni molekül hedeflerinin belirlenmesi gerekmektedir (16).

Bu tez çalışması kapsamında, laboratuvarımızda 2018 yılında üretilmiş olan *Apc* mutasyonuna sahip *Apc*^{Δ750} fare soyunun ince bağırsaklarındaki kriptlerden oluşturulacak olan KRK öncülü intestinal organoidlere anti-kanser potansiyeli olan XAV939 ve Niklozamid ilaçları uygulanacaktır. İlaç uygulanan gruplar, *Ctnnb1*, *Axin2* ve *Lgr5* gen ifadenmeleri açısından değerlendirilerek, ilaçların etki mekanizmaları aydınlatılacak hem de *Apc*^{Δ750} fare modelinin kanser araştırmalarında kullanılabilecek etkili bir model olabileceği gösterilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

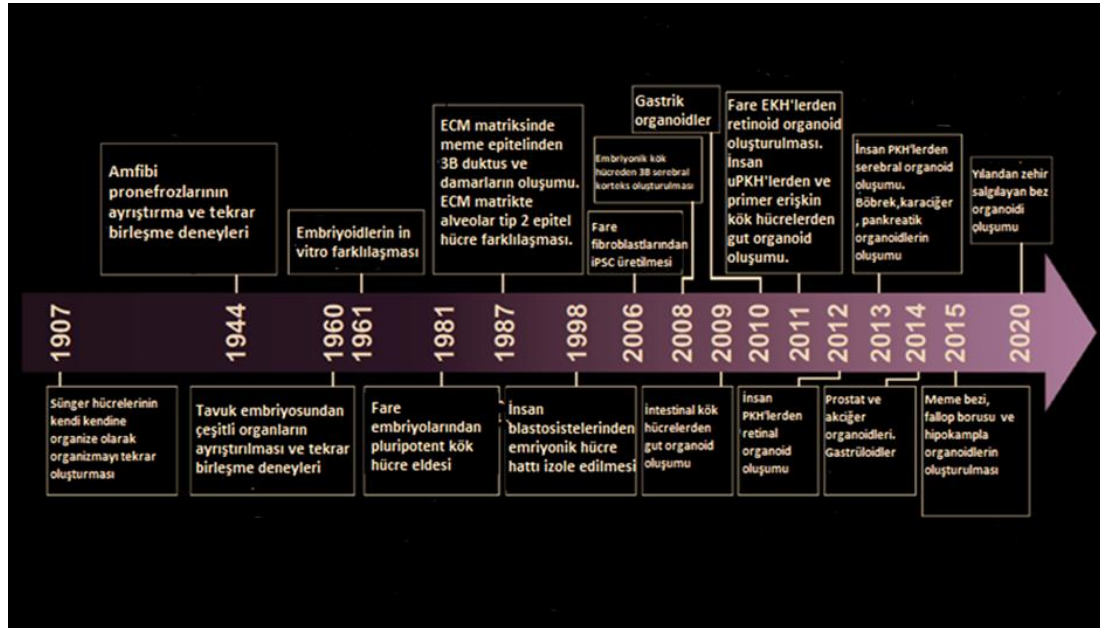
2.1. Organoid Teknolojisi

Kök hücre biyolojisindeki gelişmeler tıp ve biyoloji alanlarında yenilikleri de beraberinde getirmiştir. Gelişen teknolojinin hücreler üzerindeki kullanımı ile özellikle insan biyolojisi alanında yeni çalışma modelleri oluşturulmuştur. Organoid teknolojisiyle beraber hücreler, koşullandırılmış hücre kültürü ortamlarında üç boyutlu olarak kültürlenebilmektedirler. In-vivo organ karmaşıklığını yansıtabilme özelliklerinden dolayı 'mini organ' olarak da tanımlanmaktadır. Organoid yapımında kullanılacak hücre kaynaklarının temel özelliği yenilenebilir ve tekrarlanabilir doku kaynaklarında elde edilebilir olmalarıdır. Doku spesifik kök hücreler, embriyonik kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH) ve birincil dokulardan elde edilen hücreler temel hücre kaynaklarıdır. İzole edilen hücreler özel olarak koşullandırılmış ortamda kendi kendilerine organize olarak, sağlıklı veya hasta model dokuyu taklit etmektedirler. Organoidler, hücrelerin izole edildikleri organizmaya benzerlik gösterdikleri için araştırmacılar, doku seviyesinde araştırma yapabilmektedirler (18).

2.2. Organoidlerin Tarihçesi

Organoid teknolojisinin gelişimine öncülük eden bilimsel araştırmaların tarihi yaklaşık olarak 114 yıl öncesine dayanmaktadır. İlk olarak 1907 senesinde, Henry Van Peter Wilson *in vitro* olarak bir organizmanın kendi kendini yenileyebileceğini sünger hücreleriyle yaptığı çalışmada göstermiştir (19). 1981 yılında fare embriyolarından PKH izolasyonu (20,21) kök hücre araştırmaları için çok önemli bir gelişme olsa da 1998 yılına kadar insan blastokistlerinden PKH izolasyonu ve kültür yapılamamıştır (22). Üç boyutlu hücre kültürü çalışmalarına öncülük eden ilk bilimsel araştırma, 1987'de Mavis Li ve ekibinin *in vivo* mikroçevreyi taklit ederek meme epitel dokusundan 3B meme kanalı ve lümenini elde etmeleri olmuştur (23). Çalışma sonucunda, iki boyutlu hücre kültüründen farklı olarak, oluşan yapılar süt proteinlerini sentezleyebilmekte ve salgılayabilmekteydiler. Organoid çalışmalarının iki boyutludan üç boyutluya asıl geçişi 2008'de Eiraku ve ekibinin 3B hücre kültürü

tekniklerini kullanarak embriyonik kök hücrelerden serebral korteks üretmeleridir (24). 2009'da Toshiro Sato ve Hans Clevers'ın 2009'da *Lgr5* (*Single Leucine-rich Repeat Containin G protein-coupled Receptor 5*) ifade eden erişkin intestinal kök hücrelerden 3B intestinal organoid oluşturması ise son yıllarda organoid alanında yapılan önemli çalışmalardan biri olmuştur (14,18).



Şekil 2.1. Organoid teknolojisinin gelişiminin zaman çizelgesinde gösterimi (18).

2.3. Organoidlerin Avantajları ve Dezavantajları

Organoidlerin çok çeşitli avantajları bulunmakla birlikte en önemlisi yeni bir model organizma imkanı yaratmalarıdır. Yalnızca insan değil farklı organizmalardan elde edilen biyomateryaller ile oluşturulan organoidler sayesinde bilimsel çalışmaların tekrarlanabilirliği ve derinliği artmaktadır. Özellikle insan dokularından üretilen organoidler sayesinde, insanların gelişimsel sürecindeki doku ve organ oluşumlarındaki morfogenetik değişimler incelenebilmektedir. Aynı zamanda türler arasındaki genetik çeşitlilikte böylece belirlenebilmektedir. Hastalardan alınan doku örnekleri için, hasta onamlarında örneklerin farklı kurumlar, araştırmacılar ve ülkeler arasında gerektiğinde paylaşılabilmesi açıkça belirtilmelidir. Fakat organoidlerin araştırma ve tıp alanlarına kullanımı beraberinde etik belirsizliği ve kamuoyu

endişesini de getirmektedir. Organoidlerin ne olduğu ve ne olmadığı ve sağladığı faydalar bilimsel organizasyonlar aracılığıyla insanlara anlatılmalıdır. Bu gibi sebeplerden dolayı insan dokularındaki çeşitliliği yansıtabilecek herhangi bir model organizmadan elde edilecek materyallerden oluşturulabilmektedir. Doku ve organların karmaşıklığı yansıtabildikleri için ilaç keşfi, doku mühendisliği, biyoteknoloji çalışmaları, hastalık modellemesi, konak-patojen ilişkisi araştırmaları ve daha birçok biyolojik araştırmada organoidlerden faydalanılmaktadır. Üretilen organoidler kriyoprezervasyon sistemi ile herhangi bir genotipik veya fenotipik değişime maruz kalmadan uzun süre saklanabilmektedir (25).

Bilim dünyasına sağladığı tüm avantajlarının yanı sıra beraberinde bazı kısıtlamalara da neden olmaktadır. Deney hayvanlarının aksine organoidler, tek bir organın fonksiyonu hakkında bilgi verebilmektedirler bu nedenle organizmanın total değerlendirmesi yapılamamaktadır.

In vivo özelliklerden (vücut eksenleri, immün yanıt, fizyolojik ağ tepkisi vb.) yoksundurlar, bu nedenle organoidlerden elde edilecek bilgiler model sistemler üzerinde denenmelidir. Organoid çalışmalarının ilerlemesi, yenilebilir ve karşılaştırılabilir doku kaynaklarının varlığına bağlıdır. Çünkü spesifik bir organ üzerinde çalışmak isteyen araştırmacıların karşılaştırma yapabilmesi için hücre tipleri ve yapılarını kıyaslayabilecekleri kriterler belli olmalıdır. Organoid üretimi için gerekli olan en ideal koşullar ve uygulama yöntemleri araştırma başlatılmadan önce saptanmalıdır (25).

2.4. Organoidlerin Kullanım Alanları

Dezavantajlarının yanı sıra, avantajlarına dayanarak organoidlerin kullanım alanları son yıllarda çok geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Biyomedikal araştırmalar çoğunlukla hayvan modelleri üzerinde yürütülmektedir. Fakat insanlardaki genetik çeşitlilik hayvan modellerine göre çok keskin farklılıklar göstermektedir. İnsan modellerinin kullanılamaması, elde edilen başarıyı gölgelemektedir. Örneğin, ilaçların hayvan modelleri üzerinde denenmesi yerine sağlıklı veya hasta kişilerin dokularından üretilecek olan organoidlerde denenmesi yeni bir model sunmaktadır. *Tuft Center for Study of Drug Development*'in son açıklamasına göre, reçeteli bir ilacın geliştirilmesi

ortalama 2,6 milyon dolara mal olmaktadır. Bu çalışmaların ise yaklaşık %88'inde ise insanlarda denenirken hatalar alınmaktadır (25,26). 2017 yılında yapılan çalışmada ise UPKH'lerden üretilen nöral projenitör hücrelerden oluşturulan insan beyin organoidlerinde 6000'den fazla ilaç denenebilmektedir (27).

Organoidlerin özellikle hastalık modelleme alanında fonksiyonelliği ışığında, 2009 yılında Sato ve ark. *LGR5* ifade eden intestinal kök hücrelerden üç boyutlu epitelyal organoid üretmişlerdir (11). Matrijele gömdükleri intestinal kök hücreleri; serumsuz, R-spondin 1 (Wnt agonisti; *LGR5* ligandı), EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve BMP (Kemik Morfogenetik Proteini) komponentlerinin kök hücre nişini taklit ettiği ortamda kültürlemişlerdir. Sonucunda ise *LGR5+* intestinal kök hücreler organotipik büyüme göstererek polarize epitelyal yapılar olan kriptleri ve villusları oluşturmuşlardır. Bu kültür protokolü, insan ve fare epitellerinden çeşitli organların oluşturulması için ihtiyaç duyulan organoid protokollerinin başlangıcı olmuştur (Şekil 2.2). İntestinal organoid yapımında kullanılacak başlıca biyomateryal kaynakları; erişkin-doku spesifik kök hücreler, embriyonik kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler, kanser hücre hatları ve hastalıklı organdan alınmış dokulardır. Bu kaynaklar çerçevesinde ilerleyen yıllarda oluşturulan protokol değişikliklere uğramıştır (11).

Doku Tipi	Doku Kaynağı	Kök Hücre Niş Faktörleri	Farklılaşma Kültürü Koşulları
İnce Bağırsak	Erişkin Fare	EGF, Noggin, R-spondin	EGF, Noggin, R-spondin
	Erişkin İnsan	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, TGF-b inhibitörü, p38 inhibitörü	EGF, Noggin, R-spondin, TGF-b inhibitörü
	İnsan UPKH	EGF	EGF
Kolon	Erişkin Fare	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A	EGF, Noggin, R-spondin
	Erişkin İnsan	EGF, Noggin, R-spondin, Wnt-3A, TGF-b inhibitörü, p38 inhibitörü	EGF, Noggin, R-spondin, TGF-b inhibitörü

Şekil 2.2. Organoid üretiminde kullanılan hücre kökenine göre kültür ortamına eklenecek niş komponentleri (28).

Doku spesifik kök hücrelerden intestinal organoid oluşturmak için kullanılan protokol, insan embriyonik kök hücreleri için modifiye edilmiştir. Bu kök hücreler, mezendodermal yönde farklılaşma sağlanabilmesi için Aktivin-A ile muamele edilmekte ve hindgut özelleşmesi içinse WNT3A ve Fibroblastik Büyüme Faktörü-4 (FGF4) içeren kültür ortamında büyütülmektedirler. Hindgut sferoidleri matrijelde doku spesifik kök hücrelerle aynı kültür koşullarında (serumsuz, R-spondin 1, EGF,

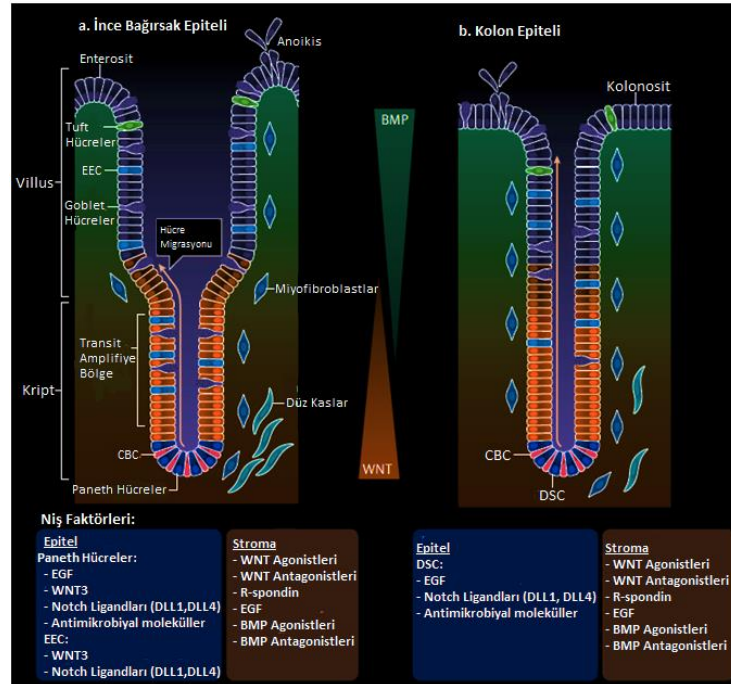
BMP içeren) ortamda kültürlenmektedirler. Embriyonik kök hücre kaynaklı intestinal organoidlerle, doku spesifik kök hücre kökenlilerin en önemli farklarından biri: fareye engrafmanıya başlayan damarlanma sırasında, kültür ortamını çevreleyen mezenkimal kök hücrelerin olması epitel ve mezenşim dokularının oluşumunu desteklemektedir (29,30). Kolon kanseri kök hücrelerinin kript ve villus yapılarında hiperplazi gözlemlendiği için organoid üretiminde kültür ortamına herhangi bir büyüme faktörü, EGF, R-spondin 1 veya BMP eklenmesine gerek duyulmamaktadır (31).

İntestinal organoid üretimi sırasında kript proliferasyonunu desteklemek için WNT3A, FGF4, R-spondin1 ve EGF moleküllerine ihtiyaç duyulmaktadır. WNT ve FGF sinyal molekülleri ayrıca definitif endodermin hindgut yönünde özelleşmesinde görev almaktadırlar. Yine intestinal kript proliferasyonunu desteklemek için Laminin α 1/2 yönünden zengin matrijel kullanılmaktadır. Kript tabanının Laminin α 1/2 yönünden zengin olduğu bilinmekte ve böylece niş ortamı taklit edilmektedir. BMP sinyali ise kript proliferasyonunun negatif düzenleyicisi olduğu için kültür ortamına Noggin eklenerek intestinal gelişim desteklenmektedir (14,29,32,33).

2.5. İntestinal Kök Hücreler

Gut yapısı anatomik olarak ince bağırsak ve kolon olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır (Şekil 2.3). İnce bağırsak epitelinde altı tip farklılaşmış hücre sahiptir. Bunlar; panet hücreleri, enteroendokrin hücreler, mikrofild hücreler, tuft hücreleri, enterositler ve goblet hücreleridir. İnce bağırsak epitelinin organizasyonunu ise kript ve villus yapıları oluşturmaktadır. Villuslar, lümene doğru uzanan parmaklı çıkıntılardır ve en önemli görevi yüzey alanını arttırarak besin emilimini sağlamaktır. Yapılarında bulunan hücreler fonksiyoneldir fakat bölünme yetileri bulunmamaktadır. Villus yapısında bulunan enterositler absorpsiyonda; goblet hücreleri mukus salgısında ve enteroendokrin hücreleri hormon salgılanmasında görev almaktadırlar. Kriptler ise hücre proliferasyonunun gerçekleştiği yapılardır. Proliferatif hücreler, kript tabanında yer almaktadırlar ve *LGR5* ifade eden hücrelerdir. Kript tabanında bulunan ve özellikle organoid yapımında sıklıkla kullanılan bu proliferatif hücreler,

intestinal kök hücrelerdir. Kript tabanında çoğalan ve terminal farklılaşmaya uğrayan hücreler, yaklaşık 3 gün sonra villusların ucunda anoikise uğramakta ve lümeneye dökülmektedirler. Kript tabanından villuslara doğru olan bu migrasyon sürecinde farklılaşmaya yatkın fakat aynı zamanda kök hücre özelliklerini de barındıran *transit-amplifying* hücreler adı verilen hücre grubu ortaya çıkmaktadır. Bu hücre grubunun oluşumu ise henüz açıklanamamıştır (34,35).



Şekil 2.3. İntestinal hücreler ve düzenleyici sinyalleri (35).

Her kriptin yapısında 6 farklı bağımsız kök hücre olduğunu savunan iki model vardır: klasik model ve kök hücre bölgesi modeli (34). İnce bağırsak kriptlerinde bir tüp boyunca çoğalan kök hücreler, Paneth hücreleri tarafından kontrol edilmektedir. 1950'lerden bugüne kadar, klasik model kök hücrelerin kript tabanında transit-amplifiye bölgede bulunduğunu savunmaktadır. Burada terminal farklılaşmaya uğrayan Paneth hücreleri, bu bölgede lokalize olan ilk üç hücrenin pozisyonunu almaktadırlar. Potten ve arkadaşlarının ortaya koyduğu +4 kök hücre modeline göre, sessiz haldeki kök hücrelerin bu lokasyonda bulduklarını ortaya koymuşlardır(36). Ayrıca, bu bölgede bulunan kök hücrelerin, radyasyona karşı duyarlı oldukları, böylece de buldukları kök hücre kompartmanını genetik hasardan korumaktadır.

Bu modele göre, hasarlı olan kök hücreler transit-amplifiye hücrelerin ilk 2-3 jenerasyonu ile yer değiştirerek onarılabilmektedir.

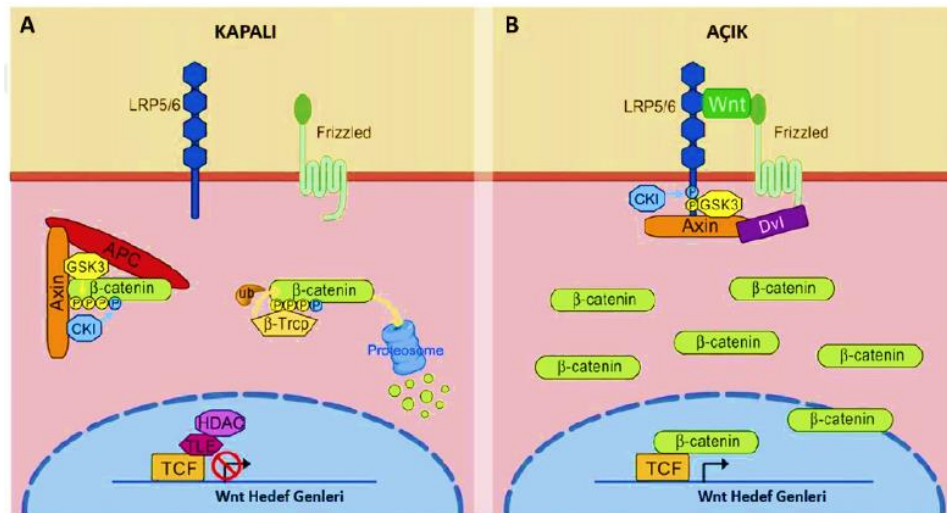
Kript tabanında Panet hücrelerinin arasında bulunan *crypt-base columnar cells* (CBC) *LGR5* ifade eden intestinal kök hücrelerdir (Şekil 2.3a). Panet hücreleri, köklülük için gerekli olan WNT ve Notch ligandlarının yanı sıra proliferasyonu destekleyici EGF salgılamaktadırlar. WNT sinyalizasyonu köklülük özelliklerini desteklerken, BMP sinyalizasyonu köklülük özelliklerinin negatif düzenleyicisidir. Bu nedenle CBC'den köken alan hücreler kript tabanından villuslara doğru göç ederken WNT sinyalinin aktivasyonu azalmakta, BMP sinyali artmaktadır. Stromal nişte bulunan mezenkimal hücreler BMP sentezlerken; miyofibroblastlar ve düz kas hücreleri ise BMP inhibitörü olan Noggin salgılamaktadırlar. Terminal farklılaşması tamamlanan ve yaşam döngüsünün sonuna gelen hücreler kriptlerden villuslara doğru göç etmektedirler. Bu hücreler villusların ucunda anoikise uğrayarak lümene dökülmektedirler (35).

İnce bağırsak ile kolon arasında anatomik olarak birçok farklılık bulunmaktadır. Bunlardan biri; ince bağırsaklarda villus bulunurken, kolonda villus bulunmamasıdır. İnce bağırsakta suyun geri emiliminden sorumlu olan enterositlerin görevini kolonda kolonositler yerine getirmektedirler. Panet hücreleri haricinde kolon epiteli, ince bağırsak epiteli ile aynı hücre tiplerini barındırmaktadır. Kript yapısında bulunan panet hücrelerinin yerine kolon villuslarında REG4 ifade eden *deep secretory cells* bulunmaktadır. Bu hücreler, EGF ve Notch liganları sentezlemesi açısından Paneth hücrelerine benzerler fakat Wnt ligandı üretememektedirler. Wnt ligandı yalnızca kolon stromasından sentezlenmektedir (35).

2.6. Wnt Sinyal Yolağı, Aktivatör ve İnhibitörleri

Wnt sinyal yolağı, embriyonik gelişim ve doku homeostazı süreçlerindeki hücre proliferasyonu, proliferasyonu ve hücre kaderinin belirlenmesinde kritik bir role sahiptir (37). Bu nedenle Wnt sinyal yolağında gerçekleşen mutasyonlar doğumsal kusurlar, kanser gelişimi ve birçok hastalık neden olmaktadır. Bu süreçlerde kritik rolü olan ve sıklıkla bilimsel çalışmalara konu olan kanonikal Wnt sinyal yolağındaki β -catenin miktarının düzenlenmesi, gelişimsel süreçlerde etkili olan

gen ifadenmelerinin programlanmasında rol oynamaktadır (Şekil 2.4). Wnt ligandı yokluğunda, sitoplazmik β -catenin proteini, *Axin*, *APC*, *Kazein Kinaz-1 (CK1)* ve *Glikojen Sentaz Kinaz (GSK3)*'dan oluşan yıkım kompleksi tarafından degrade edilmektedir. CK1 ve GSK3, β -catenin'in amino ucunu fosforillemekte ve sonucunda E3 ubiquitin ligaz tarafından tanınmaktadır. Sonucunda da β -catenin proteozomal degradasyona uğramakta ve çekirdeğe geçişi önlenmektedir. Böylece Wnt hedef genleri olan TCF/LEF ailesi proteinlerinin ifadenmesi de baskılanmaktadır. Ortamda Wnt ligandı varken, Frizzled (Fzd) reseptörü ve ko-reseptör olan LDL Reseptör ilişkili Protein 5 ve 6 (Lrp6/Lrp5)' ya bağlanmaktadır. Wnt-Fzd-Lrp6 kompleksi, Dishevelled (Dvl) proteini ile birleşmektedir. Sonucunda, Lrp6 fosforile olarak aktifleşmektedir. Axin kompleksi heterodimer yapısındaki reseptörlerle birleşmektedir böylece, β -catenin fosforile olamamakta ve proteozomal degradasyona da uğramamaktadır. Sitoplazmada biriken β -catenin, çekirdeğe geçmekte ve TCF/LEF ile etkileşerek Wnt hedef genlerinin ifadenmesinde rol oynamaktadır (37).



Şekil 2.4. Wnt/ β -catenin Sinyal Yoluğu (37).

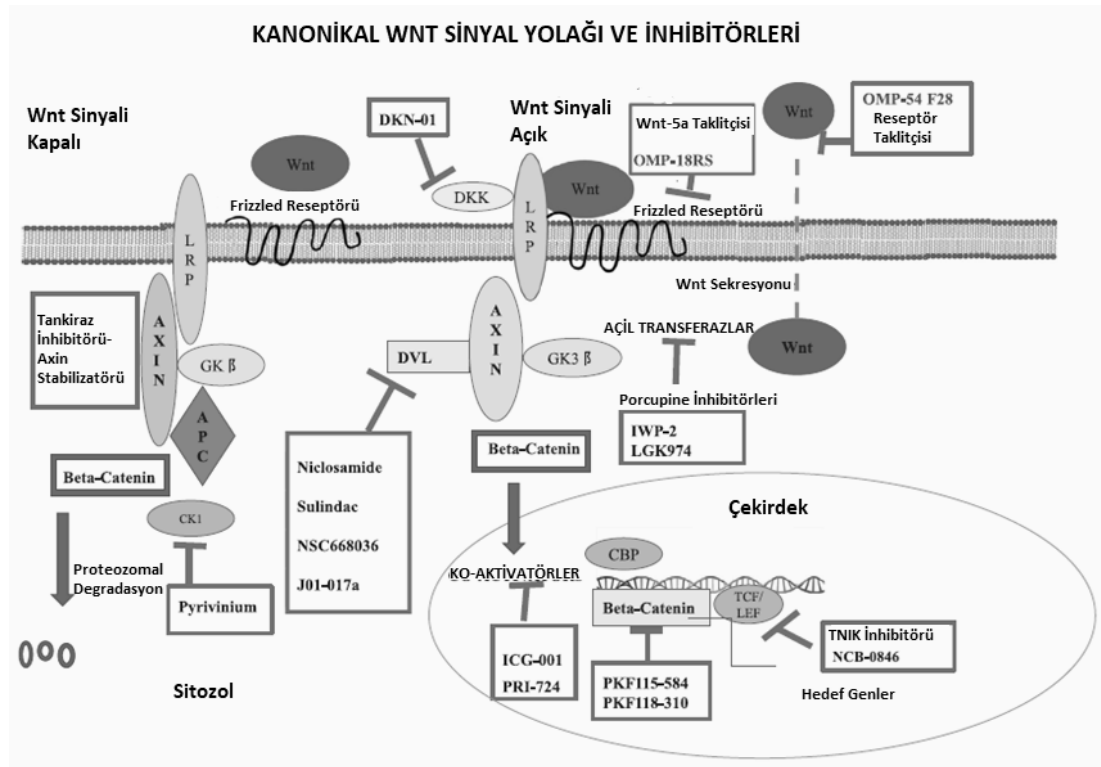
Kolon kanserlerinin çoğunda, Wnt sinyal yolağının mutasyonuna rastlanmaktadır. Özellikle tümör baskılayıcı görevi olan *APC* geninde oluşan mutasyonlar sonucunda oluşan proteindeki amino asit dizisindeki eksilme, fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki Wnt yolağındaki yüksek aktivasyon, bağırsak tümörlerinin gelişimindeki en önemli onkojenik faktörlerden

biridir. Bu nedenle Wnt yolağı elemanlarının farmakolojik olarak inhibisyonu, kolorektal kanserlerin tedavisi için umut vaat etmektedir (38). Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda Wnt sinyal yolağını farklı seviyelerde inhibe edebilen moleküller bulunmuştur (Şekil 2.5). İnhibitör etkisi olan küçük moleküller Wnt sinyal yolağının farklı etkileşimlerini bozmaktadırlar. Bu inhibitörlerin genel sınıflandırması; Wnt-reseptör kompleksi inhibitörleri, β -catenin-yıkım kompleksi inhibitörleri, TCF/ β -catenin kompleksi inhibitörleri, Wnt ko-aktivatör antagonistleri, Wnt5a taklitçileri, gamma sekretaz inhibitörleri ve Hedgehog inhibitörleri olarak hedeflerine göre çeşitlilik göstermektedirler (39).

Wnt sinyali, dokulardaki kök hücre işleyişlerini düzenleyerek doku homeostazının dengede tutulmasını sağlamaktadır. Wnt yolağının hedef genleri de dokulara özgü kök hücre mekanizmalarını etkilemektedir. KRK çalışmalarında çoğunlukla hedeflenen *Lgr5*, intestinal epitelde ifadenmekte olup özellikle kript tabanındaki kök hücrelerde daha fazla ifadenmektedir. İntestinal kök hücrelerin devamlılığı için kritik olan *Lgr5* ifadesi aynı zamanda kıl foliküller, ovaryum epiteli ve daha birçok doku içinde önemlidir. Wnt yolağının bir başka hedefi olan *Axin2* geni, karaciğeri oluşturan kök hücre fonksiyonlarında görev almaktadır. Karaciğeri oluşturan loblarda *Axin2* ifadeleyen kök hücreler çoğunlukta olup, bu hücrelerin poliploid hepatositlerin projenitörlerini oluşturdukları bulunmuştur. Tüm bunların yanında karaciğer intestinal kök hücrelerdeki rollerinin aksine, Keratin-14+ olan tırnak kök hücrelerinde β -catenin susturulduğunda tüm tırnak epiteli kaplayan Keratin-14+ hücreler dolayısıyla tırnak büyümesi engellenmiştir(40).

Wnt yolağı aktivatörlerinden KRK'lerde en sık çalışılanı olan R-spondinler (Rspo1-4) 4 adet büyüme faktöründen oluşmaktadır. Wnt ligandlarının yanı sıra Rspo aktivatörleri β -catenin'in aktivasyonunu da sağlamaktadırlar. Tüm Rspo'lerin ortak özelliği kanonikal Wnt sinyal yolağını aktifleştirmeleridir. Son yapılan çalışmalarda LGR5 ve homoloğu olan LGR4'ün Rspo reseptörleri oldukları ve özellikle LGR5'in çoğalmakta olan ince bağırsak, kolon, mide ve kıl foliküllerindeki kök hücrelerin belirteci oldukları saptanmıştır. Wnt3a ligandının Wnt yolağı üzerindeki etkisinin sinerjistik hali LGR4 ve -5 ile Rspo sinyalizasyonu arasında mevcuttur. E3 ubiquitin

ligazı olan *Zinc and Ring Finger 3* (ZNRF3), Frizzled (Fzd) ve LRP6 reseptörlerinin stabilizasyonlarını bozarak Wnt sinyalizasyonunu engellemektedir. Bu inhibisyonu engellemek için Rspo, ZNRF3'ün ekstrasellüler kısmına bağlanarak LGR4 ile etkileşime girmesini sağlamak ve böylece reseptörlerin stabilizasyonu devam edebilmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda ZNRF3'e bağlı Wnt yolağı inhibisyonunun lens gelişimi için önemli olduğu bulunmuştur. Rspo haricinde özellikle gelişimsel süreçlerde önemli rolü olan Norrin de önemli Wnt aktivatörlerinden bir diğeridir (41).



Şekil 2.5. Kanonikal Wnt Sinyal Yolağı İnhibitörleri (39).

β -catenin-yıkım kompleksi inhibitörleri sınıfında yer alan tankiraz inhibitörleri (XAV939, IWR-1 vb.) hakkında sıkça çalışma yürütülen gruplardan biridir. Tankiraz proteinleri (TNKS), poli-ADP-riboz (PARP) ailesine bağlı bir polimerazlardır. Tankiraz 1 (TNKS1/PARP5a) ve Tankiraz 2 (TNKS2/PARP5b) olmak üzere Wnt/ β -catenin sinyal yolağında etkili olan iki izoformu bulunmaktadır. Diğer PARP proteinlerinin aksine, TNKS1/2 DNA onarımında görev almamakta, Axin1/2'nin PARilasyonu ile Wnt sinyalizasyonunu güçlendirmeyi hedeflemektedir. PARilasyona uğrayan Axin 1/2, degradasyon için hedeflenmekte ve yıkım kompleksinin stabilizasyonu da olumsuz

yönde etkilenmektedir. Tankiraz 1/2 proteinlerinin mitoz bölünme düzenlenmesinde, telomer devamlılığında ve kanonikal Wnt sinyal yolağı düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu belirtilmiştir(42–45). TNKS'nin başlıca hedef proteinleri TRF1, AXIN, PTEN, NuMA, IRAP, TAB182, FBP17, CTIF ve PrxII'dir(44,46–51). Fakat bu proteinler arasından, aktif olarak β -catenin yıkım kompleksinde baskılayıcı rol alan AXIN kanonikal Wnt sinyal yolağı ile direkt ilişkilidir. Güncel olarak sıklıkla üzerinde çalışılmakta olan TNKS inhibitörleri XAV939, IWR-1, G007-LK ve NVP-TNKS656'dır (44,52–55). E7449 molekülü haricinde, henüz klinik araştırmalara dahil olabilen bir TNKS inhibitörü bulunmamaktadır. Anti-kanser ilaç olarak kullanılabilen bir TNKS inhibitörü ihtiyacı halen devam etmektedir(42,56).

Anti-helmintik ilaç olarak kullanılmakta olan Niklozamid ise Dvl inhibitörü olarak kullanılmaktadır. PDZ domeyni aracılığıyla Dvl, Fzd reseptörünün karboksil ucuna bağlanmaktadır. Niklozamid ise bu protein-protein etkileşimini inhibe edici bir ajan olarak görev almaktadır (39,57). Niklozamid, son 50 yıldır kullanılan FDA tarafından onaylanmış anti-helmintik bir ilaçtır(58,59). İnsan kolon kanserinin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarında(60,61) etkili bir ajan olabileceği raporlandığından beri diğer kanser çeşitleri için olan araştırmalara yoğunlaşmıştır(62,63). Niklozamidin kullanılabilen hedeflerden bazıları Notch sinyalizasyonu, Dishevelled, S100A4 ve Frizzled reseptörüdür(60–62) fakat ilacın eylem modu henüz tam olarak açıklanamamıştır. Niklozamid, Frizzled reseptör internalizasyonunu sağlayarak Dvl ve B-catenin ifadelerini protein düzeyinde azaltmakta ve KRK hücrelerinin büyümesini *in vivo* ve *in vitro* olarak engellemektedir(60,64,65). Wnt sinyal yolağının yanı sıra Niklozamid, mTOR, NF-kB, Notch ve STAT-3 onkojenik sinyal yollarını da inhibe edebilmektedir(66).

Wnt- β -catenin sinyal yolağının yüksek aktivitesi yalnız kanserde değil, kök hücrelerin devamlılığı ve doku yenilenmelerinde de kritik bir rol oynamaktadır. Wnt yolağının inhibe edilmesiyle birlikte özellikle kıl folikülleri ve gastrointestinal sistemde bulunan Wnt-bağımlı kök hücre popülasyonları olumsuz olarak etkilenmektedir. Bu nedenle de tankiraz inhibitörleriyle çalışırken öncelikle gastrointestinal toksisiteyi önlemek amacıyla doz limiti belirlenmektedir (39). Kök hücreler üzerindeki olumsuz

etkisi göz önüne alındığında Wnt sinyalinin uzun süreli inhibisyonu toksik etkiye neden olmaktadır. Örneğin, intestinal mukozada hasarlanma, azalan kemik yoğunluğu, saçkıran ve toksisiteye bağlı birçok hastalığa neden olmaktadır (67).

2.7. *In vivo* Hastalık Modeli Olarak *Apc* Mutant Fare Tümör Modelleri

Uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda kolorektal tümörler iki moleküler kategoriye ayrılmıştır: mutator fenotip ve kromozomal instabil fenotip. Sporadik kolorektal tümörlerin %85'i kromozomal instabil olmakta ve bu gruptaki tümörlerde heterozigosite kaybı, gen füzyonları, geniş insersiyon ve delesyonlara rastlanmaktadır. Bugüne kadar üretilen *Apc* mutant farelerin arasındaki en büyük fark, *Apc* sekansını kesen mutasyonunun gerçekleştiği lokasyonunun farklılığıdır. Cre-lox teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, bilim insanları *Apc* delesyonun gerçekleşeceği zamanı ve lokasyonu kontrol edebilmeye başlamışlardır. Örneğin, Cre rekombinaz enziminin dokuya özgü promotörden ifadenmesi (*Fabpl*, *Villin* promotörleri), *Apc* geninin spesifik olarak gastrointestinal epitel hücrelerinde gerçekleşmesini sağlamaktadır. *Apc* delesyonu olan her mutant fare farklı fenotipik özelliklere sahip olsada, sonuç olarak gastrointestinal adenokarsinomlar geliştirmektedir. Bu tip *Apc* mutant fareler nadiren agresif metastaz geliştirdikleri için erken evrede KRK tümör oluşumunu çalışabilmek için kullanılmaktadırlar (68,69).

Cre-lox teknolojisinin haricinde, mutant fare modelleri oluşturabilmek için kimyasal ile uyarılmış tümör modelleri ve insersiyonel mutagenез sonucunda elde edilen tümör modelleri bulunmaktadır. Kanser mikroçevresini taklit edebilmek için araştırmacılar, karsinogenik kimyasallar uygulayarak sporadik KRK gelişimi sağlamışlardır. Metilazoksimetanol, 1,2-dimetilhidrazin ve azoksimetan sıklıkla kullanılan karsinogenik kimyasal ajanlardır. İnsersiyonel mutagenезde ise çoğunlukla retroviral gen içine veya yanına eklenen sekans ile hedeflenen genin ifadenmesi değiştirilmektedir. Bu uygulama sonucunda yapılan genetik çalışmalar ile kansere özgü genler saptanabilmektedir (68).

KRK araştırmalarında en sık kullanılan tümör modeli, çoklu intestinal neoplazi (*Multiple Intestinal Neoplasia; Min*) modeli olan *ApcMin/+* fareleridir. N- etil- N-

nitrozüre mutajenine maruz bırakılan farelerde *Apc* geninin 850. Kodonundaki mutasyona bağlı olarak *Apc* fonksiyonu yitirilmektedir. *ApcMin/+* farelerin *Apc* mutasyonu sonucu oluşturdukları intestinal polipler, insanlardakinden farklı olarak kanserleşmeye neden olmamaktadır. Bu özelliğinden dolayı *Apc* gen kaybının insanlarda yol açtığı FAP sendromu için tedavi geliştirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadırlar. *ApcMin/+* fareleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda insanlarda gelişen sporadik poliplere cerrahi olarak müdahale edilmesiyle, kanserleşmenin önüne geçilebileceği saptanmıştır (69).

2.8. İntestinal Tümör Gelişiminde Kök Hücre Dinamikleri

Malign tümörlerin birçoğunda kök hücrelerin malign gelişime neden olan hücreler olduğu tespit edilmiştir. Bir kök hücre, mutasyona sahip olduğunda malign dönüşümü başlatmaktadır (70,71). İnce bağırsakta gerçekleşen adenomatoz büyüme, Wnt sinyalinin kript tabanında bulunan *LGR5+*, *PROM1+* ve *BMI1+* hücrelerde hiper aktivitesi sonucunda hızlı bir şekilde başlamaktadır. Bu durumun aksine, farklılaşmış hücrelerde *Apc*'nin inhibe olması sporadik tümör gelişimine neden olmaktadır. Tümörleşmenin başlangıcı için birden fazla hücre sel sinyal görev almaktadır. Gerekli sinyal molekülleri İKH mikroçevresinde bulunmaktadır. Bu sinyaller ile hücreler, malign dönüşüme elverişli hale gelmektedirler. Örneğin, villus hücrelerinde nükleer faktör- κ B (NF- κ B) yolağının yüksek aktivasyonu, bu hücreleri malign transformasyona yatkın hale getirmektedir. Hamartomatöz sendromlar (Peutz–Jeghers Sendromu vb.) veya şiddetli kolitle birlikte gelişen KRK'ların bu mekanizmaya dayanabileceği tartışılmaktadır (70,72).

'*Biased Drift*' modeline göre, yabanıl tip İKH'ler (WT-İKH) ve mutant İKH'ler nişteki pozisyonları için eşit şartlarda olmayan bir yarış içerisindedirler çünkü mutant İKH'lerin avantajı daha yüksektir. Örneğin, *Apc* genindeki hem heterozigot hem homozigot mutasyon taşıyan İKH'ler, WT-İKH'lere göre niş yarışında avantajlıdır (70).

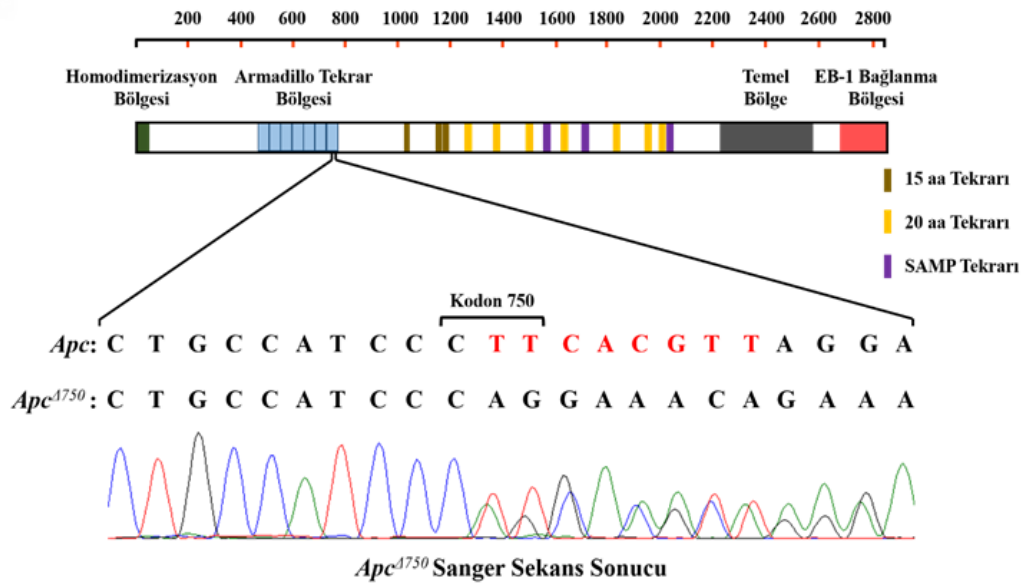
Kök hücre benzeri kanser hücreleri, İKH belirteçlerini eksprese etmekte, multipotent özellik göstermekte ve kendi kendilerini yenileyebilmektedirler. Bu

özelliklerinden dolayı bu hücreler, kanser kök hücreleri (KKH) denilmiştir. KKH'lerin tümör büyümesi ve progresyonunda rol aldığı bilinmekte fakat çalışma mekanizmaları ve önemleri hakkında hala birçok bilinmezlik bulunmaktadır. KKH popülasyonu, yeni tümör oluşumlarını desteklemekte ve kanserin nüksetmesine neden olabilmektedirler. Yapılan çalışmalar sonucunda KKH'ler arasında CD133, CD44 ve Kök hücre benzeri kanser hücreleri, İKH belirteçlerini eksprese etmekte, multipotent özellik göstermekte ve kendi kendilerini yenileyebilmektedirler. KKH'lerin tümör büyümesi ve progresyonunda rol aldığı bilinmekte fakat çalışma mekanizmaları ve önemleri hakkında hala birçok bilinmezlik bulunmaktadır. KKH popülasyonu, yeni tümör oluşumlarını desteklemekte ve kanserin nüksetmesine neden olabilmektedirler. Yapılan çalışmalar sonucunda KKH'ler arasında CD133, CD44 ve CD166 pozitif olan hücrelerin tümörjenik özellikte, farklılaşmış hücrelerin ise bu belirteçler açısından negatif olduğu saptanmıştır (73).

Adenomlarda fonksiyonel olan kök hücre bölümlerinin tespit edilebilmesi için Kozar ve arkadaşları, belirteçlerden bağımsız olarak klonal işaretleme yöntemi geliştirmişlerdir (70,74). Bu çalışmada, adenomatöz bezlerde bulunan tüm hücrelerde *Apc* inaktif durumundadır bu nedenle niş yarışında bütün hücreler eşit potansiyele sahiptirler. Adenomatöz kript benzeri yapılar işaretlendiğinde, görülmüştür ki, 6 adet fonksiyonel kök hücreye sahip normal bağırsağa göre, adenomatöz kriptler fonksiyonel olarak kök hücre bulundurmaktadırlar. Fakat adenomlardaki fonksiyonel kök hücrelerin sayısı, *Lgr5+* hücre sayısından daha azdır. Bunun nedeninin kript benzeri glandüler yapılarıdaki heterojeniteye bağlı olduğu düşünülmektedir fakat henüz pratikte bunun araştırabileceği bir fare modeli bulunmamaktadır (70). KKH biyolojisi hakkında kapsamlı çalışmaların yapılması, geliştirilecek yeni tedavi yöntemleri için önemlidir, bu nedenle kök hücre dinamiklerinin de bu çalışmalar kapsamında detaylıca incelenmesi gerekmektedir.

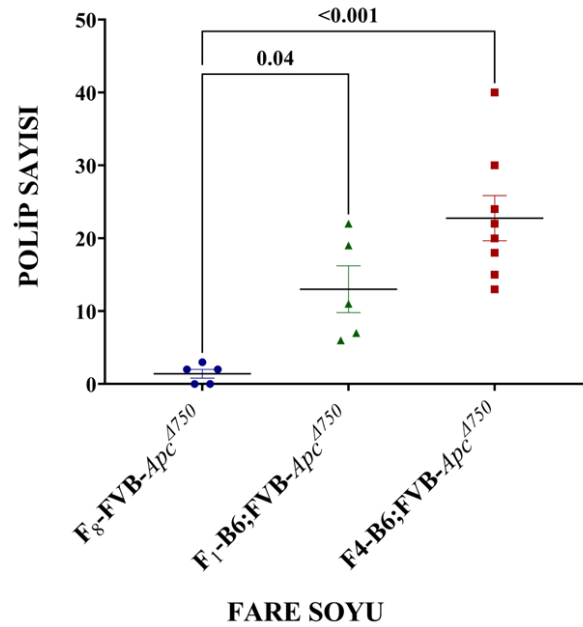
2.9. *Apc*^{Δ750} Fare İntestinal Tümör Modeli

Kolorektal kanserlerde en sık mutasyona uğrayan genlerden bir tanesi tümör baskılayıcı rolü olan *APC* genidir (75). Kolorektal kanserin gelişim sürecinde WNT, TGF, P53, PIK3 ve RTK-RAS sinyal yolları sıklıkla rol almaktadır (76). *APC* geni ise bu yollardan olan kanonikal Wnt sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olarak görev almaktadır. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %93'ünde *APC* ve β -catenin mutasyonlarına rastlanmaktadır. *APC* genindeki moleküler değişimlere bağlı olarak β -catenin sitoplazmada stabilize olmakta ve Wnt sinyal yolağı hiperaktif duruma geçmektedir. Klasik yolak sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %80'inde yüksek Wnt aktivasyonu görülmekte ve bu durum farelerde de FAP sendromuna neden olmaktadır (76). *Apc* geninin farklı bölgelerinde oluşturulan mutasyonlara bağlı olarak çok sayıda intestinal tümör fare modelleri üretilmiştir (77). Laboratuvarımızda 2018 yılında yapılan çalışmada CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak *Apc* geni mutant olan transgenik fare soyu oluşturulmuştur (75).

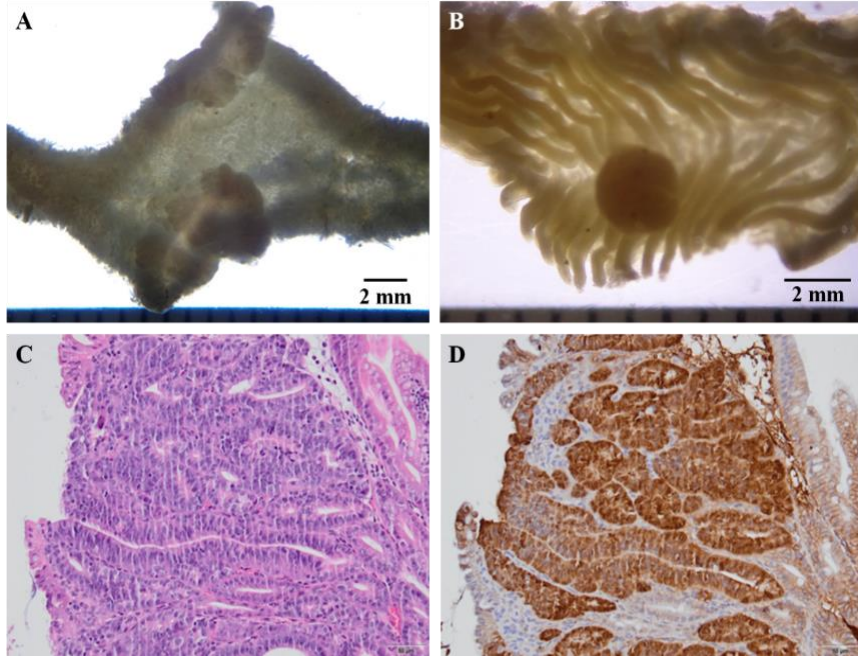


Şekil 2.6. *Apc*^{Δ750} sekansı (75).

Proje yürütücülüğünü Prof. Dr. Aytekin Akyol'un üstlendiği TÜBİTAK 1001 projesi (Proje no: 215S926) kapsamında 2018 senesinde FVB/N fare soyunda *Apc* geni hedeflenerek yeni bir kolorektal kanser modeli oluşturulmuştur (Şekil 2.6). 507 numarası verilen fare hattındaki farelerde 18. kromozomda bulunan *Apc* geninde 16. ekzonun 750-752. kodonları arasında 8 nükleotidlik delesyon oluşturulmuştur. Delesyona bağlı oluşan çerçeve kayma mutasyonu, 758. kodonun stop kodonuna dönüşmesine neden olmuştur. Sonuç olarak, bu farelerde üretilen *Apc* proteininin yaklaşık 2000 amino asitlik bölümü kaybolmaktadır. Fare soyları devam ettirilken, üretilen farelerin *Apc* mutant Min farelerine göre daha az polip oluşturdukları ve daha uzun süre yaşadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 2.7). Yapılan literatür çalışmaları sonucunda FVB/N *Apc*^{Δ750} fareleri C57BL/6J kökenli fareler ile geri çaprazlanarak çalışmalara devam edilmiştir. Geri çaprazlama sonucunda oluşan farelerin polipleri histopatolojik olarak incelendiğinde adenom morfolojisine sahip oldukları görülmüştür (Şekil 2.8).



Şekil 2.7. Fare soylarına göre polip sayıları (75).



Şekil 2.8. B6 ve FVB- *Apc*^{Δ750} farelerin çaprazlanmasından elde edilen bağırsak (A) ve proksimal kolon polipleri (B). Polibe ait hematoksilin ve eozin boyaması (C) ve immünohistokimyasal β-catenin boyaması (D) (75). Ölçek: 60 µm.

2.10. Hedeflerimiz

Bu tez çalışması kapsamındaki amacımız öncelikli olarak *Apc*^{Δ750} farelerimizin ince bağırsak hücrelerinden KRK öncülü olabilecek intestinal organoidler elde etmektir. Oluşturacağımız *Apc* +/- intestinal organoidlere uygulanacak olan Wnt yolağı inhibitörlerinin kolonik adenomlardaki kök hücre dinamikleri üzerine etkileri araştırılacaktır. Özellikle Wnt inhibitörlerine maruz kalacak olan organoidlerin gelişimsel özellikleri ve kript tabanlarında yer alan İKH'lerdeki *Lgr5* ifadenmelerinin yanı sıra Wnt sinyal yolağının negatif düzenleyicilerinden *Axin2* ve *Ctnnb1* gen ifadeleri analiz edilecektir. Bu sayede özellikle sporadik kolon tümörlerinin tedavisinde kullanılabilir potansiyel Wnt inhibitörü saptanabilmesi için potansiyel bir tarama sistemi oluşturulabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Organoid Kültürü

Organoid kültürünün başlatılması için TÜBİTAK 1001 Projesi kapsamında (Proje No: 120S967) araştırmacıların diseke ettiği C57BL/6 soyuna ait 507 hattından *Apc +/-* mutant 30 günlük erkek farelerin ince bağırsakları kullanılmıştır. Farelerin ince bağırsak bölümleri mideden itibaren çekuma kadar diseke edilmiştir. Organoid kültürü aşamaları için satın alınan *Intesticult Organoid* Büyütme Medyası (Stem Cell Technologies, Kat. No. 06005) protokollerine bağlı kalınmış olmakla birlikte bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Toplanan ince bağırsak örnekleri soğuk *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (D-PBS; Biowest, Kat. No. L0615-500) içerisine alınarak uzunlamasına açılmış ve temizlenmiştir. Bu işlem tüm bağırsak dışı vb. içeriklerden arınana kadar devam ettirilmiştir. Temizlenen ince bağırsak hücre kültürü kabine alınarak soğuk D-PBS içeren 50 ml falkon tüp üstünde 2 mm'lik parçalar halinde kesilmiştir. Tüp içindeki bağırsak parçaları serolojik pipet yardımı ile pipetajlanarak temizlenmiştir. Temizleme aşamasında pipetajlanan örneklerin yerçekimi ile pellet oluşturması 30 sn beklenip, süpernatant kısmı aspire edilmiş ve üstüne soğuk D-PBS ilave edilmiştir. Bu işleme yaklaşık 15-20 defa, süpernatant kısmı saydam bir görüntü alana kadar devam edilmiştir. Oluşan pellete oda sıcaklığında 25 ml *Gentle Dissociation Reagent* (Stem Cell Technologies, Kat. No. 100-0485) ilave edilerek süspansiyon edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında orbital karıştırıcı üzerinde 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda dokuların 30 sn boyunca yerçekimi ile çökmesi beklenmektedir. Süpernatant aspire edildikten sonra dokular 10 ml %0,1 Sığır Serum Albümini (BSA; Biowest, Kat. No. P6154) içeren soğuk D-PBS ile süspansiyon edilmiştir. 3 defa pipetlendikten sonra dokular 70 µm filtre yerleştirilen 50 ml falkon tüpe aktarılır. Bu işlem 4 defa gerçekleştirilerek izolasyon için 4 farklı fraksiyon oluşturulmuştur. Örnekler +4 °C'de 290 g'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 380R). Süpernatant aspire edildikten sonra, pellet kısmı 10 ml %0,1 BSA içeren soğuk D-PBS ile tekrar süspansiyon edilmiştir. Süspansiyonlar temiz 50 ml falkonlara aktarılmış ve +4 °C 200 g'de 3 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra istenen hücreler pellet kısmında yer almıştır. Her fraksiyon

ayrı ayrı 10 ml soğuk DMEM/F12 (Biowest, Kat. No. L0092-500) içerisinde süspansiyon edilmiştir. Her örnekten 1 ml alınarak 6 kuyucuklu plakada ayrı ayrı koyularak ters ışık mikroskobu (Leica, DM IL LED) altında kriptler izlenmiştir. İçerdiği kriptlerin kalitesine göre fraksiyon 3 kullanıma daha uygun görülmüş ve organoid kültürü başlatılmıştır. Kript sayımı hemasitometre ile yapılmıştır. Kuyucuk başına 1500 hücre olacak şekilde hacimler ayarlanmıştır. İstenilen hacimde alınan süspansiyon, +4 °C 200 g'de 5 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant aspire edildikten sonra, pellete 100 µl *Intesticult Complete Organoid Medium* eklenerek süspansiyon edilmiştir. Medya ile aynı hacimde matrijel (Corning, Kat. No. 356234) eklenmiş ve önceden 37 °C'de ısıtılmış 48 kuyucuklu plakanın her kuyusuna 25 µl süspansiyon eklenmiştir. Plaka, 37 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra, kuyu başına 250 µl organoid medyası eklenmiştir. Her kullanımdan önce organoid medyası içeriğine 50 mg/ml Gentamisin Sülfat (Biowest, Kat. No. L0012-100) ve 1:10 oranında Amfoterisin B (Biowest, Kat. No. L0009-100) eklenmiştir. Plakadaki boş kalan kuyulara D-PBS ilave edilmiştir. Organoid kültürleri 37 °C ve %5 CO₂ inkübatörde (Nüve, Kat. No. EC160) muhafaza edilmiştir. Kültür medyaları 2-3 gün aralıklarla değiştirilmiş olup, pasajlamaları 1:4 olacak şekilde 10-14 gün aralığında yapılmıştır.

3.2. İlaç Muamelesi

Test edilmek üzere XAV939 (Cayman, Kat. No. 13596) ve Niklozomit (Cayman, Kat. No. 10649) kullanılmıştır. XAV939 için 500 µM'lık ana stok hazırlanarak -80 °C'de saklanmıştır. Kullanımdan hemen önce XAV939 besiyeri içerisinde 5 µM ve 10 µM olacak şekilde seyreltilerek organoidler muamele edilmiştir. Niklozomit, 50 µM'lık ana stoklar halinde -80 °C'de saklanmıştır. Yine kullanımdan hemen önce besiyeri içerisinde 0.5 µM ve 1 µM olacak şekilde hazırlanarak ortama eklenmiştir. Her iki ilaç da Dimetil Sülfoksit (DMSO; Pancreac Applicchem, Kat. No. A3672) içerisinde çözülmüş olup, kontrol grubunda ise yalnızca DMSO uygulanmıştır. İlaç uygulamaları, organoid kültürünün 2-3. Günlerinde organoid yoğunluğuna bağlı olarak uygulanmıştır. Her iki ilaç için de inkübasyon süreleri 48 saat olarak belirlenmiştir.

3.3. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için 48 kuyucuklu plakanın konfluan 2 veya 3 kuyusu kullanılmıştır. Eski medya aspire edildikten sonra kuyu başına 100 µl Trizol (Invitrogen, Kat. No. 15596-018) eklenmiştir. Matrijel 1000'lik pipet ucu yardımı ile parçalanmış ve oluşan süspansiyon 1.5 ml eppendorf tüpe aktarılmıştır. Toplam Trizol miktarı ile eşit olacak şekilde izopropanol (Merck, Kat. No. 09634) süspansiyona eklenmiştir. İzopropanol hacminin 1:10'u kadar 3M sodyum asetat (pH 5.5) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Örnekler +4 °C 12.000 g'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet, 1:1 olacak şekilde %75 etanol eklenerek tekrar süspanse edilmiştir. Örnek yaklaşık 10 sn vortekslenildikten sonra +4 °C 7500 g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin 5-10 dk hava akımı ile kuruması sağlanmıştır. Örnek, istenilen konsantrasyona göre 20-50 µl RNazsız su ile çözdürülmüş ve 55 °C su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir. Daha saf bir RNA elde edebilmek için, Qiagen RNA İzolasyon Kit'i (Qiagen, Kat. No. 74004) ile temizleme işlemi uygulanmıştır. İzole edilen RNA üzerine RNazsız su eklenerek hacim 100 µl olarak ayarlanmıştır. 350 µl RLT tampon çözeltisi eklenip karıştırıldıktan sonra 250 µl %100 etanol eklenerek örnek karıştırılmıştır. Örnek, kit içeriğinde temin edilen 2 ml toplama tüpüne aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı dökülerek uzaklaştırılmıştır. Aynı filtre üzerine 500 µl RPE tampon çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Toplanan süpernatant döküldükten sonra 500 µl RPE tampon çözeltisi filtreye eklenmiş ve oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Kullanılan filtre kısmı yeni bir 2 ml tüpe aktarılmış ve 15.000 rpm'de 1 dk boş olarak santrifüjlenmiştir. Filtre kısmı, yeni bir 1.5 ml eppendorf tüpe yerleştirildikten sonra üzerine 30-50 µl RNazsız su eklenmiştir. Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 1 dk santrifüjlendikten sonra istenilen örnek tüpte yer almıştır. RNA miktarı spektrofotometre (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher) ile ölçülmüştür.

3.4. Komplementer DNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Kat. No. 4368814) ile yapılmıştır. Reaksiyon başına 20 µl olacak şekilde, 1X *master* karışımı için kit protokolüne bağlı kalınmıştır. Kit protokolünden farklı olarak *master* karışım içerisinde su yerine bu hacim de RNA ile tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler ısı döngüleyici cihazda (MyGene L Series Peltier, Thermal Cyclers, LongGene) çoğaltıldı.

Tablo 3.1. 2X Ters Transkriptaz İçeriği

Malzemeler	1X (µl)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Karışımı (100 mM)	0.8
10X RT Random Primer	2
MultiScribe™ Ters Transkriptaz	1
RNaz İnhibitörü	0
Nükleazsız H ₂ O	0
cDNA	4.2
Toplam	10

Tablo 3.2. cDNA PCR Döngüsü

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	
Denatürasyon	95	2 dk	35 döngü içermektedir.
	95	30 sn	
Bağlanma	59	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
	72	5 dk	
Saklama	4	∞	

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi

Sentezlenen cDNA örneklerinin miktar ve kalite tayini için 507 mutant hattına ait primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) reaksiyonu kurulmuştur. 1X PCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve hacimler Tablo 3 'te yer almaktadır. Amplikonlar, %1 oranında hazırlanan agaroz jel ile 60 dk boyunca 100 voltta yürütülmüştür. Sentezlenen cDNA örneklerinin miktar ve kalite tayini için 507 mutant hattına ait primerler ile PCR reaksiyonu kurulmuştur. 1X PCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve hacimler Tablo 4'te yer almaktadır. Amplifiye olmuş DNA örnekleri, %1 oranında hazırlanan agaroz (Biomax, Kat. No. 104514R) jel ile 60 dk boyunca 100 V'ta yürütülmüştür. 1 kb DNA marker (Thermo Scientific, Kat. No. 10787018) ilk kuyucuklara yüklenmiştir. Agaroz jel görüntülemesi FluorChem (Protein Simple, F3, 2011) yazılımı ile sağlanmıştır.

Tablo 3.3. 1X PCR İçeriği

Malzemeler	1X (µl)
ddH ₂ O	17.25
10X Dream PCR Buffer	2.5
<i>Apc</i> Forward	0.5
<i>Apc</i> Reverse	1
<i>Apc</i> Mutant Forward	2
10 mM dNTP	0.5
Dream Taq Polimeraz	0.25
DNA	1
Toplam	25

Tablo 3.4. PCR reaksiyonlarında kullanılan primer sekansları

507 Hattı Primerleri	Sekanslar (5'-3')
<i>Apc</i> Forward	CAGCAGCTTTAAGGAATCTCA
<i>Apc</i> Reverse	TCTGACCTACTATCATCATGTCTG
<i>Apc</i> Mutant Forward	GTCTGCCATCCCAGGAAA

Tablo 3.5. PCR Döngüsü

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	
Denatürasyon	95	2 dk	38 döngü içermektedir.
	95	45 sn	
Bağlanma	56	45 sn	
Uzama	72	1 dk	
	72	5 dk	
Saklama	4	∞	

3.6. İmmüno Floresan Boyama

Organoid gelişiminin 5-7. Günleri arasında β -catenin, dapi ve phalloidin ile immüno floresan boyamaları yapılmıştır. Eski medya aspire edildikten sonra kültür 1X *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) ile yıkanmıştır. 1X PBS ile hazırlanan %4 Paraformaldehit (PFA)'ten (Aldrich Chemistry, Kat. No. 16005) 100 μ l örneklere eklenerek oda sıcaklığında 30 dk fikse olmaları sağlanmıştır. İnkübasyonun sonunda 1X PBS ile 3 defa örnekler yıkanmış ve 1X PBS içerisinde hazırlanan %1,5 Triton-X (Merck, Kat. No. 08603) eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Fiksasyon için örnekler tekrar %4 PFA ile oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. %2 keçi serumu (CST, 5425) ve %0,1 Tween-20 (Merck, Kat. No. 22184) içeren PBS solüsyonu bloklama için kullanılmıştır. Bloklama solüsyonunun eklendiği örnekler oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Primer antikor için 1:500 dilue edilen β -catenin (Thermo Fisher Scientific, Kat. No. RB-9035-PO) ile örnekler +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. *Phosphate-Buffered Saline-Tween20* (PBS-T) ile 3 defa yıkanan

örneklere +4 °C'de 4 saat boyunca sekonder antikor 1:1000 (Abcam, Kat. No. Ab150115) uygulanmıştır. Hücre iskeleti boyaması için sekonder antikor inkübasyonunun son 30 dk'sında 1X Phalloidin (Abcam / ab176757- CytoPainter Phalloidin-iFluor 594 Reagent) kültüre eklenmiştir. Örnekler PBS-T ile üçer defa yıkanmıştır. Çekirdek boyaması için 1X DAPI (Sigma, Kat. No. D8417) eklenerek oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. PBS-T ile üçer defa yıkanan örnekler temiz PBS-T eklenerek floresan mikroskop (Olympus IX73) altında görüntülenmişlerdir.

3.7. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

5 µM XAV939, 10 µM XAV939, DMSO ve kontrol gruplarından elde edilen cDNA örnekleri, kantitatif PCR (qPCR) *master* karışımı (Thermo Scientific, Kat. No. K0373) kullanılarak analiz edilmiştir. Reaksiyonlarda kullanılan cDNA örnekleri nükleazsız su ile 20X seyreltilerek kullanılmış olup, konsantrasyonların reaksiyon başına 200 ng/µl'yi aşmamasına dikkat edilmiştir. Tüm örnekler ile üçlü tekrarlar olacak şekilde çalışılmıştır. Reaksiyon içeriği ve siklus sıcaklıkları Tablo 3.6 ve Tablo 3.7'de verilmiştir. Bu çalışma da *Axin2*, *Lgr5*, *Cttnb1*, *Actb* genlerinin ifadelerine bakılmış olup, kullanılan primerlerin bilgileri Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.6. qPCR Döngüsü

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus Sayısı
dUTP Erimesi	50	2 dk	1
Denatürasyon	95	10 dk	1
Amplifikasyon Eğrisi	95	15 sn	40
	60	30 sn	
	72	30 sn	
Erime Eğrisi	95	15 sn	1
	60	30 sn	
	95	30 sn	

Tablo 3.7. qPCR içeriği

Malzemeler	1X (µl)
Master Mix	10
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
dH2O	3
cDNA	5
Toplam	20

Tablo 3.8. qPCR reaksiyonlarında kullanılan primer sekansları

Primerler	Sekanslar (5'-3')
<i>Ctnnb1</i> Forward	AATGGCTTGAATGAGACTG
<i>Ctnnb1</i> Reverse	ACCAGAGTGAAAAGAACGGTAG
<i>Lgr5</i> Forward	GGAATAAAGACGACGGCAAC
<i>Lgr5</i> Reverse	GGATCAGCCAGCTACCAAA
<i>Axin2</i> Forward	GAGGATGCTGAAGGCTCAAA
<i>Axin2</i> Reverse	GCAGGCAAATTCGTCACTC
<i>Actb</i> Forward	AGCCATGTACGTAGCCATCC
<i>Actb</i> Reverse	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

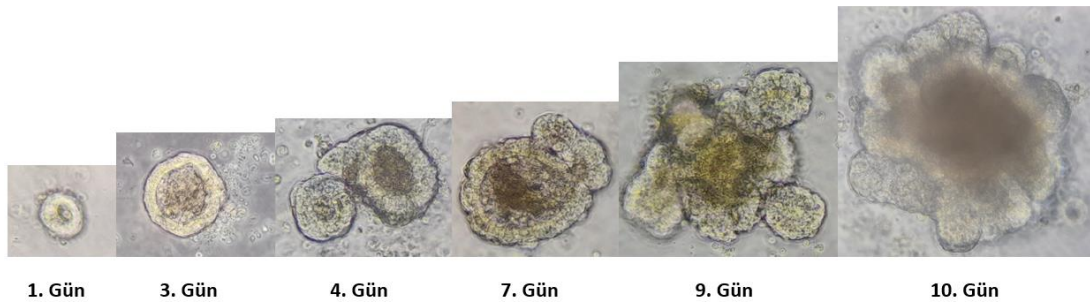
3.8. İstatistiksel Analiz

Deneyler tek biyolojik çalışma şeklinde yürütüldüğü için istatistiksel analiz yapılmamıştır. qPCR ortalama ve standart sapma değerleri Microsoft Office Excel ile hesaplanmış olup grafik çizimleri Graphpad Prism 9.4.1 ile yapılmıştır.

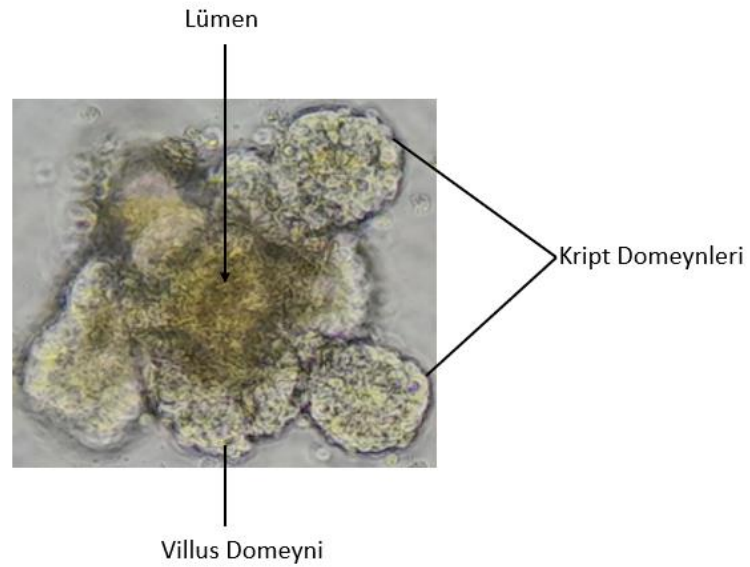
4. BULGULAR

4.1. *Apc +/-* Mutant Organoidlerin Gelişimi

Organoid kültürünün başlatılması için TÜBİTAK 1001 Projesi kapsamında (Proje No: 120S967) araştırmacıların diseke ettiği C57BL/6 soyuna ait 507 hattından *Apc +/-* mutant 30 günlük farelerin ince bağırsakları kullanılmıştır. Organoid büyüme medyası içeriğine satın alınan destekleyici 1 ve 2 maddeleri eklenerek, intestinal kriptlerin büyümesi için gerekli olan niş faktörleri sağlanmıştır. Bu faktörler ilk olarak literatürde Toshiro Sato ve Hans Clevers tarafından tanımlanan molekülleri kapsamaktadır. Fare intestinal kriptlerinden oluşturulacak organoid kültür ortamı için N2, B27, N-asetilsistein, EGF, Noggin ve R-spondin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır(28,31). Bu faktörleri içeren kültür ortamındaki organoid oluşumu ve gelişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre kültürün 10. Gününe gelindiğinde İKH'lerin proliferasyon yeteneklerinin azalması ile birlikte farklılaşmanın artması sonucu tam bir kript yapısı elde edilmektedir. Ayrıca ilk 48 saat içerisinde gelişmekte olan organoid sayısı 95 civarında iken kültürün 10-14. Günlerinde bu sayısı farklılaşmaya bağlı gerçekleşen hücre ölümleriyle birlikte yaklaşık 25'e kadar gerilemiştir. 10. Günde tam bir gelişim gösteren organoidin bölümleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Apc +/-* mutant fare hücrelerinden üretilen intestinal organoidin 10 günlük gelişim periyodu.

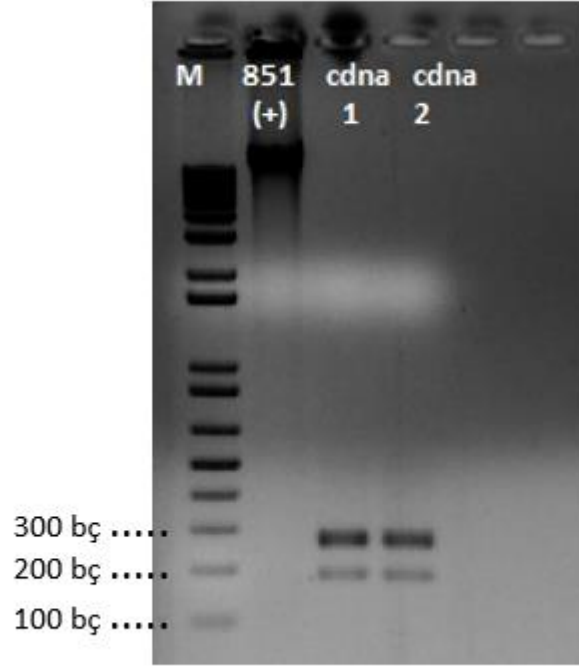


Şekil 4.2. *Apc* +/- bir intestinal organoidin bölümlerinin gösterimi.

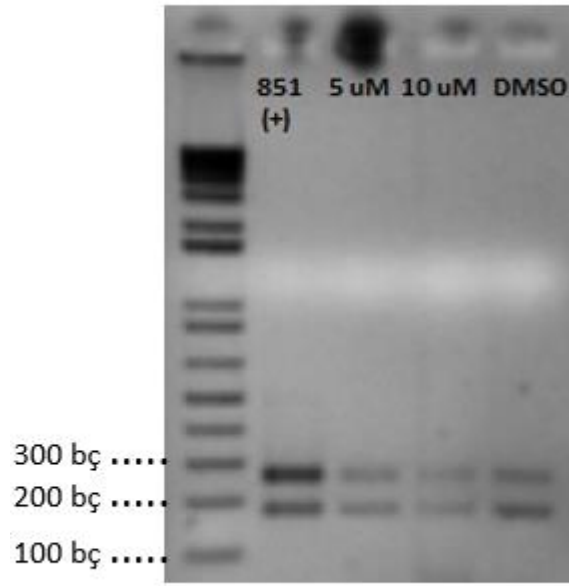
4.2. *Apc* +/- İntestinal Organoidlerin Genotiplerinin Doğrulanması

Organoidler *Apc* mutant farelerden oluşturulduğu için kontrol grubu olarak bu organoidlerde ilk olarak *Apc* geni mutasyonuna bakılmıştır. Bu amaç doğrultusunda organoid gelişiminin 5. Gününde RNA izolasyonu yapılmıştır. Sonraki aşamalarda devam edilen qPCR ile gen ifadenmesi analizlerinde kontrol grubu olarak kullanılacağı için cDNA seviyesinde genotiplendirme yapılmıştır. RNA izolasyonunu takip eden aşamada cDNA sentezlenmiştir. Örnekler 507 hattı mutasyonlarını tanıyan primerler ile amplifiye edildikten sonra agaroz jel elektroforezi ile kalite ve miktar açısından incelenmiştir. 851 numaralı DNA örneği, pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Bu DNA örneğinin *Apc* +/- olduğu önceki çalışmalarda ispatlanmıştır. Amplifiye edilen cDNA örneklerinin jel görüntülerinde yabancı tip bantlar 268 baz çiftinde (bç), mutasyon bandı ise 185 bç'inde görülmektedir (Şekil 4.3). Bu sonuca göre oluşturulan organoidler *Apc* mutasyonu taşımaktadır ve qPCR analizlerinde kullanılabilmiştir. İlaça maruz kalan grupların RNA izolasyonları ilaç eklendikten 48 saat sonra yapılmış olup, sentezlenen cDNA örneklerinin *Apc* +/- açısından analizi Şekil 4.4 ve Şekil 4.5' te sunulmuştur. Bu sonuçlara sentezlenen tüm cDNA örnekleri *Apc* gen mutasyonunu taşımaktadır, böylece gen ifadenmesi çalışmaları bu örnekler

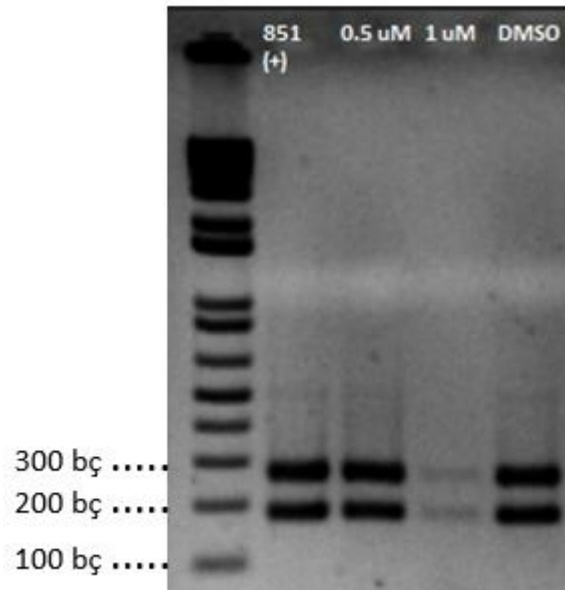
ile yürütülebilir sonucuna varılmıştır. XAV939 ve Niklozamid ile muamele edilen gruplardan elde edilen cDNA örnekleri ilk olarak *Apc* +/- mutasyon kontrolü için incelenmiştir. Şekil 4.4 ve 4.5' de görülen mutasyon bantlarının ilaç alan gruplarda yoğunluklarının azalması, kript ve villusları oluşturan *Apc* +/- hücrelerdeki azalmayı da bir açıdan göstermektedir.



Şekil 4.3. Kontrol gruplarından izole edilen cDNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (851: Pozitif Kontrol). 'M' yazan sütunda 1 kilobaz (Kb) DNA marker kullanılmıştır.



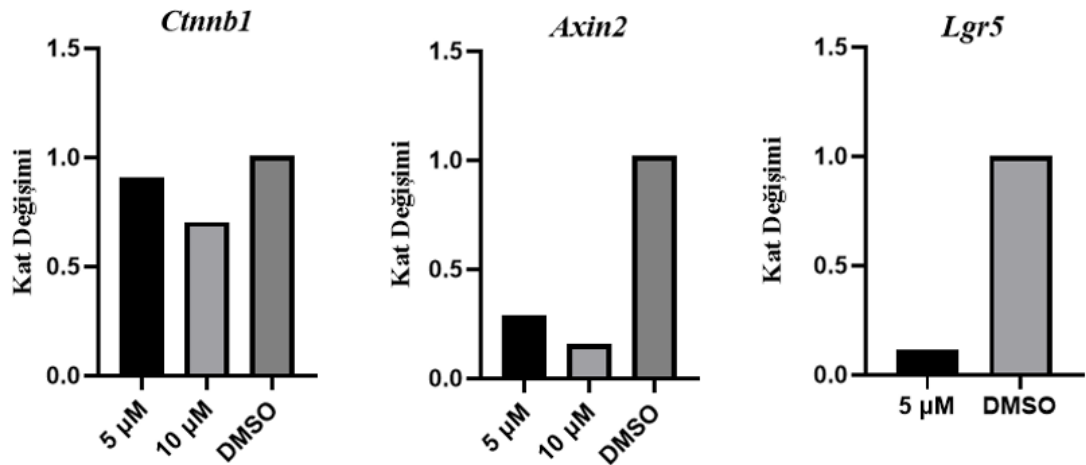
Şekil 4.4. XAV939 uygulanan (5 μ M ve 10 μ M) ve ilaç uygulanmayan gruplardan (DMSO) 48 saatlik inkübasyonun sonunda sentezlenen cDNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (851: Pozitif Kontrol). 1 Kb DNA marker kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Niklozamid uygulanan (0.5 μ M ve 1 μ M) ve ilaç uygulanmayan gruplardan (DMSO) 48 saatlik inkübasyonun sonunda sentezlenen cDNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (851: Pozitif Kontrol). 1 Kb DNA marker kullanılmıştır.

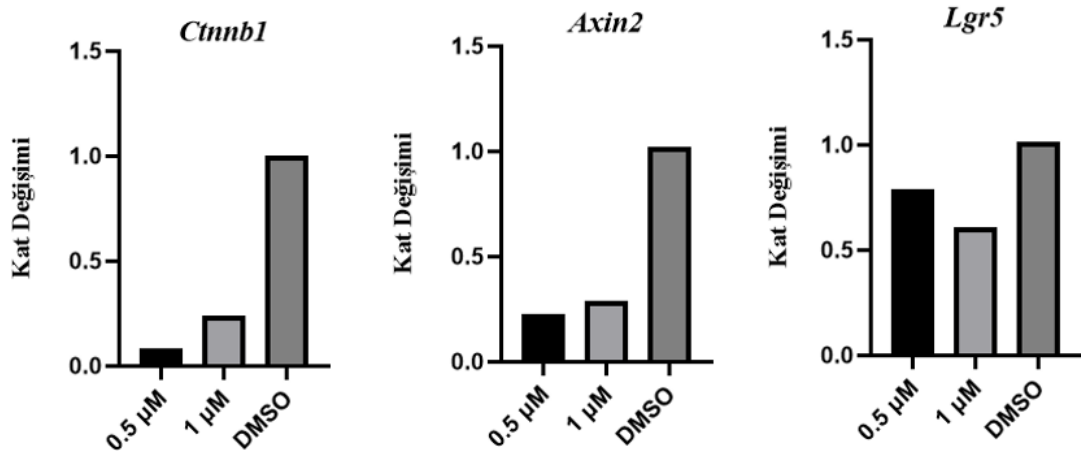
4.3. Wnt İlişkili Genlerin İfadelerinin qPCR ile İncelenmesi

Apc +/- kontrol grubu, XAV939, Niklozamid ve ilaç kontrolü olarak DMSO uygulanan intestinal organoidler Wnt yolağı hedef genleri olan *Ctnnb1*, *Axin2* ve *Lgr5* ifadelenmeleri açısından qPCR ile incelenmiştir. Analiz edilen örnek sonuçları Beta-actin (*Actb*) ile normalize edilmiştir. DMSO grubuna göre kıyaslanan ilaç uygulama gruplarının kat değişimleri $2^{\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanmıştır. Böylece hedef genlerin ifadeleri relatif olarak incelenmiştir. Metod uygulanırken ilaç alan gruplar kontrolleri olan DMSO grupları ile normalize edilmiştir. Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan *Apc* +/- mutant organoidler hesaplamalara dahil edilmemiştir. Çünkü bu grupların *Actb* değerleri DMSO gruplarına göre çok fazla değiştiği için aralarındaki fark ayırt edilememiştir. Tüm gruplara ait ortalama Ct ve standart sapma değerleri tablolar halinde Ek-5'te sunulmuştur. Elde edilen amplifikasyon eğrileri ise tüm gruplar için Ek-4'te yer almaktadır. Sonuçlar tek deneyden elde edildiği için istatistiksel analiz yapılmamış olup, ifadelenme düzeyleri kat farkları şeklinde grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.6-4.7). *Ctnnb1* geni ifade düzeyinin XAV939 alan gruplarda DMSO gruplarına göre daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4.6). Ayrıca 10 µM XAV939 uygulanan grubun *Ctnnb1* ifadelenmesi, 5 µM XAV939 uygulanan gruptan daha az olduğu kat değişiminden anlaşılmıştır. *Axin2* geni XAV939 ile muamele edilen gruplarda DMSO grubuna göre daha az ifade edilmiştir. Ayrıca 5 µM ve 10 µM XAV939 alan grupların *Axin2* ifadesi, DMSO grubuyla kıyaslandığında 10 µM XAV939 grubundaki azalışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçla da paralel olarak *Lgr5* ifadelenmesi de XAV939 ilacını alan gruplarda belirgin bir şekilde azalmıştır. Özellikle qPCR analizlerinde 10 µM ilaç alan örnekler ile deney 3 defa tekrarlanmasına rağmen Ct değeri alınamamıştır. Bu nedenle grafiksel gösterim sırasında 10 µM grubu dahil edilmemiştir. 5 µM grubundaki azalış da göz önünde bulundurulduğunda, ilacın 10 µM grubunda *Lgr5* ifadelenmesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6. 48 saatlik XAV939 muamelesi sonrası *Ctnnb1*, *Axin2* ve *Lgr5* ifadenme seviyeleri. Kat değişimleri DMSO grubuna göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar tek ilaç uygulaması deneyinden elde edilmiştir.

Apc +/- mutant organoidlere 48 saat boyunca 0.5 µM, 1 µM ve kontrol gruplarında ise DMSO uygulanmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmiştir. cDNA örnekleri ile *Ctnnb1*, *Axin2* ve ifadenmeleri açısından mRNA düzeyinde incelendi. Relatif ifadenme düzeyleri hesaplanırken değerler *Actb*'ye göre normalize edilmiştir. *Lgr5* ifadesinin Niklozamid uygulanan gruplarda daha fazla ifadelendiği fakat DMSO grubuna göre ise daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4.7). 1 µM ilaç uygulanan grupla kıyaslandığında ise 0.5 µM ilaç alan gruptaki *Lgr5* ifadesi daha fazladır. Bu sonuca göre 1 µM ilaç konsantrasyonunun İKH aktivasyonunu belirli bir düzeyde inhibe ederken sağlıklı kolon kriptlerine de tamamen zarar vermediği sonucuna varılabilmektedir. En düşük *Axin2* seviyesi 0.5 µM Niklozamid uygulanan grupta saptanmış olup; DMSO grubu ile kıyaslandığında Niklozamid uygulanan tüm gruplardaki *Axin2* ifadeleri daha düşük seyretmektedir.



Şekil 4.7. 48 saatlik Niklozamid muamelesi sonrası *Ctnnb1*, *Axin2* ve *Lgr5* ifadenme seviyeleri. Kat değişimleri DMSO grubuna göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar tek ilaç uygulaması deneyinden elde edilmiştir.

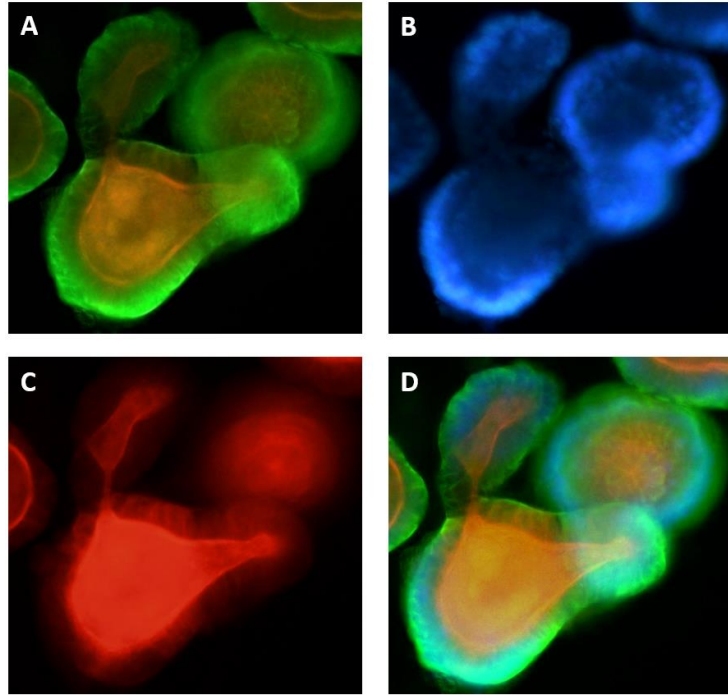
Ctnnb1 ifadesi ise en düşük 0.5 µM ilaç alan grupta iken en yüksek ifadesi DMSO grubunda görülmüştür. DMSO kontrol grubu ile 0.5 µM ve 1 µM Niklozamid uygulanan grupların *Ctnnb1* ifadeleri karşılaştırıldığında ifadenin Niklozamid uygulanan gruplarda azaldığı görülmüştür. RNA düzeyinde yapılan bu analize göre 0.5 ve 1 µM konsantrasyonlarında uygulanan Niklozamid, sağlıklı kriplere tamamen zarar vermemekle birlikte hiperaktif Wnt sinyal yolağının hedef genlerinin ifadenmelerini azaltmakta faydalı olmuştur.

4.4. β-catenin İfadesinin İmmünofloresan Boyama ile İncelenmesi

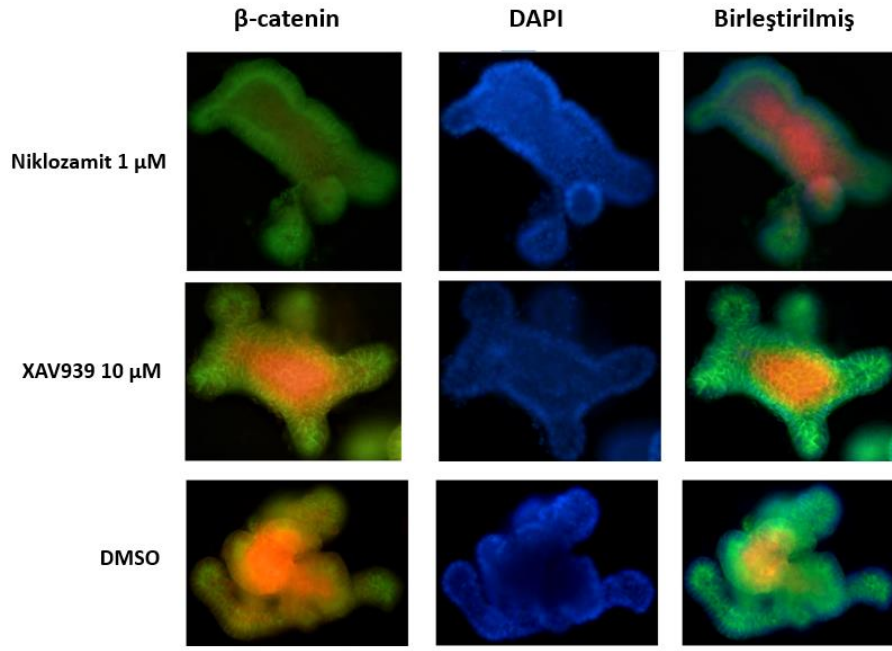
Çalışmada hedeflenen Wnt ilişkili genlerden biri olan β-catenin ifadenmesi immünofloresan boyama uygulanarak incelenmiştir. İmmünofloresan boyamalarda çekirdek boyaması için DAPI, hücre iskeleti için Phalloidin ve hedef genlerden β-catenin kullanılmıştır (Şekil 4.8). Kontrol grubu sonuçlarına göre kript tabanları ve gelişmekte olan villus domeynlerinde tüm boyama paternlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Organoidlerin lümen kısımlarına odaklanıldığında ise ölü hücrelerin birikimine bağlı olarak tüm belirteçler için ifadenmelerin diğer bölümlere göre azaldığı görülmektedir. Ayrıca kript tabanlarında artan İKH proliferasyonu ile ilgili olarak β-catenin ifadenmesi en yüksek bu alanlarda gözlenmektedir (Şekil 4.8A).

İlaç uygulanan gruplardan β-catenin ifadesini en fazla azaltan konsantrasyonlar qPCR ile doğrulandıktan sonra bu örnekler için de 1:500 dilüsyonda

β -catenin immü floresan boyaması uygulanmıştır. Şekil 4.9'da 10 μ M XAV939, 1 μ M Niklozamid ve DMSO uygulanan organoidlerin boyama paternleri gösterilmiştir. Organoidlerin kript tabanlarında, villus domeynlerinde ve lümenlerinde tüm boyama paternleri saptanabilmıştır. Ölü hücre yoğunluğuyla ilgili olarak Phalloidin ifadelenmesi lümen kısımlarda daha yoğun olarak gözlenmiştir. β -catenin ifadelenmesinin en yoğun olduğu bölgeler tüm gruplar için kript bölgeleri olmuştur. RNA seviyesinde her iki ilaç için de azalan β -catenin ifadelenmeleri ve birleştirilmiş görüntüleri DMSO grubu ile kıyaslandığında belirgin bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 4.8. İmmü floresan boyama ile kript ve villus yapılarındaki çekirdek, hücre iskeleti ve β -catenin ifadelerinin gösterimi. A. β -catenin boyaması; B. DAPI ile çekirdek boyaması; C. Phalloidin ile hücre iskeleti boyaması; D. Birleştirilmiş boyamaları göstermektedir (Ölçek: 100 μ m).



şekil 4.9. 1 μ M Niklozomit, 10 μ M XAV939 ve kontrol DMSO gruplarının immünfloresan görüntüleri. (Ölçek: 50 μ m).

5. TARTIŞMA

Uzun yıllar boyunca iki boyutlu hücre kültürleri kullanılarak KRK gelişimini etkileyen moleküller ve sinyal yolları çalışılmıştır. Fakat hücre kültürlerinin en önemli dezavantajlarından bir tanesi tümörlerin veya dokuların karmaşıklığını yansıtamaması olmuştur. Bu bağlamda bakıldığında *Lgr5* ifade eden İKH'lerin saptanması ve fare intestinal organoidlerinin oluşturulması KRK gelişiminin *in vitro* fonksiyonel çalışmaları açısından önemli bir buluş değeri taşımaktadır (78–80).

İntestinal organoidler 3 ana kategoriye sahiptir: İKH-kökenli epitelyal organoidler, PKH-kökenli multisellüler organoidler ve doku kökenli multisellüler organoidlerdir (81,82). Bu tez kapsamında üretilen organoidler, İKH'lerden köken alarak gelişmiş epitelyal organoidlerdir. İKH-kökenli intestinal organoidlerin en temel özellikleri tomurcuklanma göstermeleri ve sferikal yapılar oluşturmalarıdır. Aynı zamanda enteroid veya kolonoid olarak da literatürde adlandırılmışlardır (81). İntestinal epitel hücrelerden köken aldıkları için izole edildikleri bölgenin kimliğini, farklılaşma döngüsünü, gene ifadenmelerini, epigenetik özelliklerini, mikroRNA ekspresyonunu, fizyolojik ve patofizyolojik tüm özelliklerini 3B kültüre yansıtabilmektedirler (83–87). Bu özelliklerinden dolayı, intestinal hastalıkların moleküler mekanizmaları ve mikroçevre ilişkilerinin araştırılabilmesi için olanak sağlamaktadırlar. Fakat stromal komponentleri mikroçevreye sağlayamadıkları için, organoidlerin büyümesi için gerekli olan ligandların ve büyüme faktörlerinin dışarıdan kültür ortamına ilave edilmesi gerekmektedir (82,88). Bu sebeple çalışmada intestinal organoid kültür besiyeri ticari olarak hazırlanan intestinal büyüme medyası olarak seçilmiştir. Böylece hücrelerin gelişim ve farklılaşması için gerek duydukları niş faktörlerinden N2, B27, N-asetilsistein, EGF, Noggin ve R-spondin sağlanabilmiştir.

Klasik KRK gelişimi adenomların karsinoma dönüşümü *APC* tümör baskılayıcı genindeki mutasyonların yanı sıra *KRAS*, *TP53* ve *SMAD4* genlerindeki mutasyonlar ile ilerlemektedir. Bu yolak farelere yansıtıldığı zaman, yapılan çalışmalarda farelerde yaklaşık %40 penetransa sahip spontan metastatik tümörlerin oluştuğu görülmüştür (78,89–91). Organoid teknolojisinin gelişmesiyle birlikte tümör organoidlerinin karaciğer veya kolona ortotopik transplantasyonu ile ileri seviye KRK

araştırmalarını birçok yönden değerlendirebilecek hızlı ve güvenilir bir araç olmuştur (78,89,91–96). Kanseri gelişimine sebep olan gen mutasyonları araştırmak için sıklıkla başvurulan tekniklerden birisi genetiği değiştirilmiş fare modelleri olmasına karşın, üretimi uzun zaman almakta ve fare soylarının devamlılığı için kansere yatkınlığı olan fare ile çaprazlanarak mutant soy devamlılığı sağlanması gerekmektedir (rneğin, *Apc* +/- fare) (97–102).

Çalışmada kullanılan *Apc*^{A750} fare ırkı 2018 yılında laboratuvarımızda üretilmiştir. Fakat yapılan araştırmalarda da değinildiği gibi fare soylarının devamlılığını sağlamak için gereken uzun sreler ve etik kurallara göre belirlenen deney hayvanı kullanım sayıları göz önünde bulunduğuğunda ilaç denemesi yapılacak olan bir çalışmada organoid teknolojisinden faydalanmak daha avantajlı olmuştur. İntestinal organoid üretimi sayesinde çalışmada kullanılan fare sayısı azalırken aynı zamanda doku karmaşıklığını büyük lde yansıtabilen bir sistem ile de çalışma ortamı hedeflenmiştir.

Kanseri Genom Atlası'nın son araştırmalarına göre KRK'lerin %93'nde WNT sinyal yolağına bağlı genetik değişimler saptanmıştır. Özellikle *APC* genindeki biallelik inaktivasyon mutasyonları ve *CTNNB1*'i aktive edici mutasyonlar vakaların neredeyse %80'inde görülmüştür (42,103). Bu mutasyonların neden olduğu yoğun B-catenin birikimi sonucunda hedef genlerinin ifadelenmelerinde de anormal artışlar yaşanmaktadır. Wnt sinyal yolağını hedefleyen ilaç çalışmaları uzun yıllardır devam etse de henüz klinik kullanım için onay alan bir ilaç saptanamamıştır (42).

XAV939, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda mutant organoidlere uygulanarak *Lgr5*, *Axin2* ve *Ctnnb1* ifadelenmelerine göre uygun ilaç dozları belirlenmiştir. Uygulamalar sırasında DMSO uygulanan grup ve hiçbir uygulamaya maruz bırakılmayan gruplar kontrol olarak kullanılmıştır. Fakat yapılan çalışmalarda görülmüştür ki FAP asosiyel organoidlerde azalan *Lgr5* ve *Axin2* ifadelerinin yanı sıra sağlıklı kolonik organoid gruplarına da XAV939 uygulandığında *LGR5* ve *AXIN2* ifadelerinin önemli lde azaldığı saptanmıştır. Bu durumda XAV939'un spesifik olarak mutant tümör hücrelerini hedeflemediği, sağlıklı kolon kriptlerine hasar verdiği tartışmaya açık hale gelmiştir (104). Güncel alışmalarda, Wnt/B-catenin sinyal

yolağının kemik, saç, gastrointestinal sistem ve hematopoezdeki kök hücre devamlılığını etkilediği bilindiği için toksik etki araştırmaları tamamlanmadan klinikte kullanımı henüz uygun görülmemiştir (105–108). Bu nedenle XAV939 denemelerinin *Apc*^{Δ750} mutant organoidler ve oluşturulacak yabancı genotipteki organoidlerde karşılaştırmalı olarak çalışılması daha sağlıklı sonuçlar verecektir.

Ahn ve ark. 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada TI-12403 adını verdikleri bir TNKS inhibitörü geliştirmiş ve *APC* mutant insan KRK hücre hattı olan COLO320DM'de denemişlerdir. 10 µM konsantrasyonda 24 saat muamele ettikleri hücrelerdeki *AXIN2* ifadenmesinin anlamlı düzeyde azaldığını saptamışlardır. Deneyler sırasında referans kontrol olarak 10 µM XAV939 ile muamele edilmiş hücreleri kullanılmıştır. XAV939 ile muamele edilen gruplar da DMSO kontrol grubu ile kıyaslandığında *AXIN2* ifadesinin mRNA düzeyinde azaldığı gösterilmiştir (42). 5 µM ve 10 µM XAV939 uygulanan gruplar DMSO grubu ile karşılaştırıldığında *Axin2* ifadenmesinde anlamlı bir azalma görülmüştür ve elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmalarla uyumlu sonuçlar vermiştir.

Bu bilgiler ışığında oluşturulan *Apc* mutant intestinal organoidlere 0.5 ve 1 µM Niklozamid 48 saat boyunca uygulandıktan sonra RNA ve protein düzeyinde analizleri sağlanmıştır. İlaç konsantrasyonlarına karar verilirken referans alınan bilimsel çalışmada da gösterilmiştir ki FAP hastalarından alınan örneklerle oluşturulan tümör sferoidleri ve insan KRK hücre hatlarından SW480 ve DLD1'e 1 µM Niklozamid uygulandığında, kontrol gruplarına göre KKH belirteçlerinde CD44 ve CD166'nın azalmıştır. Bunun yanı sıra 0.5 µM Niklozamid uygulanan hücre hatlarında *Axin2* ifadesinin azaldığı RNA düzeyinde gösterilmiştir (109). Niklozamid uygulanan organoidlerdeki DMSO kontrol grubuna göre azalan *Axin2* ifadenmesi referans alınan çalışma ile de uyumluluk göstermiştir. Böylece laboratuvarımıza özgü olan KRK kanser modeli öncülü organoidlerinde de Niklozamidin anti-kanser etkili bir ilaç olarak aktivite gösterebileceği kanıtlanmıştır.

Yapılan bir araştırmada, Niklozamidin Axin-GSK3 kompleksini direkt olarak parçalayarak kanonikal Wnt sinyal yolağı aktivitesinin azalmasına ve Snail aracılı EMT'nin de kolon kanseri hücrelerinde tersine döndüğü sonucuna varılmıştır. 24 saat

boyunca 0.25 μ M Niklozomit uygulanan KRK hücre hatlarında, nükleer GSK3 protein seviyelerinde artarken; β -catenin ve Snail protein seviyelerinin azaldığı saptanmıştır (58). 0.5 ve 1 μ M Niklozomit uygulanan organoidlerdeki β -catenin ifadenmesi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında saptanılan gen ifadesindeki azalış da literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermiştir.

Kanser kök hücreleri, embriyonik ve doku spesifik kök hücrelerin birçok özelliğini yansıtmakla birlikte, tipik olarak gelişimleri esnasında Notch, Hedgehog ve Wnt sinyal yollarının yüksek aktivasyonu söz konusu olmaktadır. Böylece uzak organlarda kolonize olarak metastatik lezyonlar oluşturabilmektedirler (110–112). 0.2 ve 0.4 μ M Niklozomit uygulanan HCT116 ve HT29 hücre hatlarında Wnt sinyal yolağı aktivitesinin doz bağımlı olarak %74,5 ve %63,3 oranlarında azaldığı TOP/FOP analizi ile gösterilmiştir. Yine aynı hücre hatlarında, KKH belirteçlerinden biri ve aynı zamanda İKH belirteci de olan *LGR5*'in ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Wnt yolağı hedef genlerinden olan *Axin2* ise 0.2 ve 0.4 μ M Niklozomit uygulanan HCT116 hattında ifadesinin azaldığı saptanmıştır. Wnt sinyal yolağı ilişkili *Axin2* ve β -catenin ifadelerinin Niklozomit uygulanan gruplarda azalması, İKH ve aynı zamanda KRK ilişkili KKH'lerin en yaygın belirteçlerinden olan *Lgr5* ifadenmesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda ilaç alan gruplarda *Lgr5*'in kontrol grubuna göre daha az ifade edildiği sonucuna varılmış ve elde edilen bu sonuç güncel araştırmalarla da örtüşmüştür. Fakat bu çalışmalar esnasında görülmüştür ki uygulama yapılmayan organoidler ve DMSO uygulanan gruplar arasındaki *Actb*'e ait Ct değerleri çok farklılık göstermektedir. Değerlerdeki bu yanılsatıcı sonuçlardan dolayı ilaç denemelerinden önce DMSO uygulaması için uygun doz belirleme çalışmaları yapılarak devam edilebilir. Bunun yanı sıra, *Actb* geninin *Apc*^{*Δ750*} organoidlerinde normalizasyon geni olarak kullanımı uygun olmamıştır, bu nedenle farklı normalizasyon genleri denenerek seçim yapılmalıdır.

Niklozomit, etkili ve düşük bütçeli bir ilaç olduğun için WHO, bu ilacın temel tedavi planlarında önemli bir terapötik olabileceğini savunmuştur. Bunun yanı sıra Niklozaminin moleküler hedefleri henüz kapsamlı olarak açıklanamamıştır. Güncel çalışmalar, ilacın Wnt, S100A4, Notch ve androjen reseptörleri düzenleme etkisine

dayanarak anti-kanser bir ilaç olarak kullanılabileceğini kanıtlamaktadır (58,60–62). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ışığında denilebilir ki Niklozamid, *Apc* mutasyonu ile ilişkili hiperaktif kanonikal Wnt sinyal yolağının hedef genlerinin aktivasyonlarını azaltmakta ve metastaz oluşumunda rol oynayan İKH aktivasyonunu da azaltabilmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- *Apc*^{Δ750} farelerinin ince bağırsaklarından kripterler izole edilmiş olup, intestinal organoidler başarı ile üretilmiştir.
- Üretilen organoidlerin köken aldıkları fare soyu ile aynı *Apc* gen mutasyonunu taşıdıkları sentezlenen cDNA örneklerinin genotiplenmesi ile kanıtlanmıştır.
- Önceki çalışmalardan referans alınarak anti-kanser etkisi olabileceği düşünülen XAV939 ve Niklozamid ilaçları ile istenilen sonuçlara ulaşılmıştır.
- Literatürdeki çalışmalara göre uygulanan 5 ve 10 μM XAV939 ve 0.5 ve 1 μM Niklozamid uygulamaları sonucunda KRK gelişiminde rol oynayan *Lgr5*, *Axin2* ve *Ctnnb1* gen ifadelerinin azalması RNA düzeyinde kanıtlanmıştır.
- Organoid oluşumu için izole edilen hücrelerin tek hücre değil, kripterlerden oluştuğu kripter, villus ve lümen domeynlerinin immünfloresan boyamaları ile gösterilmiştir.
- Hedeflenen ilaçların Wnt sinyal yolağı hedef genleriyle birlikte intestinal kök hücrelerin aktivitelerini de baskılayabileceği RNA düzeyinde saptanmıştır.
- Çalışmanın sonraki aşamalarında üretilen intestinal organoidler ile transplant fare modeli oluşturularak XAV939 ve Niklozamid'in in vivo olarak aktiviteleri incelenerek *Apc*^{Δ750} fare modelinin KRK ilaç araştırmalarında etkili bir model olabileceği gösterilmelidir.
- Oluşturulan intestinal organoidlerin apikal ve bazolateral kısımlarının farklı teknikler uygulanarak tersine çevrilmesi ile daha başarılı immünfloresan boyama tekniği uygulanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Jackstadt R, Hodder MC, Sansom OJ. WNT and β -Catenin in Cancer: Genes and Therapy. *Annu Rev Cancer Biol.* 09 Mart 2020;4(1):177-96.
2. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, vd. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell.* Ocak 2018;33(1):125-136.e3.
3. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, vd. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* Ağustos 1991;66(3):589-600.
4. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, vd. Identification of FAP Locus Genes from Chromosome 5q21. *Science.* 09 Ağustos 1991;253(5020):661-5.
5. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, vd. Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients. *Science.* 09 Ağustos 1991;253(5020):665-9.
6. Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, vd. Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with β -Catenin, APC, and GSK3 β . *Science.* 24 Nisan 1998;280(5363):596-9.
7. Minde DP, Anvarian Z, Rüdiger SG, Maurice MM. Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer.* Aralık 2011;10(1):101.
8. Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, vd. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev.* 15 Haziran 2004;18(12):1385-90.
9. Vermeulen L, Morrissey E, van der Heijden M, Nicholson AM, Sottoriva A, Buczacki S, vd. Defining Stem Cell Dynamics in Models of Intestinal Tumor Initiation. *Science.* 22 Kasım 2013;342(6161):995-8.
10. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, vd. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* Ocak 2009;457(7229):608-11.
11. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer.* Temmuz 2018;18(7):407-18.
12. Ben-David U, Ha G, Tseng YY, Greenwald NF, Oh C, Shih J, vd. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet.* 01 Kasım 2017;49(11):1567-75.
13. Byrne AT, Alférez DG, Amant F, Annibali D, Arribas J, Biankin AV, vd. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer.* Nisan 2017;17(4):254-68.
14. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, vd. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* Mayıs 2009;459(7244):262-5.
15. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell.* Haziran 2016;165(7):1586-97.

16. Monin MB, Krause P, Stelling R, Bocuk D, Niebert S, Klemm F, vd. The anthelmintic niclosamide inhibits colorectal cancer cell lines via modulation of the canonical and noncanonical Wnt signaling pathway. *J Surg Res.* Haziran 2016;203(1):193-205.
17. Machii R, Saika K. Five-Year Relative Survival Rate of Colon Cancer in the USA, Europe and Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 01 Ocak 2014;44(1):105-6.
18. Corrà C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 01 Temmuz 2020;319(1):C151-65.
19. Wilson HV. A New Method by Which Sponges May Be Artificially Reared. *Science.* 07 Haziran 1907;25(649):912-5.
20. Evans M. Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *Reproduction.* 01 Temmuz 1981;62(2):625-31.
21. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* Aralık 1981;78(12):7634-8.
22. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, vd. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science.* 06 Kasım 1998;282(5391):1145-7.
23. Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci.* Ocak 1987;84(1):136-40.
24. Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, vd. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell.* Kasım 2008;3(5):519-32.
25. Lehmann R, Lee CM, Shugart EC, Benedetti M, Charo RA, Gartner Z, vd. Human organoids: a new dimension in cell biology. Drubin DG, editör. *Mol Biol Cell.* Mayıs 2019;30(10):1129-37.
26. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ.* Mayıs 2016;47:20-33.
27. Zhou T, Tan L, Cederquist GY, Fan Y, Hartley BJ, Mukherjee S, vd. High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell.* Ağustos 2017;21(2):274-283.e5.
28. Sato T, Clevers H. SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells. *Cell.* Haziran 2015;161(7):1700-1700.e1.
29. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, vd. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature.* Şubat 2011;470(7332):105-9.
30. Watson CL, Mahe MM, Múnera J, Howell JC, Sundaram N, Poling HM, vd. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med.* Kasım 2014;20(11):1310-4.
31. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, van Es JH, van den Brink S, vd. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology.* Kasım 2011;141(5):1762-72.

32. van Es JH, Clevers H. Generation and Analysis of Mouse Intestinal Tumors and Organoids Harboring APC and K-Ras Mutations. İçinde: Eferl R, Casanova E, editörler. *Mouse Models of Cancer* [İnternet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [a.yer 07 Ağustos 2022]. s. 125-44. (Methods in Molecular Biology; c. 1267). Erişim adresi: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2297-0_6
33. Sachs N, Clevers H. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev.* Şubat 2014;24:68-73.
34. van der Flier LG, Clevers H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol.* 01 Mart 2009;71(1):241-60.
35. Beumer J, Clevers H. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Ocak 2021;22(1):39-53.
36. Potten CS, Kovacs L, Hamilton E. CONTINUOUS LABELLING STUDIES ON MOUSE SKIN AND INTESTINE. *Cell Prolif.* Mayıs 1974;7(3):271-83.
37. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell.* Temmuz 2009;17(1):9-26.
38. Foronda M, Tarumoto Y, Schatoff EM, Leach BI, Diaz BJ, Zimmerman J, vd. Tankyrase inhibition sensitizes cells to CDK4 blockade. Lee JW, editör. *PLOS ONE.* 31 Aralık 2019;14(12):e0226645.
39. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* Ocak 2018;62:50-60.
40. Ramakrishnan AB, Cadigan KM. Wnt target genes and where to find them. *F1000Research.* 24 Mayıs 2017;6:746.
41. Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 01 Mart 2013;5(3):a015081-a015081.
42. Ryu H, Nam KY, Kim HJ, Song JY, Hwang SG, Kim JS, vd. Discovery of a Novel Triazolopyridine Derivative as a Tankyrase Inhibitor. *Int J Mol Sci.* 08 Temmuz 2021;22(14):7330.
43. Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol.* Kasım 2005;7(11):1133-9.
44. Huang SMA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, vd. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature.* Ekim 2009;461(7264):614-20.
45. Smith S, de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol.* Ekim 2000;10(20):1299-302.
46. Hsiao SJ, Smith S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie.* Ocak 2008;90(1):83-92.
47. Guettler S, LaRose J, Petsalaki E, Gish G, Scotter A, Pawson T, vd. Structural Basis and Sequence Rules for Substrate Recognition by Tankyrase Explain the Basis for Cherubism Disease. *Cell.* Aralık 2011;147(6):1340-54.
48. Li N, Zhang Y, Han X, Liang K, Wang J, Feng L, vd. Poly-ADP ribosylation of PTEN by tankyrases promotes PTEN degradation and tumor growth. *Genes Dev.* 15 Ocak 2015;29(2):157-70.

49. Sbdio JI, Chi NW. Identification of a Tankyrase-binding Motif Shared by IRAP, TAB182, and Human TRF1 but Not Mouse TRF1. *J Biol Chem*. Ağustos 2002;277(35):31887-92.
50. Krastev DB, Pettitt SJ, Campbell J, Song F, Tanos BE, Stoynov SS, vd. Coupling bimolecular PARylation biosensors with genetic screens to identify PARylation targets. *Nat Commun*. Aralık 2018;9(1):2016.
51. Kang DH, Lee DJ, Lee S, Lee SY, Jun Y, Kim Y, vd. Interaction of tankyrase and peroxiredoxin II is indispensable for the survival of colorectal cancer cells. *Nat Commun*. Aralık 2017;8(1):40.
52. Thorsell AG, Ekblad T, Karlberg T, Löw M, Pinto AF, Trésaugues L, vd. Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors. *J Med Chem*. 23 Şubat 2017;60(4):1262-71.
53. Lau T, Chan E, Callow M, Waaler J, Boggs J, Blake RA, vd. A Novel Tankyrase Small-Molecule Inhibitor Suppresses APC Mutation–Driven Colorectal Tumor Growth. *Cancer Res*. 15 Mayıs 2013;73(10):3132-44.
54. Shultz MD, Cheung AK, Kirby CA, Firestone B, Fan J, Chen CHT, vd. Identification of NVP-TNKS656: The Use of Structure–Efficiency Relationships To Generate a Highly Potent, Selective, and Orally Active Tankyrase Inhibitor. *J Med Chem*. 22 Ağustos 2013;56(16):6495-511.
55. Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, vd. APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther*. 01 Nisan 2017;16(4):752-62.
56. McGonigle S, Chen Z, Wu J, Chang P, Kolber-Simonds D, Ackermann K, vd. E7449: A dual inhibitor of PARP1/2 and tankyrase1/2 inhibits growth of DNA repair deficient tumors and antagonizes Wnt signaling. *Oncotarget*. 01 Aralık 2015;6(38):41307-23.
57. Schatoff EM, Goswami S, Zafra MP, Foronda M, Shusterman M, Leach BI, vd. Distinct Colorectal Cancer–Associated APC Mutations Dictate Response to Tankyrase Inhibition. *Cancer Discov*. 01 Ekim 2019;9(10):1358-71.
58. Ahn SY, Kim NH, Lee K, Cha YH, Yang JH, Cha SY, vd. Niclosamide is a potential therapeutic for familial adenomatous polyposis by disrupting Axin-GSK3 interaction. *Oncotarget*. 09 Mayıs 2017;8(19):31842-55.
59. Craig P, Ito A. Intestinal cestodes: *Curr Opin Infect Dis*. Ekim 2007;20(5):524-32.
60. Osada T, Chen M, Yang XY, Spasojevic I, Vandeusen JB, Hsu D, vd. Antihelminth Compound Niclosamide Downregulates Wnt Signaling and Elicits Antitumor Responses in Tumors with Activating APC Mutations. *Cancer Res*. 15 Haziran 2011;71(12):4172-82.
61. Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Kobelt D, Lemm M, vd. Novel Effect of Antihelminthic Niclosamide on S100A4-Mediated Metastatic Progression in Colon Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 06 Temmuz 2011;103(13):1018-36.
62. Li Y, Li PK, Roberts MJ, Arend RC, Samant RS, Buchsbaum DJ. Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug. *Cancer Lett*. Temmuz 2014;349(1):8-14.

63. Wang YC, Chao TK, Chang CC, Yo YT, Yu MH, Lai HC. Drug Screening Identifies Niclosamide as an Inhibitor of Breast Cancer Stem-Like Cells. Deoraj A, editör. PLoS ONE. 18 Eylül 2013;8(9):e74538.
64. Mook RA, Wang J, Ren XR, Piao H, Lyerly HK, Chen W. Identification of novel triazole inhibitors of Wnt/ β -catenin signaling based on the Niclosamide chemotype. Bioorg Med Chem Lett. Ocak 2019;29(2):317-21.
65. Chen M, Wang J, Lu J, Bond MC, Ren XR, Lyerly HK, vd. The Anti-Helminthic Niclosamide Inhibits Wnt/Frizzled1 Signaling. Biochemistry. 03 Kasım 2009;48(43):10267-74.
66. Chen W, Mook RA, Premont RT, Wang J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. Cell Signal. Ocak 2018;41:89-96.
67. Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer: Wnt signalling. EMBO J. 13 Haziran 2012;31(12):2737-46.
68. Clark CR. Mouse models for the discovery of colorectal cancer driver genes. World J Gastroenterol. 2016;22(2):815.
69. Jackstadt R, Sansom OJ. Mouse models of intestinal cancer. J Pathol. Ocak 2016;238(2):141-51.
70. Vermeulen L, Snippert HJ. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. Nat Rev Cancer. Temmuz 2014;14(7):468-80.
71. Visvader JE. Cells of origin in cancer. Nature. Ocak 2011;469(7330):314-22.
72. Jansen M, Langeveld D, De Leng WWJ, Milne ANA, Giardiello FM, Offerhaus GJA. LKB1 as the ghostwriter of crypt history. Fam Cancer. Eylül 2011;10(3):437-46.
73. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, vd. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proc Natl Acad Sci. 12 Haziran 2007;104(24):10158-63.
74. Kozar S, Morrissey E, Nicholson AM, van der Heijden M, Zecchini HI, Kemp R, vd. Continuous Clonal Labeling Reveals Small Numbers of Functional Stem Cells in Intestinal Crypts and Adenomas. Cell Stem Cell. Kasım 2013;13(5):626-33.
75. AKYOL_AYTEKİN_TÜBİTAK_ProjeNo_215S926.pdf.
76. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. Annu Rev Pathol Mech Dis. 28 Şubat 2011;6(1):479-507.
77. Zeineldin M, Neufeld KL. More than two decades of Apc modeling in rodents. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer. Ağustos 2013;1836(1):80-9.
78. Lannagan TR, Jackstadt R, Leedham SJ, Sansom OJ. Advances in colon cancer research: in vitro and animal models. Curr Opin Genet Dev. Şubat 2021;66:50-6.
79. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, vd. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature. Ekim 2007;449(7165):1003-7.
80. Schutgens F, Clevers H. Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. Annu Rev Pathol Mech Dis. 24 Ocak 2020;15(1):211-34.


81. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, van Es JH, van den Brink S, vd. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology*. Kasım 2011;141(5):1762-72.
82. Idris M, Alves MM, Hofstra RMW, Mahe MM, Melotte V. Intestinal multicellular organoids to study colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. Aralık 2021;1876(2):188586.
83. Rahmani S, Breyner NM, Su HM, Verdu EF, Didar TF. Intestinal organoids: A new paradigm for engineering intestinal epithelium in vitro. *Biomaterials*. Şubat 2019;194:195-214.
84. Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, vd. Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. *Genes Dev*. 15 Ağustos 2014;28(16):1752-7.
85. Ohsaka F, Sonoyama K. Murine intestinal organoids resemble intestinal epithelium in their microRNA profiles. *Biosci Biotechnol Biochem*. 02 Eylül 2018;82(9):1560-7.
86. Kraiczy J, Nayak KM, Howell KJ, Ross A, Forbester J, Salvestrini C, vd. DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut*. Ocak 2019;68(1):49-61.
87. Howell KJ, Kraiczy J, Nayak KM, Gasparetto M, Ross A, Lee C, vd. DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology*. Şubat 2018;154(3):585-98.
88. Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Ocak 2019;16(1):19-34.
89. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llergo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, vd. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. Şubat 2018;554(7693):538-43.
90. Boutin AT, Liao WT, Wang M, Hwang SS, Karpinets TV, Cheung H, vd. Oncogenic *Kras* drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes Dev*. 15 Şubat 2017;31(4):370-82.
91. Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Kouyama Y, Niida A, Fujii S, vd. Combined Mutation of *Apc*, *Kras*, and *Tgfb2* Effectively Drives Metastasis of Intestinal Cancer. *Cancer Res*. 01 Mart 2018;78(5):1334-46.
92. Varga J, Nicolas A, Petrocelli V, Pesic M, Mahmoud A, Michels BE, vd. AKT-dependent NOTCH3 activation drives tumor progression in a model of mesenchymal colorectal cancer. *J Exp Med*. 05 Ekim 2020;217(10):e20191515.
93. Fumagalli A, Drost J, Suijkerbuijk SJE, van Boxtel R, de Ligt J, Offerhaus GJ, vd. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 21 Mart 2017 [a.yer 13 Ağustos 2022];114(12). Erişim adresi: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1701219114>
94. O'Rourke KP, Loizou E, Livshits G, Schatoff EM, Baslan T, Manchado E, vd. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer. *Nat Biotechnol*. Haziran 2017;35(6):577-82.

95. Roper J, Tammela T, Cetinbas NM, Akkad A, Roghanian A, Rickelt S, vd. In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis. *Nat Biotechnol.* Haziran 2017;35(6):569-76.
96. de Sousa e Melo F, Kurtova AV, Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, vd. A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature.* Mart 2017;543(7647):676-80.
97. Takeda H. A Platform for Validating Colorectal Cancer Driver Genes Using Mouse Organoids. *Front Genet.* 28 Haziran 2021;12:698771.
98. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A Dominant Mutation That Predisposes to Multiple Intestinal Neoplasia in the Mouse. *Science.* 19 Ocak 1990;247(4940):322-4.
99. Fodde R, Edelmann W, Yang K, van Leeuwen C, Carlson C, Renault B, vd. A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 13 Eylül 1994;91(19):8969-73.
100. Oshima M, Oshima H, Kitagawa K, Kobayashi M, Itakura C, Taketo M. Loss of *Apc* heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated *Apc* gene. *Proc Natl Acad Sci.* 09 Mayıs 1995;92(10):4482-6.
101. Shibata H, Toyama K, Shioya H, Ito M, Hirota M, Hasegawa S, vd. Rapid Colorectal Adenoma Formation Initiated by Conditional Targeting of the *Apc* Gene. *Science.* 03 Ekim 1997;278(5335):120-3.
102. Colnot S, Niwa-Kawakita M, Hamard G, Godard C, Le Plenier S, Houbron C, vd. Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest.* Aralık 2004;84(12):1619-30.
103. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 19 Temmuz 2012;487(7407):330-7.
104. Crespo M, Vilar E, Tsai SY, Chang K, Amin S, Srinivasan T, vd. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med.* 01 Temmuz 2017;23(7):878-84.
105. Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* Aralık 2020;13(1):165.
106. Cui C, Zhou X, Zhang W, Qu Y, Ke X. Is β -Catenin a Druggable Target for Cancer Therapy? *Trends Biochem Sci.* Ağustos 2018;43(8):623-34.
107. Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, vd. Wnt/ β -catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* Aralık 2017;10(1):101.
108. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov.* Temmuz 2014;13(7):513-32.
109. Kang HE, Seo Y, Yun JS, Song SH, Han D, Cho ES, vd. Metformin and Niclosamide Synergistically Suppress Wnt and YAP in APC-Mutated Colorectal Cancer. *Cancers.* 09 Temmuz 2021;13(14):3437.
110. Park SY, Kim JY, Choi JH, Kim JH, Lee CJ, Singh P, vd. Inhibition of LEF1-Mediated DCLK1 by Niclosamide Attenuates Colorectal Cancer Stemness. *Clin Cancer Res.* 15 Şubat 2019;25(4):1415-29.

111. Zarour LR, Anand S, Billingsley KG, Bisson WH, Cercek A, Clarke MF, vd. Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. Mart 2017;3(2):163-73.
112. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. Ekim 2017;23(10):1124-34.

8.EKLER

Ek-1. Etik Kurul Yazısı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-09

24.08.2021

Prof. Dr. Aytekin AKYOL
Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. AKYOL,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz 06.08.2021 tarihli dilekçeniz ile Kurulumuzun 24.06.2020 tarihli toplantısında 2020/25 kayıt numarası ile onay almış olan "*Apc Mutant Fare Modelinde Azaltılmış Bdnf Ekspresyonunun İntestinal Tümör Gelişimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı çalışmanızda kullanılan farelerden elde ettiğiniz fare instestinal organidleri danışmanı olduğunuz Sinem BAKIR'ın yüksek lisans tez çalışması olan "*Fare İntestinal Tümör Organoidlerinde Wnt Yolak Modülasyonunun Kök Hücreler ve Tümörigenez Üzerine Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı projenizde kullanmayı planladığınız anlaşılmaktadır. Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik Madde 8(8) k fıkrası HADYEK onayı gerektirmeyen durumları belirlemiş olup, bu fıkrasında 2 nci maddesinde "Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler" için HADYEK onayı gerekmediği açıkça belirtilmiştir. İlgili yönetmelik gereği araştırma projeniz için Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı almanıza gerek olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Ek-2. Tez çalışması orijinallik raporu

APC MUTANT FARE İNTESTİNAL ORGANOİDLERİNDE WNT YOLAK MODÜLASYONUNUN KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 1	% 1	% 0	% 0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
2	www.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	medicopublication.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.nigde.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

Ek-3. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

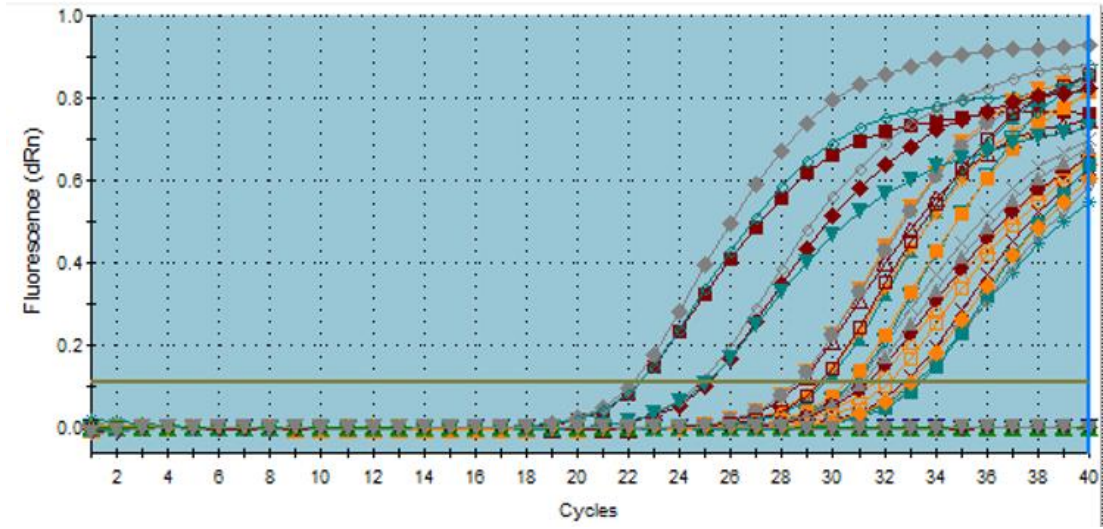
Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

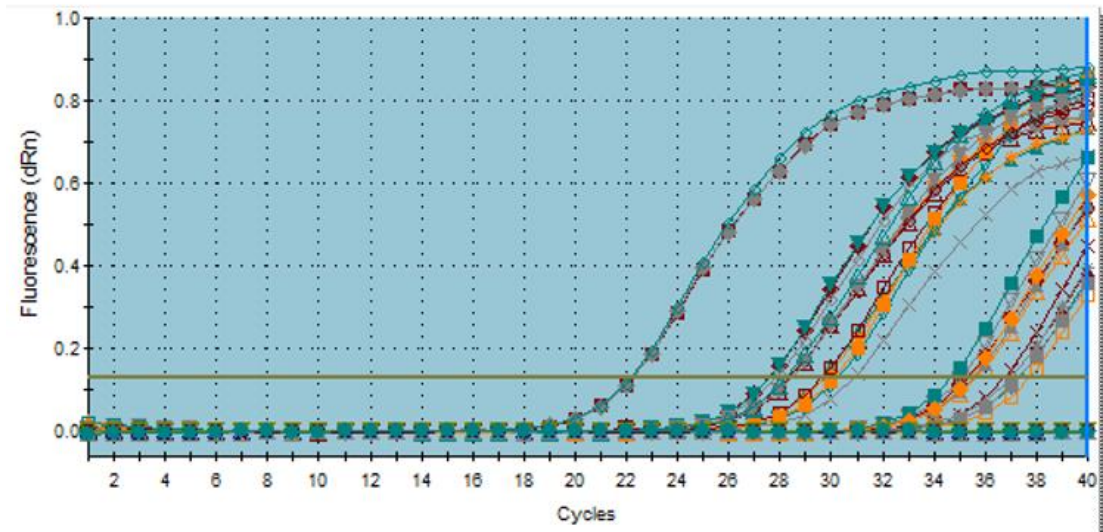
Gönderen: Sinem Bakır
Ödev başlığı: Sinem YL son
Gönderi Başlığı: APC MUTANT FARE İNTESTİNAL ORGANOİDLERİNDE WNT YO...
Dosya adı: Sinem_Tez_15092022_turnitin.pdf
Dosya boyutu: 1.71M
Sayfa sayısı: 43
Kelime sayısı: 8,667
Karakter sayısı: 60,444
Gönderim Tarihi: 16-Eyl-2022 05:59ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1900986824



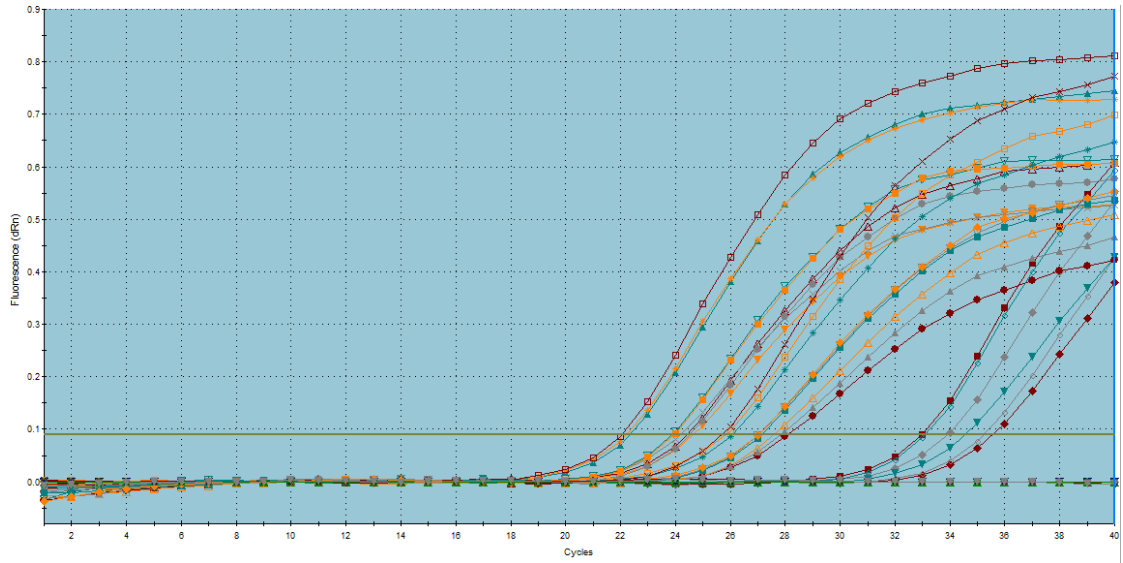
Ek-4. qPCR Analizlerine Ait Amplifikasyon Eğrileri



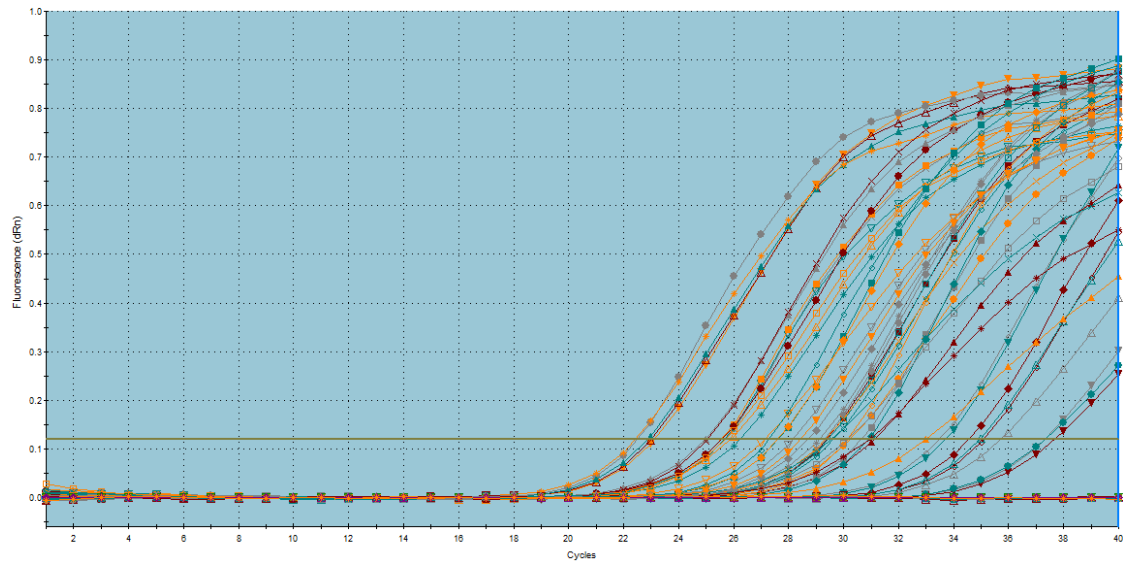
XAV939 ile muamele edilen gruplara ait *Ctnb1* analizinin amplifikasyon eğrisi



XAV939 ile muamele edilen gruplara ait *Axin2* ve *Lgr5* analizinin amplifikasyon eğrisi



Niklozomit ile muamele edilen gruplara ait *Ctnb1* analizinin amplifikasyon eğrisi



Niklozomit ile muamele edilen gruplara ait *Axin2* ve *Lgr5* analizinin amplifikasyon eğrisi

Ek-5. Tüm Grupların Ortalama Ct ve Standart Sapma Değerleri

Genler	5 µM XAV939	10 µM XAV939	DMSO	Uygulama Yapılmayan Grup
<i>Ctnnb1</i> (1)	31.31 ± 0.22	32.68 ± 0.45	33.26 ± 0.20	24.99 ± 0.14
<i>Lgr5</i> (2)	35.98 ± 0.47	-	34.1 ± 0.01	26.93 ± 3.30
<i>Axin2</i> (2)	35.52 ± 0.15	37.31 ± 0.40	35.05 ± 0.30	27.72 ± 0.10
<i>Actb</i> (1)	28.65 ± 0.06	29.59 ± 0.11	30.75 ± 0.13	22.38 ± 0.15
<i>Actb</i> (2)	28.69 ± 0.19	29.56 ± 0.55	30.02 ± 0.51	22.42 ± 0.18

XAV939 uygulanan ve uygulama yapılmayan gruplara ait ortalama Ct ve standart sapma değerleri. İlk gün yapılan deney grupları (1); sonraki gün yapılan deney grupları (2) olarak belirtilmiştir.

Genler	0.5 µM Niklozamid	1 µM Niklozamid	DMSO	Uygulama Yapılmayan Grup
<i>Ctnnb1</i>	27.91 ± 0.20	25.90 ± 0.15	27.1 ± 0.06	35.18 ± 0.42
<i>Lgr5</i>	25.51 ± 0.38	25.69 ± 0.49	27.86 ± 0.25	33.97 ± 0.46
<i>Axin2</i>	30.20 ± 0.81	29.44±0.06	30.61 ± 0.30	35.81 ± 1.09
<i>Actb</i>	22.93 ± 0.25	22.70 ± 0.20	25.68 ± 0.05	29.5 ± 0.13

Niklozamid uygulanan ve uygulama yapılmayan grupların ortalama Ct ve standart sapma değerleri.

9. ÖZGEÇMİŞ