

**PAN-AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN DANUSERTİB'İN
PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE OTOFAJİ, METASTAZ VE
EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ (EMT) ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERKAN ALABAŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
KASIM - 2018**

**PAN-AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN DANUSERTİB'İN
PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE OTOFAJİ, METASTAZ
VE EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ (EMT) ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERKAN ALABAŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



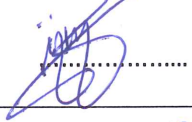
**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN**

**MERSİN
KASIM - 2018**

ONAY

Erkan ALABAŞ tarafından Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN danışmanlığında hazırlanan "Pan-Aurora Kinaz İnhibitörü Olan Danusertib'in Pankreas Kanseri Hücrelerinde Otofaji, Metastaz ve Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 26.11.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Baskan	Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN	
Üye	Doç. Dr. Yunus Kasım TERZİ	
Üye	Doç. Dr. Özlem İZCİ AY	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ~~11.11.2019~~ ²⁰¹⁹ tarih ve ~~22~~ / ~~25~~ sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Cahit BİLİM
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

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 ahlâk 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.

26 Kasım 2018 / 26 November 2018



Erkan ALABAŞ

ÖZET

PAN-AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN DANUSERTİB'İN PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE OTOFAJİ, METASTAZ VE EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ (EMT) ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser kelime anlamı olarak bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalması ile beliren ve organizmayı ölüme kadar götüren kötü tümörler olarak tanımlanır. Kanser tek bir organ hastalığı olmadığı için kanser türünün belirtileri ve tedavi yöntemleri de birbirinden farklıdır. Bu çalışmada, CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hatlarında daha önce yapılan sitotoksikite deneyinde belirlenen IC₅₀ değeri CFPAC-1 hücreleri için 399 nM, MIA PaCa-2 hücreleri için 318 nM saptanmış ve bu dozda ilaç kullanılmıştır. xCELLigence CIM-Plate 16 ve yara açma deneyleri sonucu, iki pankreas kanseri hücre hattında Danusertib ilacının bulunduğu gruplarda migrasyonu durdurduğu görülmüştür. Danusertib'in zamana bağlı IC₅₀ değerleri iki hücre hattında 24. ve 48. saatlerde akım sitometrik olarak ölçülen DAPI-A otofajik analizi sonucunda; CFPAC-1 hücrelerinde 24. saatte %6, 48. saatte %6,6 oranında MIA PaCa-2 hücrelerinde ise 24. saatte %4,1, 48. saatte %4,7 oranında otofaji görülmüştür. Danusertib'in apoptoz üzerine etkilerini göstermek için, qRT-PCR metodu ile kaspaz -3, -6, -7, kaspaz -8, -9 ve metastaz üzerine etkilerini göstermek için, qRT-PCR metodu ile VEGF, Zeb-1, Slug ve Snail gen ifade düzeyleri araştırılmıştır. Doz/Zaman bağımlı Danusertib uygulanmış CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde kaspaz ifadelerinde artış gözlenmiştir ve bu durum her iki kanser hücresinde de hem iç hem de dış yoldan apoptozun (programlanmış hücre ölümü) gerçekleştiğini göstermektedir. Metastatik gen ifade düzeyleri analizi sonucu, anjiyogenezde rol oynayan VEGF gen ifadesinde CFPAC-1 hücrelerinde azalma meydana gelirken, MIA PaCa-2 hücrelerinde artış meydana gelmektedir. EMT ile ilişkili olan Zeb1, Slug ve Snail gen ifadelerinde ise azalma meydana gelmektedir. Bu genlerin ifadelerinin azalması metastazın engellendiğini göstermektedir. Sonuç olarak, Pan-Aurora Kinaz inhibitörü Danusertib, pankreatik kanserlerde anti-tümör ve anti-metastatik etkili potansiyel bir ajan olabilir. Ancak, ileri *in-vivo* araştırmaların gerçekleştirilerek çalışmanın desteklenmesi öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Aurora kinaz, Metastaz, Otofaji, Danusertib, Migrasyon, ZEB

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

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF DANUSERTIB, A PAN-AURORA KINASE INHIBITOR, ONTO AUTOPHAGY, METASTASIS AND EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION (EMT) IN PANCREATIC CANCER CELLS

The mean of the Cancer is defined as bad tumors, which occur by irregular division and proliferation of cells in an organ or a tissue and lead the organism to death. Since cancer is not a single organ disease, the symptoms and treatment methods of the cancer type are different. In this study, two IC₅₀ values (399nM and 318nM) which previously measured by xCELLigence Cytotoxicity test were used in both CFPAC-1 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells, respectively. The xCELLigence CIM-Plate 16 Migration and Wound Healing Tests showed no migration in Danusertib treated pancreatic cancer cells. The time-dependent IC₅₀ values of Danusertib were determined by Flow Cytometric DAPI-A autophagic analysis at 24th and 48th hours in two cell lines: The Autophagy was observed that in CFPAC-1 cells at 24 and 48 hours as 6% and 6,6%, respectively and in MIA PaCa-2 cells at 24 and 48 hours as 4,1% and 4,7%, respectively. To demonstrate the effects of Danusertib on apoptosis and on metastasis, caspase -3, -6, -7, caspase -8, -9 and VEGF, Zeb-1, Slug, Snail gene expression levels were quantified by using qRT-PCR method, respectively. An increase in the caspase expressions were observed in both time/dose dependent Danusertib treated CFPAC-1 and MIA PaCa-2 cells that indicates of apoptosis (programmed cell death) as internally or externally. The result of analyses of metastatic VEGF gene expression levels; plays a role in angiogenesis, were increased in MIA PaCa-2 cells while they were decreased in CFPAC-1 cells. The expression levels of Zeb1, Slug and Snail genes, associated with EMT, are decreased. Reduction of expression of these genes indicates that metastasis is inhibited. In conclusion, Danusertib, a Pan-Aurora Kinase Inhibitor, may be a potential anti-tumor and anti-metastatic potent agent in pancreatic cancers. However, it is envisaged to support the study by conducting advanced *in-vivo* studies.

Keywords: Aurora Kinase, Metastasis, Autophagy, Danusertib, Migration, ZEB

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

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında desteklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e,

Sayın bölüm başkanım Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'a, çalışmalarımızda kullandığımız 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 çalışmalarımda bana yardımcı olan Öğ. Gör. Derya YETKİN'e, Biyolog Ayberk KIRBIYIK'a, Uzman Biyolog Hamide DOĞAN'a teşekkür ederim.

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

Ayrıca tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen diğer tüm arkadaşlarım ve MEİTAM (Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi) idari ve akademik personeline teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışması Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce 2017-1-TP2-2254 Proje Numarası ile desteklenmiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışması Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM), Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp (MERKÖK) Doku Kültürü ve Flow Sitometri Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. OnkogeneZ	3
2.2. Pankreas	4
2.2.1. Pankreas Kanseri.....	5
2.2.2. Pankreas Kanserinde Migrasyon	6
2.2.3. CFPAC-1 Pankreas Duktal Adenokarsinoma Hücre Hattı.....	6
2.2.4. MIA Paca-2 İnsan Pankreatik Karsinoma Hücre Hattı	7
2.3. Hücre Döngüsü	7
2.4. Aurora Kinazlar	8
2.4.1. Aurora Kinaz B.....	10
2.5. İlaç.....	11
2.5.1. Pan Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib.....	11
2.6. Otofaji	12
2.6.1 Ölüm İle İlişkili Protein Kinaz (DAPK=Death associated protein kinase)	15
2.7. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT).....	15
2.7.1. Epitelyal Mezenkimal Geçiş'in (EMT) Kanseri İle İlişkisi.....	18
2.7.2. Epitelyal Mezenkimal Geçiş'in (EMT) Metastaz da Rolü.....	19
2.7.3. ZEB Ailesi	21
2.8. Apoptoz.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyaller	25
3.1.1. Hücre Kültürü ve Deneylerde Kullanılan Materyaller	25
3.2. Yöntemler.....	27
3.2.1. CFPAC-1 Pankreas Karsinoma Hücrelerinin İnkübasyonu.....	27
3.2.2. MIA Paca-2 İnsan Pankreatik Karsinoma Hücrelerinin İnkübasyonu.....	27
3.2.3. CFPAC-1 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi.....	28

	Sayfa
3.2.4. MIA PaCa-2 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi.....	29
3.2.5. xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi.....	29
3.2.6. Akım Sitometri de DAPI-A ile Otofaji Ölçülmesi.....	31
3.2.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qRT-PCR tekniği ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi.....	32
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Yara Açma (Wound healing) Migrasyon Analizi	34
4.1.1. CFPAC-1 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi.....	34
4.1.2. MIA Paca-2 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi	35
4.2. xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi	37
4.2.1. CFPAC-1 Hücrelerinin xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi	37
4.2.2. MIA PaCa-2 Hücrelerinin xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi ..	38
4.3. Akım Sitometri de DAPI-A ile Otofaji Analizi.....	38
4.4. Hücrede Ölüm Yolağının ve Metastaz Yolağının Gen İfade Düzeyleri İle Analizi	43
4.4.1. CFPAC-1 Hücrelerinde Apoptoz İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi.....	45
4.4.2. CFPAC-1 Hücrelerinde Metastaz ile İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi	47
4.4.3. MIA PaCa-2 Hücrelerinde Apoptoz ile İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi.....	50
4.4.4. MIA PaCa-2 Hücrelerinde Metastaz ile İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi	53
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	58
EKLER.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	65

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Hücrelerin inkübasyonunda kullanılan materyaller.....	25
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan cihaz, materyal ve kimyasallar.....	25
Tablo 3.3. Deneylerde kullanılan deney kitleri.....	26
Tablo 3.4. Casp -3, -6, -7, -8, -9, ACTB, VEGF, Zeb-1, Slug ve Snail primer gen dizileri.....	26
Tablo 3.5. xCELLigence CIM-Plate 16 uygulaması ilaç dozajları ve kuyucuk planı.....	31
Tablo 3.6. Akım sitometri için yapılan deney dizaynı.....	32
Tablo 4.1. CFPAC-1 hücreleri 24. saat kontrol grubu analiz sonucu.....	39
Tablo 4.2. CFPAC-1 hücreleri 24. saat IC ₅₀ grubu analiz sonucu.....	39
Tablo 4.3. CFPAC-1 hücreleri 48. saat kontrol grubu analiz sonucu.....	40
Tablo 4.4. CFPAC-1 hücreleri 48. saat IC ₅₀ grubu analiz sonucu.....	40
Tablo 4.5. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat kontrol grubu analiz sonucu.....	41
Tablo 4.6. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat IC ₅₀ grubu analiz sonucu.....	42
Tablo 4.7. MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat kontrol grubu analiz sonucu.....	42
Tablo 4.8. MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat IC ₅₀ grubu analiz sonucu.....	43
Tablo 4.9. Kontrol ve ilaç uygulanmış CFPAC-1 hücreleri total RNA ve miktarları.....	44
Tablo 4.10. Kontrol ve ilaç uygulanmış MIA PaCa-2 hücreleri total RNA ve miktarları.....	44
Tablo 4.11. CFPAC-1 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları.....	44
Tablo 4.12. MIA PaCa-2 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları.....	44
Tablo 4.13. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP3 gen ekspresyonu.....	45
Tablo 4.14. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP6 gen ekspresyonu.....	45
Tablo 4.15. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP7 gen ekspresyonu.....	46
Tablo 4.16. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP8 gen ekspresyonu.....	46
Tablo 4.17. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP9 gen ekspresyonu.....	47
Tablo 4.18. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve VEGF gen ekspresyonu.....	48
Tablo 4.19. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve ZEB1 gen ekspresyonu.....	48
Tablo 4.20. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve SLUG gen ekspresyonu.....	49
Tablo 4.21. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve SNAIL gen ekspresyonu.....	49
Tablo 4.22. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP3 gen ekspresyonu.....	50
Tablo 4.23. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP6 gen ekspresyonu.....	51
Tablo 4.24. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP7 gen ekspresyonu.....	51
Tablo 4.25. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP8 gen ekspresyonu.....	52
Tablo 4.26. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP9 gen ekspresyonu.....	52
Tablo 4.27. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve VEGF gen ekspresyonu.....	53
Tablo 4.28. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve ZEB1 gen ekspresyonu.....	54
Tablo 4.29. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve SLUG gen ekspresyonu.....	54
Tablo 4.30. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve SNAIL gen ekspresyonu.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser oluşum modeli	3
Şekil 2.2. Pankreas'ın konumu ve anatomisi.....	5
Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları	8
Şekil 2.4. Aurora A, Aurora B ve Aurora C domain organizasyonu.....	10
Şekil 2.5. Danusertib'in kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.6. Memeli hücrelerinde otofaji yolu.	13
Şekil 2.7. EMT'ye genel bakış.....	16
Şekil 2.8. EMT ve anoikis direncinin şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.9. EMT'nin kanser ilerlemesine katkısı.....	19
Şekil 2.10. Apoptozun içsel ve dışsal yolu.....	23
Şekil 3.1. (a) Hücre kültürü CO ₂ inkübatörü, (b) Hücre ölçüm cihazı, (c) Cedex Smart Slide.....	28
Şekil 3.2. CFPAC-1 Yara açma deneyi için deney dizaynı.....	28
Şekil 3.3. MIA PaCa-2 Yara açma deneyi için deney dizaynı	29
Şekil 3.4. xCELLigence sisteminde kullanılan CIM-Plate 16 üç kısımdan oluşur	30
Şekil 3.5. xCELLigence RTCA sistemi.....	30
Şekil 4.1. Kontrol ve Danusertib IC ₅₀ 399 nM grupları yara açma migrasyon deneyi mikroskop görüntüleri.....	35
Şekil 4.2. Kontrol ve Danusertib IC ₅₀ 318 nM grupları yara açma migrasyon deneyi mikroskop görüntüleri.....	36
Şekil 4.3. xCELLigence sisteminde CFPAC-1 hücrelerinin CIM-Plate 16 migrasyon analiz sonucu.....	37
Şekil 4.4. xCELLigence sisteminde MIA PaCa-2 hücrelerinin CIM-Plate 16 migrasyon analiz sonucu.....	38
Şekil 4.5. CFPAC-1 hücreleri 24. saat kontrol grubu.....	39
Şekil 4.6. CFPAC-1 hücreleri 24. saat IC ₅₀ grubu.....	39
Şekil 4.7. CFPAC-1 hücreleri 48. saat kontrol grubu.....	40
Şekil 4.8. CFPAC-1 hücreleri 48. saat IC ₅₀ grubu.....	40
Şekil 4.9. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat kontrol grubu.....	41
Şekil 4.10. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat IC ₅₀ grubu.....	41
Şekil 4.11. MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat kontrol grubu	42
Şekil 4.12. MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat IC ₅₀ grubu.....	43
Şekil 4.13. CFPAC-1 hücrelerinde CASP3 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	45
Şekil 4.14. CFPAC-1 hücrelerinde CASP6 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	46
Şekil 4.15. CFPAC-1 hücrelerinde CASP7 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	46
Şekil 4.16. CFPAC-1 hücrelerinde CASP8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	47
Şekil 4.17. CFPAC-1 hücrelerinde CASP9 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	47
Şekil 4.18. CFPAC-1 hücrelerinde VEGF geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	48
Şekil 4.19. CFPAC-1 hücrelerinde ZEB1 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	49
Şekil 4.20. CFPAC-1 hücrelerinde SLUG geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	49
Şekil 4.21. CFPAC-1 hücrelerinde SNAIL geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	50
Şekil 4.22. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP3 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	51
Şekil 4.23. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP6 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	51
Şekil 4.24. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP7 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	52
Şekil 4.25. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	52
Şekil 4.26. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP9 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri	53
Şekil 4.27. MIA PaCa-2 hücrelerinde VEGF geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	53
Şekil 4.28. MIA PaCa-2 hücrelerinde ZEB1 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	54
Şekil 4.29. MIA PaCa-2 hücrelerinde SLUG geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	55
Şekil 4.30. MIA PaCa-2 hücrelerinde SNAIL geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.....	55

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
AURKA	Aurora kinase A proteini
AURKB	Aurora kinase B proteini
AURKC	Aurora kinase C proteini
ATG	Autophagy-related genes
Akt	Protein kinase B (PKB)
ACTB	Actin beta (β -Actin) geni
BRCA1	Breast Cancer 1
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5 (Survivin)
CDK1	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CDCA8	Cell division cycle associated 8 (Borealin)
CPC	Chromosomal passenger complex (Kromozomal geçiş kompleksi)
CFPAC-1	A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line
DAPI-A	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAPk	Death associated protein kinase
Danu	Danusertib
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPBS	Di phosphate buffer solution
EMT	Epithelial mesenchymal transition
ECM	Extracellular matrix
Fas	First apoptosis signal receptor
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Forward scatter. BD FACSAria III cihazında karşı ışığa algılayıcı dedektör
INCENP	Inner centromere protein (Incenp)
iPSC	Uyarılmış pluripotent kök hücresi
JNK	Janus kinase
KF	Kistik fibrozis
MET	Mesenchymal epithelial transition
MIA PaCa-2	Human pancreatic carcinoma cell line
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
NT1	Nörotensin 1
NF-kB	Nükleer factor kB
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C family
RTK	Reseptör tirozin kinaz
qRT-PCR	Real time reverse transcription polimerase chain reaction
SSC	Side scatter. BD FACSAria III cihazında yan ışığa algılayıcı dedektör
TNFR	Tümör nekroz faktörü
TrkB	Nörotrofik tirozin kinaz reseptörü
ULK1	Unc 51 like autophagy activating kinase 1
VEGF	Vascular endotelial growth factor
VPS34	Vascular protein sorting 34
Zeb1	Zinc finger E-box binding homeobox 1

1. GİRİŞ

Pankreatik kanser, pankreasın hem ekzokrin hem de endokrin tümörlerini kapsamaktadır. Pankreatik tümörlerin %90'undan fazlası duktal epitelyumdan kaynaklanır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, pankreatik kanser erkeklerde teşhis edilen ve yaygın olarak görülen hastalık olarak üst sırada yer alırken kadınlarda dokuzuncu sırada yer almaktadır. Göreceli olarak düşük orana sahip olan pankreatik kanseri, hem erkeklerde hem de kadınlarda kanser ölümlerinin dördüncü önde gelen nedeni olmakla birlikte, 2020'den sonra ABD'de kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen hastalığı olarak tahmin edilmektedir. Pankreas kanseri tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %7'sini oluşturmaktadır. Beş yıllık sağkalım oranı oldukça belirsizdir (tüm evreler için yaklaşık %6) ve tüm kanserler arasında en azdır. Diğer kanserlerle kıyaslandığında, 40 yıl önce Ulusal Kanser Yasası'nın geçişinden bu yana pankreas kanseri için hayatta kalma oranı önemli ölçüde değişiklik göstermemektedir. Pankreatik kanserin etkisi ve ölüm oranları ilerleyen yaşla birlikte artmakta ve 50 yaşından sonra daha hızlı gelişim göstermektedir. Erkekler de pankreatik kanser kadınlardan %30 daha yaygındır [1].

Dünya genelinde, pankreas kanseri her yıl 200.000'den fazla ölümlerle sonuçlanmaktadır. Pankreatik kanser vakalarının yaklaşık %10'unun aileden kaynaklanan genetik temeli vardır ve bu durum bireyin hastalığı geliştirme riskini önemli ölçüde artırmaktadır. Bununla birlikte, çoğu pankreatik kanserin genetik temeli bilinmemektedir. *BRCA2* genin mutasyonları meme, yumurtalık ve pankreas kanseri riskinde artışa neden olurken, ailesel pankreatik kanserde *BRCA1* mutasyonlarının rolü hala tartışılmaktadır. Pankreatik kanser için bilinen en iyi risk faktörü sigara kullanımınıdır ve sigara bırakma sonrasında en az 10 yıl devam eden %75'lik bir riske de yol açabilmektedir [2].

En sık rastlanılan pankreatik kanser tipi olan duktal adenokarsinomanın anlaşılmasında son 10 yıl içerisinde çok önemli bilgiler ortaya çıkarılmıştır. Diğer kanserlerde olduğu gibi pankreatik kanserde de, kromozomal değişikliklerden nokta mutasyonlarına kadar çok çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler saptanmıştır. Saptanan bu heterojenik moleküler değişiklikler hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açarak kanser olgusunu oluşturmaktadır. Hücre proliferasyonunda rol oynayan birçok genin promotör bölgesinde ki CpG adacıklarında meydana gelen epigenetik değişiklikler (metilasyon), telomer kısalması, telomeraz enzim aktivitesinin artması ve mikrosatellit instabilitesi gibi farklı mekanizmaların, pankreatik kanserlerde önemli rol oynadıkları ortaya konmuştur. Pankreas kanserinin ölüm oranı oldukça yüksektir. Bu oranın yüksek olma sebepleri ise erken teşhisin zorluğu, hızlı metastaz yapma özelliği, radyoterapi ve kemoterapiye cevap vermemesi şeklinde sıralanmaktadır. Pankreas kanserinin teşhis

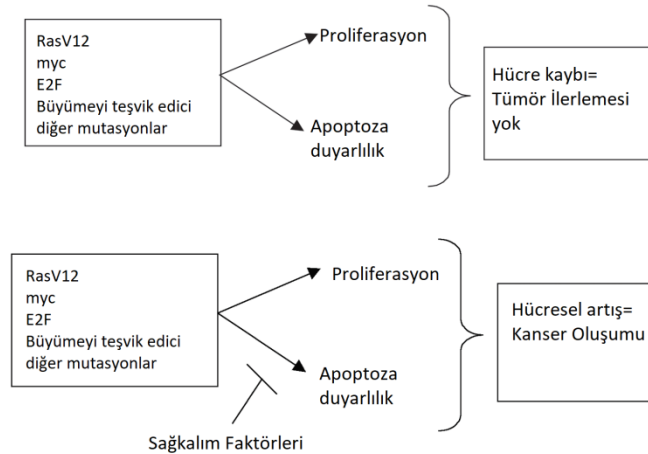
edilmesini, organın anatomik konumu, belli etmeden gelişmesi ve tümöre dair belirteçlerin olmaması bu evreyi zorlaştırmaktadır. Pankreatik kanserin erken tanı ve tedavisi için, pankreatik kanserin başlangıcında ve progresyonunda rol alan moleküler değişikliklerin ve fonksiyonlarının tanımlanması önemli hedefler arasında yer almaktadır [3].

Bu çalışmada, CFPAC-1 duktal pankreatik adenokarsinoma hücre hattı ve MIA PaCa-2 insan pankreatik karsinoma hücre hattında, Aurora kinaz B inhibitörü Danusertib'in önceki sitotoksikite çalışmalarında belirlenen IC_{50} değerleri (CFPAC-1 için 399 nM, MIA PaCa-2 için 318 nM konsantrasyonları) kullanılarak, 6 well plate'te yapılan yara açma (wound healing) ve xCELLigence DP RTCA cihazında CIM-Plate 16 deneyi ile migrasyon üzerindeki sonuçları tespit edilmiştir [4]. Ayrıca, belirlenen hücre ölüm tipinin otofajik olup olmadığı, BD FACS Aria III cihazında DAPI-A boyama (nükleus boyama) testi ile tespit edilmiştir. DAPk düzenleyicileri olan kaspaz -3, -6, -7 ve kaspaz -8, -9, metastaz ile ilişkili olan VEGF, Zeb-1, Slug ve Snail gen primerleri kullanılarak qRT-PCR ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesi sonucu apoptoz ve EMT ile ilişkileri ortaya konmuştur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Onkogenez

Kanser hücreleri, sadece bulunduğu dokuda büyümekle kalmayıp aynı zamanda metastaz yaparak başka dokularda da çoğalır. İnvazyon ve metastaz süreçleri, embriyonik hücre göçü ve yara iyileşmesinin normal fizyolojik süreçleri ile ilişkilidir. Bu fizyolojik süreçlerden sorumlu moleküller, invaziv malignitelerde dereğüle edilmiştir. Kanser hücre göçü, integrinler matriks bozucu enzimler ve hücre-hücre adhezyonu ve iletişim molekülleri tarafından düzenlenir. Özellikle, adezyon molekülü olan E-kadherin, metastaz başlatılmasının kilit bir düzenleyicisi olarak ortaya çıkmaktadır. Primer tümörde E-kadherin ekspresyonunun kaybı, epitelial hücrelerinin hücre-hücre temaslarını zayıflatır ve invazif hücrelerin salınmasına izin vermektedir. Metastaz, kanser hastaları için tedavi başarısızlığının temel nedenidir. Kanser girişiminin farklı modelleri, proliferasyonun, hücre ölümünün ve kanser ilerlemesinin ana hatları olarak düzensizleştirilmesine odaklanmıştır. Bununla birlikte, diferansiyasyon derecesinde bir azalma, yüksek derecede malign lezyonlarla ilişkili olduğu için farklılaşma çoğu kanserin bir özelliğidir. Hücrenin kaderini düzenleyen birkaç onkogenin olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle hücrenel duruma bağlı olarak, onkojenler sadece proliferasyon ve ölümü değil, aynı zamanda sınırsız bir büyümeye karşı emniyetli bir mekanizma olarak hareket edebilen farklılaşmayı da teşvik edebilir. Kanser hastalığı, karmaşık bir yapıdadır. Dokulardaki tümörler, değişken hareketler sergilemektedir. Örneğin, pankreas tümörleri yüksek derecede agresif olma eğilimindedir, buna karşın prostat tümörlerinde böyle bir durum nadir olarak görülmektedir. Kanser, aynı zamanda birçok sinyal iletim yollarının düzensizliğini içeren bir hastalıktır. İlk tümör destekleyici gen keşfedildikten sonra yüzden fazla genin, tümörün başlangıcından ilerlemesine kadar birçok olayda rol aldığı gösterilmiştir [5].



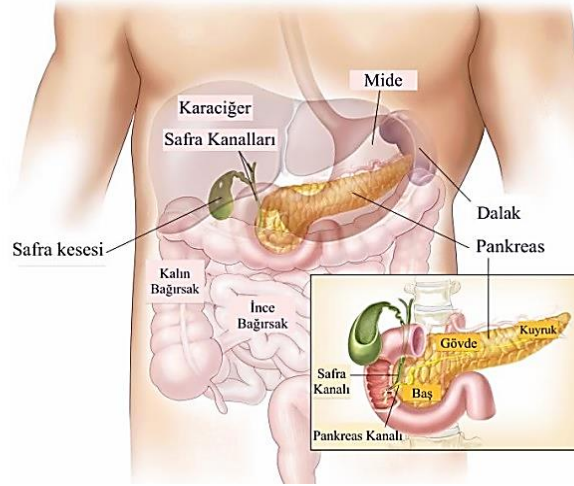
Şekil 2.1. Kanser oluşum modeli [5].

Kanser ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe daha da artarken, kanser daha anlaşılır hale gelmekte ve bu hastalığın karmaşıklığı da görünür hale gelmektedir. Kanser, kontrol edilemeyen hücre çoğalması olarak adlandırılmaktadır. Bu hücre çoğalması, hücre ölümü ve apoptozisten kurtularak tümör gelişmesine neden olmaktadır. Kontrolsüz çoğalmasının nedeni hücrelerin mutasyona uğramış olmasıdır. Bu mutasyonlar genellikle proto-onkogenler olarak bilinen genlerde oluşur. Bu genler, farklılaşmayı ve hücre büyümesini kontrol eden proteinleri kodlayarak hücre döngüsünü kontrol etmektedir. Mutasyon sonucunda ise bu genler onkogenlere dönüşür, bu durumda hücre çoğalması kontrol edilemez hale gelir. Böylece, kanser olmayan bir hücre onkojene dönüşmüş olur. Tümörün çoğalması kontrol edilemez ve kütle artışı damarlanma ihtiyacını karşılayabildiği sürece büyümeye devam edebilir. Tümörler, yeni damar oluşmasını ya da var olan damarların düzensiz bir hale gelmesine neden olur. Tümörün diğer bir özelliği ise, hücre membranının düzensiz bir şekilde büyümesine neden olmasıdır. Bu düzensizlik hücrenin endotelial bağlantılar arasında genişlemesine neden olacak şekildedir. Bu şekilde daha kısa damarlar oluşur ve besin alımını kolaylaştıracak şekilde hücreler daha poröz yapıda konumlanırlar. Her ne kadar antikanser ilaçlarının (metotreksat, paklitaksel vb.), *in-vitro* ve *in-vivo* olarak tümör çapını küçülttüğü gösterilmiş olsa da ve vücuttan tümörü uzaklaştırabileceği düşünülse de, tümörle etkileşiminden dolayı bu ilaçların yeterliliği konusunda endişeler vardır. Bazı antikanser ilaçlarının yarılanma ömrü ve spesifik olarak tümör hücreleri ile etkileşiminin az olması bu ilaçların kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır [6].

2.2. Pankreas

Pankreası ilk kez tanımlayan kişi M.Ö. 300'lerde yaşayan Herophilus'tur. Adlandırılması ise bundan yaklaşık 400 yıl kadar sonraya dayanmaktadır ve "*pankreas*" olarak adlandırılan bu organa bu isim Rufus tarafından verilmiştir [7].

Pankreas, bağırsağın arka kısmından fetal gelişimin birinci ayında pankreas tomurcuklanması (ön ve arka çıkıntı şeklinde) sonucu ortaya çıkmaktadır. Her iki çıkıntı da sağa döner ve ventral pankreasın çıktığı noktanın yanında birbiriyle birleşir. Daha sonra duodenum döndükçe pankreas da sola hareket eder [8]. Pankreas insülin ve glukagon salgısı yapan bir organdır. Salgısı kan şekerini düzenler ve sindirime yardımcı olur. Pankreas, midenin arka tarafında bulunur. Uzunluğu 16-21cm olup, erkeklerdeki ağırlığı 70gr, kadınlarda ise 55gr'dır. Sağ uç kısmında şiş olan bölüme baş, dar olan kısmına gövde, baş kısmı ile gövdenin birleştiği bölüme boyun ve arka son ucuna ise kuyruk denilmektedir. Pankreas, iç ve dış olarak iki ayrı salgıya sahiptir. Pankreas kanseri, kötü huylu tümörlerin dokuda meydana getirdiği ve metastaza kadar ilerleyen önemli bir hastalıktır [6].



Şekil 2.2. Pankreas'ın konumu ve anatomisi [6].

2.2.1. Pankreas Kanseri

Pankreas kanserleri, kistik ve solid benign tümörler dışında tüm maligniteler arasında en ölümcül olanıdır. Son yıllarda oldukça artış gösteren pankreas kanserinde tedavi süresini zorlaştıran durumlar; tanı zorluğu, hayatta kalma süresinin kısa olması ve hızlı metastaz yapma özelliğidir. A.B.D.'de 2010 yılındaki hastaliksız ölümler içinde bütün ölümlerin %0,014'nün nedeni pankreatik karsinoma olarak bilinen duktal invaziv adeno-karsinomdur. Dünya Sağlık Örgütü'nün GLOBOCAN 2012 verilerine göre Türkiye'de ki tüm kanserler içinde, pankreas kanseri kadınlarda % 0,5, erkeklerde % 0,9'dur [9].

Pankreas kanserinin en önemli yanı kötü prognozlu tümörlerden biri olmasıdır. Kırk beş yaşından sonra görülme sıklığı artmaktadır. Kadınlarda görülme oranı erkeklere göre daha azdır. Bu hastalığın devamlılığında ise sigara, diabetes mellitus ve genler önemli rol oynar. Tedavi sürecinde ameliyat kaçınılmazdır. Ameliyat olan hastalarda üç yıllık hayatta kalma oranı %30 civarında olduğu belirtilmiştir. Pankreas kanserli hastaların yaklaşık %90'unda hematojen veya peritoneal yolla yayılma saptanmaktadır. Tümörün çevre dokulara invaze yapması durumunda teknik olarak ameliyat riskli görülmektedir. Ameliyat edilemeyen hastalara bölgesel tedaviler yapılmaktadır. Metastatik hastalardaki hayatta kalım oranı 3-6 ay civarındadır. Cerrahi işlem uygulanan hastalarda ise farklı tedaviler yapılmaktadır. Bu tedaviler arasında ameliyat, kemoterapi, radyoterapi ve kemoradyoterapi yöntemleri vardır. Bütün yöntemlere rağmen tedavi sonucu hayatta kalım için tam anlamı ile yeterli gelmemektedir [10].

Pankreas kanserinin birincil tipi yüksek bir orana sahip (%95) olan ve ekzokrin fonksiyonunu etkileyen pankreatik adenokarsinomadır. Tedavi sonucu tümörün pankreas

içerisinde nerede oluştuğunun belirlenmesi ile doğru orantılıdır. Evre-0'da kanser görülmemiştir. Birinci evre, kanserin ortaya çıktığı organda yerini belirlemek için bulunan durumdur. İkinci evre, iki durumda meydana gelmektedir. Birincisi kanser yanındaki organlara metastaz yapmış fakat lenf nodlarına yayılma yapmamıştır. İkinci durumda ise kanser yakın organlara metastaz yapmıştır. Üçüncü evre de ise kanser lenf nodlarına yayılmış olabilir ancak biraz daha uzak olan diğer organlara (dalak, mide, kolon, komşu damarlar) da ulaşmıştır. Dördüncü evrede, tümör metastaz yapmış uzak organlara kadar da ilerlemiştir. Evre-0, -1 ve -2 tümörlerine ameliyat uygunabilirken, evre-3 ve evre-4 deki tümörlere uygulanamamaktadır. Beş yıllık hayatta sağkalım oranları hastalığın evresine bağlı olmaktadır. Belirlenen tümörlerde sağkalım oranı %20 iken, organ yayılmasında %2, bölgesel tümörlerde ise %8'dir. Pankreas kanseri hastalarının %7'sine tümör tanısı, %26'sına bölgesel tanı, %52'sine ise uzak organ metastaz özelliğine sahip olan pankreas kanseri tanısı konulmaktadır [11].

2.2.2. Pankreas Kanseriinde Migrasyon

Pankreas kanseri tedavisinde kullanılan yöntemlerin en büyük sorunu metastazdır. Bu sorun mevcut hastaların tedavisini kötü yönde etkileyerek ölüme neden olmaktadır. Metastaz, gelişigüzel bir olay döngüsü olmadığı için kanser hücrelerinin birbirlerine olan etkisi tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu etkiler tümörün bulunduğu yerden ayrılması ile başlar. Devamında ise kan damarlarına invazyon, hedef organa yerleşme durumu, çoğalma ve anjiyogenezin uyarılması gibi birbirleriyle ilişkili olan süreç gerçekleşir. Pankreas kanseri gelişimi sırasında tümör, komşu dokulara hücum ederek ve organlara yayılarak daha fazla metastatik hücre oluşturmaktadır. Pankreas kanseri hastalarında tümör, pankreas dışına doğru hareket ederek metastaz yapmaktadır. Yayılmanın en çok görüldüğü organ karaciğerdir. Daha sonra ise karın zarı, akciğer, kemik ve adrenal bezler gelmektedir. Ayrıca; beyin, diyafram, safra kesesi, kalp, ince ve kalın bağırsak, böbrek yumurtalık, seminal veziküller, deri, mide, dalak, testis, tiroit bezi, mesane ve uterus olmak üzere birçok organda metastatik pankreas kanseri rapor edilmektedir [11].

2.2.3. CFPAC-1 Pankreas Duktal Adenokarsinoma Hücre Hattı

Kistik fibrozis (KF), ter bezlerinde, pankreasta ve diğer organlarda epitel hücrelerinin elektrolit taşıma özelliklerine zarar veren kronik kalıtsal bir hastalıktır. CFPAC-1 hücreleri, kistik fibrozisli (KF) bir hastadan elde edilmiş pankreatik adenokarsinoma hücre hattıdır. Hücreler epitel morfolojisi gösterir ve pankreatik kanal hücrelerinin sitokeratin ve onkofetal antijen karakteristiklerini gösterir. cAMP ve cAMP-bağımlı protein kinazın bazal ve uyarılmış seviyeleri ile CFPAC-1'deki tekli Cl⁻ kanalları, Cl⁻ salgılayan epitelyal hücre hatlarına benzemektedir. Anyon

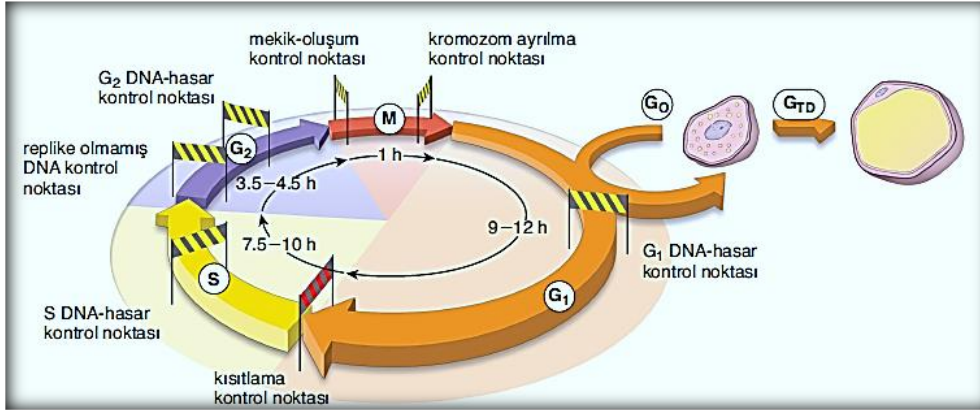
aktarımı ve tek Cl-kanalı aktivitesi Ca^{+2} iyonoforları tarafından uyarılmış, ancak forskolin, cAMP analogu veya fosfodiesteraz inhibitörleri, tarafından uyarılmamıştır. Hücrelerin CF genini eksprese ettiği en yaygın CF mutasyonu, bir fenilalanin-508 delesyonu ile sonuçlanan üç nükleotidin delesyonudur. Bu özellikleri, CFPAC-1'in 80 pasaja kadar (24 ay) stabil olan CF eksikliğini gösteren hücre hattı olduğunu göstermektedir [12].

2.2.4. MIA Paca-2 İnsan Pankreatik Karsinoma Hücre Hattı

Ameliyata, kemoterapiye ve radyoterapiye dirençli bir tümör olan pankreas kanseri, dünya çapında kanser sıralamasında dördüncü sıradadır. MIA PaCa-2, tüm pankreatik tümörlerin yaklaşık %90'ını temsil eden bir insan metastatik pankreatik adenokarsinoma hücre hattıdır. Bu hücre hattının fenotipik karakteristiği; epitelyal (CK-19), mezensimal (MNF-116), endokrin (kromogranin A, CD-56, sinaptofizin), SSTR2 ve NT1 belirteçlerinden oluşmaktadır. Genotipik özellikleri ise, karsinojenik mekanizmaların anlaşılmasında önemli rolleri olan K-RAS, p16, p53 mutasyonları ve mikrosatellit instabilitesi ile karakterizedir. Bu mutasyonlar ve genomik instabilite, pankreas adenokarsinomunun Epitelyal-Mezenkimal Geçiş mekanizmasında önemli rollere sahiptir [13].

2.3. Hücre Döngüsü

Hücrelerin bölünmesi ve çoğalması canlılığın devamı için gerekli olan olaylardır. Bu olaylar karmaşık ve kontrollü bir şekilde gerçekleşmektedir. Bölünmenin başlamasından bitimine kadar bu karmaşık olaylar bir döngü şeklinde meydana gelmektedir. Hücre siklusu olarak adlandırılan bu olaylar dizini iki ana fazdan oluşmaktadır: Bu fazlar interfaz (hazırlık) ve mitoz (bölünme) şeklindedir. Hazırlık evresi olarak adlandırılan interfaz evresi ise kendi arasında üçe ayrılmaktadır. Bunlar; G1, S, ve G2 fazları'dır. G1 evresi büyüme, S evresi DNA'nın replike olması, G2 evresi ise bölünmeye hazırlık olarak ifade edilmektedir. Bu evreler kontrollü bir şekilde gerçekleşir. Bu kontrol 3'e ayrılır. Birinci kontrol noktası olan G1/S fazı, DNA'nın kendini eşlemek için hazır olduğunu, ikinci kontrol noktası olan G2/M fazı, hücrenin bölünme için hazır olduğunu, üçüncü kontrol noktası olan M ise mitozun tamamen gerçekleşmesi için uygun olduğunu ifade etmektedir. Bu 3 aşamanın gerçekleşmesi ile hücre normal olarak bölünmesini tamamlamaktadır [11].



Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları [11]. Üç ana kontrol fazı: G₁/S fazı, G₂/M fazı ve M noktası.

G₁/S, G₂/M ve M noktaları, hücre içi ya da çevresindeki sinyal hareketlerine yanıt olarak gerçekleşen döngünün ilerlemesini takip eder. İnterfaz evresinin en uzun ve en değişken fazı G₁ evresidir. G₁ evresinde hücre besinleri toplamakta, DNA sentezi ve kromozom eşlenmesi için gerekli proteinleri ve RNA'yı sentezlemektedir. Bu evrede hücre hareketi iki kontrol noktası tarafından sağlanır. Bunlar, kısıtlama noktası ve G₁ DNA-hasar kontrol noktasıdır. Kısıtlama noktası hücre içi hareketlerin fizyolojik sürecini, G₁ DNA-hasar kontrol noktası ise replike olan DNA'nın bütünlüğünü kontrol eder. Örneğin, DNA'da büyük bir hasar meydana gelmişse, p53 geni devreye girerek G₁ DNA hasar kontrol noktasından hücrenin S fazına girmesini engeller ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) gerçekleşir. Kısıtlama noktası en önemli kontrol noktasıdır. Hücre döngüsünü geçici olarak durduran p53 geni, sikline bağlı kinazların (CDKI=Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü, en önemlisi p21) bazılarını transkripsiyonel düzeyde artırarak bu işlemi gerçekleştirir. Amaç, DNA'nın kendini eşlemesini durdurmak ve hasar düzeltilene kadar gen aktarımında oluşabilecek zararı ortadan kaldırmaktır. Bu zarar düzeltilemez ise devreye p21/CDKI girerek hücreyi ölüme götürür [11].

2.4. Aurora Kinazlar

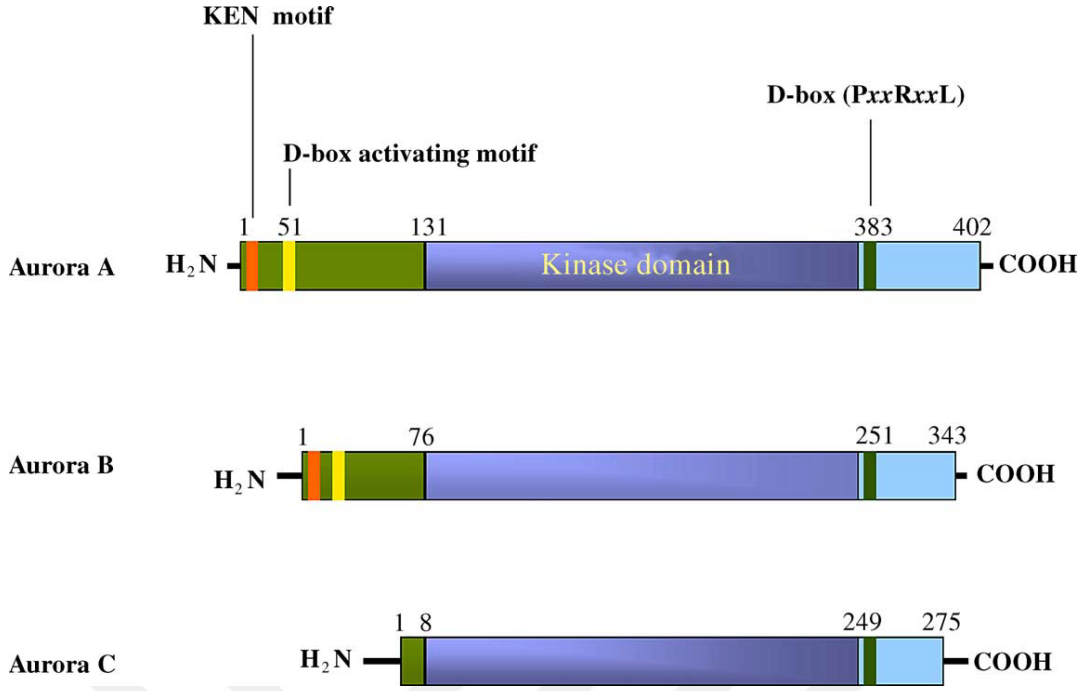
Aurora kinazlar, hücre döngüsü düzenleyicileri olan önemli bir protein kinaz ailesidir. Aurora kinazlar 3 üyeden (Aurora A, Aurora B ve Aurora C) oluşmaktadır ve mitotik olaylarda, kromozom segregasyonunda, sitokinezde ve mayoz gibi hücreysel olaylarda görev alırlar [14].

Memeli genomları, Aurora-A, Aurora-B, Aurora-C olarak isimlendirilen Aurora kinazları kodlayan üç önemli geni içerir. Bu Aurora kinazlar, AGC'nin (protein kinaz A / protein kinaz G / protein kinaz C-ailesi) protein kinazları ile birlikte filogenetik olarak ilişkili kinaz ailesini oluşturan serin-treonin protein kinazlarıdır. Aurora kinazların belirgin üyesi, mitotik iş

fonksiyonunda yer alan genleri tanımlamak için bulunan *Drosophila* Aurora kinazıdır. Mantarlar gibi daha yüksek organizmalarda işlevsel olarak fazla ilişkili olan Aurora B kinazı (*S. cerevisiae* ve *S. Pombe*'de Ark1) bulunmaktadır. Memeliler Aurora-C adı verilen üçüncü Aurora genine sahiptir. Aurora kinaz fonksiyonu çeşitli mekanizmalarla kontrol edilir. Bunlardan en önemlisi de, gen transkripsiyonu düzenlenmiş hücre döngüsüdür [15].

Aurora kinazlar, mitoz ve mayoz sırasında kromozomların mikrotübüller ile beraberliğini etkilemesi sonucu kromozom ayrılmasında rol oynamaktadırlar. Profaz safhasında setromerlerde kromozom kolları boyunca lokalizedir. Metafaz safhasında ise iç sentromer bölgesine lokalize olmakta ve kromozom kolları ile bir ilişki kurarak, anafaz da merkezi iğ ve kortekse hareket ederek telofaz safhasında akümüle olmaktadır [16].

Bir hücrenin bölünmesi, büyümesi ve gelişmesi için bir ön şarttır ve bu süreç sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bazı organizmalardaki çalışmalar, mitotik kinazlar olarak bilinen birkaç serin-treonin kinazının, siklin bağımlı kinaz 1 [(CDK1) p34cdc2 olarak da bilinir], polo-benzeri kinazlar, NIMA-ilişkili kinazlar, WARTS / LATS1-ilişkili kinazları içerdiğini göstermiştir. Aurora / Ip11 ile ilgili kinazlar ise hücre bölünmesinin aşamalarında önemli bir rol oynarlar. Bu enzimlerin yapısı evrimle iyi korunmuştur. Hücre büyümesini ve apoptozu düzenleyen genetik yollardaki herhangi bir sapma hücre transformasyonuna ve tümör oluşumuna yol açar. Aurora kinaz ailesi mitozun kilit düzenleyicileri olan yüksek derecede ilişkili serin-treonin kinazların bir düzenleyecisidir; Genomik materyalin hücrelere doğru ve eşit şekilde ayrılması için gereklidir. Aurora kinazlar (AURK), ökaryotik organizmaların her iki yapısının ve işlevinin korunmasını gösterir. Bu kinazların üyeleri, farklı model organizmalarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Aurora kinazlarda düzensizlik, tümör oluşumuna bağlanmıştır. Üç aile üyesinden AURKA, sürekli olarak kanserler ile ilişkilidir. AURKB'nin son zamanlarda tümör oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir ancak AURKC'nin rolü hakkında henüz net bir bilgi yoktur [17].



Şekil 2.4. Aurora A, Aurora B ve Aurora C domain organizasyonu [18].

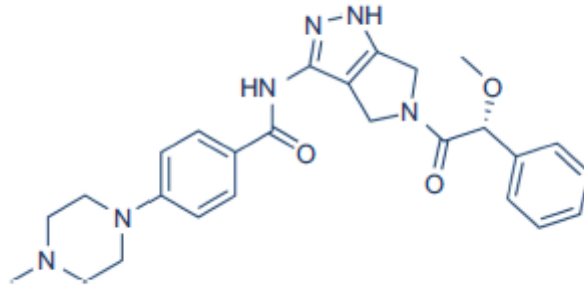
2.4.1. Aurora Kinaz B

Aurora kinaz B (AURKB), insan 17. kromozomun q13 kolunda lokalizedir [17]. Aurora B, kromozom segregasyonunda ve sitokinezinde önemli bir rol oynar. Bipolar kromozom yönelimi, kromozom yoğunlaşması ve kinaz aktivitesi için de gereklidir. Aurora B kinazları, hücrelerde iç sentromer proteini (INCENP) ve survivin içeren bir komplekste bulunan "kromozomal yolcu" proteinleridir [18]. CPC (chromosomal passenger complex); iç sentromer proteini (INCENP), survivin (BIRC5), borealin (CDCA8) ve diğer enzim olmayan alt kısımlardan meydana gelir. Bu kompleks, kinaz aktivitesinden sorumludur ve bu kısımları yönetmektedir [19]. Bu kompleks ilk önce profaz sırasında kromozom boyunca lokalize olur. Prometafaz sırasında ise iç sentromer bölgesinde yoğunlaşır, kromozomdan ayrılır ve anafazda merkezi eksen boyunca lokalize olur. Bir Aurora B kinaz-ölü mutantının (K-R) aşırı ifadesi mitotik olaylarda, mikrotübüllere kinetektor eklenmesi ve kaybı, anafaz veya sitokinez olmaksızın mitozdan çıkış da dahil olmak üzere çoklu kusurlara neden olmaktadır. Aurora B memeli hücrelerinde kinetektor oluşumunda önemli bir rol oynasa da, bugüne kadar sadece bir Aurora B hedefi olan sentromer protein-A tanımlanmıştır [18].

2.5. İlaç

2.5.1. Pan Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib

Danusertib, Aurora kinaz ve güçlü antikanser etkiye sahip olan üçüncü nesil bir Bcr-Abl tirozin kinaz inhibitörüdür. Danusertib yakın zamanda hücre büyümesi, apoptoz, otofaji ve epitelial mezenkimal geçiş ve insan mide kanseri AGS ve NCI-N78 hücrelerinde yer alan moleküler mekanizmalar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Danusertib'in AGS ve NCI-N78 hücreleri üzerinde güçlü büyüme-inhibe edici, apoptoz ve otofajiyi indükleyici etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Danusertib, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunda artış meydana getirmekte fakat anti-apoptotik proteinlerde ise azalma ile birlikte mitokondri aracılı apoptoze neden olmaktadır. Önceden PHA-739358 olarak bilinen Danusertib, tüm Aurora kinaz ailesi üyelerine karşı aktivitesi güçlü olan bir pan-Aurora kinaz inhibitörüdür [20].



Şekil 2.5. Danusertib'in kimyasal yapısı [20].

PHA-739358 şu anda Aurora Kinase B'nin baskın inhibisyonu ile tüm Aurora kinaz ailesi üyelerini (Aurora A, Aurora B ve Aurora C) güçlü bir şekilde inhibe eden en ileri klinik bileşiktir. PHA-739358, faz I ve faz II denemelerinde çalışılmış, hem solid tümörler hem de lösemiler dahil olmak üzere çok çeşitli kanserlerde antikanser etkisine sahip terapötik potansiyel göstermiştir [21]. PHA-739358, Aurora kinazlara karşı kuvvetli aktiviteye sahip küçük molekülü bir 3-aminopirazol türevidir. Bir biyokimyasal deneyde PHA-739358, Aurora kinaz A, B ve C'yi sırasıyla 13, 79 ve 61 nmol/L'lik IC₅₀'ler ile inhibe eden bir pirollo-pirazoldur. Bu veriler doğrultusunda PHA-739358, kanserle ilgili kinazlar için bir spektrum-seçici kinaz inhibitörü olarak tanımlanabilir [22].

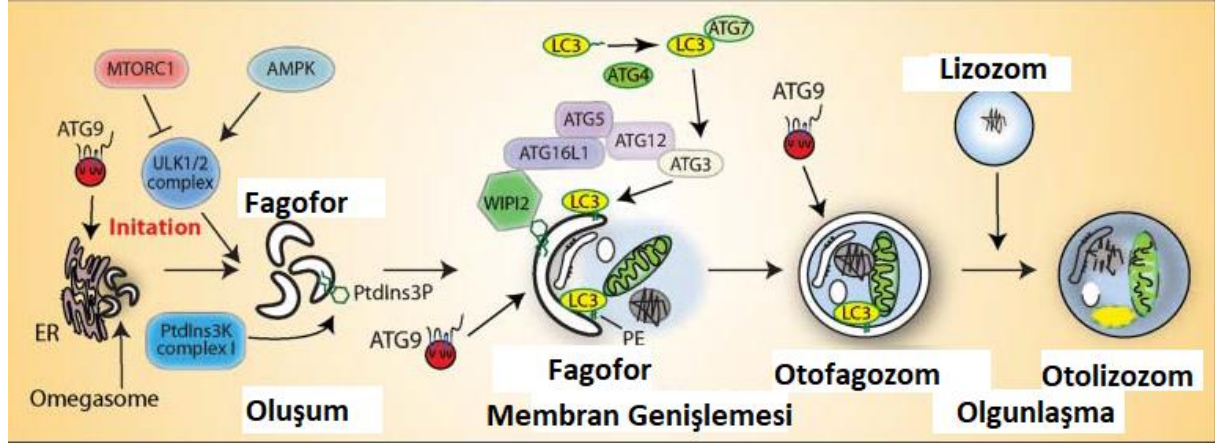
2.6. Otofaji

Otofaji, hücre içi bozulması durumu sonucunda yeterli enerji seviyelerini ve hücrel homeostaziyi korumak için sitoplazmik bileşenlerin lizozomlara dağılması olayıdır. Bu kompleks, düşük hücrel besin seviyeleri, düşük ATP seviyeleri, hasarlı proteinlerin veya organellerin birikmesi sonucu ve patojen invazyonu gibi diğer stres durumları ile aktive edilir. Çok aşamalı bir süreç olarak otofaji, intrasellüler membran ile otofajik veziküllerin bağlanmasına ve birleşimine yol açan veziküler şekilde taşınma olaylarını içerir. Bu zamana kadar memeli hücrelerinde üç ana tip otofaji tanımlanmıştır: makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA). Bu otofajik olaylar sadece mekanizma ve morfolojik özellikler açısından değil, aynı zamanda ilgili faktörlerde de farklılık göstermektedir. Bu tipler arasında, makrootofaji (bundan böyle otofaji) en kapsamlı çalışılmış ve en iyi karakterize edilen süreçtir. Bu evrimsel olarak korunan otosindirim programı, hücrel beslenme durumuna göre hücre metabolizmasının sürdürülmesinde kritik bir role sahiptir. Otofajinin bir diğer kritik rolü ise işlevsiz organellerin hızlı ve etkin bir şekilde uzaklaştırılması ve aynı zamanda yayılan patojenlere karşı bir savunma mekanizması olarak aktif şekilde görev almasıdır. Otofaji indüksiyonu, proteinler ve sitoplazmik bileşenler, otolizozomlar oluşturmak için lizozomlarla kaynaşan otofagozomlar olarak da bilinen çift zar yapılarında tutulur. Bu bileşenler daha sonra parçalanır ve üretilen moleküller (yani amino asitler, nükleik asitler, serbest yağ asitleri, kolesterol), hücre tarafından anabolik reaksiyonlarda kullanılacak şekilde sitoplazmaya geri döndürülür [23].

Otofaji, hücre ölümüne karşı korunmanın yanı sıra inflamatuvar yanıtları hafifleterek ek faydalar sağlayabilir. Otofajinin kanserde karmaşık bir rolü vardır. Karsinogenezisin başlangıcına karşı koruma sağlandığı gibi, besinlerin sınırlı olduğu solid tümörlerde de hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu mekanizmalar bu basit modelden daha karmaşık olabilir ve ilgili tümörün genetik yapısına bağlı olarak farklılık da gösterebilmektedir. Otofajinin birçok hastalık ve fizyolojik durumun yanı sıra metabolik hastalıklarda, kalp hastalığında, felçte ve hematopoeziste de rol oynadığı görülmektedir. Otofajinin oluşması için gerekli olan otofaji ile ilişkili genlerin (ATG'ler) tanımlanması, mayadaki öncü çalışmalarla sağlanmıştır [24].

Özel bir ATG proteinleri grubu, otofajiyi başlatmak için membranlara aktive edilen fonksiyonel kompleksleri birleştirir. Kısacası bunlar, ULK kompleksi, bir serin treonin kinaz kompleksi (ULK1, ULK2, ATG13, RBCC1 / FIP200 [RB1-indüklenebilir sarmal-sarmal protein 1], ATG101); fosfatidilinositol 3-fosfat (PIK3C3 / VPS34, PIK3R4 / p150, BECN1 / Beclin 1, ATG14) üreten III. sınıf lipit kinaz kompleksi; fosfatidilinositolün efektörü 3-fosfat (PtdIns3P), WIPI

proteinleri; ATG12'nin ATG16L1 (ATG7, ATG10) ile bağlantılı ATG12 ve ATG7 ailesi üyelerinin (ATG7, ATG3) lipidizasyonunu uyaran 2 ubiquitin benzeri konjugasyon kompleksleridir. Memelilerdeki Atg8 ailesi ise en az 6 protein içermektedir (LC3A, B ve C, GABARAP, GABARAPL1 ve GABARAPL2/GATE-16). Son olarak, ATG9 ise tek transmembran proteindir ve fonksiyonu belirlemektedir [25].



Şekil 2.6. Memeli hücrelerinde otofaji yolu [25].

Otofaji, ULK1 kompleksinin (mayada Atg1 kompleksi) aktivasyonu ile başlar. ULK1, insanlardaki ULK1–4 kinazlar grubunun bir parçasıdır. Otofaji de ULK1 ise bunların en önemlisidir. Bazı hücre hatlarında, ULK1 ve ULK2'yi bloke etmek, otofajiyi tamamen engellemek için gereklidir. Ancak ULK2 daha az karakterize edilir. ULK1/Atg1, otofaji indüksiyonu üzerinde en az üç yolla aktive edilir. Protein kinaz aktivitesinin açık olması için aktif kinazın PAS'ye alınması gerekir. Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3KC3), fosfatidylinositolün lipit grubunu PI (3) P üretmek için fosforile eder. PI (3) P'nin oluşumu, otofajinin başlangıcında ULK1'in altında meydana gelen önemli bir olaydır. PI3KC3, I ve II olarak bilinen iki farklı kompleks oluşturur (PI3KC3–C1 ve PI3KC3–C2). Her iki kompleks de VPS34/Vps34 katalitik alt ünitesini, VPS15/Vps15 protein kinazını ve BECN1/Atg6'yı içerir. PI3KC3–C1 kompleksi fagofor başlatma bölgelerine yönlendiren ATG14L/Atg14 içerir. PI3KC3–C1, uzamayı kolaylaştırırken, PI3KC3–C2, endozom ve otofagozom olgunlaşmasını yönlendiren UVRAG (UV radyasyon direnci ile ilişkili gen) genini içermektedir [26].

Otofaji sadece lizozom organelini kapsayan bir süreç olmayıp diğer organeller ile de bağlantılı bir olaylar dizisidir. Örneğin; Mitofaji, mikro veya makrotofaji ile hasarlı veya aşırı mitokondrilerin spesifik olarak çıkarılmasıdır. Pexophagy, peroksizomları hedef alan makrotofajik bir yanıttır. Nükleofaji, nükleusun kısımlarını seçici olarak hedefleyen otofajik bir süreçtir. Retikülofaji, ER'nin kısımlarının otofajik degradasyonudur. Ribofaji, ribozomları hedef

alan özgü bir otofajidir. Agrefaji, protein agregatları için spesifik bir otofajik yanıt olarak tanımlanabilir. Lipofaji, nötral lipid damlacıklarının seçici otofajik degradasyondur. Proteofaji, inaktif proteazomlara özgü makrotofajik yanıtları belirtmek için kullanılan bir terimdir. Lizofaji, memeli hücrelerinde hasarlı lizozomların makrotofajik olarak dağılmasıdır [27].

Otofaji de PI3K/Akt/mTOR yolağı: Kanser hücrelerinde meydana gelen hücre sinyal iletimi çoğunlukla sitoplazmik kinazları (serin/tirozin kinazlar gibi) tetikleyen reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivasyonunu içermektedir. mTOR, hücre içi sinyal yollarında önemli bir yeri olan bir serin/treonin protein kinazdır. Kanserde önemli olduğu bilinen birçok sinyal iletim yolunda (PI3K)/AKT kinaz zinciri, protein kinaz C ailesi (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/Ras sinyalizasyon zincirleri yer alır. PI3K/Akt/mTOR yolağı, büyük bir öneme sahip olan sinyal yollarından birisidir. Bu sinyal iletim yolunun işlevi, tirozin kinazlar ile yakın bir ilişki oluşturmaktadır [28].

Hücre içi ve dışındaki durumları etkileyen koşullar (açlık, hipoksi ve stres), hücrede meydana gelen bir takım otofajik eylemleri uyarır. Otofaji ölüm yolunun aktivitesinde Tor proteini önemlidir. Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (Akt/PKB), mitojenik uyarılara yanıt vermesi nedeni ile hücre büyümesinin kontrolünde en etkili sinyal yolları arasındadır. Sınıf I PI3K, PI (3,4)P fosfat ve PI (3,4,5) P oluşumunu sağlamaktadır. Bu oluşum Akt/PKB yolağının aktivasyonuna sebep olmaktadır. Aktif durumdaki Akt, Tor'un aktive olmasını sağlayarak otofajiyi engellemektedir. Akt/PKB/mTOR yolağı; otofajinin düzenlenmesinde öneme sahip ve bu yolda önemli bir moleküler sensör olan Tor (memelilerde mTor), bir "GTP-bağlayıcı küçük protein" olan Rheb'in GTP bağlı şekli tarafından düzenlenmektedir. Tuberoz skleroz proteinleri Tsc1 ve Tsc2 (Tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/TSC2) Rheb tarafından GTP hidrolizini kolaylaştırır ve böylece Rheb'i inaktive etmektedir. Rheb; mTor aktivitesini olumlu, Tsc1/Tsc2 aktivitesini ise olumsuz yönde etkiler. Tor yolağının aktivasyonu hücre büyümesine ve hayatta kalmasına, baskılanması ise otofajiye yol açmaktadır [29].

Otofaji ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), kanserde iki ana süreçtir. Otofaji onkobaskılayıcı fonksiyon üzerinde çalışmakta ancak stresli durumların üstesinden gelmek için bir strateji olarak tümör hücrelerine de hizmet etmektedir. EMT, hücrelerin stresli çevresel ve içsel koşullardan kurtulması için yardımcı olan artan otofaji ile ilişkilidir. TGF β da dahil olmak üzere başlıca sinyal yolları, otofaji ve EMT'nin düzenlenmesinde rol almaktadır. Sitoskeleton ve mitokondri arasındaki karşılıklı etkileşim, kanserde otofaji ve EMT arasındaki etkileşimde fonksiyonel bir merkez olarak görev almaktadır [30].

2.6.1 Ölüm İle İlişkili Protein Kinaz (DAPK=Death associated protein kinase)

Ölümlle ilişkili protein kinaz (DAPK), kalmodulin ile düzenlenmiş ve sitoskeleton ile ilişkili serin/treonin kinazdır. Bazı kanıtlar DAPK'nın tümör baskılanmasında önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. Birincisi, DAPK'nın ifadesi çeşitli insan kanser hücre dizileri ve tümör dokularında sıklıkla kaybolması ve birkaç çeşit kanserin nüksetmesi ve/veya metastaz insidansı ile güçlü bir şekilde bağlantılı olmasıdır. İkincisi ise DAPK'nın antitümörijenik etkisi yani bir nedeni olarak DAPK ifadesinin Lewis akciğer karsinomunun farelerde metastazı baskılamakta rol oynadığı doğrudan gösterilmiştir. Üçüncü olarak DAPK'nın, bir p53 aracılı apoptotik yolağı aktive ederek c-myc ve E2F (transkripsiyon faktör 1) ile indüklenen onkojenik transformasyonunu baskılayabilmesidir.

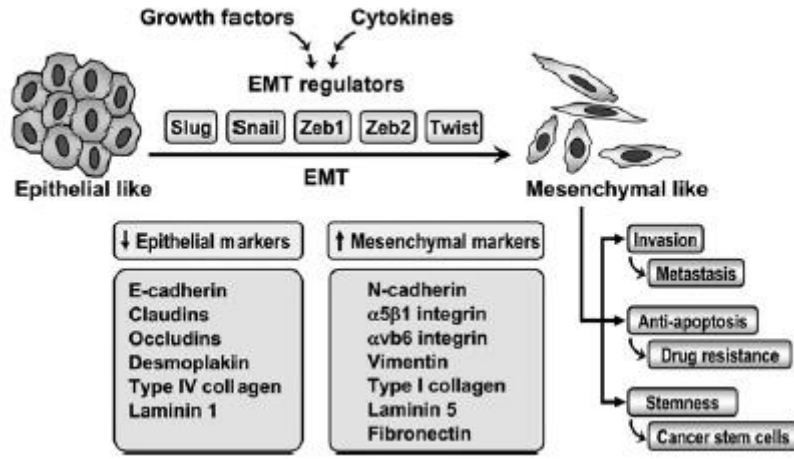
DAPK'nın tümör baskılayıcı fonksiyonu, apoptozu teşvik etme üzerindeki etkisine bağlanmıştır. DAPK iyi bilinen bir pro-apoptotik proteindir ve çok çeşitli apoptotik paradigmalara katılır. Son zamanlarda, DAPK'nın integrin $\beta 1$ 'in içten dışa inaktivasyonu ile apoptotik bir etki gösterdiği, böylece matriks sağkalım sinyalini baskıladığı ve p53'e bağlı bir apoptoz yolunu da aktive ettiği bulunmuştur. Buna göre, DAPK'nın pro-apoptotik aktivitesi büyük ölçüde fonksiyonel olarak p53 proteininin varlığına bağlıdır. Eksik hücre dizisi durumunda ise p53 geni hücre ölümünden kaçır ya da DAPK aşırı ekspresyonuna cevap olarak otofajik ölüme uğrar. Bununla birlikte, DAPK'nın tümörün bastırılmasında yaygın olarak yer alması ve çeşitli tümörlerde p53'ün sıklıkla kaybı veya mutasyonu göz önüne alındığında, DAPK'nın tümör ilerlemesini baskılamak için ikinci apoptosis ile ilgisiz bir mekanizmayı ortaya çıkardığı söylenmektedir. DAPK'nın integrin inaktivasyonu ve aktin hücre iskeletini yeniden düzenlemesi üzerindeki etkisi, DAPK'nın motilite düzenlemesine katılım olasılığını artırmaktadır [31].

2.7. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)

Metastaz sırasında, epitel kanser hücreleri temel zar engelinin bozulması sonucu ortamlarından serbest kalırlar. Bu süreç epitelyal mezenkimal geçişe (EMT) bağlıdır. EMT, polarize epitel hücrelerinin biyokimyasal değişikliklerden geçerek migrasyon kapasitesi, invazivlik ve apoptoz direnci gibi mezenkimal bir fenotip oluşturduğu biyolojik süreçtir.

EMT, gelişme sürecinde önemli bir süreçtir ve yetişkinlerde inflamasyon ve yüksek derecede karsinomlar da dahil olmak üzere doku onarımı ve patolojik süreçler sırasında da tetiklenir. EMT; E-kadherin, β -katenin ve γ -katenin de dahil olmak üzere çeşitli epitelyal

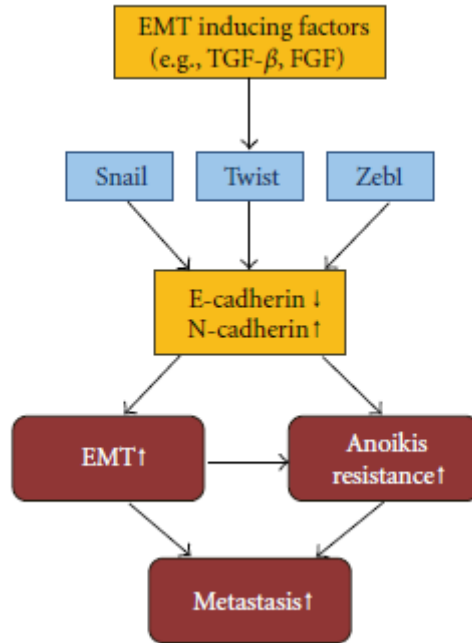
proteinlerin kaybı ile karakterizedir. Ayrıca, N-kadherin, vimentin, fibronektin ve düz kas aktin gibi mezenkimal proteinlerin artmış ifadesine de eşlik eder. Metastaz'daki E-kadherin kaybının önemi, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* modellerde gösterilmiştir ve E-kadherin kaybı EMT'nin en önemli özelliğidir. E-kadherin kaybı, E12/E47, Twist ve Zeb ve Snail protein ailelerinin üyeleri dahil olmak üzere E-kadherin'in transkripsiyonel baskılayıcılarının upregülasyonu yoluyla başarılabılır.



Şekil 2.7. EMT'ye genel bakış [39].

EMT'nin indükleyicisi olan transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), bu transkripsiyon faktörlerini upregüle eder, böylece EMT'yi ve metastazı teşvik eder. EMT, yalnızca epitel kaynaklı hücrelerin hareketli ve invaziv bir fenotip kazanması için önemli bir olay değildir aynı zamanda anoikis direnci için de önemli bir süreçtir [32]. Ayrıca, EMT'nin çeşitli kilit düzenleyicileri de nükleer faktör kB (NF-kB), Snail ve Twist gibi hayatta kalma sinyalleri de anoikis direncine katılır. Epitelyal hücrelerde bağlantıların ana bileşeni, transmembran glikoprotein E-kadherindir. Diğer hücrelerle homofilik etkileşimler aracılığıyla, E-kadherinler komşu hücrelerin aktin hücre iskeletini bağlayan bir köprü oluşturmaktadır. Bu, hücreler arasındaki yapışma noktalarının ve karakteristik epitelyum hücre kohezyonunun ve şeklinin düzenlenmesini sağlamaktadır. EMT'de erken bir durum olarak, E-kadherin'in aşağı regülasyonu ve N-kadherin (mezenkimal hücrelerin karakteristiği olan) ifadesinde eşzamanlı bir artıştan oluşan durum "kadherin değişimi" dir. N-kadherinler hücre adhezyon komplekslerini destabilize etme, hücreler arası kohezyonu bozma ve mezenkimal fenotipe yol açma eğilimindedir. Morfolojik değişimlere ek olarak, bu kadherin değişimi anoikise karşı dirençle de ilişkilidir; E-kadherin azalması, ECM'ye hücre yapışmasının kaybını takiben sağkalımını arttırmaktadır ve N-kadherin ekspresyonu, melanom hücrelerini anoikis'ten korumaktadır. EMT ve anoikise karşı direnç arasındaki ilişki, ortak düzenleyicilerin varlığına da yansımaktadır; bunlar, hem hücre hayatta kalma genlerinin artan ifadesini hem de EMT'nin altında yatan epitelyal ve mezenkimal

genlerin koordineli ifade dengesini modüle edebilmektedir [33]. EMT'yi destekleyen proteinler anoikis direnciyle bağlantılıdır. E-kadherin kaybı, anoikis direncine neden olur ve metastazı teşvik eder ve N-kadherin ekspresyonu da anoikis direncini indükler. Twist, E-kadherin kaynaklı anoikis direncinin kaybedilme aracısıdır [32]. Benzer şekilde, gelişimsel morfogenezde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan Twist-1'in, EMT düzenlenmesiyle meme kanseri metastazına karıştığı yakın zamanda gösterilmiştir. Dahası, Twist-1'in, çeşitli karsinomlar da dahil olmak üzere pek çok insan kanseri türünde bir onkojen gibi işlev gördüğü, aynı zamanda ileri derecede nöroblastomalar, melanomalar ve sarkomlar olduğu gösterilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen veriler, Twist-1'in hem embriyogenezis hem de tümör progresyonu sırasında apoptozun önemli bir negatif düzenleyicisi olduğunu göstermiştir. Bu nedenle Twist-1, hücre hayatta kalımı, farklılaşma ve metastaz arasındaki ilginç bir bağlantıyı temsil edebilir [34]. Memeli epitelinde E-kadherin ve p53'ün şartlı olarak devrilmesi, fare modelinde meme tümörünü başlatma, metastaz ve anoikis direnci tetiklemektedir. Dahası, E-kadherin kaybı Twist ekspresyonunu aktive eder ve EMT'nin devamlılığını sağlar. Nörotrofik tirozin kinaz reseptörü B (TrkB), TrkB kaynaklı EMT, anoikis direnci ve tümör büyümesi ile birlikte EMT'yi ve Twist'i indükler. Üstelik Snail, Twist tarafından indüklenir ve Snail'in susturulması EMT ve anoikis direncini bozmaktadır. Zeb1'in indüklenmesi, E-kadherin ekspresyonunu uyarır ve serbest koşullardaki hücre büyümesini engeller. Zeb1, TrkB'ye bağlı EMT, anoikis direnci ve metastaz için de gereklidir [32].

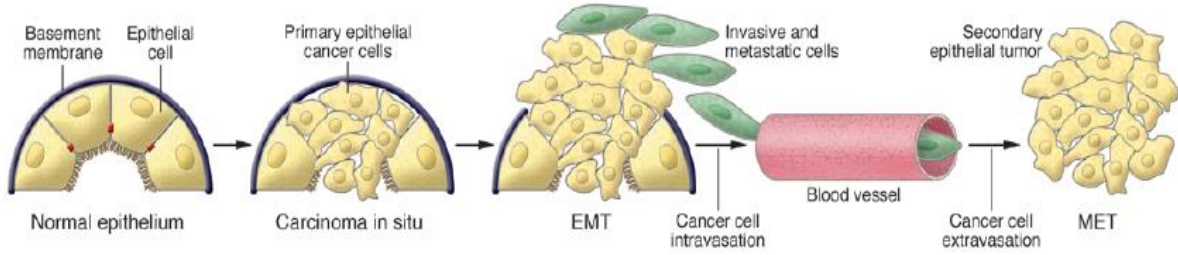


Şekil 2.8. EMT ve anoikis direncinin şematik gösterimi. TGF-β ve FGF; Snail, Twist ve Zeb1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Transkripsiyonel faktörler aktif E-kadherin (kodlanmış CDH1 geni) ifadesini bastırır ve N-kadherin ekspresyonunu (kadherin anahtarı) indükler. Kadherin anahtarı, tümör metastazı ile ilişkili olan EMT ve anoikis direncini uyarır [32].

Epitelyal-Mezenkimal geçiş (EMT), epitelyal hücrelerin polarize olması ve hücre-hücre birleşme noktasını kaybetmesi nedeniyle hücrenel bir işlemdir. Hücre şekli ve hücre iskeletinde değişiklikler meydana gelir ve fibroblast benzeri hücre morfolojisi, artmış hücre göçü ve yayılması gibi mezenşimal özellikleri kazanır [35]. Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), karsinom ve stromal hücrelerin etkileşimi ile düzenlenir ve mesane kanseri (UBC) ilerlemesi için çok önemlidir [36]. Metastaz, ekstrasellüler matriks (ECM), epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), tümör anjiyogenez ve programlanmış hücre ölümü de dahil olmak üzere çok sayıda faktör içeren kanser ilerlemesinin önemli bir özelliğidir [37]. Kanser hücreleri diğer organlara ulaşmak için hücrelerarası bağlantının kopması sonucu çözünürler ve epitel mezenkim geçişi (EMT)'nin bir parçası olarak daha hareketli mezenkimal bir fenotip özellik kazanırlar [38].

2.7.1. Epitelyal Mezenkimal Geçiş'in (EMT) Kanser ile İlişkisi

Tümör yayılımı karmaşık bir süreçtir. Kanser metastazının patogenezi, göç, istila, adhezyon, proliferasyon ve anjiyogenez gibi süreçleri içeren bir dizi bağlantılı, ardışık ve seçici adımlardan oluşur. Metastatik kaskadın en önemli adımı olan invazyon, tümör hücrelerinin çevre ile etkileşimini içeren bir dizi biyolojik aktivite içerir. Tümörler farklı özelliklere sahip heterojen bir neoplastik hücre kitlesidir. Kanser ilerlemesi sırasında, bazı tümör hücreleri mezenkimal belirteçlerin bir ifadesi ve epitelyal markerlerin kaybı olarak yeni karakterler edinir ve toplu olarak epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılan derin morfojenetik değişikliklere uğrarlar. EMT, embriyonik gelişim sırasında gastrulasyon gibi bir fenotipik dönüşüm olarak tarif edilebilir. Çünkü mezoderm, invazyon ve sinir sistemi gelişimi sırasında oluşur ve hücreler nöral çıkıntından göç eder. EMT, aynı zamanda yara iyileşmesinin yeniden epitelizasyonu ve organ fibrozu sürecinde doku fibroblastında da tarif edilmiştir. EMT sitoskeletonun yeniden düzenlenmesini ve hücre dışı matris ile etkileşimin değişmesini de içerir. EMT, tümörlerin metastaz ve invazyona doğru ilerlemesinde önemli bir adımdır. Dahası, bir EMT geçiren kanser hücreleri, apoptoza ve kemoterapötik ilaçlara karşı direncini artırır ve kök hücreler tarafından eksprese edilen özelliklerini ortaya çıkarır [39].



Şekil 2.9. EMT'nin kanser ilerlemesine katkısı. Normal epitelyumdan invaziv karsinoma ilerlemesi birkaç evreden geçer. İnvaziv karsinoma evresi, epitel hücrelerinin polaritelerini kaybetmesini ve bazal membrandan ayrılmasını içerir. Bazal zarın bileşimi, hücre-ECM etkileşimlerini ve sinyalizasyon ağlarını değiştirir. Bir sonraki adım ise EMT ve anjiyogenik bir adımdan oluşur ve tümör büyümesinin malign fazını kolaylaştırır [42].

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), pankreas kanseri de dahil olmak üzere çeşitli solid tümörlerde tümör ilerlemesi ve metastazında önemli bir rol oynadığı görülen gelişimsel bir süreçtir. EMT fenotipi, sıkı, yapışık ve boşluk bağlantılarının parçalanmasıyla hücre-hücre birleşme kaybı ve "epitelyal" morfolojiden hareketli, fibroblast benzeri bir morfolojiye fenotipik bir değişim ile karakterize edilir. EMT'nin ayırt edici özelliği, epitelyal homotipik adezyon molekülü E-kadherin kaybını ve vimentin, fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin kaybını ifade etmektedir. E-kadherin ekspresyonunun normal hücrelerde ve kanserlerde baskılanması, CDH1 (cadherin 1)'in mutasyon ve promoter metilasyonu veya Snail, Slug, Twist, Zeb-1 and Sip1 tarafından aracılık edilen doğrudan promoter baskısı dahil olmak üzere bir dizi genetik faktöre aracılık eder. E-kadherin promoterinin proksimal bölgesinde yer alan E-box elemanları ile etkileşime girer. Bir dizi klinik çalışma, E-kadherinin artan ekspresyonunun, çeşitli tümör tiplerinde geliştirilmiş sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir ve bu transkripsiyonel baskılayıcıların siRNA aracılığıyla susturulması, genotoksik strese hücrel duyarlılığı arttırabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Zeb-1'in susturulması yoluyla EMT'nin ters çevrilmesi, sadece tipik epitelyal marker genlerin ekspresyonunu değil aynı zamanda terapötik reaktiflere hücrel duyarlılığını da arttırmaktadır [40].

2.7.2. Epitelyal Mezenkimal Geçiş'in (EMT) Metastaz da Rolü

Embriyonik gelişim, büyüme ve farklılaşmayı içeren bir süreçtir. Bu sürecin önemli bir kısmı, hücrel farklılaşma ve doku oluşumunu içerir. Tüm ana yapılar oluşturulduğunda, büyüme gerçekleşir. Bölünen tek bir hücrenin süreci, özel hücrelere farklılaşan veya özdeş hücrelere ayrılan hücrelerin öncelikle epigenetik kontrollerine göre programlanır. Bir organizma içindeki EMT, normal hücrelerin popülasyonunu geliştirmede ve farklılaşma sürecini kontrol eden değişikliklerin düzenlenmesinde rol oynar. Bu düzenleme ile kanser hücrelerinde

benzer epigenetik modifikasyonlar meydana geldiğinde bu hücreler metastatik hale gelir. Bu kanser hücrelerinin metastaz yapabilmeleri için öncelikle, programlanmış hücre ölümü olan anoikis sürecini aşmaları gerekir. Bu süreç ise hücre membranında bulunan integrinlerin ECM'den ayrılması ile başlar. Normal koşullar altında, epitelyal hücre yüzeyi üzerindeki integrinler ECM ile temas ettiğinde, FAK fosforilasyon ile aktive edilir, bu da Akt'in aktivasyonu ile biten bir fosforilasyon kaskadını tetikler ve böylece hücre sağkalımını teşvik eder. Eğer integrinin ECM ile teması kesilirse, hücre sağkalım sinyalleri durur, bu durumu ise Bad gibi pro-apoptotik proteinler engeller ve hücre ölümünü başlatabilir. Kanser hücreleri anoikisin önüne çoğu zaman EMT ile geçebilir. Örneğin, E-kadherin ekspresyonunun azalması veya N-kadherin ekspresyonunun artması, anoikis direnci ve artan invazivlik ile ilişkilidir. Başarılı metastaz için bir başka önemli önkoşul mezenkimal-epitelyal geçiştir (MET). EMT uygulanan ve vücudun diğer bölgelerine yayılan kanser hücrelerinin, diğer dokulara invaze olması ve o dokuda anlamlı tümör bölgeleri oluşmasını sağlayan bir mekanizmaya sahip olması gerekir. Bunu yapmak için, önce dokuyu çevreleyen hücrelere bağlanıp epitel özelliklerini tekrar kazanmaları gerekir. Örneğin, uyarılmış pluripotent kök hücrelerde (iPSC'ler) bu olay gözlemlenir. Son yapılan çalışmalar, MET'i indükleyen faktörlerin ekspresyonunun artması ve iPSC'lerin üretilmesinin yanında EMT araçlarını da baskıladığını göstermektedir. Diğer dokularda metastatik ve başarılı implantasyon arasındaki bu ilişki metastazın ileri düzeyde organize olmuş ve geliştirilmiş EMT/MET hipotezini desteklemektedir [41].

Görünen bir farklı durum ise EMT'den türeyip göç eden kanser hücrelerinin tipik olarak histopatolojik düzeyde diğer dokularda ortaya çıkan primer tümöre benzeyen ikincil koloniler kurdukları gözlenir. Buna bağlı olarak, metastaz yapan karsinom hücrelerine verilen mezenkimal fenotipleri artık sergilemezler. Bu davranış kanser hücrelerini metastaz yapan ikincil tümör oluşumu sırasında bir MET yoluyla mezenşimal fenotip kazanılmasının ancak metastatik yayılımın kolaylaştırıcısı olarak bilinen EMT ile sağlandığının mümkün olduğu fikrini ortaya koymaktadır. Metastaz yapan kanser hücrelerinin MET'e dönüşüm eğilimi, diğer organların kanserli dokusu içine geçip ekstrasvazyondan sonra karşılaştıkları lokal mikroçevrede -büyük olasılıkla birincil tümörde yaşadıkları heterotipik sinyallerin yokluğunun EMT'nin indüklenmesinden kaynaklı bir yerde- olduğu düşünülmektedir. Bu değerlendirmeler, EMT'nin indüksiyonunun, karsinomların metastatik bir aşamaya ilerlemesi için merkezi olarak önemli bir mekanizma olabileceğini ve bununla beraber kolonizasyon işlemi sırasında MET'i ima ettiğini göstermektedir. Ancak, bu olayın birçok adımı hala deneysel olarak doğrulanmaya ihtiyaç duymaktadır [42].

2.7.3. ZEB Ailesi

İlk olarak 1990'ların başında tanımlanan ZEB-1 proteini, embriyogenez ve hücre farklılaşması sırasında önemli düzenleyici faktörler de dahil olmak üzere birkaç düzine hedef genlerin düzenleyici bölgeleri olarak rapor edilmiştir. ZEB ailesinde (ZEB1 ve ZEB2, farklı isimler altında tanımlanmış olmasına rağmen), Snail1 (Snail), Snail2 (Slug) Twist1, Twist2 ve E12/E47 bulunmaktadır. ZEB proteinlerinin yakın zamanda moleküler onkoloji alanında özel bir yer kazanma sebebi; kemoterapi ilaçlarına, tümörün invaziv olmasına ve metastaza karşı direnç göstermeleridir. ZEB proteinleri, DNA'ya bağlanmalarına aracılık eden bağımsız bölgelerle (transkripsiyon faktörleri ve bir dizi kofaktör-aktivatör veya represör transkripsiyon aktivitesi olan proteinler) oldukça modülerdir fakat kendi başlarına bir DNA bağlanma alanından yoksundurlar [43].

Zeb ailesi (Zeb1 ve Zeb2), omurgalı embriyonun normal gelişimi sırasında nöral krest hücrelerinin ve türev yapıların oluşumunda önemli bir rol oynayan bir çinko parmak/homedomain transkripsiyon faktörleri grubudur. Her iki Zeb ailesi üyeleri, geniş ölçüde ayrılmış çinko parmak kümeleri (ZFC) içerir. Proteinin N-terminali (Nt-ZFC) ve C-terminali (Ct-ZFC) uçlarına doğru yer alır ve hedef gen promotörlerinde yer alan CACCT (G) E-box benzeri DNA dizileri ile etkileşime girer. Zeb proteinleri, E-kadherini inhibe ederek EMT'yi indükler ve birçok diğer mezankimal markerları, vimentini, fibronektini, N-kadherini ve MMP'leri aşırı aktive ederek hücre göçünü, invazyonu ve uzak organlara metastazını kolaylaştırır. Zeb proteinlerinin ekspresyonu, hipoksi koşullarda büyüme ve steroid hormonları, hipoksi-indüklenbilir faktör-1 alfa (HIF-1 α), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve reseptörleri gibi çeşitli sinyal molekülleri ile düzenlenir ve Ras-ERK2-Fra1, NF- κ B ve Janus kinaz (JAK)/STAT3 ve TGF β /Smad, Wnt ve Notch dahil sinyal yolları üzerinden aktive edilir. Zeb proteinlerinin yüksek ekspresyonu, yumurtalık, meme, endometriyum, akciğer, prostat, kolon, safra kesesi, pankreatik ve mesane kanseri de dahil olmak üzere primer insan karsinomları üzerinde artan agresif ve yüksek metastatik kapasiteden sorumludur [44].

2.8. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda sürekli olarak gerçekleşen hücre bölünmesi ancak hücre ölümleri ile dengelenir. Bir organizmadaki hücrenin işlevi bittikten sonra o hücreye artık ihtiyaç duyulmuyorsa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu süreç Yunan dilinde yaprak dökümü anlamına gelir ve bu durum apoptoz (programlanmış hücre

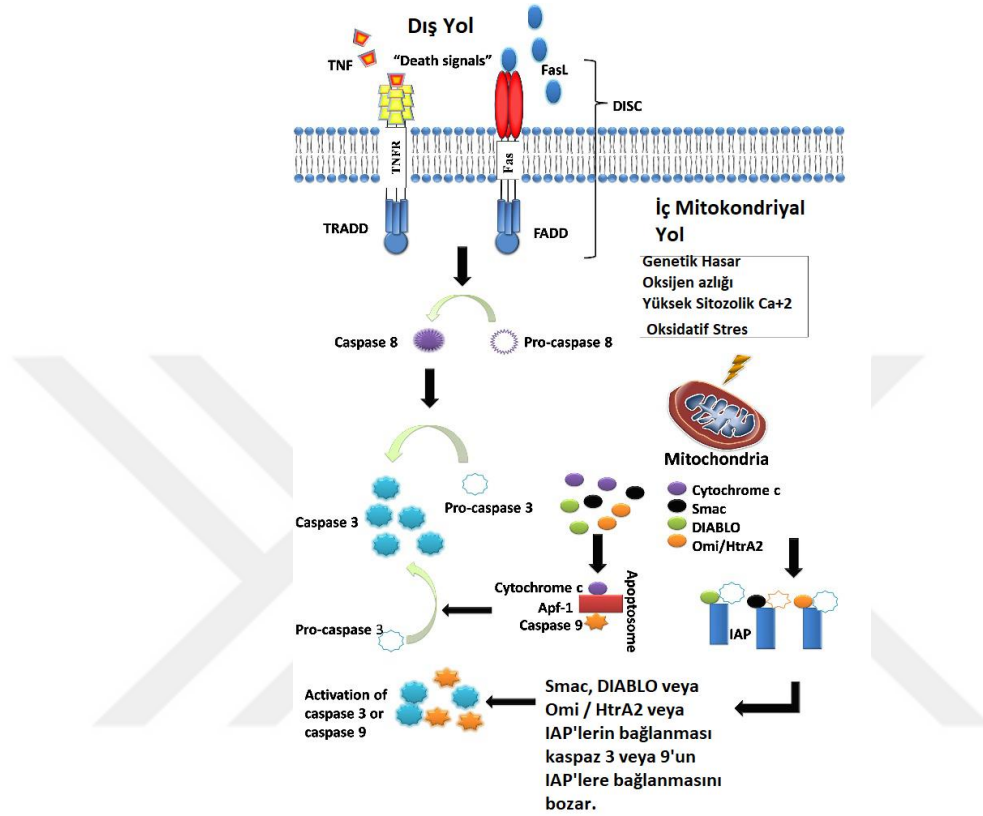
ölümü) olarak adlandırılır. Hücre içinden ve dışından apoptoz için gerekli olan sinyaller alındıktan sonra hücrede birçok değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanase olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır [45].

Apoptoz, Kerr ve arkadaşları tarafından 1970'lerde adlandırılmıştır. Biyolojik araştırmalarda incelenen apoptoz, önemli bir yere sahip olup bu süreçte belirleyici rol oynamaktadır. Apoptoz sürecinin önemi, fizyolojik ve patolojik olaylar ile yakından ilişkili olduğu için derinlemesine araştırılan bir konu olmuştur. Kaspazlar, hem başlatıcı hem de uygulayıcı oldukları için apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alırlar. Kaspazların aktive edilebildiği üç yol vardır. Yaygın olarak tarif edilen iki başlangıç yolu, apoptozun içsel (veya mitokondriyal) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yollarıdır [46].

Dışsal yol, pro-apoptotik bir molekül veya bu reseptöre özgü ligandlar tarafından aktive edilen hücre yüzeyinde pro-apoptotik reseptörler ile başlar. Bu hücre DR'leri, en yoğun olarak incelenen elemanlar olarak Fas reseptörü ve TNFR1 ile tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine aittir. Fas, aktif B hücreleri ve T hücreleri dahil çeşitli hücre tipleri üzerinde bulunur. Pro-apoptotik reseptörleri aktive eden ligandlar, Fas ligandını (FasL) ve TNF-alfa'yı içerir. FasL, aktive edilmiş T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler dahil çeşitli hücre tipleri tarafından ifade edilir. TNF-alfa, baskın olarak aktive edilmiş monosit/makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilir. DR'nin hücre içi kısmı ölüm alanı (DD) olarak bilinir. Üç ya da daha fazla DR-ligand kompleksleri birleştiğinde, DD'leri yakın hale getirir ve bir adaptör protein için bir bağlanma bölgesi oluşur. Adaptör proteini, bu reseptöre özgüdür (örn. Fas ilişkili DD [FADD] veya TNF reseptörü ile ilişkili DD [TRADD]). Bu ligand-reseptör-adaptör proteini kompleksi, başlatıcı kaspazlar -8 ve -10'un aktif olmasına yol açan, hücre ölümünü indükleyen sinyalleşme kompleksi (DISC) olarak adlandırılır. Bu kaspazlar aktif kaspaz enzim moleküllerini sitozole salmaktadırlar. Burada, efektör kaspazlar -3, -6 ve -7'yi aktive ederler [47].

İçsel yol, adından da anlaşılacağı gibi hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, sitosolik Ca^{+2} ve şiddetli oksidatif stresin yüksek konsantrasyonları gibi iç uyaranlar, içsel mitokondriyal yolun başlatılmasının bazı tetikleyicileridir. Uyaranlara bakılmaksızın, bu yol artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının sonucudur. Bu yol, foliküler non-Hodgkin lenfomada t(14-18) translokasyonunun kromozomal kırılma noktasında orijinal olarak gözlenen *BCL2* geninden sonra adlandırılan Bcl-2 ailesine ait bir protein grubu tarafından düzenlenir. Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu vardır, yani pro-apoptotik proteinler (örn. Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) ve anti-apoptotik proteinler (örn. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1). Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin

mitokondriyal salınımını bloke ederek apoptosisi düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu tür salınımı teşvik ederek etki ederler. Sitokrom c'nin sitoplazmik salımı, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz-9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumuyla kaspaz-3'ü aktive eder [46]. Bu olay, hücrenin ölümüyle sonlanan durumu ortaya koyar.



Şekil 2.10. Apoptozun içsel ve dışsal yolu [46].

Programlanmış hücre ölümü, içeriden veya dışarıdan gelen farklı pro-apoptotik uyarımları aldıktan sonra aktif sistein proteazlar ve kaspaz ailesi tarafından koordine edilir. Sonlandırıcı olan kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) hücrenin gerçek yıkımı için sorumlu olduğu düşünülen etkiye sahip olma eğilimindedir. Özellikle, kaspaz-6 ve -7 sonlandırıcı olarak kabul edilir. Kaspaz-3'ün DNA bozulması, nükleer yoğunlaşma, plazma zar bozulması ve proteoliz gibi hücre içi olaylar için önemli olduğu bilinmektedir [48].

İçsel endoplazmik retikulum (ER) yolu üçüncü bir yoldur ve daha az bilinir. Kaspaz 12'ye bağımlı ve mitokondriden bağımsız olduğuna inanılmaktadır. ER, hipoksi, serbest radikaller veya glukoz açlığı gibi hücre içi stresler tarafından zarar gördüğünde, proteinlerin açılımı ve hücre içinde protein sentezinin azalması ve prokaspaz-12'den ayrılan TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) olarak bilinen bir adaptör proteininin aktivasyonu ile sonuçlanır [46].

Bu bilgiler ışığında, Danusertib'in aşırı metastatik tümör (CFPAC-1) ve primer tümör (MIA PaCa-2) hücrelerinde belirgin olan EMT ve Otofajik etkileri bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında pankreas kanseri hücre hatları olan CFPAC-1 (Zeb1⁺) ve MIA PaCa-2 (Zeb1⁻) kullanılarak migrasyon, apoptoz, otofaji ve EMT üzerindeki etkileri ilk kez araştırılmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

Bu tez çalışması Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM)'ndeki MERKÖK laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Hücre Kültürü ve Deneylerde Kullanılan Materyaller

CFPAC-1 duktal pankreatik adenokarsinoma hücreleri Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan, MIA PaCa-2 insan pankreatik karsinoma hücreleri Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan sağlanmıştır. Hücrelerin inkübasyonu ve diğer deney aşamalarında kullanılan materyaller aşağıda tablolar halinde verilmiştir.

Tablo 3.1. Hücrelerin inkübasyonunda kullanılan materyaller.

Materyal	Kimyasallar
Falcon Tüp 15 ml, 50 ml, LP Italiana, Italy.	Horse Serum, Biowest, USA.
Pipet ucu 10 µl, 200 µl, 1000 µl, Isolab, Türkiye.	Ethanol % 99,8'lik Absolute, Sigma Aldrich, USA.
Pastör pipeti 3 ml, Isolab, Türkiye.	Fetal Bovine Serum, Biowest, USA.
Serolojik pipet 5 ml, 10 ml, Isolab, Türkiye.	Trypsin-Edta Solution, Sigma Aldrich, USA.
Milipore 0,22 µm, 0,45 µm, Millex-GP, Sigma Aldrich, USA.	DPBS, non CaCl ₂ , MgCl ₂ , Sigma Aldrich, USA.
6 Well plate, Corning, Sigma, Aldrich, USA.	IMDM Medium, Biowest, USA.
Flask T-25, T-75, Isolab, Türkiye.	Penicillin-Streptomycin, Sigma Aldrich, USA.

Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan cihaz, materyal ve kimyasallar.

Cihazlar	Materyal ve Kimyasallar
Esco Cell Culture İnkübatör (CCL-170b-8), Esco, Singapore.	DAPI-A, 1mg/ml BD, USA
ViiA 7 Reel Time PCR cihazı	Danusertib (PHA-739358) 10mg., Mybiosource
BD FACSAria III Cell Sorter, BD Biosciences, USA.	xCELLigence CIM-Plate 16, Aceabio, USA.
Cedex XS Analyzer, Roche, Germany.	Cedex Smart Slides, Roche, Germany.
NanoQ Micro-Volume Spectrometer, Core Life Sciences, USA.	BD FacsClean, , BD Biosciences, USA.
Techne TC-512 Thermal Cycler, Bibby Scientific, UK.	BD Facs Flow Sheat Fluid, BD Biosciences, USA.
xCELLigence DP RTCA, Aceabio, USA.	xCELLigence E-Plate 16, Aceabio, USA.

Tablo 3.3. Deneylerde kullanılan deney kitleri

Deney Kitleri
Gotaq PCR Master Mix, Promega, USA.
Kaspaz -3,-6,-7,-8,-9, VEGF, Zeb-1, Slug, Snail, ACTB Gen Primerleri.
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Germany.
High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Germany.
DNA Quality Control Particles, BD Biosciences, USA.

Tablo 3.4. Casp -3, -6, -7, -8, -9, ACTB, VEGF, Zeb-1, Slug ve Snail primer gen dizileri.

Casp3 Forward	5' TCA TCA CCT GTT CAG ATC CAG AG 3'	(23mer)
Casp3 Reverse	5' TCA GCC CTC CAT GTT GTG AA 3'	(20 mer)
Casp6 Forward	5' ATC AGC AGG TAC GCT TTC CAA 3'	(21 mer)
Casp6 Reverse	5' GTA ATT GGA CAG GCC GTT TTT GA 3'	(23 mer)
Casp7 Forward	5' ACA GCT GGA GAG GTG TTT GAT 3'	(21 mer)
Casp7 Reverse	5' TGG CTC TGA CCT TTC ATT GCT 3'	(21 mer)
Casp8 Forward	5' GAA ATA GAA CTA CAA GCG GAT GGT T 3'	(25 mer)
Casp8 Reverse	5' GGA AAA TGA GGG AAG GAC ACA AA 3'	(23 mer)
Casp9 Forward	5' CTT TGC TGC TTG CCT GTT AGT T 3'	(22 mer)
Casp9 Reverse	5' ATC CTG CCT TTC TTT CCA AAC AG 3'	(23 mer)
ACTB Forward	5' GAG GTG ATA GCA TTG CTT TCG 3'	(21 mer)
ACTB Reverse	5' CAA GTC AGT GTA CAG GTA AGC 3'	(21 mer)
VEGF Forward	5' CTA CCT CCA CCA TGC CAA GT 3'	(20 mer)
VEGF Reverse	5' GCA GTA GCT GCG CTG ATA GA 3'	(20 mer)
Zeb-1 Forward	5' CAA GAA ACA ATC AAT GCT TCA CC 3'	(23 mer) [49]
Zeb-1 Reverse	5' GGT TGT TCC ATC TTG ATC AAC CA 3'	(23 mer) [49]
Slug Forward	5' GGC TTG GCT GCA CTG TCT GAC TT 3'	(23 mer) [49]
Slug Reverse	5' TTC ATT TCC ACC CTG GCA CCT AC 3'	(23 mer) [49]
Snail Forward	5' CCA GCT CTC TGA GGC CAA GGA TC 3'	(23 mer) [49]
Snail Reverse	5' TGG CTT CGG ATG TGC ATC TTG AG 3'	(23 mer) [49]

3.2. Yöntemler

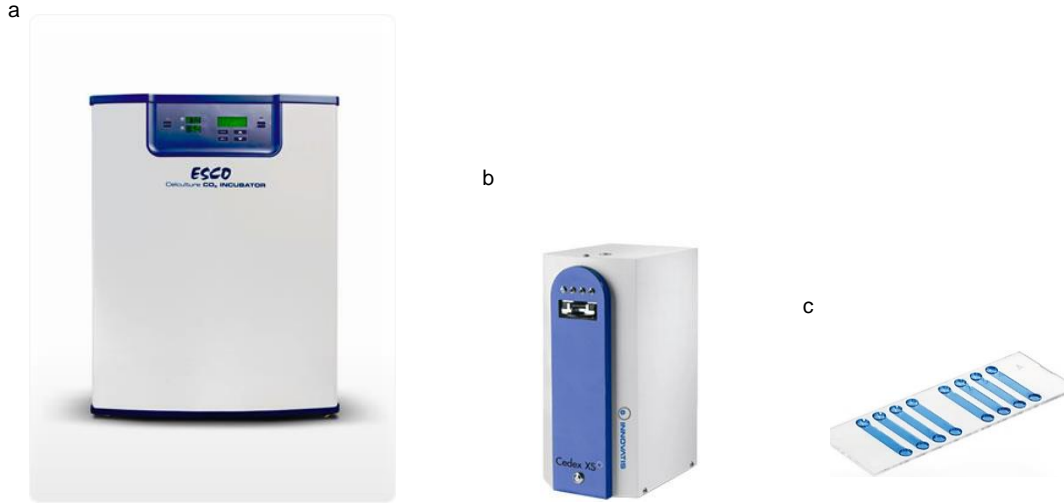
3.2.1. CFPAC-1 Pankreas Karsinoma Hücrelerinin İnkübasyonu

CFPAC-1 flask kabına yapışan pankreas karsinoma hücreleri, %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 (100 unit/ml) penicilin + (100 µg/ml) streptomisin, %1 amphoteresin içeren IMDM besiyeri içinde kültürü yapılmıştır. Hücre kültüründe T25 ve T75 boyutunda flasklar kullanılmıştır. Hücreler optimum koşulları olan 37°C, %95 nem ve %5 CO₂'li ortam şartlarında inkübatörde çoğaltılmıştır. Kültür kabına yapışan hücreler kültür kabında konfluens olduktan sonra Tripsin ile hücreler kaldırılmıştır. 1M DPBS ile yıkanıp santrifüj edildikten sonra hücreler 1ml besiyeri ile resüspanse edilmiştir. Tripin Blue ile 1:1 oranında 20µl alınmış ve Smart Slides'a alınarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. MIA Paca-2 İnsan Pankreatik Karsinoma Hücrelerinin İnkübasyonu

MIA Paca-2 flask kabına yapışan pankreas karsinoma hücreleri, %10 FBS, %2,5 Horse Serum, %1 L-glutamin, %1 (100 unit/ml) penicilin + (100 µg/ml) streptomisin, %1 amphoteresin içeren DMEM besiyeri içinde kültürü yapılmıştır. Hücre kültüründe T25 ve T75 boyutunda flasklar kullanılmıştır. Hücreler optimum koşulları olan 37°C, %95 nem ve %5 CO₂'li ortam şartlarında inkübatörde çoğaltılmıştır. Kültür kabına yapışan hücreler kültür kabında konfluens olduktan sonra Tripsin ile hücreler kaldırılmıştır. 1M DPBS ile yıkanıp santrifüj edildikten sonra hücreler 1ml besiyeri ile resüspanse edilmiştir. Tripin Blue ile 1:1 oranında 20µl alınmış ve Smart Slides'a alınarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

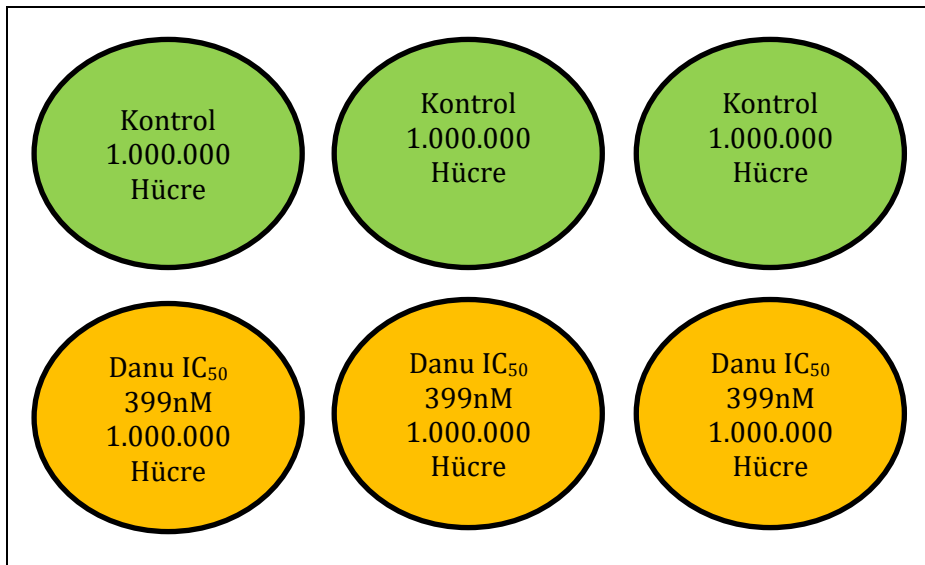
Yara açma (wound healing) ve xCELLigence CIM-Plate 16 migrasyon analizinde kullanılan hücre sayısı CFPAC-1 için (20.000 hücre) Çelik H. (2015) yüksek lisans tezi [19], MIA PaCa-2 için (5.000 hücre) Kırbıyık İ.A. yüksek lisans tezi çalışmalarında yaptıkları sitotoksosite deneyinde, IC₅₀ belirlemesi için kullandıkları hücre sayıları baz alınmıştır. İlaç dozajları ise Kırbıyık İ.A. yüksek lisans tezi çalışmasında yaptığı sitotoksosite deneyinde CFPAC-1 hücreleri için 399 nM, MIA PaCa-2 hücreleri için 318 nM bulduğu IC₅₀'ler kullanılmıştır [4].



Şekil 3.1. (a) Hücre Kültürü CO₂ inkübatörü, (b) Hücre ölçüm cihazı (c) Cedex Smart Slide.

3.2.3. CFPAC-1 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi

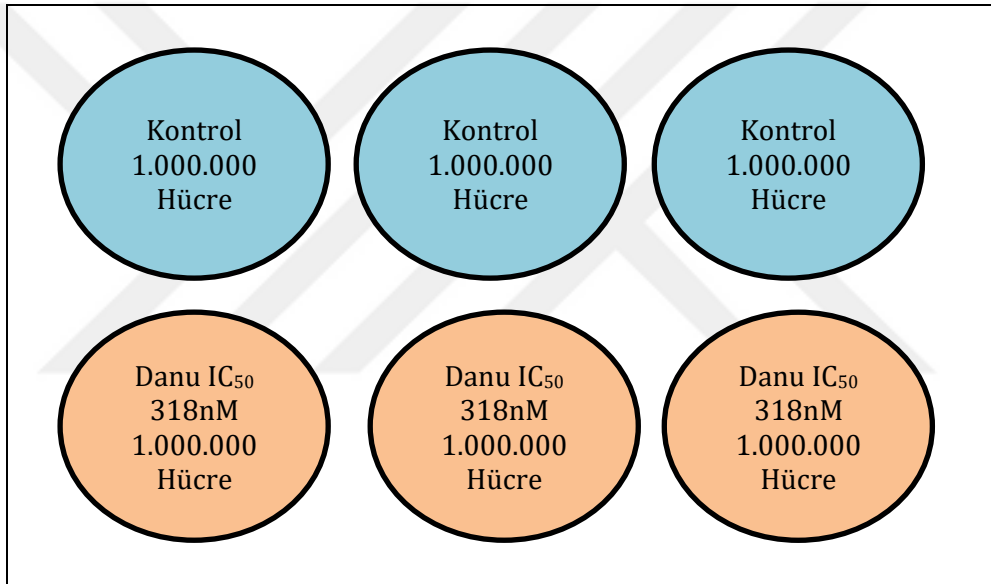
Yara açma deneyi için CFPAC-1 hücreleri 6 well içerisinde (her kuyucukta 1×10^6 hücre) 2 grup 3 tekrarlı şekilde ekilmiştir. Yirmidört saat veya daha fazla beklenmiş ve tabana yapışmış hücrelerin yaklaşık olarak konfluens olduğu görülmüştür. Ardından 24 saat FBS içermeyen medium ile inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri alınmış, düz bir çizgi halinde 10 μ l pipet ucuyla birbirine paralel yaralar açılmıştır. DPBS ile 3 kez yıkayıp kalkan hücreler ortamdan alındıktan sonra %1 FBS'li medium ve gruplara göre ilaç dozajları eklenmiştir. İlaç dozları uygulanan hücrelerin belirli zaman aralıklarında (0, 18, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde) fotoğrafları çekilmiş, yara kapanması olarak gruplar kontrol ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır [50].



Şekil 3.2. CFPAC-1 Yara açma deneyi için deney dizaynı.

3.2.4. MIA PaCa-2 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi

Yara açma deneyi için MIA PaCa-2 hücreleri 6 well içerisinde (her kuyucukta 1×10^6 hücre) 2 grup 3 tekrarlı şekilde ekilmiştir. Yirmidört saat veya daha fazla beklenmiş ve tabana yapışmış hücrelerin yaklaşık olarak konfluens olduğu görülmüştür. Ardından 24 saat HS içermeyen medium ile inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki medium alınmış, düz bir çizgi halinde 10µl pipet ucuyla birbirine paralel yaralar açılmıştır. DPBS ile 3 kez yıkayıp kalan hücreler ortamdaki alandıktan sonra %1 HS'li medium ve gruplara göre ilaç dozajları eklenmiştir. İlaç dozları uygulanan hücrelerin belirli zaman aralıklarında (0, 18, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde) fotoğrafları çekilmiş, yara kapanması olarak gruplar kontrol ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır [50].



Şekil 3.3. MIA PaCa-2 Yara açma deneyi için deney dizaynı.

3.2.5. xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi

Tüm zaman aralıkların da 0-99 saate kadar ilaçtan elde edilerek belirlenmiş olan IC₅₀ dozajı ile xCELLigence cihazında CIM-Plate 16 uygulamasıyla migrasyon deneyi yapılmıştır. CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücreleri bir gece önceden serum free mediuma alınmıştır. CIM-Plate 16'nın alt kabına 160µl %20 serumlu medium (CFPAC-1 için IMDM, MIA PaCa-2 için DMEM) konulmuştur. Üst parça alt parçaya, mavi noktalar üst üste gelecek şekilde oturtulmuştur. Üst parçada her well içine 90µl Serum free medium konulmuş ve 37°C de 60 dk. bekletilmiştir. Bir saat sonra ilk step (1dk, 1. sweep) okutulmuştur. Bir saatlik bekleme süresinde hücreler DPBS ile yıkamıştır. Tripsinize edilerek hücreler kaldırılmış, serum free medium eklenip 300xG de 5 dak. santrifüj edilerek hücreler elde edilmiştir. Daha sonra hücreler serum free medium ile

seyreltilmiş ve CFPAC-1 için 20.000 hücre, MIA Paca-2 için ise 5.000 hücre 110 μ l (100 μ l +10 μ l ilaç) olacak şekilde CIM-Plate 16'nın üst kısmına eklenmiştir. CIM-Plate 16, 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiş ve hücrelerin tabana inmesi gözlenmiştir. Daha sonra CIM-Plate 16 cihaza yerleştirilmiş ve 15dk'lık döngülerle 99 saate kadar kayıt alınmıştır. Uygulanan ilaç dozajları Tablo 3.4.'deki gibidir.



Şekil 3.4. xCELLigence sisteminde kullanılan CIM-Plate 16 üç kısımdan oluşur. En altta bulunan alt tabla, ortada hücrelerin konulduğu plak ve üst kapaktan meydana gelir.



Şekil 3.5. xCELLigence RTCA sistemi.

Tablo 3.5. xCELLigence CIM-Plate 16 uygulaması ilaç dozajları ve kuyucuk planı.

	1	2	
A	Kontrol CFPAC-1	Kontrol CFPAC-1	
B	CFPAC-1 IC ₅₀ 399nM	CFPAC-1 IC ₅₀ 399nM	Kontrol: 20.000 Hücre + %20 FBS'li Medium
C	CFPAC-1 IC ₅₀ 399nM	MIA Paca-2 IC ₅₀ 318nM	20.000 Hücre + Danu 399nM + %20 FBS'li Medium
D	MIA Paca-2 IC ₅₀ 318nM	MIA Paca-2 IC ₅₀ 318nM	5.000 Hücre + Danu 318nM + %20 HS'lu Medium
E	Kontrol MIA Paca-2	Kontrol MIA Paca-2	Kontrol: 5.000 Hücre + %20 HS'lu Medium
F	%0 Horse Serum	%0 Horse Serum	Hücre + %0 HS'lu Medium
G	Boş	Boş	
H	Boş	Boş	

3.2.6. Akım Sitometri de DAPI-A ile Otofaji Ölçülmesi

CFPAC-1 ve MIA Paca-2 hücreleri tablo 3.5.'de olduğu gibi 6 well plate'e 24 ve 48 saatlik gruplara ayırarak ekimleri yapılmıştır. İlaç dozajları 24 saatin sonunda eklenmiş ve %5 CO₂, %95 nem ve 37°C sıcaklıkta 24-48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu hücreler tripsinize edilmiş ve Cedex XS cihazında sayım yapılmıştır ve 1.000.000 hücre/mL olacak şekilde seyreltilip (100.000 hücre + 5µl DAPI) DAPI-A (dalga boyu 405nm) boyama prosedürü uygulanmıştır.

Bu boyama prosedürüne göre, tek hücre süspansiyonu elde edilmiştir. 1xDPBS (500µl) içerisinde 5µl DAPI-A ile hücreler tekrar süspansiyon edilmiştir. Gruplar oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Analizden önce yıkama yapılmamıştır. Akım sitometri de ölçüm yapılmıştır. Danusertib'in otofajik hücre ölümü üzerine etkisine bakılmıştır.

Tablo 3.6. Akım sitometri için yapılan deney dizaynı. Gruplar; A) CFPAC-1: 24.saat kontrol ve ilaç grubu, B) CFPAC-1: 48.saat kontrol ve ilaç grubu, C) MIA Paca-2: 24.saat kontrol ve ilaç grubu, D) MIA Paca-2: 48.saat kontrol ve ilaç grubu.

A)

24.saat Kontrol	1.000.000 hücre CFPAC-1	1.000.000 hücre CFPAC-1	1.000.000 hücre CFPAC-1
24.saat Danusertib	1.000.000 hücre CFPAC-1 399nM	1.000.000 hücre CFPAC-1 399nM	1.000.000 hücre CFPAC-1 399nM

B)

48.saat Kontrol	1.000.000 hücre CFPAC-1	1.000.000 hücre CFPAC-1	1.000.000 hücre CFPAC-1
48.saat Danusertib	1.000.000 hücre CFPAC-1 399nM	1.000.000 hücre CFPAC-1 399nM	1.000.000 hücre CFPAC-1 399nM

C)

24.saat Kontrol	1.000.000 hücre MIA Paca-2	1.000.000 hücre MIA Paca-2	1.000.000 hücre MIA Paca-2
24.saat Danusertib	1.000.000 hücre MIA Paca-2 318nM	1.000.000 hücre MIA Paca-2 318nM	1.000.000 hücre MIA Paca-2 318nM

D)

48.saat Kontrol	1.000.000 hücre MIA Paca-2	1.000.000 hücre MIA Paca-2	1.000.000 hücre MIA Paca-2
48.saat Danusertib	1.000.000 hücre MIA Paca-2 318nM	1.000.000 hücre MIA Paca-2 318nM	1.000.000 hücre MIA Paca-2 318nM

3.2.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qRT-PCR tekniği ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

CFPAC-1 ve MIA Paca-2 hücreleri tablo 3.5.'deki gibi 8 grup oluşturulmuş ve ml'de 500.000 hücre 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. DNase incubation buffer ve DNase solüsyonu ile 15 dk. inkübe edilmiştir. Sırasıyla Wash buffer I ve II ile hücreler yıkandıktan sonra son olarak Elution buffer ile RNA çözdürülmüş ve elde edilen RNA'ların NanoQ cihazında miktarları ölçülmüştür. Saflaştırılan total-RNA'lar -80°C'de muhafaza altına alınmıştır. Daha sonra cDNA sentez çalışmalarına başlanılmış ve total-RNA'lardan 1µg alınarak, Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti ile prosedüre uygun olarak termal cyclus da tek döngüde gerçekleştirilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen cDNA lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Üretilen cDNA'lar Sybergreen Gotaq master mix kitine uygun olarak oluşturulan gruplar halinde real time PCR cihazına yüklenmiş ve kaspaz -3, -6, -7, -8, -9 ve VEGF, Zeb-1, Slug, Snail 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 ile (melting curve) kıyaslanarak ölçülmüştür.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

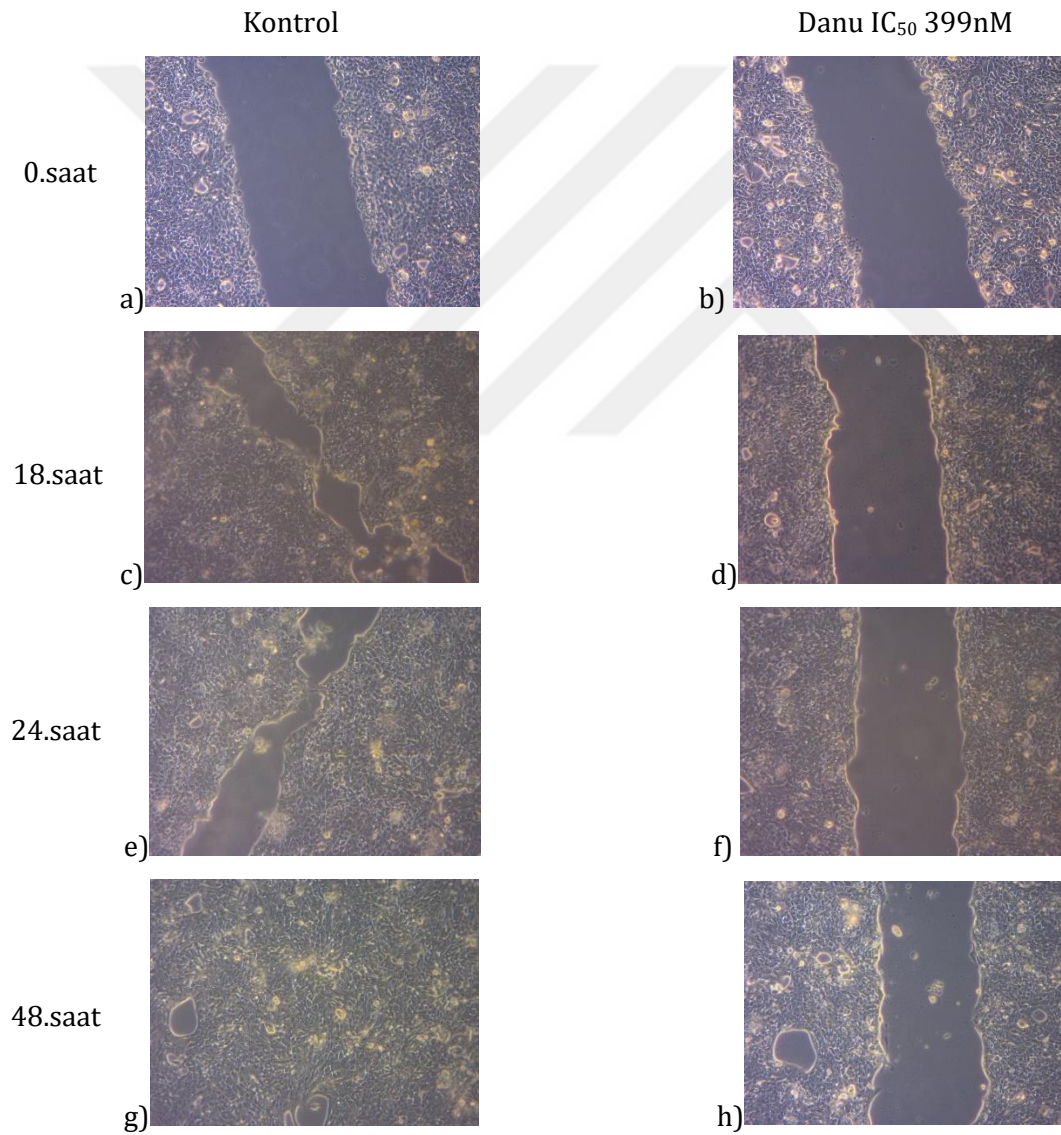
Bu çalışmadaki migrasyon, xCELLigence sistemindeki RTCA yazılımı ile cell index analiz programında istatistiksel olarak belirtilmiştir. Akım sitometri cihazında DAPI-A ile histogram analizi yapılmıştır. Otofaji yolağındaki DAPk düzenleyicilerinden kaspaz -3, -6, -7, apoptoz ile ilişkili kaspaz -8, -9 ve metastaz ile ilişkili olan VEGF, Zeb-1, Slug, Snail gen ifade düzeyleri anlatımları Pffafle metoduna göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne uygun olarak hesaplanmıştır.

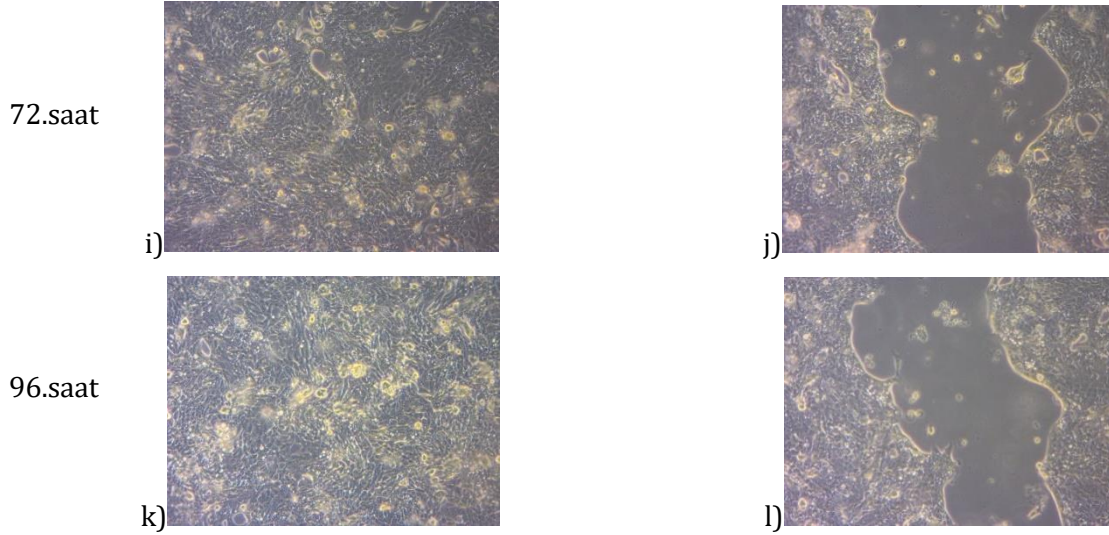
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yara Açma (Wound healing) Migrasyon Analizi

4.1.1. CFPAC-1 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi

Yara açma deneyinde 3.2.3.'deki deney prosedürü uygulanmıştır. İlaç dozları uygulanan hücrelerin belirli zaman aralıkların da (0, 18, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde) fotoğrafları çekilmiş, yara kapanması olarak gruplar kontrol ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Uygulanan ilaç dozajları Şekil 3.2.'de verilmiştir.



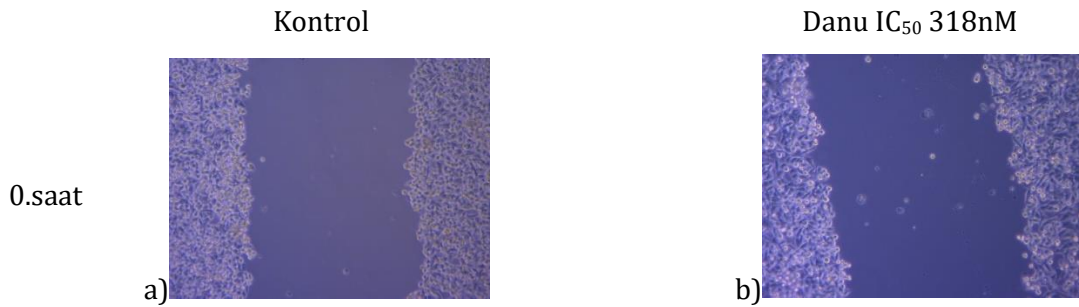


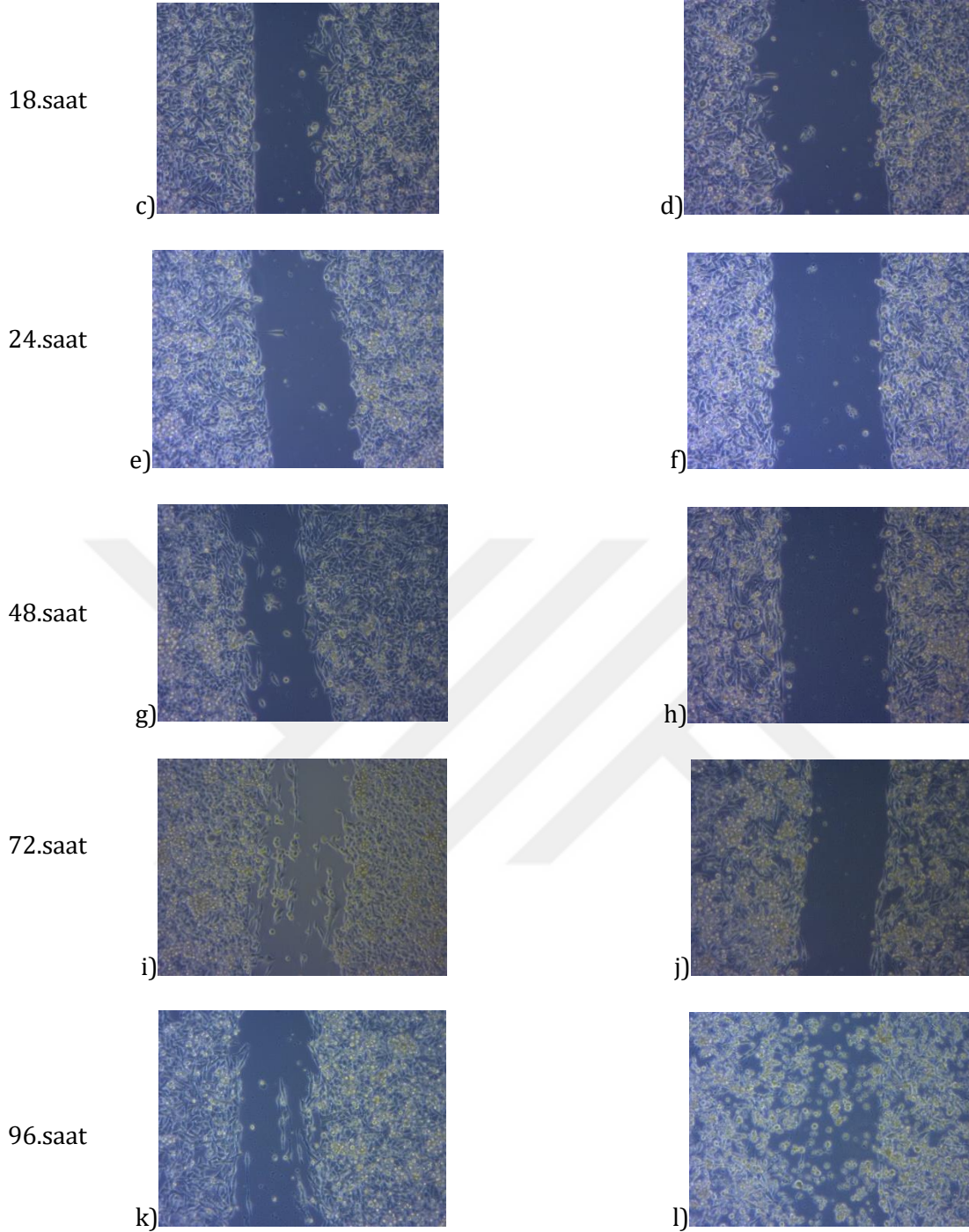
Şekil 4.1. Kontrol ve Danusertib IC₅₀ 399 nM grupları yara açma migrasyon deneyi mikroskop görüntüleri. a-b: 0. saat, c-d: 18. saat, e-f: 24. saat, g-h: 48. Saat, i-j: 72. saat, k-l: 96. saat hücrelerin görüntüleri (x400 büyütmede).

CFPAC-1 hücrelerinin yara açma deneyi mikroskop görüntülerine bakıldığında kontrol grubunda 48. saatte tam kapanma görülmüştür. İlaç grubuna bakıldığında ise 96. saate kadar yaranın kapanmadığı görülmüştür. Xie ve Meykens'in yaptıkları çalışmada, Danusertib'in SK Mel28 melanoma hücrelerinde migrasyon üzerine etkisinin olduğu gösterilmiştir [21]. Bu tez çalışmasında CFPAC-1 hücrelerinde Danusertib'in etkisinin olduğu görülmektedir.

4.1.2. MIA Paca-2 Hücrelerinin Yara Açma (Wound Healing) Migrasyon Analizi

Yara açma deneyinde 3.2.4.'deki deney prosedürü uygulanmıştır. İlaç dozları uygulanan hücrelerin belirli zaman aralıklarının da (0, 18, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde) fotoğrafları çekilmiş, yara kapanması olarak gruplar kontrol ve kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Uygulanan ilaç dozajları Şekil 3.3.'de verilmiştir.





Şekil 4.2. Kontrol ve Danusertib IC₅₀ 318 nM grupları yara açma migrasyon deneyi mikroskop görüntüleri. a-b: 0. saat, c-d: 18. saat, e-f: 24. saat, g-h: 48. Saat, i-j: 72. saat, k-l: 96. saat hücrelerin görüntüleri (x400 büyütmede).

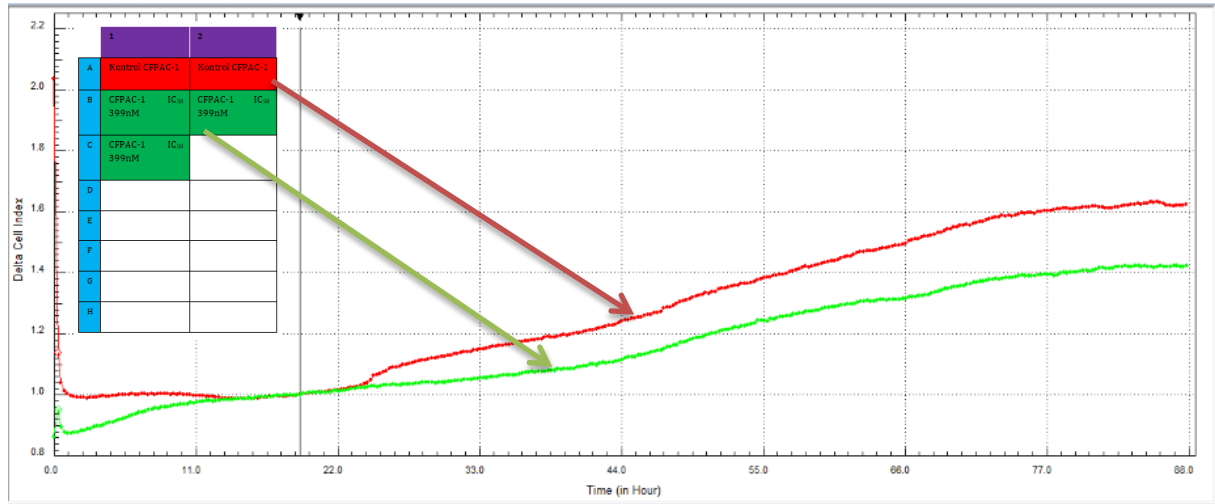
MIA Paca-2 hücrelerinin yara açma deneyi mikroskop görüntüleri incelendiğinde, kontrol grubunda 96. saate kadar tam kapanma görülmemiştir. Danusertib dozajı uygulanan grupta MIA Paca-2 hücrelerinde migrasyonun az oranda etkili olduğu düşünülmektedir. İlaç grubuna bakıldığında ise 96. saate kadar ilaç etkisi nedeni ile kollegat oluşumları ve yaranın kapanmadığı görülmüştür. Xie ve Meykens'in yaptığı çalışmada, SK Mel28 melanoma

hücrelerinde Danusertib'in kullanılan düşük konsantrasyon dozajında (100nM) bu hücrelerin migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir [21]. Bu tez çalışmasında Danusertib'in migrasyonun inhibisyonuna neden olduğu görülmektedir.

4.2. xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi

CIM-Plate 16 migrasyon analizinde 3.2.5.'deki prosedür uygulanmıştır. xCELLigence sisteminde RTCA yazılımı ile kontrol grubu ve ilaç dozajları kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ve ilaç dozajları tablo 3.4.'deki gibidir.

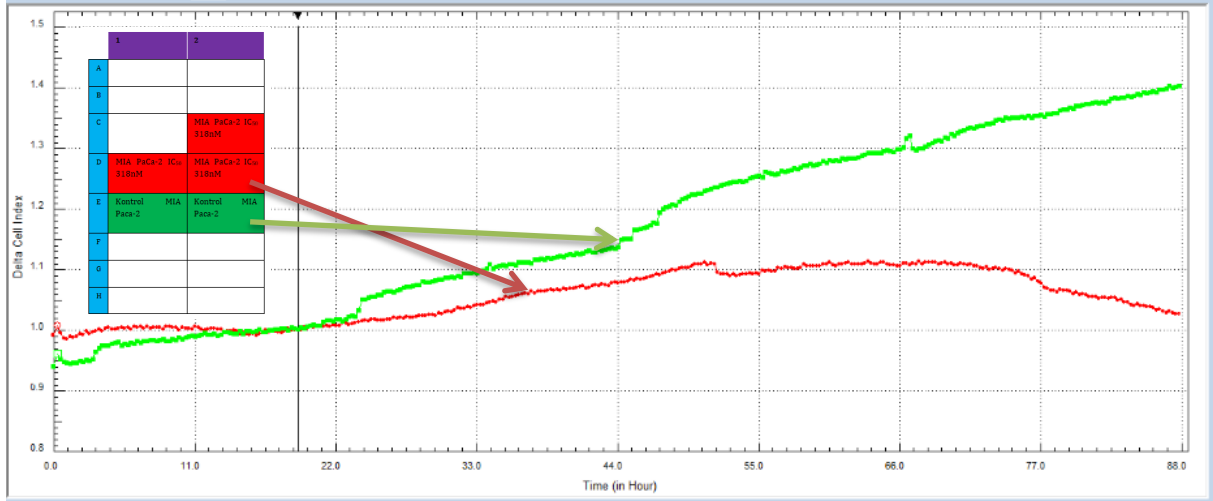
4.2.1. CFPAC-1 Hücrelerinin xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi



Şekil 4.3. xCELLigence sisteminde CFPAC-1 hücrelerinin CIM-Plate 16 migrasyon analiz sonucu. Kırmızı; Kontrol, yeşil; Danu IC₅₀ 399 nM grupları ifade etmektedir.

xCELLigence sistemini kontrol eden RTCA yazılımı üzerinde hücre popülasyonu grafiği 20.000 hücre için incelendi. Siyah dikey çizgi ile gösterilen bölgede hücre popülasyonları için yazılımdan delta normalizasyonu yapılarak büyüme eğrilerinin üst üste gelmesi sağlanmıştır. xCELLigence sisteminde CIM-Plate 16 migrasyon analiz sonucu grafiğinden de yara açma deneyine paralel olarak yapılan Danusertib IC₅₀ dozu uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde migrasyon gözlenmediği görülmektedir.

4.2.2. MIA PaCa-2 Hücrelerinin xCELLigence Sisteminde CIM-Plate 16 Migrasyon Analizi

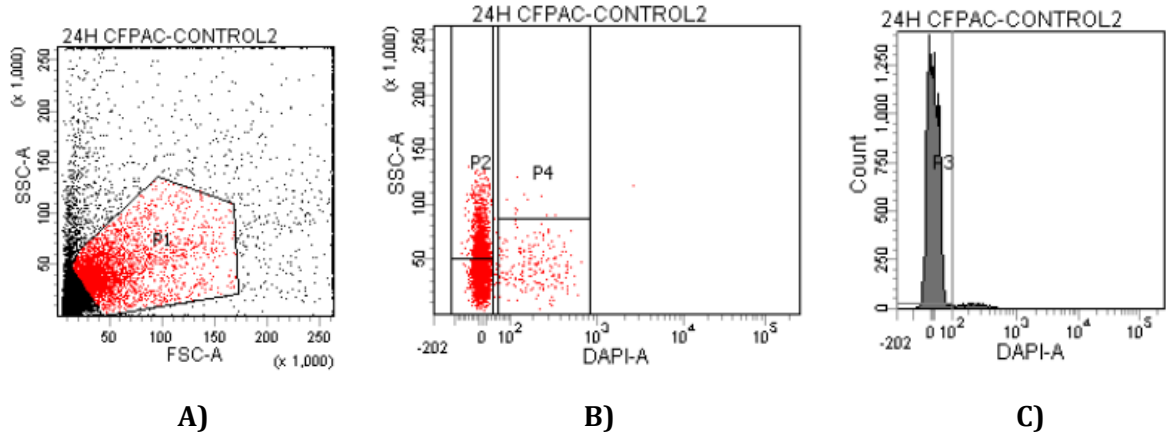


Şekil 4.4. xCELLigence sisteminde MIA PaCa-2 hücrelerinin CIM-Plate 16 migrasyon analiz sonucu. Kırmızı; Danu IC₅₀ 318 nM, yeşil; Kontrol gruplarını ifade etmektedir.

xCELLigence sistemini kontrol eden RTCA yazılımı üzerinde hücre popülasyonu grafiği 5.000 hücre için incelendi. Siyah dikey çizgi ile gösterilen bölgede hücre popülasyonları için yazılımdan delta normalizasyonu yapılarak büyüme eğrilerinin üst üste gelmesi sağlanmıştır. xCELLigence sisteminde CIM-Plate 16 migrasyon analiz sonucu grafiğinden de yara açma deneyine paralel olarak yapılan Danusertib IC₅₀ dozu uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinde migrasyon gözlenmediği görülmektedir.

4.3. Akım Sitometri de DAPI-A ile Otofaji Analizi

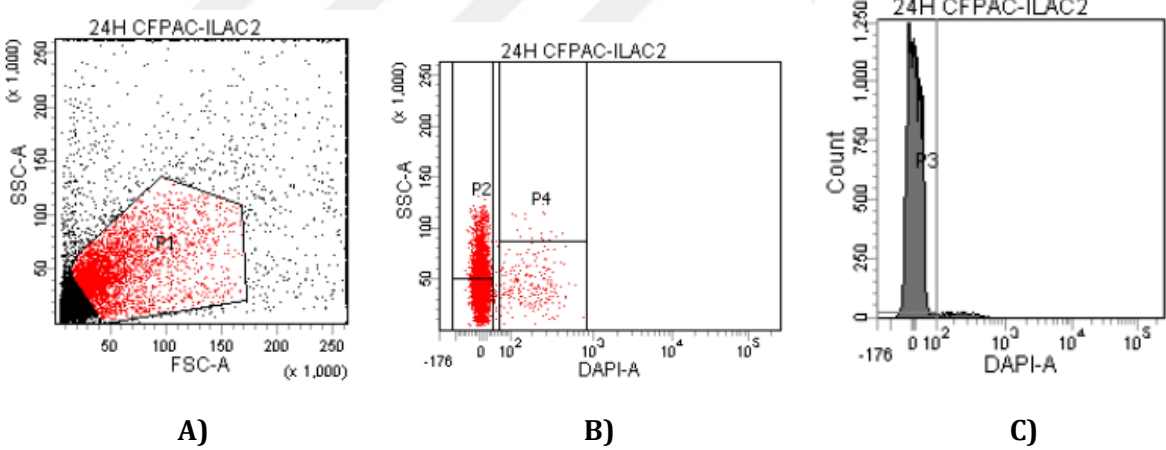
CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücreleri 3.2.6.'daki gibi DAPI-A boyama prosedürüne göre boyanmıştır. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), DNA'nın A-T açısından zengin sekanslarına eklenmesiyle bir floresan kompleksi oluşturan DNA'ya özgü bir probtur [51]. DAPI-A (1mg/ml) boyası ile akım sitometri cihazında 405nm dalga boyunda mor lazer kullanılarak SSC-A ve DAPI-A histogramında canlı hücrelerin çekirdek boyanması ile otofajik hücrelere bakılmıştır. Hücre grupları tablo 3.5.'deki gibidir.



Şekil 4.5. CFPAC-1 hücreleri 24. saat kontrol grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P1 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.

Tablo 4.1. CFPAC-1 hücreleri 24. saat kontrol grubu analiz sonucu.

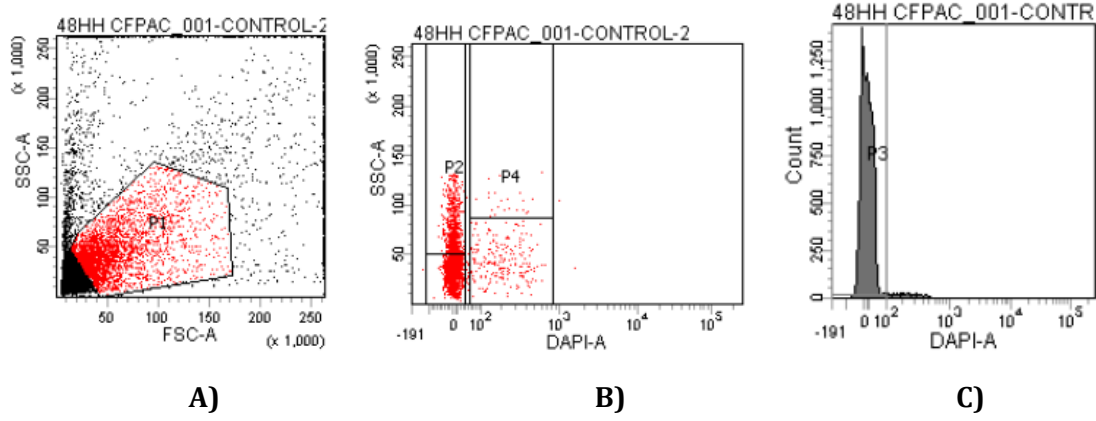
Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,4
Otofajik hücreler	% 6,2



Şekil 4.6. CFPAC-1 hücreleri 24. saat IC₅₀ grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P1 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.

Tablo 4.2. CFPAC-1 hücreleri 24. saat IC₅₀ grubu analiz sonucu.

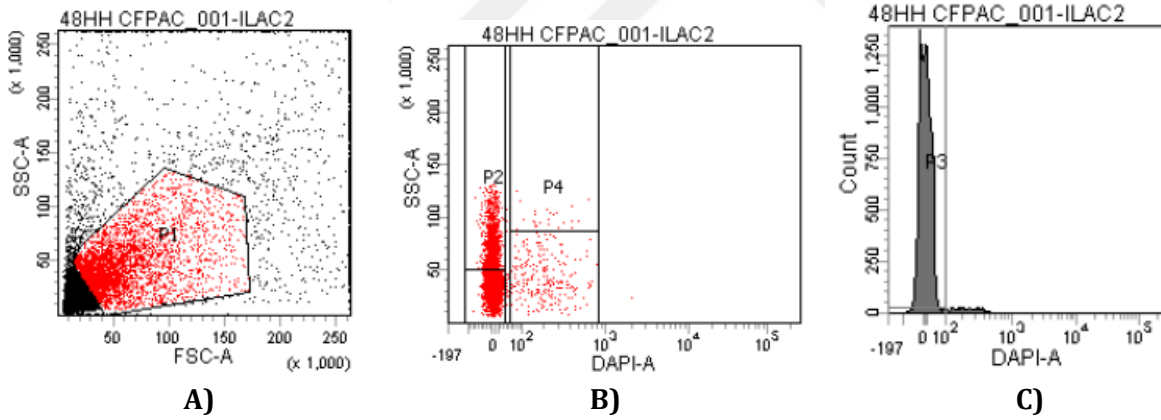
Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,7
Otofajik hücreler	% 6



Şekil 4.7. CFPAC-1 hücreleri 48. saat kontrol grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P1 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.

Tablo 4.3. CFPAC-1 hücreleri 48. saat kontrol grubu analiz sonucu.

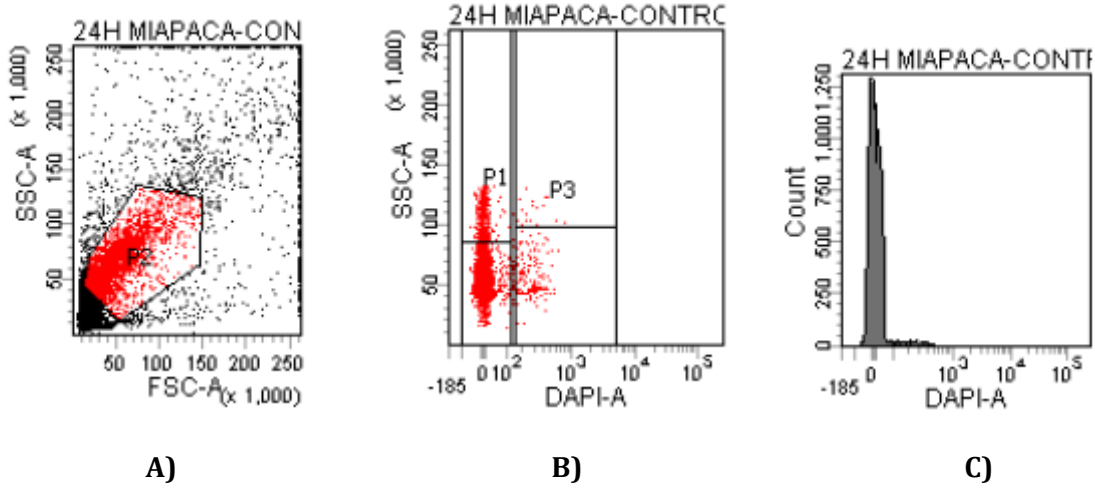
Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,4
Otofajik hücreler	% 7



Şekil 4.8. CFPAC-1 hücreleri 48. saat IC₅₀ grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P1 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.

Tablo 4.4. CFPAC-1 hücreleri 48. saat IC₅₀ grubu analiz sonucu.

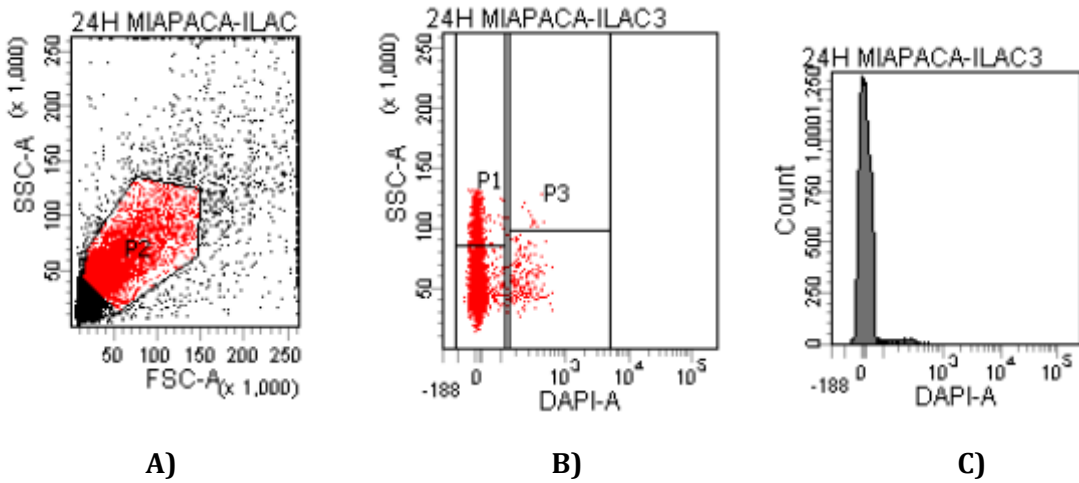
Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,2
Otofajik hücreler	% 6,6



Şekil 4.9. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat kontrol grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P2 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.

Tablo 4.5. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat kontrol grubu analiz sonucu.

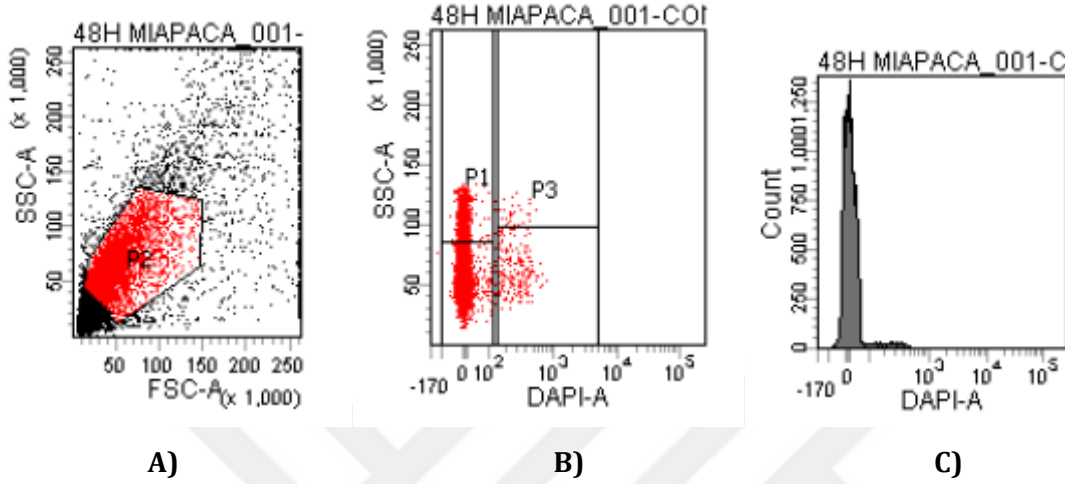
Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,8
Otofajik hücreler	% 3,3



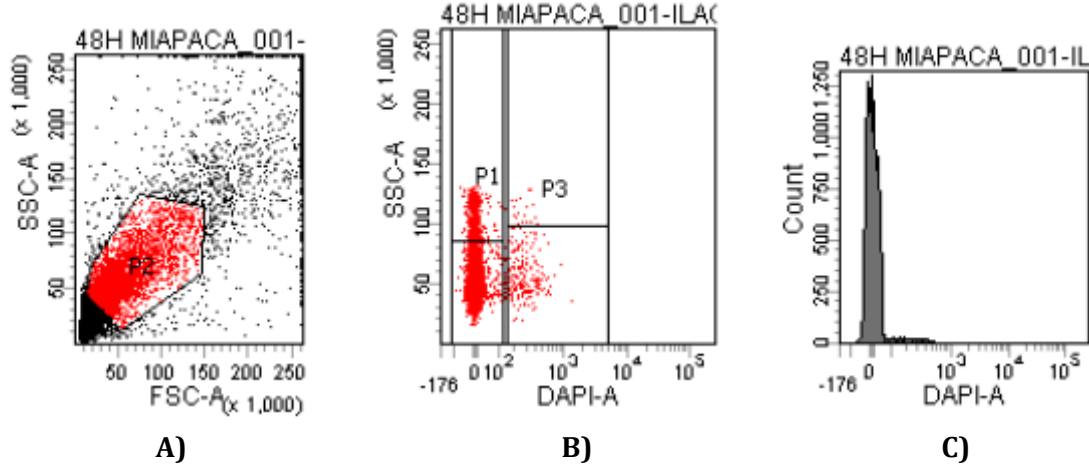
Şekil 4.10. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat IC₅₀ grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P2 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.

Tablo 4.6. MIA PaCa-2 hücreleri 24. saat IC₅₀ grubu analiz sonucu.

Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,9
Otofajik hücreler	% 4,1

**Şekil 4.11.** MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat kontrol grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P2 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.**Tablo 4.7.** MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat kontrol grubu analiz sonucu.

Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,1
Otofajik hücreler	% 4,7



Şekil 4.12. MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat IC₅₀ grubu. A) FSC-A ve SSC-A grafiğinde P2 kapısı hücre yoğunluğunu, B) SSC-A ve DAPI-A grafiğinde P hücre popülasyonlarını, C) Hücre sayısı ve DAPI-A histogram grafiğini göstermektedir.

Tablo 4.8. MIA PaCa-2 hücreleri 48. saat IC₅₀ grubu analiz sonucu.

Hücre popülasyonu	Popülasyon yüzdesi
Canlı hücreler	% 95,7
Otofajik hücreler	% 4,7

CFPAC-1 hücrelerinin Danusertib IC₅₀ dozajları 24 ve 48. saatler sonucunda, az miktarda otofaji görülmektedir. MIA PaCa-2 hücrelerinin Danusertib IC₅₀ dozajları 24. ve 48. saatler sonucunda ise CFPAC-1 hücrelerine oranla daha da az miktarda otofaji görülmektedir. He ve ark.'nın yaptığı çalışmada Danusertib'in THP-1, HL-60 ve K562 lösemi hücrelerinde otofajiyi önemli ölçüde artırmıştır [52]. Bu iki hücre hattında otofajinin artmasının beklenmesi için daha uzun zamandaki (72, 96 saat) saat gruplarına bakılması gerektiği düşünülmektedir.

4.4. Hücrede Ölüm Yolağının ve Metastaz Yolağının Gen İfade Düzeyleri İle Analizi

CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücreleri tablo 3.5.'deki gibi 8 grup şeklinde oluşturulmuştur. Total-RNA'lar, 24. saat ve 48. saat gruplarından izole edilmiştir. NanoQ cihazında izole edilmiş RNA'lar ölçülmüştür. Total-RNA'lardan cDNA'lar sentezlenmiştir. cDNA'lar daha sonra qRT-PCR'de Promega Gotaq master mix kiti prosedürüne göre; hücrede ölüm yolunu başlatan kaspaz -3, -6, -7, apoptoz ile ilişkili kaspaz -8, -9 ve metastaz ile ilişkili VEGF, Zeb-1, Slug ve Snail gen ifade düzeyleri ACTB geni ile normalizasyonu yapılarak ölçülmüştür.

Tablo 4.9. Kontrol ve ilaç uygulanmış CFPAC-1 hücreleri total RNA ve miktarları.

Gruplar	Örnek	260/280 nm	Konsantrasyon ng/µl
Kontrol 24	RNA	2,09	205,21
İlaç 24	RNA	1,98	186,10
Kontrol 48	RNA	2,07	146,58
İlaç 48	RNA	2,10	168,94

Tablo 4.10. Kontrol ve ilaç uygulanmış MIA PaCa-2 hücreleri total RNA ve miktarları.

Gruplar	Örnek	260/280 nm	Konsantrasyon ng/µl
Kontrol 24	RNA	2,03	411,0
İlaç 24	RNA	1,98	241,40
Kontrol 48	RNA	2,02	641,50
İlaç 48	RNA	2,05	1004,80

Tablo 4.11. CFPAC-1 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları.

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

Tablo 4.12. MIA PaCa-2 hücrelerinin cDNA sentezi için NanoQ sonuçlarına göre eklenen RNA ve hazırlanan mix miktarları.

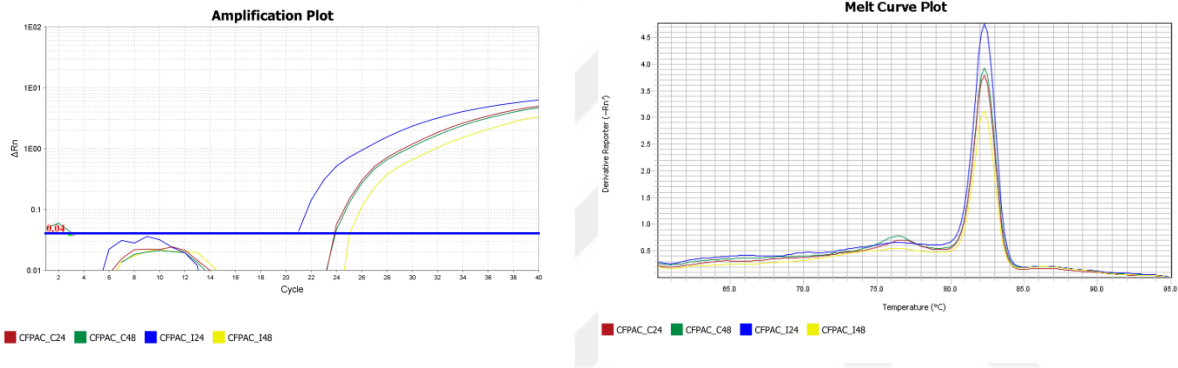
	Kontrol 24	İlaç 24	Kontrol 48	İlaç 48
Transcriptor RT Reactrion Buffer	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
dNTP Mix	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl
Random Hexamer Primer Mix	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Protector RNase Inhibitor	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
PCR-Grade Water	10,8 µl	9,1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

4.4.1. CFPAC-1 Hücrelerinde Apoptoz İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi

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

Tablo 4.13. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP3 gen ekspresyonu.

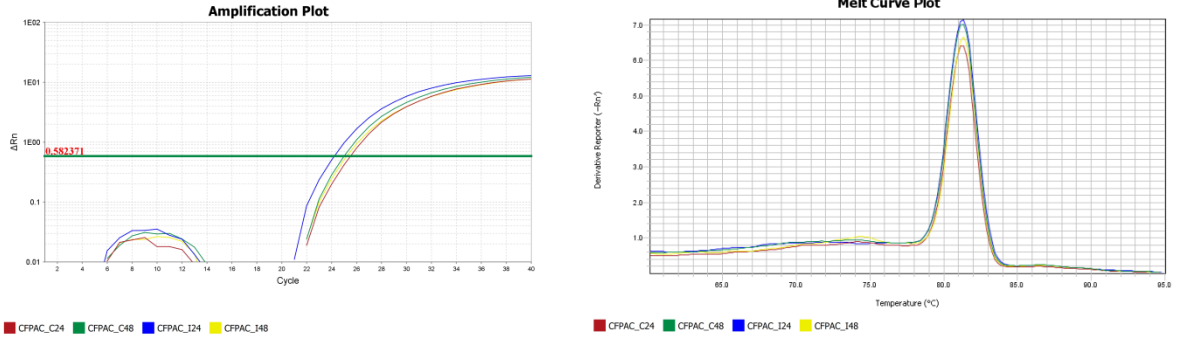
Gruplar	ACTB	CASP3	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	16,064	23,765	7,701	0	1
İlaç 24	16,818	20,956	4,138	-3,563	11,820
Kontrol 48	15,264	23,881	8,617	0	1
İlaç 48	16,073	24,963	8,890	0,272	0,828



Şekil 4.13. CFPAC-1 hücrelerinde CASP3 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.14. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP6 gen ekspresyonu.

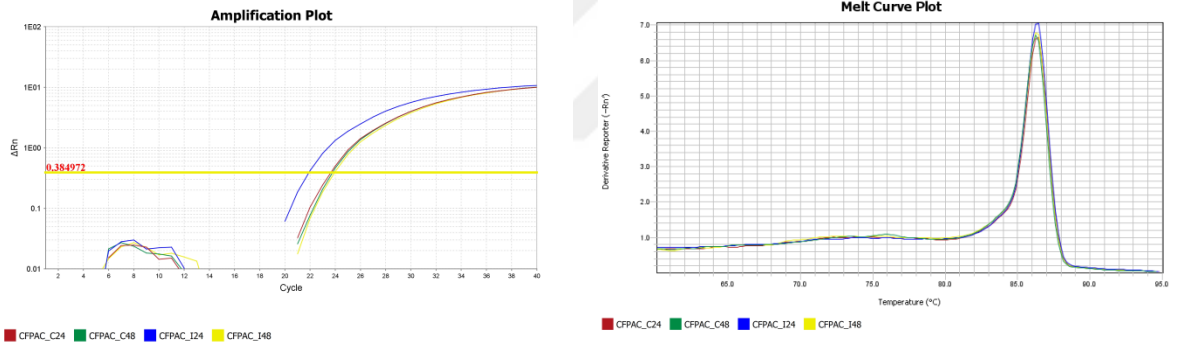
Gruplar	ACTB	CASP6	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	16,064	25,460	9,396	0	1
İlaç 24	16,818	24,166	7,348	-2,048	4,135
Kontrol 48	15,264	24,971	9,708	0	1
İlaç 48	16,073	25,150	9,077	-0,630	1,548



Şekil 4.14. CFPAC-1 hücrelerinde CASP6 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.15. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP7 gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	CASP7	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
Kontrol 24	16,064	23,561	7,497	0	1
İlaç 24	16,818	21,853	5,034	-2,462	5,510
Kontrol 48	15,264	23,719	8,455	0	1
İlaç 48	16,073	23,891	7,818	-0,637	1,555

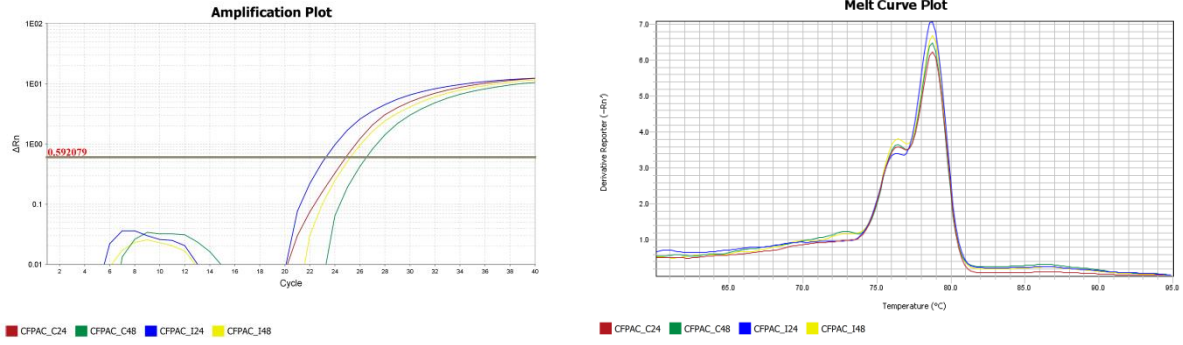


Şekil 4.15. CFPAC-1 hücrelerinde CASP7 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

CASP3 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 11,8 kat arttığı, 48. saat ilaç grubunda 0,8 kat, azaldığı görülmektedir. CASP6 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 4,1 kat, 48. saat ilaç grubunda 0,5 kat artış görülmektedir. CASP7 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 5,5 kat arttığı, 48. saat ilaç grubunda 0,5 kat artış görülmektedir.

Tablo 4.16. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP8 gen ekspresyonu.

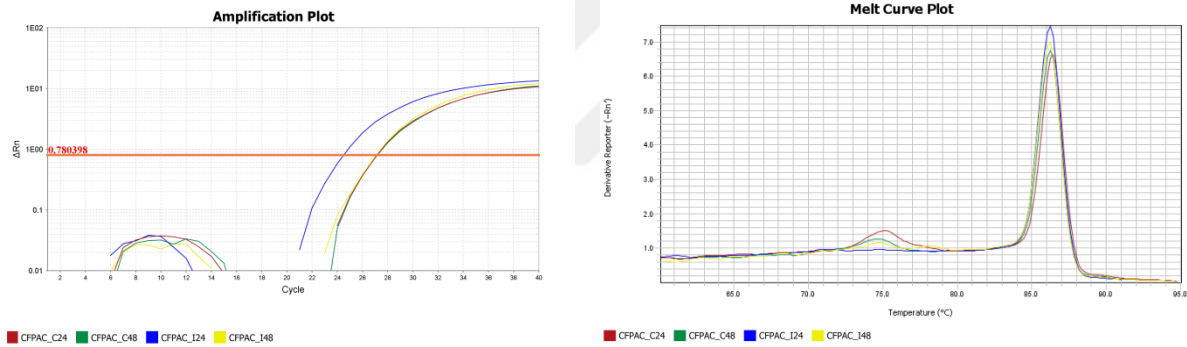
Gruplar	ACTB	CASP8	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
Kontrol 24	16,064	24,844	8,780	0	1
İlaç 24	16,818	23,199	6,381	-2,399	5,273
Kontrol 48	15,264	26,445	11,182	0	1
İlaç 48	16,073	25,163	9,090	-2,092	4,263



Şekil 4.16. CFPAC-1 hücrelerinde CASP8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.17. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve CASP9 gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	CASP9	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	16,064	27,042	10,978	0	1
İlaç 24	16,818	24,405	7,587	-3,391	10,493
Kontrol 48	15,264	27,078	11,815	0	1
İlaç 48	16,073	27,011	10,938	-0,877	1,837



Şekil 4.17. CFPAC-1 hücrelerinde CASP9 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

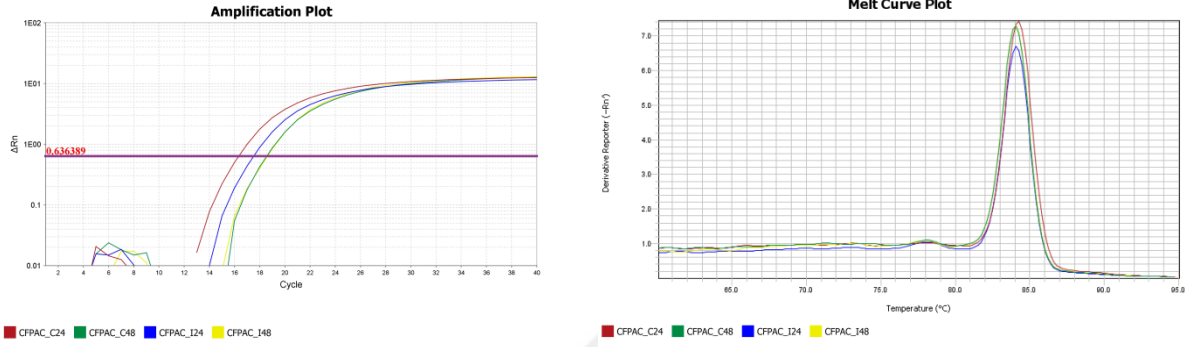
CASP8 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 5,2 kat 48. saat ilaç grubunda 4,2 kat artış görülmektedir. CASP9 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 10,4 kat artış, 48. saat ilaç grubunda 0,8 kat artışın meydana geldiği görülmektedir. Zi ve arkadaşlarının Danu uygulanmış C13 ve A2780cp yumurtalık karsinoma hücrelerinde yaptığı çalışmada kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyesinde artış meydana gelmiştir [53]. Bu tez çalışmasında, Danusertib IC_{50} dozu uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde kaspaz gen ifadelerinde artışın meydana geldiği görülmüştür.

4.4.2. CFPAC-1 Hücrelerinde Metastaz ile İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi

Metastaz ile ilişkili VEGF, Zeb-1, Slug ve Snail gen ifade düzeyleri ACTB ile normalize edilerek ölçülmüştür.

Tablo 4.18. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve VEGF gen ekspresyonu.

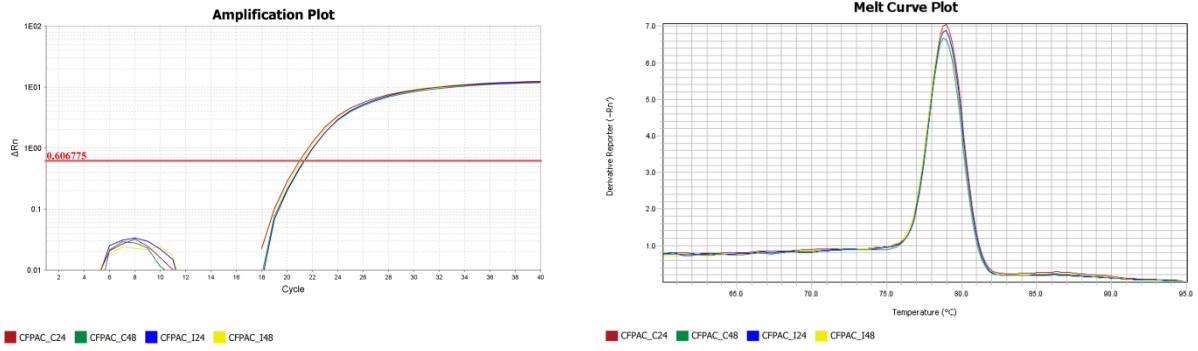
Gruplar	ACTB	VEGF	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	16,064	16,287	0,223	0	1
İlaç 24	16,818	17,474	0,656	0,433	0,741
İlaç 48	16,073	18,575	2,502	2,279	0,206

**Şekil 4.18.** CFPAC-1 hücrelerinde VEGF geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü), anjiyogeneizde önemli bir yere sahip büyüme faktörüdür. VEGF'nin organizmada birçok olay ile ilişkisi vardır. Post-natal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retina yeni damarlanma, kalp ve damar hastalıkları dahil başlıca önemli rolleri arasında yer alır [54]. VEGF ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 0,3 kat, 48. saat ilaç grubunda 0,8 kat azalma görülmektedir. Danusertib ilaç dozajının olduğu grupların yara açma deneyi ve CIM-Plate 16 deney sonuçlarına göre CFPAC-1 hücrelerinde metastazın engellendiği bu tez çalışmasında gösterilmiştir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.3.). CFPAC-1 hücrelerinde VEGF gen ifade düzeyinin yüksek oranda azalması, metastaz mekanizmasında önemli rol oynayan anjiogenezin baskılanmasını düşündürmektedir.

Tablo 4.19. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve ZEB1 gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	ZEB1	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	16,064	20,940	4,876	0	1
İlaç 24	16,818	21,307	4,488	-0,388	1,308
İlaç 48	16,073	21,052	4,979	0,103	0,931

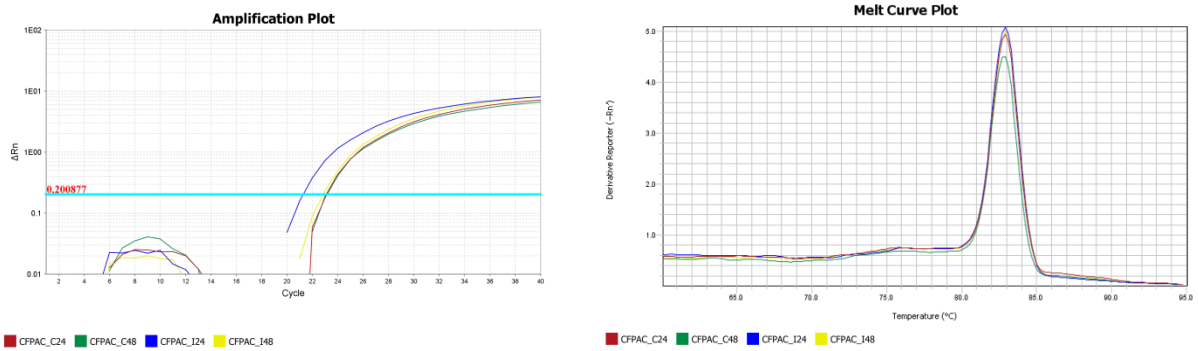


Şekil 4.19. CFPAC-1 hücrelerinde ZEB1 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

ZEB-1 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 0,3 kat artış, 48. saat ilaç grubunda ise 0,1 kat azalma meydana geldiği görülmektedir. Kurahara ve arkadaşları pankreatik kanser hastalarında ZEB-1 ekspresyonunun azalması durumunda metastazın engellendiğini ifade etmiştir [55]. Yaptığımız çalışmada, CFPAC-1 hücrelerinde 24. saat ilaç dozajı grubunda çok az artış görülürken ilerleyen saatlerde ilaç grubunda ZEB-1 gen ifadesinin azaldığı belirtilmiştir.

Tablo 4.20. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve SLUG gen ekspresyonu.

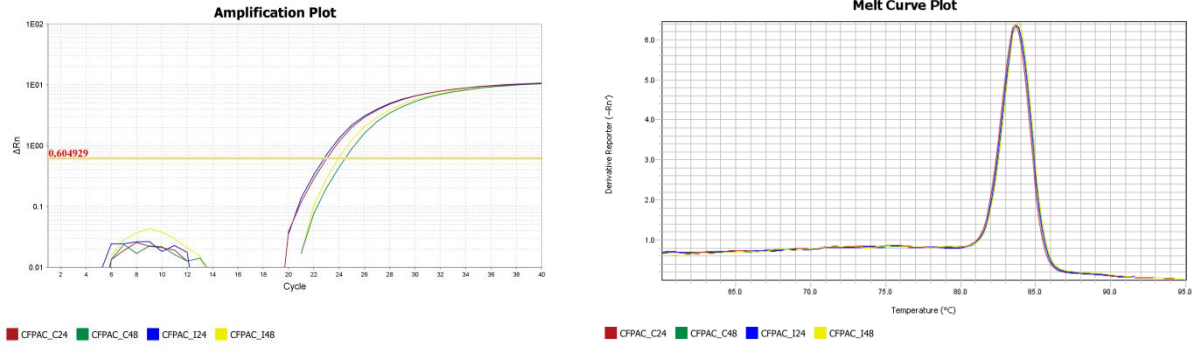
Gruplar	ACTB	SLUG	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	16,064	23,052	6,988	0	1
İlaç 24	16,818	21,177	4,359	-2,630	6,189
İlaç 48	16,073	22,825	6,752	-0,236	1,178



Şekil 4.20. CFPAC-1 hücrelerinde SLUG geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.21. CFPAC-1 hücrelerinde ACTB ve SNAIL gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	SNAIL	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	16,064	22,976	6,912	0	1
İlaç 24	16,818	22,761	5,943	-0,969	1,958
İlaç 48	16,073	23,895	7,822	0,910	0,532



Şekil 4.21. CFPAC-1 hücrelerinde SNAIL geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

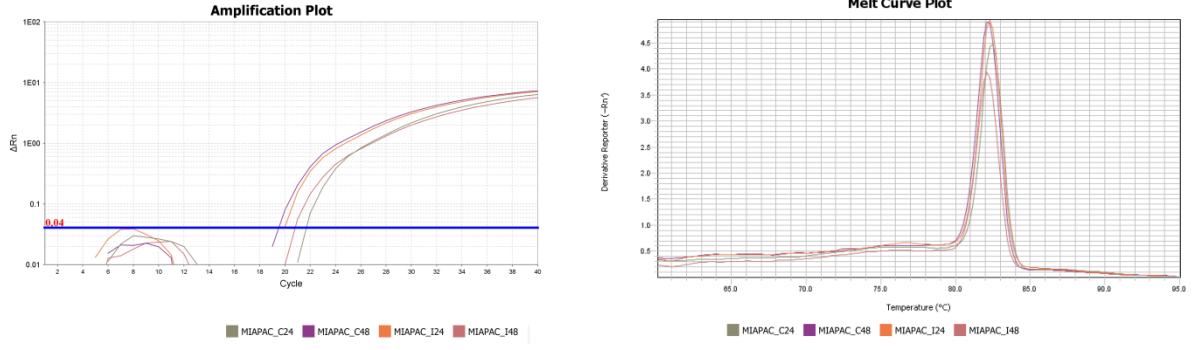
SLUG ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 6,1 kat, 48. saat ilaç grubunda 0,1 kat oranında artış görülmektedir. SNAIL ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 2 kat artış, 48. saat ilaç grubunda ise 0,5 kat azalış görülmektedir. Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HepG2 hücrelerinde Slug ve Snail gen ekspresyonlarının ilerleyen saatlerde azaldığı gösterilmiştir [56]. CFPAC-1 hücrelerinde Slug ve Snail gen ekspresyonunun ifadesi kontrole göre zaman bağımlı olarak azalmıştır.

4.4.3. MIA PaCa-2 Hücrelerinde Apoptoz ile İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi

MIA PaCa-2 hücrelerinden elde edilen total RNA'lerden cDNA'lar prosedüre göre sentezlenmiştir. cDNA'lar daha sonra qRT-PCR'de Promega Gotaq master mix kiti prosedürüne göre gen ifade düzeyleri ACTB geni ile normalizasyonu yapılarak ölçülmüştür.

Tablo 4.22. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP3 gen ekspresyonu.

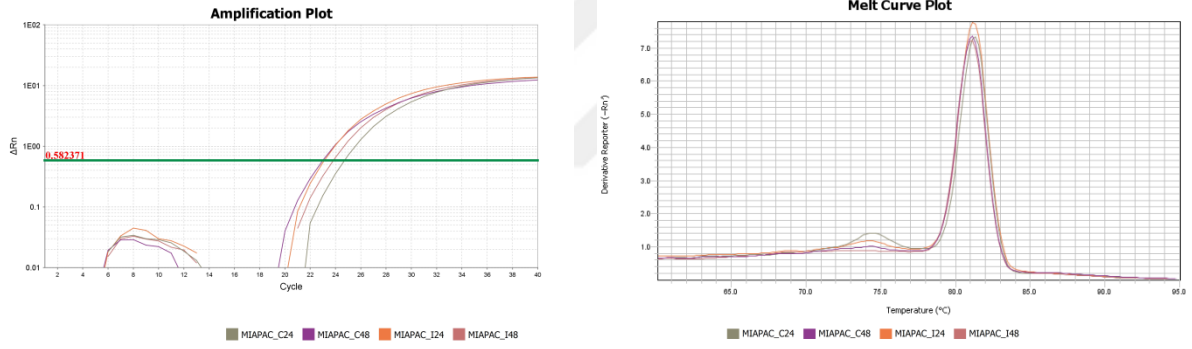
Gruplar	ACTB	CASP3	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
Kontrol 24	14,912	21,582	6,670	0	1
İlaç 24	15,595	19,937	4,342	-2,329	5,023
Kontrol 48	13,321	19,456	6,135	0	1
İlaç 48	14,982	20,688	5,706	-0,429	1,346



Şekil 4.22. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP3 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.23. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP6 gen ekspresyonu.

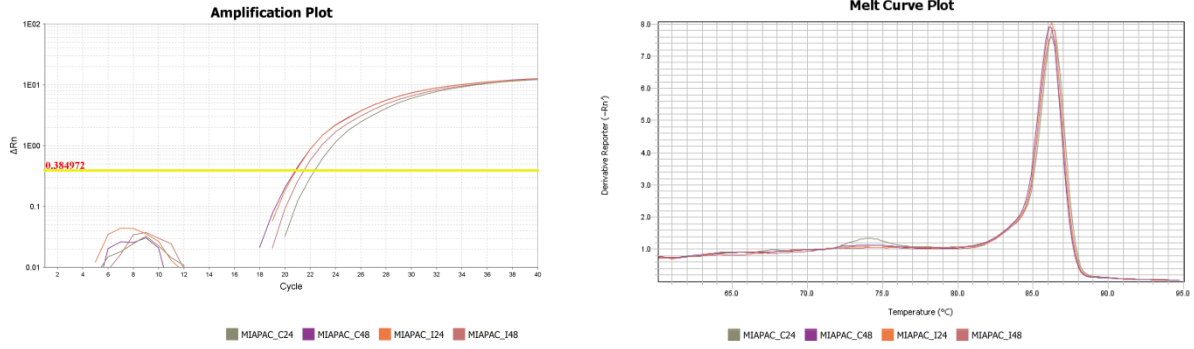
Gruplar	ACTB	CASP6	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	24,687	9,775	0	1
İlaç 24	15,595	23,075	7,480	-2,296	4,910
Kontrol 48	13,321	22,982	9,660	0	1
İlaç 48	14,982	23,808	8,825	-0,835	1,784



Şekil 4.23. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP6 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.24. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP7 gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	CASP7	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	22,267	7,355	0	1
İlaç 24	15,595	20,834	5,239	-2,115	4,333
Kontrol 48	13,321	20,775	7,454	0	1
İlaç 48	14,982	21,418	6,435	-1,018	2,026

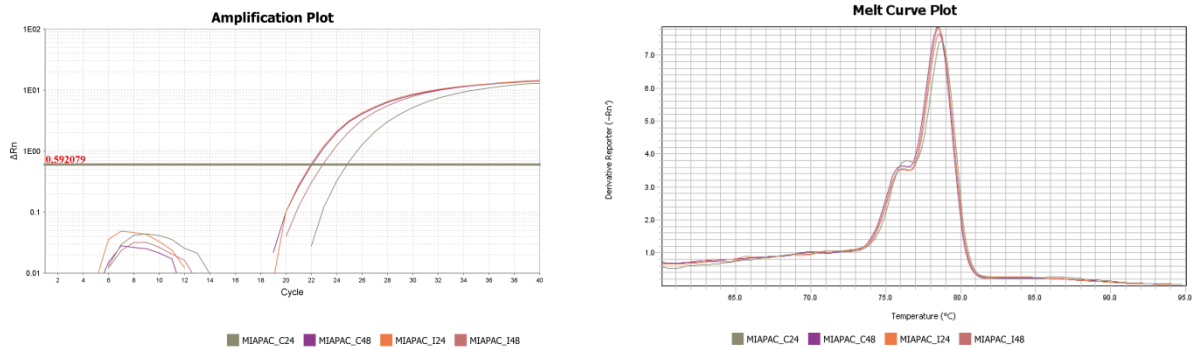


Şekil 4.24. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP7 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

CASP3 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 5 kat, 48. saat ilaç grubunda 0,3 kat artış görülmektedir. CASP6 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 4,9 kat arttığı, 48. saat ilaç grubunda 0,7 kat artış görülmektedir. CASP7 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 4,3 kat, 48. saat ilaç grubunda 2 kat artış görülmektedir.

Tablo 4.25. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP8 gen ekspresyonu.

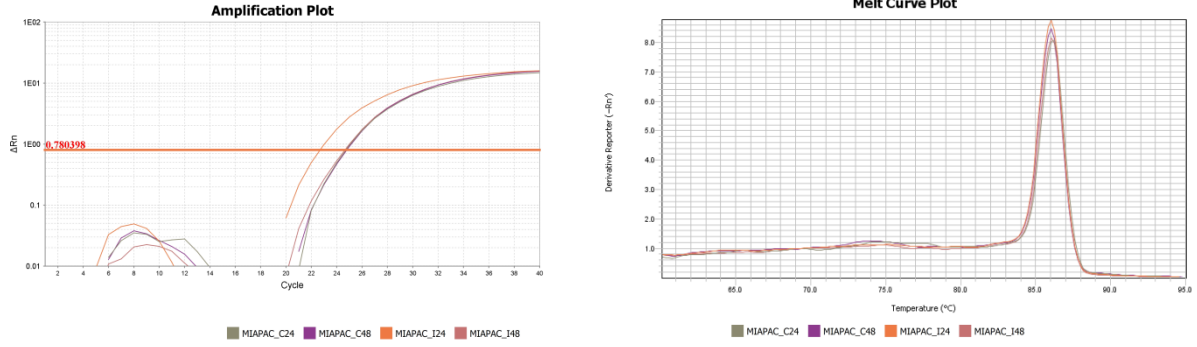
Gruplar	ACTB	CASP8	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	24,768	9,856	0	1
İlaç 24	15,595	21,914	6,319	-3,537	11,606
Kontrol 48	13,321	21,980	8,658	0	1
İlaç 48	14,982	22,876	7,894	-0,765	1,699



Şekil 4.25. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP8 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.26. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve CASP9 gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	CASP9	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	24,651	9,739	0	1
İlaç 24	15,595	22,616	7,021	-2,718	6,580
Kontrol 48	13,321	24,732	11,411	0	1
İlaç 48	14,982	24,580	9,597	-1,813	3,514



Şekil 4.26. MIA PaCa-2 hücrelerinde CASP9 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

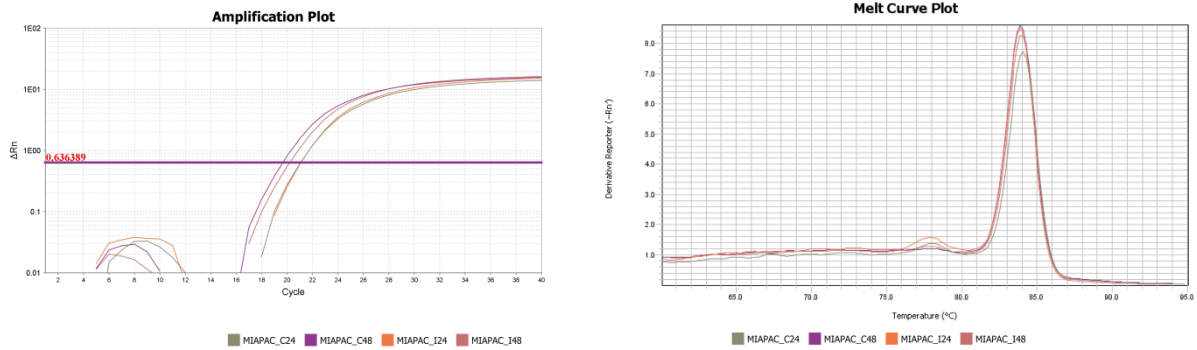
CASP8 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 11,6 kat, 48. saat ilaç grubunda 0,7 kat artış görülmektedir. CASP9 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 6,5 kat artış, 48. saat ilaç grubunda ise 3,5 kat oranında artışın meydana geldiği görülmektedir. Li ve arkadaşlarının Danusertib uygulanmış insan meme kanseri hücrelerinde Bcl-2 seviyesinin azalmasıyla kaspaz-3 ifadesinin sonuçlarımızdaki gibi arttığını bildirmiştir [57].

4.4.4. MIA PaCa-2 Hücrelerinde Metastaz ile İlişkili Gen İfade Düzeyleri Analizi

Metastaz ile ilişkili VEGF, Zeb-1, Slug ve Snail gen ifade düzeyleri ACTB ile normalize edilerek ölçülmüştür.

Tablo 4.27. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve VEGF gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	VEGF	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	21,016	6,104	0	1
İlaç 24	15,595	21,059	5,464	-0,640	1,559
İlaç 48	14,982	20,195	5,212	-0,892	1,856

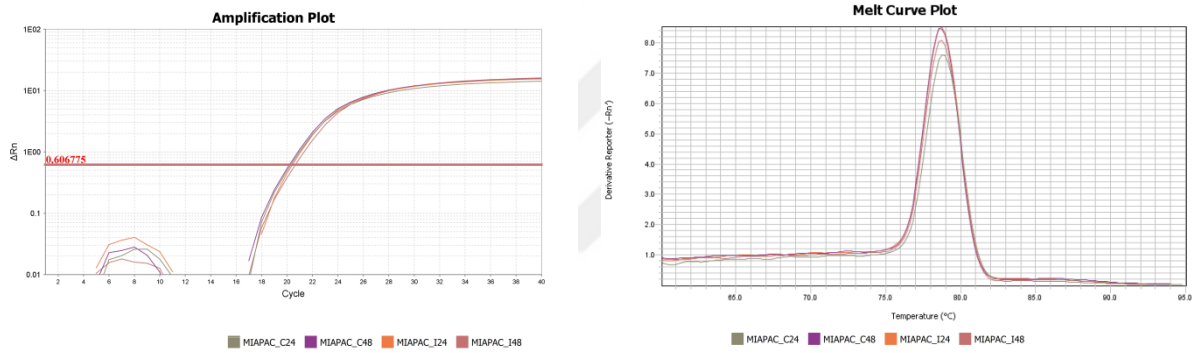


Şekil 4.27. MIA PaCa-2 hücrelerinde VEGF geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

VEGF, gelişimde ve yetişkinlerde angiogenez için gerekli bir faktördür. Bu büyüme faktörü birçok olayda (romatoid artrit, yara iyileşmesi, kanser) kritik rol alırken endotelial hücrelerinin fonksiyonunda da önemli görevler üstlenir [58]. VEGF ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 0,5 kat artış, 48. saat ilaç grubunda 0,8 kat artış görülmektedir. Danusertib ilaç dozajının olduğu grupta yara açma deneyi ve CIM-Plate 16 deney sonuçlarına göre MIA PaCa-2 hücrelerinde metastazın engellendiği yukarıda görülmektedir (Şekil 4.2. ve Şekil 4.4.). VEGF gen ekspresyon düzeyinin MIA PaCa-2 hücrelerinde CFPAC-1 hücrelerine göre artışın olması angiogenezin baskılanamayacağını düşündürmektedir.

Tablo 4.28. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve ZEB1 gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	ZEB1	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	20,244	5,332	0	1
İlaç 24	15,595	20,380	4,784	-0,548	1,462
İlaç 48	14,982	20,631	5,649	0,317	0,803

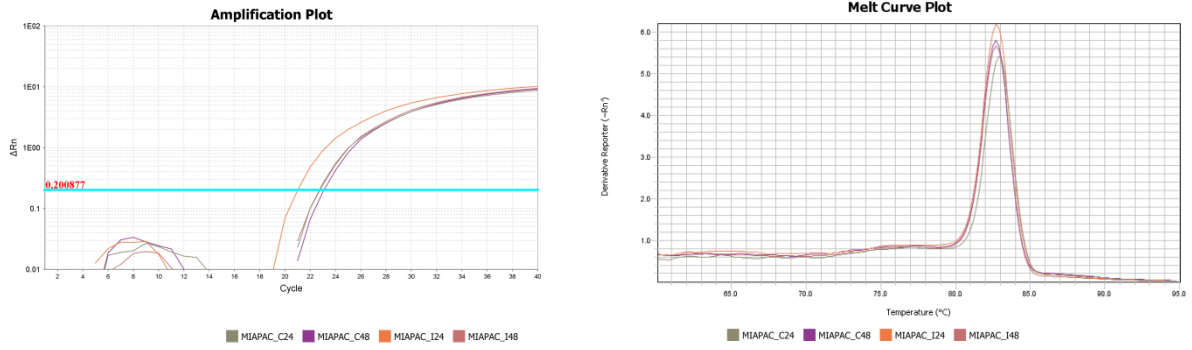


Şekil 4.28. MIA PaCa-2 hücrelerinde ZEB1 geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

ZEB-1 ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 0,5 kat artış, 48. saat ilaç grubunda ise 0,2 kat azalma meydana geldiği görülmektedir. Kurahara ve arkadaşları belirli sayıdaki pankreatik kanser hastalarında E-kaderin seviyesinin yüksek olması nedeni ile ZEB-1 geni ekspresyonunun azalması durumunda metastazın engellendiğini ifade etmiştir [55]. Bu tez çalışması sonucunda, MIA PaCa-2 hücrelerinde 24. saat ilaç grubunda artış görülürken 48. saat ilaç grubunda ZEB-1 gen ifadesinin azalması belirtilmiş ve bu durumun metastazda önemli bir faktör olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.29. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve SLUG gen ekspresyonu.

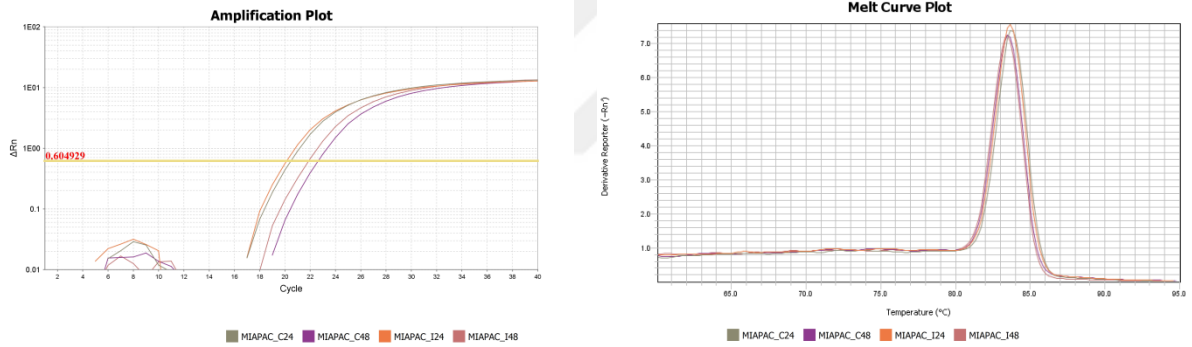
Gruplar	ACTB	SLUG	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	22,690	7,778	0	1
İlaç 24	15,595	20,911	5,316	-2,462	5,508
İlaç 48	14,982	22,752	7,770	-0,008	1,006



Şekil 4.29. MIA PaCa-2 hücrelerinde SLUG geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

Tablo 4.30. MIA PaCa-2 hücrelerinde ACTB ve SNAIL gen ekspresyonu.

Gruplar	ACTB	SNAIL	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol 24	14,912	20,402	5,490	0	1
İlaç 24	15,595	20,027	4,432	-1,058	2,082
İlaç 48	14,982	21,835	6,852	1,363	0,389



Şekil 4.30. MIA PaCa-2 hücrelerinde SNAIL geni amplifikasyon grafiği ve erime pikleri.

SLUG ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda %5,5 kat artış, 48. saat ilaç grubunda ise değişim gözlenmemiştir. SNAIL ifadelerinin 24. saat ilaç grubunda 2 kat artış, 48. saat ilaç grubunda ise 0,6 kat azalma görülmektedir. Sun ve arkadaşları HepG2 hücrelerinde antimigratif ajan kullanarak Slug ve Snail gen ifadesinde zamana bağlı olarak azalma olduğunu belirlemişlerdir [56]. Bu çalışmaya paralel olarak Danusertib ilacı uygulanan bu tez çalışmasında MIA PaCa-2 hücrelerinde Slug ve Snail gen ifadesinde azalma gözlemlendi. Bu gen ifadelerindeki azalma ise, Danusertib uygulanan CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde; VEGF, Zeb1, Slug ve Snail gen ifadelerindeki azalma metastazda çok önemli bir mekanizma olan EMT'nin baskılandığını göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib'in xCELLigence DP cihazında migrasyona etkisi, DAPI-A ile otofajinin akım sitometri de ölçülmesi ve gen primerleri kullanılarak gen ifade düzeylerinin belirlenmesi araştırılmıştır.

Bu araştırmada;

1. Metastazda önemli bir migrasyon testi olan yara açma (wound healing) deneyi ile CFPAC-1 hücrelerinin kontrol grubunda, açılan yara 48. saatte tamamen kapanmış, Danusertib IC₅₀ ilaç dozajı bulunan grupta ise 96. saate kadar kapanma gözlenmemiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde ise hem kontrol grubunda hem de Danusertib IC₅₀ ilaç dozajı grubunda 96. saate (ileri saatlere) kadar kapanma gözlenmemiştir. Sonuç olarak; Pan Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib ilacının bu iki hücre hattında migrasyon üzerine etkisinin olduğu görülmektedir.
2. xCELLigence sisteminde CIM-Plate 16 migrasyon analizi ile yara açma deneyindeki bulgulara paralel olarak, CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında ilaç dozajlarının bulunduğu gruplarda migrasyon gözlenmediği, varsa da çok düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Sonuç olarak Danusertib'in, bu iki hücre hattında migrasyonu inhibe ettiği görülmektedir.
3. Akım sitometri cihazı ile yapılan DAPI-A otofaji analizi ölçüm sonucunda, CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde Danusertib IC₅₀ dozajının uygulanan 24.saat ve 48.saat gruplarında çok az miktarda otofajiyi tutukladığı görülmektedir. Otofaji'nin görülebilmesi için yüksek oranda ilaç dozajı ya da yüksek saatlerde otofajik ölümün araştırılması düşünülmektedir.
4. CFPAC-1 hücrelerinde apoptozun araştırılması için; qRT-PCR tekniği ile DAPk düzenleyicileri olan kaspaz -3, -6, -7 ve apoptoz ile ilişkili kaspaz -8, -9 gen ifade düzeyleri incelenmiştir. Kaspaz -3, -6, -7 ve -8, -9 gen ifadelerinde 24.saat ve 48.saat ilaç gruplarında artışın meydana geldiği görülmektedir. Bu sonuçlar, Danusertib IC₅₀ ilacının ilk 24 saat içinde CFPAC-1 pankreatik kanser hücrelerinde apoptotik olduğunu göstermektedir.
5. CFPAC-1 hücrelerinde metastazın araştırılması için; qRT-PCR tekniği ile metastaz ile ilişkili gen ifade düzeyleri incelenmiştir. VEGF gen ifadelerinde azalış; Zeb-1 gen ifadelerinde 24.saat ilaç grubunda artış, 48.saat ilaç grubunda azalış; Slug gen ifadelerinde artış; Snail gen ifadelerinde 24.saat ilaç grubunda artış, 48.saat ilaç grubunda azalış meydana geldiği

görülmektedir. Bu gen ifadelerindeki azalma ajan olarak kullanılan Danusertib'in, metastazda önemli olaylarından biri olan EMT mekanizmasını inhibe ettiğini göstermektedir.

6. MIA PaCa-2 hücrelerinde apoptozun araştırılması için; qRT-PCR tekniği ile DAPk düzenleyicileri olan kaspaz -3, -6, -7 ve apoptoz ile ilişkili kaspaz -8, -9 gen ifade düzeyleri incelenmiştir. Kaspaz -3, -6, -7 ve -8, -9 gen ifadelerinde 24.saat ve 48.saat ilaç gruplarında artışın meydana geldiği görülmektedir. Bu sonuçlar, Danusertib IC₅₀ ilaç dozunun ilk 24 saat içinde MIA Paca-2 insan pankreatik kanser hücrelerinde apoptotik olduğunu göstermektedir. Danusertib IC₅₀ ilaç dozunun ilk 24 saat içinde MIA PaCa-2 pankreatik kanser hücrelerinde apoptotik olduğunu göstermektedir.

7. MIA PaCa-2 hücrelerinde metastazın araştırılması için; qRT-PCR tekniği ile metastaz ile ilişkili gen ifade düzeyleri incelenmiştir. VEGF gen ifadelerinde artış; Zeb-1 gen ifadelerinde 24.saat ilaç grubunda artış, 48.saat ilaç grubunda azalış; Slug gen ifadelerinde 24.saat ilaç grubunda artış, 48.saat ilaç grubunda değişim gözlenmemiş; Snail gen ifadelerinde 24.saat ilaç grubunda artış, 48.saat ilaç grubunda azalış meydana gelmektedir. Bu gen ifadelerinde VEGF gen ifadesinde artışın meydana gelmesi bu hücrelerde anjiyogenezin baskılanmadığını düşündürmekte, Zeb-1, Slug ve Snail gen ifadelerindeki azalma ise bu hücrelerde metastazda önemli bir geçiş olan EMT'nin baskılanabileceğini göstermektedir.

CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hatlarında kullanılan pan Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib ilacının apoptoz, otofaji, metastaz ve EMT ilişkileri üzerine yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler gelecekte planlanan *in-vivo* çalışmalara ışık tutacaktır. Danusertib ilacının diğer ajanlarla birlikte sinerjik etkilerinin doz/zaman bağımlı olarak değişkenleri dikkate alınarak çalışılması farklı kanser hücre hatlarında hücre ölümü ve gen ifade düzeylerindeki çalışmaların gerçekleştirilmesi diğer *in-vitro* çalışmalara da katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Muniraj, T., A. Jamidar, Priya., R. Aslanian, H. (2013). Pancreatic cancer: A comprehensive review and update. *Disease-a-Month*, 59: 368–402.
- [2] Kamisawa, T., D. Wood, L., Itoi, T., Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *Published Online*.
- [3] Şahin, F., Taşpınar, M., Sunguroğlu, A. (2007). Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 27: 560-566.
- [4]. Kırbıyık, İ.A. (2018). Pan Aurora Kinaz İnhibitörü olan Danusertib'in Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksiste, Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 51 s.
- [5] Pedraza-Farina, L. G. (2006). Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 79: 95–103.
- [6] Öztürk, K. (2015). Anti-Vegfr-1 Monoklonal Antikor ile Konjuge Edilmiş Gemsitabin Yüklü Dendrimerlerin Pankreas Kanseri Aktif Hedeflendirilmesi ve İn Vitro/İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi. *Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı, Doktora Tezi*, 152 s.
- [7] Ayazlı, H. M. (2009). Akut Pankreatitte Komorbiditenin Mortalite ve Morbiditeye Etkisi. *Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Aile Hekimliği Kliniği, Uzmanlık Tezi*, 50 s.
- [8] Gökçe, T. (2015). Pankreas kanser Tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanlarının hücre canlılığı ve cox aktivitesi üzerine in vitro etkisi. *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 52 s.
- [9] Hoyert D.L, Xu, J. (2012). Deaths: Preliminary Data for 2011. *National Vital Statistics Reports* 61(6):16-19.
- [10] Uğur, V.I., Kara, Ş.P., Küçükplakçı, B., Mısırlıoğlu, C., Özgen, A., Demirkasımoğlu, T., Elgin, Y., Sanrı, E., Yörükoğlu, T., Özdamar, N. (2007). Pankreas Kanserli Hastalarımızın Genel Özellikleri ve Sağlık Sonuçları, *Acta Oncologica Turcica*, 43: 1-7
- [11] Öztürk, E. (2017). Arum Dioscoridis Bitki Ekstraktının, Tozasertib ile Birlikte CFPAC-1 Pankreas Karsinoma Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Etkisinin İn Vitro Araştırılması. *Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 77 s.
- [12] Schoumacher, R.A., Ram, J., Iannuzzic, M.C., Bradbury, N.A., Wallace, R.W., Tom Hon, C., Kelly, D.R., Schmid, S.M., Gelder, F.B., Rado, T.A., Frizzel, R. A. (1990). A Cystic Fibrosis Pancreatic Adenocarcinoma Cell Line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4012-4016.
- [13] Gradiz, R., Carvalho, L., Silva, H., Nobre, R.J., Botelho, M.F., Mota-Pinto, A. (2012). Phenotypic and Genotypic Characterization. *Pancreatology* 12(6): 547-547.
- [14] Cicenas, J., Cicenas, E. (2016). Multi-kinase inhibitors, AURKs and cancer, *Medical Oncology*. 33(5): 1–11.
- [15] Vader, G., Lens, S. M. A. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1786(1): 60–72.

- [16] 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. *J. Cell Biol.* 166: 179–191.
- [17] Dar, A. A., Goff, L. W., Majid, S., Berlin, J., El-Rifai, W. (2010). Aurora Kinase Inhibitors - Rising Stars in Cancer Therapeutics? *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2): 268–278.
- [18] Bolanos-Garcia, V. M. (2005). Aurora kinases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(8): 1572–1577.
- [19] Çelik, H. (2015). Aurora Kinaz B İnhibitörü Tozasertib'in Pankreas Karsinoma Hücrelerinde CPC (Chromosomal Passenger Complex) Yolağı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. *Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 80 s.
- [20] Yuan, C., Zhou, Z., Yang, Y., He, Z., Zhang, X., Wang, D., Yang, T., Pan, S., Chen, X., Zhou, S. (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.
- [21] Xie, L., Meykens, F. L. (2014). The pan-Aurora kinase inhibitor, PHA-739358, induces apoptosis and inhibits migration in melanoma cell lines. *Melanoma research*, 23(2):102–113.
- [22] Carpinelli, P., Ceruti, R., Giorgini, M. L., Cappella, P., Gianellini, L., Croci, V., Degrassi, A., Texido, G., Rocchetti, M., Vianello, P., Rusconi, L., Storici, P., Zugnoni, P., Arrigoni, C., Soncini, C., Alli, C., Patton, V., Marsiglio, A., Ballinari, D., Pesenti, E., Fancelli, D., Moll, J. (2007). PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(12): 3158–3168.
- [23] Amaya, C., Fader, C. M., Colombo, M. I. (2015). Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Letters*, 589(22): 3343–3353.
- [24] Bento, C. F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F. M., Rubinsztein, D. C. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry*, 85(1): 685–713.
- [25] Yu, L., Chen, Y., Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14(2): 207–215.
- [26] Hurley, J. H., Young L. N. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu. Rev. Biochem.* 86:10.1–10.20
- [27] Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, J. M. B-S., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E-L., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., Hansen, M., Harper, J. W., Jaattela, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A. C., Kraft, C., Ktistakis, N. T., Kumar, S., Levine, B., Lopez-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Münz, C., Murphy, L. O., Penninger, J. M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D. C., Ryan, K. M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A. N., Simon, H-U, Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S. A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13): 1811–1836.
- [28] Küçüköner, M., Işıkdoğan, A. (2013). Kanser Tedavisinde mTOR Sinyal Yolağı ve mTOR İnhibitörleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 40 (1): 156-160

- [29] Gozuacik, D., Kimchi, A. (2007). Autophagy and Cell Death. Elsevier Inc. 0070-2153/07
- [30] Gugnoni, M., Sancisi, V., Manzotti, G., Gandolfi, G., Ciarrocchi, A. (2016). Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell death & disease*, 7(12): e2520.
- [31] Kuo, J. C., Wang, W. J., Yao, C. C., Wu, P. R., Chen, R. H. (2006). The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway. *Journal of Cell Biology*, 172(4): 619–631.
- [32] Kim, Y. N., Koo, K. H., Sung, J. Y., Yun, U. J., Kim, H. (2012). Anoikis resistance: An essential prerequisite for tumor metastasis. *International Journal of Cell Biology*, 2012.
- [33] Guadamillas, M. C., Cerezo, A., del Pozo, M. A. (2011). Overcoming anoikis - pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of Cell Science*, 124(19): 3189–3197.
- [34] Mehlen, P., Puisieux, A. (2006). Metastasis: A question of life or death. *Nature Reviews Cancer*, 6(6): 449–458.
- [35] Tiwari, N., Gheldof, A., Tatari, M., Christofori, G. (2012). EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*, 22(3): 194–207.
- [36] Schulte, J., Weidig, M., Balzer, P., Richter, P., Franz, M., Junker, K., Gajda, M., Friedrich, K., Wunderlich, H., Östman, A., Ptersen, I., Berndt, A. (2012). Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Z β 1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: Relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(6): 847–860.
- [37] Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14(1): 1–14.
- [38] Sanchez-Tillo, E., Liu, Y., De Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D.S., Dean, D.C., Castells, A., Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: Beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(20): 3429–3456.
- [39] Shih, J. Y., Yang, P. C. (2011). The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 32(9): 1299–1304.
- [40] Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K. F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J. L., Gallick, G. E., Logsdon, C.D., McConkey, D. J., Choi, W. (2009). Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 69(14): 5820–5828.
- [41] Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine*, 4(1): 6.
- [42] Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6): 1420–1428.
- [43] Sanchez-Tillo, E., Siles, L., de Barrios, O., Cuatrecasas, M., Vaquero, E. C., Castells, A., Postigo, A. (2011). Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *American journal of cancer research*, 1(7): 897–912.
- [44] Tania, M., Khan, M. A., & Fu, J. (2014). Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumor Biology*, 35(8): 7335–7342.

- [45] Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008(2): 73–78.
- [46] Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1): 87.
- [47] O'Brien, M. A., Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6): 572–585.
- [48] Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J. (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10): 7320–7326.
- [49] Ren, J., Chen, Y., Song, H., Chen, L., Wang, R. (2013). Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(6), 1395–1403.
- [50] Zhao, W., Li, D., Liu, Z., Zheng, X., Wang, J., Wang, E. (2013). Spiclomazine Induces Apoptosis Associated with the Suppression of Cell Viability, Migration and Invasion in Pancreatic Carcinoma Cells. *Plos One*, 8(6): e66362.
- [51] Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-Specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(5): 220–233.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] Konukoğlu, D., Turhan, M. S. (2005). Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezini. *Cerrahpaşa J. Med.* 36: 42-48
- [55] Kurahara, H., Takao, S., Maemura, K., Mataka, Y., Kuwahata, T., Maeda, K., Ding, Q., Sakoda, M., Ino, S., Ishigami, S., Ueno, S., Shintani, H., Natsugoe, S. (2012). Epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition via regulation of ZEB-1 and ZEB-2 expression in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 105(7): 655–661.
- [56] Sun, Y., Song, G. D., Sun, N., Chen, J. Q., Yang, S. S. (2014). Slug overexpression induces stemness and promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis. *Oncology Letters*, 7(6): 1936–1940.
- [57] 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., Qui, 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.
- [58] Yazır, Y., Gonca, S., Filiz, S., Dalçık, H. (2004). Endotel Hücreleri için Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 26 (4): 181-184.

EKLER

Ek 1. Yara açma (Wound healing) protokolü

1. Hücreler 6 well içerisine (her kuyucukta 1×10^6 hücre) ekilir.
2. Hücrelerin tabana yapışması ve yaklaşık olarak konfluens olması için 24 saat veya daha fazla beklenir.
3. Hücreler FBS ve HS içermeyen medium içerisinde 24 saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki mediumlar alınır. 10 µl pipet ucuyla birbirine paralel yaralar (çizgi) açılır.
5. Soğuk DPBS ile 3 defa yıkayıp kalkan hücreler ortamdan uzaklaştırılır.
6. Kullanılacak olan ilaç dozajları %1 FBS'li ve HS'li medium ile kuyucuklara eklenir.
7. Hücrenin karakterine, doubling zamanına ve yaranın kapanma durumuna göre 0-96 saatler arası fotoğraflar alınır.

Ek 2. CIM-Plate 16 migrasyon protokolü

1. Hücreler bir gece önceden serum free mediuma alınır.
2. CIM-Plate 16'nın alt kabına 160µl %20 serumlu medium konulur. Menisküs olduğu gözlenir.
3. Üst parça alt parçaya mavi noktalar üst üste gelecek şekilde oturtulur.
4. Üst parçada her well içine 90µl Serum free medium konulur ve 37°C de 60 dk. bekletilir.
5. İlk step 1 saat sonra (1dk, 1. sweep) okutulur.
6. Hücreler 1 ml'de yaklaşık CFPAC-1 hücre sayısı 20.000, MIA PaCa-2 hücre sayısı 5.000 olacak şekilde serum free medium ile seyreltilir.
7. 110 µl (100 µl +10 µl ilaç) içinde hücre hattına göre değişiklik gösteren hücre sayısı kadar CIM-Plate 16'nın üst kısmına eklenir.
8. CIM-Plate 16, 30 dk. oda ısısında bekletilir ve hücrelerin tabana çökmesi gözlenir.
9. Daha sonra CIM-Plate 16 xCELLigence cihazına yerleştirilir ve 15 dk'lık döngülerle kayıt alınır.

Ek 3. DAPI- A boyama protokolü

DAPI, çift sarmallı DNA'nın A-T bakımından zengin bölgelerine bağlanan bir nükleik asit boyasıdır. DAPI mor renkli lazer kullanılarak 405nm dalga boyunda uyarım emisyonuna sahiptir.

1. Tek hücre süspansiyonu elde edilir.
2. FBS veya 1xDPBS içinde kullanılacak olan DAPI miktarı kadar hücreler tekrar süspanse edilir.
3. Canlılık analizi için DAPI'nin optimum konsantrasyonu hücre türüne göre değişebilir.
4. Oda sıcaklığında 5dk inkübe edilir.
5. Analizden önce yıkama gerekmez.
6. Akım sitometri de analizlere devam edilir.

Ek 4. 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 90µl DNase Incubation Buffer ve 10µl DNase eklenir.
4. 15 dk 25°C'da inkübe edilir.
5. Kolona 500µl Wash Buffer I eklenir.
6. 30 sn 13500 rpm'de santrifüj edilir.
7. Toplama tüpüne geçen sıvı boşaltılır. Kolona 200µl Wash Buffer II eklenir.
8. 2 dk 14500 rpm'de santrifüj edilir. Toplama tüpleri atılır.
9. Kolonlar 2 ml'lik eppendorf'a yerleştirilir. 75µl Elution Buffer eklenir.
10. 75 sn 13500 rpm'de santrifüj edilir.
11. Eppendorf tüplerine geçen RNA'lar NanoQ'da ölçülür. 260 nm/280 nm'de 1,7-2,0 kalite beklenir.
12. RNA'lar -80°C'de saklanır.

Ek 5. Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti protokolü

Kullanıma başlamadan önce bütün kimyasallar ve RNA örnekleri erimeye bırakılır. Prosedüre başlamadan önce erimiş örnek ve kimyasallar çöktürülür. Bütün kimyasallar ve RNA örnekleri buz üzerinde korunmalıdır.

MIX:

Total RNA veya poly (A) mRNA (NanoQ ölçümüne göre) (1µg)	x µl
10X RT Random primer	2 µl
Su, PCR grade (RNA miktarına göre)	3,2 µl
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase İnhibitor	1 µl

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 6. 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;

- 4.0 µL PCR için uygun saflıkta su
- 10 µL Reaksiyon enzimi (Probe master)
- 1.0 µL Forward Primer
- 1.0 µL Reverse Primer
- 4.0 µL 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 :Erkan ALABAŞ

Doğum Tarihi : 01.08.1987

E-mail : erknalabas@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2011-2014
Yüksek Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2015-2018

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Kısmi Zamanlı	Mersin Üniversitesi	2017-2018

YAYINLAR

Sözlü Sunum

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Alabaş, E., Özçimen, A. A. Pan-Aurora Kinaz İnhibitörü Olan Danusertib'in Pankreas Kanseri Hücrelerinde Otofaji Üzerine Etkilerinin Araştırılması, I. Uluslararası Mersin Sempozyumu, Abstract Book, 51-52s. Mersin, Türkiye, 2018.
2. Alabaş, E., Özçimen, A. A. CFPAC-1 Pankreas Adenokarsinoma Hücrelerinde Yara Açma Deneyi İle Migrasyon Analizi, I. Uluslararası Mersin Sempozyumu, Abstract Book, 53-54s. Mersin, Türkiye, 2018.
3. Alabaş, E., Özçimen, A. A. Pan-Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib İle CFPAC-1 Pankreatik Kanser Hücrelerinde Migrasyon Analizi, I. Uluslararası Mersin Sempozyumu, Abstract Book, 55-56s. Mersin, Türkiye, 2018.
4. Alabaş, E., Özçimen, A. A. MIA Paca-2 İnsan Pankreatik Karsinoma Hücrelerinde Yara Açma Deneyi İle Migrasyon Analizi, I. Uluslararası Akdeniz Sempozyumu, Abstract Book, 36-37s. Mersin, Türkiye, 2018.
5. Alabaş, E., Özçimen, A. A. İnsan Pankreatik Kanser Hücrelerinde Dapı-A Yöntemi İle Otofajik Hücrelerin Belirlenmesi, I. Uluslararası Akdeniz Sempozyumu, Abstract Book, 38-39s. Mersin, Türkiye, 2018.
6. Özçimen, A. A., Alabaş, E. Danusertib Uygulanan MIA Paca-2 İnsan Pankreatik Kanser Hücrelerinin CIM-Plate 16 Kullanılarak Migrasyon Analizi, I. Uluslararası Akdeniz Sempozyumu, Abstract Book, 299-300s. Mersin, Türkiye, 2018.