T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANKREAS KANSERİNDE MUC1, MUC4, MUC16 MOLEKÜLLERİ İLE TREG HÜCRELERİ VE EPİTELYAL-MEZENKİMAL TRANSİZYON ARASINDAKİ İLİŞKİ

Uzm. Biol. Işınsu Melis GÖÇER

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, çalışmalarım sırasında emeğini hiç esirgemeyen, bana inanan ve yol gösteren, önümde akademik bir pencere aralayan, sayesinde öğrenirken keyif aldığım tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Füsun Özmen'e gönülden teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca eğitimime katkıda bulunan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Lale Doğan'a, Doç. Dr. Hande Canpınar'a ve Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya teşekkür ederim.

Eğitimimize her zaman destek olan, mesleki gelişimimiz konusunda bizi özgürleştiren, yoğun iş tempomuzda yüksek lisans yapabilmemize imkan tanıyan sevgili hocam Başkent Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı bölüm başkanı Prof. Dr. Handan Özdemir'e bize açtığı ufuklar için teşekkür ederim. Tezimin immünohistokimyasal değerlendirmelerini yapan, geç saatlere kadar mikroskop başında birlikte çalıştığımız, beni hep destekleyen, her zaman akıl danışabildiğim, kendisinden çok şey öğrendiğim hocam ve ablam Doç. Dr. Gonca Özgün'e katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden beri derslerde ve deneylerde bana hep yardımcı olan, bilimsel ufkunu ve bakış açısını çok sevdiğim sevgili arkadaşım Emre Gedik'e, ihtiyaç duyduğumda hep yanımda olan sevgili arkadaşım Utku Horzum'a, bana her zaman pozitiflikleriyle destek olan ekip arkadaşlarım Çiğdem Çelik, Melek Günindi, İlknur Gündüz, Ceren Narin ve Özge Ergen'e çok teşekkür ederim. Laboratuvarda dirsek temasında çalıştığım, kimi zaman fikir danıştığım, ihtiyaç duyduğum zamanlarda bana destek olan tüm Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı yüksek lisans ve doktora öğrencilerine ve tüm teknisyenlere teşekkürlerimi sunarım.

Bu sürecimde emeği büyük olan meslektaşlarım, oda arkadaşlarım; bilimsel sohbetlerimizle ufkumu genişleten, takıldığım her noktada, kafam her karıştığında yanımda olan arkadaşım Ayşegül Yücel Polat'a, desteklerini hep yanımda hissettiğim, sürecimi her zaman paylaşan ve beni anlayan canım arkadaşlarım Pınar Arıbal ve Ceren Gülgör'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Neşesini, duruşunu, pozitif bakış açısını her zaman çok sevdiğim, sürecimi paylaşan, meslek hayatımın ilklerini birlikte yaşadığım, hep yanımda olan sevgili hocam, ablam, arkadaşım Doç. Dr. Merih Tepeoğlu'na teşekkür ederim.

Ve asıl teşekkür, gelişimim ve yolculuğumda her zaman yanımda olan, bana inanmaktan hiç vazgeçmeyen canım aileme; ilk öğretmenim biricik Meralciğime, canım Bengi'ye, can arkadaşım, dostum Nihan'a ve en büyük destekçim olan, tez yazma sürecimde de hep yanımda olan yol arkadaşım eşim Barbaros'a…

İyi ki varsınız.

ÖZET

GÖÇER I.M, Pankreas Kanserinde MUC1, MUC4, MUC16 Molekülleri ile Treg Hücreleri ve Epitelyal-Mezenkimal Transizyon Arasındaki İlişki, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Yüksek Lisans Programı, Ankara, 2020. Pankreas kanseri, artmış invazyon ve metastaz kapasitesine sahip, kısa yaşam süresi olan kanser türlerinden bir tanesidir. Transmembran müsinler normalde epitel dokuyu koruma fonksiyonuna sahipken ekspresyonlarının tümör dokuda arttığı belirlenmiştir. Epitelyal Mezenkimal Transizyon (EMT) aktivasyonunun da tümör invazyonunu indüklediği bilinmektedir. Treg hücrelerin tümör mikroçevresinde bulunması ise immünsüpresif bir ortam oluşmasına katkı sağlayarak tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışını kolaylaştırmaktadır. Bu tezin amacı transmembran müsinleri (MUC1, MUC4, MUC16) ve EMT moleküllerinin (E-Kaderin, N-Kaderin, TWIST) ekspresyon düzeyleri ile mikroçevrede bulunan FOXP3+ Treg hücreleri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Ayrıca bu çalışmada, moleküllerin ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik bulgular arasındaki ilişkinin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Araştırmaya 50 (18K) pankreas kanseri hastası arşiv dokuları dahil edildi, hastaların ortalama yaşı 69,7(40-94) olarak bulundu. Analizler *real-time* PCR (Q-PCR) ve immünohistokimya (IHC) yöntemi ile yapıldı. Tümörlü dokudaki rölatif gen ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. Verilerin TNM evresi, diferansiyasyon, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz gibi klinikopatolojik bulgular ile ilişkisi araştırıldı. Tümörde MUC1 in ekspresyon düzeylerinde belirgin bir fark izlenmedi MUC4 ve MUC16'nın gen ve molekül ekspresyon düzeyleri tümörlü dokuda normal dokuya göre artmış olarak saptandı ($p<0,05$) ve aralarında pozitif bir korelasyon bulundu ($p<0,001$). FOXP3 gen ve molekül ekspresyonu tümörde anlamlı artış gösterdi ($p<0,05$). Tümörde E-Kaderin gen ve molekül ekspresyon kaybı, N-kaderin ve TWIST ekspresyon artışı değerlendirildi ve 24 hastada (%48) EMT olduğu belirlendi. E-Kaderin ve TWIST'in tümörde gen ve molekül ekspresyon değişimi anlamlı bulundu ($p<0,05$). FOXP3 ve MUC16'nın tümörde artan ekspresyonu ile TNM evresi arasında anlamlı bir korelasyon saptandı ($p<0,001$) ve ilk evrelerde bu genlerin yüksek ekspresyonu dikkat çekiciydi. EMT görülen hastalarda da FOXP3 gen ekspresyon düzeyi artış gösterdi. MUC16 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların CA 19-9 serum düzeyi arasında anlamlılık tespit edildi ($p<0,05$). Sonuç olarak pankreas kanserinde eksprese olan MUC16, FOXP3 ve EMT'ye ilişkin bulgularımız MUC16 ve Treg hücrelerinin EMT'yi destekliyor olabileceğini düşündürmektedir. Gelecekte, onkogenezin erken evrelerinde ekspresyonu artan bu genlerin, birbirleriyle olası ilişki mekanizmalarını açıklamaya yönelik yeni araştırmalar planlanabilir, bu mekanizmaların belirlenmesi yeni hedef moleküllerin belirlenmesinde rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, transmembran müsinler, FOXP3, Treg, EMT

Destekleyen kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Proje No: TYL-2018-17498, Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No: KA 18/284

ABSTRACT

Gocer I.M., The Relationship Between MUC1, MUC4, MUC16 Molecules and Treg Cells and Epithelial-Mesenchymal Transmission In Pancreatic Cancer, Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Master Thesis of Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2020. Pancreatic cancer has a poor prognosis due to its increased invasion and metastasis capacity. Transmembrane mucins normally have as their functions to protect the epithelial tissues but their expression level is has been found to increase in tumors. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role to understand the potential mechanisms for tumor progression and metastasis. Treg cells are critical for maintaining immune tolerance, but they can also impede antitumor immune responses. Treg cells promote tumor progression and metastasis via their immune-suppressive functions. The study aims to investigate the relationship between transmembrane mucins (MUC1, MUC4, MUC16) and the expression levels of EMT molecules (E-Cadherin, N-Cadherin, TWIST) and FOXP3+ Treg cells in the microenvironment. Also in this study, it was aimed to determine the relationship between the expression levels of molecules and clinicopathological findings. Archive tissues of 50 (18F) pancreatic cancer patients were included in the study, the mean age of the patients was 69.7 (40-94). The analysis was performed by real-time PCR (Q-PCR) and immunohistochemistry (IHC). The relative gene expression levels in tissues were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The relations between expression levels and tumor differentiation, TNM stage, lymph node metastasis, and metastasis were investigated. There was no significant difference in the expression levels of MUC1 in the tumor. The gene and molecular expression levels of MUC4 and MUC16 were found to be increased in tumor tissue compared to normal tissue ($p < 0.05$) and positive correlation was found between them ($p < 0.001$). FOXP3 gene and molecule expression levels were found to be significantly increased in tumor tissues ($p < 0.05$). Loss of gene and molecule expression, an increase of N-cadherin and TWIST expression were analyzed in the tumor. EMT was detected in 24 patients (48%). E-Cadherin and TWIST gene and molecule expression changes were found significant in the tumor ($p < 0.05$). There was a significant correlation between the increased expression of FOXP3 and MUC16 in the tumor and the TNM stage ($p < 0.001$), and the high expression of these genes in the early stages was remarkable. The levels of FOXP3 gene expression increased in EMT-active patients. In addition, MUC16 gene expression was found to be significant between patients serum levels of CA 19-9 ($p < 0.05$). In conclusion, our findings on MUC16, FOXP3 and EMT expressed in pancreatic cancer suggest that MUC16 and Treg cells may support EMT. Further studies can be planned to explain the possible mechanisms of interaction of these genes and these mechanisms can play a role in determining new target molecules in pancreatic cancer.

Key words: Pancreatic cancer, transmembrane mucins, FOXP3, Treg cell, EMT

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. (SRC Project No: TYL-2018-17498)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI iii

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI iv

ETİK BEYAN SAYFASI v

TEŞEKKÜR vi

ABSTRACT viii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

ŞEKİLLER xvii

TABLOLAR xix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Pankreas Kanseri ve Sınıflandırılması 5

2.2. Transmembran Müsinler 7

2.2.1. MUC1 Molekül Yapısı ve Fonksiyonu 8

2.2.2. MUC4 Molekül Yapısı ve Fonksiyonu 10

2.2.3. MUC16 Molekül Yapısı ve Fonksiyonu 11

2.2.4. Pankreas Kanseri ve MUC1, MUC4, MUC16 ilişkisi 13

2.2.5. Transmembran Müsinlerinin (MUC1, MUC4, MUC16) İnvazyon ile İlişkisi 15

2.3. Regülatuvar T Hücreleri *(Regulatory T Cell, Treg)* 18

2.3.1. Treg Hücrelerinin Yapısı ve İşlevi 19

2.3.2. Treg Hücrelerinin Pankreas Kanseri ve İnvazyon ile İlişkisi 20

2.4. Epitelyal-Mezenkimal Transizyon (EMT) Süreci 22

2.4.1. Pankreas Kanseri ve EMT İlişkisi 23

2.5. Transmembran Müsin Molekülleri (MUC1, MUC4, MUC16) ve EMT Arasındaki İlişki 28

2.6. Regülatuvar T Hücreler ve EMT Arasındaki İlişki 30

2.7. Pankreas Kanserinde İnvazyon ve Metastaz Kapasitesinin Azalmasına Yönelik Terapötik Yaklaşımlar 31

2.8. Amaç 31

3. GEREÇ ve YÖNTEM 33

3.1. Olguların Genel Özellikleri 33

3.2. Hasta Materyallerinin Hazırlanması 33

3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri 34

3.4. İmmünohistokimyasal Kesitlerin Değerlendirilmesi 36

3.4.1. MUC1 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi 37

3.4.2. MUC4 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi 38

3.4.3. MUC16 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi 38

3.4.4. FOXP3 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi 39

3.4.5. E-Kaderin Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi 39

3.4.6. N-Kaderin Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi 39

3.4.7. TWIST Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi 40

3.5. Makroskobik Diseksiyon İşlemi (Parafin Blokların Moleküler Araştırmalar için Hazırlanması) 41

3.6. Parafin Bloklardan RNA İzolasyonu 42

3.6.1. Deparafinizasyon 43

3.6.2. RNA İzolasyonu 44

3.6.3. RNA Miktarının Ölçülmesi 45

3.7. Cdna Sentezi 46

3.8.Real-Time PCR ve Analizi 47

3.9.Agaroz Jel Elektroforezi 51

3.10. İstatistiksel Analizler 52

4. BULGULAR 53

4.1. Pankreas Kanseri Hastalarının Yaş ve Cinsiyet Dağılımı 53

4.2. Pankreas Kanseri Hastalarının Klinikopatolojik Parametreleri 53

4.3. Pankreas Kanserinde Gen Ekspresyon Düzeyleri (Q-PCR) 57

4.3.1. Transmembran Müsin (MUC1, MUC4, MUC16) Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri ve Korelasyonları 57

4.3.2. Epitelyal-Mezenkimal Transizyon Gen Ekspresyon Düzeyleri 60

4.3.3. FOXP3 Gen Ekspresyon Düzeyi 64

4.4. Pankreas Kanserinde Moleküllerin Ekspresyon Düzeyleri (IHC) 67

4.4.1. Transmembran Müsin (MUC1, MUC4, MUC16) Moleküllerinin Ekspresyon Düzeyleri 67

4.4.2. Epitelyal-Mezenkimal Transizyon (EMT) Moleküllerinin Ekspresyon Düzeyleri 72

4.4.3. FOXP3 Molekül Ekspresyon Düzeyi 77

4.5. Gen Ekspresyon Düzeyleri ile Molekül Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması 78

4.6. Gen ve Molekül Ekspresyon Düzeyleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Korelasyonu 80

4.6.1. Gen Ekspresyon Düzeyleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması 80

4.6.2. Molekül Ekspresyon Düzeyleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması 84

4.7. Sağkalım Analizi 85

5. TARTIŞMA 90

6. SONUÇ ve ÖNERİLER 97

7. KAYNAKLAR 103

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

EK-3: Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
ACTB	Beta Aktin, ß-aktin
AJCC	Amerikan Kanser Ortak Komitesi *(American Joint Committee on Cancer)*
AKT	Protein Kinaz B
ALP	Alkalen Fosfataz
AMOP	Adhezyon ilişkili alan
bHLH	*basic-helix-loop-helix*
CA 19-9	Kanser Antijen 19-9
CANNTG	DNA üzerinde proteinlerin bağlanma alanları olan E-kutuları
CAR	Kimerik Antijen Reseptör *(Chimeric antigen receptor)*
CDH1	Cadherin-1
CDH2	Cadherin-2
cDNA	Komplementer DNA
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
CRP	C-reaktif protein
CTL	Sitotoksik T lenfosit
CTLA-4	Sitotoksik T Lenfosit Antijen-4 *(Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)*
DC	Dendritik Hücre
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
E-Cad	Epithelial Cadherin, E-Cadherin
ECM	Ekstraselüler matriks (*extracellular matrix*)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü *(*epidermal *growth factor receptor)*
EMT	Epitelyal Mezenkimal Transizyon
ErbB2	Eritroblastik onkogen B2
ERK	*Extracellular signal regulated kinase*
EtBr	Etidyum Bromür
FAK	Fokal adezyon kinaz
F-aktin	Fibroz aktin
FOXC2	Forkhead Box P2
FOXP3	Forkhead Box P3
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
IFN- γ	İnterferon gama
IHC	İmmünohistokimya
IL	İnterlökin
IL-2	İnterlökin-2
iTreg	indüklenmiş Treg
Kb	kilo baz
kDa	kilo dalton
KW	Kruskal Wallis
MAPK	mitojen-aktive protein kinaz (Mitogen activated protein kinase)
MDSC	myeloid kökenli baskılayıcı hücre
MET	mezenkimal-epitelyal geçiş
miRNA	mikroRNA
MMP-7	Matriks metalloproteinaz-7
mRNA	Messenger (Haberci) RNA

MUC1	Müsin-1
MUC16	Müsin-16
MUC4	Müsin-4
MWU	Mann Whitney U
N-Cad	Neural Cadherin, N-Cadherin
NIDO	nidogen benzeri alan
NK Hücre	*Natural Killer*- Doğal Öldürücü Hücre
PanIN	Pankreatik intraepitelyal neoplazi
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PD-1	Programlı Ölüm Proteini 1
PDAK	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PDL-1	Programlı Ölüm Ligandı 1
RNA	Ribonükleik asit
SMC	Sialomüsin kompleks
ß-catenin	Beta katenin
TAM	Tümör ilişkili Makrofaj (Tumor-associated macrophage)
TBE	Tris-borate-EDTA
TCR	T hücre Reseptörü
TF	Transkripsiyon Faktörü
TGF-ß	Transforming Büyüme Faktörü-Beta
TME	Tümör mikroçevresi
TNM	T (tümör)-N (nod=lenf nodu)- M (metastaz)
Treg	Regülatuvar (Düzenleyici) T hücreleri
tTreg	Timik Treg hücreleri
UV	Ultraviyole

VKİ	Vücut Kitle İndeksi
IPMN	İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi
VNTR	Değişken tandem tekrar dizisi *(Variable number tandem repeat)*
ZEB	*Zinc finger E-box-binding homeobox* protein
ZO-1	*Zonula occludens*-1

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Pankreasın anatomisi	5
2.2.	Normal MUC1 ve Tümör ilişkili MUC1 arasındaki fark.	9
2.3.	MUC4'ün fonksiyonel alt birimleri.	11
2.4.	MUC16 yapısının şematik gösterimi.	12
2.5.	A-) *E-Cadherin* B-) *N-Cadherin* yapısı.	25
3.1.	Makrodiseksiyon işlemi.	42
3.2.	Real-time PCR'da tümör örneklerinin görünümü	50
3.3.	FOXP3 geninin real-time pcr ile gösterimi	50
3.4.	Real-time PCR'da TWIST'in görünümü	51
3.5.	Tüm genlerin amplifikasyon ile elde edilen ürün büyüklüklükleri.	52
4.1.	Pankreas kanseri hastalarında serum belirteçlerinin değişimi.	56
4.2.	Pankreas kanserinde transmembran müsinlerin gen ekspresyon düzeyleri.	58
4.3.	MUC1 gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.	58
4.4.	MUC4 gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.	59
4.5.	MUC16 gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.	60
4.6.	Pankreas kanserinde EMT belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri	61
4.7.	E-Kaderin gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.	62
4.8.	N-Kaderin gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.	62
4.9.	TWIST gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.	63
4.10.	Epitelyal mezenkimal transizyon süreci.	64
4.11.	FOXP3 geninin agaroz jel elektroforez görünümü	64
4.12.	Pankreas kanserinde FOXP3 gen ekspresyon düzeyleri	65
4.13.	FOXP3 gen ekspresyonunun EMT'ye göre dağılımı.	66
4.14.	Pankreas kanseri hastalarının normal dokuya göre tümör dokularındaki gen ekspresyon düzeylerinin değişimi.	67
4.15.	MUC1 antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.	68
4.16.	MUC4 antikoru ile dokuda boyanma.	70
4.17.	MUC16 antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.	71
4.18.	E-cadherin antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.	74
4.19.	N-Kaderin antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.	75

Şekil		**Sayfa**
4.20.	TWIST antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma	76
4.21.	Pankreas kanseri hastalarında EMT profili.	76
4.22.	Tümör dokuda ve normal dokuda FOXP3 durumunun gösterimi.	77
4.23.	Pankreas kanseri hastalarında genlerin sağkalıma etkisi.	86
4.24.	PDAK'da tümör diferansiyasyonunun sağkalıma etkisi.	88
5.1.	Tez araştırma şeması.	92

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	TNM Evreleme Sistemi.	6
2.2.	Pankreas kanserinde TNM evrelerinin belirlenmesi.	7
3.1.	İmmünohistokimyada kullanılan antikorların klonları ve dilüsyon oranları	36
3.2.	cDNA sentezinde kullanılan bileşen miktarları ve final konsantrasyonları	47
3.3.	Real-Time PCR'da kullanılan gen primer dizileri	48
3.4.	Eş zamanlı PCR bileşen miktarları ve final konsantrasyonları	48
3.5.	Real Time PCR reaksiyon koşulları.	49
4.1.	Pankreas Kanseri Hastalarının Cinsiyet ve Yaş Dağılımı	53
4.2.	Pankreas kanseri hastalarının klinikopatolojik bulguları	55
4.3.	Pankreas kanseri tanısında önemli olan serum belirteçlerinin hastalardaki düzeyleri	56
4.4.	Transmembran müsinlerin gen ekspresyon dağılımları.	57
4.5.	Epitelyal-mezenkimal transizyon gen ekspresyon dağılımları.	61
4.6.	FOXP3 gen ekspresyon dağılımı	65
4.7.	MUC1 molekül ekspresyonunun tümör ve normal dokuda hastalara göre dağılımı.	69
4.8.	MUC4 molekül ekspresyonunun tümör ve normal dokuda hastalara göre dağılımı.	70
4.9.	MUC16 molekül ekspresyonunun tümör ve normal dokuda hastalara göre dağılımı.	72
4.10.	EMT moleküllerinin immünohistokimyasal değerlendirilmesi.	73
4.11.	FOXP3 molekülünün hastalara göre boyanma durumu	78
4.12.	Gen ve molekül ekspresyon düzeylerinin korelasyon analizi.	78
4.13.	Transmembran müsin genlerin ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması	81
4.14.	FOXP3 ekspresyonu ve klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması.	82
4.15.	EMT genlerinin ekspresyonları ile klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması	83
4.16.	Pankreatik kanseri hastalarının tümör dokusunda eksprese olan moleküller ile klinikopatolojik parametrelerinin karşılaştırılması (IHC)	85

Tablo		Sayfa
4.17.	Pankreas kanseri hastalarında genlerin sağkalıma etkisi.	86
4.18.	Pankreas kanseri hastalarına ait yaşam tablosu ve sağkalım istatistikleri.	89

1. GİRİŞ

Pankreas kanseri en fazla ölüme neden olan malign tümörlerden biridir. Karsinogenezde rol alan biyolojik mekanizmaların anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalara, yeni hedef molekül keşfi için yapılan araştırmalara ve gelişmiş cerrahi tekniklere rağmen, sağkalım süresi oldukça kısadır. Birçok kanserin aksine, pankreas kanserinin insidansı ve mortalitesi giderek artmaktadır. Pankreas kanserinin 2030 yılında dünyada kansere bağlı ölümlerin en önemli ikinci nedeni olabileceği tahmin edilmektedir (1).

Pankreas kanserine neden olan faktörler tam olarak bilinmese de sigara kullanımı, kronik pankreatit varlığı, obezite, artmış vücut kütle indeksi (VKİ), diabetes mellitus ve çeşitli genetik sendromlar pankreas kanseri ile ilişkilidir. Pankreas kanserinin kötü prognozunun temel nedenleri; tümörün artmış invazyon yeteneği, yüksek metastaz kapasitesi, kemoterapi ve radyoterapiye karşı yüksek direnç göstermesidir. Bu nedenle pankreas kanseri için yeni tedavi stratejilerine duyulan ihtiyaç hayati önem taşımaktadır (2, 3).

Pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAK), pankreasın en sık görülen neoplazmıdır. PDAK'ın erken evrede tespiti çok önemli olmasına karşın rutinde kullanılan immünohistokimyasal bir tümör belirteci bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda müsinlerin anormal ekspresyonları dikkat çekmektedir ve tümör dokusunda müsinlerin yüksek ekspresyonu önemli bir araştırma alanı oluşturmuştur (3, 4).

Pankreas kanserinde transmembran müsin ailesi üyeleri olan MUC1, MUC4 ve MUC16'nın aşırı ekspresyonunun kötü prognoz ve kemorezistans ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Tümör progresyonunda ve metastazında kritik bir rol oynadıkları ise bilinmektedir. İmmünohistokimyasal araştırmalar neticesinde MUC1, MUC4, MUC5AC, MUC16 gibi moleküllerin PDAK'da artmış ekspresyonları bilinmektedir (4).

Müsinler, epitelyal bariyerlerin bütünlüğünü korumakla görevli, transmembranda veya sekrete halde bulunan kompleks yapılı glikoproteinlerdir. Transmembran müsinler (MUC1, MUC4 ve MUC16 vs.) epitel hücrelerinin

yüzeylerinde lokalize olarak hücre bütünlüğünün sağlanmasında ve adezyonunda önemli rol oynarlar. Malign dönüşüm sırasında transmembran müsinler polarite kaybına uğrayarak epitelyal yüzeylerde yeniden yapılandırılırlar ve epitelyal-mezenkimal transizyon (EMT) molekülleriyle etkileşime girebilirler. Böylece EMT programı indüklenir ve doğal mekanizmanın bozulması ile malign hücreler agresif bir kimlik kazanabilirler. Transmembran müsinlerinin anormal ekspresyonları PDAK'ın yanısıra pankreasın intraduktal papiller müsinöz neoplazi(IPMN)'leriyle de ilişkilendirilmiştir(5).

Müsinler sırasıyla, tümör büyümesini, proliferasyonunu, onkojenik sinyal iletimini, EMT gelişimini ve metastazı kolaylaştırır. Dahası, tümör mikro çevresini oluşturan stromal hücreler, ekstraselüler matriks (*extracellular matrix*, *ECM*), büyüme faktörleri ve sitokinler doğrudan ile etkileşirler. Pankreas kanserinde anormal musin ekspresyonu, malign hücrelerin ve tümör mikroçevresinin kompleks senkronizasyonunu içerir. Onkojenik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler, inflamatuvar faktörler ve hipoksik ortam, müsin ekspresyonunda gözlenen değişimler için başlıca aracılar olarak görev yaparlar. Bu işlevleri nedeniyle, müsinlerin tümör hiyerarşisindeki çok yönlü rolü tartışılmaktadır. Bazı çalışmalar tümör mikroçevresinin (*tumor microenvironment*, TME) bileşimi ve davranışında doğrudan ve dolaylı olarak müsinlerin rolünü açığa çıkarsa da müsin ailesi üyelerinin birlikte ekspresyonlarının nasıl gerçekleştiği, polimorfik ve mutasyona uğramış formlarının patofizyolojik önemi henüz bilinmemektedir. Bu konulara açıklık getirilmesiyle inhibitör ajanların kullanımı, daha etkin terapötiklerin geliştirilmesi, erken teşhis ve/veya prognostik belirteçlerin tasarlanması söz konusu olabilecektir. Müsinlerin pankreas kanserindeki rolü ile ilgili yapılacak araştırmalar, aynı anda tümör hücreleri ile mikroçevresinin hedeflenmesini sağlayan terapötik stratejilerin geliştirilmesine yol açabilirler (5, 6).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, regülatuvar T hücrelerinin (Treg) kanser gelişimini kontrol eden immün tolerans mekanizmalarını anlamada önemli bir bileşen olduğu gösterilmiştir. Tümör ilişkili Treg'ler tümör mikroçevresi için önemli immün hücrelerdir. Tümör hücrelerinde Treg'lerin artmış oranının kötü prognozla

ilişkili olduğu ve tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışında rol oynadığı bilinmektedir (7).

Epitelyal-mezenkimal transizyon (EMT), epitelden mezenkimale fenotipik geçiş olarak tanımlanan morfolojik, hücresel bir programdır. Adheran epitel hücrelerin, hücresel motilite ve invazivlik de dahil olmak üzere mezenkimal özellikler kazandığı gelişimsel bir süreçtir. Normalde erken embriyonik dönemde önemli biyolojik rolü olan EMT karsinogenezde de temel bir rol oynar. Sayısız yayın, malign transformasyon, kanser progresyonu ve metastazda EMT'nin önemini vurgular (8).

Metastaz ile ilgili birçok çalışmada, dolaşımdaki tümör hücrelerinin, hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçler eksprese ettiğinin gösterilmesi EMT sürecinin kanser yayılımındaki önemini vurgulamaktadır. Çalışmalar, pankreas hücrelerinde güçlü EMT inhibitörleri olan SNAIL veya ZEB moleküllerinin kaybının, PDAK metastazını engellemediğini, dolayısıyla EMT'nin klasik kavramına ters düştüğünü göstermiştir. Bu durum, EMT'nin ilerleyişinde farklı mekanizmaların da yer aldığını düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, EMT, malign bir tümör saptanmadan önce ortaya çıkabilmektedir. Yapılan bazı *in-vitro* çalışmalar, pankreatik intraepitelyal neoplazilerin (PanIN), EMT'nin karakteristik özelliklerini sergilediğini göstermiştir (9).

Fareler üzerinde yapılan *in-vitro* bir çalışmada, radyasyon ile indüklenen pulmoner fibroziste, EMT ve ß-kateninin Treg'ler üzerindeki etkileri incelenmiş; tipik EMT özelliklerine sahip olan kanser hücrelerinin, immünosüpresif T hücre fonksiyonunu uyardığı gözlenmiştir. EMT ve ilgili ß-katenin birikimini kontrol eden Treg kavramı, yeni bir mekanizma olarak sunulmuştur. Çalışmada Treg'lerin radyasyonla ortamdan uzaklaştırılması ile farelerin akciğer dokularında EMT molekülleri ve ß-katenin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (10). Elde edilen veriler, Treg'lerin, EMT'yi kısmen hızlandırdığını göstermektedir.

I.Akalay ve arkadaşlarının meme kanserinde yaptığı bir çalışma, EMT'nin immünoterapi direncinde oynadığı önemli rolü açıklığa kavuşturmuştur(11). EMT geçiren kanser hücreleri, ana hücrelerinden çok daha fazla metastatiktir ve bu

hücrelerin immünosüpresyon–yapan $CD4^+$ Treg'lerin indüklenmesine neden olduğu gösterilmiştir. EMT ve immünsüpresyon arasındaki etkileşimin malign neoplazide araştırılması gereklidir.

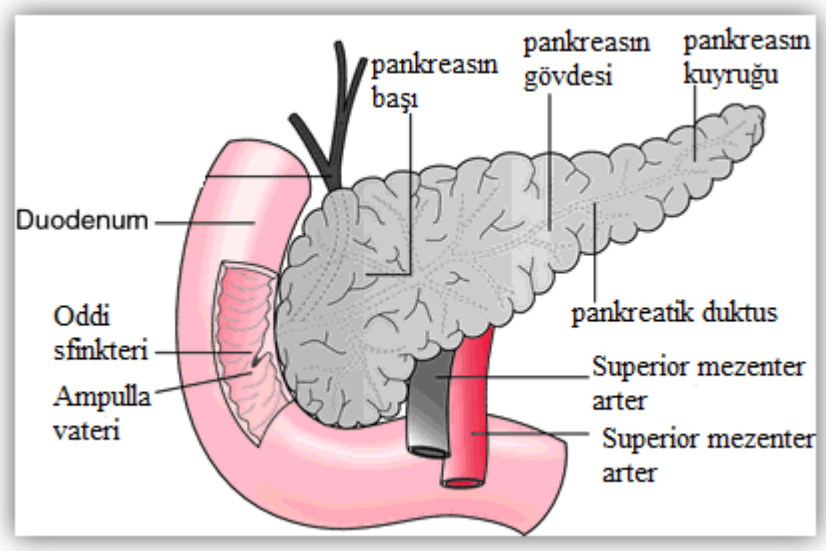
Literatüre bakıldığında EMT ve Treg ilişkisine dair çalışmaların genellikle fare ve/veya hücre hattı çalışmaları olduğu ve insan kanserlerinde hasta dokularıyla yapılan araştırmaların daha az olduğu dikkat çekmiştir(10, 12-14). Bu literatür bilgileri doğrultusunda bizim çalışmamızda, insan pankreas kanserlerinde, kanser hücrelerinden eksprese olan transmembran müsin moleküllerinin (MUC1, MUC4, MUC16) ekspresyon düzeyleri ile EMT molekülleri ve Treg molekülleri ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmadaki temel amacımız pankreatik duktal adenokarsinomada, müsin moleküllerinin (MUC1, MUC4, MUC16) ve EMT moleküllerinin (E-cadherin, N-cadherin, TWIST) ekspresyon düzeyleri ile FOXP3+ Treg hücrelerinin tümör mikroçevresindeki varlığının ilişkisini araştırmak ve bu süreçte yer alan moleküllerin klinikopatolojik bulgular açısından önemini belirlemektir. Çalışma sonucunda elde edilecek bilgiler bundan sonra yapılacak olan hedef tedavi araştırmaları açısından yol gösterici nitelikte olabilirler.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri ve Sınıflandırılması

Pankreas retroperitoneal bir organdır ve anatomik olarak baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere temelde dört bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin özellik taşıyan bir organdır. Yaklaşık %80-90'ını sindirim enzimleri salgılayan ekzokrin bezler, %10-20'sini ise Langerhans adacıklarının yer aldığı endokrin bezler oluşturur. Akut-kronik pankreatit ve pankreas kanseri ekzokrin pankreasın en belirgin hastalığıdır (15, 16).



Şekil 2.1. Pankreasın anatomisi. (Ref. (17) den uyarlanmıştır.)

Pankreas kanserinin neredeyse %70'i pankreas başından kaynaklanmakta, gövde veya kuyruktan köken alan tümörler ise daha az görülmektedir. Neredeyse tüm lezyonlar duktal epitelden gelişim gösterirler. Pankreas kanseri çoğunlukla komşu yapı ve organlara invazyon yapana dek sessiz ilerler, büyük boyutlara ulaşıp geniş bir yayılım yaptıklarında saptanırlar. Retroperitonel boşluğa yayılma, çevre sinirlere infiltrasyon yapma, bazen de duodenumu, transvers kolonu, dalağı, vertebraları invaze etme eğilimi gösterirler (15, 16).

Pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAK), pankreasta en sık görülen glandüler neoplazmdır. Tanı anında çoğu pankreatik duktal adenokarsinom, pankreas

parankimini invaze etmiştir ve opere edilemez. PDAK için teşhiste TNM evrelemesinden yararlanılır; bu durum tümör progresyonunun hızını ve metastaz kapasitesini vurgular niteliktedir (4).

TNM Evrelemesinde, *The American Joint Committee on Cancer* (AJCC) tarafından geliştirilen sınıflandırma sisteminden yararlanılmaktadır. Bu evrelemenin amacı pankreas kanseri hastalarını tümörün patolojik durumuna göre sınıflandırarak hastalık prognozunu öngörmek ve tedaviyi yönlendirerek süreci anlaşılabilir kılmaktır (18). TNM evrelemesi tümörün büyüklüğü (T), lokal lenf nodları durumu (N) ve metastaz (M) varlığına bağlı olarak tümörü derecelendirir. (Tablo 2.1)

Tablo 2.1. TNM Evreleme Sistemi.

Primer tümör (T)
TX Primer tümör değerlendirilemiyor
TO Primer tümör ile ilgili bulgu yok
Tis İn situ karsinom
Tl Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı ≤ 2 cm
T2 Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı ≥ 2 crm
T3 Tümör direkt olarak duodenum, safra kanalı veya peripankreatik dokulara yayılmış
T4 Tümör direkt olarak mide, dalak, kolon veya komşu kan damarlarına yayılmış
Bölgesel lenf nodları (N)
NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
NO Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok
NI Bölgesel lenf nodu metastazı
pNla Tek bir bölgesel lenf noduna metastaz
pNlb Multipl bölgesel lenf nodıına metastaz
Uzak metastaz (M)
MX Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor
MO Uzak metastaz yok
Ml Uzak metastaz

Pankreas kanseri için TNM sınıflandırmasında kullanılan AJCC 8. Evreleme sistemi 2019 yılında modifiye edilmiştir. Yapılan düzenlemede evre IIA ve IIB

tümörler tek bir kategoride birleştirilirken, evre III tümörlerin ayrımı yapılmıştır (19). Tabloda AJCC sisteminde yapılan son evrelendirme görülmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Pankreas kanserinde TNM evrelerinin belirlenmesi.

Evre IA → T1 N0 M0
Evre IB → T2 N0 M0
Evre II → T3 N0-1 M0, T1-2 N1 M0
Evre III A → T1-2 N2 M0
Evre III B → T3 N2 M0, T4 NxM0
Evre IV → T1-4 N0-2 M1

2.2. Transmembran Müsinler

Mukozal yüzeyler vücut boşluklarını kaplar ve gastrointestinal sistemde organları örterek patojenlere karşı bir bariyer görevi görür. Mukozayı düzenleyen epitel hücreleri "müsin" denilen glikoproteinleri salgılar. Goblet hücreleri tarafından iki tip müsin salgılanır: Jel oluşturan sekrete müsinler ve transmembran müsinler. MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 ve MUC19 sekrete müsinleri oluşturur. MUC1, MUC3A, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 ve MUC20 ise transmembran müsinlerdir. Transmembran müsin ailesinin üyeleri, sitoplazmik sinyal iletimi, alan kompozisyonu ve uzunluk gibi özelliklerle birbirlerinden farklılık gösterirler (20, 21).

Transmembran müsinler epitelin apikal yüzeyinde bulunan büyük yapılı glikoproteinlerdir. Karaciğer, pankreas, mide, safra, tükrük bezleri ve göz gibi birçok sağlıklı organda eksprese olur ve bu organlarda çeşitli patojenlere karşı mukozal bariyerin korunmasında rol alırlar. Sağlıklı dokuların yanısıra birçok kanserde de transmembran müsinlerin artmış ekspresyonu dikkati çekmiştir. Özellikle kolon, meme, uterus ve pankreas kanserlerinde transmembran müsinlerin aşırı ya da anormal ekspresyonu kaydedilmiştir ve müsinlerin aşırı ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (20).

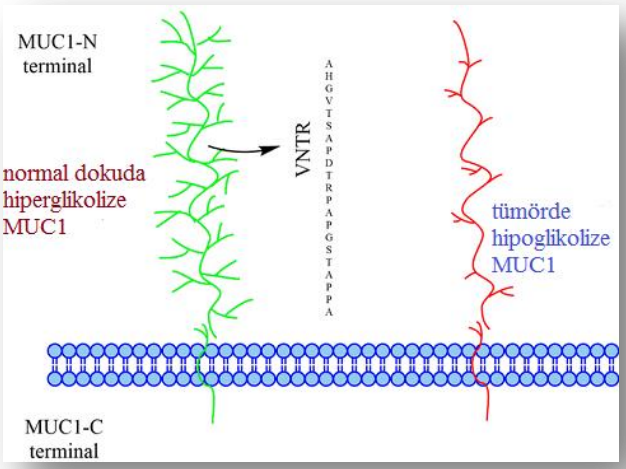
Transmembran müsinlerinin kanserde artmış ekspresyonun nedenleri kesin olarak bilinmemektedir. Bulundukları organlarda ve üstlendikleri rollere göre farklılık gösterebilirler. Bu çalışmada, pankreas kanserinde transmembran müsin molekülleri olan MUC1, MUC4 ve MUC16'nın normal ve tümörlü dokudaki ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

2.2.1. MUC1 Molekül Yapısı ve Fonksiyonu

MUC1, tek geçişli tip 1 transmembran bir glikoproteindir. Episialin, PEM, H23Ag, EMA, CA15-3, MCA olarak da bilinir. Kromozom 1q22'de lokalizedir (21). Uzunluğu 4 ila 7 kb arasındadır ve 3.7 ila 6.4 kb'lik transkriptler oluşturur. MUC1 sitoplazmik, transmembran ve ekstraselüler olmak üzere üç ana bölümden oluşur. İnsanlarda bulunan ekstraselüler alan, serin, treonin ve prolinden zengin 20 amino asitten oluşur ve 20-125'lik *tandem* tekrarlar içerir. Proteinin ağırlığı 120-225 kDa kadardır ancak matür glikolize formlarda 250-500 kDa aralığında değişkenlik gösterebilir (22, 23).

Kolon, mide, pankreas, duodenum, uterusta, memenin glandüler hücrelerinde ve hematopoetik hücrelerde salgılandığı bilinmektedir. Bu dokularda epitel tabakasının korunmasını sağlar. MUC1 çoğu insan epitelyal kanserinde aşırı eksprese edilir ve bu nedenle onkojenik bir molekül olarak dikkat çekmektedir. MUC1'in pankreatik duktal adenokarsinomanın tümör progresyonu ve metastazında da kritik rol oynayan bir transmembran glikoprotein olduğu düşünülmektedir (24).

MUC1, hücre dışındaki N terminal bölgesi, aminoasit tekrar birimi ve hücre içindeki C-terminal bölgesinden oluşur (25). Normal epitel hücrelerinde, MUC1 apikal yüzey üzerinde lokalize olur ve koruyucu bir bariyer sağlar. Normal hücreler malign hücrelere dönüştüklerinde ve polaritelerini yitirdiklerinde, MUC1 artık apikal yüzeye sınırlı değildir; hipoglikozile olarak birçok büyüme faktörü reseptörü ile etkileşebilir. MUC1'in normal ve kanserli hücrelerdeki görünümü Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Normal MUC1 ve Tümör ilişkili MUC1 arasındaki fark. (Ref. (25)'den uyarlanmıştır.)

MUC1'in tümörle ilişkili formu onkojenik sinyal iletiminde önemli bir rol oynamaktadır ve bu onkojenik sinyal iletiminin MUC1'in sitoplazmik kuyruğu (MUC1-CT) ile oluştuğu bilinmektedir (26). MUC1-CT fosforile edildikten sonra, β-katenin ve diğer transkripsiyon faktörleri ile birleşir ve N-terminal ucundan serbest kalır. Çekirdeğe giderek bazı sinyal yolaklarını (TGF-ß/SMAD4, ERK sinyal yolağı gibi) aktive eder. MUC1-CT 72 amino asit uzunluğundadır ve hücre içi kinazlar tarafından fosforillenen yedi adet tirozin aminoasidi bulundurur. Bu fosfotirozinler bir proto-onkogen olan c-Src gibi moleküller için bir bağlanma bölgesi olarak işlev görürler. Grover ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir hücre kültürü çalışmasında, SMAD4–susturulmuş pankreatik tümör hücrelerinde, MUC1'in aşırı ekspresyonunun, TGF-β ile indüklenen apoptozu doğrudan azalttığı ve MUC1-CT'deki tirozinler tarafından iletilen sinyallerin tümör hücrelerinin invaziv potansiyelini arttırdığını gösterilmiştir (27).

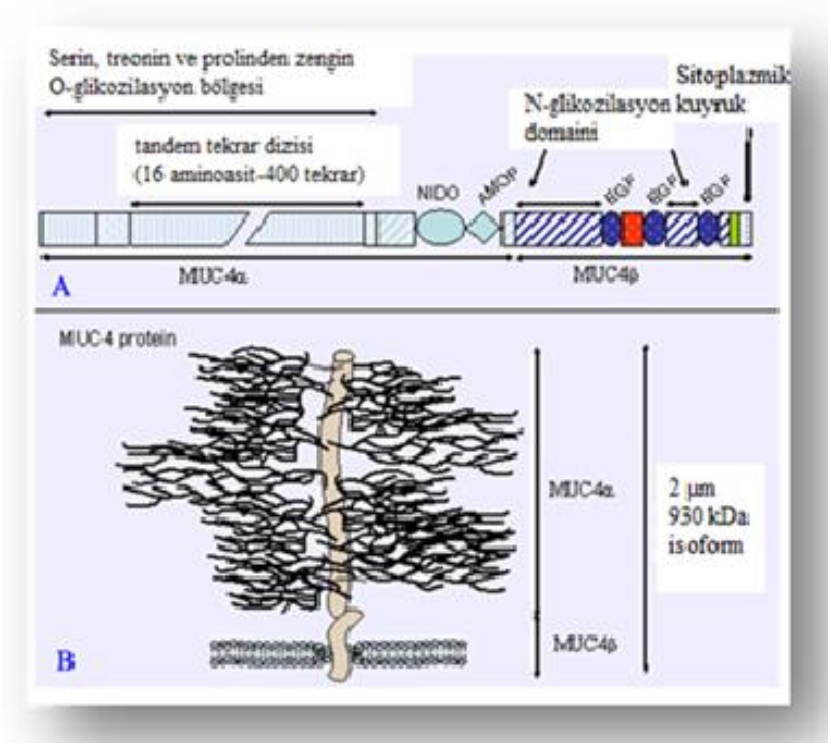
Roy ve arkadaşlarının PDAK fare modelinde yaptığı bir araştırmada ise pankreas kanseri hücrelerinde MUC1'in aşırı ekspresyonunun EMT'nin artan invazivlik ve metastazın moleküler sürecini tetiklediğini gösterilmiştir. Buna göre, MUC1 fare modelinde genetik olarak silindiğinde veya MUC1-CT mutasyona uğradığında EMT'nin önemli ölçüde azaldığını bildirmişler (28).

2.2.2. MUC4 Molekül Yapısı ve Fonksiyonu

MUC4 geni 3q29 kromozom bölgesinde lokalizedir ve 550-930 kDa ağırlığındaki bir transmembran müsini kodlar (21). MUC4, serin ve treonin bakımından zengin ekstrasellüler alan, epidermal büyüme faktörü benzeri üç bölge, transmembran alan, kısa sitoplazmik kuyruk ve bir tirozin fosforilasyon bölgesinden oluşur (Şekil 2.3.). Ekstraselüler alan çoğunlukla, çok sayıda O-glikozilasyon bölgesi taşıyan, geniş bir tandem tekrar [TR] dizisinden oluşur. Bu alanı nidogen benzeri alan (NIDO) ve adezyon ilişkili alan (AMOP) alanları izler (29, 30).

Aminoasit dizi homolojisi nedeniyle MUC4'ün MUC4α ve MUC4ß olmak üzere iki fonksiyonel alt grubu olduğu tahmin edilmektedir. MUC4α'nın müsin benzeri, MUC4ß'nın ise transmembran büyüme faktörü benzeri bir alt ünite olduğu düşünülmektedir. Transmembran müsin ailesinin bir üyesi olan MUC4, solunum sistemindeki epitel hücrelerinde ve tükürük, gözyaşı anne sütü gibi vücut sıvılarında bulunur. Sağlıklı dokulardaki ekspresyonuna ek olarak, meme, prostat ve pankreas kanseri gibi çeşitli karsinomlarda anormal bir MUC4 ekspresyonu olduğu rapor edilmiştir (30).

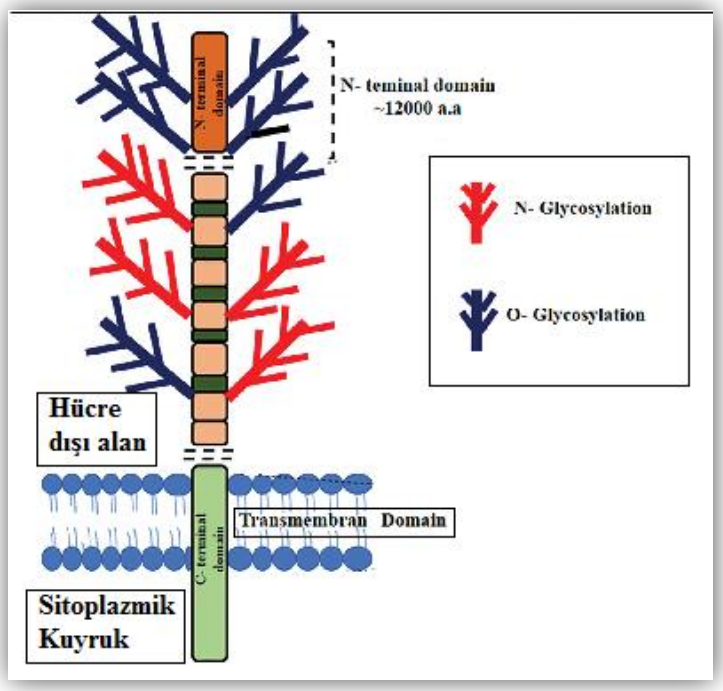
MUC4 transmembran müsinler arasında en fazla farklılık gösteren ve pankreas kanserinde artmış ekspresyonu olan bir glikoproteindir. MUC4'ün pankreas kanseri patobiyolojisine ve tümörün agresif kimlik kazanmasına katkıda bulunduğu Gautam ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (31). Bu araştırmacılar MUC4 ekspresyonunun inhibe edilmesiyle, pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunun ve metastazının azaldığını ve terapötik ajanlara duyarlılığın arttığını fare modellerinde ksenograft tümörleri kullanılarak *in vitro, in vivo* ve *ex vivo* olarak göstermişlerdir.



Şekil 2.3. MUC4'ün fonksiyonel alt birimleri. (Ref.(32)'den uyarlanmıştır.)

2.2.3. MUC16 Molekül Yapısı ve Fonksiyonu

MUC16 müsini "CA 125" olarak da bilinir. CA 125, 1981 yılında monoklonal antikor olan OC125'in geliştirilmesiyle bulunmuştur. CA 125 ilk olarak over kanseri hücrelerinin yüzeyindeki ekspresyonuyla tanınmıştır ve bugün de klinikte over kanseri için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. CA 125 çok büyük bir molekül ağırlığına sahiptir ve biyokimyasal yapısı karmaşıktır (33). 2001 yılında Yin ve ark. tarafından ilk CA125 cDNA klonu sekanslandığında, ilgili gen bölgesinin MUC16 müsin proteinine karşılık geldiği bulunmuştur (34, 35). MUC16 proteini 19. kromozomun kısa kolunda, 19p13.2'de lokalizedir (21). MUC16 yaklaşık 22.000 amino asitlik çekirdek *(core)* proteini ve molekül ağırlığı 2.5 MDa olan bilinen en büyük müsindir. Protein omurgasında N-terminal ve C terminal uçları arasında, MUC1 ve MUC4'e göre çok daha geniş olan, 156 aminoasitten oluşan bir *tandem* tekrar dizisi (VNTR) bulunmaktadır. MUC16, farklı potansiyel fosforilasyon bölgeleri olan 32 amino asitlik kısa bir sitoplazmik kuyruk içerir (Şekil 2.4) (33, 36, 37).



Şekil 2.4. MUC16 yapısının şematik gösterimi. (Ref. (33)'den uyarlanmıştır.)

MUC16 sağlıklı dokuda, oküler yüzey, trakeal yüzey, karın boşluğunun mezotel astarı, endometrial doku glandları ve servikal epitel gibi birçok organın epitelinde eksprese olmaktadır. Normalde, diğer müsin tiplerinde olduğu gibi epitelde koruyucu bir bariyer görevi üstlenir ve mukozayı korur. MUC16'nın sitoplazmik kuyruğu aracılığıyla diğer adhezyon molekülleri ve immün hücreleriyle etkileşerek, farklı organlarda çeşitli roller üstlendiği bilinmektedir (33).

Birçok çalışmada MUC16'nın over kanseri, mesane kanseri, pankreas kanseri gibi birçok kanser tipinde aşırı eksprese edildiği, metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. MUC 16 aşırı ekspresyonu, malignitede kötü prognoz ile bağlantılı bulunmuştur. Mesane kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada, anormal MUC16 salınımının hastalarda kötü prognoza neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca MUC16'nın pankreas kanseri hücrelerinin metastazını teşvik ettiği bildirilmiştir (33, 36, 38). Haridas ve arkadaşlarının MUC16 ekspresyonunun pankreas kanserinin progresyonu ve metastazındaki etkisini analiz ettikleri bir hücre kültürü araştırmasında, metastatik lezyonlarda primer tümöre kıyasla daha güçlü MUC16 ifadesi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tümörde ekspresyon artışı izlenirken normal

pankreas dokusunda ve pankreatit dokularında MUC16 ekspresyon artışı görülmemiş (39). Özetle, pankreas kanserinde MUC16 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını ve hastalığın ilerlemesinde MUC16'nın potansiyel bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

2.2.4. Pankreas Kanseri ve MUC1, MUC4, MUC16 ilişkisi

Transmembran müsinler kolon, meme, over, pankreas gibi birçok kanserde anormal veya aşırı eksprese edilir ve bu yüksek ekspresyon durumu kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Birçok kanserde yaygın olarak görülmesine karşın, müsin ekspresyonu ile karsinogenez arasındaki ilişkinin mekanizması henüz tam olarak gösterilememiştir (20).

Müsinlerin epitel için koruyucu rolünün yanı sıra, epitel yenilenmesi, farklılaşması, hücre adezyonu ve sinyal iletimi gibi önemli biyolojik olaylarda da yer aldıkları bilinmektedir (6).

Hücrelerin malign transformasyonunda, özellikle epitelyal kanserlerin patogenezinde müsinlere sıklıkla rastlanmaktadır. Patoloji çalışmalarının immünohistokimya analizleri sonucunda adenokarsinomlarda yüksek düzeyde müsin üretildiği bildirilmiştir. Tümörlerin, büyüme, invazyon ve hatta metastaz yapabilmek için bulundukları mikroçevreyi yapılandırarak müsinleri kullandıkları düşünülmektedir. Müsinlerin farklı oligosakarit yapılarının olması ve çekirdek *(core)* proteinlerinin farklı şekillerde glikolize olması sayesinde, tümör hücreleri diğer adezyon molekülleriyle etkişebilmek için müsinleri kullanabilmektedirler. Yani, kanser hücrelerinin olumsuz büyüme koşullarından korunmak, invazyon ve metastaz kabiliyetlerini artırmak için müsinleri normal epitel gibi kullanabildiği belirtilmektedir (6, 40, 41).

Pankreasın pre-neoplastik ve neoplastik lezyonlarında farklı transmembran müsinlerin yapı ve ekspresyonunda değişiklikler görülmüştür. Bu nedenle, müsinlerin ve müsin ilişkili serum antijenlerinin (CA 125 gibi) pankreas kanserinin erken teşhisinde veya pankreas kanseri ile pankreasın benign hastalıklarının spesifik ayrımında potansiyel birer biyobelirteç olabilecekleri düşünülmektedir (5).

Hücre kültürü çalışmalarında, MUC1 ekspresyonunun kronik pankreatit ve normal pankreas dokusuna kıyasla, pankreas kanseri hücrelerinde yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca yayınlanmış veriler, pankreas kanseri hücrelerinde sitoplazmatik ve membrana bağlı MUC1 ekspresyon düzeyleri arasındaki kalitatif farklılıkları göstermektedir. Normal pankreas dokusunda ve kronik pankreatit varlığında, sitoplazmatik boyama görülmezken, pankreas kanseri hücreleri, anormal bir glikozilasyon paterni ile karakterize edilir(5, 29). Bu nedenle onkojenik sinyal iletiminin müsinlerin sitoplazmik kuyruğu aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Pankreas kanserinde MUC1, epitel hücrelerin polarite kaybını teşvik ederek, büyüme ve sağkalım yollarını destekleyerek, reseptör tirozin kinaz sinyal yolaklarını aktive ederek ve stres kaynaklı hücre ölüm yoluna direnç sağlayarak onkogeneze katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (41).

MUC4 ekspresyonu, normal pankreatik duktusta saptanmazken, pankreatik intraepitelyal neoplazilerden (PanIN) adenokarsinomlara doğru kademeli bir artış göstermektedir. MUC4 ekspresyonu neoplastik transformasyonu indükleyerek onkogenezi ve metastazı destekler. Tümör hücrelerinin tümör mikroçevresi *(tumor microenvironment, TME)* ile etkileşimini düzenleyerek tümör direncine katkıda bulunmaktadır. MUC4'ün EGFR ailesiyle, fibulin-2 gibi ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleriyle ve galectin-3 gibi metastazı destekleyen moleküller ile etkileşim gösterdiği bildirilmiştir (31). MUC4, ErbB2'nin spesifik fosforilasyonunu indükleyerek ve hücre döngüsü inhibitörlerinden siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27'nin ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonu ve epitel farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (41). Ayrıca, MUC4'ün pankreas kanserindeki artmış ekspresyonunun TME bileşenlerine ek olarak, T-hücreler üzerinde de etkili olduğu, özellikle sitotoksik T-lenfositlerin apoptozunu kolaylaştırarak tümörlerin immün sistemden kaçışına yardımcı olduğu gösterilmiştir (42). Literatürde MUC4, PDAK patolojisindeki aşırı ekspresyonu ve fonksiyonel değişimi nedeniyle, immünoterapötik stratejilerin etkinliğini arttırmak için potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğine dikkat çekilmektedir (31).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda MUC16 ekspresyonunun diğer transmembran müsinlerde olduğu gibi, prekürsör invaziv lezyonlardan (PanIN)

kansere progresyonda kademeli olarak arttığı görülmüştür. Normal pankreas dokusunda saptanmazken kanser progresyonunda MUC16 artışının görülmesiyle, atipi/şüpheli lezyon ayrımında spesifitesinin yüksek olduğu belirtilmiş ve biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (39, 43). Özellikle metastatik tümörlerde MUC16'nın anormal ekspresyonuyla daha sık karşılaşılmıştır. 2016 yılında Crispr/Cas9 teknoloji kullanılarak yapılan klinik bir araştırmada, PDAK hücrelerinde MUC16 ve fokal adezyon kinazı (FAK) arasında yeni bir etkileşim ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada, MUC16-susturulmuş hücrelerde mezenkimal ekspresyonun azaldığı ve epitelyal ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. MUC16 kaybının, FAK aracılı Akt-ERK / MAPK aktivasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiş ve MUC16 fokal adezyon sinyallerinin PDAK büyümesini ve metastazı kolaylaştırmada kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (44).

Ek olarak, CA 125 özellikle over kanseri prognozunda kullanılan önemli bir serum belirtecidir. Over ve meme kanserleri başta olmak üzere insan epitelyal kanserlerinde CA 125 seviyesi yüksektir. CA 125 antijeni MUC16 çekirdek *(core)* proteinin üzerinde bulunan konformasyonel epitoplara bağlanır. Pankreas kanserinde de artan CA 125 seviyesinin de tümör gelişiminde ve kötü prognoz ile anlamlı bir ilişkisi olabileceği düşünülmektedir (40, 45).

2.2.5. Transmembran Müsinlerinin (MUC1, MUC4, MUC16) İnvazyon ile İlişkisi

İnvazyon ve metastaz gelişimi karmaşık bir olaydır. Metastaz kısaca, tümör hücrelerinin primer gelişim bölgelerinden ayrılarak başka bölgelerde koloni oluşturma sürecidir. Metastatik süreçte ilk önce bazal membranı aşan hücreler stromayı işgal ederek intravazasyon yaparlar. Kan ve lenfatikler aracılığıyla taşınan tümör hücreleri, daha sonra ekstravazasyon yaparak tutunacağı organda koloni oluşturur ve ikincil tümör böylece oluşur. Bu süreç son derece komplekstir ve tümör hücrelerinin taşınmasında yardımcı rol üstlenen birçok immün hücre bulunmaktadır. Tümör hücreleri, hücre etkileşimlerini kendi lehine kullanmayı başarır. Metastaz hücre yüzeyinde önemli moleküler süreçler içerir: İstilacı tümör hücreleri ile stroma arasındaki temasların kırıldığı 'anti-adezyon' süreci ve tümör hücreleri ilerledikçe

yeni temasların kurulduğu ‘adezyon’ süreci. Bu süreçler, hücre adezyonuna ve anti-adezyona aracılık eden moleküllerin koordine ekspresyonu ile gerçekleştirilebilir ve müsinler bu aktivitelerin tümünü etkiler. Müsinler, anti-adezyon hem de adezyon etkilerine aracılık eden domainler içerir. Böylece, proteolitik aktiviteyi bloke edebilirler veya otokatalitik proteolitik aktiviteye sahip olabilirler (6, 40). Bu nedenle müsinlerin hücre-yüzey özelliklerini yeniden yapılandırarak tümör hücrelerinin invazyon kapasitesine ve metastaza katkı sağladıkları düşünülmektedir.

Transmembran müsinler reseptör-ligand etkileşimleri veya hücre yüzeyinin adezyon durumu hakkında hücrelere sinyaller sağlar. Bu sürecin en iyi bilinen ve araştırılan örneği MUC1’dir. MUC1'in tümörlerin progresyonuna ve metastatik özelliklerine katkıda bulunduğuna dair bulgular vardır ancak farklı tümör tiplerinde etkisi değiştiği için, kesin işlevi tam olarak anlaşılamamıştır. Farklı tümörlerde yapılan MUC1 ekspresyon seviyelerini değerlendiren klinik araştırmalarda, MUC1'in aşırı ekspresyonunun kolon, pankreas ve oral epitelin invaziv ve metastatik tümörleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. MUC1'in hem adezyon hem de adezyon önleyici etkilere aracılık ettiği bildirilmiştir. MUC1'in glikozile tandem dizi tekrarı, hücre yüzeyinin 200-500 nm üzerinde uzayabilen bir yapı sağlar. Ayrıca MUC1’in üzerindeki oligosakkarit ve protein yapılarının da adezyon moleküllerine bağlanarak hücre adezyonuna aracılık edebileceği gösterilmiştir (40). Pankreatik tümör hücrelerinin transkripsiyon profili ve invaziv ve metastatik özellikleri üzerinde yapılan bir araştırmada MUC1'in yapısındaki tandem dizilerinin hücre yüzeyinin özelliklerine katkısının sitoplazmik kuyruğun sinyal iletim fonksiyonlarıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, MUC1’in sitoplazmik kuyruğu (MUC1-CT) ‘nun tümör hücrelerinin invaziv ve metastatik aktivitelerine katkıda bulunan çok sayıda gen ürününün transkripsiyon profilini etkileyen sinyaller sağladığı bildirilmiştir (46).

Çeşitli karsinomlarda, MUC4’ün anormal ekspresyonunun malign transformasyondaki önemi bilinmektedir. Amerika’da 2004 yılında yapılan bir araştırmada, MUC4’ün fonksiyonel önemini anlayabilmek için, pankreas kanseri hücre hattı olan CD18/HPAF’da MUC4’ün ifadesi inhibe edilmiştir. Çalışmada MUC4'ün hücre hattındaki yüksek ekspresyonu, antisens-MUC4 RNA'yı eksprese

eden bir plazmid yapısının stabil entegrasyonu ile susturulmuştur ve oluşan fenotipte tümör progresyonu ve metastazında azalma görülmüştür (30, 47). Daha sonra yapılan çalışmalarda tümör büyümesindeki MUC4 ile ilişkili artışın, artmış proliferasyon ve pankreatik kanser hücrelerinin azalmış apoptozundan kaynaklandığı gösterilmiştir. Ratlarda yapılan araştırmalarda ise, MUC4'ün çoklu mekanizmalarla tümör oluşumunu ve metastazını güçlendirdiği gösterilmiştir. Sialomüsin kompleksi (SMC), MUC4'ün ratlardaki homoloğudur. Yapılan bir rat in vivo tümör transplantasyon deneyinde, SMC aşırı eksprese eden hücrelerin intravenöz enjeksiyonu, SMC ekspresyonu inhibe edilmiş hücrelerin enjeksiyonundan çok daha fazla akciğer metastazı ile sonuçlanmıştır. SMC'nin metastatik odakların oluşumunu destekleyerek metastazı güçlendirdiği belirtilmiştir. Böylece tümör metastazının MUC4/SMC ekspresyonunun regülasyonu ile modüle edilebileceği hayvan modellerinde gösterilmiştir (30, 31, 48).

MUC16'nın ise kanser metastazındaki önemli rolü, yüksek afiniteli bir glikoprotein olan mezotelin (MSLN) ile bağlanabildiğinin keşfiyle gösterilmiştir. Bu etkileşim, kanser hücrelerinin mezotele bağlanmasını kolaylaştırarak over ve pankreas kanseri hücrelerinin peritoneal metastazına yol açar. Bu mekanizmanın ise yüksek MMP-7 seviyeleri ve p38 mitojenle aktifleştirilen protein kinazın (MAPK) artmış fosforilasyonu ile düzenlendiği düşünülmektedir. Ayrıca MUC16'nın benzer bir şekilde selektinlere de bağlanabildiği ve pankreas kanseri hücrelerinin metastazını destekleyebildiği bulunmuştur (43, 49). Epitelyal tümörlerde adhezyon proteinlerinin önemi bilinmektedir. Bu nedenle pankreatik duktal adenokarsinomada da hücre-hücre etkileşimleri ve bağlar oldukça büyük önem taşır. Bunlara ek olarak, pankreas kanseri hastalarının çoğunda bulunan dolaşımdaki müsin konsantrasyonlarının (örneğin MUC16/CA 125 gibi), bağışıklık tepkilerini etkileyebilme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Müsinleri aşırı eksprese eden malignitelerde sıklıkla görülen immün supresyonun da müsinlerin sitoplazmik kuyrukları aracılığıyla önemli yollarda diğer hücre ve moleküllerle etkişerek işlev kazanmaları olduğu düşünülmektedir (40).

Özetle, literatürden edindiğimiz mevcut veriler, transmembran müsinlerin, hem glikolize hücre dışı bölgeleri hem de hücre farklılaşmasını, apoptozu ve

inflamasyonu düzenleyen yollarla etkişebilen hücre içi bölgeleri aracılığıyla tümör hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırarak karsinogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (20). Transmembran müsinlerin farklı süreçlerde edindiği bu kritik roller malign transformasyonda ve özellikle invazyon ve metastaz aşamalarında giderek önem kazanır. Bu müsinler birçok tümörde karşımıza çıkmalarına rağmen, transmembran müsinlerin kapsamlı ve karşılaştırmalı olarak bir arada incelendiği çok sayıda çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda MUC1, MUC4 ve MUC16'nın pankreatik duktal adenokarsinomada ekspresyon düzeyleri incelenecektir.

2.3. Regülatuvar T Hücreleri *(Regulatory T Cell, Treg)*

Self antijenlere yanıtsızlık yani immünolojik tolerans iki ana kategoriye ayrılır: Santral tolerans ve periferal tolerans. Santral (merkezi) tolerans, kemik iliği ve timüs gibi primer lenfoid organlarda bulunan immatür lenfositlerle ilişkilidir. Periferik (çevresel) tolerans ise, matür lenfositlerin periferik organlarda self antijenlerle karşılaşması sonucu oluşur (50, 51).

Regülatuvar T hücrelerinin periferik toleransın indüklenmesinden ve korunmasından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Treg hücreleri özellikte timusta veya nadiren periferik dokularda self antijenleri tanıyan CD4+ T hücrelerden farklılaşırlar. Treg'ler, başka bir hücre tipinin aktivitesini etkileyerek immün yanıtı işlevsel olarak baskılayan bir T hücresi popülasyonu olarak tanımlanabilir (51).

Treg'ler, ilk olarak Gershon ve ark. tarafından 1970'de baskılayıcı T hücreleri (suppressive T cells) olarak adlandırılmıştır (52, 53). 1975 yılında ise Sehon ve ark. tarafından düzenleyici T hücrelerinin tümör bağışıklığını olumsuz olarak düzenlediğini ve yaptıkları araştırmalarda Treg'lerin farelerde tümör büyümesine katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir (54). 1980 yılında ise, North ve ark. tarafından, fareler üzerinde yapılan bir kanser araştırmasında Treg'lerin varlığı gösterilmiştir. Çalışmada, tümörlü farelerden alınan CD4+ CD25+ T hücrelerinin, tümör reddini inhibe ettiğini gösterilmiştir (55). İmmün toleranstaki inhibitör rolünün yanı sıra karsinogenezde düzenleyici rol üstlenmesi nedeniyle "regülatuvar (düzenleyici) T hücreleri" olarak adlandırılmıştır.

Treg hücreleri, gelişimsel kökenlerine göre iki geniş gruba ayrılabilir. "Doğal Treg hücreleri" olarak da bilinen "Timik Treg hücreleri (tTreg hücreleri)", timusta CD4 + tek pozitif timositler olarak ayrı bir soy olarak üretilir ve self peptitler için yüksek afinite gösteren T hücresi antijen reseptörleri (THR) *(T-cell receptor, TCR)* sergilerler. Treg'lerin immün baskılayıcı mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamış olsa da Treg'lerin supresif yeteneğinin büyük olasılıkla mikro çevreye ve kontrol edilecek hedef popülasyona bağımlı olduğu bilinmektedir. Treg'ler işlevlerini spesifik hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla hücre temas mekanizmaları sağlayarak gerçekleştirir; IL-10, TGF-ß ve IL-35 gibi inhibitör sitokinlerin salgılanmasıyla immun supresyon oluştururlar. Treg hücrelerinin ikinci grubu ise, indüklenebilir Treg (iTreg) 'lerdir. Bu hücreler periferde naif CD4+ T hücrelerin antijenlerle karşılaştıktan sonra farklılaşması ile gelişirler. Hem tTreg hem de iTreg'ler transkripsiyon faktörü FOXP3 ekspresyonu ve CD25 yüzey ekspresyonu ile karakterizedirler (56-58).

2.3.1. Treg Hücrelerinin Yapısı ve İşlevi

Düzenleyici T hücreleri (Treg)'nin çoğunluğu CD4+ fenotipindedir. Hücre yüzeylerinde yüksek düzeyde CD25 bulunur. IL-2 reseptörünün alfa (α) zincirini taşırlar. Treg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için FOXP3 *(forkhead box P3)* olarak adlandırılan transkripsiyon faktörüne ihtiyaç duyulur. İnsan ve farelerde FOXP3 gen mutasyonlarının sıklıkla sistemik otoimmün hastalıklara neden olduğu görülmüştür. Bu durum Treg hücrelerinin self toleranstaki önemini sergiler niteliktedir (51, 58).

FOXP3, *forkhead box* (FOX) proteini ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür. FOX proteini ilk olarak Drosophila embriyosunda tanımlandı ve gen ekspresyonunu düzenlemek için nükleusun içinde lokalize olduğu bulundu.

Tüm FOX ailesi üyeleri, transkripsiyonel bir aktivatör veya inhibitör görevi gören bir forkhead (FKH) domainine sahiptir. FOX'un forkhead domaini yaklaşık 700 genin transkripsiyonunu düzenleyebilir. 90'lı yılların sonunda FOXP3 Treg'lerin gelişimi ve fonksiyonundaki önemli bir regülatör olarak bulunmuştur. Keşif çalışmaları

sırasında, CD4+ CD25− T hücrelerinin, FOXP3'ün ekspresyonundan sonra Treg fenotipine dönüşebildiği gösterilmiştir (59, 60).

FOXP3, Treg'lerin "imza" gen ifade profilini stabilize eder. FOXP3 kaybı Treg hücrelerinin inhibitör fonksiyonunu azaltır ve proinflamatuvar sitokinleri kodlayanlar da dahil olmak üzere karakteristik olmayan efektör gen ekspresyonuna izin verir (59).

2.3.2. Treg Hücrelerinin Pankreas Kanseri ve İnvazyon ile İlişkisi

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, kanser gelişiminde regülatuvar/düzenleyici T hücrelerinin immün tolerans mekanizmalarının immün yanıtı anlamada önemli bir bileşen olduğu gösterilmiştir. Tümör ilişkili Treg'ler tümör mikroçevresi için önemli immün hücrelerdir. Tümörde Treg hücrelerinin artmış oranının kötü prognozla ilişkili olduğu ve tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışında rol oynadığı bilinmektedir (7, 10, 58).

Hücresel ve moleküler immünolojideki ilerlemeler, tümör hücreleri ile immün hücreler arasındaki etkileşimlerin çok daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Tümörlerin immün yanıttan kaçınmak için birçok farklı mekanizma kullandığı açıkça görülmektedir. Otoimmüniteyi baskılayarak işlev gören Treg hücrelerin, kanserlere karşı immün yanıtı azaltabildiği bilinmektedir. Birçok çalışma, çoğu kanserde çeşitli histolojik tiplerin tümörlerinde doğrulanmış immünosüpresif aktiviteye sahip çok sayıda CD25+ CD4+ lenfositin olduğunu göstermiştir. Fareler üzerine yapılan bir araştırmada, kimyasal olarak indüklenmiş fibrosarkomlu farelerde CD4+ Treg'lerin varlığının tümöre karşı oluşan immün hücre yanıtını azalttığı bildirilmiştir. Deneysel araştırmalarda, tümör infiltre eden Treg hücrelerinin susturulmasının, lösemi, myelom, sarkom ve melanom gibi tümörlerin reddedilmesini desteklediği gösterilmiştir. Bu nedenle, Treg hücrelerinin kansere karşı immün yanıtı engellediğine dair önemli kanıtlar vardır (54, 55, 61).

Treg hücreleri meme, akciğer, karaciğer, pankreas kanseri, gastrointestinal kanser ve melanoma dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde bulunabilirler. Ayrıca, Treg hücreleri NK hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve B hücreleri gibi birçok anti-tümör immün hücrenin alt gruplarını baskılayabilirler. Bunu immünsüpresif

faktörler salgılayarak hücre-hücre temasını ve sitolizi inhibe ederek yaparlar ve böylece tümör büyümesini desteklemiş olurlar. Bu nedenle, FOXP3+ Treg hücrelerinin sayısının azalması tümöre karşı oluşan immün yanıtı artırarak anti tümoral etkiyi tetikleyebilir (60).

Pankreas kanserinde tümör progresyonunda Treg hücrelerinin rolünü gösteren kanıtlar insan ve fare çalışmalarından elde edilmiştir (58, 61, 62). İlk olarak, artmış Treg prevalansının pankreatik adenokarsinoma da dahil olmak üzere meme, akciğer, karaciğer, gastrointestinal kanserler ve malign melanoma gibi pekçok kanserde prognostik bir faktör olduğu gösterilmiştir (63). Treg hücreleri, premalign lezyonlarda gösterildiği gibi erken evrelerde görülmeye başlanır ve tümör progresyonu ile birlikte Treg prevalansı artar.

Tan ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, Treg hücrelerinin tümör alanına göç etmesinde etkili bir kemokin olan CCR5 kemotaksisinin bozulmasıyla, tümör mikroçevresindeki Treg oranının azaldığı ve tümör progresyonunun yavaşladığı dikkati çekmiştir (64). Bu durum, tümör mikroçevresinde Treg hücrelerin azalmasının immün yanıtı arttırdığını göstermektedir. Ayrıca Treg hücreleri ile insan pankreas kanseri hücreleri arasında yoğun bir sinyal iletiminin olduğu gösterilmiştir (61, 64-66).

Jang ve arkadaşları tarafından yapılan daha güncel bir araştırmada ise, fare deneylerinde ortamdaki Treg'lerin uzaklaştırılmasının pankreas kanserinin erken ve ileri evrelerinde, anti-tümör immün reaksiyonunu uyandırmak için yeterli olduğu gösterilmiştir (66). Tümörlere karşı oluşan bu immün yanıt sitotoksik CD8+ T hücrelerinin ürettiği interferon-γ (IFN- γ) sitokinine bağlıdır. Bu çalışmada, Treg hücrelerinin, tümörle ilişkili CD11c+ dendritik hücreler (*dendritic cell*, *DC*) ile etkileşime girdiği ve CD8+ T hücresi aktivasyonu için gerekli kostimülatör ligandların ekspresyonunu baskılayarak immünojenik fonksiyonlarını kısıtladığı gösterilmiştir.

Özetle, Treg hücre infiltrasyonu, pankreatik duktal adenokarsinomun belirgin bir özelliğini oluşturmasına karşın PDA'daki Treg hücrelerinin immün-modülatör işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle altta yatan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için araştırmalar geliştirilmektedir. Treg oranının tümörün

ilerleyen evrelerinde artış göstermesi, invazyon ve metastaz sürecinde de bu hücrelerin aracılık ettiğini düşündürmektedir.

2.4. Epitelyal-Mezenkimal Transizyon (EMT) Süreci

Epitelyal-mezenkimal transizyon (EMT) dokularda gelişim aşamalarında ortaya çıkan hücresel bir değişim programıdır. EMT, adından da anlaşılacağı üzere, epitelyal (E) ve mezenkimal (M) eksen boyunca dizilmiş hücrelerde, epitel hücrelerin mezenkimal hücre fenotipine dönüşmesidir. Epitelyal ve mezenkimal hücreler arasında önemli biyolojik farklılıklar görülür. Epitel hücreleri, hücre-hücre bağlantıları ve apikal bazal polarite gösterirken; mezenkimal hücreler apikal-bazal polariteden yoksun iğ benzeri morfolojileri ile daha yüksek bir motilite yeteneğine sahiptirler.

EMT ilk olarak 1982 yılında, lens epitelinde yapılan bir araştırma ile tanımlanmıştır. EMT programının embriyonik morfogenezin temel aşamalarından olduğu bilinmektedir. Transgenik fareler ile yapılan bir araştırma, EMT programını düzenleyen bazı transkripsiyon faktörlerinin (EMT-TF) ifadelerinin baskılanmasıyla bu süreci engellemenin ciddi gelişimsel bozukluklara neden olduğunu göstermiştir. Bu durum, fizyolojik koşullarda EMT-TF'lerinin önemini vurgular.

EMT embriyogenezin yanı sıra, yara iyileşmesi, doku fibrozisi ve özellikle kanser gelişimi gibi farklı patolojik süreçlerde de önemli bir rol oynamaktadır. Tüm bu süreçlerde, mezenkimal-epitelyal transizyon (MET) olarak adlandırılan ve EMT programın tersi olan süreç de bulunur. EMT ve MET hücre fizyolojisinde birden fazla temel değişikliğe neden olur. Normal fizyolojik bir durumda, örneğin yara iyileşmesi sırasında, yara bölgesinin epitel hücreleri, epitelyal hücre tabakasının yeniden yapılandırılmasına yardımcı olmak üzere hareketlilik kazanmak ve koordineli bir hücre grubu olarak hareket etmek için kısmi bir EMT geçirir. Sonunda, bir EMT programının aktivasyonu ile oluşturulan yarı mezenkimal hücreler, epitelyal tabaka bütünlüğünü yeniden sağlamak için MET programıyla epitelyal fenotiplerine geri dönerler (67, 68).

EMT sürecinde, mezenkimal fenotipin stabil olmadığı düşünülürken, epitelyal fenotipin ise stabil olduğu ve kolonizasyon kapasitesinin olabileceği

düşünülmektedir. EMT süreci, *Zinc finger* protein SNAIL (SNAIL), *Zinc finger E-boxbinding homeobox* 1 (ZEB) ve *Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1* (Twist) gibi EMT indükleyen transkripsiyon faktörlerini içeren epigenetik modifikasyonlar ve transkripsiyon kontrolü yapan karmaşık düzenleyici, mikroRNA (miRNA)'lar gibi transkripsiyon düzenleyicileri tarafından modüle edilir (8-10, 68).

Metastaz ile ilgili olarak, çok sayıda çalışma, dolaşımdaki tümör hücrelerinin çoğunun hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçleri eksprese ettiğini ve EMT'nin karsinomun yayılmasındaki önemli rolünü vurguladığını göstermiştir. EMT aracılığıyla, dolaşımdaki tümör hücreleri bu süreçte hayati bir rol oynar. Syn ve arkadaşları tarafından yapılan bir literatür derlemesinde, deneysel araştırmalarda meme, over ve pankreatik kanser hücreleri de dahil olmak üzere gibi pekçok kanser kök hücresi, karsinom hücrelerinin yayılması sırasında EMT'nin ortaya çıkabileceğini gösteren hem epitelyal hem de mezenkimal özellikler gösterir (69).

2.4.1. Pankreas Kanseri ve EMT İlişkisi

Pankreas kanseri, invazyon kapasitesi ve erken metastaz özelliği nedeniyle kötü bir prognoza sahiptir. Yapılan araştırmalar pankreas kanserinde EMT durumunun, portal ven invazyonu ve lenf nodu metastazı gibi kötü prognoz ve olumsuz klinik sonuçlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir. EMT süreci hem fizyolojik hem de patolojik gelişim için esastır. Pankreas kanseri gelişiminde anormal şekilde aktive edilen EMT fenotipi, tümör ilerlemesi ve tedavi direncinde büyük önem taşır.

Pankreas karsinogenezinin histolojisi ve genetiği iyi tanımlanmış olmasına rağmen, metastatik yayılmasını destekleyen moleküler mekanizmalar henüz net olarak açıklanamamıştır. Bu mekanizmalar temelde kanser hücrelerinin ekstraselüler matriksten kopma ve apoptoz sürecinin üstesinden gelme yeteneğini içerir. Bu davranış premalign lezyonlarda erken epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkilendirilmiştir. EMT sürecindeki hücreler, epitelyal hücre bağlantılarındaki bileşenlerin ekspresyonunu giderek kaybederler ve bunun yerine, mezenkimal hücre iskeleti gelişir. Sonuç olarak bu hücreler hem invaziv hem de kemorezistans özelliklerini kazanırlar. Son çalışmalar, metastazın pankreas kanserinin doğal

tarihinde erken bir olay olduğunu ve hatta tümör oluşumunun önüne geçebileceğini ileri sürmektedir (70, 71).

EMT ile indüklenen kanser hücresinin yayılmasının kötü prognozun ana nedeni olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, EMT'li kanser hücreleri, kendi kendilerini yenileme ve farklılaşma özelliğine sahip, kemoterapi ve radyoterapiye direnç gösteren, kanser kök hücresi özelliklerine sahiptir (72). Geçici olarak aktifleşen bu süreç, tümör hücrelerine agresif bir kimlik kazandırarak tümör hücrelerinin mobilizasyonu sağlar. Tümör hücrelerinin taşınımı EMT süreci ile gerçekleşir. EMT süreci primer tümörlerde görülmüş olsa da sıklıkla metastatik tümörler ile ilişkilidir.

EMT ve pankreas kanseri prognozu arasındaki ilişkini, çok sayıda EMT düzenleyicileri ile gösterilebilir. Cerrahi olarak rezeke edilen pankreas kanseri dokularında EMT durumu, E-kaderin ekspresyonunun azalması ve N-kaderin, TWIST, Snail, Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin artan ekspresyonunun saptanması ile ayırt edilebilmektedir (8, 9, 72, 73).

Çalışmamızda da EMT sürecinin varlığı *E-cadherin, N-Cadherin* ve *TWIST* ekspresyon düzeylerinin pankreas kanseri hastalarının tümör ve normal dokularında değerlendirilmesiyle gösterilmiştir.

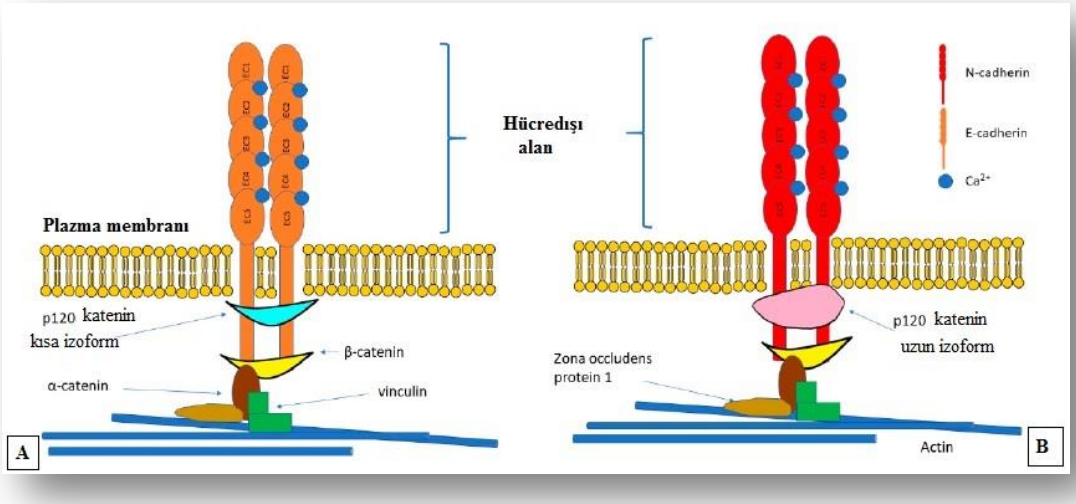
2.4.1.1. Kaderin Moleküllerinin Yapı ve İşlevi

Hücre-hücre etkileşimleri ve etkileşimlerin dinamik düzenlenmesi dokuya özgü gelişimler için önemlidir. Adezyon komplekslerinin uzamsal ekspresyonu sadece embriyogenez sırasında farklı dokuların oluşumuna ve katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda hücre sinyal iletiminde de önemli bir rol oynar. Embriyogenez sırasında, farklı hücre tipleri birbirine bağlı hücre tabakaları veya tek tek hücreler olarak göç edebilir. Hücre göçü, hücre polaritesinin değiştirilmesini ve hücre-hücre adezyon komplekslerinin dinamik düzenlenmesini içerir (74). Embriyogeneze benzer şekilde de, karsinogenezde aktifleşebilen EMT sürecinde aynı organizasyon izlenir.

Doku morfogenezinde ve koordineli hücre hareketinde yer alan başlıca protein sınıflarından biri kadherin ailesidir. Kadherinler, Ca^{2+} bağımlı hücre-hücre adezyonuna aracılık eden transmembran glikoproteinlerdir. E-kaderin (*E-cadherin,*

CDH1) kaderin ailesinin klasik örneği olup tip I grubunda sınıflandırılır. *E-cadherin*'in varlığı ve adezyonun önemli bir aracısı olduğu ilk olarak 1970'lerin sonlarında gösterildi. Diğer klasik kaderinler, N-kaderin (*N-Cadherin*, CDH2), P-kaderin (*P-cadherin*, CDH3), R ve M kaderinlerdir (74).

Matür *E-cadherin* proteini 120 kDa iken matür *N-cadherin* proteininin büyüklüğü 130 kDa'dır. E ve N-kaderin yapısı Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Kadherin sitoplazmik kuyruklar α-katenin ile bağlanan β-katenin ile bağlanır, böylece kaderin-katenin adezyon kompleksini oluşturur. Molekül α-katenin ve β-katenin, kaderinin F-aktine bağlanmasında çok önemli olmakla birlikte, F-aktini doğrudan bağlayamazlar; dolayısıyla vinculin, eplin veya *zonula occludens* protein-1 (ZO-1) gibi ek adaptörler gereklidir.



Şekil 2.5. A-) E-kadherin B-) N-kadherin yapısı. (Ref. (75)'den uyarlanmıştır.)

E-kaderin ve N-kaderin klasik kaderinlerdir ve benzer yapıları paylaşırlar ve aralarındaki yapısal farklılık, *E-cadherin*'in daha kısa p120 katenin izoformuna bağlanırken, *N-cadherin* daha uzun izoforma bağlanmasından kaynaklanır.7

2.4.1.1.1. E-kaderin Molekülü

E-kaderin, kaderin ailesinin önemli bir üyesidir. Kromozom 16q22.1'de bulunan *Cadherin-1* (CDH1) geni tarafından kodlanır. Çeşitli sinyal yolaklarını modüle ederek epitelyal fenotipin korunmasında ve dokuların homeostazının

düzenlenmesinde rol alır. Bu özellikleri sayesinde fonksiyonel olarak güçlü bir tümör baskılayıcı gibi davranır. E-kaderin, çevre hücrelere bağlanır ve epitelyal bariyer oluşturan hücreler arası bir kompleks oluşturur. E-kaderin'in ekstraselüler kısmı çevre hücrelerin kadherinlerine bağlanır ve çevre hücreler ile hücre iskeletleri arasında bir köprü oluşturur. İntraselüler alanı ise α-katenin aracılığıyla hücrelerin içindeki aktin filamentleri olan β-katenin ile etkileşir. Bu sayede hücre polaritesini düzenler.

EMT sürecinde epitel hücreler, mezenkimal karakter elde eder. Bu süreçte, epitelyal hücrelerde hücre-hücre bağlantılarının ayrılması ve E-kaderin supresyonu izlenir. Sıkı hücre bağlarının *(tight junction, gap junction, adherens junction)* zayıflaması epitelyal bütünlüğün kaybına neden olur (75). Tümör progresyonunda CDH1'in azalması veya inaktivasyonu sıklıkla gözlenmiştir. Bu durumun nedenlerine yönelik üç mekanizma önerilmiştir: germline mutasyonlar, promotor hipermetilasyonları ve alternatif olarak EMT transkripsiyon faktörleri olarak bilinen E-kaderin transkripsiyonel baskılayıcılarının artması. EMT sürecinde yer alan ve çeşitli sinyal yolaklarına katılan birçok transkripsiyon faktörü (TF) vardır; TWIST, Snail, Slug, ZEB1 ve FOXC2 gibi. Bu TF'lerin hepsi, E-kaderin'in promotor bölgesinde bulunan E-kutusuna doğrudan veya dolaylı yollardan bağlanarak transkripsiyonu bastırır ve EMT'yi indüklerler (76).

E-kaderinin azalması sıklıkla malign epitelyal kanserlerde bulunur. Mide, meme, karaciğer, pankreas ve deri dahil olmak üzere çeşitli malignitelerin gelişiminde, CDH1 promotörünün mutasyonları, proteolitik kesim, kromozomal delesyonlar, epigenetik regülasyon ve transkripsiyonel susturma gibi değişikliklerin *E-cadherin* işlevselliğini engellediği gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde E-kaderin kaybı metastatik yayılmaya ve çeşitli EMT transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur (74, 75).

2.4.1.1.2. N-Kaderin Molekülü

Cadherin-2 (CDH2) olarak da bilinen N-kaderin, embriyolarda yaygın olarak eksprese edilir. Nöral doku, beyin, kalp gibi organların gelişimi ve düzenlenmesi ile ilişkilidir (77). E-kaderin molekülünün aksine, N-kaderin epitel olmayan dokularda

yaygındır ve nöral hücreler, endotel hücreleri, stromal hücreler ve osteoblastlar gibi farklı hücre tiplerinde eksprese edilir. Nöral dokuda, N-kaderin, nörulasyon yani nöral plakanın nöral tüpe dönüşümü sırasında E-kaderin yerine geçer ve nöral dokuların yapısını korumak ve nöral progenitör hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlemek için güçlü adhezyon bağlantıları oluşturur (75).

EMT, E-kaderin ekspresyonunun azalması ve N-kaderin ekspresyonunun artması ile karakterize bir süreçtir. Bu durum kaderin değişimi (*cadherin switch*) olarak adlandırılır. E-kaderinin migrasyon baskılayıcı, epitelde koruyucu bariyer rolünün aksine, N-kaderin tümör hücrelerinin migrasyon ve invaziv kapasitelerinin gelişimine aracılık eder. Bu nedenle, N-kaderin artışının epitelyal kanser metastazı ve hastalık ilerlemesinde kritik bir adım olduğu görülmektedir (78).

N-kadherin, devam eden EMT'nin bir göstergesi olarak kullanılır ve ekspresyonu çeşitli karsinom tiplerinin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. N-kaderin artışı, onkojenik K-rasG12D modelinde, pankreatik intraepitelyal neoplazi tümör insidansının artmasına yol açar, bu da tümör büyümesini destekleyici işlev görebileceğini gösterir. Nöroblastomada da, N-kaderinin artan ekspresyonunun metastatik yayılıma neden olduğu rapor edilmiştir (74, 75).

2.4.1.2. TWIST Molekülünün Yapı ve İşlevi

TWIST, evrimsel olarak korunan *basic-helix-loop-helix* (bHLH) ailesinin bir üyesidir. Memelilerde yüksek yapısal homoloji paylaşan iki TWIST proteini vardır: TWIST-1 ve TWIST-2. TWIST-1'in metastatik gelişimde önemli rol üstlendiği bilinmektedir ve önemli bir transkripsiyon faktörüdür. TWIST-1 geni iki ekzon ve bir introndan oluşur, 7p21 kromozomu üzerinde bulunur. Sadece ekzon 1 protein kodlar. bHLH motifinde, homodimerler DNA'ya bağlanamazlar, ancak promotor dizilerini tanırlar ve diğer proteinlerle etkileşerek pozitif ya da negatif etkide bulunurlar. Twist proteinlerinin, transkripsiyon faktörleri olarak işlev görmeleri için, DNA üzerinde proteinlerin bağlanma alanları olan E-kutuları (CANNTG) olarak isimlendirilen gen bölgesine bağlanır (79, 80).

Fizyolojik süreçte TWIST proteinleri, embriyonik gelişimin çeşitli aşamalarında önemli rol oynarlar. 1999 yılında fareler üzerinde yapılan bir

araştırmada, mezenkimin gelişiminde TWIST-1'in gerekli olduğu gösterilmiştir. TWIST-1 yokluğunda ise farelerde nöral tüp defektleri görülmüştür (81). 2004 yılında ise Yang ve ark. tarafından çeşitli tümör tiplerinde yapılan seri araştırmalar ile, TWIST'in tümör metastazına önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu araştırmalara göre, TWIST1'in ekspresyon seviyesi tümör istilası ile ilişkili bulundu ve TWIST1'in siRNA susturulması, meme kanseri hücrelerinin metastazını baskıladı (82, 83). TWIST1'in metastatik sürece olan katkısı ise, daha sonra EMT'yi desteklemesi ve bu süreçte transkripsiyon faktörü olarak rol alması ile açıklanmıştır.

TWIST'in yüksek ekspresyonuna insan meme, mide, prostat, pankreas kanseri, skuamoz hücreli karsinom, deri kanserleri gibi pek çok kanser tipinde rastlanmıştır. TWIST ekspresyonunun EMT'ten bağımsız olarak da artmış olabileceğine dair araştırmalar yapılmıştır; Twist1'in apoptoz inhibisyonu ve proliferasyonu indükleyerek tümör başlangıcını nasıl desteklediği kesin olarak bilinmemekle birlikte, Twist1 delesyonunun p53'ün ekspresyonunun artmasına neden olduğu görülmüştür (84-86).

Birçok insan kanser tipine (pankreas, over, oral, özafagus ve serviks kanseri) dair yapılan araştırmalar göstermiştir ki TWIST-1 aşırı ekspresyonu karsinomlarda düşük sağkalım ile ilişkilidir. TWIST'in ve ilişkili olduğu sinyal iletim yolaklarının karsinomun ilerlemesinde önemli rol oynaması nedeniyle, TWIST-1'in karsinomlar için prognostik bir belirteç olabileceği önerilmiştir (80, 85).

2.5. Transmembran Müsin Molekülleri (MUC1, MUC4, MUC16) ve EMT Arasındaki İlişki

EMT sürecinin çeşitli transkripsiyonel modülatörler ve sinyal mediatörleri tarafından düzenlenmesine karşın, müsinler de hücresel farklılaşma sürecinde önemli rol oynamaktadırlar. Müsinlerin epiteldeki koruyuculuk işlevlerinin yanı sıra metastatik tümör hücrelerinin artışıyla da ilişkili olduğu bilinmektedir. Pankreas, kolon ve akciğer kanserlerinde müsinlerin anormal ekspresyonu gözlenmiştir ve ayrıca kanser hücrelerinin proliferasyonu, hücresel adezyonun değişimi, invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Transmembran müsinler arasında, MUC1, MUC4 ve MUC16'nın EMT süreci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (87).

Literatürdeki mevcut bulgular, MUC1'in epitel plastisitesi ile bağlantılı yolları aktive ederek kök hücre benzeri özelliklerin kazanılmasında onkojenik bir efektör olarak rol üstlendiğini ve EMT'nin başlatılmasındaki etkisini göstermektedir. MUC1'in anormal ekspresyonunun kanser hücrelerinde EMT fenotipini başlattığı birçok *in vitro* fare deneyiyle gösterilmiştir. Pankreas kanseri hücrelerinde MUC1'in aşırı ekspresyonunun EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini uyararak veya EMT'nin başlatılmasına doğrudan etki ederek, pankreas kanserinin invazyon ve metastaz kapasitesini arttırdığı görülmüştür. Pankreas kanseri hücrelerinde MUC1'in sitoplazmik kuyruğunu mutasyona uğratarak, MUC1'in fosforilasyon durumunun ve EMT ilişkisinin fonksiyonel önemini gösterilmiştir. Genetiği değiştirilmiş fare modeliyle ise MUC1'in yıkımının EMT ve metastaz sürecinin önemli ölçüde azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (87, 88).

MUC4'ün dokulardaki ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalar, metastaz sürecinin başlatılmasındaki rolünü göstermiştir. Over kanseri hücrelerinde yapılan bir araştırmada, MUC4 aşırı ekspresyonunun EMT süreciyle ilgili morfolojik özellikleri belirlediğini göstermiştir ve MUC4 ekpresyonu yüksek olan hücrelerde EMT-TF'lerinin de (TWIST, Snail) önemli ölçüde artmış olduğu tespit edilmiştir. Pankreas kanseri hücrelerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise MUC4'ün fokal adezyon kinaz (FAK) sinyal yolağının aktivasyonu ile *N-cadherin* ekspresyon artışını etkilediği gösterilmiştir. MUC4'ün çeşitli sinyal yolaklarına katılarak, epidermal veya fibroblast büyüme faktörü reseptörleriyle etkileşerek EMT sürecine dahil olduğu bilinmektedir (87, 89).

MUC16'nın diğer transmembran müsinlerden farklı olarak, EMT'ye dahil olmasının hücre yüzeyi proteinlerinin yanı sıra intraselüler sinyal yolakları molekülleri ile etkileşerek olduğu gösterilmiştir. 2011 yılında over kanserinde yapılan bir çalışma, MUC16 ekspresyonunun susturulmasının önemli ölçüde hücre morfolojisi değişikliklerine neden olduğunu belirtmektedir. MUC16 hücre yüzeyi ekspresyon kaybı, mezenkimal özellikleri indüklemekte ve hücreler daha iğsi ve fibroblast benzeri yapı kazanmaktadırlar. Yine bu çalışmada, MUC16 eksikliğinde *N-cadherin* ve *Vimentin* gibi mezenkimal belirteçlerin artmış olduğu ve bu durumun artmış invazyona ve motiliteye sebep olduğu, kanser hücrelerine agresiflik

kazandırdığı görülmüştür. Bir başka çalışma ise, MUC16 sitoplazmik kuyruğunun artan ekspresyonunun tümörde artan motilite ve invaziviteyi etkilediğini göstererek, invazyon gelişiminde MUC1-CT'nin önemini belirtmiştir. Bu çalışmalarda MUC16'nın hem hücre içinde hem hücre yüzeyinde etkileştiği moleküller aracılığıyla fonksiyonlarını gerçekleştirdiği, özellikle hücre içinde EGFR'ler ve sitokinler ile etkileşerek ve çeşitli sinyal yolaklarına katılarak EMT sürecini desteklediği düşünülmektedir (87, 90, 91).

2.6. Regülatuvar T Hücreler ve EMT Arasındaki İlişki

Pankreatik duktal adenokarsinoma, desmoplastik, geniş bir fibrotik tümör mikroçevresine sahiptir. PDAK tümör mikroçevresinde yaygın olarak regülatuvar T hücreleri, tümör-ilişkili makrofaj (TAM)'lar, miyeloid kökenli baskılayıcı hücre (MDSC)'ler ve doğal öldürücü (*Natural killer,* NK) hücreler bulunur. Doğal ve adoptif (edinsel) immün yanıtlar tümöre karşı aktif olmasına rağmen, tümör mikroçevresinde bulunan efektör hücreler aracılığıyla tümör hücreleri immün yanıttan kaçılabilir ve bu durum lokal ve sistemik immün disfonksiyonuna neden olur. Tümör mikroçevresindeki tümör infiltre immün hücrelerinin çoğu, lokal bir sitokin fırtınası aracılığıyla pankreas kanseri hücrelerinin mezenkimal geçişini kolaylaştırır. Örneğin, Treg hücreleri güçlü EMT indükleyicileri olarak tanımlanmıştır: Tümör mikroçevresinde bulunan Treg hücreleri, hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin ve TGF-ß, IL-1β, IL-6, TNF-α gibi interlökin ve sitokinlerin aracılığıyla EMT'yi indükleyebildiği belirtilmektedir (70).

Treg hücreleri tümör mikroçevresinde immün supresif bir ortam oluşturur ve bu ortam tümör hücrelerin mezenkimal sürece geçişlerini kolaylaştırıyor olabilir. Howley ve ark. tarafından yapılan bir gen ekspresyon düzeyi araştırmasında, TGF-β sinyal yolunun EMT indüksiyonu yoluyla kanser ilerlemesinde kritik bir düzenleyici olduğu öne sürülmüştür. Treg hücrelerinin TGF-ß aracılığıyla bu süreçte rol üstlendiği düşünülmektedir (92). Mide kanserinde yapılan bir araştırmada, Treg hücrelerinin tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışına yardım ettiği ve TGF-ß,

IL-2, IL-10, galektin-3 gibi immünosüpresif faktörler aracılığıyla tümör progresyonunun gelişimini desteklediği bildirilmiştir (93).

2.7. Pankreas Kanserinde İnvazyon ve Metastaz Kapasitesinin Azalmasına Yönelik Terapötik Yaklaşımlar

Kanser araştırmalarındaki ilerlemelere rağmen, pankreas kanseri kötü prognoz ve yüksek mortalite oranlarını korumaktadır. Pankreas kanseri için temel tedavi cerrahi rezeksiyondur; ancak tanı anında hastaların %60'ından fazlasında hastalığın ilerlemiş olması nedeniyle bazı hastalara cerrahi yapılamamaktadır. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavi stratejileri hastaların çoğu için hala bir yıldan daha düşük sağkalım oranları sağlamaktadır.

İmmünoterapi, melanom, akciğer kanseri, renal kanser gibi birçok kanser türünde başarı göstererek, solid tümörler için terapötik yeni bir alan açmıştır. Pankreas kanserinde de pek çok immünoterapatik strateji geliştirilmektedir. İmmün *checkpoint* inhibitörleri (Ipilimumab, Tremelimumab, Pembrolizumab, Atezolizumab vs.) anti-CTLA-4 veya anti-PD-1 /anti-PD-L1 ajanları ile immün kontrol noktalarının bloke edilmesi esasına dayanmaktadır ve bu durum T hücresi aktivasyonunun devam etmesini sağlayarak tümöre karşı gelişen immün reaksiyonun etkisinin artmasını sağlar. Kanser antijenine spesifik CTL'lerin aktivasyonuyla anti-tümoral immün yanıt oluşturmayı amaçlayan bir diğer tedavi stratejisi de terapötik aşılardır (*GVAX, Algenpantucel-L gibi*). *"CAR-T-cell"* tedavisi, hastanın kendi tümör antijenine spesifik T hücrelerin toplanması ve *ex vivo* genişletilerek hastaya yeniden enjekte edilerek immünitenin arttırılması amacıyla geliştirilen adaptif hücre transferi yöntemi de immünoterapötik stratejilerden bir tanesidir. Kemoradyoterapi/radyoterapi ve moleküler ajanlar-sitokinlerle yapılan kombine yaklaşımlar tedavi etkinliğini artırmaktadır (94).

2.8. Amaç

Bu tezin amacı, pankreas kanseri hastalarında transmembran müsinleri ve EMT molekülleri ile Treg hücre arasındaki ilişki ekspresyon düzeyinde araştırmaktır. Tümör dokudaki ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinikopatolojik bulguları

arasındaki ilişkiyi analiz etmek de bu tezin amaçları arasında yer almaktadır. Ayrıca araştırma sonucunda elde edilen bilgiler ile tümör belirteci olabilecek veya tedavi açısından önemli olabilecek moleküllerin belirlenmesine katkı sağlamak da hedeflenmiştir. Bu amaçla ilk olarak PDAK hücrelerinden eksprese olan transmembran müsin moleküllerinin (MUC1, MUC4, MUC16) gen ekspresyon düzeyleri ile EMT moleküllerinin (E-Kaderin, N-Kaderin, TWIST) ve Treg hücresini tanımlayan FOXP3'ün gen ekspresyon düzeyleri pankreas kanseri hastalarının arşiv dokularında çalışılmıştır. Bu molekülerin protein düzeyinde ekspresyonunu tesbit edebilmek için ise doku kesitlerinde moleküller immünohistokimya yöntemi ile boyanarak analiz edilmişlerdir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Olguların Genel Özellikleri

Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan 1999-2015 yılları arasında pankreas kanseri (pankreatik duktal adenokarsinom) tanısı almış 50 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu hastalardan whipple, total/subtotal pankreatektomi cerrahisi sonrası alınan ve parafin bloklara gömülen doku örnekleri çalışmada kullanıldı.

-Pankreatik duktal adenokarsinom tanısı almasına rağmen, küçük biyopsi (iğne biyopsi vs.) materyalleri olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

-Primer tümörü pankreasta bulunmayan, metastatik olgular çalışmaya dahil edilmedi.

-Whipple cerrahi materyalleri arasında da primer pankreas kanseri tanısı olmasına karşın "müsinöz adenokarsinom" patolojisi gösteren olgular çalışmanın doğruluğunu engellememesi için dışlandı.

-Pankreatik duktal adenokarsinom tanısı almış olan hastaların dokularına ait parafin bloklar araştırmada kullanıldı.

Arşiv materyallerin kullanımı için Başkent Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu ve moleküler deneylerin yürütülebilmesi için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından izin ve onay alınmıştır (Karar No: GO 18/822-05).

3.2. Hasta Materyallerinin Hazırlanması

Pankreatik duktal adenokarsinoma tanısı olan hastaların, whipple cerrahi ve pankreatektomi materyallerine ait parafin bloklar Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden seçildi. Bunun için 1999-2015 yılları arasında pankreas kanseri tanısı ile ameliyat olan hastaların dosyası taranmıştır. Hastaların tanı alma yaşı, cinsiyeti, uygulanan cerrahi bilgisi, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, lenf nodu metastaz durumu ve sayısı, uzak organ metastaz ve sağkalım bilgileri kaydedildi. Hasta raporlarından tümör boyutu, lenf

nodu ve uzak organ metastaz bilgileri elde edildi, 2017 yılında modifiye edilen "American Joint Committee on Cancer (AJCC)" TNM sistemi ile tümör evrelendirilmesi yapıldı.

Hasta bilgileri kaydedildikten ve gerekli veritabanı oluşturulduktan sonra laboratuvar araştırmaları için parafin bloklar hazırlandı. İmmünohistokimyasal araştırmalarda kullanmak üzere, her hastanın tümör dokusundan ve tümör infiltrasyonu içermeyen normal pankreas parankim dokusundan kesitler hazırlandı.

Moleküler araştırmalarda kullanmak için arşiv kesitleri mikroskobik olarak yeniden taranarak tümörlü ve tümörsüz doku alanlarının belirlenmesi sağlandı (Şekil 3.1). Bu işlemin temel nedeni, parafin bloklarda gömülü olan doku alanlarında tümörlü alanların yanı sıra, tümör infiltrasyonu olmayan normal pankreas parankiminin bulunabilmesi, duodenumun bulunabilmesidir. Bu durumun moleküler deneylerin doğruluğunu etkilememesi için deney öncesi, tümörlü ve tümörsüz doku alanları belirlendi. Bu hazırlık aşamasında,

- kesit lamları üzerinde tümörlü ve tümörsüz alanlar işaretlendi.
- İşaretli lamlar ile parafin bloklardaki doku eşleştirilerek tümör ve normal doku alanları ayrıştırıldı.
- Parafin bloklar eritilerek işaretli alanlar bistüri ile kesildi.
- Ayrıştırılan dokular farklı kasetlerde yeniden parafine gömüldü.
- Bu işlem her 50 hasta için tekrarlanarak tümörlü ve tümörsüz dokunun saflaştırılması yapıldı ve iki grup oluşturuldu.
- Makroskobik diseksiyon işlemi sonrası kesin ayrımı yapılan normal ve tümör dokudan, her bir hasta örneği için 1,5ml'lik tüplere kesitler alınarak Q-PCR deneyinde kullanabilmek için örnekler hazırlandı.

3.3. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri

Her bir olgu için tümör histolojik tipini en iyi temsil eden ve komşu normal pankreas dokusunu da içeren parafin bloklardan adezivli lamlara 3µm kalınlığında kesitler alındı.

İmmünohistokimyasal boyama işlemlerinden önce, antikorların uygun çalışıp çalışmadığını test etmek amacıyla antikorlara, kullanım klavuzunda belirtilen doku kontrolleri uygulandı. MUC1 antikoru için kolon kanseri, MUC4 antikoru için oral skuamoz hücreli karsinom, MUC16 antikoru için seröz endometriyum kanseri, FOXP3 antikoru için tümörsüz sağlıklı tonsil dokusu, E-Kaderin antikoru için tümörsüz sağlıklı prostat dokusu, N-Kaderin antikoru için karaciğer kanseri ve TWIST antikoru için akciğer adenokarsinom dokusu kontrol olarak kullanıldı. Antikorların çalışırlığı doku-kontrol testiyle teyit edildikten sonra antikorların dilüsyon oranları belirlendi (Bkz. Tablo 3.1) ve immünohistokimya çalışması için hazır hale getirildi.

İmmünohistokimyasal boyama işlemi Omnis *(DAKO, Danimarka)* cihazında EnVision Flex immünohistokimya boyama kitleri kullanılarak otomatik olarak yapıldı. İlgili bloklardan hazırlanan kesitler 60°C'lik etüvde 60 dakika bekletildi. Deparafinizasyon işlemi, camlara makinenin içinde 25°C'de 1 dakika "Clearify (*Dako, Danimarka*)" solüsyonu uygulanarak yapıldı. Ardından antijenlerin geri kazanılması için dokulara '*antigen retrieval'* işlemi uygulandı.

MUC1, FOXP3, E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST antikorları için dokular 97 °C'de 30 dakika EDTA tamponunda (EnVFlex HRS, High pH); MUC4 ve MUC16 antikorları için ise dokular 97 °C'de 30 dakika sitrat tamponunda (EnVFlex HRS, Low pH) kaynatıldı.

Yıkama işleminin ardından; dokulara MUC1 antikoru *(Rabbit monoklonal, Abcam, İngiltere),* MUC4 antikoru *(Rabbit monoklonal, Abcam, İngiltere),* MUC16 antikoru (*Mouse monoklonal, Abcam, İngiltere),* FOXP3 antikoru *(Rabbit monoklonal, Abcam, İngiltere),* E-Kaderin antikoru *(Rabbit monoklonal, Abcam, İngiltere),* N-Kaderin antikoru *(Rabbit poliklonal, Bioss, ABD)* ve TWIST antikoru *(Rabbit poliklonal, Abcam, İngiltere)* ile 30 dakika inkübasyon işlemi yapıldı. Daha sonra primer antikorla muamele edilmiş dokulara zemin boyanmanın engellenmesi amacıyla kite ait peroksidaz solüsyonu *(EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, Dako, Danimarka)* uygulandı ve 3 dakika inkübe edildi. Yıkama işleminin ardından

EnV Flex/HRP solüsyonu damlatılarak 20 dakika inkübe edildi. Kesitlere kromojen ve enzim substratı içeren çalışma solüsyonu *(EnV Flex Substrate Working Solution,Dako)* damlatılıp oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkandı. En son basamakta hematoksilen ile 5 dakika zıt boyama işlemi yapılıp alkol, ksilen aşamalarından geçirilerek kapama işlemi gerçekleştirildi.

Antikorların klonları ve antikorlara ait uygun dilüsyon oranları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. İmmünohistokimyada kullanılan antikorların klonları ve dilüsyon oranları

	Klonu	**Dilüsyon Oranları**
MUC1	EPR1023	1:250
MUC4	SP241	1:250
MUC16	OC125	1:100
FOXP3	EPR15038-69	1:200
E-CADHERIN	SP64	1:100
N-CADHERIN	Bs-1172R	1:200
TWIST	EPR1023	1:100

3.4. İmmünohistokimyasal Kesitlerin Değerlendirilmesi

Laboratuvarda standartize edilen ve uygun antikorlar ile boyanan dokular mikroskobik olarak tarandı. Her bir antikor için, tümörlü dokuda ve tümörsüz normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdesi araştırıldı. İncelenen moleküllerin dokudaki lokalizasyonu, boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı özelliklerine göre antikorların değerlendirmesinde sınıflandırma ve skorlama yapıldı.

NOT: İncelenen moleküllerin dokudaki boyanma yüzdesi belirlenirken MUC1, MUC4, E-Kaderin ve N-Kaderin %70, MUC16'da %50, TWIST'te %20 sınırı baz alınarak skorlandı. Bunun nedeni, genler birbirlerinden bağımsız olarak

tarandı ve birbirlerinden farklı boyanma yaygınlığı göstermeleri nedeniyle tüm moleküller kendi dokuları içinde değerlendirildi. Örneğin, MUC1'in tüm dokularda yaygın boyanma göstermesi nedeniyle yüzde skor sınırı yüksek (%70), TWIST'in ise tüm dokularda daha sınırlı alanlarda boyanma göstermesi nedeniyle skor sınırı düşük (%20) tutulmuştur. Böylece tümörlü ve tümörsüz dokular arasındaki ayrımın belirgin olması sağlandı.

FOXP3'te ise negatif/pozitif şeklinde nitelendirerek dokuda bulunma özellikleri belirtildi.

3.4.1. MUC1 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi

MUC1 antikoru ile tümör alanındaki ve normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdesi araştırıldı.

Sitoplazmik ve membranöz boyanma yoğunluğuna göre hücreler iki sınıf altında değerlendirildi:

Sınıf 1: hafif ve orta boyanma,
Sınıf 2: şiddetli boyanma.

Dokulardaki boyanma yüzdesi ise aşağıdaki gibi kategorize edildi:
Skor 1: ≤ %70
Skor 2: % 70-100

Boyanma yüzdesi %70 üzerinde olanlar (skor2) ve şiddetli boyanma gösteren dokular (sınıf 2) yüksek ekspresyon, boyanma yüzdesi %70 ve altında olan (skor1) ve hafif- orta boyanma yoğunluğuna sahip dokular (sınıf 1) ise düşük ekspresyon olarak değerlendirildi.

3.4.2. MUC4 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi

MUC4 antikoru ile tümör alanındaki ve normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdesi araştırıldı.

Sitoplazmik ve membranöz boyanma yoğunluğuna göre hücreler iki sınıf altında değerlendirildi:

Sınıf 1: hafif ve orta boyanma,

Sınıf 2: şiddetli boyanma.

Dokulardaki boyanma yüzdesi ise aşağıdaki gibi kategorize edildi:

Skor 1: ≤ %70

Skor 2: % 70-100

Boyanma yüzdesi %70 üzerinde olanlar (skor2) ve şiddetli boyanma gösteren dokular(sınıf 2) yüksek ekspresyon, boyanma yüzdesi %70 ve altında olan (skor1) ve hafif- orta boyanma yoğunluğuna sahip dokular(sınıf 1) ise düşük ekspresyon olarak değerlendirildi.

3.4.3. MUC16 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi

MUC16 antikoru ile tümör alanındaki ve normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdesi araştırıldı.

Sitoplazmik ve membranöz boyanma yoğunluğuna göre hücreler üç sınıf altında değerlendirildi:

Sınıf 1: boyanma yok,

Sınıf 2: hafif ve orta boyanma,

Sınıf 3: şiddetli boyanma.

Dokulardaki boyanma yüzdesi ise aşağıdaki gibi kategorize edildi:

Skor 1: ≤ %50

Skor 2: % 50-100

Boyanma yüzdesi %50'nın üzerinde olan (skor2) ve şiddetli boyanma yoğunluğuna sahip olan dokular (sınıf 3) yüksek ekspresyon olarak değerlendirirdi.

3.4.4. FOXP3 Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi

FOXP3 antikoru ile tümör alanındaki ve normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve tümör hücrelerinin boyanma yüzdesi araştırıldı. Nükleer boyanma yoğunluğuna göre hücreler 'FOXP3 negatif' ve 'FOXP3 pozitif' olarak kategorize edildi.

3.4.5. E-Kaderin Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi

E-Kaderin antikoru ile tümör alanındaki ve normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve tümör hücrelerinin boyanma yüzdesi araştırıldı.

Membranöz boyanma yoğunluğuna göre hücreler 2 sınıf altında değerlendirildi:

Sınıf 1-hafif ve orta boyanma,

Sınıf 2- şiddetli boyanma.

Dokulardaki boyanma yüzdesi ise aşağıdaki gibi kategorize edildi.

Skor 1: ≤ %70

Skor 2: % 70-100

Boyanma yüzdesi %70 üzerinde olanlar (skor2) ve şiddetli boyanma gösteren dokular(sınıf 2) yüksek ekspresyon, boyanma yüzdesi %70 ve altında olan (skor1) ve hafif- orta boyanma yoğunluğuna sahip dokular(sınıf 1) ise düşük ekspresyon olarak değerlendirildi.

3.4.6. N-Kaderin Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi

N-Kaderin antikoru ile tümör alanındaki ve normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve tümör hücrelerinin boyanma yüzdesi araştırıldı.

Membranöz boyanma yoğunluğuna göre hücreler 2 sınıf altında değerlendirildi:

Sınıf 1-hafif ve orta boyanma,

Sınıf 2- şiddetli boyanma.

Dokulardaki boyanma yüzdesi ise aşağıdaki gibi kategorize edildi.

Skor 1: ≤ %70

Skor 2: % 70-100

Boyanma yüzdesi %70 üzerinde olanlar (skor2) ve şiddetli boyanma gösteren dokular(sınıf 2) yüksek ekspresyon, boyanma yüzdesi %70 ve altında olan (skor1) ve hafif- orta boyanma yoğunluğuna sahip dokular(sınıf 1) ise düşük ekspresyon olarak değerlendirildi.

3.4.7. TWIST Antikoru ile Boyanan Kesitlerin Değerlendirilmesi

TWIST antikoru ile tümör alanındaki ve normal pankreas dokusundaki hücrelerin boyanma yoğunluğu ve tümör hücrelerinin boyanma yüzdesi araştırıldı.

Membranöz boyanma yoğunluğuna göre hücreler 3 sınıf altında değerlendirildi:

0- boyanma yok,

1- hafif ve orta boyanma,

2- şiddetli boyanma.

Dokudaki boyanma yüzdesi ise aşağıdaki gibi kategorize edildi:

Skor 1: < %20

Skor 2: ≥ % 20-100

3.5. Makroskobik Diseksiyon İşlemi (Parafin Blokların Moleküler Araştırmalar için Hazırlanması)

Moleküler çalışmaların yürütülebilmesi için hastalara ait parafin bloklardan tümör ve normal doku ayrımı yapılmıştır. Her bir olgu için tümörün histolojik tipini ve normal pankreas dokusunu en iyi temsil eden doku örneklerinin bulunabilmesi için, hastalara ait lam arşiv materyalleri yeniden mikroskobik olarak taranarak tümör ve normal doku alanları işaretlenmiştir. Tümör alanlarının belirlenmesinde, tümör çevresinde bulunan yaygın lenfositik ve nekrotik alanlar, tümöre komşuluk eden normal pankreas dokusu gibi harici alanlar dışlandı. Normal doku örneklerinin belirlenmesinde ise lenfoid alanlar, duodenum gibi pankreasa komşu alanlar belirlenerek sadece hastalara ait normal pankreas dokusu alanları seçildi. İşaretli lam-parafin blok eşleştirilmesinin ardından, parafin bloklar Tıbbi Patoloji Kesit Laboratuvarı'nda yeniden hazırlandı (Şekil 3.1).

Parafin blokların eritilerek doku ayrıştırılması aşamasında aşağıdaki işlemler yapıldı.

-Mikroskobik olarak işaretlenen alanların diseksiyonu için seçilen parafin bloklar, kaset bloklama kalıplarına koyularak Otomatik Döküm Makinesi(Shandan)'nin sıvı parafin banyosunda 8-10 dk bekletildi.

-Eritilen bloklar gömme alanına alındı.

-Pens ile kaset çıkarıldı ve içerisinden doku alınarak işaretli alanlar bistüri ile kesildi.

-Kesilen doku, yeniden doku bloklama kalıbına alındı, üzerine sıcak parafin koyularak gömme işlemi yapıldı ve kasetlenerek cihazın "*cold plate"* alanında soğumaya bırakıldı.

-Tez araştırması için, her bir hastaya ait 50 (elli) adet tümör ve 50 (elli) adet normal doku ayrıştırılarak yeniden bloklandı.

Şekil 3.1. Makrodiseksiyon işlemi.

A: Preparattan tümörlü/tümörsüz alanın belirlenerek işaretlenmesi, B: İşaretli lam ile parafin bloktaki dokunun eşleştirilerek doku alanının belirlenmesi, C: Lam ve parafin blokta işaretli alanların gösterimi D: Doku alanının ayrıştırılıp yeniden bloklanma sonrası görünümü.

3.6. Parafin Bloklardan RNA İzolasyonu

Hasta rezeksiyon materyallerinden elde edilen dokuların normal ve tümör doku olarak ayrılması (makroskobik diseksiyon) işleminden sonra, iki ayrı hasta grubuna ait parafin bloklardan 10 μm kalınlığında kesitler alındı. Hasta örnekleri birden elliye kadar numaralandırıldı ve tümör dokular T1-T50 ve normal dokular N1-N50 kodlarıyla temsil edilmek üzere toplam yüz örneklik iki ayrı grup olacak şekilde hazırlandı.

Her bir hasta örneği için alınan parafin blok kesit ruloları parçalanarak izolasyon deneyi için hazırlandı. Moleküler çalışmalar için ortamdaki parafinin

uzaklaştırılması gereklidir. Bu nedenle 1,5 ml'lik tüplere alınan 10 µm kalınlığındaki parafin kesitlere deparafinizasyon işleminin ardından RNA izolasyonu uygulandı. Pankreas kanseri tümör ve normal doku örneklerinin RNA izolasyonları *High Pure FFPET RNA Isolation Kit (Roche, Almanya)* protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

3.6.1. Deparafinizasyon

Parafin bloklardan RNA izolasyonu yapabilmenin en önemli aşaması deparafinizasyondur. Bu aşamada dokuların parçalanması çok önemlidir. Deparafinizasyon işlemine başlamadan önce, 10µm kalınlığında kesilerek rulo şeklinde 1,5ml'lik tüplere alınan doku örnekleri bir lam üzerinde bistüri yardımıyla parçalandı. Parçalanan dokular pens yardımıyla dikkatlice steril 1,5ml'lik tüplere alındı. Her dokunun parçalanması sırasında lam, bistüri ve pens steril edildi. Böylece dokudan dokuya bulaş riski önlenmiş oldu. Dokunun parçalanması, ksilen ve etonolün dokuya daha iyi nüfuz edebilmesi ve böylece parafinin dokudan daha kolay uzaklaştırılabilmesi için kritik önem taşımaktadır. Tüplere alınan doku örneklerinin miktarının fazla olması, izolasyon sonucu elde edilen RNA kalitesini ve miktarını etkileyeceği için çok önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda parafin bloklardan alınan 4-5 adet doku kesit rulosu kullanıldı.

Dokuların parçalanması işleminden sonra deparafinizasyon aşamasında şu şekilde yapıldı:

- 1,5ml'lik tüplere sırayla 800µl ksilen eklendi ve iyice vortekslendi. Vorteks (*Cyclomixer CM*-101) aşamasında dokunun zar gibi, şeffaf bir hal alması sağlandı. Bu nokta RNA izolasyonunun başarısı açısından çok önemlidir.

- Ardından tüplere 400µl etanol eklendi ve tekrar vorteks yapıldı.

- Vorteksin ardından 12.000rpm'de 2 dakika santrifüj (*Eppendorf Centrifuge* 5417R) edildi ve santrifüj sonrası süpernatan dışlandı. Bu aşama yıkama aşamasıdır.

- Tüplere 1 ml etanol eklendi ve vorteks sonrası yine 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatan tekrar atıldı ve doku peletinin iyice dibe çökmesi için 2

dakika yeniden santrifüj edildi. Tüp içerisinde etanol artıkları kalmaması için, kalan süpernatan tekrar atıldı.

-Tüpte dibe çöken doku peletlerin kuruması ve etanolün tamamen ortamdan uzaklaşması için tüpler kapakları açık bir şekilde 55°C'ye ayarlanmış olan ısı bloğunda (*Techne Dri-block* DB-2D) 20 dakika kurumaya bırakıldı.

Deparafinizasyon işlemi *High Pure FFPET RNA Isolation Kit (Roche, Almanya)* protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Bu şekilde parafinden temizlenen dokular RNA İzolasyonu için hazır hale getirilmiştir.

3.6.2. RNA İzolasyonu

RNA İzolasyonu, *High Pure FFPET RNA Isolation* kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bunula birlikte protokolün bazı aşamalarında inkübasyon ve/veya santrifüj süreleri değiştirilerek en iyi sonucu aldığımız koşullar bütün örnekler için uygulandı. Buna göre;

-Deparafinizasyon işleminin ardından tüplerde bulunan doku peletlerinin üzerine 100µl RNA Tissue Lysis Buffer, 16µl %10 SDS ve 40 µl Proteinaz K eklendi.

-Çok kısa vorteks yapıldı ve doku peletiyle miksin iyice karışması sağlandı.

- 30 dakika boyunca 85 ^{0}C ve 600 rpm'e ayarlı sıcak su banyosunda (Memmert WNE) inkübe edildi.

-İnkübasyon sonrası kısa santrifüj yapıldı ve soğuyunca 80 µl Proteinaz K eklendi. Düşük seviyede vorteks ve santrifüj yapıldı.

-55^{0}C ve 600 rpm'e ayarlı sıcak su banyosunda 40 dakika inkübe edildi.

* NOT: Bu aşama sonrası tüplerin şeffaf görünmesi, doku parçalarının görülmemesi, tüplerde bulanıklık olmaması gerekir. Tüplerin berrak görünmesi, parafin bloktan RNA izolasyonunda deney sonuçlarını etkileyen bir diğer önemli aşamadır.

-İnkübasyon sonrası tüplere yine kısa vorteks ve santrifüj yapıldı ardından doku lizatı 325µl RNA *Binding Buffer* ve 325 µl etanol eklenerek vorteks yapıldı.

-Bu karışm, kit içeriğinde bulunan özel filtreli tüplere *(collection tube)* aktarıldı.

-2 dakika 12.000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatan atıldı. İşlem iki kez tekrarlandı.

-100 µl *DNase working solution* eklendi ve oda sıcaklığında (15-25^{0}C) 15 dakika inkübe edildi.

-İnkübasyon sonrası yıkama aşamasına geçildi. Yıkama aşamasında,

- 500 µl *Wash Buffer I working solution* eklendi. 12.000rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan atıldı.
- 500 µl *Wash Buffer II working solution* eklendi. 12.000rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan atıldı.
- Yıkamanın son aşamasında ise, 500 µl *Wash Buffer II working solution* ile önce 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatan atıldı. Ardından 2 dakika 12.000rpm'de santrifüj edilerek kalan süpernatanın atıldı.

- Yıkama işlemlerinin ardından filtre kurutuldu ve filtreli tüpler 1,5ml'lik reaksiyon tüplerine alındı

-Tüplere 25µl RNA *elüsyon buffer* eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

-Son aşamada 3 dakika, 10.000 rpm'de santrifüj edilerek RNA elde edildi.

-Elde edilen RNA'lar ölçüm işleminin ardından, deneylerde kullanmak üzere -80^{0}C'de saklandı.

3.6.3. RNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen RNA'lar spektrofotometre *(NanoDrop ND-1000, Thermo, ABD)* cihazı ile ölçüldü. RNA'ların miktarları, 260/230 ve 260/280 değerleri, kontaminasyon durumları ve saflık dereceleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

RNA ölçümünde 2µl örnek kullanıldı. Moleküler çalışmalarda, optimal sonuçlar için 260/280 oranının 1,8-2,0 olması önerilmektedir. 260/280 oranı düşük veya yüksek olan örnekler yeniden izole edilmiş ve 1,8-2,0 aralığında bulunmayan RNA'lar çalışmaya alınmamıştır. Optimal özellikteki RNA'lar ise cDNA eldesinde kullanıldı.

3.7. cDNA Sentezi

Polimeraz zincir reaksiyonu ile genlerin ekspresyon düzeyini saptayabilmek için, elde edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmesi gerekmektedir. Tüm örneklerden elde edilen RNA miktarları göz önünde tutularak tüm örnekler için eşit olması için 400 ng RNA cDNA sentezi için kullanıldı. RNA konsantrasyonu bilinen her örnek için kullanılacak RNA miktarı hesaplandı. cDNA sentezi *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, ABD)* kiti ile gerçekleştirildi.

Örnek cDNA Hesabı:

T1 no'lu örnek için total RNA konsantrasyonu: **201,21 ng/µl**
400ng ÷ 201,21ng/µl = **2,0 µl RNA**
Random hexamer primer = **1 µl**
H_20 (su) = (12-1-2) **= 9 µl**

} Total hacim 12µl

cDNA sentezi iki aşamada gerçekleştirildi:

İlk aşamada, her örnek için 400 ng olacak şekilde hesaplanan RNA, 1µl *random hexamer primer* ve 12 µl'ye tamamlayacak kadar distile su eklendi. 1.aşama her örnek için ayrı hesaplanarak yapıldı. Hazırlanan örnekler, 65^0C'de 5 dakika *Thermal Cycler* cihazında inkübe edildi.

İkinci aşamada ise cDNA sentez kitine uygun olarak,

-5XReaction buffer 4 µl, Ribolock RNase İnhibitor 1 µl, 10mM dNTP mix 2 µl ve 1 µl RevertAid M-MuLV RT enzimi ekleyerek master mix hazırlandı. İnkübasyon sonrasında tüplere 8µl hazırlanan karışımdan dağıtıldı ve total hacim 20 µl'ye tamamlandı. Düşük derecede çok kısa vorteks ve ardından santrifüj yapılan örnekler,

25^0C'de 5 dakika,

42^0C'de 60 dakika,

70^0C'de 5 dakika inkübe edildi.

Elde edilen cDNA'lar Real-Time PCR deneyinde kullanılmak üzere -20^0C'de saklandı. (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. cDNA sentezinde kullanılan bileşen miktarları ve final konsantrasyonları

1. Aşama

Bileşen	Miktar	Son konsantrasyon
RNA	400 ng	0,02 µg/µl
Random Hexamer Primer	1 µl	0,5µM
ddH_2O	12 µl'ye tamamlandı	

Koşullar her bir tüp için tek tek hazırlandı, 65^0de 5 dk inkübe edildi.

2. Aşama

Bileşen	Miktar	Son konsantrasyon
Reaksiyon buffer (5X)	4 µl	1 µg/µl
dNTP (10mM)	2 µl	1 mM
Ribolock RNase İnhibitor (20U/µl)	1 µl	1 U/µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl	10 U/µl
Toplam hacim	20 µl	

3.8. Real-Time PCR ve Analizi

Elde edilen cDNA'lar *Light Cycler*^{r} *480 Probes Master (Roche, Almanya)* kiti kullanılarak Real Time PCR (Q-PCR: Polymerase *Chain Reaction*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gerçekleştirildi. Tümörlü ve normal dokulardan elde edilen cDNA örneklerinde genlerin mRNA ekspresyon seviyelerini ölçmek için, TaqMan primer problar ile çalışıldı. *House keeping* geni olarak ACTB (Actin beta) seçildi. MUC1, MUC4, MUC16, FOXP3, CDH1 *(E-Cadherin)*, CDH2 *(N-Cadherin)*, TWIST1 genlerini hedefleyen TaqMan primer probları kullanıldı. Primer dizileri tabloda görülmektedir (Tablo 3.2).

Tablo 3.3. Real-Time PCR'da kullanılan gen primer dizileri

Gen	Gen İsmi	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	bp
ACTB	Actin, Beta	TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA	CGTGGATGCCACAGGACT	127
MUC1	Mucin 1	TCGTAGCCCCTATGAGAAGG	CCCTACAAGTTGGCAGAAGTG	96
MUC4	Mucin 4	CCTGAGCTGCCTGTGTCTC	ATTAATGTGTCCTCTGTGGTTCC	66
MUC16	Mucin 16	TGGGCAAGCTCTATTTCAGTTC	ACGTGGAATTTCCTTGTGCT	112
FOXP3	Forkhead Box P3	ACCTACGCCACGCTCATC	TCATTGAGTGTCCGCTGCT	65
CDH1	Cadherin 1, E-Cad	GGCCAGGAAATCACATCCTA	GGCAGTGTCTCTCCAAATCC	87
CDH2	Cadherin 2, N-Cad	GCTGGACTTGATCGAGAAAAA	CGTGGCTGTGTTTGAAAGG	99
TWIST1	Twist homolog 1	AGCTACGCCTTCTCGGTCT	TCCTTCTCTGGAAACAATGACA	125

Her bir gen için, Light Cycler[r] 480 Probes Master kit protokolü esas alınarak mix oluşturuldu. Standartizasyon deneyleri yapıldı ve farklı protokoller denendi. Optimal verim alınan yarı protokol ile deneyler yapıldı. Buna göre Tablo 3.3'te yer alan bileşenlerden oluşan karışım hazırlandı. Genleri ifade ettiği bilinen bir cDNA örneği pozitif kontrol olarak kullanıldı, negatif kontrol olarak cDNA içermeyen karışım hazırlanarak kullanıldı.

Tablo 3.4. Eş zamanlı PCR bileşen miktarları ve final konsantrasyonları

Bileşen	Miktar	Son konsantrasy
LightCycler 480 Probes master (2x conc.) *[FastStart Taq DNA Polymerase, Reactin buffer, dNTP mix, 6.4mM $MgCl_2$]*	5µl	1X
Primer-probe mix (10x conc.)	1µl	1X
H_2O	1,5µl	
cDNA	2,5µl	
Toplam hacim	10 µl	

Tablo 3.5. Real Time PCR reaksiyon koşulları.

İlk Denatürasyon	95^0C	10 dakika
1. Denatürasyon **2. Bağlanma** **3. Uzama**	95^0C 60^0C 72^0C	30 saniye 30 saniye 30 saniye — 45 döngü
Soğutma	40^0C	30 saniye

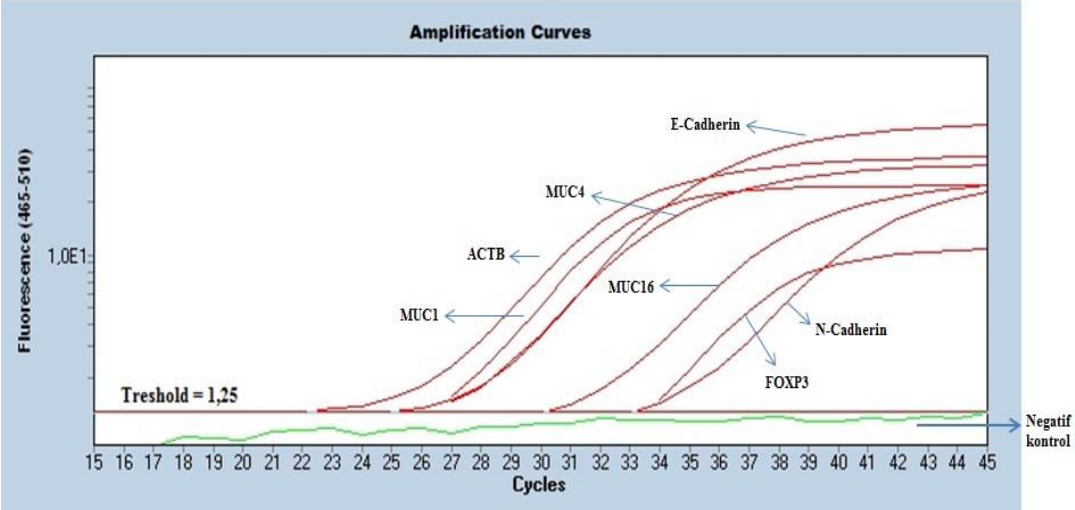
Ekspresyon düzeyini hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundan yararlanıldı. Öncelikle, her bir örnek için PCR amplifikasyonunda eşik siklus (Ct) değeri tespit edildi. Örnekler ile duplike çalışıldığı için Ct değerlerinin ortalamaları alındı. Tümörlü dokudaki (hedef) gen ekspresyon düzeyinin, normal (kontrol) dokuya göre nasıl değişim gösterdiği hesaplandı. House keeping gen olarak ACTB kullanıldığı için, genlerin Ct değerlerinin normalizasyonu ß-actin ile sağlandı.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = 2-(ΔCt hedef gen - ΔCt referans gen)

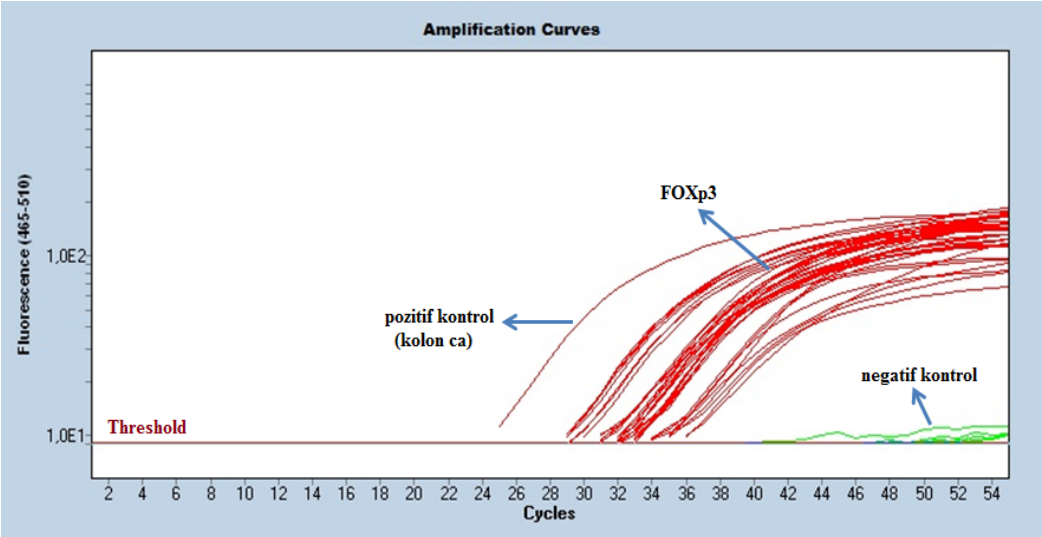
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = 2 - [(ΔCt hedef – ΔCt referans) – (ΔCt kontrol – ΔCt Referans)]

Genlerin ekspresyon analizinde, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı. Q-PCR analiz sonuçlarına göre tümör dokunun normal dokuya göre kaç kat değişim gösterdiği hesaplandı. Tüm genler için hesaplanan $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre,

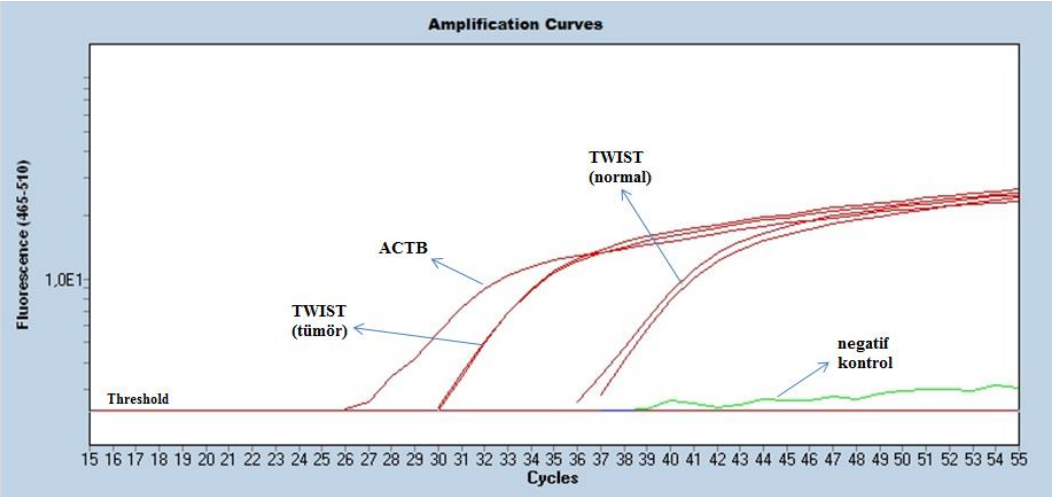
- $\mathbf{2^{-\Delta\Delta CT} > 1}$ ise tümör dokuda gen ekspresyonu artmış,
- $\mathbf{2^{-\Delta\Delta CT} < 1}$ ise tümör dokuda gen ekspresyonu azalmış anlamı taşımaktadır.
- $\mathbf{2^{-\Delta\Delta CT} = 1}$ ise ekspresyon düzeyinin her iki dokuda da aynı olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 3.2. Real-time PCR'da tümör örneklerinin görünümü.



Şekil 3.3. FOXP3 geninin real-time pcr ile gösterimi.

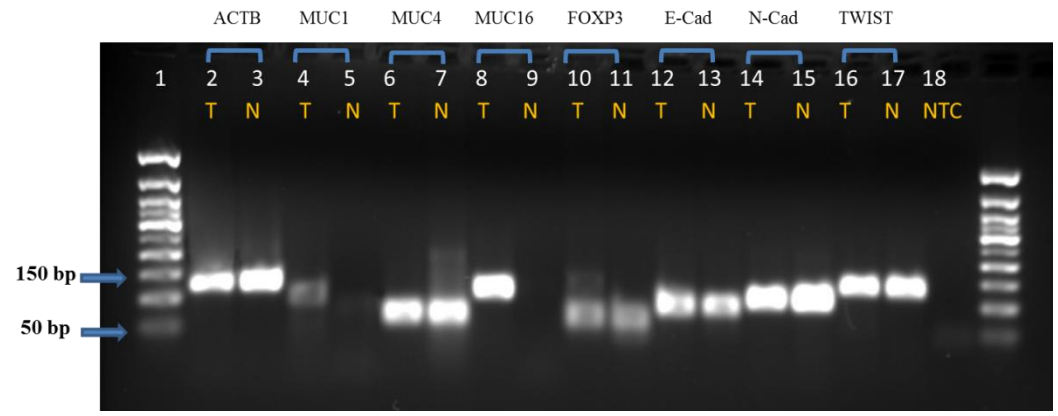


Şekil 3.4. Real-time PCR'da TWIST'in görünümü.

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen Q-PCR ürünlerini görüntülemek ve kontrol etmek için agaroz jel elektroforezi yapıldı. %2'lik agaroz jel hazırlamak için, 6 gr agaroz, 300ml TBE 1x (Tris Base EDTA) tampon çözeltisi ile karıştırılarak mikrodalgada 800 watt'ta yaklaşık bir buçuk dakika içerisinde partikül kalmayana dek (tamamen eriyene kadar) kaynatıldı. Mikrodalgadan çıkarılan tüp biraz soğutulduktan sonra, içerisine 16µl Etidyum Bromür (EtBr) eklendi. Jel tarakları yerleştirilmiş olan tanka hazırlanan agaroz jel döküldü ve soğumaya bırakıldı. Kuyucukların yürüyebilmesi için oluşan hava kabarcıkları jel yüzeyinden temizlendi. Agaroz jel tamamen donduktan sonra taraklar kuyulara zarar vermeden çıkarıldı.

PCR ürünlerinden 10µl alındı, yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk ve son kuyulara, ürün bantlarını daha iyi görebilmek için DNA Ladder yüklendi. Örnekler yüklendikten sonra, 150v sabit akımda 60 dakika yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra, bantların UV translüminatör ile görüntülenmesi sağlandı ve fotoğrafları çekildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Tüm genlerin amplifikasyon ile elde edilen ürün büyüklüklükleri.

Kuyulara göre genlerin dağılımı: 1. ve 18. DNA Ladder, 2-3. ACTB, 4-5. MUC1, 6-7. MUC4, 8-9. MUC16, 10-11. FOXP3, 12-13. E-Kaderin, 14-15. N-Kaderin, 16-17. TWIST, 18.negatif kontrol. T: Tümör doku, N: Normal doku

3.10. İstatistiksel Analizler

Hastalardan ve laboratuvar çalışmalarından elde edilen tüm veriler *IBM SPSS Statistics 23 (SPSS, ABD)* programı kullanılarak analiz edildi. Gruplanabilen klinikopatolojik verilerin birbirleri ve immünohistokimyasal veriler ile karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı.

Genlerin ekspresyon düzeylerinin normal dağılıma uygunluğu görsel ve analitik yöntemlerle (histogram, Kolmogorov-Smirnov) incelendi. Normal dağılımın olmaması, ordinal değişkenlerin olması ve verilerin bağımsız olması nedeniyle, değerlendirme non-parametrik testler kullanılarak yapıldı. Gen ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi (iki grup arasındaki karşılaştırma) ve Kruskal Wallis testi (ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırma) kullanıldı. Klinikopatolojik veriler, immünohistokimyasal veriler ve gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon (*Spearman Correlation Coefficients)* testi kullanılarak değerlendirildi. Hastalara ait sağkalım istatistikleri Kaplan-Meier testi ile değerlendirildi. Hastalara ait klinikopatolojik verilerin ve genlerin sağkalım üzerine etkisi ise Log Rank (Mantel-Cox) testi ile yapıldı. P değerinin 0.05'in altında olması ($p<0.05$) durumunda sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamlılık için tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Pankreas Kanseri Hastalarının Yaş ve Cinsiyet Dağılımı

Çalışmamızda incelenen pankreatik duktal adenokarsinom tanısı almış 50 hastanın ortalama yaşı 69,7 (40-94) olarak analiz edildi. Hastaların cinsiyete göre dağılımında, PDAK tanılı erkek hastaların sayısı [n=32, (%63)], kadın hastalara göre daha yüksek oranda olduğu görüldü. Kadınlarda görülen hastalığın minimum yaşı 51 olarak görülürken, erkeklerde en düşük yaşın 40 olduğu dikkati çekti (Tablo 4.1). Elde edilen verilerde, erkeklerin daha yüksek oranda ve daha erken yaşlarda tanı aldığı görülmüş olsa da yaş ve cinsiyet dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (p>0,05).

Tablo 4.1. Pankreas Kanseri Hastalarının Cinsiyet ve Yaş Dağılımı

			YAŞ		
		n (%)	Ort. Yaş	Minimum	Maksimum
CİNSİYET	**Kadın**	18 (%37)	72	51	87
	Erkek	32 (%63)	68	40	94

4.2. Pankreas Kanseri Hastalarının Klinikopatolojik Parametreleri

Çalışmadaki hastaların klinik öyküleri araştırılarak, hastalara ait TNM evresi, tümörlerin histopatolojik dereceleri, hastaların lenf nodu metastaz durumu; metastaz varsa sayısı, uzak metastaz durumu; varsa metastaz bölgesi, tümörün pankreastaki yerleşim yeri ve kemoterapi alıp almama durumları kaydedildi. Hastalara ait klinik veriler Tablo 4.2.'de görülmektedir.

Tabloya göre, PDAK tanılı hastaların TNM evreleri incelendiğinde, hastaların en fazla (%42) evre II'de olduğu, bu durumu Evre III (%22), Evre I (%20) ve Evre IV (%16) hastaların izlediği görülmektedir. Tümörlerin histopatolojik derecesi, yaygın olarak Grade 2 olarak izlenmiş olup 31 hastanın (%62) bu grupta olduğu görüldü. 13 hastanın (%26) grade 1, 6 hastanın ise (%12) grade 3 olduğu kaydedildi. Lenf nodu metastazı varlığı değerlendirildiğinde, 33 hastada (%66) lenf nodu

metastazı saptanırken, 17 hastada (%34) lenf nodu metastazı yoktu. Tümörlerin pankreastaki yerleşim yerleri incelendiğinde, tümörlerin sıklıkla baş bölgesinde (34 hasta, %64) yerleştiği tespit edildi. 13 hastada (%26) tümör lokalizasyonu pankreas gövdesinde, 3 hastada (%6) ise tümörün pankreas kuyruğunda yerleştiği görüldü.

Uzak metastaz varlığı araştırıldığında, hastaların yalnızca 8'inde (%16) uzak metastaz saptandı. Hastaların klinik bilgilerinde, uzak metastaz görülen bölgeler mide, karaciğer, akciğer, kolon, over ve safra kesesi olarak kaydedildi. 8 hastanın 4'ünde karaciğer metastazı olduğu görüldü. Karaciğer metastazının daha sık görüldüğü izlenmiş olsa da, uzak metastaz varlığı olan hasta sayısının az olması nedeniyle metastaz bölgesi istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Hastaların kemoterapi alma durumları araştıldığında, 18 hastanın (%36) kemoterapi almış olduğu, hastalarının büyük çoğunluğunun ise (32 hasta, %64) kemoterapi almadığı görüldü. Hastaların tamamının adjuvan kemoterapi aldığı bilinmektedir. Kemoterapi alan 18 hastadan 16'sının gemcitabine ile diğer 2 hastanın ise Fluorourasil (5-FU) ilacı ile tedavi edildiği kaydedildi.

Hastaların pankreas kanseri tanısı aldıkları zaman ve/veya ameliyat öncesi ölçülen hematolojik ve biyokimyasal değerleri de kaydedildi. Hastaların anamnezlerine bakıldığında büyük çoğunluğunun karın ağrısı, gözlerde sararma, sarılık ve ishal şikayetleri ile acil kliniğine başvurduğu görüldü. Hastalara ait serum belirteçlerinin durumu Tablo 4.2'de gösterilmektedir.

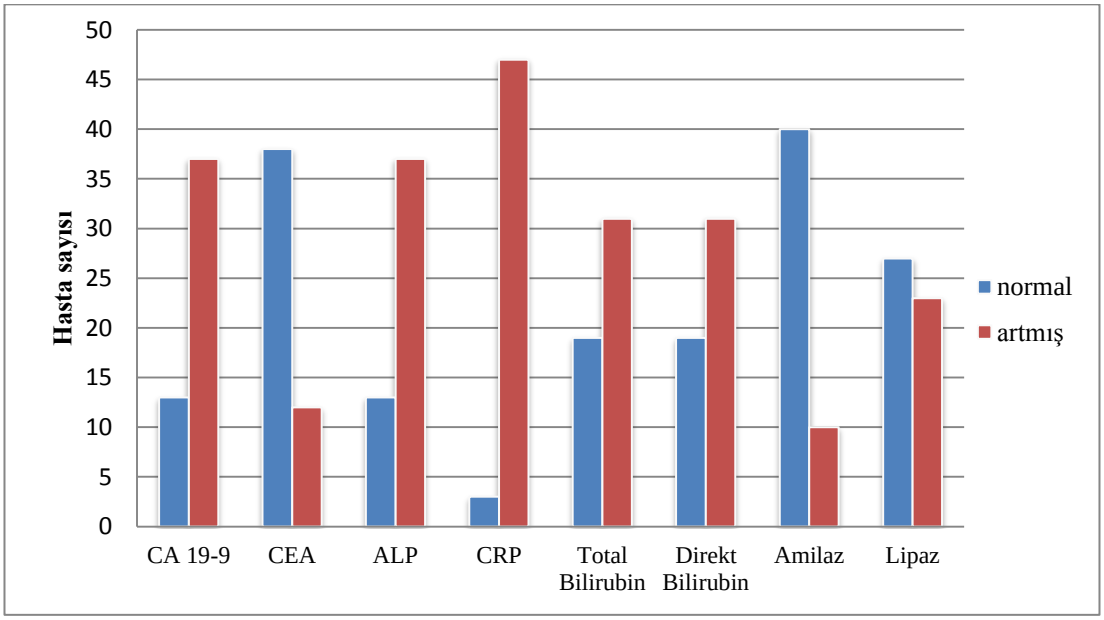
Hastaların 37'sinde (%74) CA 19-9 ve Alkalen Fosfataz (ALP) serum düzeylerinin artmış olduğu saptandı. 12 hastada (%24) Karsinoembriyonik Antijen (CEA) düzeyi yüksekliği kaydedilmiştir. 47 hastada (%94) C-Reaktif Protein (CRP)'in yüksek olduğu, 31 hastada (%62) total bilirubin ve direkt bilirubin değerlerinin artışı görülmüştür. Hastaların 10'unda (%20) amilaz düzeyinde artış izlenirken, hastaların 23'ünde (%46) ise lipaz düzeyinin artmış olduğu izlenmiştir. Hastaların serum düzeyleri şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.1). Hastalarda tümör belirteci olan CA19-9'un ve ALP enziminin beklendiği gibi çok yüksek olduğu saptanmıştır. Bilirubin seviyelerindeki artış ile hastaların yarısından fazlasında sarılık olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. Pankreas kanseri hastalarının klinikopatolojik bulguları

Hastaların Klinikopatolojik Bulguları		**n(%)**
TNM Evresi	Evre I	10 (%20)
	Evre II	21 (%42)
	Evre III	11 (%22)
	Evre IV	8 (%16)
Histopatolojik Grade	Grade 1 (İyi Diferansiye)	13 (%26)
	Grade 2 (Orta Diferansiye)	31 (%62)
	Grade 3 (Az Diferansiye)	6 (%12)
Lenf Nodu Metastazı	Yok	17 (%34)
	Var	33 (%66)
Uzak Metastaz	Yok	42 (%84)
	Var	8 (%16)
Kemoterapi	Almış	18 (%36)
	Almamış	32 (%64)
Tümör Lokalizasyonu	baş	34(%68)
	gövde	13(%26)
	kuyruk	3 (%6)

Tablo 4.3. Pankreas kanseri tanısında önemli olan serum belirteçlerinin hastalardaki düzeyleri

Serum Belirteçleri	Ortalama ± Std.Sapma	Referans Aralığı
CA19-9 (IU/mL)	6277,98 ± 19027,86	0-37
CEA (ng/mL)	7,81± 19,87	0-5
ALP (U/L)	432,16± 477,62	20-150
CRP (mg/L)	65,04± 75,66	0-5
Total Bilirubin (mg/dL)	5,18± 5,73	0,3-1,2
Direkt Bilirubin (mg/dL)	3,64± 4,36	0-0,5
Amilaz (U/L)	404,06± 1824,96	20-160
Lipaz (U/L)	802,84± 3751,81	8-78



Şekil 4.1. Pankreas kanseri hastalarında serum belirteçlerinin değişimi.

4.3. Pankreas Kanserinde Gen Ekspresyon Düzeyleri (Q-PCR)

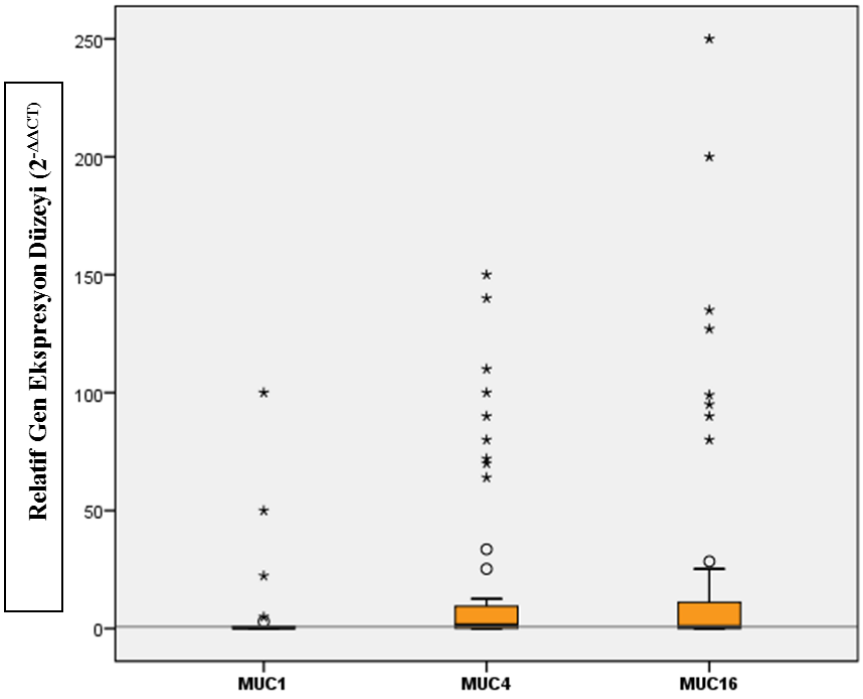
Eş zamanlı *(Real-Time)* PCR sonuçlarına göre, MUC1, MUC4, MUC16, FOXP3, E-Kaderin, N- Kaderin ve TWIST'in gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4.14.'de gösterilmiştir. Bir hastanın tümörlü dokusundaki gen ekspresyon düzeyi ile aynı hastanın tümörsüz dokusundaki gen ekspresyon düzeyleri tespit edildi ve karşılaştırma analizleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar tümörlü dokuda gen ekspresyon düzeyinin, tümörsüz dokuya göre kaç kat arttığını göstermektedir.

4.3.1. Transmembran Müsin (MUC1, MUC4, MUC16) Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri ve Korelasyonları

MUC1, MUC4, MUC16 transmembran müsinlerinin gen ekspresyon düzeyleri Q-PCR yapılarak tespit edildi. Ekspresyon analizleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Transmembran müsinlerin gen ekspresyon dağılımları.

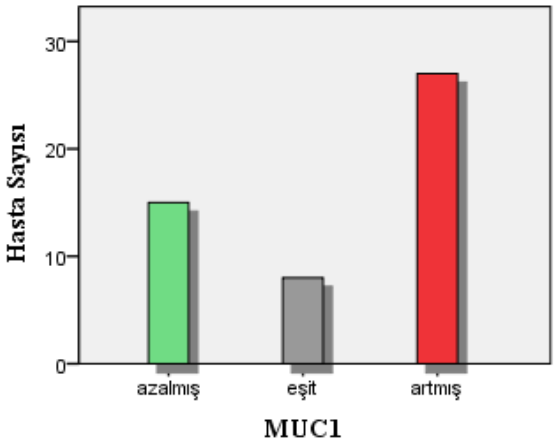
GEN	Ekpresyonu artan hasta sayısı (%)	Ekpresyonu azalan hasta sayısı (%)	Ekspresyonu eşit olan hasta sayısı (%)	Ortalalam (Ekpresyon Aralığı)	P değeri
MUC1	27 (%54)	15 (%30)	8 (%16)	3,97 (0,01-100,36)	0,1
MUC4	27 (%54)	15 (%30)	8 (%16)	20,46 (0,01-150,25)	**0,008 ***
MUC16	26 (%52)	20 (%40)	4 (%8)	24,21(0,01-250, 36)	**0,0001 ***



Şekil.4.2. Pankreas kanserinde transmembran müsinlerin gen ekspresyon düzeyleri.

4.3.1.1. MUC1 Gen Ekpresyon Düzeyi

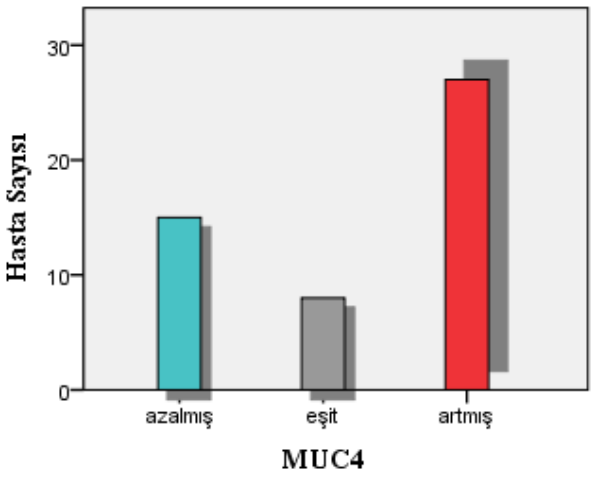
Q-PCR analizi sonucunda, MUC1'in tümör dokuda gen ekspresyonunun normal dokuya göre, 27 hastada (%54) artmış olduğu, 15 hastada (%30) normal dokuya göre azalmış olduğu, 8 hastada ise (%16) tümör ve normal doku arasında eşit ekspresyona sahip olduğu bulundu. MUC1'in tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p>0,05). (Tablo 4.4)



Şekil 4.3. MUC1 gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.

4.3.1.2. MUC4 Gen Ekspresyon Düzeyi

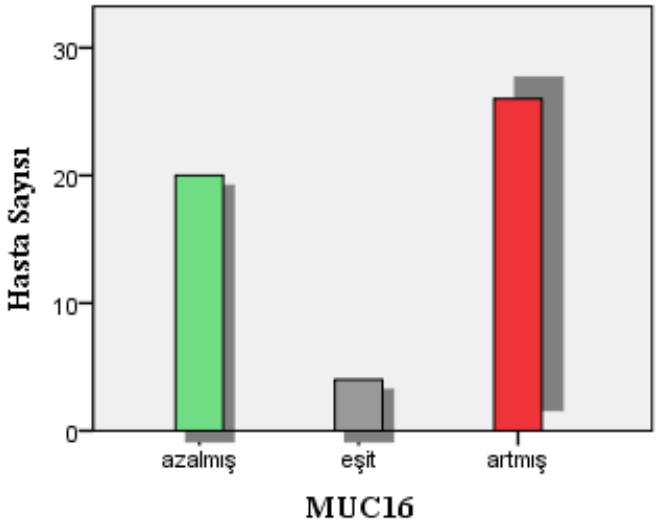
Q-PCR analizi sonucunda, MUC4'in tümör dokuda gen ekspresyonunun normal dokuya göre, 27 hastada (%54) artmış olduğu, 15 hastada (%30) normal dokuya göre azalmış olduğu, 8 hastada ise (%16) tümör ve normal doku arasında eşit ekspresyona sahip olduğu bulundu. MUC4'ün tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). (Tablo 4.4)



Şekil 4.4. MUC4 gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.

4.3.1.3. MUC16 Gen Ekspresyon Düzeyi

Eş zamanlı *(Real-Time)* PCR analizi sonucunda, MUC 16'nın tümör dokuda gen ekspresyonunun normal dokuya göre, 26 hastada (%52) artmış olduğu, 20 hastada (%40) normal dokuya göre azalmış olduğu, 4 hastada ise (%8) tümör ve normal doku arasında eşit ekspresyona sahip olduğu bulundu. MUC16'nın tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). (Tablo 4.4). Hasta bazlı sonuçlar incelendiğinde, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre, diğer transmembran müsinler olan MUC1 ve MUC4'e göre MUC16'nın tümör dokuda ekspresyonunun daha yüksek olduğu dikkati çekti.



Şekil 4.5. MUC16 gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.

MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeylerinin birbirleri ile ilişkisi araştırıldı. Buna göre:

- MUC1'in, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi [sırasıyla (r= 0,01 p=0,9), (r= 0,02 p=0,8)].

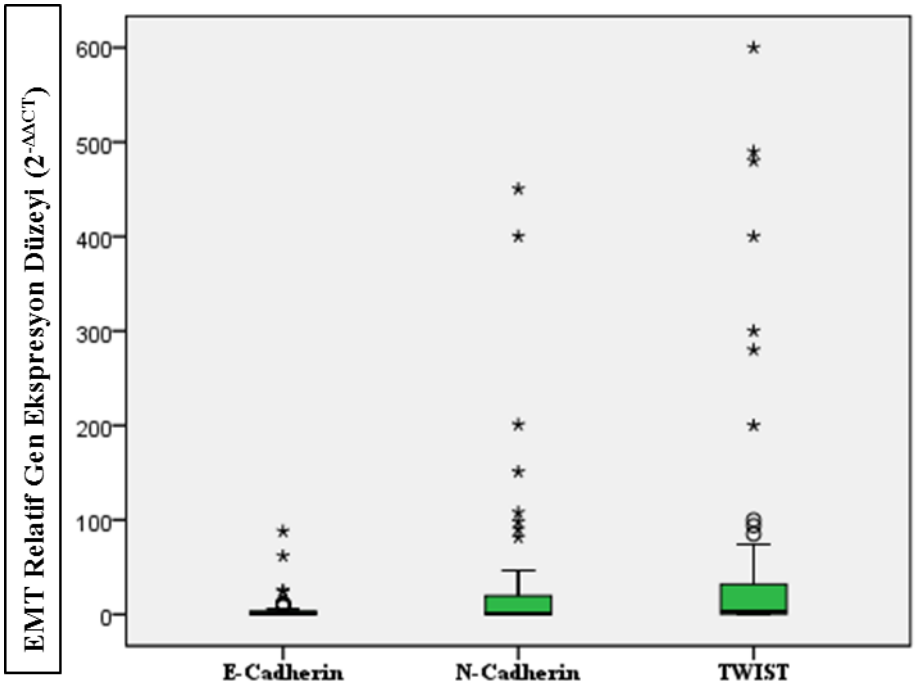
- MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (r= 0,4 p=0,03). Buna göre, MUC4 gen ekspresyonunun arttığı hastalarda MUC16 gen ekspresyonunun da artmış olduğu görüldü.

4.3.2. Epitelyal-Mezenkimal Transizyon Gen Ekspresyon Düzeyleri

Eş zamanlı PCR sonuçlarına göre, tümör dokuda E-Kaderin, N- Kaderin, TWIST gen ekspresyon düzeyleri analiz edildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre gruplanan genlerin ekspresyon dağılımları Tablo 4.5.'te verilmiştir. EMT belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri de Şekil 4.6'da görülmektedir.

Tablo 4.5. Epitelyal-mezenkimal transizyon gen ekspresyon dağılımları

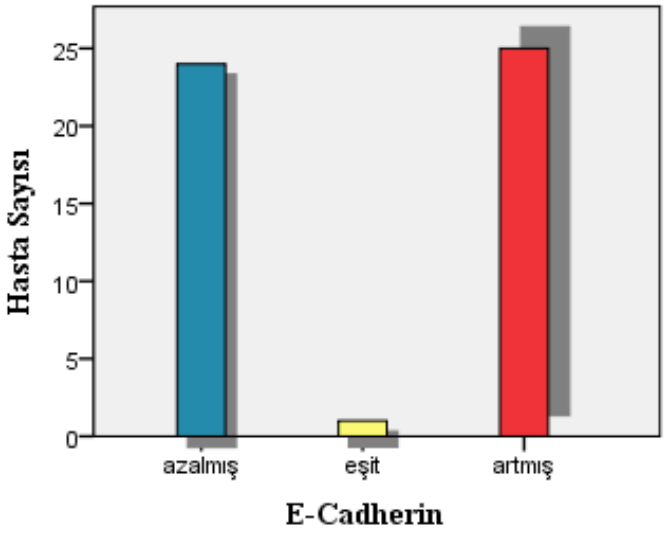
GEN	Ekpresyonu artan hasta sayısı (%)	Ekpresyonu azalan hasta sayısı (%)	Ekspresyonu eşit olan hasta sayısı (%)	Ortalama (Ekpresyon Aralığı)	P değeri
E-Cadherin	25 (%50)	24 (%48)	1 (%2)	4,62 (0,01-61,8)	0,08
N-Cadherin	24 (%48)	21 (%42)	5 (%10)	35,71(0,01-450,41)	**0,01**
TWIST	23 (%46)	17 (%34)	10 (%20)	62,60(0,01-600,28)	**0,002***



Şekil 4.6. Pankreas kanserinde EMT belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri

4.3.2.1. E-Kaderin Gen Ekspresyon Düzeyi

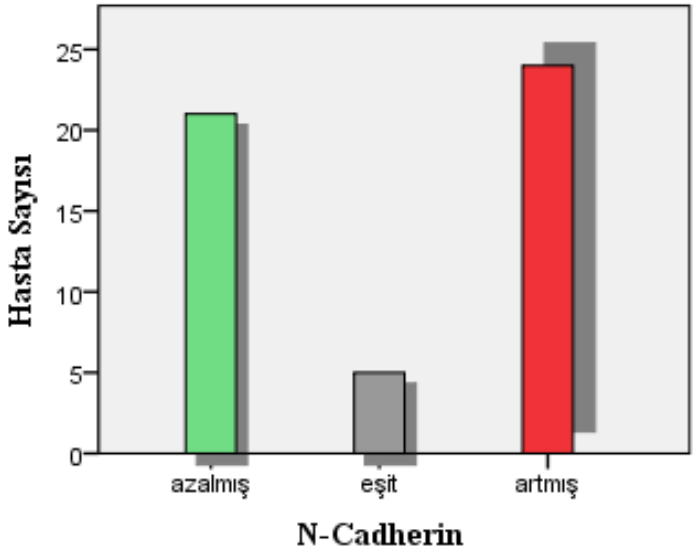
Q-PCR analizi sonucunda, E-Kaderinin tümör dokuda gen ekspresyonunun normal dokuya göre, 25 hastada (%50) artmış olduğu, 24 hastada (%48) normal dokuya göre azalmış olduğu, 1 hastada ise (%2) tümör ve normal doku arasında eşit ekspresyona sahip olduğu bulundu. E-Kaderinin tümör dokusundaki ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p>0,05).(Tablo 4.5).



Şekil 4.7. E-Kaderin gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.

4.3.2.2. N-Kaderin Gen Ekspresyon Düzeyi

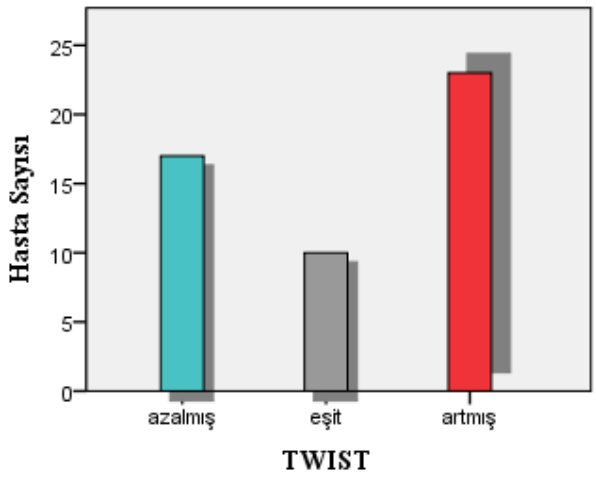
Q-PCR analizi sonucunda, N-Kaderinin tümör dokuda gen ekspresyonunun normal dokuya göre, 24 hastada (%48) artmış olduğu, 21 hastada (%42) normal dokuya göre azalmış olduğu, 5 hastada ise (%10) tümör ve normal doku arasında eşit ekspresyona sahip olduğu bulundu. N-Cadherinin tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). (Tablo 4.5)



Şekil 4.8. N-Kaderin gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.

4.3.2.3. TWIST Geninin Ekspresyon Düzeyi

Q-PCR analizi sonucunda, TWIST'in tümör dokuda gen ekspresyonunun normal dokuya göre, 23 hastada (%46) artmış olduğu, 17 hastada (%34) normal dokuya göre azalmış olduğu, 10 hastada ise (%20) tümör ve normal doku arasında eşit ekspresyona sahip olduğu bulundu. TWIST'in tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).



Şekil 4.9. TWIST gen ekspresyonunun hastalara göre değişimi.

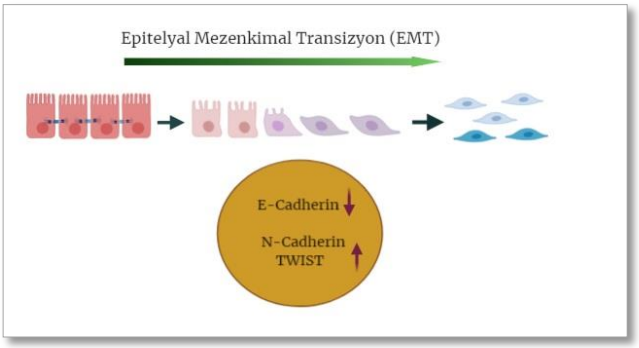
E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST gen ekspresyon düzeylerinin birbirleri ile ilişkisi araştırıldı. Buna göre:

- E-Kaderin'in N-Kaderin ve TWIST gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak negatif yönde anlamlı ilişki olduğu belirlendi [sırasıyla (r= -0,5 p=0,0), (r= -0,4 p=0,0)] . E-Kaderinin tümör dokuda gen ekspresyonunun azaldığı hastalarda, TWIST ve N-Kaderin ekspresyonunun artmış olduğu belirlendi.

-TWIST ve N-Kaderin gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkideğerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir ilişki ve olduğu tespit edildi (r= 0,8 p=0,0). Buna göre, beklendiği üzere, N-Kaderin gen ekspresyonunun arttığı hastalarda TWIST gen ekspresyonunun da artmış olduğu görüldü.

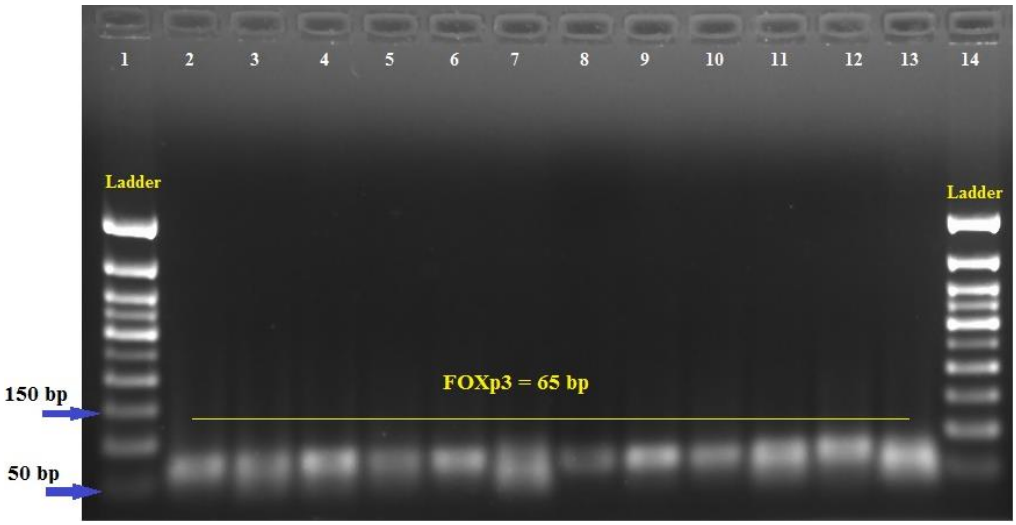
Sonuçların analiz edilmesiyle hastalardaki EMT durumu belirlendi. Buna göre, literatür bilgilerine dayanarak, E-Cadherin ekspresyonunun azaldığı, N-Kaderin

ve TWIST ekspresyonunun arttığı hastalarda EMT olduğu kabul edildi (Şekil 4.18). PCR sonuçları ve immunohistokimyasal bulgular birlikte değerlendirildi ve hasta bazlı incelemelerin sonucunda temelde E-Cadherin ekspresyon profili baz alınarak ve N-Kaderin ve TWIST'in de tümör dokudaki değişimi izlenerek EMT varlığı değerlendirildi.



Şekil 4.10. Epitelyal mezenkimal transizyon süreci.

4.3.3. FOXP3 Gen Ekspresyon Düzeyi



Şekil 4.11. FOXP3 geninin agaroz jel elektroforez görünümü.

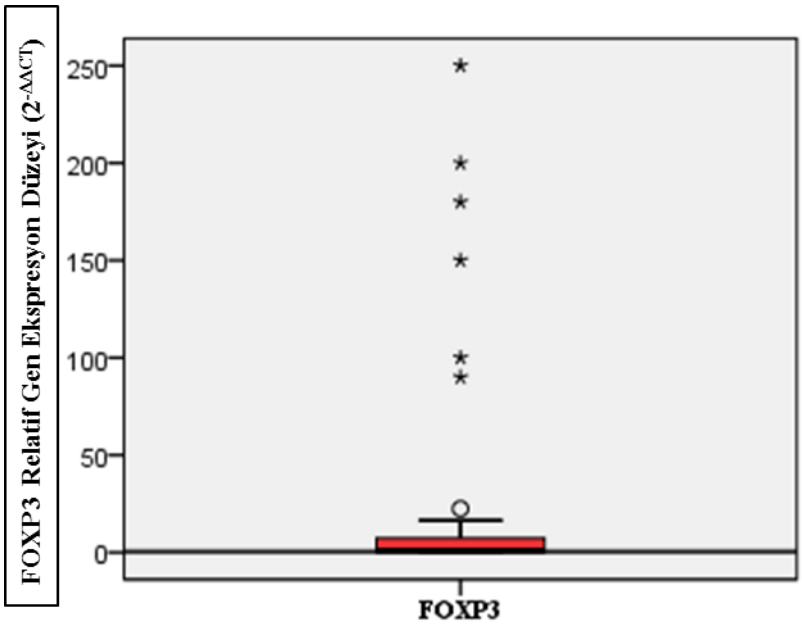
1.ve 14. Kuyular DNA Ladder, 2,4,6,8,10,12. kuyular pankreas tümör doku örnekleri, 1,3,5,7,9,11,13. kuyular pankreas normal doku örnekleri.

Real Time PCR analizi sonucunda, FOXP3'ün tümör dokuda gen ekspresyonunun 28 hastada (%56) artmış olduğu, 16 hastada (%32) normal dokuya

göre azalmış olduğu, 6 hastada ise (%12) tümör ve normal doku arasında eşit ekspresyona sahip olduğu bulundu. FOXP3 geninin tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. FOXP3 gen ekspresyon dağılımı

FOXP3 Gen Ekspresyonu	Hasta sayısı (%)	Ortalama (Ekspresyon Aralığı)	p değeri
Azalmış	16 (%32)	22,19 (0,01-250,01)	**0,001***
Artmış	28 (%56)		
Eşit	6 (%12)		



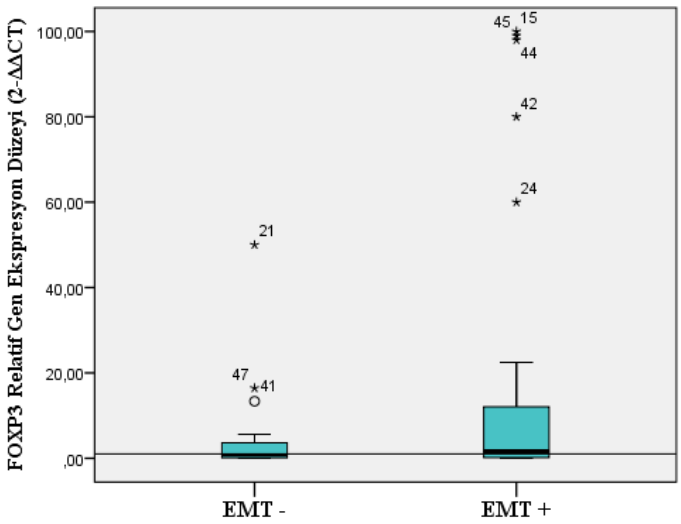
Şekil 4.12. Pankreas kanserinde FOXP3 gen ekspresyon düzeyleri.

FOXP3 gen ekspresyon düzeylerinin, transmembran müsin genleri ve EMT genleri ile ilişkisi araştırıldı. Buna göre:

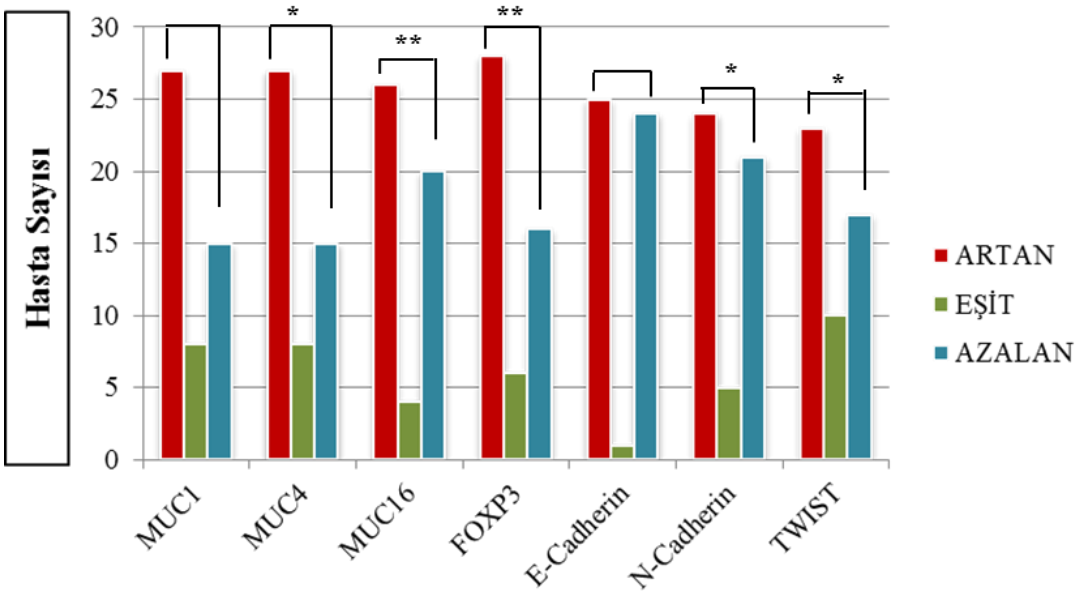
- FOXP3'ün MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu belirlendi. [sırasıyla (r= 0,4 p=0,001), (r= 0,4 p=0,003), (r=0,5, p=0,0001)]

FOXP3'ün transmembran müsinler arasında özellikle MUC16 ile güçlü korelasyon gösterdiği tespit edildi. Buna göre, FOXP3'ün tümör dokuda gen ekspresyonunun arttığı hastalarda, MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyonlarının da artmış olduğu belirlendi.

-FOXP3'ün E-Kaderin, N- Kaderin ve TWIST gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi [sırasıyla (r= -0,6 p=0,0001), (r= 0,8 p=0,0003), (r=0,7, p=0,0001)]. Buna göre, FOXP3'ün gen ekspresyonunun arttığı durumlarda E-Kaderin ekspresyonu azalırken, N-Kaderin ve TWIST gen ekspresyonunun artmış olduğu görüldü. Bu durum FOXP3 ile EMT'nin anlamlı bir ilişkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.13. FOXP3 gen ekspresyonunun EMT'ye göre dağılımı.



Şekil 4.14. Pankreas kanseri hastalarının normal dokuya göre tümör dokularındaki gen ekspresyon düzeylerinin değişimi (*p≤0,05, **p≤0,001, - p>0,05)

4.4. Pankreas Kanserinde Moleküllerin Ekspresyon Düzeyleri (IHC)

MUC1, MUC4, MUC16 transmembran müsin moleküllerinin ekspresyonları immünohistokimyasal olarak araştırıldı. Müsin moleküllerinin tümör-normal grup arası farkları ve birbirleriyle olan ilişkileri kaydedildi.

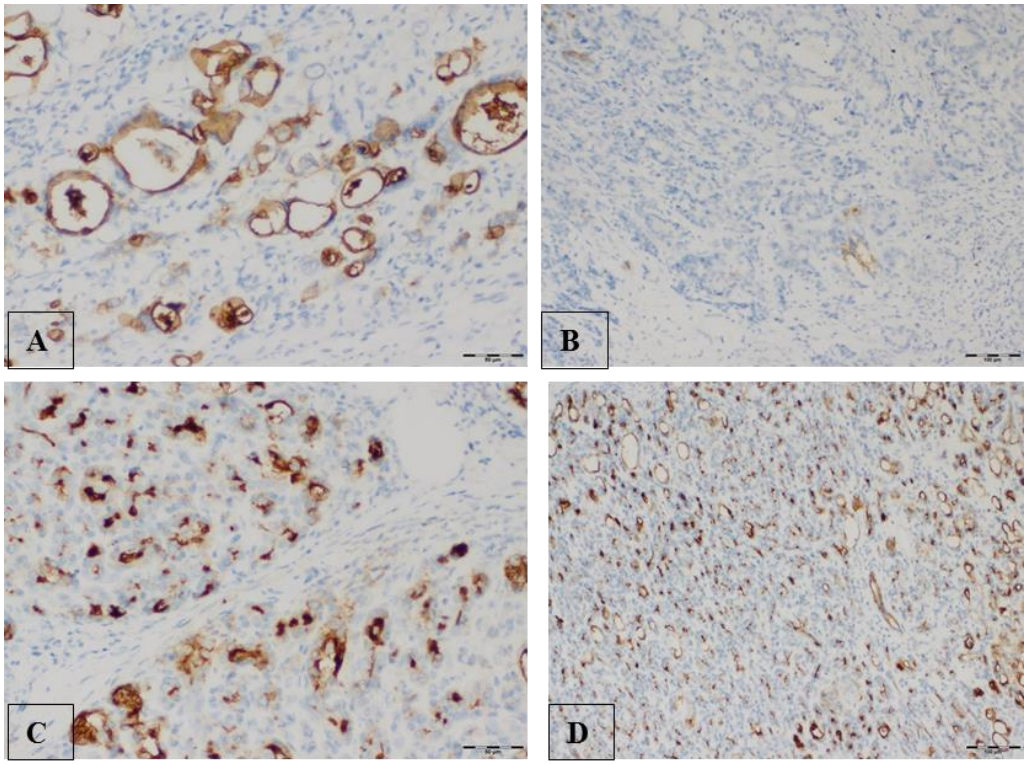
4.4.1. Transmembran Müsin (MUC1, MUC4, MUC16) Moleküllerinin Ekspresyon Düzeyleri

MUC1, MUC4 ve MUC16 antikorları ile boyanan dokularda tümör ve normal doku alanları mikroskobik olarak değerlendirildi. Antikorların dokudaki sitoplazmik ve membranöz boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdesine göre analizler gerçekleştirildi.

Boyanma yüzdesi “skor 2” olan ve şiddetli boyanma gösteren “sınıf 2” dokular yüksek ekspresyon, boyanma yüzdesi “skor 1” olan ve hafif- orta boyanma yoğunluğuna sahip “sınıf 1” dokular ise düşük ekspresyon olarak değerlendirildi.

4.4.1.1. MUC1 Molekül Ekpresyon Düzeyi

MUC1 antikorunun immünohistokimyasal değerlendirilmesi sonucunda tümör ve normal pankreas dokusu arasında spesifik bir fark izlenmedi. Tümör dokudada normal dokudada yaygın boyanma görüldü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. MUC1 antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.

A: Tümör dokuda yüksek ekpresyon (x20), B: tümör dokuda düşük ekspresyon(x10), C-D: Normal dokuda yüksek ekspresyon (x20,x10).

MUC1 ‘in boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdeleri Tablo 4.15’te gösterilmiştir. Tümör ve normal doku arasındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$, Ki-kare testi). MUC1’in Q-PCR sonuçlarında da tümör dokudaki gen ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştı ($p=0,1$). Q-PCR ve IHC yöntem sonuçlarına bakıldığında birbiri ile uyumlu oldukları tespit edildi.

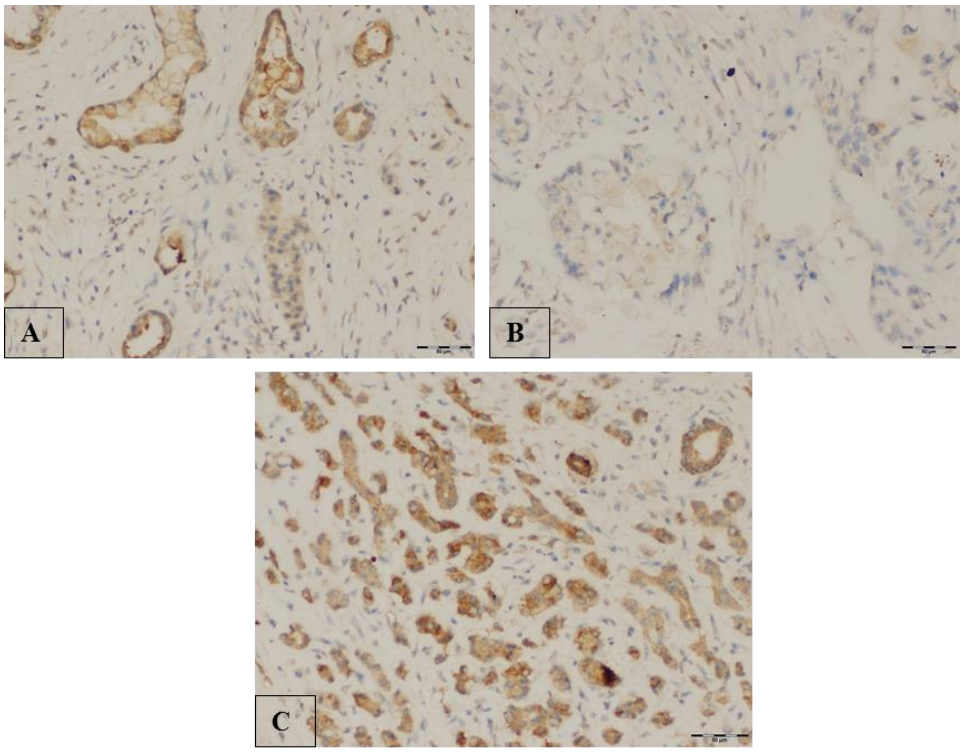
Tablo 4.7. MUC1 molekül ekspresyonunun tümör ve normal dokuda hastalara göre dağılımı.

Boyanma Yoğunluğu	Hafif-orta boyanma (%)	Şiddetli boyanma (%)	p değeri
Normal Doku	3 (%6)	47 (%94)	
Tümör doku	8 (%16)	42 (%84)	
Boyanma Yüzdesi	**≤ %70 (%)**	**>%70(%)**	0,4
Normal Doku	3 (%6)	47 (%94)	
Tümör doku	8 (%16)	42 (%84)	

Mikroskobik değerlendirmeler esnasında, MUC1'in tümör ve normal doku arasında spesifik bir ayrıma gitmediği ancak pankreas dokusu dışındaki alanları (duodenum, yağ dokusu vs.) boyamadığı önemle dikkati çekti. Bu bulgu MUC1'in pankreasa spesifik bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

4.4.1.2. MUC4 Molekül Ekpresyon Düzeyi

MUC4'ün immünohistokimyasal değerlendirilmesi sonucunda belirlenen boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdeleri Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Tümör ve normal doku arasındaki karşılaştırmada tümör dokudaki ekspresyon değişiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Ki-kare, $p<0,05$).



Şekil 4.16. MUC4 antikoru ile dokuda boyanma.

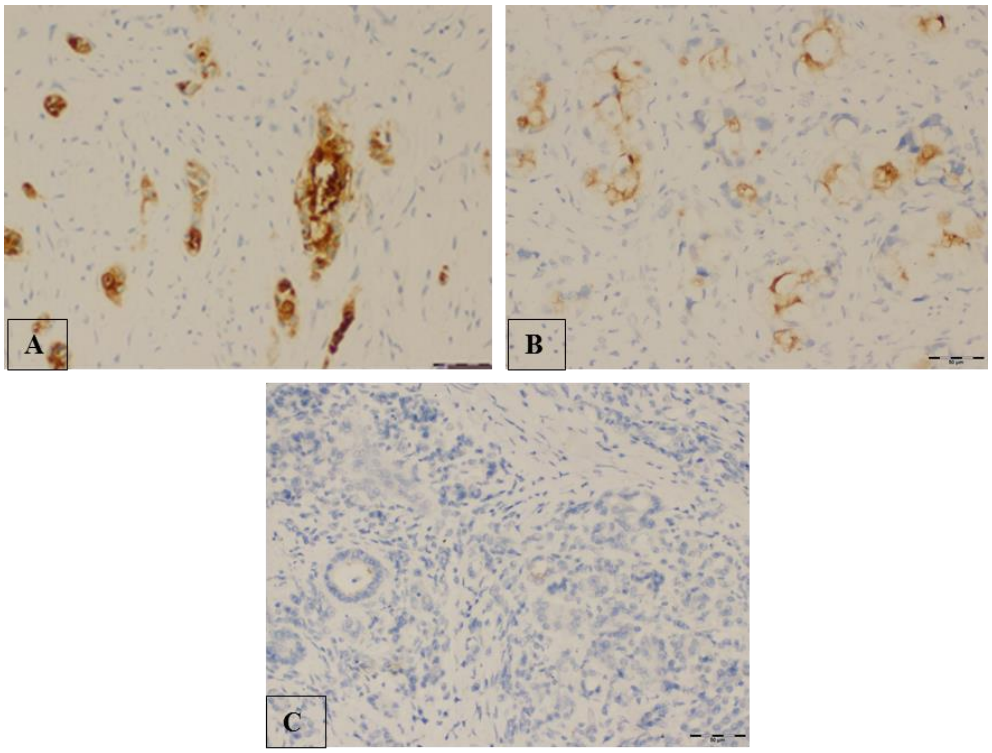
A: Tümörde yüksek ekspresyon (x20), B: Tümörde düşük ekspresyon(x20), C: Normal dokuda yüksek ekspresyon (x20).

Tablo 4.8. MUC4 molekül ekspresyonunun tümör ve normal dokuda hastalara göre dağılımı.

Boyanma Yoğunluğu	Hafif-orta boyanma (%)	Şiddetli boyanma (%)	P değeri
Normal Doku	16 (%32)	34 (%68)	
Tümör doku	18 (%36)	32 (%64)	
Boyanma Yüzdesi	**≤ %70 (%)**	**>%70(%)**	0,06
Normal Doku	1 (%2)	49 (%98)	
Tümör doku	12 (%24)	38 (%76)	

4.4.1.3. MUC16 Molekül Ekpresyon Düzeyi

İmmünohistokimyasal incelemelerde sitoplazmik ve membranöz boyanma gösteren MUC16'nın tümör dokuda yüksek ekspresyon gösterirken, normal dokuda büyük oranda boyanmadığı görüldü (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. MUC16 antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma. A-B: Tümör dokuda yüksek ekspresyon, C: Normal dokuda düşük ekspresyon. (x20)

PDAK hastalarından 47'sinin (%94) normal pankreas dokularında MUC16 molekülüne rastlanmazken, yalnızca 3 hastanın normal pankreas dokusunda hafif-orta boyanma yoğunluğu ve skor1 boyanma yüzdesine rastlandı. MUC16 molekülünün mikroskobik olarak değerlendirilen boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdeleri Tablo 4.18'da gösterilmiştir. Tümör ve normal doku karşılaştırmasında, tümör dokudaki moleküler ekspresyon artışı istatiksel olarak anlamlı bulundu (ki kare, $p<0,05$).

Mikroskobik incelemeler sırasında diğer müsinlerden farklı olarak MUC16'nın tümör seçici boyama özelliği gösterdiği, tümör dışı alanları neredeyse

hiç boyamadığı önemle dikkati çekti. Q-PCR sonuçlarında da tümördeki gen ekspresyon düzeyi anlamlı artış göstermişti (p<0,001).

Tablo 4.9. MUC16 molekül ekspresyonunun tümör ve normal dokuda hastalara göre dağılımı.

Boyanma Yoğunluğu	Boyanma yok (%)	Hafif-orta boyanma (%)	Şiddetli boyanma (%)	P değeri
Normal Doku	47(%94)	3 (%6)	0	
Tümör doku	0	15 (%30)	35 (%70)	
Boyanma Yüzdesi	**Boyanma yok**	**≤ %50 (%)**	**>%50(%)**	**0,004**
Normal Doku	47 (%94)	3 (%6)	0	
Tümör doku	0	28 (%56)	22 (%44)	

4.4.2. Epitelyal-Mezenkimal Transizyon (EMT) Moleküllerinin Ekspresyon Düzeyleri

EMT molekülleri olan E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST'in immünohistokimyasal analizler sonucu ekspresyon durumları hastaların tümör ve normal dokusunda değerlendirildi. Buna göre, EMT sürecinin aktif olabilmesi için beklenen özellikler (tümörde E- Kaderin ekspresyon kaybı, N- Kaderin ve TWIST ekspresyon artışı) ayrıca incelenerek EMT varlığı belirlendi. (Şekil 4.21)

Tablo 4.10'da EMT molekülerinin immünohistokimyasal analiz sonuçları verilmiştir. Verilere göre, E-Kaderin'in tümörde ekspresyon kaybı 24 hastada izlenmiştir. N-Kaderin, normal dokuda da yaygın boyanma gösterse de tümör alanları şiddetli ve yoğun boyanma izlendi. TWIST molekülünde normal pankreas dokusunda 45 hastada (%90) ekspresyon izlenmezken, tümör dokuda daha yaygın boyandığı, tümör seçili olduğu dikkati çekti.

Tablo 4.10. EMT moleküllerinin immünohistokimyasal değerlendirilmesi.

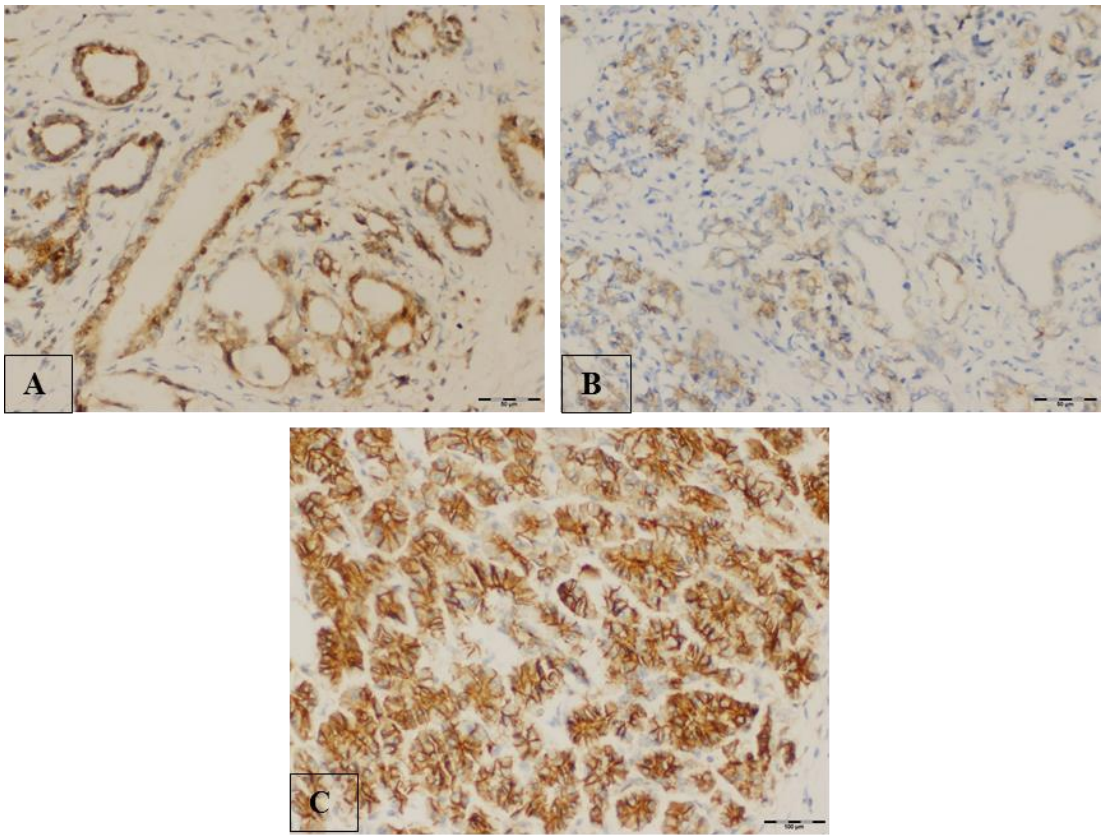
			E-Cadherin	N-Cadherin	TWIST
Boyanma yoğunluğu	Tümör Doku	boyanma yok	-	-	12(%24)
		hafif-orta	24(%48)	6(%12)	26(%52)
		şiddetli	26(%52)	44(%88)	12(%24)
	Normal Doku	boyanma yok	-	-	45(%90)
		hafif-orta	0	18 (%36)	5(%10)
		şiddetli	50(%100)	32 (%64)	0
Boyanma yüzdesi	Tümör Doku	düşük	24(%48)	5(%10)	31 (%62)
		yüksek	26(%52)	45(90)	10 (%38)
	Normal Doku	düşük	0	8(%16)	45(%90)
		yüksek	50(%100)	42(%84)	5(%10)
			p<0,05	p>0,05	**p<0,05**

Q-PCR analizinde EMT belirteçlerinin, tümör dokusundaki gen ekspresyon düzeylerindeki değişim istatiksel olarak anlamlı bulunmuştu ($p<0,05$). Her iki yöntemde de tümör ve normal grup arası fark izlenmiş olsa da, immünohistokimyasal olarak özellikle N-Kaderin ve TWIST'te boyanma yoğunluğu ve yüzdelerinin hastalar arası değişiklik gösterdiği görülmektedir.

4.4.2.1. E-Kaderin Molekül Ekpresyon Düzeyi

Mikroskobik değerlendirmelerde tümör dokuda E-Kaderin ekspresyon kaybına rastlanırken normal pankreas dokusunda ekspresyon kaybı izlenmedi. (Şekil 4.18)

IHC analizlerine göre 24 hasta (%48)'nın tümör dokusunda E-Kaderin ekspresyon kaybı izlenmiştir. Hasta bazlı incelemelerde, Q-PCR sonuçlarında tümörde gen ekspresyonu azalan hastaların aynı hastalar olduğu görüldü. E-Kaderin molekülünün tümör dokuda azalan ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (ki-kare, $p=0,03$) (Tablo 4.10).

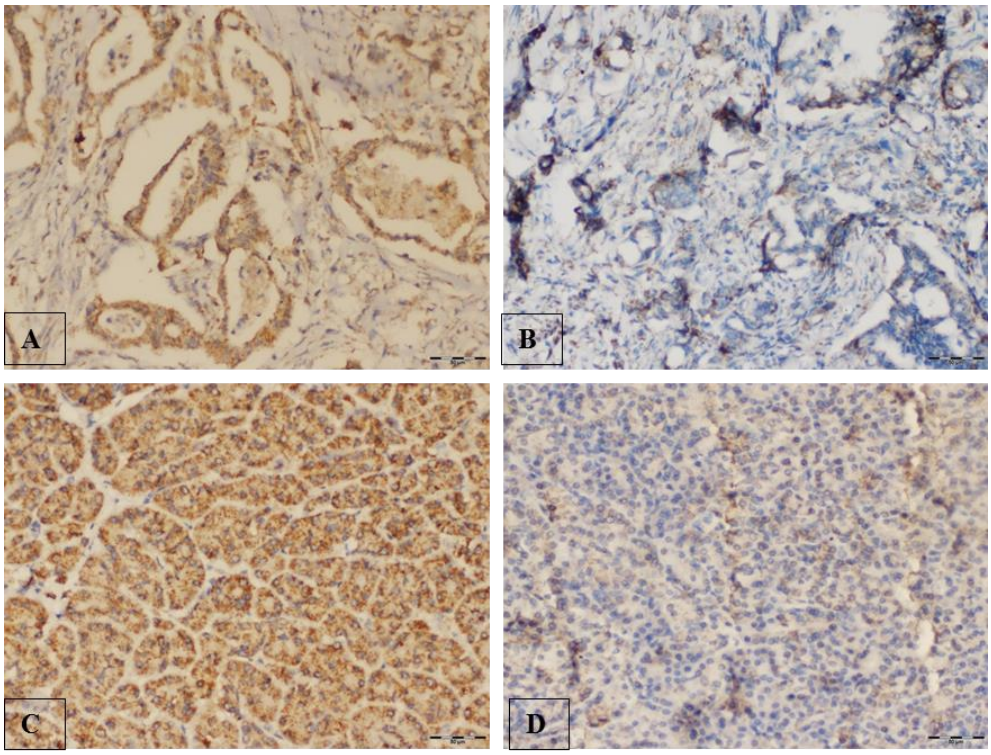


Şekil 4.18. E-Kaderin antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.

A: Tümör dokuda yüksek ekspresyon, B: Tümör dokuda E-cadherin ekspresyon kaybı, C: Normal dokuda yüksek ekspresyon (x20)

4.4.2.2. N-Kaderin Molekül Ekpresyon Düzeyi

IHC analizlerine göre N- Kaderin'in değerlendirmesinde 45 hastanın (%90) tümör dokusunda N-Kaderin ekspresyon artışı izlendi. Ancak veriler incelendiğinde, 42 hastanın (%84) normal pankreas dokusunda da yüksek ekspresyon dikkati çekti. (Tablo 4.10) İstatiksel olarak da N-Kaderin molekülünün tümör dokusundaki ekspresyon düzeyi normal dokuya göre anlamlı bir değişim göstermemektedir (ki-kare, p=0,3). Q-PCR sonuçlarında tümörde gen ekspresyon düzeyinde anlamlı bir artış görülse de immünohistokimyasal sonuçlarda spesifik bir bulguya rastlanamadı.

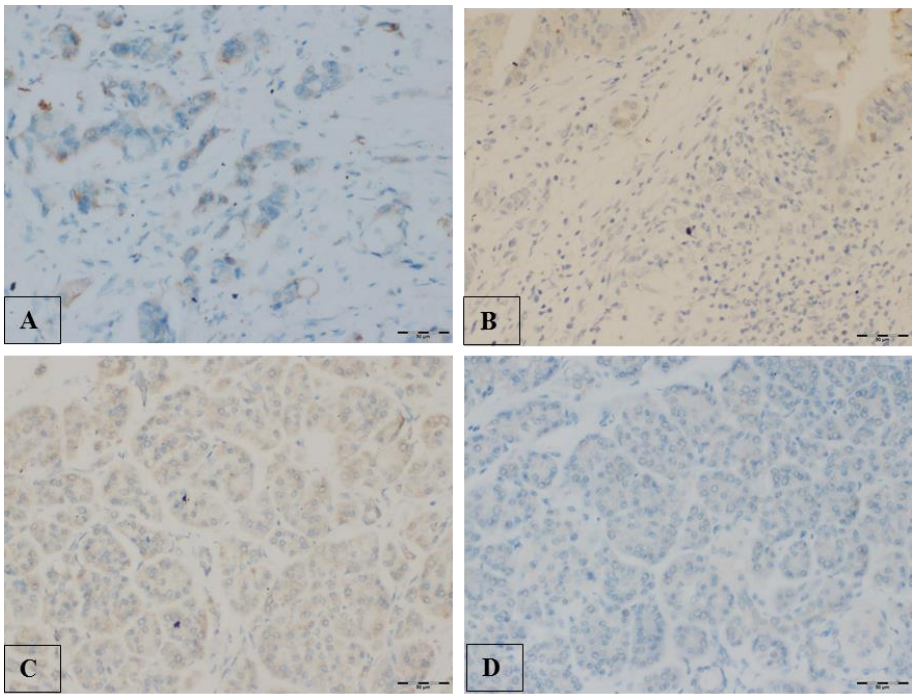


Şekil 4.19. N-Kaderin antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.

A: Tümörde yüksek ekspresyon, B: Tümörde düşük ekspresyon, C: Normal dokuda yüksek ekspresyon, D: Normal dokuda düşük ekspresyon. (x20)

4.4.2.3. TWIST Molekül Ekpresyon Düzeyi

TWIST'in boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdesinin tümör ve normal doku arasındaki değişimi de Tablo 4.10'da gösterilmiştir. Buna göre, tümör dokuda yüksek ekspresyon göstermesine karşın hastalardan 45'inin (%90) normal dokusunda düşük ekspresyon görüldü. TWIST de tümör seçili boyanma özelliği gösterdi ve normal pankreas dokusunda ekspresyonu yaygın olarak görülmedi. İstatistiksel analiz sonucunda da TWIST molekülünün ekspresyon düzeyinin tümör dokuda anlamlı bir artış gösterdiği bulundu (p=0,003).

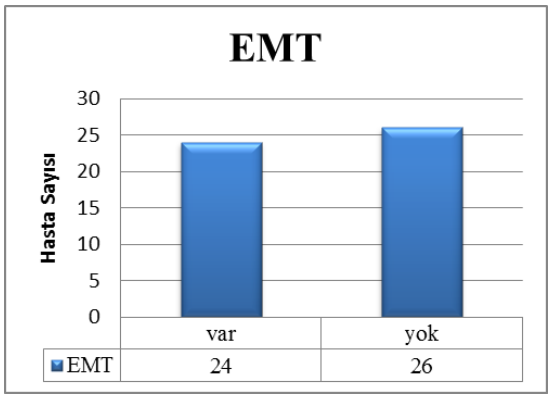


Şekil 4.20. TWIST antikoru ile tümör ve normal dokuda boyanma.

A: Tümörde yüksek ekspresyon, B:Tümörde düşük ekspresyon, C: Normal dokuda yüksek ekspreson, D: Normal dokuda düşük ekspresyon. (x20)

E-Kaderin ve TWIST moleküllerinin tümör dokudaki ekspresyon düzeyleri gen ekspresyon düzeyleriyle karşılaştırıldığında birbiri ile ilişkili olduğu görüldü (sırasıyla r= 0,4 ,**P<0,001** ve r= 0,8 **p<0,001).**

İncelediğimiz E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST EMT belirteçlerinin gen ve molekül ekspresyon düzeyleri göz önüne alınarak hastaların EMT profili belirlendi (Şekil 4.21)

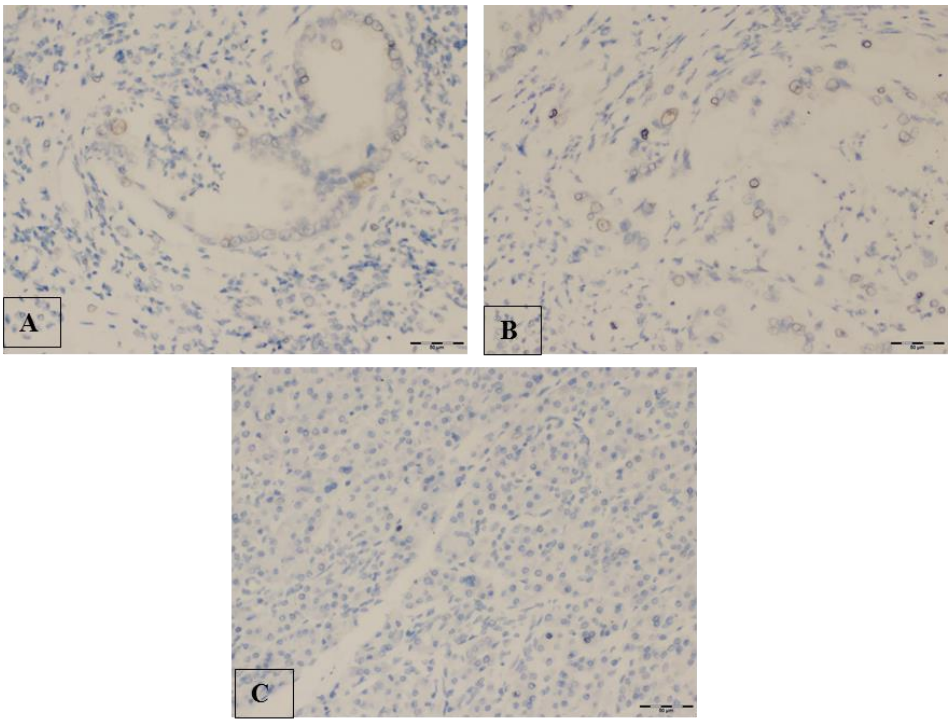


Şekil 4.21. Pankreas kanseri hastalarında EMT profili.

Not: EMT belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, tümörde E-Kaderin gen ekspresyonu tümörde 24 hastada (%48) azalırken, N-Kaderin ve TWIST gen ekspresyon düzeyinin arttığı belirlenmişti. İmmünohistokimyasal incelemelerimizde de aynı hastalarda benzer değişimleri saptadık. IHC yönteminde N-Kaderin ve TWIST değerlendirmeleri değişiklik gösterse de hasta bazlı incelemelerimizde ekspresyon artışlarının aynı hastalarda olduğu gözlemledik. E-kaderin molekül ekspresyonunun 24 hastanın tümör dokusunda azaldığı saptandı ve bu hastaların N-Kaderin ve TWIST molekül ekspresyonları da yüksekti. Bu nedenle, gen ve molekül ortak ekspresyon profili baz alınarak EMT varlığı belirlenm

4.4.3. FOXP3 Molekül Ekspresyon Düzeyi

Mikroskobik incelemelerde FOXP3'ün dokuda bulunma durumu (nükleer boyanma özelliği) değerlendirilerek olgular FOXP3 negatif ve FOXP3 pozitif olarak belirlendi. İmmünohistokimyasal veriler incelendiğinde 28 hastada (%56) FOXP3 varlığına rastlanırken, 22 hasta negatif olarak kaydedildi. (Tablo 4.11)



Şekil 4.22. Tümör dokuda ve normal dokuda FOXP3 molekül ekspresyonunun gösterimi.

A-B: Tümör dokuda FOXP3, C: Normal dokuda FOXP3 (x20)

Tablo 4.11. FOXP3 molekülünün hastalara göre boyanma durumu

FOXP3	Negatif (%)	Pozitif (%)
	22 (%44)	28 (%56)

Q-PCR sonuçları ile karşılaştırıldığında ise gen ekspresyonu artan 28 hastanın IHC sonuçlarında da FOXP3 molekülünün pozitif olduğu görüldü. İki yöntem arasında istatistiksel olarak yüksek anlamlı güçlü pozitif korelasyon saptandı (r=0,9, p<0,001).

4.5. Gen Ekspresyon Düzeyleri ile Molekül Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Q-PCR analizleri ve immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda MUC1, MUC4, MUC16, FOXP3, E-Cadherin, N-Cadherin ve TWIST'in tümör dokudaki değişimlerinde gen ve molekül düzeylerinin ilişkisi Spearmen korelasyon testi ile araştırıldı. İstatistiksel veriler tablo 4.12' de verilmiştir.

Tablo 4.12. Gen ve molekül ekspresyon düzeylerinin korelasyon analizi.

IHC / Q-PCR	MUC1	MUC4	MUC16	FOXP3	E-Cad	N-Cad	TWIST
MUC1	r=0,4 **p=0,01**	r=0,7 **p<0,001***	r=0,3 **p=0,01**	p=0,6	p=0,06	p=0,8	p=0,8
MUC4	r=0,4 **p=0,01**	r=0,7 **p=0<001***	r=0,3 **p=0,01**	p=0,6	p=0,06	p=0,8	p=0,8
MUC16	r=0,3 p=0,1	r=0,3 **p=0,02**	r=0,9 **p<0,001***	r=0,5 **p<0,001***	r= -0,8 **p<0,001***	p=0,9	p=0,3
FOXP3	p=0,1	p=0,5	r=0,4 **p=0,001**	r=0,5 **p<0,001***	r= -0,4 **p<0,001***	p=0,9	p=0,06
E-Cad	p=0,6	p=0,4	r= -0,5 **p<0,001***	r= -0,5 **p<0,001***	r=0,4 **P<0,001***	p=0,9	r=0,3 p=0,01
N-Cad	p=0,5	p=0,6	r=0,2 **p=0,05**	r=0,4 **p<0,001***	r=-0,3 **p=0,009**	p=0,5	r=0,4 **p=0,003**
TWIST	p=0,2	p=0,5	p=0,5	p=0,1	p=0,1	p=0,4	r=0,8 **p<0,001***

r = *Spearman rho correlation coefficient*

Gen ve molekül ekspresyonlarının ilişki durumu incelendiğinde MUC1 gen ekspresyon düzeyinin, immünohistokimyasal analizde MUC1, MUC4 ve MUC16 moleküler ekspresyon düzeyi ile istatistiksel olarak anlamlı, pozitif korelasyonu bulundu. Korelasyon katsayıları (r) incelendiğinde, özellikle MUC4 moleküler ekspresyonu ile istatistiksel olarak oldukça anlamlı, güçlü pozitif korelasyon görüldü ($p<0,001$ ve $r=0,7$). MUC4'ün her iki yöntemde de uyumlu sonuç verdiği, korelasyon katsayısının yüksekliğinden ve anlamlılık testinden anlaşılmaktadır. MUC16 gen ekspresyonunun diğer müsinlerden daha farklı olarak, MUC16, FOXP3 ve E-Kaderin molekül ekspresyon düzeyleriyle istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi bulundu. MUC16 gen ekspresyonu, MUC16 ve FOXP3 molekülü ile anlamlı pozitif korelasyon gösterirken, E-Kaderin ile güçlü negatif korelasyon göstermektedir. Bu durum MUC16'nın da benzer hastalarda aynı artışı gösterdiğini, gen ve molekül ekspresyonunun neredeyse aynı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda FOXP3 ile pozitif korelasyonu MUC16 ekspresyonu artan hastalarda FOXP3 ekspresyonunun da artmış olduğuna işaret etmektedir. E-Kaderin ile saptanan negatif korelasyon, MUC16 ve FOXP3'te ekspresyonu artan hastaların E-Kaderin ekspresyonunun azaldığını göstermektedir.

EMT belirteçlerinden E-Kaderin ve TWIST'in her iki yöntemde de uyumlu sonuç verdiği, hem gen hem molekül ekspresyonunun korelasyonu ile görülmektedir. Özellikle tablo incelediğinde, iki yöntem karşılaştırılmasında, TWIST'in korelasyon katsayısının ($r=0,8$) oldukça yüksek olduğu görülür. Bu iki grup arasındaki güçlü benzerliğe işaret etmektedir.

Özetle ilişkiler değerlendirildiğinde özellikle MUC4, MUC16, FOXP3, E-Kaderin ve TWIST gen ve molekül ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı ve çok iyi düzeyde korelasyon gösterdiği saptandı ($p<0,001$). MUC1'in gen ve molekül ekspresyon düzeyleri arasında ise orta düzeyde pozitif korelasyonu saptandı ($p<0,05$). İlişki testinde yalnızca N-Kaderin'in iki yöntem arasında ilişkisi bulunamadı. N-Kaderin'in tümördeki gen ekspresyon düzeyleri Q-PCR verilerinde daha anlamlı olarak belirlenirken, IHC sonuçlarında molekül ekspresyonunun tümör-normal doku arasında spesifik bir fark yaratmadığı gözlendi.

Q-PCR ve IHC yöntemleri karşılaştırıldığında görülen bu farklılığın, gen anlatımındaki kalitatif ve kantitatif farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Eş zamanlı PCR yöntemiyle, fizyolojik veya patolojik olaylardaki transkripsiyonel yanıtlar ölçülürken, immünohistokimyasal yöntemde ilgili moleküllerin dokuda bulunma durumları ve lokalizasyonları araştırılmaktadır. N-Kaderin ekspresyonları arasında izlenen bu farkın transkripsiyon aşamasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.6. Gen ve Molekül Ekspresyon Düzeyleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Korelasyonu

Hastalara ait TNM evresi, tümörün histolojik tipi (diferansiasyon derecesi), lenf nodu metastaz durumu; lenf nodu metastazı varsa sayısı, uzak metastaz durumu; metastaz varsa bölgesi, tümörün pankreastaki lokalizasyonu ve kemoterapi durumları kaydedildi. Bu histopatolojik parametreler ile MUC1, MUC4, MUC16, FOXP3, E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST'in gen ve molekül ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Sonuçlar tablolar halinde verildi.

4.6.1. Gen Ekspresyon Düzeyleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması

Transmembran müsinlerin gen ekspresyon düzeyleri, hastaların TNM evresi, diferansiyasyon, lenf nodu metastazı ve metastaz parametreleri ile karşılaştırıldı. (Tablo 4.13)

MUC1 gen ekspresyon düzeyleri ile TNM evrelerindeki dağılım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri ve TNM evreleri arasındaki karşılaştırmada ise, düzeyler arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Ancak veriler incelendiğinde beklenenin aksine, TNM evre 1'de daha yüksek müsin ekspresyonları görüldü. Bu bulgu, MUC4 ve MUC16'ya kanserin ilk evrelerinde rastlandığını, evre ilerledikçe müsin ekspresyonlarının anlamlı olmadığını düşündürmektedir.

Tümörün diferansiyasyon derecesi ile transmembran müsinlerin karşılaştırılmasında ise, MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri ile diferansiyasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p>0,05).

Lenf nodu metastaz durumu ile yapılan karşılaştırmada ise, MUC1 ve MUC4 gen ekspresyon düzeyleri ile istatistiksel anlamlılık bulunamadı (p>0,05). Ancak MUC16 gen ekspresyon düzeyi ile lenf nodu metastazı varlığı arasında istatistiksel anlamlılık görüldü (p<0,05). Yine burada da lenf nodu metastazı olmayan hastalarda MUC16 ekspresyonunun daha yüksek olduğu görüldü.

Metastaz ve transmembran müsin gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında ise istatistiksel anlamlılık görülmedi (p>0,05). Bu durumun metastatik hasta sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.13. Transmembran müsin genlerinin ekspresyon düzeyleri ile klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması

	n	**MUC1**	**MUC4**	**MUC16**
TNM Evresi				
Evre I	11	0,4 (0,1-50,1)	9,4 (0,2-140,2)	16,5 (0,1-250,4)
Evre II	21	0,1 (0,1-22,3)	0,1 (0,1-72,1)	0,3 (0,0-200,2)
Evre III	8	0,8 (0,1-1,0)	1,5 (0,2-110,5)	0,2 (0,0-28,4)
Evre IV	10	0,4 (0,1-100,4)	3,2 (0,1-150,3)	1,5 (0,0-135,3)
		p=0,5	**p=0,05**	**p=0,01**
Diferansiyasyon				
Grade 1 (iyi)	12	0,3 (0,1-4,9)	4,6 (0,1-110,5)	0,4 (0,1-90,0)
Grade 2 (orta)	31	0,5 (0,1-100,4)	1,0 (0,01-140,2)	0,6 (0,1-250,4)
Grade 3 (az)	7	0,1 (0,1-0,8)	3,7 (0,02-150,3)	3,2 (0,1-95,2)
		p=0,3	**p=0,3**	**p=0,4**
Lenf Nodu Metastazı				
Yok	17	0,4 (0,0-100,4)	3,5 (0,0-140,2)	4,0 (0,0-250,4)
Var	33	0,5 (0,0-1,0)	1,2 (0,0-150,3)	0,4 (0,0-200,2)
		p=0,3	**p=0,5**	**p=0,03**
Metastaz				
Yok	42	0,47 (0,0-22,3)	1,2 (0,0-110,5)	0,5 (0,0-200,2)
Var	8	0,45 (0,0-100,4)	9,1 (0,0-150,3)	7,9 (0,0-250,4)
		p=0,3	**p=0,1**	**p=0,2**

FOXP3 gen ekspresyonunun TNM evrelerine göre dağılımına bakıldığında evreler arası gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). FOXP3 gen ekspresyon düzeyi ile TNM evre düzeyi korelasyonu incelendiğinde Spearman korelasyon testine göre, TNM evresi ile negatif korelasyon saptandı (*Spearman's rho correlation coefficient* r= -0.1, p=0.3) ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Veriler incelendiğinde, burada da beklenenin aksi bir durum görülmektedir. Evre I'de bulunan hastalarda FOXP3 gen ekspresyonunun daha yüksek olması, erken evrelerde FOXP3'e rastlanıldığını düşündürmektedir.

Diferansiyasyon, lenf nodu metastazı, uzak metastaz durumu ile FOXP3 gen ekspresyon düzeyinin karşılaştırılmasında ise düzeyler arası istatiksel anlamlılık görülmedi ($p>0,05$). Korelasyon testinde de diferansiyasyon, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ile korelasyon saptanamadı.

Tablo 4.14. FOXP3 ekspresyonu ve klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması.

		n	**FOXP3**	
TNM Evresi	Evre I	11	4,6 (0,1-200,2)	**p=0,03**
	Evre II	21	0,8 (0,1-100,3)	
	Evre III	8	0,2 (0,1-250,1)	
	Evre IV	10	2,5 (0,1-22,4)	
Diferansiyasyon	Grade 1 (iyi)	12	0,8 (0,1-180,3)	p=0,8
	Grade 2 (orta)	31	1,6 (0,1-250,1)	
	Grade 3 (az)	7	0,5 (0,1-200,2)	
Lenf Nodu Metastazı	Var	33	0,8 (0,1-180,3)	p=0,5
	Yok	17	1,7 (0,1-250,1)	
Metastaz	Var	8	4,5 (0,1-22,5)	p=0,2
	Yok	42	0,9 (0,1-250,1)	
**Kruskal-wallis testi ile yapıldı.*				

EMT genleri ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırıldı. TNM evreleri ile EMT genlerinin karşılaştırılmasında, E-Kaderin gen ekspresyon düzeyi ile evre düzeyleri arasındaki farkın istatiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). N-

Kaderin ve TWIST'in ise evreler arası gen ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tümörün diferansiyasyon derecesi ile EMT gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p>0,05). Ancak istatistiksel anlamlılık görülmese de, tabloda da görüldüğü gibi, tümörün diferansiyasyonu arttıkça tüm EMT genlerinin ekspresyon düzeyi artmıştır. Hasta verileri incelendiğinde, Grade 2 tümörlerden eksprese olan genler ile Grade 3 tümörlerden eksprese olan genlerin düzeyleri arasında neredeyse iki kat artış izlendi. Bu durum, tümör diferansiyasyonun son evrelerinde EMT sürecinin aktifleşmiş olabileceğini düşündürdü.

Tablo 4.15. EMT genlerinin ekspresyonları ile klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması

	n	**E-Cadherin**	**N-Cadherin**	**TWIST**
TNM Evresi				
Evre I	11	11,2 (0,1-11,2)	9,7 (0,2-400,1)	1,2 (0,1-600,2)
Evre II	21	0,6 (0,1-58,0)	0,4 (0,1-107,9)	0,4 (0,1-200,0)
Evre III	8	0,2 (0,1-9,7)	0,3 (0,1-450,4)	2,1 (0,1-500,5)
Evre IV	10	1,2 (0,1-61,8)	0,6 (0,1-81,5)	1,1 (0,1-94,5)
		p=0,03	**p=0,1**	**p=0,08**
Diferansiyasyon				
Grade 1 (iyi)	12	9,7 (0,1-61,8)	1,6 (0,1-150,8)	1,8 (0,1-490,2)
Grade 2 (orta)	31	1,0 (0,1-25,5)	0,8 (0,2-450,4)	1,0 (0,1-500,5)
Grade 3 (az)	7	0,2 (0,1-5,3)	0,1 (0,1-400,1)	0,2 (0,1-600,2)
		p=0,7	**p=0,8**	**p=0,3**
Lenf Nodu Metastazı				
Yok	17	2,0 (0,1-61,8)	0,8 (0,1-200,8)	0,8 (0,1-490,2)
Var	33	0,6 (0,1-11,20)	1,0 (0,1-450,4)	0,4 (0,1-600,2)
		p=0,4	**p=0,7**	**p=0,9**
Metastaz				
Yok	42	0,9 (0,1-58,0)	0,6 (0,1-450,4)	0,5 (0,1-600,2)
Var	8	3,3 (0,1-61,8)	0,9 (0,1-81,6)	2,1 (0,1-94,5)
		p=0,7	**p=0,6**	**p=0,4**

Lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ile EMT gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılık elde edilemedi ($p>0,05$).

EMT genleri ile klinikopatolojik parametrelerin korelasyon analizi yapıldı. E-Kaderin ile TNM evresi arasında negatif korelasyon bulundu (*Spearman rank correlation coefficient,* $r=-0.29$, $p=0.03$). N-Kaderin ve TWIST'in klinikopatolojik veriler ile ilişkisi bulunamadı ($p>0,05$).

4.6.2. Molekül Ekspresyon Düzeyleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması

PDAK hastalarına ait TNM evresi, tümör grade, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, kemoterapi, sağkalım süreleri immünohistokimyasal analizler sonucu elde edilen, MUC1, MUC4, MUC16, E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST'in boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdeleri ile karşılaştırıldı (Tablo 4.16). Bağımsız grupların karşılaştırılmasında ve histopatolojik verilerin analizinde Ki-kare testi kullanıldı.

Transmembran müsinlerin klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırılmasında, MUC1 ve MUC4 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. MUC16 molekülünün ise, diğer transmembran müsinlerden farklı olarak tümörün histolojik derecesi ve uzak metastaz durumu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Q-PCR verilerinin istatistiksel analizlerinde de diğer müsinlerden farklı olarak, MUC16 gen ekspresyonunun lenf nodu metastazı olup olmaması ve TNM evrelerine göre dağılımı arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştü. Tümör dokudaki MUC16 molekülünün boyanma yüzdesinin klinikopatolojik veriler ile ilişkisi incelendiğinde ise, tümör diferansiyasyonu ile pozitif korelasyonu saptandı (spearman testi, $r=0.3$, $p=0.014$).

FOXP3'ün klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılmasında TNM evresi ile istatistiksel olarak anlamlılık görüldü ($p<0,05$). Metastaz ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da ($p=0,06$) metastazı olan hastaların dokularında FOXP3'ün daha yaygın ve şiddetli boyandığı görüldü. Korelasyon testlerinde de FOXP3'ün TNM evresiyle pozitif korelasyonu saptandı (Spearman testi, $r=0.4$, $p=0,004$) (Tablo 4.16).

E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST molekül ekspresyonları histopatolojik veriler ile karşılaştırıldığında ise tümör diferansiyasyonu ve E-Kaderin arasında istatistiksel olarak anlamlılık görüldü ($p<0.05$). EMT varlığı ve TNM evresi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r=0,4$, $p=0,001$).

Tablo 4.16. Pankreatik kanseri hastalarının tümör dokusunda eksprese olan moleküller ile klinikopatolojik parametrelerinin karşılaştırılması (IHC)

	MUC1	MUC4	MUC16	FOXp3	E-Cadherin	N-Cadherin	TWIST
TNM Evresi	0,6	0,6	0,3	**0,02***	0,9	0,7	0,5
Tümör Grade	0,6	0,3	**0,04***	0,2	**0,03***	0,4	0,3
Lenf Nodu Metastazı	0,2	0,5	0,7	0,1	0,3	0,7	0,1
Uzak Metastaz	0,7	0,4	**0,05***	**0,06**	0,6	0,3	0,9
Kemoterapi	0,9	0,1	0,9	0,2	0,2	0,4	0,4
Sağkalım Süresi	0,5	0,4	0,8	0,8	0,3	0,2	0,5
* İşaretli olanlar p<0,05 olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.							

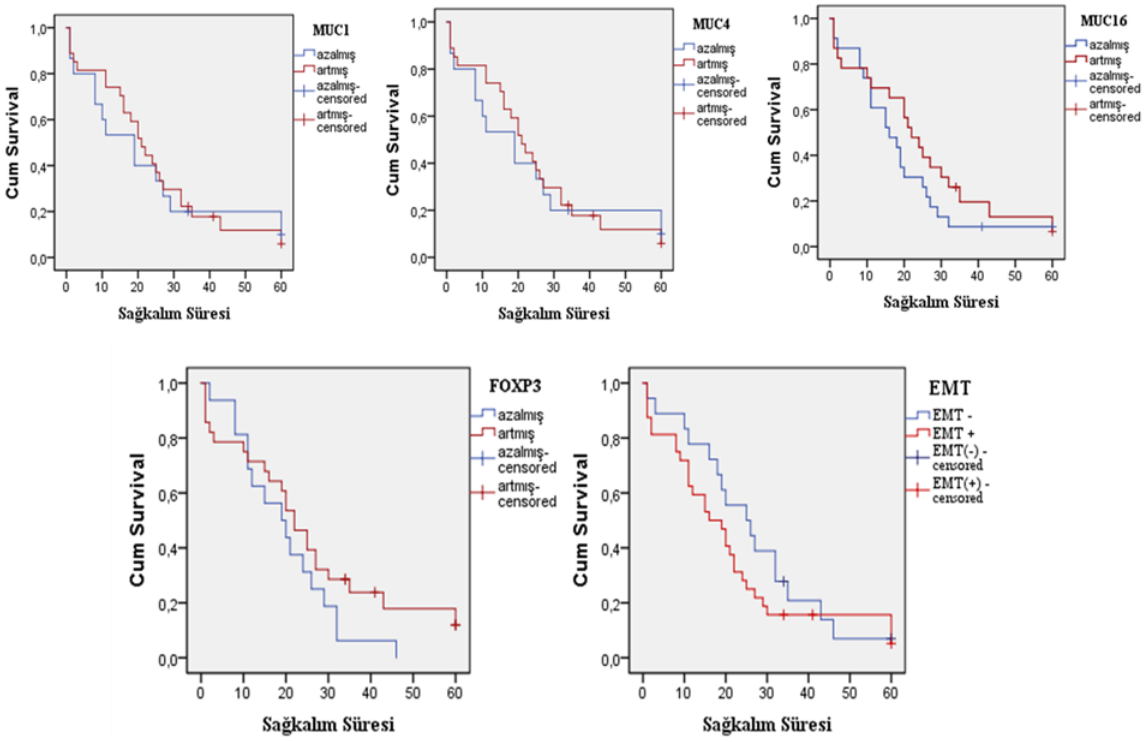
4.7. Sağkalım Analizi

Hastaların klinik bilgileri araştırılarak pankreas kanseri hastalarının "sansürlü (sağkalım) verileri kaydedildi. Yapılan testler ve yaşam tablosu analizinde, 50 hastadan 45'inin (%90) hayatta olmadığı görüldü. Hastaların tanı aldıktan sonraki sağkalım süresinin minimum 27 gün, maksimum 73 ay olduğu tespit edildi. Sağkalım istatistikleri ay birimi ile yapıldı, minimum sağkalım süresi 1 ay olarak değerlendirmeye alındı. Hastalığın medyan sağkalımı ise 20.4 ay bulundu.

PDAK tanılı hastalarda MUC1, MUC4, MUC16, FOXP3, E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST genlerinin artan ekspresyon düzeylerinin sağkalım üzerindeki etkisi incelendi (Tablo 4.17). Sağkalım istatistik verilerine göre gen ekspresyonlarının sağkalım üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. (Kaplan meier testi, log-rank (mantel-cox) analizi)

Tablo 4.17. Pankreas kanseri hastalarında genlerin sağkalıma etkisi

Sağkalım İstatistiği	Transmembran Müsinler			FOXP3	EMT		
	MUC1	MUC4	MUC16		E-Cad	N-Cad	TWIST
Log-rank değeri	p= 0,7	p= 0,7	p=0,3	p=0,2	p=0,2	p=0,7	p=0,5



Şekil 4.23. Pankreas kanseri hastalarında genlerin sağkalıma etkisi.
(Kaplan-Meier grafiği)

Şekil 4.23'te transmembran müsinlerin, FOXP3+ Treg hücrelerinin ve EMT varlığının panreas kanseri hastalarında sağkalıma etkisi gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık görülmese de Kaplan-Meier grafikleri incelendiğinde, EMT varlığının hastalarda düşük sağkalıma neden olduğu görülmektedir.

Pankreas kanseri hastalarının histopatolojik parametrelerinin değerlendirilmesiyle, hastalara ait TNM evresi, tümör diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, uzak metastaz bilgisi, hastaların kemoterapi alma durumu ve tümörlerin pankreastaki lokalizasyonu gibi veriler karşılaştırılarak hastaların bir yıllık, üç yıllık

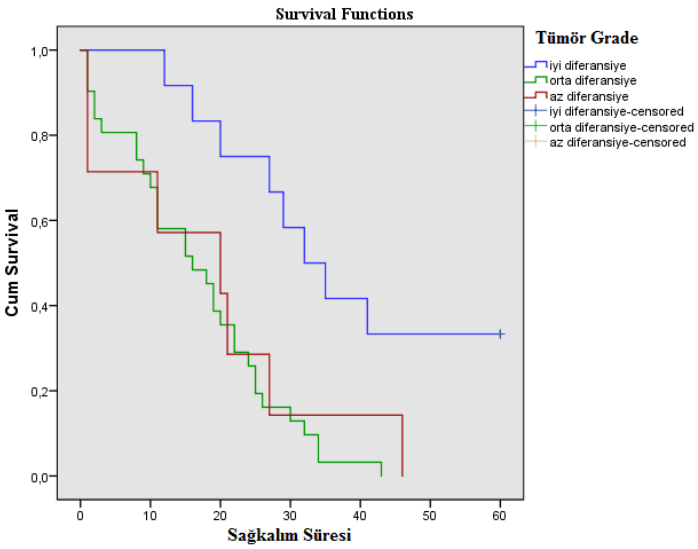
ve beş yıllık sağkalım analizleri yapıldı (Tablo 4.18). Sağkalım istatistikleri için Kaplan-Meier testi kullanıldı. Hastaların klinikopatolojik verilerinin; TNM Evresi, tümör diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı, uzak metastaz, kemoterapi alma durumu ve tümör lokalizasyonlarının sağkalım üzerine etkisi Log Rank (Mantel-Cox) testi ile yapıldı.

- TNM evresinin hastaların sağkalımı üzerine etkisi incelendiğinde, tabloda da görüldüğü üzere istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,06). Ancak yaşam tablosunda evreler ve sağkalım oranları incelendiğinde, evre arttıkça 5 yıllık sağkalım oranının ne kadar düştüğü görülmektedir. Evre I'de 1.yılda %82 oranda hasta hayattayken, 5. yılda yalnızca %18 hasta sağ kalabilmiştir. Evre II'de, 1.yılda %57oranda hasta hayattayken, 5. yılın sonunda yalnızca %4 hastanın hayatta kalabildiği görülmektedir. Evre yükseldikçe sağkalım oranının ne kadar kötüleştiği izlenmektedir. Evre III'de tanı anından itibaren 1.yılda %38 oranda hasta hayattayken 5.yılın sonunda tüm hastalar hayatını kaybetmiştir. Evre IV'de aynı durum izlenmektedir. TNM evresi sağkalım üzerinde istatistiksel anlamlılık göstermese de, tablodan da görüldüğü gibi evre arttıkça sağkalım önemli ölçüde etkilenmiştir. İlk evrelerdeki hastaların sağkalımı nispeten daha yüksekken, evre III ve evre IV'de sağkalım oldukça düşüktür.
- Tümörün histolojik derecesinin sağkalıma etkisi incelendiğinde, tümör diferansiyasyonun sağkalıma istatistiksel olarak da anlamlı bir etkisi olduğu görülmektedir (log-rank/mantel-cox p=0,002). Tümör diferansiyasyonu arttıkça hastaların sağkalımı da azalmıştır. Grade 1 tümörlü hastaların 5 yıllık sağkalım oranı %33 iken, Grade 2 ve Grade 3 tümörlü hastaların tamamı 3. ve 5. yıllar arasında hayatını kaybetmiştir.
- PDAK tanılı hastaların lenf nodu metastazının olup olmaması sağkalım üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi saptanmamıştır (p>0,05).
- Metastaz varlığının sağkalıma etkisi araştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemese de, metastatik olgularda 5 yıllık sağkalımın

daha düşük olduğu, 5 yıl içerisinde 8 hastadan 7'sinin eks olduğu görülmektedir.

- Hastaların kemoterapi öyküsünün sağkalıma etkisi incelendiğinde ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Tedavi alan hastaların tamamı adjuvan kemoterapi almaktaydı. Bu noktada, sağkalımın tedaviden ziyade tümörün histolojik derecesi ve evresinden etkilendiğini söyleyebilmek mümkündür.
- Tümörün pankreastaki lokalizasyonunun sağkalıma etkisi incelendiğinde istatistiksel anlamlılık elde edilemese de, tablo incelendiğinde gövde ve kuyruk yerleşimli tümöre sahip olguların tamamının 1-5 yıl arasında eks olduğu görülmektedir. Hastaların büyük bir çoğunluğunda tümör lokalizasyonu pankreasın başıydı. Bu hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %21 olarak belirlenmiştir.

Özetle, histopatolojik parametrelerin sağkalıma etkisi incelendiğinde, özellikle TNM evresi ve tümör grade'nin (diferansiyasyon) PDAK hastalarında düşük sağkalıma ve kötü prognoza neden olduğu görüldü. Orta ve az diferansiye tümör tiplerinin sağkalıma olumsuz etkisi Şekil 4.24'te de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. PDAK'da tümör diferansiyasyonunun sağkalıma etkisi (Kaplan-Meier grafiği).

Tablo 4.18. Pankreas kanseri hastalarına ait yaşam tablosu ve sağkalım istatistikleri.

Sağkalım İstatistikleri		n(ex n)	1 yıllık Sağkalım Oranı (%)	3 yıllık Sağkalım Oranı (%)	5 yıllık Sağkalım Oranı (%)	P değeri (*log rank)*
TNM Evresi	Evre I	11(9)	82	27	18	**0,06**
	Evre II	21(20)	57	14	4	
	Evre III	8(8)	38	0	0	
	Evre IV	10(9)	8	1	0	
Tümör Grade	Grade 1 (İyi Diferansiye)	12(8)	92	50	33	**0,002**
	Grade 2 (Orta Diferansiye)	31(31)	58	9	0	
	Grade 3 (Az Diferansiye)	7(7)	57	14	0	
Lenf Nodu Metastazı	Yok	17(15)	82	24	12	**0,1**
	Var	33(31)	57	9	6	
Uzak Metastaz	Yok	42(39)	62	14	7	**0,6**
	Var	8(7)	88	12	12	
Kemoterapi	Almış	18(14)	56	13	9	**0,09**
	Almamış	32(29)	83	28	22	
Tümör Lokalizas-yonu	Baş	33(26)	67	24	21	**0,08**
	Gövde	13(13)	69	0	0	
	Kuyruk	3(3)	66	33	0	

5. TARTIŞMA

Pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAK) tüm dünyada, kansere bağlı ölümlerin yedinci nedenidir ve yılda 331.000'den fazla ölüme neden olmaktadır (95). PDAK' 5 yıllık ortalama sağkalım (OS) oranı %5'in altında ve 1 yıllık OS oranı %24 olan, son derece kötü prognozla ilişkili bir kanser türüdür. Tüm dünyada 2006'dan 2015'e kadar pankreas kanseri insidansı yılda yaklaşık %1, ölüm oranı da yılda % 0,3 oranında artmıştır (96). Kötü prognoz ve yüksek mortalitenin temel nedenleri, pankreas kanserinin erken evrelerde semptomlarının olmaması, tümörün hızlı ilerlemesi ve metastatik hastalıkta mevcut tedavilerin sınırlı etkinliğinden kaynaklanmaktadır. Cerrahi rezeksiyondan sonra bile, 5 yıllık OS oranı %20-25'i geçmez ve modifiye adjuvan tedavi olarak kemoterapi rejimlerinin uygulanması (FOLFIRINOX gibi) sadece iyileştirilmiş sağkalım oranlarını gösterir. Bu nedenle, pankreas kanserinde daha etkili terapötik stratejilere önemli bir ihtiyaç vardır (94).

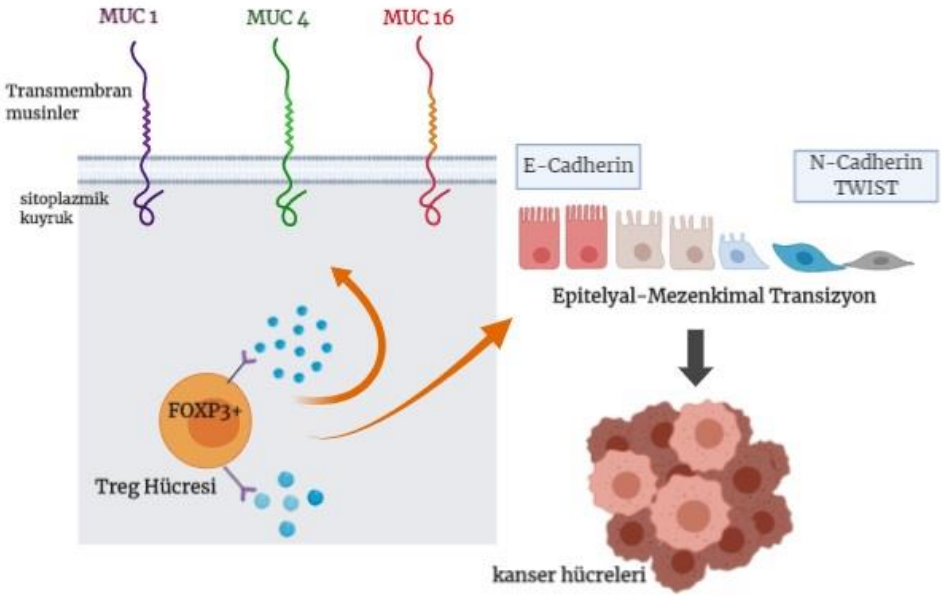
Treg'ler tümör mikroçevresinde immünsupresif bir ortam yaratarak tümör hücrelerinin ilerleyişini kolaylaştırır. Treg'lerin varlığı pankreas kanseri de dahil olmak üzere meme, kolon, mide kanseri gibi pek çok kanser türünde kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (60, 64, 97, 98). Yi ve arkadaşlarının insan pankreatik duktal adenokarsinomunda FOXP3+ Treg'in tanımlanması ve fonksiyonel analiziyle ilgili çalışmasında, insan tümör mikro çevresindeki T hücre kompozisyonunun normal dokudan farklı olduğunu ve daha immüno-düzenleyici bir profili desteklediğini gösterilmiştir. Treg hücrelerinin, tümöre komşu dokular ve periferik kan ile karşılaştırıldığında hem tümörlerinde hem de tümör infiltre eden lenf nodlarında yüksek miktarda bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, Treg hücrelerinin daha agresif PDAK tümörlerinde sıklıklarının artığını ve Treg artışının tümörün yüksek histolojik derecesi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (99). Tümör infiltre eden Treg'ler tümör mikroçevresinde efektör T hücresi yanıtlarını baskılayabilir. Tümör ortamında Treg hücrelerinin birikmesinden kaynaklanan immünosupresyonun PDAK hastalarında kötü prognoz için anahtar bir faktör olduğu bilinmektedir (100, 101). Bu nedenle, tümör infiltre eden Treg hücrelerinin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması terapötik fırsatlar sunabilir (63, 102).

Transmembran müsinlerden MUC1, MUC4 ve MUC16'nın yüksek ekspresyonlarının pankreas kanserinde tümör invazyonunun artışına ve kötü prognoza neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (7, 28, 39, 103, 104). Fan ve arkadaşları pankreas kanserinde MUC16-CT'nin tümörle ilişkili Treg'lerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını, lokal ve sistemik olarak tümör hücreleri ve Treg hücreleri arasındaki korelasyonu göstermiştir (7). Pankreas kanserinde, transmembran müsinlerin epiteldeki koruyuculuklarını kaybederek, çeşitli sitokinlerle ve hücrelerle etkileşerek, farklı sinyal yolaklarına katılarak EMT'nin aktivasyonunu etkilediği ve metastatik sürece olan katkısı farklı araştırmalarla gösterilmiştir (28, 87, 88, 91).

Çalışmamızda bu araştırmalar kapsamında yola çıkarak, Treg hücrelerinin tümör mikroçevresinde oluşturduğu immunsupresif ortamda, transmembran müsinlerin gen ve molekül ekspresyon düzeylerinin EMT ile ilişkisini ve bu durumun prognoza olan etkisini araştırdık. Bu nedenle invazyon ve metastaz yeteneği yüksek bir kanser tipi olan pankreas kanseri seçildi.

Daha önce bahsedildiği gibi literatürde pankreas kanserinde transmembran müsinler, Treg'ler ve EMT'yi inceleyen araştırmalar genellikle hücre kültürü ve/veya hayvan deneylerinden elde edilen verilere dayalıdır. Aynı zamanda, transmembran müsinlerin kapsamlı bir şekilde ekspresyon düzeylerinin ve birbirleriyle olan ilişkilerinin incelendiği çalışmalar nadirdir. Bu nedenle bizim çalışmamızın insan dokusunda transmembran müsinlerinin, Treg ve EMT varlığında ekspresyon düzeylerini ve tüm bu moleküllerin birbirleriyle olan ilişkilerini ekspresyon düzeyinde bütün bir şekilde inceleyen ilk kesitsel çalışma olduğunu düşünmekteyiz. (Şekil 5.1)

Çalışmamızın temel amacı FOXP3'ün, transmembran müsinleri ve EMT ile ilişkisini gen ve molekül ekspresyon düzeyleri ile araştırmak ve bu genlerin PDAK prognozuna olan etkisini incelemektitr. Bunun yanı sıra pankreas kanserinde tümör hücrelerinin metastatik kapasitesini gösterebilme veya prognostik bir biyobelirteç olarak transmembran müsin moleküllerinin kullanılabilme potansiyelini araştırmaktır.



Şekil 5.1. Tez araştırma şeması.

Q-PCR sonuçlarında, literatür bulgularıyla uyumlu olarak transmembran müsinler MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ifade düzeyleri, tümör dokuda normal dokuya göre daha yüksek olarak bulundu (Tablo 4.4). Transmembran müsinlerin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, MUC16'nın MUC1 ve MUC4'e göre tümör dokudaki ekspresyonunun daha yüksek olduğunu gördük (Şekil 4.2). MUC1'in tümördeki gen ekspresyon düzeyine göre, sırasıyla MUC4 ve MUC16'da ekspresyon düzeyi giderek artmaktaydı. İstatistiksel olarak da MUC1'in tümörde ekspresyon artışı anlamlı bulunmazken, MUC4 ve MUC16'da tümör dokudaki gen ekspresyon artışının normal dokuya göre anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$).

İmmünohistokimyasal incelemelerimizde, MUC1 ve MUC4'ün sonuçlarının tümör-normal doku ayrımında çok spesifik olmadığını, tümör dokuda da normal dokuda da boyandığını, yalnızca boyanma şiddeti ve yaygınlığının değişiklik gösterdiğini saptadık. Önemli bir nokta olarak, özellikle MUC1 molekülünün boyanmasında, mikroskobik incelemeler sırasında, pankreas dokusu olmayan doku alanlarını (duodenum gibi) boyamadığını, yalnızca pankreas dokusunda boyandığını gözlemledik. Böylece MUC1 molekülünün PDAK'ta anlamlı bir ekspresyon profilini saptayamasak bile pankreas dokusuna spesifik bir ayrım gösterdiğini gözlemledik. Yine immünohistokimyasal sonuçlara ve mikroskobik değerlendirmelerimize göre

MUC16'nın diğer müsinlerden farklı olarak, tümöre spesifik anlamlı bir boyanma paterni olduğunu gördük; normal pankreas dokusunda MUC16 boyanması görülmezken, tümör alanlarında oldukça spesifik bir ayrım olduğu görüldü. Transmembran müsinlerin Q-PCR ve IHC deneysel verilerinin karşılaştırılmasında, MUC16 gen ve molekül ekspresyonu oldukça anlamlı bir ilişki gösterdi ($p<0,001$). MUC1 ve MUC4'te ise korelasyon izlense de, hasta bazlı incelemelerde Q-PCR verilerinde tümördeki gen ekspresyon artışının daha anlamlı olduğunu saptadık. İstatistiksel analizler sonucunda da, MUC1 ve MUC4 hastaların klinikopatolojik verileriyle anlamlı fark göstermezken, MUC16 ile hastaların TNM evresi ve lenf nodu metastazı anlamlı bulundu ($p<0,05$). Aynı zamanda, hastaların serum düzeyleri ve genler arasındaki karşılaştırmalarda da MUC16 ile pankreas kanseri tümör belirteci olan CA19-9 arasında anlamlılık görüldü ($p=0,005$). Ancak beklenenin aksine, TNM evresi arttıkça MUC16 gen ekspresyonu doğrusal bir artış göstermiyordu; evre I hastalarda MUC16 gen ekspresyon düzeyinin daha yüksek olduğunu fark ettik. Lenf nodu metastazında da durum benzerdi, lenf nodu metastazı olmayan hastalarda MUC16 gen ekspresyonu daha yüksek bulundu. Bu bulgu bize MUC16'nın karsinogenezin ilk aşamalarında etkili olabileceğini düşündürmektedir. MUC16'nın onkogenezin erken evrelerinde ekspresyonun arttığı ve tümörün ilerleyen evrelerinde ekspresyonunun azaldığı düşünülebilir. MUC16 artmış ekspresyonunun özellikle EMT görülen hastalarda artmış olduğu göz önünde önünde bulundurulduğunda MUC16'nın bu hastaların prognozuyla ilgili önemli bir işaret olabilir, bu konu ile ilgili yeni çalışmalar planlanabilir.

Transmembran müsinlerin birbirleri ile olan ilişkilerini incelediğimizde, tümördeki gen ve molekül ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonu saptandı ($p<0,05$). Bu bulgu tümör dokuda müsinlerin bir arada bulunabileceğini gösterdi ancak tümördeki etki düzeyleri aynı değildi. Tüm sonuçları değerlendirdiğimizde MUC1 ve MUC4'ün tanı sürecinde immünohistokimyasal bir belirteç olarak pankreas dokusuna spesifik bir ayrımda kullanılabileceğini, MUC16'nın ise tümör-normal doku ayrımında çok spesifik olması ve tümördeki gen ekspresyon düzeyinin artan anlamlılığı nedeniyle tümör ilişkili bir belirteç olabileceği varsayımında bulunulabilir.

Literatüre göre, transmembran müsinlerin çeşitli moleküller ile etkileşerek ve farklı sinyal yolaklarına katılarak EMT'yi başlatıcı ya da hızlandırıcı rol üstlendiği ileri sürülmektedir (6, 28, 103). Bizim sonuçlarımızda EMT aktivasyonu ile MUC1 ve MUC4 ekspresyonu arasında ilişki bulunamazken, FOXP3 ve MUC16 ekspresyonu ile EMT arasında daha anlamlı ilişki olduğu gözlemlendi. Hasta verileri incelendiğinde, EMT görülen hastaların çoğunda MUC16 ekspresyonun artmış olduğu saptandı ve aynı şekilde bu hastalarda FOXP3 ekspresyonun da artmış olması dikkat çekiciydi. Daha önce de bahsedildiği gibi, Fan ve ark. tarafından pankreas kanserinde MUC16 ve Treg ilişkisinin incelendiği çalışmada, MUC16'nın IL-6 over ekspresyonu ve JAK2/STAT3 yolağı aracılığıyla mikroçevredeki tümör ilişkili Treg gelişimini düzenliyor olabileceği öne sürülmüştü (7). Biz de araştırmamızda MUC16 ve FOXP3 ekspresyon artışı arasında anlamlı bir ilişki gözlemledik. MUC16, sitokinler ile etkileşerek ve sinyal iletiminde rol alarak Treg hücrelerinin farklılaşmasını destekliyor olabilir.

Çalışmamızdaki amaçlardan bir tanesi tümörde bulunan Treg hücrelerinin müsin ve EMT belirteçleri ile ekspresyon düzeyinde bir ilişkisinin olup olmadığının araştırılmasıydı. Hastaların FOXP3 ekspresyon profili incelendiğinde, gen ve molekül ekspresyonunun oldukça uyumlu olduğunu fark ettik ve Q-PCR sonuçlarında gen ekspresyonu artan 28 hastanın immünohistokimyasal olarak da pozitif boyanma gösterdiğini saptadık. Tümör dokudaki gen ekspresyonu normal dokuya göre neredeyse 200-300 kat artış gösteren hastaların immünohistokimyasal değerlendirmesinde de tümör dokuda FOXP3'ün yoğun olarak bulunduğunu gözlemledik. Sonuçlarımızda Treg varlığı (FOXP3+) ve MUC16 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandığını ($p=0,001$) ve EMT varlığında da FOXP3'ün gen ekspresyon düzeyinde artış olduğunu daha önce belirtmiştik. EMT belirteçleriyle ayrı ayrı ilişkileri değerlendirildiğinde ise E-Cadherin ile negatif, N-Cadherin ile istatistiksel olarak oldukça anlamlı güçlü bir pozitif korelasyon gösterdiğini belirledik ($p<0,001$). TWIST ve FOXP3 arasında gen ekspresyonu düzeyinde anlamlı bir ilişki görülürken moleküler ekspresyonlarında bu korelasyonu bulamadık fakat hasta sonuçları tek tek değerlendirildiğinde çok yüksek gen ekspresyonu olan hastaların IHC verilerinde de yüksek ekspresyon gösterdiği görüldü. Bu bulgular bizim tümörde Treg hücrelerinin bulunması EMT'yi başlatıcı

bir etki yapabilir mi sorusunu düşünmemize neden oldu. Bunun yanıtını verebilmek için gelecekte deneysel çalışmaların yapılması düşünülebilir.

Bulgularımıza göre, tümör dokuda FOXP3 gen ekspresyonu artarken, E-Kaderin ekspresyonu azalıyordu. E-Kaderin kaybı EMT başlangıcının en önemli aşamasıdır. Bu nedenle tümörde FOXP3'ün artan ekspresyonunun EMT'yi destekleyebileceğini düşündük. Klinikopatolojik veriler ile karşılaştırdığımızda, FOXP3 gen ekspresyonun da TNM evresi ile istatistiksel olarak anlamlı sonuç gösterdiği görüldü ($p<0,05$). Ancak burada da MUC16 sonucuna benzer bir tablo görüldü. Evre arttıkça doğrusal bir FOXP3 artışı izlenmedi, evre I'de olan hastalarda FOXP3'ün daha yüksek ifadeleri görüldü. Bu bulgular hem FOXP3'ün hem de MUC16'nın tümörün erken evrelerinde etkili olabileceğini düşündürdü. Malign transformasyonun ilk basamaklarında görülmeleri, prognozla ilgili önemli bir belirteç olabilir. FOXP3 ve MUC16 genlerinin artmış ekspresyonuna rastlanan hastalarda sürecin yakın takibi yapılabilir ve bu hastalarda tümörün invaziv potansiyel taşıdığı düşünülebilir. Akciğer, kolon, mide, meme, over kanserinde yapılan araştırmalarda da Treg hücrelerinin kötü prognoz ile ilişkisi gösterilmiştir. Hayvan çalışmaları, Treg hücrelerinin efektör hücrelerin tümöre karşı aktivitesini azalttığını ve Treg hücrelerinin tümör antijenlerine karşı bağışıklık tepkisini bozabileceğini ortaya koymaktadır (105-107). North ve arkadaşlarının bir raporunda, antitümör immün yanıtını inhibe eden Treg hücrelerinin gelişiminin tümör ilerlemesinden önce olduğu gözlenmiştir (108). Bizim bulgularımızın da bu literatür bilgileri ile uyumlu olduğu görülmektedir ve daha geniş bir örneklemde araştırıldığında MUC16 ve FOXP3 ilişkisinin daha net değerlendirilebileceğini düşünülmektedir. Böylece MUC16 ve FOXP3 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimin ve EMT durumunun pankreas kanserleri için ifade ettiği anlam konusunda yorum yapmak daha kolay olabilecektir.

Daha geniş bir örneklemde araştırıldığında MUC16 ve FOXP3 ilişkisinin daha net değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz. Böylece MUC16 ve FOXP3 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimin ve EMT durumunun pankreas kanserleri için ifade ettiği anlam konusunda yorum yapmanın daha kolay olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak pankreatik duktal adenokarsinomada, Treg hücrelerin varlığı ve MUC16'nın ifadesine yönelik yapılan araştırmaların geliştirilmesiyle, MUC16'nın pankreas kanserinde kullanılabilecek prognostik bir biyobelirteç olma olasılığı olabilir. MUC16'nın TNM evresiyle korelasyon göstermesi nedeniyle, erken evrelerde MUC16 artmış ekspresyonunun saptanması hastalığın ilerleyişi konusunda yardımcı bir bilgi verebilir. Özellikle metastatik olgularda MUC16 ve FOXP3'ün artmış ekspresyonundan yola çıkılması, yeni hedef tedavilerin bulunması ve kullanılması için bir basamak olabilir. Bu tezden elde edilen bilgiler kullanılarak yapılacak olan yeni deneysel araştırmalar, pankreas kanserinde transmembran müsinlerinin artmış ekspresyonu, EMT'nin başlaması ve Treg hücrelerinin varlığı arasındaki olası mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

-Tümör dokuda MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyonlarının normal dokuya oranla artmış olduğu görüldü. Ekspresyon düzeyleri incelendiğinde MUC16'nın normal dokuya göre tümör dokuda artmış ekspresyonunun olduğu belirlendi. İstatistiksel olarak tümör dokudaki ekspresyon artışı MUC1'de anlamlı bulunmazken (p=0,4), MUC4 ve MUC16'da anlamlı bulundu. [sırasıyla p=0,008, p=0,00001]

- MUC1'in, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi [sırasıyla (r= 0,01 p=0,9), (r= 0,02 p=0,8)]

- MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir ilişki ve olduğu tespit edildi (r= 0,4 p=0,03)

- N-Kaderinin tümör dokusundaki gen ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$)

- TWIST'in tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

- E-Kaderin'in N-Kaderin ve TWIST gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak negatif yönde anlamlı ilişki olduğu belirlendi. [sırasıyla (r= -0,5 p=0,0), (r= -0,4 p=0,0)]

-E-Kaderinin tümör dokuda gen ekspresyonunun azaldığı hastalarda, TWIST ve N-Kaderin ekspresyonunun artmış olduğu belirlendi.

- TWIST ve N-Kaderin gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (r= 0,8 p=0,0).

- FOXP3 geninin tümör dokusundaki ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$)

- FOXP3 gen ekspresyonu ile MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak pozitif

yönde anlamlı ilişki olduğu belirlendi. [sırasıyla (r= 0,4 p=0,001), (r= 0,4 p=0,003), (r=0,5, p=0,0001)]

- FOXP3'ün E-Kaderin, N-Kaderin ve TWIST gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi [sırasıyla (r= -0,6 p=0,0001), (r= 0,8 p=0,0003),(r=0,7, p=0,0001)].

- FOXP3 gen ekspresyonu ile EMT varlığı arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki olduğu saptandı ($p<0,001$).

- MUC1 molekülünün tümör dokudaki ekspresyon değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$).

- MUC4 molekülünün tümör dokudaki ekspresyon değişiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$).

- MUC16 molekülünün tümör dokudaki ekspresyon değişiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$).

- Q-PCR ve immünohistokimyasal verilerde FOXP3 molekülünün 28 hastanın tümör dokusunda yüksek eksprese olduğu görüldü. Artan gen ekspresyonuna sahip hastaların dokularında da FOXP3 pozitif boyanma gösterdi. İki yöntem arasında istatistiksel olarak yüksek anlamlı güçlü pozitif korelasyon saptandı ($r=0,9$, $p<0,001$).

- E-Kaderin molekülünün tümör dokudaki azalan ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

- N-Kaderin molekülünün tümör dokusundaki ekspresyon düzeyi normal dokuya göre istatiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemektedir ($p>0,05$)

- TWIST molekülünün ekspresyon düzeyinin tümör dokuda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir ($p<0,05$).

- E-Kaderin ve TWIST moleküllerinin tümör dokudaki ekspresyon düzeyleri gen ekspresyon düzeyleriyle karşılaştırıldığında birbiri ile ilişkili olduğu görüldü (sırasıyla r= 0,4 ,**P<0,001** ve r= 0,8 **p<0,001).**

- N-Kaderin tümördeki gen ve molekül ekspresyon düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0,05$).

- MUC1, MUC4, MUC16 gen ve molekül ekspresyon düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon görüldü ($p<0,001$).

- MUC1 gen ekspresyon düzeyleri ile TNM evrelerindeki dağılım arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

- MUC4, MUC16 gen ekspresyon düzeyleri ve TNM evreleri arasındaki istatiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

- Tümörün diferansiyasyon derecesi ile MUC1, MUC4 ve MUC16 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

- MUC16 gen ekspresyon düzeyi ile lenf nodu metastazı varlığı arasında istatistiksel anlamlılık görüldü ($p<0,05$).

- Metastaz ile transmembran müsin gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılık görülemedi ($p>0,05$).

- FOXP3 gen ekspresyonunun TNM evrelerine göre dağılımında, evreler arası gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

- Diferansiyasyon, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ile FOXP3 gen ekspresyon düzeyinin karşılaştırılmasında düzeyler arası istatiksel anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$).

- E-Kaderin gen ve molekülünün tümördeki ekspresyon kaybı ile TNM evresi arasında anlamlı korelasyon bulundu ($r= 0.29$, $p=0.03$).

- Tümörde artan MUC16 molekül ekspresyonunun tümör diferansiyasyonu ile pozitif korelasyonu saptandı ($r=0.3$, $p=0.014$).

- Tümörde artan FOXP3 molekül ekspresyonunun TNM evresi ile arasında istatistiksel olarak anlamlılık görüldü ($p<0,05$).

- Sağ kalım istatistik verilerine göre gen ekspresyon düzeylerinin sağkalım üzerine anlamlı bir etkisi belirlenemedi ($p>0,05$).

- TNM evresi ve tümör diferansiyasyonunun sağkalıma anlamlı etkisi belirlendi ($p<0,05$).

- PDAK hastalarının serum belirteçleri ve genlerin karşılaştırılmasında, CA 19-9 tümör belirteci ile MUC16 arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p<0,05$)

Bu bulgular dikkate alındığında,

-Özellikle MUC16'nın ekspresyon profili ile sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda (FOXP3 pozitifliği, EMT varlığı, TNM evresi, tümör diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı gibi.) örneklem genişletilerek yapılacak çalışmalar ile sonuçlar tekrar değerlendirilebilir.

-Daha geniş bir örneklemde "taze" doku ile çalışma yapılabilir. Böylece çalışmamızda anlamlı çıkan genlerin ekspresyon düzeyleri ve dokuda bulunma durumlarının birbiri ile karşılaştırması yapılabilir.

-FOXP3'ün PDAK tümör dokusundaki öneminin daha iyi anlaşılabilmesi için tümör mikroçevresinin incelenebileceği, TME'de bulunan hücreler ile ilişkilerinin ve sitokinler ile olan etkileşimlerinin araştırılacağı bir hücre kültürü çalışması yapılabilir.

- Çalışmamızda anlamlı ilişkileri bulunan FOXP3 ve MUC16'nın tümördeki etki ve gelişimlerinin daha iyi gözlemlenebilmesi için Treg hücreleri ile *co-culture* çalışması yapılabilir.

-Hayvan deneyleri oluşturularak, tümör gelişimi sırasında MUC16 geninin susturulması ile tümör gelişiminin nasıl etkilendiği araştırılabilir.

-MUC16 molekülünün hangi sinyal yolaklarını kullandığını ve hangi sitokinler ile etkişerek immün hücrelerle konuştuğunu anlamak amacıyla ileri çalışmalar yapılabilir.

-EMT sürecinin daha iyi gösterilebilmesi ve bu sürece etki eden genlerin daha iyi anlaşılabilmesi için, metastatik hasta örneklem grubu seçilerek çalışma yapılabilir.

- Ekspresyonları birbiri ile ilişkili olan genlerin birbirinin ekspresyonunu etkileyip etkilemediğini gösteren mekanizmayı çözmeye yönelik deneysel çalışmalar planlanabilir.

- MUC 16, TWIST Moleküllerinin hedeflendiği *in vivo* immün tedavi araştırmaları yapılabilir

- FOXP3 gelişimini veya inhibisyonunu içeren invivo immün tedavi çalışmaları planlanabilir

- CTLA-4 inhibitörleri kulanımı ile tümör dokuda artışını belirlediğimiz MUC16, TWIST, N-Kaderin ve azalmış ekspresyonu olan E-Kaderin gen ekspresyon profilinin nasıl değişim gösterdiği, FOXP3 varlığının nasıl etkilendiği *invivo* olarak çalışılabilir.

- Gen ekspresyonları arasında ilişki kanıtlanırsa düzeyleri için *cut off* değerini belirlemek üzere çok yüksek sayıda hastanın dahil edildiği çalışmalar yapılabilir.

- TWIST molekülünün rutinde kullanımına yönelik çalışma yapılabilir

- EMT gen ekspresyonlarının erken evrelerde değişimi saptandığında tedavinin buna göre planlamasına yönelik *in vivo* sonrasında, klinik çalışmalar planlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017;67(1):7-30.

2. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. The Lancet. 2016;388(10039):73-85.

3. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. N Engl J Med. 2014;371(11):1039-49.

4. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. Surg Pathol Clin. 2016;9(4):547-60.

5. Löhr JRaM. The MUC gene family: Their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer. Molecular Cancer. 2003;2:9.

6. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. Nat Rev Cancer. 2009;9(12):874-85.

7. Fan K, Yang C, Fan Z, Huang Q, Zhang Y, Cheng H, et al. MUC16 C terminal-induced secretion of tumor-derived IL-6 contributes to tumor-associated Treg enrichment in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2018;418:167-75.

8. Lahat G, Lubezky N, Loewenstein S, Nizri E, Gan S, Pasmanik-Chor M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) is associated with high tumor grade and adverse outcomes. Ann Surg Oncol. 2014;21 Suppl 4:S750-7.

9. Wang S, Huang S, Sun YL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review. Biomed Res Int. 2017;2017:2646148.

10. Xiong S, Pan X, Xu L, Yang Z, Guo R, Gu Y, et al. Regulatory T Cells Promote β-Catenin–Mediated Epithelium-to-Mesenchyme Transition During Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 2015;93(2):425-35.

11. Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, Andre F, De Cremoux P, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. Cancer Res. 2013;73(8):2418-27.

12. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. Cancer Cell. 2009;15(3):195-206.

13. Wang K, Zu C, Zhang Y, Wang X, Huan X, Wang L. Blocking TG2 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through inhibiting EMT. Respir Physiol Neurobiol. 2020;276:103402.

14. Bhutia YD, Ogura J, Grippo PJ, Torres C, Sato T, Wachtel M, et al. Chronic exposure to excess iron promotes EMT and cancer via p53 loss in pancreatic cancer. Asian J Pharm Sci. 2020;15(2):237-51.

15. Abbas AK, Aster JC, Kumar V. Robbins Basic Pathology (Robin's Temel Patoloji) (9. Baskı)2014.

16. John R. Goldblum LWL, Jesse McKenney, Jeffrey L Myers. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 11th Edition. 2018.

17. J Trauma E E Moore 1 THC, M A Malangoni, G J Jurkovich, H R Champion, T A Gennarelli, J W McAninch, H L Pachter, S R Shackford, P G Trafton. Organ Injury Scaling, II: Pancreas, Duodenum, Small Bowel, Colon, and Rectum. Pancreatic organ injury scale J Trauma 30:1427. 1990;30:1427–1429.

18. Chun YS, Pawlik TM, Vauthey JN. 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Pancreas and Hepatobiliary Cancers. Ann Surg Oncol. 2018;25(4):845-7.

19. Pu N, Yin L, Habib JR, Gao S, Hu H, Zhu Y, et al. Optimized modification of the eighth edition of AJCC TNM staging system for resected pancreatic ductal adenocarcinoma. Future Oncol. 2019;15(30):3457-65.

20. van Putten JPM, Strijbis K. Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer. J Innate Immun. 2017;9(3):281-99.

21. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. Chest. 2018;154(1):169-76.

22. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. Trends Cell Biol. 2006;16(9):467-76.

23. Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. Reprod Biol Endocrinol. 2004;2:4.

24. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. Trends Mol Med. 2014;20(6):332-42.

25. Hossain MK, Wall KA. Immunological Evaluation of Recent MUC1 Glycopeptide Cancer Vaccines. Vaccines (Basel). 2016;4(3).

26. Zhou R, Curry JM, Roy LD, Grover P, Haider J, Moore LJ, et al. A novel association of neuropilin-1 and MUC1 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role in induction of VEGF signaling and angiogenesis. Oncogene. 2016;35(43):5608-18.

27. Grover P, Nath S, Nye MD, Zhou R, Ahmad M, Mukherjee P. SMAD4-independent activation of TGF-beta signaling by MUC1 in a human pancreatic cancer cell line. Oncotarget. 2018;9(6):6897-910.

28. Roy LD, Sahraei M, Subramani DB, Besmer D, Nath S, Tinder TL, et al. MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. Oncogene. 2011;30(12):1449-59.

29. Kumar S, Cruz E, Joshi S, Patel A, Jahan R, Batra SK, et al. Genetic variants of mucins: unexplored conundrum. Carcinogenesis. 2017;38(7):671-9.

30. Chaturvedi P, Singh AP, Batra SK. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. FASEB J. 2008;22(4):966-81.

31. Gautam SK, Kumar S, Cannon A, Hall B, Bhatia R, Nasser MW, et al. MUC4 mucin- a therapeutic target for pancreatic ductal adenocarcinoma. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2017;21(7):657-69.

32. Nicolas Moniaux PC, Isabelle Van Seuningen, Nicole Porchet, Ajay P. Singh, Surinder K. Batra. Atlas Genetics Oncology, MUC4 gene figure 2007 [updated 2007. Available from: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/Images/MUC4Fig2.jpg.

33. Aithal A, Rauth S, Kshirsagar P, Shah A, Lakshmanan I, Junker WM, et al. MUC16 as a novel target for cancer therapy. Expert Opin Ther Targets. 2018;22(8):675-86.

34. Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. Int J Cancer. 2002;98(5):737-40.

35. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. J Biol Chem. 2001;276(29):27371-5.

36. Felder M, Kapur A, Gonzalez-Bosquet J, Horibata S, Heintz J, Albrecht R, et al. MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. Mol Cancer. 2014;13:129.

37. Hanson RL, Hollingsworth MA. Functional Consequences of Differential O-glycosylation of MUC1, MUC4, and MUC16 (Downstream Effects on Signaling). Biomolecules. 2016;6(3).

38. Rao TD, Tian H, Ma X, Yan X, Thapi S, Schultz N, et al. Expression of the Carboxy-Terminal Portion of MUC16/CA125 Induces Transformation and Tumor Invasion. PLoS One. 2015;10(5):e0126633.

39. Haridas D, Chakraborty S, Ponnusamy MP, Lakshmanan I, Rachagani S, Cruz E, et al. Pathobiological implications of MUC16 expression in pancreatic cancer. PLoS One. 2011;6(10):e26839.

40. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. Nat Rev Cancer. 2004;4(1):45-60.

41. Yokoyama S, Higashi M, Kitamoto S, Oeldorf M, Knippschild U, Kornmann M, et al. Aberrant methylation of MUC1 and MUC4 promoters are potential prognostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinomas. Oncotarget. 2016;7(27):42553-65.

42. Zhu Y, Zhang JJ, Liang WB, Zhu R, Wang B, Miao Y, et al. Pancreatic cancer counterattack: MUC4 mediates Fas-independent apoptosis of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte. Oncol Rep. 2014;31(4):1768-76.

43. Muniyan1 S, Haridas1 D, Lakshmanan I, Chugh S, Gupta S, Smith LM, et al. MUC16 contributes to the metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma through focal adhesion mediated signaling mechanism. Genes & Cancer. 2016;Vol.7.

44. Muniyan S, Haridas D, Chugh S, Rachagani S, Lakshmanan I, Gupta S, et al. MUC16 contributes to the metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma through focal adhesion mediated signaling mechanism. Genes Cancer. 2016;7(3-4):110-24.

45. Akita K, Tanaka M, Tanida S, Mori Y, Toda M, Nakada H. CA125/MUC16 interacts with Src family kinases, and over-expression of its C-terminal fragment in human epithelial cancer cells reduces cell–cell adhesion. European Journal of Cell Biology. 2013;92(8-9):257-63.

46. Kohlgraf KG, Gawron AJ, Higashi M, Meza JL, Burdick MD, Kitajima S, et al. Contribution of the MUC1 tandem repeat and cytoplasmic tail to invasive and metastatic properties of a pancreatic cancer cell line. Cancer Res. 2003;63(16):5011-20.

47. Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. Cancer Res. 2004;64(2):622-30.

48. Komatsu M, Tatum L, Altman NH, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Potentiation of metastasis by cell surface sialomucin complex (rat MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein. Int J Cancer. 2000;87(4):480-6.

49. Chen SH, Hung WC, Wang P, Paul C, Konstantopoulos K. Mesothelin binding to CA125/MUC16 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion via MMP-7 activation. Sci Rep. 2013;3:1870.

50. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th Edition ed: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2017 2017.

51. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Nineth Edition ed: 11th May 2017; 2018.

52. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. Immunology. 1970;18(5):723-37.

53. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. Immunology. 1971;21(6):903-14.

54. Fujimoto S, Greene M, Sehon Ah.Immunosuppressor t cells in tumor bearing hosts. immunological communication. 1975.

55. Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. J Exp Med. 1980;151(1):69-80.

56. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. Cell. 2008;133(5):775-87.

57. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. Trends Immunol. 2015;36(1):3-12.

58. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. Nature Immunology. 2018;19(7):665-73.

59. Georgiev P, Charbonnier LM, Chatila TA. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. J Clin Immunol. 2019;39(7):623-40.

60. Jia H, Qi H, Gong Z, Yang S, Ren J, Liu Y, et al. The expression of FOXP3 and its role in human cancers. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2019;1871(1):170-8.

61. Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. Immunol Res. 2005;32(1-3):155-68.

62. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003;4(4):330-6.

63. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol. 2014;27:1-7.

64. Tan MC, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, et al. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. J Immunol. 2009;182(3):1746-55.

65. Y. T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, et al. Circulating CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients With Pancreatic Cancer. Pancreas Journal. 2012;Volume 41(3).

66. Jang JE, Hajdu CH, Liot C, Miller G, Dustin ML, Bar-Sagi D. Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. Cell Rep. 2017;20(3):558-71.

67. GREENBURG G, HAY ED. Epithelia Suspended in Collagen Gels Can Lose Characteristics of Migrating Mesenchymal Cells Polarity and Express. THE IOURNAL OF CELL BIOLOGY 1982;VOLUME 95 333-9

68. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. Front Med. 2018;12(4):361-73.

69. Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery JP, Goh BC. Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. Trends Pharmacol Sci. 2016;37(7):606-17.

70. Gaianigo N, Melisi D, Carbone C. EMT and Treatment Resistance in Pancreatic Cancer. Cancers (Basel). 2017;9(9).

71. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. Cell. 2012;148(1-2):349-61.

72. Jiang JH, Liu C, Cheng H, Lu Y, Qin Y, Xu YF, et al. Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: Is it a clinically significant factor? Biochim Biophys Acta. 2015;1855(1):43-9.

73. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002;2(6):442-54.

74. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. Prog Mol Biol Transl Sci. 2013;116:317-36.

75. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. Cells. 2019;8(10).

76. Liu X, Yun F, Shi L, Li ZH, Luo NR, Jia YF. Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(15):6201-6.

77. Cao ZQ, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. Biomed Pharmacother. 2019;118:109320.

78. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. BMC Cancer. 2018;18(1):939.

79. Zhu QQ, Ma C, Wang Q, Song Y, Lv T. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. Tumour Biol. 2016;37(1):185-97.

80. Wushou A, Hou J, Zhao YJ, Shao ZM. Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival. Int J Mol Sci. 2014;15(12):21621-30.

81. Ghouzzi VE, Elisabeth Lajeunie, Martine Le Merrer, Val ´erie Cormier-Daire, Dominique Renier, Munnich A, et al. Mutations within or upstream of the basic helix–loop–helix domain of the TWIST gene are specific to Saethre-Chotzen syndrome. European Journal of Human Genetics (1999) 7, 27–33. 1999;7:27-33.

82. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. Cell. 2004;118(3):277-9.

83. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell. 2004;117(7):927-39.

84. Jung HY, Yang J. Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness. Cell Stem Cell. 2015;16(1):1-2.

85. Chen S, Chen JZ, Zhang JQ, Chen HX, Yan ML, Huang L, et al. Hypoxia induces TWIST-activated epithelial-mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in nude mice. Cancer Lett. 2016;383(1):73-84.

86. Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, Berx G. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2017;1868(2):584-91.

87. Ponnusamy MP, Seshacharyulu P, Lakshmanan I, Vaz AP, Chugh S, Batra SK. Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition. Curr Cancer Drug Targets. 2013;13(9):945-56.

88. Rajabi H, Kufe D. MUC1-C Oncoprotein Integrates a Program of EMT, Epigenetic Reprogramming and Immune Evasion in Human Carcinomas. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 2017;1868(1):117-22.

89. Xia P, Choi AH, Deng Z, Yang Y, Zhao J, Wang Y, et al. Cell membrane-anchored MUC4 promotes tumorigenicity in epithelial carcinomas. Oncotarget. 2017;8(8):14147-57.

90. Dhanisha SS, Guruvayoorappan C, Drishya S, Abeesh P. Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. Crit Rev Oncol Hematol. 2018;122:98-122.

91. Comamala M, Pinard M, Theriault C, Matte I, Albert A, Boivin M, et al. Downregulation of cell surface CA125/MUC16 induces epithelial-to-mesenchymal transition and restores EGFR signalling in NIH:OVCAR3 ovarian carcinoma cells. Br J Cancer. 2011;104(6):989-99.

92. Howley BV, Howe PH. TGF-beta signaling in cancer: post-transcriptional regulation of EMT via hnRNP E1. Cytokine. 2019;118:19-26.

93. Hui D, Chen J, Jiang Y, Pan Y, Zhang Z, Dong M, et al. CD44(+)CD24(-/low) sphere-forming cells of EBV-associated gastric carcinomas show immunosuppressive effects and induce Tregs partially through production of PGE2. Exp Cell Res. 2020;390(2):111968.

94. Schizas D, Charalampakis N, Kole C, Economopoulou P, Koustas E, Gkotsis E, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update. Cancer Treat Rev. 2020;86:102016.

95. Society AC. Cancer Facts & Figures 2019. Cancer Facts & Figures 2019 Atlanta: American Cancer Society; 2019. 2019.

96. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2016;22(44):9694-705.

97. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2006;6(4):295-307.

98. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Cell Res. 2017;27(1):109-18.

99. Yi G, Guo S, Liu W, Wang H, Liu R, Tsun A, et al. Identification and functional analysis of heterogeneous FOXP3+ Treg cell subpopulations in human pancreatic ductal adenocarcinoma. Science Bulletin. 2018;63(15):972-81.

100. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, et al. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. Nature. 2012;486(7404):549-53.

101. Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. Cell. 2015;162(5):1078-89.

102. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012;12(4):252-64.

103. Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. Cancer Research. 2004;64(2):622-30.

104. Hinoda Y, Ikematsu Y, Horinochi M, Sato S, Yamamoto K, Nakano T, et al. Increased expression of MUC1 in advanced pancreatic cancer. J Gastroenterol. 2003;38(12):1162-6.

105. Hou F, Ma D, Cui B. Treg cells in different forms of uterine cancer. Clin Chim Acta. 2013;415:337-40.

106. Kumar P, Saini S, Prabhakar BS. Cancer immunotherapy with check point inhibitor can cause autoimmune adverse events due to loss of Treg homeostasis. Semin Cancer Biol. 2020;64:29-35.

107. Wang M, Chen B, Sun XX, Zhao XD, Zhao YY, Sun L, et al. Gastric cancer tissue-derived mesenchymal stem cells impact peripheral blood mononuclear cells via disruption of Treg/Th17 balance to promote gastric cancer progression. Exp Cell Res. 2017;361(1):19-29.

108. North RJ, Bursuker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. J Exp Med. 1984;159(5):1295-311.