



**PANKREAS KANSERİ ve TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN
ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖRÜ 2 KİNAZ (EF2K)
ENZİM İNHİBİSYONU ARACILIĞIYLA HEDEFLENMESİ**

Didem KARAKAŞ



**PANKREAS KANSERİ ve TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN
ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖRÜ 2 KİNAZ (EF2K)
ENZİM İNHİBİSYONU ARACILIğIYLA HEDEFLENMESİ**

Didem KARAKAŞ



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREAS KANSERİ ve TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN ÖKARYOTİK
ELONGASYON FAKTÖRÜ 2 KİNAZ (EF2K) ENZİM İNHİBİSYONU
ARACILIĞIYLA HEDEFLENMESİ**

Didem KARAKAŞ

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2017
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Didem KARAKAŞ tarafından hazırlanan "Pankreas kanseri ve tümör mikroçevresinin ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K) enzim inhibisyonu aracılığıyla hedeflenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen Dere

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Egemen Dere

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Ferda Arı

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Arzu Yılmaztepe Oral

Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç.Dr. Selvi Durmuş Erim

İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Moleküler Onkoloji

Üye: Prof. Dr. Engin Ulukaya

İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İmza
İmza

İmza
İmza

İmza
İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

24/02/2017

İmza

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17/02/2017

Didem KARAKAŞ

ÖZET

Doktora Tezi

PANKREAS KANSERİ ve TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖRÜ 2 KİNAZ (EF2K) ENZİM İNHİBİSYONU ARACILIĞIYLA HEDEFLENMESİ

Didem KARAKAŞ

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Pankreatik kanser ortalama 6 aylık sağ kalım süresi ile en agresif ve ölümcül kanser türlerinden biridir. Kullanılan geleneksel tedavi yöntemleri sadece kanser hücrelerini hedeflemektedir. Ancak son yıllardaki çalışmalar ile tümör mikroçevresinin de tümör gelişimi, invazyonu, kemorezistans ve metastaz süreçlerinde aktif rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle etkin bir tedavi için hem tümör hücrelerinin, hem de tümör mikroçevresinin hedeflenmesi gerekmektedir. Ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K), kanser hücrelerinde artmış aktivite gösteren ve stres koşullarında kanser hücrelerinin hayatta kalmasında rol alan bir enzimdir. EF2K pankreas kanserinde invazyon sürecinde rol almaktadır ve bu enzimin inhibisyonu kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklemektedir. Literatürde EF2K ile tümör mikroçevresi arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada tümör mikroçevresinin önemli hücre gruplarından biri olan makrofajlar ile PANC1 pankreatik kanser hücreleri arasındaki etkileşimin EF2K ekspresyonuna etkileri incelendi. Çalışmada PANC1 hücreleri ile monositik THP-1 hücreleri ve bu hücrelerden polarize edilen makrofajlar indirekt olarak kültüre edildi. Ardından PANC1 hücrelerinde EF2K ekspresyonu, hücre migrasyon ve invazyonundaki değişimler sırasıyla western blot, migrasyon ve invazyon testleri ile incelendi. PANC1 hücreleri ile monosit ve makrofajların kokültürü sonrası, tümör mikroçevresinin önemli kemokinlerinden olan monosit kemoatraktan-1 proteini (MCP-1) düzeyleri ELISA testi ile ölçüldü. MCP-1'in PANC1 hücrelerinde EF2K ekspresyonu ve migrasyon yetenekleri üzerine etkileri de incelendi. MCP-1'in monosit-makrofaj dönüşümü üzerindeki etkisi western blot ile incelendi. MCP-1 ile EF2K arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla, EF2K overeksprese eden PANC1 hücreleri kullanılarak MCP-1 düzeyi western blot ile incelendi. Ayrıca, EF2K siRNA'sı kullanılarak PANC1 hücrelerinin koloni oluşturma, migrasyon ve invazyon yeteneklerinde ve MCP-1 ekspresyonundaki değişimler incelendi. EF2K inhibisyonunun *in vivo* etkilerini değerlendirmek için pankreatik ortotopik tümör modeli kullanıldı ve EF2K inhibisyonu sonrası MCP-1 düzeyi western blot ile incelendi. Tümöre infiltre olan protümörijenik makrofajlar mmünohistokimyasal boyama ile gösterildi. Sonuç olarak, makrofajlar ile PANC1 hücreleri arasındaki etkileşimin EF2K ve MCP-1 ekspresyonunu arttırdığı ve hücre migrasyon ve invazyonunda artışa neden olduğu bulundu. Ayrıca EF2K ile MCP-1 arasında iki yönlü bir etkileşim olduğu ve MCP-1'in monositlerin protümörijenik makrofajlara farklılaşmasına yol açtığı bulundu. EF2K'nin *in vitro* susturulması MCP-1 protein düzeyinde, hücre invazyon ve migrasyonunda azalmaya yol açtı. Ayrıca, EF2K inhibisyonu sonucu *in vivo* olarak tümör hacmi ve proliferasyonunda ve MCP-1 protein ekspresyonunda azalma olduğu gösterildi. EF2K inhibisyonu tümöre infiltre olan protümörijenik makrofaj sayısında da azalmaya yol açtı. Sonuç olarak, EF2K inhibisyonu ile hem kanser hücreleri hem de makrofajların hedeflenmesinin pankreatik kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: pankreatik kanser, tümör mikroçevresi, makrofaj, EF2K, MCP-1

2017, xi + 104 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

TARGETING PANCREATIC CANCER and TUMOR MICROENVIRONMENT THROUGH EUKARYOTIC ELONGATION FACTOR 2 KINASE (EF2K) INHIBITION

Didem KARAKAŞ

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Egemen DERE

Pancreatic cancer is one of the most aggressive and deadliest cancer with 6 months average survival rate. Traditional therapies only target cancer cells. However, recent studies indicate that tumor microenvironment plays an important role during tumor progression, invasion, chemoresistance and metastasis. Therefore, both tumor cells and their microenvironment should be targeted for an effective treatment. Eukaryotic elongation factor 2 kinase (EF2K) is an enzyme which is overexpressed in cancer cells that plays a key role in cancer cell survival under stress conditions. EF2K participate in invasion of pancreatic cancer cells and inhibition of this enzyme triggers apoptosis in cancer cells. There is no study that have shown the relationship between EF2K and tumor microenvironment. Therefore, in this study it has been investigated that the interaction between macrophage (one of the most abundant cell type in tumor microenvironment) and PANC1 pancreatic cancer cells on EF2K expression. In this study, PANC1 cells were cultured with monocytic THP-1 cells and macrophages which were polarized from THP-1 cells. The changes in EF2K expression, cell migration and invasion were analyzed using western blot, migration and invasion assays, respectively. The effects of coculture of PANC1 cells with monocytes and macrophages on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels, which is one of the most important chemokines in tumor microenvironment were analyzed using ELISA. The role of MCP-1 on both EF2K and migration of PANC1 cells were investigated. The role of MCP-1 on monocyte-macrophage differentiation was also investigated. To determine the relationship between EF2K and MCP-1, EF2K was stably overexpressed in PANC1 cells and MCP-1 levels were measured using western blot. EF2K was silenced using siRNA and then the changes in MCP-1 expression levels, the ability of colony formation, migration and invasion of PANC1 cells were investigated. Pancreatic orthotopic tumor model was used to determine the *in vivo* effects of EF2K inhibition. Following EF2K inhibition, the changes in expression levels of MCP-1 was measured using western blot. The presence of tumor-infiltrated pro-tumorigenic macrophages were shown using immunohistochemical staining. As a result, it was found that the interaction between PANC1 cells and macrophages caused an increase in EF2K and MCP-1 proteins and this interaction accelerated cell migration and invasion. In addition, there was a bidirectional interaction between MCP-1 and EF2K. MCP-1 also caused differentiation of monocytes to pro-tumorigenic macrophages. *In vitro* silencing of EF2K decreased MCP-1 expression, cell invasion and migration. *In vivo* inhibition of EF2K also decreased MCP-1 expression, tumor volume and the number of tumor-infiltrated pro-tumorigenic macrophages. Consequently, targeting both tumor cells and macrophages through EF2K inhibition might be a promising strategy for pancreatic cancer treatment.

Key words: pancreatic cancer, tumor microenvironment, macrophage, EF2K, MCP-1

2017, xi + 104 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde danışmanlığımı yapan, tecrübelerinden her daim faydalandığım, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük özveri gösteren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Yüksek lisans çalışmalarımda eş danışmanlığımı üstlenen, ideallerim doğrultusunda ilerlemem için beni her zaman yüreklendiren ve yanımda olan, bilimsel ve insani olarak her zaman saygı duyduğum ve örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için beni öğrencisi olarak kabul eden ve eğitim hayatım boyunca hep çalışma hayalini kurduğum dünyanın en prestijli kanser araştırma merkezlerinden biri olan M.D. Anderson Cancer Center'da çalışma şansını bana vererek bu eşsiz deneyimi yaşamama olanak sağlayan, bilimsel bilgisine ve kendini bilime adanmasına hayranlık duyduğum, tanıma şansına eriştiğim için büyük mutluluk duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Bülent ÖZPOLAT'a,

Bugüne kadar yaptığım tüm çalışmalarda her ihtiyacım olduğunda desteklerini hissettiğim, fikir ve tecrübelerinden her daim yararlandığım değerli hocalarım Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL ve Doç. Dr. Ferda ARI'ya,

Çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, hem bilimsel hem arkadaşlık anlamında desteklerini hep hissettiğim sevgili arkadaşlarım Nermin KAHRAMAN, Recep BAYRAKTAR, Emine BAYRAKTAR, Nashwa KABİL, Buse CEVATEMRE ve tüm diğer arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi olan canım annem ve babam Sevim ve Selami KARAKAŞ'a, her koşulda yanımda olduğunu hissettiren, iyi ki benim kardeşim olmuş dediğim canım kardeşim Onur KARAKAŞ'a,

En zor zamanlarımda varlığı ve desteği ile güçlü kalmamı sağlayan, hayallerimin ve ideallerimin en büyük destekçisi olan Emre ZEYBEK'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Bursu (2015 1. dönem) ile desteklenerek Doç. Dr. Bülent Özpolat'ın yönetiminde University of Texas (Houston) M.D. Anderson Cancer Center'da tamamlanmıştır.

Didem KARAKAŞ

17/02/2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SIMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. Pankreas Anatomisi ve Fizyolojisi.....	2
2.2. Pankreatik Kanseri, Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi.....	3
2.3. Pankreatik Kanseri Histolojisi.....	5
2.4. Pankreas Kanseri Moleküler Biyolojisi.....	7
2.4.1. KRAS.....	8
2.4.2. Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A (CDKN2A).....	9
2.4.3. TP53.....	9
2.4.4. SMAD.....	10
2.5. Tümör Mikroçevresi.....	10
2.5.1. Fibroblastlar ve tümör mikroçevresindeki rolü.....	12
2.5.2. İmmün hücreler ve tümör mikroçevresindeki rolü.....	15
2.5.3. Adipoz hücreler ve rolü.....	21
2.5.4. Kan ve lenfatik hücreler ve rolleri.....	22
2.5.5. Ekstraselüler matriks (ECM) ve rolü.....	23
2.6. Tümör Mikroçevresindeki Ekstraselüler Moleküller.....	24
2.7. Eksozomlar.....	25
2.8. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 Kinaz (EF2K) Enzimi.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Hücre kültürü malzemeleri ve kimyasal maddeler.....	29
3.1.2. Sarf malzemeler.....	30
3.1.3. Cihazlar.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Hücre kültürü.....	31
3.2.2. Kullanılan besiyerinin hazırlanması.....	31
3.2.3. Hücre soylarının stoktan çıkartılması.....	32
3.2.4. Pankreatik kanser hücre soylarının pasajlanması ve stoklanması.....	32
3.2.5. Süspanse THP-1 hücre soyunun pasajlanması.....	33
3.2.6. Hücre stoklanması.....	33
3.2.7. Hücrelerin sayımı.....	33
3.2.8. siRNA uygulaması.....	34

3.2.9. MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) hücre canlılık testi	34
3.2.10. THP-1 hücrelerinin M0 ve M2 tip makrofajlara polarize edilmesi	36
3.2.11. Pankreatik kanser hücreleri ve stellat hücrelerinin farklılaşmamış ve farklılaşmış THP-1 hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmesi	37
3.2.12. Farklılaşmamış ve farklılaşmış THP-1 hücrelerinden eksozom izolasyonu	39
3.2.13. Koloni oluşturma yeteneği testi	41
3.2.14. Hücre migrasyon testi	41
3.2.15. Matrijel hücre invazyon testi.....	41
3.2.16. Salınmış MCP-1 düzeyinin belirlenmesi için enzim-bağımlı immünosorbent test (ELISA) uygulanması	42
3.2.17. Western blot metodu	43
3.2.17.1. Protein izolasyonu.....	43
3.2.17.2. Örneklerin protein miktarlarının ölçülmesi, yüklenmesi ve jelde yürütülmesi	44
3.2.17.3. Islak transfer yöntemiyle proteinlerin membrana aktarılması	45
3.2.17.4. Membranların bloklanması ve antikor aklenmesi.....	45
3.2.18. Lipozomal siRNA hazırlanması.....	46
3.2.19. In vivo ortotopik zenograft tümör modeli.....	46
3.2.20. İmmünohistokimyasal analizler	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Kokültür Deneyleri	47
4.1.1. Monositik hücrelerin makrofajlara farklılaştırılması ve karakterizasyonu	47
4.1.2. Pankreatik kanser ve stellat hücrelerinin farklılaşmamış ve farklılaşmış monosit hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmesinin ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K) enzim ekspresyonu üzerine etkisi	48
4.1.3. THP1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajların ortamdaki varlığının PANC1 hücrelerinin göç etme (migrasyon) ve invazyon yetenekleri üzerine etkisi.....	50
4.2. Kokültür Ortamındaki Eksozomların PANC1 Hücreleri Üzerine Etkileri	53
4.2.1. THP-1, M0 ve M2 hücrelerinden izole edilen eksozomların sayı ve boyut bakımından kantifiye edilmesi.....	53
4.2.2. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 hücreleri kaynaklı eksozomların PANC1 hücrelerinde EF2K protein ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi	55
4.2.3. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 hücreleri kaynaklı eksozomların PANC1 hücrelerinin göç etme (migrasyon) ve invazyon yetenekleri üzerine etkisi.....	55
4.3. EF2K Proteinini ile Mikroçevre Proteinlerinden Olan Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1) Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	57
4.3.1. THP-1, M0 ve M2 hücrelerinin MCP-1 üzerine etkilerinin incelenmesi	57
4.3.2. MCP-1 peptidi uygulanmasının PANC1 hücrelerinde EF2K protein ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi	59
4.3.3. MCP-1 peptidi uygulanmasının PANC1 hücrelerinde hücre proliferasyonu, koloni oluşturma yeteneği ve hücre migrasyonu üzerine etkisi	59
4.4. EF2K Protein Overekspresyonunun MCP-1 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	64
4.5. MCP-1 Proteinin THP-1 Makrofajları Üzerine Etkisi	65

4.6. Pankreatik Kanser Hücrelerinin ve Makrofajların EF2K İnhibisyonu ile Hedeflenmesi	66
4.6.1. EF2K inhibisyonunun hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkisi.....	66
4.6.2. EF2K inhibisyonunun hücrelerin metastatik yetenekleri üzerine etkisi	67
4.6.3. EF2K inhibisyonunun protein ifadelerine etkisi	68
4.6.4. EF2K İnhibisyonunun Kemoterapi Yanıtına Etkisinin İncelenmesi.....	69
4.6.5. EF2K enzimi inhibisyonunun M0 ve M2 makrofajlar üzerinde incelenmesi.....	72
4.7. EF2K Enzim İnhibisyonunun <i>in vivo</i> Etkilerinin İncelenmesi	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	76
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	103



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
ATP	Adenozin trifosfat
CAF	Karsinoma ile ilişkili fibroblast
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 A
ECM	Ekstraselüler matriks
EF2	Ökaryotik elongasyon faktörü 2
EF2K	Ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FAP	Fibroblast aktivasyon proteini
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAP	Guanozin trifosfataz aktive edici protein
GEF	Guanin nükleotid değişim faktörü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
IFN- γ	Interferon gama
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IPMN	İntraduktal papiller müsinöz
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein 1
PanIN	Pankreatik intraepitelyal neoplazi
PDAC	Pankreatik duktal adenokarsinom
PDGFR β	Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü beta
SDF-1	Stromal hücre kaynaklı faktör 1
TAM	Tümörle ilişkili makrofaj
TGF- β	Transforme büyüme faktörü beta
TNF- α	Tümör nekrozis faktörü alfa
α -SMA	Alfa düz kas aktini

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Pankreasın anatomisi. Pankreasın onikiparmak bağırsağı ve safra kanalı ile anatomik ilişkisini gösteren genel anatomisi	2
Şekil 2.2. Pankreatik kanserin gelişim modeli.....	6
Şekil 2.3. Pankreatik kanseri gelişiminde rol alan genetik değişiklikler	7
Şekil 2.4. Tümör mikroçevresi.....	11
Şekil 2.5. CAF'ların köken aldığı hücre grupları	14
Şekil 2.6. CAF'lar ve kanser hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimin şematize edilmesi	15
Şekil 2.7. Kalıtsal ve adaptif bağışıklıkta rol alan immün sistem hücreleri	16
Şekil 2.8. M1 ve M2 türü makrofajların indükleyicileri, ürettikleri proteinler ve fonksiyonları	19
Şekil 2.9. EF2K'nın kanser hücrelerindeki rolleri	28
Şekil 3.1. MTS tuzunun canlı hücrede (metabolik olarak aktif hücre) formazan kristali oluşturmasının şematize edilmiş hali	35
Şekil 3.2. Monositik THP-1 hücrelerinin PMA ve IL4+IL13 uygulaması sonrası M0 ve M2 tip makrofajlara polarize edilmesi.....	37
Şekil 3.3. Farklılaşmamış ve farklılaşmış THP-1 hücrelerinin (M0 ve M2 tip makrofaj) PANC1, MiaPaCa-2 ve PSC hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmesinin şematik olarak gösterimi	39
Şekil 4.1. Süspanse haldeki monositik THP-1 hücrelerinin PMA ve IL4+IL13 uygulaması ile yüzeye yapışma yeteneği kazanması ve makrofajlara farklılaşması.....	48
Şekil 4.2. Pankreatik kanser hücre hatları (PANC1, MiaPaCa-2), pankreatik stellat hücreleri (PSC) ve normal pankreas hücre hattında (HPDE) EF2K ekspresyon düzeylerinin western blot metodu ile ölçülmesi.....	49
Şekil 4.3. Pankreatik kanser hücre hatları (PANC1, MiaPaCa-2) ve pankreatik stellat hücrelerinin (PSC) THP-1 monosit hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlar ile birlikte kültüre edilmesi sonrası hücrelerdeki EF2K ekspresyon değişimlerinin western blot metodu ile gösterilmesi.	50
Şekil 4.4. PANC1 hücrelerinin THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlarla indirekt olarak kültüre edilmesinin hücre migrasyonu (A) ve invazyonu üzerine etkisi (B, C). Hücre migrasyonu, ve invazyonu ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyindeki değişimlerin western blot metodu ile incelenmesi (D).	52
Şekil 4.5. THP-1 hücreleri (A), M0 tip (B) ve M2 tip (C) makrofajlardan izole edilen eksozomların konsantrasyon ve boyutlarının nanosight ile ölçümü	54
Şekil 4.6. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan izole edilen eksozomların PANC1 hücreleriyle 48 saat muamelesi sonrası EF2K ekspresyon düzeyi değişimleri.....	55
Şekil 4.7. PANC1 hücrelerinin THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan izole edilen eksozomlarla muamele edilmesinin hücre migrasyonu (A) ve invazyonu üzerine etkisi (B, C).....	56

Şekil 4.8. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan salınan MCP-1 düzeyleri (A). PANC1 hücrelerinin THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle kokültürü sonrası ortamdaki MCP-1 düzeylerindeki değişimler (B).....	58
Şekil 4.9. THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle kokültür yapılan PANC1 hücrelerinde MCP-1 ekspresyonunun western blot ile incelenmesi.....	58
Şekil 4.10. PANC1 hücrelerine 6 ve 24 saat boyunca üç farklı konsantrasyonda (25, 50 ve 100 ng/ml) MCP-1 uygulanmasının EF2K ekspresyonu üzerine etkisi.....	59
Şekil 4.11. PANC1 hücrelerinin MCP-1 uygulaması sonucu koloni oluşturabilme yetenekleri.....	60
Şekil 4.12. PANC1 hücrelerinin MCP-1 uygulaması sonucu koloni oluşturabilme yetenekleri.....	61
Şekil 4.13. PANC1 hücrelerine 48 saatlik MCP-1 (1,25-50 ng/ml) uygulaması sonucu hücrelerin proliferasyon özelliklerindeki değişikliklerin MTS testi ile değerlendirilmesi. .	62
Şekil 4.14. PANC1 üç farklı konsantrasyonda (25, 50 ve 100 ng/ml) MCP-1 uygulanmasının hücre migrasyonu üzerine etkisi.....	63
Şekil 4.15. MCP-1 uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinde migrasyon, invazyon ve anjiyogenez ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinin western blot metodu ile incelenmesi.	64
Şekil 4.16. EF2K overeksprese edilen PANC1 hücrelerinde MCP-1 protein ekspresyon düzeyinin western blot ile incelenmesi.	65
Şekil 4.17. THP-1 hücrelerinin PMA, PMA+IL4+IL13 ve MCP-1 ile muamelesi sonrası pro-tümörijenik makrofaj markırı olan CD206 ekspresyonunun western blot ile belirlenmesi.....	65
Şekil 4.18. EF2K siRNA uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü.....	66
Şekil 4.19. EF2K siRNA uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinin migrasyon (A) ve invazyon (B ve C) yeteneklerinin incelenmesi.	68
Şekil 4.20. EF2K siRNA uygulaması sonrası PANC1 hücrelerindeki protein ekspresyon değişimlerinin western blot metodu ile belirlenmesi.....	69
Şekil 4.21. PANC1 hücrelerinin 7 farklı doz gemsitabin (0,20-12,5 µM) ile 96 saat boyunca muamelesi sonrası (%) hücre canlılığı grafiği (A). Hücrelerin 50 nM konsantrasyondaki kontrol siRNA'sı ve EF2K siRNA'sı ile transfeksiyonu sonrası hücre canlılığı grafiği (B)	70
Şekil 4.22. PANC1 hücrelerinin 7 farklı doz gemsitabin (0,20-12,5 µM) ile kombine olarak kontrol siRNA'sı (A) ve EF2K siRNA'sı (B) ile 96 saat boyunca muamelesi sonrası (%) hücre canlılığı grafiği.....	71
Şekil 4.23. PANC1 hücrelerinin kontrol siRNA / EF2K siRNA'sı ile 24 saat transfeksiyonunun ardından gemsitabine 72 saat maruziyeti sonrası oluşturulan (%) hücre canlılığı grafiği.....	71
Şekil 4.24. M0 ve M2 tip makrofajların 100 nM konsantrasyonundaki EF2K siRNA'sı ile 48 saat muamelesi sonrası EF2K ve CCR2 protein ekspresyonlarının western blot ile incelenmesi.....	72

Şekil 4.25. Atimik dişi nude farelere PANC1 hücreleri enjeksiyonu sonrası kontrol ve EF2K siRNA'ları ile 4 hafta boyunca tedavi sonucu tümör hacimleri	73
Şekil 4.26. Kontrol siRNA ve EF2K siRNA'sı uygulanan tümör dokularının hematoxilen & eozin ile boyama görüntüleri	74
Şekil 4.27. Kontrol siRNA ve EF2K siRNA'sı uygulanan tümör dokularının hematoxilen & eozin ile boyama görüntüleri	74
Şekil 4.28. Kontrol siRNA ve EF2K siRNA'sı uygulanan tümör dokularında EF2K ve MCP-1 protein ekspresyonlarının western blot ile incelenmesi (A). Doku kesitlerinin M2 tip makrofaj infiltrasyonu markırı olan F4/80 antikoru ile boyanması (B)	75



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Makrofajların buldukları organlara göre isimlendirilmesi (Das ve ark. 2015'ten Türkçeleştirilerek alınmıştır).20
---	-----



1. GİRİŞ

Pankreatik kanser tüm kanser türleri arasında en öldürücü kanserlerden biridir ve hastaların 5 yıllık sağ kalım oranları %5'ten daha azdır (Crane ve ark. 2004, Long ve ark, 2011). 2015 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde pankreatik kanser tanısı konan hastaların %80'inden daha fazlası 1 yıl içinde hayatını kaybetmiştir (Anonim 2015). Mevcut tedavi yöntemleriyle tanı konduktan sonra ortalama yaşam süresi 6 aydır, dolayısıyla günümüzde pankreatik kanser için etkin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Pankreatik kanserin en öldürücü kanserler arasında yer almasının nedenleri; erken evrede metastaz yapabilme yeteneği ve agresif tümör gelişimiyle kemoterapi ve radyoterapiye direnç geliştirmesidir (He ve ark. 2012, Ottenhof ve ark. 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, yalnızca karsinoma hücrelerinin değil, tümör mikroçevresinin de pankreatik kanserin bu agresif doğasına katkı sağladığı ortaya konmuştur (Fujita ve ark., 2010; Miyamoto ve ark., 2004). Bu nedenle sadece tümör hücrelerini hedefleyen tedaviler başarısız olmaktadır ve etkin tedavi için karsinoma hücreleri ile birlikte tümör mikroçevresinin de hedeflenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K) enzimi pek çok kanser türünde fazla miktarda aktivite gösteren (Bagaglio ve Hait 1994, Nilsson ve Nygard 1995, Parmer ve ark. 1999, Knebel ve ark. 2002) ve açlık, besin kıtlığı gibi stres koşulları altında protein sentezini yavaşlatarak hücrelerin ekstrem koşullarda bile hayatta kalmalarına olanak sağlayan bir enzimdir (Browne ve ark. 2004). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda EF2K enziminin kanser hücre invazyonu (Ashour ve ark. 2014a) ve ilaç direncinde rol aldığı (Tekedereli ve ark. 2012) ve bu enzimin baskılanmasının hücrelerde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (Ashour ve ark. 2014b). Ancak literatürde EF2K protein ekspresyonu ve tümör mikroçevresi arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

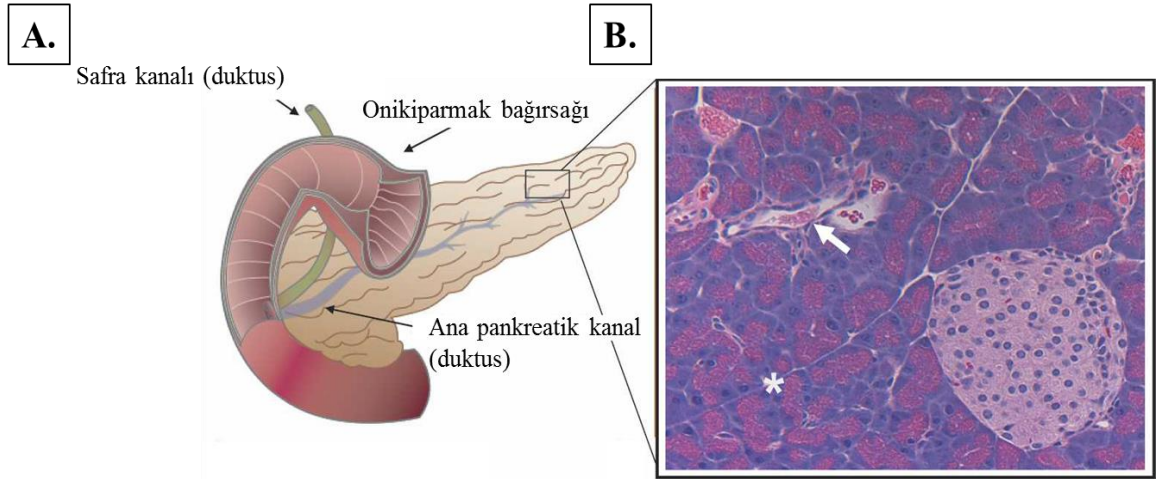
Bu nedenle bu çalışmada, tümör mikroçevresinin önemli hücre gruplarından biri olan makrofajlar ile pankreatik kanser hücreleri arasındaki etkileşimin EF2K proteini üzerine etkileri araştırıldı. Bu çalışma EF2K enziminin tümör mikroçevresinin önemli hücre gruplarından olan makrofajlar ile ilişkisini gösteren ilk çalışmadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Pankreas Anatomisi ve Fizyolojisi

Pankreas endokrin ve ekzokrin fonksiyonlara sahip glandüler bir organdır (Keller ve Layer 2005, Roder ve ark. 2016). Bağırsaklara sindirim enzimlerini sekrete eden ve gastrointestinal sistemin bir parçası olan pankreas, aynı zamanda enerji metabolizmasının kontrolü için hormonlar salgılayan endokrin bir organdır (Longnecker 2014).

Pankreas genel olarak endokrin ve ekzokrin pankreas şeklinde iki başlık altında değerlendirilebilir. Ekzokrin pankreas, sindirim enzimlerini üreten ve onikiparmak bağırsağına sekrete eden kısımdır. Bu kısım bağ doku, kan damarları ve sinirler ile ilişki içinde bulunan asinar ve duktal hücreleri içerir. Ekzokrin kısım total pankreasın %95'lik kısmını meydana getirir. Endokrin pankreas ise kana insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptidleri salgılayan ve total pankreasın %1-2'lik kısmını oluşturan bölümdür (Longnecker 2014). Endokrin pankreastaki hücre tiplerinin kümeler şeklinde bir araya gelmesiyle oluşan yapıya Langerhans Adacıkları adı verilmiştir (Hezel ve ark. 2006). Pankreasın genel yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Pankreasın anatomisi. Pankreasın onikiparmak bağırsağı ve safra kanalı ile anatomik ilişkisini gösteren genel anatomisi (A). Pankreatik parankimanın histolojik düzeydeki ana bileşenleri (B). Sağ alt köşedeki dairesel kısım; Langerhans adacıklarını, yıldız; asinar hücreyi, ok işareti; pankreatik kanalı (duktus) göstermektedir (Hezel ve ark. 2006'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.2. Pankreatik Kanser, Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri tüm kanser türleri arasında, karaciğer kanseri ile birlikte en ölümcül 2 kanser türünden biridir (Siegel ve ark. 2016). 2015 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde pankreatik kanser tanısı konan 48 960 hastadan 40 560 kişisi hayatını kaybetmiştir (Anonim 2015). Semptomlarının azlığı, erken deteksiyon ve efektif tedavi seçeneklerinin bulunmaması nedeniyle en öldürücü kanser türleri arasında yer alan pankreatik kanserin 5 yıllık sağ kalım oranı %5'ten daha düşüktür ve hastaların %50'si ilk 6 ay içinde hayatını kaybetmektedir (Michaud 2017).

Pankreatik kanser için pek çok etiyolojik faktör tanımlanmıştır. Pankreas kanserine neden olan çevresel faktörlerin başında gelen sigara kullanımı en ciddi olan ve en yaygın olarak çalışılan risk faktörlerinden biridir. Aktif sigara kullanımı, günlük tüketilen sigara miktarına bağlı olarak pankreatik kanser riskini 1,5-3 kat arttırmaktadır. Pasif kullanımın risk faktörü olduğu kanıtlanmamıştır (Harnack ve ark. 1997).

Alkol tüketimiyle pankreas kanseri gelişimi arasındaki ilişkiye odaklanan çok sayıda epidemiyolojik çalışma bulunmaktadır. Bazı çalışmalar alkol tüketimi ve pankreas kanseri riski arasında bir ilişki bulunmadığını ifade ederken (Farrow ve Davis, 1990), bazı çalışmalar ise ortalama alkol tüketiminin pankreas kanserine yol açmadığını, ancak aşırı miktarda tüketimin pankreas kanseriyle ilişkili olduğunu ifade etmektedir (Vecchia ve Bosetti 2016).

Beslenme ve pankreas kanseri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yapılan çalışmalar bu konuda tutarlı bir bilgi sunmamaktadır. Bu konuda yapılan pek çok çalışma hayvansal yağlar ve et bakımından (kavrulmuş, ızgara ya da kızarmış) zengin beslenme ile pankreas kanseri arasında ilişki olabileceğini ifade etmektedir. Ancak, et, yumurta, süt ve süt ürünleri tüketiminin artmış pankreas kanseri riskine neden olabileceği üzerine odaklanan bu çalışmaların sonuçları tutarsızdır (Calle ve ark. 2003). Meyve, sebze, vitamin ve lif bakımından zengin beslenme ise koruyucu faktör olarak kabul edilmektedir (Nkondjock ve ark. 2005). Ancak, 2005 yılında yaklaşık 125 000 kişi ile yapılan bir çalışmada, yüksek oranda sebze ve meyve tüketen grup ile yüksek oranda yağ ve et ile beslenen grup arasında

pankreas kanseri riskinin azalması açısından bir fark bulunamamıştır (Michaud ve ark. 2005). Kahve ve çay tüketimiyle pankreatik kanser arasında bir ilişki olduğu saptanamamıştır (Dusek ve ark. 2010).

Obezitenin de pankreatik kanser ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Obezite, adipöz dokularda fizyolojik fonksiyon değişikliklerine yol açarak, insülin direncine, kronik inflamasyona, adipokinlerin sekresyonunda değişikliklere neden olarak karsinogenez ve kanser gelişimine neden olmaktadır (Cindy ve ark. 2015).

Uzun süreli tip 2 diyabet de artmış pankreatik kanser riski ile ilişkilidir. Öte yandan, 2-3 yıldan daha kısa süreli diyabetin, pankreas kanser hücreleri tarafından indüklenen beta-hücre disfonksiyonu ve periferik insülin direncine yol açması nedeniyle erken para-neoplastik bir belirti olduğu, dolayısıyla da etiyolojik bir faktör olmadığı düşünülmektedir (Mateos ve Conlon 2016). Kronik pankreatitis hastalığı da pankreas kanseri için risk faktörlerinden biridir (Mateos ve Conlon 2016). Pankreatik kanser riskini arttıran diğer faktörler arasında, 0-dışındaki kan grupları, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, kronik hepatit B ve C enfeksiyonu yer almaktadır (Mateos ve Conlon 2016). Ancak bu risk faktörlerinin daha fazla çalışma ile desteklenmesine gereksinim duyulmaktadır.

Çevresel karsinojenlere maruziyetin pankreatik kanser riskini arttırdığı bilinmektedir. Özellikle aromatik ve heterosiklik aminlere ve klorlu çözücülere maruziyet pankreatik kanser riskini arttırmaktadır. Berberler, kuaförler, petrokimya ve lastik endüstrisinde çalışan işçiler bu maddelere uzun süre maruz kaldığından bu kişilerin daha fazla risk altında oldukları kabul edilmektedir (Ojajärvi ve ark. 2001). İyonize radyasyon ile pankreatik kanser arasında bir ilişki bulunamamıştır. 1990 yılında yapılan bir çalışma iyonize radyasyonun pankreatik kanser riskini arttırmadığını ifade etmektedir (Anonim, 1990).

Pankreas kanserinin yaş ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. 30'lu yaşlardan sonra insidansın ciddi düzeyde arttığı, 70-80 yaşlarından sonra pik yaparak pankreas kanseri riskinin %80'lere ulaştığı ifade edilmektedir. Ortalama tanı yaşı 65 olarak belirtilen pankreas kanseri için 50 yaşından önce tanı konulan hasta sayısı %10'dan daha azdır (Li ve ark. 2009).

İrk bazında değerlendirildiğinde, en yüksek pankreatik kanser insidansı Amerika BirleŖik Devletleri'nde yaŖayan Afro-Amerikalarda, Kuzey Avrupalılarda, Hawai'deki Polinezyahlarda ve Yeni Zelanda'daki Maorislerde görülmektedir. Amerika BirleŖik Devletleri'nde yaŖayan Afro-Amerikalarda pankreatik kanser nedeniyle meydana gelen lmler Kafkaslara kıyasla 1,4 kat daha yüksektir. Afro-Amerikalarda sigara kullanımının ve diabetin daha yaygın olması bu durumun açıklaması olarak gösterilmektedir (Silverman ve ark. 2003).

Son olarak, pankreatik kanser hastalarının %7-10'u arasında ailesel öykü bulunmaktadır. 2012 yılında yayınlanan Pankreas Tarama Kılavuzu'na göre, en az iki kuŖak yakınında pankreatik kanser hastası olan kiŖilerin, birinci dereceden yakınlarından en az bir kiŖinin pankreatik kanserden etkileneceği belirtilmiŖtir (Mateos ve Conlon 2016).

2.3. Pankreatik Kanser Histolojisi

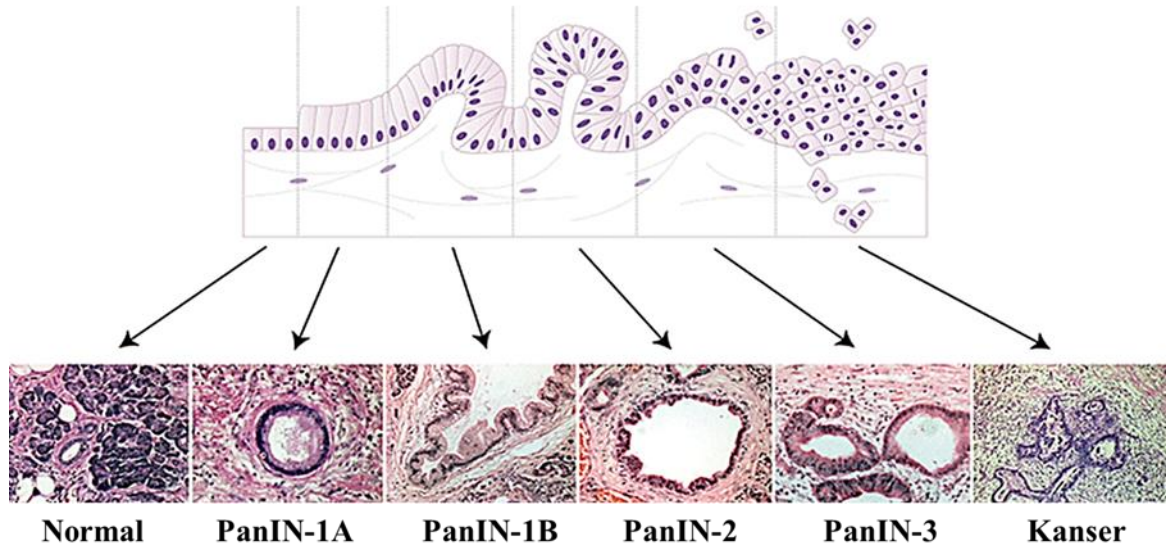
Pankreatik kanser ekzokrin ya da endokrin hücrelerden kkenlenir. Bu yüzden ekzokrin ve endokrin tümörler histolojik bakımdan farklılık gösterirler. Endokrin tümörler genellikle daha az yaygındır ve tüm pankreatik kanserlerin %5'ini meydana getirir (Grant ve ark. 2016). Bu tümörler pankreatik adenokarsinoma kıyasla 27 aylık ortalama yaŖam süresi ile daha dŖk ölüm oranına sahiptir (Fesinmeyer ve ark. 2005). Endokrin tümörler genellikle islet (adacık) hücrelerinden köken alır ve devamlı olarak fazla miktarda pankreatik hormon üretirler. Bu tümörler orjinlerine ve sekrete ettikleri hormonlara göre insülinoma, glukagonoma ve gastrinoma olarak gruplandırılmaktadır (Grant ve ark. 2016). Pankreatik endokrin tümörler ürettikleri fazla miktarda hormonlar nedeniyle meydana gelen hipoglisemi ya da eritreml dermatoz (cilt döküntüsü) gibi dramatik semptomlar nedeniyle daha kolay detekte edilebilirler (Phan ve ark. 1998).

Ekzokrin hücrelerden meydana gelen pankreatik kanserler, endokrin tümörlerden daha yaygındır ve iki ana histolojik alt gruba ayrılmaktadır. Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) alt grubu, ekzokrin tümörlerin büyük çoğunluğunu ve tüm pankreatik malignansilerin de %90'ından fazlasını meydana getirmektedir. PDAC pankreatik duktus ve salgı bezi gibi epitelyal hücrelerden köken almaktadır (Fesinmeyer ve ark. 2005).

Bu hücreler genellikle karaciğer ve lenf nodlarına metastaz yapabilme yeteneğindedir (Kern ve ark. 2002). Erken evrede semptomlarının azlığı nedeniyle PDAC için genellikle tümörün metastaz yaptığı geç evrelerde tanı konulmaktadır.

PDAC'lar pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) ve intraduktal papiler müsinöz neoplazm (IPMN) olarak bilinen hiperplastik lezyonların gelişimi ile meydana gelmektedir (Grant ve ark. 2016) (Şekil 2.1).

Pankreatik intraepitelyal neoplazmalar (PanIN) pankreatik duktusta yer alan mikroskobik, non-invazif epitelyal proliferasyonlar olarak tanımlanmaktadır. PanIN formasyonu aynı zamanda asinar-duktal metaplazi olarak da bilinmektedir. Pankreatik hasar ya da KRAS aktivasyonunu takiben asinar hücreler aşamalı olarak asinar özelliklerini kaybeder ve duktal özellik kazanmaya başlar (Gooiker ve ark. 2014). Bu lezyonlar, mutasyonların birikimine paralel olarak artan displaziye göre 4 grade (sınıf) altında incelenmektedir: PanIN-1A, -1B, -2 ve -3) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Pankreatik kanserin gelişim modeli (Chang ve ark. 2008'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Intraduktal papiler müsinöz neoplazm (IPMN) ise PanIN'den sonra ikinci ana pankreatik kanser prekürsör lezyondur. IPMN, pankreatik duktalardan ya da dallarından köken alan kistik

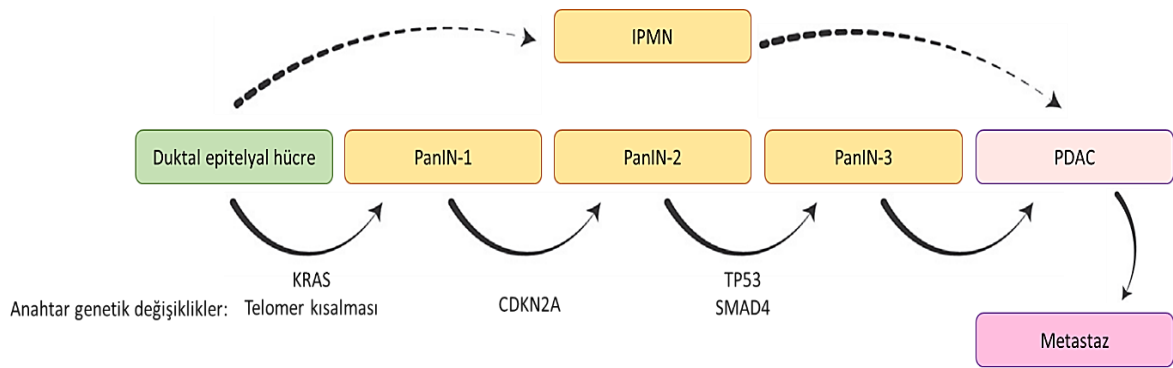
makroskopik lezyonlardır. Bu tümörler fazla miktarda müsin üreterek duktal dilatasyona ve pankreatitise neden olurlar (Mateos ve Conlon, 2016).

2.4. Pankreas Kanseri Moleküler Biyolojisi

Onkojenler proto-onkojen olarak adlandırılan ve hücre döngüsü progresyonu gibi olayları regüle eden genlerdeki mutasyonlar sonucu meydana gelirler (Sakorafas ve ark. 2000). Bu mutasyonların sonucu olarak bu genlerden üretilen proteinler değişikliğe uğrar ve hücre içerisinde farklı özellikler ya da artmış aktivite kazanır.

Tümör supresör genler ise hücre proliferasyonu gibi süreçlerin inhibisyonunda rol alan genlerdir. Tümör supresör genlerde meydana gelen mutasyon ve/veya delesyonlar bu genlerin inhibe edici fonksiyonlarının ortadan kalkmasına neden olur (Friend ve ark. 1988). Sonuç olarak onkojenler ve tümör supresör genlerde meydana gelen bu değişiklikler hücrelerin malign fenotip (artmış proliferasyon, apoptozisten kaçma yeteneği, invazyon ve metastaz yeteneği) kazanmalarına olanak sağlar (Abramson ve ark. 2007).

Tüm genom analizi sonuçlarına göre PDAC’da meydana gelen 4 temel genetik değişiklik şunlardır: onkojenik KRAS mutasyonu ve tümör supresör genler olan CDKN2A, TP53 ve SMAD4 inaktivasyonu (Grant ve ark. 2016) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Pankreatik kanseri gelişiminde rol alan genetik değişiklikler (Grant ve ark. 2016, Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.4.1. KRAS

Pankreas kanserinin tanımlayıcı genetik özelliklerinden biri olan aktive edici KRAS mutasyonları tüm pankreas kanserlerinin yaklaşık %92'sinde bulunmaktadır (Bailey ve ark. 2016). RAS süperailisinin bir üyesi olan KRAS, hücre proliferasyonu, farklılaşma, sağ kalım ve migrasyon gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol alan küçük GTPaz kodlanmasından sorumludur (Downward 2003). Normal fizyolojik koşullar altında KRAS GTP-bağlı aktif formu ile GDP-bağlı inaktif formu arasında dönüşür. Bu iki form arasındaki geçişler GDP'nin GTP'ye dönüşümünden sorumlu olan guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF) adı verilen proteinler ve GTP'den GDP'ye dönüşümü sağlayan GTPaz aktive edici proteinler (GAP) tarafından gerçekleştirilmektedir (Cox ve ark. 2014, Stephen ve ark. 2014). Durağan haldeki hücrede KRAS GDP bağlı haldedir. Büyüme faktörleri stimülasyonu sonrası GEF'ler KRAS'a bağlanarak onun GDP-GTP dönüşümünü katalizleyerek aktivasyonunu sağlar (Pylayeva-Gupta ve ark. 2011).

İnsan PDAC vakalarında KRAS geninde intrinsik GTPaz aktivitesini zayıflatan ve KRAS ile GAP proteinleri arasındaki etkileşimi bloke eden aktive edici nokta mutasyonları olduğu bulunmuştur. Bu mutasyonlar arasında en yaygın olanı kodon G12'de görülmektedir. Bu mutasyon KRAS'ın devamlı aktivasyonu ile birlikte alt kısmında (downstream) yer alan ve artmış proliferasyon, metabolik yeniden programlanma, apoptozisten kaçış ve mikroçevrenin yenilenmesi gibi süreçlerde rol alan sinyal yollarının kalıcı olarak aktivasyonuna neden olmaktadır (Pylayeva-Gupta ve ark. 2011).

Aktive edici KRAS mutasyonları neredeyse tüm pankreatik karsinomların gelişimindeki en erken genetik değişikliktir (Kanda ve ark. 2012). Ayrıca, KRAS geninin ileri evre pankreatik kanserin devamlılığında esansiyel rolü olduğu dominant negatif mutant çalışmalarla öne sürülmüştür (Hirano ve ark. 2002). Daha sonra yapılan RNA-interferans çalışmaları ile KRAS'ın pankreatik karsinom devamlılığında da hayati role sahip olduğu kanıtlanmıştır (Brummelkamp ve ark. 2002, Fleming ve ark. 2005).

2.4.2. Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A (CDKN2A)

Tümörlerin yaklaşık %95'inde CDKN2A geninde fonksiyon kaybı olduğu bilinmektedir (Rozenblum ve ark. 1997, Schutte ve ark. 1997). CDKN2A mutasyonları genellikle ileri derece PanIN lezyonlarında, PDAC gelişiminden önceki dönemlerde detekte edilmektedir (Wilentz ve ark. 1998). CDKN2A geni iki protein kodlamaktadır. Bunlardan ilki olan p16 proteini hücre döngüsündeki G1 kontrol noktasındaki rolü dolayısıyla tümör supresör olarak bilinmektedir (Lukas ve ark. 1995). Bu protein G1 kontrol noktasındaki rolü ile hücre döngüsünde S-fazına geçişin durdurulmasından sorumludur (Sherr 2001). CDKN2A geni aynı zamanda p14ARF proteinini kodlamaktadır (Sherr 2001). P14 proteini p53'ün stabilizasyonu ile büyüme üzerinde negatif regülatör etkiye sahiptir (McWilliams ve ark. 2011). Bu protein p53 proteolizi inhibisyonu ile büyüme tutulması ya da apoptozisi indüklemektedir. P14 inaktivasyonu yalnızca CDKN2A geni delesyonu ile meydana gelmektedir (Rozenblum ve ark. 1997, Schutte ve ark. 1997). Hem p14 hem p16-aracılı büyüme tutulmasının neoplastik transformasyona karşı koruyucu rol oynadıkları düşünülmektedir (McWilliams ve ark. 2011).

2.4.3. TP53

p53 tümör supresör geni PDAC vakalarının %50-75'inde inaktifir (Li ve ark. 2004, Goggins 2005, Hruban ve ark. 2001). 17'nci kromozomda lokalize olan bu gen hücre döngüsü ilerlemesi, apoptozis ve DNA onarımı gibi önemli hücresel olayların düzenlenmesinde rol alan p53 transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. p53 inaktivasyonu ileri evre PanIN lezyonlarında CDKN2A'daki genindeki kaybı takiben meydana gelmektedir (Maitra ve ark. 2003). Bu düzeydeki hastalık progresyonunda, DNA hasarı birikiminin p53 aktivite kaybına yol açan selektif bir baskıya yol açtığı ve bu şekilde tümörjenik hücrelerin hayatta kalma ve proliferere olma özelliklerini koruduğu düşünülmektedir (Grant ve ark. 2016).

PDAC'da p53 mutasyonlarının pankreatik kanserin yüksek metastatik doğasına katkıda bulunduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Morton ve ark 2010). Bir çalışmada p53'ün spesifik tümörle ilişkili olan mutant formunun p73 proteinine bağlandığı ve bu proteinin trombosit-kökenli büyüme faktörü reseptörü beta (PDGFR β) ekspresyonu üzerindeki

baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Weissmueller ve ark. 2014). PDGFR upregülasyonunun farelerde invazyonu ve metastatik potansiyeli arttırdığı bilinmektedir. Dolayısıyla PDAC’da p53 hem tümör supresör hem de metastaza katkı sağlayıcı olarak görev alabilmektedir. Bu bilgiler de PDAC’da meydana gelen genetik değişimlerin karmaşıklığına dikkat çekmektedir (Grant ve ark. 2016).

2.4.4. SMAD

Tümör supresör gen SMAD4 (DPC4) epitelyal hücre büyümesini baskılayan transforme büyüme faktörü beta (TGF- β) sinyal yolağına aracılık etmektedir (Miyaki ve Kuroki 2003). Bu gen pankreatik kanserlerin %55’inde inaktivedir (Hahn ve ark. 1996). SMAD inaktivasyonu hücre döngüsünün düzensiz progresyonuna neden olmaktadır (Hansel ve ark. 2003). SMAD genindeki genetik değişimler genellikle ileri evre PanIN lezyonlarında, CDKN2A kaybı sonrası meydana gelmektedir ve bu durum ile SMAD4 kaybı tümör başlangıcı evresinin final aşamalarından biri olmaktadır (Maitra ve ark. 2003, Wilentz ve ark. 2000). Ek olarak, SMAD4 kaybı olan hastaların wild-type SMAD4 ekspresyonuna sahip hastalara kıyasla daha kötü prognoza sahip oldukları belirtilmiştir (Tascilar ve ark. 2001).

2.5. Tümör Mikroçevresi

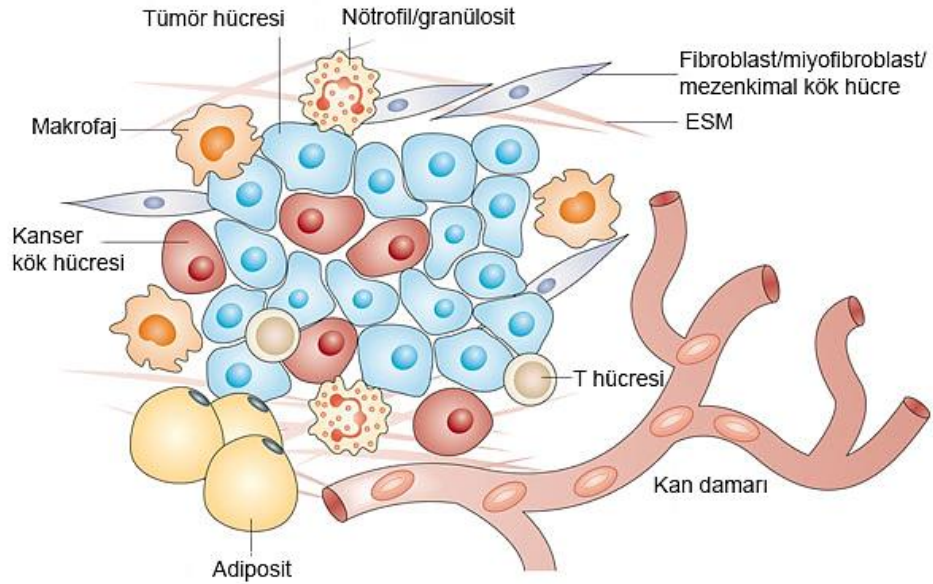
Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren malign sürecin devamlılığını sağlayan malign hücrelerdeki genetik ve epigenetik değişiklikler kanser biyolojisi ve terapisi konularının odağı durumuna gelmiştir (Stratton ve ark. 2009). Ancak günümüzde bu malign süreçte sadece tümör hücrelerinin değil, bu hücrelerle yakın etkileşim halinde olan ekstraselüler matriks (Extracellular matrix, ECM) ve genetik-olmayan değişimlere sahip stromal hücrelerin oluşturduğu tümör mikro çevresinin de önemli rol oynadığı bilinmektedir (Hanahan ve Coussens 2012). Kanser gelişimi sürecinde önemli rol oynayan tümör hücreleri ile tümör mikro çevresi arasındaki bu etkileşim tüm kanser belirteçlerine (hallmark) katkı sağlamaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011).

Normal stroma neoplastik uyarılara hızlıca yanıt verecek ve bitişindeki epitelyum ile uyum içerisinde davranarak “reaktif stroma” yı meydana getirecek şekilde kalıtsal bir

plastisite yeteneğine sahiptir. Normal şartlarda stromanın karsinojeniz sürecini baskılama özelliği organizmal sağ kalım ve uzun ömür ile ilişkilidir. Ancak, stromayı oluşturan hücreler çeşitli uyarılarla uyarılıp transforme olduklarında sahip oldukları anti-karsinojenik etki tersine döner ve kanser gelişimi sürecine katkı sağlamaya başlarlar. Bu koşullar altında stromal hücreler kanser hücreleriyle birlikte evrilir ve çeşitli sitokinleri, kemokinleri, büyüme faktörlerini ve proteinazları sentezleyecek duruma gelecek şekilde asimile olarak farklılaşırlar (Junttila ve de Sauvage 2013).

Tümör mikro çevresinin tipik stromasında yer alan yapısal ve fonksiyonel olarak esansiyel elementler başlıca şu şekilde gruplandırılabilir (Chen ve ark. 2015):

- Fibroblastlar, miyofibroblastlar,
- adipöz (yağ) hücreleri,
- immün ve inflamatuvar hücreler,
- kan ve lenfatik vasküler ağ
- ECM



Şekil 2.4. Tümör mikroçevresi. (Nature Reviews Drug Discovery'den Türkçeleştirilerek alınmıştır, Dranoff, 2004)

Tümör gelişimi ve devamlılığı için, tümör hücrelerinin dört kritik özelliği geliştirmesi gerekmektedir. Bu özelliklerden ilki hareket yeteneği, ikincisi ECM'yi degrade edebilme yeteneği, üçüncüsü kanda hayatta kalabilme özelliği ve son olarak yeni bir çevreye uyum sağlayabilmesi. Peki kanser hücreleri bu özellikleri tam olarak nasıl kazanmaktadır? Son yıllardaki çalışmalar kanser hücrelerinin embriyonel gelişim sürecinde rol alan bazı transkripsiyon faktörlerini aktive ederek pleiotropik özellik kazandıklarını ve böylelikle bu özellikleri kazandıklarını ifade etmektedir. Bu süreçte ise tümör mikroçevresi kritik öneme sahiptir (Weinberg 2007).

İleri evre ve metastatik pankreatik kanserin tedavisinde kemoterapi rejimi genellikle yetersiz kalmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar bu durumun nedeni olarak yüksek oranda fibrotik, hipoksik ve immün-baskılanmış pankreatik tümör mikroçevresini göstermektedir (Strauss ve ark. 2016). Pankreatik kanser mikroçevresi pankreatik stellat hücreleri, tip 1 kollajen ve hiyalüronik asitten oluşan yüksek oranda dezmozoplastik ve fibrotik stromadan meydana gelmektedir. Pankreatik stellat hücrelerinin de dahil olduğu bu stroma bileşenlerinin tümör hücresi büyümesi, migrasyon ve invazyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hagg ve ark. 2014).

Pankreatik tümör mikroçevresi zayıf vasküler perfüzyon ve hipoksi ile karakterizedir (Provenzano ve ark. 2012). Bu durum pankreas kanseri için gemsitabin (Kindler ve ark. 2010) ya da gemsitabin+erlotinib (Van Cutsem ve ark. 2009) ile uygulanan standart tedavi yaklaşımının ve bevacizumab gibi (anjioyogenez inhibitörü) hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının başarısız olma nedenini de açıklamaktadır.

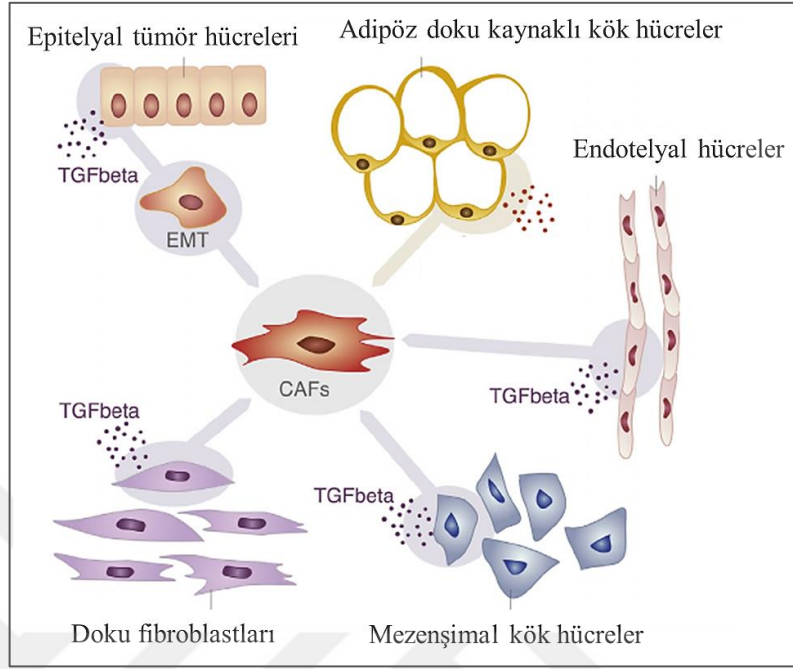
2.5.1. Fibroblastlar ve tümör mikroçevresindeki rolü

Fibroblastlar bağ dokuda en fazla bulunan ve sekrete ettikleri ECM komponentleri ile dokuların yapısal çerçevesini oluşturan hücre grubudur (Cirri ve Chiarugi 2011). Fibroblastlar sağlıklı dokularda ECM'nin yeniden modellenmesi ve yara iyileşmesi sürecinde doku onarımı rolleri ile sağlıklı dokuların yapılarının ve fonksiyonlarının devamlılığını düzenlemektedir (Ohlund ve ark. 2014). Normal koşullarda durağan halde olan

fibroblastlar yara iyileşmesi ve fibrozis durumlarında aktifleşir ve “miyofibroblast” olarak adlandırılan aktif hücre grubuna dönüşür (Gabbiani ve ark. 1971). Miyofibroblastlar karakteristik olarak kontraktıl stress liflerine sahiptir, α -düz kas aktini (α - smooth muscle actin, α -SMA) ve fibronektinin varyant formu olan ED-A fibronektini eksprese ederler (Tomasek ve ark. 2002).

Çok sayıda kanıt fibroblastların tümörjenezde esansiyel oyuncular olduklarını ve özellikle pankreatik, meme ve prostat kanserlerinde tümörün etrafındaki stromal hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturduklarını ifade etmektedir (Ohlund ve ark. 2014). Tümör stromasında yer alan ve “karsinoma ile ilişkili fibroblastlar (Carcinoma associated fibroblasts, CAF)” olarak adlandırılan bu aktifleşmiş fibroblastlar, yara iyileşmesi ve inflamasyon süreçlerinde rol alan miyofibroblastlarla pek çok benzer özellik sergilemektedir (Cirri ve Chiarugi 2011). Hatta, bu bağlamda kanser “asla iyileşmeyen yara” olarak tanımlanmaktadır (Dvorak 1986). Doku hasar gördüğünde o bölgedeki fibroblastlar parakrin sinyallere yanıt olarak miyofibroblastlara farklılaşırlar (Li ve Wang 2011). Miyofibroblastların indüklenmesi kanser gelişimi riskini arttıran organ fibrozisine de neden olmaktadır (Desmoulie`re ve ark. 2004, Radisky ve ark. 2007).

Endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, miyoepitelyal hücreler ya da mezenşimal hücreler gibi çeşitli hücre grupları CAF’lar için öncül hücre grupları olabilmektedir (Brittan ve ark. 2002, Tomasek ve ark. 2002, Willis ve ark. 2006, Spaeth ve ark. 2009) (Şekil 2.5).

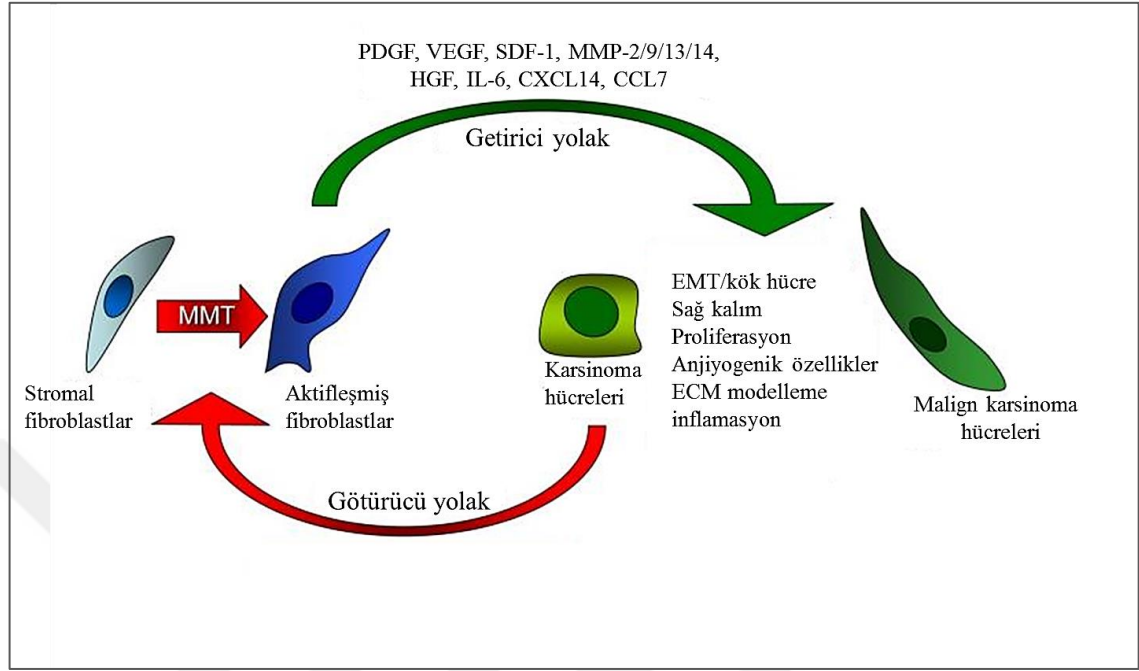


Şekil 2.5. CAF'ların köken aldığı hücre grupları (Calon ve ark. 2014'ten Türkçeleştirilerek alınmıştır)

CAF'ların esansiyel fonksiyonları arasında ECM'nin depozisyonu, epitelyal farklılaşmanın düzenlenmesi, inflamasyonun düzenlenmesi ve yara iyileşmesi yer almaktadır (Mbeunkui ve Johann 2009). Bu hücreler hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1/CXCL12) ve çeşitli fibroblast büyüme faktörlerini (FGF) eksprese ve sekrete ederek kanser hücrelerinde proliferasyonu indüklemeye yeteneğindedir (Orimo ve ark. 2005, Kalluri ve Zeisberg 2006, Rosen ve MacDougald 2006, Spaeth ve ark. 2009, Erez ve ark. 2010, Franco ve ark. 2010, Cirri ve Chiarugi 2011).

Tümör hücreleri ve CAF'lar arasında karşılıklı etkileşim olduğu bilinmektedir. Kanser hücreleri ve fibroblastlar arasındaki etkileşimi açıklayan iki interaktif sinyal yolu tanımlanmıştır (Şekil 2.6):

- “Götürücü (efferent)” yolak; kanser hücreleri stromada reaktif yanıtı tetikler,
- “Getirici (afferent)” yolakta ise; mikroçevrenin etrafındaki modifiye olmuş stromal hücreler kanser hücresi yanıtını etkiler (De Wever ve Mareel 2003, Giannoni ve ark. 2010).



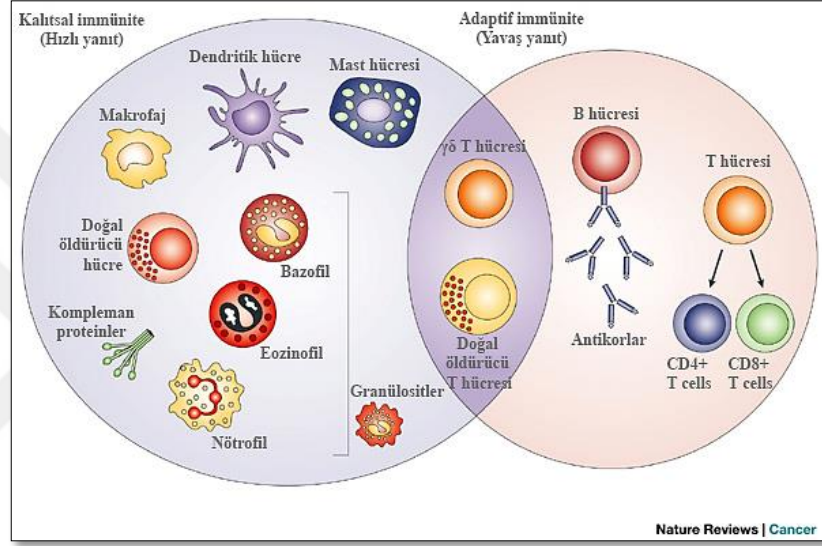
Şekil 2.6. CAF'lar ve kanser hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimin şematize edilmesi (Cirri ve Chiarugi 2011'den düzenlenerek alınmıştır) *MMT: mezenşimal-mezenşimal farklılaşma

Sonuç olarak, fibroblast aktivasyon proteini (FAP) (Park ve ark. 1999), HGF (Bhowmick ve ark. 2004) ve katepsin K (Allinen ve ark. 2004) gibi fibroblast aktivasyonu sürecinde miktarları artan moleküllerin tümör mikroçevresi için iyi birer hedef olabileceği düşünülmektedir.

2.5.2. İmmün hücreler ve tümör mikroçevresindeki rolü

Memeli immün sistemi, organizmayı yabancı patojenlere karşı korumak için non-immün hücreler ile diğer hücreler arasında kompleks ve dinamik bir ağ ile etkileşim kurmuş olan çok çeşitli hücre grupları ve mediatörlerden meydana gelmektedir (de Visser ve ark. 2006). Sağlıklı organizmada, doğuştan gelen immün sistem içsel veya dışsal tehlike sinyallerine karşı savunma halindedir (Italiani ve Boraschi 2014). İmmün sistemin esasansiyel rolü "kendiden olmayanları" ayırmaktır. Bu özellik en küçük virüsten, en büyük çok hücreli parazite kadar tüm yabancı organizmaların saptanması ve elimine edilmesine olanak sağlamaktadır (Blair ve Cook 2008).

İmmün sistem genel olarak kalıtsal ve adaptif olmak üzere iki ana başlıkta incelenmesine rağmen, hücrelerin doku hasarına hızlıca yanıt vermelerine olanak sağlayan sofistike bir iletişim ağına sahip immün sistem hücreleri, antijen spesifitesi ve hücresel kompozisyon bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedir (de Visser ve ark., 2006). Kalıtsal ve adaptif immün sistem hücreleri aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Kalıtsal ve adaptif bağışıklıkta rol alan immün sistem hücreleri (Nature Reviews Cancer'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır, Dranoff, 2004).

Yakın zamana kadar doğuştan gelen ya da adaptif immün hücrelerin tümördeki varlığı, immün sistemin kansere karşı efektif bir atak halinde olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmekteydi. Fakat günümüzde immün hücrelerin aynı zamanda kanser başlangıcı, gelişimi ve metastaz süreçlerine katkı sağladıkları da bilinmektedir (Pollard 2004, de Visser ve ark. 2006, Hao ve ark. 2012, Menen ve ark. 2012, Fan ve ark. 2014) ve immün hücrelerin kanser gelişimindeki bu iki yönlü rolünün temelinde “polarizasyon” konseptinin olduğu ifade edilmektedir (Fang ve DeClerck 2013).

Monositler kan, kemik iliği ve dalakta dolaşımda olan ve insanlardaki total lökositlerin yaklaşık %10'unu oluşturan bir hücre grubudur. Dolaşımda 1-2 gün kalabilen monositler, eğer bir tehlikeyle karşı karşıya olan bir dokuya yerleşmezlerse bu süre sonunda ölür ve

ortadan kaldırılırlar (Italiani ve Boraschi 2014). Hematopoetik kök hücre (Hematopoietic Stem Cells, HSC) monoblastlarından köken alan monositler önce promonositlere, ardından da olgun monositlere farklılaşırlar (Gordon ve Taylor 2005). Bu hücreler, oval ya da böbrek şeklindeki nükleus, düzensiz hücre şekli, sitoplazmik vakuoller ve yüksek sitoplazma-nükleus oranı gibi bazı karakteristik özelliklere sahiptir (Italiani ve Boraschi 2014). Gelişim, homeostaz ve inflamasyon süreçlerinde oynadıkları kritik rollere ek olarak bu hücreler apoptotik ve nekrotik hücrelerin ortadan kaldırılmasından da sorumludur (Serbina ve ark. 2008).

1884 yılında Rus-Fransız asıllı bir biyolog olan Ilya Mechnikov bazı beyaz kan hücrelerinin bakterileri içine alarak sindirdiğini keşfetmiş ve bu süreci “fagositoz” olarak adlandırmıştır ve bu buluşu ile 1908 yılında Nobel Tıp Ödülü’nü almıştır. Daha sonra bu hücreler Yunanca kökenli kelimeler olan, büyük anlamına gelen “makros” ile yemek anlamına gelen “phagein” kelimelerinin birleşiminden oluşan “makrofaj” hücreleri olarak isimlendirilmiştir (Zalkind 2001).

Makrofajlar doku onarımında ve yeniden modellenmesinde ve metabolik fonksiyonların senkronizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Gordon ve Martinez 2010). Bu hücreler çevresel uyaranlara bağlı olarak, başta kalıtsal immün yanıt olmak üzere çeşitli süreçlerde önemli fonksiyonlar üstlenebilirler (Paletta-Silva 2012), ancak bazı durumlarda bu fonksiyonlarının tam tersi özellikler de kazanabilirler. Makrofajların bu çeşitli rolleri (pro/anti-inflamatuvar özellikleri) çeşitli fonksiyonel fenotipler kazanmaları için onları indükleyen çevresel uyaranlara bağlıdır (Paletta-Silva 2012).

Lenfositler adaptif immünitinin en önemli hücre gruplarından. Hücrelerin olgunlaştıkları organlara göre iki ana lenfosit grubu bulunmaktadır: kemik iliğinde (bone marrow) olgunlaşan B lenfositleri ve timusta (thymus) olgunlaşan T lenfositleri (Alberts ve ark. 2002). T lenfositleri de iki gruba ayrılmaktadır: B hücrelerine daha efektif antikör üretiminde ve makrofajlara mikropların öldürülmesinde yardımcı olan “T-yardımcı hücreleri” (T-helper cell, Th cells) ve enfekte olmuş konak hücrenin öldürülmesinde görev alan “sitotoksik T lenfositleri” (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) (Alberts ve ark. 2002).

1986 yılında Mossmann, Coffman ve arkadaşları, T lenfosit aktivasyonu sonrası salınan sitokinlerin türüne göre iki farklı yardımcı T hücre alt popülasyonu olabileceği ve bu alt popülasyonların farklı düzenleyici ve efektör fonksiyonlara sahip olabileceği hipotezini ortaya atmışlardır (Mosmann ve ark. 1986). Tümör mikroçevresini istila eden (infiltrate eden) çeşitli T hücre popülasyonları mevcuttur. Bu T hücrelerinin salgıladıkları sitokin profiline bağlı olarak immün yanıtı kontrol ettikleri bilinmektedir (Mosmann ve Coffman 1989, Gazzinelli ve ark. 1993, O'Garra ve Murphy 1994). Bu hücre grupları arasında, tümör hücrelerini öldürme yeteneğine sahip olan ve iyi prognoz ile ilişkilendirilen (Fridman ve ark. 2012) sitotoksik CD8⁺ hafıza T hücreleri (memory T cells), interlökin-2 (IL-2) ve interferon gama (IFN- γ) üretimiyle karakterize olan CD4⁺ T-yardımcı 1 (T-helper 1, Th1) hücreleri tarafından desteklenmektedir. Bu sitokinlerin tümör mikroçevresindeki yüksek ekspresyonu da iyi prognozla ilişkilidir (Fridman ve ark. 2012). B hücresi yanıtını indükleyen IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi interlökinleri üreten Th2 hücreleri gibi diğer CD4⁺ hücre gruplarının ise genellikle tümör büyümesiyle ilişkili oldukları düşünülmektedir (Fridman ve ark. 2012).

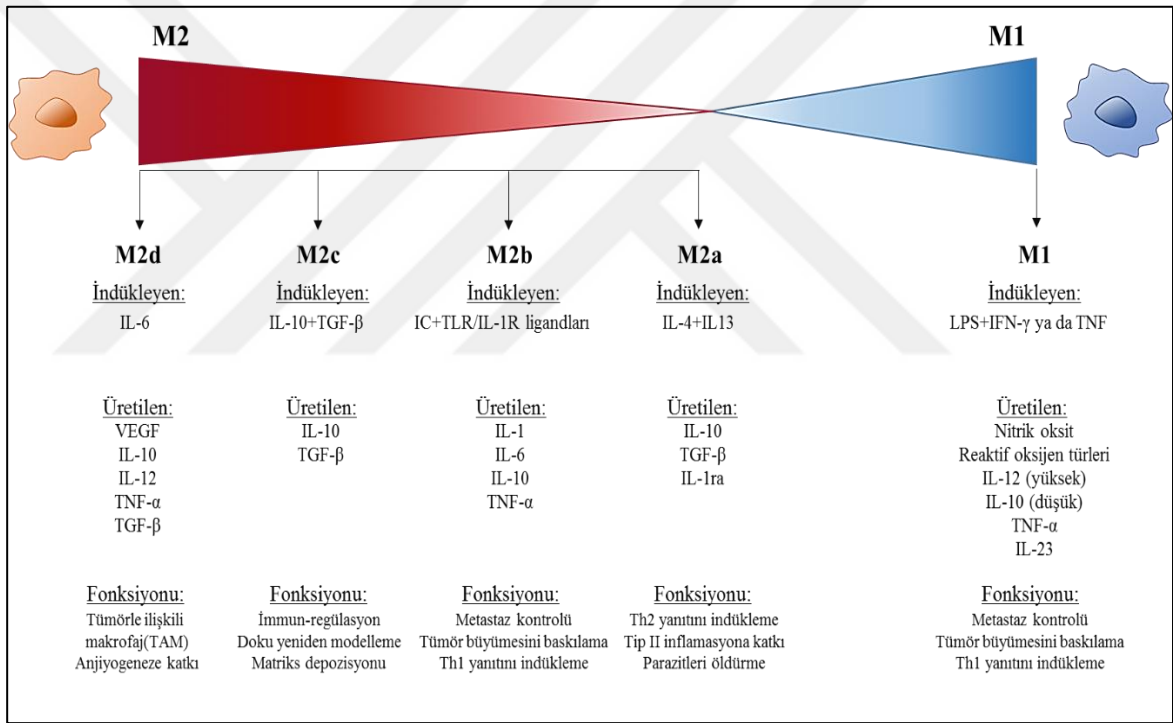
İki tür makrofaj aktivasyon yolu bulunmaktadır: Makrofajların “klasik olarak aktifleşmiş” M1 tip makrofajlara aktivasyonunda rol oynayan interferon-gama (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) gibi sitokinler baskın olarak Th1 hücrelerinden salınır. Öte yandan, Th2 hücrelerinden salınan sitokinlerden olan interlökin 4 ve -10 (IL-4 ve IL-10) makrofaj aktivasyonunu inhibe etmektedir ve bu tip makrofajlar “alternatif olarak aktifleşmiş/anti-inflamatuvar” M2 tip makrofajlar olarak tanımlanır (Stout ve Suttles 1997, Gordon 2003, Stout ve Suttles 2004).

M1 makrofajlarının ana fonksiyonu antijen sunma ve Th1 aktivasyonunu desteklemektir (Derlindati ve ark. 2015). M1 makrofajları inflamasyona katkı sağlamak ve antitümör fonksiyonu göstermek için proinflamatuvar sitokinler ve immün aktivasyon faktörlerini sekrete edebilirler (Zhao ve ark. 2014).

M2 makrofajları alternatif aktivasyon yolağında yer alır ve IL-4, IL-13 gibi sitokinler, vitamin D3, TGF- β , prostoglandin E2 (PGE2) ve glukokortikoidler tarafından aktifleştirilebilirler (Josephs ve ark. 2015). M2 makrofajları CCL17, CCL-22, AMAC-1 gibi

IL-1 kemokin reseptör agonistlerini ve matris metaloproteinazları sekrete edebilir, fakat antijen sunumunda efektif bir görev alamaz (Hu ve ark. 2016). M2 makrofajlarının ana fonksiyonu, IL-10 ve TGF- β gibi inhibitör sitokinlerin sekresyonu ile T hücrelerini engelleyerek immün yanıtı sınırlamak ve tümör büyümesi, invazyonu ve metastazına katkı sağlamaktır (Mira ve ark. 2013).

M1 ve M2 tip makrofajların indükleyicileri, ürettikleri proteinler ve fonksiyonları Şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8. M1 ve M2 türü makrofajların indükleyicileri, ürettikleri proteinler ve fonksiyonları (Weigel ve ark. 2015’ten değiştirilerek alınmıştır)

Mikroçevreden gelen uyarana bağlı olarak M2 makrofajları üç alt gruba ayrılmaktadır.

- i) M2a: IL-4 veya IL-13 tarafından stimüle edilen profibrotik fenotip (Lech ve ark. 2012),
- ii) M2b: immün kompleksler ve Toll-benzeri reseptörlere (Toll-like receptors, TLR) ya da IL-1 reseptör agonistleriyle birlikte indüklenen fenotip (Mantovani ve ark. 2004),

- iii) M2c: IL-10, transforme büyüme faktörü beta (Transforming Growth Factor beta, TGF- β) ya da glukokortikoidler tarafından indüklenen ve sadece inflamasyonu baskılamakla kalmayıp, aynı zamanda neovaskülarizasyona da katkıda bulunan fenotip (Lech ve ark. 2012).

Dokuda yerleşik makrofajlar hemen hemen tüm yetişkin memeli dokularında bulunan ve normal (durağan) koşullarda total hücre sayısının %10-15'ini temsil eden heterojen ve çok yönlü hücrelerdir. Bu sayı inflamatuvar uyaranlara yanıt olarak artabilir. Makrofajların belirli çevreye göre farklılaşabilme özellikleri onların heterojenite özellikleriyle açıklanmaktadır. Makrofajlar buldukları dokuya göre farklı isimler alırlar (Çizelge 2.1) (Das ve ark. 2015).

Çizelge 2.1. Makrofajların buldukları organlara göre isimlendirilmesi (Das ve ark. 2015'ten Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Doku/Organ	Hücre Adı
Yara	Yara makrofajları
Merkezi sinir sistemi	Mikroglial hücreler
Akciğerler	Alveolar makrofajlar
Bağ doku	Histiositler
Karaciğer	Kupffer hücreleri
Kemik	Osteoklastlar

Hasar bölgesinin kaderini belirleyen makrofajlar inflamatuvar fazdan proliferatif faza geçişte en önemli oyuncularlardır. Makrofajlar çok çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile fibroblastlar gibi diğer hücre gruplarını da hasar bölgesine çekerler ve böylece yeni doku matriksi yapımını organize eder ve anjiyogeneze katkı sağlarlar (Das ve ark. 2015).

Tümör mikroçevresi M1 ve M2 makrofaj dönüşümüne karar verir. Eksojen faktörlerin müdahalesi sonucunda M2 makrofajları M1 makrofajlarına dönüşebilir (Geissmann ve ark. 2010, Li ve ark. 2015).

Tümör mikroçevresinde bulunan monosit-makrofaj soyundaki hücreler genellikle “tümörle ilişkili makrofajlar (Tumor Associated Macrophages, TAM) olarak adlandırılır. Bu hücreler genellikle M2-tip fenotipe sahiptir ve fonksiyonel olarak da M2 makrofajlarına benzer görevlere sahiptir (Mantovani ve ark. 1992, Mantovani ve ark. 2008, DeNardo ve ark. 2011, Hanahan ve Weinberg 2011, Sica ve Mantovani 2012, Coussens ve ark. 2013).

TAM’lar hematopoetik kemik iliği prekürsörlerinden sirküle monositler olarak meydana gelirler ve daha sonra aktif olarak tümör dokularında birikirler (Mantovani ve ark. 1992, Jenkins ve ark. 2012, Franklin ve ark. 2014, Shand ve ark. 2014). TAM’ların tümör mikroçevresinde bulunmasını ve birikmesini regüle eden sinyaller hem tümör hücreleri hem de diğer hücreler tarafından üretilmektedir (Belgiovine ve ark. 2016).

CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 ve CCL8 gibi kemotaktik faktörler, vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF), granüosit koloni stimüle edici faktör (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) ve plesantadaki büyüme faktörleri monositlerin tümörde birikmesinde rol alabilir (Hamilton 2008, Allavena ve Mantovani 2012). Bu faktörler arasından en önemlisi ekspresyonu TAM invazyonu, bölgesel lenf nodu metastazı ve hastalık progresyonu ile pozitif korele olan MCP-1/CCL2’dir (Ohtaki ve ark. 2010, Allavena ve Mantovani 2012).

2.5.3. Adipoz hücreler ve rolü

İntraabdominal tümörler gibi bazı kanserlerde adipositler adipokinlerin sekresyonu ile malign hücrelerin birikiminde rol alırlar. Ayrıca bu hücreler kanser hücreleri için yakıt olarak kullanılan yağ asitlerini de sağlayarak malign hücre büyümesine katkı sağlarlar (Nieman ve ark. 2011).

Obezitede beyaz adipoz dokusunun aşırı büyümesi insülin direncini etkileyerek ve aşırı miktarda sitokin ve adipokin salınımına neden olarak karsinojenezde rol almaktadır (Vona-Davis ve Rose 2009). Beyaz adipoz dokusunun kanser gelişimindeki rolünü aydınlatmak amacıyla yapılan bir çalışmada adipoz stromal hücreler farelere transplante edilmiştir. Çalışma sonucunda bu hücrelerin tümör damarlanması ve hücre büyümesini desteklemek

amacıyla stromal ve vasküler progenitörlere bir kaynak görevi yaptıkları bulunmuştur (Zhang ve ark. 2012). Bu çalışma ve bunun gibi yapılmış benzer çalışmalar endojen adipoz dokudan kökenli stromal progenitör hücrelerin tümör mikroçevresinde yer alan perisit ve adipositlere katkıda bulduklarını ve bu hücrelere kanser gelişimi, devamlılığı, kemoterapi direnci ve tümör nüksü süreçlerinde rol alan sitokin ve büyüme faktörleri sağladıklarını göstermektedir (Vona-Davis ve Rose 2009). 2011 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise, kanserle ilişkisi adipositlerin, tümöre infiltre olan immün hücrelerin analogu olarak, radyasyon terapisinin etkinliğini azalttığı ve meme kanseri hücrelerinde adiposit kökenli interlökin-6 (IL-6) aracılığıyla radyasyon direncine katkı sağladığı gösterilmiştir (Bochet ve ark. 2011).

2.5.4. Kan ve lenfatik hücreler ve rolleri

Kan endotelial hücreleri ve lenfatik endotelial hücreler tümör mikroçevresinde yer alan iki komponenttir. Kan endotelial hücrelerini de kapsayan tümör kan damarları tümöre destek sağlayan kan için yol görevi yapar ve tümör büyümesi ve hematogenöz tümör yayılımında rol alır. Lenfatik endotelial hücreleri de kapsayan lenfatik damarlar ise kan damarları ile karşılaştırıldığında daha zayıf yapıdadır, ancak bu hücreler de tümör hücrelerinin lenfojen yayılımında rol almaktadır (Lee ve ark. 2015).

Tümör lenfatik damarları perisitler ve düz kas hücreleri ile daha seyrek olarak sarıldığından kan damarlarına kıyasla daha geçirgen yapıdadır ve özellikle metastaz süreci için önemlidir (Cao 2005). Örneğin meme kanserinde tümör yayılımı özellikle stromal ve peritümöral lenfatik damarlar ile olmaktadır. Şu zamana kadar elde edilen bilgiler ile kan damarları ve lenf damarlarının geleneksel rolleri oksijen, besin, lenf sıvısı ve metastatik hücrelere yol görevi yapmaları şeklinde sınırlandırılmıştır. Kan damarları ve lenf damarlarından salınan ve kanser gelişimi ve metastazı sürecini yöneten faktörlerin rolleri henüz tam olarak anlaşılammıştır, bu nedenle bu konuda daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır (Lee ve ark. 2015).

2.5.5. Ekstraselüler matriks (ECM) ve rolü

ECM, proteinler glikoproteinler, proteoglikanlar ve polisakkaritler gibi farklı fiziksel ve biyokimyasal özelliklere sahip çeşitli komponentlerin bir araya gelmesiyle oluşmuş bir yapıdır (Whittaker ve ark. 2006, Ozbek ve ark. 2010)

Çeşitli makromoleküllerin karmaşık ağı ile oluşan ECM hücre büyümesi, sağ kalımı, motilitesi ve integrin, sindekan ve diskoidin gibi çeşitli reseptörlerin ligasyonu ile hücre farklılaşması gibi çok çeşitli biyokimyasal ve biyomekanik özellikleri ile üç boyutlu supramoleküler bi yapı meydana getirmektedir (Leitinger ve Hohenester 2007, Xian ve ark. 2010).

ECM'nin görevi sadece tümör mikroçevresindeki tüm hücreler için yapı iskeleti sağlamak değildir. Ayrıca kanser gelişimi ve yayılımında da dinamik rol oynamaktadır. ECM anjiyogenik faktörler ve kemokinler gibi hücre yüzey reseptörleriyle etkileşen ve hücreye kasılma ve elastisite özellikleri kazandıran pek çok önemli büyüme faktörünü içermektedir (Frantz ve ark. 2010). CAF'lar tümör dokularında ECM depozisyonuna neden oldukları için tümör dokuları çevre dokulara kıyasla çok daha katıdır (Weigelt ve Bissell, 2008). ECM'de hücre adezyonu integrinler, diskoidin domain reseptörleri ve sindekan reseptörleri gibi ECM reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Humphries ve ark. 2006, Leitinger ve Hohenester 2007, Harburger ve Calderwood 2009, Xian ve ark. 2010).

Tümörler genellikle dezmoplazi özelliği göstermektedir ve bu fibrotik durum ECM proteinlerinin artmış post-translasyonel modifikasyonları ve değişmiş organizasyonu ile karakterizedir (Lu ve ark. 2012). Pankreatik kanser hastalarında ECM'deki değişimlerle meydana gelmiş olan stromal dezmoplazinin tümör progresyonu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Pandol ve ark. 2009). Benzer şekilde matriksi yeniden yapılandırmada rol alan genlerden olan MMP2 (matriks metaloproteinaz 2) ve kollajen de meme kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilidir (Erlor ve ark. 2006, Slattery ve ark. 2013).

2.6. Tümör Mikroçevresindeki Ekstraselüler Moleküller

Tümör mikroçevresinin önemli komponentlerinden olan ECM çeşitli büyüme faktörleri, kemokin ve sitokinler barındırmaktadır (Hynes 2009). Bu kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri kanser hücreleri ve stromal hücreler tarafından mikroçevreye salınmaktadır (Li ve ark. 2007).

Sitokinler hücreler arasında iletişim ve etkileşim üzerine spesifik etkileri olan küçük sekrete proteinler olarak tanımlanmaktadır (Zhang ve An 2007). Sitokinler tümör fenotipini modifiye ederek doğrudan karsinojenez ve metastaz süreçlerine etki edebilmektedir (Tartour ve Fridman 1998). Öte yandan sitokinler tümör bölgesindeki stromal ve immün efektör hücreleri doğrudan uyararak sitotoksik efektör hücrelerce tanınırlıklarını da arttırabilirler. Çok sayıda hayvan çalışması ile sitokinlerin anti-tümöral aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Lee ve Margolin 2011).

Kemotaktik sitokinler (*chemotactic cytokines*) olarak bilinen kemokinler, G-proteini bağlı kemokin reseptörleri (GPCR, G-protein-coupled chemokine receptors) aktivasyonu ile hücre trafiğini ve pozisyonunu düzenler (Chow ve Luster 2014). Kemokinler tümör progresyonu ve metastazda hayati öneme sahiptir. Pankreatik, meme, ovaryum, melanom, akciğer kanseri gibi pek çok kanserin gelişiminde kemokinler rol oynamaktadır (Sarvaiya ve ark. 2013).

Kemokinler genellikle proinflamatuvar sitokine yanıt olarak sekrete edilir ve salgılandıkları bölgede monositler, nötrofiller ve lenfositlerin birikiminde önemli rol oynarlar (Deshmane ve ark. 2009).

Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1/CCL2)

Monosit kemotaktik/kemoatraktan protein 1 (MCP-1/CCL2) 76 amino asitten oluşan ve fibroblastlar, endotelial ve epitelyal hücreler, monositler ve çeşitli tümör hücreleri tarafından sekrete edilen bir proteindir. MCP-1 proteini monosit ve makrofajların inflamasyon bölgesinde toplanması ve aktivitelerinin düzenlenmesinde rol almaktadır (Deshmane ve ark. 2009).

Çok sayıda çalışma MCP-1 proteininin kanser malignansisini de etkileyebileceğini ifade etmektedir (Salcedo ve ark. 2000, Loberg ve ark. 2006, Koga ve ark. 2008, Yoshimura ve ark. 2013). MCP-1(CCL2) proteininin CCR2 reseptörüne bağlanmasıyla aktifleşen bu sinyal yolağı pek çok kanser türünde hücre invazyonu ve migrasyonunda önemli rol oynamaktadır (Lim ve ark. 2016). 2009 yılında prostat kanseri prelinik modellerinde yapılan bir çalışmada, MCP-1 overekspresyonunun artmış zenograft tümör büyümesi, artmış makrofaj akümüasyonu ve metastatik süreç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mizutani ve ark. 2009). Bir başka çalışmada, hepatik miyofibroblastlardan salınan MCP-1 proteininin insan hepatoselüler karsinom hücrelerinde hücre migrasyon ve invazyonuna doğrudan katkı sağladığı gösterilmiştir (Dagouassat ve ark. 2010). 2013 yılında yapılan bir diğer çalışma ise MCP-1 proteininin insan yumurtalık kanseri hücre hattında hücre invazyonunu arttırdığını göstermiştir (Furukawa ve ark. 2013).

Ek olarak MCP-1/CCR2 sinyal yolağı monositlerin makrofajlara farklılaşmasını (Shields ve ark. 2007, Xia ve Sui 2009) ve normal peritonel makrofajların da TAM özelliği kazanarak tümöre infiltrasyonunu uyarmaktadır (Loberg ve ark. 2007, Shields ve ark. 2007, Vergunst ve ark. 2008, Mizutani ve ark. 2009, Xia ve Sui 2009, Vela ve ark. 2015). İnsan meme ve özofagus kanserleri ile yapılan bir çalışmada MCP-1 düzeyleri ile makrofaj infiltrasyonu, lenf nodu metastazı ve klinik agresiflik arasında korelasyon olduğu bulunmuştur (Saji ve ark. 2001, Azenshtein ve ark. 2002).

2.7. Eksozomlar

Tümör hücreleri ve stromal hücreler arasında hücre içi ve hücreler arası iletişim genellikle hücre-hücre interaksiyonları; büyüme faktörleri, kemokinler, proteazlar gibi sekrete moleküller ve ekstraselüler veziküller aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Andaloussi ve ark. 2013).

Apoptosis sürecinde apoptotik cisimciklerin salınması uzun zamandır bilinmesine rağmen, sağlıklı hücrelerin de plazma membranlarından veziküllerin ayrıldığı ancak geçtiğimiz yıllarda aydınlatılmıştır. Bu veziküller genellikle mikroveziküller, ektozomlar ve

mikropartiküller olarak adlandırılmaktadır (Holme ve ark. 1994, Hess ve ark. 1999, Cocucci ve ark., 2009, György ve ark. 2011). Bu veziküller arasında yer alan eksozomlar ilk olarak 1981 yılında, boyutları 40 ile 1000 nm arasında değişen ve çeşitli hücrelerden salınan veziküller olarak tanımlanmıştır (Trams ve ark. 1981). Günümüzde ise eksozomlar boyutları 30-120 nm arasında değişen ve kaynaklandığı hücre tipine bağlı olarak çeşitli proteinler, lipid, mRNA ve mikroRNA'ları taşıyabilen küçük veziküller olarak tanımlanmaktadır (Lin ve ark. 2015). Hatta 2014 yılında yapılan bir çalışma ile eksozomların çift zincirli DNA (dsDNA) da taşıdıklarını gösterilmiştir (Thakur ve ark. 2014).

Eksozomların hedef hücre ile tam olarak nasıl etkileşime girdiği ve hücre tarafından nasıl alındığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Hedef hücreler tarafından eksozomların alınması konusunda olası üç mekanizma tanımlanmaktadır:

- Eksozom hedef hücre membranıyla kaynaşır ve içeriğini doğrudan hedef hücrenin sitoplazmasına salar,
- Eksozomlar endositoz ile hücreye alınır,
- Eksozomlar hedef hücreye eksozomların bağlanmasına ve hücreye alınmasına olanak veren çeşitli reseptör proteinlerin varlığı ile alınır (Gajos-Michniewicz ve ark. 2014).

Eksozomlar tümör mikroçevresinin olgunlaşması, tümör büyümesi ve proliferasyonu ile sonuçlanan kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki hücreler arası iletişimde önemli rol oynamaktadır (Roma-Rodrigues ve ark. 2014).

Tümör mikroçevresindeki immün mediatörler ve modülatörlerin aktivasyon düzeyleri ve miktarları inflamatuvar yanıt ya da antitümöral immünite durumlarına bağlı olarak denge halindedir (Grivennikov ve ark. 2010). Bu dengenin kurulmasında eksozomlar önemli rol oynamaktadır. Daha önceki çalışmalara göre, çeşitli tümörlerden kökenlenen eksozomlar, plevral malign mezotelyoma ve prostat kanserinde doğal öldürücü hücre ve lenfositlerin proliferasyonunu inhibe etmektedir (Bobrie ve ark. 2011, Clayton 2012). Eksozomların metastazın ilk aşaması olan invazyon sürecinde doğrudan rol aldıkları bilinmektedir. Eksozomlar, ekstraselüler matriks degradasyonu ile invazyon sürecini başlatan aktince zengin hücre uzantısı (invadopodia) yapıları ile ilişki içindedir (Hoshino ve ark. 2013).

Ayrıca eksozomlar bir hücreden diğerine aktardıkları içerikleri aracılığıyla çoklu ilaç direnci (MDR, multidrug resistance) sürecinde de rol alırlar. Eksozomlar tümör mikroçevresi içerisinde hücre-hücre etkileşimini kolaylaştırmaktadır ve bu durum da MDR sinyal yollarının aktifleşip sinyallerin artmasında kritik rol oynamaktadır (Milane ve ark. 2015). Yapılan bir çalışmada, meme kanseri hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimin kanser hücrelerinde kemoterapi ve radyoterapinin etkilerinin azaltılmasına yardımcı olduğunu belirtilmektedir (Boelens ve ark. 2014).

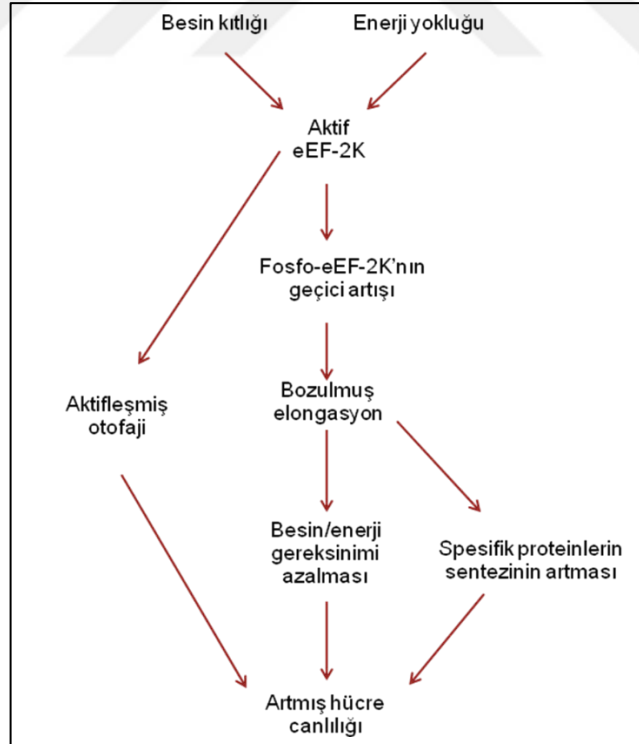
2.8. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2 Kinaz (EF2K) Enzimi

Ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K) enzimi “ α -kinaz” olarak adlandırılan atipik protein kinaz ailesi üyesidir (Ryazanov ve ark. 1999, Middelbeek ve ark. 2010). EF2K enzimi aktivitesi Ca^{++} iyonlarına bağlı olan tek α -kinaz enzimidir (Ryazanov ve ark. 1988, Nairn ve ark., 1985). Bilinen tek substratı elongasyon faktörü 2 (EF2) dir.

EF2K aynı zamanda Ca^{+2} /kalmodulin-bağımlı kinaz-III olarak da bilinmektedir ve asıl görevi protein sentezi sürecinde, substratı olan elongasyon faktörü 2 (EF2) yi Thr56’dan fosforilleyerek peptid zinciri uzamasını kontrol etmek ve bu şekilde protein sentezini yavaşlatmaktır (Jorgensen ve ark. 2006). EF2 proteini protein sentezi sürecinde peptid bağı oluşumunu takiben ribozomun mRNA boyunca translokasyonunu katalizler (Nairn ve ark. 2001). EF2 proteininin EF2K tarafından fosforilasyonu onun bu rolünü baskılar.

Ca^{++} tarafından regülasyonu dışında, EF2K aktivitesi protein kinaz A (PKA), adozin monofosfat tarafından aktifleştirilen protein kinaz (AMPK) ve p70 S6 kinaz gibi çeşitli kinazlar tarafından fosforilasyon ile de çift yönlü olarak ayarlanmaktadır (Mitsui ve ark. 1993, Redpath ve Proud 1993, Diggle ve ark. 2001, Wang ve ark. 2001, Browne ve ark. 2004). Hipoksi, besin yokluğu ve metabolik stresin AMPK aracılı EF2K aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Browne ve ark. 2004). EF2K aktivasyonu, protein sentezi sürecindeki ATP tüketimini kısıtlayarak bir “survival stratejisi” olarak görev yapmaktadır (Browne ve ark. 2004). EF2K’in proliferasyon bağımlı, mitojenler tarafından aktifleştirilen bir enzim olduğunu ve bu nedenle pek çok kanser türünde upregüle olduğunu gösteren pek

çok çalışma bulunmaktadır (Bagaglio ve Hait 1994, Nilsson ve Nygard 1995, Parmer ve ark. 1999, Knebel ve ark. 2002). EF2K'in otofaji aktivasyonu ile pek çok antikanser terapiye karşı sitoprotektif rol oynadığı öne sürülmektedir (Hait ve ark. 2006). Yang ve ark. tarafından yapılan çalışmada EF2K'in glioma (Yang ve ark. 2001, Wu ve ark. 2006, Wu ve ark. 2009, Cheng ve ark. 2011, Zang ve ark. 2011) ve meme kanseri hücrelerinde sitoprotektif role sahip olduğu gösterilmiştir (Cheng ve ark. 2010). Özpolat ve ekibinin meme kanseri ve pankreatik kanser ile yaptığı çalışma sonuçlarına göre, EF2K'in meme kanserinde hücre büyümesi, sağ kalımı ve ilaç direnciyle ilişkili sinyal yollarını desteklediği (Tekedereli ve ark. 2011), pankreatik kanserde de invazyon sürecinde rol aldığı (Ashour ve ark. 2014a) ve EF2K inhibisyonunun pankreatik kanserde apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Ashour ve ark. 2014b). EF2K'in kanser sürecindeki rolleri Şekil 2.9'da özetlenmiştir. Tüm bu kritik rollerinden dolayı EF2K son yıllarda pek çok kanser türü için potansiyel terapötik bir hedef olarak kabul edilmektedir (Hait ve ark. 2006, Tekedereli ve ark. 2012).



Şekil 2.9. EF2K'nin kanser hücrelerindeki rolleri (Kenney ve ark., 2014'den düzenlenerek alınmıştır)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre kültürü malzemeleri ve kimyasal maddeler

- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12 50/50 Mix with L-glutamine, Corning, New York, ABD
- Föetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X), Corning, New York, ABD
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Sigma, ABD
- %0,25 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD
- Tripın mavisi (%0,4), Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- HiPerfect Transfeksiyon Solüsyonu, Qiagen, Hilden, Almanya
- MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD
- PMS (Fenazin metosülfat), Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD
- İnsan MCP-1 Proteini ELISA kiti, Quantikine Immunoassay, R&D Systems, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD
- Rekombinant insan interlökin-4 proteini, R&D Systems, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Rekombinant insan interlökin-13 proteini, R&D Systems, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Rekombinant İnsan CCL2/MCP-1 Proteini, R&D Systems, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Rekombinant İnsan Gas6 Proteini, R&D Systems, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Tween-20, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Pierce RIPA Tamponu, Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Hema-3 Fiksatif ve Solüsyonları, Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, ABD

3.1.2. Sarf malzemeler

- 25cm², 75cm² ve 150cm²'lik flasklar, CellStar, Greiner Bio-one, Monroe, ABD
- 6, 24 ve 96 kuyucuklu pleyt, CellStar, Greiner Bio-one, Monroe, ABD
- 5ml ve 10ml'lik enjektörler, Becton Dickinson, New Jersey, ABD
- 10µl'lik pipet uçları, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- 100µl'lik pipet uçları, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- 1000µl'lik pipet uçları, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- 15ml'lik ve 50ml'lik falkon, Becton Dickinson, New Jersey, ABD
- 0,5 ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Countess Hücre Sayım Slaytları, Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Kriyovial, Nalgene, Thermo-Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- 5 ml'lik serolojik pipet, Corning Costar, New York, ABD
- 10 ve 25 ml'lik serolojik pipet, Corning Costar, New York, ABD
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Corning Costar, New York, ABD
- İnvazyon testi için insert, 0.8 mikron por genişliği, transparan pet membran, 24 kuyulu pleyte uyumlu, Corning, New York, ABD
- Kokültür deneyleri için insert, 0.4 mikron por genişliği, transparan pet membran, 6 kuyulu pleyte uyumlu, Corning, New York, ABD
- Matrijel, Corning Costar, New York, ABD
- Fisher HealthCare Hema 3™ Fiksatif ve Solüsyonlar, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Permout lam-lamel kapatma solüsyonu, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD

3.1.3. Cihazlar

- Spektrofotometre, BioRad, Kaliforniya, ABD
- CO₂ inkübatörü, Nuaire, ABD
- Steril kabin, Nuaire, ABD
- Faz-kontrast ve floresan mikroskobu, Nikon, Japonya
- Santrifüj, Beckman Coulter, ABD

- Manyetik karıştırıcı, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- Isı bloğu, VWR International, Pensilvanya, ABD
- Vorteks, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
- 10 µl, 100 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Eppendorf, Almanya
- Pipet boy, Eppendorf, Almanya
- 20-200µl Transferpipet, Eppendorf, Almanya
- Ultrasantrifüj, Beckman Coulter, ABD
- Western blot için güç kaynağı, BioRad, Kaliforniya, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Deneylerde kullanılan PANC-1 ve MiaPaCa2 insan pankreatik kanser hücre soyları Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edildi (Manassas, Virginia, ABD). İnsan pankreatik stellat hücreleri (PSC) Dr. Rosa Hwang tarafından M.D. Anderson Kanser Araştırma Merkezi'nde izole edilmiştir. İnsan monositik hücre hattı olan THP-1 hücreleri Dr. Jim Klostergaard (M.D. Anderson Kanser Araştırma Merkezi) tarafından temin edilmiştir ve kültüre edilmiştir. EF2K overekspres eden PANC1 hücreleri Recep Bayraktar (M.D. Anderson Kanser Araştırma Merkezi) tarafından lentiviral transfeksiyon ile hazırlanmış ve çalışmada kullanılmak üzere hediye edilmiştir. İnsan pankreatik duktal epitelyal hücre hattı (HPDE) Dr. Kapil Mehta (M.D. Anderson Kanser Araştırma Merkezi) tarafından hediye edilmiştir.

3.2.2. Kullanılan besiyerinin hazırlanması

PANC1, MiaPaCa-2 ve PSC hücreleri 1:1 oranındaki Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ve Ham's F12 (DMEM/F12) (Corning, ABD) besiyeri içine %10 Fetal sığır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich, ABD) ve %1 Penisilin-Streptomisin (P/S) solüsyonu (Corning, ABD) eklenmesiyle oluşturulan besiyeri içinde kültüre edildi. THP-1 hücreleri ise %10 FBS ve %1 P/S ve L-glutamin içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) besiyeri içerisinde büyütüldü. HPDE hücreleri ise L-glutamin içeren keratinosit serumsuz besiyeri içerisinde

(Keratinocyte-SFM, 1X, ThermoFisher Scientific, ABD) insan rekombinant epidermal büyüme faktörü 1-53 (EGF 1-53) ve 25 mg/500 ml olacak şekilde sığır pituiter ekstraktı (Bovine Pituitary Extract, BPE, Invitrogen/Life Technologies, ABD) eklenmesiyle oluşturulan besiyeri içerisinde büyütüldü.

3.2.3. Hücre soylarının stoktan çıkartılması

Donmuş haldeki stok hücreleri çoğaltmak için, hücrelerin içerisinde saklandığı kriyovialler -80 °C'deki buzdolabından alındı ve hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonu; 15ml'lik santrifüj tüpünde bulunan %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM/F12 (1:1) besiyeri içine alındı. Santrifüj tüpü 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve tüpün tabanındaki hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek pipetaj ile hücrelerin süspansiyon haline gelmesi sağlandı. Daha sonra tüp üzerine 4 ml daha besiyeri ilave edildi ve 5ml'lik hücre süspansiyonu 25cm²'lik hücre kültürü kapları (Thermo Scientific, USA) içerisine alınarak 37°C'ye ayarlı, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.2.4. Pankreatik kanser hücre soylarının pasajlanması ve stoklanması

Hücreler %80-90 arası yoğunluğa ulaştıklarında hücre pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi için, ilk olarak hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından, hücre artıklarından ve besiyeri içerisinde bulunan serumdan uzaklaşmak amacıyla 25 cm²'lik flaskın içerisine 1X PBS'ten (Sigma-Aldrich, ABD) 2 ml ilave edildi (75 cm²'lik flask için 4 ml) ve yüzey PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı ve hücreleri yapıştıkları yüzeyden kaldırmak amacıyla %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonundan (Sigma-Aldrich, ABD) 0,5 ml eklendi (75 cm²'lik için 1 ml) ve hücreler yaklaşık 5 dakika inkübatör içerisinde bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları mikroskop ile kontrol edildikten sonra, kullanılan tripsin miktarının 5 katı kadar besiyeri ile toplanarak 15 ml'lik falkonlara aktarıldı ve 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücre peleti 1 ml besiyeri ile pipetaj yapılarak hücrelerin tek tek dağılması sağlandı. Ardından hücre yoğunluğuna ve hücrelerin büyüme hızına göre uygun miktarda

besiyeri ile sulandırılarak yeni bir 75 cm²'lik flask içerisine aktarıldı. Hücreler istenilen yoğunluğa (sayıya) ulaşmaya kadar 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. Süspansiyon THP-1 hücre soyunun pasajlanması

Kültür ortamında süspansiyon halinde büyüyen THP-1 hücrelerini pasajlamak amacıyla flask içerisindeki hücreler 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve hücreleri çöktürmek amacıyla 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası supernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pelet 1 ml besiyeri ile pipetaj yapıldı. Ardından, hücre yoğunluğuna ve hücrelerin büyüme hızına göre uygun miktarda besiyeri ile sulandırılarak yeni bir 75 cm²'lik flask içerisine (son hacim 10 ml olacak şekilde) aktarıldı ve hücreler istenilen yoğunluğa (sayıya) ulaşmaya kadar 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.6. Hücre stoklanması

Hücrelerin yedeklenmesi ve kullanılmayan hücrelerin saklanması amacıyla gerçekleştirilen hücre stoklama işlemi, pasajlama işlemine benzer şekilde hücreler büyütüldükleri flask yüzeyini %80-90 oranında kapladığında gerçekleştirildi. Pasajlama işlemine benzer şekilde yüzeyden kaldırılan hücreler santrifüj yapıldıktan sonra pelet üzerine hücre yoğunluğuna göre hücre dondurma (stoklama) besiyeri (%10 FBS içeren besiyerine %10 dimetil sülfoksit-DMSO-) eklendi ve pipetaj yapılarak hücrelerin tek tek dağılması sağlandı. Kriyovial başına 1-1,5 ml hücre süspansiyonu (1,5-2 milyon hücre) olacak şekilde paylaştırıldı ve kriyovialler -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.7. Hücrelerin sayımı

Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak mikrosantrifüj tüpüne eklendi. Üzerine 10 µl tripan mavisi (Life Technologies, ABD) eklendi ve pipetaj yapılarak karışmaları sağlandı. Ardından bu karışımdan 10 µl alınarak hücre sayım slaytlarına çift taraflı olarak aktarıldı (Countess, Thermo Fisher Scientific, ABD) ve hücre sayım cihazına (Countess, Thermo Fisher Scientific, ABD) yerleştirilerek ml'deki hücre sayısı ölçüldü.

3.2.8. siRNA uygulaması

Hücreler deneyin amacına göre kullanılacak pleytlere uygun sayılarda (96 kuyu için 3×10^3 , 6 kuyu için 2×10^5) ekildikten sonra gece boyunca inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün siRNA'lar ve HiPerFect transfeksiyon solüsyonu serum ve P/S içermeyen besiyeri içerisine eklendi. HiPerFect transfeksiyon solüsyonu 6 kuyucuklu pleyt için kuyu başına 8 μ l, 96 kuyucuklu pleyt için ise 0,5 μ l olacak şekilde kullanıldı. siRNA'lar ise western blot ve migrasyon deneyleri için 100 nM konsantrasyonda, MTS testi için ise 50 nM konsantrasyonda hazırlandı.

Belirtilen miktar ve konsantrasyondaki HiPerFect ve siRNA'lar serum ve P/S içermeyen besiyeri içerisinde karıştırıldıktan sonra oda ısısında 20 dakika bekletildi. Bu sürede hücreler üzerindeki besiyeri aspire edildi ve serum ve P/S içermeyen taze besiyeri kuyulara eklendi. 20 dakika sonunda, kuyulara eklenen hacmin 1/3'ü kadar siRNA ve HiPerFect miksinden eklendi (Örneğin, 6 kuyucuklu pleyt için 750 μ l besiyeri + 250 μ l siRNA ve HiPerFect içeren besiyeri).

Daha sonra pleytlar inkübatörde 6 saat inkübe edildi. Süre sonunda serumsuz besiyerleri uzaklaştırıldı, hücrelerin üzerine %10 serum içeren besiyerleri eklendi ve hücreler bu şekilde tedavi süresi sonuna kadar (48 saat) inkübatörde inkübe edildi.

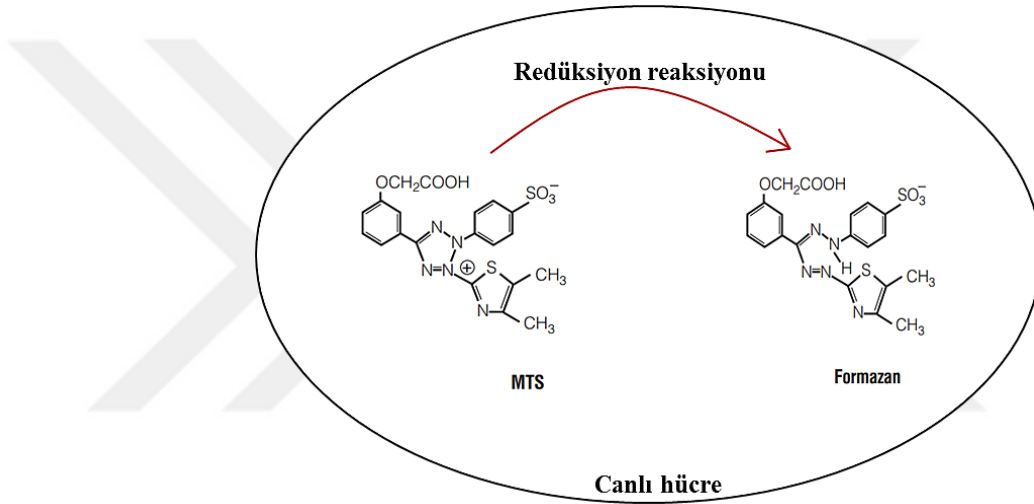
3.2.9.MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) hücre canlılık testi

Çalışmada hücre canlılığını kantifiye edebilmek amacıyla kolorimetrik bir test olan MTS hücre canlılık testi kullanıldı. Hücre canlılığını ölçen kolorimetrik testler kullanılan tetrazolyum bileşiklerine göre MTT, MTS, XTT ve WST-1 gibi çeşitli isimler almaktadır. Bu bileşikler genel olarak iki ana gruba ayrılabilir:

1. MTT gibi pozitif yüklü olanlar ve bu pozitif yük ile canlı ökaryotik hücrelere kolaylıkla girebilenler,
2. MTS, XTT ve WST-1 gibi negatif yüklü olanlar. Bu gruptaki bileşikler hücreye kolaylıkla giremezler, bu nedenle elektronları sitoplazma ya da plazma membranına

transfer ederek tetrazolyumun renkli formazan ürününe dönüşümünü sağlayan aracı bir elektron alıcısı (akseptör) fenazin metil sülfat (PMS) ya da fenazin etil sülfat (PES) ile kullanılırlar.

Metabolik olarak aktif hücrelerde MTS tuzu dehidrogenaz enzimi varlığında indirgenerek renkli formazan kristali oluşturur ve bu renk yoğunluğu ölçülerek hücre canlılığı kantifiye edilir. MTS tuzu ve oluşturduğu formazan yapısı Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. MTS tuzunun canlı hücrede (metabolik olarak aktif hücre) formazan kristali oluşturmasının şematize edilmiş hali

Çalışmada, MCP-1 muamelesinin hücre proliferasyonuna bir etkisi olup olmadığı MTS canlılık testi ile ölçüldü. Bu amaçla, PANC1 pankreatik kanser hücreleri 96 kuyucuklu pleytlere 3×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 100 μ l besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin yapışmasına izin vermek için %5 CO₂ içeren inkübatörde yaklaşık 24 saat inkübe edildikten sonra 100 μ l besiyeri içerisinde tedavi uygulaması yapıldı. MCP-1 uygulaması öncesi pleytlerdeki besiyerleri uzaklaştırıldı ve 6 farklı konsantrasyonda (1,56-50 ng/ml) hazırlanan MCP-1 peptidi PANC1 hücrelerine serumsuz besiyeri içerisinde uygulandı. Serumsuz besiyeri içerisinde gece boyu inkübasyon sonrası kuyulara 100 μ l %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve inkübasyon süresi toplamda 48 saate tamamlandı.

Ayrıca EF2K siRNA'sı ve gemsitabin tedavisi tek başlarına ve kombine kullanılarak kombinasyonun hücre canlılığı üzerine etkisi olup olmadığı incelendi. Bu amaçla, 96 kuyucuklu pleytlere 3×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µl besiyeri içerisinde ekildi. Ertesi gün 50 nM kontrol siRNA'sı ya da EF2K siRNA'sı uygulandı. siRNA uygulamasından 24 saat sonra gemsitabin 7 farklı konsantrasyonda (0,20-12,5 µM) hazırlanarak hücrelere uygulandı ve 72 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süreleri sonunda kuyulardaki son hacimlerden 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyularda kalan 100 µl besiyeri üzerine 20 µl MTS+PMS (2 ml MTS içerisine 100 µl PMS) solüsyonundan eklendi.

Ardından pleytler ışık almayacak şekilde sarıldıktan sonra hücrelerin metabolizma hızlarına bağlı olarak, renk değişimlerini gözlemlemek üzere inkübatöre kaldırıldı (yaklaşık 1-3 saat). Reaksiyon sonrası meydana gelen renk değişimi spektrofotometre (BioRad, iMark Microplate Reader, ABD) ile 490 nm dalga boyunda ölçüldü ve elde edilen Optik Dansite (O.D) değerleri kullanılarak yüzde canlılık hesaplaması yapıldı ve grafikler oluşturuldu.

% canlılık hesaplaması:

$$= \frac{\text{Tedavi grubu} \times 100}{\text{Kontrol ortalaması}}$$

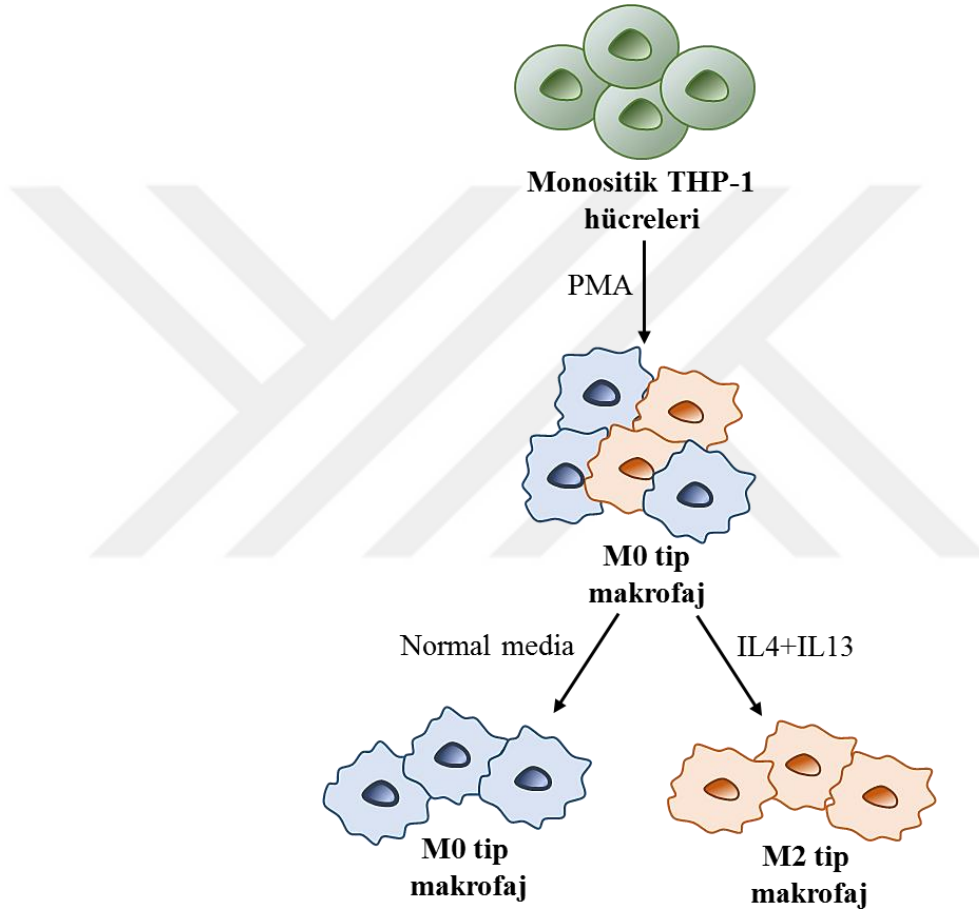
3.2.10. THP-1 hücrelerinin M0 ve M2 tip makrofajlara polarize edilmesi

Akut monositik lösemi hastasından çoğaltılmış ve karakterize edilmiş olan THP-1 hücreleri forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak genel bir makrofaj fenotipi olan M0 tip makrofajlara polarize edildi. Ardından, PMA uygulanmış olan M0 tip makrofajlar interlökin 4 (IL4) (R&D Systems, ABD) ve interlökin 13 (IL13) (R&D Systems, ABD) uygulanması ile M2 türü (pro-tümörijenik) makrofajlara polarize edildi.

PMA uygulaması için, süspansiyon halindeki THP-1 hücrelerinin besiyerine son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde PMA eklendi ve hücreler 24 saat inkübatörde inkübe edildi. Ardından PMA içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyular dikkatlice PBS ile yıkandı. Daha sonra, son

konsantrasyonları 20 ng/ml olacak şekilde IL4 ve IL13 içeren besiyeri kuyulara eklendi ve hücreler 24 saat daha inkübasyona bırakıldı.

THP-1 monositik hücrelerinin M0 ve M2 tip makrofajlara farklılaştırılması aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Monositik THP-1 hücrelerinin PMA ve IL4+IL13 uygulaması sonrası M0 ve M2 tip makrofajlara polarize edilmesi

3.2.11. Pankreatik kanser hücreleri ve stellat hücrelerinin farklılaşmamış ve farklılaşmış THP-1 hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmesi

Tümör mikroçevresindeki hücreler arası etkileşimi hücre kültürü ortamında modellemek amacıyla indirekt kokültür metodundan yararlanıldı. Bu amaçla 6 kuyucuklu pleytlere

uyumlu, 0,4 mikron por genişliğine sahip “insert” olarak adlandırılan özel kuyucuklar kullanıldı (Corning, ABD).

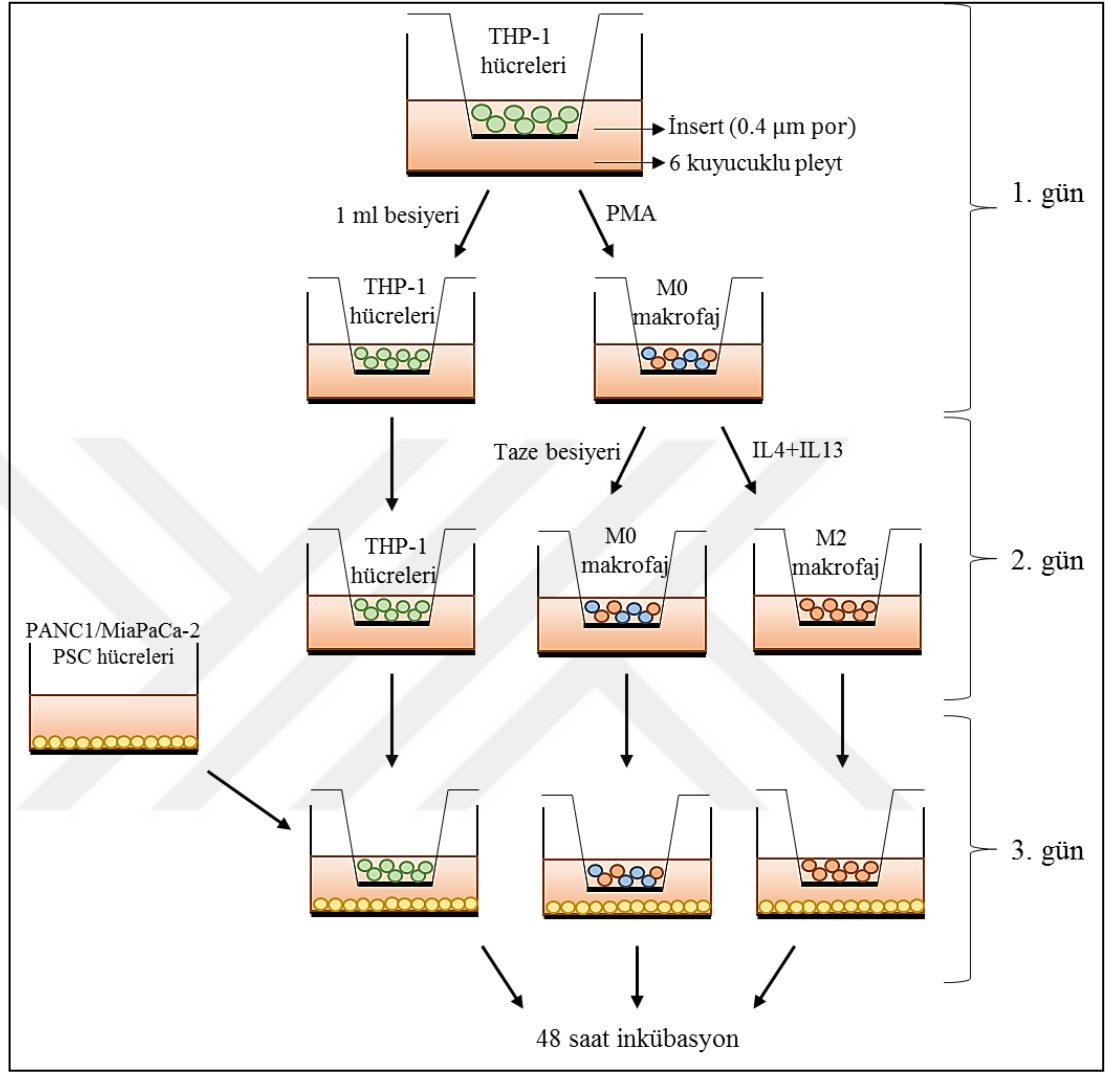
Kokültür çalışmaları için öncelikle insertler içerisine THP-1 hücreleri 2×10^5 hücre olacak şekilde 1 ml besiyeri içinde ekildi. Ardından, M0 ve M2 tip makrofajlara farklılaştırılacak olan hücre gruplarına son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde PMA içeren besiyerinden 1 ml eklendi. Farklılaştırılmayacak olan THP-1 hücrelerine ise 1 ml PMA içermeyen besiyeri eklendi ve böylece tüm hacimlerin 2 ml olacak şekilde eşitlenmesi sağlandı. İnsertlerin içinde bulunduğu kuyuların tabanlarına da 1 ml hücrelerin büyütüldüğü besiyerinden eklendi ve hücreler bu şekilde 24 saat inkübatörde inkübe edildi.

24 saat inkübasyonun sonunda PMA eklenen kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile dikkatlice yıkama yapıldı. Ardından, M0 tip makrofajlara farklılaştırılmış olan insertlerdeki hücrelerin üzerine 2 ml taze besiyeri eklendi. M2 tip makrofajlara dönüştürülecek olan hücrelerin üzerine ise son konsantrasyonları 20 ng/ml olacak şekilde hazırlanmış olan IL4 ve IL13 karışımından 2 ml eklendi ve hücreler 24 saat daha inkübasyona bırakıldı.

Bu sırada, PANC-1, MiaPaCa-2 ve PSC hücreleri 6 kuyucuklu pleytlere hücre büyüme hızına bağlı olarak 1.5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 2 ml besiyeri içinde ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edilerek yüzeye yapışmaları sağlandı.

İnkübasyon sonrası farklılaşmamış ve farklılaşmış THP-1 hücrelerini içeren insertler kuyular üzerine aktarıldı ve bu şekilde indirekt kokültür ortamı oluşturularak hücreler toplamda 48 saat boyunca inkübe edildi.

Kokültür metodunun uygulanışının şematize edilmiş hali Şekil 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.3. Farklılaşmamış ve farklılaşmış THP-1 hücrelerinin (M0 ve M2 tip makrofaj) PANC1, MiaPaCa-2 ve PSC hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmesinin şematik olarak gösterimi

3.2.12. Farklılaşmamış ve farklılaşmış THP-1 hücrelerinden eksozom izolasyonu

THP-1 hücreleri her bir hücre grubu için 2 flask olacak şekilde, 6 tane 75 cm²'lik flaskta 4x10⁶ hücre olacak şekilde ekildi. Çalışmada kullanılan hücre grupları aşağıda verildi:

Farklılaşmamış THP-1 hücreleri → 2 flask

M0 tip makrofaj → 2 flask

M2 tip makrofaj → 2 flask

Ardından M0 ve M2 tip makrofajlara polarize edilecek flasklara PMA ve/veya IL4+IL13 eklenerek yukarıda anlatıldığı şekilde hücrelerin farklılaştırılması sağlandı. 48 saatin sonunda tüm hücreler eksozom içermeyen besiyerine alındı ve bu besiyeri içerisinde gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra eksozom izolasyonu için aşağıdaki adımlar uygulandı. Çalışma süresince tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

1. Hücrelerin üzerindeki süpernatant kısmı 50 ml'lik falkonlara toplandı ve falkonlar 2000 rpm hızında +4°C'de 30 dakika santrifüj yapıldı.
2. Santrifüj sonrası pellet kısmını kaldırmamaya dikkat ederek süpernatantlar ultrasantrifüj tüplerine (Beckman Coulter, ABD) aktarıldı ve ultrasantrifüjde (Beckman, L8-80M, ABD) 10 000 rpm hızında +4°C'de 45 dakika santrifüj yapıldı.
3. Ardından süpernatantlar temiz ultrasantrifüj tüplerine aktarıldı ve örnekler 40 000 rpm hızında +4°C'de 90 dakika santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonrası süpernatant kısımlar dikkatlice aspire edildi ve tüpler ters çevrilerek 15-20 dakika inkübatör içinde kurumaya bırakıldı.
5. Daha sonra tüplere 500 µl PBS (0.2 mikron filtre ile filtre edilmiş) eklendi ve tüplerin her bir kenarı uzun uzun vortexlenerek eksozomların PBS içerisinde toplanması sağlandı.
6. Eksozom boyutu ve sayısı nanosight (Malvern NanoSight NS300, Birleşik Krallık) kullanılarak kantifiye edildi.

Pankreatik kanser hücreleri eksozomların eklenmesinden 1 gün önce 6 kuyucuklu pleytlere kokültür yöntemi kısmında belirtilen sayılarda ekildi ve hücrelerin yüzeye yapışmalarına zaman tanımak adına 24 saat inkübatörde inkübe edildi.

Ardından, hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edildi ve nanosight ile sayıları hesaplanan eksozomlardan, kuyu başına 1×10^8 eksozom olacak şekilde hücrelerin üzerine eksozom içermeyen media içinde eklendi. Hücreler 48 saat boyunca eksozomlar ile birlikte inkübe edildikten sonra ileri analizler için kullanıldı.

3.2.13. Koloni oluşturma yeteneği testi

PANC1 hücresleri 6 kuyucuklu pleytlere 1×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Ardından MCP-1 uygulaması ya da siRNA uygulaması yapıldı ve hücreler yaklaşık 14 gün inkübe edildi. Süre sonunda koloniler kristal viole ile boyandı ve fotoğraflandı. Koloni-alan dağılımı densitometrik olarak analiz edildi.

3.2.14. Hücre migrasyon testi

Kokültür, eksozom uygulaması, MCP-1 peptidi uygulaması ve siRNA ile tedavi sonrası hücrelerin migrasyon (göç etme) özelliklerinin incelenmesi için hücre migrasyon testi yapıldı. Kokültür, eksozom ve MCP-1 uygulaması sonrası migrasyon testi için, PANC1 hücreleri kuyu başına $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde 2 ml besiyeri içerisinde ekildi ve hücrelerin yapışmasına zaman vermek adına gece boyunca inkübatörde inkübe edildi. Ardından deneyin amacına uygun olarak (kokültür, eksozom ya da MCP-1 uygulaması öncesi) 200 μ l'lik pipet ucu yardımıyla kuyular boyunca düz çizgiler çekildi ve her kuyudan 3 alan işaretlenerek 0'ncı saat fotoğrafları çekildi.

Ardından kokültür için monosit ve makrofaj hücrelerini içeren insertler kuyulara yerleştirildi. Eksozom tedavisi için kuyu başına 1×10^8 eksozom ilave edildi. MCP-1 tedavisi için ise belirtilen konsantrasyonlarda (25-100 ng/ml) MCP-1 uygulandı. Her bir grup için, 24 ve 48 saat sonunda işaretli alanlar tekrar fotoğraflandı.

siRNA uygulaması sonrası migrasyon testi için ise kuyu başına 2×10^5 hücre ekildikten sonraki gün siRNA'lar ile transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra kuyularda 200 μ l'lik pipet ucuyla çizgi çekilerek 0. saat fotoğrafları çekildi. 24 ve 48 saat sonunda aynı alanlar tekrar fotoğraflandı.

3.2.15. Matrijel hücre invazyon testi

Hücre invazyonu için kullanılacak insertler matrijel ile aşağıda açıklandığı şekilde kaplandı: 200 μ l matrijel 3 ml serumsuz besiyerine eklendi ve vortex kullanarak homojen karışması sağlandı. Ardından, 24 kuyucuklu pleyt için uyumlu olan insertler kuyucuklara yerleştirildi.

Hazırlanan matrijelden kuyu başına 100 µl eklendi. Pleytler oda ısısında 4-5 saat bekletilerek matrijellerin donması sağlandı.

Kokültür, eksozom uygulaması ya da siRNA ile tedaviden 48 saat sonra PANC1 hücreleri tripsin ile yüzeyden toplandı ve matrijel ile kaplanmış olan insertler içerisine 6×10^4 hücre olacak şekilde serumsuz besiyeri ile ekildi. İnsertlerin dışında kalan alanlara kemoatraktan özellik sağlaması için %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. 24 saatin sonunda insertler içerisindeki hücreler Hema 3 boyama kiti kullanılarak boyandı. Hema 3 kiti protokolü:

1. İnsertlerin içerisine ve dışarısına kuyuyu tamamen kaplayacak şekilde fiksatif eklendi ve oda ısısında 20 dakika inkübe edildi.
2. Ardından fiksatif insert ve kuyulardan uzaklaştırıldı ve solüsyon-1 benzer şekilde eklendi ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. Solüsyon-1 kuyu ve insertlerden uzaklaştırıldı ve solüsyon-2 eklenerek 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
4. Kuyu ve insertlerden solüsyon-2 uzaklaştırıldı. İnsertler distile su içerisinde fazla boyalardan uzaklaştırılarak oda ısısında kurumaya bırakıldı.
5. Ertesi gün arka plandaki fazla boyamaları temizlemek amacıyla pamuklu çubuk ıslatılarak insertlerin iç kısımlarındaki fazla boyalar dikkatlice temizlendi.
6. Bistüri yardımıyla insertlerin taban kısmı dikkatlice kesilerek membranlar lam üzerine aktarıldı ve permount kapatma solüsyonu damlatılarak üzerlerine lamel kapatıldı. Her bir insert için rastgele 5 alan mikroskop ile (Nikon Eclipse TE-200-U) fotoğraflandı.

3.2.16. Salınmış MCP-1 düzeyinin belirlenmesi için enzim-bağlantılı immünosorbent test (ELISA) uygulanması

PANC1 hücreleri THP-1, M0 ve M2 tip hücrelerle kokültür yapıldıktan 48 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyerleri falkon tüplere toplandı. Örnekler test gerçekleştirilene

kadar -20°C 'de bekletildi. Daha sonra MCP-1 ELISA testi kit içerisinde çıkan protokole göre aşağıda tanımlandığı şekilde çalışıldı.

1. Kit içerisinde çıkan MCP-1 standartı 31,25 pg/ml ile 2000 pg/ml arasında dilue edilerek hazırlandı. Hazırlanan standartlar ve test için hücrelerden toplanmış besiyerleri minimum 2 tekrarlı olacak şekilde test için hazırlanmış 96 kuyucuklu pleytlere 200 µl pipetlendi. Tüm örnekler oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonunda kit içerisinde çıkan yıkama solüsyonu ile kuyular 3 kez yıkandı.
3. Kuyulara 200 µl MCP-1 konjugatı eklendi ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
4. Yıkama aşaması tekrarlandı.
5. Ardından, kit içerisinde çıkan “color reagent A” ve “color reagent B” bileşenlerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla oluşturulan substrat solüsyonundan kuyulara 200 µl eklendi ve 30 dakika oda ısısında pleyt ışık almayacak şekilde inkübe edildi.
6. 30 dakika sonunda renk değişimi gözlemlendikten sonra kuyulara 50 µl “stop solüsyonu” eklendi ve pleytler spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.

3.2.17. Western blot metodu

Kokültür deneyleri, eksozom uygulaması, MCP-1 peptidi uygulaması ve siRNA'ler ile tedaviler sonrası hücrelerin protein düzeylerindeki değişiklikleri incelemek amacıyla öncelikle total protein izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.17.1. Protein izolasyonu

Hücrelerden protein izolasyonu için RIPA lizis tamponu içerisinde hücre parçalama (lizis) solüsyonu hazırlandı. Lizis solüsyonu için; 1 ml RIPA tamponu içerisine 10µl Proteaz inhibitör kokteyli, 10 µl fosfataz inhibitörü ve 4 µl sodyum florid (NaF) eklendi. Lizis solüsyonu kullanmadan hemen önce hazırlanarak taze kullanıldı.

Öncelikle, kuyulardaki tüm hacim aspire edildi ve kuyulara 1 ml tripsin eklenerek hücreler yüzeyden kaldırıldı. Tripsinizasyon sonrası kuyulardaki hacimler kullanılan tripsinin 2 katı besiyeri ile etiketli falkonlara toplandı ve falkonlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj

yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peletinin miktarına göre 50-100 µl lizis solüsyonu eklendi ve falkonlar içindeki hacimler pipetaj yapılarak etiketli ependorf tüplerine (1,5 ml'lik santrifüj tüpleri) aktarıldı. Tüpler buz üzerinde 30 dakika lizis solüsyonu ile inkübe edildi ve inkübasyonun 10, 20 ve 30. dakikalarında 10 saniye vorteks yapıldı. Süre sonunda ependorf tüpleri +4°C'de 13 000 rpm hızında, 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası pelet kısmına dokunmamaya dikkat ederek, süpernatant kısımlar yeni ependorf tüplere aktarıldı. Hazırlanan hücre lizatları hemen kullanılmayacaksa -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.17.2. Örneklerin protein miktarlarının ölçülmesi, yüklenmesi ve jelde yürütülmesi

Örneklerin protein konsantrasyonları BCA yöntemiyle (Pierce BCA Protein Assay Kit, ABD) belirlendi ve örneklerden hesaplanan miktarlar ependorf tüplere 5:1 oranında yükleme boyasıyla karıştırılarak 5 dakika 100°C'de inkübe edildi. Ardından örnekler buz üzerine alındı ve özel yükleme pipet uçları (Corning® gel-loading pipet tips, Sigma, ABD) kullanılarak 40 µl hacim %4-15 gradyan jelle (Mini-Protean TGX Gels, BioRad, ABD) yüklendi ve yükleme tamponu içerisinde 100-150 V'da yaklaşık 2 saat yürütüldü.

Stok (10x) yükleme/transfer tamponununun hazırlanması: (1 L için)

30 g Tris bazı + 144 g Glisin + 1 L distile su

Çalışma solüsyonu hazırlanması:

100 ml 10x yükleme/transfer tamponu + 890 ml distile su + 10 ml sodyum dodesil sülfat (SDS)

Yükleme boyasının hazırlanması:

1,8 ml gliserol + 1,2 ml SDS (%30) + 0,9 ml beta-merkaptolanol +

0,18 ml Bromofenol mavisi (%2,5) + 1,1 ml Tris-HCl (0,5 M)

pH 6,8'e ayarlanır, ardından 0,82 ml distile suyla hacim tamamlanır.

3.2.17.3. Islak transfer yöntemiyle proteinlerin membrana aktarılması

Proteinlerin jelde yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması sağlandıktan sonra ıslak transfer metodu ile jeldeki proteinler 0.45 mikron pora sahip PVDF membranlara (EMD Millipore Immobilon™-P PVDF Transfer Membranes, Fisher Scientific, ABD) aktarıldı. Transfer işlemi transfer tamponu içerisinde +4°C'de 40V akımda 16-20 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi.

Transfer tamponununun hazırlanması:

100 ml 10x yükleme/transfer tamponu + 700 ml distile su +200 ml metanol

3.2.17.4. Membranların bloklanması ve antikor eklenmesi

Transfer sonrası membranlar %5 yağsız süt içeren (Blotting-Grade Blocker, BioRad, ABD) TBS-T tampon içerisinde oda ısısında, dairesel karıştırıcı (shaker) üzerinde 1 saat inkübe edilerek bloklandı.

Ardından %5 yağsız süt içeren TBS-T solüsyonu içerisinde 1:1000 ya da 1:500 dilüsyon ile birincil antikorlar hazırlandı ve membranlara bu birincil antikorlar eklenerek, +4°C'de dairesel karıştırıcı üzerinde gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membranlar dairesel karıştırıcı üzerinde 2x7 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra görüntüleme için, kullanılan birincil antikorla uyumlu olacak şekilde anti-rabbit, anti-goat ya da anti-mouse ikincil antikorları %5 yağsız süt içeren TBS-T solüsyonu içerisinde 1:1000 dilüsyon ile hazırlanarak membranların üzerine eklendi. Membranlar ikincil antikorlar ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası TBS-T ile 2x7 dakika yıkama yapıldı ve kemiluminesans sprej (HyGLO™ Quick Spray Chemiluminescent HRP Antibody Detection Reagent, Denville Scientific, ABD) kullanılarak karanlık odada görüntüleme yapıldı. Membranlar kemiluminesans sprej ile iyice ıslatılıp 1 dakika kadar solüsyon içerisinde bekletildikten sonra X-ray film kaseti içerisinde bulunan şeffaf poşet dosya arasına konuldu ve hava kabarcıkları peçete ile temizlendi. Ardından üzerine X-ray filmi (Premium X-Ray film) konularak, görüntülenecek proteine bağlı olarak farklı sürelerde inkübe edildi ve filmler cihazda taranarak görüntüler alındı.

3.2.18. Lipozomal siRNA hazırlanması

In vivo taşıma için siRNA'lar dioleoyl-snglycero-3-phosphocholine (DOPC) lipozomları içine yerleştirildi. DOPC ve siRNA'lar tersiyer butanol varlığında 1:10 (w/w) oranında siRNA/DOPC olacak şekilde karıştırıldı. *In vivo* uygulama öncesi hazırlanan bu lipozomlar %0,9 tuz solüsyonu ile sulandırıldı ve intravenöz uygulama için hazır hale getirildi.

3.2.19. *In vivo* ortotopik zenograft tümör modeli

4-5 haftalık atimik dişi nude farelere PANC1 hücreleri %20 matrijel içinde 5×10^6 hücre olacak şekilde doğrudan pankreasın kuyruk kısmından verildi. Enjeksiyondan yaklaşık 2 hafta sonra, tümörler yaklaşık 3-5 mm boyuta ulaştığında liposomal siRNA tedavileri uygulandı. Tedavi grubundaki her bir fare EF2K siRNA'sı ya da kontrol siRNA'sı ile 4 µg/fare olacak şekilde 4 hafta boyunca uygulandı. Tedavi süreleri sonunda fareler CO₂ ile ötenazi yapıldı. Tümör boyutları ölçüldü ve tümör dokuları western blot ve immünohistokimyasal analizler için çıkarıldı. Bütün çalışmalar M.D. Anderson Hayvan Bakımı ve Kullanımı Enstitüsü kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2.20. İmmünohistokimyasal analizler

Tümörler çıkarıldıktan sonra alınan doku kesitleri (5 µm) hematoksilin ve eosin ile boyandı. Ki-67 ve F4/80 antikoları ile yapılan boyamalar sırasıyla hücre proliferasyonu ve M2 tip makrofaj infiltrasyonu için gerçekleştirildi. Formalin ile fikse edilmiş tümör dokuları sırasıyla ksilen, %100 etanol, %95 etanol, %80 etanol ve ardından PBS ile deparaffinize ve dehidre edildi. Ardından antijenik bölgeleri açığa çıkarmak için "DIVA antigen retrieval" solüsyonu içerisinde 95°C'de 40 dakika inkübe edildi. Örnekler oda ısısına getirildikten sonra endojen peroksidazların bloklanması için %3 hidrojen peroksit içeren metanol ile 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra doku kesitleri Ki-67 (ThermoFisher, ABD) ve F4/80 (abcam, İngiltere) için primer antikolar ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Ardından ikincil antikolar ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi ve doku örnekleri hematoksilin ile 30 saniye boyandıktan sonra mikroskop (Leica DM 4000 B LED) ile fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1. Kokültür Deneyleri

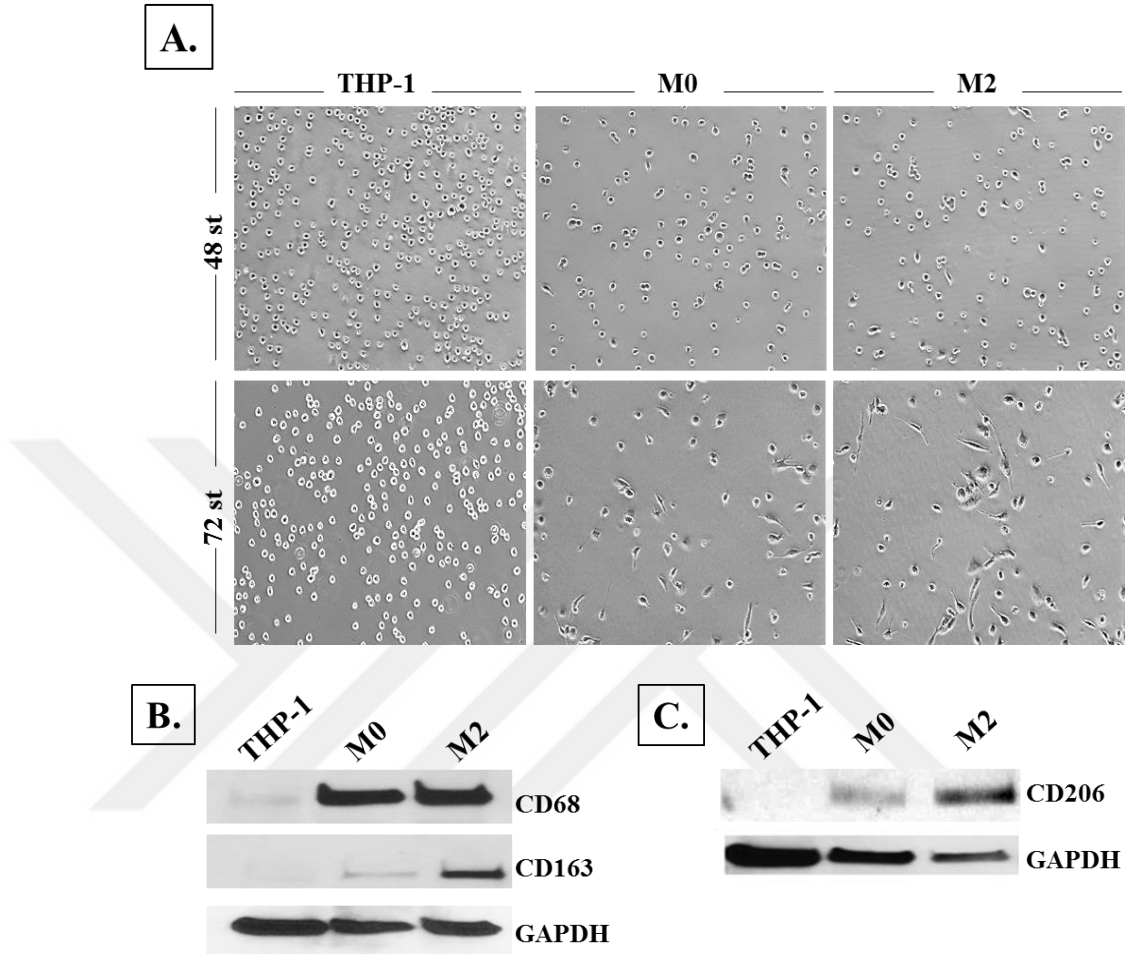
4.1.1. Monositik hücrelerin makrofajlara farklılaştırılması ve karakterizasyonu

Akut monositik lösemi hastasından elde edilmiş bir hücre hattı olan THP-1 hücreleri PMA uygulamasıyla öncelikle olgun M0 tip makrofajlara dönüştürüldü. Ardından bu hücreler IL4 ve IL13 eklenmesiyle pro-tümörijenik özellikteki M2 tip makrofajlara dönüştürüldü.

Süspanse haldeki monositik hücrelerin M0 ve M2 tip makrofajlara farklılaştırılması sonrası en karakteristik değişiklik olan hücrelerin flaska yapışma özelliği kazandıkları, hücrelerin bölünme hızlarının yavaşladığı ve fibroblastik morfoloji kazandıkları gözlemlendi ve fotoğraflandı (Şekil 4.1A).

Genel makrofaj farklılaşması karakterizasyonu için CD68 makrofaj markırı kullanıldı. M2 tip makrofaj karakterizasyonu için ise CD163 ve CD206 markırı kullanıldı. Karakterizasyon sonuçları şekil 4.1B ve C’de verildi.

THP-1 hücreleri PMA uygulaması ile M0 tip makrofajlara farklılaştırıldığında, genel makrofaj markırı olan CD68 ekspresyonunun PMA uygulanmayan THP-1 hücrelerine kıyasla arttığı görüldü (Şekil 4.1B). PMA uygulamasının ardından IL4 ve IL13 eklenmesiyle M2 tip makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin M0 tip makrofajlara kıyasla yüksek düzeyde CD163 ve CD206 eksprese ettikleri görüldü (Şekil 4.1B ve C).

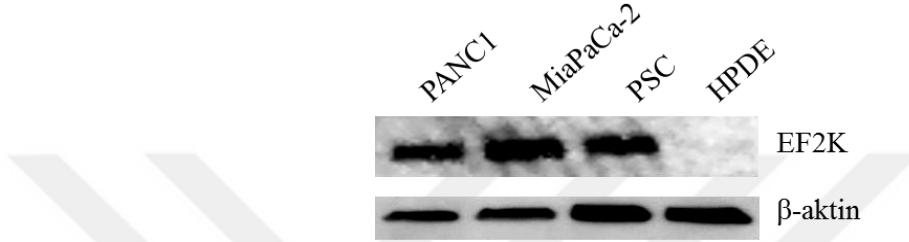


Şekil 4.1. Süspans haldeki monositik THP-1 hücrelerinin PMA ve IL4+IL13 uygulaması ile yüzeye yapışma yeteneği kazanması ve makrofajlara farklılaşması (A). Fotoğraflar 10X büyütme ile çekilmiştir. M0 ve M2 makrofaj fenotiplerinin CD68, CD163 ve CD206 markırları ile karakterize edilmesi (B)

4.1.2. Pankreatik kanser ve stellat hücrelerinin farklılaşmamış ve farklılaşmış monosit hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmesinin ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K) enzim ekspresyonu üzerine etkisi

Ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K), pek çok kanser türünde yüksek oranda eksprese olduğu bilinen bir enzimdir. Çalışmada, öncelikle PANC1 ve MiaPaCa-2 pankreatik kanser hücre hatlarında, pankreatik kanser mikroçevresinin en önemli hücre gruplarından olan pankreatik stellat hücrelerinde (PSC) ve normal pankreas hücre hattında

(HPDE) bazal EF2K ekspresyon düzeyleri western blot metodu ile ölçüldü (Şekil 4.2). Western blot sonuçlarında görüldüğü üzere, normal pankreas hücre hattı olan HPDE hücrelerinde EF2K ekspresyonu yok iken, kanser hücreleri ve stellat hücreleri (PSC) yüksek oranda EF2K ekspresyonuna sahiptir (Şekil 4.2).

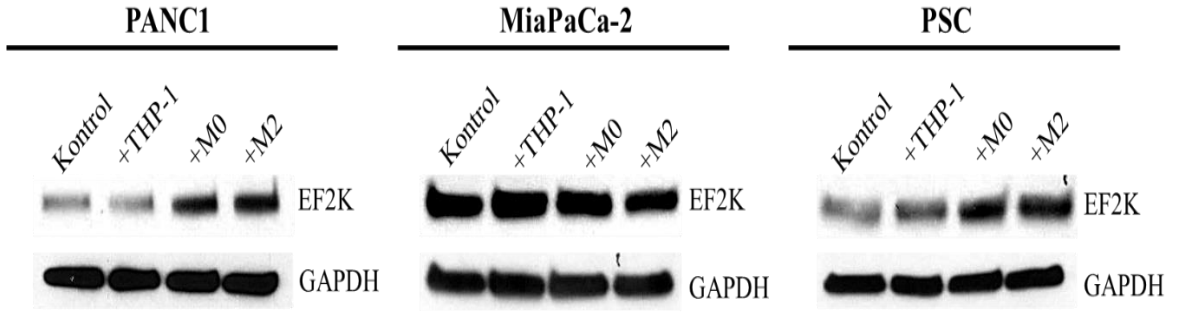


Şekil 4.2. Pankreatik kanser hücre hatları (PANC1, MiaPaCa-2), pankreatik stellat hücreleri (PSC) ve normal pankreas hücre hattında (HPDE) EF2K ekspresyon düzeylerinin western blot metodu ile ölçülmesi

Açlık, besin kıtlığı gibi ekstrem koşullar altında bile kanser hücrelerinin hayatta kalmasında önemli role sahip olan EF2K enziminin tümör mikroçevresinde diğer hücrelerin varlığındaki ekspresyon düzeyi ve rolü henüz bilinmemektedir.

Bu amaçla, tümör mikroçevresini kültür ortamında taklit edebilmek için, PANC1 ve MiaPaCa-2 pankreatik kanser hücre hatları ile THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlar 48 saat boyunca indirekt olarak birlikte kültüre (kokültür) edildi. Bu süre içerisindeki hücreler arası etkileşimin PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerindeki EF2K ekspresyonuna etkisi western blot yöntemiyle değerlendirildi (Şekil 4.3). Ayrıca mikroçevre modellemesi için pankreatik stellat hücreleri (PSC) de kullanıldı (Şekil 4.3).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, kokültür yapılmayan grubu (kontrol grubu) yüksek EF2K ekspresyon düzeyine sahip MiaPaCa-2 hücrelerinde THP-1, M0 ve M2 hücrelerinin varlığı ile EF2K düzeyinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Öte yandan PANC1 ve PSC hücrelerinde ise, kokültür yapılmayan (kontrol) hücrelere kıyasla, özellikle M0 ve M2 tip makrofajların ortamdaki varlığı ile EF2K ekspresyon düzeyinde ciddi artış meydana geldiği görüldü.



Şekil 4.3. Pankreatik kanser hücre hatları (PANC1, MiaPaCa-2) ve pankreatik stellat hücrelerinin (PSC) THP-1 monosit hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlar ile birlikte kültüre edilmesi sonrası hücrelerdeki EF2K ekspresyon değişimlerinin western blot metodu ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı

Bu verilerden sonra, kanser hücresi-mikroçevre arasındaki etkileşimin EF2K ekspresyonuna olan etkisini mekanistik olarak aydınlatmak amacıyla PANC1 hücrelerine odaklanıldı ve çalışmalar bu hücre hattı ile devam ettirildi.

4.1.3. THP1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajların ortamdaki varlığının PANC1 hücrelerinin göç etme (migrasyon) ve invazyon yetenekleri üzerine etkisi

EF2K enziminin kanser hücrelerinin göç etme (migrasyon) ve invazyon yeteneklerini arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle, PANC1 hücreleri THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmeden önce (0'inci saat) ve kültüre edildikten sonra (24 ve 48'inci saat) migrasyon yeteneklerini değerlendirmek amacıyla fotoğraflandı (Şekil 4.4A). PANC1 hücreleri M0 ve M2 tip makrofajlarla indirekt olarak kültüre edildiğinde, PANC1 hücrelerinin migrasyon yeteneklerinin arttığı açık bir şekilde görüldü.

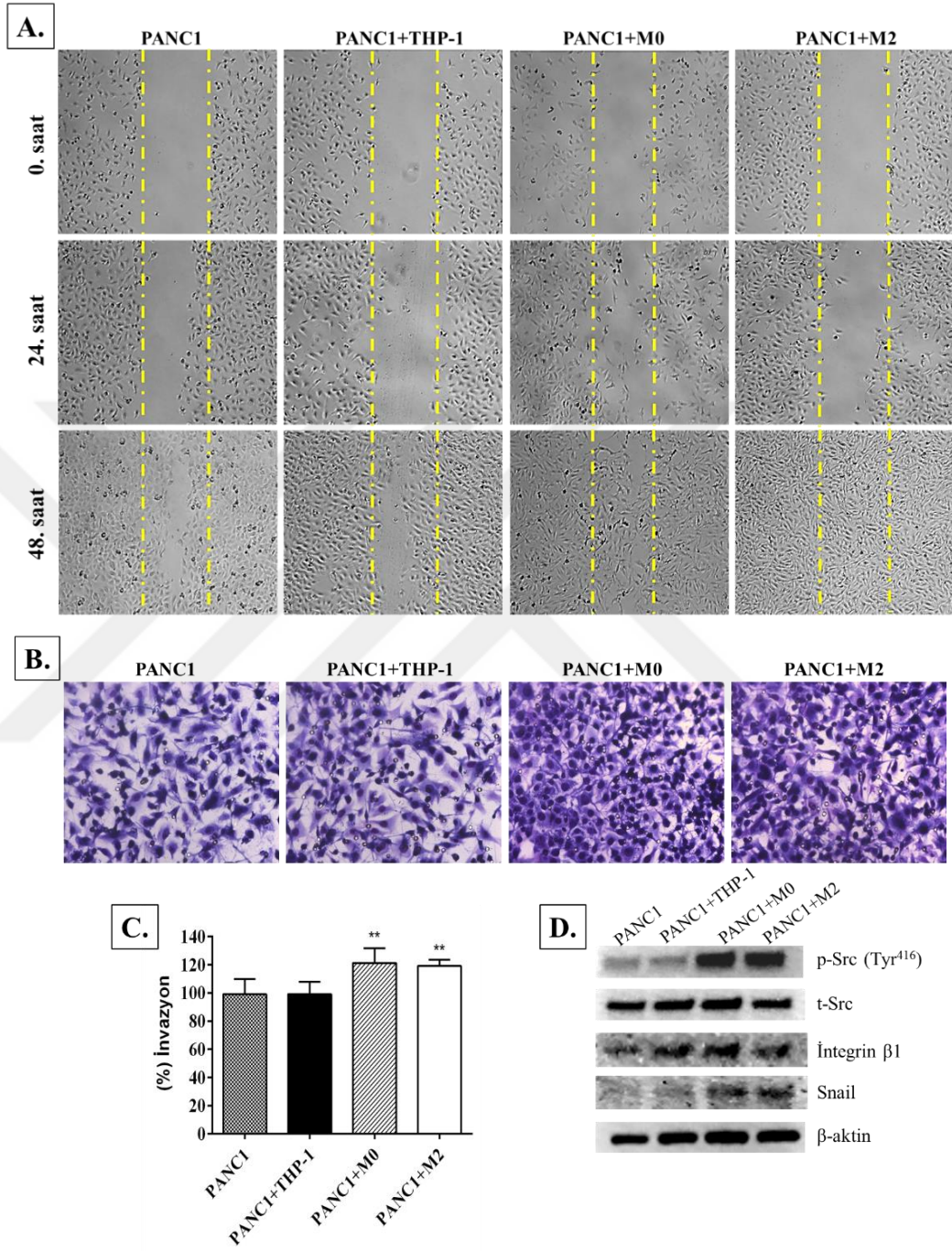
Kokültür sonrası hücrelerin invazyon özelliklerindeki değişiklikleri incelemek amacıyla matrijel invazyon testi yapıldı ve hücre fotoğrafları şekil 4.4B'de gösterildi (Şekil 4.4B). Ortamda M0 ve M2 hücrelerinin varlığının, PANC1 hücrelerinin invazif yeteneğini arttırdığı görüldü. Alan başına düşen hücreler sayıldı ve sonuçlar (%) invazyon şeklinde kantifiye edilerek istatistiksel olarak analiz edildi (Şekil 4.4C).

Grafiğe bakıldığında, PANC1 hücrelerinin M0 ve M2 hücreleriyle indirekt olarak kültüre edilmesinin hücre invazyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı görüldü (Şekil 4.4C).

Ardından, THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle birlikte kültüre edilen PANC1 hücrelerinde migrasyon ve invazyon ile ilişkili bazı proteinlerin değişimi western blot yöntemiyle değerlendirildi (Şekil 4.4D). Sonuçlar incelendiğinde, ortamda M0 ve M2 hücrelerinin varlığının hücre invazyonu ve migrasyonu ile ilişkili proteinlerden olan proto-onkojen tirozin protein kinaz Src proteinin fosforillenmesine ve dolayısıyla aktifleşmesine (p-Src) neden olduğu görüldü.

Diğer yandan beklenildiği üzere, total-Src düzeyinde herhangi bir değişiklik görülmedi. Hücre invazyonu ile ilişkili proteinlerden olan integrin beta 1 (integrin β 1) protein ekspresyonunun da M0 ve M2 hücreleri varlığında arttığı görüldü.

Ayrıca hücre migrasyonu fotoğrafları incelendiğinde (Şekil 4.4A), M0 ve M2 hücreleriyle kültüre edilen PANC1 hücrelerinin morfolojik değişime uğradığı, hücre morfolojilerinin epitelyal görünümünden mezenşimal görünüme değiştiği görüldü. Western blot sonuçlarındaki epitelyal-mezenşimal sürecin kritik proteinlerinden olan Snail proteinindeki ekspresyon artışı da bu görsel değişikliği doğruladı.



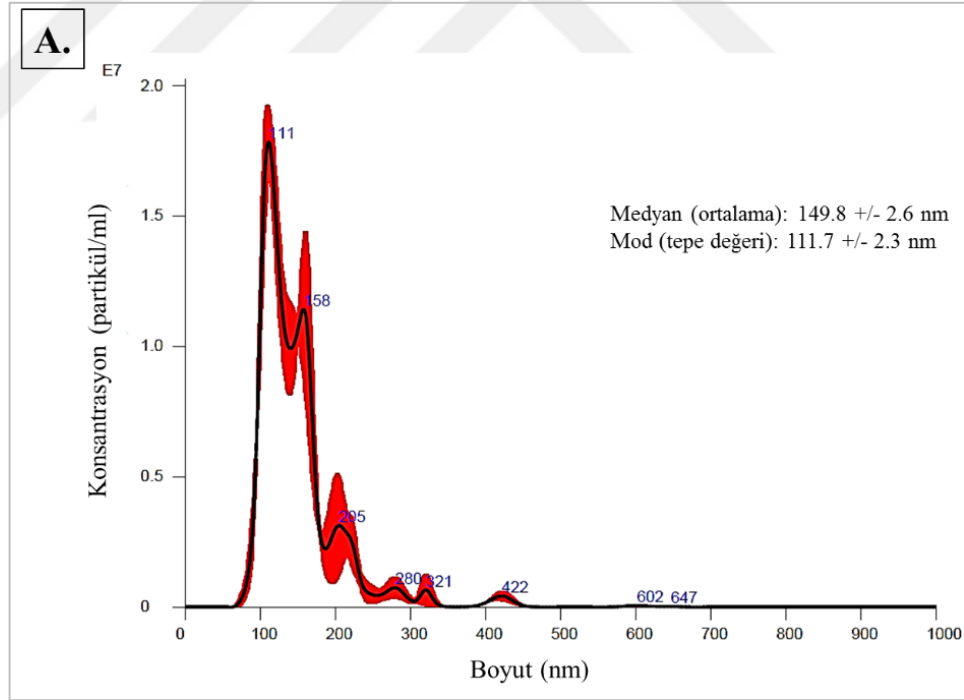
Şekil 4.4. PANCI hücrelerinin THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle kokültürünün hücre migrasyonu (A) ve invazyonu üzerine etkisi (B, C). Hücre migrasyonu, ve invazyonu ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyindeki değişimlerin western blot ile incelenmesi (D). Yükleme kontrolü olarak beta aktin (β -aktin) kullanıldı. p-Src: fosfo Src, t-Src: total Src. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *Tek başına PANCI hücrelerine kıyasla kokültür gruplarının istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. ** $p \leq 0,01$

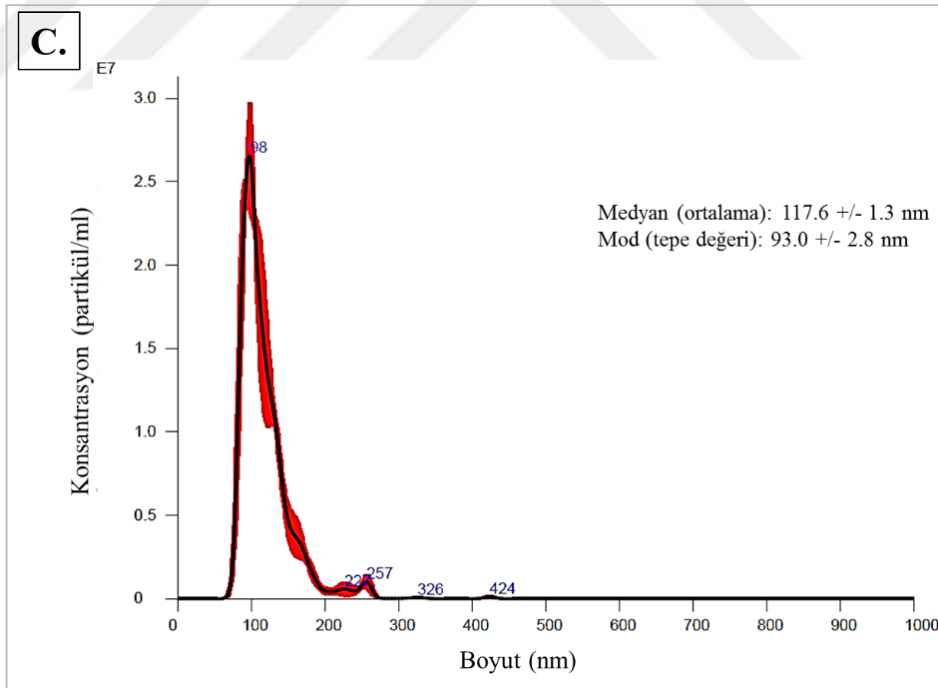
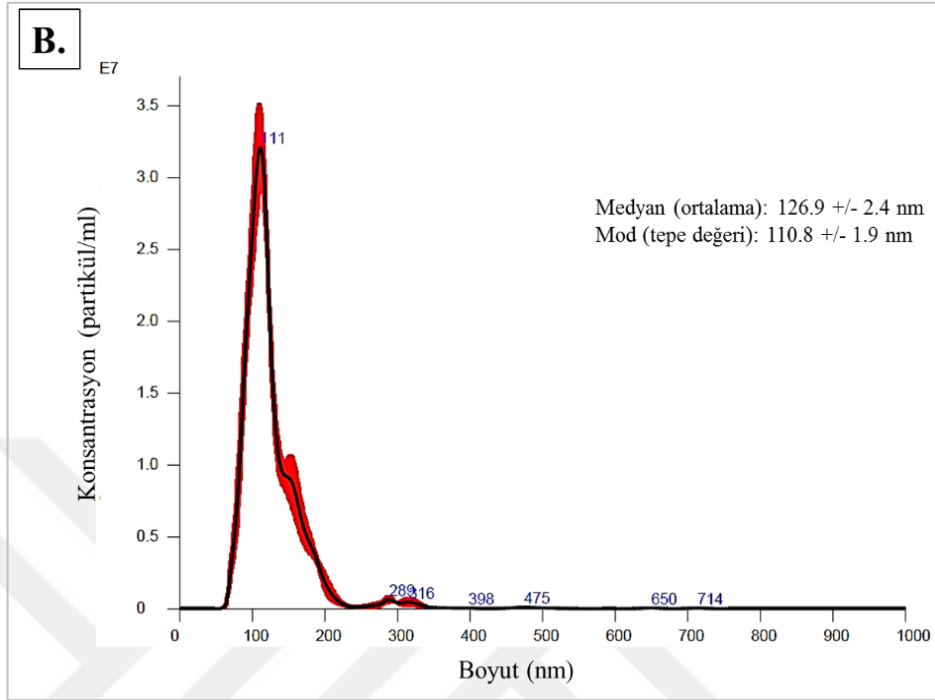
4.2. Kokültür Ortamındaki Eksozomların PANC1 Hücreleri Üzerine Etkileri

PANC1 hücrelerinin THP-1, M0 ve M2 hücreleri ile birlikte kültüre edilmesi sonrası, PANC1 hücrelerinde EF2K ekspresyon artışı ile birlikte hücrelerin koloni oluşturma, migrasyon ve invazyon yeteneklerinde artışa sebep olduğu bulundu. Bu verilerden sonra, bu etkilerin kokültür ortamındaki eksozomlar aracılığıyla olup olmadığını incelemek amacıyla eksozom deneyleri gerçekleştirildi.

4.2.1. THP-1, M0 ve M2 hücrelerinden izole edilen eksozomların sayı ve boyut bakımından kantifiye edilmesi

Eksozom deneyleri için öncelikle THP-1, M0 ve M2 hücrelerinden eksozomlar izole edildi. Eksozom boyutu ve konsantrasyonları nanosight ile kantifiye edildi (Şekil 4.5).



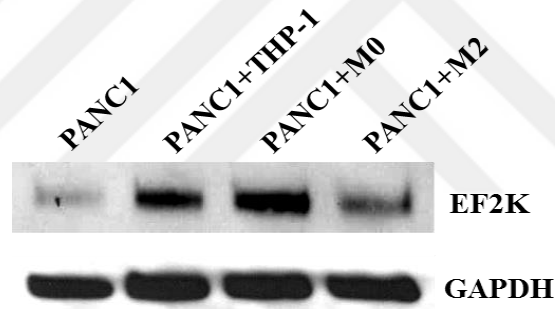


Şekil 4.5. THP-1 hücreleri (A), M0 tip (B) ve M2 tip (C) makrofajlardan izole edilen eksozomların konsantrasyon ve boyutlarının nanosight ile ölçümü

4.2.2. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 hücreleri kaynaklı eksozomların PANC1 hücrelerinde EF2K protein ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi

Ardından, monositik hücreler ve makrofajlardan izole edilen eksozomlar PANC1 hücrelerine (1×10^8 eksozom/kuyu) uygulandı ve PANC1 hücreleri bu eksozomlara 48 saat boyunca maruz bırakıldı. EF2K protein ekspresyon düzeylerindeki değişimler western blot ile incelendi (Şekil 4.6).

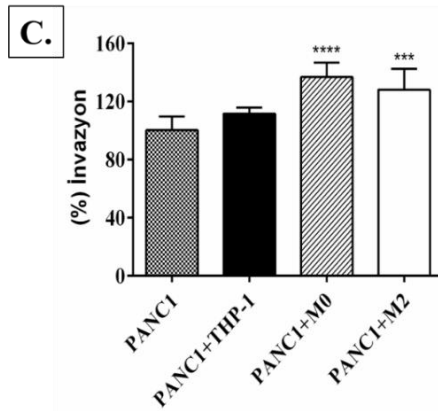
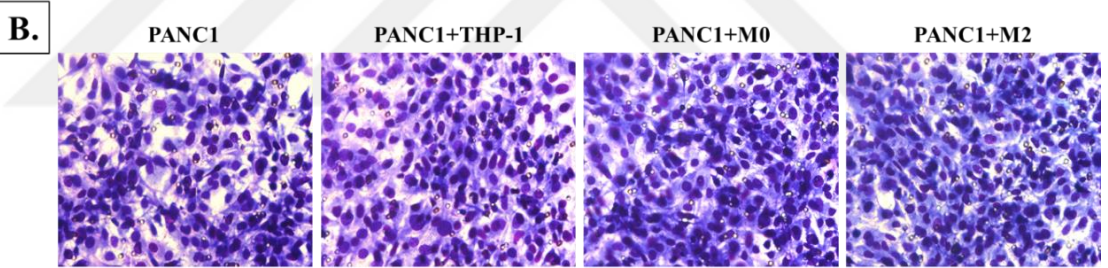
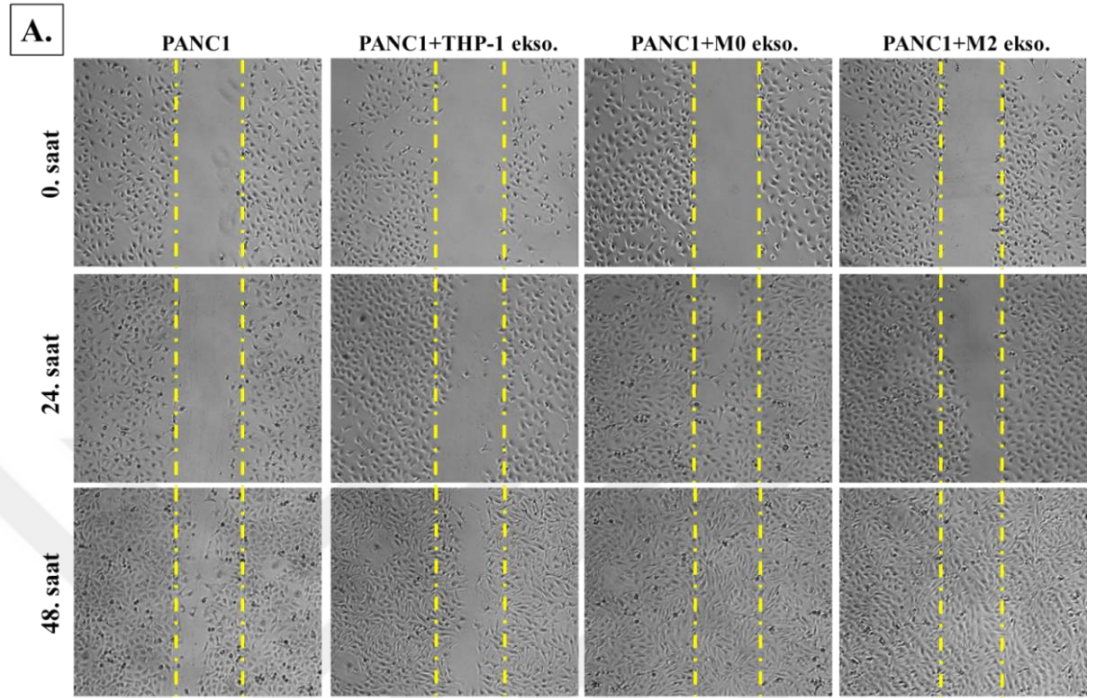
Sonuç olarak, PANC1 hücrelerinin THP-1 hücreleri, M0 ve M2 hücrelerinden kaynaklı eksozomlara maruziyetinin eksozom uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla EF2K ekspresyonunda artışa neden olduğu görüldü.



Şekil 4.6. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan izole edilen eksozomların PANC1 hücreleriyle 48 saat muamelesi sonrası EF2K ekspresyon düzeyi değişimleri

4.2.3. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 hücreleri kaynaklı eksozomların PANC1 hücrelerinin göç etme (migrasyon) ve invazyon yetenekleri üzerine etkisi

THP-1, M0 ve M2 hücrelerinin EF2K indüksiyonuna sebep olduğu gösterildikten sonra eksozomların hücre migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri incelendi (Şekil 4.7). Kokültür sonuçlarına benzer şekilde, PANC1 hücrelerinin M0 ve M2 hücreleri kökenli eksozomlara maruziyetinin hücrelerin migrasyon (Şekil 4.7A) ve invazyon (4.7B ve C) yeteneklerinde artışa neden olduğu görüldü.



Şekil 4.7. PANC1 hücrelerinin THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan izole edilen eksozomlarla muamele edilmesinin hücre migrasyonu (A) ve invazyonu üzerine etkisi (B, C). Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *Tek başına PANC1 hücrelerine kıyasla eksozom uygulanan grupların istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

4.3. EF2K Proteini ile Mikroçevre Proteinlerinden Olan Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1) Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

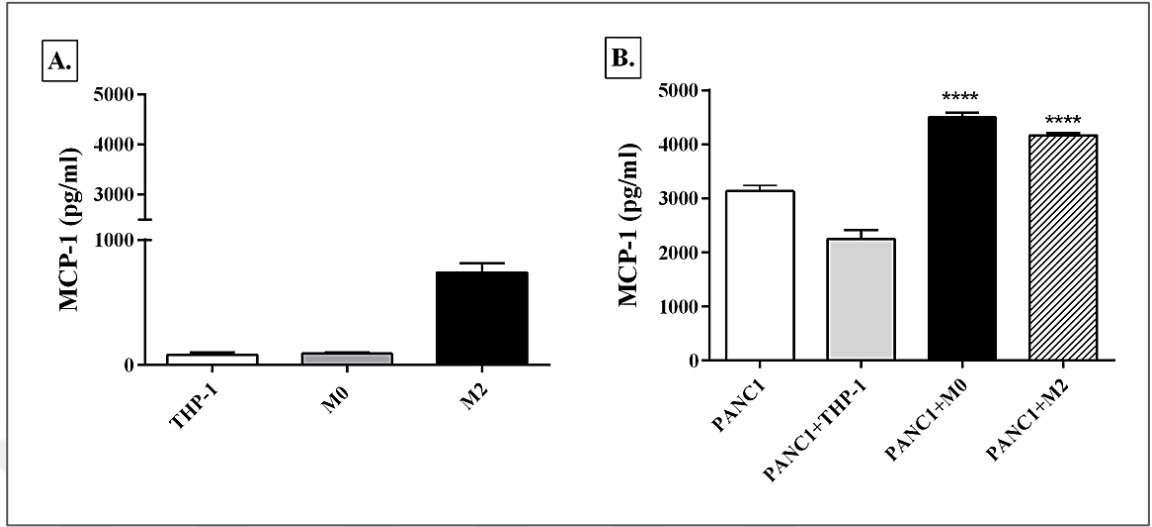
4.3.1. THP-1, M0 ve M2 hücrelerinin MCP-1 üzerine etkilerinin incelenmesi

Monosit kemoatraktan proteini (MCP-1 ya da CCL2) tümör mikroçevresinde ağırlıklı olarak kanser hücrelerinden salınmaktadır ve bu protein monositleri tümör mikroçevresine çekerek, onların makrofajlara farklılaşmasında rol almaktadır. Kanser hücreleri yüksek miktarda MCP-1 salınımı yaparken, monositik hücreler ve makrofajlar da bu proteinin reseptörü olan CCR2 reseptörünü yüksek düzeyde eksprese etmektedir.

İlk bulgulara göre, ortamda makrofajların varlığı PANC1 hücrelerinde eksozomlar aracılığıyla EF2K ekspresyonu artışına sebep olmakta ve bu EF2K artışı ile birlikte hücrelerde migrasyon ve invazyon gibi agresif tümör özellikleri artmaktadır. Bu bulgulara dayanarak, mikroçevre modelini yansıtmak amacıyla kullanılan kokültür deneyine ait besiyerinde ve PANC1 hücrelerindeki MCP-1 düzeyinin ölçülmesi ve MCP-1 ile EF2K arasında bir ilişki olup olmadığının incelenmesi amaçlandı.

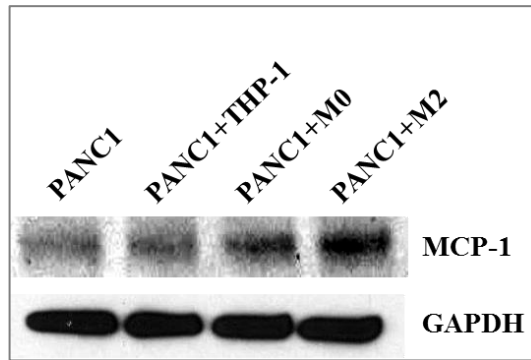
Bu amaçla, PANC1 hücrelerinin THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlar ile 48 saat boyunca birlikte kültüre edilmesinden sonra ortamdaki besiyeri toplandı ve ELISA testi ile MCP-1 düzeyi ölçümü için kullanıldı.

Öncelikle THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan salınan MCP-1 düzeyleri ölçüldü ve Şekil 4.8A'da gösterildi. Grafikte görüldüğü üzere, THP-1 hücreleri ve M0 tip makrofajlardan neredeyse hiç MCP-1 proteini salınmazken, hücreler pro-tümörijenik özellikteki M2 tip makrofajlara farklılaştırıldığında görece yüksek düzeyde MCP-1 salgılama özelliği kazandı (Şekil 4.8A). Daha sonra, tek başına PANC1 hücreleri ve bu hücrelerin THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle kokültür sonrası MCP-1 düzeyleri ölçüldü ve sonuçlar Şekil 4.8B'de verildi. PANC1 hücreleri tek başına (kokültür yapılmadan da) yüksek MCP-1 düzeyine sahipken, hücreler M0 ve M2 tip makrofajlarla kokültür yapıldığında ortamdaki MCP-1 düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görüldü (Şekil 4.8B).



Şekil 4.8. THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan salınan MCP-1 düzeyleri (A). PANC1 hücrelerinin THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle kokültür sonrası ortamdaki MCP-1 düzeylerindeki değişimler (B). Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *Tek başına PANC1 hücrelerine kıyasla kokültür gruplarının istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. **** $p \leq 0,0001$

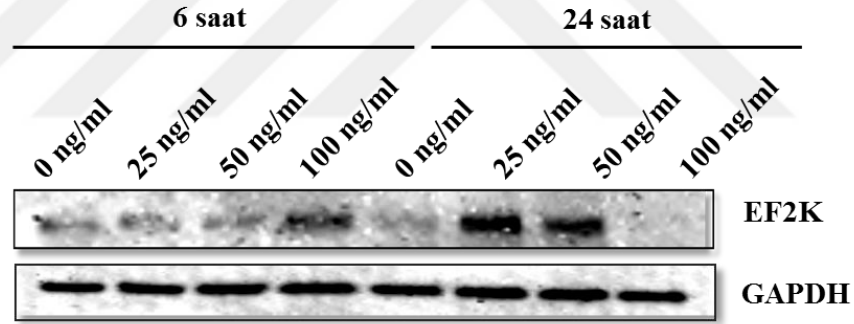
Ardından, kokültür sonrası PANC1 hücrelerindeki hücresel MCP-1 düzeyi western blot ile analiz edildi ve sonuçlar şekil 4.9’da verildi. Sonuçlara bakıldığında, PANC1 hücreleri M0 ve M2 tip makrofajlara farklılaştırıldığında ELISA sonuçlarıyla uyumlu olarak, hücresel MCP-1 düzeyinin arttığı bulundu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle kokültür yapılan PANC1 hücrelerinde MCP-1 ekspresyonunun western blot ile incelenmesi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı

4.3.2. MCP-1 peptidi uygulanmasının PANC1 hücrelerinde EF2K protein ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi

PANC1 hücrelerinin M0 ve M2 makrofajlarla kokültürü sonrası EF2K ekspresyonu artışı ve bu koşullarda hücresel ve ortamdaki MCP-1 düzeyinin artışı bulgularından sonra, MCP-1 peptidinin doğrudan EF2K ekspresyonunu indükleyip indüklediğini incelemek amacıyla PANC1 hücreleri farklı MCP-1 konsantrasyonları (25, 50 ve 100 ng/ml) ile farklı sürelerde (6 ve 24 saat) muamele edildi. Tedavi süresi sonrası hücrelerdeki EF2K ekspresyon düzeyi değişimini gözlemek amacıyla western blot yapıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 6 saatlik MCP-1 muamelesi sonrası sadece yüksek konsantrasyonda (100 ng/ml) hücrelerde EF2K artışı meydana gelirken, 24 saat sonunda 25 ve 50 ng/ml konsantrasyonlarında kontrole kıyasla ciddi düzeyde EF2K artışı saptandı (Şekil 4.10).



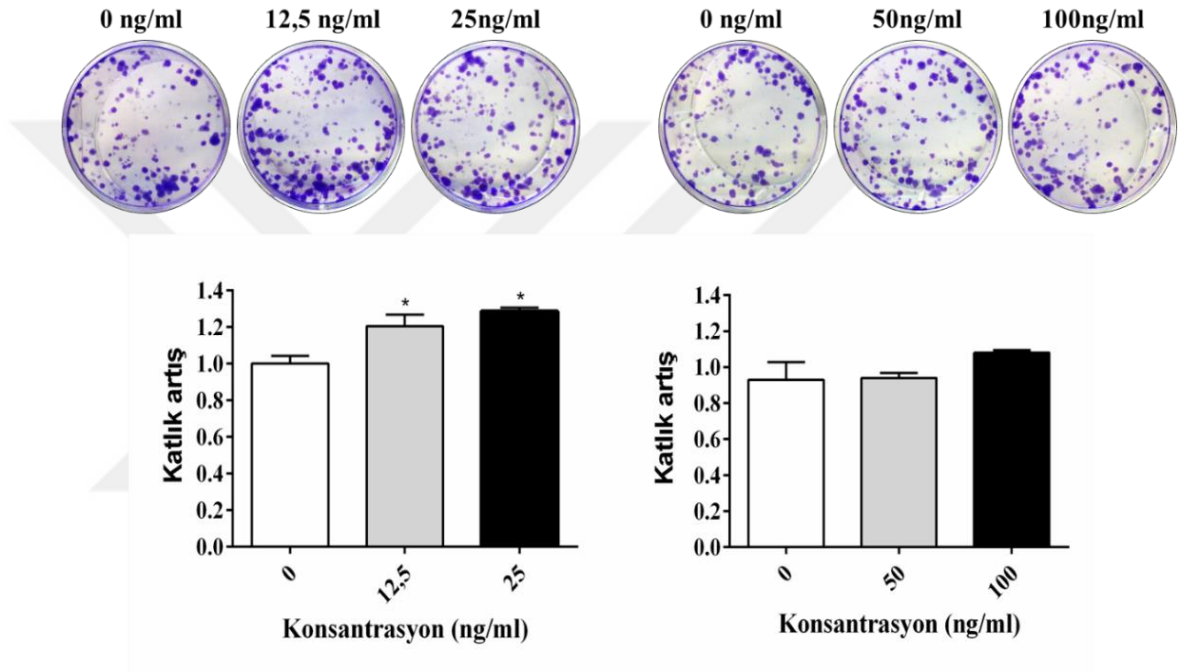
Şekil 4.10. PANC1 hücrelerine 6 ve 24 saat boyunca üç farklı konsantrasyonda (25, 50 ve 100 ng/ml) MCP-1 uygulanmasının EF2K ekspresyonu üzerine etkisi. 0 ng/ml MCP-1 uygulanmayan kontrol grubunu ifade etmektedir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4.3.3. MCP-1 peptidi uygulanmasının PANC1 hücrelerinde hücre proliferasyonu, koloni oluşturma yeteneği ve hücre migrasyonu üzerine etkisi

MCP-1 peptidi uygulanmasının PANC1 hücrelerindeki uzun süreli etkisini değerlendirmek amacıyla koloni oluşturma testi gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreler 4 farklı MCP-1 konsantrasyonu (12,5-100 ng/ml) ile 14 gün boyunca muamele edildi.

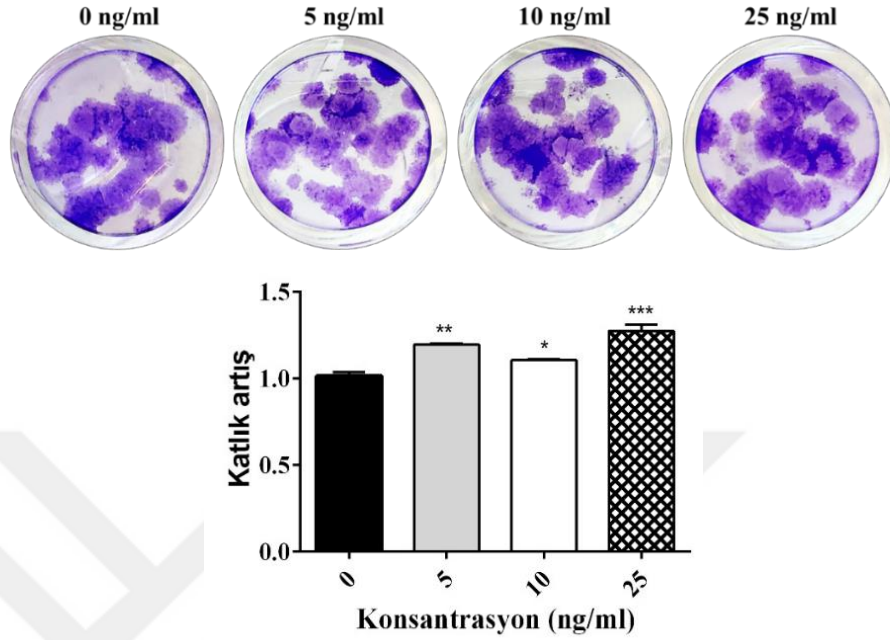
14 gün sonunda oluşan koloniler fotoğraflandı ve koloni yoğunluğu baz alınarak kantifiye edildi. Sonuçlar Şekil 4.11’de verildi.

Şekilde görüldüğü üzere, görece düşük MCP-1 konsantrasyonları (12,5 ve 25 ng/ml) hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneklerini arttırken, daha yüksek konsantrasyonlarda bir fark gözlenmedi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. PANC1 hücrelerinin MCP-1 uygulaması sonucu koloni oluşturabilme yetenekleri. Hücreler 14 gün boyunca 4 farklı MCP-1 konsantrasyonu (12,5-100 ng/ml) varlığında kültüre edildi. 0 ng/ml MCP-1 uygulanmayan kontrol grubunu ifade etmektedir

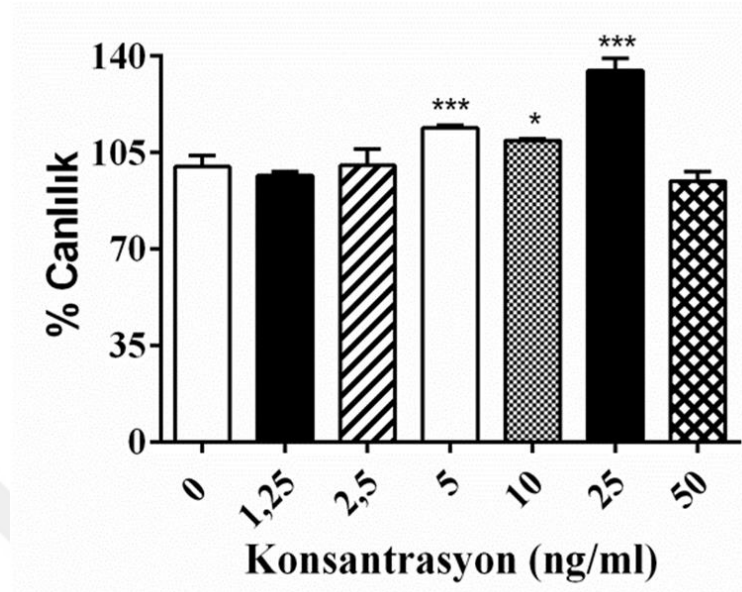
Koloni oluşturma testi sonuçlarına göre görece düşük konsantrasyonlarda (12,5 ve 25 ng/ml) koloni sayısında artış görüldüğünden, aynı test daha düşük dozlarla tekrarlandı ve sonuçlar Şekil 4.12’de verildi. İlk sonuçlarla uyumlu olarak, düşük dozlarda MCP-1 uygulanmasının hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini arttırdığı görüldü (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. PANC1 hücrelerinin MCP-1 uygulaması sonucu koloni oluşturabilme yetenekleri. Hücreler 14 gün boyunca 3 farklı MCP-1 konsantrasyonu (5-25 ng/ml) varlığında kültüre edildi. 0 ng/ml MCP-1 uygulanmayan kontrol grubunu ifade etmektedir. *MCP-1 uygulanmayan kontrol hücrelerine (0 ng/ml) kıyasla MCP-1 uygulanan grupların istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

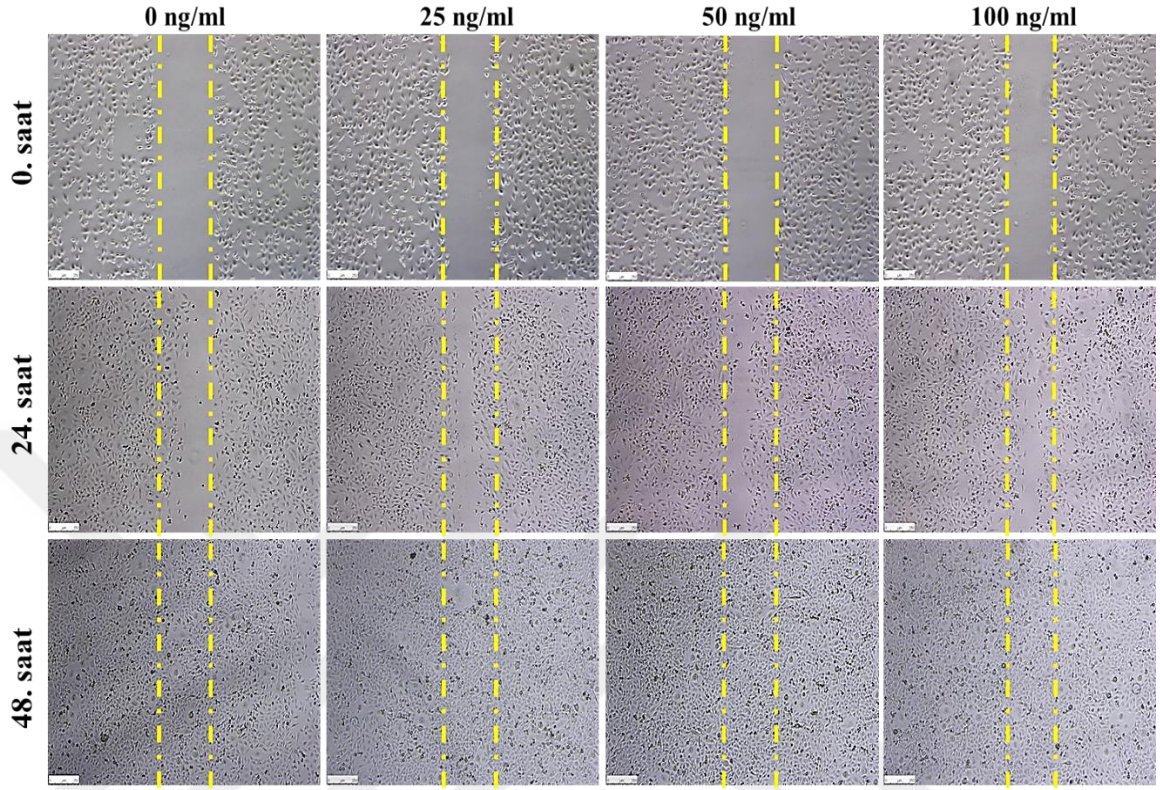
PANC1 hücrelerinde 24 saatlik MCP-1 uygulanmasının görece düşük konsantrasyonlarda EF2K ekspresyonu artışına neden olmasının ardından, düşük konsantrasyonlardaki MCP-1 peptidi uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla kolorimetrik bir canlılık testi olan MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) testi gerçekleştirildi.

Elde edilen optik dansite (OD) değerleri kullanılarak (%) hücre canlılıkları hesaplandı ve sonuçlar şekil 4.13'te verildi. PANC1 hücreleri 5, 10 ve 25 ng/ml MCP-1 peptidiyle 48 saat boyunca muamele edildiğinde hücre canlılıklarında istatistiksel olarak artışlar olduğu bulundu (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. PANC1 hücrelerine 48 saatlik MCP-1 (1,25-50 ng/ml) uygulaması sonucu hücrelerin proliferasyon özelliklerindeki değişikliklerin MTS testi ile değerlendirilmesi. 0 ng/ml MCP-1 uygulanmayan kontrol grubunu ifade etmektedir. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *MCP-1 uygulanmayan kontrol hücrelerine (0 ng/ml) kıyasla MCP-1 uygulanan grupların istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$

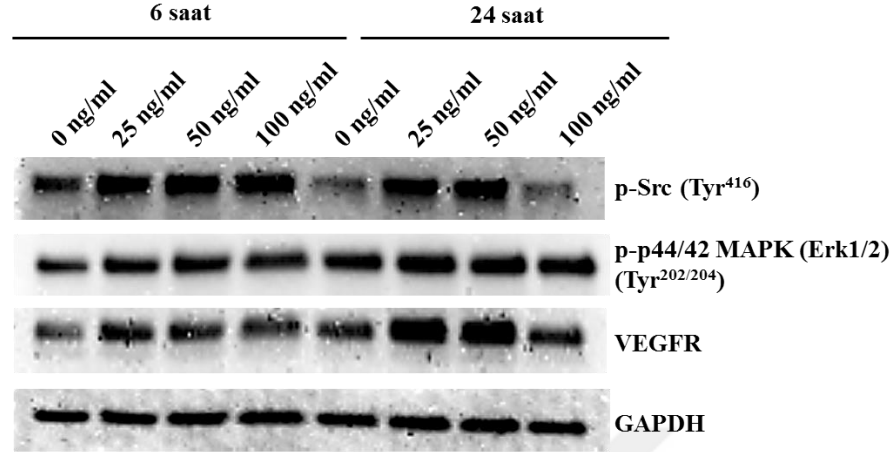
Ayrıca MCP-1 peptidi ile tedavi sonrası PANC1 hücrelerinin migrasyon yeteneklerindeki değişiklik migrasyon testi ile incelendi (Şekil 4.14). Sonuçlar değerlendirildiğinde, MCP-1 peptidi uygulanması sonrası hücrelerin migrasyon yeteneklerinde kısmi bir artış meydana geldiği görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. PANC1 üç farklı konsantrasyonda (25, 50 ve 100 ng/ml) MCP-1 uygulanmasının hücre migrasyonu üzerine etkisi. 0 ng/ml MCP-1 uygulanmayan kontrol grubunu ifade etmektedir

Ayrıca, MCP-1 uygulaması sonrası hücrelerde invazyon ve migrasyon süreçlerinde rol alan proteinlerden olan Src ve mitojenle aktifleşen protein kinaz olan MAPK proteinin fosforillenmiş formu western blot ile incelendi. Ek olarak, anjiyogenez sürecinin önemli proteinlerinden olan vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü VEGFR proteinin ekspresyon düzeyi değişiklikleri de değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 4.15'te verildi.

MCP-1 uygulanması sonrası, özellikle EF2K ekspresyonunun da arttığı 25 ve 50 ng/ml konsantrasyonlarında Src ve Erk proteinlerinin fosforile formlarının (p-Src ve p-Erk) ve VEGFR proteinin ekspresyon düzeylerinin MCP-1 uygulanmayan kontrol grubuna göre (0 ng/ml) önemli düzeyde arttığı görüldü (Şekil 4.15).

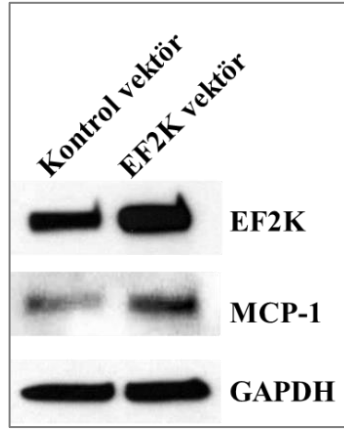


Şekil 4.15. MCP-1 uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinde migrasyon, invazyon ve anjiyogenez ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinin western blot metodu ile incelenmesi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı

4.4. EF2K Protein Overekspresyonunun MCP-1 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Bu zamana kadar elde edilen verilere göre, kültür ortamındaki makrofajların varlığının PANC1 hücrelerinde EF2K ekspresyon artışına ve besiyerinde salınmış MCP-1 protein artışına sebep olduğu görüldü. Ardından, hücrelerdeki EF2K artışına MCP-1 proteininin yol açıp açmadığını incelemek amacıyla hücreler MCP-1 proteini ile muamele edildi ve EF2K ekspresyonunda artış bulundu. Dolayısıyla tümör mikroçevresinin önemli proteinlerinden biri olan MCP-1 proteininin hücrelerde EF2K ekspresyonunu arttırarak hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu arttırdığı bulundu.

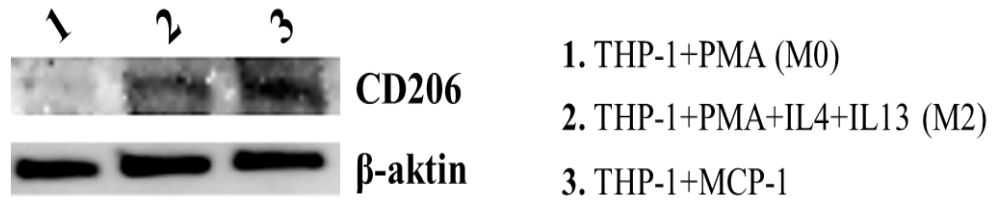
Bu verilere dayanarak, artan EF2K ekspresyonunun da MCP-1 proteininin artışına sebep olup olmadığını incelemek amacıyla PANC1 hücrelerinde EF2K proteini lentiviral olarak overeksprese edildi ve MCP-1 düzeyi western blot metodu ile analiz edildi (Şekil 4.16). Sonuç olarak, hücrelerde EF2K overeksprese edildiğinde hücresel MCP-1 düzeyinin de arttığı görüldü. Dolayısıyla EF2K ve MCP-1 arasında çift yönlü bir etkileşim olduğu görüldü.



Şekil 4.16. EF2K overeksprese edilen PANC1 hücrelerinde MCP-1 protein ekspresyon düzeyinin western blot ile incelenmesi. Herhangi bir proteini hedeflemeyen vektör çalışmanın kontrolü olarak kullanıldı (Kontrol vektör). GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4.5. MCP-1 Proteinin THP-1 Makrofajları Üzerine Etkisi

Literatür bilgilerine göre MCP-1 proteininin tümör mikroçevresinde kemoatraktan rol oynayarak monositleri tümöre çektiği ve pro-tümörijenik makrofajlara farklılaşmasında rol aldığı bilinmektedir. Bu bilgiye dayanarak, ortamdaki MCP-1 varlığının THP-1 hücrelerinin farklılaşması üzerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla THP-1 hücreleri 50 ng/ml konsantrasyonundaki MCP-1 ile 48 saat boyunca muamele edildi ve pro-tümörijenik makrofaj markırı olan CD206 protein ekspresyonu western blot ile incelendi (Şekil 4.17).



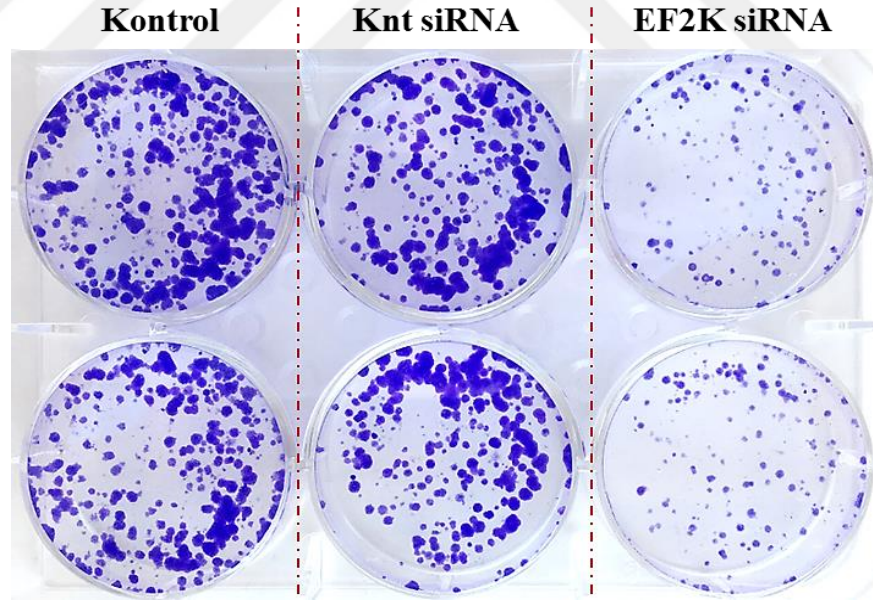
Şekil 4.17. THP-1 hücrelerinin PMA, PMA+IL4+IL13 ve MCP-1 ile muamelesi sonrası pro-tümörijenik makrofaj markırı olan CD206 ekspresyonunun western blot ile belirlenmesi. Beta aktin (β -aktin) yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4.6. Pankreatik Kanser Hücrelerinin ve Makrofajların EF2K İnhibisyonu ile Hedeflenmesi

4.6.1. EF2K inhibisyonunun hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkisi

EF2K enziminin hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla koloni oluşturma testi (koloni formasyon testi) gerçekleştirildi. Bu amaçla PANC1 hücreleri 6 kuyucuklu pleytlere ekildikten sonra 50 nM konsantrasyonda EF2K siRNA'sı ile transfekte edildi.

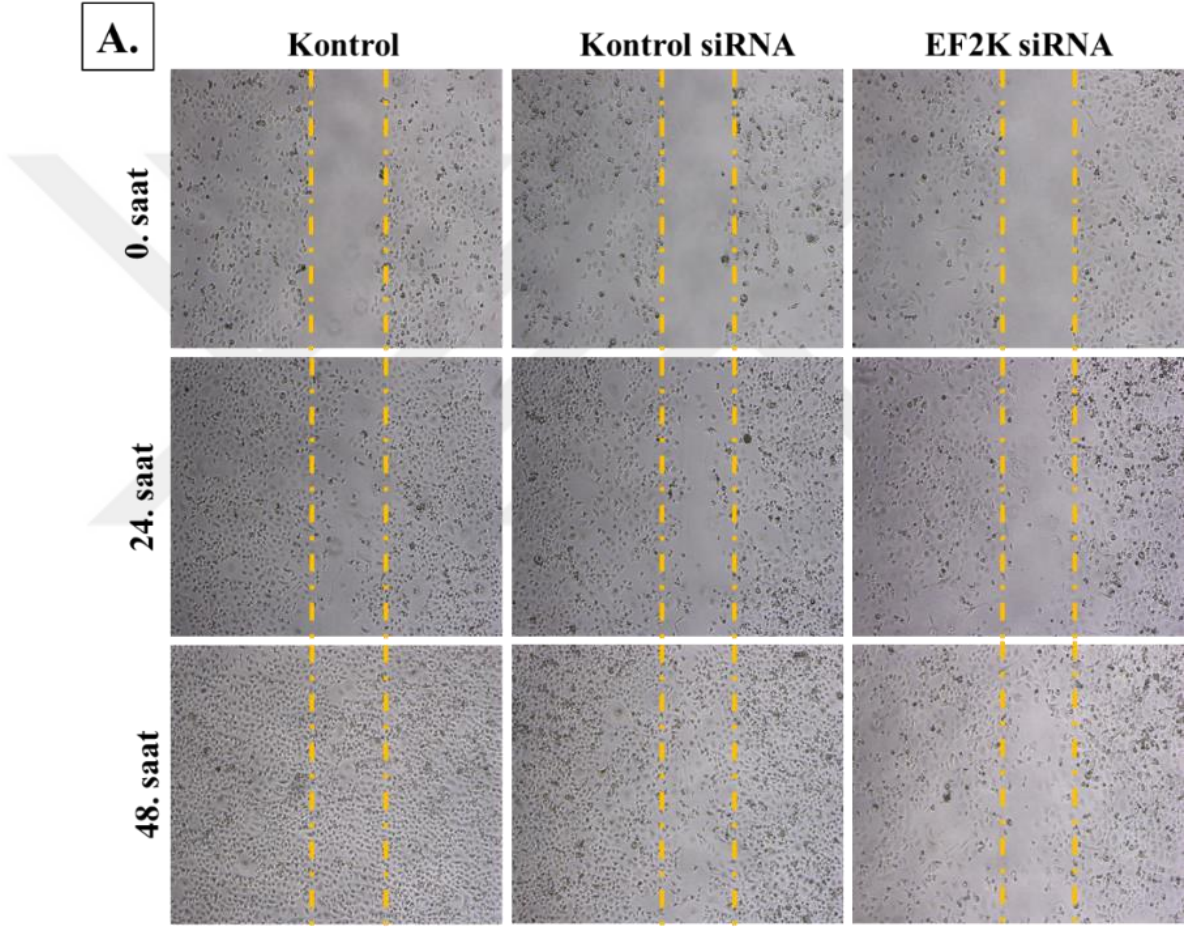
Kontrol olarak tedavi uygulanmayan grup ve herhangi bir mRNA'yı hedeflemeyen bir kontrol siRNA'sı kullanıldı. 14 gün inkübasyon sonrası koloniler boyandı ve fotoğraflandı. Sonuçlar Şekil 4.18'de verildi. EF2K inhibisyonu sonrası PANC1 hücrelerinin koloni oluşturabilme yeteneklerinin önemli düzeyde baskılandığı gözlemlendi.



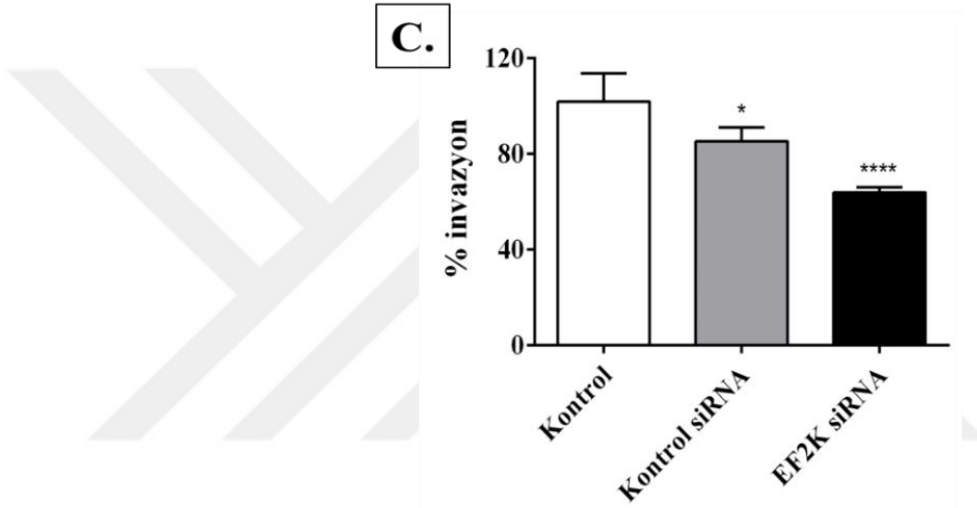
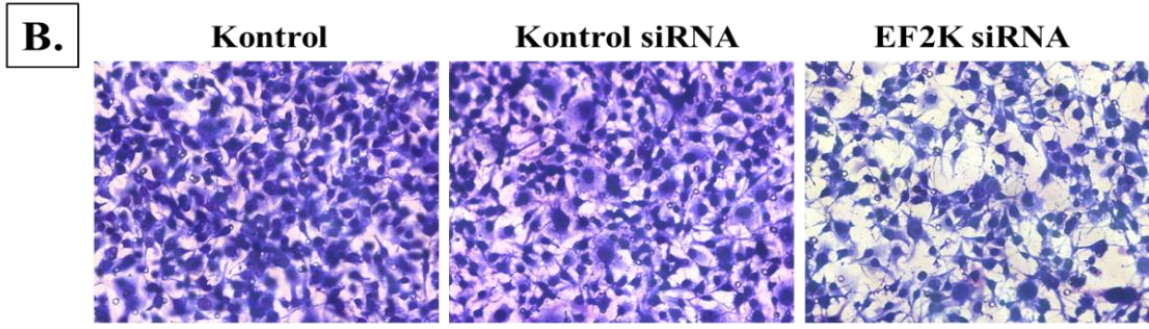
Şekil 4.18. EF2K siRNA uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü. Kullanılan fotoğraflar en az üç bağımsız çalışmayı temsil etmektedir. Kontrol; tedavi uygulanmamış grup, Knt siRNA; kontrol siRNA

4.6.2. EF2K inhibisyonunun hücrelerin metastatik yetenekleri üzerine etkisi

EF2K inhibisyonunun metastatik sürece olan etkisini değerlendirmek amacıyla migrasyon ve invazyon testleri gerçekleştirildi (Şekil 4.19). Sonuçlar değerlendirildiğinde, EF2K inhibisyonunun hücre migrasyonu ve invazyonunda azalmaya yol açtığı görüldü (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. EF2K siRNA uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinin migrasyon (A) yeteneklerinin incelenmesi

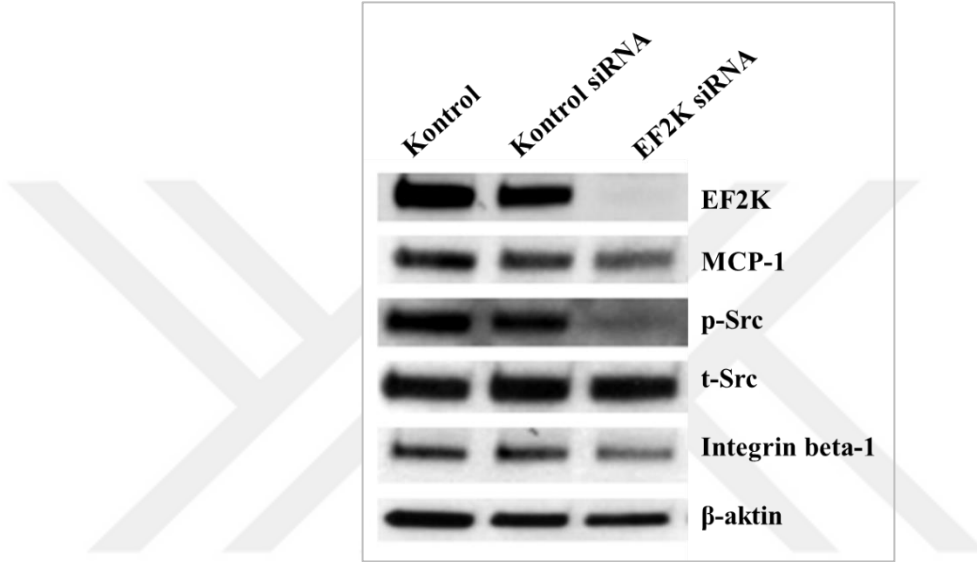


Şekil 4.19. EF2K siRNA uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinin invazyon (B ve C) yeteneklerinin incelenmesi. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *siRNA uygulanmayan kontrol hücrelerine kıyasla siRNA uygulanan grupların istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$

4.6.3. EF2K inhibisyonunun protein ifadelerine etkisi

EF2K inhibisyonunun MCP-1 protein ekspresyonu üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla western blot analizi gerçekleştirildi. PANC1 hücreleri 100 nM konsantrasyonda EF2K siRNA'sı ile 48 saat inkübe edildikten sonra MCP-1 ekspresyonundaki değişimler western blot ile incelendi ve sonuçlar şekil 4.19'da verildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, EF2K inhibisyonunun PANC1 hücrelerinde MCP-1 protein ekspresyonunda azalmaya neden olduğu görüldü (Şekil 4.20).

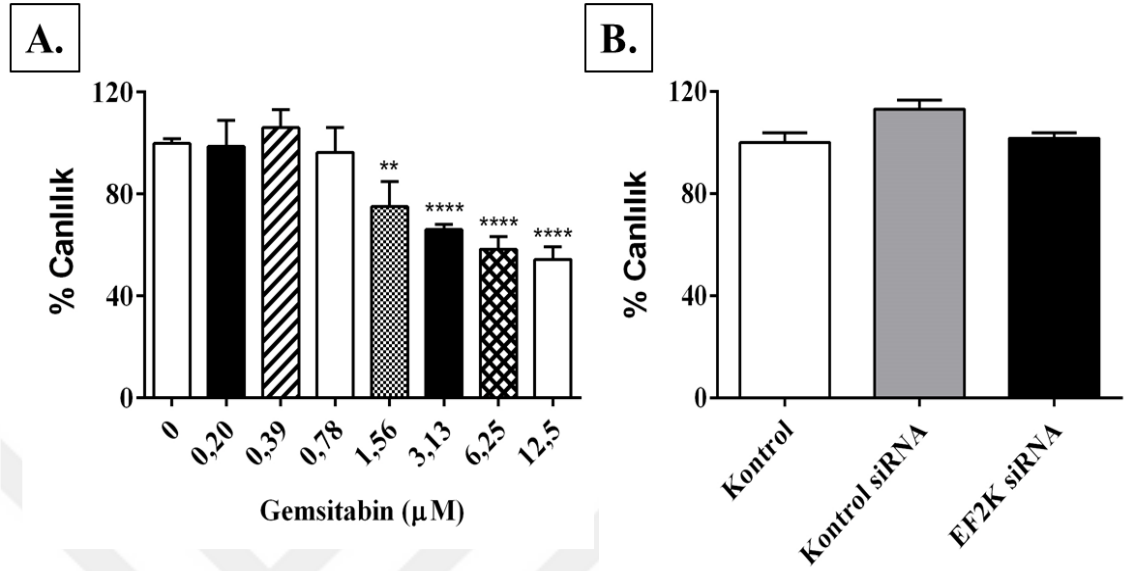
MCP-1 proteini varlığında ekspresyonunda artış bulunan p-Src proteinin de EF2K inhibisyonu ile azaldığı bulundu. Ayrıca invazyon sürecinde rol alan proteinlerden olan integrin beta protein ekspresyonunda da EF2K inhibisyonu ile azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. EF2K siRNA uygulaması sonrası PANC1 hücrelerindeki protein ekspresyon değişimlerinin western blot metodu ile belirlenmesi

4.6.4. EF2K inhibisyonunun kemoterapi yanıtına etkisinin incelenmesi

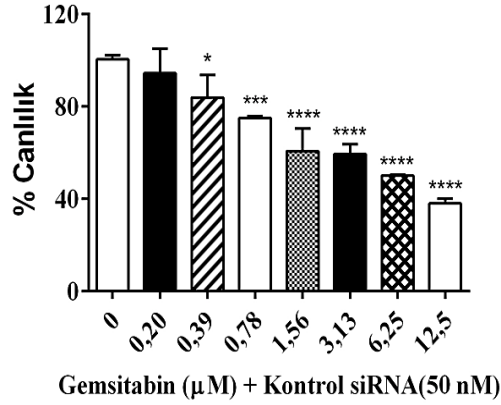
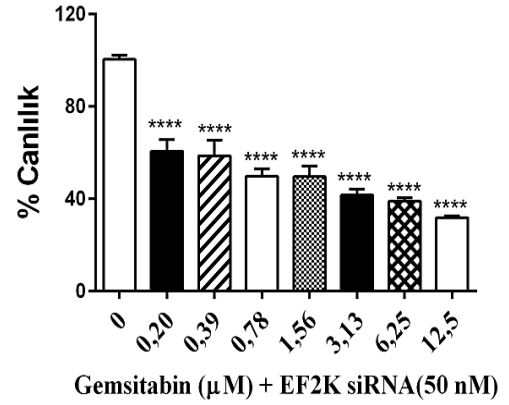
En düşük sağ kalım oranına sahip pankreatik kanserin tedavisinde en yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajan gemsitabindir. Ancak hastaların büyük çoğunluğunda bir süre sonra gelişen ilaca direnç nedeniyle hedeflenen etkin tedavi sağlanamamaktadır. Bu nedenle, gemsitabinin etkinliğini arttırmak amacıyla EF2K siRNA'sı ile kombine olarak kullanıldı ve siRNA kullanımının hücrelerin gemsitabine olan yanıtını değiştirip değiştirmediği MTS canlılık testi ile değerlendirildi. Öncelikle hücrelerde tek başına gemsitabin ve siRNA (kontrol ve EF2K siRNA) kullanımlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi (Şekil 4.21). Tek başına EF2K siRNA kullanımının hücre canlılığında azalmaya neden olmazken (Şekil 4.21A), görece yüksek dozlardaki (3,13-12,5 µM) gemsitabinin hücre canlılığında yaklaşık %50'lik bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (4.21B).



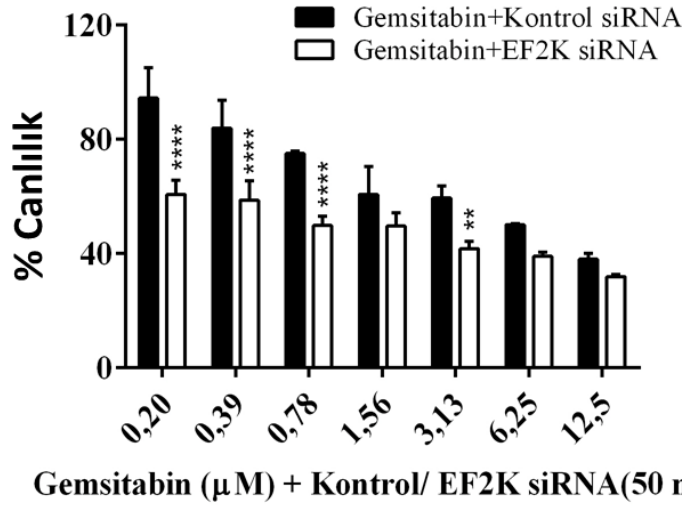
Şekil 4.21. PANC1 hücrelerinin 7 farklı doz gemsitabin (0,20-12,5 µM) ile 96 saat boyunca muamelesi sonrası (%) hücre canlılığı grafiği (A). Hücrelerin 50 nM konsantrasyondaki kontrol siRNA'sı ve EF2K siRNA'sı ile transfeksiyonu sonrası hücre canlılığı grafiği (B). Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *Gemcitabin uygulanmayan kontrol hücrelerine (0 µM) kıyasla MCP-1 uygulanan grupların istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$

Ardından, gemsitabinin her bir dozu ile (0,20-12,5 µM) ile 50 nM konsantrasyondaki kontrol siRNA'sı ve EF2K siRNA'sı ayrı ayrı kombine edildi. Bu amaçla, hücreler ekildikten 1 gün sonra kontrol veya EF2K siRNA'sı ile 24 saat transfeksiyon yapıldı. 24 saatin sonunda belirtilen dozlardaki gemsitabinler ile tedavi uygulandı ve hücreler 72 saat boyunca inkübe edildikten sonra MTS testi gerçekleştirildi. MTS testi sonucunda elde edilen O.D değerleri ile çizilen % canlılık grafikleri Şekil 4.22'de verildi.

Grafikte görüldüğü üzere, gemsitabin kontrol siRNA'sı ile kombine kullanımına kıyasla, EF2K siRNA'sı ile birlikte kullanıldığında özellikle düşük dozlarda hücre canlılığında azalmaya neden oldu. Ardından, Şekil 4.21A ve B'de verilen grafikler birlikte oluşturuldu ve EF2K siRNA'sı kullanımıyla hücre canlılığında meydana gelen azalmalar tek bir grafikte gösterildi (Şekil 4.23). EF2K siRNA'sı özellikle düşük doz gemsitabin ile kombine edildiğinde (0,20-0,78) hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar bulundu

A.**B.**

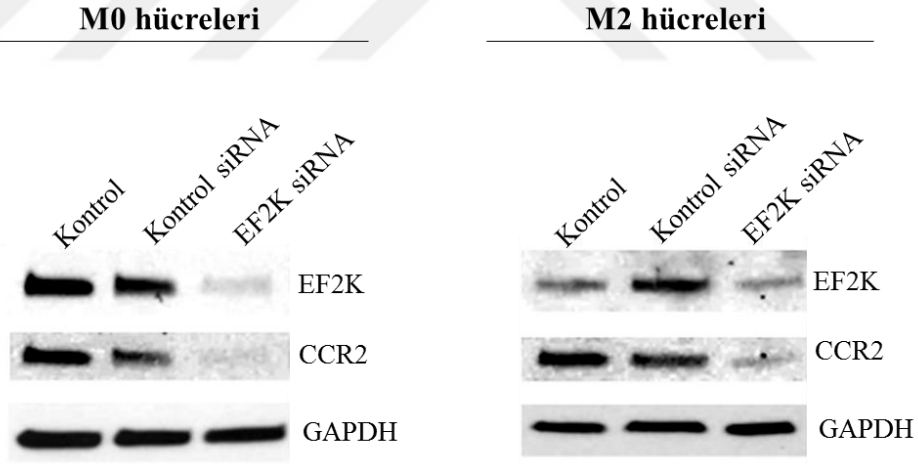
Şekil 4.22. PANC1 hücrelerinin 7 farklı doz gemsitabin (0,20-12,5 µM) ile kombine olarak kontrol siRNA'sı (A) ve EF2K siRNA'sı (B) ile 96 saat boyunca muamelesi sonrası (%) hücre canlılığı grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *Gemcitabin uygulanmayan kontrol hücrelerine (0 µM) kıyasla MCP-1 uygulanan grupların istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$



Şekil 4.23. PANC1 hücrelerinin kontrol siRNA / EF2K siRNA'sı ile 24 saat transfeksiyonunun ardından gemsitabine 72 saat maruziyeti sonrası oluşturulan (%) hücre canlılığı grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık için iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ile Sidak çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanıldı. *Gemcitabin+kontrol siRNA ile tedavi edilen gruplara kıyasla gemcitabin+EF2K siRNA'sı uygulanan grupların istatistiksel anlamlılığını temsil etmektedir. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$

4.6.5. EF2K enzimi inhibisyonunun M0 ve M2 makrofajlar üzerinde incelenmesi

Tümör mikroçevresinde yer alan monosit ve makrofajların MCP-1 proteininin reseptörü olan CCR2 reseptörünü tümör hücrelerine kıyasla oldukça yüksek oranda eksprese ettikleri bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmada bu hücrelerde MCP-1/CCR2 sinyal yolağınının EF2K inhibisyonu ile hedeflenmesi amaçlandı. Bu amaçla monositik THP-1 hücreleri M0 ve M2 tip makrofajlara farklılaştırıldıktan sonra 100 nM konsantrasyondaki kontrol siRNA'sı ve EF2K siRNA'sı ile transfekte edildi. 48 saatin sonunda EF2K ve CCR2 protein ekspresyonları western blot ile incelendi (Şekil 4.24). THP-1 hücreleri kültür ortamında süspanse olarak büyüdüğünden, bu hücrelerin transfekte edilmesi oldukça zorlu ve transfeksiyon verimi oldukça düşük olduğundan bu hücreler bu deney kapsamında kullanılmadı. Şekil 4.24 incelendiğinde, her iki hücre grubunda da EF2K inhibisyonunun CCR2 protein ekspresyonunu tamamen ortadan kaldırdığı görüldü (Şekil 4.24). Sonuç olarak EF2K inhibisyonunun MCP-1/CCR2 sinyal yolağını baskıladığı görüldü.

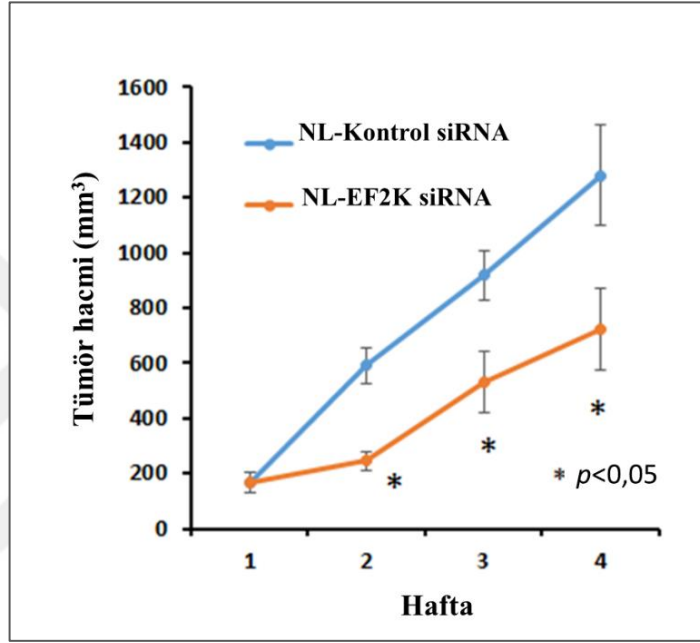


Şekil 4.24. M0 ve M2 tip makrofajların 100 nM konsantrasyonundaki EF2K siRNA'sı ile 48 saat muamelesi sonrası EF2K ve CCR2 protein ekspresyonlarının western blot ile incelenmesi. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4.7. EF2K Enzim İnhibisyonunun *in vivo* Etkilerinin İncelenmesi

EF2K inhibisyonunun PANC1 hücreleri üzerindeki etkilerinden sonra *in vivo* etkileri değerlendirmek amacıyla ortotopik zenograft tümör modeli ile *in vivo* deneyler gerçekleştirildi.

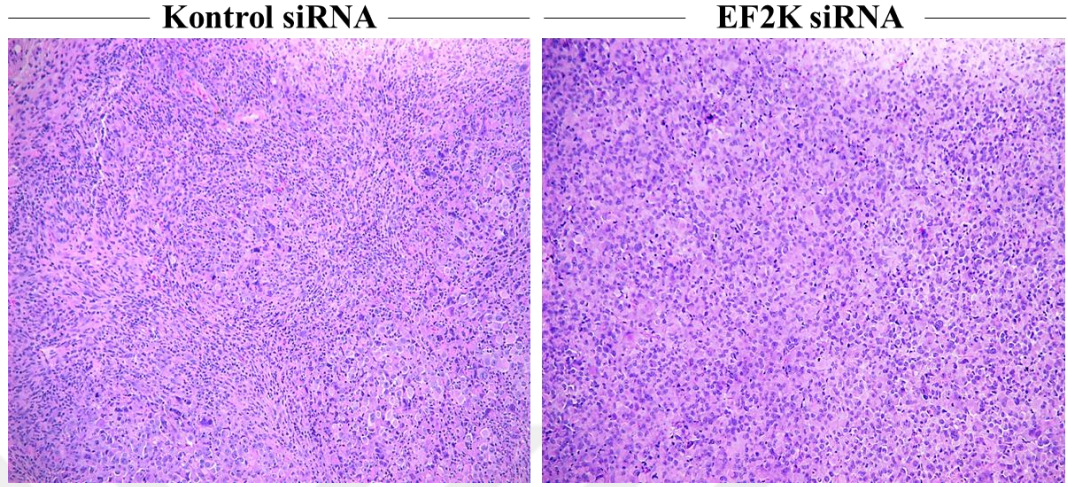
Kontrol ya da EF2K siRNA'sı ile 4 hafta tedavi sonrası tümörler çıkarıldı ve tümör hacimleri hesaplanarak Şekil 4.25'te verildi. Grafikte görüldüğü üzere, EF2K siRNA uygulaması tümör hacminde kontrol siRNA'sına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden oldu (Şekil 4.25).



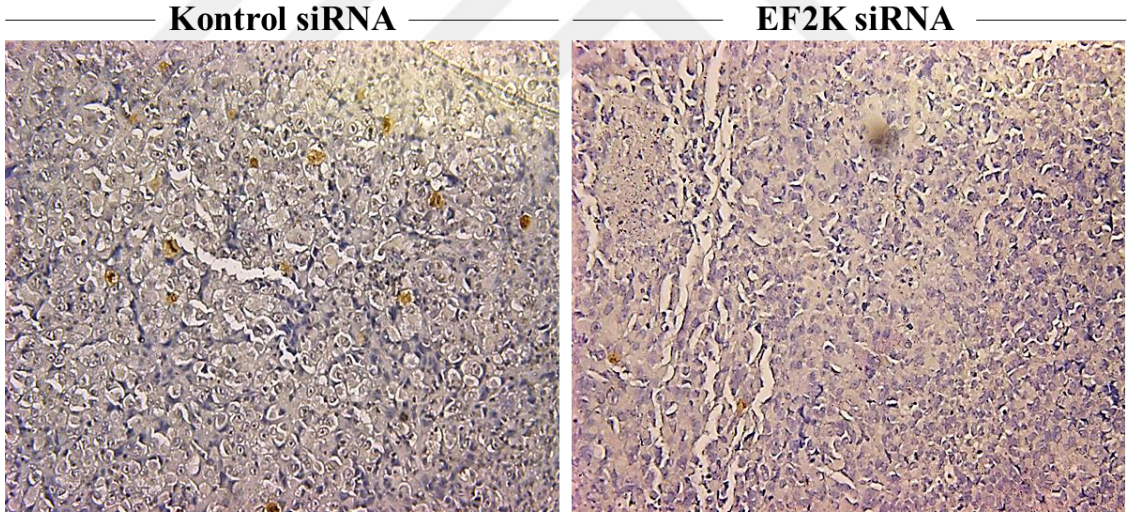
Şekil 4.25. Atimik dişi nude farelere PANC1 hücreleri enjeksiyonu sonrası kontrol ve EF2K siRNA'ları ile 4 hafta boyunca tedavi sonucu tümör hacimleri. siRNA'lar in vivo uygulama için DOPC nanolipozomal partiküller içerisinde hazırlanarak uygulandı. NL: Nanolipozomal

Çıkarılan tümör dokularından immünohistokimyasal analizler için kesitler alındı ve bu kesitler hematoxilen & eozin ile boyanarak dokuların tümör dokusu oldukları doğrulandı (Şekil 4.26).

Ardından, hücre proliferasyonunda azalma olup olmadığını göstermek amacıyla Ki-67 boyaması yapıldı ve sonuçlar şekil 4.27'de verildi. Kontrol siRNA uygulanan gruptaki kahverengi noktalar proliferasyon olan hücrelerin varlığını gösterirken, EF2K siRNA'sı uygulaması sonrası bu hücrelerin sayısının büyük oranda azaldığı görüldü (Şekil 4.27).



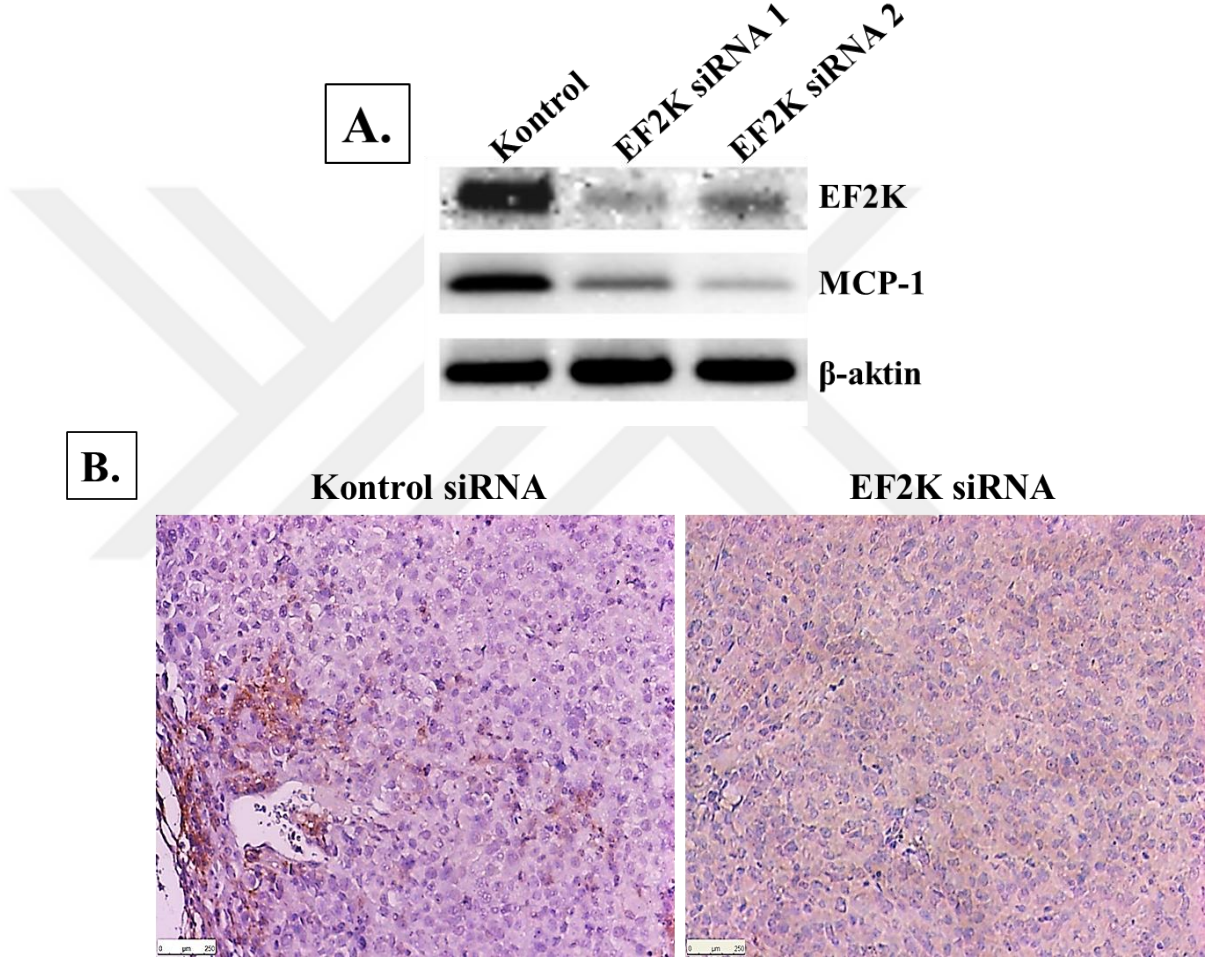
Şekil 4.26. Kontrol siRNA ve EF2K siRNA'sı uygulanan tümör dokularının hematoksilen & eozin ile boyama görüntüleri. Fotoğraflar 4X büyütme ile çekildi



Şekil 4.27. Kontrol siRNA ve EF2K siRNA'sı uygulanan tümör dokularının Ki-67 ile boyama görüntüleri. Fotoğraflar 10X büyütme ile çekildi

EF2K uygulaması sonrası PANC1 hücrelerinde MCP-1 inhibisyonunu gösteren *in vitro* veriler, tümör dokularıyla çalışılan western blot analizi ile doğrulandı (Şekil 4.28A). *In vivo* olarak uygulanan EF2K siRNA'sının büyük oranda MCP-1 inhibisyonuna neden olduğu görüldü (Şekil 4.28A).

Ayrıca kontrol ve EF2K siRNA'sı uygulaması sonrası doku kesitleri M2 tip makrofaj infiltrasyonu için F4/80 antikorunu ile boyanarak immünohistokimyasal olarak analiz edildi (Şekil 4.28B). Şekilde görüldüğü üzere, EF2K siRNA uygulaması sonrası tümöre infiltre olan M2 tip makrofaj sayısında azalma olduğu izlendi (Şekil 4.28B).



Şekil 4.28. Kontrol siRNA ve EF2K siRNA'sı uygulanan tümör dokularında EF2K ve MCP-1 protein ekspresyonlarının western blot ile incelenmesi (A). Doku kesitlerinin M2 tip makrofaj infiltrasyonu markırı olan F4/80 antikorunu ile boyanması (B). Fotoğraflar 10X büyütme ile çekildi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %5 olan pankreas kanseri oldukça agresif bir malignansi olup, tüm kanserler arasında en öldürücü olanlardan biridir (Crane ve ark. 2004, Long ve ark., 2011). Tanı konduktan sonra ortalama yaşam süresi mevcut tedavi yöntemleriyle yaklaşık 6 aydır. Dolayısıyla pankreas kanserinin şu anda etkin bir tedavisi yoktur. Geleneksel olarak pankreatik kanser tedavi yöntemleri kanser hücrelerine karşıdır ve hastaların ortalama 6 aylık yaşama süresinden de anlaşılacağı gibi bu yöntemlerin başarılı olmadığı açıktır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, yalnızca karsinoma hücrelerinin değil, tümör mikroçevresinin de tedavideki başarısızlığa aracılık ettiği ortaya konmuştur (Fujita ve ark. 2010, Miyamoto ve ark. 2004). Bu nedenle son yıllarda tümör hücrelerinin yanı sıra tümör mikroçevresininin de (stromal hücrelerin) de hedeflenmesinin başarılı olacağı düşünülmekte ve bu konuda çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Pankreas kanseri fibroblastlar, miyofibroblastlar, pankreatik kanser hücreleri, immün hücreler gibi hücreler ve ekstraselüler matriks, sitokinler, büyüme faktörleri gibi hücreler olmayan komponentlerden oluşan oldukça heterojen bir kanser türüdür (Feig ve ark. 2012). İmmün sistem tümörün terapiye yanıtını düzenleyen kompleks mekanizmalarda rol alan esansiyel oyuncularından biridir. Yüksek düzeyde plastisite ve multifonksiyonel özelliklerinden dolayı “tümörle ilişkili makrofajlar (Tumor Associated Macrophages, TAM) pankreatik tümörün tedaviye duyarlılık ya da direncini düzenleyen en önemli hücre gruplarından (Belgiovine ve ark. 2016). Terapi direncine ek olarak bu hücreler solid tümör gelişimi ve metastazı süreçlerine de aktif olarak katkı sağlamaktadır (Pollard 2004). Bu nedenle pankreatik kansere karşı efektif bir tedavi rejimi geliştirebilmek için pankreatik kanserin gelişiminden ve terapi direncinden sorumlu olan immün ve inflamatuvar yanıtları da hedefleyen tedavi stratejileri geliştirilmelidir.

Ökaryotik elongasyon faktörü 2 kinaz (EF2K) enzimi kanser sürecinde proliferasyon, kanser hücrelerinin hayatta kalması, tümörijenizasyon, invazyon, hastalığın ilerlemesi ve ilaç direncinden sorumlu bir enzimdir (Tekedereli ve ark. 2012, Hamurcu ve ark. 2016). EF2K enziminin

görevi, substratı olan EF2'yi fosforilleyerek protein sentezi sürecinde peptid zincirinin uzamasını yavaşlatmaktır (Jorgensen ve ark. 2006). Bu şekilde kanser hücrelerinin ekstrem koşullarda bile hayatta kalmasına olanak sağlayan EF2K enziminin pek çok kanser türünde upregüle olduğunu ve hızlı proliferasyon yapan malign hücrelerde aktivitesinin arttığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Bagaglio ve Hait 1994, Nilsson ve Nygard 1995, Parmer ve ark. 1999, Knebel ve ark. 2002). Yapılan çalışmalar EF2K enziminin kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini ifade etmektedir (Hait ve ark. 2006, Tekedereli ve ark. 2012). Ancak literatürde EF2K protein ekspresyonu ve tümör mikroçevresi arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada, tümör mikroçevresinin önemli hücre gruplarından biri olan makrofajlar ile pankreatik kanser hücreleri arasındaki etkileşimin hem kanser hücreleri hem de makrofajlar üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmada, her iki hücre grubunu da hedeflemeye olanak sağlayacak ortak bir hedef bulunarak pankreatik kanser tedavisi için standart tedavilere ek umut verici bir yaklaşım elde edilmesi planlandı.

Çalışmada ilk olarak, kullanılan pankreatik kanser hücre hatları (PANC1 ve MiaPaCa-2), pankreatik stellat hücreleri (PSC) ve normal pankreatik duktal epitelyal hücrelerinde (HPDE) bazal EF2K protein ekspresyon düzeyi western blot ile incelendi. Daha önce yapılan bir çalışmada, meme kanseri hastalarına ait dokularda yüksek EF2K aktivitesi görülürken, normal dokularda EF2K aktivitesinin bulunmadığı gösterilmiştir (Chafouleas ve ark. 1981). Literatür bilgileriyle uyumlu olarak, bu çalışmada HPDE hücrelerinde hiç EF2K ekspresyonu görülmezken, PANC1, MiaPaCa-2 ve PSC hücrelerinde yüksek EF2K ekspresyonu görüldü (Şekil 3.2).

Ardından, monositik THP-1 hücreleri ve bu hücrelerden polarize edilen M0 ve M2 tip makrofajlar ile PANC1, MiaPaCa-2 ve PSC hücreleri arasındaki indirekt etkileşimin EF2K ekspresyonu üzerine bir etkisi olup olmadığını araştırmak için PANC1, MiaPaCa-2 ve PSC hücreleri THP-1, M0 ve M2 hücreleri ile birlikte kültüre edildi. Daha sonra THP-1, M0 ve M2 hücreleriyle kokültür yapılan PANC1, MiaPaCa-2 ve PSC hücreleri ile western blot analizi yapıldı. Sonuç olarak PANC1 ve PSC hücreleri M0 ve M2 tip makrofajlar ile kültüre

edildiğinde hücreler arası etkileşim sonucu EF2K ekspresyon düzeylerinde ciddi artış olduğu bulundu (Şekil 3.3).

Son yıllarda yapılan pek çok çalışma kültür ortamında tümör hücreleri ile makrofajların kokültürü sonrası tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonunun arttırdığını ifade etmektedir (Tjiu ve ark. 2008, Bohrer ve Schwertfeger 2012, Zhang ve ark. 2012, Shen ve ark. 2013, Dehai ve ark. 2014, Chan ve ark. 2017). Bu çalışmada da literatür bilgilerini destekler şekilde PANC1 pankreatik kanser hücreleri THP-1 hücrelerinden polarize edilen M0 ve M2 tip makrofajlarla birlikte kültüre edildiğinde hücre migrasyonu ve invazyonunun arttığı görülmüştür (Şekil 3.4). Ayrıca makrofajların kültür ortamında varlığı ile PANC1 hücrelerinin epitelial morfolojisinin mezenşimal morfolojiye dönüştüğü ve mezenşimal dönüşümün markırlarından olan Snail protein ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Şekil 3.4). Literatürde de bu bulguyu destekleyen çok sayıda çalışma mevcuttur (Goswami ve ark. 2005, Bonde ve ark. 2012, Fu ve ark. 2014, Johansson ve ark. 2015, Ma ve ark. 2016).

Tümör hücreleri ve stromal hücreler arasındaki intraselüler ve interselüler iletişim hücre-hücre etkileşimi, büyüme faktörleri, kemokinler ve proteazları içeren parakrin mekanizmalar ve ekstraselüler veziküller ile sağlanmaktadır (Andaloussi ve ark. 2013). Küçük ekstraselüler veziküler cisimcikler olarak tanımlanan “eksozomlar” tümör mikroçevresinin en önemli bileşenlerinden biridir (Wang ve ark. 2016). Eksozomlar alıcı hücrenin aktivitesini modüle etmek amacıyla çeşitli onkojenik proteinleri ve nükleik asitleri transfer ederler ve bu yolla tümör büyümesi, gelişimi, metastazı ve ilaç direncinde önemli rol oynarlar (Zhang ve ark. 2015). Bu bilgilerin ışığında, bu çalışmada, PANC1 hücrelerinin THP-1, M0 ve M2 hücreleri ile kokültürü sonrası EF2K ekspresyonundaki artışın eksozomlar kaynaklı olup olmadığı incelendi. PANC1 hücreleri THP-1 hücreleri, M0 ve M2 tip makrofajlardan izole edilen eksozomlara 48 saat süreyle maruz bırakıldığında PANC1 hücrelerinde eksozomlara maruz kalmayan kontrol grubuna kıyasla EF2K ekspresyonunda ciddi bir artış olduğu bulundu (Şekil 3.6). Daha sonra eksozomların hücre invazyonu ve migrasyonu üzerine etkileri değerlendirildi ve kokültür sonuçlarına benzer şekilde, eksozomların PANC1 hücrelerinde hücre migrasyonu ve invazyonunu arttırdığı bulundu (Şekil 3.7).

Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1/CCL2) tümör mikroçevresinde hem kanser hücreleri hem de stromal hücreler tarafından üretilen ve monositlerin tümöre çekilmesinde en önemli role sahip olan kemokinlerden biridir (Belgiovine ve ark. 2016). MCP-1(CCL2) proteininin reseptörü olan CCR2 reseptörü pek çok kanser hücresi ve stromal hücrede eksprese edilmektedir. MCP-1(CCL2) proteininin CCR2 reseptörüne bağlanmasıyla aktifleşen bu sinyal yolağı pek çok kanser türünde hücre invazyonu ve migrasyonunda önemli rol oynamaktadır (Lim ve ark. 2016). 2009 yılında prostat kanseri prelinik modellerinde yapılan bir çalışmada, MCP-1 overekspresyonunun artmış zenograft tümör büyümesi, artmış makrofaj akümüasyonu ve metastatik süreç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mizutani ve ark. 2009). Bir başka çalışmada, hepatik miyofibroblastlardan salınan MCP-1 proteininin insan hepatoselüler karsinom hücrelerinde hücre migrasyon ve invazyonuna doğrudan katkı sağladığı gösterilmiştir (Dagouassat ve ark. 2010). 2013 yılında yapılan bir diğer çalışma ise MCP-1 proteininin insan yumurtalık kanseri hücre hattında hücre invazyonunu arttırdığını göstermiştir (Furukawa ve ark. 2013).

PANC1 tümör hücreleri ile monosit ve makrofaj hücrelerinin kokültürü yapılarak tümör mikroçevresini *in vitro* olarak modellemeyi hedefleyen bu çalışmada, kokültür deneyi sonrası hücrelerin besiyeri toplandı ve makrofajların varlığında MCP-1 proteini salınımında değişim olup olmadığı ELISA testi ile incelendi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, PANC1 hücrelerinin M0 ve M2 tip makrofajlarla kültürünün, salınmış MCP-1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlara ($p \leq 0,0001$) neden olduğu bulundu (Şekil 3.8). Ayrıca kokültür sonrası PANC1 hücrelerindeki hücresel MCP-1 düzeyleri de western blot ile incelendi ve ELISA sonuçları ile uyumlu olarak M0 ve M2 tip makrofajlarla kültüre edilen PANC1 hücrelerinde MCP-1 protein ekspresyonunda artış görüldü (Şekil 3.9).

Literatür bilgilerine göre EF2K ve MCP-1 proteinlerinin hücre migrasyonu ve invazyonu süreçlerinde rol aldıkları ve böylece agresif tümör gelişimine katkı sağladıkları bilinmektedir. Ancak bu iki protein arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığına dair yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada kokültür sonrası ekspresyon düzeyleri artan EF2K ve MCP-1 proteinleri arasında bir etkileşim olup olmadığı incelendi. PANC1 hücreleri 4 farklı konsantrasyonda (25-100 ng/ml) MCP-1 ile 6 ve 24 saat

boyunca muamele edildi. 6 saat süre sonunda, sadece yüksek konsantrasyonda (100 ng/ml) EF2K protein ekspresyon düzeyinde bir artış görülürken, 24 saatlik maruziyet sonrası görece düşük konsantrasyonlar olan 25 ve 50 ng/ml konsantrasyonlarında ciddi artışlar olduğu gözlemlendi (Şekil 3.10). MCP-1 proteinin hücrelerin koloni oluşturma ve proliferasyon yetenekleri üzerine etkileri incelendiğinde, özellikle 25 ng/ml konsantrasyonunda MCP-1 uygulamasının hücrelerde koloni oluşumu ve proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p \leq 0,001$) arttırdığı görüldü (Şekil 3.12, 3.13).

MCP-1 uygulaması sonrası EF2K ekspresyonu artışını gösteren bu bulgulardan sonra, EF2K proteininin artmış ekspresyonunun MCP-1 üzerinde bir etkisi olup olmadığı, bu iki protein arasında karşılıklı olarak bir etkileşim olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla, PANC1 hücrelerinde lentiviral vektör kullanılarak EF2K proteini overeksprese edildi ve bu hücrelerde hücreSEL MCP-1 düzeyi western blot ile incelendi. Western blot sonuçlarına göre, EF2K proteinini overeksprese eden hücrelerin MCP-1 proteinini de yüksek düzeyde eksprese ettikleri, dolayısıyla bu iki protein arasında karşılıklı olarak bir etkileşim olduğu bulundu (Şekil 3.16).

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) çeşitli kemoatraktanlara yanıt olarak sirküle monositlerden farklılaşarak tümör mikroçevresinde birikirler (Lin ve Pollard 2004). MCP-1 proteini monositler için en önemli kemoatraktanlardan biridir. MCP-1/CCR2 sinyal yolağı monositlerin makrofajlara farklılaşmasını (Shields ve ark. 2007, Xia ve Sui 2009) ve normal peritoneal makrofajların da TAM özelliği kazanarak tümöre infiltrasyonunu uyarmaktadır (Loberg ve ark. 2007, Shields ve ark. 2007, Vergunst ve ark. 2008, Mizutani ve ark. 2009, Xia ve Sui 2009, Vela ve ark. 2015). İnsan meme ve özofagus kanserleri ile yapılan bir çalışmada MCP-1 düzeyleri ile makrofaj infiltrasyonu, lenf nodu metastazı ve klinik agresiflik arasında korelasyon olduğu bulunmuştur (Saji ve ark. 2001, Azenshtein ve ark. 2002).

Bu çalışmaların tersi yönünde MCP-1 proteinin anti-tümörijenik özellikte olabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Non-tümörijenik melanoma ile yapılan bir çalışma, düşük MCP-1 sekresyonunun TAM'ların fizyolojik akümülyasyonu ile tümör formasyonuna

katkı sağladığını, öte yandan yüksek MCP-1 sekresyonunun ise aşırı düzeyde makrofaj infiltrasyonuna yol açarak tümör yapısının bozulmasına yol açtığını ifade etmektedir (Nesbit ve ark. 2001). Pankreas kanseri hastalarıyla yapılan bir diğer çalışmada MCP-1 proteinin yüksek serum düzeylerinin iyi prognoz ve düşük tümör proliferasyon indeksi ile korele olduğu bulunmuştur (Monti ve ark. 2003). MCP-1 proteinin bu iki yönlü etkilerinin tümördeki M1 tipteki anti-tümörijenik makrofajlar ile M2 tipteki pro-tümörijenik makrofajlar arasındaki “makrofaj dengesi” hipotezi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Mantovani ve ark. 1992).

Literatürde tümör hücrelerinden salınan çeşitli ekstraselüler matriks bileşenlerinin ve içerisinde MCP-1 proteinin de yer aldığı kemokinlerin M2 tip pro-tümörijenik makrofaj farklılaşmasında rol aldıkları belirtilmektedir (Mantovani ve ark. 2008, Roca ve ark. 2009). Bu nedenle bu çalışmada, MCP-1 proteininin THP-1 hücrelerinde M2 tip makrofaj farklılaşmasına neden olup olmadığı araştırıldı. Sonuç olarak, THP-1 hücrelerine 48 saat boyunca 50 ng/ml konsantrasyonda uygulanan MCP-1 proteininin hücrelerde M2 tip makrofaj markırı olan CD206 protein ekspresyonuna yol açtığı bulundu (Şekil 3.17).

Elde edilen tüm bu bulgulardan sonra, EF2K siRNA’sı kullanımı ile EF2K ve MCP-1 proteinlerini birlikte hedefleyerek, hem PANC1 tümör hücrelerinin hem de makrofajların hedeflenmesi amaçlandı. PANC1 hücrelerinin 50 nM konsantrasyondaki EF2K siRNA’sıyla transfeksiyonu sonrası hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin önemli düzeyde azaldığı görüldü (Şekil 3.18). Bu sonuçlarla uyumlu olarak daha önce meme kanseri ile yapılan çalışmada da EF2K inhibisyonunun meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşumunu önemli düzeyde inhibe ettiği gösterilmiştir (Tekedereli ve ark. 2012). Ayrıca EF2K inhibisyonunun meme ve pankreatik kanser hücre hatlarında hücrelerin invazyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar (Tekedereli ve ark. 2012, Ashour ve ark. 2014a) ile uyumlu olarak, bu çalışmada da EF2K siRNA kullanımı sonrası PANC1 hücre migrasyonu ve invazyonunda azalmalar olduğu bulundu (Şekil 3.19). Ek olarak EF2K inhibisyonu ile PANC1 hücrelerinde MCP-1 protein ekspresyonu düzeyinde azalma olduğu görüldü (Şekil 3.20).

2012 yılında Tekedereli ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, EF2K siRNA'sı ile doksorubisinin kombine kullanımının *in vivo* ortotopik meme tümör modellerinde, tek başına EF2K siRNA'sı ya da doksorubisin kullanımına kıyasla, apoptozis artışı ile birlikte tümör ağırlıklarında ciddi azalmalara yol açtığı gösterilmiştir (Tekedereli ve ark. 2012). Bu çalışmada da, PANC1 hücrelerine pankreatik kanser tedavisinde ilk sırada yer alan kemoterapötik olan gemsitabin, EF2K siRNA'sı ve gemsitabin+EF2K siRNA'sı kombine olarak 96 saat boyunca uygulandı ve sonuç olarak gemsitabinin EF2K siRNA'sı ile kombine kullanımının tek başına kullanımına kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,01$ ve $p \leq 0,0001$) azalmalara yol açtığı görüldü (Şekil 3.23).

2017 yılında yapılan bir çalışma, MCP-1(CCL2)/CCR2 sinyal yolağının CCR2 siRNA'sı ile susturulması ya da CCR2 antagonisti ile inhibisyonunun hepatoselüler karsinom hastalarında malign büyümeyi ve metastazı inhibe ettiğini ve cerrahi sonrası nüksleri azaltarak sağ kalım süresini arttırdığını göstermektedir (Li ve ark. 2017). Aynı çalışmada MCP-1(CCL2)/CCR2 sinyal yolağının inhibisyonunun inflamatuvar monositlerin tümörde birikimini ve M2 polarizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Li ve ark. 2017). Bu bilgilerin ışığında, bu çalışmada EF2K inhibisyonu ile CCR2 reseptörünü inhibe ederek, bu sinyal yolağının inhibe edilmesi amaçlandı. THP-1 hücrelerinden polarize edilen M0 ve M2 tip makrofajlar EF2K siRNA'sı ile tranfekte edildiğinde CCR2 reseptör ekspresyonunun neredeyse tamamen baskılandığı bulundu (Şekil 3.24).

Tüm bu bulgulardan sonra, EF2K inhibisyonunun tümör büyümesi, tümöral MCP-1 ekspresyon düzeyi ve tümöre infiltre olan M2 tip makrofajlara olan etkisini değerlendirmek amacıyla ortotopik pankreatik tümör modeli ile *in vivo* çalışma gerçekleştirildi. Çalışma sonuçlarına göre, EF2K inhibisyonu sonrası tümör hacminde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) azalmalar olduğu bulundu (Şekil 3.25). Dokulardan alınan kesitlerle gerçekleştirilen hematoksilen ve eozin boyaması ile dokuların tümör dokusu oldukları doğrulandı (Şekil 3.26). Ardından, bir proliferasyon markırı olan Ki-67 antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapılarak, EF2K siRNA'sı ile tedavi sonrası dokulardaki proliferasyon hücrelerinin sayısındaki azalma gösterildi (Şekil 3.27).

EF2K siRNA'sı kullanımıyla PANC1 hücrelerinde MCP-1 ekspresyonunun azaldığını gösteren western blot sonuçlarını *in vivo* doğrulamak amacıyla tümör dokuları ile western blot gerçekleştirildi. Western blot sonucuna göre, EF2K siRNA'sı kullanımının MCP-1 ekspresyon düzeyinde ciddi azalmalara yol açtığı görüldü (Şekil 3.28).

Tümöre makrofaj infiltrasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Pankreatik kanser ile yapılan bir çalışmada, tümöre infiltre olan makrofaj sayısının fazlalığının hastalarda metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gardian ve ark. 2012). Bu çalışmada da, EF2K siRNA'sı ile tedavi sonrası tümöre infiltre olan M2 tip makrofajların sayısında bir değişiklik olup olmadığını göstermek amacıyla, M2 tip makrofaj markırı olan F4/80 antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Boyama sonuçları incelendiğinde, EF2K inhibisyonunun tümöre infiltre olan M2 tip makrofaj sayısında azalmalara yol açtığı bulundu (Şekil 3.28).

Bu çalışma EF2K enziminin tümör mikroçevresinin önemli hücre gruplarından olan makrofajlar ile ilişkisini gösteren ilk çalışmadır. Çalışma, makrofajlar ile PANC1 pankreatik kanser hücre hattı arasındaki etkileşimin EF2K ve MCP-1 ekspresyonunu arttırdığını ve hücre migrasyon ve invazyonunda artışa neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca EF2K ile MCP-1 proteini arasında iki yönlü bir etkileşim olduğunu ve MCP-1 proteinin monosit hücrelerinin M2 tip makrofajlara farklılaşmasına yol açtığını göstermektedir. EF2K proteininin siRNA ile susturulması *in vitro* olarak MCP-1 protein düzeyinde azalmaya yol açmakta ve hücre invazyon ve migrasyonunu inhibe etmektedir. EF2K inhibisyonu ile makrofajlarda MCP-1 proteininin reseptörü olan CCR2 proteini de inhibe edilerek bu sinyal yolağının da inhibisyonu sağlanmıştır. Ayrıca, EF2K inhibisyonu sonucu *in vivo* olarak tümör hacmi ve proliferasyonunda ve MCP-1 protein ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. Son olarak, EF2K inhibisyonu tümöre infiltre olan M2 tip makrofaj sayısında azalmalara yol açmıştır.

Tüm bu bulguların doğrultusunda, EF2K inhibisyonu ile hem tümör hücrelerini hem de makrofajları hedefleyecek bir yaklaşımın, tedavi seçenekleri oldukça sınırlı ve başarısız olan pankreas kanseri için gelecek çalışmalar adına umut verici olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramson, M.A., Jazag, A., van der Zee, J.A., Whang, E.E. 2007.** The Molecular Biology of Pancreatic Cancer. *Gastrointest. Cancer Res.*, 1: 7–12.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002.** Molecular Biology of the Cell 4th edition. Garland Science, New York, USA, 712 pp.
- Allavena, P., Mantovani, A. 2012.** Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin. Exp. Immunol.*, 167: 195–205.
- Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, WR., Polyak, K. 2004.** Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, 6(1): 17-32.
- Andaloussi, S.E., Mäger, I., Breakefield, X.O., Wood, M.J.A. 2013.** Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5): 347–357.
- Anonim, 1990.** Beir V: implications for the nuclear workforce. *Science*, 247(4943): 620-622.
- Anonim, 2015.** SEER stat fact sheets: pancreatic cancer 2015. <https://www.cancer.gov>. (Erişim tarihi: 10.2.2017).
- Anonim, 2017.** <http://www.hereditarypathology.org>. (Erişim tarihi: 11.2.2017).
- Ashour, A.A., Gurbuz, N., Alpay, S.N., Abdel-Aziz, A.A., Mansour, A.M., Huo, L., Ozpolat, B. 2014a.** Elongation factor-2 kinase regulates TG2/ β 1 integrin/Src/uPAR pathway and epithelial-mesenchymal transition mediating pancreatic cancer cells invasion. *J. Cell Mol. Med.*, 18(11): 2235-2351.
- Ashour, A.A., Abdel-Aziz, A.A., Mansour, A.M., Alpay, S.N., Huo, L., Ozpolat, B. 2014b.** Targeting elongation factor-2 kinase (eEF-2K) induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Apoptosis*, 19(1): 241-258.
- Azenshtein, E., Luboshits, G., Shina, S., Neumark, E., Shahbazian, D., Weil, M., Wigler, N., Keydar, I., Ben-Baruch, A. 2002.** The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res.*, 62: 1093–1102.
- Bagaglio, D.M., Hait, W.N. 1994.** Role of calmodulin-dependent phosphorylation of elongation factor 2 in the proliferation of rat glial cells. *Cell Growth Differ.*, 5: 1403–1408.
- Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.M., Gingras, M.C., Miller, D.K., Christ, A.N., Bruxner, T.J. 2016.** Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592): 47–52.

- Belgiovine, C., D’Incalci, M., Allavena, P., Frapolli, R. 2016.** Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cell Mol. Life Sci.*, 73: 2411–2424.
- Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., Moses, H.L. 2004.** TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*, 303(5659): 848-851.
- Blair, G.E., Cook, G.P. 2008.** Cancer and the immune system: an overview. *Oncogene*, 27: 5868.
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. 2011.** Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses, *Traffic*, 12(12): 1659–1668.
- Bochet, L., Meulle, A., Imbert, S., Salles, B., Valet, P., Muller, C. 2011.** Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411: 102–106.
- Boelens, M.C., Wu, T.J., Nabet, B.Y., Xu, B., Qiu, Y., Yoon, T., Azzam, D.J., Twyman-Saint Victor, C., Wiemann, B.Z., Ishwaran, H., Ter Brugge, P.J., Jonkers, J., Slingerland, J., Minn, A.J. 2014.** Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell*, 159: 499–513.
- Bohrer, L.R., Schwertfeger, K.L. 2012.** Macrophages Promote Fibroblast Growth Factor Receptor-Driven Tumor Cell Migration and Invasion in a Cxcr2-Dependent Manner. *Mol. Cancer Res.*, 10(10): 1294-1305.
- Bonde, A.K., Tischler, V., Kumar, S., Soltermann, A., Schwendener, R.A. 2012.** Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer*, 12: 35.
- Brittan, M., Hunt, T., Jeffery, R., Poulsom, R., Forbes, S. J., Hodivala-Dilke, K., Goldman, J., Alison, M.R., Wright, N.A. 2002.** Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut*, 50: 752-757.
- Browne, G.J., Finn, S.G., Proud, C.G. 2004.** Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J. Biol. Chem.*, 279: 12220–12231.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R. 2002.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296: 550–553.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J. 2003.** Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.*, 348(17):1625-1638.
- Calon, A., Tauriello, D.V, Batlle, E. 2014.** TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.*, 25:15-22.

- Cao, Y. 2005.** Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat. Rev. Cancer.*, 5(9): 735-743.
- Chafouleas, J.G., Pardue, R.L., Brinkley, B.R., Dedman, J.R., Means, A.R. 1981.** Regulation of intracellular levels of calmodulin and tubulin in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 996–1000.
- Chan, R.W., Lee, C.L., Ng, E.H., Yeung, W.S. 2017.** Co-culture with macrophages enhances the clonogenic and invasion activity of endometriotic stromal cells. *Cell Prolif.*, 2017 Jan 10. doi: 10.1111/cpr.12330.
- Chang, D.K., Merrett, N.D., Biankin, A.V. 2008.** NSW Pancreatic Cancer Network. Improving outcomes for operable pancreatic cancer: is access to safer surgery the problem? *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 7(1): 1036-1345.
- Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., Sun, Y. 2015.** New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.*, 13: 45.
- Cheng, Y., Li, H., Ren, X., Niu, T., Hait, W.N., Yang J. 2010.** Cytoprotective effect of the elongation factor-2 kinase-mediated autophagy in breast cancer cells subjected to growth factor inhibition. *PLoS One*, 5: e9715.
- Cheng, Y., Ren, X., Zhang, Y., Patel, R., Sharma, A., Wu, H., Robertson, G.P., Yan, L., Rubin, E., Yang, J.M. 2011.** eEF-2 kinase dictates cross-talk between autophagy and apoptosis induced by Akt Inhibition, thereby modulating cytotoxicity of novel Akt inhibitor MK-2206. *Cancer Research*, 71: 2654–2663.
- Chow, M.T., Luster, A.D. 2014.** Chemokines in cancer. *Cancer Immunol. Res.*, 2(12): 1125-1131.
- Cirri, P., Chiarugi, P. 2011.** Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am. J. Cancer Res.*, 1: 482–497.
- Clayton, A. 2012.** Cancer cells use exosomes as tools to manipulate immunity and the microenvironment, *Oncoimmunology*, 1(1): 78–80.
- Cocucci, E., Racchetti, G., Meldolesi, J. 2009.** Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.*, 19: 43–51.
- Coussens, L.M., Zitvogel, L., Palucka, A.K. 2013.** Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, 339: 286–291.
- Cox, A.D., Fesik, S.W., Kimmelman, A.C., Luo, J., Der, C.J. 2014.** Drugging the undruggable RAS: mission possible? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 13(11): 828–851.
- Crane, C., H, Ben-Josef, E., Small, W. Jr. 2004.** Chemotherapy for pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350: 2713–2715.

- Dagouassat, M., Suffee, N., Hlawaty, H., Haddad, O., Charni, F., Laguillier, C., Vassy, R., Martin, L., Schischmanoff, P.O., Gattegno, L., Oudar O, Sutton, A., Charnaux, N. 2010.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int. J. Cancer*, 126(5): 1095-1108.
- Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C.K., Roy, S. 2015.** Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am. J. Pathol.*, 185: 2596-2606.
- de Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M. 2006.** Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer*, 6: 24–37.
- De Wever, O., Mareel, M. 2003.** Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.*, 200(4): 429-447.
- Dehai, C., Bo, P., Qiang, T., Lihua, S., Fang, L., Shi, J., Jingyan, C., Yan, Y., Guangbin, W., Zhenjun, Y. 2014.** Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6. *Immunol. Lett.*, 160(1): 1-10.
- DeNardo, D.G., Brennan, D.J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S.L., Madden, S.F., Gallagher, W.M., Wadhwani, N., Keil, S.D., Junaid, S.A., Hoopes, S., Rugo, H.S., Hwang, E.S., Jirström, K., Brian L. West, B.L., Coussens, L.M. 2011.** Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.*, 1: 54–67.
- Derlindati, E., Dei Cas, A., Montanini, B., Spigoni, V., Curella, V., Aldigeri, R., Ardigò, D., Zavaroni, I., Bonadonna, R.C. 2015.** Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? *PLoS One*, 10: e0119751.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E. 2009.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.*, 29(6): 313-326.
- Desmoulière, A., Guyot, C., Gabbiani, G. 2004.** The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int. J. Dev. Biol.*, 48:509- 517.
- Diggle, T.A., Subkhankulova, T., Lilley, K.S., Shikotra, N., Willis, A.E., Redpath, N.T. 2001.** Phosphorylation of elongation factor-2 kinase on serine 499 by cAMP-dependent protein kinase induces Ca²⁺/calmodulin-independent activity. *Biochem. J.*, 353: 621–626.
- Dittmer, J., Leyh, B. 2014.** The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 31: 3-15.
- Downward, J. 2003.** Targeting, RAS Signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 3(1): 11–22.
- Dranoff, G. 2004.** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 11-22.

- Dusek, L., Muzík, J., Gelnarová, E., Fínek, J., Vyzula, R., Abrahámová J. 2010.** Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin. Onkol.*, 23(5): 311-324.
- Dvorak, H.F. 1986.** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 315(26): 1650-1659.
- El-Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O., Wood, M.J.A. 2013.** Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5): 347–357.
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., Hanahan, D. 2010.** *Cancer Cell*, 17: 135–147.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q.T., Chi, J.T., Jeffrey, S.S., Giaccia, A.J. 2006.** Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 440(7088): 1222-1226.
- Fan, Q.M., Jing, Y.Y., Yu, G.F., Kou, X.R., Ye, F., Gao, L., Li, R., Zhao, Q.D., Yang, Y., Lu, Z.H., Wei, L.X. 2014.** Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.*, 352: 160-168.
- Fang, H., DeClerck Y.A. 2013.** Targeting the Tumor Microenvironment: From Understanding Pathways to Effective Clinical Trials. *Cancer Res.*, 73: 10.
- Farrow, D.C., Davis, S. 1990.** Risk of pancreatic cancer in relation to medical history and the use of tobacco, alcohol and coffee. *Int. J. Cancer*, 45(5): 816-820.
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D.S., Cook, N., Tuveson, D.A. 2012.** The pancreas cancer microenvironment. *Clin. Cancer Res.*, 18: 4266-4276.
- Fesinmeyer, M.D., Austin, M.A., Li, C.I., De, Roos A.J., Bowen, D.J. 2005.** Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14(7): 1766–1773.
- Fleming, J.B., Shen G.L., Holloway, S.E., Davis, M., Brekken, R.A. 2005.** Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: Justification for K-ras-directed therapy. *Mol. Cancer Res.*, 3: 413–423.
- Franco, O.E., Shaw, A.K., Strand, D.W., Hayward, S.W. 2010.** *Semin. Cell Dev. Biol.*, 21: 33–39.
- Franklin, R.A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M.V., Bivona, M.R., Liu, K., Pamer, E.G., Li, M.O. 2014.** The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*, 344: 921–925.
- Frantz, C., Stewart, K. M. and Weaver, V. M. 2010.** The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.*, 123: 4195-4200.
- Fridman, W.H., Page`s, F., Saute`s-Fridman, C., Galon, J. 2012.** The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer*, 12: 298-306.

- Friend, S.H., Dryja, T.P., Weinberg, R.A. 1988.** Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N. Engl. J. Med.*, 318(10): 618-622.
- Fu, X.T., Dai, Z., Song, K., Zhang, Z.J., Zhou, Z.J., Zhou, S.L., Zhao, Y.M., Xiao, Y.S., Sun, Q.M., Ding, Z.B., Fan, J. 2015.** Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway. *Int. J. Oncol.*, 46(2): 587-596.
- Fujita, H., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Nakata, K., Yu, J., Kayashima, T., Cui, L., Manabe, T., Ohtsuka, T., Tanaka, M. 2010.** α -Smooth muscle actin expressing stroma promotes an aggressive tumor biology in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*, 39: 1254–1262.
- Furukawa, S., Soeda, S., Kiko, Y., Suzuki, O., Hashimoto, Y., Watanabe, T., Nishiyama, H., Tasaki, K., Hojo, H., Abe, M., Fujimori, K. 2013.** MCP-1 promotes invasion and adhesion of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.*, 33(11): 4785-4790.
- Gabbiani, G., Ryan, G.B., Majne, G. 1971.** Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27(5): 549-550.
- Gajos-Michniewicz, A., Duechler, M., Czyz, M. 2014.** miRNA in melanoma-derived exosomes. *Cancer Letters*, 347(1): 29–37.
- Gao, X., Wang, X., Yang, Q., Zhao, X., Wen, W., Li, G., Lu, J., Qin, W., Qi, Y., Xie, F., Jiang, J., Wu, C., Zhang, X., Chen, X., Turnquist, H., Zhu, Y., Lu, B. 2015.** Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8⁺ T and NK cells. *J. Immunol.*, 194: 438–445.
- Gardian, K., Janczewska, S., Olszewski, W.L., Durlik, M. 2012.** Analysis of pancreatic cancer microenvironment: role of macrophage infiltrates and growth factors expression. *J. Cancer*, 3: 285–291.
- Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., Sher, A. 1993.** Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6115-6119.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. 2010.** Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327: 656–661.
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., Chiarugi, P. 2010.** Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer associated fibroblasts stimulates epithelial mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.*, 70: 6945–6956.
- Goggins, M. 2005.** Molecular markers of early pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23(20): 4524-4531.
- Gooiker, G.A., Lemmens, V.E., Besselink, M.G., Bush, O.R., Bonsing, B.A., Molenaar, I.Q., 2014.** Impact of centralization of pancreatic cancer surgery on resection rates and mortality. *Br. J. Surg.*, 101: 1000e5.

- Gordon, S. 2003.** Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 23e35.
- Gordon, S., Martinez, F.O. 2010.** Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32: 593e604.
- Gordon, S., Taylor, P.R. 2005.** Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 5: 953-964.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., Condeelis, J.S. 2005.** Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.*, 65(12): 5278-5283.
- Grant, T.J., Hua, K., Singh, A. 2016.** Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer: Progress in Molecular Biology and Translational Science, Editör: Pruitt, K., ABD, volume 144: p. 242-268.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. 2010.** Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6): 883–899.
- György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzás, E.I. 2011.** Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol. Life Sci.*, 68: 2667–2688.
- Hagg, J., Howells, L.M., Garcea, G., Metcalfe, M.S., Steward, W.P., Dennison, A.R. 2014.** Pancreatic stellate cells and pancreas cancer: current perspectives and future strategies. *Eur. J. Cancer*, 50: 2570–2782.
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, LT., Rozenblum, E., Weinstein, CL., Fischer, A., Yeo, CJ., Hruban, RH., Kern, SE. 1996.** DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, 271(5247): 350-353.
- Hait, W.N., Wu, H., Jin, S., Yang, J.M. 2006.** Elongation factor-2 kinase: its role in protein synthesis and autophagy. *Autophagy*, 2: 294–296.
- Hamilton, J.A. 2008.** Colony-stimulating factor in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 8: 533-544.
- Hamurcu, Z., Ashour, A., Kahraman, N., Ozpolat, B. 2016.** FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(13): 16619-16635.
- Hanahan, D., Coussens, L.M. 2012.** Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21: 309–322.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646–674.
- Hansel D.E, Kern S.E, Hruban R.H. 2003.** Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 4: 237-256.

- Hao, N.B., Lü, M.H., Fan, Y.H., Cao, Y.L., Zhang, Z.R., Yang, S.M. 2012.** Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012: 948098.
- Harburger, D.S., Calderwood, D.A. 2009.** Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.*, 122: 159-163.
- Harnack, L.J., Anderson, K.E., Zheng, W., Folsom, A.R., Sellers, T.A., Kushi, L.H. 1997.** Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 1081–1086.
- Hess, C., Sadallah, S., Hefti, A., Landmann, R., Schifferli, J.A. 1999.** Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J. Immunol.*, 163: 4564–4573
- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., Depinho, RA. 2006.** Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.*, 20(10): 1218-1249.
- Hirano T., Shino Y., Saito T., Komoda F., Okutomi Y., Takeda A., Ishihara T., Yamaguchi T., Saisho H., Shirasawa H. 2002.** Dominant negative MEKK1 inhibits survival of pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 21: 5923–5928.
- Holme, P.A., Solum, N.O., Brosstad, F., Røger, M., Abdelnoor, M. 1994.** Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb. Haemost.*, 72: 666–671.
- Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M.J., Weaver, A.M. 2013.** Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep.*, 5: 1159–1168.
- Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue C., Wilentz, RE, Goggins, M., Kern, SE. 2001.** Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J.*, 7(4): 251-258.
- Hu, W., Li, X., Zhang, C., Yang, Y., Jiang, J., Wu, C. 2016.** Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin. Transl. Oncol.*, 18: 251–258.
- Humphries, J. D., Byron, A., Humphries, M. J. 2006.** Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.*, 119: 3901-3903.
- Hynes, R.O. 2009.** The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326: 1216-1219.
- Italiani, P., Boraschi, D. 2014.** From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.*, 5: 514.
- Jenkins, S.J., Rucker, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., Allen. J.E. 2011.** Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 332: 1284–1288.

- Johansson, J., Tabor, V., Wikell, A., Jalkanen, S., Fuxe, J. 2015.** TGF- β 1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. *Front. Oncol.*, 5: 3.
- Jorgensen, R., Merrill, A.R., Andersen, G.R. 2006.** The life and death of translation elongation factor 2. *Biochem. Soc. Trans.*, 34: 1–6.
- Josephs, D.H., Bax, H.J., Karagiannis, S.N. 2015.** Tumour-associated macrophage polarization and re-education with immunotherapy. *Front. Biosci. (Elite Ed)*, 7: 293–308.
- Junttila, M.R., de Sauvage, F.J. 2013.** Influence of tumour microenvironment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501: 346–354.
- Kalluri, R., Zeisberg, M. 2006.** Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6: 392–401.
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., Goggins, M. 2012.** Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4): 730–733.
- Keller, J., Layer, P. 2005.** Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*, 54(6): 1–28.
- Kenney, J.W., Moore, C.E., Wang, X., Proud, C.G. 2014.** Eukaryotic elongation factor 2 kinase, an unusual enzyme with multiple roles. *Advances in Biological Regulation*, 55: 15–27.
- Kern, S.E., Hruban, R.H., Hidalgo, M., Yeo, C.J. 2002.** An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. *Cancer Biol. Ther.*, 1(6): 607–613.
- Kindler, H.L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M.F., O'Reilly, E., Wozniak, T.F., Picus, J., Bhargava, P., Mayer, R.J., Schilsky, R.L., Goldberg, R.M. 2010.** Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J. Clin. Oncol.*, 28: 3617–3622.
- Knebel, A., Haydon, C.E., Morrice, N., Cohen, P. 2002.** Stress induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem. J.*, 367: 525–532.
- Koga, M., Kai, H., Egami, K., Murohara, T., Ikeda, A., Yasuokaa, S., Egashirae, K., Matsuishib, T., Kaif, M., Kataokag, Y., Kuwanoc, M., Imaizumia, T. 2008.** Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365: 279–284.
- Lech, M., Grobmayr, R., Weidenbusch, M., Anders, H.J. 2012.** Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments. *Mediators Inflamm.*, 2012: 951390.

- Lee, E., Pandey, N.B., Popel, A.S. 2015.** Crosstalk between cancer cells and blood endothelial and lymphatic endothelial cells in tumour and organ microenvironment. *Expert Rev. Mol. Med.*, 17: e3.
- Lee, S., Margolin, K. 2011.** Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 3(4): 3856–3893.
- Leitinger, B., Hohenester, E. 2007.** Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.*, 26(3): 146-155.
- Li, D., Morris, J.S., Liu, J., Hassan, M.M., Day, R.S., Bondy, M.L., Abbruzzese, J.L. 2009.** Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*, 301(24): 2553-2562.
- Li, B., Wang, J. H. 2011.** Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J. Tissue Viability*, 20: 108-120.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., Abbruzzese, J.L. 2004.** Pancreatic cancer. *Lancet*, 363(9414): 1049-1057.
- Li, H., Fan, X., Houghton, J. 2007.** Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell Biochem.*, 101(4): 805-815.
- Li, N., Qin, J., Lan, L., Zhang, H., Liu, F., Wu, Z., Ni, H., Wang, Y. 2015.** PTEN inhibits macrophage polarization from M1 to M2 through CCL2 and VEGF-A reduction and NHERF-1 synergism. *Cancer Biol. Ther.*, 16: 297–306.
- Li, X., Yao, W., Yuan, Y., Chen, P., Li, B., Li, J., Chu, R., Song, H., Xie, D., Jiang, X., Wang, H. 2017.** Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut*, 66(1): 157-167.
- Lim, S.Y., Yuzhalin, A.E., Gordon-Weeks, A.N., Muschel, R.J. 2016.** Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*, 7(19): 28697-28710.
- Lin, E.Y., Pollard, J.W. 2004.** Macrophages: modulators of breast cancer progression. *Novartis Found Symp*, 256: 158–168.
- Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X.M., Xu, Y.M., Huang, L.F., Wang, X.Z. 2015.** Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *Scientific World Journal*, 2015: 657086.
- Loberg, R.D., Ying, C., Craig, M., Yan, L., Snyder, L.A., Pienta, K.J. 2007.** CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. *Neoplasia*, 9: 556-562.
- Loberg, R.D., Day, L.L., Harwood, J., Ying, C., John, L.N.S., Giles, R., Neeley, C.K., Pienta, K.J. 2006.** CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia*, 8:578–586.

- Long, J., Zhang, Y., Yu, X., Yang, J., LeBrun, D. G., Chen, C., Yao, Q., Min, L. 2011.** Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(7): 817-828.
- Longnecker, D. 2014.** Anatomy and Histology of the Pancreas. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base, <https://www.pancreapedia.org> – (Erişim tarihi: 11.2.2017).
- Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z. 2012.** The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.*, 196(4): 395-406.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., Bartek, J. 1995.** Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375(6531): 503-536.
- Ma, H.Y., Liu, X.Z., Liang, C.M. 2016.** Inflammatory microenvironment contributes to epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.*, 22(29): 6619-6628.
- Maitra, A., Adsay, N.V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Hruban, R.H. 2003.** Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod. Pathol.*, 16(9): 902–912.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. 2008.** Cancer related inflammation. *Nature*, 454: 436–444.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., Ruco, L. 1992.** The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today*, 13: 265–270.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. 2004.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 25: 677-686.
- Mateos, R.S., Conlon, K.C. 2016.** Pancreatic cancer. *Surgery*, 34(6): 282–291.
- Mbeunkui, F., Johann, D.J, Jr. 2009.** Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63(4): 571–582.
- McWilliams, R.R., Wieben, E.D., Rabe K.G., Pedersen, K.S., Wu, Y., Sicotte, H., Petersen, G.M. 2011.** Prevalence of CDKN2A mutations in pancreatic cancer patients: implications for genetic counseling. *Eur J Hum Genet*, 19(4): 472-478.
- Menen, R.S., Hassanein, M.K., Momiyama, M., Suetsugu, A., Moossa, A.R., Hoffman, R.M., Bouvet, M. 2012.** Tumor-educated macrophages promote tumor growth and peritoneal metastasis in an orthotopic nude mouse model of human pancreatic cancer. *In Vivo*, 26: 565-569.
- Michaud, D.S. 2017.** Pancreatic Cancer: Reference Module in Biomedical Sciences, Editörler: Caplan, M., ABD, s. 390–398.

- Michaud, D.S., Skinner, H.G., Wu, K., Hu, F., Giovannucci, E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Fuchs, C.S. 2005.** Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 97(7): 518–524.
- Middelbeek, J., Clark, K., Venselaar, H., Huynen, M.A., van Leeuwen, F.N. 2010.** The alpha-kinase family: an exceptional branch on the protein kinase tree. *Cell Mol. Life Sci.*, 67: 875–890.
- Milane, L., Singh, A., Mattheolabakis, G., Suresh, M., Amiji, M.M. 2015.** Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J. Control Release*, 219: 278–294.
- Mira, E., Carmona-Rodriguez, L., Tardaguila, M., Azcoitia, I., Gonzalez-Martin, A., Almonacid, L., Casas, J., Fabriás, G., Mañes, S. 2013.** A lovastatin-elicited genetic program inhibits M2 macrophage polarization and enhances T cell infiltration into spontaneous mouse mammary tumors. *Oncotarget*, 4: 2288–2301.
- Mitsui, K., Brady, M., Palfrey, H.C., Nairn, A.C. 1993.** Purification and characterization of calmodulin-dependent protein kinase III from rabbit reticulocytes and rat pancreas. *J. Biol. Chem.*, 268: 13422–13433.
- Miyaki, M., Kuroki T. 2003.** Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306(4): 799–804.
- Miyamoto, H., Murakami, T., Tsuchida, K., Sugino, H., Miyake, H., Tashiro, S. 2004.** Tumor–stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*, 28: 38–44.
- Mizutani, K., Sud, S., McGregor, N.A., Martinovski, G., Rice, B.T., Craig, M.J., Varsos, Z.S., Roca, H., Pienta, K.J. 2009.** The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia*, 11(11): 1235–1242.
- Monti, P., Leone, BE., Marchesi, F., Balzano, G., Zerbi, A., Scaltrini, F., Pasquali, C., Calori, G., Pessi, F., Sperti, C., Di Carlo, V., Allavena, P., Piemonti, L. 2003.** The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer Res.*, 63: 7451–7461.
- Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Lowy, A.M., Brunton, V.G., Frame, M.C., Evans, T.R., Sansom, O.J. 2010.** Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(1): 246–251.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. 1986.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136: 2348–2357.

- Mosmann, T.R., Coffman, R.L. 1989.** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, 7: 145.
- Nairn, A.C., Bhagat, B., Palfrey, H.C. 1985.** Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7939–7943.
- Nairn, A.C., Matsushita, M., Nastiuk, K., Horiuchi, A., Mitsui, K., Shimizu, Y., Palfrey, H.C. 2001.** Elongation factor-2 phosphorylation and the regulation of protein synthesis by calcium. *Prog. Mol. Subcell Biol.*, 27: 91-129.
- Nesbit, M., Schaidler, H., Miller, T.H., Herlyn, M. 2001.** Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J. Immunol.*, 166: 6483–6490.
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Bourget, P., Cros, J., Couvelard, A., Sauvanet, A., Vullierme, MP., Tournigand, C., Hammel, P. 2015.** State of the art and future directions of pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Pharmacol. Ther.*, 155: 80e104.
- Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., Romero, I.L., Carey, M.S., Mills, G.B., Hotamisligil, G.S. 2011.** Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.*, 1498-1503.
- Nilsson, A., Nygard, O. 1995.** Phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 in differentiating and proliferating HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1268: 263–268.
- Nkondjock, A., Krewski, D., Johnson, K.C., Ghadirian, P. 2005.** Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, 114(5): 817-823.
- O’Garra, A., Murphy, K. 1994.** Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr. Opin. Immunol.*, 6: 458.
- Ohlund, D., Elyada, E., Tuveson, D. 2014.** Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med.*, 211: 1503–1523.
- Ohtaki, Y., Ishii, G., Nagai, K., Ashimine, S., Kuwata, T., Hishida, T., Nishimura, M., Yoshida, J., Takeyoshi, I., Ochiai, A. 2010.** Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.*, 5: 1507–1515.
- Ojajärvi, A., Partanen, T., Ahlbom, A., Boffetta, P., Hakulinen, T., Jourenkova, N., Kauppinen, T., Kogevinas, M., Vainio, H., Weiderpass, E., Wesseling, C. 2001.** Risk of pancreatic cancer in workers exposed to chlorinated hydrocarbon solvents and related compounds: a meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.*, 153(9): 841-850.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. 2005.** *Cell*, 121: 335–348.

- Ozbek, S., Balasubramanian, P.G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P., Adams, J.C. 2010.** The evolution of extracellular matrix. *Mol. Biol. Cell*, 21(24): 4300-4305.
- Paletta-Silva, R., Meyer-Fernandes, J.R. 2012.** Macrophage plasticity and polarization: cell signaling mechanisms and roles in immunity: Handbook of Macrophages. Editörles: Takahashi, R., Kai, H., NovaScience Publishers; Hauppauge, NY, s. 147–174.
- Pandol, S., Edderkaoui, M., Gukovsky, I., Lugea, A., Gukovskaya, A. 2009.** Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 7(11): 44-47.
- Park, J.E., Lenter, M.C, Zimmermann, R.N., Garin-Chesa, P., Old, L.J., Rettig, W.J. 1999.** Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 274(51): 36505-36512.
- Parmer, T.G., Ward, M.D., Hait, W.N. 1997.** Effects of rottlerin, an inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase III, on cellular proliferation, viability, and cell cycle distribution in malignant glioma cells. *Cell Growth Differ.*, 8: 327–334.
- Parmer, T.G., Ward, M.D., Yurkow, E.J., Vyas, V.H., Kearney, T.J. Hait, W.N. 1999.** Activity and regulation by growth factors of calmodulin dependent protein kinase III (elongation factor 2-kinase) in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 79: 59–64.
- Pattabiraman, D.R., Weinberg, R.A. 2014.** Tackling the cancer stem cells-what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13: 497-512.
- Phan, GQ., Yeo, CJ., Hruban, RH., Lillemoe, KD., Pitt, HA., Cameron, JL. 1998.** Surgical experience with pancreatic and peripancreatic neuroendocrine tumors: review of 125 patients. *J. Gastrointest Surg.*, 2(5): 472–482.
- Pollard, J.W. 2004.** Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 71-78.
- Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., Hingorani, S.R. 2012.** Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21: 418-429.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D. 2011.** RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer*, 11(11): 761–774.
- Radisky, D.C., Kenny, P.A., Bissell, M.J. 2007.** Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J. Cell. Biochem.*, 101: 830-839.
- Redpath, N.T., Proud, C.G. 1993.** Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates rabbit reticulocyte elongation factor-2 kinase and induces calcium-independent activity. *Biochem. J.*, 293: 31–34.
- Roca, H., Varsos, Z.S., Sud, S., Craig, M.J., Ying, C., Pienta, K.J. 2009.** CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J. Biol. Chem.*, 284(49): 34342–34354.

- Roder, P.V., Wu, B., Liu, Y., Han, W. 2016.** Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.*, 48: e219.
- Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A.R., Baptista, P.V. 2014.** Exosome in Tumour Microenvironment: Overview of the Crosstalk between Normal and Cancer Cells. *BioMed Research International*, 2014: 10 pages.
- Rosen, E.D., MacDougald, O.A. 2006.** Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7: 885–896.
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., Kern, S.E. 1997.** Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.*, 57(9): 1731–1734.
- Ryazanov, A.G., Natapov, P.G., Shestakova, E.A., Severin, F.F., Spirin, A.S. 1988.** Phosphorylation of the elongation factor 2: the fifth Ca²⁺/calmodulin-dependent system of protein phosphorylation. *Biochimie*, 70: 619–626.
- Ryazanov, A.G., Pavur, K.S., Dorovkov, M.V. 1999.** Alpha kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr. Biol.*, 9: 43–45.
- Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K., Toi, M. 2001.** Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer*, 1085–1091.
- Sakorafas, G.H., Tsiotou, A.G., Tsiotos, G.G. 2000.** Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treat Rev.*, 26(1): 29-52.
- Salcedo, R., Ponce, M.L., Young, H.A., Wasserman, K., Ward, J.M., Kleinman, H.K., Oppenheim, J.J., Murphy, W.J. 2000.** Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*, 96: 34–40.
- Sarvaiya, P.J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P., Lesniak, M.S. 2013.** Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*, 4(12): 2171-2185.
- Scherz-Shouval, R., Santagata, S., Mendillo, M.L., Sholl, L.M., Ben-Aharon, I., Beck, A.H., Dias-Santagata, D., Koeva, M., Stemmer, S.M., Whitesell, L., Lindquist, S. 2014.** The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell*, 158: 564–578.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S.B., Kern, S.E. 1997.** Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.*, 57(15): 3126–3130.
- Scott, A.M., Wiseman, G., Welt, S., Adjei, A., Lee, F.T., Hopkins, W., Divgi, C.R., Hanson, L.H., Mitchell, P., Gansen, D.N., Larson, S.M., Ingle, J.N., Hoffman, E.W., Tanswell, P., Ritter, G., Cohen, L.S., Bette, P., Arvay, L., Amelsberg, A., Vlock, D., Rettig, W.J., Old, L.J. 2003.** A Phase I dose-escalation study of sibrutumab in patients

with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9(5): 1639-1647.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer E.G. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.*, 26: 421-452.

Shand, F.H., Ueha, S., Otsuji, M., Koid, S.S., Shichino, S., Tsukui, T., Kosugi-Kanaya, M., Abe, J., Tomura, M., Ziogas, J., Matsushimaa, K. 2014. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 7771-7776.

Shen, Z., Kauttu, T., Cao, J., Seppänen, H., Vainionpää, S., Ye, Y., Wang, S., Mustonen, H., Puolakkainen, P. 2013. Macrophage coculture enhanced invasion of gastric cancer cells via TGF- β and BMP pathways. *Scand J. Gastroenterol.*, 48(4): 466-472.

Sherr, C.J. 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(10): 731-737.

Shields, J.D., Fleury, M.E., Yong, C., Tomei, A.A., Randolph, G.J., Swartz, M.A. 2007. Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer Cell*, 11: 526-538.

Sica, A., Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.*, 122: 787-795.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2016. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 66(1): 7-30.

Silverman, D.T., Hoover, R.N., Brown, L.M., Swanson, G.M., Schiffman, M., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Schwartz, A.G., Liff, J., Pottern, L.M., Fraumeni, J.F Jr. 2003. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*, 14(1): 45-54.

Slattery, M.L., John, E., Torres-Mejia, G., Stern, M., Lundgreen, A., Hines, L., Giuliano, A., Baumgartner, K., Herrick, J., Wolff, R.K. 2013. Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study. *PLoS One*, 8(5): e63165.

Spaeth, E. L., Dembinski, J. L., Sasser, A. K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M. and Marini, F. 2009. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*, 4: e4992.

Stephen, AG., Esposito, D., Bagni, R.K., McCormick, F. 2014. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, 25(3): 272-281.

Stout, R.D., Suttles, J. 1997. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Front. Biosci.*, 2: 197e206.

Stout, R.D., Suttles, J. 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.*, 76: 509e513.

- Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A. 2009.** The cancer genome. *Nature*, 458: 719–724.
- Strauss, J., Alewine, C., Figg, W.D., Duffy, A. 2016.** Targeting the microenvironment of pancreatic cancer: overcoming treatment barriers and improving local immune responses. *Clin. Transl. Oncol.*, 18: 653–659.
- Tartour, E., Fridman, W.H. 1998.** Cytokines and Cancer. *International Reviews of Immunology*, 16: 683-704.
- Tascilar, M., Skinner, H.G., Rosty, C., Sohn, T., Wilentz, R.E., Offerhaus, G.J., Adsay, V., Abrams R.A., Cameron, J.L., Kern, S.E., Yeo, C.J., Hruban, R.H., Goggins, M. 2001.** The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7(12): 4115-4121.
- Tekedereli, I., Alpay, S.N., Tavares, C.D., Cobanoglu, Z.E., Kaoud, T.S., Sahin, I., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G., Dalby, K.N., Ozpolat, B. 2012.** Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PLoS One*, 7: e41171.
- Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J.M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H., Lyden, D. 2014.** Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.*, 24(6): 766-769.
- Tjiu, J.W., Chen, J.S., Shun, C.T., Lin, S.J., Liao, Y.H., Chu, C.Y., Tsai, T.F., Chiu, H.C., Dai, Y.S., Inoue, H., Yang, P.C., Kuo, M.L., Jee, S.H. 2009.** Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J. Invest. Dermatol.*, 129(4): 1016-1025.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A. 2002.** Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(5): 349-363.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem Jr, N., Heine, U. 1981.** Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 645: 63–70.
- Valencia, T., Kim, J.Y., Abu-Baker, S., Moscat-Pardos, J., Ahn, C.S., Reina-Campos, M., Duran, A., Castilla, E.A., Metallo, C.M., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J. 2014.** Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 26: 121–135.
- van Cutsem, E., Vervenne, W.L., Bennouna, J., Humblet, Y., Gill, S., Van Laethem, J.L., Verslype, C., Scheithauer, W., Shang, A., Cosaert, J., Moore, M.J. 2009.** Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.*, 27: 2231-2237.

- Vecchia, C.L., Bosetti, C. 2016.** Tobacco, alcohol and pancreatic disease: Key findings from global consortia. *Epidemiology Biostatistics and Public Health*, 13(1): e11779-1-e11779-2.
- Vela, M., Aris, M., Llorente, M., Garcia-Sanz, J.A., Kremer, L. 2015.** Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges. *Front. Immunol.*, 6: 12.
- Vergunst, C.E., Gerlag, D.M., Lopatinskaya, L., Klareskog, L., Smith, M.D., van den Bosch, F., Dinant, H.J., Lee, Y., Wyant, T., Jacobson, E.W., Baeten, D., Tak, P.P. 2008.** Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis. A double-blind, randomized, placebocontrolled clinical trial. *Arthritis and Rheumatism*, 58: 1931-1939.
- Vona-Davis, L., Rose, D.P. 2009.** Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(3): 193-201.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., Proud, C.G. 2001.** Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.*, 20: 4370–4379.
- Wang, Z., Chen, J.Q., Liu, J., Tian, L. 2016.** Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *J. Transl. Med.*, 14: 297.
- Weigel, E., Smith, C., Liu, P.G., Robison, R., O’Neill, K. 2015.** Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. *J. Clin. Cell Immunol.*, 6: 4.
- Weigelt, B., Bissell, M.J. 2008.** Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 311-321.
- Weinberg, R.A. 2007.** The biology of cancer, Garland Science, New York, USA, 960 pages.
- Weissmueller, S., Manchado, E., Saborowski, M., Morris, J.P., Wagenblast, E., Davis, C.A., Moon, S.H., Pfister, N.T., Tschaharganeh, D.F., Kitzing, T., Aust, D., Markert, E.K., Wu, J., Grimmond, S.M., Pilarsky, C., Prives, C., Biankin, A.V., Lowe, S.W. 2014.** Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling. *Cell*, 57(2): 382–394.
- Whittaker, C.A., Bergeron, K.F., Whittle, J., Brandhorst, B.P., Burke, R.D., Hynes, R.O. 2006.** The echinoderm adhesome. *Dev. Biol.*, 300(1): 252-266.
- Wilentz, R.E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G.J., Kang, M., Goggins, M., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H. 1998.** Inactivation of the p16 (INK4A) tumor suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.*, 58(20): 4740–4744.
- Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H. 2006.** Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.*, 2002–2006.
- Willis, B.C., duBois, R.M., Borok, Z. 2006.** Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 3: 377-382.

- Wu, H., Yang, J.M., Jin, S., Zhang, H., Hait, W.N. 2006.** Elongation factor-2 kinase regulates autophagy in human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, 66: 3015–3023.
- Wu, H., Zhu, H., Liu, D.X., Niu, T.K., Ren, X., Patel, R., Hait, W.N., Yang, J.M. 2009.** Silencing of elongation factor-2 kinase potentiates the effect of 2-deoxy-D-glucose against human glioma cells through blunting of autophagy. *Cancer Res.*, 69: 2453–2460.
- Xia, M., Sui, Z. 2009.** Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 19: 295-303.
- Xian, X., Gopal, S., Couchman, J.R. 2010.** Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.*, 339: 31-46.
- Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H., Xu, W. 2015.** Exosomes in cancer: small particle, big player. *J. Hematol. Oncol.*, 8: 83.
- Yang, J., Yang, J.M., Iannone, M., Shih, W.J., Lin, Y., Hait, W.N. 2001.** Disruption of the EF-2 kinase/Hsp90 protein complex: a possible mechanism to inhibit glioblastoma by geldanamycin. *Cancer Res.*, 61: 4010–4016.
- Yoshimura, T., Howard, O.M., Ito, T., Kuwabara, M., Matsukawa, A., Chen, K., Liu, Y., Liu, M., Oppenheim, J.J., Wang, J.M. 2013.** Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. *PLoS One*, 8: e58791.
- Zalkind S. 2001.** Ilya Mechnikov: His Life and Work. Honolulu, HI, University. Press of the Pacific, pp 212.
- Zhang, B., Zhang, Y., Yao, G., Gao J, Yang, B., Zhao, Y., Rao, Z., Gao, J. 2012.** M2-polarized macrophages promote metastatic behavior of Lewis lung carcinoma cells by inducing vascular endothelial growth factor-C expression. *Clinics (Sao Paulo)*,67(8): 901–906.
- Zhang, J.M., An, J. 2007.** Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45(2): 27-37.
- Zhang, L., Zhang, Y., Liu, X.Y., Qin, Z.H., Yang, J.M. 2011.** Expression of elongation factor-2 kinase contributes to anoikis resistance and invasion of human glioma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32: 361–367.
- Zhang, Y., Daquinag, AC., Amaya-Manzanares, F., Sirin, O., Tseng, C. 2012.** Kolonin MG Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment. *Cancer Res.*, 5198-5208.
- Zhao, H., Zhang, X., Chen, X., Li, Y., Ke, Z., Tang, T., Chai, H., Guo, A.M., Chen, H., Yang, J. 2014.** Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 279: 311–321.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Didem KARAKAŞ

Doğum Yeri ve Tarihi: Kocaeli, 8 Şubat 1988

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Merkez Bankası Derince Anadolu Lisesi (2002-2006)

Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2006-2011)

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2011-2013)

Doktora: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2013-Halen)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, Department of Experimental Therapeutics, Houston, (2016-2017)

İletişim (e-posta): didemmkarakass@gmail.com

Yayınları:

Karakas, D., Cevatemre, B., Ulukaya, E. 2014. Cancer Stem Cells: Emerging Actors in Both Basic and Clinical Cancer Research. *Turkish Journal of Biology*, 38:829-838.

Karakas, D., Cevatemre, B., Aztopal, N., Ari, F., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2015. Addition of niclosamide to palladium(II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer. *Bioorg Med Chem*. 23(17):5580-5586.

Deniz, N.G., Ibis, C., Gokmen, Z., Stasevych, M., Novikov, V., Komarovska-Porokhnyavets, O., Ozyurek, M., Guclu, K., Karakas, D., Ulukaya, E. 2015. Design, Synthesis, Biological Evaluation, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Heteroatom Substituted 1,4-Naphtho- and Benzoquinones. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 63:1029-1039.

Acilan, C., Cevatemre, B., Adiguzel, Z., Karakas, D., Ulukaya, E., Ribeiro, N., Correia, I., Pessoa, J.C. 2016. Validation data supporting the characterization of novel copper complexes as anticancer agents. *Data Brief*, 9:1160-1174.

Acilan, C., Cevatemre, B., Adiguzel, Z., Karakas, D., Ulukaya, E., Arda N, Ribeiro N, Correia I, Pessoa J.C. 2017. Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agents. *Biochim Biophys Acta*, 1861(2):218-234.

Aztopal, N., Karakas, D., Cevatemre, B., Ari, F., Iysel, C., Daidone, M.G., Ulukaya, E. 2017. A trans-platinum (II) complex induces apoptosis in cancer stem cells of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(1): 269-276.

Tunc, D., Dere, E., Karakas, D., Cevatemre, B., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2017. Cytotoxic and apoptotic effects of the combination of palladium (II) 5,5-diethylbarbiturate complex with bis(2-pyridylmethyl)amine and curcumin on non small lung cancer cell lines. *Bioorg Med Chem*, 2017 Jan 28. (baskıda) doi: 10.1016/j.bmc.2017.01.043.

