

Akut Lösemi Hücre Serilerinde Beta-Katenin siRNA Uygulamaları

“ β -Catenin siRNA Application In Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines”

Özden Hatırnaz Ng¹, Yücel Erbilgin¹, Esin Aktaş², Günnur Deniz²,
Uğur Özbek¹, Müge Sayitoğlu^{1*},

¹Genetik Anabilim Dalı, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul
²İmmunoloji Anabilim Dalı, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul

Alınan destekler: Bu çalışma TUBITAK (Project no: 106S112) ve İstanbul Üniversitesi BAP
(Proje no: 1667) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Ribonükleik asit (RNA) interferans, evrimsel olarak korunmuş ve çift iplikli kısa RNA dizilerinin hedef mRNA'lara bağlanarak, gen anlatımını baskılayan bir biyolojik süreçtir. Keşfini takiben deneysel kullanımı son derece yaygınlaşmış ve farklı alanlarda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hücre serilerinde, WNT sinyal ileti yolağının kilit molekülü olan BETA KATENİN genini siRNA ile baskılayarak apoptotik etkilerini incelenmiştir. Sonuçta siRNA yöntemi ile beta-kenenin genini %60 başarı ile kapatılarak anlatımını baskılanmıştır. Ayrıca baskılanma sonrası, MOLT4 hücre serilerinde apoptozun baskılanmamış hücrelere göre iki kat arttığı belirlenmiştir. Buna göre ALL hücre serilerinde var olan aktif WNT sinyalleri, siRNA kullanımı ile kapatılarak apoptozdan kaçan lösemi hücrelerinin yeniden apoptoza yönelmesi sağlanmıştır. siRNA uygulamaları, özellikle in vitro çalışmalarda hızlı, etkin ve ucuz bir yöntemdir. Ancak in vivo çalışmalardaki etkinliği ve klinik uygulamaları için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ABSTRACT

Ribonucleic acid (RNA) interference, is an evolutionarily conserved biological process in which double stranded short RNA sequences leads transcriptional suppression of targeted genes. Ever since its discovery it has been widely used in many different areas. In this study, we aim to suppress the active WNT pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) cell lines by beta-catenin specific siRNA, key molecule of WNT pathway, and evaluate its effects on apoptosis. We were able to suppress beta-catenin expression with a success rate of 60%. Furthermore in MOLT4 cell line, the apoptosis level was 2 fold higher than untreated cells. In conclusion, the active WNT pathway in ALL cell lines can be suppressed by using siRNA and the cells can be lead to apoptosis. siRNA treatments are fast, easy to apply and cost efficient methods for in vitro studies. Nevertheless there is still need for more experiments for its usage in in vivo and clinical applications.

Giriş ve Amaç

Çift zincirli ribonukleik asitlerin (dsRNA), gen baskılanması üzerindeki etkileri ilk kez bitkilerde tanımlanmıştır (1). Ancak RNA aracılı baskılanma mekanizmasını esas tanımlayan çalışma C.Elegans'da Fire ve arkadaşları tarafından 1998 yılında gerçekleştirilmiştir (2). Bu keşif sonrası sırası ile farklı organizmalarda benzer mekanizmalar tespit edilmiştir (1,3-5). Otuz baz çiftinden daha uzun, çift iplikli RNA'lar, türler arası korunmuş "Dicer" enzimi tarafından tanınır ve yaklaşık 21-23 nükleotidli küçük "interferans" RNA'ya (small interfering, siRNA) dönüştürülür. siRNA'lar, RNA aracılı baskılanma kompleksine (RISC) katılır (6) ve RISC'in hedef mRNA'ya bağlanmasını sağlar. Tüm bu süreçler sonunda RISC'in endonükleaz aktivitesi ile hedef mRNA parçalanır ve transkripsiyon baskılanır (7). Mekanizmanın detaylı açıklanması ile birlikte, sentetik siRNA'nın in vitro çalışmalarda kullanımı hız kazanmış ve moleküler biyolojinin en önemli metodlarından biri haline gelmiştir. siRNA dizayn ederken, birbirine komplementer 21 nükleotidli, GC içeriği %30-50 arasında olan ve ardışık ya da palindrom dizilerin bulunmadığı siRNA'lar tercih edilmelidir (8,9). siRNA hakkında daha çok bilgi üretilmesi ile siRNA kütüphaneleri oluşturulmuş, biyoinformatik araçlarla bilgisayara dayalı etkin ve işlevsel siRNA'lar dizayn edilmiştir (10).

WNT erken dönem gelişiminde kritik öneme sahip bir sinyal ileti yoludur. WNT sinyallerinin, lenfosit öncüllerinin sağkalm ve proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (11). Bu nedenle anormal WNT aktivasyonunun, lökogenozun nedenlerinden biri olduğu öne sürülmektedir (12). Yaptığımız önceki çalışmalarda, Beta katenin aracılı kanonik WNT sinyal ileti yolağının akut lösemilerde (T-ALL ve B-ALL) bozulmuş aktivasyonunu gösterdik (Revizyonda). Bu çalışmamızda, daha önceden hastalarda saptadığımız bu anormal aktivasyonu, akut lösemi hücre serilerinde (Jurkat, Molt 4, CEM ve REH) siRNA yöntemini kullanarak baskılamayı ve baskılanma sonucu hücrelerdeki gen/protein anlatımı, hücre sayısı ve apoptoz gibi parametrelerdeki değişiklikleri incelemeyi hedefledik. Bu amaçla kanonik WNT sinyal ileti yolağının anahtar molekülü olan β -KATENİN genini hedefleyen spesifik siRNA ile lösemi hücre serilerinde, WNT yolağı kapatılmış ve apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Metod

Hücre Kültürü

T-lenfositik lösemi (Molt4, Jurkat, CEM), B-lenfositik lösemi (REH) hücre serileri, %10 FCS (fetal calf serum),

penisillin (50U/mL), streptomisin (50mg/mL; Invitrogen Life Sciences, USA) içeren RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, USA) besi yerinde, 37°C de ve %5 CO₂ koşullarında büyütülmüştür.

β -KATENİN genine özgü siRNA ile β -KATENİN Geninin Susturulması

Çalışmada 0. saatte, hücreler, siRNA ve kontrollerle muamele edildikten sonra 24., 48. ve 72. saatlerde toplanmış ve ilgili deneysel aşamalar için farklı işlemlere tabii tutulmuşlardır. Her zaman aralığı için, RNA izolasyonu yapılacak hücreler (QRT), canlılığın ölçüleceği hücreler (Viabilite), immünfloresan (IF) yapılacak hücreler ve apoptozun ölçüleceği hücreler (annV) belirlenmiştir.

β -KATENİN siRNA ve "nontargeting" (hedeflemeyen) siRNA'lar liyofilize halde satın alınarak, uygun koşullar altında, lipofektamin aracılı transfeksiyon kiti (İnvitogen) kullanılarak, hücrelere transfekte edilmiştir. β -KATENİN geninin etkin olarak susturulması için, bu gene özgü ve 4 farklı bölgeden oluşturulmuş antisens siRNA havuzu kullanılmıştır. Tüm hücre serilerinde β -KATENİN genine özgün siRNA'nın yanı sıra (beat), hedeflemeyen ("non-targeting") siRNA'lar (2) ve herhangi bir muameleye maruz kalmamış ("untreated") kontrol hücreleri (unt) kullanılmıştır. Anlatım seviyeleri, NT örneklerine göre karşılaştırılmıştır. Her bir kuyucuktaki 3x10⁵ hücre için 100nM siRNA verilmiştir. Çalışmamızda 24., 48. ve 72. saatlerde hücreler toplanıp analizler yapılmıştır.

Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hücre serilerinden elde edilen hücreler, RLT solüsyonu (Qiagen, GmbH, Almanya) içinde homojenize edildikten sonra çalışma yapılabildiği kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Qiagen RNeasy Plus Kit (Qiagen, GmbH, Almanya) protokolü kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin kalite ve miktar tayini için Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Almanya) cihazı kullanılmıştır. 1µg total RNA'dan, random hekzamer (Roche, Mannheim, Almanya) ve ters transkriptaz enzimi (MBI Fermentaz, Litvanya) kullanılarak, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Kantitatif gerçek zamanlı PZR

Kantitatif gerçek zamanlı PZR, Light Cycler 480 cihazında (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) gerçekleştirilmiştir. Hedef genlere özgü primer ve probler insan "universal probe library" kullanılarak (Roche Applied Sciences, Almanya) tasarlanmıştır. Kantitatif PCR amplifikasyonları final 20µl içinde 5µM primer ve 0.5 µM

prob kullanarak Light Cyler 480 ProbMaster Mix (Roche Applied Sciences, Almanya) ile yapılmıştır. Her örnek çift çalışılmıştır. Normalizasyon için en uygun 3 referans gen (β -aktin, Siklofilin ve ABL) seçilmiştir. Relatif gen anlatım düzeyleri delta Ct algoritması (13) ile hesaplanmıştır.

İmmünfloresan analizler

Elde edilen hücreler PBS ile yıkayıp 1×10^6 olacak şekilde sulandırılıp sitosantrifüj (Thermo Scientific) yardımı ile lamaların üzerine yapıştırılmıştır. Anti-Aktif-Beta-Katenin (clone 8E7, mouse monoclonal IgG1K, Millipore, Temecula, CA) antikoru nükleer β katenin birikiminin tespiti için kullanılmıştır. Total β katenin tespiti için Katenin-Beta AB-2 tavşan poliklonal antikoru (Thermo Fisher Scientific, USA) ve kontrol olarak Beta-Aktin epitop spesifik tavşan antikoru (Millipore, Temecula, CA) kullanılmıştır. Fikse edilen hücrelerde proteinlere spesifik primer antikolar ile inkubasyon yapıp (gece boyu, $4+0C$ 'de), floresan işaretli ikincil antikolar (2-3 saat oda ısısında) ile görüntülenme sağlanmıştır. Her işaretlemede nükleusu görüntülemek için DAPI (1:15000 ve 5 dak.) boyamasından yararlanılmıştır. Analizler dijital floresan mikroskopta (Leica CTR 6000, Wetzlar, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

Apoptoz Oranının Belirlenmesi

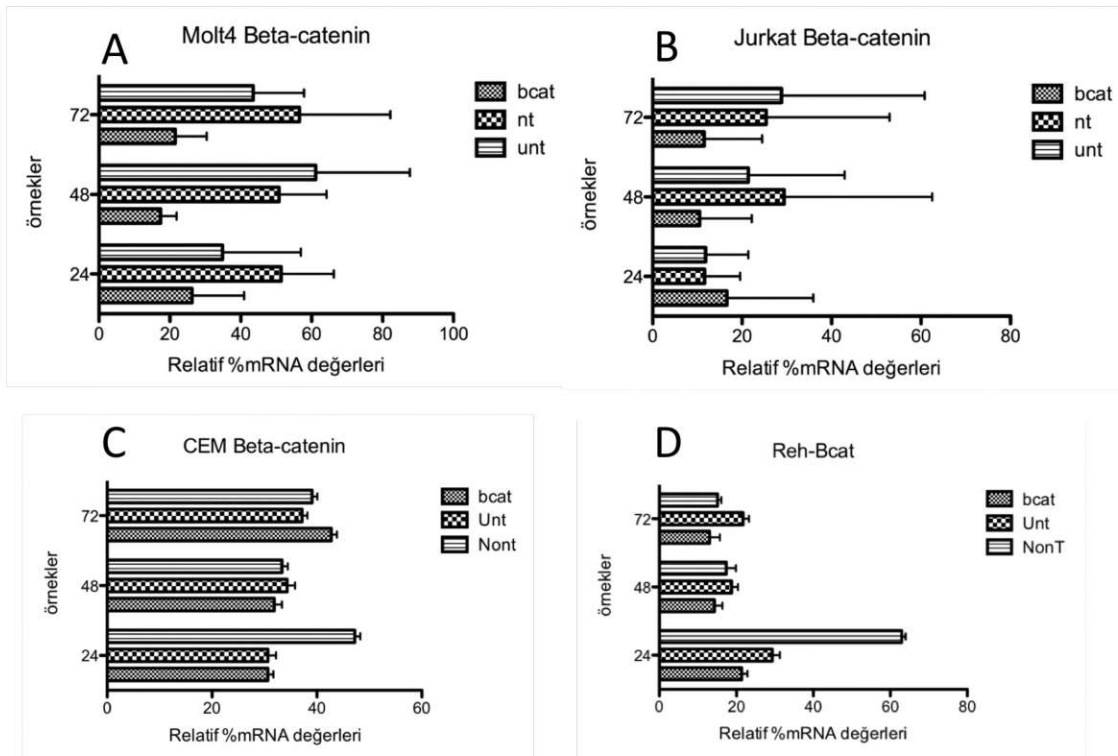
Süspansiyon haldeki hücrelerdeki apoptoz oranı akım sitometri ile "Annexin V:FITC Apoptosis Deteksiyon Kiti (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) kullanılarak

saptanmıştır. Hücre süspansiyonundaki apoptotik hücreler Annexin V-FITC, ölü hücrelerin tayini ise Propidium iodid (PI) kullanılarak tespit edilmiştir. Hücreler 0.01 M HEPES, 0.14 mM NaCl and 2.5 mM $CaCl_2$. içeren tampon çözelti içerisinde Annexin V ve propidium iyodid ile boyandıktan sonra BD FACS Calibur cihazında Cell Quest programında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda erken apoptotik hücreler Annexin V (+) /Propidium iyodid (14), geç apoptotik hücreler ise Annexin V (+) /Propidium iyodid (+) ekspresyonu ile tayin edilmiştir.

BULGULAR

β -KATENİN baskılamasının mRNA düzeyinde belirlenmesi:

Lenfoid lösemi hücre serilerinde β -KATENİN genine özgü siRNA muamelesini takiben, gen baskılanması öncelikle mRNA düzeyinde incelenmiştir (Şekil 1). Molt4 hücre serisinde, 24. saatte NT'lere göre baskılanma %49 iken, 48. saatte %66 ve 72. saatte %62 olarak belirlenmiştir (Şekil 1A). Jurkat hücre serisinde 24. saatte baskılanma gözlenmezken, 48. saatte %65 ve 72. saatte %55 olarak belirlenmiştir (Şekil 1B). Bu verilere göre en iyi baskılanma 48. saatte elde edilmiştir. CEM hücre serisinde sadece 24. saatte baskılanma gözlenirken, 48 ve 72. saatlerde bu baskılanmanın ortadan kalktığı (Şekil 1C), Reh hücre serisinde ise 24. saatte başlayan baskılanmanın 48. ve 72. saatlerde sabitlendiği gözlenmiştir (Şekil 1D).

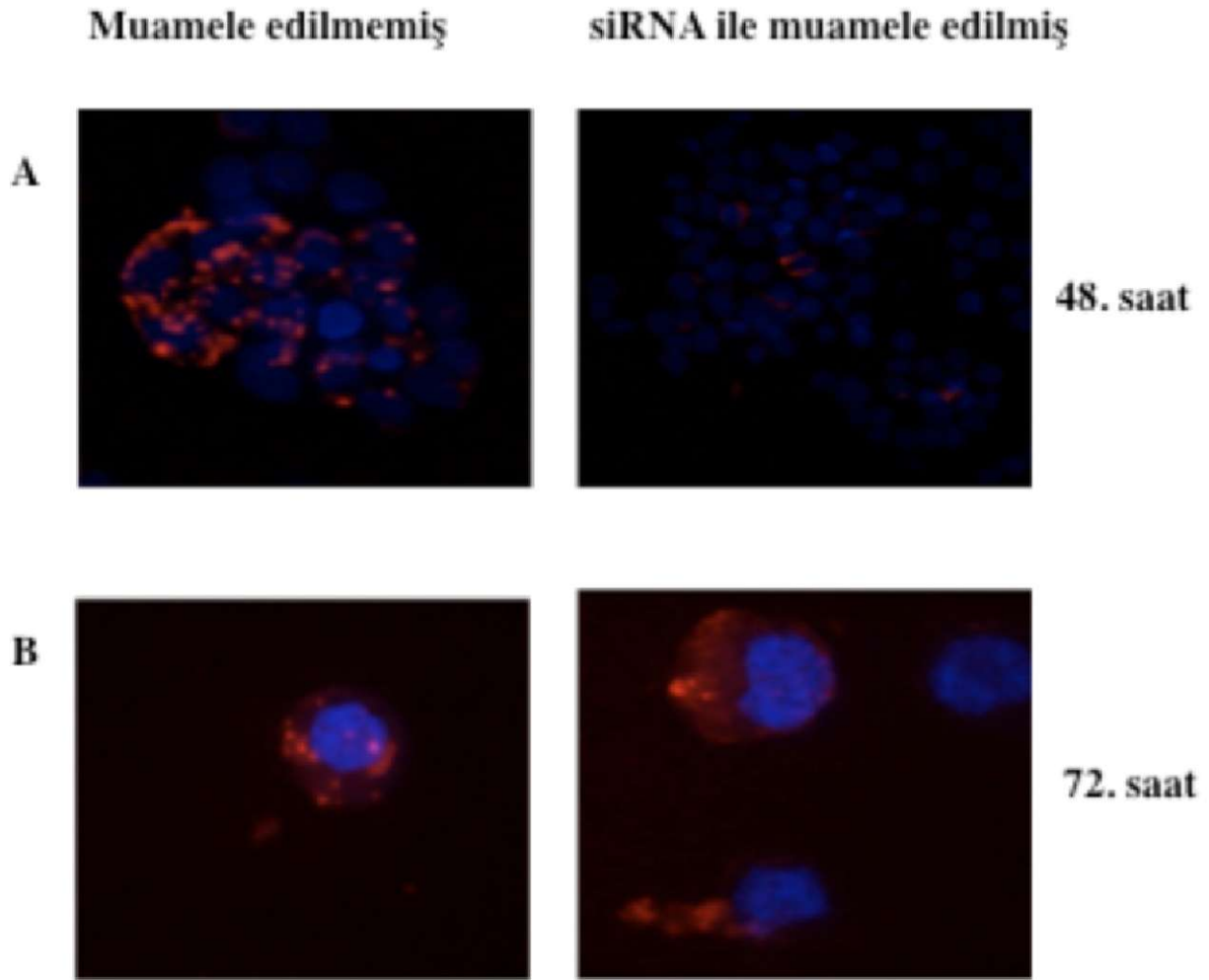


Şekil1: Lenfoid lösemi hücre serilerinde β -KATENİN baskılanmasının mRNA düzeyinde gösterilmesi. A,B ve C T-lenfoid hücre serileri, D.B-lenfoid hücre serisi. Her örnek iki kez çalışılmış ve 3 farklı referans gen ile normalize edilmiştir. Bcat; β -KATENİN siRNA uygulanmış, Unt; herhangi bir uygulama yapılmamış, Nont; Hedefsiz siRNA kontrolleri uygulanmış hücreler.

siRNA muamelesi sonrası immünfloresan yöntemi ile β -KATENİN baskılanması, protein düzeyinde de gösterilmiştir. Molt4 hücre serisinde yapılan siRNA muamelesi sonucunda

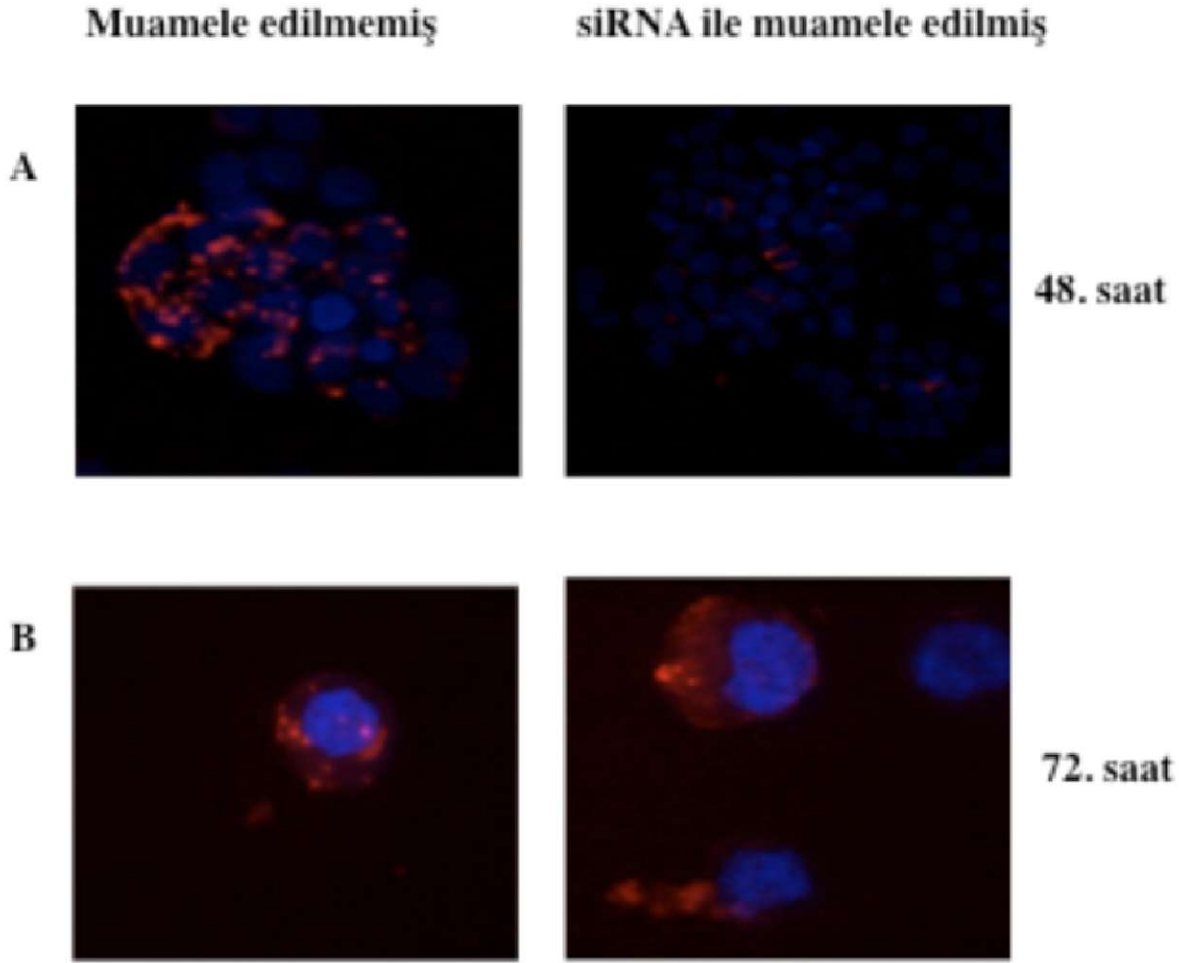
baskılanma 24. saatten itibaren gözlenmiş, en ideal baskılanma 48. saatte elde edilmiştir (Şekil 2).

Jurkat, Molt4 ve Reh hücre serilerinde β KATENİN geni siRNA uygulaması ile yaklaşık %60 oranında baskılanmıştır. Bu baskılanma β katenin proteininin immünfloresan işaretlenmesi ile 48. saatten itibaren protein düzeyinde gösterilmiştir. Benzer şekilde, Jurkat hücre serilerinde de 24. saatten itibaren mRNA baskılanması net bir şekilde gözlenmiş ve 48. saat ve 72. saatlerde baskılanma protein düzeyinde gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 2: Molt4 hücre serilerinde 48. ve 72. saatlerde baskılanmanın protein düzeyinde gösterilmesi. Total Beta-

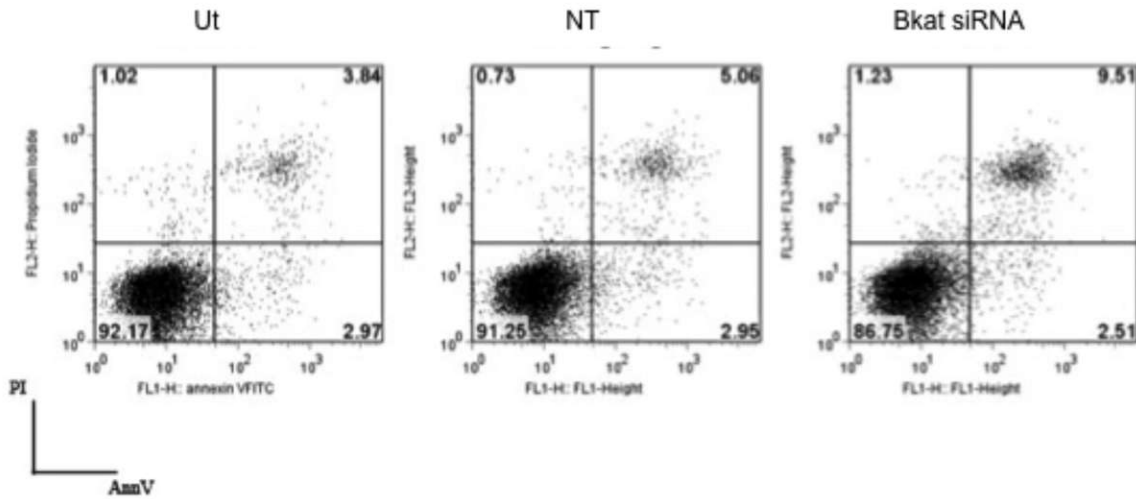
Katenin Anti-Aktif-Beta-Katenin (clone 8E7, mouse monoclonal IgG1K, Millipore, Temecula, CA) ile tepit edildi.



Şekil 3: Jurkat hücre serilerinde 48. ve 72. saatlerde baskılanmanın protein düzeyinde gösterilmesi. Total Beta-Katenin Anti-Aktif-Beta-Katenin (clone 8E7, mouse monoclonal IgG1K, Millipore, Temecula, CA) ile tepit edildi.

β -KATENİN baskılanmasının apoptoz üzerine etkisi Molt4 hücre serilerinde 48. saat apoptoz oranları, AnnexinV (AnnV) ve Propidium Iodide (PI) ekspresyon

oranlarına göre akım sitometri cihazında ölçülmüştür. 48. saatte siRNA uygulanan hücrelerde (Bkat siRNA), uygulanmayan hücelere göre 2 kat daha fazla apoptoz saptanmıştır. Hedeflemeyen (2) siRNA ve siRNA uygulanmamış (ut) hücre kontrolleri sırasıyla %4 ve %5 apoptoz gösterirken, siRNA uygulanmış hücrelerde apoptoz oranı %10 olarak belirlenmiştir (Şekil4).



Şekil 4: siRNA baskılanmasının 48. saatte apoptoz üzerindeki etkisi. PI; propidium iodide, AnnV; annexin V, Ut;

muamele edilmemiş, NT; hedefsiz siRNA ile muamele edilmiş, Bkat siRNA; Beta-katenin siRNA ile muamele edilmiş hücreler

TARTIŞMA

Günümüzde siRNA uygulamaları, hedefe yönelik terapi geliştirme çalışmalarında en önemli metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Kolay uygulanabilir olması, kısmen ucuz olması ve hızlı sonuca götürmesi siRNA uygulamalarını, post transkripsiyonel modifikasyon çalışmaları için ideal bir yöntem haline getirmektedir. WNT aktivasyonu birçok kanser gelişiminde rol oynayan ve araştırmalara çok fazla konu olan bir yolaştır. Bu yolağın anlaşılmasında merkez rolü β katenin proteini oynar. Artmış β katenin varlığı, sitoplazmada başlayan ve nükleustan, hedef genlere doğru uzanan bir aktivasyon mekanizmasını tetikler. Ligand bağımlı ya da bağımsız olarak başlayan aktivasyon mekanizmalarının ilk tetikleyicisi sitoplazma/nükleus β katenin oranıdır. Bulgularımıza göre akut lösemi hücre serileri ve hastalarda belirgin bir β KATENİN artışı ile beraber WNT yolağı aktivasyonu vardır. Lösemi hücre serilerinde β KATENİN geninin posttranskripsiyonel olarak susturulması ile kanonik WNT sinyal ileti yolağının aktivasyonun durdurulması ve devamında gözlenen apoptotik değişimler izlenmiştir.

Jurkat, Molt4 ve REH hücre serilerinde β KATENİN geni siRNA uygulaması ile yaklaşık %60 oranında mRNA düzeyinde baskılanmıştır. mRNA düzeyinde saptanan baskılanmanın, protein düzeylerine de yansıdığı yapılan immunfloresan işaretlemelerle gösterilmiştir. Bu bulgular, siRNA uygulamasının üç gün boyunca etkin olarak devam ettiğini göstermektedir. Ancak CEM hücre serisinde baskılanma sadece 24. saatte gözlenmiş ve sonraki zaman aralıklarında ortadan kalkmıştır. Bunun nedeni kullanılan siRNA'nın transfeksiyon başarısının hücre serileri/karakteristikleri arasında değişkenlik göstermesi olabilir. β KATENİN geninin baskılanmasının apoptoza etkisi incelendiğinde baskılanmanın ikinci gününün sonunda, siRNA uygulanan hücrelerde, uygulanmayan hücrelere göre 2 kat daha fazla apoptoz gerçekleştiği görülmüştür. Diğer kanserlerde olduğu gibi lösemilerde de gözlenen artmış apoptoz, malign hücrelere yaşamsal bir avantaj sağlamaktadır. Çalışmamızda incelediğimiz aktif WNT yolağında, β -KATENİN geni baskılandığında, hücrelerin yeniden apoptoza

yöneldiği görülmektedir. Bu sonuçlar WNT üyelerinin lösemi patogenezinin katılımlarını ve bu süreçte apoptoz yollarını ile de iletişim içinde olduklarını göstermektedir.

siRNA'lar keşiflerinden bugüne, moleküler biyolojinin en etkin kullanılan yöntemlerinden biri olmuştur. Özellikle türler arası korunmuş olmaları, çok sayıda deney modelinde kullanımlarına olanak sağlamıştır. siRNA kullanımı ile seçici olarak, istenilen her türlü gen baskılanabilmektedir. Gelişimsel genetik, sinyalizasyon mekanizmaları, enfeksiyon gibi çok sayıda ve farklı alanda kullanımı mümkündür. siRNA'nın tüm bu yaygın kullanım alanlarının yanı sıra terapötik kullanımı da gündeme gelmiştir. Her ne kadar in vitro kullanımda etkin başarılar elde edilse de klinik uygulamalar için daha çok deneysel çalışmaya ihtiyaç olduğu aşikardır. In vivo çalışmalarda karşılaşılan en büyük sorun siRNA'nın hücre içine etkin olarak aktarılamaması ve hücre içinde etkinliğinin kısa süreli olmasıdır. Hücre içine aktarım sırasında kullanılan ajanlar hücrede stres ve toksik etki oluşturabilirler. Daha önce yapılan çalışmalarda hücreye siRNA aktarımını takiben hedeflenen diziden bağımsız olarak hücrede interferon yanıtı geliştiği gösterilmiştir. Ayrıca aktarım başarı ile gerçekleşse bile siRNA'nın hücre içindeki anlatımı daimi olmamaktadır. Bunun üstesinde gelebilmek için siRNA'ların sürekli anlatımın sağlayan vektörler içine klonlanması gündeme gelmiştir (17). siRNA teknolojisindeki tüm bu gelişmeler, in vivo çalışmaların sayısını arttırmıştır ve klinik uygulamalar için umut vaadeden sonuçlar elde edilmiştir (18, 19). Her ne kadar klinik uygulamalar için henüz erken gibi gözükse de siRNA yöntemine dayalı gen baskılanması, kanser gibi yoğun ve ağır terapi gerektiren hastalıkların tedavisinde umut vaadeden bir yöntemdir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK (proje no: 106S112) ve BAP (proje no: 1667) ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Napoli C, Lemieux CJ, Jorgensen R, Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 1990. 2(4): p. 279-289.
2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SEM, Mello CC, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998. 391(6669): p. 806-811.
3. Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker E, Macino G, Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J*, 1996. 15(12): p. 3153-3163.
4. Lindbo J, Dougherty WG, Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*, 1992. 189(2): p. 725-733.
5. van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR, Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 1990. 2(4): p. 291-299.
6. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ, An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000. 404(6775): p. 293-296.
7. Aigner A, Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol*, 2006. 124(1): p. 12-25.
8. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T, Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 2001. 20(23): p. 6877-6888.
9. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WSK, Khvorovova A, Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(3): p. 326-330.
10. Huesken D, Lange J, Mickanin C, Weiler J, Asselbergs F, Warner J, Meloon B, Engel S, Rosenberg A, Cohen D, Labow M, Reinhardt M, Natt F, Hall J, Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat Biotechnol*, 2005. 23(8): p. 995-1001.
11. Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W, A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*, 1997. 89(10): p. 3624-3635.
12. Chung EJ, Hwang SG, Nguyen P, Lee S, Kim JS, Kim JW, Henkart PA, Bottaro DP, Soon L, Bonvini P, Lee SJ, Karp JE, Oh HJ, Rubin J, Strepel JB, Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin. *Blood*, 2002. 100(3): p. 982-990.
13. Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-408.
14. Steg AD, Katre AA, Goodman B, Han HD, Nick AM, Stone RL, Coleman RL, Alvarez RD, Lopez-Berestein G, Sood AK, Landen CN, Targeting the notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 17(17): p. 5674-5685.