



T.C.

**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOMA
HÜCRELERİNDE CD44'ÜN, EKSTRASELLÜLER MATRİKS
YIKIMINA OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Furkan İlker ÖZBALCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. Nilgün GÜRBÜZ

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TYL-2019-7008 nolu proje ile desteklenmiştir**

Tez No: 196

ISPARTA-2020

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans/Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/01/2020

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ
SDÜ Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT DÖNMEZ
Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yalçın ERZURUMLU
SDÜ, Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ

Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğuna, tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığına, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurullar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

“Pankreatik Duktal Adenokarsinoma Hücrelerinde CD44’ün, Ekstrasellüler Matriks Yıkımına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi” adlı yüksek lisans tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve yazma yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Furkan İlker ÖZBALCI

İmza

Danışman

Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ

İmza

ÖZET

Pankreatik Duktal Adenokarsinoma Hücrelerinde CD44'ün, Ekstrasellüler Matriks Yıkımına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

Pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) mortalitesi en yüksek kanser türleri arasında yer alır. PDAC'in erken evrede metastaza uğraması ve erken tanı belirteçlerinin olmaması, bunun yanı sıra hastalığa karşı geliştirilen ilaç stratejilerin yoğun desmoplastik stroma nedeniyle kanser hücrelerine ulaşamaması tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu tez çalışmamızda hücre yüzey adezyon reseptörü olan CD44 transmembran glikoproteininin ekstrasellüler matriks yıkımına olan etkisini değerlendirmek için Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücre hatlarında CD44 siRNA transfeksiyonu sonrası CD44 ve İntegrin β 1 mRNA ekspresyonu, kollajen IV ve fibronektin protein ekspresyonu seviyeleri belirlenmiştir. 50 nM CD44 siRNA uygulaması sonrası Panc-1 hücrelerinde hücre canlılığı %55,4, MiaPaCa-2 hücrelerinde ise %52,5 olarak görülmüştür. Uygulanan CD44 siRNA dozajının hücrelerde sitotoksositeye yol açmadığı tespit edilmiştir. CD44 siRNA transfeksiyonu sonucu CD44 ve integrin β 1 mRNA ekspresyonu Panc-1 hücrelerinde sırasıyla 0,13 ve 0,35 olarak değerlendirilmiştir. MiaPaCa-2 hücrelerinde ise CD44 mRNA ekspresyon seviyesi 0,08, integrin β 1 mRNA ekspresyon seviyesi ise 0,20 düzeyinde değerlendirilmiştir. CD44 siRNA transfeksiyonuna bağlı fibronektin ve kollajen IV protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde Panc-1 hücrelerinde fibronektin protein ekspresyon seviyesi 0,81, kollajen IV protein ekspresyon seviyesi ise 0,87 olarak tespit edilmiştir. MiaPaCa-2 hücrelerinde ise fibronektin protein ekspresyon seviyesi 0,39, kollajen IV protein ekspresyon seviyesi 0,52 olarak tespit edildi. Çalışma sonuçlarına göre CD44 proteininin ekstrasellüler matriks yıkımında MiaPaCa-2 hücreleri üzerinde Panc-1 hücrelerine göre daha fazla etkili olduğu değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: CD44, Ekstrasellüler Matriks, siRNA, PDAC

ABSTRACT

The Evaluation of The Effect of CD44 on Extracellular Matrix Destruction in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is most lethal cancer in many cancer types. PDAC's early metastasis and lack of early diagnostic markers, as well as drug strategies developed against the disease, cannot reach cancer cells due to intense desmoplastic stroma. In this study, we evaluated CD44 and Integrin β 1 mRNA expression, collagen IV and fibronectin protein expression after CD44 siRNA transfection in Panc-1 and MiaPaCa-2 cell lines in order to evaluate the effect of cell surface adhesion receptor CD44 transmembrane glycoprotein on extracellular matrix destruction. Cell viability was %55,4 in Panc-1 cells and %52,5 in MiaPaCa-2 cells after 50 nM CD44 siRNA application. It was determined that the administered CD44 siRNA dosage did not cause cytotoxicity in the cells. CD44 and integrin β 1 mRNA expression as a result of CD44 siRNA transfection was evaluated as 0,13 and 0,35 in Panc-1 cells, respectively. In MiaPaCa-2 cells, CD44 mRNA expression level was 0,08 and integrin β 1 mRNA expression level was 0,20. When the fibronectin and collagen IV protein expression levels due to CD44 siRNA transfection were examined, fibronectin protein expression level was 0,81 and collagen IV protein expression level was 0,87 in Panc-1 cells. In MiaPaCa-2 cells, fibronectin protein expression level was 0,39 and collagen IV protein expression level was 0,52. According to the results of the study, it was evaluated that CD44 protein was more effective on MiaPaCa-2 cells than Panc-1 cells in extracellular matrix destruction.

Keywords: CD44, Extracellular Matrix, siRNA, PDAC

TEŞEKKÜR

Lisanüstü eğitim boyunca bana her konuda yardımcı olan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen laboratuvar çalışmalarında kısa sürede büyük bir bilgi birikimi elde etmemi sağlayan, büyük bir özveriyle akademik hayatıma yön veren değerli danışman hocam Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ'e

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak hayata dair düşüncelerime katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e

Bu yolculukta kendimi geliştirmem hususunda her zaman beni destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Nilüfer Şahin CALAPOĞLU'na

Manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli tavsiyeleri ile hayatıma katkıda bulunan değerli hocam Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve çalışmalarında yardımcı olan değerli hocalarım Dr. Gülçin YAVUZ TÜREL'e, Dr. Dilek AŞCI ÇELİK'e, Arş. Gör. Vehbi Atahan TOGAY'a

Maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme

Bu çalışmayı destekleyen TYL-7008-19 nolu proje ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2.1. Pankreatik Duktal Adenokarsinoma (PDAC)	3
2.2. PDAC’de Moleküler Mekanizmalar	4
2.2.1. Hücre Proliferasyonu.....	4
2.2.2. Apoptozis	5
2.2.3. Otofaji	6
2.2.4. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Mezenkimal-Epitelyal Geçiş (MET).....	7
2.2.5. Metastaz	8
2.3. Ekstrasellüler Matriks Komponentleri	10
2.3.1. İntegrin	10
2.3.2. Matriks Metalloproteinaz (MMP)	11
2.3.3. Kollajen.....	12
2.3.4. Fibronektin	13
2.4. Başkalaşım Kümesi (Cluster of Differentiation, CD)	13
2.4.1. CD44	15
2.5. Küçük interferans RNA (siRNA).....	16
2.6. PDAC Tedavisinde siRNA’nın Yeri	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Hücre Kültürü	19
3.2. siRNA Transfeksiyonu.....	20
3.3. Sitotoksosite (Hücre Canlılığı) Testi	22
3.4. RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi.....	23

3.4.1. Hücre Gruplarının Hazırlanması ve RNA İzolasyonu.....	24
3.4.2. cDNA Sentezi.....	25
3.4.3. PCR Analizi ve Görüntüleme.....	25
3.5. Western Blot Analizi.....	26
3.5.1. Protein Miktarı Analizi.....	27
3.5.2. Immunoblot Analizi	28
4. BULGULAR.....	32
4.1. CD44 siRNA'nın PDAC Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	32
4.2. PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, CD44 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	34
4.3. PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, İntegrin β 1 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi	37
4.4. PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, Fibronektin Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi	39
4.5. PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, Kollajen IV Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi	41
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kollajen Tiplerinin PDAC hücrelerine Etkisi	13
Tablo 3.1. Primer Dizilimleri	24



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. EMT ve MET geçişlerinde protein belirteçleri	8
Şekil 2.2. İntegrin Ligandları	10
Şekil 2.3. Alternatif kırılma mekanizması sonucu oluşan CD44 varyantları	15
Şekil 2.4. Ökaryotlarda siRNA işleme prosedürü	17
Şekil 3.1. Hücrelerin sitotoksosite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı.....	23
Şekil 3.1. Bradford yöntemine göre elde edilen standart grafiği.....	28
Şekil 4.1a. CD44 siRNA'nın Panc-1 hücre canlılığı üzerine etkisi	33
Şekil 4.1b. CD44 siRNA'nın MiaPaca-2 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.2a. Panc-1 hücrelerinde CD44 siRNA'nın, CD44 gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.2b. CD44 siRNA'nın MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.3a. Panc-1 hücresinde CD44 gen susturulmasının, İntegrin- β 1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.3b. MiaPaCa-2 hücresinde CD44 gen susturulmasının, İntegrin β 1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.4a. CD44 siRNA'nın Panc-1 hücrelerinde Fibronektin protein ekspresyonu üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.4b. CD44 siRNA'nın MiaPaCa-2 hücrelerinde Fibronektin protein ekspresyonu üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.5a. CD44 siRNA'nın Panc-1 hücrelerinde Kollajen IV protein ekspresyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.5b. CD44 siRNA'nın MiaPaCa-2 hücrelerinde Kollajen IV protein ekspresyonu üzerine etkisi.....	43

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BLBC	: Bazal benzeri meme kanseri hücre hattı
CAF	: Kanser ilişkili fibroblast
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
Chk1	: DNA Hasarı Kontrol Noktası Kinaz-1
Chk2	: DNA Hasarı Kontrol Noktası Kinaz-2
DNMT1	: DNA Metil Transferaz-1
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
FAP-1	: Fibroblast Aktivatör Protein-1
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
PDAC	: Pankreatik duktal adenokarsinoma
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MT1-MMP	: Membran Tip I Metalloproteinaz
MET	: Mezenkimal-Epitelyal Geçiş
uPA	: Ürokinaz Tip Plazminojen Aktivatör
uPAR	: Ürokinaz Tip Plazminojen Aktivatör Reseptör
RNase III	: Ribonükleaz III
siRNA	: Küçük interferans RNA

1. GİRİŞ

Pankreas endodermden köken alan glikoz homeostazisinde, karbonhidratların ve proteinlerin sindiriminde görev alan enzimlerin salgılandığı bir organdır. Eksokrin ve endokrin pankreas olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Eksokrin pankreas birbiriyle ilişkili dallanmalar gösteren dukt ve asinar hücrelerden oluşur. Dukt ve asinar hücrelerin ürettiği inaktif durumdaki sindirim enzimleri gastrointestinal boşluğa salgılanır. Endokrin pankreastan ise langerhans adalarında yer alan dört farklı çeşidi bulunan endokrin hücrelerden glikoz homeostazisini düzenleyen insülin ve glukagon hormonları salgılanır (1). Pankreasın yapısında meydana gelen fizyolojik ve moleküler değişimler malignansiye yol açarak pankreas kanserlerinin oluşumunu başlatır. Pankreasın dukt hücrelerindeki neoplazm, invazyon ve moleküler mekanizmaların hasarlarından kaynaklanan pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) tüm pankreas kanserlerinin %95'ini oluşturmaktadır. Bu hastalığa yakalananların 5 yıl içerisinde hayatta kalma oranı %2-3 oranında değişmektedir. Pankreatik duktal adenokarsinomanın bu denli ölümcül olmasında erken evre tanı belirteçlerinin olması, kemoterapi ve apoptozise direnç, hastalığın erken evrede metastaza uğraması, pankreasın vücuttaki yerleşkesinden dolayı cerrahi operasyon yapmanın zorluğu gösterilebilir (2). Pankreatik duktal adenokarsinoma çevresel ve genetik faktörlerle yakından ilişkilidir. Obezite, sigara kullanımı, uzun süreli kronik pankreatitis, diyabet, ilerleyen yaş pankreatik duktal adenokarsinoma için risk faktörleridir.

Kemoterapi, cerrahi operasyon, radyoterapi, nanolipozomal tedavi yöntemleri, CAR-T hücreleri, kodlama yapmayan oligonükleotid bazlı terapötikler pankreatik duktal adenokarsinomanın tedavisinde yoğun stroma bariyerinden geçememektedir. Pankreatik duktal adenokarsinoma hücrelerinin yoğun stromayla kaplı olması, tümör mikroçevresinin kanser hücrelerini tarafından immun baskılanması, apoptozise karşı hücrelerin direnç geliştirmesi kullanılan tedavi yöntemlerinin etkisiz kalmasıyla ilişkilidir (2). Tümör mikroçevresinin, ekstrasellüler matriks komponentlerinin, hücreler arası etkileşimlerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması yeni terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi için hayati önem taşımaktadır. PDAC hücrelerinin ekstrasellüler matriks komponentlerinin yıkımı,

yapımı ve bu komponentlerin proteolize uğraması ile metastatik potansiyeli artmaktadır. Bu hücrelerin ekstrasellüler matriks ile etkileşimi ve diğer hücrelerle kurduğu hücre-hücre etkileşimi de hastalığın metastatik indeksini yükseltmektedir. Hücre yüzeyinde yer alan Cluster of Differentiation (CD) reseptör familyasının hücre-hücre ve hücre- ekstrasellüler matriks etkileşiminde önemli bir yeri vardır. CD reseptör familyasının 400'den fazla üyesi vardır. Günümüzde yeni CD reseptörlerinin bulunmasıyla bu sayısı daha da artmaktadır. CD'ler immün sistemin düzenlenmesinde, kök hücrelerin farklılaşmasında, ekstrasellüler matriksin stabilizasyonunda, hücrelerin adezyonunda rol oynamaktadır. CD ekspresyonlarının artması veya azalması birçok biyokimyasal reaksiyon ve hücre immünofenotiplendirmesi için biyobelirteç görevi görür.

Yapılan tez çalışması için seçtiğimiz CD44, pankreatik duktal adenokarsinoma için bir biyobelirteçtir. CD44 aracılı ekstrasellüler matriks komponentlerinin degradasyonuna ait moleküler mekanizmaların aydınlatılması, yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için hayati önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreatik Duktal Adenokarsinoma (PDAC)

Pankreas endodermden kökenlenen, endokrin ve ekzokrin olmak üzere iki kısımdan oluşan bir organdır. Pankreasın ekzokrin kısmında üretilen protein ve karbonhidrat sindiriminde görevli enzimler dukt kanalı ile duodenuma aktarılır. Pankreas kanserlerinin %95'ini ekzokrin pankreas kaynaklı pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) oluşturur. PDAC dukt yapısında meydana gelen tümörleşme ile başlar. İlerlemiş yaş, sigara kullanımı, obezite, uzun süreli kronik pankreatitis, genetik yapı gibi risk faktörleri PDAC oluşumunu indükler (1,3). Asya ve Amerika kıtalarında 100.000 kişiden 9,8'si PDAC sebebiyle hayatını kaybetmektedir (4). Hastalığın başlıca semptomları olarak sarı görünümlü deri, abdominal ağrı ve sırt ağrısı, idrarda siyahlaşma, aşırı kilo kaybı sayılmaktadır. PDAC'nin günümüzde tedavisi için klinikte başlıca gemitabin olmak üzere Nab-Paclitacel, İrinotecan lipozom enjeksiyonu, oxaliplatin ve 5-florourasil kullanılmaktadır. Sadece gemitabin kullanımıyla hastalarda sağkalım süresi ortalama 6,6 ay uzarken, gemitabinin Nab-Paclitaxel ile kombine edilerek klinikte kullanımı sonucu hastalarda sağkalım süresi 8,7 aya çıkmıştır. Yapılan diğer bir klinik çalışmada 5-florourasilin oxaplatin ve irinotecan ile kombine edilerek metastatik PDAC vakalarına uygulanması sonucu ortalama sağkalım süresi 11,1 ay olarak gözlenmiştir (5). PDAC oluşmasında hücre döngüsünü sağlayan moleküler mekanizmaların bozulması, hücrelerin apoptozise ve kemoterapiye direnç geliştirmesi, kanser kök hücreleri kaynaklı hücre yüzey adezyon reseptörlerinin artması, hücrelerin tümör mikroçevresiyle etkileşimi sonucu sitoplazmik iskelet yapısının değişmesi, mitokondriyal oksidasyon yoluyla hücresel enerji sağlayan mekanizmaların bozulması, hipoksi oluşumu, pankreatik dukt epitelinin morfolojik yapısının değişimi, stromal yapının değişimi gösterilebilir (6).

2.2. PDAC’de Moleküler Mekanizmalar

2.2.1. Hücre Proliferasyonu

Hücrelerin çoğalmasında hücre döngüsü ve Ras/Raf/MEK/ERK ve Akt/mTOR gibi proliferatif hücre içi sinyal yolları etkin rol oynamakla birlikte bu mekanizmalar fizyolojik şartlarda kontrolü sağlayan mediyatörlerin ekspresyonu ile denge içerisinde. Ancak, hücre proliferasyonundaki kontrolün bozulması ve dengenin aşırı çoğalma yönüne kayması nedeniyle kanserlerin gelişimi gerçekleşmektedir. PDAC’nin ortaya çıkmasında da pankreatik hücrelerin proliferasyon dengesinin bozulması tümörleşmeye yol açan etkenler biridir. Proliferasyonun bozulmasında DNA onarım mekanizmasını sağlayan genlerin mutasyona uğraması, hücre döngüsü kontrol noktalarında görev alan proteinleri kodlayan genlerin mutasyona veya delesyona uğraması, ayrıca proliferasyondan sorumlu hücre içi sinyalizasyonunu artması sorumlu tutulmaktadır (7). Bu hücre içi sinyal proteinleri içerisinde en önemlilerden olan K-Ras proteini, DNA üzerinde 12p12.1 konumunda lokalize olan genden ifade edilmektedir. K-Ras proteini, içerdiği GTP/GDP bağlayan domainler sayesinde GTP bağladığı zaman aktif, GDP bağladığında ise inaktif durumdadır. K-Ras’ın içerisindeki intrinsik GTPaz aktivitesi sayesinde GTP, GDP’ye hidroliz edilerek K-Ras inaktif konuma geçer. Ancak birçok kanser olgusunda olduğu gibi pankreas kanserinde de K-Ras genindeki mutasyonlar sonucunda genetik veya epigenetik nedenlerden dolayı genin ekspresyonu aşırı derecede artmaktadır. PDAC vakalarında da K-Ras genindeki mutasyon oranı %90 gibi yüksek bir değerdir. PDAC’de K-Ras geninin 12, 13, 60 ve 61. kodonlarında mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar sonucunda, büyüme faktörleri tarafından uyarılan Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı sürekli aktif kalarak hücreyi kontrolsüz bölünmeye teşvik etmektedir (8). Bunun yanı sıra G1/S fazında DNA hasarı tespit eden ATM ve ATR genlerinde meydana gelen mutasyonlar da tümörleşmeye yol açmaktadır. ATM, DNA’daki çift iplik kırıklarını ATR ise, tek iplik kırıklarını tespit ederek alt hedefleri olan Chk1 ve Chk2 protein kinaz enzimlerini fosforile eder ve takibinde de bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteinini fosforile ederek aktif konuma geçer. Normalde hücre içerisinde kısa süre içinde parçalanacak olan p53 proteini fosforillendikten sonra kararlı hale gelir. Aktif olan p53 proteini de p21’in

transkripsiyonunu arttırarak hücre dñngüsünü G1, G1/S ve S evrelerindeki kontrolü sağlayan Siklin/Cdk komplekslerini inhibe ederek döngüyü durdurur. Bu nedenle önemli bir tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geninde oluşan bir mutasyon sonucunda ne DNA tamiri gerçekleşir, ne hasar algılanıp hücre döngüsü durur ne de hasar onarılamayacak boyutta ise hücre apoptoza gider; böylelikle hasarlı DNA'lar kontrolsüz bir şekilde yavru hücelere aktarılarak ileri mutasyonların gerçekleşmesi için yol açılmış olur (9). Birçok kanser türünde olduğu gibi PDAC vakalarında da en az %40 oranında p53 mutasyonu olduğu tespit edilmiştir. Tümör supresör özellik gösteren p53 geninde meydana gelen mutasyonların PDAC'de invazyon ve lenf nodu metastazını arttırdığı belirlenmiştir (10).

2.2.2. Apoptozis

Apoptozis normal dokularda homeostazinin sağlanması için gerçekleşen programlı hücre ölümdür. Bu mekanizma hasarlı, enfekte olmuş ve yaşlanmış hücrelerin eliminasyonu için elzemdir. Ancak hücrelerin apoptozise direnç göstermesi sonucunda hasarlı hücreler programlı hücre ölümüne gidemez (11). Böylelikle tümörleşme başlar. PDAC'de iki ana apoptozis sinyal yolağının kontrolünün bozulduğu gözlenmiştir. Bunlardan ilki mitokondriyal apoptozis ile Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 faktörlerinin hücresel stres, büyüme faktörü yokluğu, sitotoksik ajanlar veya onkogen aktivasyonu etkisiyle etkinleşmesidir. Bcl protein ailesi BAX-like ve BH-3 olmak üzere iki alt gruba sahiptir. Hücresel stresin artmasıyla BH-3 aktifleşir. Aktifleşen BH-3, BAX-like grubunu uyararak Bcl proteinlerinin ekspresyonunu arttırır. PDAC vakalarında Bcl ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. İkincil apoptotik sinyal yolağı ise, mitokondriden bağımsız olup burada ölüm reseptörleri kilit rol oynar. Bu reseptörler; başlıca Tümör Nekrozis Faktör (TNF), Fas-L ve TRAIL ligandlarının bağlanmasıyla etkinleşir. Aktif ölüm reseptörleri tarafından parçalanarak aktif hale gelen kaspaz-8, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'i aktifleştirerek hücrenin apoptoza gitmesini uyarır. PDAC vakalarında ise trozin fosfataz aktivitesi olan FAP-1 proteinin artmış ekspresyonu sonucunda, FAS aracılı kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe olmaktadır (12). Apoptozise direnç geliştiren Pankreas kanseri hücrelerinde NF-kB sinyal yolağının inhibisyonuna bağlı anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (13).

2.2.3. Otofaji

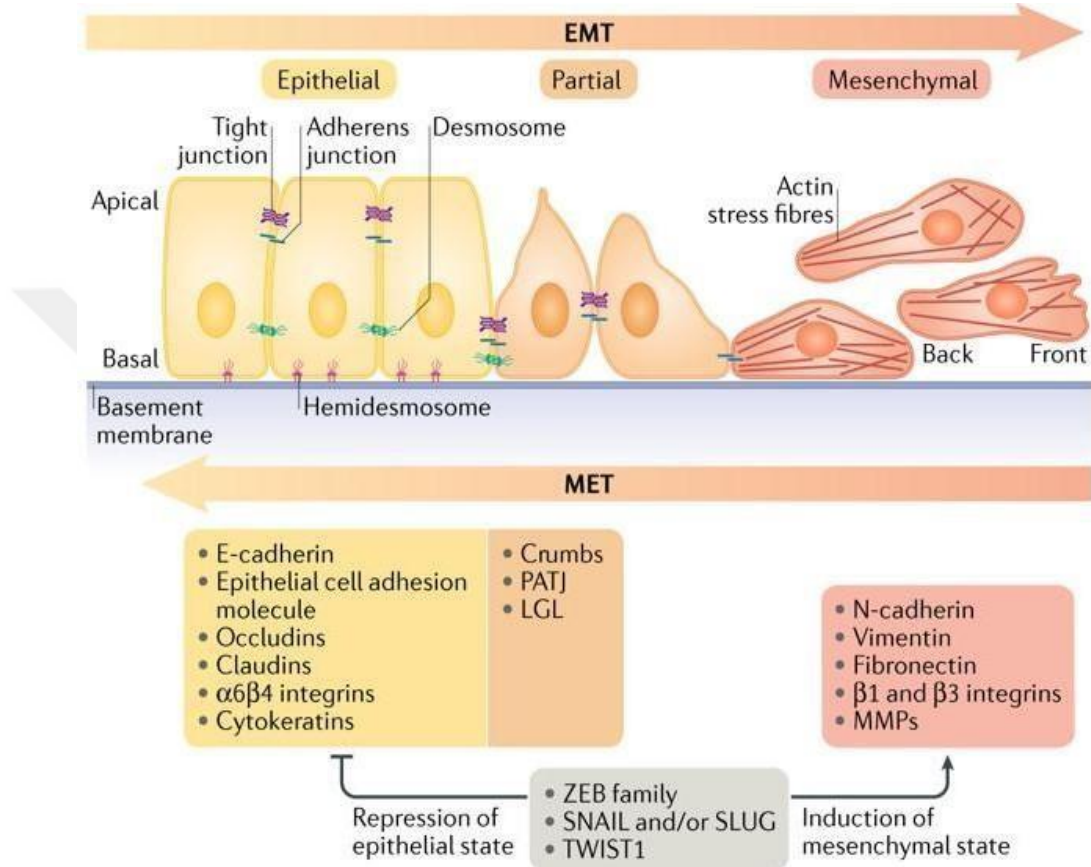
Otofaji, programlı hücre ölüm yollarından birisi olup hücrelerin lizozomal enzimler varlığında parçalanarak geride kalan organik moleküllerin yeni hücrelerin oluşumu için harcadığı bir geri dönüşüm mekanizmasıdır. Otofaji, moleküler anlamda fagafor, otofagozom ve otofagolizozom oluşumu aşamalarından oluşan 3 aşamalı bir süreci içermektedir. Hücre membranı veya endoplazmik retikulum membranından köken alan fagafor, parçalanmak istenen hücre, organel, protein gibi birçok farklı komponenti içine alarak parçalanmaya hazır hale getirir. Otofajinin kontrolünde birçok faktör rol oynamakla birlikte bunlardan en önemlileri Atg otofaji ilişkili gen (Atg) tarafından kontrol edilen en az 18 farklı Atg proteinleridir. Atg proteinleri, parçalanacak kargoyu tanıma, kargonun içine alındığı vezikül şekli, kargo paketlenme gibi süreçleri yöneterek otofagozom kompleksi oluşumunu sağlarlar. Oluşan otofagozomlar lizozomlar ile birleşerek kargo sindirimini gerçekleştirir. Otofajinin başlangıcı yani fagafor oluşumu otofajinin en önemli kontrol aşaması olup bu süreç, ULK kinaz kompleksi ve Bcl-2 aracılı Beclin-1 tarafından kontrol edilir (14). Otofaji ile transkripsiyonel aktivasyon ve post-translasyonel modifikasyon arasında sıkı bir bağ bulunur. Çünkü büyüme faktörü yetersizliği, ER stresi, hücresel açlık, hipoksi gibi durumlar otofaji başlangıcını uyarır (15).

Otofaji kanser ile yakından ilişkilidir. Ancak bu ilişki kanserin hangi evrede olduğuna göre değişir. Erken evre kanserlerde otofaji inhibe olurken, tersine ileri evre kanserlerde ise aktive olur. Çünkü ileri yani metastatik evrede yeni hücrelerin oluşması için gerekli organik moleküller, otofajik hücre ölümünün artmasıyla sağlanır. Bu noktada otofaji, bir hayatta kalım mekanizması olarak çalışmaktadır. Otofagozom oluşumunda önemli rol oynayan mikrotübül ilişkili LC3 proteinin GFP ile işaretlenmesi sonucu PDAC hücrelerinde bazal otofajinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. PDAC'de tümör gelişiminin sağlanması için hücreler otofajinin artmasına ihtiyaç duyar. Otofajinin genetik ve farmakolojik inhibisyonu ROS enzimlerinin ekspresyonunun artmasına neden olur. Bu durum oksidatif DNA hasarına ve metabolik defektlere yol açarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyon mekanizmalarını bloke eder. Böylelikle tümör gelişimi engellenir (16).

2.2.4. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Mezenkimal-Epitelyal Geçiş (MET)

EMT, dokuların fenotipik yapısını epitelyal formdan mezenkimal forma geçiren bir hüresel programdır (şekil 2.1). Epitelyal-mezenkimal form mozaik bir yapıda görülebildiği gibi, epitelyal formun tamamen mezenkimal forma geçtiği durumlar görülmüştür. Embriyonal gelişim gibi fizyolojik süreçlerde önemli olan EMT'nin kontrolünde meydana gelen bozukluk sonucunda, kanser hürelerinin metastatik potansiyelinin artarak kanserin ilerleyişini uyarmaktadır. Çünkü mezenkimal karaktere sahip olan bir kanser hüresi, kök hücre özelliklerini taşımasından dolayı hem kanserin metastazını hem de kanser hürelerinin heterojenitesini artırarak kanserin hem ilerleyişine hem tedavideki etkinliğin güçlüğüne hem de yıllar sonra kanser nükslerinin gelişmesine neden olur. Hürelerin epitelyal karakterinin mezenkimal yöne dönüşmesi PDAC vakalarında metastatik etkiyi çok yükseltmektedir (17). Çünkü epitelyal form mezenkimal forma göre daha stabil ve organize bir yapıya sahiptir. EMT'nin gelişimi sırasında epigenetik modifikasyonların meydana geldiği, bazı proteinlerde hüresel lokasyonun değiştiği, alternatif kırılma ve transkripsiyonal kontrol dengesinin bozulduğu görülmektedir. Kanserde bu denge bozularak; E-Kaderin, Klaudin ve Okludin gibi kilit öneme sahip epitelyal belirteçlerin ekspresyonu azalırken, Snail, Slug, Zeb1 ve Twist gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonu transkripsiyonel düzeyde artmaktadır. (18). Bu transkripsiyon faktörleri de genellikle helix-loop-helix yapısında olduğu için proteazlar tarafından degrede edilemezler, ancak ubiquitin aracılı proteozom ile degrede edilebilirler (19). Bu sebeple EMT transkripsiyon faktörleri, miRNA'lar tarafından regüle edilir. EMT regülasyonunda miR-200, miR-203 ve miR-34 gibi miRNA'lar etkilidir. TGF- β /SMAD4, İntegrin/ILK ve kanonikal Wnt/B-katenin sinyali EMT başlangıcında etkilidir. Bu sinyal yollarıyla Twist, Snail, Zeb ve Slug transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu artar (20). Snail ve Zeb proteinleri, E-kaderin ve Klaudin epitelyal belirteçlerin transkripsiyonunu baskılar niteliğe sahip transkripsiyon faktörleridir. miR-200 ailesi tarafından Snail ve Zeb'in bloklanması mezenkimal forma geçişi arttırır (21). Twist ise mezenkimal forma geçişi indükler. Epitelyal formdan mezenkimal forma geçişte hücre-hücre etkileşimi zayıflarken hücre-matriks etkileşimi artar. Bununla birlikte apikal bazal polarite yerini iğsi hücre

yapılarına bırakır. Hücreler iğsi şekle dönüştüğü için sitokeratin ekspresyonu azalır. Bazal membran üzerindeki hücreler arasındaki bağlantıyı sağlayan E-Kaderin ekspresyonu da epitelyal formdan mezenkimal forma geçişte azalır. Mezenkimal formda ise N-kaderin, vimentin fibronektin ve kollajen I artışı görülür. Epitelyal formdaki kollajen IV ise bazal membran polaritesi sağlar (22).



Şekil 2.1. EMT ve MET geçişlerinde protein belirteçleri (23)

2.2.5. Metastaz

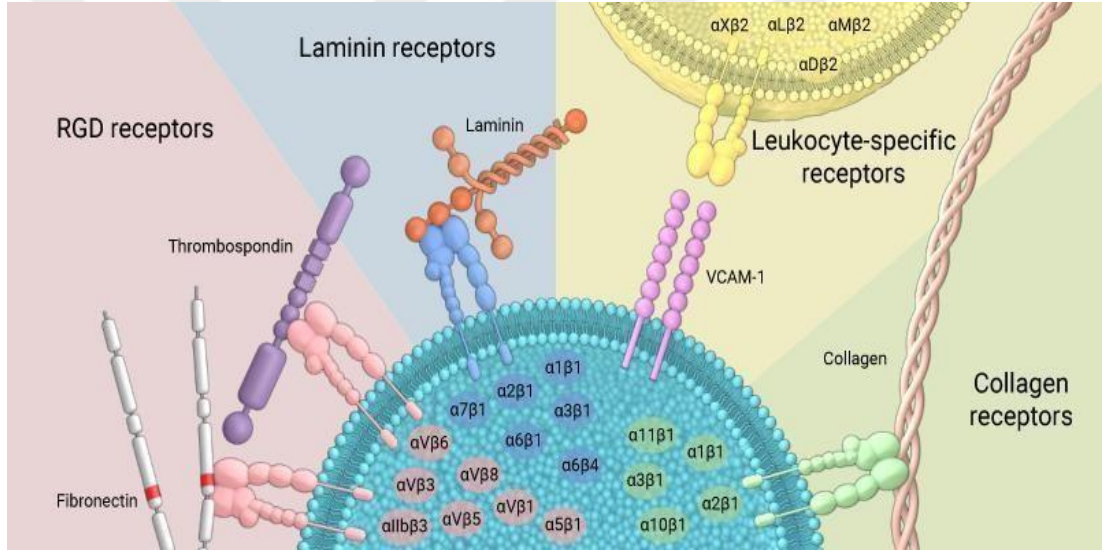
PDAC'nin teşhisinde erken evre tanı belirtecinin bulunmaması ve hastalığın erken evrede metastaza uğraması hastalığın tedavisini oldukça güç kılmaktadır. Pankreasın dukt bölümü, kan damarları ve lenf damarları açısından zengin olduğu için desmoplastik vasküler infiltrasyonun artmasıyla PDAC hızlı bir şekilde hematolojik ve lenfojenik yayılma göstermektedir (24). Son yıllarda PDAC'nin tümör mikroçevresiyle ve ekstrasellüler matris bileşenleriyle olan etkileşimi yeni terapötik ve klinik yaklaşımların geliştirilmesinde önem kazanmaya başlamıştır. Yoğun desmoplastik stroma sırasıyla migrasyon, invazyon ve metastaz

gerçekleşmesinde önemli bir etkiye sahiptir (25). Normal epitelyum yapısındaki hücreler, yapışma kuşakları üzerinden E-kaderin ile birbirlerine, hemidesmozom üzerinden de lamina lucidaya ve ekstrasellüler matrikse bağlanmış durumdadırlar. Lamina lucida'nın hücre membranı yüzeyinde yer alan integrinler, lamininler (laminin 1, 5, 6, 10) için reseptör görevi görürler. Lamina lucida, lamininlerin yanısıra kollajen XVII ve kollajen IV açısından zengindir. Lamina lucida'nın hemen altında bulunan ve bazal laminanın diğer tabakası olan lamina densa ise, kollajen IV, perlekan, heparin sülfat proteoglikan açısından zengindir. Bazal laminanın son tabakası olan ve stromaya bağlı bulunan retiküler lamina'nın içeriğinde ise kollajen I, kollajen III, kollajen V ve proteoglikanlar bulunmaktadır (26). Fibroblast, stromada bulunur ve kemik iliğinden köken alan mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasıyla oluşur. Bu farklılaşma fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), interlökinler, TGF- β , TNF- α gibi sinyal yollarının aktivasyonu tarafından sağlanır (27). PDAC kanser hücrelerinin metastaz ile yayılabilmeleri için, epitelyum-bazal membran-stromal yapıyı degrade edip kan ve lenf dolaşımına geçmesi gerekmektedir. Bunun için kanser hücreleri tarafından sitokinler ve peptid, mRNA ve protein inhibitörleri içeren eksozomlar salgılanarak fibroblastların ve kollajenlerin doğal yapısının bozulması sonucu kanser ilişkili fibroblastlar (CAF) ve düzensiz kollajen örgüsü oluşur (28). Doğal fibroblast hücreleri elastik fiber oluşumu için elastin üretimine katkıda bulunurken, kanser ilişkili fibroblastlar elastik fiber yapının içinde yer almazlar ve MMP'ler tarafından degrade edilmekten korunurlar. PDAC'de, hyaluronan sentaz enziminin aktivitesinin artmasından dolayı hyaluronik asit düzeyleri artmıştır (29). Normal şartlarda hyaluronan sentaz geninin promotör bölgesi DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) enzimi tarafından kontrollü bir epigenetik düzenlenmeyle metilasyona uğrarken, kanser hücrelerinin salgıladığı transforme mRNA içeren eksozomlar ile DNMT1 enzimini kodlayan gen susturularak hyaluronan/ hyaluronik asit sentezi artmaktadır, kanser kök hücreleri ve lökositler hyaluronandan zengin stromaya hücre yüzey adezyon reseptörleriyle tutunarak yerleşmektedir (30).

2.3. Ekstrasellüler Matriks Komponentleri

2.3.1. İntegrin

İntegrinler, insan genomunda kodlanan en az 18 α ve 8 β alt birime sahip heterodimer yapıda transmembran glikoproteinlerdir. Bu glikoproteinler hücre adezyonu, bazal membran yapılanması, nükleer zarfta yer alan lamininlerin sabitlenmesi, hücrelerin ekstrasellüler matrikse bağlanması gibi geniş ölçekte biyolojik olaylarda rol oynarlar (31). α ve β alt ünitelerin farklı kombinasyonlarıyla oluşan farklı integrin tiplerinin, farklı ligandlara affinitesi olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.2). Kollajenler, lamininler, lökositler, RGD rezidüsü içeren ligandlar (Arg-Gly-Asp), α ve β alt ünite kombinasyonlarına göre integrinlere bağlanırlar (32).



Şekil 2.2. İntegrin Ligandları (33)

İntegrin $\alpha2\beta1$ ve $\alpha1\beta1$, kollajen I için reseptör görevi görerek retiküler laminanın stromaya bağlanmasını sağlar. Trombositlerin kollajen I tarafından yakalanmasında yine integrin $\alpha2\beta1$ reseptörü aracılık eder. Bu reseptörün yokluğunda trombozis ve inflamasyon artar. Fibronektinler ise içerdikleri RGD rezidüsü sayesinde (Arg-Gly-Asp), integrin $\beta1$ ve $\beta3$ varyantları tarafından tanınırlar. Fibronektinler, fibroblastlar tarafından salgılanır ve kollajenlere bağlanarak ekstrasellüler matriks stabilizasyonunda önemli rol oynarlar (34). Fibronektin bağlanması için birincil integrin reseptörü integrin $\alpha5\beta1$ 'dir. İntegrin $\alpha5\beta1$ aracılı fibronektin bağlanması hücre proliferasyonunun, adezyonun ve migrasyonun

regülasyonunda büyük önem taşır. İntegrin $\alpha 5\beta 1$ 'in sitozolik kuyruğuna bağlanan talinler, aktin aracılı hücre iskeleti ve integrin $\beta 1$ arasında mekanik bağlantı oluşumunu sağlarlar. Bu durum hücre içi integrin sinyalinin iletilmesi için önemlidir. İntegrinin sitozolik $\beta 1$ domaini, aynı zamanda fokal adezyon kinaz (FAK) aracılı İntegrin/Src/FAK hücre içi sinyal iletiminde de etkilidir (35). PDAC vakalarında integrin $\alpha 5\beta 1$ 'in ekspresyonunun arttığı ve onkojenik aktivite gösterdiği görülmüştür. Dolayısıyla artmış İntegrin $\alpha 5\beta 1$ ekspresyonu sonucunda, hücre içerisinde önce çok güçlü bir onkojenik protein olan Src'ı, takibinde ise FAK'yi fosforile ederek bu proteinleri aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (36). Normal hücrelerde hücre proliferasyonu ve Rho aracılı hücre iskeletinin dinamik yapısını kontrol eden Src/FAK sinyal yolağının aşırı aktif olması sonucu MMP-2, MMP-9 ve uPA sentezi artar, bu durum tümör mikroçevresinin parçalanarak tümör invazyonunu artmasına sebep olur (37).

2.3.2. Matriks Metalloproteinaz (MMP)

Ekzopeptidazlar proteinlerin uç kısmında yer alan aminoasitler arasındaki bağları yıkararak protein degradasyonu sağlayan enzim grubudur. Endopeptidazlar ise proteinlerin iç kısmındaki peptid bağlarını yıkararak proteinleri degrades eden enzim grubudur. Tripsin, kimotripsin, pepsin enzimleri endopeptidaz sınıfına dahildir. Matriks metalloproteinazlar (MMP)'da çinko ve kalsiyum bağımlı bir endopeptidaz ailesidir (38). İçerdikleri pro-domain, katalik bölge, fibronektin benzeri tekrarlar, hemopeksin domaini, sinyal dizileri, transmembran domain, GPI çapası bakımından 20'den fazla MMP kombinasyonu vardır. MMP'ler genel olarak fibroblast, endotelial hücreler, makrofaj ve lökositlerden üretilirler. Proenzim olarak üretilen MMP'ler proteolitik kırılma ile aktif forma dönüşür. Pro-MMP'nin aktif formdaki MMP'ye dönüşümü matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) tarafından düzenlenir. TIMP yapısında bulunan NH_2 grubu $\text{C}=\text{O}$ grubu ile MMP'lerin çinko domainine bağlanarak MMP'leri inhibe ederler. TIMP ve MMP arasındaki dengesizlik MMP aktivasyonunu artırır (39). Ekstrasellüler matriksin yapım ve yıkımında (turnover), kollajenlerin parçalanmasında, hücre ve hücrel mikroçevrenin morfolojik şekillenmesinde MMP'ler aktif rol oynar. PDAC'de MMP-2, MMP-7 ve MMP-9 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Sırasıyla jelatinaz A

ve Jelantinaz B olarak, MMP-2 ve MMP-9, sahip oldukları fibronektin benzeri yapıları sayesinde kollajen fibrillerine tutunarak bu fibrilleri parçalarlar MMP-2 ve MMP-9 tarafından parçalanan fibriller kollajen yapılanmasını gerçekleştiremezler. Böylelikle ekstrasellüler matriks degradasyonuna bağlı migrasyon, invazyon ve metastaz artar (40).

2.3.3. Kollajen

Ekstrasellüler matriksin en önemli komponentlerinden biri kollajenlerdir. İnsan vücudunda en çok eksprese edilen proteinlerden birisi olan kollojenler, üç polipeptid zincirinin sağa dönümlü olarak prolin ve glisin arasında kurulan bağlarla birleşmesi sonucu kollajen fibrillerinden meydana gelir. Kollajen genlerinden sentezlenen öncül kollajen iplikleri prolin 4-hidroksilaz, prolin 3-hidroksilaz, protein disülfid izomeraz enzimleri ile prokollajen formuna dönüşür. Burada prolin hidroksilazlar, polipeptidler arasında prolin- glisin bağları oluşumunu katalizler. Prokollajen oluşuktan sonra N-terminal ve C-terminal proteinazlar prokollajenin rezidülerini parçalar. Oluşan üçlü sarmal yapıya tropokollajen adı verilir. Tropokollajenlerin N-terminal ve C-terminal telopeptidleri birbirlerine lizil oksidaz enzimi ile bağlanarak kollajen fibrillerini oluşturur. Kollajenleri genel olarak fibriler yapıdaki kollajenler ve bağlantı formundaki kollajenler olarak ikiye ayırabiliriz (41). Tez çalışmamızda incelemiş olduğumuz Kollajen I, epitel dokuda yer alan fibriler kollajenler grubunda yer alır. Kollajen IV ise bağlantı formundaki kollajen sınıfında yer alır. Epitelyal mezenkimal geçişte Kollajen IV'in ekspresyonunun azaldığı, Kollajen I ekspresyonunun ise arttığı görülmüştür (42). Olivares ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kollajenden zengin desmoplazmik yapıda PDAC'de düşük besin ve düşük oksijen kondisyonlarında PDAC hücreleri kollajen yapısındaki prolin ve diğer aminoasitleri metabolize ederek hayatta kaldıkları görüldü. MMP'ler tarafından parçalanan Kollajen I ve Kollajen IV' lere ait prolinler sitrik asit döngüsüne (TCA) yönelerek tümör hücreleri tarafından besin kaynağı olarak kullanılır (43). Kollajen IV'ün bazal membranda oluşturduğu epitel hücreler ve endotelial hücreler arasındaki supramoleküler bağlantılar adezyon, migrasyon ve metastazı indükler. PDAC'de farklı kollajen tiplerinin, kanserde önemli moleküler mekanizmalar üzerindeki etkileri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Kollajen Tiplerinin PDAC hücrelerine Etkisi

Kollajen Tipi	PDAC hücrelerine etkisi	Artış (+)/Azalış (-)
Kollajen I	Apoptozis EMT FAK yolağı Histon asetiltransferazlar Migrasyon MMP Proliferasyon	- + + + + + +
Kollajen IV	Migrasyon Proliferasyon	+ +
Kollajen V	Adezyon Migrasyon Proliferasyon Canlılık	+ + + +
Kollajen XV	Migrasyon	+

2.3.4. Fibronektin

Fibronektinler ekstrasellüler matrikste yer alan protein gruplarından biridir. Hücre yüzeyinde bulunan integrin $\alpha 5\beta 1$, fibronektin için temel reseptördür. Bunun yanı sıra fibronektinler integrinlerin $\beta 1$ ve $\beta 3$ alt ünitelerini içeren integrin kombinasyonlarına da bağlanırlar. Fibronektin protein yapısında RGD rezidüsü, heparin domaini, fibrin domaini, N-bağlı proteoglikan domaini, O-bağlı proteoglikan domaini, peptid zincirleri arasında çapraz bağlantıların oluşumunu sağlayan izoglutamil lizin izopeptid dizisi, sekonder protein yapısının oluşması için disülfid dizileri bulunur. Fibronektinler, genel olarak plazma fibronektinleri ve hücreSEL fibronektinler olarak ikiye ayrılmaktadır. Plazma fibronektinleri hepatositlerden tarafından sentezlenirken, hücreSEL fibronektinler fibroblast, endotelyal hücreler, miyosit ve kondrositler tarafından sentezlenir (44). Löhr ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Panc-1 hücrelerinde görülen fibronektik doku gelişimine bağlı desmoplazinin oluşumunda TGF- β aracılı fibronektin üretiminin arttığı görülmüştür (45).

2.4. Başkalaşım Kümesi (Cluster of Differentiation, CD)

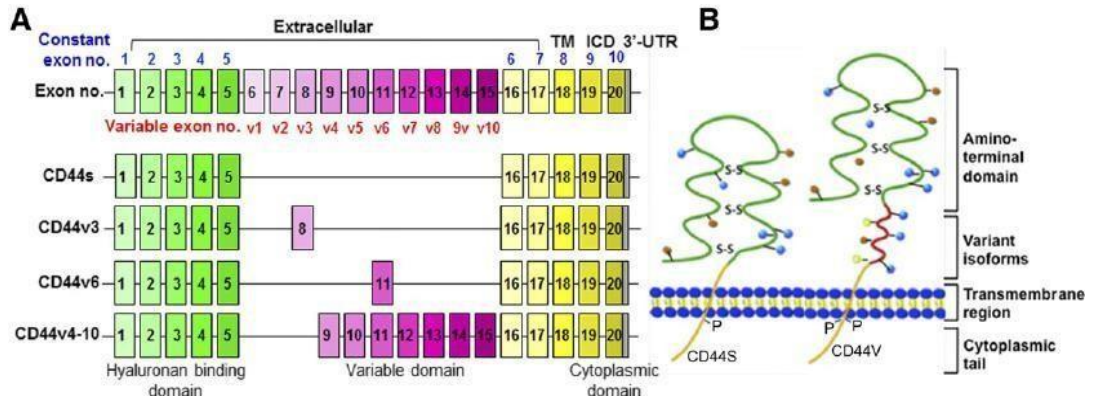
Başkalaşım kümeleri anlamına gelen “Cluster of Differentiation (CD)” antijenleri, fizyolojik olarak hiçbir gruba dahil edilemediğinden kendilerine ait grupları vardır. CD’ler, hücre yüzeyinde yer alan hücre yüzey reseptörleri olup

reseptör, ligand, adezyon molekülü gibi birçok fonksiyona sahiptirler. Moleküler veri toplanması ve hücre çeşitlerinin immünofenotiplendirilmesinde CD'lerin hücre spesifik ekspresyonlarından yararlanır. Bugüne kadar insan hücrelerinde 400'den fazla CD antijeni tanımlanmıştır (46). Bazı CD antijenleri lenfosit göçü, T hücreleri aktivasyonu, immün hücrelerinin başkalaşımı, sinyal iletimine bağlı hücre davranışının düzenlenmesinde görev alırken hücre adezyonu, migrasyon, invazyon ve hücre inhibisyonunda görev alan CD antijenleri de bulunur. Sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T hücreleri olarak iki gruba ayrılan T hücrelerinin karakterizasyon ve saflaştırılmasında CD ekspresyon farkından yararlanır. Sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T hücrelerinin her ikisinde CD2, CD3, HLA-DR (CD45), CD28, TCR reseptörleri bulunurken; sitotoksik T hücrelerinde ayrıca CD8 reseptörü, yardımcı T hücrelerinde ise ayrıca CD4 reseptörü yer alır. CD8 ve CD4 antikoru kullanılarak bu iki T hücresi birbirinden ayırt edilebilir (47). Mezenkimal kök hücrelerin tespit edilmesinde ise CD105 antijeni belirteç olarak kullanılır (48). Nükleus içeren hücreler viral yolla enfekte olduklarında yüzeylerinde yer alan MHC I reseptörlerine patojen virüse ait bir peptid dizisini yükleyerek patojen virüsü sitotoksik T hücrelerine CD reseptörleri ile tanıtır, antijen sunan B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler ise yüzeylerinde yer alan MHC II reseptörleriyle dolaşımda bulunan ekzojenik patojenleri tespit ederek sitotoksik T hücrelerine CD reseptörleri aracılığı ile tanıtır. İmmün sistem hücrelerinin birbiriyle haberleşmek için kullandığı interlökin olarak adlandırılarak sitokinler, hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını, B hücrelerinin hafıza regülasyonu ve göç etmesini sağlarlar (49). İnterlökinler için reseptör görevi CD'ler tarafından gerçekleştirilir. Diğer taraftan adezyon, migrasyon, invazyon ve hücre inhibisyonu düzenlenmesinde görev alan CD'lerin doku ve organ düzeylerinde ekspresyonu farklılık gösterebilir. Li ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir çalışmada pankreatik kanser kök hücrelerinin kimliğinin tanımlanması için CD44, CD24, Epitelyal Spesifik Antijen (ESA) antijenlerin kullanıldığı görülmüştür (51). Bu çalışmada CD44+/CD24-/ESA+ olarak oluşturulan insan PDAC tümör modellerinin farelere enjekte edilmesiyle xenograft farelerde meme metastazına sahip PDAC'nin geliştiği gözlenmiştir. CD44+/CD24+/ESA+ üçlü pozitif PDAC tümör modelinin enjekte edildiği xenograft modellerinde ise non-tümorojenik xenograft modellerine göre tümöral potansiyelin 100 kat arttığı

saptanmıştır (50). Yapılan tez çalışmamızda, metastatik potansiyeli olan PDAC karakterindeki Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında, CD44 aracılı ekstrasellüler matriks degradasyonunu integrin $\alpha 5\beta 1$, fibronektin, kollajen parametreleri üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır.

2.4.1. CD44

CD44 antijeni glikoprotein yapıda hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşiminde rol oynayan non-kinaz yapıda Tip 1 transmembran proteinidir. Genomda 11p13 lokusunda yer alan 20 ekson içeren CD44 geninden sentezlenen çok sayıda CD44 izoformu bulunmaktadır. Alternatif kırılma mekanizmaları ve post-translasyonel modifikasyonlarla CD44 izoformları oluşur (Şekil 2.3). CD44 antijeni ekstrasellüler domain, transmembran domain, sitoplazmik uç olmak üzere 3 kısımdan oluşur. CD44 geninin 6. ve 15. eksonlarının alternatif kırılmasıyla ekstrasellüler domain varyantları oluşur. 18, 19 ve 20. eksonlar ise sitoplazmik domaini kodlar (51). CD44'ün birincil ligandı hyaluronan/hyaluronik asittir. Bunun yanı sıra ekstrasellüler domain varyantlarına göre laminin, osteopontin, kollajen, fibronektin de CD44 reseptörü için ligand olabilir. CD44'e ait ekson 3'ün kırılıp, Ser-Gly dipeptid tekrarlarıyla modifiye edilmesi sonucu fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) de CD44'e bağlanabilir (52).



Şekil 2.3. Alternatif kırılma mekanizması sonucu oluşan CD44 varyantları (53)

Pankreatik kanser kök hücre belirteci olarak bilinen CD44'ün PDAC'de ekspresyonunun artmaktadır (54). CD44 hücre adezyonu, migrasyon ve metastazı indükler.

Xiao-pang Li (2015) ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada CD44'ün PI3K/Akt ve MAPK/ERK sinyal yolu aracılığıyla PDAC'de metastaz ve anjiyogenezi indüklediği görülmüştür. Yine aynı çalışmada CD44+ hastaların, CD44- hastalara göre 10-12 ay daha kısa süre hayatta kaldığı verisi yer almaktadır (55).

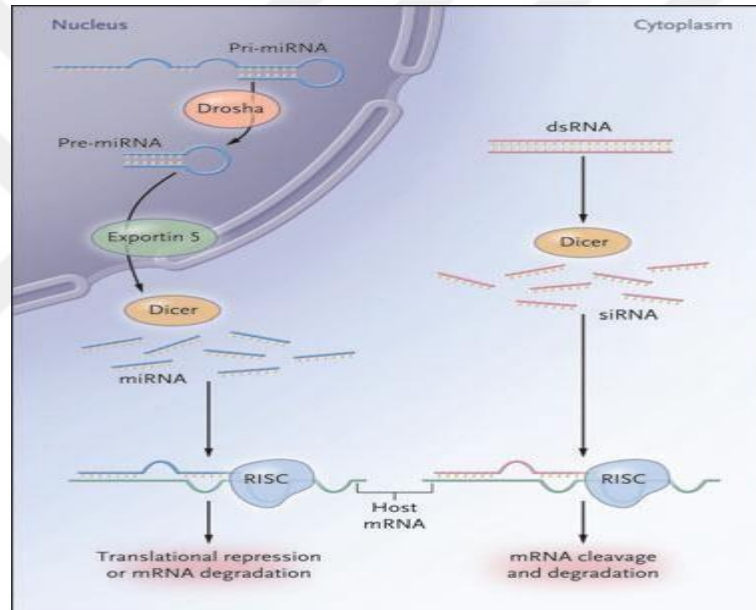
Zhao ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan BxPc3, Capan-2, MiaPaca-2, CFPAC-1, Panc-1, AsPc-1 hücre hatları kullanılarak yapılan farklı bir çalışmada ise düşük CD44 seviyesine sahip PDAC hücrelerinin gempitabine duyarlı olduğu invaziv kapasitesinin düşük olduğu görülmüştür. Yüksek CD44 seviyesine sahip PDAC hücrelerinde ise gempitabin direncinin geliştiği, invaziv kapasitenin arttığı ve mezenkimal fenotipe geçişin indüklendiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada PDAC hücre hatlarında CD44 izoformlarının ekspresyonları değerlendirilmiş. Major olarak CD44s izoformunun ekspresyonunun arttığı, minor olarak da CD44v3 ve CD44v6 izoformlarının arttığı görülmüştür (56).

2.5. Küçük interferans RNA (siRNA)

Viral enfeksiyona karşı bitkilerin geliştirdiği defans mekanizmalarının aydınlatılmasıyla keşfedilen siRNA'lar, çok kısa bir zamanda gen ekspresyonunun susturulmasına dair bilimsel çalışmalarda kendisine geniş bir yer buldu. Hedeflenen mRNA dizisine homoloji gösteren siRNA'lar, bağlandıkları mRNA'ların degradasyonuna neden olarak post-transkripsiyonel düzeyde gen susturulmasını sağlarlar. Hücre içine giren çift iplikli RNA (dsRNA)'lar, RNaz-III ribonükleaz enzim grubunda yer alan Dicer II tarafından 19-25 nükleotidlik siRNA'lara parçalanır. 19-25 nükleotid uzunluğundaki siRNA'lar, ATP bağımlı Dicer enziminin helikaz aktivitesi sayesinde sense ve anti-sense olmak üzere iki ipliğe ayrılırlar. mRNA'ya komplementer olan anti-sense iplik RNA ile indüklenen susturucu kompleks (RISC) tarafından tanınarak endonükleaz aktivitesi olan Argonaut proteini tarafından işlenir. RISC kompleksiyle beraber, mRNA'ya bağlanan anti-sense iplik gen susturulmasını sağlar (Şekil 2.4). Sentetik olarak üretilen siRNA'ların eksojen olarak hücre içine lipozomal transfeksiyon ajanı ile verilmesiyle RISC kompleksi tarafından tanınması gerekmektedir. Bu sebeple sentetik siRNA'ların 3'OH⁻ ucuna eklenen 2 nükleotidlik overhang yapıları, RNaz-III Ribonükleaz tarafından tanınır.

İdeal siRNA uzunluğu 20-25 nükleotid arasında olmalıdır. Çünkü bu uzunluktan daha kısa olan siRNA'ların birden fazla mRNA'ya bağlanma ihtimali artar. 20-25 nükleotidden daha uzun siRNA'lar ise hem hücreye eksojen yolla girmekte zorlanmakta hem de hücre içi interferonlar tarafından bir tehdit olarak algılanmaktadır (57).

Yapılan tez çalışmamızda; Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44'ün ekstrasellüler matriks yıkımı üzerindeki rolünün moleküler anlamda aydınlatılması amacıyla CD44 geni, CD44'e spesifik siRNA ile susturularak ekstrasellüler matriks bileşenlerinden integrin $\alpha5\beta1$, fibronektin ve Kollajen IV'ün ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 2.4. Ökaryotlarda siRNA işleme prosedürü (57)

2.6. PDAC Tedavisinde siRNA'nın Yeri

PDAC'de birtakım klinik çalışmalarda siRNA'lar onkogen inhibisyonu, anjiyogenez faktörleri, büyüme faktörleri ve tümör gelişimi esnasında aşırı eksprese olan reseptörleri kodlayan genleri susturmak için kullanılmaktadır. siRNA'ların kan dolaşımında yıkıma uğramadan hedeflenen bölgeye ulaşabilmesi için PEG, folat reseptörü, aptamerler, altın kolloidler, süperparamanyetik boncuklar, tripeptidler ile kovalent olarak modifiye edilmiş nanolipozomlar ve miçeller kullanılmaktadır. siRNA'lar direkt olarak DNA'ya bağlanmadığından dolayı yeni mutasyon oluşturma

riski olmadığı için güvenlidir ve yüksek gen susturma özelliğine sahiptir. siRNA'ların klinikte kullanılabilmesi için faz çalışmaları devam etmektedir (58).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneysel aşamaları Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Hücre Kültürü/Western Blot/PCR laboratuvarında yapılmıştır. Yapılan deneyler ve kullanılan prosedürler ile ilgili detaylı bilgi aşağıda açıklanmıştır.

3.1. Hücre Kültürü

Pankreas kanseri hücre hatları olan Panc-1 ve MiaPaCa-2, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Ertan Küçükşayan tarafından hediye edilmiştir.

Kullanılan Solüsyonlar

- Serum: Fetal Sığır Serumu (FBS) kullanıma hazır halde steril şişe içerisinde Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) firmasından temin edildi. Kullanım süresince -20 °C'de saklandı.

- Antibiyotik: Penisilin/Streptomisin antibiyotik solusyonu kullanıma hazır halde steril şişe içerisinde Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) firmasından temin edildi. Kullanım süresince -20 °C'de saklandı.

- Besiyeri: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) kullanıma hazır halde steril şişe içerisinde Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) firmasından temin edildi. Kullanım süresince +4 °C'de saklandı.

- Tripsin Etilen Diamin Asetik asit (Tripsin-EDTA) (%0,25), 1x fosfat tamponlu tuz (PBS) solusyonları kullanıma hazır halde steril şişe içerisinde Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) firmasından temin edildi.

- DimetilSülfoksit (DMSO) ve Tripan Mavisi (%0,4) solusyonları kullanıma hazır halde Sigma (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edildi.

Hücrelerin Üretilmesi:

PDAC hücreleri olan Panc-1 ve MiaPaCa-2, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin varlığında DMEM/F12 besiyerinde 37 °C sıcaklık, %95 nem, %5 CO₂ içeren standart hücre kültürü şartlarında inkübatör içerisine steril olarak

kültüre edildi. Hücreler, buldukları steril flasklarda %80 yoğunluğa ulaştıklarında yeni bir steril flaska aktarılıp pasajlandı. Bu amaçla steril 1xPBS ile yıkanan hücreler, Tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flasktan kaldırılarak DMEM/F12 besiyeri içerisinde yeni bir flaska eşit olarak paylaştırıldı.

Hücrelerin Dondurulması:

Tripsin-EDTA çözeltisi ile flask yüzeyinden koparılan hücreler, DMEM/F12 besiyeri içerisinde 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve takibinde tripsin-EDTA'nın uzaklaştırılması amacıyla 1500xg hızda, 25 °C'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Üstte kalan fazın uzaklaştırılmasından sonra kalan hücre peletine, hücre dondurmak için özel olarak taze hazırlanmış %20 FBS ve %7 DMSO içeren DMEM/F12 besiyeri eklenerek hücreler 1,5 ml olacak şekilde dondurma tüplerine aktarılıp önce -20 °C'de, sonra -80 °C'de ve en son da sıvı nitrojen içerisinde saklandı.

3.2. siRNA Transfeksiyonu

Prensip: 20-21 nükleotid uzunluğundaki siRNA, hücreye aktarılmasını takiben komplementeri olduğu ilgili mRNA'ya bağlanarak bu mRNA'nın parçalanmasına neden olur. Böylelikle hedef proteinin translasyonu engellenerek gen susturulur. Yapılan tez çalışmamızda, CD44 mRNA'sına komplementer olarak bağlanarak CD44 mRNA'nın parçalanmasını sağlayan özel dizilimli CD44 siRNA ve ayrıca kontrol amacıyla herhangi bir mRNA'ya komplementer olarak bağlanmayan negatif siRNA kullanıldı. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, bu siRNA'lar ile hiperfekt varlığında transfekte edildi.

Kullanılan Solusyonlar:

- CD44 siRNA ve negatif siRNA, Life Technologies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) firmasından temin edildi.

- Hücrelerin siRNA ile transfekte edilmesi için kullanılan Hiperfekt reaktifi, Qiagen (Hilden, Germany) firmasından temin edildi.

Prosedür: Liyofilize olarak temin edilen 5 nmol konsantrasyonuna sahip CD44 siRNA ve negatif siRNA, yine firma tarafından siRNA'lar ile beraber temin edilen nükleazdan yoksun su içerisinde final konsantrasyonu 50µM olacak şekilde

resüspanse edildi. Bu stok solüsyon, hücre canlılığı/sitotoksisite, RT-PCR, western blot ve migrasyon deneylerinde kullanıldı.

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin CD44 siRNA veya negatif siRNA ile transfeksiyonunda aşağıda belirtilen prosedürler uygulandı.

Sitotoksisite (Hücre Canlılığı) Testi için siRNA Transfeksiyonu Prosedürü:

- Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri siRNA ile transfekte edilmek üzere ayrı ayrı 96 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başı %30 hücre yoğunluğu olacak şekilde aktarıldı.

- Ependorf tüp içerisinde; serumsuz DMEM/F12 besiyeri, final konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde CD44 siRNA ve negatif siRNA ve son olarak hiperfekt reaktifi karıştırılarak, bu karışım 25 dakika boyunca oda ısısında laminar flow kabin içerisinde inkübe edildi.

- 96 kuyucuklu kültür kaplarında Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM CD44 siRNA ve 50 nM negatif siRNA ile transfekte edildi. Ayrıca siRNA içermeyen örneklem de kullanıldı. Transfekte edilen hücreler 8 saat süreyle %95 nem, %5 CO₂, 37 °C sıcaklık şartlarındaki inkübatörde bekletildi.

- Sürenin bitiminde kuyucuklardaki serum içermeyen besiyeri uzaklaştırılarak, kuyucuklara 2X serum içeren besiyeri eklendi. Hücreler toplamda 72 saat süreyle steril ortamda inkübe edildi. Ayrıca hücrelerin hiçbir muameleye uğramadığı kontrol grubu için hücreler, sadece besiyeri içerisinde aynı şartlarda inkübe edildi.

RT-PCR ve Western Blot Deneyi İçin siRNA Transfeksiyon Prosedürü:

- Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri siRNA ile transfekte edilmek üzere ayrı ayrı 6 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başı %30 hücre yoğunluğu olacak şekilde aktarıldı.

- Ependorf tüp içerisinde; serumsuz DMEM/F12 besiyeri, final konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde CD44 siRNA ve negatif siRNA ve son olarak hiperfekt reaktifi karıştırılarak, bu karışım 25 dakika boyunca oda ısısında laminar flow kabin içerisinde inkübe edildi.

- Süre sonunda, 6 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücelere karışım eklenerek siRNA ile muamele edilmesi için hüceler, 72 saat süresince inkübatörde bekletildi. Ayrıca hücrelerin hiçbir muameleye uğramadığı kontrol grubu için hüceler, sadece besiyeri içerisinde aynı şartlarda inkübe edildi.

3.3. Sitotoksisite (Hücre Canlılığı) Testi

Prensip: Panc-1 ve MiaPaCa-2 hüceleri üzerinde CD44 siRNA'nın sitotoksik etkisini değerlendirmek için MTS-PMS hücre canlılığı/sitotoksisite testi yapıldı. Bu yöntemin dayandığı temel prensip; suda çözünmeyen tetrazolyum tuzunun [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum] (MTS), fenazin metosülfat (PMS) varlığında elektron taşıyıcılığı yapan hücre içi dehidrogenazlar tarafından suda çözünebilir formazana dönüştürülmesidir. Canlı hücrelerde aktif olan dehidrogenazlar, MTS'yi formazana dönüştürürler. Formazan yoğunluğuna bağlı olarak oluşan kahverengi rengin absorbans değeri, 490 nm dalga boyunda spektrofotometre aracılığı ile ölçülür.

Deney prosedürü: Steril flasklarda kültüre edilen Panc-1 ve MiaPaCa-2 hüceleri, Tripsin-EDTA yardımıyla flask yüzeyinden kaldırılarak 600xg, 25 °C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Besiyeri ile resüspanse edilen hüceler tripan mavisi ile thoma lamında sayılarak her bir kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına bölüştürüldü. Hücrelerin yüzeye yapışması için 96 kuyucuklu kültür kapları gece boyunca inkübatörde bekletilerek, final konsantrasyonu 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM olan CD44 siRNA'lar ve final konsantrasyonu 50 nM olan negatif siRNA ile transfekte edilerek 72 saat süre ile inkübe edildi (Şekil 3.1). 72 saatlik sürenin bitiminde kültür kaplarında oluşan kahverengi rengin absorbansı 490 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
Negatif siRNA 50 nM	Negatif siRNA 50 nM	Negatif siRNA 50 nM	Negatif siRNA 50 nM	Negatif siRNA 50 nM	Negatif siRNA 50 nM
25 nM CD44 siRNA	25 nM CD44 siRNA	25 nM CD44 siRNA	25 nM CD44 siRNA	25 nM CD44 siRNA	25 nM CD44 siRNA
50 nM CD44 siRNA	50 nM CD44 siRNA	50 nM CD44 siRNA	50 nM CD44 siRNA	50 nM CD44 siRNA	50 nM CD44 siRNA
75 nM CD44 siRNA	75 nM CD44 siRNA	75 nM CD44 siRNA	75 nM CD44 siRNA	75 nM CD44 siRNA	75 nM CD44 siRNA
100 nM CD44 siRNA	100 nM CD44 siRNA	100 nM CD44 siRNA	100 nM CD44 siRNA	100 nM CD44 siRNA	100 nM CD44 siRNA

Şekil 3.1. Hücrelerin sitotoksosite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı

3.4. RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi

Deney Prensipli: Hücre hatlarından elde edilen RNA'lerden, retrovirüs kaynaklı ters transkriptaz enzimi yardımı ile tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenir. CD44 ve İntegrin beta-1 genlerine özgü primerler aracılığı ile analiz edilmek istenen DNA fragmentleri polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) reaksiyonları ile çoğaltılır. Çoğaltılan spesifik gen bölgeleri, Syber green fluoressan boya varlığında agaroz jel elektroforezinde görüntülenir.

Kullanılan Kit ve Solusyonlar

- Trizol reaktifi, DNA Ladder ve Platinyum Taq DNA polimeraz kiti (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

- Yüksek kapasiteli cDNA sentez kiti (Applied Biosystem, Lithuania)

- 1-bromo 3-kloropropan (BCP) (Sigma-St.Louis, MO, USA)

- İzopropanol ve absolut etanol (Sigma-St.Louis, MO, USA)

- Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu: 54 gr Tris Baz, 27,5 gr Borik asit ve 20 ml 0,5M EDTA kullanılarak 10x'lik 500 ml stok solusyonu hazırlanmıştır. Kullanım için 1x final konsantrasyonuna dilue edilen TBE tamponu, PCR sonrası agaroz jel elektroforezi için kullanılmıştır.

- CD44 ve İntegrin β 1 genlerine ait spesifik primerler, Doç. Dr. Nilgün Gürbüz tarafından <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ve

<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> sitesinde bulunan veritabanları kullanılarak dizayn edildi. Dizayn edilen primer dizilimleri, dimer ve saç tokası (hairpin) oluşturma ve çapraz bağlanma gibi özellikleri açısından kontrol edildi. CD44 ve İntegrin β 1 genlerine ait spesifik primerler dizilimleri Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. Primer Dizilimleri

CD44 için Spesifik Primer Dizilimi:
Forward: 5’ GTA CAT CCT CAC ATC CAA CAC CTC 3’ Reverse: 3’ TGC TCC ACC TTC TTG ACT CCC 3’
İntegrin β1 için Spesifik Primer Dizilimi:
Forward: 5’ CCT ACT TCT GCA CGA TGT GAT G 3’ Reverse: 3’ CCT TTG CTA CGG TTG GTT ACA TT 3’

Primerlerin Stok Olarak Hazırlanması: Belirlenen CD44 ve İntegrin β 1 primer dizilimleri, Life Technologies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) firması tarafından sentezlenip liyofilize bir şekilde tarafımıza gönderildi. İçerdikleri baz dizilerinin farklı olması sebebi ile farklı nmol değerlerine sahip olarak gelen primerler, 100 μ M ana stok çözeltisi elde edilecek şekilde DNaz/RNaz içermeyen su ile resüspanse edildi. Deneylerde kullanılmak üzere 100 μ M ana stok çözeltisinden 10 μ M ara stok çözeltisi hazırlandı.

3.4.1. Hücre Gruplarının Hazırlanması ve RNA İzolasyonu

Steril flasklarda kültüre edilen Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, Tripsin-EDTA kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılarak hücre peleti elde etmek amacıyla hücre süspansiyonu 600xg ve 25 $^{\circ}$ C’de, 8 dakika süresince santrifüj edildi. Besiyeri ile resüspanse edilen hücreler, her bir kuyucukta %30 hücre yoğunluğu bulunacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına bölüştürüldü. Yüzeye yapışması için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler, final konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde ertesi gün negatif siRNA veya CD44 siRNA ile transfekte edilerek inkübatörde hücre kültürü şartlarında 72 saat süresince inkübe edildi.

- 72 saat sonunda hücrelerin bulunduğu kuyucuklara 1 ml Trizol eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Steril ependorflara aktarılan hücre süspansiyonuna, 200 μ l BCP eklenerek RNA’nın izolasyonu için faz ayırımı

sağlandı. Hücrelerin, 12000xg'de ve +4 °C'de 15 dakika süresince santrifüj edilmesi sonucunda en üstteki RNA'yı içeren renksiz faz dikkatli bir şekilde alınarak yeni steril bir ependorf tüpe aktarıldı.

- RNA'yı içeren fazın üzerinde, RNA'nın çöktürülmesi amacıyla 500 µl izopropanol eklenerek 12000xg, 4°C'de 8 dakika süresince santrifüj edildi Santrifüj sonucunda süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen RNA peletinin üzerine RNA'nın saflığını arttırmak amacıyla 1 ml %75'lik etanol eklendi. 7500xg, 4 °C'de 5 dakika süresince santrifüj sonucunda elde edilen RNA, DNaz/RNaz içermeyen su ile resüspanse edilerek 58 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

- Elde edilen RNA'nın, hem miktarının hem de saflığının ölçülmesi amacıyla, 1 µl RNA örneğinin 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri nanodrop spektrofotometre cihazında (Thermo, Multiskan) tespit edildi. A260 değeri konsantrasyonu (ng/µl), A260/A280 oranı ise saflığı ifade etmekte olup 1,7-1,95 oran aralığına sahip örnekler RT-PCR için kullanıldı.

3.4.2. cDNA Sentezi

Bu amaçla, yüksek kapasiteli cDNA ters transkripsiyon sentez kiti (Applied Biosystem, Lithuania) kullanılmış olup, kitin protokolü uygulanmıştır. Bu kapsamda;

- 1 µg RNA örnekleri; total hacim 20 µl olacak şekilde 1x PCR tamponu, RNaz inhibitörü, 1x dNTP karışımı, ters transkriptaz enzimi, 1x Random primer DNaz/RNaz içermeyen su varlığında aşağıda belirtilen cDNA sentez reaksiyonlarına tabi tutuldu. Elde edilen cDNA ürünleri PCR kullanıldı.

- 25 °C' de 10 dakika

-37 °C' de 120 dakika

- 85 °C'de 5 dakika olmak üzere 3 aşamalı program uygulandı.

3.4.3. PCR Analizi ve Görüntüleme

Her bir örnek için sentezlenen cDNA'lar, Taq DNA polimeraz enzimi, MgCl₂, 1x PCR buffer, 10µM dNTPmix, forward primer, reverse primer ve Dnaz/RNaz içermeyen su varlığında final hacim 25 µl olacak şekilde 200 µl santrifüj

tüplerinde hazırlandı. Hazırlanan karışım aşağıda belirtilen PCR reaksiyon şartlarına tabi tutularak gen amplifikasyonu sağlandı.

- 94 °C' de 2 dakika
- 94 °C' de 30 saniye
- 55 °C' de 45 saniye 35 döngü
- 72 °C' de 1 dakika
- 72 °C' de 5 dakika

Elde edilen PCR ürünleri, final konsantrasyonu 1x olan örnek yükleme tamponu içerisinde hazırlanarak, 1x TBE tamponu varlığında %2'lik agaroz jelde görüntülendi. DNA belirteci olarak TrackIt DNA Ladder 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eşliğinde, 90 V'luk elektriksel akımda 35-45 dakika yürütülen PCR örnekleri, Sybergreen flüoresan boyanın kullanıldığı Blook LED Transillüminatör (Genedirex, MiaoliCounty, Taiwan) cihazında görüntülendi. Elde edilen bantların miktarı, Image J-Versiyon 1.52 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı ile kuantifiye edildi.

3.5. Western Blot Analizi

Kullanılan Solüsyonlar:

- Hücre lizis tamponu: Kullanıma hazır olarak Promega (Madison, WI, USA) firmasından temin edildi.

- Proteaz/Fosfataz İnhibitör Kokteyli: 100x stok konsantrasyonuna sahip proteaz/fosfataz inhibitör kokteyli hücre lizis tamponuyla dilüe edilerek 1x final konsantrasyonunda kullanıldı. Proteaz/fosfataz inhibitör kokteyli Thermofisher Scientific (Rockford, IL, USA) firmasından temin edildi.

Deney Prosedürü:

- Steril flasklar içinde kültüre edilen Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri laminar flow kabin içerisinde Tripsin-EDTA çözeltisi yardımıyla flask yüzeyinden kaldırılarak, 15 ml'lik tüpler içerisine konuldu. Elde edilen süspansiyonlar 600xg, 25°C' de 8 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre peletleri besiyeri ile resüspanse

edilerek her bir kuyucukta %30 yoğunluk olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına bölüştürüldü.

- Yüzeye yapışabilmesi için bir gece boyunca 37 °C, %95 nem, %5 CO₂ şartlarında inkübatörde bekletilen hücreler; serumsuz DMEM/F12 besiyeri ve hiperfekt reaktifi varlığında final konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde CD44 siRNA veya negatif siRNA ile 72 saat süresince transfekte edildi.

-Süre sonunda Tripsin-EDTA yardımıyla kuyucuklardan alınan hücreler, 1x PBS ile yıkanarak elde edilen hücre peletlerinin miktarına göre 50-100 µl arası hacimlerde protez/fosfataz inhibitör kokteyli içeren hücre lizis tamponu eklendi. Hücrelerin, 10000xg, +4 °C'de 10 dakika santrifüjü sonucunda sitozolik proteinleri içeren süpernatant alınarak steril yeni ependorf tüplere aktarıldı.

- İmmunoblot deneylerinde kullanılacak olan süpernatant örneğinde protein miktar tayini yapıldı.

3.5.1. Protein Miktarı Analizi

Prensip: Hücrelerdeki proteinlerin miktar tayini, Bradford yöntemiyle ölçüldü. Bradford yönteminde kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası molekülleri proteinin var olduğu asidik ortamda kırmızı renkten mavi renge döner. Boya eşlenmemiş elektronlarını proteinin hidrofobik bölgelerine verir. Proteinlerin hidrofobik bölgeleri ile eşleşen boyanın apolar kısımları arasında van Der Waals etkileşimleri oluşur. Oluşan kompleks mavi renkli olup, protein miktarı arttıkça mavi rengin şiddeti de artar. Bu mavi renk 595 nm'de maksimum absorbanans vererek protein miktarı tayini yapılır (59)

Kullanılan Solüsyonlar

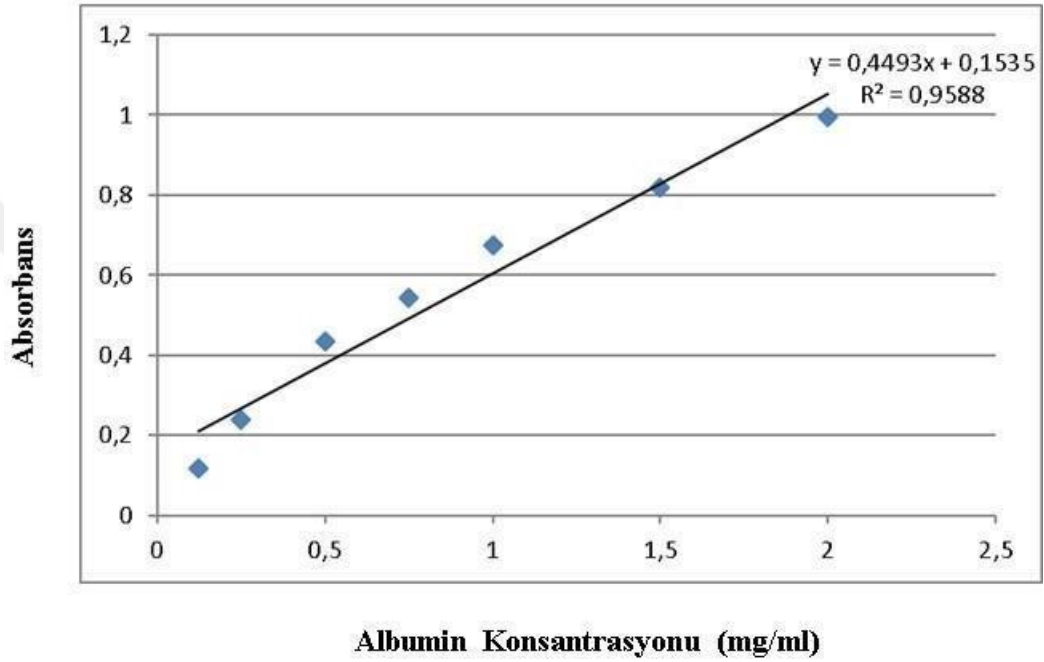
-Bradford Protein analiz kiti (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Deney Prosedürü

- Bradford Protein analiz kiti içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mg/ml konsantrasyonlarında albumin solüsyonları protein standartları olarak kullanıldı. 5 µl albümin standartları ve 5 µl hücre örnekleri (dublik), 250 µl Bradford reaktifi ile 5 dakika süresince oda ısısında muamele

edilerek oluşan mavi rengin şiddeti 595 nm dalga boyunda multiplate reader cihazında (Thermo, Multiskan) tayin edildi. Albumin standartlarına göre elde edilen standart grafiği olarak, her bir protein analizi için eş zamanlı olarak anlık elde edilen protein standart grafikleri kullanılmış olup R^2 değeri 0,95 ve üzeri olan standart grafikleri örneklerdeki proteinlerin hesaplanmasında kullanıldı (Şekil 3.2).

Protein Standart Grafiği



Şekil 3.1. Bradford yöntemine göre elde edilen standart grafiği

3.5.2. Immunoblot Analizi

Negatif siRNA veya CD44 siRNA ile transfekte edilmiş Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinden elde edilen protein örnekleri kullanılarak fibronektin ve kollajen IV protein ekspresyonlardaki değişim immunoblotlama ile gösterilmiştir.

Prensip: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlanır. SDS kullanımı sayesinde proteinlerin 3 boyutlu yapısı bozularak konformasyonel bağları kırılır ve aynı zamanda proteinler eksi yük ile yüklenir. Böylelikle elektriksel ortamda katottan anota hareket etmeleri sağlanmış olur. Poliakrilamid jel, pH'ları ve akrilamid/bisakrilamid yüzdeleri farklı olan toplama jeli ve ayrışma jelinden oluşur.

Toplama jelinin kullanım amacı, proteinlerin göçe eşit seviyede ve aynı zamanda başlamasıdır. Ayırışam jelinde ise por çapı daha küçük olduğu için proteinler belirgin bantlar oluşturacak şekilde moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlanır. Daha sonra moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, polivinilidin florür (PVDF) membrana aktarılarak membran ilk önce primer antikorlar ile, sonrasında ise alkalin fosfataz (AP) bağlı sekonder antikorlar ile muamele edildi. Elde edilen bantlar BCIP/NBT reaktifi varlığında PVDF membran üzerinde kolorimetrik olarak görüntülendi.

Kullanılan Kit ve Solüsyonlar

- Elektroforez Tamponu: 1L distile su içerisinde 15 gr Tris, 5 gr SDS, 72 gr glisin çözünerek 5x konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok tamponu elektroforez öncesinde taze olarak 1x final konsantrasyonuna dilüe edilerek kullanıldı.

- Blotlama Tamponu :1 L distile su içerisinde 30,3 gr Tris, 144 gr glisin ve 10 gr EDTA çözülerek 10x konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Kullanıma hazır hale getirmek için solusyon 1x final konsantrasyona dilüe edildi.

-Tris Buffered Saline (TBS-T) (%0,1 Tween 20): 1 L distile su içerisinde 31,5 gr Tris-HCL ve 80 gr NaCl çözülerek 10x konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiye %0,1 oranında Tween-20 eklenerek 1x TBS-T final konsantrasyonunda çözelti elde edildi.

- 20 ml 1x TBS-T içerisinde 1 gr yağsız süt tozu kullanılarak %5 bloklama solüsyonu elde edildi.

- Santa Cruz Biotechnology (Dallas, CA, USA) firmasından temin edilen primer ve antikorlar, %5'lik yağsız süt tozu içeren 1x TBS-T içerisinde 1:100 oranında dilüe edildi.

- Sekonder antikor (Cell Signaling, Leiden, Netherlands), primer antikorun orjinine uygun olarak anti-rabbit ve AP ile konjuge edilmiş özellikte olup 1:2000 oranında %5 yağsız süt tozu içeren 1x TBS-T içerisinde hazırlandı.

- 150 mM Tris-HCL (pH 6,8), 300 mM DTT, %6 SDS, %30 gliserol, %0,3 bromfenol mavisi içeren 3x SDS-PAGE yükleme tamponu (Biovision, Milpitas, CA, USA)

-Methanol (Merck, Darmstadt, Germany)

Deney prosedürü

- Elektroforez tankına yerleştirilen %4-15 gradiyentine sahip Tris-HCL poliakrilamid hazır jel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) elektroforez tankına yerleştirilerek tank, 1x elektroforez tamponu çözeltisi ile doldurulmuştur.

-Her bir kuyucuğa yüklenmek üzere, 3x yükleme tamponu ile karıştırılan 40 µg protein örnekleri kuru ısı bloğunda 95 °C' de 5 dakika inkübe edildi. Jelin ilk kuyucuğuna protein belirteci olarak Kaleidoscope Prestained standartı (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), diğer kuyucuklara ise 40 µgram protein içerecek şekilde 40 µl hacminde örnekler yüklendi.

- Toplama jelinde örneklerin yürütülmesi için 80 V' luk akım uygulandı. Ayrışma jelinde ise bu akım 120 V'a arttırılarak proteinlerin elektriksel ortamda molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlandı.

- PVDF membran metanol içerisinde 2-3 dakika bekletilerek rehidrate edildi ve 2-3 dakika distile su içerisinde bekletilerek protein transferine hazır hale getirildi.

- Elektroforez bitiminde plakalar arasında bulunan jel 1x transfer tamponu içerisinde sandviç aparatı yardımıyla sandviçlenmeye başlandı.

- Sandviç aparatının içi katottan anota doğru sırasıyla sünger, blotlama kağıdı, jel, PVDF membran, blotlama kağıdı ve sünger üst üste gelecek şekilde yerleştirilerek aparat sıkıca kapatıldı. Jeldeki proteinlerin katottan anota doğru PVDF membrana transfer edilmesi için transfer tankı metanol içeren 1x transfer tamponu ile dolduruldu ve içerisine sandviç aparatı yerleştirildi. 4 °C' de 80 V'luk akımda 4,5 saat transfer işlemi gerçekleştirildi.

- Transfer sonrasında proteinleri üzerinde bulunduran PVDF membran, spesifik olmayan antikor bağlanmalarının engellenmesi için oda sıcaklığında 1 saat süreyle %5'lik bloklama solüsyonunda bekletildi.

- Bloklama işleminin hemen ardından PVDF membranlar, kollajen IV ve fibronektin primer antikorlarıyla (1:100 dilüsyon oranında) gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi.

- Primer antikorla inkübe edilen PVDF membran alkalin fosfataz bağlı sekonder antikör (1:2000 dilüsyon oranında) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Primer ve sekonder antikör ile işaretlenen PVDF membran üzerindeki kollajen IV ve fibronektin protein ekspresyon bantlarının görüntülenmesi amacıyla AP ile reaksiyon veren BCIP/NBT reaktifi (Sigma, St. Louis, USA) PVDF membrana eklendi. Kolorimetrik reaksiyon sonucu oluşan bantlar görüntülenerek dijital ortama aktarıldı. Imaje J-Versiyon 1.52 (National Institute of Health, Maryland, USA) programıyla protein bantları kantitatif olarak değerlendirildi.

3.6. İstatiksel Analiz

Yapılan tez çalışmasının istatistiksel analizlerinde SPSS 20.0 paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar non-parametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve * simgesi ile gösterildi.

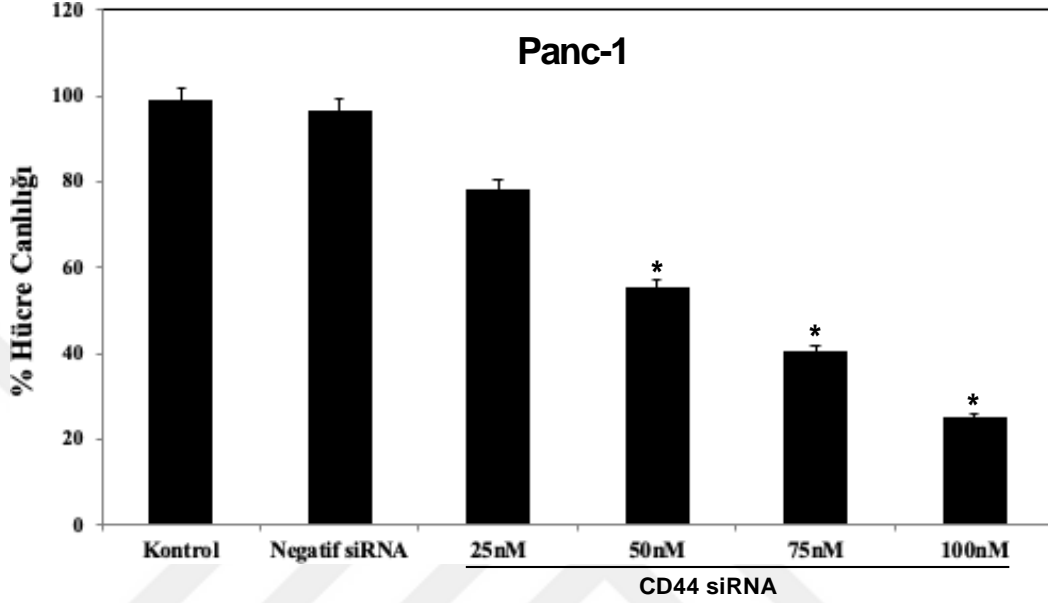
4. BULGULAR

4.1. CD44 siRNA'nın PDAC Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

Hücre canlılığı analizi, hem CD44 siRNA'nın PDAC hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkisinin incelenmesi hem de ileri analizlerde kullanılacak en uygun CD44 siRNA dozunun belirlenmesi amacıyla Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde yapıldı. Sitotoksitenin tespit edilmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemler enzimatik, lüminesans ve kolorimetrik yöntemlerdir. Kolorimetrik yöntemlerde temel prensip, hidrofobik karakterde olan renksiz MTT, XTT, MTS, XTS, WTS-8 gibi tetrazolyum tuzlarının hücre içi dehidrogenazlar tarafından indirgenerek hidrofilik renkli bir madde olan formazana dönüşmesi ve oluşan formazanın da spektrofotometrik olarak uygun dalga boyunda ölçülmesidir. Artan renk şiddetine bağlı olarak formazan miktarı ve dolayısıyla hücre canlılığı da artmaktadır. Tez çalışmamızda kullandığımız MTS hücre içerisinden geçemez, fakat membrandan geçebilen fenazin metil sülfat (PMS) veya fenazin etil sülfat (PES) gibi elektron taşıyıcıları sayesinde MTS'ler formazana indirgenir.

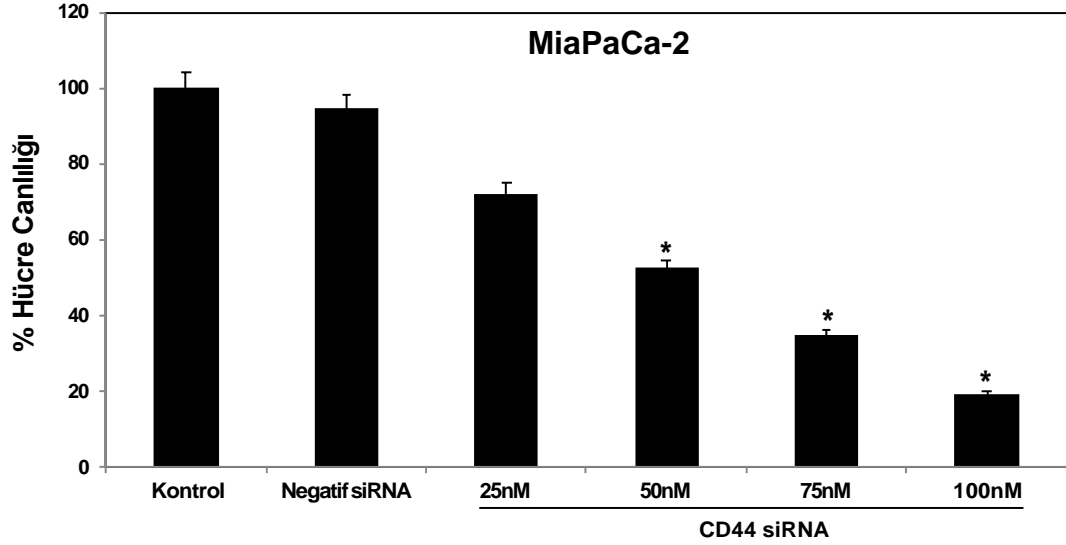
CD44 siRNA'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için hücre canlılığı analizi, kontrol, negatif siRNA ve CD44 siRNA grupları olmak üzere temel olarak 3 grupta gerçekleştirildi. Bu örneklemeler CD44 siRNA ve negatif siRNA ile 72 saat süre ile muamele edilmiştir. Panc-1 hücrelerinde herhangi bir maddeyle muameleye maruz kalmayan kontrol grubundaki hücreler için hücre canlılığı %100 olarak tespit edilirken, 50 nM negatif siRNA ile muamele edilen grupta hücre canlılığı %96,4 olarak tespit edildi. Negatif siRNA ile transfekte edilen Panc-1 hücrelerindeki canlılık oranı ile kontrol grubundaki hücrelerin canlılık oranı arasında önemli bir farklılık tespit edilmedi. Panc-1 hücrelerinin canlılığı; 25 nM CD44 siRNA ile muamele edildiğinde %78,1, 50 nM siRNA'da %55,4, 75 nM siRNA'da %40,6 ve 100 nM siRNA'da ise %25,3 oranında tespit edildi (Şekil 4.1a). Bu sonuç, uygulanan CD44 siRNA dozunun artışına bağlı olarak Panc-1 hücre canlılığının azaldığını göstermektedir. Bu artışlar 25 nM uygulama dozu hariç olmak üzere diğer CD44 siRNA dozlarında kontrol şartlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0,05$). CD44 siRNA'nın doza bağlı hücre canlılığı yanıtlarına

göre herhangi bir muameleye uğramamış hücrelerin yaklaşık yarısının canlılığını azaltmakta olan 50 nM CD44 siRNA dozu, ileri deneylerimiz olan RT-PCR ve western blot analizlerinde kullanılmış olup Panc-1 hücreleri 50 nM CD44 siRNA ile gen ve protein ekspresyon analizleri için muamele edilmiştir.



Şekil 4.1a. CD44 siRNA'nın Panc-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 siRNA'nın farklı dozlarına bağlı hücre canlılığı yanıtlarının değerlendirilmesi yapıldığında; herhangi bir muameleye uğramamış olan hücreler ile kıyaslandığında 50 nM negatif siRNA ile muamele edilen hücrelerin canlılığı %94,7 oranında tespit edilmiş olup anlamlı bir fark gözlenmemiştir. CD44'ün farklı dozları ile MiaPaCa-2 hücreleri muamele edildiğinde ise; 25 nM'de hücre canlılığı %72,3 oranında iken, 50 nM'da 52,5, 75 nM'da 35,1, 100 nM'da ise 19,4 olduğu ölçülmüştür (Şekil 4.1b). Panc-1'daki yanıtlara benzer olarak uygulanan CD44 siRNA dozunun artmasına paralel olarak hücre canlılığının azaldığı dolayısıyla gözlenmiştir. MiaPaCa- 2'deki bu yanıt, 25 nM uygulama dozu dışındaki diğer CD44 siRNA dozlarında kontrol şartlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0,05$). Yine Panc- 1'daki sonuca benzer olarak kontrol grubuna kıyasla hücrelerin yaklaşık yarısının canlılığını azaltan CD44 siRNA dozu olan 50 nM, ileri deneyler olan RT-PCR ve western blot analizlerinde kullanılmak için seçildi.



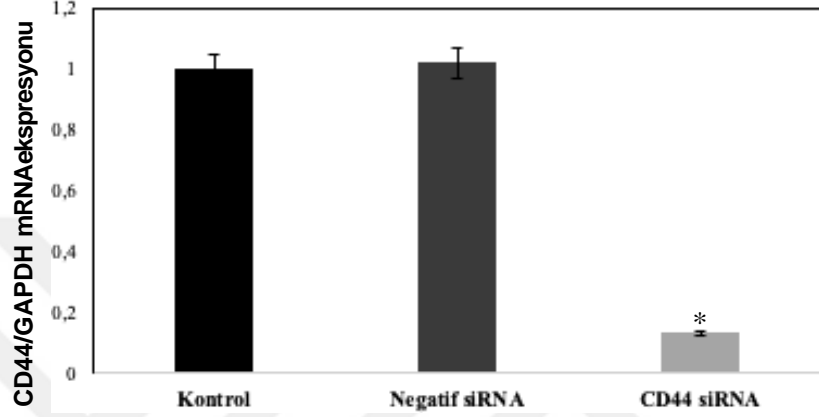
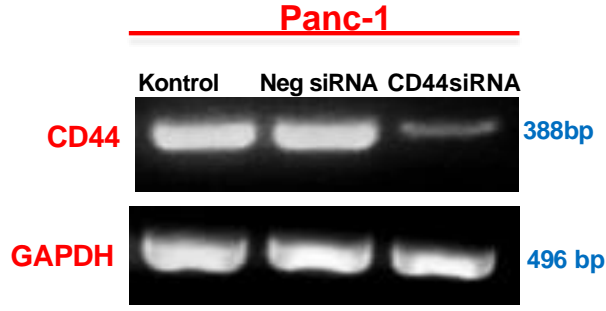
Şekil 4.1b. CD44 siRNA'nın MiaPaca-2 hücre canlılığı üzerine etkisi

CD44'ün, MiaPaCa-2 ve Panc-1 hücrelerinde canlılık üzerindeki yanıtları kıyaslandığında, daha agresif ve metastatik potansiyeli daha yüksek olan Panc-1 hücrelerinin CD44 siRNA muamelesine karşı daha dirençli olduğu, metastatik potansiyeli daha düşük olan MiaPaCa-2 hücrelerinin ise tersine daha hassas olduğu açıkça görülmektedir. Bu oranlar doz bazında değerlendirildiğinde; 25 nM CD44 siRNA dozuna karşı Panc-1 hücrelerinin MiaPaca-2'ye göre %5,8, 50 nM'da %2,9, 75 nM'da %5,5 ve 100 nM'da %5,9 oranında daha dirençli olduğu tespit edildi. CD44 siRNA doz artışı her iki hücre hattında hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemektedir. Tez çalışmamızda kullandığımız CD44 siRNA dozu olan 50 nM konsantrasyonu güvenli olarak değerlendirilmiş olup, hücrelerde sitotoksik düzeyde etkiye sebebiyet vermediği görüldü.

42 PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, CD44 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

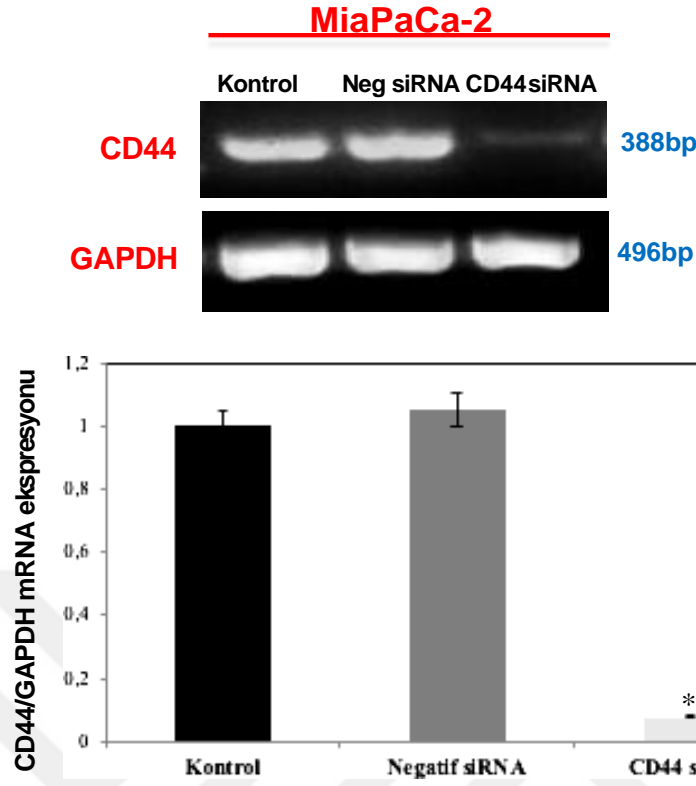
Bu analizin yapılmasındaki amaç; CD44 siRNA'nın, CD44 mRNA ekspresyonunu gerçekten inhibe ettiğini ispatlamak ve bundan sonraki aşamalarda elde edilen sonuçların güvenilirliğini arttırmaktır. Bu amaçla; Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri 50 nM negatif siRNA ve 50 nM CD44 siRNA ile 72 saat süresince transfekte edilerek, CD44 siRNA transfeksiyonuna bağlı CD44 mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişiklik tespit edildi. Panc-1 hücrelerinde CD44 mRNA

ekspresyonunu incelemek amacıyla kontrol grubu, negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubu ve CD44 siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna ait mRNA ekspresyon bantlarının yoğunluğunun, ilgili grubun GAPDH mRNA ekspresyon bant yoğunluğuna oranlanmasıyla elde edilen veriler yarı kantitatif olarak Şekil 4.2a'da görüldüğü üzere ifade edildi. Glikoliz metabolik yolunda görevli olan GAPDH enzimi, Gliseraldehit 3-fosfatın D-gliserat 1,3 bifosfata dönüşümünü katalizler. Tüm hücrelerde GAPDH gen ekspresyonu mevcut olduğu için bu gen, tüm bantlarda eşit miktarda mRNA olduğunu göstermek amacıyla internal kontrol olarak RT-PCR analizlerimizde kullanıldı. RT-PCR sonuçları; hem CD44 hem de GAPDH gen ekspresyon bantlarının Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre tarama programında kuantifiye edilmesiyle elde edilen CD44/GAPDH mRNA ekspresyon oranları şeklinde ve kontrol hücrelerin bu oranı 1 kabul edildiğinde negatif veya CD44 siRNA grubu için 1'in katları şeklinde verilerek değerlendirildi. Buna göre Panc-1 hücrelerinde negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna kıyasla CD44 siRNA, CD44 mRNA ekspresyonunu 0,89 düzeyinde inhibe ederek CD44 geninin susmasını sağladı. Negatif siRNA ile transfekte edilen Panc-1 hücrelerinde CD44 mRNA ekspresyonu kontrol hücre grubuna göre 1,02 olarak değerlendirildi (Şekil 4.2a). Panc-1 hücrelerinde negatif siRNA ile transfekte edilen grup ile kontrol hücre grubu arasındaki CD44 mRNA ekspresyon farkı önemsiz olarak kabul edildi.



Şekil 4.2a. Panc-1 hücrelerinde CD44 siRNA'nın, CD44 gen ekspresyonu üzerine etkisi

Negatif siRNA ile transfekte edilen MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 mRNA ekspresyonu kontrol hücre grubu baz alındığında 1,05 olarak tespit edildi. CD44 siRNA ile transfekte edilen MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 mRNA ekspresyon seviyesinin negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna kıyasla 0,97 kat düştüğü tespit edildi (Şekil 4.2b). Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücre grupları karşılaştırıldığında CD44 siRNA'nın Panc-1'e göre daha az metastatik etkiye sahip olan MiaPaCa-2 hücre hattı üzerinde etkisinin biraz daha fazla olduğu görüldü.

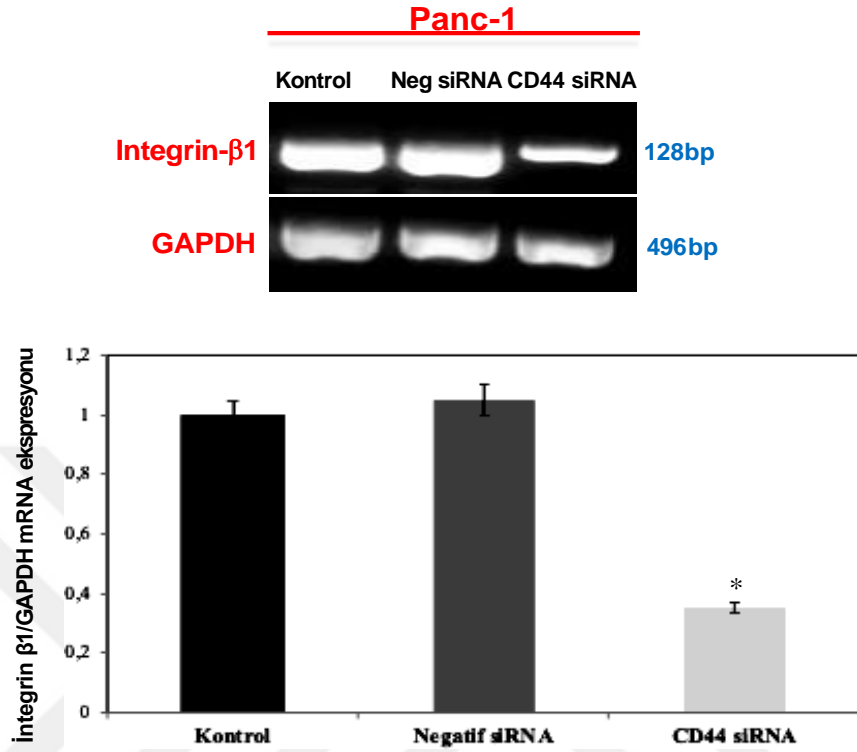


Şekil 4.2b. CD44 siRNA'nın MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 gen ekspresyonu üzerine etkisi

43. PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, İntegrin β 1 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

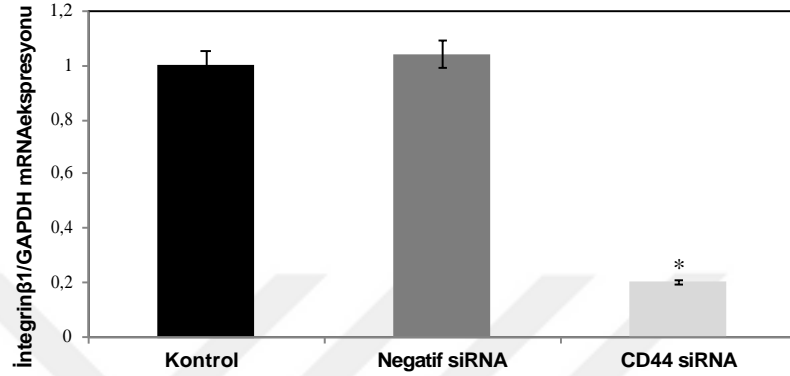
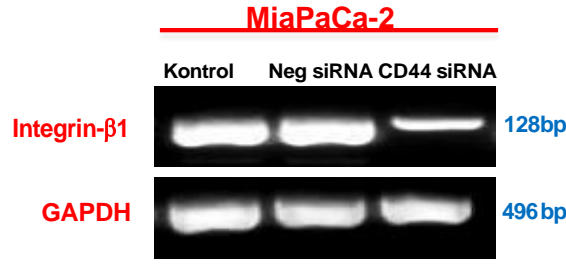
Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin herhangi bir muameleye uğramadığı ve 50 nM negatif siRNA veya 50 nM CD44 siRNA ile transfekte edildiği durumdaki İntegrin β 1 mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR metodu ile değerlendirildi. CD44 siRNA veya negatif siRNA ile 72 saat süresince transfekte edilen Panc-1 hücrelerinde İntegrin β 1 mRNA ekspresyon sonucu, İntegrin β 1 mRNA ekspresyon bantlarındaki yoğunluğun, internal kontrol amacıyla kullanılan GAPDH bantlarındaki yoğunluğa oranlanmasıyla kontrol şartlardaki orana göre kıyaslanarak yarı-kantitatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.3a). CD44 siRNA ile transfekte edilen Panc-1 hücrelerinde İntegrin β 1 mRNA ekspresyonunun, negatif siRNA ile transfekte edilen gruba kıyasla 0,70 kat azaldığı gözlemlendi. Bu sonuç agresif PDAC hücre tipi olan Panc-1'da CD44'ün, PDAC metastazında önemli rol oynayan İntegrin β 1'in gen ekspresyonunu direk uyardığını ve bununla bağlantılı olarak CD44'ün gen

düzeyinde susturulmasının da İntegrin $\beta 1$ gen ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir.



Şekil 4.3a. Panc-1 hücresinde CD44 gen susturulmasının, İntegrin- $\beta 1$ mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

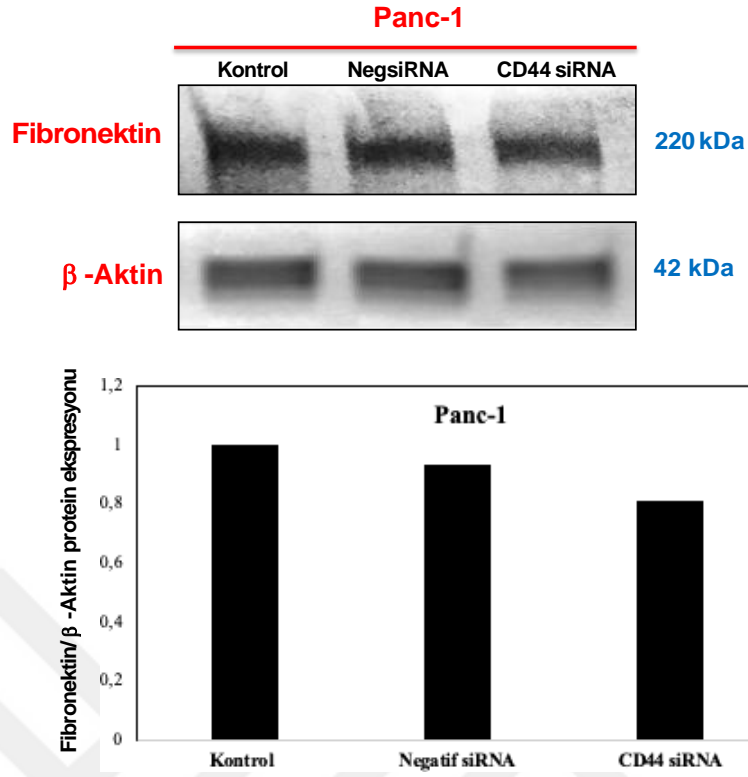
MiaPaca-2 hücreleri 72 saat süresince 50 nM CD44 siRNA ile transfekte edildiğinde İntegrin $\beta 1$ mRNA ekspresyonunun, negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna kıyasla 0,84 kat azalarak İntegrin $\beta 1$ geninin büyük bir oranda inhibe olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3b). Bu sonuç Panc-1’da gözlenen sonuca paralel olarak MiaPaCa-2 hücrelerinde de CD44’ün İntegrin $\beta 1$ gen ekspresyonunu ile direk ilişkili olduğunu ve gen ekspresyonun uyardığını göstermiştir. Dolayısıyla CD44 siRNA aracılı gen susturma tedavi yaklaşımının da etkili sonuç vererek, İntegrin $\beta 1$ gen ekspresyonunu büyük ölçüde azalttığını açıkça gösterdi. MiaPaCa-2’ye göre daha agresif olan Panc-1 hücrelerinde İntegrin $\beta 1$ mRNA ekspresyonunun daha az azaldığı görüldü.



Şekil 4.3b. MiaPaCa-2 hücresinde CD44 gen susturulmasının, İntegrin β1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

44 PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, Fibronektin Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi

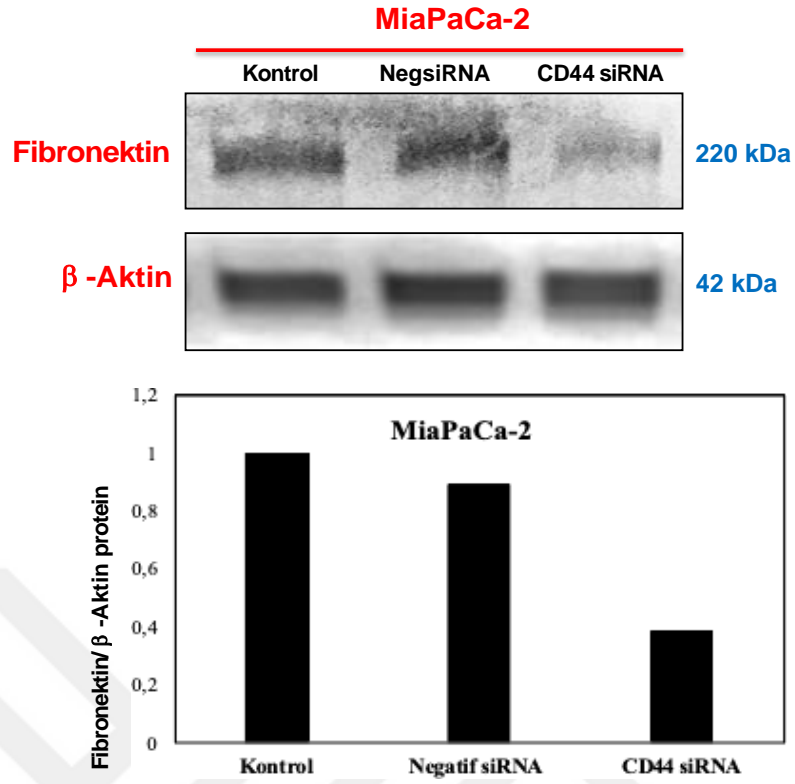
Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde 50 nM negatif siRNA veya CD44 siRNA ile transfekte edilen hücre gruplarında ekstrasellüler matriksin önemli komponentlerinden biri olan Fibronektin proteinin ekspresyon analizi Western Blot yöntemiyle incelendi. Tüm örneklerin eşit miktarda protein içerdiğini göstermek amacıyla hücre iskeletinin oluşumunda etkin rolü olan ve tüm hücrelerde bulunan β-aktin internal kontrol proteini kullanıldı. Western blot sonuçları; hem Fibronektin hem de β-Aktin protein ekspresyon bantlarının Image J (NIH, Maryland, USA) densitometre tarama programında kuantifiye edilmesiyle elde edilen Fibronektin/β-Aktin protein ekspresyon oranları şeklinde ve kontrol hücrelerin bu oranı 1 kabul edildiğinde negatif veya CD44 siRNA grubu için 1'in katları şeklinde verilerek değerlendirildi.



Şekil 4.4a. CD44 siRNA'nın Panc-1 hücrelerinde Fibronektin protein ekspresyonu üzerine etkisi

Panc-1 hücrelerinde negatif siRNA ile transfekte edilen şartlarda fibronektin protein ekspresyon seviyesinin kontrole kıyasla 0,93 olduğu tespit edildi. CD44 siRNA ile transfekte edilen Panc-1 hücrelerinde ise bu değer negatif siRNA'ya transfekte edilen hücelere göre 0,12 kat azaldığı gözlemlendi. Böylelikle Panc-1 hücrelerinde CD44 gen susturulması, fibronektin protein ekspresyonunun negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna göre 0,12 kat azalmasına neden oldu (Şekil 4.4a).

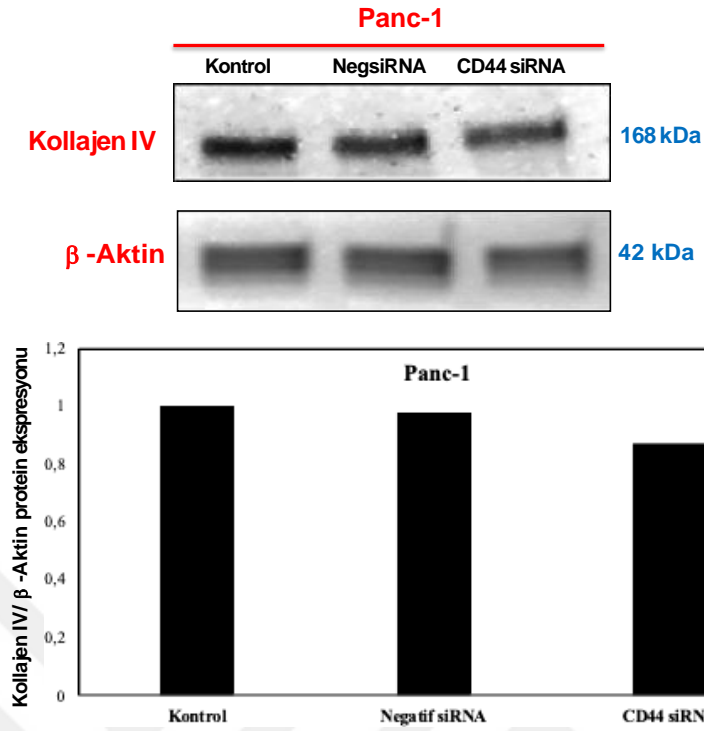
Negatif siRNA ile transfekte edilen MiaPaCa-2 hücrelerinde ise fibronektin protein ekspresyon seviyesinin, kontrol hücre grubu baz alındığında 0,89 olarak gözlenirken, CD44 siRNA ile transfekte edilmesi sonucunda ise bu değer 0,39 seviyesindedir (Şekil 4.4b). Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerindeki CD44 siRNA gen susturulmasının fibronektin protein ekspresyonu üzerindeki etkileri kıyaslandığında fibronektin proteinin MiaPaCa-2 hücrelerinde Panc-1 hücrelerine göre iki kat daha fazla ekspresyon kaybı görülmüştür.



Şekil 4.4b. CD44 siRNA'nın MiaPaCa-2 hücrelerinde Fibronektin protein ekspresyonu üzerine etkisi

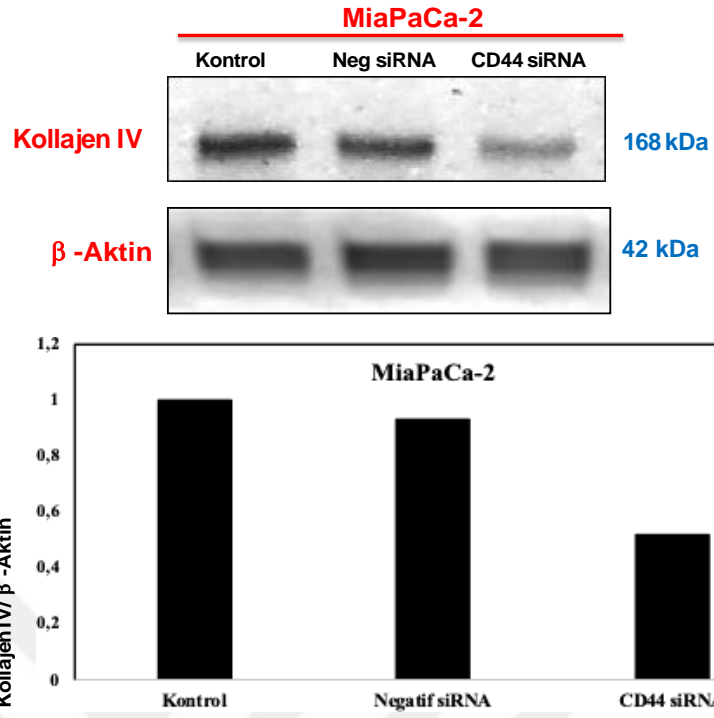
45. PDAC Hücrelerinde CD44 Gen Susturulmasının, Kollajen IV Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Pankreatik ekstrasellüler matriksi kuşatan bazal membranın en önemli yapıtaşlarından biri olan Kollajen IV proteininin PDAC oluşumunda sentezinin artarak oluşan Kollajen IV'lerin bazal membran yapısına katıldığı bilinmektedir. Wstern blot analizi sonucu elde edilen Kollajen IV protein ekspresyon bantlarının internal kontrol amacıyla kullanılan β -Aktin bantlarına oranlanmasıyla elde edilen veriler kontrol şartlarına oranla yarı-kantitatif olarak değerlendirildi. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde kollajen IV protein ekspresyonları sırasıyla Şekil 4.5a ve Şekil 4.5b'de gösterildi. Panc-1 hücrelerinde negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubunda kollajen IV protein ekspresyon seviyesi 0,98 olarak belirlenmesine karşılık, CD44 siRNA ile transfekte edilen grupta negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna kıyasla bu değer 0,85 olarak tespit edildi (Şekil 4.5a).



Şekil 4.5a. CD44 siRNA'nın Panc-1 hücrelerinde Kollajen IV protein ekspresyonu üzerine etkisi

MiaPaCa-2 hücrelerinde ise negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubunda Kollajen IV protein ekspresyon seviyesi kontrol hücre grubuna kıyasla 0,93 iken, CD44 siRNA ile transfekte edilen hücre grubunda Kollajen IV protein ekspresyon seviyesi negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna göre 0,45 olarak belirlendi (Şekil 4.5b.) Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin Kollajen IV protein ekspresyon seviyelerinde, CD44 siRNA geninin susturulmasına bağlı olarak verdikleri cevap karşılaştırıldığında MiaPaCa-2 hücrelerinde Kollajen IV protein ekspresyon kaybının Panc-1 hücrelerindeki Kollajen IV protein ekspresyon kaybına göre daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 4.5b. CD44 siRNA'nın MiaPaCa-2 hücrelerinde Kollajen IV protein ekspresyonu üzerine etkisi

5. TARTIŞMA

CD44 proteinin insan vücudunda en fazla eksprese edildiği bölgeler deri, akciğer ve apendiks olmakla birlikte, en az eksprese edildiği organlar testis ve yumurtalıklardır (60). Genomda 20 adet ekson ve 19 adet içeren CD44 geni tarafından sentezlenen, CD44 hücre yüzey reseptör proteini non-kinaz yapıda olup tip I transmembran glikoproteinidir. CD44 geninin başlıca pozitif transkripsiyon düzenleyicileri Sp1, Egr1, TCF4, AP-1, NF-kB, ETS-1 iken, başlıca negatif transkripsiyon düzenleyicileri p53, KLF4, FOXP3'tür. Bu proteinin N-terminal ucu ektodomainde C-terminal ucu sitozolde yer alır. ESRP1 proteini aracılığıyla alternatif kırılan CD44 mRNA'ları CD44 izoformlarının oluşumunu sağlar. İlk 5 ekson hyaluronan bağlanan domaini kodlarken, son 5 ekson proteinin sitozolik ucunu kodlar bu proteinin sitozolik ucu ankrin proteinine bağlanır ve dolaylı yoldan RhoGTPaz'ları aktive ederek hücre iskeletinin morfolojik yapısını etkiler, geriye kalan 6-15. eksonların alternatif kırılması sonucu proteinin ektodomaininde izoform oluşumunu sağlayan değişken bölgeler oluşur. Oluşan CD44 izoformlarının osteopontin, fibrin, serin-glisin dipeptid tekrarı içeren heparan sülfat, kondroitin sülfat gibi glikozaminoglikanlar, hematopoetik büyüme faktörü (HGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) için de ligand görevi gördüğü saptanmıştır. Baş ve boyun, gastrik, akciğer, meme, prostat, kolorektal, mesane ve over gibi farklı kanser türlerinde farklı CD44 izoformlarının ekspresyonlarının arttığı, meme kanserinde CD44s, CD44v6, prostat kanserlerinde CD44s, CD44v2, CD44v6, CD44v9, baş ve boyun kanserlerinde CD44v3, gastrointestinal kanserlerde CD44v6, CD44v9, CD44v10, PDAC'de ise CD44s, CD44v6 ve CD44v3 izoformlarının aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (61). Bu sebeple CD44 bazı kanser türleri ve PDAC için biyobelirteç olarak kabul edilmektedir.

Yapılan bu tez çalışmamızda CD44 geninin CD44 siRNA ile susturularak, CD44 ve İntegrin β 1 üzerinde gen düzeyinde etkileri, fibronektin ve kollajen IV üzerinde ise protein düzeyinde etkileri saptamak amacıyla CD44'ün ekstrasellüler matriks yıkımındaki rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan 50 nM CD44 siRNA dozunun Panc-1 hücreleri için hücre canlılığını %44,6 düzeyinde, MiaPaCa-2 hücreleri için ise %47,5 düzeyinde

baskıladığı görülmüştür. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerindeki bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p \leq 0,05$) göz önüne alındığında CD44'ün ekstrasellüler matriks yıkımındaki rolünün aydınlatılmasına katkı sağlayan bu tez çalışmamızda, CD44 siRNA'nın 50 nM dozunda kullanımını toksik bir etki oluşturmadığından güvenliği olduğu görülmüştür.

Genel olarak pankreatik ekstrasellüler matriks yapısına baktığımızda desmozom yapılarıyla birbirine bağlanan epitel hücreler arasında e-kaderin, klaudin, okludin, ZO-1, JAM, nektin gibi proteinler aracılığıyla adezyon kuşakları oluşur. Oluşan epitel dokununun hemen altında lamina lucida ve lamina densadan oluşan bazal lamina yer alır. Non-fibriller yapıdaki kollajen IV, kollajen XV, kollajen XVIII laminin, integrin, nidojen, perlekan bu katmanda bol miktarda bulunur. Epitel doku hemidesmozomlar ile bazal laminaya bağlanır, bu bağlanmada integrin $\alpha 6\beta 4$ reseptörleri aktif rol oynar. Bazal laminanın hemen altında yer alan retiküler lamina bazal lamina ve ekstrasellüler matriks arasında bir geçiş katmanı olarak görünmektedir. Hücreleri içinde bulunduran ekstrasellüler matriks temel olarak kollajen, laminin, fibronektin, elastin gibi fibrotik proteinler, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşur. Ekstrasellüler matrikste ağırlıklı olarak kollajen 1 yer alır. Kollajenlerin birbirleriyle olan çapraz etkileşimleri ve kollajen örgü figürleri elastin proteini ile beraber ekstrasellüler matriksin dayanıklılığını, yapım-yıkımını ve esnekliğini düzenler. Ekstrasellüler matriks-hücre etkileşimlerinde integrin reseptörleri, fibronektinler ve hücre yüzey adezyon molekülleri önemli rol oynar. Hücre yüzeyinde yer alan integrin $\alpha 5\beta 1$ 'ler fibronektinler için reseptör görevi görür. İntegrinler ve fibronektinler aynı zamanda migrasyon, invazyon ve tümör metastazında da etkilidir (62).

Tümör gelişimine bağlı olarak ekstrasellüler yıkım için proteolitik kaskad uyarılır. Ekstrasellüler matriks yıkımı proteazlar tarafından başlatılır, metalloproteinazlar, serin proteazlar, aspartil proteazlar ve sistein proteazlar olmak üzere dört adet proteaz türü bulunmaktadır. Proteolitik enzimler direkt ekstrasellüler matriks bileşenlerine bağlanabildiği gibi, diğer proteazları aktive ederek ekstrasellüler matriks yıkımını başlatabilirler. Ekstrasellüler matriks yıkımının genel prensibine göre Aspartil proteaz (katepsin D), katepsin B gibi sistein proteazları aktive ederek öncül ürokinaz tip plazminojen aktivatör (pro-uPA)'ü aktifleştirir.

Ürokinaz tip plazminojen aktivatörünün (uPA), ürokinaz tip plazminojen aktivatör reseptörüne (uPAR) bağlanması sonucu plazminojen plazmine dönüşür. Aktif haldeki plazminler inaktif haldeki proMMP'leri aktif hale getirir. Aktifleşen MMP'ler kollajenleri parçalayarak ekstrasellüler matriksi parçalar. Ekstrasellüler matriksin parçalanması migrasyon, invazyon ve metastaz süreçlerini hızlandırır (63).

PDAC sahip olduğu yoğun desmoplastik stroma nedeniyle immün hücrelerin ekstrasellüler matrikse geçişi ve hedef hücrelere yönelik ilaç dağıtımını çok zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sitotoksik hücresel terapinin yapılmasına karşı direncin gelişmesi PDAC'de oluşan fibrotik stroma ile ilişkilidir. Yoğun stromal yapının seçici olmayan deplesyonuna bağlı olarak immün terapi, lipozomal ilaçların taşınımı, gen terapi gibi tekniklerin uygulanmasına yönelik terapötik hedefler geliştirilmektedir. Bunun için uygulanan yöntemlerden bazıları Hedgehog sinyal yolağının inhibisyonuna bağlı fibrozisin engellenmesi, polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş hyaluronidaz enzimi ile stromada bulunan hyaluronanların parçalanması, MMP aktivasyonuna veya TIMP inaktivasyonuna bağlı matrisomum parçalanması olarak gösterilebilir. Yoğun fibrotik stromanın oluşumunda, pankreatik yıldız hücreler tarafından salgılanan sitokinlerin, FGF ve TGF- β gibi faktörlerin etkisiyle kollajen I, kollajen III, fibronektin ve kanser ilişkili fibroblastların (CAF) protein düzeyinde ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (64). Kanser ilişkili fibroblastların kökeni olan mezenkimal stromal hücreler yüzeylerinde CD44 artışıyla beraber hyaluronan bakımından zengin stromaya yerleşirler ve burada farklılaşarak çok sayıda alt tipe sahip olan CAF'ları oluşturur. Miyofibroblastik CAF'lar ve inflamatuvar CAF'lar en önemli iki grubu oluşturur. CAF'lar tenascin-c, osteopontin, periostin ve interlökin gibi moleküller salgıyabilir. Miyofibroblastik CAF'ların salgıladığı osteopontin integrin $\alpha V\beta 3$ 'e bağlanarak kanser kök hücre ekspresyonunu arttırabilir. İnflamatuvar CAF'lardan salgılanan IL-6 düzenleyici T hücreleri ve myeloid kökenli supresör hücreleri kontrol ederek immün yanıtı baskımlarken, IL-33 tümör ilişkili makrofajları uyararak bu makrofajların MMP-9 sentezlenmesini sağlar. MMP-9 sentezlenmesiyle tümör migrasyonu artar (65).

Özdemir ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada genetik yapısı manipüle edilmiş fareler (KPT ve PKT fare modelleri) de α SMA(+) miyofibroblast deplesyonuna bağlı olarak ortalama 4,5 haftada pankreatik intraepitelyal neoplazi

geliştiği, 6.haftada invaziv kanserin arttığı 8.haftada ise ölüm gerçekteştiği sonuç olarak invazyonun arttığı, yaşam süresinin azaldığı görölmüştür. Kontrol fare modeli gruplarına ait 4.393 farklı gene ait ekspresyon verilerinin miyofibroblast deplesyonu yapılan gruba kıyasla transkriptomik analizi ile Kollajen I ekspresyonunun pankreatik kanserde azaldığı fakat ilginç bir şekilde lizil oksidaz ekspresyonunda değişim olmadığı gözlenirken, EMT'nin pozitif transkripsiyonel düzenleyicileri Twist, Snail ve Slug ekspresyonunun pankreas kanserinde arttığı gözlenmiştir. CD44+/CD133+ fenotipe sahip PDAC kanser kök hücrelerinin miyofibroblast deplesyonuna bağlı sayılarının arttığı da rapor edilmiştir. Bu çalışmanın önemli çıktılarından biri de miyofibroblast deplesyonuna bağlı PDAC fare modellerinde fibrozisin azaldığı fakat bu farelere uygulanan sitotoksik gemitabin tedavisinin etkinliğinin artmadığı gözlenirken, anti-CTLA-4 antikör tedavisi uygulanan KPT ve PKT fare modellerinde yaşam süresinin arttırdığı gözlenmiştir. Anti-CTLA-4 ile tedavi edilen kontrol grubu farelerde yaşam süresi 47 gün iken, anti-CTLA-4 ve miyofibroblast deplesyonu kombine olarak uygulanmış fare modeli grubunda yaşam süresinin 65 gün olduğu görölmüştür (66).

Hingorani ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan Faz 1b çalışmasında ise PEG ile modifiye edilmiş rekombinant Human Hyaluronidaz (PEGPH20), gemitabin ile kombine edilerek yaş ortalamaları 59 ağırlık ortalamaları 65 kg olan 20 adet seviye IV PDAC hastasına uygulanmış olup, oluşan etkiler incelendiğinde doku hyaluronan düzeyleri yüksek olan hastalarda PEGPH20'nın gemitabin etkinliğini arttırdığı gözlenmiştir (67).

Hedgehog sinyal yolağı pankreatik fibrozisin oluşumuna neden olan önemli sinyal yolaklarından biridir. Pankreasta yaralanma meydana geldiğinde pankreatik yıldızlı hücreler morjolojik ve fonksiyonel değişikliğe uğrayarak α -SMA ile birlikte proliferasyon ve migrasyonu indükleyen ekstrasellüler matriks proteinleri de salgırlar. Bu durum lezyon oluşumuna bağlı fibrozisi başlatır. Hedgehog sinyali asinar hücrelerin yapılarını deforme ederek proliferatif dukt yapısında fibrozis oluşumunu devam ettirir. Parakrin Hedgehog sinyali miyofibroblastları aktive eder, aktive olan miyofibroblastların Hedgehog sinyaline cevap olarak sentezlediği Pth, Smo, Gli 1/2 proteinleri MMP'leri aktive eder. Pth ve Smo proteinlerinde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları sonucu pankreatik duktal neoplazinin geliştiği

görülmüştür. Aşırı eksprese olan Sonik Hedgehog sinyal yolağının sentezini indüklediği MMP-2 ve MMP-9 enzimleri pankreatik tümör migrasyonunu indükler. Hedgehog sinyalinin inhibisyonuna bağlı klinik çalışmalarda pankreatik duktal adenokarsinoma ve kronik pankreatitli hastaların kan serum düzeylerinde, sağlıklı bireylerle kıyaslandığında Hedgehog proteinlerinin düşük seviyede olduğu çünkü plazma proteinleri tarafından hedgehog sinyalinin inhibe edildiği görülmüştür. Fakat bu bulgu tek başına erken tanı konulması için yetersiz kalmaktadır. EMT programında hedgehog sinyalinin etkileri incelendiğinde bu sinyalin EMT'yi kontrol ettiği, MAPK/PI3K aracılı hücre proliferasyonunu arttırdığı, Bcl-2 ve Bcl-X proteinleri aracılı apoptozisi azalttığı ve kanser kök hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür. Hedgehog inhibisyonuna bağlı terapötiklerin geliştirilmesi için faz çalışmaları devam etmektedir (68).

PDAC'de TIMP ve MMP protein ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada PDAC'in karakteristik özelliği olan yoğun desmoplastik stromanın oluşumunda rol oynayan ve pankreatik yıldız hücrelerden salgılanan IL-1 α ve TGF- β faktörlerinin TIMP ve MMP proteinlerinin ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir (69). Ekstrasellüler matriksin yıkılmasında önemli rol oynayan MMP'lerin kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu indüklediği bilinmektedir. Tümör mikroçevresi incelendiğinde malign hücrelerin bol miktarda IL-1 α salgıladığı görülmüştür. TGF- β çok sayıda biyolojik fonksiyona sahip sinyallerden biridir. PDAC'nin erken evrelerinde TGF- β salgılanması tümör supresif bir etki gösterse de ilerleyen evrelerde kanser progresyonunu hızlandırmaktadır. Bu sinyal EMT, tümör ve stroma arasında hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerinin bozulması ve tümör invazyon mekanizmalarında kilit rol oynamaktadır. Capan-2, PC013, BxPC3 hücre hatlarının kullanıldığı bu çalışmada, hasta örneklerinden izole pankreatik yıldız hücrelerle PC013 hücre hattı ko-kültüre edilmiştir. PC013 ile ko-kültüre edilen pankreatik yıldız hücrelerde MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-11, TIMP-1 ve TIMP-2 gen ekspresyonlarının yalnızca pankreatik yıldız hücrelerdeki gen ekspresyonlarına göre arttığı görülmüştür. Capan-2, PC013, BxPC3 PDAC hücre hatlarında yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu bu hücre hatlarında IL-1 α ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda stromada bulunan pankreatik yıldız hücrelerin salgıladığı IL-1 α tarafından regüle edilen

MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1 ve TIMP-2'in TGF- β tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir. Bu inhibisyon sonucu MMP-1 ve MMP-3 tarafından parçalanmış Kollajen I'in stabilizasyonunun arttığı görülmüştür. TGF- β 'nin karmaşık etkisiyle oluşan yoğun desmoplastik stromanın belki de tümör yayılımını engellediği düşünülmüştür (69).

Yapılan çalışmalar sonucu MT1-MMP enziminin CD44 proteininin ektodomaininde yer alan değişken bölgeleri parçalaması sonucu hyaluronan bağlanan domainin serbest kaldığı bu durumun hücre migrasyonunu indüklediğini ve de diğer taraftan prenisilin ve γ -sekretaz enzimleri tarafından kırılan sitoplazmik uç ile beraber anjiyogenez ve invazyonun uyarıldığı gösterilmiştir (70).

McFarlane ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada östrojen ve progesteron yönünden negatif bazal benzeri insan meme kanseri (BLBC)'ne ait MDA-MB-231 ve Hs578T hücre hatlarında, CD44 proteininin kanser hücrelerinin vasküler endotelial katmanına tutunması ve hücre-ekstrasellüler matriks ile ilişkisini anlamak için CD44 aktivasyonuna bağlı integrin $\alpha 5\beta 1$ proteininin alt ünitelerin protein ekspresyonu, integrin $\alpha 5\beta 1$ ligandı olan fibronektin proteininin ekspresyonu, bunun yanında aktin polimerleşmesini sağlayan kortaktin proteini ve hücre-ekstrasellüler matriks interaksyonunda rol oynayan fokal adezyon ilişkili paksillin proteininin Src ve FAK aracılı etkisi incelenmiştir. Hyaluronan stimülasyonuna bağlı CD44 ekspresyonunun artması sonucu İntegrin $\beta 1$ heterodimerlerinin ekspresyonlarının arttığı belirtilmiştir. Tüm $\beta 1$ integrin heterodimerlerinin inhibisyonu sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde adezyon seviyesini %73'ten %61'e indirdiği görülmüştür. Diğer taraftan kollajen IV için reseptör görevi gören integrin $\alpha 2\beta 1$ 'in inhibisyonu hücre adezyonunu etkilememiştir. Fosforile edilmiş Src (p-Src) ve fosforile edilmiş FAK (p-FAK) protein ekspresyonları incelendiğinde tümör hücre hatlarında p-Src ekspresyonunun arttığı ve de otofosforilasyon ve integrin bağlanma bölgeleri içeren p-FAK proteininin ekspresyonunun da arttığı görülmüştür. Bu durum CD44/İntegrin sinyalinin hücre iskeleti ve adezyon dinamiklerini etkileyebileceğini göstermiştir. (71).

Kollajen IV'ün PDAC üzerine etkilerinin incelendiği Öhlund ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise PDAC'ye ait HPAC ve CFPAC-1 hücre

hatlarında Kollajen IV ve Kollajen XVIII, perlikan, laminin, nidojen gibi bazal membran proteinlerinin normal pankreas ve pankreatik kanser dokularında immunofloresan yöntemiyle incelenmesi sonucu, normal pankreas dokularında bu bazal membran proteinlerinin epitel ve dukt yapısında aynı protein ekspresyon paternine sahip olduğu, pankreatik kanser dokularında ise birbirine yakın hücrelerde kollajen IV'ün aşırı derece eksprese olduğu, perlikan ve nidojen ekspresyonunun yalnızca stromada arttığı, laminin ve kollajen XVIII ekspresyonunun ise tümör stromasında çok az eksprese olduğu görüldü. Kollajen IV bağlayan integrin $\alpha1\beta1$ ve integrin $\alpha2\beta1$ 'in ise hem normal dokularda hem pankreatik kanser dokularında protein ekspresyon paterni tespit edildi. Bu çalışma sonucunda pankreatik kanser hücrelerinden kollajen IV eksprese edildiği ve eksprese edilen kollajen IV'ün pankreatik kanser hücrelerini çevreleyen bazal membran yapısına katıldığı görülmüştür (72).

PDAC hastalarından elde edilen doku örnekleri üzerinden yapılan bir incelemede fibronektin antikoru yapılan immunohistokimyasal boyamalarla hastaların %15,3'ünün fibronektin yönünden negatif olduğu %47,8'inin dokularında az derece fibronektin ekspresyonu, %31,9'unda orta derece, %5,1'inde aşırı derecede fibronektin ekspresyonu olduğu görüldü. Hastalar arasında yaş, cinsiyet, tümör lokasyonu gibi parametrelerle fibronektin ekspresyonu arasında korelasyon olmadığı gözlenmiştir. Fakat tümör boyutu ile fibronektin protein ekspresyonu arasında doğru orantı saptanmıştır (73).

Söz konusu tez çalışmamızda RT-PCR sonuçlarına göre Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 siRNA transfeksiyonu uygulaması sonucu Panc-1 hücrelerinde CD44 mRNA ekspresyonu negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna kıyasla 0,89 kat azalırken MiaPaCa-2 hücrelerinde ise CD44 mRNA ekspresyon seviyesinin negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna kıyasla 0,97 kat azaldığı tespit edilmiştir. CD44 siRNA'nın CD44 genini inhibe ettiğini göstermek amacıyla yapılan bu deneyde Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 mRNA ekspresyon seviyelerine göre siRNA transfeksiyonu işleminin başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür.

İki hücre hattında da CD44 gen inhibisyonuna bağlı integrin $\beta 1$ mRNA seviyeleri ölçüldüğünde integrin $\beta 1$ mRNA ekspresyonunun Panc-1 hücrelerinde negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubu baz alındığında 0,70 kat azaldığı, MiaPaCa-2 hücrelerinde 0,84 kat azaldığı tespit edilmiştir. Pankreatik tümör metastazlarında ekspresyonu artan CD44 glikoprotein baskılanması sonucu, yine onkojenik etkiye sahip integrin $\beta 1$ 'in ekspresyon seviyesinin azalması daha önce yapılan araştırma çalışmalarının sonuçları ile de uyumlu bulunmuştur.

Western blot deneylerinden elde ettiğimiz bulgulara göre Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 siRNA uygulaması sonrası fibronektin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde Panc-1 hücrelerinde fibronektin proteini ekspresyon seviyesi negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna kıyasla 0,74 düzeyinde bulunurken MiaPaCa-2 hücrelerinde fibronektin proteini ekspresyon seviyesi negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna göre 0,28 olarak bulundu. İntegrin $\alpha 5\beta 1$ reseptörünün birincil ligandı olan fibronektinin CD44 gen inhibisyonuna bağlı Panc-1 hücrelerinde daha az ekspresyon kaybına uğraması MiaPaCa-2 hücrelerine daha metastatik olan Panc-1 hücrelerinin metastazla yayılmak için farklı sinyal yollarını kullanabileceği düşüncesini oluşturdu.

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 transfeksiyonu sonucu bazal membranın en önemli birleşenlerinden kollajen IV'ün iki hücre hattında da protein ekspresyonu incelendiğinde negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubu baz alındığında Panc-1 hücrelerinde 0,85 seviyesi görülürken MiaPaCa-2 hücrelerinde 0,45 seviyesi görüldü.

CD44 glikoprotein ekstrasellüler matriks yıkımına olan etkisini değerlendirdiğimiz bu tez çalışmamızda invazyon, migrasyon, metastaz gibi tümör gelişiminde ekspresyonu artan CD44 hücre yüzey adezyon reseptörünün ekstrasellüler matriks yıkımında integrin $\beta 1$ gibi onkojenik faktörleri indüklediği için dolaylı olarak ekstrasellüler matriks yıkımında etkili olabileceği öngörüldü.

Sonuç olarak; mikroskopik incelemeler sonucu PDAC'in sinir hücreleri, lenf damarları ve küçük ven damarları ile etkileşim halinde olduğu görülmekle birlikte bu durumun PDAC'in metastatik potansiyelini arttırdığı bilinmektedir. İmmünespresif özellik taşıyan tümör mikroçevresine sahip PDAC'de tümör kütlelerinin büyük bir

kısmını desmoplastik stroma oluşturmaktadır. Yoğun desmoplastik stromanın deplesyonuna dayalı ilaç dağıtım stratejileri iki yönlü etki yapmaktadır. Hedefe özel ilaçların dağıtılması yoğun stroma bariyerini aşabildiği için ilaç dağıtımı kolaylaşmaktadır. Ama diğer taraftan tümör hücrelerin stromadan dışarı çıkarak diğer organlara metaste olma ihtimali artmaktadır. Yoğun stromal yapının tümör hücrelerine oksijen ve besin ulaşmasını engellediği düşünülse de glikoliz ile enerji ihtiyacını karşılayan tümör hücreleri kollajenden zengin tümör mikroçevresindeki prolin bakiyelerini prolidaz enzimleriyle parçalayarak TCA siklusunda metabolize etmektedir. Ayrıca stromada yer alan kanser ilişkili fibroblastlar salgıladıkları Hedhehog, SDF-1, TGF- β 1, PDGF ve sitokinler gibi faktörlerle tümör gelişimini indüklemektedir. Tümör gelişimi esnasında ekspresyonu artan CD44 glikoproteinlerinin hücrelerde migrasyon, invazyon ve metastazı indüklediği bilinmektedir. CD44 proteinin sitozolik domaini ankrin proteinine yüksek afinite göstermekle birlikte Src ve FAK proteinlerinin fosforillenmesini sağlayarak integrin β 1 domaini aktivasyonu arttırmaktadır. Çalışmamızda CD44 siRNA kullanılarak CD44 geninin inhibe edilmesi sonucu integrin β 1 mRNA ekspresyonun önemli miktarda azaldığı, fakat fibronektin protein ekspresyonunun aynı oranda azalmaması fibronektin protein ekspresyonunda CD44 proteinin çok kritik bir rol oynamasına rağmen fibronektinlerin integrin α 5 β 1'lere bağlanmasını engelleyerek migrasyonu azalttığını düşündürmüştür. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 gen susturulmasına bağlı olarak Kollajen IV protein ekspresyon seviyelerinin çok büyük ölçüde azalmamasının sebebi bazal membran yapıtaşlarından olan Kollajen IV proteinin, hücre hatlarında ekstrasellüler matris yapısının tam oluşmamasından dolayı kaynaklı olduğu tahmin edilmiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. PDAC'e ait Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri 25 nM, 50 nM, 75 nM ve 100 nM CD44 siRNA ve negatif siRNA ile 72 saat süreyle transfekte edildi. Transfeksiyon işleminden sonra uygulanan hücre canlılığı/sitotoksosite deneyinden elde edilen verilere göre 50 nM, 75 nM ve 100 nM CD44 siRNA dozu hücre canlılığı/sitotoksosite açısından istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p \leq 0,05$). Kontrol hücre grubu baz alındığında Panc-1 hücrelerinin %44,6'sını, MiaPaCa-2 hücrelerinin ise %47,5'ini öldüren 50 nM CD44 siRNA dozunun ileri aşama RT-PCR ve Western Blot deneyleri için kullanımı uygun görüldü.

2. 50 nM CD44 siRNA uygulanması sonucu Panc-1 hücrelerinde hücre canlılığı %55,4 MiaPaCa-2 hücrelerinde ise %52,5 olarak görüldü. Bu değerler herhangi bir maddeyle muamele edilmeyen kontrol grubu ve negatif siRNA ile transfekte edilen hücre grubuna ait MTS değerleri baz alındığında CD44 siRNA'nın hücrelerde canlılığı azaltıcı etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

3. CD44 siRNA uygulaması sonrası Panc-1 hücrelerinde CD44 mRNA ekspresyonu 0,89 kat azalırken, MiaPaCa-2 hücrelerinde ise CD44 mRNA ekspresyonu 0,97 kat azaldı. Bu durum Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 siRNA kullanımının CD44 mRNA inhibisyonunu büyük oranda gerçekleştirdiğini gösterdi.

4. CD44 siRNA uygulaması sonrası Panc-1 hücrelerinde İntegrin $\beta 1$ mRNA ekspresyonu 0,70 kat azalırken, MiaPaCa-2 hücrelerinde ise İntegrin $\beta 1$ mRNA ekspresyonununun 0,84 kat azaldığı tespit edildi.

5. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 siRNA transfeksiyonu sonrası fibronektin protein ekspresyon seviyesi Panc-1 hücrelerinde 0,74, MiaPaCa-2 hücrelerinde 0,28 olarak bulundu. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri arasındaki 0,46 protein ekspresyon farkı dikkati çekti.

6. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde CD44 siRNA transfeksiyonu uygulanması Kollajen IV protein ekspresyon seviyesini çok fazla etkilemedi. Panc-1 hücrelerinde Kollajen IV protein ekspresyon seviyesi 0,85 olarak görülürken, MiaPaCa-2 hücrelerinde ise 0,45 olarak görüldü.

Yaptığımız tez çalışmasından elde edilebilecek çıkarımları özetlersek;

Son yıllarda CD44 hücre yüzey adezyon reseptörü üzerine yapılan çalışmalar CD44 proteinin PDAC için kanser kök hücre biyobelirteci olduğunu göstermiştir. Tümörlü hücrelerde CD44 proteinin ekspresyonunun artması adezyon, migrasyon, invazyon ve metastazı arttırmaktadır. CD44 proteinin hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerinin moleküler mekanizmalarının aydınlığa kavuşturulması, PDAC'ye yönelik yeni terapötik hedeflerin geliştirilebilmesi için elzemdir.

Tez çalışmamızda onkojenik etkiye sahip integrin $\alpha 5\beta 1$ reseptör proteininin PDAC hücre hattı modellerinde CD44 geninin CD44 siRNA ile susturulması sonucu gen ekspresyonunun azaldığını gözlemledik. Ekstrasellüler matriksin önemli yapıtaşı proteinlerinden fibronektin ve Kollajen IV'ün ise kısmi olarak protein ekspresyon seviyesinin azaldığını tespit ettik.

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilerin ekstrasellüler matriks yıkımına hedefli etkili ilaç yaklaşımlarının geliştirilmesine ve PDAC'de migrasyon, invazyon ve metastazın inhibe edilmesine dayalı ilaç hedeflerinin bulunmasına katkı sağlamasını temenni etmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1) Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & DePinho, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 2006; 20(10), 1218-1249.
- 2) Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A., & DePinho, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 2016; 30(4), 355-385.
- 3) Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., & Lucas, A. L. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014; 20(32), 11182.
- 4) Gharibi, A., Adamian, Y., & Kelber, J. A. Cellular and molecular aspects of pancreatic cancer. *Acta histochemica*. 2016; 118(3), 305-316.
- 5) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03487016>. Erişim Tarihi. 30/10/2019
- 6) Abramson, M. A., Jazag, A., Van Der Zee, J. A., & Whang, E. E. The molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointestinal cancer research: GCR*. 2007; 1(4 Suppl 2), S7.
- 7) Wong, M. H., Xue, A., Baxter, R. C., Pavlakakis, N., & Smith, R. C. Upstream and downstream co-inhibition of mitogen-activated protein kinase and PI3K/Akt/mTOR pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2016; 18(7), 425-435.
- 8) Waters, A. M., & Der, C. J. KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018; 8(9), a031435.
- 9) Drosos, Y., Escobar, D., Chiang, M. Y., Roys, K., Valentine, V., Valentine, M., Rehg, J.E., Sahai, V., Begley, L.A., Ye, J., Paul, L., McKinnon, P.J., Sosa-Pineda, B. ATM-deficiency increases genomic instability and metastatic potential in a mouse model of pancreatic cancer. 2017; *Scientific reports*, 7(1), 11144.
- 10) Pellegata, N. S., Sessa, F., Renault, B., Bonato, M., Leone, B. E., Solcia, E., & Ranzani, G. N. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer research*. 1994; 54(6), 1556-1560.
- 11) Modi, S., Kir, D., Banerjee, S., & Saluja, A. Control of apoptosis in treatment and biology of pancreatic cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2016; 117(2), 279-288.
- 12) Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2011; 30(1), 87.
- 13) Hamacher, R., Schmid, R. M., Saur, D., & Schneider, G. Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular cancer*. 2008; 7(1), 64.

- 14) New, M., Van Acker, T., Long, J. S., Sakamaki, J. I., Ryan, K. M., & Tooze, S. A. Molecular pathways controlling autophagy in pancreatic cancer. *Frontiers in oncology*. 2017; 7, 28.
- 15) Kong, B., Cheng, T., Wu, W., Regel, I., Raulefs, S., Friess, H., ... & Michalski, C. W. Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2015; 6(31), 32154.
- 16) Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., ... & Mautner, J. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development*. 2011; 25(7), 717-729.
- 17) Wang, S., Huang, S., & Sun, Y. L. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: a review. *BioMed research international*, 2017.
- 18) Dangi-Garimella, S., Krantz, S. B., Shields, M. A., Grippo, P. J., & Munshi, H. G. Epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer progression. In *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Transworld Research Network. 2012
- 19) Roberts, B. J., & Whitelaw, M. L. Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(51), 36351-36356.
- 20) Guo, S., Fesler, A., Wang, H., & Ju, J. microRNA based prognostic biomarkers in pancreatic Cancer. *Biomarker research*. 2018; 6(1), 18.
- 21) Diaz-Riascos, Z. V., Ginesta, M. M., Fabregat, J., Serrano, T., Busquets, J., Buscail, L., ... & Capellá, G. Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2019; 17, 491-503.
- 22) Puls, T. J., Tan, X., Whittington, C. F., & Voytik-Harbin, S. L. 3D collagen fibrillar microstructure guides pancreatic cancer cell phenotype and serves as a critical design parameter for phenotypic models of EMT. *PloS one*. 2017; 12(11), e0188870.
- 23) Dongre, A., & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2019; 20(2), 69-84.
- 24) Fink, D. M., Steele, M. M., & Hollingsworth, M. A. The lymphatic system and pancreatic cancer. *Cancer letters*. 2016; 381(1), 217-236.
- 25) Murakami, T., Hiroshima, Y., Matsuyama, R., Homma, Y., Hoffman, R. M., & Endo, I. Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Annals of gastroenterological surgery*. 2019; 3(2), 130-137.
- 26) Weniger, M., Honselmann, K. C., & Liss, A. S. The extracellular matrix and pancreatic cancer: a complex relationship. *Cancers*. 2018; 10(9), 316.
- 27) Salazar, K. D., Lankford, S. M., & Brody, A. R. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF- β 1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2009; 297(5), L1002-L1011.

- 28) Richards, K. E., Zeleniak, A. E., Fishel, M. L., Wu, J., Littlepage, L. E., & Hill, R. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 2017; 36(13), 1770.
- 29) Sun, Q., Zhang, B., Hu, Q., Qin, Y., Xu, W., Liu, W., Sun, Q., Zhang, B., Hu, Q., Qin, Y., Xu, W., Liu, W., Yu, X. & Xu, J. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics*, 8(18), 5072 & Xu, J. (2018). The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics*. 2018; 8(18), 5072.
- 30) Bourguignon, L. Y. Matrix Hyaluronan-CD44 Interaction Activates MicroRNA and LncRNA Signaling Associated With Chemoresistance, Invasion, and Tumor Progression. *Frontiers in oncology*. 2019; 9.
- 31) Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. The integrins. *Genome biology*. 2007; 8(5), 215.
- 32) Ruoslahti, E. Integrins. *The Journal of clinical investigation*. 1991; 87(1), 1-5.
- 33) <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/what-is-the-extracellular-matrix-and-the-basal-lamina/what-is-integrin/what-ligands-bind-to-integrin/>
- 34) Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*. 2006; 119(19), 3901-3903.
- 35) Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., & Schlaepfer, D. D. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature cell biology*. 2000; 2(5), 249.
- 36) Tian, H., Myhre, K., Golzio, C., Katsanis, N., & Blobel, G. C. Endoglin mediates fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$ integrin and TGF- β pathway crosstalk in endothelial cells. *The EMBO journal*. 2012; 31(19), 3885-3900.
- 37) He, Y., Chen, Z. Y., Zhu, J., Xiong, Y., Li, K., Dong, J. H., & Li, X. Interaction between cancer cells and stromal fibroblasts is required for activation of the uPAR-uPA-MMP-2 cascade in pancreatic cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13(11), 3115-3124.
- 38) Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., & Rosochacki, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016; 31(sup1), 177-183.
- 39) Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006; 69(3), 562-573.
- 40) Jakubowska, K., Pryczynicz, A., Januszewska, J., Sidorkiewicz, I., Kemon, A., Niewiński, A., Kedra, B., & Guzińska-Ustymowicz, K. (2016). Expressions of matrix metalloproteinases 2, 7, and 9 in carcinogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Disease markers*, 2016.
- 41) Shoulders, M. D., & Raines, R. T. Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*. 2009; 78, 929-958.

- 42) Medici, D., & Nawshad, A. Type I collagen promotes epithelial–mesenchymal transition through ILK-dependent activation of NF- κ B and LEF-1. *Matrix Biology*. 2010; 29(3), 161-165.
- 43) Olivares, O., Mayers, J. R., Gouirand, V., Torrence, M. E., Gicquel, T., Borge, L., Lac, S., Roques, J., Lavaut M.N., Berthezene, P., Rubis, M., Secq, V., Garcia, S., Moutardier, V., Lombardo, D., Iovanna, J.L., Tomasini, R., Guillaumond, F., Vander Heiden, M.G. Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nature communications*. 2017; 8, 16031.
- 44) Akiyama, S. K., Yamada, K. M., & Hayashi, M. The structure of fibronectin and its role in cellular adhesion. *Journal of supramolecular structure and cellular biochemistry*. 1981; 16(4), 345-358.
- 45) Löhr, M., Schmidt, C., Ringel, J., Kluth, M., Müller, P., Nizze, H., & Jesnowski, R. Transforming growth factor- β 1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer research*. 2001; 61(2), 550-555.
- 46) Engel, P., Boumsell, L., Balderas, R., Bensussan, A., Gattei, V., Horejsi, V., ... & Stockinger, H. CD nomenclature 2015: human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology. *The Journal of Immunology*. 2015; 195(10), 4555-4563.
- 47) Porcelli, S., Brenner, M. B., Greenstein, J. L., Terhorst, C., Balk, S. P., & Bleicher, P. A. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4– CD8 γ – cytolytic T lymphocyte. *Nature*. 1989; 341(6241), 447.
- 48) Cleary, M. A., Narcisi, R., Focke, K., Van der Linden, R., Brama, P. A. J., & van Osch, G. J. V. M. Expression of CD105 on expanded mesenchymal stem cells does not predict their chondrogenic potential. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016; 24(5), 868-872.
- 49) Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in immunology*. 2017; 8, 292.
- 50) Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., ... & Simeone, D. M. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*. 2007; 67(3), 1030-1037.
- 51) Naor, D., Sionov, R. V., & Ish-Shalom, D. CD44: structure, function and association with the malignant process. In *Advances in cancer research*. 1997; (Vol. 71, pp. 241-319). Academic Press.
- 52) Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2017; 5, 18.
- 53) Wang, L., Zuo, X., Xie, K., & Wei, D. The role of CD44 and cancer stem cells. In *Cancer Stem Cells*. 2018; (pp. 31-42). Humana Press, New York, NY.

- 54) Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. Concise review: emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic target. *Stem cells translational medicine*. 2015; 4(9), 1033-1043.
- 55) Li, X. P., Zhang, X. W., Zheng, L. Z., & Guo, W. J. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015; 8(6), 6724.
- 56) Zhao, S., Chen, C., Chang, K., Karnad, A., Jagirdar, J., Kumar, A. P., & Freeman, J. W. CD44 expression level and isoform contributes to pancreatic cancer cell plasticity, invasiveness, and response to therapy. *Clinical Cancer Research*. 2016; 22(22), 5592-5604.
- 57) Ozpolat, B., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2014; 66, 110-116.
- 58) Kaya K, İyiöz S, Kayacan B, Abit H, Şenyiğit ŞC, Özbacı Fİ, Gürbüz N. The Nanoparticle-Based Targeted Therapy For Pancreatic Cancer and Clinical Trials. *Med J SDU* 2019; 26(4): 506-511.
- 59) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2), 248-254.
- 60) Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjöstedt, E., Lundberg, E., Al-Khalili Szigartyo C., Skogs, M., Takanen, J.O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M, Lindskog, C., Danielsson, F., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Olsson, I., Navani, S., Huss, M., Nielsen, J., Ponten, F., Uhlen, M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014; 13(2), 397-406.
- 61) Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology*. 2018; 11(1), 64.
- 62) Venkatasubramanian, P. N. Imaging the pancreatic ECM. In *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Transworld Research Network. 2012
- 63) Skrzydlewska, E., Sulkowska, M., Koda, M., & Sulkowski, S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2005; 11(9), 1251.
- 64) Tian, C., Clauser, K. R., Öhlund, D., Rickelt, S., Huang, Y., Gupta, M., ... & Hynes, R. O. Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019; 116(39), 19609-19618.
- 65) Zeltz, C., Primac, I., Erusappan, P., Alam, J., Noel, A., & Gullberg, D. Cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumors: Emerging role of integrins. In *Seminars in cancer biology*. 2019; Academic Press.

- 66) Özdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J. L., Zheng, X., Wu, C. C., Simpson, T. R., ... & De Jesus-Acosta, A. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer cell*. 2014; 25(6), 719-734.
- 67) Hingorani, S. R., Harris, W. P., Beck, J. T., Berdov, B. A., Wagner, S. A., Pshevlotzky, E. M., ... & Raghunand, N. Phase Ib study of PEGylated recombinant human hyaluronidase and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016; 22(12), 2848-2854.
- 68) Bai, Y., Bai, Y., Dong, J., Li, Q., Jin, Y., Chen, B., & Zhou, M. Hedgehog signaling in pancreatic fibrosis and cancer. *Medicine*. 2016; 95(10).
- 69) Tjomsland, V., Pomianowska, E., Aasrum, M., Sandnes, D., Verbeke, C. S., & Gladhaug, I. P. Profile of MMP and TIMP expression in human pancreatic stellate cells: regulation by IL-1 α and TGF β and implications for migration of pancreatic cancer cells. *Neoplasia*. 2016; 18(7), 447-456.
- 70) Jiang, W., Zhang, Y., Kane, K. T., Collins, M. A., Simeone, D. M., di Magliano, M. P., & Nguyen, K. T. CD44 regulates pancreatic cancer invasion through MT1-MMP. *Molecular Cancer Research*. 2015; 13(1), 9-15.
- 71) McFarlane, S., McFarlane, C., Montgomery, N., Hill, A., & Waugh, D. J. CD44-mediated activation of α 5 β 1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices. *Oncotarget*. 2015; 6(34), 36762.
- 72) Öhlund, D., Franklin, O., Lundberg, E., Lundin, C., & Sund, M. Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC cancer*. 2013; 13(1), 154.
- 73) Hu, D., Ansari, D., Zhou, Q., Sasor, A., Hilmersson, K. S., & Andersson, R. Stromal fibronectin expression in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *World journal of surgical oncology*. 2019; 17(1), 29.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı : Furkan İlker	Soyadı : ÖZBALCI
Doğum Yeri : Isparta	Doğum Tarihi : 06.06.1994
Uyruğu : T.C.	Tel : 545 514 48 77

Eğitim Düzeyi

Mezun Olduğu Kurum	Mezun Olduğu Yıl
Lise : Rize TOBB Fen Lisesi	2008-2012
Lisans : İstanbul Üniversitesi Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2012-2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Biyolog	SDÜ Arş. Uyg. Hastanesi	2017-2019

Yabancı Dilleri

Yabancı Dilleri	YDS Puanı	Yökdil Puanı
İngilizce	52,5	61,25