

**PAN-AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRÜ DANUSERTİB'İN
PANKREATİK KARSİNOMA HÜCRELERİNDE KROMOZOMAL
GEÇİŞ KOMPLEKS GENLERİNİN mRNA İFADE DÜZEYLERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CENGİZ ÇOLAK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
KASIM - 2019**

**PAN-AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRÜ DANUSERTİB'İN
PANKREATİK KARSİNOMA HÜCRELERİNDE KROMOZOMAL
GEÇİŞ KOMPLEKS GENLERİNİN mRNA İFADE DÜZEYLERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CENGİZ ÇOLAK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN**

**MERSİN
KASIM - 2019**

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others'works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

21KASIM 2019 / 21NOVEMBER 2019



Cengiz ÇOLAK

ÖZET

PAN-AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRÜ DANUSERİTİB'İN PANKREATİK KARSİNOMA HÜCRELERİNDE KROMOZOMAL GEÇİŞ KOMPLEKS GENLERİNİN mRNA İFADE DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması sonucu oluşan kötü tümörlerin vücutta meydana getirdiği bir hastalık durumudur. Pankreas kanseri de bu hastalık grubunda en ölümcül olanıdır. Pankreas kanserinin en sık görülen şekli pankreas duktal adenokarsinomu'dur. Pankreas kanseri tüm kanser tedavi yöntemlerine ve erken metastazlara direnç ile karakterize biyolojik bir fenotipe sahiptir ve genellikle geç teşhis edilir. İnsan kanser hücreleri genellikle, mitozdaki hatalardan kaynaklanan DNA miktarındaki veya organizasyonundaki değişikliklerle karakterize edilir, bu da kromozom kararsızlığı ve anöploidi ile sonuçlanır. Kanser hücrelerinin aşırı çoğalmasında Aurora kinazlar etkin rol oynamaktadır. Bu kinazlardan Aurora -A, -B ve -C olarak memelilerde üç alt tipi tanımlanmıştır. Diğer bir yandan, bu kinazların terapötik inhibisyonu, büyük bir ihtimalle hücre bölünmesi sırasındaki temel rollerinden dolayı potansiyel anti-kanser tedavilerinin gelişimi için cazip bir hedef haline gelmiştir. Aslında, birkaç küçük molekülü Aurora kinaz inhibitörü hali hazırda geliştirilmiştir ve bazıları Faz-I ve -II klinik deneylerinde bazı insan tümörlerinde ümit verici klinik etkinlik göstermiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde, aurora kinazlara karşı güçlü etkinlik gösteren en gelişmiş klinik bileşiklerden biri de Danusertib (eski adı: PHA-739358)'dir. Bu her üç Aurora kinaz üzerinde etkili olduğundan Pan-Aurora Kinaz inhibitörü olarak adlandırılmıştır. Bu bilgiler dahilinde, tümöral MIA PaCa-2, metastatik CFPAC-1 karsinoma hücrelerinde ve HEK293t (embriyonik böbrek epiteli) kontrol hücrelerinde doz/zaman bağımlı olarak Pan-Aurora Kinaz inhibitörü Danusertib'in kromozomal geçişte rolleri olan Kromozomal Geçiş Kompleksi (CPC) genlerinin ifade düzeylerine etkilerinin mRNA düzeyinde araştırılması bu çalışmanın kapsamını oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, doz/zaman bağımlı Danusertib'in, CPC yolağındaki genlerden; AURKB, INCENP, CDCA8 ve BIRC5 gen ifade düzeyi üzerine inhibisyon etkisi CFPAC-1, MIA PaCa-2 ve HEK293t hücrelerinde araştırılmıştır. Bu çalışmada, Pan-Aurora Kinaz inhibitörü Danusertib'in metastatik CFPAC-1 hücre hattında AURKB (24h=11,5 kat, 48h=6,8 kat artış), INCENP (ölçüm sonuçlanmadı), CDCA8 (24h=6,4 kat, 48h=6,8 kat artış) ve BIRC5 (24h=30,4 kat, 48h=4,4 kat artış) gen ifade düzeyleri doz/zaman bağımlı inhibisyon etkisi önemli bir değergöstermedi. Bununla birlikte, CFPAC-1 hücrelerinin Danusertib'e karşı bir direnç gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak Danusertib'in tümöral MIA PaCa-2 hücre hattında ise CPC yolağı genlerinin ifade düzeyleri doz/zaman bağımlı inhibisyon etkisi önemli bir düzeyde olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak Danusertib pankreas kanserinde *in vitro* çalışmalarla antitümöral bir ilaç olduğunu kanıtlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Pankreas Karsinoma, Aurora Kinaz, Danusertib, CFPAC-1, MIA PaCa-2, AURKB.

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PAN-AURORA KINASE INHIBITOR DANUSERTIB ON THE mRNA EXPRESSION LEVELS OF CHROMOSOMAL TRANSITION COMPLEX GENES IN PANCREATIC CARCINOMA CELLS

Cancer is a disease caused by uncontrolled cell proliferation of bad tumors in the body. Pancreatic cancer is the most fatal in this disease group. Pancreatic ductal adenocarcinoma is the most common form of pancreatic cancer. Pancreatic cancer has a biological phenotype characterized by resistance to all cancer treatment methods and early metastases and is usually diagnosed late. Human cancer cells are often characterized by changes in the amount or organization of DNA resulting from errors in mitosis, resulting in chromosome instability and aneuploidy. Aurora kinases play an important role in the proliferation of cancer cells. Of these kinases, three subtypes have been identified as Aurora -A, -B and -C in mammals. On the other hand, the therapeutic inhibition of these kinases has probably become an attractive target for the development of potential anti-cancer therapies due to their fundamental role during cell division. In fact, several small molecule Aurora kinase inhibitors have already been developed, and some have shown promising clinical efficacy in some human tumors in Phase-I and-II clinical trials. As a result of the studies, one of the most advanced clinical compounds showing strong activity against aurora kinases is Danusertib (formerly known as PHA-739358). This is named as Pan-Aurora Kinase inhibitor because it is effective on all three Aurora kinases. Within this information, the effects of dose/time dependent Danusertib onto the mRNA levels of chromosomal passenger complex (CPC) genes in pre-cancerous MIA PaCa-2, metastatic CFPAC-1 carcinoma cells and in HEK293t control epithelium cells is the aim of the study. Targeting the aim of the project, dose/time dependent danusertib was applied to these cells and quantified the mRNA levels of the CPC pathway (AURKB, INCENP, CDCA8 and BIRC5) genes. In this study, AURKB (24h=11,5 fold, 48h=6,8 fold increase), INCENP (The measurement did not result), CDCA8 (24h=6,4 fold, 48h=6,8 fold increase) and BIRC5 (24h=30,4 fold, 48h=4,4 fold increase) gene expression levels in the metastatic CFPAC-1 cell line of Pan-Aurora Kinase inhibitor Danusertib showed no significant value for dose/time dependent inhibition effect. However, it was concluded that CFPAC-1 cells showed resistance to Danusertib. Moreover, in Danusertib's tumoral MIA PaCa-2 cell line, expression levels of CPC pathway genes have shown a significant level of dose/time dependent inhibition effect. In conclusion, Danusertib has proved to be an antitumor drug in pancreatic cancer by in vitro studies.

Keywords: Pancreas Carcinoma, Aurora Kinase, Danusertib, CFPAC-1, MIA PaCa-2, AURKB

Advisor: Assoc. Prof. Ahmet Ata ÖZÇİMEN, Department of Biology, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgibirikiminden yararlandığım, oldukça özverili ve fedakâr olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e, katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullanılan CFPAC-1 duktal pankreatik adenokarsinoma hücrelerini sağlayan Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya, MIA PaCa-2 hücrelerini sağlayan Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ömer Faruk BAYRAK'a ve çalışmalarımda bana yardımcı olan Öğ. Gör. Derya YETKİN'e teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Hikmet ÇELİK, Hamide DOĞAN, Erkan ALABAŞ, İsmail Ayberk KIRBIYIK ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek lisans hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz içtenlikle teşekkür ederim.

Bu Yüksek lisans tez çalışması Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce 2019-1-TP2-3444 Proje Numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Pankreasın Anatomisi ve Fizyolojisi	3
2.2. Pankreas Neoplazmaları ve Oluşum Mekanizmaları	5
2.2.1. Kistik Neoplazmlar	6
2.2.2. Pankreatik Karsinoma	8
2.2.2.1. Pankreas Kanseri Prekürsörleri	10
2.2.2.2. Moleküler Karsinogenez	11
2.2.3. Pankreatoblastom	13
2.3. Pankreas Kansellerinin Tedavisi	13
2.4. Aurora Kinaz ve Hücre Döngüsü	13
2.5. Kromozomal Geçiş Kompleksi (CPC) Yolağı	15
2.5.1. AURKB	17
2.5.2. INCENP (Inner Centromere Protein)	17
2.5.3. BOREALİN (CDCA8)	18
2.5.4. SURVİVİN(BIRC5)	18
2.6. Pan Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib(PHA-739358)	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Materyaller	21
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	21
3.1.2. Kullanılan Hücreler	21
3.1.2.1. CFPAC-1 Hücreleri	22
3.1.2.2. MIA PaCa-2 Hücreleri	22
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	22
3.1.3.1. Hücre Kültürü Kimyasalları	22
3.1.3.2. Gen Ekspresyonu Deney Kimyasalları	23
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	23
3.1.4.1. Hücre Kültürü Cihazları	23
3.1.4.2. Real Time RT-PCR reaksiyonunda Kullanılan Cihazlar	24
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Hücre Kültürü	25
3.2.1.1. CFPAC-1 Hücre Kültürü	25
3.2.1.2. MIA PaCa-2 Hücre Kültürü	28
3.2.2. Doz ve Zaman Bağımlı İlaç Uygulama	28
3.2.3. Hücrelerin Harvesting Yöntemi	29
3.2.4. Gen İfadesi Yöntemi	30
3.2.4.1. RNA Pürifikasyonu	30
3.2.4.2. cDNA Sentezi	31
3.2.4.3. qRT-PCR Tekniğı ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi Yöntemi	32
3.3. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	35

	Sayfa
4.1. Bulgular	35
4.1.1. CPC Yolağı Gen İfade Düzeylerinin Analizi	35
4.1.1.1. CFPAC-1 Hücrelerinde CPC Yolağı Gen İfade Düzeyleri	35
4.1.1.2. MIA PaCa-2 Hücrelerinde CPC Yolağı Gen İfade Düzeyleri	38
4.2. Tartışma	41
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	48
EKLER	55
ÖZGEÇMİŞ	57



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İnvaziv Pankreatik Adenokarsinomada Moleküler Değişim	11
Tablo 3.1. Deney aşamasında kullanılan sarf malzemeler	21
Tablo 3.2. Hücre Kültürü Kimyasalları	23
Tablo 3.3. Gen Ekspresyonu Deney Kimyasalları	23
Tablo 3.4. Hücre Kültürü Cihazları	24
Tablo 3.5. CFPAC-1 hücreleri için besiyeri miktarları	25
Tablo 3.6. MIA PaCa-2 hücreleri için besiyeri miktarları	28
Tablo 3.7. CFPAC-1 hücreleri için deney öncesi uygulanan besi miktarları ve hücre sayıları. 24 saat ve 48 saat kontrol grupları	28
Tablo 3.8. MIA PaCa-2 hücreleri için deney öncesi uygulanan besi miktarları ve hücre sayıları. 24 saat ve 48 saat kontrol grupları	29
Tablo 3.9. CFPAC-1 hücreleri için Danusertib miktarları ve hücre sayıları. 24 saat ve 48 saat ilaç grupları	29
Tablo 3.10. MIA PaCa-2 hücreleri için Danusertib miktarları ve hücre sayıları. 24 saat ve 48 saat ilaç grupları	29
Tablo 3.11. 24/48 saat kontrol ve ilaç uygulanmış CFPAC-1 hücreleri RNA kalite miktarları	30
Tablo 3.12. 24/48 saat kontrol ve ilaç uygulanmış MIA PaCa-2 hücreleri RNA kalite miktarları	30
Tablo 3.13. CFPAC-1 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları	31
Tablo 3.14. MIA PaCa-2 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları	31
Tablo 3.15. ACTB, AURKB, INCENP, CDCA8 ve BIRC5 gen primerleri	33
Tablo 4.1. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve AURKB ekspresyonu	35
Tablo 4.2. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CDCA8 ekspresyonu	36
Tablo 4.3. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve BIRC5 ekspresyonu	37
Tablo 4.4. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve AURKB ekspresyonu	38
Tablo 4.5. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CDCA8 ekspresyonu	39
Tablo 4.6. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve BIRC5 ekspresyonu	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Pankreasın anatomik ilişkileri, abdomenin üst lomber vertebra seviyesinden geçen kesitinden görülmesi	3
Şekil 2.2. Pankreas'ın konumu ve anatomik yapısı	4
Şekil 2.3. Seröz kistadenoma. A, Bir seröz kistadenomanın kesiti. B, Kistler atipi göstermeyen kübik epitel ile döşelidir	7
Şekil 2.4. Pankreatik müsinöz kistadenoma. A, Pankreas kuyruğundaki müsinöz multiloküler kistten geçen kesit. B, Kistlerin içi silindirik müsinöz epitel hücrelerle kaplı	7
Şekil 2.5. İntraduktal papiller müsinöz neoplazm. A, Pankreas başından geçen kesit. B, Küçük kanal ve kanalcıklara yayılan papiller müsinöz neoplazm	8
Şekil 2.6. PanIN'nın genetik değişiklikler göstererek ilerleme modeli	11
Şekil 2.7. Hücre döngüsünün mitotik fazının ilerlemesinde, Aurora kinaz A, B ve C'nin dahil edilmesi	15
Şekil 2.8. CPC proteinleri	16
Şekil 2.9. Pan Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib (PHA-739358) kimyasal yapısı	20
Şekil 3.1. Thermal Cyclers	24
Şekil 3.2. VIIA 7 Real-Time PCR cihazı	24
Şekil 3.3. Hücre Kültürü CO2 inkübatörü	26
Şekil 3.4. Hücre sayımında kullanılan cihaz ve sarf malzeme. A, Cedex Smart Slide XS hücre ölçüm cihazı. B, Cedex Smart Slide ve Cedex Smart Slide'a hücre-tripan mavisi karışımı uygulaması	27
Şekil 4.1. CFPAC-1 hücrelerinde AURKB geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	36
Şekil 4.2. CFPAC-1 hücrelerinde CDCA8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	36
Şekil 4.3. CFPAC-1 hücrelerinde BIRC5 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	37
Şekil 4.4. MIA PaCa-2 hücrelerinde AURKB geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	38
Şekil 4.5. MIA PaCa-2 hücrelerinde CDCA8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	39
Şekil 4.6. MIA PaCa-2 hücrelerinde BIRC5 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	40

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
AURKA	Aurora kinase A proteini
AURKB	Aurora kinase B proteini
AURKC	Aurora kinase C proteini
AKT	Protein kinase B (PKB β)
ACTB	Actin Beta (β -Actin) geni
ATP	Adenozin Trifosfat
BRCA2	Breast Cancer 2
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5 (Survivin)
CDCA8	Cell Division Cycle Associated 8 (Borealin)
CPC	Chromosomal Passenger Complex (Kromozomal Geçiş Kompleksi)
CF	Kistik Fibrozis
CFPAC-1	A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
IAP	Apoptoz inhibitör proteini
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INCENP	Inner centromere protein (Incenp)
IPMN	Intraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPBS	Di Phosphate Buffer Solution
FBS	Fetal Bovine Serum
MCN	Mucinous Cystic Neoplasms
MIA PaCa-2	Human pancreatic carcinoma cell line
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia
PDAC	Pankreas duktal adenokarsinomu
qRT-PCR	Real time reverse transcription polimerase chain reaction
RNA	Ribo Nükleik Asit
SCA	Serous cystadenoma
Ser	Serin
TGF β	Transforming Growth Factor Beta
Thr	Treonin
TSS	Treonin-Serin-Serin
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Pankreas kanseri gastrointestinal kanserler arasında son yıllarda giderek artan sıklığı ile dikkat çekmekte ve gastrointestinal kanser ile ilişkili ölümlerde ülkemizde mide ve kolon kanserinden sonra gelmektedir. Pankreas kanseri 1 yıllık genel sağkalım oranı %26 ve 5 yıllık sağkalım oranı %5'ten daha az olan son derece malign solid bir tümördür. Pankreas kanseri insidansı ve ölüm oranı, ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır. Hastalık nadiren 45 yaş öncesi rastlanır ve 50 yaş üstünde görülme sıklığı çok yüksektir [1,2]. Pankreas kanseri insidansı yaş farklılıklarının yanı sıra cinsiyetler arasında da farklılık göstermektedir. Bu hastalık erkeklerde sık rastlandığından kadınlara oranla %50 daha fazla görülmektedir. Erkeklerde bu oranın fazla olması nedenleri alkol, sigara kullanımı ve kanserojen madde maruziyetinin daha yaygın olduğu düşünülmektedir. Afrikalı ve Amerikalılar'da yıllık insidans oranı 15.3/100.000 iken, beyaz ırk popülasyonunda bu oran 11.6/100.000'e gerilemiştir [1,3]. Pankreas kanserinden, tüm dünyada her yıl 200.000'den fazla kişinin hayatını kaybettiği kayıtlara geçmiştir. Pankreas kanseri kaynaklı ölümlerin giderek artmakta olduğu ve ABD'de 2030 yılına kadar pankreas kanseri ikinci önde gelen ölüm nedenlerinden biri olacağı tahmin edilmektedir. Avrupa'da, pankreas kanser vaka oranlarında da artışlar olduğu ve hastalığın dünya genelindeki doğal seyrini vurguladığı bildirilmiştir [3].

Pankreas kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturan pankreas duktal adenokarsinomu, dünya genelinde kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sırada yer almaktadır [4]. Pankreas duktal adenokarsinomunda dört ana sürücü gen vardır (bir onkogen ve üç tümör baskılayıcı gen). Büyüme faktörü reseptörlerinden aşağı yönlü sinyalleme aracılığı eden küçük bir GTPaz kodlayan KRAS, en sık mutasyona uğramış onkogendir. KRAS'taki somatik mutasyonlar, spesifik sıcak noktalarda tümörlerin ve kümelenmelerin %90'ında meydana gelir (en yaygın olarak kodon 12). Temel bir hücre döngüsü düzenleyicisini kodlayan CDKN2A, en sık değiştirilen tümör baskılayıcı genidir ve %90'ından duktal adenokarsinomlarda fonksiyon kaybı meydana gelir. TP53 tümör baskılayıcı genindeki somatik mutasyonlar da sık görülür. TP53 tarafından kodlanan protein, hücrel stres yanıtında kilit bir role sahiptir ve çok çeşitli tümör tiplerinde mutasyona uğrar. Tümör baskılayıcı gen SMAD4, transforme büyüme faktörü (TGFβ) reseptörünün aşağı yönlü sinyaline aracılık eder ve tümörlerin yaklaşık %50'sinde inaktive edilir [3].

Bu tez çalışmasında kullanılan CPC yolağı gen primerlerinden AURKB, Ser/Thr kinaz ailesinin Aurora kinazlar alt ailesine ait bir protein olan Aurora kinaz B'yi kodlamaktadır. Kromozom 17p13.1'de bulunan AURKB geni, tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinden

terapötik hedefdir [5].INCENP geni, kromozom 11q12.3'de bulunan vemitozda CPC yolağının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan proteindir [6].CDCA8geni, 1. kromozom üzerinde bulunan veinsan Borealin proteinini kodlayan CPC yolağı ana bileşenlerindendir [7].BIRC5, 17. kromozomun telomerik bölgesinde bulunan ve apoptoz protein ailesinin en küçük üyesi olan survivin proteinini kodlayan genidir. BIRC5, 14,5 kb uzunlukta ve AURKB, INCENP ve CDCA8 genleriyle beraber CPC'yi oluşturmaktadır [8].

Bu çalışmada, metastatik ve non-metastatik pankreas karsinoma hücreleri olan CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında Aurora kinaz B inhibitörü olan Danusertib'in Real Time PCR yöntemi ile kromozomal geçiş kompleksi(CPC) yolağı Sybr green gen primerleri (AURKB, INCENP, CDCA8 ve BIRC5) kullanılarak gen ifade düzeylerinin belirlenmesi araştırılmıştır.

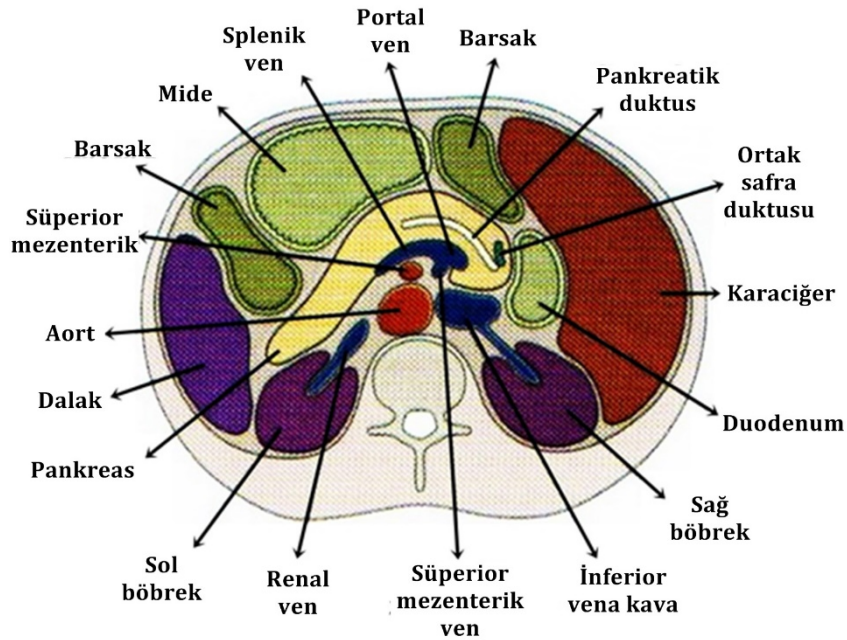


2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Pankreasın Anatomisi ve Fizyolojisi

Pankreas organı, tarihte ilk kez M.Ö.300'lerde anatominin babası olarak kabul edilen Kalsedonlu Herophilus tarafından tanımlanmaya çalışılmış; fakat yaklaşık 400 yıl kadar sonrasında ise, tanınmış bir hekim ve iyi bir anatomist olan Efesli Rufus tarafından "pankreas" olarak isimlendirilmiştir [9-11].

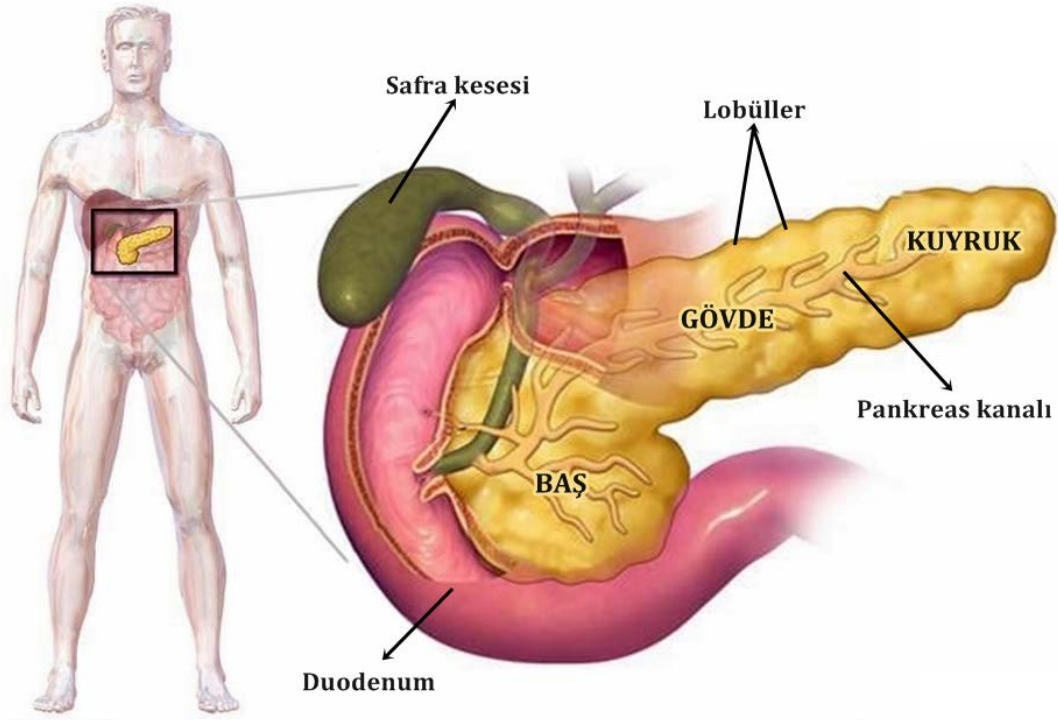
Erişkin bir insan pankreası, karın boşluğunda, midenin arkasında ve duodenumun "C" biçimindeki kıvrımından dalak hilusuna oblik olarak uzanan transvers yerleşimli retroperitoneal bir organdır (Şekil 2.1) [12,13]. Pankreas, ortalama 85-90gr ağırlığa, 15-20cm uzunluk ile 3cm en ve 1-1.5cm kalınlığa sahiptir. Erkeklerde 90gr, kadınlarda ise 85gr ağırlığında sindirim enzimleri ve hormonlar üreten bir endokrin (iç) ve ekzokrin (dış) salgı organıdır. Salgılanan enzimler, ekzokrin kısmın hücreleri tarafından depolanır ve salınır. Endokrin salgılar ise Langerhans adacıkları olarak bilinen endokrin dokuda bulunan hücre grupları tarafından sentezlenir [13,14].



Şekil 2.1. Pankreasın anatomik ilişkileri, abdomenin üst lomber vertebra seviyesinden geçen kesitinden görülmesi [12].

Pankreas organı, karın arka duvarında 1. ve 2. lomber vertebra hizasında, genellikle hareketsiz, retroperitoneal yerleşim gösteren bir organdır. Lokalizasyonu itibari ile

birçok organ ve anatomik yapı ile sıkı bir ilişki içerisindedir. Baş (head), gövde (body) ve kuyruk (tail) kısımlarından oluşur. Aralarında kesin anatomik sınırlar yoktur (Şekil 2.2) [13,14].



Şekil 2.2. Pankreas'ın konumu ve anatomik yapısı [15].

İnsan vücudunda salgılanan endokrin, ekzokrin ve karma olarak üç tip bez vardır. Karaciğerden sonra ikinci büyük salgı organı olan pankreas bunlardan endokrin ve ekzokrin salgısını yapmaktadır. Pankreastan salgılanan salgılar, metabolik düzenin devamlılığının sağlanmasında önemli bir yere sahiptir. Pankreasın sindirim enzimleri üreten ekzokrin kısmı tüm pankreasın %80-85'ini oluşturmaktadır. Endokrin kısmı yaklaşık 1 milyon hücre kümesinden ve Langerhans adacıklarından oluşmakta ve bu tüm pankreasın %2'sini teşkil etmektedir. Pankreasın geri kalan kısmı da ekstrasellüler matriks ve damarlardan oluşmaktadır [12,13,16].

Pankreas organının endokrin salgı yapan kısmı,kanın glikoz dengesini sağlamak ve vücut enerji metabolizması üzerine etki etmektedir. Ekzokrin salgı yapan kısmı ise ince bağırsağa sindirim enzimlerini salgılayarak besin sindirimi üzerine etki etmektedir. Endokrin kısmın en önemli salgıları vücudun kan şekeri seviyesini kontrol eden "insülin" ve "glukagon" hormonudur [17,18]. Pankreastan salınan enzimler de protein, karbonhidrat, yağ metabolizmasını etkiler ve sindirim sistemi motilitesini değiştirebilirler. Metabolik süreç içerisinde ekzokrin ve endokrin

salgı fonksiyonlarında meydana gelebilecek dengesizliklerden dolayı çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilmektedir[13,19].

2.2. Pankreas Neoplazmaları ve Oluşum Mekanizmaları

Günümüzde en yaygın ölüm nedenlerinden biri sayılan kanser neoplazik bir rahatsızlıktır. Patolojik bir kavram olan neoplazinin kelime anlamı, “yeni büyüme” ve “yeni oluşum”dur. Neoplazi, ayrıca hızlandırılmış ve otonomi kazanmış dokuproliferasyonu anlamına da gelmektedir. Neoplaziyi tanımlamada kullanılan diğer bir ifade de “şişlik” anlamına gelen tümör deyiminin kullanılması ve anlamını, herhangi bir sınırlama veya sonlanma göstermeyen, konak canlıının kontrol mekanizmaları dışında hareket eden, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla ortaya çıkan anormal bir doku kitlesi olarak açıklayabiliriz [20]. Pankreas organında geniş bir spektrumda ekzokrin neoplazmlar gelişebilmektedir. Bu neoplazmlar kistik ya da solid olabilir; bazıları benign olarak nitelendirilir, diğerleri ise tüm maligniteler içerisinde en öldürücü olanlar arasında yer alır[12].

Onkolojide, neoplazmların “benign” ve “malign” olarak gruplandırılmasının önemli bir yeri vardır. Çünkü bu ayırım, neoplazmin potansiyel klinik davranışı ve mikroskopik görünümü göz önüne alınarak yapılmıştır. Tıbbın babası sayılan Hippocrates (MÖ 460-375) tümörleri, masum (benign-iyi huylu-selim) tümörler ve tehlikeli (malign-kötü huylu-habis) hastanın ölümüne yol açan tümörler olarak ikiye ayırmıştır [20].

Benign tümörlerin büyüme hızı genellikle yavaştır. Hormona bağımlı benign tümörlerin büyüme hızı hormon düzeyine bağlı olarak bir süre sonra durabilmekte ve hatta küçülebilmektedir. Bu lezyon, insan vücudunda lokalize kalarak diğer bölgelerine yayılmayı pek sınırlı (kitlesini genişleterek) şekilde büyümektedir. Tübüler yapılar oluşturarak gelişen epitelyal kökenli benign tümörler, adenom olarak adlandırılmaktadır. Lokal cerrahi operasyon ile bu lezyon insan vücudundan çıkarılabilmekte ve hasta normal yaşamına devam edebilmektedir. Bazı benign tümörler ise lokalizasyon özelliğine bağlı olarak ciddi problemler ortaya çıkarabilmektedir [20].

Malign tümörlerin ise tamamı “kanser” olarak tanımlanmaktadır. Kanser, Latince’den köken almış ve “cancrum” sözcüğünden türetilmiştir. Kelime anlamı, yengeçtir ve tutunduğu yeri bırakmayan anlamına gelmektedir. Hippocrates’in bu şekilde tanımlaması, tümörleri şekline ve davranışına göre, yengeci referans olarak benzetmesi düşünülmektedir. Hippocrates’in, malign tümörleri, iyileşmeyen kabarıklıkları ve ülserleri anlatmak için kullandığı bilinmektedir. Malign

tümörlerin büyüme hızı genellikle yüksektir ve hızlı invazyon yapabilmektedir. Malign olarak tanımlanan bir neoplazm, çevre dokulara ve organlara invazyon yapabildiği gibi yıkıma (destrüksiyona) da uğratabilir. Malignitenin olduğu kısımdan uzak bölgelere vücut boşlukları, kan ve lenf yollarıyla yayılarak (metastaz) kişinin ölümüne sebep olmaktadır. Epitelyal kökenli malign tümörlerin tübüler yapılar oluşturarak gelişmesine “adenokarsinom” denir [20].

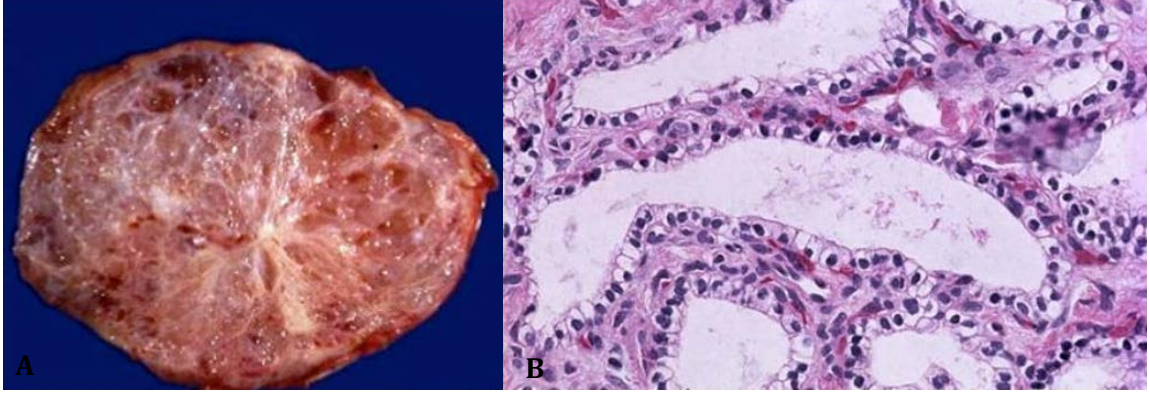
2.2.1. Kistik Neoplazmlar

Pankreasın kistik neoplazmları, neoplastik ve non-neoplastik kistler olarak iki grupta incelenmektedir. Non-neoplastik kistler başlıca psödokist ve sinüs mukozasındaki serömüköz bezlerin kanallarının tıkanıklığına bağlı oluşan kistik dilatasyonları (retansiyon kisti) içerirken neoplastik kistler, non-neoplastik kistlere nazaran daha karmaşık bir grup oluşturmaktadır [21,22]. Bu grupta gerçek kistik neoplazmlar (*seröz kistik neoplazm, müsinöz kistik neoplazm, intraduktal papiller müsinöz neoplazm (IPMN)*) ve kistik dejenerasyon gösteren solid pankreas tümörleri (*solid psödopapiller tümör, kistik nöroendokrin tümör, kistik duktal adenokarsinom*) yer alır. Solid pankreas tümörleri ile karşılaştırıldığında, kistik pankreas tümörleri ya benigndir ya da düşük malignite potansiyeline sahiptir. Müsinöz kistik tümörler ve IPMN malignite potansiyellerinin varlığı ve invaziv komponent içerebilmeleri nedeni ile ayrıcalıklı bir yere sahiptir [17,21,23].

Pankreasın kistik neoplazmları neoplastik ve neoplastik olmayan (non-neoplastik) olarak iki kısma ayrılarak incelenir. Neoplastik kistlerde, genellikle cerrahi tedavi uygulanırken, non-neoplastik kistlerde sadece semptomatik tedavi yeterli görülmektedir. Pankreas kistik neoplazmları, tüm pankreas neoplazmlarının %10-15’ini oluşturmakta ve benign ya da malign olabilmektedir [23-25]. Seröz kistadenom (SCA) gibi bazıları tamamen benign iken, müsinöz kistik neoplazmlar (MCN) gibi bazıları *dabeyign, borderline malign* veya *malign* olabilirler. Borderline malign neoplazmlar, tam malign bir neoplazmın tüm özellikleri olmasa da bazı özelliklerini taşır [12,25,26].

SCA’lar, berrak, saman rengi sıvı içeren ve glikojenden zengin, alçak küboidal epitelin çevrelediği tek veya birden fazla sayıda küçük kistlerden oluşan iyi huylu kistik neoplazmlardır (Şekil 2.3). SCA’lar, pankreasın tüm kistik neoplazmlarının %25-30’unu oluşturmaktadır. Asemptomatik olmakla birlikte genellikle tesadüfen saptanırlar. Bu tümörler ileri yaşlarda (ortalama 66 yaşlarda) görülmekle birlikte, kadınlarda erkeklerle kıyasla 2 kat daha fazla rastlanmaktadır. SCA’lar, çoğunlukla benigndir ve hastaların çok büyük kısmında cerrahi

rezeksiyon tedavi edicidir. Fakat nadiren de olsa bazı seröz kistadenomlar malign dejenerasyon (kanserleşme, seröz kistadenokarsinom) olabilme ihtimali taşımakta ve malignite gelişme riski yaklaşık %0,1 olarak bildirilmektedir[12,23,25,27].



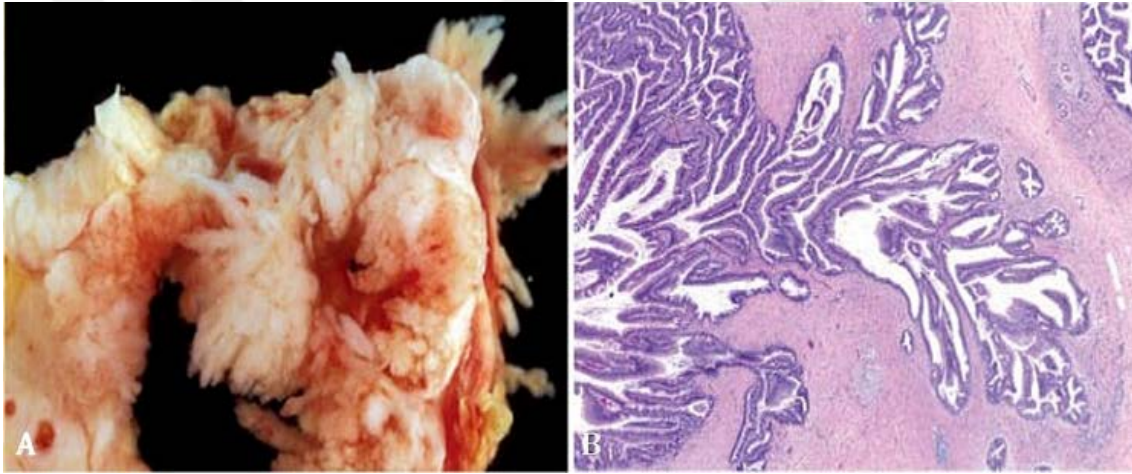
Şekil 2.3. Seröz kistadenoma. **A**, Bir seröz kistadenomanın kesiti. **B**, Kistler atipi göstermeyen kübik epitel ile döşelidir [28].

MCN'ler, pankreasın genellikle kuyrukbazen de gövde kısmında yerleşim gösteren, tek veya birden fazla geniş kistik boşluklardan oluşur. Kist içeriği, genellikle mukoid özellikte olup müsin ile dolu ve kist içi yüzeyi değişik ölçülerde atipi gösterebilen müsinöz karaktere sahip epitel hücrelerle döşeli multi-kistik yapıda ve over benzeri stromaya sahip lezyonlardır (Şekil 2.4). MCN'ler, pankreas kistlerinin %10'unu oluşturmaktadır ve genellikle kadınlarda görülmektedir. Müsinöz kistadenomların bazıları seröz kistadenomlar gibi benign ya da tam aksine, borderline malign veya malign olabilir. Benign müsinöz kistadenomda belirgin sitolojik ve yapısal atipi olmaz, oysa borderline müsinöz kistik neoplazmlarda belirgin sitolojik ve yapısal atipi vardır ancak dokuya invazyon gözlenmez [12,23,25,27].



Şekil 2.4. Pankreatik müsinöz kistadenoma. **A**, Pankreas kuyruğundaki müsinöz multiloküler kistten geçen kesit. **B**, Kistlerin içi silindirik müsinöz epitel hücrelerle kaplı [28].

İntraduktal papiller müsinöz neoplazmlarda (IPMN) da müsin içeren kistler görülür (Şekil 2.5) ve IPMN, müsinöz kistik neoplazmlar gibi benign, borderline-malign veya malign olabilir [24,29]. Dünya Sağlık Örgütü IPMN'leri son sınıflandırmasına göre 4 gruba ayırmış ve bunlar; adenom, borderline, karsinoma in-situ ve karsinomdur. IPMN, pankreasın diğer tüm kistik neoplazmlarının arasında %20-25 oranında görülmektedir [27]. IPMN'ler diğer kistik neoplazmlardan farklı olarak kadın ve erkekte eşit oranda ve 25 ile 90 yaş aralığında görülmektedir. IPMN'lerde benign ve malign IPMN'yi birbirinden ayırmak oldukça kolaydır çünkü benign IPMN'lerde dokularda invazyon olmamaktadır [12,30,31].



Şekil 2.5. İntraduktal papiller müsinöz neoplazm. **A**, Pankreas başından geçen kesit. **B**, Küçük kanal ve kanalcıklara yayılan papiller müsinöz neoplazm [28].

2.2.2. Pankreatik Karsinoma

Daha sıklıkla “pankreas kanseri” olarak bilinen pankreasın infiltratif duktal adenokarsinomu, Birleşik Devletler’de akciğer, kolon ve meme kanserinden sonra dördüncü sıklıkta gelen kanserden ölüm nedenidir. Tüm kanserler arasında pankreas kanseri en yüksek mortaliteye sahip olan kanserdir [32]. 2019 yılında yapılan araştırmaya göre, 2018 yılında ABD’de pankreas kanserinden 28.600 kişinin hayatını kaybettiği bildirilmiş ve 2019’un sonlarına doğru yaklaşık 30.000 civarında Amerikalı’nın pankreas kanseri tanısı alacağı ve tanı sonrası takip eden bir yıl içerisinde hepsinin bu hastalıktan hayatını kaybedeceği tahmin

edilmektedir. Pankreas kanserinde göz ardı edilmemesi gereken en önemli husus beş yıllık sağkalımoranının (%5'ten az) çok düşük olmasıdır [12].

Günümüzde kanserler arasında en ölümcül olan ve son yıllarda artış gösteren pankreas kanseri, tanı zorluğu, hızlı metastaz yapma ve hayatta kalım süresinin kısa olması sebebiyle tedavi yaklaşımlarını güçleştiren bir hastalıktır [32]. 2010 yılında ABD'deki hastaliksız ölümler dahil bütün ölümlerin %0.014'ü neoplastik pankreas kanseri oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün GLOBOCAN 2012 verilerine göre Türkiye'deki tüm kanserler içinde, pankreas kanseri görülme sıklığı erkeklerde yaklaşık %0,9 iken, kadınlarda bu oran %0,5 olarak yayınlanmıştır. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2017 yılında yayınlanan verilere göre 2015 yılı Türkiye'de, pankreas kanserinsidansı erkeklerde yaklaşık (100.000'de) 5,6 iken, kadınlarda (100.000'de) 3,3 olarak yayınlanmıştır [33-35].

İngiltere ve ABD'de yıllık pankreas kanseri insidansı milyonda yaklaşık 100 kişidir; bu ülkelerde ölümlerle sonuçlanan dördüncü en yaygın kanserdir. Her yıl kanser teşhisinin %2,4'ünü ve kansere bağlı ölüm nedenlerinin %5,8'ini oluşturmaktadır [32]. Hastalığın görülme sıklığına bakıldığı zaman, çevresel faktörler ve aile hikayelerine bağlı olarak genellikle batılı veya sanayileşmiş ülkelerde daha yüksektir. Hastalık 45 yaşından önce nadir görülür ve vakaların yaklaşık %80'i 60 ile 80 yaşları arasındadır. Tüm dünyada pankreas kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha yaygındır. Erkek/Kadın oranı 1,5 ile 2 arasındadır. Ancak, İngiltere'den gelen son rakamlar, bu erkeklerin üstünlüğünün son 20 yılda 1,25-1'e düştüğünü göstermektedir [36].

Pankreas kanserlerinde tümörlerin yerleşim yeri çoğunlukla pankreas başında %60-75 oranlarında bulunur ve 1,5-5cm çapa sahip, sert, sklerotik ve sarı-beyaz renktedir. Gövde kısmı oranı %10-20, kuyruk kısmı %5-15 oranında ve tümör baş kısmına göre daha büyük çaplardadır. Çoğu soliterdir ve nadiren de heterotopik pankreas dokusunda gelişebilir [37].

Pankreas kanserlerinin çoğu, pankreatik intraepitelyal neoplaziler olarak adlandırılan, pankreas kanallarındaki mikroskobik non-invaziv epitel proliferasyonlarından kaynaklanmaktadır. Pankreas kanseri için dört önemli yönetici geni vardır: KRAS, CDKN2A, TP53 ve SMAD4. KRAS mutasyonu ve CDKN2A'daki değişiklikler, pankreas tümörü oluşumunda erken dönem olaylarıdır[3].

Pankreas kanseri, genellikle çok geç teşhis edilir. Bu sebeple, kemoterapi ve radyasyon tedavisine çok dirençlidir. Pankreas tümörlerinin %90'ından fazlası pankreasın ekzokrin

hücrelerinden gelişir ve pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC) olarak adlandırılırken %5'lik bir oranda ise endokrin hücrelerinde gelişir [18,38,39]. Günümüzde, çok az sayıda tedavi stratejisivardır, ancak, bunlar çoğunlukla birçok yan etkisi olan kombinasyonlardır. Örneğin, Gemsitabin 1997'deki ilk klinik etkinlik olarak kendini göstermesinden bu yana, on yıldan uzun bir süredir birinci basamak PDAC tedavisi için referans ilacı olarak gösterilmiştir. Gemsitabin'in kombinasyon terapisi ile etkinliğini arttırmaya yönelik tüm girişimler, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) tirozin kinaz inhibitörü Erlotinib ile kombinasyonu'nda olduğu gibi, hayatta kalmada en iyi marjinal iyileşmelerde bulunmuştur. Bununla birlikte, poli-kemoterapi gibi son zamanlardaki yaklaşımlar veya Gemsitabin'in etkinliğini artıran stratejiler, bazı önemli iyileştirmeler sağlamıştır. Yine de bu kombinasyonlar, metastatik hastalık için bakım standartları olmasına rağmen, çoğunlukla etkinlikleri sınırlıdır ve hastalığın etkili bir tedavisinden ziyade yaşam kalitesinin iyileşmesine olanak sağlar [38].

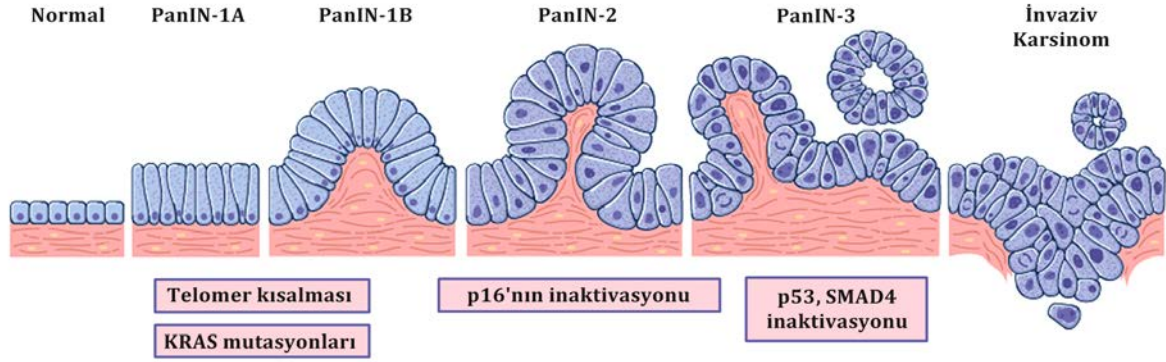
2.2.2.1. Pankreas Kanseri Prekürsörleri

*Pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN); **pankreasın mikroskopik duktus ve duktullerinde*** displastik epitelden, non-invaziv ve invaziv karsinomaya ilerlemesiyle oluşan prekürsör lezyonlardır ve sıklıkla pankreas başında görülmektedir [12,40].

PanIN-invaziv karsinom sekansı aşağıdaki gözlemler ile desteklenmiştir:

- ✘ PanIN'ın invaziv kanser dağılımı pankreastaki dağılımı ile birbirine benzerlik gösterir.
- ✘ PanIN'ların PDA'ların prekürsör lezyonları olduğusaptanmıştır [41].
- ✘ PanIN pankreas parankiminde sıklıkla infiltratif karsinom komşuluğunda bulunur.
- ✘ PanIN'dainvaziv kanserde rastlanan benzer gen mutasyonları saptanmıştır.
- ✘ PanIN'daki epitelyal hücreler ciddi ölçüde telomer kısalması gösterir. PanIN'datelomer uzunluğunda kritik kısalma, bu lezyonlarda gelişen kromozomal anomalilerin birikmesine ve invaziv karsinom gelişimine yol açabilir [12,40].

Bu gözlemlere dayanarak normal bir panreatik dokununpankreatik adenokarsinomaya doğru ilerlemesi,diğer bir ifadeyle PanIN gelişimine dair bir model ileri sürülmüştür (Şekil 2.6).PanIN'lar değişik ölçülerde atipikepitel hücrelere göre, 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar, PanIN-1 (PanIN-1A ve PanIN-1B), PanIN-2 ve PanIN-3'dür [12,40,41].



Şekil 2.6. PanIN'nın genetik değişiklikler göstererek ilerleme modeli [12].

2.2.2.2. Moleküler Karsinogenez

Pankreas kanseri, temelinde hücrenin genetik unsurlarında meydana gelen değişime bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Genetik hasar (veya mutasyon=başkalaşım) meydana gelmesinin sebepleri, radyasyon, kimyasal madde maruziyeti ve virüsler gibi çevresel faktörler etken oluşturabildiği gibi kişinin aile hikayesine bakılarak kalıtsal olup olmadığı görülebilir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, kromozomal değişikliklerden nokta mutasyonlarına kadar çok çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler saptanmıştır. Bu genetik değişikliklerin paterni pankreas kanserini diğer kanserlerden çok farklı tutmaktadır. Aşağıda Tablo 2.1'de pankreas kanserindeki moleküler değişiklikler ve genetik değişiklikler verilmiştir [12].

Tablo 2.1. İnvaziv Pankreatik Adenokarsinomda Moleküler Değişim

Gen (Kromozom Bölgesi)	Genetik Değişim Gösteren Tümörlerin Yüzdesi
K-RAS (12p)	%>90
P16CDKN2A (9p)	%>95
p53 (17P)	%50-70
SMAD4 (18q)	%55
AKT2 (19q)	% 10-20
MYB(6q)	%10
AIB1 (20q)	%10
BRCA2 (13q)	%7-10
LKB1/STK11 (19p)	%<5
MKK4 (17p)	%<5
TGFβ-R 1 (9q) veya TGFβ-R2 (3p)	%<5
RB1 (13q)	%<5

K-RAS:K-RAS geni (kromozom 12p), hücre yaşamı ve hücre fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilmekte ve pankreas kanserinde en sıkdeğişen onkogendir. Bu onkogen içindeki mutasyonlar daha çok kodon 12'nin 1 ekzonunda ve bazen de kodon 61 ve 13'te bulunur. Bu onkogen pankreas kanserlerinin %83-90'ında nokta mutasyonu ile aktive olur. Bu nokta mutasyonları K-RAS gen ürününün intrinsek GTPaz aktivitesini bozar ve sürekli olarak aktif olan bir protein ortaya çıkar[12,42,43].

CDKN2A (p16): p16 geni kromozom 9p'da lokalizedir ve birçok kanser türünde olduğu gibi pankreas kanserinde de en sık inaktive olan tümör baskılayıcı genidir. Genellikle olguların %95'inde inaktive olur. p16 proteini, hücre siklusu kontrolünde kritik rol oynar ve p16 inaktivasyonu önemli bir hücre siklus kontrol noktasını ortadan kaldırır.p16 proteini,sikline bağımlı kinazları (hücre döngüsü kontrolünde etkili olan moleküller) inhibe ederek bölünme aşamasındaki hücrenin G₁ fazından S fazına geçişini engellemiş olur. Ayrıca p16 geni, karsinomlarda ve yüksek dereceli premalign lezyonlarda aşırı ekspresyonu olduğu bilinmektedir [12,44].

SMAD4: SMAD4 tümör baskılayıcı geni kromozom 18q21'de lokalizedir ve pankreas kanserlerinin %55'inde inaktive olur. DPC4 olarak da bilinen SMAD4, hücre-yüzey reseptör ailesinden transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)'nın sinyal iletiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. SMAD4'ün normal fonksiyonu büyümeyi baskılama ve apoptozu başlatma gibi görünmektedir. Bu nedenle, SMAD4 kaybı hücre popülasyonunda iki önemli kontrolü ortadan kaldırır. SMAD4, diğer kanser tiplerinde nadiren inaktive olur [12,43].

p53:p53 tümör baskılayıcı genin (kromozom 17p2) inaktivasyonu pankreas kanserlerinde oldukça sık rastlanır ve bu oran %50 ile %70 arasında görülmektedir. p53, DNA zarar gördüğünde belirli kontrol noktalarında (G₁'den S fazına geçiş) hücre döngüsünü geciktirerek veya durdurarak genomu korur.Döngünün durdurulmasıyla hücrenin DNA onarımı sağlanır ve yeni hücre oluşumu gerçekleşir. Aksi halde hasarlı hücrelerin mitoz (G₂/M kontrol noktası) içine girmesini önler.p53 gen ürünü, hem hücre siklusu kontrolünü ve ekspresyonunu sağlayan, hem de hücre ölümünün (apoptoz) başlatıcısı olan nükleer DNA-bağlayan hayati bir öneme sahip proteindir[43,45].

Diğer Genler: Pankreas kanserinde, önemli ama daha az sıklıkta görülen ve sayıları giderek artan, zedelenmiş genetik lokuslar bildirilmektedir. Bu genler görülme sıklığına göre tablo içinde belirtilmiştir (Tablo 2.1) [12].

2.2.3. Pankreatoblastom

Pankreatikoblastom veya pankreasın infantil tip karsinoması olarak da bilinen pankreatoblastom, erişkinde oldukça nadir rastlanan bir pankreatik tümör olup 1 ile 15 yaş arasındaki çocuklarda sık görülen bir neoplazmdır [12,46]. Tümör ilk olarak 1957’de Becker tarafından 15 aylık bir erkek çocukta “pankreasın infantil adenokarsinoması” olarak tanımlandı. Daha sonraki takip eden olgu raporlarında, 1977’de Horie ve arkadaşları, 8 haftalık gebelikte, diğer embriyolara benzer şekilde pankreasın normal embriyonik görünümüyle histolojik benzerlikleri gözlemledi ve “pankreatoblastom” adını verdi [46]. Küçük çocuklarda en sık görülen pankreas tümörü olmasının yanısıra literatürde yaklaşık 100 olgu bildirilmiştir [47]. Farklılaşmamış hücrelerle karışık skuamöz adaları ile belirgin bir mikroskopik görünümü vardır. Sağkalımı pankreasın duktal adenokarsinomundan daha iyi olabilmekle birlikte, tamamen malign neoplazmlardır.

2.3. Pankreas Kanserlerinin Tedavisi

Malign tümörlerin sebep olduğu tüm pankreas kanserleri, tümörlerin hızlı ilerlemesi sebebiyle yüksek mortalite oranına sahiptir. Kanser evresine bağlı olarak prognoz belirlenir ve 5 yıllık sağkalım oranları %5’in altındadır. Buna ek olarak tanı sonrası hastaların çoğu, genellikle ilk 1 yıl içinde kaybedilir. Pankreas kanseri, pankreasın lokalizasyonuna bağlı olarak sinsi ilerlemesi sebebiyle geç bulgu veren bir hastalıktır ve çoğunlukla invazyon ilerlemesi ve metastatik hastalık evresinde teşhis edilmektedir. Pankreas kanserlerinde cerrahi yöntemle alınamayacak derecede ileri evrede bulunan ve metastaz yapmış tümörlere genellikle kemoterapi tedavisi uygulanmaktadır. Fakat pankreas kanserinde kemoterapi uygulamalarının yeri sınırlıdır. Günümüz tedavi yöntemlerinin gelişmesiyle kemoterapi uygulamalarında hem adjuvan hem de neoadjuvan tedavi yöntemi tercih edilmektedir [48,49]. Adjuvan tedavi yöntemi, ameliyat sonrası uygulanan kemoterapi tedavi yöntemi olarak adlandırılmakta ve amacı cerrahi operasyon sonrasında kalan gözle görünmeyen kanser hücrelerini öldürerek kanserin nüks etme olasılığını azaltmaktır. Neoadjuvan tedavi yöntemi ise ameliyat öncesi kullanılan kemoterapi yöntemi olarak adlandırılmakta ve amacı kanser hücrelerini küçültmektir [17,50].

2.4. Aurora Kinaz ve Hücre Döngüsü

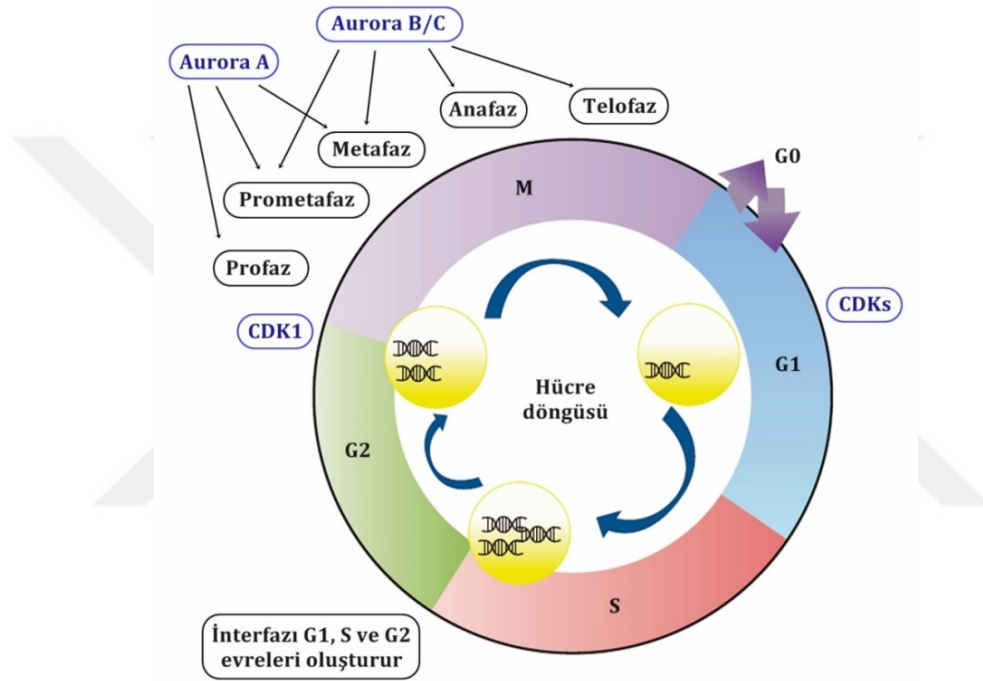
Mitoz düzenleyici (mitozun başlangıcı ve ilerlemesi) ve hücre döngüsünün evrelerini kontrol eden, yüksek oranda korunan serin/treonin (Ser/Thr) kinaz ailesinin bir üyesi olan

Aurora Kinazlar'ın kanser hücrelerinde sıklıkla aşırı miktarda ifade edildikleri tespit edilmiştir. Mitotik kromozom ayrışmasının ana düzenleyicileri olarak, metafaz plağında yoğunlaşma ve oryantasyon, iğ düzeneği ve sitokinezin tamamlanması hücre bölünmesinde önemli bir rol oynar. Bunlar, hücre döngüsünün G₂/M fazında regülasyonu sağlarlar [51-53]. Bu ailenin, Aurora -A, -B ve -C kinazlarını içeren üç memeli alt tipi tanımlanmıştır. Bu kinazların hepsi mitoz sırasında farklı lokalizasyon ve fonksiyonlara sahip, korunmuş bir C-terminal katalitik domeini ve değişken uzunluklarda bir N-terminal domeini içermektedir [52,54-56].

“Aurora” kelimesi Latin kökenlidir ve gerçek anlamı “Şafak” demektir. Güneş fırtınalarının uzaya yaymış olduğu yüklü parçacıkların dünyanın her iki manyetik alan hatlarına yönlendirilmesi ile gerçekleşen etkileşim sonucu oluşan ışık yayılımıdır. *Aurora borealis* olarak adlandırılan kuzey kutbu ışıması en çok görülen ışık yayılımıdır. Aurora geni ilk olarak 1980'lerin sonunda *Drosophila Melanogaster*'de (meyve sineği) mutant iğ-kutup oluşumuna neden olan mutant aleller olarak taranma sırasında Glover ve arkadaşları tarafından tespit edildi. Mitotik iğlerin *Aurora borealis* gibi benzer renk ışımaları göstermesi nedeniyle Aurora olarak adlandırılmıştır [54].

Aurora kinaz A, kanser hücre hatlarında sıklıkla tespit edilen, AURKA geni tarafından kodlanan ve kromozom lokusu 20q13.2 içerisinde lokalize olan proteindir [56]. Aurora kinaz A, “polar kinaz” olarak adlandırılır ve sentrozom lokalizasyonu, sentrozom ayrılması ve bipolar iğ montajı kısaca doğru sentrozom döngüsü için gereklidir. Hücre döngüsünün S fazı başlangıcında sentrozomlarda lokalize ve mitoz sırasında bipolar iğ mikrotübüllerine doğru kayar. Aurora kinaz A mutasyonu anormal iğ morfolojisine ve mitoz içine girişte gecikmelere neden olmaktadır. Aurora kinaz B, “ekvatorial kinaz” olarak adlandırılır ve iğ kontrol noktasında uygun sitokinez ve kromozom birleşmesi için gereklidir. Ayrıca Aurora B mutasyonu kromozomun yanlış hizalanmasına ve sitokinezin tamamlanmamasına neden olur [55-58]. Aurora C, germ hücrelerinde eksprese edilir ve diğer somatik hücrelerde tespit edilmemiştir. Aurora-C, ilk önce sentromerlere ve daha sonra da mitotik hücrelerin orta bölgesine lokalize olduğu, sonraki evrelerde ve sitokinez sırasında mayotik iğ oluşumunda rol oynadığı düşünülen proteindir. Buna ek olarak, son yıllarda yapılan birçok çalışmada Aurora B gibi Aurora C'nin de INCENP tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. Aurora C ve INCENP'nin aşırı ekspresyonu, Aurora B'nin substrat histonu H3'ün fosforilasyonunda bir artışa neden olmuştur. Bu, Aurora C'nin aynı zamanda bir kromozomal geçiş proteini olduğunu ve Aurora B'ye benzer şekilde çalıştığını gösterir. Aurora kinaz C, germ hücrelerinde olduğu gibi testis hücrelerinde de yüksek oranda eksprese edilir ve mitozda Aurora kinaz B'ninkine benzer bir rol oynar [58-61].

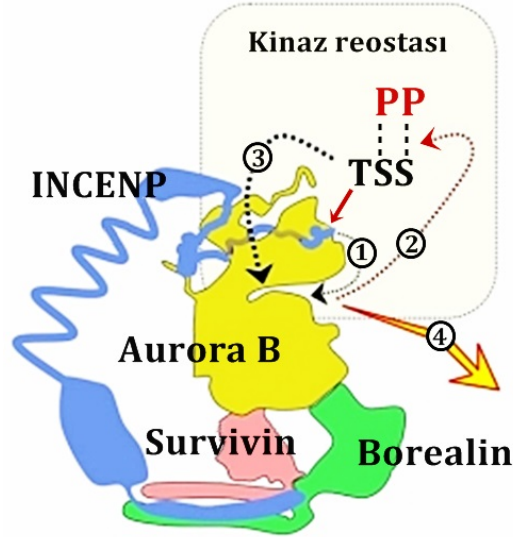
Bu düzenleyici proteinler, özellikle kinetokorlar arasındaki hücre iskeleti ve kromozomal yapılarda aktive olduğundan, mitoz içine giriş, sentrozom fonksiyonu, kromozom düzeneği ve segregasyonun kontrolünü sağlayan işlevlerde görev almaktadır. Bu kinazların disfonksiyonu, tümörgenezi sağlayan kararlı bir kromozom içeriğinin korunamaması ile ilişkilendirilmiştir [51,59,62]. Özellikle, insan Aurora Kinazları'nın ekspresyon seviyeleri, lösemi, lenfoma, miyeloma, meme, kolon, pankreas, yumurtalık ve mide tümörleri dahil olmak üzere belirli bir çok kanser türlerinde aşırı derecede artmış olduğundan, bu yolaktaki proteinlere hedefli bir ajan etkin olabilecektir.



Şekil 2.7. Hücre döngüsünün mitotik fazının ilerlemesinde, Aurora kinaz A, B ve C'nin dahil edilmesi [63].

2.5. Kromozomal Geçiş Kompleksi (CPC) Yolağı

Hücre bölünmesi sırasında, özellikle metafaz plağı oluşuktan sonra ve anafaz geçişi sırasında etkili olan protein ve enzim grubudur. Hücre bölünmesi sürecinde, birkaç adımda ana düzenleyici olarak ortaya çıkmaktadır [64]. Dörtlü kompleks olarak hareket eder ve hücreyi bölünmeye doğru ilerletir. Bu dörtlünün oluşturduğu işlevsel birime Kromozomal Geçiş Kompleksi (CPC) adı verilir [64-66].



Şekil 2.8.CPC proteinleri: ①Aurora B kinazı aktive için INCENP bağlanır. ② INCENPTSS (Thr-Ser-Ser) motifini fosforile eder. ③ Fosforlanmış INCENP,④ diğer substratları fosforile eden kinazı tamamen aktifleştirir [67].

CPC,dört önemli proteinden oluşur. Bunlar,bir enzimatik alt ünite olan AURK-Bve üç düzenleyici alt ünite olan INCENP (İç Sentromer Proteini), Survivin, Borealin'dir.Survivin, Borealin ve INCENP, Kromozomal Geçiş Kompleksi'nin enzimatik bileşeninin, kinaz Aurora B'nin aktivitesini ve lokalizasyonunu düzenleyen üç bileşendir [64-66,68,69].

CPC proteinleri, mitozun başlangıcında, yoğunlaşan kromozomların kollarından iç sentromerlere aktarılır.CPC proteinleri,metafazsırasında iç sentromerde yoğunlaşır. Metafazın anafaza geçişi sırasında ise, kromozomlar kutuplara doğru hareket ederken, sentromerlerden ayrışır ve sonunda sitokinezde oluşan paketlenmiş mikrotübüllerin hücre içi köprüsünün içindeki orta gövdeyle birleşmeden önce merkezi iğın mikrotübüllerine yerleşir.CPC proteinleri, anafaz sırasında iğ orta bölgesine ve son olarak sitokinez sırasında orta gövdeye göç eder [20,21]. CPC, kromozom yoğunlaşması, iğ düzeneği, kromozom hizalaması için uygun olmayan mikrotübül-kinetokor etkileşimlerini düzelterek, iğ kontrol noktasına sinyal göndererek ve sitokinezin tamamlanmasında rol oynar [64,66,70].

Mitoz sırasında kromozomların yanlış ayrılmasından kaynaklanan kromozomal instabilite, tümör oluşumuna neden olarak kanser hücrelerinin belirleyici özelliğini taşımaktadır. Genom bütünlüğünün bozulmasıyla gerçekleşen bu kromozomal dengesizliklerin ortaya çıkmasını engelleyen ve başarılı bir hücre bölünmesini sağlayan sofistike bir mekanizma olan CPC ile hücre siklusu garanti altına alınmıştır [69].

2.5.1. AURKB

AURKB geni, Ser/Thr kinaz ailesinin aurora kinazlar alt ailesine ait bir protein olan Aurora kinaz B'yi kodlamaktadır. Kromozom 17p13.1'de bulunan AURKB geni, AURK-A gibi tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinden terapötik hedeftir [5]. Aurora kinaz B proteini, insanda 1314 baz çifti uzunluğundaki AURKB transkript varyantından sentezlenmektedir. Aurora B mitoz bölünmenin erken evresinde, kromozom kolu boyunca dağıtılır ve daha sonra kromozomun sentromeri üzerinde toplanır ve bölünmenin orta aşamasına kadar burada kalır. Mitozun geç evresinde ise bölünme sonrası, Aurora kinaz B sentromerden merkezi için orta bölgesine ve bölme oluşunun hücre korteksine göç eder [71].

Mitoz ve mayoz bölünmeleri sırasında Aurora kinazlar kromozom-mikrotübül birlikteliğini etkileyerek kromozom ayrışmasını düzenlemektedir. Profaz safhasında sentromerler üzerinde kromozom kolları boyunca lokalizedir. Metafaz safhası süresince iç sentromer bölgesinde lokalize olur ve kromozom kollarıyla etkileşim kurar, anafaz safhasında korteks ve iç düzeneğinin merkezine doğru hareket eder ve telofaz evresinde akümüle olur. INCENP (iç sentromer proteini), borealin (CDCA8), survivin (BIRC5) ve diğer non-enzimatik alt birimlerle birlikte kromozomal geçiş kompleksini (CPC) oluşturmaktadır. Bu kompleksin görevi, kinaz lokalizasyonunu ve aktivitesini yönetmektir [68].

CPC mitozun erken aşamasında, mitotik için kromozomlar ve mikrotübüller arasında yaptığı yanlış bağlanmaları düzelterek kromozom dizilimini organize eder. Mitoz sırasında bu kompleks hücrede iki şekilde bulunur. Komplekslerden biri dört bileşeni de içerirken (AURKB, INCENP, BIRC5, CDCA8), diğeri INCENP ve AURKB'yi içerir. Dörtlü bileşen kromozom dizilimi ve sitokinez süresince işlevsel iken, INCENP-Aurora kinaz-B kompleksi H3 histonunun modifiye edilmesinden sorumludur [68,72]. Aurora kinaz B, insan pankreas kanseri hücre hatları (AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, CFPAC-1, Mutj, HPAFII, MIAPaCa-2, Panc-1 ve Su.86.86)'nda yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Ayrıca, AURKB'nin gen anlatımının anti-sense oligonükleotidler ile inhibisyonu pankreas kanserlerinde hücre döngüsünün tutuklanmasını sağlayan çalışmalar da mevcuttur [73].

2.5.2. INCENP(Inner Centromere Protein)

INCENP geni, 135kD ile 155kD'luk ve kromozom 11q12.3'de bulunan proteindir. Mitozda CPC yolağının düzenlenmesinde, aktivitesinde ve lokalizasyonunda kilit rol oynayan proteindir. Kromozomların hizalanması ve ayrılması için mikrotübüllerin stabilizasyonu ve iç iplikciklerinin

toplanmasını sağlar [6]. INCENP'in mikrotübüllere *in vitro* bağlandığı da gösterilmiştir. INCENP iki fonksiyonel modülden oluşmakta ve bunlardan; C-terminali, AURKB veya AURKC ile N-terminali ise survivin (BIRC5) ve borealin (CDCA8) ile bağlanır. Merkezi SAH domaini AURKB/C'yi CPC iç sentromer ve mikrotübül bağlanma aktivitesinde görevlendirir [64,74]. Kromozomal Geçiş Komplexinden iç sentromer proteininden (INCENP) veya Aurora B kinazdan birinin kaybı, kromozom ayrışma kusurlarına ve sitokinezde başarısızlıklara neden olur. Bunun yanı sıra, INCENP ve Aurora B, mitoz sırasında aynı lokalizasyon desenlerine sahiptir ve birbirlerine doğrudan bağlandığı *in vitro* deneylerle gösterilmiştir. INCENP'nin direkt olarak Aurora B'nin bir substratı olduğu hipotezine yol açtığı sonucuna varılmıştır [75].

2.5.3. BOREALİN (CDCA8)

Borealin, survivin, Aurora kinaz B (AURKB) ve INCENP'yi içeren dörmlü kompleksin, kromozomal geçiş kompleksi (CPC)'nin en önemli ana bileşenlerindedir [65,66,68]. Borealin, Survivin ve INCENP'e doğrudan bağlanmakta fakat Aurora B'ye bağlanmaz ve *in vitro* DNA bağlama özellikleri gösterir [21].

İnsan Borealin proteinini kodlayan CDCA8 geni, 1. kromozom üzerinde bulunan ve 280 amino asitlik bir bazik proteini kodlayan 10 ekzondan oluşmuştur. Bu genin psödogenleri kromozom 7, 8 ve 16'da bulunur. Veri tabanı araştırmaları, incelenen tüm omurgalılarda insan Borealin'e olan yakınlıklarını ortaya çıkarmıştır. İlginçtir ki, Borealin, tavuk, *X. laevis* ve zebra balığı gibi ek bir paraloğa sahiptir [7,68].

Borealin, esas olarak mitoz sırasında organ gelişiminde ifade edilir. Proliferasyon oranının yüksek olduğu Borealin'i ifade eden yetişkin dokular testis, kolon ve deridir. Diğer yetişkin dokularda borealin ekspresyonu zayıftır [65].

2.5.4. SURVİVİN (BIRC5)

Survivin, apoptoz ve hücre bölünmesinde anahtar bir rol oynayan, çoğu kanserde belirgin şekilde aşırı eksprese edilen, yeni bir protein ailesi olan apoptoz inhibitör proteini (IAP) ailesinin en küçük üyesidir [76]. Protein yapısında tek BIR domaini vardır ve karboksi ucunda RING-finger domain bulunmamaktadır [76,77]. Embriyonik gelişim sırasında, dokularda ve pek çok malign tümörde yaygın olarak eksprese edilirken, farklılaşmış yetişkin doku hücrelerinde neredeyse hiç eksprese edilmez. Survivin, hızlı-bölünmeyi desteklemek amacıyla hücre siklusunun G₂/M fazında eksprese edilmektedir [78]. Hücre bölünmesi sırasında kromozomların düzgün

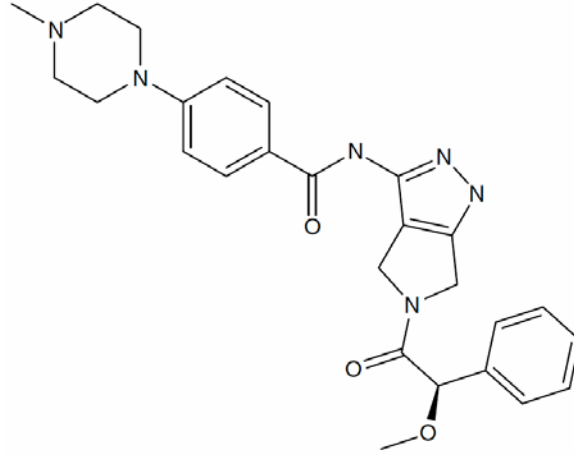
ayrılmasına yardım etmektedir. Kanserde survivinin aşırı ekspresyonu, hücre siklusu kontrol noktalarını hızla geçip hücrelerin mitozla gitmesine neden olmaktadır [8].

Survivin, 16,3 kD'lık ve 142 aa'lık bir proteindir. Kodlayan gen 17. kromozomun telomerik bölgesinde bulunur ve 14,5 kb'dir. Bu gen, 4 ekzon ve 3 introna sahiptir. IAP ailesinin en küçük üyesidir. Survivin'in pek çok splice varyantı (izoformları) mevcuttur. Farklı dokularda ve kanser türlerindeki proapoptotik uyarıya yanıt olacak survivin izoformları arasında karmaşık bir denge mevcuttur. Survivin mitoz sırasında hücre siklusu-bağımlı bir şekilde eksprese edilir. Survivin ekspresyonu hücre siklusunun G₂/M fazında G₂ ve S fazlarına göre 10 kat daha fazladır. Çoğu normal diferansiye hücrede ekspresyonu tespit edilemez seviyelerdedir. Ancak, hızlı bölünen normal hücrelerde, CD34+ kemik iliği kök hücreleri, bazal epitelyum hücreleri, timositler ve normal uterin serviks bazal epitelyum hücreleri gibi, yavaş yavaş tespit edilebilir ekspresyon düzeyleri izlenir [8]. Kanserlerin çoğunda, özellikle kolon, akciğer, meme, beyin tümörlerinde ve melanomda, survivin ekspresyonu oldukça yüksektir [8,78].

2.6. Pan Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib (PHA-739358)

Pan-Aurora Kinaz inhibitörü Danusertib, çeşitli malignitelerin patogenezinde rol oynayan ve güçlü antikanser etkilere sahip tirozin kinazlardan BCR-ABL inhibitörüdür [58]. Danusertib'in insan pankreas kanserinde [79], mide kanserinde [80], baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, rahim ağzı kanserinde [81], melanomda [82], insan yumurtalık karsinomunda [83] ve meme kanserinde [84,85] indükleyici etkileri olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Danusertib, pro-apoptotik protein ekspresyonunda bir artış meydana getirmesinin yanı sıra anti-apoptotik proteinlerde bir azalmaya neden olmaktadır [80]. Ayrıca Danusertib, doz ve zaman bağımlı şekillerde mitokondri aracılı apoptozu ve otofajiyi indüklemiştir [80,82,83].

Danusertib, BCR-ABL tirozin kinazların yanısıra Aurora kinaz ailesinden Aurora-A, -B ve -C kinazlarını inhibe eden, 3-aminopirazol türevi küçük ve güçlü bir ATP kompetitif inhibitörüdür (Aurora-A IC₅₀=13nM, Aurora-B IC₅₀=79nM ve Aurora-C IC₅₀=61nM) [51,60,83,86]. Kimyasal ismi *N*-{5-[2*R*]-2-methoxy-2-phenylacetyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-3-yl}-4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide dir [87]. Moleküler formülü (C₂₆H₃₀N₆O₃) ve 474.55g/mol moleküler ağırlığa sahip güçlü bir bileşiktir [63].



Şekil 2.9.Pan Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib (PHA-739358) kimyasal yapısı [87].

Oldukça çığır açıcı ve üç aurora kinazı da inhibe eden Danusertib, aslında insanda test edilen ilk aurora kinaz inhibitörüdür. Bunun yanı sıra Faz I ve Faz II denemelerinde de ilk klinik çalışmalar yine güçlü bir ilaç olan aurora kinaz inhibitörü Danusertib ile yapılmıştır [87].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

Bu tez çalışması Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM)'ndeki MERKÖK laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'nin TP2-Yüksek Lisans Tez Projesi kapsamında, 2019-1-TP2-3444 proje kodu ile desteklenmiştir.

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Deney aşamasında kullanılan sarf malzemeler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo 3.1. Deney aşamasında kullanılan sarf malzemeler

Deney aşamasında kullanılan sarf malzemeler
2 ml Cryo Tüp,CAPP
5 ml serolojik pipet, LP ITALIANA SPA
10 ml serolojik pipet, LP ITALIANA SPA
25 ml Serolojik Pipet, LP ITALIANA SPA
Pastör Pipeti, Hacim 3 ml, Uzunluk 150 mm, Taksimatlı, 26 damla/ml,LP ITALIANA SPA
Tissue culture flask 25 cm ² / filter screw cap, SARSTEDT
Tissue culture flask 75 cm ² / filter screw cap, SARSTEDT
Santrifüj Tüpü P.P, Vidalı Kapaklı 15 ml DNA/RNA free gamma steril, LABSOLUTE
Santrifüj Tüpü P.P, Vidalı Kapaklı 50 ml DNA/RNA free gamma steril, LABSOLUTE
10 ul Pipet ucu; Steril; Raklı, Filtreli, CAPP
200 ul Pipet ucu; Steril; Raklı, Filtreli, CAPP
1000 ul Pipet ucu; Steril; Raklı, Filtreli, CAPP
TC Plate 6 Well, Standard, F, SARSTEDT

3.1.2. Kullanılan Hücreler

Bu tez çalışmasında kullanılan CFPAC-1 duktal pankreatik adenokarsinoma hücreleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Güneş Esendağlı'dan ve MIA PaCa-2 insan pankreatik karsinoma hücreleri Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Ömer Faruk BAYRAK tarafından sağlanmıştır.

3.1.2.1. CFPAC-1 Hücreleri

CFPAC-1 hücre hattı “A Cystic Fibrosis Pancreatic Adenocarcinoma Cell Line” olarak adlandırılmaktadır. Sebebi Kistik Fibrozis (CF)’li bir hastadan pankreas kanalı karsinomundan elde edilmiştir [88]. Kistik Fibrozis, pankreas ve diğer organlardaki epitel hücrelerin elektrolit taşıma özelliklerini bozan kronik, kalıtsal bir hastalıktır. Bu hastalığın asıl kökeni 7. kromozomun üzerinde bulunan kistik fibrozis (CF) geninin mutasyonu sonucu oluşmasıdır. CFPAC-1 karaciğer kaynaklı metastaz yapmış ve pankreasa nüks etmiş epitel kökenli hücre hattıdır [89]. CFPAC-1 (ATCC No: CRL-1918) hücresi, insan pankreas kanseri epitel kökenli hücre soyudur, 26 yaşında beyaz ırktan kistik fibrozlu bir erkek hastadan duktal adenokarsinomdan (karaciğer metastazı) elde edilmiştir. Adherent (yüzeye tutunan) özelliği taşıyan aşırı malign bir hücredir. cAMP, adenil siklaz uyarıcıları ya da fosfodiesteraz inhibitörleri ile Cl⁻ kanallarını aktive edememektedir. Ayrıca, tümör oluşturucu karaciğerde küçük lezyon oluşturma özelliği vardır. CFPAC-1 hücre popülasyonunun sayısının iki katına çıkma süresi (doubling time) 32 saattir [89,90].

3.1.2.2. MIA PaCa-2 Hücreleri

MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™) hücresi, insan pankreas kanseri epitel kökenli hücre soyudur, 1975 yılında 65 yaşında beyaz ırktan bir erkeğin pankreas tümör dokusundan izole edilmiştir. Adherent (kültür kabına yapışan) özelliği taşımaktadır ve karsinoma hücrelidir [91].

MIA PaCa-2 pankreatik karsinomanın epitel kökenli hücre hattıdır. CFPAC-1 hücreleri gibi MIA PaCa-2 hücreleri de adherent (yüzeye tutunan) özelliğine sahiptir. TP53 ve p16/CDKN2A geninin mutasyonu sonucu oluşmuş ve ayrıca KRAS mutasyonu da bulunduğu için kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Hipotriployitdir ve L-Asparaginaz’a duyarlı bir hücre hattıdır. Bazı normal kromozomlardan yoksundur. MIA PaCa-2 hücre popülasyonu sayısının iki katına çıkma süresi (doubling time) 40 saattir [4,92].

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

3.1.3.1. Hücre Kültürü Kimyasalları

Hücre kültürü deneylerinde kullandığımız deney kimyasalları tablo halinde aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.2. Hücre Kültürü Kimyasalları

Hücre Kültürü Deney Kimyasalları
Danusertib (PHA-739358) 10mg, Mybiosource
Fetal Bovine Serum-SA-SOURCED 500mL,Hyclone
DMEM with High Glucose, with 4.0mM L-Glutamine, without Sodium Pyruvate 500mL,Hyclone
IMDM without L-glutamine, Lonza
Horse Serum, Biowest
Trypsin-EDTA w/ Phenol Red, Biowest
Penicillin-Streptomycin, Biowest
DPBS-10X w/o Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ , Biowest
Tripan Blue, BD.

3.1.3.2. Gen Ekspresyonu Deney Kimyasalları

Gen ekspresyonu deneylerimizde kullandığımız deney kimyasalları aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo 3.3. Gen Ekspresyonu Deney Kimyasalları

Gen Ekspresyonu Deney Kimyasalları
High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Germany.
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 200 rxn.,THERMO
GoTaq qPCR Master Mix, 200 x 50µl reactions, PROMEGA
AURKB, INCENP, CDCA8 ve BIRC5 ve ACTB gen primerleri

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

3.1.4.1. Hücre Kültürü Cihazları

Hücre kültürü için kullanılan cihazlar aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo 3.4. Hücre Kültürü Cihazları

Hücre Kültürü Cihazları
Esco Cell Culture (CCL-170B-8) CO ₂ inkübatör
Cedex XS Cell Analyzer
NanoQ mikrovolum spektrometer
Thermal cycler

3.1.4.2. Real Time RT-PCR reaksiyonunda Kullanılan Cihazlar

- ✘ Bibby Scientific™ Techne™ TC-512 Gradient Thermal Cycler.



Şekil 3.1. Thermal Cycler [93].

- ✘ Gen ekspresyonunda kullanılan Applied Biosistem ViiA™ 7 Real-Time PCR Sistemi - 96 Well.



Şekil 3.2. ViiA 7 Real-Time PCR cihazı [94].

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. CFPAC-1Hücre Kültürü

CFPAC-1 hücrelerinin besi yeri, 50ml'lik falkon tüplerinde hazırlandı. Birkaç besleme için hazırlanan besiyeri miktarları aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.5.CFPAC-1hücreleri için besiyeri miktarları.

Kullanılan Kimyasallar	Kullanılan Miktar
%87,5 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	43.75mL
%10 FBS (Fetal Bovine Serum)	5mL
%1 L-glutamin	0.5mL
%1 Pen-strep(Penicillin-Streptomycin)	0.5mL
%0.5 Amphotericin-B	0.25mL
Total miktar	50mL

Hücreler, hücre kültür kapları (T25 flask) içerisine ekimleri yapılarak, hazırlanan besi yeri ile 3 gün aralıkla düzenli olarak beslenmesi gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin inkübasyon işlemi, Esco Cell Culture (CCL-170B-8) cihazında, 37°C'de, %95 nemli atmosferde ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında yürütülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hücre Kültürü CO₂ inkübatörü [95].

Düzenli bir şekilde beslenen adherent özellikteki bu hücrelerin %80-90 oranında konflüens (hücre kabının kaplanması) olduğu zaman, Tripsin-EDTA ile muamele edilerek kültür kabından ayrılması sağlanmıştır. Kapların yüzeyinden ayrılan bu hücreleri, 15mL'lik falcon tüpler içerisine aktararak, üzerlerine DPBS eklenmiş ve 1240 rpm'de 5dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısım atılmıştır ve geriye kalan pellet kısım (hücreler) ise hücreler yeterli miktara ulaşana kadar tekrar ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan hücrelerde yeterli miktara ulaşıldığı zaman, aynı santrifüj işlemi tekrarlanarak hücre toplama işlemi yapılmıştır. Bu sefer pellet kısım, dondurma prosedürü uygulanarak -80°C'de saklama koşullarına uygun şekilde depolanmıştır. Hücreler deney ve dondurma prosedürü öncesinde Cedex XS (ROCHE, Mannheim, Germany) cihazı ile sayılmaktadır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Hücre sayımında kullanılan cihaz ve sarf malzeme. **A**, Cedex Smart Slide XS hücre ölçüm cihazı. **B**, Cedex Smart Slide ve Cedex Smart Slide'a hücre-tripran mavisi karışımı uygulaması [96,97].

Her sayım işleminde, santrifüj sonrası elde edilen hücreler (pellet), PBS (dondurma işlemi öncesi) veya katkısız IMDM (deney öncesi) ile 1ml'ye tamamlanmıştır. 1ml PBS (katkısız IMDM)- hücre karışımından 10 μ l ve tripan mavisinden 10 μ l alınarak 20 μ l'lik karışım oluşturulmuştur. Bu karışım Cedex XS Smart Slide kuyucuklarına aktarılarak, Cedex XS cihazından analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 1ml içerisindeki hücre sayısı ve hücrelerin canlılık oranı elde edilmiştir.

Dondurma prosedürü uygulanmadan önce Cedex Smart Slide XS hücre ölçüm cihazıyla hücre sayımı yapılmıştır. Sayım sonrası, 1ml içerisindeki hücre sayısı yaklaşık 2-3 milyon olacak şekilde FBS ile seyreltilerek 1.5ml'lik cryovial tüp veya tüpler içerisine aktarılmıştır. Daha sonra her tüpe %10 oranında (yaklaşık 100 μ l) DMSO (dimetil sülfoksit, hücrelerin donarak patlamasını önlemektedir) eklenmiştir. Hücrelerle doldurulan cryovial tüpler kademeli şekilde soğutularak (+4, -20, -80°C) -196°C sıvı azot tankı içerisinde depolanmıştır.

3.2.1.2. MIA PaCa-2 Hücre Kültürü

MIA PaCa-2 hücrelerinin besi yeri, 50ml'lik falkon tüplerinde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri miktarları tablo 3.6'de yer almaktadır.

Tablo 3.6. MIA PaCa-2 hücreleri için besiyeri miktarları.

Kullanılan Kimyasallar		Kullanılan Miktar
%85	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	42.5mL
%10	FBS (Fetal Bovine Serum)	5mL
%2.5	Horse Serum	1.25mL
%1	L-glutamin	0.5mL
%1	Pen-strep	0.5mL
%0.5	Amphotericin-B	0.25mL
Total miktar		50mL

MIA PaCa-2 hücrelerinin inkübasyonu, yeniden ekim (pasajlanma), sayım ve dondurulma işlemleri, CFPAC-1 hücrelerinde uygulanan yöntemler ile aynı şekilde yapılmaktadır.

3.2.2. Doz ve Zaman Bağımlı İlaç Uygulama

Pan-Aurora Kinaz inhibitörü Danusrteib'in CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerine doz ve zaman bağımlı olarak uygulamaları Tablolar 3.7 – 3.10'da ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Tablo 3.7.CFPAC-1 hücreleri için deney öncesi uygulanan besimiktarları ve hücre sayıları. 24 saatve 48 saatkontrol grupları.

24saat	1.000.000 CFPAC-1 1mL Free IMDM	1.000.000 CFPAC-1 1mL Free IMDM	1.000.000 CFPAC-1 1mL Free IMDM
48 saat	1.000.000 CFPAC-1 1mL Free IMDM	1.000.000 CFPAC-1 1mL Free IMDM	1.000.000 CFPAC-1 1mL Free IMDM

Tablo 3.8. MIA PaCa-2 hücreleri için deney öncesi uygulanan besimiktarları ve hücre sayıları. 24 saatve 48 saatkontrol grupları.

24 saat	1.000.000 MIA PaCa-2 1mL Free DMEM	1.000.000 MIA PaCa-2 1mL Free DMEM	1.000.000 MIA PaCa-2 1mL Free DMEM
48 saat	1.000.000 MIA PaCa-2 1mL Free DMEM	1.000.000 MIA PaCa-2 1mL Free DMEM	1.000.000 MIA PaCa-2 1mL Free DMEM

Tablo 3.9.CFPAC-1 hücreleri için Danusertib miktarları ve hücre sayıları. 24 saatve 48 saatilaç grupları.

24 saat	1.000.000 CFPAC-1 400nM	1.000.000 CFPAC-1 400nM	1.000.000 CFPAC-1 400nM
48 saat	1.000.000 CFPAC-1 400nM	1.000.000 CFPAC-1 400nM	1.000.000 CFPAC-1 400nM

Tablo 3.10.MIA PaCa-2 hücreleri için Danusertib miktarları ve hücre sayıları. 24 saatve 48 saatilaç grupları.

24 saat	1.000.000 MIA PaCa-2 300nM	1.000.000 MIA PaCa-2 300nM	1.000.000 MIA PaCa-2 300nM
48 saat	1.000.000 MIA PaCa-2 300nM	1.000.000 MIA PaCa-2 300nM	1.000.000 MIA PaCa-2 300nM

3.2.3. Hücrelerin Harvesting Yöntemi

İnkübasyonu izleyen sürelerde hücreler Tripsin/EDTA uygulanarak, plate tabanından 1X DPBS ile yıkayıp 1240 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından 1mL DPBS ile sulandırılan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra uygulanacak total-RNA pürifikasyon işlemlerine göre 5×10^5 hücre alınıp hazır hale getirilmiştir.

3.2.4. Gen İfadesi Yöntemi

3.2.4.1. RNA Pürifikasyonu

CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücreleri Tablo 3.7-Tablo3.10'deki gibi 8 grup oluşturulmuş ve 1.000.000hücre/ml olacak şekilde bu iki pankreas karsinoma hücrelerinden total-RNA'lar High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak prosedüre göre saflaştırılmıştır. Bunun için hücreler ilaç uygulamasından sonra tripsinizasyon ile kaldırılmış, yıkama ve santrifüj işlemlerinden sonra, her gruba ayrı ayrı olacak şekilde 400µl Lysis Binding Buffer eklenmiştir. Örnekler RNA izolasyon kolonuna aktarılmıştır. DNaseincubation buffer ve DNase solüsyonu ile 15 dk. inkübe edilmiştir. Sırasıyla Wash buffer I ve II ile hücreler yıkandıktan sonra son olarak 75µl Elution buffer ile RNA çözdürülmüş ve elde edilen RNA'ların NanoQ cihazında miktarları ölçülmüştür. Saflaştırılan total-RNA'lar -80°C'de muhafaza altına alınmıştır.

Tablo 3.11.24/48 saatkontrol ve ilaç uygulanmış CFPAC-1 hücreleri RNA kalite miktarları.

RNA	GRUPLAR			
	Kontrol		İlaç	
	24saat	48saat	24saat	48saat
OD _{260/280} nm	2,08	2,06	2,07	1,97
Konsantrasyon ng/µl	112,8	218,8	87,10	67,7
1µg RNA için alınacak volüm (µl)	8,8	6,0	4,5	7,3

Tablo 3.12.24/48saatkontrol ve ilaç uygulanmışMIA PaCa-2 hücreleri RNA kalite miktarları.

RNA	GRUPLAR			
	Kontrol		İlaç	
	24saat	48saat	24saat	48saat
OD _{260/280} nm	2,03	2,02	1,98	2,05
Konsantrasyon ng/µl	411,0	641,50	241,40	1004,80
1µg RNA için alınacak volüm (µl)	2,4	1,5	4,1	1,0

3.2.4.2. cDNA Sentezi

Harvest yapılan hücrelerden pürifiye edilen total-RNA'lardan cDNA sentez çalışmalarına başlanılmış ve total-RNA'lardan 1µg alınarak, Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti ile prosedüre uygun olarak termal cycler'da tek döngüde gerçekleştirilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir. cDNA sentez protokolü her iki hücre için Tablo 3.13veTablo 3.14 de gösterilmiştir.

Tablo 3.13.CFPAC-1 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları.

	Kontrol		İlaç	
	24saat	48saat	24saat	48saat
Transcriptor RT Reactrion Buffer	2µl	2µl	2µl	2µl
dNTP Mix	0,8µl	0,8µl	0,8µl	0,8µl
Random Hexamer Primer Mix	2µl	2µl	2µl	2µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	1µl	1µl	1µl	1µl
Protector RNase Inhibitor	1µl	1µl	1µl	1µl
PCR-Grade Water	4,4 µl	8,7µl	7,2µl	5,9µl
RNA	8,8µl	4,5µl	6,0µl	7,3µl
Total Miktar	20µl	20µl	20µl	20µl

Tablo 3.14. MIA PaCa-2 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları.

	Kontrol		İlaç	
	24saat	48saat	24saat	48saat
Transcriptor RT Reactrion Buffer	2µl	2µl	2µl	2µl
dNTP Mix	0,8µl	0,8µl	0,8µl	0,8µl
Random Hexamer Primer Mix	2µl	2µl	2µl	2µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	1µl	1µl	1µl	1µl
Protector RNase Inhibitor	1µl	1µl	1µl	1µl
PCR-Grade Water	10,8µl	9,1µl	11,7µl	12,2µl
RNA	2,4µl	4,1µl	1,5µl	1,0µl
Total Miktar	20µl	20µl	20µl	20µl

3.2.4.3. qRT-PCR Tekniği ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi Yöntemi

Üretilen cDNA'lar Sybergreen Gotaq master mix kitine uygun olarak oluşturulan gruplar halinde real time PCR cihazına yüklenmiş ve AURKB, INCENP, BIRC5 ve CDCA8 gen primerleri ile amplifiye edilmiş ve bu genlerin ifade düzeyleri referans gen β -aktin kullanılarak rölatif kantitasyonu ölçülmüştür.

SYBR Green qRT-PCR için Promega Gotaq master mix, forward-reverse gen primerleri, enzim ve cDNA'lar 96 well içerisine gruplara göre oluşturularak eklenmiş ve qRT-PCR cihazına yüklenmiştir. DNA polimerazın aktive olması için 95°C'de 2 dakika bekletilmiştir. Ardından 95°C'de 15 saniye DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi, 60°C'de 60 saniye DNA zincirinin uzaması, 60-95°C'de ayrışması sağlanmıştır. Bu döngü 40 kez tekrar edilerek gen amplifikasyonu oluşturulmuştur. Ardından üretilen gen miktarları DNA erime eğrileri (melting curve) ile kıyaslanarak ölçülmüştür.

Tablo 3.15. ACTB, AURKB, INCENP, CDCA8 ve BIRC5gen primerleri.

ACTB Beta Actin												
Sequence (5'→3')Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity					
Plus GAGGTGATAGCATTGCTTTTCG	21	1568	1588	57.40	47.62	9.00	7.00					
Minus CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC 209	21	1776	1756	56.30	47.62	6.00	2.00					
AURKB												
Sequence (5'→3')Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity					
Plus GAGAGCTGAAGATTGCTGACT	21	757	777	57.75	47.62	4.00	1.00					
Minus AACTTTAGGTCCACCTTGACGA 210	22	997	976	59.30	45.45	6.00	1.00					
INCENP												
Sequence (5'→3')Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity					
Plus CGTGCAGTCTCCAGCTTGTA	20	2587	2606	60.04	55	5	2					
Minus AGGTTCCGGTGGGTGGTAGTA 210	20	2796	2777	59.89	55	3	3					
CDCA8												
Sequence (5'→3')Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity					
Plus GCAGCAGGAGAGCGGATTTA	20	809	828	60.18	55	3	2					
Minus GAGACGGTTGGAGAGCTTCTT 991/992 (reverse primer) on template NM_018101.3	21	1000	980	59.73	52.38	4	2					
SURVIVIN												
Sequence (5'→3')Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity					
Plus GACCACCGCATCTCTACATTC 192	21	167	187	58.53	52.38	2.00	2.00					
Minus TGCTTTTATGTTCCCTCTATGGG 991/992 (reverse primer) on template NM_018101.3	23	360	338	56.57	39.13	2.00	2.00					

3.3. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında, CPC yolağındaki AURKB, INCENP, BIRC5 ve CDCA8 gen ifade düzeyleri anlatımları Pfaffle metoduna göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne uygun olarak hesaplanmıştır. Internal kontrol olarak β -Aktin geni amplifikasyonuna göre normalizasyon yapılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Doz ve zaman bağımlı Danusertib uygulanan CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinin harvest sonucu pürifiye edilen total RNA pürifikasyonları gerçekleştirilmiş ve kalite-miktar ölçüm sonuçları tablo 3.11-3.12'de gösterilmiştir. Bu total RNA'lardan prosedüre uygun şekilde cDNA sentezi yapılmıştır. Takiben AURKB, INCENP, CDCA8, BIRC5 ve ACTB primerleri kullanılarak qRT-PCR tekniği ile gen ifadelerinin rölatif kantitasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. CPC Yolağı Gen İfade Düzeylerinin Analizi

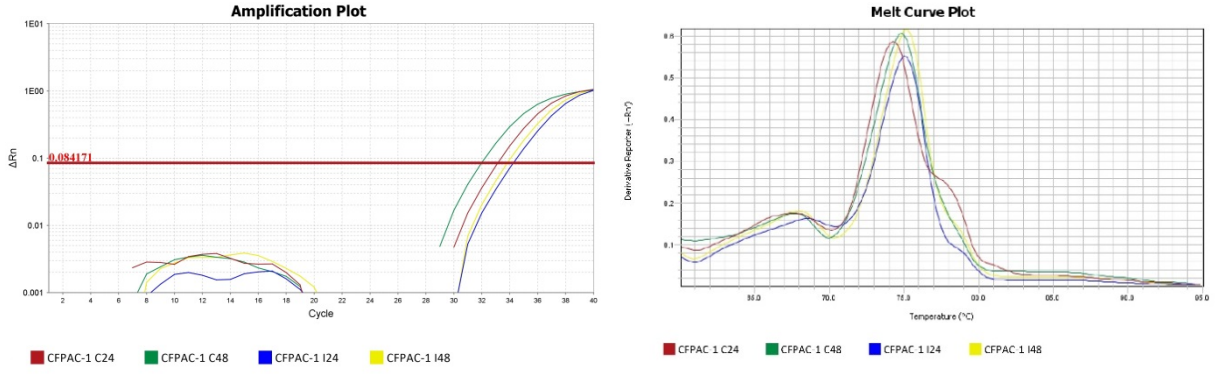
4.1.1.1. CFPAC-1 Hücrelerinde CPC Yolağı Gen İfade Düzeyleri

CFPAC-1 hücrelerinden elde edilen total-RNA'lardan cDNA'lar prosedüre göresentezlenmiştir. Gen ifade düzeyleri ACTB geni ile normalizasyonu yapılarak ölçülmüştür.

Tablo 4.1. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve AURKB ekspresyonu.

	Gruplar			
	Kontrol 24	Kontrol 48	İlaç 24	İlaç 48
CT-ACTB	26,647	26,576	31,366	29.405
CT-AURKB	32,937	32,948	34,125	33,008
ΔCT	6,290	6,372	2,759	3,603
$\Delta\Delta CT$	0	0	-3,530	-2,769
$2^{-\Delta\Delta CT}$	1,00	1,00	11,555	6,815

AURKB ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 11,5 kat artış, 48. saat ilaç grubunda 6,8kat artış görülmektedir.

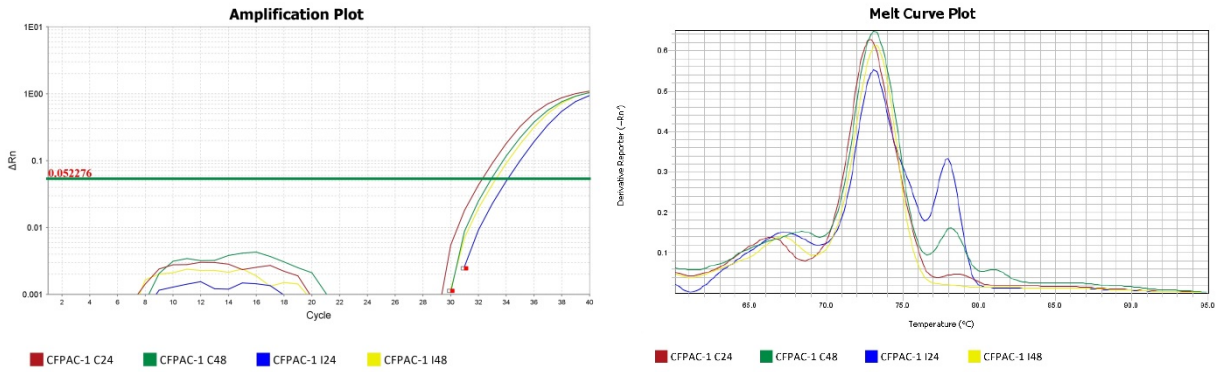


Şekil 4.1. CFPAC-1 hücrelerinde AURKB geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.2. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CDCA8 ekspresyonu.

	Gruplar			
	Kontrol 24	Kontrol 48	İlaç 24	İlaç 48
CT-ACTB	26,646	26,576	31,366	29,405
CT-CDCA8	32,440	32,973	34,464	33,026
Δ CT	5,794	6,397	3,098	3,621
$\Delta\Delta$ CT	0	0	-2,696	-2,776
$2^{-\Delta\Delta$ CT	1,00	1,00	6,479	6,850

CDCA8 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 6,4 kat artış, 48. saat ilaç grubunda 6,8 kat artış görülmektedir.

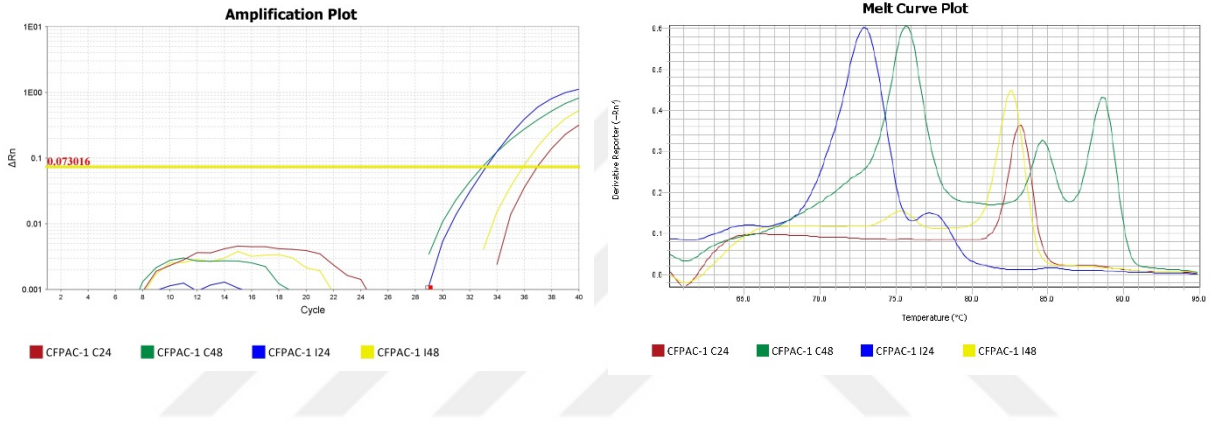


Şekil 4.2. CFPAC-1 hücrelerinde CDCA8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.3. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve BIRC5 ekspresyonu.

	Gruplar			
	Kontrol 24	Kontrol 48	İlaç 24	İlaç 48
CT-ACTB	26,646	26,576	31,366	29.405
CT-BIRC5	35,738	34,224	35,527	34,899
Δ CT	9,091	7,648	4,162	5,494
$\Delta\Delta$ CT	0	0	-4,930	-2,154
$2^{-\Delta\Delta$ CT	1,00	1,00	30,479	4,450

BIRC5 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 30,4 kat artış, 48. saat ilaç grubunda 4,4 kat artış görülmektedir.

**Şekil 4.3.** CFPAC-1 hücrelerinde BIRC5 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

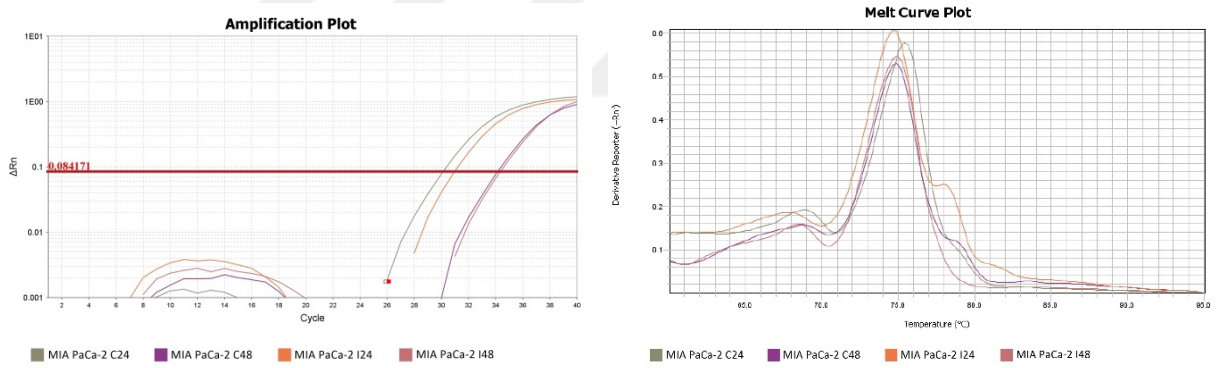
4.1.1.2. MIA PaCa-2 Hücrelerinde CPC Yolağı Gen İfade Düzeyleri

MIA PaCa-2 hücrelerinden elde edilen total-RNA'lardan cDNA'lar prosedüre göresentezlenmiştir. Gen ifade düzeyleri ACTB geni ile normalizasyonu yapılarak ölçülmüştür.

Tablo 4.4. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve AURKB ekspresyonu.

	Gruplar			
	Kontrol 24	Kontrol 48	İlaç 24	İlaç 48
CT-ACTB	29,713	28,181	28,619	28,360
CT-AURKB	31,659	31,948	31,671	32,874
ΔCT	1,946	3,768	3,051	4,515
$\Delta\Delta$CT	0	0	1,105	0,747
$2^{-\Delta\Delta$CT}	1,00	1,00	0,465	0,596
Gen ekspresyon düzeyinde değişim katsayıları			2,151	1,678

AURKB ifadelerinin değişimi 24. saat ilaç grubunda 2,1 kat, 48. saat ilaç grubunda 1,6 kat azalma görülmektedir.

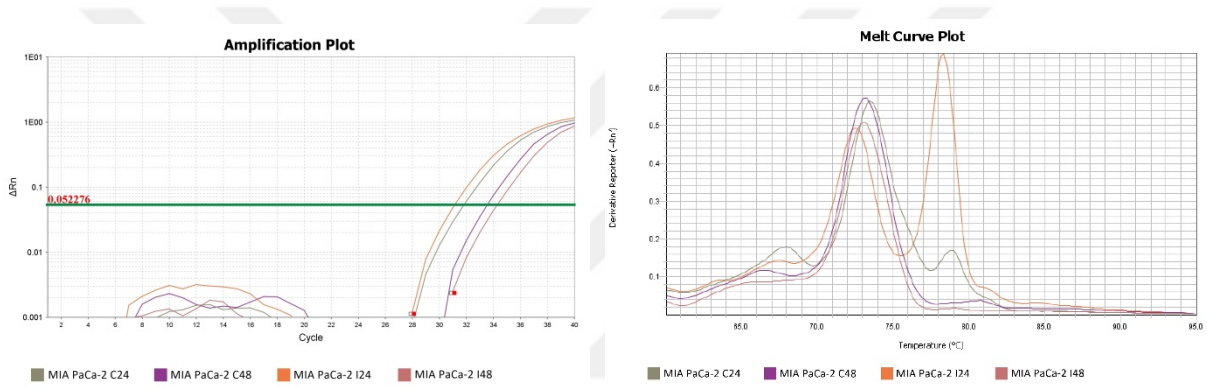


Şekil 4.4. MIA PaCa-2 hücrelerinde AURKB geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.5. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CDCA8 ekspresyonu.

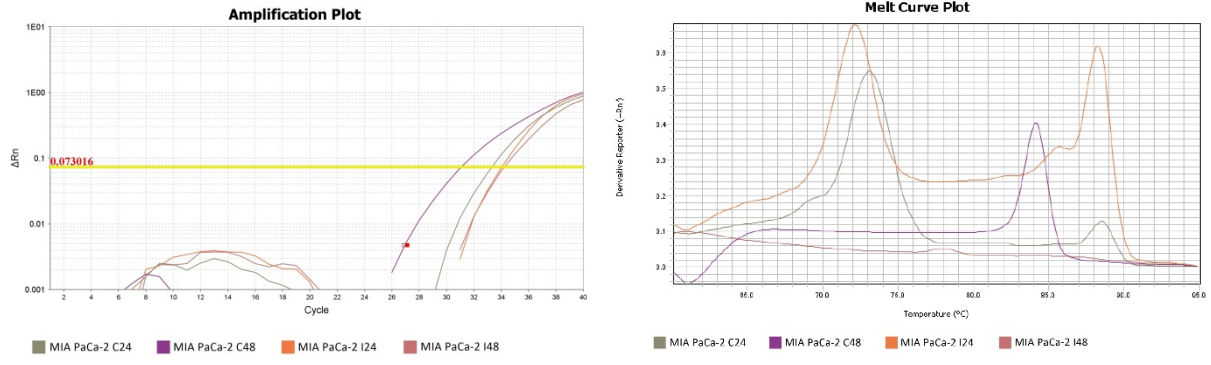
	Gruplar			
	Kontrol 24	Kontrol 48	İlaç 24	İlaç 48
CT-ACTB	29,713	28,181	28,619	28,360
CT-CDCA8	32,592	32,663	32,205	33,735
ΔCT	2,879	4,482	3,586	5,376
$\Delta\Delta$CT	0	0	0,706	0,894
$2^{-\Delta\Delta$CT}	1,00	1,00	0,613	0,538
Gen ekspresyon düzeyinde değişim katsayıları			1,631	1,857

CDCA8 ifadelerinin değişimi 24. saat ilaç grubunda 1,6 kat, 48. saat ilaç grubunda 1,8 kat azalma görülmektedir.

**Şekil 4.5.** MIA PaCa-2 hücrelerinde CDCA8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.**Tablo 4.6.** MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve BIRC5 ekspresyonu.

	Gruplar			
	Kontrol 24	Kontrol 48	İlaç 24	İlaç 48
CT-ACTB	29,713	28,181	28,619	28,360
CT-BIRC5	32,323	33,517	33,096	34,249
ΔCT	2,610	5,337	4,477	5,889
$\Delta\Delta$CT	0	0	1,867	0,552
$2^{-\Delta\Delta$CT}	1,00	1,00	0,274	0,682
Gen ekspresyon düzeyinde değişim katsayıları			3,647	1,466

BIRC5 ifadelerinin değişimi 24. saat ilaç grubunda 3,6 kat, 48. saat ilaç grubunda 1,4 kat azalma görülmektedir.



Şekil 4.6.MIA PaCa-2 hücrelerinde BIRC5 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

4.2. Tartışma

Mitoz sırasında farklı rollere sahip olan aurora kinazların inhibisyonu, antikanser tedavisi için yeni bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Günümüz teknolojisiyle daha çok hız kazanan tedavi yöntemleri sayesinde çok çeşitli kanser türlerinde ve antikanser tedavisinde büyük terapötik potansiyele sahip danusertib'inin *in vivo* ve *in vitro* denemeleri sonucunda bize Aurora kinaz B'yi inhibe eden küçük molekülü ve güçlü bir ilaç olduğunu göstermektedir. Buna ek Danusertib, faz I ve faz II'deki klinik çalışmalarda, pankreas kanseri de dahil birçok çeşitli kanserlerde önemli terapötik potansiyel göstermiştir.

Bu çalışmada, danusertib ile muamele edilen pankreas kanseri hücre hattı CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde CPC'de önemli olan AURKB, INCENP, CDCA8 ve BIRC5 genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

Bu çalışmada, CFPAC-1 hücrelerinde CPC'de önemli olan AURKB, CDCA8 ve BIRC5 genlerin ekspresyon sonuçlarına ulaşılmıştır. Ancak INCENP geni ekspresyonu primerlerin çalışmaması nedeniyle gösterilememiştir.

MIA PaCa-2 hücrelerinde de CFPAC-1 hücrelerinde olduğu gibi CPC'de önemli olan AURKB, CDCA8 ve BIRC5 genlerin ekspresyon sonuçlarına ulaşılmıştır. Ancak burada da INCENP geninin primerlerden kaynaklanan hatalar nedeniyle eksprese edilmediği gözlemlenmiştir.

AURKB, önemli bir mitoz düzenleyicidir. Sitokinez kontrolü yoluyla kromozom ayrışmasında önemli bir rol oynar [56]. AURKB, tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinden terapötik bir hedef haline gelmiştir [5]. Bu denli güçlü bir hedef olan AURKB geninin, bu çalışmada, ekspresyon sonuçlarındaki değişim katsayıları göz önüne alınarak diğer AURKB çalışmalarıyla karşılaştırılıp desteklenmesi amaçlanmıştır.

He ve arkadaşları, çalışmalarında insan lösemi hücrelerinde AURKB gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana geldiğini açıklamışlardır. Çalışmalarında Pan-Aurora kinaz inhibitörü Danusertibin, AURKB gen ekspresyon seviyelerinin lösemi ve lenfoma dahil birçok insan kanserinde inhibe edildiğini ve insan lösemi hücrelerinde apoptoz ve otofaji indüksiyonu ile sonuçlandığını açıklamışlardır [98]. Bu çalışmada, AURKB gen perimeri için elde edilen veriler CFPAC-1 hücrelerinde ACTB geni ile normalizasyonu yapılarak, AURKB ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 11,5 kat artış görülürken 48. saat ilaç grubunda ise 6,8 kat artış görülmektedir. Bu durum MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB geni ile normalizasyonu yapıldığında AURKB ifadelerinin

değişimi 24. saat ilaç grubunda 2,1 kat, 48. saat ilaç grubunda 1,6 kat azalma görülmektedir. Ancak bu çalışmada, doz ve zaman bağımlı Danusertib uygulamasında CFPAC-1 hücrelerinde bir direnç ortaya çıkmakta ve istenilen düzeyde bulunmamaktadır. MIA PaCa-2 hücrelerinde ise doz ve zaman bağımlı Danusertib uygulamasında bir azalış görülmekte ve bu istenilen sonucu vermektedir. Pankreas kanserinde AURKB gen ekspresyon düzeylerinde ki artış, Pan-Aurora kinaz inhibitörü Danusertib kullanılmasıyla He ve arkadaşlarının çalışmalarında olduğu gibi azalış gösterdiği sonucuna varılmıştır. Pan-Aurora kinaz inhibitörü Danusertib'in kullanılmasıyla primer tümörlerde azalışların meydana gelmesi uygun bir anti-tümöral ilaç olduğunu kanıtlamaktadır.

Borealin proteini kodlayan CDCA8 geni, esas olarak mitoz sırasında organ gelişiminde ifade edilir. CPC yolağı gen primerleri arasında önemli bir yeri olan CDCA8 geni yetişkin dokularda, testis, kolon ve deride eksprese edilmektedir. Diğer yetişkin dokularda ekspresyonu neredeyse yok denecek kadar zayıftır [65]. Bu çalışmada, CDCA8 gen perimeri için elde edilen veriler CFPAC-1 hücrelerinde ACTB geni ile normalizasyonu yapılarak, CDCA8 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 6,4 kat artış görülürken 48. saat ilaç grubunda ise 6,8 kat artış görülmektedir. Bu durum MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB geni ile normalizasyonu yapıldığında CDCA8 ifadelerinin değişimi 24. saat ilaç grubunda 1,6 kat, 48. saat ilaç grubunda 1,8 kat azalma görülmektedir.

BIRC5 geni, diğer CPC yolağı gen primerleri gibi birçok kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir. Embriyonik gelişim sırasında dokularda aşırı miktarda eksprese edilirken, olgunlaşmış yetişkin dokularda çok zayıftır [76,78]. BIRC5, birçok kanser hücresinde olduğu gibi pankreas kanser hücresinde de eksprese edilmektedir. Bu çalışmada, BIRC5 gen perimeri için elde edilen veriler CFPAC-1 hücrelerinde ACTB geni ile normalizasyonu yapılarak, BIRC5 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 30,4 kat artış gözlemlenirken, 48. saat ilaç grubunda ise 4,4 kat artış ortaya çıkmıştır. Bu durum MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB geni ile normalizasyonu yapıldığında BIRC5 ifadelerinin değişimi 24. saat ilaç grubunda 3,6 kat, 48. saat ilaç grubunda ise 1,4 kat azalma görülmektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen veri sonuçları karşılaştırıldığında her iki hücre hattında INCENP geninin eksprese edilmediğinin görülmesi ile kılara bu genin pankreas kanserinde sonuç verip vermediği sorusunu getirmektedir. Ancak, gen primerlerinin çalışmamış olması olasılığı yüksektir.

Honda ve arkadaşlarının Aurora B, INCENP ve Survivin ekspresyonu ile ilgili yaptığı çalışmalar sonucu, rekombinant proteinleri kullanarak, Aurora B kinaz aktivitesinin INCENP tarafından uyarıldığını ve INCENP'nin C-terminal bölgesinin aktivasyon için yeterli olduğunu sonucuna ulaşmışlardır. Aurora B, INCENP ve Survivin, hücre döngüsünün G₁ fazının ilk evrelerinde koordineli bir şekilde eksprese edildiği ve bunun ardından mitoz başlangıcına doğru sürekli artış gösterdiğini belirtmiştir [99]. Lau ve arkadaşları, pankreas kanserine özgü markırlardan INCENP'in, kanserli olmayan kontrol pankreaslarına kıyasla tümör taşıyan pankreaslarda önemli ölçüde upregüle edildiği sonucuna ulaşmışlardır. Ek olarak pankreas kanserinde INCENP gen ifade düzeyinin 11,5 kat artış gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır [100]. Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda kullanmış olduğumuz INCENP gen primerinin çalışmadığı sonucuna varılmıştır.

Yuan ve arkadaşları, danusertib'in hücre büyümesi, apoptoz, otofaji ve epitelyal-mezenkimal geçişi ve insan mide kanseri AGS ve NCI-N78 hücrelerinde etki mekanizmalarını araştırmışlardır. Çalışmalarında danusertib'in, hücre çoğalmasını inhibe ettiği, mitokondri aracılığıyla apoptotik yolağı aktive ettiğini, insan AGS ve NCI-N7 hücrelerinde otofajiyi indüklediği ve ayrıca danusertib'in, antikanser etkisine katkıda bulunarak, epitelyal-mezenkimal geçişi bastırdığı sonucunu varmışlardır [80].

Kalu ve arkadaşları, insan papilloma virüsü (HPV) ile ilişkili baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) ve rahim ağzı kanseri için yaptıkları ilaç geliştirme araştırmalarında, Aurora kinaz inhibisyonunun *in vivo* etkinliğini test etmek için HPV pozitif HNSCC hastası türetilmiş ksenograftları (PDX'ler) taşıyan farelere danusertib uygulanmış ve danusertibin HNSCC'li hastadan elde edilen ksenograft modellerinde tümör boyutunu azalttığını belirlemişlerdi [81].

Shang ve arkadaşları, çalışmada danusertib'in melanoma karşı antikanser etkilerini *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile kanıtlamaya çalışmıştır. Danusertib'in melanomda hücre döngüsünü durdurma ve apoptozu indükleyerek melanom büyümesini önemli ölçüde inhibe edebildiğini ve buna ek olarak onkojenik Akt/mTOR sinyal yolunu ve melanom hücrelerinde otofajiyi indüklediği sonucuna ulaşmışlardır [82].

Zi ve arkadaşları, danusertibin kanser hücresi öldürme etkisini incelemeyi ve insan yumurtalık karsinomu hücre hatları C13 ve A2780cp'de proliferasyon, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, otofaji ve epitelyal-mezenkimal geçiş üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada Danusertib'in hücre proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini, apoptoz ve otofajiyi

indüklediğini ve hatta her iki hücre hattında da PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu içeren epitelyal-mezenkimal geçişi baskıladığını bulmuştur [83].

Li ve arkadaşları, Danusertib'in büyüme, apoptoz, otofaji ve epitelyal-mezenkimal geçiş ve insan meme kanseri MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde etkilerini araştırmıştır. Çalışmalarında Danusertib'in hücre proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini, apoptoz ve otofajiyi indüklediğini ve her iki meme kanseri hücre hattında epitelyal-mezenkimal geçişi baskıladığını göstermiştir [84].

Wang ve arkadaşları, intra iliak arter enjeksiyonu yoluyla meme kanseri hücreleri ile önceden yüklenmiş fare kemiklerini parçalayarak, kültür içinde kemik dizisi veya BICA olarak adlandırılan bir *ex vivo* kemik metastazı modeli oluşturmuş ve daha sonra danusertib'in *in vivo* etkinliğini test etmişlerdir. Spesifik olarak, 100nM danusertib, BICA'da tümör büyümesinin %90'ından fazlasını inhibe ettiğini, MCF-7 hücrelerinde olduğu gibi benzer inhibitör etkiler sergilediği sonucuna varmışlardır [85].

Fei ve arkadaşları, danusertib ile muamele edilmiş insan Bcr/Abl T315I, Bcr/Abl vahşi tip ve Bcr/Abl olmayan ALL hücrelerinin duyarlılıklarını karşılaştırmıştır. Çalışmalarında, Danusertib'in hücrelerde proliferasyonu ve apoptozu indüklediğini gözlemlemiştir. Ayrıca *in vivo* çalışmalarda, Bcr/Abl tirozin kinaz aktivitesini ve Aurora kinaz B'yi etkili bir şekilde bloke ettiğini ve Danusertib ile muamele edilmiş insan Bcr/Abl T315I ALL hücreleri ile transplantasyon yapılan farelerin, önemli ölçüde daha uzun süre hayatta kaldığı sonucuna varmışlardır [101].

Meulenbeld ve arkadaşları çalışmalarında, dosetaksel-refrakter metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarında danusertib'in antitümör aktivitesini değerlendirmiştir. Danusertib'in prostat kanseri modellerinde *in vivo* antitümör aktivitesini gösterdiğini ve bu randomize faz II çalışmasının, danusertib'in, dosetaksel-refrakter kastrasyona dirençli prostat kanserli hastalarda minimal tek ajan aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir [102].

Zhu ve arkadaşları, pan-Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib'in, hepatoselüler karsinom HepG2 hücrelerinin proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptoz ve otofajisi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Kanserli insan karaciğer hücre hattındaki (HepG2) hücrelerinde *in vitro* çalışmalarında danusertib uygulanan HepG2 hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı sonucunavarmışlardır. Buna ek olarak Danusertibin, HepG2 hücrelerinde G₂/M fazında hücre

döngüsünün durmasına neden olduğunu, apoptozu ve otofajiyi indüklediğinitespit etmişlerdir [103].

Cilibrasi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Aurora kinazların inhibisyonunun, glioblastom (primer malign beyin tümörü) hastalarından izole edilen beş glioma kök hücre (GBM2, G144, G179, G166, GliNS2) hattındaki etkisini araştırmıştır. Çalışmalarında Danusertibin, Aurora kinazları tüm glioma kök hücrelerinde benzer ölçüde inhibe ettiğini kanıtlamışlardır [104].

Vargas ve arkadaşları, HIV-1 latanslı 24ST1NLESG hücre hattında Aurora kinaz inhibitörü Danusertib'in latent HIV-1 enfeksiyonunun tersine çevrilmesini bloke eden en seçici ve etkili inhibitör olduğunu tespit etmişlerdir [105].

Danusertib'in farklı kanser türlerinin çeşitli yolaklarında yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda hücre döngüsünü indüklediği, apoptozu ve otofajiyi bloke ettiği araştırılmıştır [80,82,83,98,103]. Ayrıca Dausertib'ininhibisyon etkisi daha önce yapılan çalışmaları referans olarak bu çalışmada yapılan pankreas kanserinde CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında AURKB, INCENP, BIRC5 ve CDCA8 genlerinin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada Danusertib'in diğer kanser türlerinde olduğu gibi inhibisyon etkisi gözlemlendi.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib'in, β -aktin geni referans alınarak, CPC yolağı (AURKB, INCENP, CDCA8 ve BIRC5) Sybr green gen primerlerinin ekspresyon düzeyleri, VIIA 7 Real Time PCR cihazında ölçülmüştür.

CFPAC-1 hücrelerinde kromozomal geçişte önemli olan genlerin araştırılması için; qRT-PCR tekniği ile CPC ilişkili gen ifade düzeyleri incelenmiştir.

× **AURKB** ifadeleri,

İlaç Gruplar	Artış-Azalış katsayıları
24 saat	11,5↑
48 saat	6,8↑

× **INCENP** geni eksprese edilememiştir.

× **CDCA8** gen ifadeleri,

İlaç Gruplar	Artış-Azalış katsayıları
24 saat	6,4↑
48 saat	6,8↑

× **BIRC5** gen ifadeleri,

İlaç Gruplar	Artış-Azalış katsayıları
24 saat	30,4↑
48 saat	4,4↑

MIA PaCa-2 hücrelerinde kromozomal geçişte önemli olan genlerin araştırılması için; qRT-PCR tekniği ile CPC ilişkili gen ifade düzeyleri incelenmiştir.

× **AURKB** ifadeleri,

İlaç Gruplar	Artış-Azalış katsayıları
24 saat	2,1↓
48 saat	1,6↓

× **INCENP** geni eksprese edilememiştir.

× **CDCA8** gen ifadeleri,

İlaç Gruplar	Artış-Azalış katsayıları
24 saat	1,6↓
48 saat	1,8↓

× **BIRC5** gen ifadeleri,

İlaç Gruplar	Artış-Azalış katsayıları
24 saat	3,6↓
48 saat	1,4↓

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere bakıldığında, CFPAC-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik ilaç gruplarında, AURKB, BIRC5 ve CDCA8 gen ekspresyonlarının yüksek, MIA PaCa-2 hücre hatında da çok düşük olduğu gözlenmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışması sonucunda, metastatik hücre hattı olan CFPAC-1 hücrelerinin Danusertibe direnç gösterdiği sonucuna ulaşılmaktadır. Daha fazla CPC proteini üreterek blokasyondan kurtulmaya çalıştığı sonucuna varılmaktadır. Ancak, primer tümör (non-metastatik) hattı olan MIA PaCa-2 hücreleri bu ajana karşı sensitive özellik gösterdiğinden, Pan-Aurora Kinaz inhibitörü Danusertibin Pankreas Duktal Adenokarsinomlarında etkin bir inhibitör olabileceği düşünülmektedir.

Pan-Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib'in, doz ve zaman bağımlı etkisinin CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında daha önce yapılmış olan çalışmalarına ek olarak, ilerde pankreas karsinoma üzerine yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Danusertib'in doz ve zamana bağlı farklı bileşiklerle sinerjik etkilerinin araştırılıp, değişik karakterdeki pankreas karsinoma hücre dizilerindeki ve sinyal yollarındaki etkilerinin araştırılması, gelecek *in-vitro* ilaç çalışmalarına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- [1]Çetin, Ş.,Dede, İ. (2019). Pankreas Kanserinde Prognostik Faktörler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(1), 30-34.
- [2]Metin, M. R., Tahtacı, M. (2018). Pankreas kanseri - karaciğer metastazlarında diffüzyon ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleme. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 78-84.
- [3]Kamisawa, T., Wood, L.D., Itoi, T., Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer Seminar. *The Lancet*, 388(10039), 73-85.
- [4]Gradiz, R., Silva, H.C., Carvalho, L., Botelho, M.F., Pinto, A.M.(2016). MIA PaCa-2 and PANC-1-pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Scientific Reports*, 6, 21648.
- [5] Kitzen, J. J. E. M., De Jonge, M. J. A., Verweij, J. (2010). Aurora kinase inhibitors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 73, 99-110.
- [6] Sun, M., Veschi, V., Bagchi, S., Xu, M., Mendoza, A., Liu, Z., Thiele, C. J. (2019). Targeting the chromosomal passenger complex subunit INCENP induces polyploidization, apoptosis, and senescence in neuroblastoma. *Cancer Research*, 79(19), 4937-4950.
- [7] The Human Protein Atlas. (2019).*CDCA8(Borealin).2* Eylül 2019 tarihinde <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134690-CDCA8/cell> adresinden erişildi.
- [8] Öztürk, M. A. (2009). *Kolorektal kanser hastalarında survivin (BIRC-5) immünekspresyonunun prognostik önemi ve diğer patolojik prognostik faktörlerle ilişkisi*. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Marmara Üniversitesi,İstanbul.
- [9]Alabaş, E. (2018). *Pan-aurora kinaz inhibitörü olan danusertib'in pankreas kanseri hücrelerinde otofaji, metastaz ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) üzerine etkilerinin araştırılması*. Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- [10] Busnardo, A. C., Didio, L. J. A., Tidrick, R. T., Thomford, N. R. (1983). History of the pancreas. *American Journal of Surgery*, 146(5), 539-550.
- [11] Akpulat P. (2014). *Akut pankreatit oluşturulan sıçanlarda karvakrol'ün akciğer üzerine etkileri*. Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- [12]Kumar, V.,Abbas, A.K., Fausto, N.,Aster, J.(2010). *Robbins and cotran pathologic basis of disease, 8th edition*. Philadelphia:Elsevier Saunders.
- [13] Çağlar, V., Gönül, Y., Songur, A. (2014). Pankreas anatomisi ve varyasyonları pancreas anatomy and variations. *International Journal of Clinical Research*, 2(2), 77-82.
- [14] Zeren, M. (2009). *Pankreatikoduodenektomilerde pankreatik fistül*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi,İstanbul.
- [15]KaizenHospital. (2019). *Pankreas'ın konumu ve anatomik yapısı*. 28 Temmuz 2019 tarihinde <https://tr.pinterest.com/pin/313492824055109391/> adresinden erişildi.
- [16] Tarhan, Ö. R. (2019).*Pankreas Fizyolojisi ve Histolojisi*. 28 Temmuz 2019 tarihinde <http://www.turkcerrahi.com/makaleler/pankreas/pankreas-fizyolojisi-histolojisi/> adresinden erişildi.

- [17] Andarsen, D. K. (2016). *Schwartz cerrahinin ilkeleri* (M. M. Özmen, Çev.) Ankara: Güneş tıp kitabevleri.
- [18] Boukes, G. J., Van De Venter, M. (2016). The apoptotic and autophagic properties of two natural occurring prodrugs, hyperoside and hypoxoside, against pancreatic cancer cell lines. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 83, 617-626.
- [19] Filiz, A.K.(2017). Pankreas Fizyolojisi, *Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol-Special Topics*, 10(3), 122-125.
- [20] Ünal, T. (2012). *Neoplazi*. 21 Temmuz 2019 tarihinde http://dent2.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/301_patoloji/12.pdf adresinden erişildi.
- [21] Yılmaz, F.(2017). Pankreasın Kistik Neoplazmları, *Turkiye Klinikleri Medical Pathology-Special Topics*, 2(3), 235-43.
- [22] Tiryaki, Ç., Turgut, H. T., Yirmibeşoğlu, A. O., Bayhan, Z., Okay, E., Özyıldız, M., Coşkun, M. (2013). Pankreasın İntraduktal Onkositik Papiller Neoplazmı. *Kocaeli Tıp Dergisi*, 1, 32-36.
- [23] Akkoca, M., Buluş, H., Yavuz, A., Coşkun A. (2012). Kistik Pankreas Neoplazmlarına Yaklaşım. *Ortadoğu Medical Journal*, 4(1), 23-32.
- [24] Karateke, F., Menekşe, E., Daş, K., Özyazıcı, S., Sözen, S., Bozkurt, H., Önel, S., Özdoğan, M. (2012). Diagnosis and treatment in cystic neoplasms of the pancreas: Analysis of 12 cases and review of the literature. *Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi*, 39(4), 547-551.
- [25] Dobrucalı, A. (2016). *Pankreasın kistik neoplazmlar*. 4 Ağustos 2019 tarihinde, <http://drahmetdobrucali.com/pankreas-kistleri/> adresinden erişildi.
- [26] Akalin, G., Uhri, M. (1988). Pankreasın Kistik Tümörleri. *Türk Patoloji Dergisi*. 4(2), 23-27.
- [27] Ersöz, C. C., Savaş, B. (2019). Pankreasın Kistik Lezyonları. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 23(1), 32-40.
- [28] Kaya, R. (2011). *Patoloji pratik: Pankreas ve biliyer sistem. Seröz kistadenoma*. 4 Ağustos 2019 tarihinde <https://www.slideshare.net/tipcivizbiz/pankreas-ve-biliyer-sistem-patoloji-pratik-e4-b2byramazankaya3> adresinden erişildi.
- [29] Güçer, H., Tetikkurt, Ü. S., Erdoğan, N., Demiray, O. (2004). Pankreasta minimal invaziv: intraduktal papiller müsinöz neoplazi. *Türk Patoloji Dergisi*, 20(1-2), 31-33.
- [30] Altaca, G.(2016). *İntraduktal papiller müsinöz neoplazmlar*. 4 Ağustos 2019 tarihinde, <http://www.kolaydoktor.com/hastalik-arsiv/arsiv/3/50/0376/1> adresinden erişildi.
- [31] Bostancı, M. T., Seki, A., Benk, M. Ş., Arıkök, A. T., Dilli, A. (2018). A case of synchronous pancreatic multiple branch-type intraductal papillary mucinous neoplasm and colon adenocarcinoma. *The Journal of Tepecik Education and Research Hospital*, 28(3), 236-239.
- [32] Toft, J., Hadden, W. J., Laurence, J. M., Lam, V., Yuen, L., Janssen, A., Pleass, H. (2017). Imaging modalities in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis of sensitivity, specificity and diagnostic accuracy. *European Journal of Radiology*, 92, 17-23.
- [33] Curado, M.P., Edwards, B., Shin, H. R., Storm, H., Ferlay, J., Heanue, M., Boyle, P. (2007). Cancer Incidence in Five Continents Volume IX. *IARC Scientific Publication No. 160*, 490-493.

- [34]Hoyert, D.L., Xu, J. (2012). Deaths: Preliminary Data for 2011. *National Vital Statistics Reports* 61(6), 16-19.
- [35]Başara, B. B., Çağlar, İ. S., Aygün, A., Özdemir, T. A., Kulali, B., ve diğerleri. (2018). *Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2017*. Ankara: Sağlık Bilgi Sistemleri Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı.
- [36]Pai, M., Spalding, D. (2015). Pancreatic cancer. *Medicine (United Kingdom)*, 43(6), 329-333.
- [37] Ertem, M. (2011). *Türkiye Kanserve Savaş Vakfı Onkolojide Güncel Yaklaşım Toplantıları, Pankreas kanseri*. 5 Ağustos 2019 tarihinde, <http://www.kanservakfi.com/upload/file/pankreas-kitapcik.pdf> adresinden erişildi.
- [38]Falasca, M., Kim, M., Casari, I. (2016). Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1865(2), 123-132.
- [39] Christian, H., Magnus, F. (2018). Prosjektoppgave En oversikt over biomarkører i behandling og diagnostikk av pankreas cancer. *Prosjektoppgave ved det Medisinske fakultet*, 1-28.
- [40] Göral, V. (2014). Pankreas Kanseri: Patogenez ve Tanı. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 18(4), 407-414.
- [41] Nart, D., Ertan, Y., Çiriş, M., Zeytinlu, M., Yüce, G., Yüzer, Y., Çoker, A., Yılmaz, F. (2006). Pankreatik Adenokarsinom ve Pankreatik İntraepitelyal Neoplazilerde İmmunohistokimyasal Olarak p53 ve Ki67 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 45(2), 77-82.
- [42]Bryant, K. L., Mancias, J. D., Kimmelman, A. C., Der, C. J. (2014). KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(2), 91-100.
- [43] Şahin, F., Taşpınar, M., Sunguroğlu, A. (2007). Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezini. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27, 560-566.
- [44] Moreno-Ramírez, C. E., Curiel-Beltrán, J. A., Cruz-Toraya, O. R., Arisbeth-Villanueva, M., Morales-Flores, E. A., Castro-Herrera, G. A., Nande-Vázquez, E. M., Torres-Vázquez, J. A., Ramos-Gallardo G., Corona-Hernández, J. M. (2017). Expresión de p16 y correlación citocitológica en lesiones de cérvix en pacientes de Puerto Vallarta, Jalisco. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 22(4), 153-161.
- [45] Gully, C. P., Velazquez-Torres, G., Shin, J. H., Fuentes-Mattei, E., Wang, E., Carlock, C., Chen, J., Rothenberg, D., Adams, H. P., Choi, H. H., Guma, S., Phan, L., Chou, P. C., Su, C. H., Zhang, F., Chen, J. S., Yang, T. Y., Yeung, S. C. J., Lee, M. H. (2012). Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), 9232-9233.
- [46]Chung, E., Travis, M., Conran, R. (2006). Pancreatic tumors in children: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*, 26, 1211-1238.
- [47]Türk, A., Saygılı, Ö., Can, U., Örmeci, T., Ayan, İ. (2011). Pankreatoblastom: Çocukluk Çağının Nadir Bir Tümörü, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(1), 37-39.
- [48]Turna, H., Demir, G. (2002). Pankreas Kanseri Tedavisine Medikal Onkolojik Yaklaşım. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 28, 231-236.
- [49] Tempero, M. A., Malafa, M. P., Al-Hawary, M., Asbun, H., Bain, A., Behrman, S. W., Benson III, A. B., Binder, E., Cardin, D. B., Cha, C., E. Chiorean, G., Chung, V., Czito, B., Dillhoff, M., Dotan, E., Ferrone, C. R., Hardacre, J., Hawkins, W. G., Herman, J., Ko, A. H., Komanduri, S., Koong, A.,

LoConte, N., Lowy, A. M., Moravek, C., Nakakura, E. K., O'Reilly, E. M., Obando, J., Reddy, S., Scaife, C., Thayer, S., Weekes, C. D., Wolff, R. A., Wolpin, B. M., Burns, J., Darlow, S. (2017). Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2017. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15(8), 1028–1061.

[50] Medstar Antalya Hastanesi Kanser Merkezi (2019). *Pankreas Kanserlerinde kemoterapi tedavisi yöntemleri*. 4 Ağustos 2019 tarihinde, <https://www.pankreaskanserindeyenilikler.com/sayfa/357/pankreas-kanserinde-kemoterapi.html> adresinden erişildi.

[51] Borisa, A.C., Bhatt, H.G. (2017). A comprehensive review on Aurora kinase: Small molecule inhibitors and clinical trial studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 140, 1–19.

[52] Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P. N., Rogister, B. (2018). The functional diversity of Aurora kinases: *A comprehensive review*. *Cell Division*, 13(1), 1-17.

[53] Carmena, M., Earnshaw, W. C., Glover, D. M. (2015). The dawn of Aurora kinase research: From fly genetics to the clinic. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(NOV), 1-5.

[54] Pandya, P. N., Mankad, A. U., Raval, R. M. (2018). Role of Aurora Kinases in Cancer : *a Comprehensive Review*. 4(80), 80–93.

[55] Brown, J. R., Koretke, K. K., Birkeland, M. L., Sanseau, P., Patrick, D. R. (2004). Evolutionary relationships of Aurora kinases: Implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 1–10.

[56] Bolanos-Garcia, V. M. (2005). Aurora Kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37(8),1572-1577.

[57] Mehra, R., Serebriiskii, I. G., Burtness, B., Astsaturrov, I., Golemis, E. A. (2013). Aurora kinases in head and neck cancer. *Lancet Oncology*, 14(10), 425–435.

[58] Gontarewicz, A., Brümmendorf, T. H. (2010). Danusertib (formerly PHA-739358) – A Novel Combined Pan-Aurora Kinases and Third Generation Bcr-Abl Tyrosine Kinase Inhibitor. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 184, 199–214.

[59] Seeling, J. M., Farmer, A. A., Mansfield, A., Cho, H., Choudhary, M. (2018). Differential selective pressures experienced by the aurora kinase gene family. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1-16.

[60] Gavriilidis, P., Poutahidis, T., Giakoustidis, A., Makedou, K., Angelopoulou, K., Hardas, A., Andreani, P., Zacharioudaki, A., Saridis, G., Gargavanis, A., Louri, E., Antoniadis, N., Karampela, E., Psychalakis, N., Michalopoulos, A., Papalois, A., Iliadis, S., Mudan, S., Azoulay, D., Giakoustidis, D. (2018). Targeting hepatocarcinogenesis model in C56BL6 mice with pan-aurora kinase inhibitor Danusertib. *Journal of Cancer*, 9(5), 914-922.

[61] Sasai, K., Katayama, H., Stenoi, D. L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E. A., Earnshaw, W. C., Brinkley, W. R., Sen, S. (2004). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 59(4), 249–263.

[62] Choudary, I., Barr, P.M., Friedberg, J. (2015) Recent advances in the development of Aurora kinases inhibitors in hematological Malignancies. *Therapeutic Advances in Hematology*, 6(6),282-294.

- [63] MybioSource. (2019). *Danusertib*. 3 Ağustos 2019 tarihinde, <https://www.mybiosource.com/kinase-inhibitor/danusertib/8506148> adresinden erişildi.
- [64] Jeyaprakash, A. A., Klein, U. R., Lindner, D., Ebert, J., Nigg, E. A., & Conti, E. (2007). Structure of a Survivin-Borealin-INCENP Core Complex Reveals How Chromosomal Passengers Travel Together. *Cell*, 131(2), 271–285.
- [65] Carré, A., Stoupa, A., Karyiawasam, D., Gueriouz, M., Monus, T., Léger, J., Gaujoux, S., Sebag, F., Glaser, N., Zenaty, D., Nitschke, P., Feysot, C. B., Hubert, L., Lyonnet, S., Scharfmann, R., Munnich, A., Besmond, C., Taylor, W., Polak, M. (2016). Mutations in BOREALIN cause Thyroid Dysgenesis. *Human Molecular Genetics*, 26, 599–610.
- [66] Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): From easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), 789-803.
- [67] Xu, Z., Vagnarelli, P., Ogawa, H., Samejima, K., Earnshaw, W. C. (2010). Gradient of increasing aurora B kinase activity is required for cells to execute mitosis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 40163-40170.
- [68] Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L., Earnshaw, W.C. (2004). Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *Journal of Cell Biology*, 166, 179–191.
- [69] Yi, Q., Chen, Q., Yan, H., Zhang, M., Liang, C., Xiang, X., Pan, X., Wang, F. (2019). Aurora B kinase activity– dependent and–independent functions of the chromosomal passenger complex in regulating sister chromatid cohesion. *Journal of Biological Chemistry*, 294(6), 2021-2035.
- [70] Kaur, H., Stiff, A. C., Date, D. A., Taylor, W. R. (2007). Analysis of mitotic phosphorylation of Borealin. *BMC Cell Biology*, 8, 1-17.
- [71] Goldenson, B., Crispino, J. D. (2015). The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene*, 34(5), 537-545.
- [72] Carmena, M., Earnshaw, W.C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 842–854.
- [73] Rojanala, S., Han, H., Muñoz, R.M., Browne, W., Nagle, R., Von Hoff, D.D., Bearss, D.J. (2004) The mitotic serine threonine kinase, Aurora-2, is a potential target for drug development in human pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(4), 451-7.
- [74] UniProt. (2019). *INCENP* geni. 27 Temmuz 2019 tarihinde, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NQS7> adresinden erişildi.
- [75] Bishop, J.D., Schumacher, J.M. (2002). Phosphorylation of the Carboxyl Terminus of Inner Centromere Protein (INCENP) by the Aurora B Kinase Stimulates Aurora B Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 27577–27580.
- [76] Mahotka, C., Liebmann, J., Wenzel, M. (2002). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ*, 9, 1334-1342.
- [77] Altieri, D. C. (2003). Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 3, 46-54.

- [78] Borbély, Á. A., Murvai, M., Kónya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F., Veress, G. (2006). Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *Journal of General Virology*, 87(2), 287–294.
- [79] Xie, L., Kassner, M., Munoz, R. M., Que, Q., Kiefer, J., Zhao, Y., Mousses, S., Yin, H., Hoff, D. D. V., Han, H. (2012). Kinome-wide siRNA screening identifies molecular targets mediating the sensitivity of pancreatic cancer cells to Aurora kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 83(4), 452–461.
- [80] Yuan, C.X., Zhou, Z.W., Yang, Y.X., He, Z.X., Zhang, X., Wang, D., Yang, T., Pan, S.Y., Chen, X.W., Zhou, S.F. (2015). Danusertib, a potent pan-Aurora kinase and ABL kinase inhibitor, induces cell cycle arrest and programmed cell death and inhibits epithelial to mesenchymal transition involving the PI3K/Akt/mTOR-mediated signaling pathway in human gastric cancer AGS and NCI -N78 cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 9,1293–1318.
- [81] Kalu, N. N., Mazumdar, T., Peng, S., Tong, P., Shen, L., Wang, J., Banerjee, U., Myers, J. N., Pickering, C. R., Brunell, D., Stephan, C. C., Johnson, F. M. (2018). Comprehensive pharmacogenomic profiling of human papillomavirus-positive and -negative squamous cell carcinoma identifies sensitivity to aurora kinase inhibition in KMT2D mutants. *Cancer Letters*, 431, 64-72.
- [82] Shang, Y. Y., Yu, N., Xia, L., Yu, Y. Y., Ma, C. Mei, Jiao, Y. N., Li, Y. F., Wang, Y., Dang, J., Li, W. (2019). Augmentation of danusertib's anticancer activity against melanoma by blockage of autophagy. *Drug Delivery and Translational Research*,1-10.
- [83] Zi, D., Zhou, Z. W., Yang, Y. J., Huang, L., Zhou, Z. L., He, S. M., He, Z. X., Zhou, S. F. (2015). Danusertib induces apoptosis, cell cycle arrest, and autophagy but inhibits epithelial to mesenchymal transition involving PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human ovarian cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27228–27251.
- [84] Li, J. P., Yang, Y. X., Liu, Q. L., Zhou, Z. W., Pan, S. T., He, Z. X., Zhang, X., Yang, T., Pan, S. Y., Duan, W., He, S. M., Chen, X. W., Qiu, J. X., Zhou, S. F. (2015). The pan-inhibitor of aurora kinases danusertib induces apoptosis and autophagy and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 1027-1062.
- [85] Wang, H., Tian, L., Goldstein, A., Liu, J., Lo, H. C., Sheng, K., Welte, T., Wong, S. T. C., Gugala, Z., Stossi, F., Zong, C., Li, Z., Mancini, M. A., Zhang, X. H. F. (2017). Bone-in-culture array as a platform to model early-stage bone metastases and discover anti-metastasis therapies. *Nature Communications*, 8, 1–13.
- [86] Borthakur, G., Dombret, H., Schafhausen, P., Brummendorf, T. H., Boisse, N., Jabbour, E., Mariani, M., Capolongo, L., Carpinelli, P., Davite, C., Kantarjian, H., Cortes, J. E. (2015). A phase I study of danusertib (PHA-739358) in adult patients with accelerated or blastic phase chronic myeloid leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant or intolerant to imatinib and/or other second generation c-ABL therapy. *Haematologica*, 100(7), 898–904.
- [87] Meulenbeld, H.J., Mathijssen, R.H.J., Verweij, J., Wit, R., Jonge, M.J.A. (2012). Danusertib, an aurora kinase inhibitor, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21,3, 383-393.
- [88] Öztürk, E. (2017). *Arum Dioscoridis bitki ekstraktının, tozasertib ile birlikte CFPAC-1 pankreas karsinoma hücre hattı üzerindeki antikanser etkisinin in vitro araştırılması*. Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.

- [89] Schoumacher, R. A., Ram, J., Iannuzzi, M. C., Bradbury, N. A., Wallace, R. W., Hon, C. T., Kelly, D. R., Schmid, S. M., Gelder, F. B., Rado, T. A., Frizzell, R. A. (1990). A Cystic Fibrosis Pancreatic Adenocarcinoma Cell Line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4012-4016.
- [90] ATCC Product Sheet. (2016). *CFPAC-1 (ATCC® CRL1918™)*. 21 Temmuz 2019 tarihinde <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1918.aspx#history> adresinden erişildi.
- [91] ATCC Product Sheet. (2016). *MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™)*. 21 Temmuz 2019 tarihinde <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1420.aspx#generalinformation> adresinden erişildi.
- [92] Yunis, A. A., Grace, K., Arimura, K., Russin, D. J. (1977). Human Pancreatic Carcinoma (MIA PaCa-2) in Continuous Culture: Sensitivity to Asparaginase. *International Journal of Cancer*, 19, 128-135.
- [93] Fisher Scientific. (2019). *Bibby Scientific™ Techne™ TC-512 Gradient Thermal Cycler*. 5 Kasım 2019 tarihinde, <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/techne-tc-512-gradient-thermal-cycler-2/11719372> adresinden erişildi.
- [94] Atlas Biyoteknoloji. (). *Applied Biosistem VIIA™ 7 Real-Time PCR Sistemi - 96 Well*. 5 Kasım 2019 tarihinde, http://www.atlasbiyo.com/6_applied-biyosistem--vii-a--7-real-time.html adresinden erişildi.
- [95] Esco Technologies. (2019). *CelCulture® CO₂ Incubators*. 5 Ağustos 2019 tarihinde, <http://escolifesciences.us/product/co2-incubator/co2-incubators/ccl/> adresinden erişildi.
- [96] İbidi GMBH. (2019). *Cedex® XS Analyzer, Smart Slide*. 5 Ağustos 2019 tarihinde, <https://ibidi.com/channel-slides/197-smart-slide.html> adresinden erişildi.
- [97] Cedex® XS Analyzer, Smart Slide. 5 Ağustos 2019 tarihinde, http://netdocs.roche.com/PPM/Cedex_XS_Analyzer_User_Training_Guide_1_0_March_2010.pdf adresinden erişildi.
- [98] He, S. J., Shu, L. P., Zhou, Z. W., Yang, T., Duan, W., Zhang, X., He, Z. X., Zhou, S. F. (2016). Inhibition of Aurora kinases induces apoptosis and autophagy via AURKB/p70S6K/RPL15 axis in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 382(2), 215-230.
- [99] Honda, R., Körner, R., Nigg, E. A. (2003). Exploring the Functional Interactions between Aurora B, INCENP, and Survivin in Mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 3325-3341.
- [100] Lau, C., Kim, Y., Chia, D., Spielmann, N., Eibl, G., Elashoff, D., Wei, F., Lin, Y., Moro, A., Grogan, T., Chiang, S., Feinstein, E., Schafer, C., Farrell, J., Wong, D. T. W. (2013). Role of pancreatic cancer-derived exosomes in salivary biomarker development. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 2688-2697.
- [101] Fei, F., Lim, M., Schmidhuber, S., Moll, J., Groffen, J., Heisterkamp, N. (2012). Treatment of human pre-B acute lymphoblastic leukemia with the Aurora kinase inhibitor PHA-739358 (Danusertib). *Molecular Cancer*, 11, 1-12.
- [102] Meulenbeld, H. J., Bleuse, J. P., Vinci, E. M., Raymond, E., Vitali, G., Santoro, A., Dogliotti, L., Berardi, R., Cappuzzo, F., Tagawa, S. T., Sternberg, C. N., Jannuzzo, M. G., Mariani, M., Petroccione, A., De Wit, R. (2013). Randomized phase II study of danusertib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer after docetaxel failure. *BJU International*, 111, 44-52.

[103] Zhu, Q., Luo, M., Zhou, C., Chen, Z., Huang, W., Huang, J., Zhao, S., Yu, X. (2018). Effect of danusertib on cell cycle, apoptosis and autophagy of hepatocellular carcinoma HepG2 cells in vitro. *Nan Fang yi ke da xue xue bao =Journal of Southern Medical University*, 38(12),1476-1484.

[104]Cilibrasi, C., Guzzi, A., Bazzoni, R., Riva, G., Cadamuro, M., Hochegger, H., Bentivegna, A. (2019). A ploidy increase promotes sensitivity of glioma stem cells to aurora kinases inhibition. *Journal of Oncology*, 2019, 1–15.

[105]Vargas, B., Giacobbi, N. S., Sanyal, A., Venkatachari, N. J., Han, F., Gupta, P., Sluis-Cremer, N. (2019). Inhibitors of Signaling Pathways That Block Reversal of HIV-1 Latency. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), e01744-18.



EKLER

Ek 1. High Pure RNA izolasyon protokolü

1. Hücre süspansiyonu santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır. Üzerine 400µl Lysis Binding Buffer eklenir. Resüspanse edilir. Köpürtülür.
2. Örnek RNA izolasyon kolonuna aktarılır.
3. 30sn 13500 rpm'de santrifüj edilir. Toplama tüpüne geçen sıvı boşaltılır. Kolona 56µl DNase+Incubation Buffer (1µl DNase I, 5µl Incubation Buffer, 50µl Apyrojenik su) eklenir.
4. 15dk 25°C'da inkübe edilir.
5. Kolona 500µl Wash Buffer I eklenir.
6. 30sn 13500 rpm'de santrifüj edilir.
7. Toplama tüpüne geçen sıvı boşaltılır. Kolona 500µl Wash Buffer II eklenir.
8. 30sn 13500 rpm'de santrifüj edilir.
9. Kolona 200µl Wash Buffer II eklenir.
10. 2dk 14500 rpm'de santrifüj edilir. Toplama tüpleri atılır.
11. Kolonlar 1,5µl'lik eppendorf'a yerleştirilir. 75µl Elution Buffer eklenir.
12. 75 sn 13500 rpm'de santrifüj edilir.
13. Eppendorf tüplerine geçen RNA'lar NanoQ'da ölçülür. 260nm/280nm'de 1,7-2,0 kalite beklenir.
14. RNA'lar -80°C'de saklanır.

Ek 2. Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti protokolü

Kullanıma başlamadan önce bütün reagent ve RNA örnekleri erimeye bırakılır. Prosedüre başlamadan önce erimiş örnek ve reagentlar kısa bir spin yapılır. Bütün reagent ve RNA örnekleri buz üzerinde korunmalıdır.

MIX:

Total RNA veya poly (A) mRNA (NanoQ ölçümüne göre)	xµl
10X RT Random primer	2µl
Su, PCR grade (RNA miktarına göre)	x µl
10X RT Buffer	2µl
25X dNTP Mix (100mM)	0,8µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1µl
RNase İnhibitor	1µl

Mix tamamlandıktan sonra Termalcycler'a yüklenir ve tek döngüde cDNA sentezi gerçekleştirilir.

Termalcycler protokolü (tek döngü)

- 25°C de 10 dakika
- 37°C de 120 dakika
- 85°C de 5 dakika
- 4°C de 1 dakika

Üretilen cDNA örnekleri -20'de muhafaza edilir.

Ek 3. Gotaq qPCR Master Mix qRT-PCR protokolü

Gerekli Malzemeler

1. VIIA 7 Reel Time PCR cihazı (Applied Biosystems)
2. Master Mix; Gotaq qPCR Master Mix (Promega cat no: A6001)
3. Lightcycler 480 sealing foil (Roche cat no: 04729757001)
4. Lightcycler 480 multiwell plate 96 (Roche cat no: 04729692001)
5. Primer

Real-Time PCR da kullanılan karışım;

- 4.0µL PCR için uygun saflıkta su
- 10µL Reaksiyon enzimi (Probe master)
- 1.0µL Forward Primer
- 1.0µL Reverse Primer
- 4.0µL c-DNA

İnkübasyon aşaması

95°C'de 2 dakika DNA polimerazın aktive olması için bekletilmiştir.

Amplifikasyon aşaması

3 aşamada gerçekleştirilmiştir, aşağıdaki döngü 40 defa tekrarlanmıştır.

- 1.Basamak; 95°C'de 15 saniye DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon).
- 2.Basamak; 60°C'de 60 saniye primerlerin bağlanması (annealing).
- 3.Basamak; 60-95°C'de ayrışma (dissociation).

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Cengiz ÇOLAK

Doğum Tarihi :21.07.1982

E-mail : ccolak0182@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Bozok Üniversitesi	2009-2015
Yüksek Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2015-2019

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl