

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BORTEZOMİB VE İMATİNİB'İN PANKREAS KANSERİNDE
OLASI SİNERJİSTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Mol. Bio. Gaye PİŞİREN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BORTEZOMİB VE İMATİNİB'İN PANKREAS KANSERİNDE
OLASI SİNERJİSTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Mol. Bio. Gaye PİŞİREN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Begüm KOCATÜRK

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Seçil DEMİRKOL CANLI

ANKARA

2023

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BORTEZOMİB VE İMATİNİB'İN PANKREAS KANSERİNDE OLASI
SİNERJİSTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Öğrenci: Gaye Pişiren

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Begüm Kocatürk

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seçil Demirkol Canlı

Bu tez çalışması 11.05.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Tayfun Özçelik*
(Bilkent Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Dr. Öğr. Üyesi Begüm Kocatürk*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Füsun Özmen*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Hande Canpınar*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Serkan Akın*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

22 Mayıs 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

22/05/2023

Gaye PİŞİREN

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Begüm KOCATÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Seçil DEMİRKOL CANLI danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Gaye PİŞİREN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen kıymetli danışmanlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Begüm KOCATÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Seçil DEMİRKOL CANLI'ya çok teşekkür ederim.

Tüm eğitimim süresince paylaştıkları engin bilgiler ile akademik bilgi birikimime olan katkılarından dolayı Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Doç. Dr. Fusun ÖZMEN, Doç. Dr. Hande CANPINAR, Doç. Dr. Gürcan GÜNAYDIN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bölümümüzün eski bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. A. Lale DOĞAN'a da saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yardım severliği ve sonsuz hoşgürüsünden ötürü Temel Onkoloji Anabilim Dalımızın çok kıymetli sekreteri Sayın Semra SOLMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı sürdürdüğüm sırada arkadaşlıkları ile bana destek olan Melek GÜNİNDİ KORKUT, Hazal KARAKOYUN, Rukiye ABANOZ ve diğer tüm Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğrencilerine teşekkür ederim.

İyi ve kötü günde desteklerini asla esirgemeyen, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Pisiren G., Bortezomib ve İmatinib'in Pankreas Kanserinde Olası Sinerjistik Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2023. Pankreas kanseri hastaları arasındaki yüksek ölüm oranı, uygun tedavinin önemine dikkat çekmektedir. Ancak geleneksel tedavi stratejilerinin yetersiz kalması, alternatif yöntemlerin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Proteozom inhibitörü olan bortezomib, hücre içerisinde anormal proteinlerin uzaklaştırılmasını engellemektedir ve bu proteinlerin endoplazmik retikulumda (ER) birikmelerine neden olarak organel içerisinde stres oluşumunu tetiklemektedir. Pankreas organında var olan aktif protein sentezi, bu organın çok iyi bir şekilde kontrol edilen protein homeostaz merkezi ihtiyacını vurgulamaktadır. Bu durum bortezomib ilacının pankreas kanseri tedavisinde iyi bir aday olabileceğini göstermektedir. Fakat tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla stres eşliğinin aşılması büyük önem arz ettiği için bu ilaç ile birlikte diğer ER stres aktive edici ilaçların birlikte uygulanması gerekmektedir. Bu doğrultuda kombine tedavi amacıyla ER stresi aktive edebildiği bilinen tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib ilacı kullandı. Bu tez çalışmasında, bortezomib ve imatinib kombinasyonunun pankreas kanseri hücreleri üzerindeki olası sinerjistik etkisinin araştırılması amaçlandı. BxPC-3 ve MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde sXBP1 transkript seviyesi qRT-PCR ile incelenerek hem bortezomib hem de imatinibin ER stresi aktive edebildiği gösterildi. Elde edilen bulgular doğrultusunda, ilaç kombinasyonunun kanser hücresinin ölümü üzerinde sinerjistik bir etkiye yol açtığı gözlemlendi. Ayrıca imatinib ve bortezomibin RIDD mekanizması üzerinde aktive edici etkiye de sahip oldukları anlaşıldı. Yapılan *in silico* analizler sonucunda ER stres ile ilişkili olduğu bilinen genlerden DERL2, DNAJB11, EDEM1, EIF2AK3, HSPA5 ve CEBPB'in pankreas kanserlerinde bortezomibe karşı gösterilen dirençte rol oynayabildiği ortaya koyuldu. Sonuç olarak, bortezomib ve imatinibin pankreas kanseri hücrelerinde daha önce bilinmeyen etkileri keşfedildi ve ER strese bağlı hücre ölüm aktivasyonunun pankreas kanseri tedavisinde bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, Bortezomib, İmatinib, ER stres, Sinerji

Destekleyen kurumlar: TÜBİTAK 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs programı

ABSTRACT

Pisiren G., Investigation of the Possible Synergistic Effect of Bortezomib and Imatinib in Pancreatic Cancer. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Program Master of Science Thesis, Ankara 2023. The high mortality rate among pancreatic cancer patients underlines the importance of proper treatment. However, the traditional treatment strategies remain inadequate indicating that alternative therapy options need to be explored. Bortezomib is a proteasome inhibitor which blocks the removal of aberrant proteins and causes their accumulation in endoplasmic reticulum (ER) which in turn triggers stress in this organelle. The active protein synthesis in pancreas emphasizes the need for a stringent central of protein homeostasis thus bortezomib might be a good candidate for pancreatic cancer treatment. However, it is important to note that exceeding the stress threshold is crucial, indicating that combination of bortezomib with other ER stress activating drugs might increase the effectiveness of therapy. Imatinib is a tyrosine kinase inhibitor that is used for the purpose of combination with bortezomib due to its known effect on ER stress activation. In this thesis, we aimed to understand if combination of bortezomib and imatinib shows a synergistic effect on pancreatic cancer cells. We showed that both bortezomib and imatinib activates ER stress in BxPC-3 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells via analysing sXBP1 levels by qRT-PCR. Our findings revealed that the combination of these drugs resulted in a synergistic effect in the cancer cell death. It is also discovered that both imatinib and bortezomib have an activator impact on the RIDD mechanism. *In silico* analysis further unveiled that ER stress-related genes DERL2, DNAJB11, EDEM1, EIF2AK3, HSPA5, CEBPB may be involved in bortezomib resistance in pancreatic cancers. Overall, our study discovered the previously unknown effects of imatinib and bortezomib in pancreatic cancer cells and indicated that activation of ER stress induced death might be used as a therapy option for pancreatic cancer treatment.

Keywords: Pancreatic cancer, Bortezomib, Imatinib, ER stress, Synergy

Supported by: TUBITAK 2210-A scholarship for domestic MSc study

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Pankreas Kanseri	5
2.1.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	6
2.1.2. Tedavi Yaklaşımları	7
2.2. Endoplazmik Retikulum Organeli ve Endoplazmik Retikulum Stres Yanıtları	9
2.2.1. Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Yıkım (ERAD)	10
2.2.2. Otofaji	13
2.2.3. Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY)	14
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Kanser	20
2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Pankreas Kanseri	22
2.5. İnhibitör Molekül Kullanımı	24

2.5.1. Kanser Tedavisinde Proteozom İnhibitörlerinin Rolü	24
2.5.2. Pankreas Kanseriinde Proteozom İnhibitörlerinin Rolü	29
2.6. Tirozin Kinazlar	30
2.6.1. Tirozin Kinaz ve Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Kanserdeki Rolü	32
2.6.2. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Pankreas Kanseriindeki Rolü	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1 Çalışmada Kullanılan Malzemeler	38
3.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar ve İlaçların Hazırlanması	39
3.3. <i>In silico</i> Analizler	40
3.4. Hücre Hatlarının Çözülmesi	42
3.5. Hücre Hatlarının Pasajlanması	43
3.6. Hücre Sayımı ve Hücre Ekimi	44
3.7. İlaç Uygulaması	44
3.8. Hücre Canlılık Tayini	45
3.9. Kristal Viyole Boyaması	46
3.10. Kombinasyon İndeks Analizi	47
3.11. Total RNA İzolasyonu	49
3.12. RNA Kalite ve Konsantrasyon Tayini	50
3.13. cDNA sentezi	50
3.14. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	50
3.15. İstatistiksel Analizler	51
4. BULGULAR	52
4.1. Bortezomib ve İmatinib İlaçlarının Hedef Aldıkları Genlerin mRNA Düzeyindeki İfadelerinin Pankreas Kanseriinde <i>in silico</i> Yöntemlerle İncelenmesi	52

4.2. Bortezomib İlacına Karşı Hassas ve Dirençli Profil Sergileyen Pankreatik Kanser Hücre Hatlarının <i>in silico</i> Yöntemlerle Belirlenmesi	55
4.3. Pankreatik Kanser Hücre Hatlarının Bortezomib Hassasiyetlerinin <i>in vitro</i> Koşulda Belirlenmesi	57
4.4. BxPC-3 ve MIA PaCa-2 Hücre Hattında Bortezomib ve İmatinib İlaçlarına Ait IC ₅₀ Doz Miktarlarının Farklı İnkübasyon Sürelerinde Belirlenmesi	58
4.5. Bortezomib ve İmatinib İlaç Kombinasyonunun BxPC-3 ve MIA PaCa-2 Hücre Hatları Üzerindeki Olası Sinerjistik Etkisinin İncelenmesi	63
4.6. Bortezomib ve İmatinib İlaçlarının ER Stres Aktivasyonu Üzerindeki Etkilerinin Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması	71
4.7. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarının Bortezomib İlacına Karşı Oluşturdukları Yanıtın ve ER Stres ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin <i>in silico</i> İncelenmesi	78
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	95
8. EKLER	
EK-1: CompuSyn Yazılımı Tarafından Belirtilen Sinerji ve Antagonistik aralıklar.	
EK-2: <i>In silico</i> Analizlerde Kullanılan Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Gen Listesi.	
EK-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu.	
EK-4: Dijital Makbuz.	
EK-5: Etik Kurul İzin Belgesi.	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADM	Asinar - Duktal Metaplazi
ATF4	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
ATF6	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
AUC	Eğri Altında Kalan Alan
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
CFTR	Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Regülatörü
CGP	Kanser Genom Projesi
CHOP	C/EBP Homolog Protein
CI	Kombinasyon İndeksi
CTRP	Kanser Terapötik Yanıt Portalı
DR5	Ölüm Reseptörü 5
E1	Ubikitin Aktive Edici Enzim
E2	Ubikitin Konjuge Edici Enzim
E3	Ubikitin Ligaz
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eIF2α	Ökaryotik Translasyon Başlatıcı Faktör Alt Birim 2 α
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ER	Endoplazmik reticulum
ERAD	Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Yıkım
Fa	İnhibitör Etki
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
GADD34	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
GDSC	Kanserde İlaç Hassasiyet Genomiği

GEO	Gen Ekspresyon Omnibus
GEPIA	<i>The Gene Expression Profiling Interactive Analysis</i>
GIST	Gastrointestinal Stromal Tümör
GTE_x	Genotip Doku Ekspresyon Projesi
IP₃R	İnositol Trifosfat Reseptörü
IRE1	İnositol Gerektiren Enzim-1
JAK	Janus Kinaz
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
KPY	Katlanmamış Protein Yanıtı
mAb	Monoklonal Antikor
MCL	Mantle Hücreli Lenfoma
MEF	Fare Embriyonik Fibroblast
MM	Multiple Miyelom
nRTK	Reseptör Olmayan Tirozin Kinazlar
PDAC	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PDGFR	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü
PERK	Protein Kinaz R Benzeri ER Kinaz
Ph	<i>Philadelphia Kromozomu</i>
PTK	Protein Tirozin Kinazlar
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIDD	IRE1 α Bağımlı Bozunma
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinazlar
SEL1L	Lin-12 homolog 1 Benzeri Baskılayıcı/Hızlandırıcı Protein
SMI	Küçük Molekül İnhibitör
sXBP1	Kesilmiş X-box Bağlanma Protein 1
TCGA	Kanser Genom Atlası

TCR	T Hücre Reseptörü
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TRAF2	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör ile İlişkili Faktör 2
VEGFR	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü
XBP1	X-box Bağlanma Protein 1

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Endoplazmik retikulum ile ilişkili yıkım reaksiyonunun sitoplazmada gerçekleşme aşamaları (<i>BioRender.com</i> ile hazırlanmıştır).	12
2.2. 26S proteozom A) 19S ve 20S proteozom alt birimleri B) 20S proteozom alt biriminde bulunan katalitik beta halkası (<i>BioRender.com</i> ile hazırlanmıştır).	13
2.3. Endoplazmik retikulum ile ilişkili hücre ölümünde stresin şiddetinin ve süresinin rolü (<i>BioRender.com</i> ile hazırlanmıştır).	15
2.4. ER stres varlığında katlanmamış protein yanıtının aktivasyonu (<i>BioRender.com</i> ile hazırlanmıştır).	16
2.5. ER stres aracılı indüklenen hücre ölüm yolları (<i>BioRender.com</i> ile hazırlanmıştır).	19
4.1. Bortezomib ilacının hedef genlerinin ekspresyon seviyesinin normal ve tümör pankreatik doku örneklerinde karşılaştırılması (GEPIA). Kırmızı kutu tümör, gri kutu normal pankreatik doku örneklerini göstermektedir. Kutu grafikleri 25 percentilden 75 percentile kadar uzanmaktadır, yatay çizgi medyanı göstermektedir.	52
4.2. Proteoliz mekanizmasında yer alan genlerin imzasının normal ve tümör pankreatik örnekler kullanılarak karşılaştırılması (GEPIA2). Kırmızı kutu tümör, gri kutu normal pankreatik örneklerini göstermektedir. Kutu grafikleri 25 percentilden 75 percentile kadar uzanmaktadır, yatay çizgi medyanı göstermektedir.	53
4.3. İmatinib ilacının hedef genlerinin ekspresyon seviyesinin normal ve tümör pankreatik doku örneklerinde karşılaştırılması (GEPIA). Kırmızı kutu tümör, gri kutu normal pankreatik doku örneklerini göstermektedir. Kutu grafikleri 25 percentilden 75 percentile kadar uzanmaktadır, yatay çizgi medyanı göstermektedir.	54
4.4. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının hedef genlerinin ekspresyon düzeyinin GSE28735 veri seti ile incelenmesi.	55
4.5. Farklı veritabanlarının kullanımı ile pankreas kanseri hücre hatlarının bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyet bilgisinin AUC parametresi ile belirlenmesi: A) GDSC veritabanı B) CTRP veritabanı.	56

- 4.6.** Bortezomib ilacına ait 72 saatlik inkübasyon sonunda A) BxPC-3 B) MIA PaCa-2 hücre hatlarında belirlenen IC₅₀ doz miktarları. Grafikler ortalama ± standart sapma değerleri temel alınarak oluşturuldu (n=3). 57
- 4.7.** Bortezomib ilacına ait 72 saatlik inkübasyon sonunda A) CFPAC-1 B) SU.86.86 C) AsPC-1 D) Capan-1 E) PANC-1 hücre hatlarında belirlenen IC₅₀ doz miktarları. Grafikler ortalama ± standart sapma değerleri temel alınarak oluşturuldu (n=3). 58
- 4.8.** BxPC-3 hücre hattında bortezomib ilacına ait IC₅₀ doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü. 59
- 4.9.** MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ilacına ait IC₅₀ doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü. 60
- 4.10.** BxPC-3 hücre hattında imatinib ilacına ait IC₅₀ doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 72 saatlik inkübasyon (n=3) D) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü. 61
- 4.11.** MIA PaCa-2 hücre hattında imatinib ilacına ait IC₅₀ doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 72 saatlik inkübasyon (n=3) D) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü. 62
- 4.12.** Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) ilaçların birlikte uygulandığı durumda 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan etkinin grafiği (n=3) B) Bortezomib ve imatinib ilaçları arasında oluşan etkinin kombinasyon index (Fa-CI) grafiği. CI: kombinasyon indeks değeri, Fa: inhibitör etki, CI<1 sinerjistik etki, CI=1 aditif etki, CI>1 antagonistik etki. Fa=0.5 hücrenin %50'sini öldüren inhibitör etki noktası. 63
- 4.13.** Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkisinin CombeneFit yazılımı kullanılarak incelenmesi. Kombinasyon doz-yanıt ve referans doz yanıt kullanılarak sinerji dağılımı oluşturulmuştur ve sinerji seviyeleri matrix formatında verilmiştir. Standart sapma “+/-” ile belirtilmiştir (*p<0.05 **p<0.001 ***p<10⁻⁴). 64
- 4.14.** Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) İlaçların birlikte uygulandığı durumda 48 saatlik 65

inkübasyon süresi sonunda oluşan etkinin grafiği (n=3). B) Kombinasyon index (Fa-CI) grafiği. CI: kombinasyon indeks değeri, Fa: inhibitör etki, CI<1 sinerjistik etki, CI=1 aditif etki, CI>1 antagonistik etki. Fa=0.5 hücrenin %50'sini öldüren inhibitör etki noktası.

- 4.15.** Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki etkisinin Combeneft yazılımı kullanılarak incelenmesi. Kombinasyon doz-yanıt ve referans doz yanıt kullanılarak sinerji dağılımı oluşturulmuştur ve sinerji seviyeleri matrix formatında verilmiştir. Standart sapma “+/-” ile belirtilmiştir (*p<0.05 **p<0.001 ***p<10⁻⁴). 66
- 4.16.** Combeneft yazılımına göre belirlenen bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucunda BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) Bortezomibin 1.92 nM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken imatinib konsantrasyonunun değiştiği koşul B) İmatinibin 6.15 uM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken bortezomib konsantrasyonunun değiştiği koşul. CI<1 sinerjistik etki, CI=1 aditif etki, CI>1 antagonistik etki. 67
- 4.17.** Combeneft yazılımına göre belirlenen bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucunda MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) Bortezomibin 1.18 nM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken imatinib konsantrasyonunun değiştiği koşul B) İmatinibin 6.85 uM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken bortezomib konsantrasyonunun değiştiği koşul. CI<1 sinerjistik etki, CI=1 aditif etki, CI>1 antagonistik etki. 69
- 4.18.** İmatinib ilacının 48 saatlik inkübasyon sonucunda pankreas kanseri hücre hatlarında bortezomib ilacına karşı hassasiyet oluşturup oluşturmadığının incelenmesi: A) BxPC-3 hücre hattı B) MIA PaCa-2 hücre hattı. 71
- 4.19.** BxPC-3 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. A) IC₅₀ doz miktarında B) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulamasına ait sonuçlar. 72
- 4.20.** MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. A) IC₅₀ doz miktarında B) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulamasına ait sonuçlar. 74
- 4.21.** BxPC-3 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında RIDD hedef genlerinin ekspresyon 75

seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. Scara3 genine ait A) IC₅₀ doz miktarında B) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları. Bloc1s1 genine ait C) IC₅₀ doz miktarında D) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları.

- 4.22.** MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında RIDD hedef genlerinin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. Scara3 genine ait A) IC₅₀ doz miktarında B) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları. Bloc1s1 genine ait C) IC₅₀ doz miktarında D) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları. 77
- 4.23.** ER stres ile ilişkili genlerin pankreas kanseri hücre hatlarındaki ekspresyon seviyesi ile bu hücrelerin bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyetin korelasyonu. CGP-GDSC (n=29) platformunda A) DNAJB11 B) EIF2AK3 C) EDEM1 D) ATF3 genlerine ait korelasyon grafikleri. CCLE-CTRP (n=27) platformunda E) DERL2 genine ait korelasyon grafiği. 79
- 4.24.** ER stres ile ilişkili genlerin pankreas kanseri hücre hatlarındaki protein düzeyinde ekspresyon seviyesi ile hücrelerin bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyetin korelasyonu. A) HSPA5 (n=13) B) CEBPB (n=14) C) WFS1 (n=14) genlerine ait korelasyon grafikleri. 80

TABLULAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Kimyasal maddeler, sarf malzemeler, kitler ve çözeltiler.	38
3.2.	Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonu deney dizaynı.	48
3.3.	Total RNA izolasyonu için hazırlanan ilaç kombinasyonu deney dizaynı.	49

1.GİRİŞ

Kanser, en yüksek ölüm oranına sahip hastalıklardan olup tedavisinde kullanılan kemoterapi, hedeflenmiş terapi, radyoterapi, cerrahi müdahale ve immünoterapi hem yan etkiler doğurmakta hem de tedaviye gelişen direnç sonrası yetersiz kalmaktadır. Tedavinin başarıya ulaşmasında erken teşhis önemli bir rol oynamaktadır, fakat her kanser erken evrede teşhis edilememektedir. Bu kanserlerin başında agresif ve ölümcül yapısı ile bilinen pankreas kanseri gelmektedir. Bu hastalık ileri evreye gelene dek belirti göstermemektedir ve dolayısıyla hastalık ancak ileri evrelerde yakalanabilmektedir. Birçok kanser hastalığında bireylerin ölüm oranı tıptaki gelişmeler doğrultusunda düşüş göstermesine rağmen pankreas kanseri hastalarında bu oranda ciddi bir azalma gözlenmemektedir. Pankreas kanserine ait 5 yıllık sağ kalım oranı incelendiğinde de bu oranın %5-%7'ye kadar düşük oranlarda seyrettiği bilinmektedir (1, 2). Buna ek olarak, pankreas kanserinin 2030 yılına kadar kanser sebepli ölümler arasında ikinci sıraya yükselmesi de beklenmektedir (3). Hastalığın tedavisinde kullanılan klasik yöntemler hastaların yaşamını uzatma konusunda da yetersiz kalmaktadır (4-7). Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda bu hastalığın tedavisine yönelik çalışmaların ve alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

Hücrelerde bulunan endoplazmik retikulum (ER) organeli ribozomlar aracılığıyla vücudumuzda önemli role sahip proteinlerin sentezinden ve sonrasında da doğru şekilde katlanmalarından sorumludur (8). Fakat karsinogenez sonrası oluşan hipoksi, glikoz mahrumiyeti, hızlı büyüme sonucu artan protein sentezi, oksidatif stres ve pH değişimi gibi sebeplerden dolayı ER organelinin homeostazı bozulmaktadır. Bu durum sonucunda da yanlış katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin ER içerisinde birikimi gerçekleşmektedir (9, 10). Bu yanlış katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin ER'da birikimi sonrasında gerekli düzenleme sağlanamazsa organelde stres meydana gelmektedir ve katlanmamış protein yanıtı (KPY) adı verilen mekanizma devreye girmektedir. Bu mekanizma açıldığında ER membranı üzerinde bulunan ve KPY mekanizmasında görevli olan üç protein BiP şaperon proteininin yapılarından ayrılmasının akabinde aktif hale gelmektedir. Bu proteinlerden biri hem kinaz hem de RNaz aktivitesine sahip olan inositol gerektiren enzim 1 (IRE1)'dir. Bu

protein kinaz aktivitesini kullanarak otoposforilasyon yaptıktan sonra RNaz aktivitesini ile RIDD (IRE1 α Bağımlı Bozunma) mekanizmasını tetikleyerek hücredeki belirli mRNA'ların kesimine neden olur (11). Bu mekanizma homeostaza giden ayakta önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü bu mekanizma sayesinde hedef mRNA'ların kesimi sağlanarak hücrede zaten birikmiş durumda bulunan protein havuzuna yeni proteinlerin eklenmesi engellenerek organelde meydana gelen stres kısmen azaltılmaktadır. IRE1'in RNaz aktivitesinin bir başka hedef mRNA'sı ise XBP1'dir. IRE1 aracılığıyla XBP1'e ait mRNA alternatif kesip çıkarma yolu ile kesilerek aktif bir transkripsiyon faktörü haline dönüşmektedir. Bunun sonunda XBP1 hücre çekirdeğine giderek hücredeki problemin çözülmesine yardımcı olabilecek şaperon gibi proteinlerin yapımını sağlamaktadır (12, 13).

KPY mekanizmasının devreye girmesinin akabinde aktive olan bir diğer protein ise Protein Kinaz R Benzeri ER Kinaz (PERK)'dir. Kinaz aktivitesi ile önce kendini fosforile eden PERK, bu reaksiyon sonucunda aktif hale gelerek translasyonun başlaması için gerekli olan öncü tRNA'yı taşıyan ökaryotik başlatma faktörü 2 alpha (eIF2 α)'yı da fosforile etmektedir (14). eIF2 α 'nin fosforilasyonu sonucunda hücrede meydana gelen global translasyon durmaktadır ve böylece daha fazla yeni protein sentezinin gerçekleşmesi engellenerek yine ER organeli içerisindeki protein yükü azaltılmaktadır. İlginçtir ki, ATF4 transkripsiyon faktörü ile GADD34 translasyondaki bu inhibisyonundan kurtulmaktadır ve yine homeostazı sağlayacak genlerin yapımında rol oynamaktadır (15, 16).

KPY mekanizmasında yer alan son protein aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ise şaperon proteinin yapısından ayrılmasının akabinde golgi cisimciğine gidip bu organelde kesilerek aktif bir transkripsiyon faktörü haline dönüşmektedir ve hücrel homeostazın sağlanmasında önemli role sahip genlerin yapımını sağlamaktadır (17). KPY mekanizması her ne kadar ilk aşamada hücreyi yaşatmak için gerekli sinyalleri devreye geçirsede oluşan stres şiddetinin ve süresinin arttığı durumda hücrelerde ölüm meydana getirmektedir (18).

Kanser hücreleri hücre canlılıklarının devamlılığını sağlamak amacıyla ER organelinde biriken yanlış katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin birikimi sonrası olası stresin meydana gelmesini engellemek için Endoplazmik retikulum ile ilişkili

yıkım (ERAD) ve otofaji mekanizmalarını kullanırlar. Bu mekanizmaların yetersiz kaldığı noktada ise KPY mekanizmasının açılışı ile homeostaz sağlanmaya çalışılır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda kurtarıcı ERAD ile otofaji yollarının bloklanması ve stresin derecesinin yükseltilmesi ile KPY mekanizması tarafından yönetilen ölüm ayaklarının hedeflenmesi iyi bir tedavi yöntemi olmaktadır (19, 20). Şu an klinikte multipl miyelom ve mantle hücreli lenfoma hastalıklarının tedavisinde kullanılan bortezomib ilacı ERAD mekanizmasında görevli proteozom kompleksini bloklayan bir proteozom inhibitörüdür. Bortezomib aracılığıyla ERAD mekanizmasının engellenmesi sonucunda hücrede artan protein yükü ile KPY mekanizmasının tetiklendiği ve apoptoz ayaklarının açıldığı gözlenmiştir (21). Bortezomib ile elde edilen bu başarı multiple miyelomda plazma hücrelerinden yüksek dozda immunoglobulin salınımı sonucunda artan protein yükü ile ilişkilendirilirken, mantle hücreli lenfomada aşırı ROS üretimi aracılığıyla kaynaklandığı bilinmektedir (22-25). Fakat bortezomib ile yapılan çalışmalar incelendiğinde bu ilacın her kanser türünde istenilen etkiyi oluşturamadığı da anlaşılmaktadır (26).

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) ile yapılan ilk çalışmalar bu ilaçların neoplastik hastalıkların tedavisi için umut vaat ettiklerini göstermekle beraber hedef dışı etkilerinden dolayı klinikte hastalıkların tedavisinde kullanılmalarının uygun görülmedikleri bilinmektedir. Fakat son yıllarda geliştirilen inhibitörlerle hedefler daha spesifik hale getirilmektedir. Bu TKI'lerden biri de imatinib'tir ve bu ilacın Abl, c-Kit ve PDGF tirozin kinazlar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (27-30). İmatinib, klinikte kronik miyeloid lösemi ve gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde FDA tarafından onaylı bir şekilde kullanılmaktadır (31). İmatinib'in pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bu ilacın kanser hücrelerinin büyümelerini engellendiği gözlenmiştir (32). Fakat imatinibin pankreas kanser hücrelerinin proliferasyonundaki bu gerilemeye sebep oluşunun altında yatan mekanizma incelendiğinde bu ilacın etkisini TKI'ların çalışmasını engellemesinden bağımsız bir şekilde gerçekleştirdiği anlaşılmaktadır ve bu mekanizmanın anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (33). İmatinib'in gastrik kanser ve kardiyomiyositler üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalarda ise bu ilacın hücrelerde KPY mekanizması aracılığıyla hücre ölümüne

yol açtığı da gözlenmektedir (34, 35). Ayrıca yapılan bir başka çalışmada imatinib ilacının RIDD mekanizmasını engellediği de gösterilmektedir (36).

Bu tez çalışmasında, pankreas kanseri hücre hatlarında bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun hücre ölümü üzerindeki olası sinerjistik etkisi, imatinib ilacının bortezomib ilacına karşı dirençli profil sergileyen pankreatik kanser hücreleri üzerindeki etkisi ve imatinib ilacının RIDD mekanizmasındaki olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri

Pankreas, yaklaşık 15 cm uzunluğunda karın bölgesinde mide ile omurga arasında bulunan bir organdır (37). Pankreas organı, duodenum kıvrımına yerleşik olarak bulunan ve organın en geniş kısmını oluşturan baş, bu bölgenin uzantısı olan boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere dört ana bölümden oluşmaktadır. Pankreas organı endokrin ve ekzokrin fonksiyonlara sahiptir. Endokrin pankreasta, Langerhans adacıklarında bulunan özelleşmiş fonksiyonlara sahip endokrin hücreler bulunmaktadır ve bu hücreler tarafından vücut metabolizmasının düzenlenmesinde önemli role sahip çeşitli hormonların yapımı gerçekleşmektedir. Langerhans adacığında dört tane önemli endokrin hücre bulunmaktadır. Bu hücreler; insülin üreten beta hücreleri, glukagon üreten alfa hücreleri, somatostatin üreten gamma hücreleri ve pankreatik polipeptit hücreleridir (38, 39) . Tüm pankreasın %85'ini oluşturan ekzokrin pankreasta ise asinar hücreler ve duktus (epitel) hücreler tarafından sindirim sisteminde görevli çok çeşitli proteinlerin yapımı gerçekleşmektedir. Ayrıca yüksek plastisiteye sahip olduğu bilinen asinar hücreler aracılığıyla da pankreas homeostazisi ve rejenerasyonu düzenlenmektedir (40).

Pankreas kanseri, makroçevre ve mikroçevreden kaynaklanan doku hasarı, enflamasyon ve/veya stres gibi çeşitli uyaranlar aracılığıyla asinar hücrelerin duktal benzeri epitel karakter (ADM) kazanması ile başlamaktadır (41, 42). ADM sırasında asinar hücreler progenitör hücre benzeri bir karakter kazanmaktadır ve bu durum hücreleri onkojenik faktörlere karşı daha hassas bir hale getirmektedir. Oluşan hassasiyet ile birlikte asinar hücreler sıklıkla pankreatik intraepitelyal neoplazma (PanINs) haline dönüşmektedir (43, 44). Pankreas kanseri gelişiminin ilk basamağı olarak bilinen bu dönüşüm sonrasında KRAS, CDKN2A, TP53, SMAD3 ve BRCA2 genlerinde gerçekleşen mutasyonlar ile birlikte pankreatik hücreler kontrolsüz büyüme ve bölünme özelliği kazanmaktadır (45, 46).

Pankreas kanseri, teşhisin genellikle ileri evrelerde koyulmasından dolayı en agresif ve ölümcül kanser türlerinden biri olarak bilinmektedir (47). Kanserin endokrin veya ekzokrin pankreastan köken almasına bağlı olarak çeşitli pankreas kanseri türleri bulunmaktadır. Ekzokrin kökenli tümörlerden en sık görülen kanser türü pankreatik

duktal adenokarsinom (PDAC) iken adenoskuamöz karsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom, asinar hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom daha az sıklıkta karşılaşılan ekzokrin tümör çeşitleridir (48). Pankreatik nöroendokrin tümörler ise ekzokrin tümörlere kıyasla çok daha az sıklıkta görülen endokrin tümör türüdür (49). Pankreas kanserinin görülme sıklığı anatomik olarak incelendiğinde, kanserin yaklaşık olarak %60-%70'inin organın baş kısmında oluştuğu, %15'inin gövde ve de kuyruk kısmında meydana geldiği bilinmektedir (50).

2.1.1 Pankreas Kanserinin Epidemiyolojisi

2020 yılı Küresel Kanser İstatistik (GLOBOCAN) verilerine göre, 36 kanser türü incelendiğinde yaklaşık 19.3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ile ilişkili ölüm saptanmıştır. Pankreas kanseri bu 36 kanser türü arasında yaklaşık 496 bin yeni vaka sayısı (%2.6) ile on dördüncü, kanser ile ilişkili ölümlerde yaklaşık 466 bin vefat sayısı (%4.7) ile yedinci sırada yer almaktadır (51). 28 Avrupa ülkesinde yapılan araştırma sonucuna göre pankreas kanserinin 2025 yılına kadar kanser ile ilişkili ölümlerde meme kanserini geride bırakarak üçüncü sırada yer alacağı öngörülmektedir (52). Bu durumun hastalığın tedavisinde kullanılan kemoterapi, radyoterapi, ameliyat ve palyatif bakım gibi geleneksel yöntemler ile birlikte hedefsel tedavi, immünoterapi ve mikrobiyal terapi gibi yeni yöntemlerin de var olmasına rağmen bireylerin çoğunda semptomların ileri evreye kadar saptanamamasından dolayı kaynaklandığı bilinmektedir (53, 54). Hastalığın teşhisinde karşılaşılan bu zorluktan dolayı pankreas kanserine ait 5 yıllık sağkalım oranı kanserin erken evrede teşhis edildiği durumda %39 iken, kanserin ileri evrede teşhis edildiği durumda %3 - %5'e kadar düşmektedir (1).

2.1.1.1 Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin tedavisi için hastalığın erken evrede teşhisi ve dolayısıyla hastalığa neden olan faktörlerin neler olduğunun anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Pankreas kanserine neden olan faktörler kesin olarak bilinmemesine karşın hastalık ile ilişkili birçok önlenemeyen ve önlenemeyen risk faktörleri belirlenmiştir (37). Örneğin; pankreas kanserine yaş, aile öyküsü ve genetik mutasyonlar gibi önlenemez faktörler ile sigara kullanımı, alkol tüketimi, bağırsak mikroflorası, kronik pankreatit ve obezite gibi müdahale edilebilir faktörlerin neden olduğu bilinmektedir (54). Pankreas kanseri

yaş faktörü açısından incelendiğinde, hastalığa yakalanma riskinin yaş ile ilişkili bir şekilde arttığı ve özellikle 60 ile 80 yaşları arasındaki bireylerde bu riskin çok daha fazla olduğu bilinmektedir. Hastalık cinsiyet faktörü açısından incelendiğinde ise hastalığa yakalanma sıklığı erkek bireylerde kadınlara kıyasla daha fazladır (51, 55). En önemli müdahale edilebilir risk faktörlerinden biri sigara kullanımınıdır. Yapılan bir vaka-kontrol çalışmasında sigara kullanımının bireylerde pankreas kanseri riskini %74 oranında artırdığı gözlenmiştir (56, 57). Ayrıca sigara kullanımının ve sigarada bulunan bileşenlerin pankreatik hücrelerin kök hücre karakteristiğini de artırabildiği yapılan birçok çalışma doğrultusunda ortaya konulmuştur (58). Epidemiyolojik kanıtlara göre obezitenin de pankreas kanserinde önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, yapılan bir *in vivo* çalışma sonucunda normal besinler ile beslenen farelerin sadece %10'unda pankreatik neoplazi gelişimi olurken, yüksek yağlı diyet ile beslenen hayvanların obez hale geldiği ve bu hayvanların yaklaşık olarak %45'inin pankreatik duktal hücrelerinde neoplastik değişim meydana geldiği gözlenmiştir (59).

Bu faktörler dışında, son yıllarda yapılan çalışmalar doğrultusunda pankreas kanserli ve pankreas kanseri ile ilişkili hastalık içeren aile öyküsüne sahip bireylerde de hastalığa yakalanma riskinin arttığı anlaşılmıştır. Bu durum pankreas kanseri gelişiminde rol oynayan genetik mutasyonlar ile açıklanabilmektedir (60, 61). Genetik mutasyon kaynaklı oluşan pankreas kanseri kalıtsal ve sporadik olmak üzere iki şekilde gelişmektedir. Pankreas kanserinin gelişimi kalıtsal olarak incelendiğinde; Lynch sendromu (DNA yanlış eşleşme tamir mekanizmasında görevli hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 ve hMSH6/GTBP genlerinde mutasyon), Peutz-Jeghers sendromu (tümör baskılayıcı *STK11* geninde mutasyon), Ailesel atipik ben sendromu (FAMM), kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri sendromu (*BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon) gibi kalıtsal genetik hastalıklar da pankreas kanseri riskini artırmaktadır (62). Ayrıca, PRSS1, KRAS, p16 ve p53 genlerinde gerçekleşen mutasyonlarında pankreas kanseri riskini artırdığı bilinmektedir (63).

2.1.2. Tedavi Yaklaşımları

Pankreas kanserinden geleneksel tedavi yöntemi olarak ameliyat, kemoterapi, radyoterapi ve palyatif bakım uygulanmaktadır (54). Uygulanacak tedavinin türü

belirlenirken öncelikle kanserin türü ve evresi ile hastanın yaşı, genel sağlık durumu ve organ fonksiyon testleri dikkate alınmaktadır. Örneğin; evre 1 ve evre 2’de bulunan pankreas kanseri hastalarında öncelikle ameliyat tercih edilirken, evre 4’te bulunan hastalarda öncelikle neoadjuvan tedavi olarak uzun süreli kemoterapi uygulanarak tümör boyutunun küçülmesi sağlandıktan sonrasında ameliyat tercih edilmektedir (64). Ayrıca ameliyat öncesi uzun süreli kemoterapi uygulamasının daha iyi bir tümör kontrolü ve dolayısıyla hastanın yaşam süresi ile yaşam kalitesinde de artış sağladığı bilinmektedir (65). Ameliyat sonrasında hastanın genel sağlık durumu ve organ fonksiyonları değerlendirildikten sonra adjuvan kemoterapi de uygulanmaktadır. Genel sağlık durumu ve organ fonksiyonu daha iyi olan hastalara genellikle dört ilacın kombinasyonundan oluşan FOLFIRINOX (florourasil, oksaliptin, irinotekan, lökovorin) tedavisi uygulanırken, durumu daha kötü olan hastalara gemsitabin veya bu ilacın bazı ilaçlar ile birlikte kombinasyonu tercih edilmektedir (66).

Adjuvan ve neoadjuvan tedaviler her ne kadar çoğu hastada olumlu yönde etkilere sahip olsa da, bu tedavi yöntemlerinin de kısıtlamaları bulunmaktadır. Örneğin ameliyat sonrasında hastaların yaklaşık %40’ında gelişen komplikasyonlardan dolayı bu bireyler adjuvan tedavi alamamaktadır (67). Neoadjuvan tedavi alan hastalarda ise ameliyat öncesinde aldıkları tedavi kaynaklı gelişen komplikasyonlar sonucunda bireyler ameliyat edilememektedir. Bunların yanı sıra bireylere uygulanan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemleri sonucunda pankreasta fibrozisin tetiklendiği ve dolayısıyla ameliyat ile ilişkili gelişebilecek komplikasyon oranının da arttığı bilinmektedir (68).

Pankreas kanseri tedavisinde tercih edilen bu geleneksel tedavi yöntemlerinin kısıtlamalarının üstesinden gelmek için hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve mikrobiyal tedavi gibi çok çeşitli yeni yaklaşımlar da geliştirilmektedir (54, 69). Fakat her ne kadar pankreas kanseri hücrelerinde gerçekleşen genetik alterasyonların heterojenitesi ve immün tolerans mekanizmaları temel alınarak yeni yaklaşımlar geliştirilse de, bunlar da hastalığın tedavisi için yetersiz kalmaktadır (54).

2.2. Endoplazmik Retikulum Organeli ve Endoplazmik Retikulum Stres Yanıtları

Endoplazmik retikulum (ER), hücre sitoplazmasında bulunan, zarlı tabaka ile tübüllerin sürekli ağından oluşan ve ER lümeninin sitozolden ayrımını sağlayan çift zarlı lipit tabakasına sahip en büyük intrasellüler organeldir (70). ER, protein sentezi ve transportu, protein katlanması, lipit ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması gibi çok çeşitli fonksiyonlara sahiptir (71-77). ER organeli ribozom içeren granüllü kompartman ile ribozom içermeyen granülsüz kompartmandan oluşmaktadır. Tüm ökaryotik hücreler ER bulundururken, bazı özelleşmiş hücreler yapılarında çok daha fazla sayıda ER bulundurmaktadır. Örneğin, lipit sentezinden sorumlu majör hücrelerden hepatositler çok sayıda granülsüz ER'a sahipken, efektör B hücreler gibi plazma hücreleri ve ekzokrin hücrelere sahip pankreas hücreleri yapılarında bol miktarda granüllü ER içermektedir (78).

Granülsüz ER, lipitler ile steroid hormonların biyosentezinden sorumludur ve ayrıca organlardaki detoksifikasyon reaksiyonları da burada gerçekleşmektedir (79). Kaslarda bolca bulunan granülsüz ER'ın özel bir türü olan sarkoplazmik retikulum ise kas kasılması sırasında gerekli olan kalsiyumun temininden sorumludur. Granüllü ER'lar yapılarında bol miktarda integral hücre zarı proteininin ve/veya salgı proteinlerinin sentezinden sorumlu olan ribozomları bulundurmaktadır. Ribozomlar aracılığıyla transkripsiyon reaksiyonu sonucunda oluşan mRNA'ların polipeptit zinciri haline gelmesi için önce sitozolde daha sonra ER'da translasyon reaksiyonu gerçekleşmektedir (80, 81). Translasyon reaksiyonu sonucu oluşan küçük peptit zincirleri de peptidaz enzimleri tarafından kesilerek serbest protein halinde ER lümenine girerler (82). ER lümenine giren serbest proteinlerin öncelikle integral membran proteini mi yoksa salgı proteini mi olduğu belirlenmektedir. Yapısında hidrofobik rezidüleri bulunduran veya transferi engelleyecek özelleşmiş sekanslar içeren proteinin integral membran proteini olduğunun anlaşılmasından sonra proteinin sitoplazmaya translokasyonu engellenerek fosfolipit tabakasına yerleşmesi sağlanmaktadır (83).

Hücre zarına katılmayan salgı proteinlerinin ilgili bölgeye transportu sağlanmadan önce proteinin fonksiyonunun ve/veya transportunun gerçekleşeceği

bölgeyi belirlemek amacıyla şaperon proteinler aracılığıyla katlama işlemi gerçekleşmektedir. Doğru katlanma sonrasında ise ilgili enzimler yardımıyla N-glikolizasyon, disülfid bağ oluşumu ve oligomerizasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar meydana gelmektedir (75). Posttranslasyonel modifikasyonlar sonucunda doğru bir şekilde katlanan birçok proteinin ilgili bölgeye transportu sağlanmaktadır. Fakat mutasyonlar, şaperon protein yetersizliği veya kanser hücrelerinde karsinogenez kaynaklı oluşan hipoksi, glukoz yetersizliği, kontrolsüz hücre büyümesinden dolayı artan protein sentezi, oksidatif stres ve pH değişimi gibi sebeplerden dolayı bazı proteinlerin katlanmaları sağlanamamakta veya yanlış katlanabilmektedir (84). Hem protein homeostazının sağlanabilmesi hem de ER’da olası stres oluşumunun engellenebilmesi için katlanamayan ve/veya yanlış katlanmış proteinler çeşitli kalite kontrol sistemleri ile ER’dan elimine edilirler. Bu kalite kontrol sistemleri; ER ile ilişkili yıkım (ERAD), otofaji ve Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY)’dir (85).

2.2.1. Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Yıkım (ERAD)

ER ile ilişkili yıkım yolağının varlığı, heptamerik T hücre reseptörü (TCR) kompleksinde yer alan alt birimlerin döngüsü üzerine çalışmalar yapan Klausner ve ark. tarafından saptanmıştır. TCR kompleksinin transferi için öncelikle TCR alt birimlerinin T hücre ER’ında heterooligomerik kompleks halini almaları gerekmektedir. Klausner ve ark. heterooligomerik kompleks hali alamayan TCR alt birimlerinin lizozomal proteazlardan bağımsız bir şekilde yıkıldıklarını fark etmişlerdir ve bu durum ER’ın kendisinin yanlış katlanmış proteinlere karşı proteolitik aktivitesinin olabileceğini düşündürmüştür (86). Daha sonra mayalarda yapılan önemli bir çalışma sonucunda ise ubiquitin konjugasyon mekanizmasının bileşenlerinden olan Ubc6’yı bulundurmayan hücrelerde, kısa ömürlü yanlış katlanmış membran proteinlerinin yıkımının gerçekleşmediği anlaşılmıştır (87). ER protein kalite kontrolündeki bu ubiquitin-proteozom sisteminin varlığı ayrıca kistik fibroz transmembran iletkenlik regülatörünün (CFTR) mutant ve doğal suşunda yapılan çalışmalarda da doğrulanmıştır. CFTR’ler ile yapılan çalışmada, proteozom fonksiyon inhibisyonu ile CFTR moleküllerinin birikiminin gerçekleştiği gösterilmiştir (88). Tüm bu bilgiler ışığında ER lümeninde ve membranında bulunan aberant proteinlerin ubiquitin-proteozom sistemi tarafından sitoplazmada yıkıma uğradıkları anlaşılmıştır.

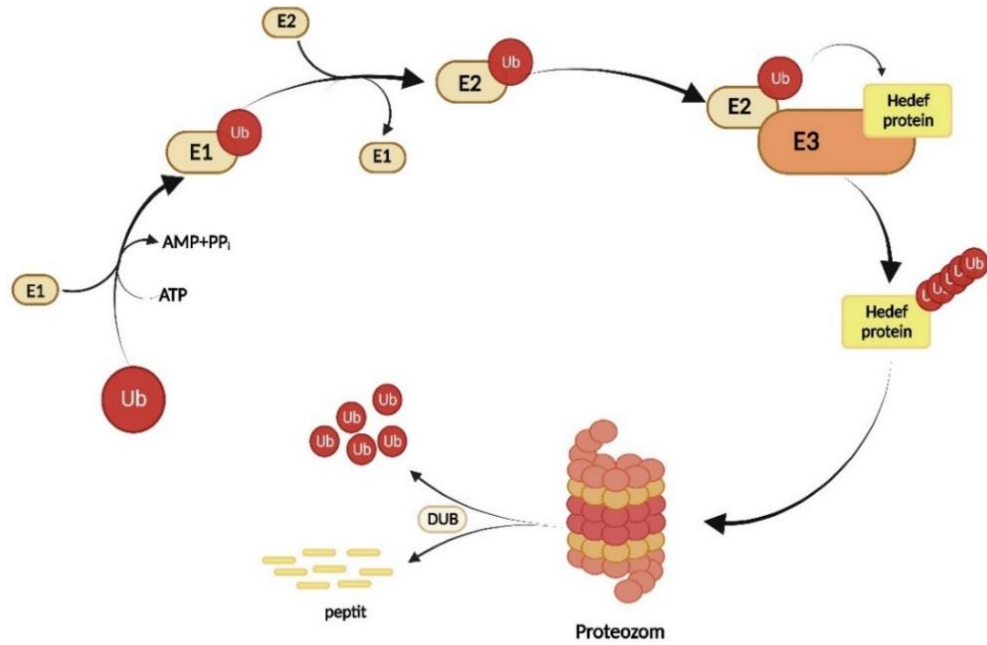
ERAD reaksiyonunda görevli çok sayıda bileşen bulunmaktadır ve bu bileşenler aracılığıyla da sırasıyla substrat molekülün tanınması, retrotranslokasyonu, poliubikitinasyonu ve 26S proteozom tarafından yıkımı gerçekleşmektedir.

Substrat Molekülünün Tanınması: Posttranslasyonel modifikasyonu başarısız olan veya yanlış katlanmış polipeptit molekülleri ile bir araya gelememiş yapıdaki çoklu protein kompleksleri ERAD mekanizmasının substratı olarak bilinmektedir (89). Bu substrat moleküllerinin tanınması moleküler şaperonlar ve şaperon benzeri lektinler aracılığıyla sağlanmaktadır. Örneğin; hidrofobik yapılar içeren katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler şaperonlar tarafından tanınırken, kotranslasyonel modifikasyon sonucunda yapısında N-bağlı oligosakkaritler bulduran glikoproteinler şaperon benzeri lektinler tarafından tanınmaktadır. Fakat yapılan çalışmalar doğrultusunda, şaperon benzeri lektin eksikliğinin olduğu koşullarda devreye şaperonların da girebildiği anlaşılmıştır (90).

Substrat Molekülünün Retrotranslokasyonu: Tanınan substrat molekülü ER lümeninden sitoplazmaya transfer edilir. Retrotranslokasyon reaksiyonu sırasında çeşitli kanalların görev aldığı bilinmektedir (90). Örneğin; elde edilen ilk veriler doğrultusunda translokasyondan sorumlu Sec61 kanalının retrotranslokasyonda da görev aldığı anlaşılmıştır (91, 92). Sec61'e ek olarak yapılan bazı çalışmalar sonucunda ubikitin proteinin ligasyonundan sorumlu proteinlerin de bu mekanizmada bir kanal görevi gördükleri fark edilmiştir (93, 94). Retrotranslokasyon reaksiyonun ayrıca kanal kullanılmadan da gerçekleştiği bilinmektedir. Örneğin; integral membran proteinleri direkt olarak hücre zarının lipid tabakasından geçebilmekte veya bir şekilde lipid tabakasından çözünür hale gelerek sitoplazmaya transferlerinin gerçekleştiği düşünülmektedir (95).

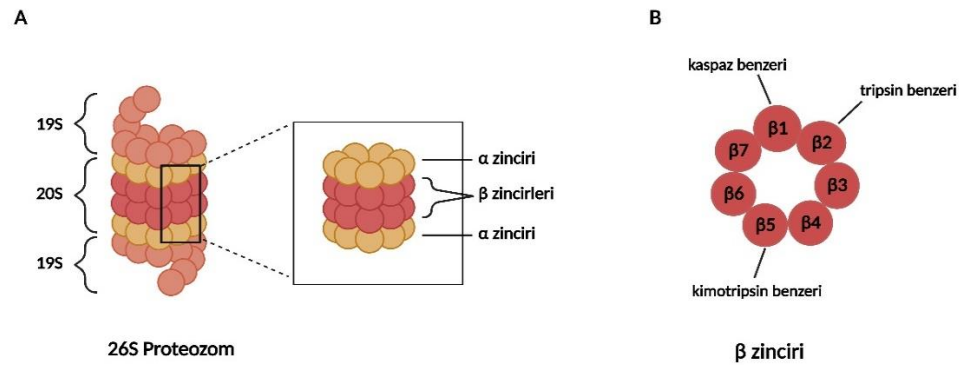
Substrat Molekülünün Poliubikitinasyonu: Retrotranslokasyonu gerçekleşen substrat molekülü öncelikle ubikitinlenir. 76 amino asitlik bir protein olan ubikitin, substratın ERAD sırasında proteozomlar aracılığıyla yıkılması için bir sinyal görevi görmektedir (96). Ubikitin substrat molekülüne bağlanması enzimatik kaskat aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu kaskat, ubikitin aktive edici enzimin (E1) aktivitesi ile başlamaktadır. E1, önce adenilasyon reaksiyonu daha sonra nükleofilik atak aracılığıyla ubikitine bağlanmaktadır. E1'e bağlanan ubikitin, ubikitin konjuge edici

enzim olarak bilinen E2'ye aktarılmaktadır. E2'ye aktarılan ubiquitin ise bu molekülün substrata bağlanmasından sorumlu enzim olan ubiquitin ligaz (E3)'a aktarılmaktadır. E1-E2-E3 enzim kaskadı aracılığıyla gerçekleşen bu işlem substrat molekülünün yıkıma uğrayabilmesi için gerekli uzunlukta ubiquitin molekülleri elde edilene kadar devam etmektedir (Şekil 2.1.) (97).



Şekil 2.1. Endoplazmik retikulum ile ilişkili yıkım reaksiyonunun sitoplazmada gerçekleşme aşamaları (*BioRender.com* ile hazırlanmıştır).

Ubikitin-Proteozom Sistemi: Sitoplazmaya transferinin akabinde poliubikitinlenen substrat molekülünün yıkımı 26S proteozom tarafından gerçekleşir. 26S proteozom, katalitik fonksiyona sahip 20S proteozom alt birimi ile molekülün tanınmasından ve yapının içine alınmasından sorumlu olan iki tane 19S düzenleyici birimden oluşmaktadır (21, 98). 20S birimi, yapısında toplam 28 tane alt birim içeren dört heptamerik halka bulundurmaktadır (22). Bu dört heptamerik halkayı iki tane birbirinin aynısı olan katalitik beta halkaları (14 beta alt birim) ile bunların dışında kalan katalitik olmayan alfa halkaları (14 alfa alt birim) oluşturmaktadır (99) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. 26S proteozom A) 19S ve 20S proteozom alt birimleri B) 20S proteozom alt biriminde bulunan katalitik beta halkası (*BioRender.com* ile hazırlanmıştır).

Alfa halkasında yer alan alt birimler, sadece yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin yapının aktif bölgesine girişini kontrol etmektedir. Beta halkasında yer alan $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ alt birimleri ise proteozom kompleksinin proteolitik aktivitesinden sorumludur (99). $\beta 1$ alt birimi kaspaz benzeri (asidik rezidü sonrası kesim), $\beta 2$ alt birimi tripsin benzeri (bazik rezidü sonrası kesim) ve $\beta 5$ alt birimi kimotripsin benzeri (hidrofobik rezidü sonrası kesim) proteolitik aktiviteye sahiptir (99, 100) ve tüm beta alt birimler amino uçta bulunan treonin 1'den kesim yaparlar (101). 19S birimi ise proteozom kompleksinde düzenleyici göreve sahip alt birimlerden oluşmaktadır. Alt birimleri, altı tane ATPaz ve en az sekiz tane ATPaz olmayan enzim oluşturmaktadır. Bu alt birimler yıkılacak olan substrat molekülünün tanınması, deubikitasyonu, yapısında bulunan posttranslasyonel modifikasyonunun kesimi ve translokasyonundan sorumludur (102, 103). Dolayısıyla yıkıma uğrayacak olan poliubikitinlenmiş protein molekülü, önce 19S proteozom birimi tarafından tanınarak yıkımı gerçekleştirecek alt birimlere sahip 20S proteozoma aktarılır ve sonuç olarak proteinin yıkımı gerçekleştirilir (22).

2.2.2. Otofaji

Otofaji, hücrel moleküllerin ve hasar görmüş organellerin lizozomlar yardımıyla yıkımlarının gerçekleştiği programlı katabolik bir mekanizmadır (104). Günümüzde memeli hücrelerde bulunduğu bilinen otofaji türleri; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofajidir. Bunlar kendi arasında fizyolojik

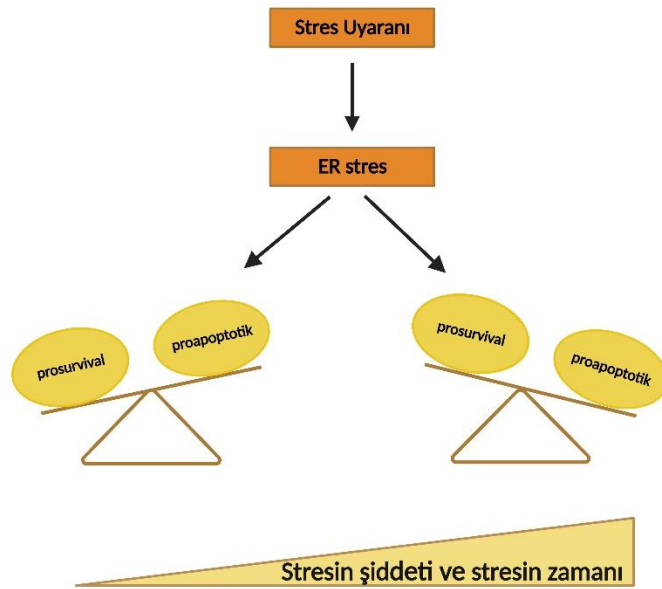
fonksiyonlar ve yıkım için izlenen taşıma mekanizmaları açısından farklılıklar göstermektedir (105, 106). Makrootofajide sitoplazmada bulunan taşınacak bileşenler öncelikle otofagozom olarak bilinen çift hücre zarlı veziküllere alınırlar. Daha sonra otofagozomun lizozom ile birleşmesi sonucunda oluşan otolizozom yapısı sayesinde taşınan bileşenlerin yıkımı meydana gelmektedir. Mikrootofajide sitoplazmada bulunan bileşenlerin direkt olarak lizozomun membranından hücre içine alımları ve akabinde yıkımları gerçekleşmektedir. Büyük yapıli bileşenlerin yıkımı hem makrootofaji hem de mikrootofaji aracılığıyla düzenlenebilmektedir. Şaperon aracılı otofaji mekanizmasında ise, şaperon proteinler ile kompleks oluşturan yıkım için hedeflenmiş proteinler lizozom membranında bulunan reseptörler tarafından tanınır ve hücre içine alınarak yıkımları gerçekleştirilir (105). Otofajinin hastalıklarda var olan etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde makrootofajinin büyük bir önem sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Açlık veya diğ er bazı stres kaynaklı olaylar sonucunda hücrede meydana gelen hasar sonucunda açığ a çıkan hücresel bileşenlerin, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin, patojene ait ürünler gibi bileşenlerin ortamda var olması ile birlikte hücresel homeostazisin devamlılığ ının sağlanabilmesi amacıyla otofaji devreye girmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar doğrultusunda otofajinin hücre büyümesi, hücre döngüsü, farklılaşma, programlı hücre ölümü, hücresel yaşlanma ve tümör oluşumu üzerinde de önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir (107). Otofaji, hücresel homeostazisin devamlılığ ı açısından incelendiğinde bu mekanizmanın hem ER stresi düzenleyebildiğ i hem de ER stres tarafından düzenlenebildiğ i anlaşılmaktadır. ER stres varlığ ında yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin otofaji tarafından yıkımının altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Fakat yapılan çalışmalar sonucunda var olan ER stres aracılığıyla otofajinin düzenlendiğ i bilinmektedir. Örneğ in meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışma doğrultusunda KPY'de görev alan IRE1 α proteininin aktivasyonu sonrasında aktive olan apoptozis ile ilişkili JNK/ASK1/TRAF2 yolağ ının otofajiyi aktive ettiğ i gözlenmiştir (108).

2.2.3. Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY)

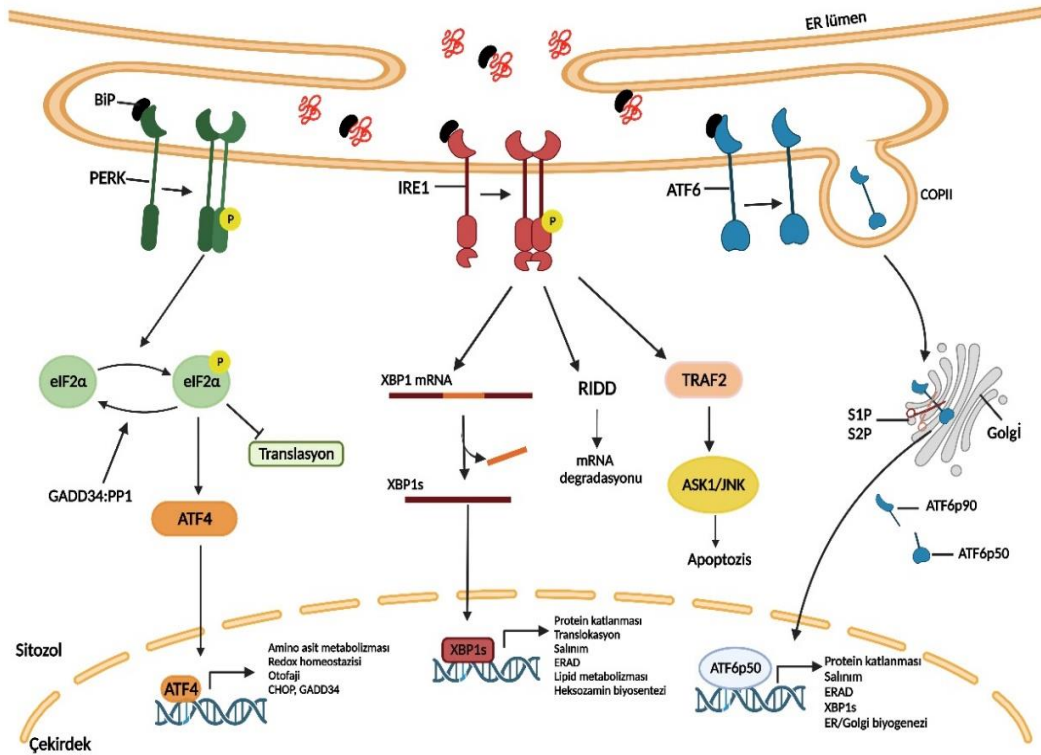
Katlanmamış veya yanlış katlanmış protein miktarının artışı ve ER lümeninde birikimi ile birlikte yetersiz kalan ERAD mekanizması ile otofajiye ek olarak KPY

sistemi devreye girmektedir. Aktive olan KPY; global protein üretim hızını azaltıp, ER'ın protein katlama ve posttranslasyonel modifikasyon kapasitesini artırıp, şaperon proteinler ile ERAD mekanizmasında görev alan bileşenlerinin üretimini indükler ve ERAD mekanizması aracılığıyla katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını sağlayarak ER stresin şiddetinin artmasını engellemektedir (109-111). Fakat ER stresin şiddetinin ve süresinin arttığı durumda aktif hale gelen KPY mekanizması da ER homeostazisini sağlamada yetersiz kalmaktadır ve sonuç olarak hücre ölümü indüklenmektedir (110) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Endoplazmik retikulum ile ilişkili hücre ölümünde stresin şiddetinin ve süresinin rolü (*BioRender.com* ile hazırlanmıştır).

KPY'de görev alan üç önemli protein bulunmaktadır. Bu proteinler; inositol gerektiren enzim-1 (IRE1), protein kinaz R benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır. Bu üç protein ER luminal ve sitozolik kısımlar içermektedir. ER luminal kısım katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri algılayarak, sitozolik kısım aracılığıyla translasyonel, transkripsiyonel veya direkt olarak sinyal molekülü ile interaksiyon sağlanarak sinyal iletimi gerçekleşmektedir (112) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. ER stres varlığında katlanmamış protein yanıtının aktivasyonu (*BioRender.com* ile hazırlanmıştır).

İnositol gerektiren enzim-1 (IRE1): IRE1, sitozolik serin/treonin kinaz ve endoribonükleaz (RNaz) aktivitelerine sahip tip 1 ER transmembran proteinidir (113, 114). Memelilerde IRE1 α ve IRE1 β olmak üzere iki tane IRE1 izoformu bulunmaktadır. IRE1 α sürekli olarak eksprese edilirken, IRE1 β 'nin ekspresyonu sınırlıdır (115). Homeostazis koşulu altında, BiP/GRP78 şaperon protein ile asosiye olarak bulunan IRE1 inaktif haldedir. ER stres durumunda ise, şaperon proteinin IRE1 α 'dan ayrılması sonrasında aktif hale gelen proteinin trans-otofosforilasyonu ve aynı zamanda oligomerizasyonu gerçekleşerek kinaz aktivitesi de aktif hale gelmektedir (116, 117). IRE1 α 'nın majör RNA substratı X-box bağlanma protein 1 (XBP1)'dir (118). IRE1 α , XBP1 mRNA' sında bulunan küçük 26 nükleotitlik intron kısmını kesip geriye kalanları birleştirerek XBP1'i aktif bir transkripsiyon faktörü (sXBP1) haline getirmektedir (112). Aktif hale gelen sXBP1'in hücre çekirdeğine translokasyonu gerçekleşir ve çekirdekte proteinlerin translokasyonunda, katlanmasında ve salınımında yer alan genler ile ERAD mekanizmasında, lipid metabolizmasında ve proteinlerin glikolizasyonu için gerekli ürünlerin sentezlendiği heksozamin biyosentezinde görevli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek oluşan ER

stresin azaltılması sağlanmaktadır (112, 116). Ayrıca IRE1 α endoribonükleaz aktivitesini kullanarak da, IRE1 bağımlı mRNA bozunması olarak bilinen RIDD (IRE1 α bağımlı bozunma) kolunu aktive edip bazı ribozomal RNA'ları, öncül mikroRNA'ları ve ER'da lokalize halde bulunan RNA'ları kesip yıkıma uğratmaktadır ve böylece daha fazla protein yapımı engellenerek var olan protein yükü azaltılmaktadır (15, 119).

Protein Kinaz R Benzeri ER Kinaz (PERK): Serin/treonin kinaz aktivitesine sahip tip 1 ER membran proteini olan PERK, aynı IRE1 proteininde olduğu gibi ER stres varlığında şaperon proteinin yapısından ayrılması sonrasında aktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen PERK, trans-otofosforilasyonunu gerçekleştirirken aynı zamanda oligomerize olarak da kinaz aktivitesini aktive etmektedir (120). PERK kinaz aktivitesini kullanarak ökaryotik translasyon başlatıcı faktör alt birim 2 α (eIF2 α) molekülünü serin 51'den tersinir bir şekilde fosforillemektedir. Fosforilasyon reaksiyonu sonrasında ise eIF2 α aracılığıyla global translasyon inhibe olmaktadır ve böylece daha fazla yeni protein sentezinin gerçekleşmesi engellenerek ER'daki protein yükü azaltılmaktadır (121, 122). Fakat diğer bir taraftan bazı genlerin ekspresyonu seçici bir şekilde devam etmektedir. Örneğin eIF2 α 'nın fosforilasyonu sonrasında aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4)'ün ekspresyonu gerçekleşmektedir. ATF4'ün daha sonra hücre çekirdeğine translokasyonu meydana gelmektedir ve burada protein sentezi, amino asit metabolizması, redox homeostazisi, apoptozis ve otofaji reaksiyonlarında görev alan genlerin ekspresyonunu aktive etmektedir. Transkripsiyon faktörü C/EBP homolog protein (CHOP), ATF4 tarafından ekspresyonu indüklenen ve pro-apoptotik fonksiyona sahip genlerden biridir (117). Ayrıca ATF4, *Growth arrest and DNA damage-inducible protein* (GADD34) geninin ekspresyonunu da indüklemektedir. GADD34, protein fosfat 1 (PP1) ile kompleks oluşturarak eIF2 α 'nın defosforilasyonuna ve dolayısıyla protein sentezinin devam etmesine yol açmaktadır (112) (Şekil 2.4.).

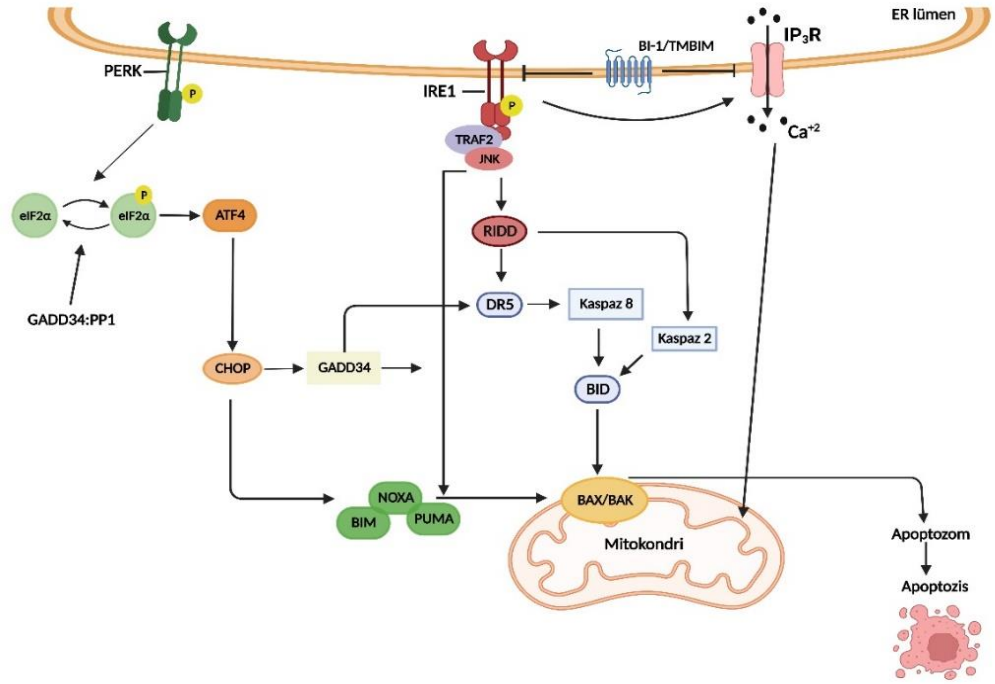
Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6): Tip 2 transmembran proteini olan ATF6, DNA bağlanma motifi içeren N uçlu sitoplazmik kısım ile BiP/GRP78 şaperonuna bağlanabilen C uçlu ER luminal kısma sahiptir. Memelilerde ATF6'nın ATF α (90 kDa) ve ATF β (110 kDa) olmak üzere iki tane homologunun var olduğu bilinmektedir (123). Hem ATF α hem de ATF β ER'da sürekli olarak

sentezlenmektedir ve KPY mekanizmasının devreye girmesinin akabinde aktivasyonları gerçekleşmektedir (124). ER stres durumunda, ATF6 proteini şaperon proteininin yapısından ayrılması sonrasında COPII vezikülleri aracılığıyla ER'dan golgi organeline taşınmaktadır ve burada *site-1 protease* (S1P) ve *site-2 protease* (S2P) enzimleri tarafından kesimi gerçekleşmektedir (125, 126). Kesim sonucunda DNA'ya bağlanabilen N uçlu sitozolik kısım içeren ve transkripsiyonel olarak aktif olan ATF6p50 fragmenti oluşmaktadır (116). ATF6p50 daha sonra hücre çekirdeğine transloke olur ve burada protein katlanması, protein transportu ve ERAD mekanizmasında görevli genlerin ekspresyonunu indükleyerek ER'da protein homeostazisinin sağlanması için yardıma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, ATF6p50'nin sXBP1 ile birlikte aynı yollar üzerinde etkili olarak protein homeostazisini sağladıkları ve ayrıca ER organeli ile golgi organelinin biyogenezini düzenleyerek ER stres varlığında hücrelerin salınım kapasitesinin artışı da sağladıkları anlaşılmıştır (112) (Şekil 2.4.).

KPY sinyal yolağında yer alan tüm bu bileşenler ER stres koşulu altında hücre fonksiyonları ve ER homeostazinin devamlılığını sağlamaya çalışmaktadır. Fakat KPY'nin yetersiz kaldığı veya çalışmadığı durumlarda çok çeşitli yollar aracılığıyla hücrelerde hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yollar aktive edilmektedir (104) (Şekil 2.5.).

Aktive olan apoptotik yollarda BCL-2 ailesine ait pro-apoptotik proteinlerden BAX ve BAK'ın mitokondri organeline konformasyonel aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu aktivasyonun devamında ise apoptozom kompleksi oluşmakta ve programlı hücre ölümünde görevli olan kaspaz 3 aktive olmaktadır (112). BCL-2 ailesinin BH3-only grubunda yer alan BIM, PUMA, NOXA ve BID proteinlerinin de ER stres ile indüklenen apoptoziste önemli role sahip oldukları bilinmektedir (127, 128). KPY sinyal yolağının aktivasyonu sonucunda oluşan PERK-ATF4-CHOP-GADD34 yolağı aracılığıyla gerçekleşen eIF2 α defosforilasyonunun devamında translasyonel inhibisyon ortadan kalkmaktadır. Dolayısıyla hem hücrede var olan protein yükü artarak hem de apoptoziste görev alan pro-apoptotik proteinlerin yapımı sağlanarak apoptozis indüklenmektedir (104). ER stres aracılı indüklenen apoptoziste KPY'de yer alan IRE1 ayağının rolü de iyi bilinmektedir. Örneğin; IRE1 aracılığıyla aktive olan tümör nekrozis faktör reseptör ile ilişkili faktör 2 (TRAF2)'nin ASK1/JNK

kinaz kaskadını devreye geçirerek direkt olarak hücrede apoptozisin indüklendiği bilinmektedir. Ayrıca apoptoziste görev alan kaspaz 2'nin düzeyini negatif yönde kontrol eden mikroRNA'lar ile inflamazom aktivasyonu sonucunda indüklene apoptozisi inhibe etme özelliğine sahip miRNA'ların da RIDD aracılığıyla yıkıldığı bilinmektedir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. ER stres aracılı indüklene hücresel ölüm yolları (*BioRender.com* ile hazırlanmıştır).

Bunların yanı sıra uzun süreli ER stres koşulu altında IRE1 ile PERK ayakları dönüşümlü olarak çalışarak hücrelerde ölüm indüklenebilir. Örneğin; ER stresin oluştuğu ilk zamanda aktif olan RIDD mekanizması, CHOP proteini aracılığıyla ekspresyonu indüklene ölüm reseptörü 5 (DR5)'i kodlayan mRNA'nın yıkımını gerçekleştirmektedir. Tümör nekrozis faktör ailesine ait olan kaspaz aktive edici hücre yüzey ölüm reseptörü olan DR5 ise apoptoziste görevli olan kaspaz 8'in aktivasyonundan sorumludur. Dolayısıyla DR5, RIDD tarafından yıkıldığı durumda hücrede ölüm inhibe edilmektedir. Fakat uzun süreli ER stres koşulu altında RIDD mekanizmasının aktivasyonu baskılanarak DR5 ekspresyonu artmaktadır ve hücrede apoptozis indüklenebilir. Ayrıca apoptozisin KPY'de görevli ayaklar haricinde, ER organelinden mitokondri organeline doğru inositol trifosfat reseptörü (IP₃R)

aracılığıyla gerçekleşen aşırı Ca^{+2} salınımı ile de indüklenemediği bilinmektedir. Çünkü mitokondri organeline Ca^{+2} alımı ile hücrelerden apoptozom oluşumu için gerekli olan sitokrom c salınımında artış gerçekleşmektedir. ER membranında yer alan hücre ölüm düzenleyicilerinden TMBIM ve BAX inhibitörü 1 ise IP_3R aracılığıyla gerçekleşen Ca^{+2} salınımını engelleyerek ER stres aracılı indüklenen apoptozisi inhibe etmektedir (104, 112) (Şekil 2.5.).

2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Kanser

Tümör mikroçevresinde var olan zayıf vaskülarizasyon, oksijen azlığı, besin yetersizliği veya fazlalığı, intrasellüler reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ve düşük pH gibi çok çeşitli faktörler ER'in protein katlama kapasitesini bozarak kanser hücrelerinde ER stres oluşumuna yol açmaktadır (104, 129). Protein sentezi sırasında disülfit bağ oluşum reaksiyonu oksijenden bağımsız bir şekilde gerçekleşirken, posttranslasyonel katlanma sırasında bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için oksijene ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla oksijenden yoksun olan kanser hücrelerinde posttranslasyonel disülfit bağ oluşumunun gerçekleşememesi sonucunda katlanmamış proteinler ER lümeninde birikerek hipoksi kaynaklı ER stres indüklenmektedir (130). Ayrıca oksijen lipid desatürasyon reaksiyonu sırasında da oldukça büyük öneme sahiptir. Kanser hücrelerinde var olan bu hipoksik koşul ile birlikte lipid desatürasyonunda azalma meydana gelmektedir. Bu azalma sonrasında ise hücrede oluşan stresin yükünü azaltmak için gerekli olan ER organelinin genişleme reaksiyonunda bir sınırlama gerçekleşerek kanser hücresinde yine hipoksi kaynaklı ER stres indüklenmektedir (131).

Besin kaynağında meydana gelen azlık veya aşırılık kaynaklı olarak meydana gelen metabolik stres, kanser hücrelerinde ER homeostazisinin bozulmasına yol açmaktadır. Örneğin; glukoz ve glutamin varlığının birçok açıdan ER stres ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Glukoz veya glutamin eksikliğini sonucunda ER'da proteinlerin katlanması ve glukozilasyonu için gerekli olan üridin difosfat N-asetilglukozamin sentezinin gerçekleştiği heksozamin biyosentetik yolağının inhibisyonunun meydana geldiği bilinmektedir (132, 133). Ayrıca glukoz azlığı protein katlanması sırasında enerji ve fosfat kaynağı olarak gerekli olan ATP üretimini de etkilemektedir (134). Besin azlığının yanı sıra örneğin yüksek kanser riski ile ilişkili olduğu bilinen obezite

durumunda palmitat ve stearat gibi doymuş uzun zincirli yağ asitlerinin fazlalığı ile ER membran boyutunda, bileşenlerinde ve akışkanlığında bozulma gerçekleşmektedir. Bu bozulmalar sonucunda ise ER'nin protein glikolizasyon fonksiyonunda bozulma meydana gelerek hücrelerde ER stres indüklenmektedir (135, 136).

Proteinlerin ER'da doğru bir şekilde katlanabilmeleri için organelin redox durumu da oldukça etkili bir faktördür. Örneğin; glutamin azlığında ortamda oluşan ROS'ların eliminasyonunda görevli olan glutatyon üretimi gerçekleşmemektedir ve ROS'ların ER lümeninde birikimi sonucunda da hücrelerde ER stres meydana gelmektedir (137). Ayrıca elektron transport zincir reaksiyonunun yan ürünü olarak da mitokondri iç membranında yüksek miktarda ROS birikimi gerçekleşmektedir (138). Bu yüksek miktar intrasellüler ROS birikimi ER'da var olan kalsiyum kanallarının bozulmasında yol açarak protein katlanmasını engelleyebileceği gibi ER'da bulunan şaperon proteinlere bağlanabilen lipid peroksidasyon yan ürünlerinin oluşumuna neden olarak ER stresi indüklemektedir (139-141). Kanser hücreleri majör metabolik yolak olarak aerobik glikolizi kullanmaktadır ve dolayısıyla bu glikoliz reaksiyonu sonucunda oluşan laktik asit tümör mikroçevrenin pH'ını düşürmektedir. Oluşan bu asidik ortamın ise intrasellüler kalsiyum homeostazisini bozarak ve/veya aşırı ROS üretimine yol açarak ER strese yol açtığı bilinmektedir (129).

Kanser hücreleri bu çok çeşitli faktörler aracılığıyla oluşan katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmesi sonucunda oluşan stres ile baş edebilmek ve kontrolsüz bir şekilde çoğalabilmeleri için bu var olan mikroçevreye adaptasyon amacıyla ERAD mekanizması ile KPY sinyal yolağını sürekli olarak aktive ederken apoptozu inhibe etmektedir (142). KPY'de yer alan proteinlerden IRE1 α ile PERK'ün hipoksik koşullar altında kanser hücrelerinin sağ kalımı ve büyümesi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, PERK ekspresyonunun olmadığı transforme edilmiş fare embriyonik fibroblastlardan (MEF) elde edilen tümörlerde, hücre ölüm hızında artış gözlenirken anjiyogenez yapımında bozukluk fark edilmiştir. PERK/eIF2 α aracılığıyla düzenlenen KPY sinyal yolağının önemi fosforile olmamış eIF2 α eksprese eden MEF'lerde yapılan bir başka çalışma sonucunda aşırı hipoksik koşul altında hücre sağ kalımındaki bozukluğun gözlenmesi ile daha iyi anlaşılmıştır (143). İnsan tümör ksenograft modelinde yapılan bir çalışmada ise dominant negatif IRE1 α 'in ekspresyonu veya XBP1'in kesiminin

inhibisyonu sonucunda damar oluşumunda azalma gözlenmesi doğrultusunda da IRE1 α /XBP1 yolağının tümör gelişiminin erken evresinde anjiyogenezdeki rolü anlaşılmıştır (144). Yapılan bir başka çalışmada ise kanser hücrelerinin P58^{IPK}'nin ekspresyonunu indüklediği ve böylece PERK yolağının aktivasyonu sonucunda eksprese edilen ve apoptozda görevli olduğu bilinen CHOP proteinini ekspresyonunu baskılayarak apoptozdan kaçtığı anlaşılmıştır (145). ATF6'nın ise memeli/rapamisin moleküler hedefi (mTOR) sinyal yolağı aracılığıyla kanser hücrelerine sağ kalım ve dormansi halinde dirençlilik kazandırdığı bilinmektedir (123). Tüm bu bilgiler ışığında kanser hücrelerinin ERAD mekanizması ile KPY sinyal yolağını kendi yararına kullandığı anlaşılmaktadır. Bu durum ERAD mekanizması ile KPY sinyal yolağının kanser tedavisinde hedefe yönelik geliştirilen yeni yaklaşımlar açısından etkili bir alan olabileceğini göstermektedir.

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Pankreas Kanseri

Pankreas organında ekzokrin pankreası oluşturan duktal hücreler ile asinar hücreler tarafından çok miktarda protein sentezi gerçekleşmektedir. Dolayısıyla pankreas organında gelişmiş bir ER sistemine ve bu sistemin iyi bir şekilde düzenlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Pankreas hücreleri, var olan yüksek miktar protein sentezi kaynaklı olarak katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikimi sonucunda oluşabilecek olası ER stresin engellenebilmesi için ERAD ve bazal düzeyde KPY mekanizmasını aktive etmektedir(146).

Pankreas kanserinde ise hem tümör mikroçevresinde bulunan çeşitli faktörlerden dolayı hem de kontrolsüz büyüme kaynaklı olarak hücreler tarafından çok miktarda protein sentezi gerçekleşmektedir. Bu aşırı protein sentezi sonucunda oluşan katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikimini engellemek, protein ve hücre homeostazisini sağlamak, hücre ölümünden kaçmak ve canlılığının devamlılığını sağlamak amacıyla pankreas kanseri hücreleri çok daha yoğun bir şekilde ERAD ve KPY mekanizmasını kullanmaktadırlar. Dolayısıyla sağlıklı pankreas hücrelerine kıyasla pankreas kanseri hücrelerinin ERAD ve KPY mekanizmasına daha fazla bağlı oldukları bilinmektedir. Ayrıca yapılan birçok çalışma sonucunda pankreas kanserinde çeşitli stres faktörleri aracılığıyla ER lümeninde

katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sonrasında indüklenen ERAD ile KPY mekanizmasının kanserin seyrini etkilediği de anlaşılmıştır (147).

Örneğin; PERK inhibitörü kullanılarak yapılan bir çalışma sonucunda PERK inhibisyonu ile PDAC hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve pankreas kanseri ksenograft modellerinde tümör boyutunun azaldığı gözlenmiştir. Yapılan bir başka çalışma sonucunda PERK aktivitesinin PDAC tümörlerinin karaciğere metastazı ile ilişkili olduğu da anlaşılmıştır (148). IRE1 ile ilgili yapılan çalışmalar doğrultusunda, IRE1 aracılığıyla indüklenen sinyal yolağının PDAC hücrelerinin proliferasyon kapasitesini düzenlediği anlaşılmıştır. Örneğin, 14 tane PDAC hücre hattı paneli ile yapılan bir çalışmada IRE1'in RNaz aktivitesinin bir inhibitör molekül aracılığıyla baskılanması doğrultusunda hücrelerin proliferasyon kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise IRE1 inhibitör molekülünün otofaji inhibitörü olarak bilinen klorokin molekülü ile kombinasyonu sonucunda PDAC hücrelerinin büyümesi üzerinde aditif bir etkinin meydana geldiği tespit edilmiştir (146). ATF6 ile ilgili çalışmalar genellikle ARG2 üzerinden ilerlemektedir. ARG2, ER'da bulunan proteinlerden protein disülfit izomeraz aile üyelerinden biridir ve birçok proteinin matürasyonu ile sekresyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Sağlıklı dokularda ARG2 ekspresyon düzeyi düşük seyirde ilerlerken, bu proteinin ekspresyon düzeyinin ER stres doğrultusunda aktif hale gelen ATF6 ve IRE1 sinyal yolları aracılığıyla indüklendiği de bilinmektedir (146, 148).

ER stresin ayrıca pankreatik asinar hücreli karsinomda da önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Yoğun bir protein sentezinden ve sentezlenen proteinlerin işlenmesinden sorumlu oldukları bilinen asinar hücreler ER bakımından oldukça zengindir. Dolayısıyla bu durum asinar hücreleri ER stres ve KPY mekanizmasının aktivasyonu açısından oldukça hassas kılmaktadır. Örneğin; asinar hücrelerde KPY mekanizmasında görev alan bileşenlerin genetik ablasyonu sonucunda KPY'nin hücre ölümü ve hücresel fonksiyon üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Aynı şekilde XBP1 gen ekspresyonunun inhibe edildiği hayvan modelinde yapılan çalışma sonucunda asinar hücrelerde apoptozun indüklendiği gözlenmiştir. Fare asinar hücreleri ile yapılan bir çalışma doğrultusunda PERK'ün de asinar hücre sağkalımı üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır (148).

ERAD mekanizmasının pankreas kanserindeki rolü çok iyi bilinmemektedir. Fakat Lin-12 homolog 1 benzeri baskılayıcı/hızlandırıcı (SEL1L) protein ile yapılan çalışmalar ERAD'ın pankreas kanserinde önemli role sahip olabileceği yönünde bilgi vermektedir. SEL1L, E3 ubiquitin ligazlardan biri olan HRD1'in stabilizasyonu ve HRD1'e substrat moleküllerinin transferinden sorumludur. Dolayısıyla SEL1L, ERAD substrat moleküllerinin ortama çağırılması, retrotranslokasyonu ve ubiquitinasyonunda önemli role sahip bir proteindir (149). Pankreas kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada, yüksek miktarda SEL1L ekspresyonunun KPY mekanizmasında yer alan proteinlerin aksine, PTEN'i indükleyerek hem hücre döngüsünün G1 fazında durmasına hem de hücre-matriks etkileşimlerinde görevli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücre invazyonunun azalmasına yol açtığı gözlenmiştir (150, 151). Tüm bu bilgiler doğrultusunda ERAD ve KPY mekanizmasının pankreas kanserinde önemli role sahip olduğu anlaşılmaktadır ve bu mekanizmaların pankreas kanseri tedavisinde hedef alınabilecek etkili noktalar olabileceği anlaşılmaktadır.

2.5. İnhibitör Molekül Kullanımı

KPY ve ERAD'ın kanser üzerindeki anti-apoptotik rollerini ortadan kaldırmak amacıyla inhibitör moleküller kullanılmaktadır ve böylece ER stresin derecesi ile süresi artırılarak hücrelerin apoptozdan kaçması engellenebilmektedir. Bu amaç doğrultusunda kullanılan PERK, IRE1 α ve şaperon inhibitör moleküllerinin yanı sıra ERAD mekanizmasının son aşamasında bulunan ubiquitin-proteozom yolağını hedef alan proteozom inhibitörleri de kanser hücrelerinde ER stres aracılı apoptozun indüklenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

2.5.1. Kanser Tedavisinde Proteozom İnhibitörlerinin Rolü

İntrasellüler proteinlerin stabilitesinin ve doğru bir şekilde yıkımlarının gerçekleşmesi sağlıklı bir hücrenin fonksiyonlarının devamlılığı için büyük önem taşımaktadır. Çoklu proteazların bir arada bulunduğu proteozom, hem katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinlerin hem de seçici bir şekilde önemli düzenleyici proteinlerin yıkımını gerçekleştirmektedir (152, 153). Proteozom tarafından seçici olarak yıkımı gerçekleşen proteinlerin büyük bir çoğunluğunu siklinler, siklin bağımlı kinaz inhibitörler (ör; p27), tümör baskılayıcılar (ör; p53), pro-apoptotik proteinler (ör; Bax) ve transkripsiyon faktörleri (ör; NF-kB inhibitörü I κ B) oluşturmaktadır (22).

Bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, hücre proliferasyonu, apoptoz ve anjiyogenez gibi önemli hücresel fonksiyonlarda görev alan genlerin ekspresyonunu indüklemektedir ve genellikle tümör tetikleyici etkisinin olduğu bilinmektedir. NF- κ B normal koşullar altında sitoplazmada I κ B kinaz tarafından stabilizasyonu sağlanarak inaktif halde bulunmaktadır. Çeşitli uyaranlar sonucunda I κ B kinaz tarafından yapısına fosfat grubunun eklenmesi ile aktif hale gelen I κ B ubiquitin-proteozom sistemi tarafından yıkıma uğramaktadır. I κ B'nin yıkımı ile aktif hale gelen NF- κ B transkripsiyon faktörü ise çekirdeğe geçerek burada ilgili genlerin ekspresyonunu indüklemektedir (154). Proteozom sisteminin inhibe edildiği durumda ise NF- κ B tarafından özellikle hücre canlılığının devamlılığı ve progresyonunda rolü olan genlerin ekspresyonu indüklenmemektedir ve böylece anti-tümörojenik bir etki oluşmaktadır. Bunlara ek olarak, normal şartlarda proteozom tarafından eliminasyonu gerçekleşen pro-apoptotik Bim, Bid ve Bik proteinleri proteozom kompleksinin inhibe edilmesi sonucunda stabilize olmaktadır. Bu stabilizasyonun akabinde önce pro-apoptotik efektör proteinlerden Bax ve Bak'ın daha sonra apoptozda görevli kaspazların aktivasyonu gerçekleşerek hücre ölümü indüklenmektedir (155). Normal şartlarda proteozom tarafından tümör baskılayıcı p53'ün de yıkımı gerçekleşmektedir. Proteozom mekanizmasının inhibe edilmesinin akabinde bu proteinin fosforilasyonu ve hücre içinde birikimi meydana gelirken, siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden p21 ile p27'nin stabilizasyonu sonucunda da hücre döngüsünün durması ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu gerçekleşmektedir (156).

Proteozomun hücre döngüsü, apoptoz, hücresel olayların devamlılığı için gerekli olan protein homeostazisi ve tümörögenizde var olan bu önemli rollerinden dolayı, proteozomun aktivitesini hedef almak amacıyla çeşitli proteozom inhibitörleri geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Proteozom inhibitörlerinin kullanılmaya başlanıldığı ilk zamanlarda araştırmacılar proteozomun sadece kanser hücreleri üzerinde değil aynı zamanda normal hücreler üzerinde de var olan önemli rollerini ve ayrıca proteozomun tamamen inhibe edilmesinin de toksik bir etki yaratacağını bildikleri için proteozom inhibitörlerinin kullanımının ne kadar doğru veya faydalı olacağı yönünde şüpheye düşmüşlerdir. Fakat yapılan çalışmalar sonucunda proteozom inhibisyonu ile elde edilen anti-proliferatif etkinin kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Bu durumun

sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümeleri için sağlıklı hücrelere kıyasla çok daha fazla miktarda protein sentezine ve bu sentezlenen proteinlerin düzenlenmesine ihtiyaç duydukları bilinmektedir. Buna ek olarak, kanser hücrelerinde düzenleyici mekanizmalar doğru bir şekilde çalışmadığı için çok miktarda katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış protein birikimi gerçekleşmektedir ve bu durum sağlıklı hücrelere kıyasla, kanser hücrelerini proteozom mekanizmasına karşı oldukça hassas kılmaktadır (153). Ayrıca üretilen proteozom inhibitörleri oldukça hedefe yönelik geliştirilerek olası hedef dışı inhibisyonun da önüne geçilmeye çalışılmaktadır.

Proteozomlar yapılarında proteolitik enzim sınıfından treonin proteazları bulundurmaktadır. Proteozomlarda bulunan tüm proteolitik bölgeler diğer proteaz enzimlerin aksine aktif bölge nükleofilleri olarak β alt birimlerin N ucunda bulunan treonin hidroksil grubunu kullanmaktadır. 26S proteozomun yapısında çeşitli enzimatik aktiviteye sahip bölgeler olmasına rağmen, geliştirilen küçük molekül inhibitörler proteozomun proteolitik aktiviteye sahip 20S proteozomunu hedef alacak şekilde geliştirilmiştir (157). Enzim spesifik proteaz inhibitörler, genellikle az miktarda peptidin bir araya geldiği ve bu peptitlerin C uçtan farmakofor ile bağlandıkları bir yapıya sahiptir. İnhibitör moleküller yapılarında bulundurdukları farmakofor ile proteozomların katalitik rezidüsünün N ucunda bulunan treonin hidroksil grubu ile tersinir veya tersinmez bir şekilde kovalent bağ oluştururken, inhibitör molekül yapısındaki peptit kısmı kullanarak enzimin aktif bölgesinde bulunan substrat bağlanma bölgesine yerleşir ve bağ oluşturarak enzimin inhibisyonuna yol açmaktadır. Proteozomun β alt birimde yer alan her bir enzimin polipeptit zincirinde kesim yaptıkları kısım farklılık göstermekle birlikte bu kısımlar diğer proteazlar ile benzerlik gösterebilmektedir. Dolayısıyla araştırmacılar yüksek spesifisiteye sahip proteozom inhibitör molekül geliştirilmesi sırasında β alt birimin kesim yaptığı peptit bölgesini göz önünde bulundurmak yerine proteozomun N ucunda bulunan treonin hidroksil grubunu hedef alabilen farmakofor yapı bulundurmasına dikkat etmektedirler (152).

Proteozom inhibitörleri, kimyasal yapılarına bağlı olarak sentetik analoglar ve doğal bileşikler olarak sınıflandırılmaktadır. Sentetik inhibitörler, bileşiğin peptit kısmına bağlı olan farmakofor gruba bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu

farmakofor grup; aldehit, boronat, vinilsülfon, epoksiketon, benzamid, α -ketoamid veya α -ketoaldehit olabilmektedir. Araştırmacılar tarafından geliştirilen ilk proteozom inhibitörleri, sentez ve optimizasyon sırasındaki kolaylık dolayısıyla peptit aldehit inhibitörleri olmuştur. Zaman içerisinde çok çeşitli peptit aldehitler geliştirilmesine rağmen (ör; CEP1612, MG115, MG132) bu inhibitörlerin gösterdikleri etkinin azlığı ve 20S proteozomun $\beta 5$ alt birimi haricinde serin ve sistein proteazlara karşı var olan aktivitelerinden dolayı diğer inhibitör sınıfları geliştirilmiştir (158).

Peptit aldehitlere kıyasla, peptit boronat inhibitörlerin sadece serin proteazlara karşı daha etkili ve seçici bir şekilde aktivitelerini gerçekleştirdikleri bilinmektedir (158). Boronat inhibitörler de peptit aldehitler gibi enzimin aktif bölgesinin N ucunda bulunan treoninin hidroksil grubu ile tersinir kovalent bir bağ oluşturmaktadır. Boron atomu ile treonin hidroksil grubu arasında oluşan etkileşim sonucunda durağan yapıda tetrahedral boron kompleksi oluşmaktadır ve bu kompleks peptit aldehitlere kıyasla çok daha uzun süre sabit kalmaktadır. Bu oluşan durağan yapıyı tetrahedral boron kompleksi öncelikle inhibitörün yapısında bulunan boronik asidin peptit zincir uzunluğunu keserek kısaltmaktadır ve böylece hücre membranından daha kolay geçebilen ve tersinir olarak enzime bağlanmasına rağmen daha yavaş bir şekilde ayrılabilen dipeptidil veya tripeptidil boronik asit yapıları oluşmaktadır. Tüm bu özelliklerden dolayı peptit boronatlar peptit aldehitlere kıyasla tedavi amaçlı geliştirilen proteozom inhibitörü olarak daha iyi aday olmaktadır (152, 159).

Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI)'nde altmış insan kanser hücre hattı üzerinde on üç adet boron içeren bileşiğin antikanser etkisi incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda bu bileşiklerden küçük moleküler ağırlığa sahip, suda çözünebilen, oldukça etkili ve birçok kanser hücre hattına karşı aktiviteye sahip bileşiğin dipeptit boronik asit olan bortezomib olduğu anlaşılmıştır. Bortezomib (Velcade, PS341)'in yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda birçok solid ve hematolojik tümör türlerine karşı güçlü aktivite gösterdiğinin anlaşılmasından sonra bu bileşik faz 1 çalışmalarında tek başına veya kemoterapötikler ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır (153). Faz 1 çalışmalarından elde edilen iyi sonuçlardan sonra faz 2 çalışmaları sırasında multiple miyelom (MM) hastalarından elde edilen hızlı cevap sonrasında bu bileşik Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2003 yılında MM hastalarının, 2006 yılında ise mantle hücreli lenfoma (MCL) hastalarının tedavisi için onay alarak klinikte kullanımı

onaylanan ilk proteozom inhibitörü olmuştur. Bu bileşik 2004 yılında da Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlar ile birlikte MM ve MCL hastalarının tedavisinde kullanım için onay almıştır (158).

İntravenöz enjeksiyon yolu ile uygulanabilen bortezomibin on dakika içerisinde hızlıca plazmadan dokulara doğru ilerleyebildiği, yarılanma ömrünün kırk saatten fazla olduğu ve adipoz doku ile beyin haricinde neredeyse tüm dokulara ulaşabildiği bilinmektedir. Bortezomib, birçok sitokrom P450 enzimi tarafından intrasellüler oksidatif deboronasyon reaksiyonu aracılığıyla metabolize edilmektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda bortezomibin aktivitesini en fazla 20S proteozomun $\beta 5$ alt birimine karşı gösterdiği ve daha az aktivite ile $\beta 1$ alt birimi üzerinde de etkili olduğu anlaşılmıştır. Farmakodinamik çalışmalar sonucunda ise bortezomibin $\beta 5$ ve $\beta 1$ alt birimlerine karşı gösterdiği inhibitör etkinin doz ile doğru orantılı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu oluşan inhibitör etkinin ilacın uygulanmasının ardından bir saat içerisinde yaklaşık olarak %75'ten fazla olduğu da gözlenmiştir. Elde edilen bu etkinin ilacın uygulanmasından yaklaşık yetmiş iki saat sonra ise ortadan kalktığı ve proteozomal aktivitenin geri kazanıldığı anlaşılmıştır (22).

Bortezomibin klinikte gösterdiği olumlu etkiler sonrasında yeni peptit boronat proteozom inhibitörleri de geliştirilmiştir. Bu inhibitör moleküllerden iksazomib, 2015 yılında FDA ve 2016 yılında EMA tarafından klinikte MM hastalarının tedavisi için lenalidomid ve deksametazon ile birlikte kullanımı için onay almıştır. Fakat yapılan çalışmalar doğrultusunda her ne kadar iksazomib inhibitör molekülünün bortezomibe benzer bir şekilde $\beta 5$ alt birimine karşı seçicilik ve etkiye sahip olduğu gözlenirse de, bu inhibitör molekülün yarılanma ömrünün çok daha kısa olduğu anlaşılmıştır (158).

Boronik asitler dışında geliştirilen ve hem FDA hem de EMA tarafında klinikte kullanım için onay alan bir diğer bileşik ise doğal proteozom inhibitörleri sınıfına ait olan karfilzomibtir. B16 fare melanom tedavisi geliştirmek amacıyla anti-tümöral etkiye sahip bir ajan üzerinde çalışan araştırmacılar, çalışmalarında *Streptomyces hygrosopicus* bakterisinden epoksiketon ve aktinomiset soyundan gelen Q996-17 bakterisinden epoksimisin doğal bileşiklerini elde etmişlerdir. Daha sonra yapılan araştırmalar sonucunda ise bu elde edilen doğal bileşiklerin 20S proteozomu inhibe ederek anti-tümöral bir etki yarattıkları anlaşılmıştır (160). Yapısında farmakofor

grubu olarak epoksiketon bulunduran karfilzomib, 2012 yılında FDA, 2015 yılında ise EMA tarafından tek başına veya deksametazon, deksametazon ile lenalidomid veya daratumumab ilacı ile birlikte MM hastalarının tedavisinde kullanım için onay almıştır. Karfilzomib de aynı bortezomib gibi proteozomun kimotripsin benzeri aktiviteye sahip β 5 alt biriminin N ucunda bulunan treonin hidroksil grubuna bağlanarak proteozomu inhibe etmektedir. Fakat bu bağlanma bortezomibin aksine tersinmez bir şekilde gerçekleşmektedir (158). Bu durum karfilzomib ile bortezomib ilaçları arasında hidrolitik stabilite açısından farklılık yaratmasına rağmen yapılan çalışmalar doğrultusunda hücrelerde proteozomal aktivitenin geri kazanımı açısından bu iki ilaç arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (161). Bu iki ilaç yarılanma ömrü açısından incelendiğinde, karfilzomib yaklaşık bir saatlik yarılanma ömrü ile hızlıca vücuttan atılırken bortezomibin kırk saatten fazla yarılanma ömrüne sahip olduğu bilinmektedir. Yan etki bakımından yapılan inceleme sonucunda ise karfilzomibin nörotoksisite açısından her ne kadar bortezomibe kıyasla daha az risk teşkil ettiği gözlenirse de, kardiyovasküler ve renal toksisite açısından oldukça yüksek risk ortaya koyduğu yapılan çalışmalar doğrultusunda anlaşılmaktadır (162-165). Bu durum MM hastalarının tedavisinde karfilzomibin kullanımını sınırlandırmaktadır ve bu ilacın klinikte kullanımını açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu da ortaya koymaktadır.

2.5.2. Pankreas Kanseri Proteozom İnhibitörlerinin Rolü

Proteozom inhibitörlerinin özellikle yüksek salınım kapasitesine sahip olan ve dolayısıyla proteostatik mekanizmaya oldukça bağlı bir şekilde çalışan hematolojik kanserlerin tedavisinde etkili oldukları iyi bilinmekle birlikte solid tümörler üzerindeki etkileri araştırılmaya devam edilmektedir.

Pankreas kanseri hastalarının yaklaşık olarak yüzde doksanında kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinen KRAS mutasyonu bulunmaktadır. KRAS mutasyonunun pankreas kanserinde hücre canlılığının devamlılığında rolü olan TNF reseptör aile üyesi TRAF6 ekspresyon düzeyinde artışa yol açtığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışma sonucunda, pankreas kanseri hücrelerinin proteozom inhibitörleri ve radyasyon ile muamelesi sonrasında TRAF6 ekspresyon düzeyinde azalma gözlenirken, otofaji ve sitotoksisite düzeyinde artış gözlenmiştir. Proteozom inhibitörlerinden bortezomib ile

yapılan bir çalışmada, otofaji inhibitörlerinin kullanıldığı koşulda bortezomibin otofaji yerine apoptotik hücre ölümü aracılığıyla pankreas kanseri hücrelerinde ölüme yol açtığı gözlenmiştir (166). Bir başka çalışmada ise proteozom inhibitörlerinden MG-132'nin tek başına ve bazı kemoterapötik ajanlar ile kombine bir şekilde pankreas kanseri hücre hatları üzerindeki etkisi incelendiğinde bu inhibitör molekülün kamptotesin ilacı ile kombinasyonunun hücrelerde apoptotik bir etki yarattığı gözlenmiştir. Bu etkinin nedeni araştırıldığında ise kombine muamele sonrasında hücrelerde anti-apoptotik proteinlerden Mcl-1'in ekspresyon düzeyinde azalma ve pro-apoptotik proteinlerden NOXA'nın ekspresyon düzeyinde de artma meydana geldiği anlaşılmıştır (167).

Proteozom inhibitörlerinin sitotoksik etkilerini ayrıca ER stres aracılı apoptoz ile de gerçekleştirebildikleri bilinmektedir. Proteozom inhibitörlerinin radyasyon tedavisi ile kombine bir şekilde uygulandığı bir çalışmada, artan IRE1 α ve JNK protein düzeyleri sonucunda pankreas kanserinde ER stres aracılı sitotoksik etki gözlenmiştir (168). Yapılan bir başka çalışmada ise bortezomibin bir taraftan ER stres ile ilişkili proteinlerden PERK'ün aktivasyonunu inhibe ettiği ve bu inhibisyona bağlı olarak eIF2 α fosforilasyonunu bloke ettiği gözlenirken diğer bir taraftan IRE1 üzerinden JNK aktivasyonunu sağlayarak L3.6pl pankreas kanser hücrelerinde hücre ölümünü hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda indüklediği ortaya konulmuştur (169). Fakat yapılan laboratuvar ve klinik çalışmalar sonucunda, kanser hücrelerinin zaman içerisinde bu inhibitör moleküllere karşı direnç geliştirdikleri ve ayrıca birçok çalışmada inhibitör moleküllerin tek başına kullanımı ile istenilen ER stres aracılı anti-apoptotik etkinin solid tümörlerde oluşturulamadığı anlaşılmaktadır. Dolayısıyla araştırmacılar pankreas kanserinde de zaman içerisinde inhibitör moleküle karşı gelişen direnci kırabilmek ve etkili bir hücre ölümü elde edebilmek için proteozom inhibitörlerinin çeşitli ajanlar ile kombine tedavileri üzerinde çalışmalarını sürdürmektedirler.

2.6. Tirozin Kinazlar

Kinaz ailesinde yer alan enzimler, ATP molekülünden kopartılan fosfat grubunun proteine transferini gerçekleştirirler. Kinazlar tarafından gerçekleşen bu transfer aracılığıyla, gen ekspresyonu, membran transportu, hücre büyümesi, metabolik yollar, farklılaşma ve hücre ölümü gibi büyük öneme sahip birçok

hücresel olayın düzenlendiği bilinmektedir (170, 171). İnsan genom sekanslaması ile elde edilen bilgiler doğrultusunda protein kinazların insan genomunun yaklaşık olarak %2'si tarafından kodlandığı da bilinmektedir (172). Kinazlar tanıdıkları ve fonksiyonlarını gerçekleştirdikleri substrat molekülüne bağlı olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Bu sınıflardan ilkini substrat molekülünde yer alan serin ve/veya treonin rezidüsüne fosfat grubunu transfer eden serin-treonin kinazlar oluştururken, substrat molekülünün tirozin rezidüsüne fosfat grubunu transfer eden protein tirozin kinazlar (PTK) da ikinci sınıfı oluşturmaktadır (171).

PTK'lar da kendi içinde iki aileye ayrılmaktadır. Bunlar reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve reseptör olmayan tirozin kinazlar (nRTK)'dir. RTK'ler yapısal olarak üç bölümden oluşmaktadırlar. Bu bölümleri, extrasellüler substrat bağlanma bölgesi, hücre membranına gömülü bölge ve yapısında ATP bağlanma bölgesi içeren intrasellüler katalitik kısım oluşturmaktadır (173). Substratın henüz tanınmadığı koşul altında RTK'ler monomerik ve inaktif bir şekilde bulunurlar. Substratın extrasellüler ligand bağlanma bölgesine bağlanmasının akabinde reseptör homo/heterodimerik yapıya geçerek konformasyonel değişime uğramaktadır ve bu değişim sonucunda substratta yer alan tirozin rezidüsüne fosfat grubunun transferi gerçekleşmektedir. Fosfat grubunun transferi sonrasında ise hücresel olayların düzenlenmesinde rol oynayan ilgili sinyal yollarının aktivasyonu gerçekleşmektedir (174). RTK'lerin aksine nRTK'ler, sitoplazmik enzimler oldukları için yapılarında ekstrasellüler substrat bağlanma bölgesi ile hücre membranına gömülü kısım bulundurmamaktadır. Fonksiyonel açıdan ise RTK'ler gibi substrat molekülüne fosfat grubunun transferinden sorumludurlar (173). Günümüzde insanlarda 58 tane RTK ve 30 tane nRTK bulunduğu bilinmektedir. Örneğin epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) ve c-Kit gibi çok çeşitli reseptörler RTK ailesinin üyeleridir. nRTK aile üyelerine ise c-SRC, fokal adezyon kinaz (FAK), kırılma noktası küme geni ile Abelson geninin füzyonu sonucunda oluşan Bcr-Abl proteini ve Janus kinaz (JAK) örnek verilebilmektedir (170).

PTK'lerde meydana gelen hasarlar sonucunda ise bu önemli hücresel mekanizmaların düzenlenmesinde rol alan sinyal yollarının kontrolsüz bir şekilde

çalışmasından dolayı kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimine yol açtığı yapılan birçok çalışma doğrultusunda bilinmektedir. Bu durum kinazları kanser tedavisinde hedef noktası haline getirmiştir (175).

2.6.1 Tirozin Kinaz ve Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Kanserdeki Rolü

Araştırmacılar tarafında protein tirozin kinazların hücrel mekanizmalarını anlamaya yönelik yapılan birçok çalışma sonucunda elde edilen bulgular, tirozin kinazların kanser gelişimi üzerindeki rolünün bu enzimlerde meydana gelen çeşitli mutasyonlar kaynaklı olduğunu ortaya koymaktadır (176). Örneğin tirozin kinazlarda meydana gelen gen amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonları sonucunda artan kinaz aktivitesi sonucunda ilgili sinyal yolağının normalden daha fazla çalışmasına yol açıldığı bilinmektedir. Füzyon proteinlerinde meydana gelen kromozomal translokasyonlardan, kinazların ekstrasellüler kısmında meydana gelen fonksiyon kazanım mutasyonlarından veya delesyonlardan kaynaklı olarak da kinaz aktivitesinin sürekli olarak devam etmesinin tetiklendiği anlaşılmıştır. Bunların yanı sıra reseptör tarafından tanınan substrat moleküllerinin ortamda aşırı miktarda bulunmaları sonucunda reseptörün sürekli olarak aktif kalmasına ve dolayısıyla ilgili sinyal yollarının normalden daha fazla çalışmasına yol açıldığı da yapılan çalışmalar sonucunda gözlenmiştir (177).

ErbB protein ailesinin üyesi olan EGFR, tirozin kinaz aktiviteye sahip bir transmembran glikoproteindir ve bu enzimin aktivasyonu ile birlikte RAS, RAF, MEK, ERK, PI3K, AKT, mTOR ve STAT sinyal yollarının düzenlendiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, akciğer kanserli hastalarda EGFR'da hassasiyet oluşmasına neden olan mutasyonlardan exon 19 delesyonu ve exon 21 substitüsyonunun meydana geldiği anlaşılmıştır (178). Ayrıca EGFR'ın aşırı ekspresyonunun yumurtalık, baş ve boyun, meme, kolorektal ve mide kanseri gibi çok çeşitli kanser türünde hastalığın kötü seyri ile ilişkili olduğu da iyi bilinmektedir. Tümör anjiyogenezinde önemli role sahip olan VEGF'ın ilgili reseptörüne bağlanması sonucunda da çeşitli kanserlerin oluşumu tetiklenmektedir. Örneğin VEGFR-1'in bağlanması ile aktive olan reseptörün ekspresyonu meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilirken, VEGFR-3'ün ekspresyonunun akciğer ve kolorektal kanserde kötü prognoza yol açtığı bilinmektedir (177). Çoklu fonksiyonlara sahip polipeptitlerin

oluşturduğu PDGF ailesi hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve anjiyogenezde önemli etkilere sahiptir. PDGFR da yeni kan damarlarının olgunlaşmasına ve VEGF ekspresyonunda artışa yol açarak anjiyogenezde önemli role sahiptir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda gastrointestinal stromal tümörlerde (GIST), PDGFR ekspresyon düzeyinde artış gözlenmiştir (178). Bir proto-onkogen olan c-Kit tirozin kinazında meydana gelen mutasyonun ise GIST hastalarının hayatta kalma süresinde azalmaya yol açarken, akut miyeloid lösemi de hastalığın tekrar etme hızında artışa ve küçük hücreli akciğer kanserinde hastalığın kötü bir şekilde ilerlemesine neden olduğu da bilinmektedir. Kronik miyeloid lösemi (KML) ve akut lenfoblastik lösemide ise Bcr-Abl füzyon proteininin ekspresyonu hastalığın teşhisinde önemli role sahiptir (177).

Tirozin kinazların, tümör oluşumunda önemli rollere sahip olan sinyal yolları üzerindeki etkilerinden dolayı anti-tümörojenik etkinin yakalanabilmesi amacıyla çok çeşitli tirozin kinaz inhibitör (TKI) molekülleri geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Ayrıca TKI'lar hedefe yönelik olarak geliştirildikleri için kanser tedavisinde kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinin aksine daha spesifik bir etkiye sahip oldukları da bilinmektedir (179). Geliştirilen TKI moleküllerinin birçoğu tirozin kinazların intrasellüler katalitik bölgesine bağlanmaktadır ve böylece normal şartlarda bu bölgeye ATP'nin bağlanmasının akabinde gerçekleşen fosforilasyon reaksiyonu ile ilgili sinyal yollarının aktivasyonunun inhibisyonu sağlanmaktadır. Hedeflenen inhibisyon aracılığıyla da hücre fonksiyonlarında bozulma sağlanarak tümör gelişiminin önüne geçilmektedir (177). Bunların yanı sıra yapılan çalışmalar doğrultusunda, TKI'ların kanser hücrelerinin anti-kanser ilaçlara karşı geliştirdiği ilaç direncini de kırabildiği anlaşılmaktadır. TKI'ların bu etkisinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte elde edilen bulgular sonucunda olası bazı yollar bulunmaktadır. Örneğin TKI'ların tirozin kinazlar haricinde hücre membranında küçük moleküllerin transportundan sorumlu olan ABC taşıyıcılarının da yapısında var olan ATP bağlanma bölgesine bağlanarak anti-kanser ilaçların hücre içinden transferini engelleyebildiği ve hücre içinde birikimlerini sağlayarak hücreleri bu ilaçlara karşı daha hassas bir hale getirdikleri bilinmektedir. Bununla birlikte TKI'ların PI3K/Akt ve/veya Raf/MEK/ERK sinyal yollarını inhibe ederek ABC taşıyıcıların hücre membranındaki tekrar eden lokalizasyon ve ekspresyonunu etkileyebilecekleri

de düşünölmektedir (173). Örneğin, mide kanseri hücre hattı SGC7901/DDP ile yapılan çalışma sonucunda bir TKI olan sorafenib uygulaması sonrasında ABC taşıyıcıların kodlanmasından sorumlu olan ABCB1 geni ile p-Akt ve p-ERK genlerinin ekspresyonunda anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir (180).

Geliştirilen TKI'lar temel olarak iki başlık altında toplanabilmektedir. Bunlar, monoklonal antikörler (mAb) ve küçük molekül inhibitörlerdir (SMI). Yapısında suda çözünebilen moleküller bulunduran mAb'ler substrat ve/veya hücre membranında eksprese olan reseptörlere bağlanmaktadır (171). mAb'ler genellikle büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak anti-tümörojenik etkilerini ortaya koyarlar. Örneğin bir antiEGFR mAb olan cetuximab, EGFR'a substratın bağlanmasını ve dolayısıyla reseptörün dimerizasyonunu engelleyerek tümör hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. Bir tirozin kinaz reseptörü olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'yi hedef alan mAb transtuzumab da klinikte meme kanserli hastaların tedavisinde kullanılmaktadır (181). VEGFR'a yönelik geliştirilen bevacizumab ise reseptöre substratın bağlanmasını engelleyerek anjiyogenez ve vaskülarizasyon için gerekli olan sinyal yolağının inhibisyonuna yol açarak anti-tümörojenik bir etki yaratmaktadır (171). Antikör tedavisinden elde edilen sonuçlar her ne kadar umut vaad etsede kanser hücrelerinin mAb'lere karşı geliştirdikleri dirençten dolayı mAb'lerin çalışma mekanizması ile bu inhibitör moleküllere karşı gelişen direnç mekanizmasının altında yatan sebeplerin bulunması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

mAb'lere kıyasla daha büyük moleküler ağırlığa sahip olan SMI'lar hastalıkların tedavisi için birçok yönden daha avantajlı durumdadır. Örneğin daha küçük yapıları sayesinde SMI'lar hücre membranından kolaylıkla geçip hedeflenen moleküle ulaşabilmektedir. Ayrıca genellikle intravenöz yol ile uygulanabilen mAb'lere kıyasla SMI'lar oral olarak uygulanabildikleri için bu moleküllerin hasta tarafından kullanımları da daha kolay olmaktadır (182, 183). İmatinib, klinikte kanser hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafında onay alan ilk tirozin kinaz hedefli SMI'dır. Bir ilaç şirketi olan Ciba-Geigy tarafından PDGFR'lara yönelik geliştirilen TKI molekülünün PDGFR'lardan ziyade aktivitesini çok daha güçlü bir şekilde nRTK olan Bcr-Abl'e yönelik ortaya koyduğu gözlenmiştir ve bu gözlem imatinibin keşfi ile sonuçlanmıştır (172). Bilindiği üzere KML'de 9. kromozom ile 22. kromozomun uzun kolları arasında gerçekleşen yer değiştirme sonucunda normalde

var olmayan “*Philadelphia kromozomu*” (Ph) bulunmaktadır. Ph kromozomunda, 22. kromozomun uzun kolunda bulunan Bcr geni ile 9. kromozomun uzun kolunda bulunan Abl genleri arasında bir bağlantı meydana gelmektedir ve sonuç olarak sürekli olarak aktif halde bulunan füzyon proteini olarak bilinen Bcr-Abl tirozin kinazını kodlayan gen ürünü oluşmaktadır. Bu bilgi doğrultusunda yapılan *in vitro*, *in vivo* ve faz çalışmaları sonucunda, imatinib 2001 yılında FDA tarafından Ph pozitif KML hastaların tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Günümüzde imatinib halen Ph pozitif KML hastalarının tedavisinde birinci basamak olarak kullanılmaktadır (172, 177). İmatinib ile ilgili devam eden çalışmaların sonucunda bu molekülün c-Kit ve PDGFR tirozin kinazlarını da hedef alabildiği anlaşılmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda imatinib, c-Kit ve PDGFR mutasyonlarının sıklıkla gözlemlendiği GIST hastalarının tedavisinde kullanılmıştır ve elde edilen başarılı sonuçlar ile de klinikte kullanım için onay almıştır (177, 178). İmatinib ile yapılan *in vitro* çalışma doğrultusunda, bu molekülün ayrıca bir başka ilaç ile kombinasyonu sayesinde kanser hücrelerinin ilaca karşı geliştirdikleri direncin kırılabilirdiği ve hücre ölümünün sağlanabildiği ortaya koyulmuştur (173). Ayrıca melanom tümör hücreleri ile yapılan bir çalışmada matriks aracılı gelişen ilaç direncinde görevli tirozin kinaz kolajen reseptörlerden DDR1 ve DDR2'nin imatinib tarafından hedef alınarak bloke edildikleri ve bunun akabinde kanser hücrelerinin kullanılan ilaca karşı geliştirdikleri direncin kırılabilirdiği de gösterilmiştir (184). İmatinib ile elde edilen sonuçların akabinde çok çeşitli tirozin kinaz hedefli SMI'lar geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Örneğin, gefitinib ile erlotinib ilaçları sırasıyla 2002 ve 2004 yılında FDA tarafından EGFR mutasyonu saptanan küçük hücreli akciğer kanserli bireylerin tedavisinde birinci basamakta kullanılmak üzere onay almıştır. VEGFR, PDGFR ve EGFR gibi çeşitli tirozin kinazları hedef alabilen sorafenib ise klinikte metastatik renal karsinom ve hepatosellüler kanser tedavisinde kullanılmaktadır (178).

2.6.2. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Pankreas Kanserindeki Rolü

Günümüze kadar her ne kadar pankreas kanserine yönelik çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmiş olsa da, pankreas kanseri hücrelerinin oldukça heterojenik yapısı ve hücrelerin uygulanan tedavi yöntemlerine karşı kısa sürede geliştirdikleri direnç kaynaklı olarak bu kanser hastalığına yönelik kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Fakat yıllar içinde yapılan çalışmalar sonucunda pankreas kanseri

hücrelerinin canlılıklarını devam ettirmek için kullandıkları bazı mekanizmalar belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde ise bu kanser türüne karşı etkili bir tedavi yöntemi geliştirilirken daha spesifik ve hedefe yönelik moleküllerin kullanımı ile pankreas kanseri hücrelerinin ölümden kaçmasının önüne geçilebileceği anlaşılmıştır. Ayrıca bu tür hedefe yönelik tedavi yaklaşımları sayesinde geleneksel kanser tedavisi uygulamalarında karşılaşılan bireyler arası tedaviye verilen yanıt farklılığının da önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, hedefe yönelik geliştirilen TKI'ların pankreas kanseri tedavisinde kullanım için oldukça uygun birer aday olduğu anlaşılmaktadır.

Tirozin kinazları hedef alan mAb'lerin pankreas kanserinde tedavi amaçlı kullanılıp kullanılmayacağı yönünde bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin mAb'lerden bevacizumab ve cetuximab ile yapılan bir çalışma sonucunda bu moleküllerin pankreas kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan gemitabin ve radyasyon ile birlikte verildiğinde her ne kadar hastalarda kötü bir yan etki profili oluşmasa da bu kombinasyonlar ile birlikte sağkalım açısından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (171). Günümüzde pankreas kanseri hastalığının tedavisinde kullanım için FDA tarafından onay almış bir tirozin kinaz hedefli mAb bulunmamaktadır. İmatinibin keşfinden sonra hızla geliştirilen ve günümüzde de birçok kanser hastalığının tedavisi amacıyla kullanılan tirozin kinaz hedefli SMI'lar pankreas kanserinde de çalışılmıştır. Bu tirozin kinaz hedefli SMI'lardan bazıları gemitabin ile birlikte hastalığın ilk aşamasından verilirken bazıları kanser hücreleri tarafından geliştirilen direnç sonrasında ikinci adımda uygulanmıştır. Örneğin yapılan randomize faz 3 çalışmasında, bir anti-EGFR SMI olan erlotinib tedavinin ilk aşamasında tek başına ve gemitabin ile birlikte hastalara verilerek bu molekülün etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda erlotinib ve gemitabin kombinasyonunun hastaların hayatta kalma süresinde ciddi bir artışa yol açmasa da anlamlı bir değişim yarattığının gözlenmesinin akabinde bu kombinasyon 2005 yılında FDA tarafında pankreas kanserli hastaların tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (171, 185). Fakat erlotinibin ikinci aşama tedavi olarak gemitabine direnç geliştiren hastalara uygulandığı durumda ilk aşama uygulama sonucunda elde edilen etki yakalanamamıştır (171). Ayrıca erlotinib ve gemitabin kombinasyonu her ne kadar pankreas kanseri tedavisinde olumlu etkilere sahip olsa da, erlotinibin hastaların

yaklaşık %55'inde diyareye yol açtığı da gözlenmiştir. Bu ilacın antitümörojenik çalışma mekanizmasını anlamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir (186).

Pankreas kanseri tedavisine yönelik imatinib ile yapılan çalışmalarda bulunmaktadır. Fakat bu moleküle ait bilgiler net değildir. Örneğin, imatinibin anti-proliferatif etkisini anlamaya yönelik yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda bu molekülün pankreas kanseri hücreleri üzerinde anlamlı bir etki yaratmadığı gözlenirken, bir başka çalışmada yüksek doz imatinibin uygulaması ile kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde inhibitör etkinin yakalanabildiği ortaya koyulmuştur (35, 187). Fakat bu çalışmada imatinibin hedef aldığı PDGFR, c-Kit veya Bcr-Abl tirozin kinazların ekspresyonu incelendiğinde, imatinib uygulaması sonrasında bu proteinlerin ekspresyon düzeyinde bir farklılık gözlenmemiştir ve sonuç olarak imatinibin yarattığı anti-proliferatif etkinin altında başka mekanizmalarında bulunduğu anlaşılmıştır (35). Ayrıca imatinibin gemsitabin tedavisi ile karşılaştırıldığı klinik bir çalışma sonucunda da imatinib ile tedavi edilen grubun verdiği cevabın yine tirozin kinazlardan bağımsız bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir (185). KPY'de yer alan proteinlerden IRE1 α 'nın DNA hasarı varlığında kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda, IRE1 α 'nın endoribonükleaz aktivitesi aracılığıyla RIDD'i aktive ettiği ve bu aktivasyon ile birlikte pro-apoptotik mRNA'ların yıkımının inhibe edilerek kanser hücrelerinin ölümden kaçabildiği anlaşılmıştır. IRE1 α 'nın aktivasyonu için gerekli olan fosforilasyon reaksiyonunun ise Abl tirozin kinazı aracılığıyla gerçekleştiğinin anlaşılmasının ardından hücreler imatinib ile muamele edilmiştir. İmatinib uygulaması sonrasında ise IRE1 α -RIDD aracılığıyla gerçekleşen anti-apoptotik etkinin inhibe edildiği gözlenmiştir. Bu çalışma doğrultusunda da imatinibin bilinen tirozin kinaz hedeflerine ek olarak ER stres aracılığıyla da anti-tümörojenik bir etki ortaya koyabileceği anlaşılmaktadır (36).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm malzemeler ve cihazlar, *in vitro* deneylerin yürütüldüğü Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında bulunmaktadır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin, sarf malzemelerin, kitlerin ve çözeltilerin adları aşağıda sıralanmaktadır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler, sarf malzemeler, kitler ve çözeltiler.

ÜRÜN ADI	ÜRETİCİ ADI ve ÜRETİLDİĞİ ÜLKE
Roswell Park Memorial Institute 1640 besiyeri (RPMI-1640)	Biowest - Fransa
Iscove's Modified Dulbecco's besiyeri (IMDM)	Biological Industries – İsrail
Sodyum Pirüvat	Biological Industries – İsrail
L-glutamin	Biological Industries – İsrail
Penisilin - Streptomisin	Biological Industries – İsrail
HEPES Tampon Solüsyonu, 1M	Biological Industries – İsrail
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biological Industries – İsrail
Tripsin EDTA Solüsyonu A (%0.25), EDTA (%0.02)	Biological Industries – İsrail; Biowest - Fransa
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (D-PBS)	Biological Industries – İsrail
Tripan mavisi, %0.4	Canvax - İspanya
Agaroz	BIOSHOP - Kanada
Trizma bazı	Sigma-Aldrich - ABD
Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA)	BIOSHOP - Kanada
Etidyum Bromür	SNP Biyoteknoloji - TÜRKİYE
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	SERVA - Almanya
RPMI-1640, Fenol Kırmızısız ve L-glutaminsiz	Biowest - Fransa
N,N- Dimetil Formamid (DMF)	ISOLAB - Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich - ABD
Bortezomib (PS-341)	Selleckchem – ABD

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler, sarf malzemeler, kitler ve çözeltiler (Devam).

İmatinib (STI571)	Selleckchem – ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	SERVA - Almanya
Kristal Viyole	SERVA - Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich - ABD
TRIZOL	Zymo Research-ABD
Kloroform	Sigma-Aldrich - ABD
İzopropanol	ISOLAB - Almanya
Etanol	Sigma-Aldrich - ABD
Nükleaz içermeyen su	BIOSHOP - Kanada
cDNA sentez kiti	Thermoscientific-ABD
SYBR green I Master	Roche-İsviçre
Hücre kültürü flaskı, 24 kuyucuklu plaka, 96 kuyucuklu plaka, serolojik pipet ve diğer sarf malzemeler	Sarstedt – Almanya; NEST - Çin

3.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonların ve İlaçların Hazırlanması

Fetal Sığır Serum (FBS) ısı inaktivasyonu: Ticari olarak temin edilen FBS oda sıcaklığında çözüldükten sonra 56⁰C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 30 dakika boyunca bekletilerek ısı ile inaktive edildi. İnaktivasyon işlemi sonrasında FBS alikotlanarak -20⁰C'de muhafaza edildi.

Tam RPMI-1640 besiyeri hazırlığı: Ticari olarak elde edilen RPMI-1640 besiyeri deneylerde kullanılmadan önce 50 ml ısı ile inaktive edilmiş FBS (%10), 5 ml penisilin-streptomisin (%1), 5 ml L-glutamin (%1), 5 ml HEPES tampon solüsyonu (%1) ve 5 ml sodyum pirüvat (%1) eklenerek hazırlandı. Hazırlanan tam besiyeri +4⁰C'de muhafaza edildi.

Tam IMDM besiyeri hazırlığı: Ticari olarak elde edilen IMDM besiyeri deneylerde kullanılmadan önce 50 ml ısı ile inaktive edilmiş FBS (%10), 5 ml

penisilin-streptomisin (%1) ve 5 ml L-glutamin (%1) eklenerek hazırlandı. Hazırlanan tam besiyeri +4⁰C’de muhafaza edildi.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solüsyon hazırlığı: Ticari olarak elde edilen toz haldeki MTT, 200 ml D-PBS ile sıvı hale (5mg/mL MTT) getirildikten sonra filtrelenerek sterilize edildi. Sterilizasyonu tamamlanan MTT alikotlanarak -20⁰C’de muhafaza edildi.

Bortezomib ilacının hazırlığı: Ticari olarak elde edilen ilaç tavsiye edildiği üzere final konsantrasyonu 190 uM olacak şekilde yeterli miktarda DMSO ile çözüldü. Çözünen ilaç alikotlanarak -80⁰C’de muhafaza edildi.

İmatinib ilacının hazırlığı: Ticari olarak elde edilen ilaç tavsiye edildiği üzere final konsantrasyonu 100 uM olacak şekilde yeterli miktar DMSO ile çözüldü. Çözünen ilaç alikotlanarak -80⁰C’de muhafaza edildi.

Dimetil formamid (DMF) ve Sodyum dodesil sülfatlı (SDS) çözücü hazırlığı: Hücre canlılık tayin deneylerinde oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için DMF/SDS (pH: 4.7) çözücü solüsyonu hazırlandı. Çözücünün hazırlığı sırasında son hacim distile su ile tamamlanacak şekilde, %50 oranında DMF (%v/v) ve %10 oranında SDS (%w/v) cam şişeye aktarıldı. Çözücü, manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılıp berrak hale getirildikten sonra pH’ı 4.7’ye ayarlandı. pH’ı ayarlanan çözücü oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Kristal viyole boya hazırlığı: Ticari olarak elde edilen toz haldeki kristal viyole, %0.5 yoğunluğa sahip olacak şekilde hazırlandı. 50 mL’lik boya solüsyonu için 0.25 g kristal viyole boyası tartıldıktan sonra bir falkonun içine aktarıldı ve daha sonra 40 mL distile su eklenerek çözdürüldü. Çözünen boyanın toplam hacmi metanol (%20) ile tamamlandı. Hazırlanan boyanın bulunduğu falkon alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3. *In silico* Analizler

Bu tez çalışmasında kullanılacak bortezomib ilacına karşı hassasiyet gösteren pankreas kanseri hücre hatlarının belirlenmesi ve ER stres ile RIDD mekanizmasıyla ilişkili genlerin ifadelerinin incelenmesi amacıyla herkes tarafından ulaşılabilir veri

tabanları kullanıldı. Analizlerde incelenen genlerin listesi literatürde var olan bilgi doğrultusunda oluşturuldu (188).

Pankreas kanseri hücre hatlarına ait RNA ve protein düzeyindeki gen ifade bilgileri *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) platformundan elde edildi (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/data>). Platformdan elde edilen RNA gen ifade bilgisinin $\log_2(\text{TPM}+1)$ transformasyonu gerçekleştirildi. Protein seviyesindeki ekspresyon bilgisi için platform tarafından hazır olarak sunulan \log_2 transformasyonu gerçekleştirilmiş olan veri kullanıldı. CCLE platformunda yer alan pankreas kanseri hücre hatlarının bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyet bilgisi Kanser Terapötik Yanıt Portalından elde edildi (<https://portals.broadinstitute.org/ctrp.v2.1/>) (CTRP). Pankreas kanseri hücre hatlarına ait ilaç hassasiyet bilgisi analizi için eğri altında kalan alan (AUC) parametresi kullanıldı. AUC değerlerinin kıyaslanabilir olması için 16 adet konsantrasyonda test edilmiş hücreler ile analiz gerçekleştirildi.

Pankreas kanseri hücre hatlarına ait mikrodizi verileri Kanser Genom Projesi (CGP)'nden elde edildi. Mikrodizi verileri Array Express (E-MTAB-3610) platformu üzerinden indirildi (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-3610/?query=GDSC>).

Ham mikrodizi verileri “Dr. Richard Simon ve BRB-ArrayTools Development grubu” tarafından geliştirilen *BRB-ArrayTools* yazılımı kullanılarak RMA normalize edildi. CGP'de yer alan pankreas kanseri hücre hatlarının bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyet bilgisi Kanserde İlaç Hassasiyet Genomiği (GDSC) platformundan elde edildi (<https://www.cancerrxgene.org/>). Pankreas kanseri hücre hatlarına ait ilaç hassasiyet bilgisi analizi için AUC parametresi kullanıldı.

Bortezomib ve imatinib ilaçlarının hedef genlerinin ekspresyon düzeylerinin normal ve tümör pankreatik doku örneklerindeki analizi için *The Gene Expression Profiling Interactive Analysis* (GEPIA) Platformu kullanıldı (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) (189). Ekspresyon düzeyine ait veri tümör doku örnekleri için Kanser genom Atlası (TCGA)'ndan elde edilirken, normal doku örnekleri TCGA ve Genotip doku ekspresyon (GTEx) platformlarından elde edildi. Normal ve tümör pankreatik örneklerin grafiksel olarak incelenmesi için GEPIA platformu üzerinden kutu grafikleri oluşturuldu. Ekspresyon düzeyine ait veri logaritmik olarak seçildi. Kat farkı

sınır değeri 1 olarak belirlendi ve p değerinin 0.01'den küçük olduğu durumda gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bortezomib ve imatinib ilaçlarının hedef genlerinin ekspresyon düzeylerinin hasta örneklerinde karşılaştırılması amacıyla Gen ekspresyon Omnibus (GEO) veritabanından pankreatik duktal adenokarsinom hastalarına ait eşli 45 adet tümör ve 45 adet komşu normal doku örneklerinden elde edilen mikrodizi verisi içeren GSE28735 veri seti indirildi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (190). Ham mikrodizi çıktısı RMA metodu ile normalize edildi. Her bir gene ait ekspresyon değerleri tümör ve normal örnekler için ortalama cinsinden hesaplama yapılarak incelendi. p değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumda gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

ER stres ile ilişkili gen imzasının normal ve tümör pankreatik doku örneklerindeki analizi için GEPIA2 platformunda çoklu gen karşılaştırması yapıldı (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). Ekspresyon düzeyine ait veri pankreatik tümör örnekleri için TCGA (n=179)'dan elde edilirken, normal pankreas örnekleri TCGA (n=4) ve GTEx (n=167) platformlarından elde edildi. ER stres ile ilişkili gen listesi olarak Gen Seti Zenginleştirme Analiz Moleküler İmza Veritabanı (GSEA MSigDB)'nda bulunan KEGG_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS gen seti (n=135) kullanıldı (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>) (191, 192). Gen listesinde yer alan SKP1P2 geni GEPIA2 platformunda bulunmadığı için geriye kalan 134 gen ile analiz gerçekleştirildi. Gruplar arası gen imzasındaki farklılıkların hesabı için gen setinde yer alan her bir genin $\log_2(\text{TPM} + 1)$ ortalama değerleri hesaplandı. Normal ve tümör pankreatik örneklerin grafiksel olarak incelenmesi için GEPIA platformu üzerinden kutu grafikleri oluşturuldu. Kat farkı sınır değeri 1 olarak belirlendi ve p değerinin 0.01'den küçük olduğu durumda gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4. Hücre Hatlarının Çözülmesi

Bu tez çalışmasında, BxPC-3, MIA PaCa-2, CFPAC-1, AsPC-1, Panc-1, SU.86.86. ve Capan-1 pankreas kanseri hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Güneş Esendağlı, İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik

Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Osmay Güre ve Leiden Üniversitesi'nden Henri Versteeg tarafından temin edildi.

Sıvı nitrojende özel dondurma tüpleri içerisinde muhafaza edilen hücre hatları öncelikle 37°C sıcaklığa sahip su banyosunda tüp içerisinde küçük bir buz kütlesi kalana kadar hızlıca çözdürüldü. Çözdürme işlemi sonrasında BxPC-3, MIA PaCa-2, CFPAC-1, AsPC-1, SU.86.86. ve Panc-1 hücre hatları tam RPMI-1640 besiyeri içeren falkona aktarılırken, Capan-1 hücre hattı tam IMDM besiyeri içeren falkona aktarılarak 1200 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant atılarak pellet ilgili tam besiyeri ile tekrar sıvı hale getirilerek hücre kültüründe kullanılan 25cm²'lik kültür kabına aktarıldı. Kültür kabına aktarılan hücreler 37°C ve %5 CO₂ koşulunda bulunan inkübatöre kaldırılarak kültürleri sağlandı.

3.5. Hücre Hatlarının Pasajlanması

BxPC-3, CFPAC-1, AsPC-1, Panc-1, SU.86.86. ve Capan-1 aderan karaktere sahip pankreatik adenokarsinom hücre hatlarıdır. Hücreler bulunduğu hücre kültürü kabının yüzeyini yaklaşık olarak %85-90 oranında kapladığı zaman pasajlandı. Yeterli doluluk oranına ulaşan hücrelerin pasajlanması için öncelikle hücre kültürü kabının içerisinde bulunan eski besiyeri atılarak D-PBS (T25 hücre kabı için 1ml; T75 hücre kabı için 2 ml) ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında ise tripsin-EDTA (T25 hücre kabı için 1ml; T75 hücre kabı için 2 ml) eklendi. Hücre kültürü kabı 37°C ve %5 CO₂ koşulunda bulunan inkübatöre kaldırılarak hücrelerin kabın yüzeyinden kalkması sağlandı. Yüzeyden kalkan hücreler yeterli miktarda taze tam besiyeri ile toplanarak yeni bir hücre kültürü kabının içerisine aktarıldıktan sonra inkübatöre kaldırıldı.

MIA PaCa-2, hem yuvarlak yapıda yüzen hem de aderan karaktere sahip hücrelerden oluşan pankreatik karsinom hücre hattıdır. MIA PaCa-2 hücre hattı bulunduğu hücre kültürü kabının yüzeyini yaklaşık olarak %85-90 oranında kapladığı zaman pasajlandı. Yeterli doluluk oranına ulaşan hücrelerin pasajlanması için öncelikle yüzen hücreleri içeren eski besiyeri bir falkonun içine aktarılıp 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sırasında aderan hücrelerin hücre kültürü kabının yüzeyinden kaldırılması için D-PBS (T25 hücre kabı için 1ml; T75 hücre kabı için 2 ml) ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında tripsin-EDTA (T25 hücre kabı için 1ml;

T75 hücre kabı için 2 ml) eklenerek hücre kültürü kabı inkübatöre kaldırıldı. Yüzeiden kalkan hücreler yeterli miktarda taze tam besiyeri ile toplandıktan sonra yeni bir hücre kültürü kabına aktarıldı. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant atıldı ve pelet yeterli miktarda taze tam besiyeri ile tekrar sıvı hale getirilerek adheran hücrelerin bulunduğu yeni hücre kültürü kabına aktarıldı. Hücre kültürü kabı 37⁰C ve %5 CO₂ koşuluna sahip inkübatöre kaldırılarak hücrelerin kültürü sağlandı.

3.6. Hücre Sayımı ve Hücre Ekimi

Hücreler ilaç uygulaması öncesinde 24 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 27.500 hücre (BxPC-3), 32.500 hücre (MIA PaCa-2), 40.000 hücre (CFPAC-1), 37.500 hücre (AsPC-1), 30.000 hücre (Panc-1), 27.500 hücre (SU.86.86.) ve 100.000 hücre (Capan-1) olacak şekilde laminar kabin içerisinde ekildi. Her bir kuyuya eşit sayıda hücre ekiminin sağlanabilmesi amacıyla *Neubauer Improved* sayım lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı sırasında canlı ile ölü hücreleri birbirinden ayırt edebilmek için hücreler %0.4 yoğunluğuna sahip tripan mavisi ile boyanarak sayıldı.

Sayım için lamın köşesinde bulunan her biri eşit 16 küçük kareye bölünmüş dört büyük karenin içindeki hücreler ışık mikroskobu altında sayıldı. Her bir büyük karenin alanı (1mm x 1mm) ile lam ve lamel arasındaki mesafe (0.1 mm) çarpılarak hacim hesabı yapıldı. Elde edilen hacmi 1 ml'e çevirmek için bu değer 10⁴ ile çarpılarak toplam hücre sayısı hesaplandı. Yapılan hesaplama sonrasında hücreler 24 kuyucuklu plakalara ekilip yüzeye yapışmaları için 37⁰C ve %5 CO₂ koşuluna sahip inkübatöre kaldırılarak bir gece bekletildi.

3.7. İlaç Uygulaması

Plaka yüzeyine yapışan hücrelerin ilaç uygulaması için seri dilüsyon ile farklı konsantrasyonlara sahip ilaçlı besiyerleri hazırlandı. Her bir konsantrasyon üç tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. İlaçlı besiyerlerindeki DMSO oranının %1'i geçmemesine dikkat edildi. İlaçlı besiyerleri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon koşulları için eş zamanlı olarak hazırlandı.

Bortezomib ilacının uygulaması için BxPC-3, MIA PaCa-2, CFPAC-1, AsPC-1, Panc-1, SU.86.86. ve Capan-1 hücre hatlarında kontrol ve 0.25-0.5-1-2-4-5-6-8-9-10-12-24-48-96-192 nM'lık 15 farklı doz aralığı kullanıldı. Bu dozların seri dilüsyon

ile hazırlanması için öncelikle 190 uM konsantrasyona sahip stok bortezomib ilacı 1:10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Seyreltme sonucunda elde edilen 19.000 nM'lık ilaçlı besiyeri kullanılarak yüksek dozdan düşük doza doğru yeterli miktarda aktarım yapılarak tüm dozlar için ilaçlı besiyerleri hazırlandı. En yüksek DMSO oranı belirlenerek kontrol grubuna ait besiyeri hazırlandı. Tüm besiyerlerinin hazırlığı bittikten sonra 24 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler inkübatörden laminar kabin içine alındı. Kuyucuklarda bulunan besiyerleri atıldı ve yerlerine hazırlanan ilaçlı besiyerleri eklendi. Plakalar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı.

İmatinib ilacının uygulaması için BxPC-3 hücre hattında kontrol ve 0.25-0.5-1-2-4-5-6-8-9-10-12-24-48-96-192 uM'lık 15 farklı doz aralığı kullanıldı. MIA PaCa-2 hücre hattında, kontrol ve 1-2-4-6-8-20-25-28-30-35-45-60-80-100 uM'lık olmak üzere 15 farklı doz aralığı kullanıldı. İlaçlı besiyerleri 100 uM konsantrasyona sahip stok imatinib ilacından yeterli miktarda alındıktan sonra yüksek dozdan düşük doza doğru aktarım sonucunda seri dilüsyon ile hazırlandı. Belirlenen en yüksek DMSO oranına göre de kontrol grubuna ait besiyeri hazırlandı. İnkübatörde bulunan plakalar laminar kabin içine alındı. Kuyucuklarda bulunan besiyerleri atılıp yerlerine hazırlanan ilaçlı besiyerleri eklendi. Plakalar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı.

3.8. Hücre Canlılık Tayini

İnkübasyon sonrasında, hücrelerde bortezomib ve imatinib ilaçlarına ait IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla ve ayrıca ilaç kombinasyon deneylerinin analizi için MTT tayin yöntemi kullanıldı.

MTT testi, hücre canlılığı, hücre çoğalması ve sitotoksosite belirteci olarak hücrel metabolik aktivitenin ölçümünde kullanılan kolorimetrik bir tayin yöntemidir (193). Sarı renkli tetrazolyum tuzu olarak da bilinen MTT, lipofilik grup içeren net pozitif yüke sahip yapısı ile canlı hücrelerin membranından kolaylıkla geçmektedir. Canlı hücrelerin membranından geçen MTT, elektron donörü olarak NAD(P)H, süksinat veya pirüvat kullanan oksidoredüktaz, dehidrogenaz, oksidaz ve peroksidaz enzimleri tarafından koyu mavi/mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgenmektedir (194). Oluşan kristaller uygun çözücü yardımıyla çözdürüldükten sonra oluşan rengin absorbans değerleri spektrofotometre yardımıyla ölçülerek hücre

canlılığına, hücre çoğalmasına ve/veya hücrelerde oluşan sitotoksositeye dair bilgi elde edilmektedir.

MTT tayin yöntemi için öncelikle L-glutamin ve fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640 besiyeri 37⁰C'ye ayarlı su banyosunda ısıtıldı. Isınan besiyeri ile MTT 1:10 (MTT:besiyeri) oranında olacak şekilde hazırlandı. Hazırlık sonrasında inkübasyon zamanını tamamlayan plakalar laminar kabin içine alındı. Kuyucuklardan ilaçlı besiyerleri atılarak yerlerine MTT ile hazırlanan besiyeri eklendi. Plakalar inkübatöre kaldırılarak 3 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklarından MTT'li besiyeri atılarak yüzeyde oluşan koyu mavi/mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi için yeterli miktarda DMF/SDS solüsyonu eklendi ve kristallerin orbital karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlandı. Kristaller tamamen çözüldükten sonra örnekler 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Körlleme olarak DMF/SDS solüsyonu kullanıldı. Absorbans değerleri 570 nm'de ölçüldü. Ölçüm sonrasında Microsoft Office Excel programı kullanılarak körlleme grubuna ait absorbans değerlerinin ortalaması tüm örneklerin absorbans değerinden çıkartıldı ve kontrol grubuna ait absorbans değerlerinin ortalaması %100 olarak değerlendirildi. Örneklere ait absorbans değerleri kontrol grubuna göre normalize edildikten sonra yüzde cinsinden hücre canlılık miktarı hesaplandı. *GraphPad Prism 9.0* yazılım programı kullanılarak ilaçlara ait IC₅₀ değerleri belirlendi.

3.9. Kristal Viyole Boyaması

İlaç uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin görsel olarak gösterimi için kristal viyole boyaması yapıldı. Boyama için öncelikle BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara ekildi ve plakalar inkübatöre kaldırıldı. Bir gün sonra BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücreleri için IC₅₀ doz belirlemesi sırasında hazırlanan konsantrasyonlar ile aynı olacak şekilde ilaçlı besiyerleri hazırlandı. Plakalara ekilen hücreler inkübatörden laminar kabin içerisine alındı ve plakaların kuyucuklarında bulunan besiyerleri atılarak yerlerine hazırlanan ilaçlı besiyerleri koyuldu. Hücreler inkübatöre kaldırılarak 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin dolmasının akabinde plakalar inkübatörden alınarak buz üstüne aktarıldı. Plaka kuyucuklarında bulunan besiyerleri atıldı ve 500 mL soğuk D-PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında D-PBS ortamdan uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 500 mL

%100'lük soğuk metanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon başlatıldı. İnkübasyon sırasında metanol kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve yerine %0.5 yoğunluğuna sahip kristal viyole boyasından 500 mL eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübasyon sağlandı. İnkübasyon sonrasında boya kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve yeterli miktarda distile su ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında plakalar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.10. Kombinasyon İndeks Analizi

BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında uygulanan ilaç kombinasyonları sonucunda elde edilen etkinin analizi için CompuSyn (Paramus, NJ, USA) ve Combeneft yazılımları kullanıldı.

CompuSyn yazılımında ilaçlar arasında oluşan etkinin incelenmesi için kütle etki yasası prensibi temel alınarak geliştirilen medyan-etki eşitlik denklemi kullanılmaktadır. Bu denklem sayesinde, ilaç kombinasyonu sonucunda elde edilen hücre büyümesindeki inhibisyon oranı (Fa) kullanılarak ilaçlar arası oluşan etki matematiksel olarak kombinasyon indeksi (CI) değerine dönüştürülmektedir. Hesaplanan CI değerine göre de oluşan etkinin sinerjistik, aditif veya antagonistik olup olmadığı anlaşılmaktadır. CI değeri 1'den küçük ise bu etki sinerjistik olarak kabul edilirken, 1'e eşitse aditif ve 1'den büyük ise antagonistik olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu analiz yöntemi sonucunda bir Fa-CI grafiği de oluşturulmaktadır. Fa-CI grafiğinde y ekseninde CI değerleri, x eksenini ise Fa değerleri yer almaktadır. Bu çizilen grafikte, y eksenindeki 1 değerinden x eksenine paralel olacak şekilde bir doğru bulunmaktadır. Elde edilen CI değerleri eğer 1'den küçük ise bu doğrunun altında kalacak şekilde dağılırken, 1'den büyük CI değerlerine sahip noktalar doğrunun üstünde yer alacak şekilde dağılmaktadır. Bu grafik sayesinde de ilaç kombinasyonları sonucunda oluşan etkiye dair inceleme yapılmaktadır (195).

Combeneft yazılımında ise ilaçlar arasında oluşan etkinin analizi içi doz-yanıt yüzeyi olarak adlandırılan bir konsantrasyon uzayı kullanılmaktadır. Burada yazılıma kontrol grubu ve ilaçlara ait hem tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen hem de kombinasyonlarından elde edilen yüzde hücre canlılık değerleri tanıtılmaktadır. Yazılım tarafından kontrol grubuna ait hücre canlılık değeri ilaçların tek başlarına kullanıldıkları durumda elde edilen değerden çıkartılarak bir doz-yanıt eğrisi

oluşturulmaktadır. İlaçların tek başlarına kullanıldıkları koşulda elde edilen doz-yanıt grafiği temel alınarak bir ilaç kombinasyon doz-yanıt yüzeyi modellenmektedir. Bu yüzey aditif-bağımsız bir kombinasyon doz-yanıt yüzeyi için referans oluşturmaktadır. Deneysel olarak elde edilen kombinasyon doz-yanıt değerleri bu model ile kıyaslanarak konsantrasyon uzayında bir sinerji dağılım tahmini gerçekleştirilmektedir (196).

BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında bortezomib ve imatinib ilaçlarının kombinasyonu sonucunda sinerjistik bir etkinin oluşup oluşmadığının incelenmesi için hücre hatlarına ait belirlenen IC_{50} dozları dikkate alındı (Tablo 3.2.). Öncelikle ilaçlar IC_{50} dozun belirlenmesi sırasında izlendiği şekilde seri dilüsyon yöntemi ile hazırlandı (Bkz. Bölüm 3.7.). İlaç kombinasyonlarının hazırlığı için de ilaçların tek başlarına hazırlandıkları en yüksek dozlardan belirli miktarda alınıp karıştırıldıktan sonra yine seri dilüsyon yapıldı. Tüm ilaçlı besiyerlerinin hazırlığı tamamlandıktan sonra bir gün önce 24 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler inkübatörden laminar kabin içine alındı. Kuyucuklarda bulunan besiyerleri atıldı ve yerlerine hazırlanan ilaçlı besiyerleri eklendi. Plakalar inkübatöre kaldırılarak 48 saatlik inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.2. Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonu deney dizaynı.

		İmatinib (ilaç 2)						
		0	0.25x IC_{50}	0.5x IC_{50}	0.75x IC_{50}	IC_{50}	1.5x IC_{50}	2x IC_{50}
Bortezomib (ilaç 1)	0	Kontrol	Fa₂	Fa₂	Fa₂	Fa₂	Fa₂	Fa₂
	0.25x IC_{50}	Fa₁	Fa_{1,2}					
	0.5x IC_{50}	Fa₁		Fa_{1,2}				
	0.75x IC_{50}	Fa₁			Fa_{1,2}			
	IC_{50}	Fa₁				Fa_{1,2}		
	1.5x IC_{50}	Fa₁					Fa_{1,2}	
	2x IC_{50}	Fa₁						Fa_{1,2}

48 saatlik inkübasyon sonrasında MTT tayin yöntemi ile örneklere ait absorbans değerleri elde edildi ve sonra yüzde cinsinden hücre canlılık hesaplaması yapıldı (Bkz. Bölüm 3.8.). Hesaplanan hücre canlılık miktarları 0 ile 1 arasında olacak şekilde düzenlendikten sonra bu değerler ile uygulanan dozlar CompuSyn yazılımına tanıtılarak kombinasyon indeks analizi yapıldı. İlaçlar arasında meydana gelen etkinin Combeneft yazılımı ile incelenmesi için yüzde cinsinden hesaplanan hücre canlılık miktarları ile uygulanan dozlar yazılıma tanıtıldı.

3.11.Total RNA İzolasyonu

İlaç uygulaması sonrasında BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapıldı. Öncelikle BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hataları her bir kuyuda sırasıyla 145.000 hücre ve 171.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve inkübatöre kaldırıldı. İlaçların tek başlarına ve kombinasyonlarından oluşan ilaçlı besiyerleri seri dilüsyon yöntemiyle en yüksek dozdan en düşük doza doğru olacak şekilde besiyeri aktarımı sonucunda hazırlandı (Tablo 3.3.). İlaçlı besiyerlerinin hazırlığı tamamlandıktan sonra bir gün önce plakalara ekilen hücreler inkübatörden laminar kabin içine alındı. Plaka kuyucuklarında bulunan besiyerleri atılarak yerlerine ilaçlı besiyerleri koyuldu ve plakalar 24 saatlik inkübasyon için inkübatöre kaldırıldı.

Tablo 3.3. Total RNA izolasyonu için hazırlanan ilaç kombinasyonu deney dizaynı.

		İmatinib		
		0	IC ₅₀ /2	IC ₅₀
Bortezomib	0	Kontrol		
	IC ₅₀ /2			
	IC ₅₀			

24 saatlik inkübasyon sonrasında plakalar buz üstüne alındı ve plaka kuyucuklarında bulunan ilaçlı besiyerleri atılarak 1 mL soğuk D-PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında her bir kuyuya 1 mL TRIZOL eklenerek hücreler kuyucuk yüzeyinden kazındı. Kazıma sonrası örnekler ependorflara aktararak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ependorflara 250 uL kloroform eklendi ve kısa bir süre vorteks yardımıyla karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonrasında 4°C'ye ayarlı santrifüj cihazında 10.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifügasyon işlemi sonrasında en üstte oluşan faz yeni bir ependorfa aktarıldı ve 550 uL izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler inkübasyon sonrasında 4°C'ye ayarlı santrifüj cihazında 14.000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrasında oluşan süpernatant atıldı ve pelet 1mL %75'lik etanol ile tekrar sıvı hale getirildi. Örnekler 4°C'ye ayarlı santrifüj cihazında 9.500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifügasyon işlemi sonrasında oluşan süpernatant

atıldı ve etanolün uçması beklendikten sonra pelet 15 uL nükleaz içermeyen su ile tekrar sıvı hale getirildi.

3.12. RNA Kalite ve Konsantrasyon Tayini

Total RNA izolasyonu sonrasında elde edilen örneklerin kalitesi ve miktarı UV spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, USA) kullanılarak belirlendi. İzole edilen RNA'nın kalitesi A260/A280 ve A260/A230 oranları dikkate alınarak incelendi. A260/A280 oranı 1.8-2.0 aralığında olan ve A260/A230 oranı 2.0'den büyük olan örnekler yüksek kaliteye sahip olarak değerlendirildi.

3.13. cDNA sentezi

cDNA sentezi için RevertAid RT kit (katalog no: 01186461, ThermoScientific, ABD) kullanıldı. Her bir örneğe ait son RNA konsantrasyonu 1000 ng/uL olacak şekilde gerekli olan RNA miktarı hesaplandı. Hesaplanan miktarda RNA'dan alınarak her bir örneğe 1 uL random primer eklendi ve son hacim nükleaz içermeyen su ile birlikte 6 uL'ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler PCR cihazında 65°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnek başına toplam 4 uL eklenecek şekilde 2 uL tampon çözeltisi, 0.5 uL RNaz inhibitörü, 1 uL dNTP ve 0.5 uL ters transkriptaz enziminden oluşan karışım hazırlandı. İnkübasyon süresi bittikten sonra her bir tüpün içerisine hazırlanan karışımdan eklendi ve PCR cihazında sırasıyla 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakika ve 4°C'de bitiş döngüsünde reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon sonunda örnekler nükleaz içermeyen su ile birlikte 10 kat seyreltikten sonra -20°C'de muhafaza edildi.

3.14. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

sXBP1, Scara3 ve Bloc1s1 genleri ile normalizasyon amacıyla kullanılan GAPDH geninin ekspresyon seviyesi qRT-PCR reaksiyonu ile incelendi. qRT-PCR reaksiyonunda her bir örnek için öncelikle 1 uL ileri primer, 1 uL geri primer ve 1 uL nükleaz içermeyen su kullanılarak primer karışımı hazırlandı. Daha sonra örnekler için 10 kat seyreltilen cDNA'dan 2 uL ve sybergreen'den 5 uL kullanılarak örnek karışımı hazırlandı. Hazırlanan primer karışımından toplam 3 uL ve örnek karışımından 7 uL alınarak 96 kuyucuklu okuma plakasının her bir kuyusuna aktarıldı ve qRT-PCR cihazı (BIO-RAD CFX Connect RT system) kullanılarak reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon

sonunda erime eğrisi grafikleri kontrol edildi ve *Cycle threshold* (Ct) değerleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak değerlendirildi.

Gen ekspresyon seviyesinin analizi için öncelikle GAPDH genine ait Ct değerleri her bir örneğin değerinden çıkartılarak ilk normalizasyon işlemi olan delta normalizasyon (ΔCt) gerçekleştirildi. Daha sonra kontrol grubuna ait ΔCt değerlerinin ortalaması hem kontrol grubunun hem de ilaç uygulanan grubun ΔCt değerinden çıkartılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri ve daha sonra $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplandı.

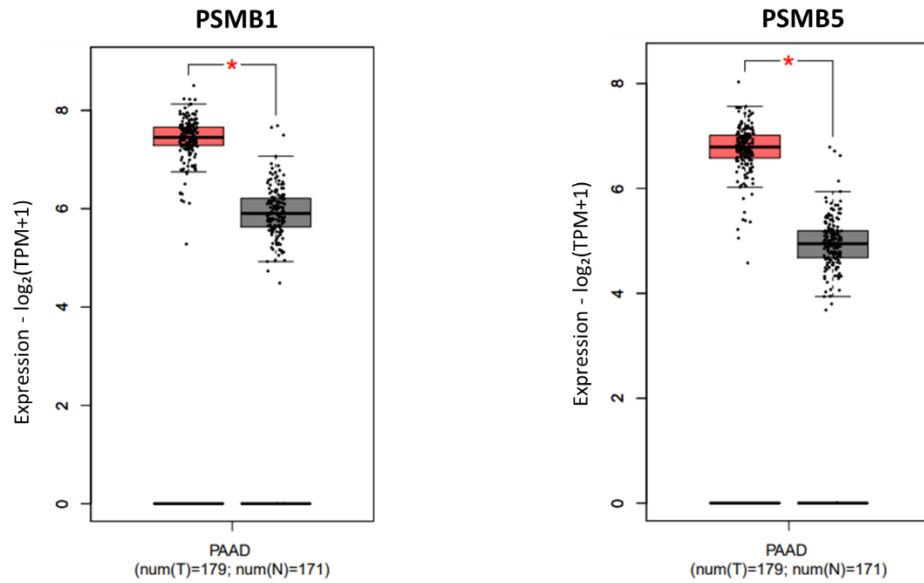
3.15. İstatistiksel Analizler

Hücre hatlarında ilaçlara ait IC_{50} dozlarının belirlenmesi amacıyla *GraphPad Prism 9.0* (GraphPad Prism 9 Software, San Diego, CA, USA) yazılım programı kullanıldı. İlaçlara ait konsantrasyon değerleri logaritmik olarak transforme edildikten sonra lineer olmayan regresyon analizi yapıldı. qPCR temelli gen ekspresyon farklarının analizi için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı ve gruplar arası karşılaştırmalar TUKEY testi ile yapıldı. Normal ve tümör örnekler arasında gen ifadesi farklılıklarının analizi için Student's t test kullanıldı. İlaç uygulaması sonrasında büyüme eğrilerinin karşılaştırılması amacıyla kareler toplamı-F test kullanıldı (197). Korelasyon analizleri Spearman's rank korelasyonu ile yapıldı. GSE28735 verisetinde tümör ve normal dokular arası gen ifadesi farklılıkları eşli t-test ile analiz edildi. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Bortezomib ve İmatinib İlaçlarının Hedef Aldıkları Genlerin mRNA Düzeyindeki İfadelerinin Pankreas Kanseri *in silico* Yöntemlerle İncelenmesi

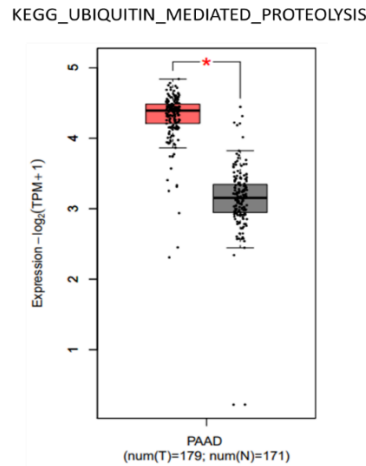
Tez çalışmasında yer alan hipotezlerden biri, pankreas kanseri hücrelerinin kontrolsüz büyüme özelliklerinden dolayı artan protein sentezinin bu hücreleri proteozomal sisteme daha bağımlı bir hale getirdiği yönündedir. Bu doğrultuda kanser hücrelerinin proteozom sistemine bağılılıkları hedef alınarak hücrelerde ölümün tetiklenip tetiklenemeyeceğinin incelenmesi amacıyla çalışmamızda bir proteozom inhibitörü olarak bilinen bortezomib ilacı kullanıldı. Bu ilacın pankreas kanseri hücrelerinde kullanım uygunluğunun incelenmesi amacıyla ilacın hedef aldığı genlerin ekspresyon düzeyleri GEPIA platformu üzerinden tümör ve normal dokular arasında karşılaştırıldı (22) (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Bortezomib ilacının hedef genlerinin ekspresyon seviyesinin normal ve tümör pankreatik doku örneklerinde karşılaştırılması (GEPIA). Kırmızı kutu tümör, gri kutu normal pankreatik doku örneklerini göstermektedir. Kutu grafikleri 25 persentilden 75 persentile kadar uzanmaktadır, yatay çizgi medyanı göstermektedir.

Analiz sonucunda bortezomib hedef genlerinin ekspresyon seviyesinin pankreatik tümör dokularında normal dokulara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu gözlemlendi (* $p < 0.01$).

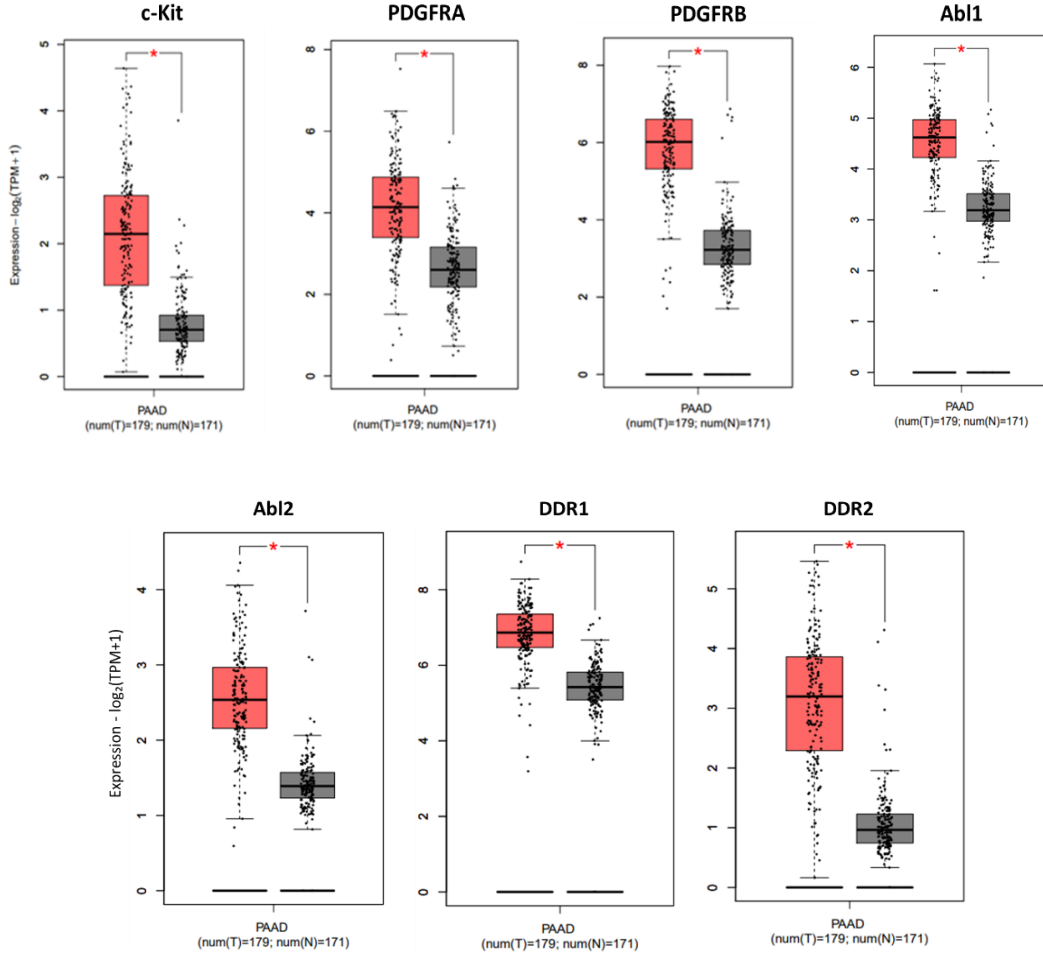
Tez çalışmasında yer alan hipotez doğrultusunda, hedef alınan proteozom sisteminin normal pankreatik dokulara kıyasla pankreatik tümör dokularında daha aktif bir şekilde çalışıp çalışmadığının *in silico* olarak incelenmesi amacıyla proteoliz mekanizmasında görev alan genlerin imzası normal ile tümör pankreatik örnekler arasında incelendi. İlgili incelemenin yapılması için GSEA veritabanından bulunan ve proteoliz mekanizması ile ilişkili olduğu belirlenen gen seti kullanıldı (n=134) (KEGG_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS). Pankreas kanseri tümör örnekleri ile normal pankreas örnekleri arasındaki gen imzası açısından farklılıkların incelenmesi için GEPIA2 platformunda çoklu gen karşılaştırması yapıldı (Şekil 4.2.). Yapılan analiz sonucunda, proteoliz mekanizması gen imzasının pankreatik tümör örneklerinde normal pankreatik örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu gözlemlendi (*p<0.01).



Şekil 4.2. Proteoliz mekanizmasında yer alan genlerin imzasının normal ve tümör pankreatik örnekler kullanılarak karşılaştırılması (GEPIA2). Kırmızı kutu tümör, gri kutu normal pankreatik örneklerini göstermektedir. Kutu grafikleri 25 persentilden 75 persentile kadar uzanmaktadır, yatay çizgi medyanı göstermektedir.

Bu tez kapsamında kullanılan bir diğer ilaç tirozin kinaz inhibitörü olarak bilinen imatinibdir. İmatinib ilacının kullanımı ile hem kanser hücrelerinin bortezomib ilacına karşı geliştirdikleri direnci kırmadaki rolünün hem de imatinib ilacının ER stresin varlığında devreye giren RIDD mekanizması üzerindeki olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilacın hedef genleri olan c-Kit, PDGFR, PDGFRB, Abl1, Abl2, DDR1 ve DDR2'nin pankreas tümörleri ve normal

pankreas dokularındaki ifadeleri GEPIA platformu kullanılarak incelendi (184, 198) (Şekil 4.3.).

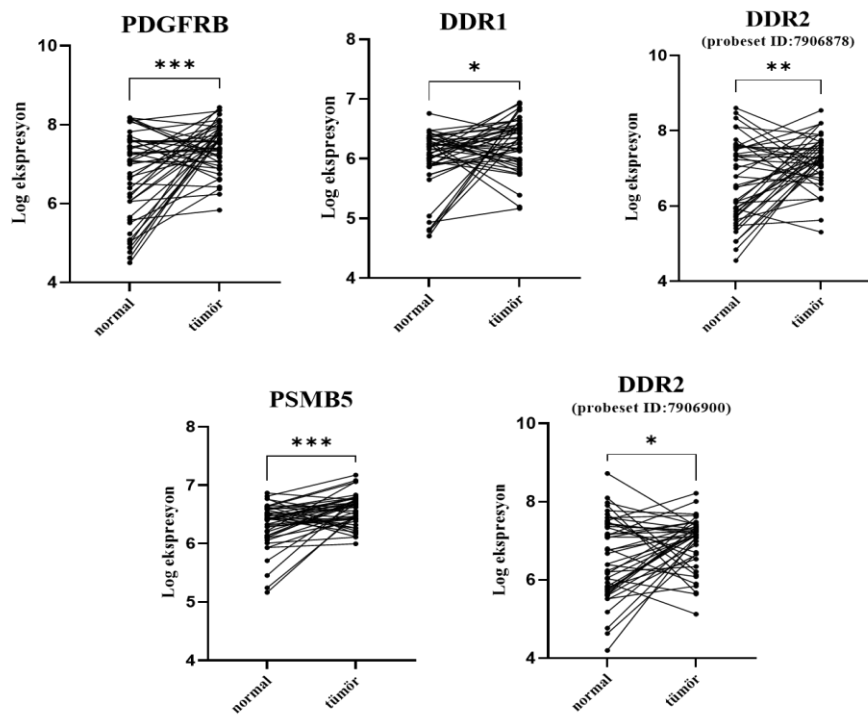


Şekil 4.3. İmatinib ilacının hedef genlerinin ekspresyon seviyesinin normal ve tümör pankreatik doku örneklerinde karşılaştırılması (GEPIA). Kırmızı kutu tümör, gri kutu normal pankreatik doku örneklerini göstermektedir. Kutu grafikleri 25 persentilden 75 persentile kadar uzanmaktadır, yatay çizgi medyanı göstermektedir.

Yapılan analiz sonucunda imatinib ilacının hedef genlerinin ekspresyon düzeyinin pankreatik tümör dokularında normal dokulara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi (* $p < 0.01$).

Bortezomib ve imatinib ilaçlarının hedef genleri olan PSMB5, PSMB1, Abl1, Abl2, c-Kit, PDGFRA, PDGFRB, DDR1 ve DDR2'nin ifade farklılıkları pankreatik duktal adenokarsinomlu bireylerden elde edilen eşli tümör ve komşu normal hücrelere ait bağımsız bir veri seti (GSE28735) kullanılarak karşılaştırıldı (Şekil 4.4.). Analiz sonucunda bortezomibin hedef genlerinden PSMB5'in ekspresyon düzeyinin tümör

örneklerinde normal örneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). İmatinibin hedef genlerinden ise PDGFRB (probeset ID:8115099), DDR1 (probeset ID:8179184), DDR2 (probeset numarası:7906878 ve probeset ID:7906900)'nin ekspresyon seviyesinin normal örneklere kıyasla tümör örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu anlaşıldı (sırasıyla $p < 0.005$, $p < 0.05$, $p < 0.005$, $p < 0.05$). Elde edilen *in silico* bulgular bortezomib ve imatinib ilaçlarının pankreas kanserinde hücre ölümünün hedeflenmesi amacıyla kullanıma uygun olabileceğini düşündürmektedir.

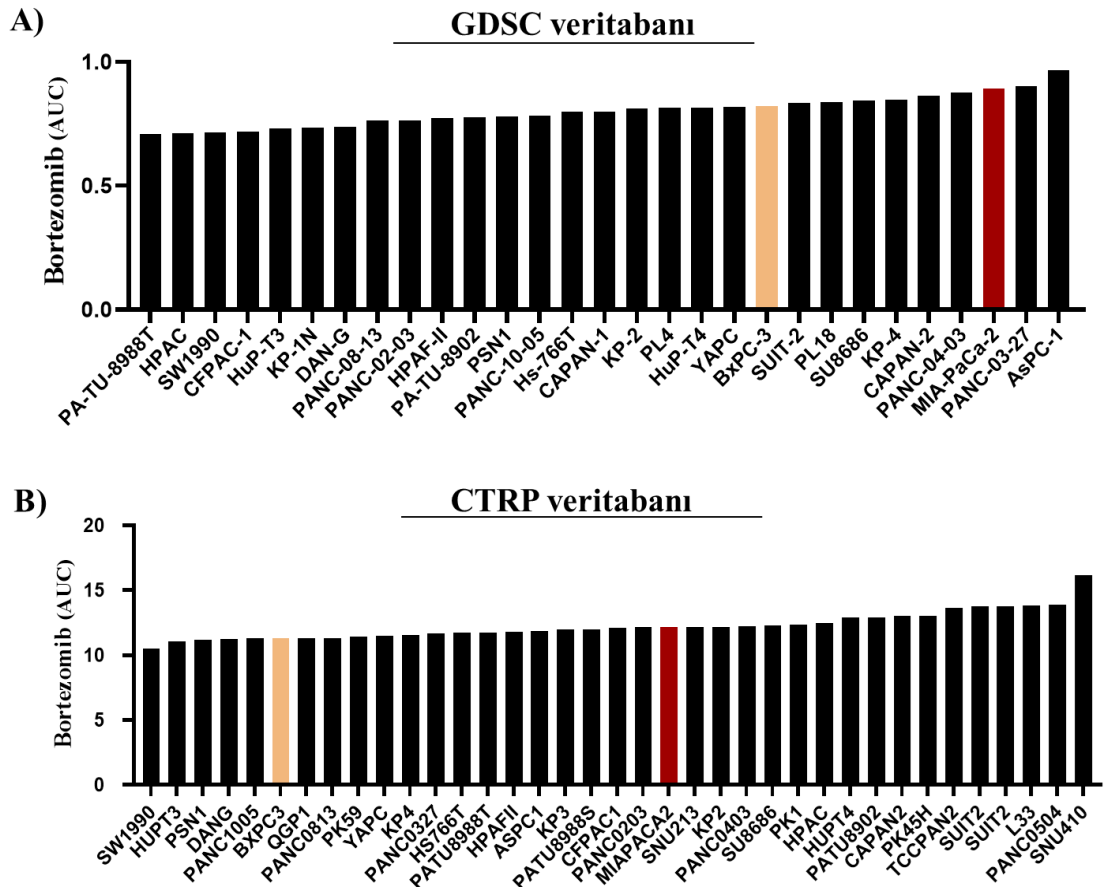


Şekil 4.4. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının hedef genlerinin ekspresyon düzeyinin GSE28735 veri seti ile incelenmesi.

4.2. Bortezomib İlacına Karşı Hassas ve Dirençli Profil Sergileyen Pankreatik Kanser Hücre Hatlarının *in silico* Yöntemlerle Belirlenmesi

Bu tez kapsamında kullanılacak olan bortezomib ilacına karşı hassasiyet ve direnç gösteren pankreatik kanser hücre hatlarının belirlenmesi amacıyla hem literatür taraması hem de *in silico* analizler yapıldı. Literatürde var olan bilgiler doğrultusunda MIA PaCa-2 hücre hattının bortezomib ilacına karşı dirençli olduğu gösterilirken, BxPC-3 hücre hattının ise bu ilaca karşı hassasiyet gösterdiği belirtilmektedir (169,

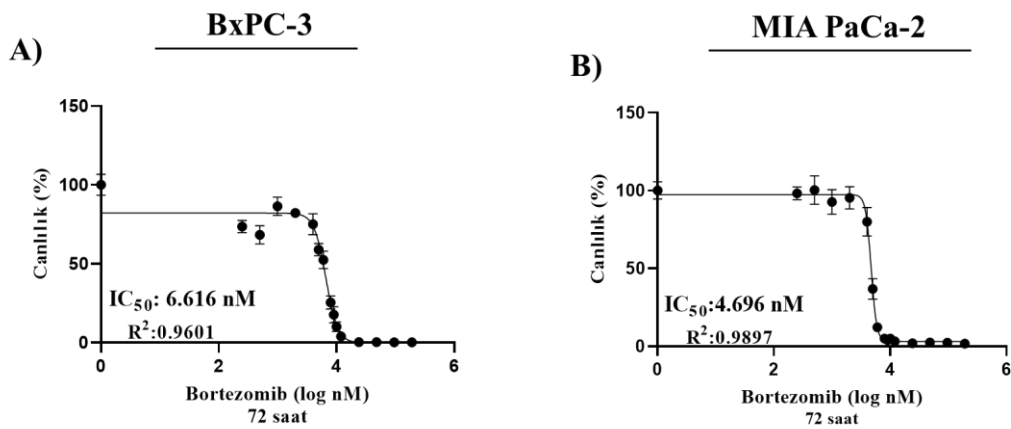
199). Literatürden elde edilen bilgiyi desteklemek amacıyla hücre hatlarının ilaca karşı gösterdikleri hassasiyetin bilgisini içeren CTRP ve GDSC veri tabanları kullanılarak *in silico* analizler yapıldı. Pankreatik kanser hücre hatlarının bortezomib ilacına karşı sergiledikleri yanıt AUC parametresi temel alınarak incelendi. GDSC ve CTRP veri tabanlarından sırasıyla 29 adet ve 37 adet pankreas kanseri hücre hattına ait bilgi bulundu (Şekil 4.5.). Hücre hatlarına ait AUC değerleri küçükten büyüğe olacak şekilde sıralandığında AUC değeri diğer hücre hatlarına kıyasla büyük olanlar ilaca karşı daha dirençli olarak değerlendirildi. Analiz sonucunda literatür ile uyumlu bir şekilde MIA PaCa-2 hücre hattının BxPC-3 hücre hattına kıyasla bortezomib ilacına karşı daha dirençli bir profil sergilediği anlaşıldı.



Şekil 4.5. Farklı veritabanlarının kullanımı ile pankreas kanseri hücre hatlarının bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyet bilgisinin AUC parametresi ile belirlenmesi: A) GDSC veritabanı B) CTRP veritabanı.

4.3. Pankreatik Kanser Hücre Hatlarının Bortezomib Hassasiyetlerinin *in vitro* Koşulda Belirlenmesi

BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarının bortezomib ilacına gösterdikleri hassasiyet IC_{50} doz miktarı temelinde hücre canlılık grafiği çizilerek belirlendi. BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatları 0.25-192 nM doz aralığında bortezomib ilacı ile 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yapılan hücre canlılık tayini sonucunda bortezomib ilacına ait IC_{50} doz miktarının, BxPC-3 hücre hattında 6.616 nM ve MIA PaCa-2 hücre hattında 4.696 nM olduğu belirlendi (Şekil 4.6.).

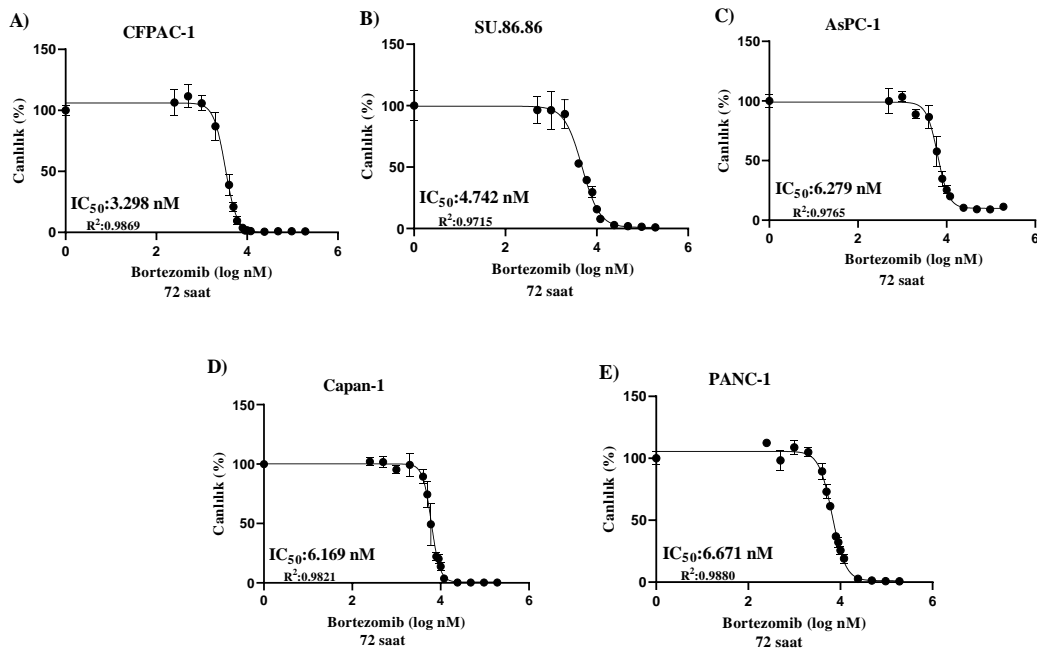


Şekil 4.6. Bortezomib ilacına ait 72 saatlik inkübasyon sonunda A) BxPC-3 B) MIA PaCa-2 hücre hatlarında belirlenen IC_{50} doz miktarları. Grafikler ortalama \pm standart sapma değerleri temel alınarak oluşturuldu (n=3).

Yapılan *in vitro* çalışma sonucuna göre MIA PaCa-2 hücre hattının BxPC-3 hücre hattına kıyasla bortezomib ilacına karşı daha hassas bir profil sergilediği gözlemlendi. Fakat BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarına ait IC_{50} doz miktarları arasındaki farkın 2 nM'dan az olmasından dolayı bu iki hücre hattının bortezomib ilacına karşı sergiledikleri hassasiyetin benzer seviyede olduğu anlaşıldı.

Bortezomib ilacına karşı dirençli hücre hattının belirlenebilmesi için daha sonra laboratuvarımızda bulunan diğer tüm pankreatik kanser hücre hatlarına ait IC_{50} doz tayini yapıldı. Bu hücre hatlarından CFPAC-1, SU.86.86, AsPC-1, Capan-1 ve PANC-1 aynı şekilde 0.25-192 nM doz aralığında bortezomib ilacı ile 72 saat boyunca muamele edildi (Şekil 4.7.). Deney sonucunda elde edilen IC_{50} dozları incelendiğinde 3.298 nM ile bortezomibe karşı en hassas yanıt veren hücre hattının CFPAC-1 olduğu anlaşılırken (Şekil 4.7.A), en dirençli profil sergileyen hücre hattının 6.671 nM ile

PANC-1 hücre hattı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7.E). Fakat taranan toplam yedi hücre hattı incelendiğinde en yüksek ve en düşük IC_{50} değerleri arasındaki farkın 3.5 nM'dan az ve birbirine yakın değerler oldukları anlaşıldı. Hücre hatları arasındaki IC_{50} doz farklarının azlığı sebebi ile *in vitro* bulgularımız temelinde bortezomibe hassas ve dirençli olarak sınıflandırılabilir hücre hatları belirlenemedi. Bu nedenle çalışmaya *in vitro* koşullarda elde edilen ortalama IC_{50} değerine sahip hücre hatlarından BxPC-3 ve MIA PaCa-2 seçilerek çalışmalar tek hücre hattı ile sınırlandırılmayıp bu iki hücre hattı üzerinden ilerletildi.



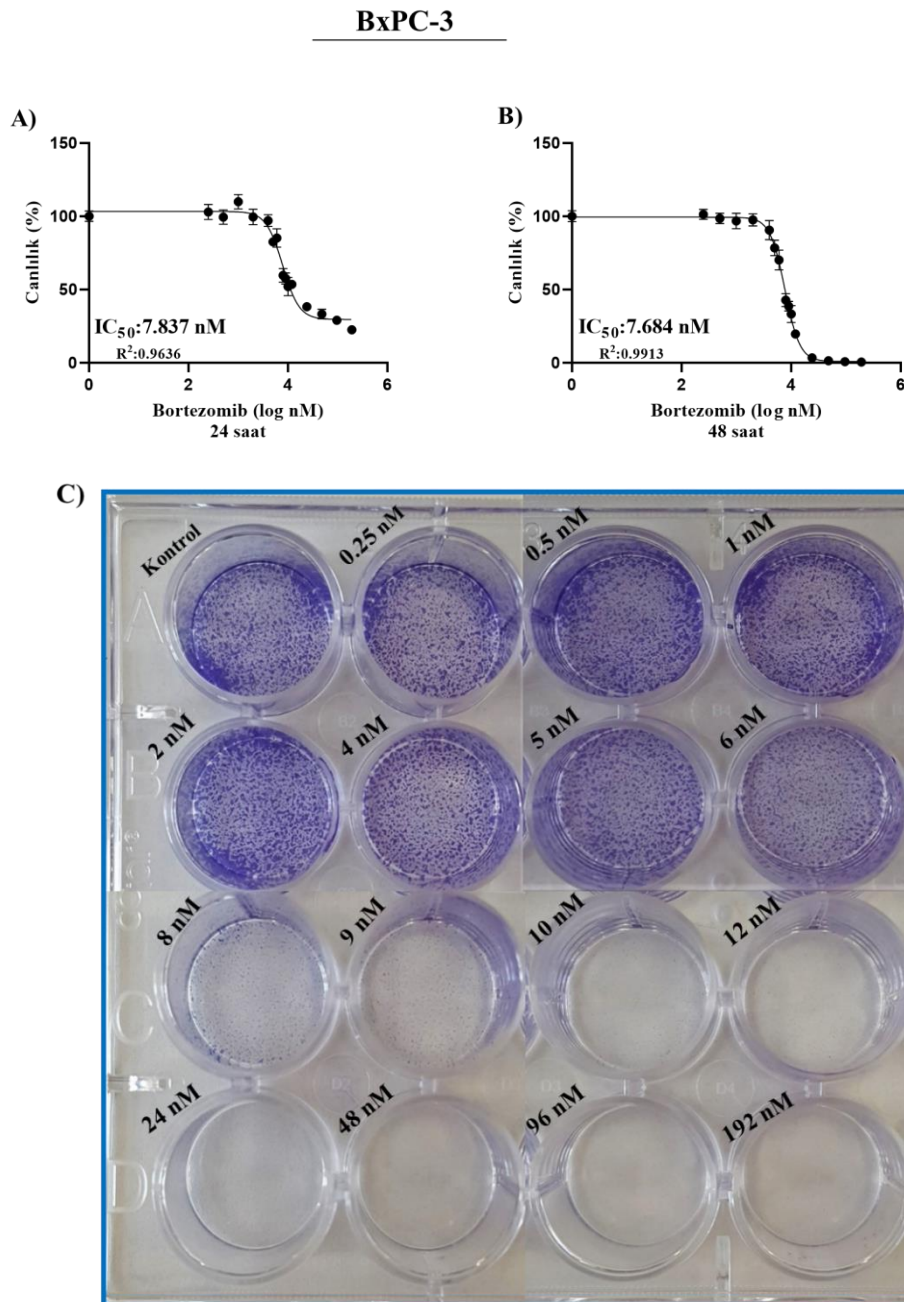
Şekil 4.7. Bortezomib ilacına ait 72 saatlik inkübasyon sonunda A) CFPAC-1 B) SU.86.86 C) AsPC-1 D) Capan-1 E) PANC-1 hücre hatlarında belirlenen IC_{50} doz miktarları. Grafikler ortalama \pm standart sapma değerleri temel alınarak oluşturuldu ($n=3$).

4.4. BxPC-3 ve MIA PaCa-2 Hücre Hattında Bortezomib ve İmatinib İlaçlarına Ait IC_{50} Doz Miktarlarının Farklı İnkübasyon Sürelerinde Belirlenmesi

Bu iki ilaç kombinasyonunun hücreler üzerindeki farklı etkilerinin incelenmesi amacıyla öncelikle farklı inkübasyon sürelerinde IC_{50} doz miktarları belirlendi. BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatları bortezomib ilacı ile 0.25-192 nM'lık doz aralığında 24, 48 saat boyunca inkübe edildi. İmatinib ilacı için BxPC-3 hücre hattı 0.25-192 μ M'lık

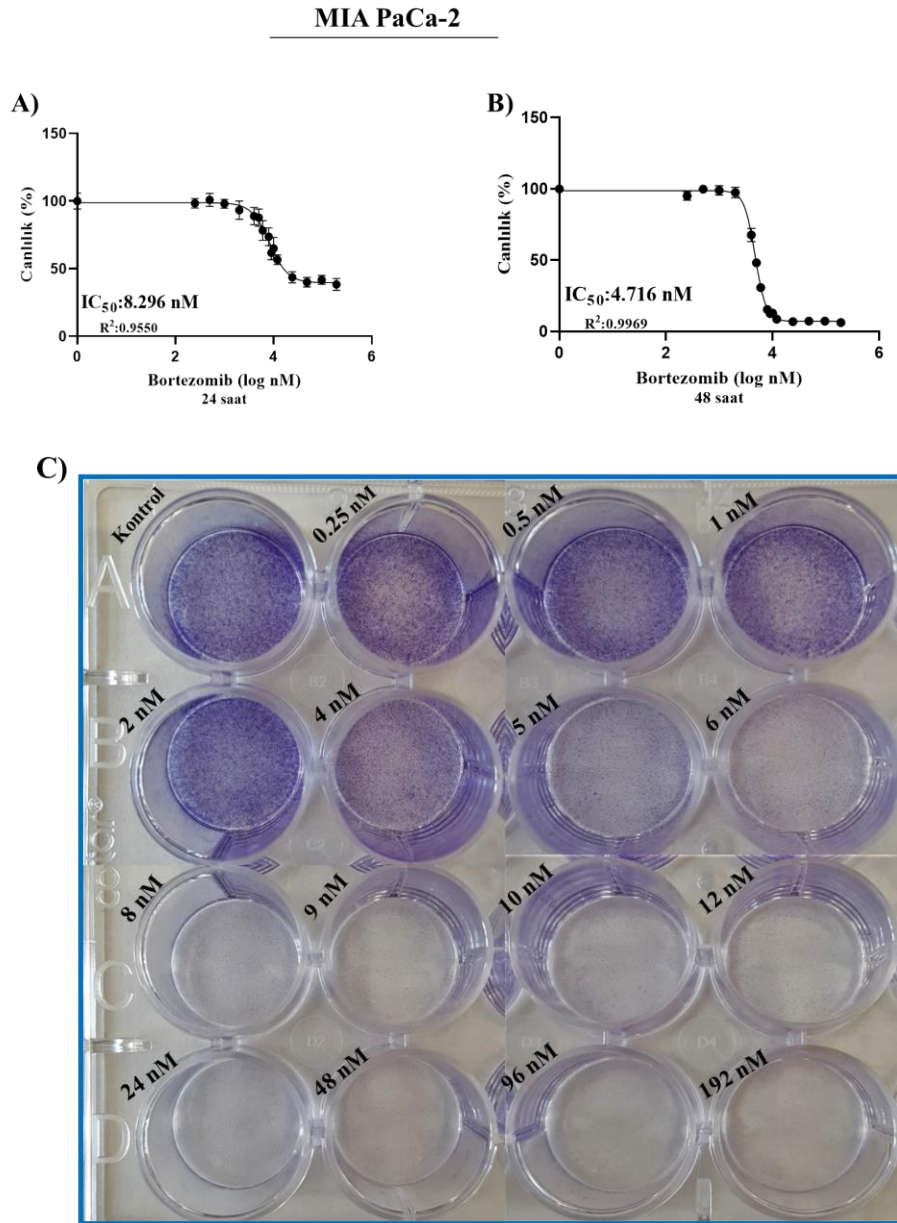
doz aralığında ve MIA PaCa-2 hücre hattı 1-100 uM doz aralığında 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücre canlılık tayin yöntemi ile IC₅₀ doz miktarları belirlendi. Ayrıca 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücreler kristal viyole ile boyanarak uygulanan dozların hücre canlılığı üzerine etkileri görsel olarak gösterildi.

Yapılan deneyler sonucunda BxPC-3 hücre hattında bortezomibe ait IC₅₀ doz miktarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde sırasıyla 7.837 nM ve 7.684 nM olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8.).



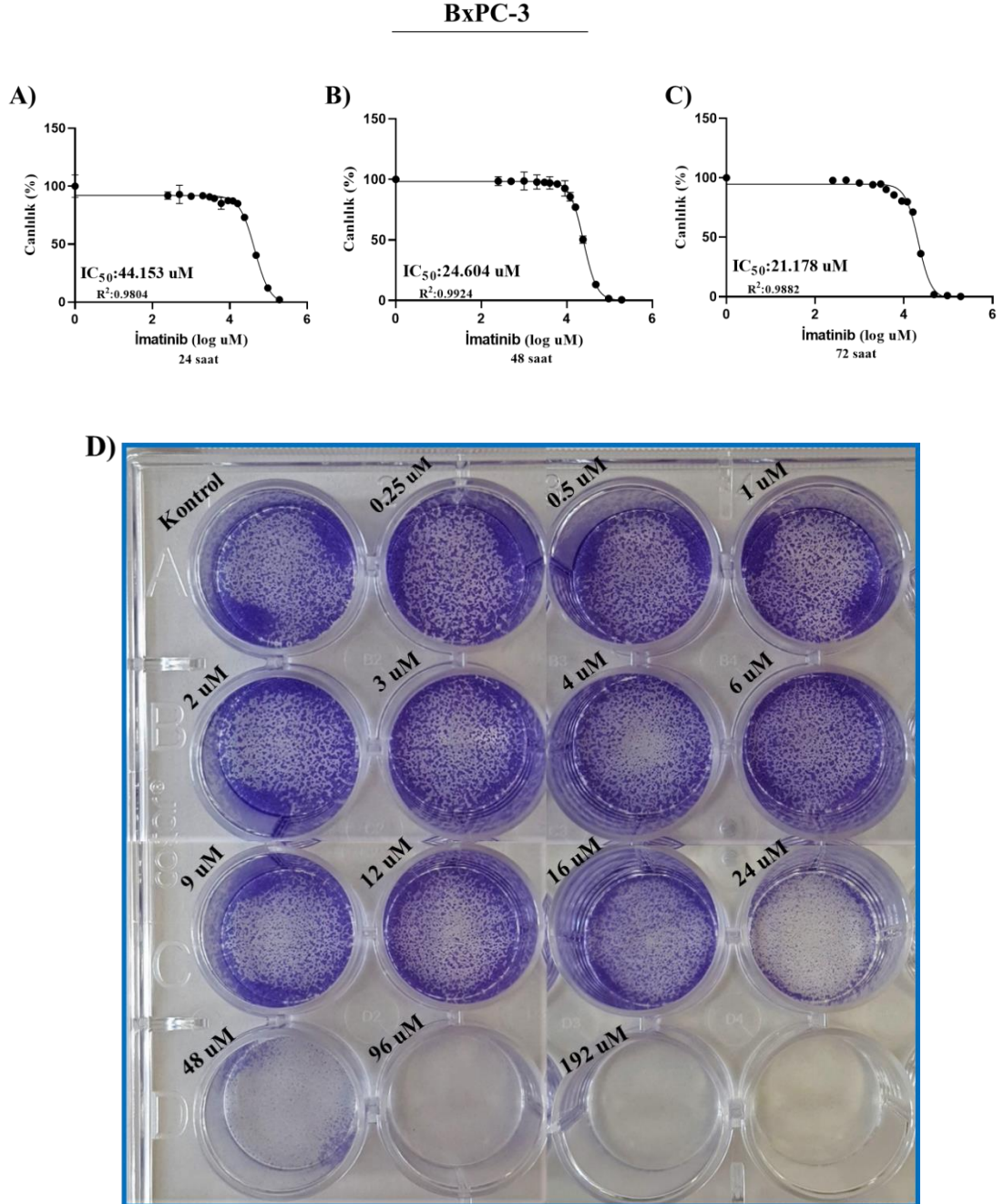
Şekil 4.8. BxPC-3 hücre hattında bortezomib ilacına ait IC_{50} doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü.

MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomibe ait IC_{50} doz miktarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda sırasıyla 8.296 nM ve 4.716 nM olduğu tespit edildi (Şekil.4.9.).



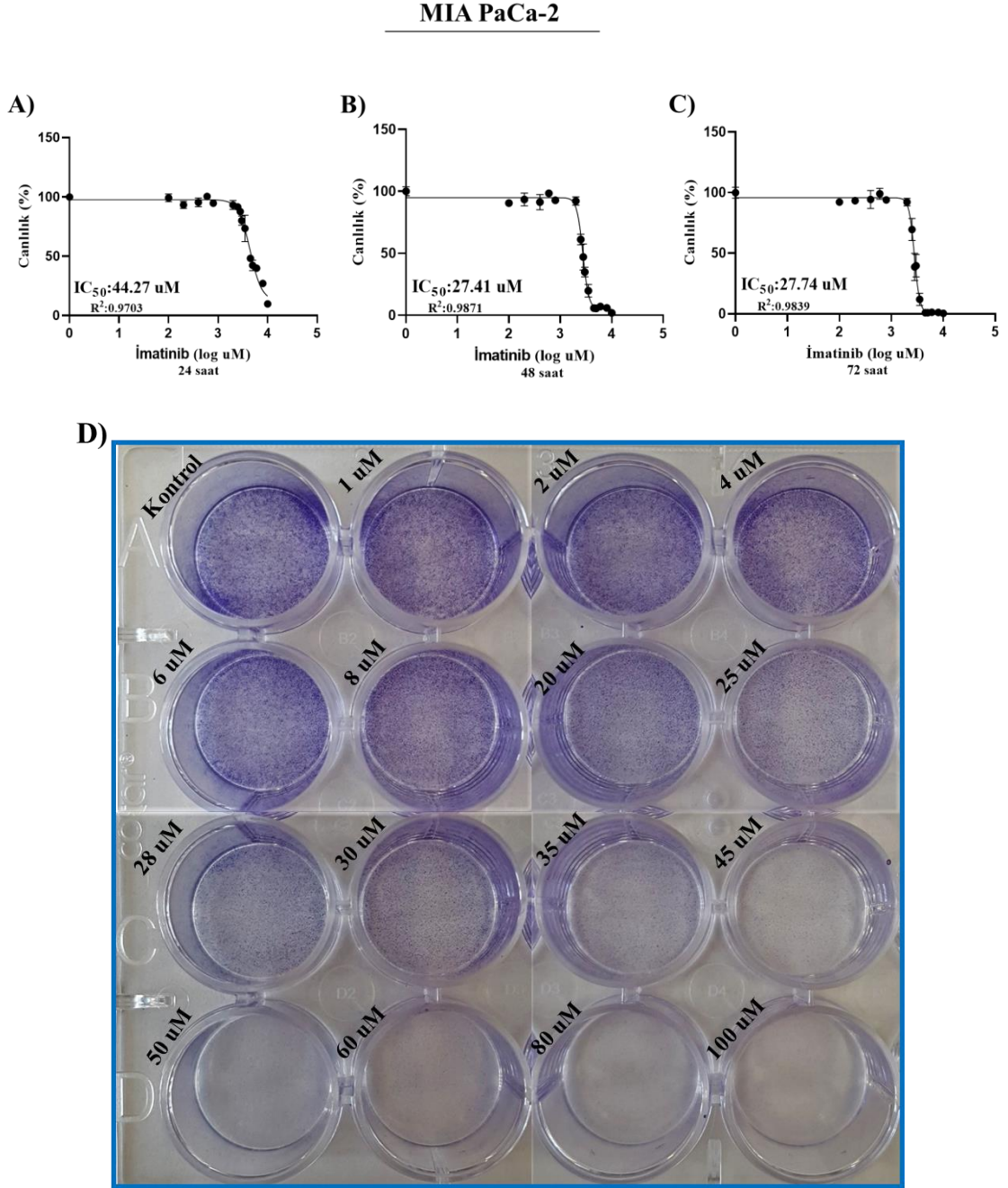
Şekil 4.9. MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ilacına ait IC_{50} doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü.

BxPC-3 hücre hattında imatinib ilacına ait IC_{50} doz miktarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda sırasıyla 44.153 μ M, 24.604 μ M ve 21.178 μ M olduğu belirlendi (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. BxPC-3 hücre hattında imatinib ilacına ait IC_{50} doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü.

MIA PaCa-2 hücre hattında imatinib ilacına ait IC_{50} doz miktarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda sırasıyla 44.27 μ M, 27.41 μ M ve 27.74 μ M olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11).

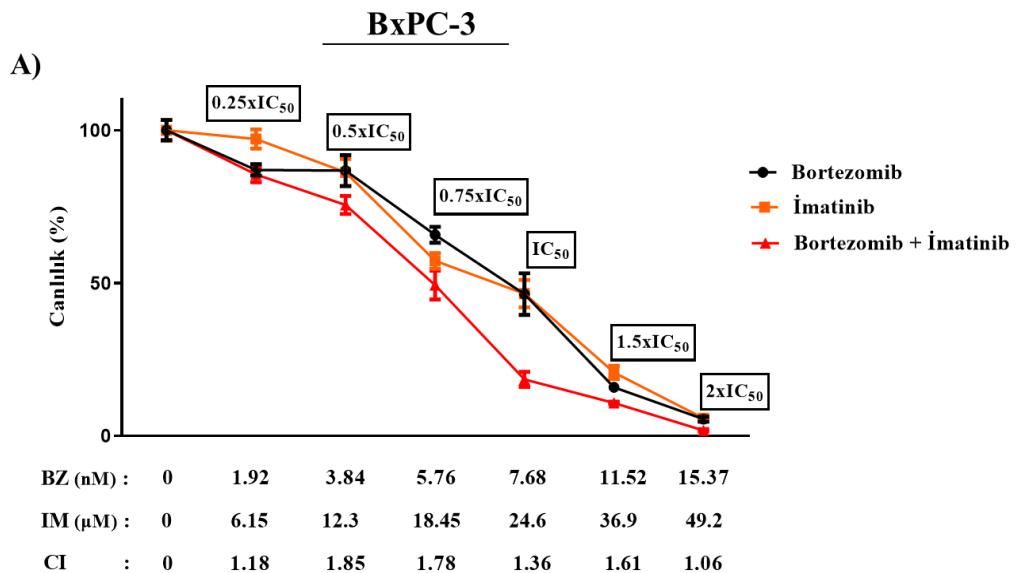


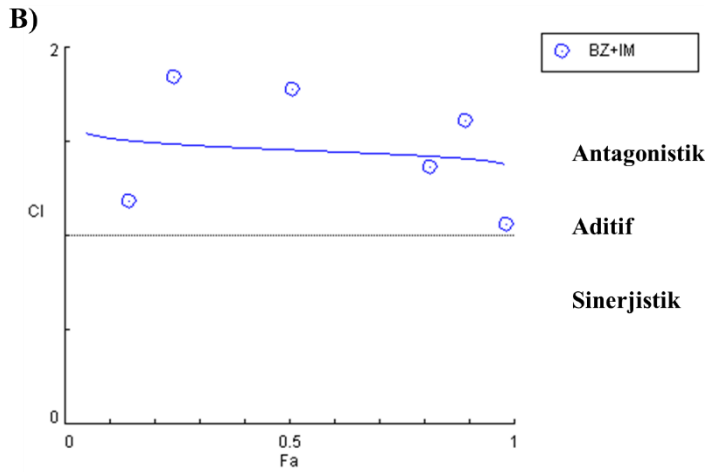
Şekil 4.11. MIA PaCa-2 hücre hattında imatinib ilacına ait IC_{50} doz miktarı A) 24 saatlik inkübasyon (n=3) B) 48 saatlik inkübasyon (n=3) C) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kristal viyole boyama görüntüsü.

4.5. Bortezomib ve İmatinib İlaç Kombinasyonunun BxPC-3 ve MIA PaCa-2 Hücre Hatları Üzerindeki Olası Sinerjistik Etkisinin İncelenmesi

Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için kombinasyon deneyleri düzenlendi. Bu etkinin incelenmesi amacıyla BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarına ait 48 saatlik inkübasyon süresi sonucunda belirlenen IC_{50} doz miktarları kullanıldı. İlk olarak deney sonucunda elde edilen verinin analizi için kullanılan CompuSyn yazılımının kullanıcı yönergesinde belirtildiği şekilde her iki ilaç için IC_{50} dozu temel alınarak altı farklı ilaç konsantrasyonu belirlendi. Bu ilaç konsantrasyonları hem tek başlarına hem de birlikte olacak şekilde 48 saatlik inkübasyon süresinde hücrelere uygulandıktan sonra ilaçlar arasında oluşan etki incelendi. BxPC-3 hücre hattında elde edilen sonuçlar incelendiğinde bu iki ilaç kombinasyonunun sinerjistik bir etki ($CI < 1$) meydana getirmedikleri tespit edildi (Şekil 4.12.).

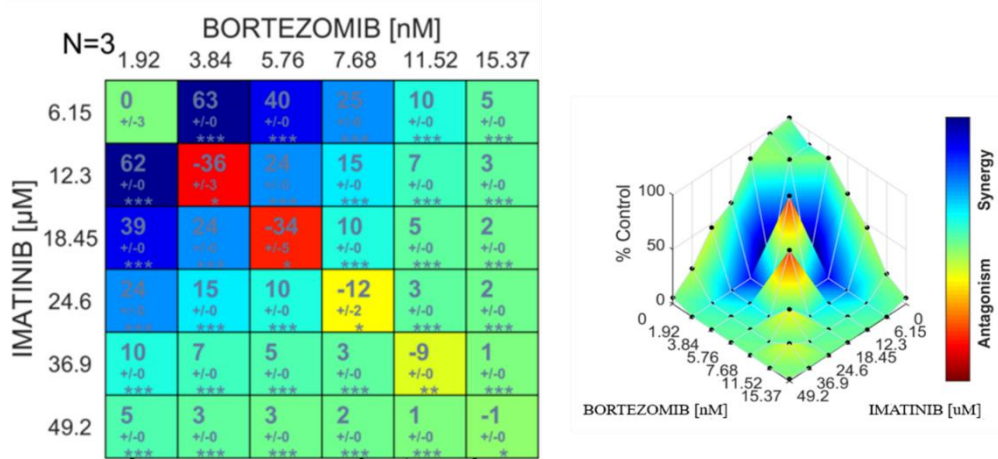
İlaçlar arasında oluşan etki ayrıca CombeneFit yazılımı kullanılarak da incelendiğinde diğer yazılım ile elde edilen sonuç ile uyumlu bir şekilde herhangi bir sinerjistik etkinin oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 4.13.).





Şekil 4.12. Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) ilaçların birlikte uygulandığı durumda 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan etkinin grafiği (n=3) B) Bortezomib ve imatinib ilaçları arasında oluşan etkinin kombinasyon index (Fa-CI) grafiği. CI: kombinasyon indeks değeri, Fa: inhibitör etki, CI<1 sinerjistik etki, CI=1 aditif etki, CI>1 antagonistik etki. Fa=0.5 hücrenin %50'sini öldüren inhibitör etki noktası.

BxPC-3

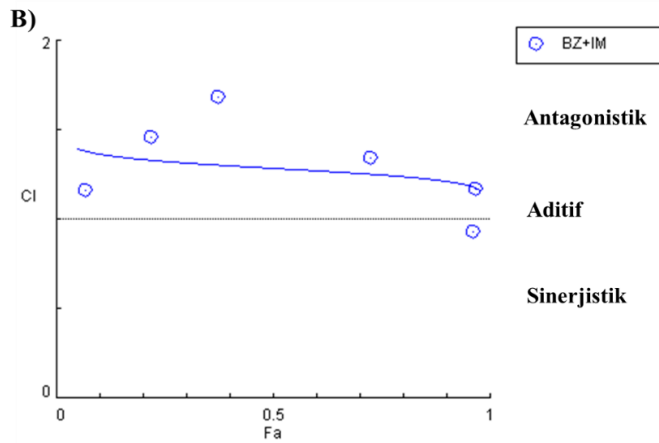
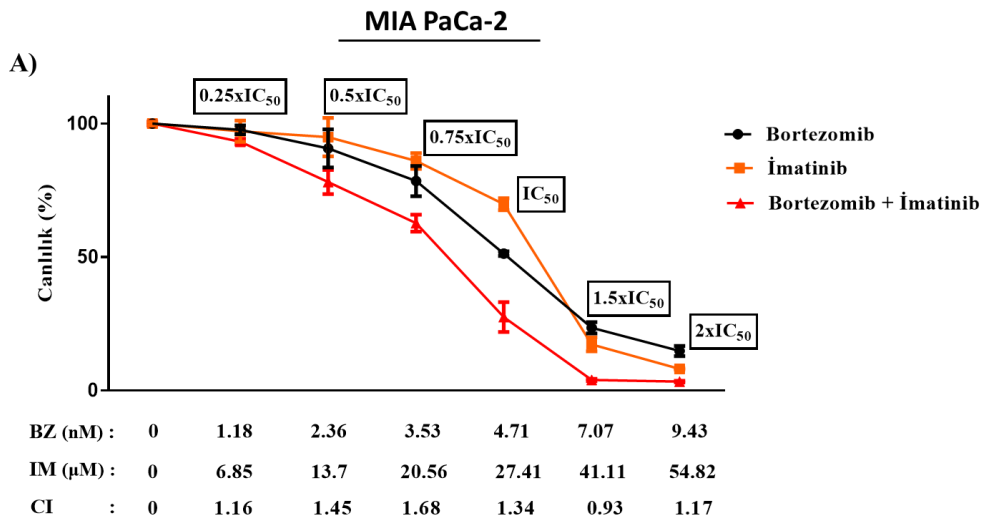


Şekil 4.13. Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkisinin Combobenefit yazılımı kullanılarak incelenmesi. Kombinasyon doz-yanıt ve referans doz yanıt kullanılarak sinerji dağılımı oluşturulmuştur ve sinerji seviyeleri matrix formatında verilmiştir. Standart sapma “+/-” ile belirtilmiştir (*p<0.05 **p<0.001 ***p<10⁻⁴).

Yapılan aynı deneyler MIA PaCa-2 hücre hattında incelendiğinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda bortezomib ve imatinib ilaçlarının “1.5xIC₅₀” doz

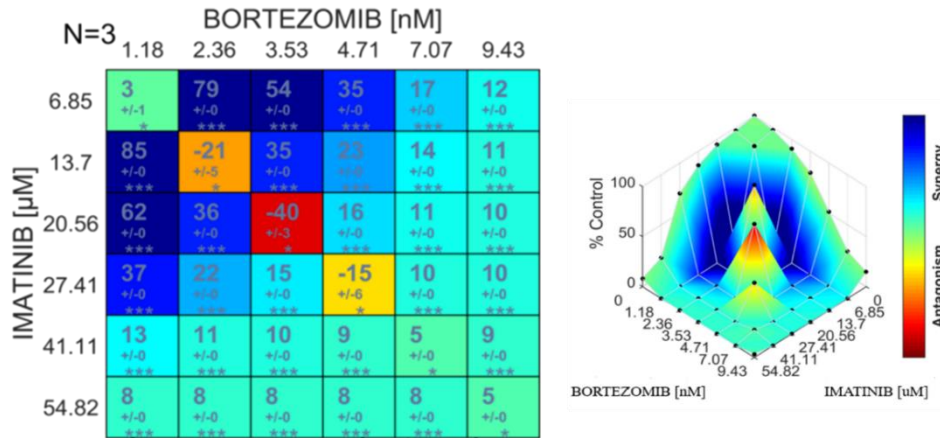
konsantrasyonunda kombine edildiği noktada sinerjistik bir etkinin ($CI < 1$) meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.14.). Fakat bu etki her ne kadar birden küçük olsa da bir değerine çok yakın olduğu için program tarafından da belirtildiği üzere kısmen aditif olarak değerlendirildi (Bkz EK-1).

Combenefit yazılımından elde edilen sonuçlar incelendiğinde de diğer yazılımda gözlenen sonuç ile uyumlu olarak ilaçların “ $1.5 \times IC_{50}$ ” doz konsantrasyonunda kombine edildiği noktada kısmen aditif etki oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.14. Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) İlaçların birlikte uygulandığı durumda 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan etkinin grafiği (n=3). B) Kombinasyon index (Fa-CI) grafiği. CI: kombinasyon indeks değeri, Fa: inhibitör etki, $CI < 1$ sinerjistik etki, $CI = 1$ aditif etki, $CI > 1$ antagonistik etki. $Fa = 0.5$ hücrenin %50'sini öldüren inhibitör etki noktası.

MIA PaCa-2



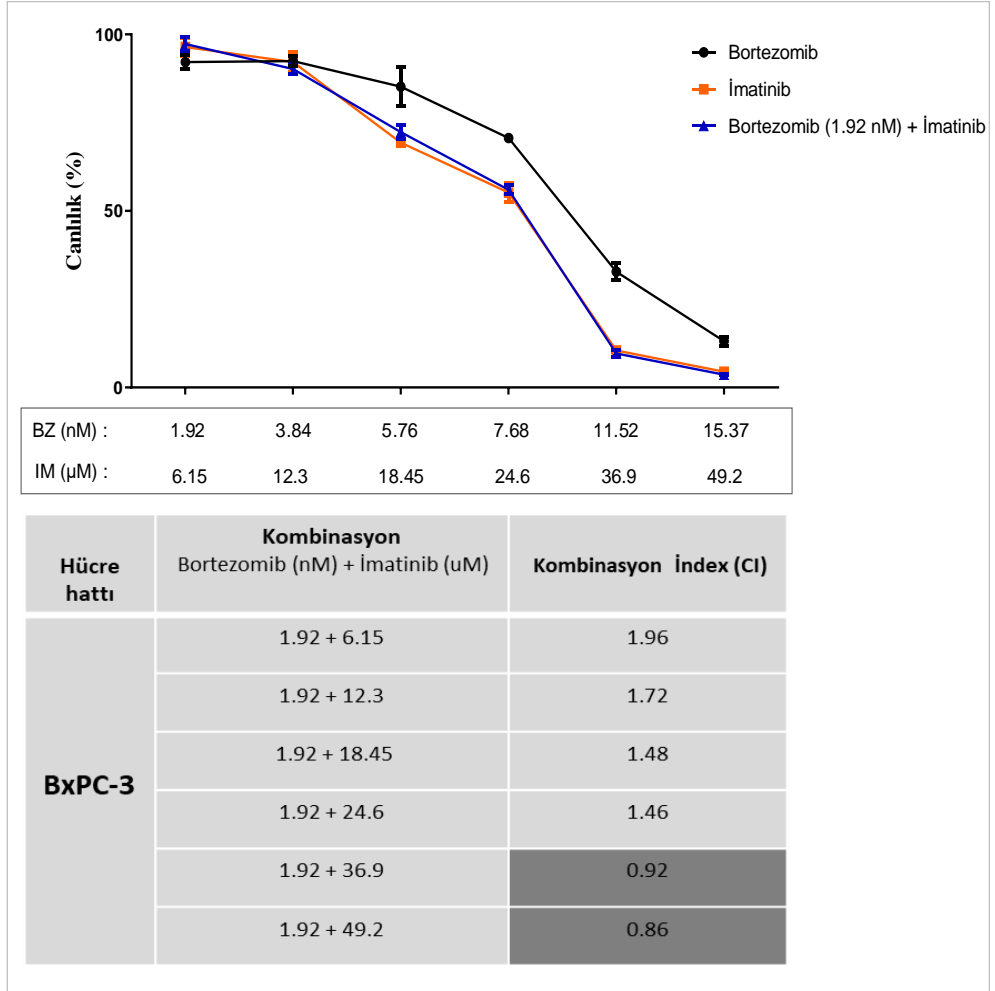
Şekil 4.15. Bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki etkisinin CombeneFit yazılımı kullanılarak incelenmesi. Kombinasyon doz-yanıt ve referans doz yanıt kullanılarak sinerji dağılımı oluşturulmuştur ve sinerji seviyeleri matrix formatında verilmiştir. Standart sapma “+/-” ile belirtilmiştir (* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$ *** $p < 10^{-4}$).

CombeneFit yazılımında deneysel olarak test edilmiş ilaç kombinasyonlarına ek olarak algoritma tarafından deneysel olarak test edilmemiş kombinasyonlar için de olası etkilerin tahmini gerçekleştirilmektedir. Dizayn edilen deney sonucunda hem BxPC-3 hem de MIA PaCa-2 hücre hattında herhangi bir sinerjistik etki oluşturan ilaç kombinasyonu bulunmadığı için yazılım tarafından önerilen sinerjistik etki oluşturabilecek olası doz kombinasyonları seçilerek deneylere devam edildi. Bu durumda sinerji matrisi grafiği incelendiğinde yazılım tarafından ilaçlardan birinin en küçük dozu ile diğer ilaca ait tüm dozlar kombine edildiğinde bazı noktalarda sinerjistik etkinin meydana gelebileceği gözlenmektedir (Şekil 4.13 ve 4.15).

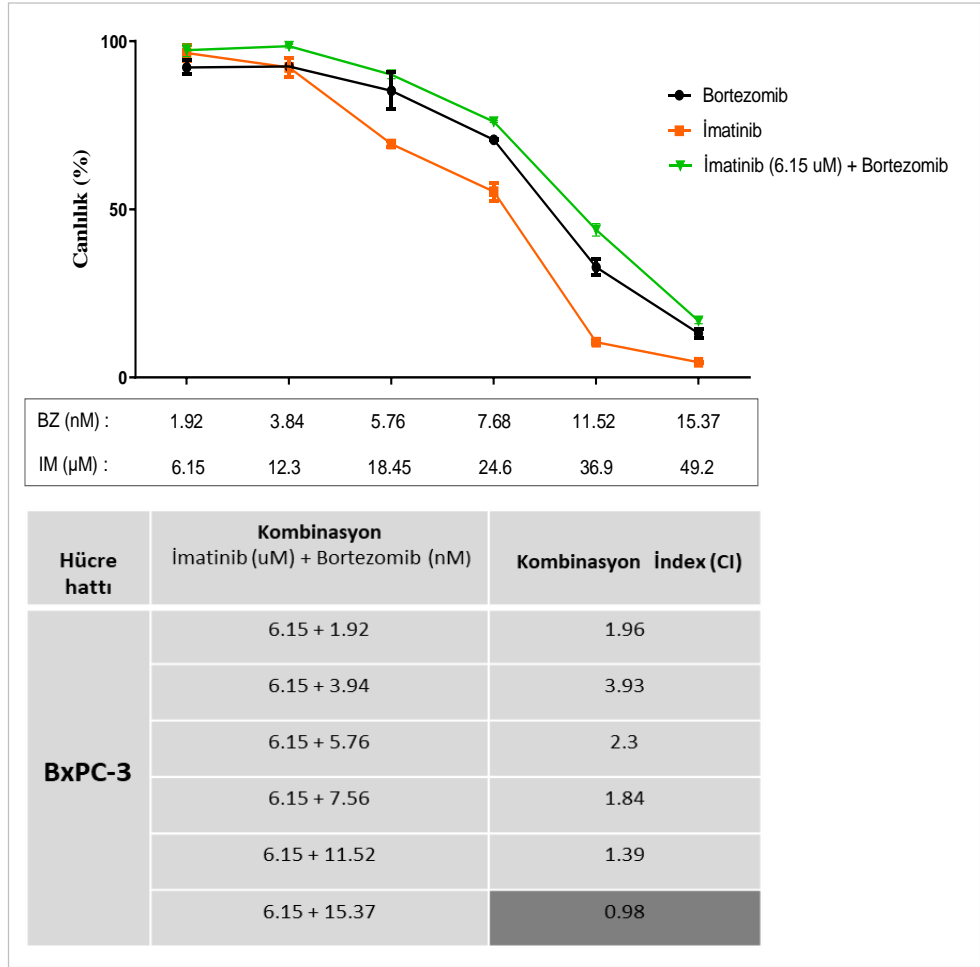
BxPC-3 hücre hattı için en yüksek sinerji seviyelerinin tahmin edildiği dozları kapsayacak şekilde bortezomib ilacının 1.92 nM’da sabit tutulup imatinib ilacının 6.15-49.2 uM doz aralığında kombine edileceği (Şekil 4.13, birinci sütun) ve imatinibin 6.15 uM’da sabit tutulup bortezomibin 1.92-15.37 nM doz aralığında kombine edileceği (Şekil 4.13, birinci satır) deneyler hazırlandı. Deney sonucunda üç farklı ilaç kombinasyonunda sinerjistik etkinin ($CI < 1$) meydana geldiği gözlemlendi. Bu kombinasyonlar; 1.92 nM bortezomib+36.9 uM imatinib ($CI=0.92$) (Şekil 4.16.A), 1.92 nM bortezomib+49.2 uM imatinib ($CI=0.86$) (Şekil 4.16.A) ve 6.15 uM imatinib+15.37 nM bortezomib ($CI=0.98$) şeklindedir (Şekil 4.16.B). Fakat bu

kombinasyonlara ait CI değerleri her ne kadar birden küçük olsa da bu üç noktadan ikisinde yine kısmen aditif etki, birinde ise zayıf sinerjik etkinin meydana geldiği anlaşıldı.

A)



B)

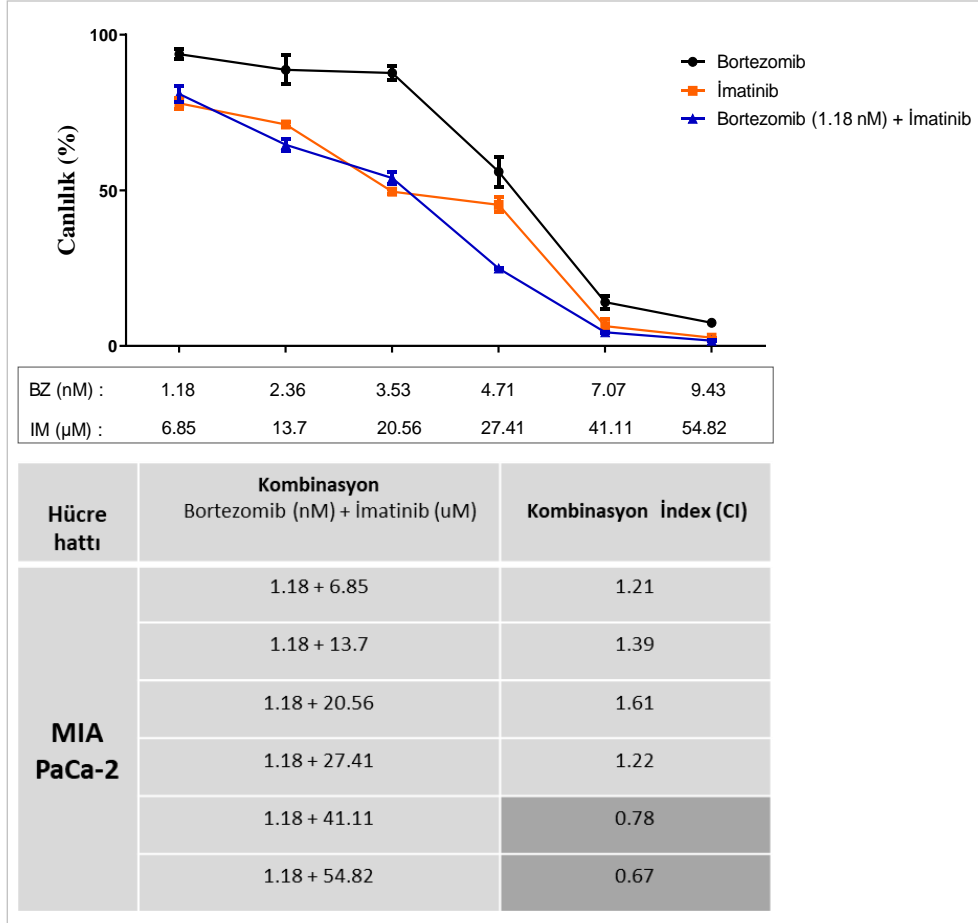


Şekil 4.16. Combeneft yazılımına göre belirlenen bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucunda BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) Bortezomibin 1.92 nM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken imatinib konsantrasyonunun değiştiği koşul B) İmatinibin 6.15 uM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken bortezomib konsantrasyonunun değiştiği koşul. $CI < 1$ sinerjistik etki, $CI = 1$ aditif etki, $CI > 1$ antagonistik etki.

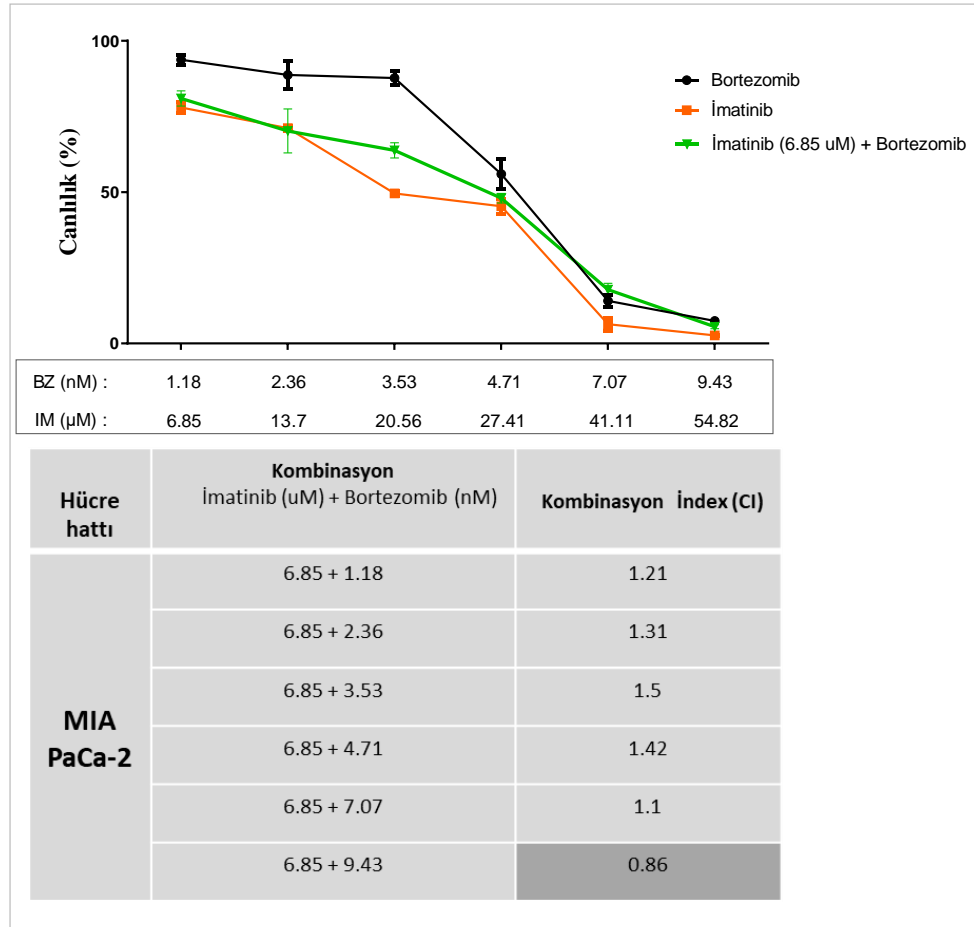
MIA PaCa-2 hücre hattı için en yüksek sinerji seviyelerinin tahmin edildiği dozları kapsayacak şekilde bortezomib ilacının 1.18 nM'da sabit tutulup imatinib ilacının 6.85-54.82 uM doz aralığında kombine edileceği (Şekil 4.15, birinci sütun) ve imatinibin 6.85 uM'de sabit tutulup bortezomibin 1.18-9.43 nM doz aralığında kombine edileceği (Şekil 4.15, birinci satır) deneyler hazırlandı. Deney sonucunda üç farklı ilaç kombinasyon noktasında sinerjistik etkinin ($CI < 1$) meydana geldiği gözlemlendi. Bu kombinasyonlar; 1.18 nM bortezomib+41.11 uM imatinib ($CI=0.78$)

(Şekil 4.17.A), 1.18 nM bortezomib+54.82 uM imatinib (CI=0.67) (Şekil 4.17.A) ve 6.85 uM imatinib+9.43 nM bortezomib (CI=0.86) şeklindedir (Şekil 4.17.B).

A)



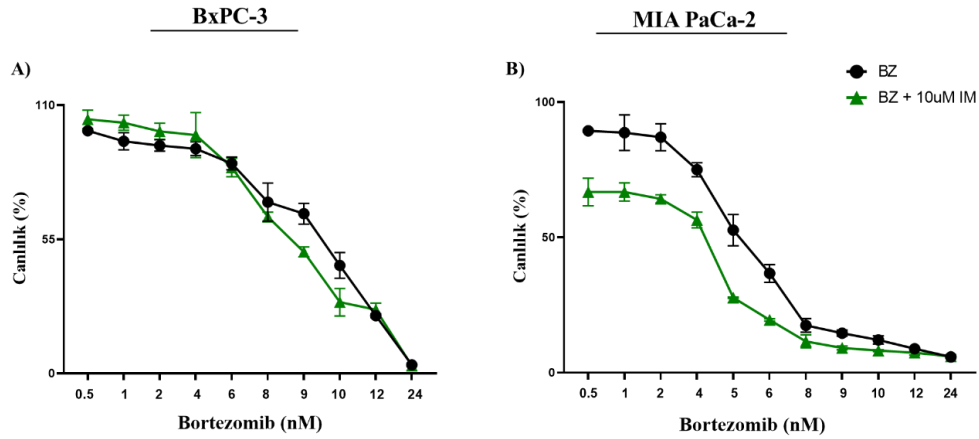
B)



Şekil 4.17. Combenefit yazılımına göre belirlenen bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucunda MIA PaCa-2 hücre hattı üzerindeki etkisinin CompuSyn yazılımı kullanılarak incelenmesi: A) Bortezomibin 1.18 nM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken imatinib konsantrasyonunun değiştiği koşul B) İmatinibin 6.85 uM doz konsantrasyonunda sabit tutulurken bortezomib konsantrasyonunun değiştiği koşul. $CI < 1$ sinerjistik etki, $CI = 1$ aditif etki, $CI > 1$ antagonistik etki.

İlaç kombinasyonlarının oluşturdukları etkinin incelenmesine yönelik yapılan deneylere ek olarak imatinib ilacının hücrelerin bortezomib ilacına verdikleri yanıtta bir hassasiyete yol açıp açmadığının incelenmesi için de BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarına hem tek başına bortezomib ilacı uygulandı hem de bu koşula 10 uM konsantrasyonunda imatinib eklendi. Deney ortamına imatinib ilacının eklediği koşul ile bortezomib ilacının tek başına uygulandığı koşula ait hücre canlılık grafikleri çizilerek bu iki grafik arasındaki fark incelendi. Yapılan analiz sonucunda hem BxPC-3 hem de MIA PaCa-2 hücre hattında yalnız bortezomib ilacının uygulandığı koşul ile ilaçların kombine edildiği koşula ait büyüme eğrileri arasında istatistiksel olarak

anlamli fark olduğu belirlendi ve imatinib ilacının varlığında hücre canlılığında azalma meydana geldiği gözlemlendi ($p < 0.001$) (Şekil 4.18.A-B). Fakat BxPC-3 hücre hattına ait eğriler incelendiğinde, eğrilerin yönü açısından anlamlı bir değişim gözlenmediği için bu hücre hattında bortezomibe karşı verilen yanıtta imatinib ilacının hassasiyete yol açmadığı sonucuna varıldı (Şekil 4.18.A).



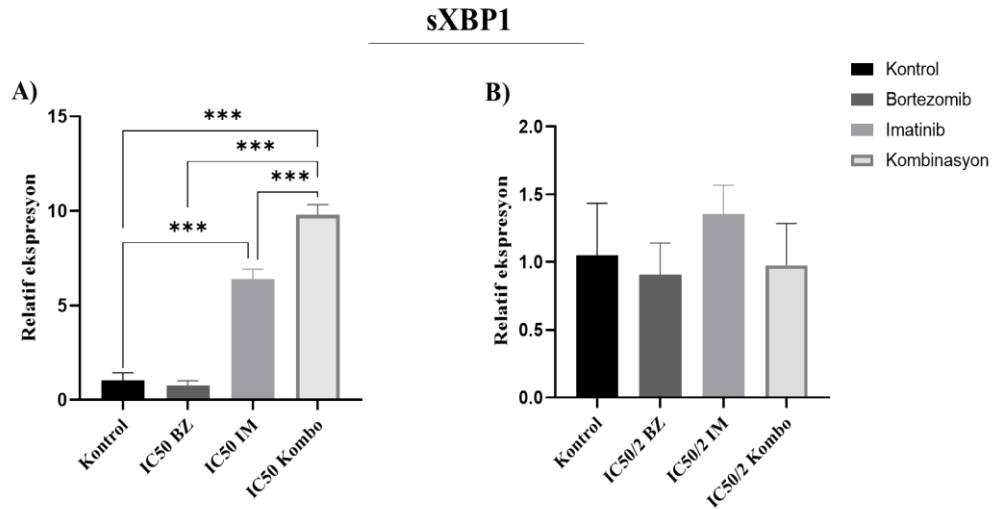
Şekil 4.18. İmatinib ilacının 48 saatlik inkübasyon sonucunda pankreas kanseri hücre hatlarında bortezomib ilacına karşı hassasiyet oluşturup oluşturmadığının incelenmesi: A) BxPC-3 hücre hattı B) MIA PaCa-2 hücre hattı.

4.6. Bortezomib ve İmatinib İlaçlarının ER Stres Aktivasyonu Üzerindeki Etkilerinin Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması

Tez çalışması kapsamında kullanılan bortezomib ve imatinib ilaçlarının pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin ER stres aktivasyonu üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği ve bu iki ilacın kombine edildiği durumda ER stres şiddetinde bir artışa yol açılıp açılmadığı araştırıldı. Bunun için ER stres varlığında devreye giren KPY mekanizmasında görevli proteinlerden IRE1 α tarafından kesilip aktive olan sXBP1'in transkript seviyesi incelendi. İlgili incelemenin yapılması için bortezomib ve imatinib ilaçlarına ait BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında 24 saatlik inkübasyon sonucunda hesaplanan IC₅₀ doz konsantrasyonları temel alındı. Çalışmada ilaçların IC₅₀ dozları ve bu dozun yarısı olacak şekilde hem tek başlarına hem de kombinasyonları kullanıldı.

BxPC-3 hücre hattında ilaçların IC₅₀ doz miktarında uygulandığı koşullarda sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde;

- kontrol grubuna kıyasla imatinib varlığında istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (**p<0.001) (Şekil 4.19.A).
- kontrol grubuna kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (**p<0.001) (Şekil 4.19.A).
- bortezomibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (**p<0.001) (Şekil 4.19.A).
- imatinibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi (**p<0.001) (Şekil 4.19.A).



Şekil 4.19. BxPC-3 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. A) IC₅₀ doz miktarında B) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulamasına ait sonuçlar.

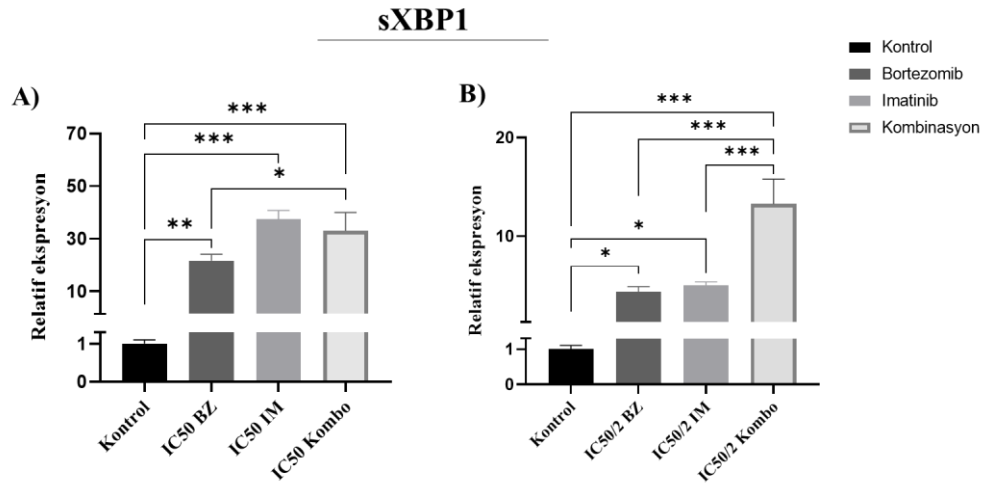
BxPC-3 hücre hattında ilaçların IC₅₀/2 doz miktarında uygulandığı koşullarda sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmedi (Şekil 4.19.B).

MIA PaCa-2 hücre hattına bakıldığında ilaçların IC₅₀ doz miktarında uygulandığı koşullarda sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde;

- kontrol grubuna kıyasla bortezomib varlığında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (** $p < 0.01$) (Şekil 4.20.A).
- kontrol grubuna kıyasla imatinib varlığında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi (** $p < 0.001$) (Şekil 4.20.A).
- kontrol grubuna kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (** $p < 0.001$) (Şekil 4.20.A).
- bortezomibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.20.A).

MIA PaCa-2 hücre hattında ilaçların $IC_{50}/2$ doz miktarında uygulandığı koşullarda sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde;

- kontrol grubuna kıyasla bortezomib varlığında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.20.B).
- kontrol grubuna kıyasla imatinib varlığında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4.20.B).
- kontrol grubuna kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (** $p < 0.001$) (Şekil 4.20.B).
- bortezomibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (** $p < 0.001$) (Şekil 4.20.B).
- imatinibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (** $p < 0.001$) (Şekil 4.20.B).



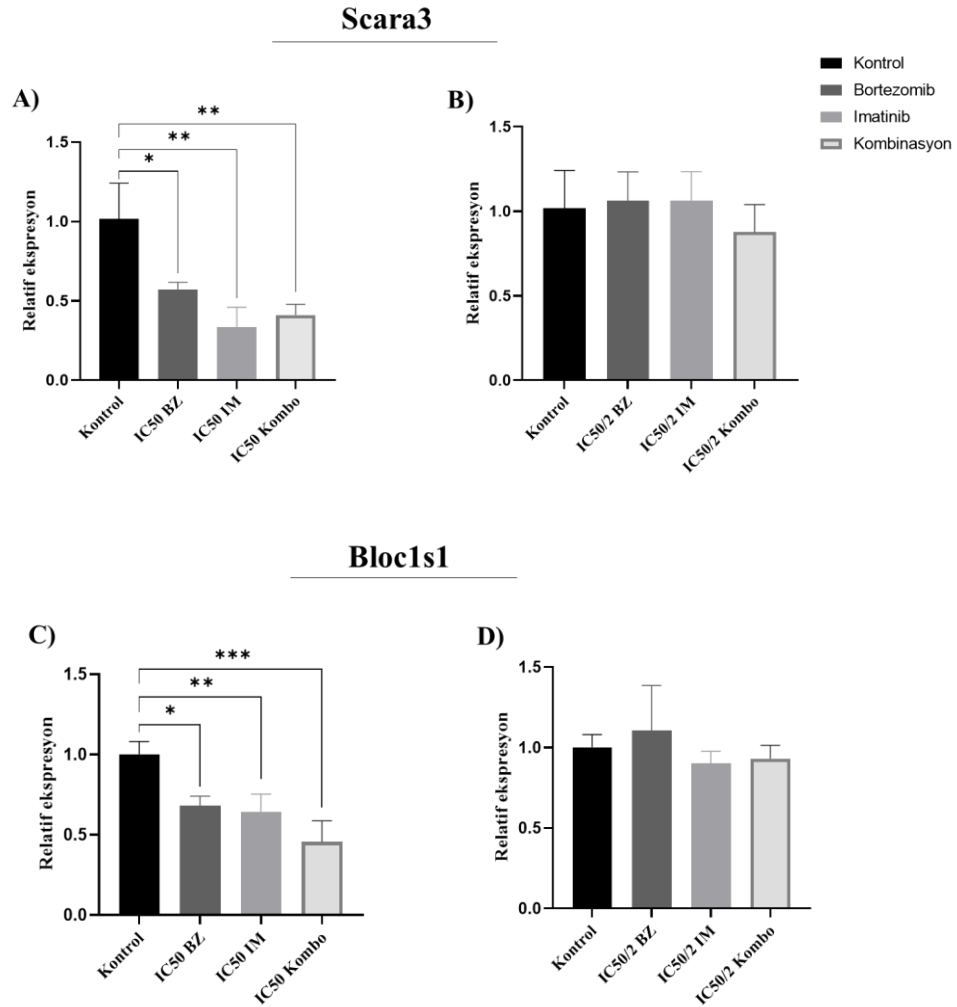
Şekil 4.20. MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. A) IC₅₀ doz miktarında B) IC_{50/2} doz miktarında ilaç uygulamasına ait sonuçlar.

Literatürde var olan bilgi doğrultusunda imatinib ilacının yine IRE1 α üzerinden düzenlenen RIDD mekanizmasını engelleyerek belirli mRNA'ların kesimini engellediği ve böylece ER strese yol açabildiği gösterilmiştir (36). İmatinibin RIDD mekanizması üzerindeki olası etkisinin araştırılması amacıyla RIDD mekanizmasının hedef mRNA'larından Scara3 ve Bloc1s1 genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi (200). Ayrıca imatinib ilacına ek olarak, literatürde bortezomibin RIDD mekanizması üzerinde bir etkisinin olup olmadığına dair bir bilgi bulunmadığı için de çalışmalara hem bortezomib hem de imatinib ilaçları kullanılarak devam edildi. Gerekli çalışmanın yapılması için bortezomib ve imatinib ilaçlarına ait BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında 24 saatlik inkübasyon sonucunda hesaplanan IC₅₀ doz konsantrasyonları temel alındı. Çalışmada ilaçların IC₅₀ dozları ve bu dozun yarısı olacak şekilde hem tek başlarına hem de kombinasyonları kullanıldı.

BxPC-3 hücre hattında ilaçların IC₅₀ doz miktarında uygulandığı koşullarda Scara3 geninin ekspresyon seviyesinde;

- kontrol grubuna kıyasla bortezomib varlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlendi (*p<0.05) (Şekil 4.21.A).
- kontrol grubuna kıyasla imatinib varlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (**p<0.01) (Şekil 4.21.A).

- kontrol grubuna kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi (** $p < 0.01$) (Şekil 4.21.A).



Şekil 4.21. BxPC-3 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında RIDD hedef genlerinin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. Scara3 genine ait A) IC₅₀ doz miktarında B) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları. Bloc1s1 genine ait C) IC₅₀ doz miktarında D) IC₅₀/2 doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları.

BxPC-3 hücre hattında ilaçların IC₅₀ doz miktarında uygulandığı koşullarda Bloc1s1 geninin ekspresyon seviyesinde;

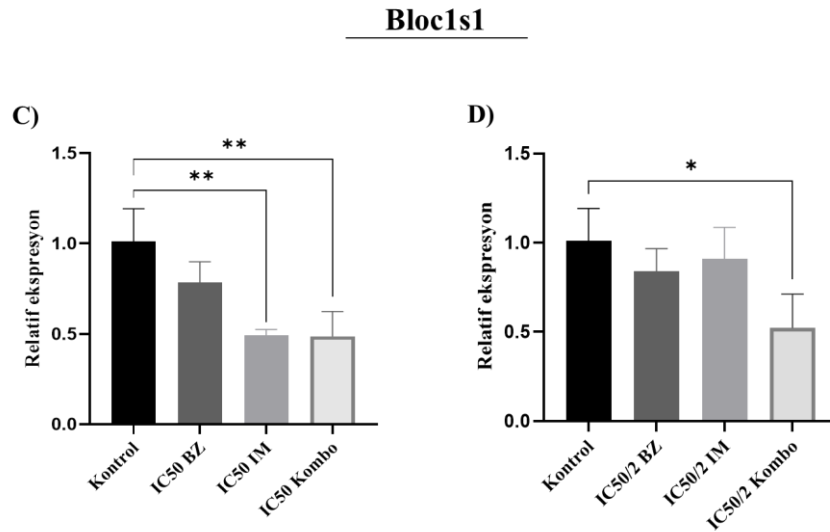
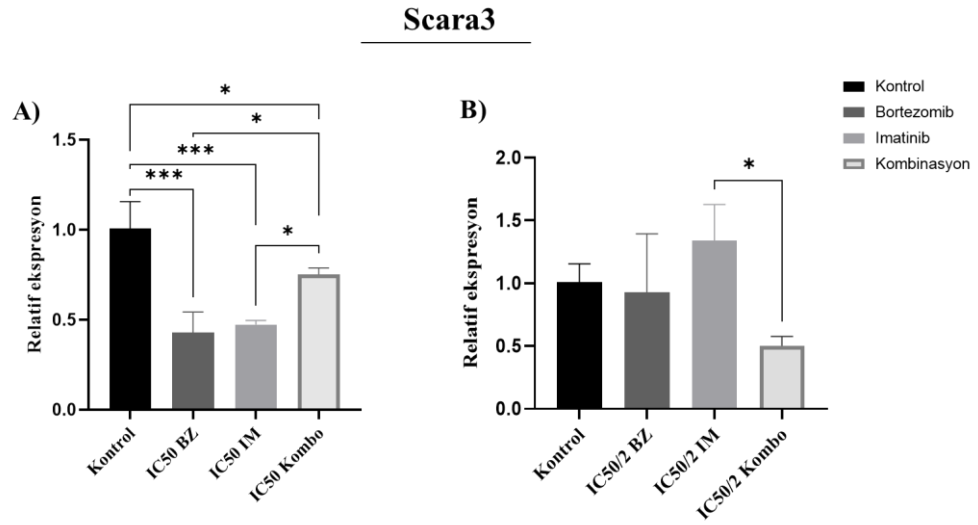
- kontrol grubuna kıyasla bortezomib varlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlendi (* $p < 0.05$) (Şekil 4.21.C).

- kontrol grubuna kıyasla imatinib varlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (** $p < 0.01$) (Şekil 4.21.C).
- kontrol grubuna kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu (** $p < 0.001$) (Şekil 4.21.C).

BxPC-3 hücre hattında ilaçların $IC_{50}/2$ doz miktarında uygulandıkları koşullarda Scara3 ve Bloc1s1 genlerinin ekspresyon düzeylerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmedi (Şekil 4.21.B ve Şekil 4.21.D).

MIA PaCa-2 hücre hattına bakıldığında ilaçların IC_{50} doz miktarında uygulandığı koşullarda Scara3 geninin ekspresyon seviyesinde;

- kontrol grubuna kıyasla bortezomib varlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlendi (** $p < 0.001$) (Şekil 4.22.A).
- kontrol grubuna kıyasla imatinib varlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (** $p < 0.001$) (Şekil 4.22.A).
- kontrol grubuna kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.22.A).
- bortezomibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.22.A).
- imatinibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.22.A).



Şekil 4.22. MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ve imatinib ilaçlarının 24 saatlik uygulanması sonrasında RIDD hedef genlerinin ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişimin qRT-PCR temelli incelenmesi. Scara3 genine ait A) IC₅₀ doz miktarında B) IC_{50/2} doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları. Bloc1s1 genine ait C) IC₅₀ doz miktarında D) IC_{50/2} doz miktarında ilaç uygulaması sonuçları.

MIA PaCa-2 hücre hattında ilaçların IC₅₀ doz miktarında uygulandığı koşullarda Bloc1s1 geninin ekspresyon seviyesinde;

- kontrol grubuna kıyasla imatinib varlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (**p<0.01) (Şekil 4.22.C).
- kontrol grubuna kıyasla bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi (**p<0.01) (Şekil 4.22.C).

MIA PaCa-2 hücre hattında ilaçların IC₅₀/2 doz miktarında uygulandığı koşullarda Scara3 geninin ekspresyon seviyesinde imatinibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken (*p<0.05) (Şekil 4.22.B), Bloc1s1 geninin ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna kıyasla ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi (*p<0.05) (Şekil 4.22.D).

Elde edilen tüm qRT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde, ilaçların doz bağımlı bir şekilde genlerin ekspresyon düzeylerinde değişim meydana getirdikleri ve bu değişim doğrultusunda bortezomib ile imatinib ilaçlarının ER stres aktivasyonuna yol açtıkları gözlemlendi. Ayrıca bu iki ilacın RIDD mekanizması üzerinde aktive edici yönde etki oluşturdukları anlaşıldı.

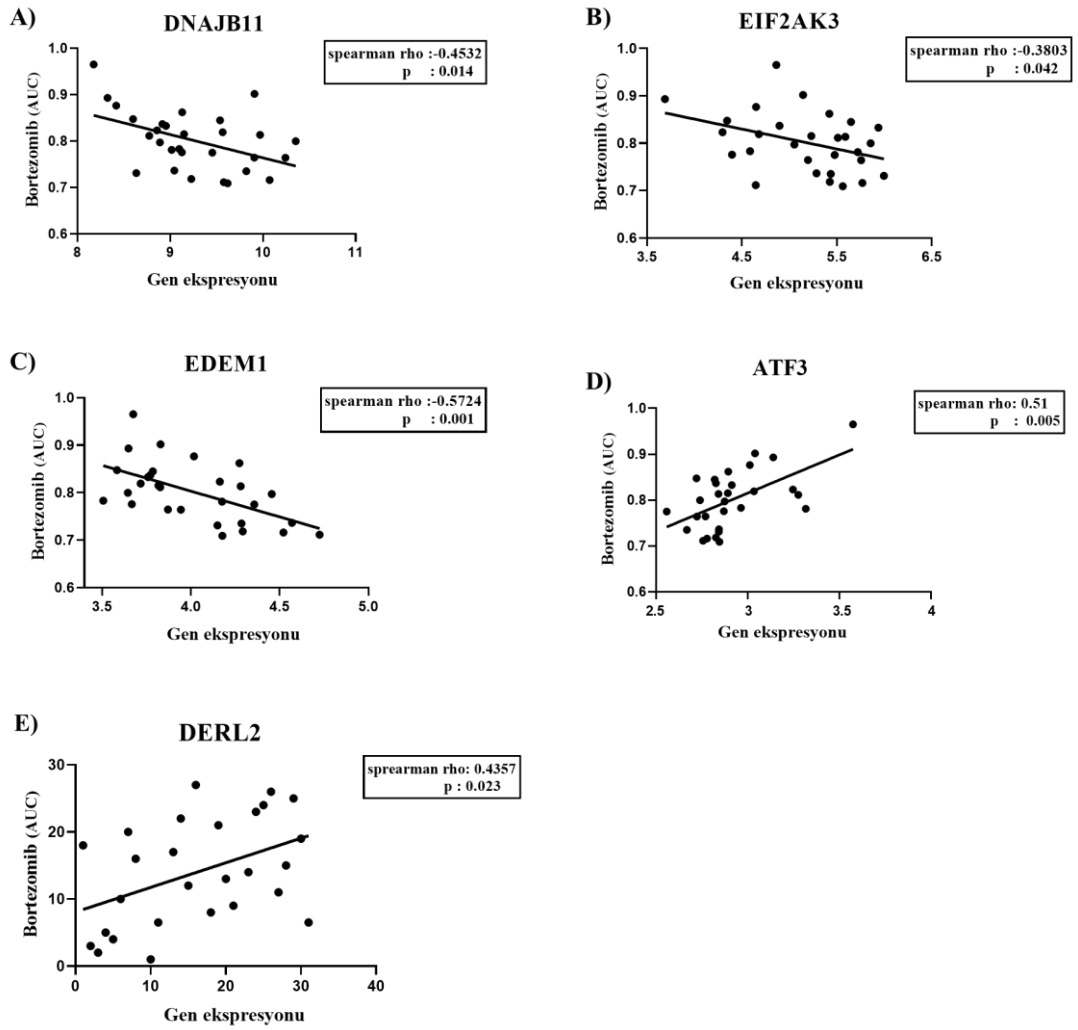
4.7. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarının Bortezomib İlacına Karşı Oluşturdukları Yanıtın ve ER Stres ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin *in silico* İncelenmesi

Pankreatik kanser hücre hatlarından BxPC-3 ve MIA PaCa-2’da bortezomib ilacına karşı verilen yanıt ile ER stres mekanizmasında yer alan genlerden sXBP1, Scara3 ve Bloc1s1 genlerinin ekspresyon seviyesindeki ilişkinin *in vitro* koşulda incelenmesine ek olarak *in silico* yöntemler ile hem bu genlerin hem de ER stres ile ilişkili diğer bilinen genlerin ekspresyon seviyesi ile bortezomib hassasiyeti arasındaki ilişkiler pankreas kanseri hücre hatlarında incelendi. Bu analizde kullanılan ER stres ile ilişkili genlerin listesi literatürde var olan bilgiler doğrultusunda belirlendi (Bkz. EK-2) (188).

Kanser hücre hatlarına ait mikrodizi verisi içeren CGP platformundan ER stres ile ilişkili genlerin pankreas kanseri hücre hatlarındaki ekspresyon verisi ile bu hücre hatlarının bortezomib ilacına karşı verdikleri yanıtın bilgisi GDSC platformundan elde edildi. Korelasyon analizi sonucunda toplam 39 genden 4 tanesinde genin ekspresyon seviyesi ile ilaca verilen yanıt (AUC) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon tespit edildi (p<0.05, rho<-0.30 veya >0.30). Bu genlerden DNAJB11 (probeset ID:11723655), EIF2AK3 (probeset ID:11722150) ve EDEM1 (probeset ID:11722261)’de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde negatif yönde korelasyon gözlenirken (sırasıyla Şekil 4.23.A-C), ATF3 (probeset numarası:11719342) geninde

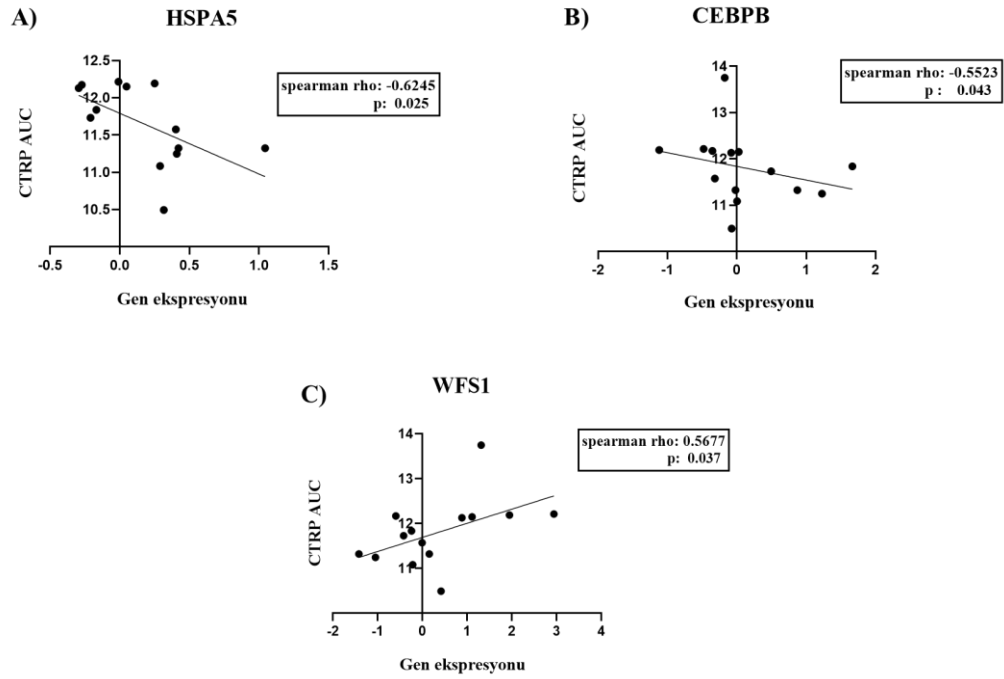
istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde pozitif yönde bir korelasyon olduğu bulundu (Şekil 4.23.D).

Bağımsız bir kanser hücre hattı veritabanı olan CCLE’de mevcut RNA sekanslama temelli gen ekspresyon seviyeleri ve CTRP platformundan elde edilen ilaç hassasiyet bilgileri kullanılarak yapılan inceleme sonucunda ise sadece DERL2 geninin ekspresyon seviyesi ile bortezomib ilacın karşı verilen yanıt arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde pozitif yönde korelasyon olduğu belirlendi ($p < 0.05$, $\rho > 0.30$) (Şekil 4.23.E).



Şekil 4.23. ER stres ile ilişkili genlerin pankreas kanseri hücre hatlarındaki ekspresyon seviyesi ile bu hücrelerin bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyetin korelasyonu. CGP-GDSC (n=29) platformunda A) DNAJB11 B) EIF2AK3 C) EDEM1 D) ATF3 genlerine ait korelasyon grafikleri. CCLE-CTRP (n=27) platformunda E) DERL2 genine ait korelasyon grafiği.

Bu analize ek olarak CCLE platformunda yer alan pankreas kanseri hücre hatlarına ait proteomik veri elde edilerek ER stres ile ilişkili genlerin protein düzeyinde ifadelerinin ilaç hassasiyeti ile ilişkisi değerlendirildi. Bu platformda incelenen toplam 29 gen den 3 tanesinde proteomik düzeyde genin ekspresyon seviyesi ile ilaç yanıtı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu. Bu genlerden HSPA5 ve CEBPB’de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde negatif yönde korelasyon gözlenirken (sırasıyla Şekil 4.24.A-B), WFS1 geninde pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde bir korelasyon olduğu belirlendi ($p < 0.05$, $\rho < -0.30$ veya > 0.30) (Şekil 4.24.C).



Şekil 4.24. ER stres ile ilişkili genlerin pankreas kanseri hücre hatlarındaki protein düzeyinde ekspresyon seviyesi ile hücrelerin bortezomib ilacına karşı gösterdikleri hassasiyetin korelasyonu. A) HSPA5 (n=13) B) CEBPB (n=14) C) WFS1 (n=14) genlerine ait korelasyon grafikleri.

Sonuç olarak, AUC değeri büyük olan hücre hatları bortezomibe karşı daha dirençli profil sergileyen hücre hatları olarak kabul gördüğü için negatif yönde korelasyon gözlenen genler (AUC değeri arttıkça genin ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen genler) hücrelerin bu ilaca karşı sergiledikleri dirençli profil ile ilişkilendirildi.

5. TARTIŞMA

Günümüzde pankreas kanseri en agresif şekilde ilerleyen kanser türlerinden biri olarak bilinmektedir. Bu kanser hastalığının hızlı bir şekilde ilerlemesinden dolayı var olan ameliyat ve geleneksel tedavi yöntemleri hastalığın tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Ayrıca hem bireyler arasında tedaviye karşı verilen yanıtın farklılığından dolayı hem de kanser hücreleri tarafından geleneksel tedavi yöntemlerine karşı geliştirilen direnç nedeniyle bu kanser hastalığına karşı mücadele için yeni tedavi yöntemlerinin keşfi büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümelerinden dolayı protein sentezinde meydana gelen artış ile pankreas organının yüksek protein salınım kapasitesi temel alınarak hastalığın tedavisinde yeni bir yaklaşım hedeflenmiştir. Var olan bu yüksek protein yapım kapasitesinden dolayı kanser hücrelerinin proteozom mekanizmasına normal hücrelere kıyasla daha bağımlı hale geldikleri bilinmektedir. Örneğin, yüksek immunglobulin salınımının gerçekleştiği bilinen MM hastalığında maling plazma hücrelerinin proteozom sistemine karşı var olan hassasiyetleri hedef alınmış ve proteozom inhibitörlerinin kullanımı ile hücrelerde proteinlerin birikimi ile yıkım kapasitesi arasında meydana gelen bozulma sayesinde de hastalıkla mücadelede istenilen başarı elde edilmiştir (159). Bu tez çalışması kapsamında pankreas kanserli tümör ve normal doku örneklerine ait verileri kullanarak yaptığımız *in silico* analizler sonucunda da proteozom mekanizmasında görev alan genlerin ekspresyon seviyesinin tümör dokularında normal dokulara kıyasla istatistiksel olarak daha fazla olduğu anlaşılmıştır.

Bu tez çalışmasında bir proteozom inhibitörü olarak bilinen bortezomib ilacı kullanılarak ER organeli içerisinde katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sağlanarak pankreas kanseri hücrelerinde ER stres aracılı ölüm hedeflenmiştir. Literatüre bakıldığında, bortezomibin pankreas kanseri hücrelerinde ER stres aracılı apoptoza yol açabildiği gösterilmiştir (201, 202). Bu tez çalışması kapsamında da kullanılan bortezomib ilacının hedef genlerinin ekspresyon seviyesi pankreatik tümör ve normal doku örnekleri arasında *in silico* yöntemlerle araştırıldı. Elde edilen bulgular sonucunda bu ilacın hedef genleri olarak bilinen PSMB5 ve PSMB1'in ekspresyon seviyesinin tümör dokularında normal doku örneklerine kıyasla

istatistiksel olarak daha fazla olduğu gözlemlendi. Tüm bu bilgiler doğrultusunda literatürde de var olan bilgiler ile uyumlu bir şekilde, bortezomib ilacının pankreas kanserinde proteozom sistem üzerinden kullanımının uygun olabileceği öngörüldü.

Bortezomib ilacının kanser hücrelerinde ER stres aracılı ölüme yol açtığı yapılan çalışmalar doğrultusunda da bilinmektedir. Fakat bortezomibin tek başına kullanımı ile solid tümörlerde aranılan yüksek etki yakalanamamakla beraber zaman içerisinde kanser hücrelerinin bu ilaca karşı direnç geliştirebildikleri de gözlemlenmiştir (166). Örneğin, bortezomib ilacı klinikte MM hastalarının tedavisinde kullanıldığında da hastaların yaklaşık olarak %35'inin ilaca yanıt verirken geriye kalan bireylerde bu ilaca karşı direnç geliştiği bilinmektedir. İlaça karşı gelişen bu dirençten sorumlu mekanizmalar incelendiğinde ise bortezomib ilacının proteozom kompleksinde hedef aldığı $\beta 5$ alt biriminde meydana gelen mutasyon ve aşırı ekspresyon, stres yanıtı ile ilişkili olduğu bilinen genlerde oluşan mutasyonlar ve/veya hücre canlılığının devamlılığında görevli yolların aşırı aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmaların rol aldığı anlaşılmıştır (158). Bortezomib ilacının solid tümörlerde etkisinin artırılması ve bu ilaca karşı gelişen direncin kırılabilmesi için uygulanan kombine tedavinin etkili yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Örneğin, servikal kanser hücreleri ile yapılan çalışmada bortezomib ilacının hücrelerde apoptozu indükleyebildiği tespit edilirken, bu sitotoksik etkinin ER stres aktivatörü olan tunicamisin ile birlikte uygulanması sonucunda artış gösterdiği anlaşılmıştır ve bortezomibin ER stres aktive edici ajanlar ile kombine bir şekilde kullanımının yeni bir başarılı tedavi yöntemi olabileceği vurgulanmıştır (203). Bortezomibe karşı gelişen direnci kırmaya yönelik hematopoetik hücreler ve lenfoma hücreleri ile yapılan çalışmalar doğrultusunda da bu ilaca karşı gelişen dirençte role sahip olduğu anlaşılan protein agregasyonunun azaltılmasına yönelik düzenlemenin yapıldığı mekanizmaların hedef alınarak direncin kırılabilmesi ortaya koyulmuştur (204, 205). Tüm bu bilgiler ışığında, bortezomib ilacının ER stres tetikleyici ajanlar ile birlikte uygulanmasının hem bu ilacın etkinliğini artırma hem de ilaca karşı gelişen direncin kırılması yönünde öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Pankreas kanseri hücrelerinde bortezomibe karşı verilen yanıtta hassasiyete yol açmak ve bu iki ilaç arasındaki olası sinerjistik etkinin incelenmesi amacıyla tez çalışmasında bir tirozin kinaz inhibitörü olarak bilinen imatinib ilacı kullanıldı. Literatüre bakıldığında, Li ve ark.'larının pankreas kanseri hücreleri ile yaptıkları

çalışma sonucunda imatinibin hücre büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu ortaya koyulmuştur (35). Ayrıca gastrik kanser hücreleri ile yapılan çalışma doğrultusunda, imatinibin ER stres aracılığıyla hücre ölümüne yol açabildiği de gösterilmiştir (206). Bu tez çalışması kapsamında da kullanılan imatinib ilacının hedef genlerinin ekspresyon seviyesi pankreatik tümör ve normal doku örnekleri arasında *in silico* yöntemlerle araştırıldı. Elde edilen bulgular sonucunda bu ilacın hedef genleri olarak bilinen PDGFRA, PDGFRB, DDR1, DDR2, Abl1, Abl2 ve c-Kit'in ekspresyon seviyesinin pankreatik tümör dokularında normal doku örneklerine kıyasla istatistiksel olarak daha fazla olduğunu gözlemlendi. Elde edilen bulgular literatürde de var olan bilgiler ile birlikte değerlendirildiğinde, imatinib ilacının pankreas kanseri hücreleri ile yapılacak deneylerde kullanımının uygun olabileceği öngörüldü.

Bağımsız bir kohortta ise (GSE28735) PDAC'lı hasta bireylerden elde edilen eşli tümör ve normal pankreas örneklerinde bu iki ilacın hedef genlerinin ekspresyon seviyesindeki değişim grupları arasında karşılaştırıldı. Yapılan analiz sonucunda bortezomibin hedef genlerinden PSMB5'te genin ekspresyon düzeyinin normal örneklere kıyasla tümör örneklerinde istatistiksel olarak daha fazla olduğu gözlenirken, imatinib ilacının hedef genlerinden ise PDGFRB (probeset ID: 8115099), DDR1 (probeset ID: 8179184) ve DDR2 (probeset ID: 7906878 ve probeset ID:7906900)'nin ekspresyon seviyesinin normal örneklere kıyasla tümör örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu gözlemlendi. İncelediğimiz gen seti çerçevesinde veri setleri arasında anlamlı fark gösteren genlerdeki bu değişkenliğin kohortlar arasında var olan biyolojik ve/veya klinik parametrelerin heterojenitesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Pankreas kanseri hücrelerinin bortezomibe karşı verdiği yanıtta imatinib ilacı ile bir hassasiyete yol açılıp açılmayacağı araştırılması amacıyla bortezomibe karşı daha dirençli profil sergileyen hücre hattının incelemesi hem literatür taraması hem de *in silico* yöntemler ile yapıldı. Pankreas kanseri hücre hatlarında bortezomib ile yapılan çalışmalar incelendiğinde MIA PaCa-2 hücre hattının BxPC-3 hücre hattına kıyasla daha dirençli bir profil sergilediği gözlemlendi (169, 199). Pankreas kanseri hücre hatlarına ait gen ekspresyon seviyesinin ve bu hücrelere ait ilaç hassasiyet bilgilerini içeren CCLE-CTRP ve CGP-GDSC platformları kullanılarak *in silico* yöntemlerle

bortezomib ilacına karşı hassasiyet ve direnç sergileyen hücre hatları incelendiğinde ise literatürde var olan bilgi ile uyumlu sonuç elde edildi.

BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarının bortezomib ilaca karşı sergiledikleri profilin *in vitro* koşullarda tespiti için öncelikle bu hücre hatlarında ilaca ait IC₅₀ doz miktarı belirlendi. Yapılan deney sonucunda 72 saatlik inkübasyon süresinde, BxPC-3 hücre hattına ait IC₅₀ dozun 6.616 nM ve MIA PaCa-2 hücre hattına ait IC₅₀ dozun 4.696 nM olduğu belirlendi. Fakat bu iki hücre hattına ait IC₅₀ dozları arasında var olan bu fark hücre hatları arasında ilaca karşı verilen yanıtta farklılık olduğunu söylemeye yetmemektedir. Bu nedenle laboratuvarımızda bulunan diğer pankreas kanseri hücre hatlarında da bortezomib ilacına ait IC₅₀ doz miktarı belirlendi. Çalışılan toplam yedi hücre hattı arasında en hassas hücre hattının 3.298 nM'lık IC₅₀ dozu ile CFPAC-1 hücre hattı olduğu ve en dirençli hücre hattının ise 6.671 nM'lık IC₅₀ dozu ile PANC-1 olduğu anlaşıldı. Ancak var olan bu yaklaşık 2 katlık fark PANC-1 hücre hattının CFPAC-1 hücre hattına göre daha dirençli olarak kabul edilebilmesi için yeterli olmamaktadır. Ayrıca bortezomibe karşı daha hassas bir yanıt veren hücre hattı olarak CFPAC-1'i seçmek de doğru olmamaktadır. Çünkü bortezomib ilacına karşı hassasiyet gösteren hücrenin kullanım amacı imatinib varlığında bu kanser hücresinde bortezomib ile oluşturulan etkinin incelenmesi yönündedir. Bu amaç doğrultusunda bortezomibe karşı bu kadar hassasiyet gösteren bir hücre hattı ile ilgili araştırmanın yapılması doğru bir yol olmayacağı için çalışmalara bortezomib ilacına karşı ortalama IC₅₀ değerinde yanıt veren BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatları ile devam edildi.

Hücre canlılık tayin testi sonucunda BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında bortezomib ve imatinib ilaçlarına ait IC₅₀ doz miktarları 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde belirlendi. Belirlenen dozlar incelendiğinde beklenen yönde hücrelerin %50'sini öldüren doz miktarında inkübasyon süresi ile ilişkili bir şekilde azalma meydana geldiği gözlemlendi.

Doz miktarlarının belirlenmesinin akabinde, pankreas kanseri hücre hatlarının bortezomib ve imatinib ilaçlarının kombinasyonu ile muamele edilmesi sonucunda hücreler üzerinde oluşabilecek olası sinerjistik etki incelendi. Literatüre bakıldığında Yu ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada, bortezomib ilacının çoklu kinaz inhibitörü olarak bilinen sorafenib ile kombine edilmesinin sonucunda sinerjistik etkinin

meydana geldiği ve incelenen çoklu kanser hücre hatlarında apoptozun indüklendiği tespit edilmiştir (207). Bu çalışmaya ek olarak, imatinib yerine alternatif olarak kullanımı önerilen Bcr-Abl tirozin kinaz inhibitörü olan dasatinib ilacının Bcr-Abl pozitif akut lenfoblastik lösemide bortezomib ile kombine olarak uygulandığı bir çalışmada da sinerjistik etkinin meydana geldiği ve hücreler üzerinde apoptotik etkinin olduğu gösterilmiştir (208). Bu tez çalışmasında bortezomib ve imatinib ilaçlarının kombine edilmesi ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise, BxPC-3 hücre hattında hiçbir doz kombinasyonunda sinerjistik etki gözlenmezken, MIA PaCa-2 hücre hattında sadece her iki ilacın “1.5xIC₅₀” doz miktarında kombine edildiği durumda sinerjiye yakın olan kısmen aditif bir etkinin (CI=0.93) meydana geldiği gözlemlendi.

İncelenen ilaç kombinasyon noktalarında aranılan kuvvetli sinerjistik etkinin bulunamamasından dolayı çalışmamıza literatürde de savunulan bir yol dikkate alınarak devam edildi. İlaç kombinasyonları ile çalışıldığında göz önünde bulundurulması gereken uygulanan doz kombinasyonunun sinerjistik bir etki yaratıp yaratmadığından ziyade ilaçlar arasındaki hangi doz oranında sinerjistik etkinin meydana geldiğinin belirlenmesidir. Bu sorunun cevabına ulaşmak için ise sabit bir oran ile çalışmak yerine bir ilacın doz miktarı sabit tutulurken diğer ilacın doz miktarında değişiklik sağlanarak deney tasarlanması gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır (209). Bu doğrultuda tez çalışmasında kullandığımız CombeneFit yazılımını referans alınarak yeni ilaç kombinasyonları uygulandı ve olası etkiler incelendi. Bu doğrultuda yapılan deneyler incelendiğinde, BxPC-3 hücre hattında bortezomib ilacının sabit tutulup imatinib ilacının artan konsantrasyonları ile kombine edildiği koşullarda kısmen aditif ve zayıf sinerjistik etkilerin olduğu gözlemlendi. Aynı hücre hattında imatinib ilacının sabit tutulup bortezomib ilacının artan konsantrasyonları ile kombine edildiği koşulda ise kısmen aditif etkinin meydana geldiği belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre sadece bir kombinasyon noktasında zayıf sinerjistik etki tespit edildiği için BxPC-3 hücre hattında bu ilaçların hangi doz oranında kombine edilmesi gerektiğine dair bilgiye ulaşabilmek için daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

MIA PaCa-2 hücre hattında yapılan çalışmalar incelendiğinde ise bortezomib ilacının sabit tutulup imatinib ilacının artan konsantrasyonları ile kombine edildiği koşullarda zayıf ve orta derecede sinerjinin meydana geldiği belirlendi. Aynı

hücre hattında imatinib ilacının sabit tutulup bortezomib ilacının artan konsantrasyonları ile kombine edildiği durumda ise zayıf sinerjistik etkinin olduğu gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara göre MIA PaCa-2 hücre hattında bu ilaçların hangi doz oranında kombine edilmesi gerektiğine dair bilgiye ulaşabilmek için çalışmalara sinerjistik etkinin yakalandığı oran dikkate alınarak devam edildiğinde aranan kuvvetli sinerjistik etkinin bu hücre hattında bulunabileceği öngörülmektedir.

İlaç kombinasyonları arasında gelişen olası sinerjistik etkinin incelenmesine ek olarak imatinib ilacının hücre hatları üzerinde bortezomib ilacına karşı verilen yanıtta bir hassasiyet oluşturup oluşturmayacağı incelendi. Literatüre bakıldığında, pankreas kanseri tedavisine yönelik klinikte kullanılan gemsitabin ilacının imatinib ile kombine olarak uygulandığı çalışmada, bu kombinasyon aracılığıyla pankreas kanseri hücrelerinin gemsitabine karşı verdikleri yanıtta hassasiyetin oluşturulabileceği ortaya konulmuştur (210). Bizim çalışmamıza bakıldığında, BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında bortezomib ilacının tek başına uygulandığı koşul ile ilaçların kombine edilerek uygulandığı koşul kıyaslandığında, bortezomibin düşük dozlarda tutulurken imatinibin spesifik dozlarda uygulandığı noktalarda hücre canlılığı bakımından azalma meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca her iki hücre hattında, bortezomib ilacının tek başına uygulandığı koşul ile ilaç kombinasyonuna ait eğriler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu da belirlendi. Fakat BxPC-3 hücre hattında eğriler arasında bir uyum olmadığından ötürü bu hücre hattı için imatinib ilacının hücreler üzerinde bortezomib ilacına karşı bir hassasiyet meydana getirmediği sonucuna varıldı.

Uygulanan ilaç kombinasyonunun hücreler üzerinde hem ER strese yol açıp açmadığının incelenmesi hem de ilaçların RIDD mekanizması üzerindeki olası etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan qRT-PCR ile ER stres belirteci olarak bilinen sXBP1 ve RIDD mekanizmasının hedef mRNA'sı olarak bilinen Scara3 ile Bloc1s1'in ekspresyon seviyeleri incelendi. Literatürde bortezomib ilacı kullanılarak multipl miyelomda yapılan bazı çalışmalar doğrultusunda bu ilacın sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde artışa yol açtığı bilinmektedir (211, 212). Bortezomib ilacının RIDD mekanizması üzerindeki etkisi ise henüz bilinmemektedir. İmatinib ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, ilacın direkt olarak sXBP1 geninin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi bilinmemekle beraber gastrik kanserli hücreler ile yapılan çalışma sonucunda bu ilacın ER stresi indükleyebildiği ortaya konulmuştur (206). Bu bilgilere

ek olarak embriyonik fibroblastlar ile yapılan bir çalışmada, genotoksik bir stres varlığında c-Abl tirozin kinaz enziminin IRE1 α ile etkileşim halinde bulunduğu ve bu etkileşim ile de RIDD mekanizmasının aktive olduğu ortaya koyulmuştur. Aynı çalışmada bu durumun engellenmesi amacıyla hücreler imatinib ilacı ile muamele edildiğinde ise RIDD mekanizmasının bloke olduğu ve böylece bu mekanizmanın hedef mRNA'larının ekspresyon seviyesinde artışın meydana geldiği gösterilmiştir (36). Tüm bu bilgiler ışığında bizim çalışmamıza ait sonuçlar incelendiğinde, BxPC-3 hücre hattında bortezomibin IC₅₀ doz konsantrasyonunda tek başına uygulandığı koşulda sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde artış olmazken, ilaçların kombine olarak uygulandığı koşulda imatinibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla bu genin ekspresyon düzeyinde artışın meydana gelmesi dikkat çekti. MIA PaCa-2 hücre hattına ait sonuçlara bakıldığında; imatinib ve bortezomibin IC₅₀/2 doz konsantrasyonunda kombine olarak uygulandığı koşulda ilaçların tek başına uygulandığı koşula kıyasla sXBP1 geninin ekspresyon seviyesinde artışın meydana geldiği tespit edildi. İlaçların IC₅₀ doz miktarında kombine olarak uygulandığı koşulda ise imatinibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla genin ekspresyon düzeyinde değişim meydana gelmemesi dikkat çekti. Sonuç olarak; bortezomibin literatürde de var olan bilgiler ile uyumlu bir şekilde pankreas kanseri hücre hatlarında potent bir ER stres aktivatörü olduğu anlaşılırken, imatinib ilacının pankreas kanseri hücre hatlarında potent bir ER stres aktivatörü olabileceği düşünüldü. Bunlara ek olarak, bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonundan elde edilen bulgular doğrultusunda bu ilaç kombinasyonunun potent bir ER stres aktivatörü olabileceği öngörüldü.

Bortezomib ve imatinib ilaçlarının RIDD mekanizması üzerindeki etkileri incelendiğinde ise, imatinibin uygulandığı koşullarda literatürde var olan bilginin aksine RIDD mekanizmasını bloke olmadığı gözlemlendi. Ayrıca ilgi çekici bir şekilde RIDD hedef genlerinin ekspresyon seviyesinde azalma meydana geldiği tespit edildi. Bortezomibin uygulandığı koşullarda da RIDD mekanizmasının hedef mRNA'larının ekspresyon düzeyinde azalma meydana geldiği gözlemlendi ve sonuç olarak bu ilacın RIDD mekanizmasını aktive edici etkiye sahip olabileceği öngörüldü. İlaçların kombine olarak kullanıldığı koşullarda da RIDD mekanizmasının hedef mRNA'larının ekspresyon seviyesinde ilaçların tek başlarına uygulandıkları koşullara kıyasla artışın meydana gelmediği tespit edildi ve sonuç olarak bu ilaç kombinasyonunun muamelesi

sonrasında ER stresin tetiklendiği ve IRE1'in endoribonükleaz aktivitesinin devreye girmesi ile RIDD mekanizmasının hedef genlerinin ekspresyon seviyesinde azalma meydana geldiğine dair yorum yapıldı.

Pankreas kanseri hücre hatlarının bortezomibe verdikleri yanıt ve ER stress ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki olası ilişkinin incelenmesi amacıyla *in silico* analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla pankreas kanseri hücre hatlarında bortezomib ilacına karşı gelişen yanıt ile mikrodizi, RNAseq ve proteomik düzeydeki gen ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki incelendi. Tez çalışmasında var olan hipotez kapsamında beklenen sonuçlar AUC parametresi fazla olan yani bortezomib ilacına karşı dirençli profil sergileyen hücre hatlarında ER stres ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyi ile ilaca karşı verilen yanıt arasında negatif yönde bir korelasyon olması yönündedir. Çünkü ER stress ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi bu stres mekanizmasının belirteci olduğundan, bortezomibe dirençli profil sergileyen pankreas kanseri hücre hatlarında ER stres devreye giremediğinden bu genlerin ekspresyon düzeylerinin de az olması beklenmektedir. Yapılan analiz sonucunda bortezomib ilacına dirençli bir profil sergileyen pankreas kanseri hücre hatlarında DNAJB11, EDEM1 ve EIF2AK3 genlerinin ekspresyon düzeyi ile ilaca karşı verilen yanıt arasında beklenildiği şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde negatif yönde korelasyon olduğu belirlenirken, ATF3 geninde beklenenin aksine istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde pozitif yönde korelasyonun varlığı saptandı.

Proteomik düzeyde yapılan analiz sonuçları incelendiğinde de HSPA5 ve CEBPB genlerinde bortezomib ilacına dirençli olan pankreatik hücre hatlarında ilaca karşı verilen yanıt ile gen ekspresyon seviyesi arasında beklenildiği şekilde negatif yönde ilişkinin var olduğu gözlenirken, WFS1 geninde bu parametreler arasında beklenenin aksine pozitif yönde ilişkinin var olduğu belirlendi. Bortezomib ilacına karşı dirençli profil sergileyen hücre hatlarında ER stres ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinin azlığı bizlere bu stress mekanizması ile ilişkili gen ifadesi ve bortezomib hassasiyeti arasında olası ilişkiyi işaret etmektedir. Fakat bu genlerin bortezomib ilacına karşı gelişen dirençte var olan rollerinin net olarak anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında pankreatik kanser hücre hatları olan BxPC-3 ve MIA PaCa-2 kullanılarak bortezomib ve imatinib ilaçlarının kombine bir şekilde uygulanması sonucunda olası sinerjistik etkiler incelenmiştir. Ayrıca imatinib ilacının kullanılan pankreas kanseri hücre hatlarında bortezomib ilacına karşı verilen yanıtta hassasiyet oluşturup oluşturmadığı da incelenmiştir. Yapılan *in silico* analizler sonucunda bu iki ilacın pankreas kanserinde kullanıma uygun olduğu anlaşıldı ve *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalar ile de bu iki ilaç kombinasyonunun belirli doz kombinasyon noktalarında farklı şiddetlerde sinerjistik etki ortaya koydukları belirlendi. ER stres ile ilişkili olduğu bilinen gen ile RIDD mekanizmasında yer alan hedef genlerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler incelendiğinde de ilk defa bortezomib ve imatinib ilaçlarının pankreas kanseri hücre hatlarında RIDD mekanizmasını aktive ettikleri ortaya koyuldu. *In silico* analizler doğrultusunda da pankreas kanseri hücrelerinin bortezomib ilacına karşı gösterdikleri dirençli profilde role sahip olabilecek genler tespit edildi. Tüm bu bilgiler doğrultusunda bortezomib ve imatinib ilaç kombinasyonları farklı doz noktalarında da denenerek daha güçlü sinerjistik etkini yakalanabileceği ve ayrıca bu doz miktarları kullanılarak ilaçların RIDD mekanizması üzerindeki etkileri ortaya koyularak pankreas kanserinde aranılan yeni tedavi yöntemine ışık tutulabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. *In silico* analiz sonucunda pankreatik tümör örneklerinde normal dokulara kıyasla proteozomal sistemde görev alan genlerin ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu ve pankreatik kanser hücrelerinin bu sisteme daha hassas oldukları sonucuna varıldı.

2. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının hedef genlerinin *in silico* analizler ile incelenmesi sonucunda bu genlerin ekspresyon seviyelerinin pankreatik tümör örneklerinde normal dokulara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu belirlendi.

3. *In vitro* deneyler sonucunda bortezomib ilacına karşı dirençli profil sergileyen pankreas kanseri hücre hattı bulunamadı. Çalışmalarda bortezomib ilacına karşı orta derecede hassasiyet gösteren BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hatları kullanıldı.

4. BxPC-3 hücre hattında bortezomib ilacına ait 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde hücrelerin yüzde ellisini öldüren dozlar tespit edildi. Bu dozların sırasıyla 7.837 nM, 7.684 nM ve 6.616 nM olduğu belirlendi. Aynı hücre hattında imatinib ilacına ait IC₅₀ dozların ise 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonucunda sırasıyla 44.153 uM, 24.604 uM ve 21.178 uM olduğu bulundu.

5. MIA PaCa-2 hücre hattında imatinib ilacına ait hücrelerin yüzde ellisini öldüren dozların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde sırasıyla 44.27 uM, 27.41 uM ve 27.74 uM olduğu tespit edildi. Aynı hücre hattında bortezomib ilacına ait IC₅₀ dozların ise 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sırasıyla 8.296 nM, 4.716 nM ve 4.696 nM olduğu belirlendi.

6. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının 0.25xIC₅₀ ile 2xIC₅₀ doz aralığında kombine edilerek uygulandıkları koşullarda;

- BxPC-3 hücre hattında sinerjistik etkinin meydana gelmediği gözlemlendi.
- MIA PaCa-2 hücre hattında ilaçların 1.5xIC₅₀ doz konsantrasyonunda kombinasyonu sonucunda sinerjistik etkinin olduğu tespit edildi (CI=0.93).

7. İlaçlardan birinin konsantrasyonunun sabit tutulurken diğerinin değiştiği deney tasarımı sonucuna göre;

- BxPC-3 hücre hattında bortezomib ilacının 1.92 nM'da sabit tutulup 36.9 uM imatinib ve 49.2 uM imatinib ile kombine edildiği koşullarda sinerjistik etkinin olduğu gözlemlendi (sırasıyla CI=0.92, CI=0.86). İmatinib ilacının 6.15 uM'da sabit tutulup 15.37 nM bortezomib ilacı ile kombine uygulandığı koşulda sinerjistik etki meydana geldiği tespit edildi (CI=0.98).
- MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ilacının 1.18 nM'da sabit tutulup 41.11 uM imatinib ve 54.82 uM imatinib ile kombine edildiği koşullarda sinerjistik etki meydana geldiği gözlemlendi (sırasıyla CI=0.78, CI=0.67). İmatinib ilacının 6.85 uM'da sabit tutulup 9.43 nM bortezomib ilacı ile kombine uygulandığı koşulda sinerjistik etki meydana geldiği belirlendi (CI=0.86).

8. İmatinib ilacının BxPC-3 ve MIA PaCa-2 hücre hattında bortezomib ilacına karşı verilen yanıtta hassasiyete yol açıp açmadığı incelendiğinde her iki hücre hattında bortezomibin tek başına uygulandığı koşul ile ilaçların kombine edildiği koşula ait grafikler arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi ve imatinib ilacının varlığında hücre canlılığında azalma meydana geldiği gözlemlendi. Fakat BxPC-3 hücre hattında eğriler arasında bir uyum olmamasından ötürü imatinib ilacının bu hücre hattında bortezomibe karşı bir hassasiyete yol açmadığı anlaşıldı.

9. Bortezomib ilacının imatinib ile kombine edildiği durumda ER stres şiddetindeki olası artışın araştırılması için sXBP1 geninin ekspresyon seviyesi incelendiğinde;

- İlaçların IC₅₀/2 doz miktarında uygulandıkları koşulda BxPC-3 hücre hattında genin ekspresyon seviyesinde farklılık bulunmadı. MIA PaCa-2 hücre hattında ise genin ekspresyon seviyesinde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiği tespit edildi.
- İlaçların IC₅₀ doz miktarında uygulandıkları koşulda BxPC-3 hücre hattında imatinib ilacının tek başına uygulandığı grupta genin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken, bortezomib ilacının tek başına kullanıldığı koşulda ekspresyon seviyesinde bir değişim gözlenmedi. Kontrol grubuna kıyasla ilaçların

kombine halde uygulandığı koşulda genin ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Ek olarak, aynı hücre hattında ilaçların kombine edildiği koşulda ilaçların tek başlarına uygulandıkları gruplara kıyasla genin ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu.

- MIA PaCa-2 hücre hattında ilaçların IC_{50} doz miktarında uygulandıkları koşulda kontrol grubuna kıyasla bortezomibin tek başına uygulandığı, imatinibin tek başına uygulandığı ve ilaç kombinasyonunun kullanıldığı gruplarda genin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Ek olarak, aynı hücre hattında ilaçların kombine edildiği koşulda sadece bortezomib ilacının tek başına uygulandığı gruba kıyasla genin ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu.

10. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının RIDD mekanizması üzerindeki olası etkisinin araştırılması için bu mekanizmanın hedef genlerinden Scara3 ve Bloc1s1'in ekspresyon düzeyleri incelendiğinde;

- BxPC-3 hücre hattında ilaçların $IC_{50}/2$ doz miktarında uygulandıkları koşulda genlerin ekspresyon seviyelerinde değişim gözlenmedi.
- MIA PaCa-2 hücre hattında ilaçların $IC_{50}/2$ doz miktarında uygulandıkları koşulda Scara3 geninin ekspresyon seviyesinde imatinibin tek başına uygulandığı koşula kıyasla ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken, Bloc1s1 geninin ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna kıyasla ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi.
- BxPC-3 hücre hattında ilaçların IC_{50} doz miktarında uygulandıkları koşulda Scara3 ve Bloc1s1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla bortezomibin tek başına uygulandığı, imatinibin tek başına uygulandığı ve ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşullarda istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu.

- MIA PaCa-2 hücre hattında Scara3 geninin ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna kıyasla bortezomibin tek başına uygulandığı, imatinibin tek başına uygulandığı ve ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşullarda istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu. Aynı genin ekspresyon seviyesinde bortezomibin tek başına ve imatinibin tek başına uygulandığı gruplara kıyasla ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşulda istatistiksel olarak anlamlı artma tespit edildi.
- MIA PaCa-2 hücre hattında Bloc1s1 geninin ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna kıyasla imatinibin tek başına kullanıldığı ve ilaç kombinasyonunun uygulandığı koşullarda istatistiksel olarak anlamlı azalma bulundu.

11. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının pankreas kanseri hücre hatlarında RIDD mekanizmasını aktive edebildiği ortaya konuldu.

12. İmatinib ilacının pankreas kanseri hücre hatlarında ER strese yol açtığı gösterildi.

13. Bortezomib ilacına karşı dirençli profil sergileyen pankreas kanseri hücre hatlarında ilaca karşı gelişen yanıtta rolü olabilecek ER stres ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri *in silico* yöntemlerle incelendiğinde DERL2, DNAJB11, EDEM1, ATF3, EIF2AK3, HSPA5, CEBPB ve WFS1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin bortezomibe karşı hassasiyetle lineer ilişki gösterdiği belirlendi.

14. Bortezomib ve imatinibin farklı doz konsantrasyonlarında kombine edileceği deneyler tasarlanarak olası daha güçlü sinerjistik etkiler araştırılabilir.

15. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının uygulandığı koşullarda hücrelerde ER stresin indüklendiğinin araştırılması amacıyla western blot yöntemi ile fosforile IRE1 α ve fosforile eIF2 α 'nin ekspresyon seviyesi protein düzeyinde incelenebilir.

16. Bortezomib ve imatinib ilaçlarının uygulandığı koşullarda hücrelerde meydana gelen ER stress aracılı hücre ölümünün araştırılması amacıyla western

blot yöntemi ile proapoptotik protein olan CHOP'un ekspresyon seviyesi protein düzeyinde incelenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ma J, Jemal A. The rise and fall of cancer mortality in the USA: why does pancreatic cancer not follow the trend? *Future Oncology*. 2013;9(7):917-9.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2013;63(1):11-30.
3. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014;74(11):2913-21.
4. Frie H, Büchler M, Kruger M, Beger HG. Treatment of Duct Carcinoma of the Pancreas with the LH-RH Analogue Buserelin. *Pancreas*. 1992;7(5):516-21.
5. Friess H, Büchler M, Beglinger C, Weber A, Kunz J, Fritsch K, et al. Low-dose octreotide treatment is not effective in patients with advanced pancreatic cancer. *Pancreas*. 1993;8(5):540-5.
6. Heinemann V. Gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer: a comparative analysis of randomized trials. *Semin Oncol*. 2002;29(6 Suppl 20):9-16.
7. van der Schelling GP, Jeekel J. Palliative Chemotherapy and Radiotherapy for Pancreatic Cancer: Is It Worthwhile? *World Journal of Surgery*. 1999;23(9):950-3.
8. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(1):79-94.
9. Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*. 2014;25(5):563-73.
10. Giampietri C, Petrunaro S, Conti S, Facchiano A, Filippini A, Ziparo E. Cancer Microenvironment and Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:417281.
11. Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018;6.
12. Lin F, Qin ZH. Degradation of misfolded proteins by autophagy: is it a strategy for Huntington's disease treatment? *J Huntingtons Dis*. 2013;2(2):149-57.
13. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(5):245-54.
14. Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*. 2006;313(5783):104-7.
15. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2009;186(3):323-31.
16. Wek RC, Cavener DR. Translational control and the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2357-71.
17. Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):14-21.
18. Bhattarai KR, Chaudhary M, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response Failure in Diseases. *Trends Cell Biol*. 2020;30(9):672-5.

19. Ron D, Hubbard SR. How IRE1 reacts to ER stress. *Cell*. 2008;132(1):24-6.
20. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol*. 2018;9:3083.
21. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):349-60.
22. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11(3):239-53.
23. Ri M. Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Int J Hematol*. 2016;104(3):273-80.
24. Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*. 2003;8(6):508-13.
25. Weniger MA, Rizzatti EG, Pérez-Galán P, Liu D, Wang Q, Munson PJ, et al. Treatment-induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(15):5101-12.
26. Deshaies RJ. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol*. 2014;12:94.
27. Accardi F, Toscani D, Bolzoni M, Dalla Palma B, Aversa F, Giuliani N. Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *Biomed Res Int*. 2015;2015:172458.
28. Zhang S, Kulkarni AA, Xu B, Chu H, Kourelis T, Go RS, et al. Bortezomib-based consolidation or maintenance therapy for multiple myeloma: a meta-analysis. *Blood Cancer J*. 2020;10(3):33.
29. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, et al. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood*. 1997;90(12):4947-52.
30. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2(5):561-6.
31. Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):3319-26.
32. McGary EC, Weber K, Mills L, Doucet M, Lewis V, Lev DC, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res*. 2002;8(11):3584-91.
33. Waller CF. Imatinib Mesylate. *Recent Results Cancer Res*. 2018;212:1-27.
34. Esposito I, Kleeff J, Bischoff SC, Fischer L, Collecchi P, Iorio M, et al. The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Lab Invest*. 2002;82(11):1481-92.
35. Li J, Kleeff J, Guo J, Fischer L, Giese N, Büchler MW, et al. Effects of STI571 (gleevec) on pancreatic cancer cell growth. *Mol Cancer*. 2003;2:32.

36. Dufey E, Bravo-San Pedro JM, Eggers C, González-Quiroz M, Urra H, Sagredo AI, et al. Genotoxic stress triggers the activation of IRE1 α -dependent RNA decay to modulate the DNA damage response. *Nature Communications*. 2020;11(1):2401.
37. Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*. 2021;27(27):4298-321.
38. Bonner-Weir S, Orci L. New Perspectives on the Microvasculature of the Islets of Langerhans in the Rat. *Diabetes*. 1982;31(10):883-9.
39. O'Dowd J, Stocker C. Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Frontiers in Physiology*. 2013;4.
40. Dougan SK. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J*. 2017;23(6):321-5.
41. Gidekel Friedlander SY, Chu GC, Snyder EL, Girnius N, Dibelius G, Crowley D, et al. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell*. 2009;16(5):379-89.
42. Kopp JL, von Figura G, Mayes E, Liu FF, Dubois CL, Morris JPt, et al. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2012;22(6):737-50.
43. Force UPST. Screening for Pancreatic Cancer: US Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *JAMA*. 2019;322(5):438-44.
44. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2012;142(4):730-3.e9.
45. de Braud F, Cascinu S, Gatta G. Cancer of pancreas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(2):147-55.
46. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 1997;57(9):1731-4.
47. B. Jagadeesan PHH, D. Praveen, P. Ranadheer Chowdary, M. Vijey Aanandhi. A Comprehensive Review on Pancreatic Cancer. *Research J Pharm and Tech*. 2021;14(1):552 - 4.
48. Hand F, Conlon KC. Pancreatic cancer. *Surgery (Oxford)*. 2019;37(6):319-26.
49. Pancreatic Cancer 2022 [Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/view-all>].
50. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. *Surg Pathol Clin*. 2016;9(4):547-60.
51. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
52. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncologica*. 2016;55(9-10):1158-60.
53. Gillen S, Schuster T, Meyer zum Büschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Response and Resection Percentages. *PLOS Medicine*. 2010;7(4):e1000267.

54. Zhao Z, Liu W. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2020;19:1533033820962117.
55. Cokkinides V, Albano J, Samuels A, Ward M, Thum J. American cancer society: Cancer facts and figures. Atlanta: American Cancer Society. 2005.
56. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's archives of surgery*. 2008;393(4):535-45.
57. Montes EM, van Hoogstraten L, Gómez-Rubio P, Löhr J-M, Sharp L, Molero X, et al. Pancreatic cancer risk in relation to lifetime smoking patterns, tobacco type, and dose-response relationships. *Pancreatology*. 2019;19:S108-S9.
58. Nimmakayala RK, Seshacharyulu P, Lakshmanan I, Rachagani S, Chugh S, Karmakar S, et al. Cigarette smoke induces stem cell features of pancreatic cancer cells via PAF1. *Gastroenterology*. 2018;155(3):892-908. e6.
59. Rawla P, Thandra KC, Sunkara T. Pancreatic cancer and obesity: epidemiology, mechanism, and preventive strategies. *Clinical Journal of Gastroenterology*. 2019;12(4):285-91.
60. Hruban RH, Canto MI, Goggins M, Schulick R, Klein AP. Update on familial pancreatic cancer. *Advances in surgery*. 2010;44(1):293-311.
61. Wood LD, Hruban RH. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2012;18(6):492.
62. Greer JB, Whitcomb DC, Brand RE. Genetic Predisposition to Pancreatic Cancer: A Brief Review. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2007;102(11):2564-9.
63. Slebos RJ, Hoppin JA, Tolbert PE, Holly EA, Brock JW, Zhang RH, et al. K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(11):1223-32.
64. Strobel O, Neoptolemos J, Jäger D, Büchler MW. Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(1):11-26.
65. He J, Page AJ, Weiss M, Wolfgang CL, Herman JM, Pawlik TM. Management of borderline and locally advanced pancreatic cancer: where do we stand? *World J Gastroenterol*. 2014;20(9):2255-66.
66. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *Jama*. 2021;326(9):851-62.
67. Ghosn M, Kourie HR, El Rassy E, Haddad FG, Hanna C, El Karak F, et al. Where does chemotherapy stands in the treatment of ampullary carcinoma? A review of literature. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(10):745-50.
68. Lopez NE, Prendergast C, Lowy AM. Borderline resectable pancreatic cancer: definitions and management. *World J Gastroenterol*. 2014;20(31):10740-51.
69. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 2018;24(43):4846-61.
70. Berridge MJ. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*. 1998;21(1):13-26.

71. Hebert DN, Garman SC, Molinari M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends in Cell Biology*. 2005;15(7):364-70.
72. Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047-58.
73. Rapoport TA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*. 2007;450(7170):663-9.
74. Fagone P, Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of Lipid Research*. 2009;50:S311-S6.
75. Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5):a013201-a.
76. Reid DW, Nicchitta CV. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015;16(4):221-31.
77. Westrate LM, Lee JE, Prinz WA, Voeltz GK. Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape. *Annual Review of Biochemistry*. 2015;84(1):791-811.
78. Lee A-H, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J*. 2005;24(24):4368-80.
79. Baumann O, Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol*. 2001;205:149-214.
80. Walter P, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 1981;91(2 Pt 1):551-6.
81. Walter P, Ibrahimi I, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 1981;91(2 Pt 1):545-50.
82. Evans EA, Gilmore R, Blobel G. Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(3):581-5.
83. Blobel G. Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(3):1496-500.
84. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol*. 2014;204(6):869-79.
85. Hwang J, Qi L. Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(8):593-605.
86. Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS, Yuan LC, Klausner RD. Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell*. 1988;54(2):209-20.
87. Sommer T, Jentsch S. A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1993;365(6442):176-9.
88. Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*. 1995;83(1):129-35.
89. Varga K, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Hong JS, Guimbellot JS, Venglarik CJ, et al. Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22578-84.

90. Needham PG, Guerriero CJ, Brodsky JL. Chaperoning Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD) and Protein Conformational Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(8).
91. Pilon M, Schekman R, Römisch K. Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* 1997;16(15):4540-8.
92. Romisch K. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *Journal of Cell Science.* 1999;112(23):4185-91.
93. Baldridge RD, Rapoport TA. Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD. *Cell.* 2016;166(2):394-407.
94. Schoebel S, Mi W, Stein A, Ovchinnikov S, Pavlovicz R, DiMaio F, et al. Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature.* 2017;548(7667):352-5.
95. Avci D, Lemberg MK. Membrane Protein Dislocation by the Rhomboid Pseudoprotease Dfm1: No Pore Needed? *Mol Cell.* 2018;69(2):161-2.
96. Preston GM, Brodsky JL. The evolving role of ubiquitin modification in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem J.* 2017;474(4):445-69.
97. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, et al. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nature Cell Biology.* 2002;4(2):134-9.
98. Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W. Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol.* 1993;234(4):932-7.
99. Groll M, Heinemeyer W, Jäger S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, et al. The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):10976-83.
100. DeMartino GN, Slaughter CA. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22123-6.
101. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol.* 2002;39(3-4):147-64.
102. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1997;386(6624):463-71.
103. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 2006;31(1):137-55.
104. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3460-70.
105. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3-12.
106. Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy.* 2015;11(11):1956-77.
107. Mohammad Fazlul K, Hyung-Ryong K, Han-Jung C. Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. In: Angel C, editor. *Endoplasmic Reticulum.* Rijeka: IntechOpen; 2018. p. Ch. 4.

108. Lin Y, Jiang M, Chen W, Zhao T, Wei Y. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother.* 2019;118:109249.
109. Corazzari M, Lovat PE, Armstrong JL, Fimia GM, Hill DS, Birch-Machin M, et al. Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: the role of stress proteins ERdj5 and ERp57. *Br J Cancer.* 2007;96(7):1062-71.
110. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334(6059):1081-6.
111. Sandow JJ, Dorstyn L, O'Reilly LA, Tailler M, Kumar S, Strasser A, et al. ER stress does not cause upregulation and activation of caspase-2 to initiate apoptosis. *Cell Death & Differentiation.* 2014;21(3):475-80.
112. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2020;21(8):421-38.
113. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-30.
114. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science.* 2006;312(5773):572-6.
115. Imagawa Y, Hosoda A, Sasaka S, Tsuru A, Kohno K. RNase domains determine the functional difference between IRE1alpha and IRE1beta. *FEBS Lett.* 2008;582(5):656-60.
116. Ojha R, Amaravadi RK. Targeting the unfolded protein response in cancer. *Pharmacol Res.* 2017;120:258-66.
117. Madden E, Logue SE, Healy SJ, Manie S, Samali A. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biol Cell.* 2019;111(1):1-17.
118. Vandewynckel YP, Laukens D, Geerts A, Bogaerts E, Paridaens A, Verhelst X, et al. The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer Res.* 2013;33(11):4683-94.
119. Acosta-Alvear D, Karagöz GE, Fröhlich F, Li H, Walther TC, Walter P. The unfolded protein response and endoplasmic reticulum protein targeting machineries converge on the stress sensor IRE1. *Elife.* 2018;7.
120. Liu CY, Schröder M, Kaufman RJ. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24881-5.
121. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999;397(6716):271-4.
122. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.* 2000;5(5):897-904.
123. Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10519-24.

124. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 1998;273(50):33741-9.
125. Schindler AJ, Schekman R. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17775-80.
126. Radanović T, Ernst R. The Unfolded Protein Response as a Guardian of the Secretory Pathway. *Cells.* 2021;10(11).
127. Pihán P, Carreras-Sureda A, Hetz C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* 2017;24(9):1478-87.
128. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175-93.
129. Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(2):71-88.
130. Koritzinsky M, Levitin F, van den Beucken T, Rumantir RA, Harding NJ, Chu KC, et al. Two phases of disulfide bond formation have differing requirements for oxygen. *J Cell Biol.* 2013;203(4):615-27.
131. Young RM, Ackerman D, Quinn ZL, Mancuso A, Gruber M, Liu L, et al. Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes Dev.* 2013;27(10):1115-31.
132. Denzel MS, Antebi A. Hexosamine pathway and (ER) protein quality control. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;33:14-8.
133. Domblides C, Lartigue L, Faustin B. Metabolic Stress in the Immune Function of T Cells, Macrophages and Dendritic Cells. *Cells.* 2018;7(7).
134. Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:71-99.
135. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(2):E275-81.
136. Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(8):455-65.
137. Zhang J, Pavlova NN, Thompson CB. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J.* 2017;36(10):1302-15.
138. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44(5):479-96.
139. Vladykovskaya E, Sithu SD, Habertzettl P, Wickramasinghe NS, Merchant ML, Hill BG, et al. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2012;287(14):11398-409.
140. Cubillos-Ruiz JR, Silberman PC, Rutkowski MR, Chopra S, Perales-Puchalt A, Song M, et al. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell.* 2015;161(7):1527-38.

141. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015;6:260-71.
142. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, et al. ER Stress and Disease: Toward Prevention and Treatment. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(9):1337-43.
143. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol.* 2002;22(21):7405-16.
144. Romero-Ramirez L, Cao H, Regalado MP, Kambham N, Siemann D, Kim JJ, et al. X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas. *Transl Oncol.* 2009;2(1):31-8.
145. Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, Pétrilli V, Malek M, Chilloux J, et al. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell.* 2013;49(6):1049-59.
146. Borrello MT, Martin MB, Pin CL. The unfolded protein response: An emerging therapeutic target for pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatol.* 2022;22(1):148-59.
147. Long D, Chen K, Yang Y, Tian X. Unfolded protein response activated by endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer: potential therapeutical target. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2021;26(12):1689-96.
148. Robinson CM, Talty A, Logue SE, Mnich K, Gorman AM, Samali A. An Emerging Role for the Unfolded Protein Response in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(2).
149. Moon HW, Han HG, Jeon YJ. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10).
150. Cattaneo M, Fontanella E, Canton C, Delia D, Biunno I. SEL1L affects human pancreatic cancer cell cycle and invasiveness through modulation of PTEN and genes related to cell-matrix interactions. *Neoplasia.* 2005;7(11):1030-8.
151. Kim H, Bhattacharya A, Qi L. Endoplasmic reticulum quality control in cancer: Friend or foe. *Semin Cancer Biol.* 2015;33:25-33.
152. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med.* 2009;30(4):191-296.
153. Montagut C, Rovira A, Albanell J. The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin Transl Oncol.* 2006;8(5):313-7.
154. Tundo GR, Sbardella D, Santoro AM, Coletta A, Oddone F, Grasso G, et al. The proteasome as a druggable target with multiple therapeutic potentialities: Cutting and non-cutting edges. *Pharmacology & Therapeutics.* 2020;213:107579.
155. Khan RZ, Badros A. Role of carfilzomib in the treatment of multiple myeloma. *Expert Review of Hematology.* 2012;5(4):361-72.
156. Nunes AT, Annunziata CM. Proteasome inhibitors: structure and function. *Seminars in Oncology.* 2017;44(6):377-80.
157. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001;8(8):739-58.

158. Leonardo-Sousa C, Carvalho AN, Guedes RA, Fernandes PMP, Aniceto N, Salvador JAR, et al. Revisiting Proteasome Inhibitors: Molecular Underpinnings of Their Development, Mechanisms of Resistance and Strategies to Overcome Anti-Cancer Drug Resistance. *Molecules*. 2022;27(7).
159. Manasanch EE, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017;14(7):417-33.
160. Borissenko L, Groll M. 20S Proteasome and Its Inhibitors: Crystallographic Knowledge for Drug Development. *Chemical Reviews*. 2007;107(3):687-717.
161. Jayaweera SPE, Wanigasinghe Kanakanamge SP, Rajalingam D, Silva GN. Carfilzomib: A Promising Proteasome Inhibitor for the Treatment of Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Front Oncol*. 2021;11:740796.
162. Fotiou D, Roussou M, Gakiopoulou C, Psimenou E, Gavriatopoulou M, Migkou M, et al. Carfilzomib-associated renal toxicity is common and unpredictable: a comprehensive analysis of 114 multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2020;10(11):109.
163. Danhof S, Schreder M, Rasche L, Strifler S, Einsele H, Knop S. 'Real-life' experience of preapproval carfilzomib-based therapy in myeloma - analysis of cardiac toxicity and predisposing factors. *Eur J Haematol*. 2016;97(1):25-32.
164. Dimopoulos MA, Goldschmidt H, Niesvizky R, Joshua D, Chng WJ, Oriol A, et al. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1327-37.
165. Efentakis P, Kremastiotis G, Varela A, Nikolaou PE, Papanagnou ED, Davos CH, et al. Molecular mechanisms of carfilzomib-induced cardiotoxicity in mice and the emerging cardioprotective role of metformin. *Blood*. 2019;133(7):710-23.
166. Roeten MSF, Cloos J, Jansen G. Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;81(2):227-43.
167. Naumann K, Schmich K, Jaeger C, Kratz F, Merfort I. Noxa/Mcl-1 balance influences the effect of the proteasome inhibitor MG-132 in combination with anticancer agents in pancreatic cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 2012;23(6):614-26.
168. Chiu HW, Lin SW, Lin LC, Hsu YH, Lin YF, Ho SY, et al. Synergistic antitumor effects of radiation and proteasome inhibitor treatment in pancreatic cancer through the induction of autophagy and the downregulation of TRAF6. *Cancer Lett*. 2015;365(2):229-39.
169. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K, Jr., Boise LH, Chiao PJ, Huang P, et al. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65(24):11510-9.
170. Zhao Y, Bilal M, Raza A, Khan MI, Mehmood S, Hayat U, et al. Tyrosine kinase inhibitors and their unique therapeutic potentialities to combat cancer. *Int J Biol Macromol*. 2021;168:22-37.
171. Lakkakula B, Farran B, Lakkakula S, Peela S, Yarla NS, Bramhachari PV, et al. Small molecule tyrosine kinase inhibitors and pancreatic cancer-Trials and troubles. *Semin Cancer Biol*. 2019;56:149-67.
172. Kannaiyan R, Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(12):1249-70.

173. Wu S, Fu L. Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer*. 2018;17(1):25.
174. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:373-98.
175. Gupta S, El-Rayes BF. Small molecule tyrosine kinase inhibitors in pancreatic cancer. *Biologics*. 2008;2(4):707-15.
176. Mongre RK, Mishra CB, Shukla AK, Prakash A, Jung S, Ashraf-Uz-Zaman M, et al. Emerging Importance of Tyrosine Kinase Inhibitors against Cancer: Quo Vadis to Cure? *Int J Mol Sci*. 2021;22(21).
177. Madhusudan S, Ganesan TS. Tyrosine kinase inhibitors and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res*. 2007;172:25-44.
178. Huang L, Jiang S, Shi Y. Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001–2020). *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13(1):143.
179. Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015;36(7):422-39.
180. Huang YS, Xue Z, Zhang H. Sorafenib reverses resistance of gastric cancer to treatment by cisplatin through down-regulating MDR1 expression. *Med Oncol*. 2015;32(2):470.
181. Zahavi D, Weiner L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)*. 2020;9(3).
182. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):201.
183. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):714-27.
184. Berestjuk I, Lecacheur M, Carminati A, Diazi S, Rovera C, Prod'homme V, et al. Targeting Discoidin Domain Receptors DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated tumor cell adaptation and tolerance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *EMBO Molecular Medicine*. 2022;14(2):e11814.
185. Giroux V, Dagorn JC, Iovanna JL. A review of kinases implicated in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2009;9(6):738-54.
186. Peerzada MM, Spiro TP, Daw HA. Pulmonary toxicities of tyrosine kinase inhibitors. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2011;9(11):824-36.
187. Chen J, Röcken C, Nitsche B, Hosius C, Gschaidmeier H, Kahl S, et al. The tyrosine kinase inhibitor imatinib fails to inhibit pancreatic cancer progression. *Cancer Lett*. 2006;233(2):328-37.
188. Marek-Iannucci S, Yildirim AD, Hamid SM, Ozdemir AB, Gomez AC, Kocatürk B, et al. Targeting IRE1 endoribonuclease activity alleviates cardiovascular lesions in a murine model of Kawasaki disease vasculitis. *JCI Insight*. 2022;7(6).
189. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(W1):W98-W102.

190. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, et al. NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D885-90.
191. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-50.
192. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics.* 2011;27(12):1739-40.
193. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991;51(10):2515-20.
194. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review.* 11: Elsevier; 2005. p. 127-52.
195. Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol.* 2011;731:421-34.
196. Di Veroli GY, Fornari C, Wang D, Mollard S, Bramhall JL, Richards FM, et al. Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics.* 2016;32(18):2866-8.
197. Motulsky H. *The GraphPad guide to comparing dose-response or kinetic curves.* GraphPad Software, San Diego, CA. 1998.
198. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract.* 2014;2014:357027.
199. White MC, Schroeder RD, Zhu K, Xiong K, McConkey DJ. HRI-mediated translational repression reduces proteotoxicity and sensitivity to bortezomib in human pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2018;37(32):4413-27.
200. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(5):245-54.
201. Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Dunner K, Jr., Huang P, et al. Bortezomib Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis. *Cancer Research.* 2005;65(24):11658-66.
202. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K, Jr., Boise LH, Chiao PJ, Huang P, et al. Bortezomib Inhibits PKR-Like Endoplasmic Reticulum (ER) Kinase and Induces Apoptosis via ER Stress in Human Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research.* 2005;65(24):11510-9.
203. Zhang Y, Bai C, Lu D, Wu X, Gao L, Zhang W. Endoplasmic reticulum stress and autophagy participate in apoptosis induced by bortezomib in cervical cancer cells. *Biotechnol Lett.* 2016;38(2):357-65.
204. Chauhan D, Li G, Shringarpure R, Podar K, Ohtake Y, Hideshima T, et al. Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res.* 2003;63(19):6174-7.
205. Robertson JD, Datta K, Biswal SS, Kehrer JP. Heat-shock protein 70 antisense oligomers enhance proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Biochem J.* 1999;344 Pt 2(Pt 2):477-85.

206. Kim JL, Lee DH, Jeong S, Kim BR, Na YJ, Park SH, et al. Imatinib-induced apoptosis of gastric cancer cells is mediated by endoplasmic reticulum stress. *Oncol Rep.* 2019;41(3):1616-26.
207. Yu C, Friday BB, Lai J-P, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, et al. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Molecular cancer therapeutics.* 2006;5(9):2378-87.
208. Maletzke S, Salimi A, Vieri M, Schroeder KM, Schemionek M, Masouleh BK, et al. Combined inhibition of BCR-ABL1 and the proteasome as a potential novel therapeutic approach in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *PLOS ONE.* 2022;17(10):e0268352.
209. Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives.* 2015;3(3):e00149.
210. Shi YH, Xu QC, Zhu YQ, Liu ZD, Zhao GY, Liu Q, et al. Imatinib facilitates gemcitabine sensitivity by targeting epigenetically activated PDGFC signaling in pancreatic cancer. *Mol Ther.* 2023;31(2):503-16.
211. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai Y-T, Cirstea D, Santo L, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood.* 2012;119(24):5772-81.
212. Zhang D, De Veirman K, Fan R, Jian Q, Zhang Y, Lei L, et al. ER stress arm XBP1s plays a pivotal role in proteasome inhibition-induced bone formation. *Stem Cell Research & Therapy.* 2020;11(1):516.

8. EKLER

EK-1: CompuSyn Yazılımı Tarafından Belirtilen Sinerjistik ve Antagonistik Aralıklar.

ETKİ	Kombinasyon İndeks değeri (CI)
Çok kuvvetli sinerji	<0.1
Kuvvetli sinerji	0.1-0.3
Sinerji	0.3-0.7
Orta sinerji	0.7-0.85
Zayıf sinerji	0.85-0.90
Kısmen aditif	0.90-1.10
Zayıf antagonizm	1.10-1.20
Orta antagonizm	1.20-1.45
Antagonizm	1.45-3.3
Kuvvetli Antagonizm	3.3-10
Çok kuvvetli antagonizm	>10

EK-2: *in silico* analizlerde kullanılan Endoplazmik retikulum ile ilişkili gen listesi.

Gen Sembolleri (mikrodizi ve RNAseq)	
HSPA5	EIF2A
ATF6	EIF2AK2
EIF2AK3	SSR1
ERN1	S100P
XBP1	WIPI1
EDEM1	DNAJB9
TRAF2	DNAJC10
HYOU1	EDEM2
DNAJC3	EDEM3
CALR	ERO1A
STC2	HERPUD1
ATF4	PDIA3
PPP1R15A	PDIA6
DERL1	SEC61A1
DERL2	SERP1
DNAJB11	SYVN1
RTN3	CEBPB
SOD2	ERP29
ERP44	TRIB3
OS9	

Gen Sembolleri (proteomik veri)	
DNAJB11	PDIA6
DNAJC3	SOD2
EDEM1	SSR1
EDEM2	WIPI1
EIF2A	WFS1
ERN1	XBP1
ERP29	ATF4
ERP44	ATF6
HSPA5	CEBPB
PDIA3	DDIT3
PDIA4	EIF2AK2
TRIB3	EIF2AK3
OS9	S100P
RTN3	TRIB1
SEL1L	

EK-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu.**BORTEZOMİB VE İMATİNİB'İN PANKREAS KANSERİNDE OLASI SİNERJİSTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ORJİNALLİK RAPORU

% 5 BENZERLİK ENDEKSİ	% 4 İNTERNET KAYNAKLARI	% 2 YAYINLAR	% 1 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
---------------------------------	-----------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
4	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.diclemedj.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	pure.fujita-hu.ac.jp İnternet Kaynağı	<% 1

EK-4: Dijital Makbuz.

turnitin

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Gaye Pişiren
Ödev başlığı:	BORTEZOMİB VE İMATİNİBİN PANKREAS KANSERİNDE OLASI ...
Gönderi Başlığı:	BORTEZOMİB VE İMATİNİBİN PANKREAS KANSERİNDE OLASI ...
Dosya adı:	N_PANKREAS_KANSER_NDE_OLASI_S_NERJ_ST_K_ETK_S_N_N_...
Dosya boyutu:	3.15M
Sayfa sayısı:	96
Kelime sayısı:	22,424
Karakter sayısı:	154,189
Gönderim Tarihi:	22-May-2023 10:30ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2099030067

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BORTEZOMİB VE İMATİNİBİN PANKREAS KANSERİNDE
OLASI SİNERJİSTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr. Gaye Pişiren

İlaçlar Bilimliği ve Farmakolojik Program
YERLEK LİSANS YERİ

ANKARA
2023

Copyright 2023 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

EK-5: Etik Kurul İzin Belgesi.

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 1162

Konu :

15.06.2021

Dr. Öğr. Üyesi Begüm KOCATÜRK
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Dr. Öğr. Üyesi KOCATÜRK,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz GO 21/754 kayıt numaralı ve *"Bortezomib ve İmatinib'in Pankreas Kanseri Üzerinde Olası Sinerjistik Etkisinin İncelenmesi"* başlıklı proje Kurulumuzun 15.06.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, çalışmanın satın alınmış ticari hücre hatları üzerinde tamamlanacağı görülmüştür. Gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Bu yazı ilgili protokolün etik açıdan incelendiğini belirtmek için Etik Kurul kararı yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN
Başkan

EK :
Toplantı Katılım Tutanağı.

9. ÖZGEÇMİŞ