

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE FAK-Rho-ROCK
BAĞLANTILI SİNYAL KASKADI İNHİBİSYONUNUN
MEKANOBİYOLOJİK ETKİLERİ**

Serap TÜRKMEN

ORCID 0009-0008-3118-6326

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Translasyonel Onkoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
AĞUSTOS 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2021970026

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE FAK-Rho-ROCK
BAĞLANTILI SİNYAL KASKADI İNHİBİSYONUNUN
MEKANOBİYOLOJİK ETKİLERİ**

Serap TÜRKMEN
ORCID 0009-0008-3118-6326

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Translasyonel Onkoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Yasemin BAŞBINAR
ORCID 0000-0001-9439-2217

İZMİR
AĞUSTOS 2024

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum " Metastatik Kolorektal Kanserde FAK-Rho-ROCK Bağlantılı Sinyal Kaskadı İnhibisyonunun Mekanobiyolojik Etkileri" başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Öğrencinin Adı Soyadı :

Tarih:

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her türlü bilim ve yaşam alanlarında derin bilgileriyle, farklı bakış açıları ve tecrübeleriyle bana daima rehberlik eden, aydınlatan, odasından her çıkışında bambaşka fikirlere uyandığım, kendisinin öğrencisi olmaktan büyük onur duyduğum sevgili danışman hocam Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR'a,

Bilgi ve desteğiyle ve aynı zamanda arkadaşça davranışları ve daima gülüyüzüyle deneyimlerini paylaşarak bana büyük katkıları olan kendisini tanımaktan büyük mutluluk duyduğum sayın hocam Doç.Dr. Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL'a,

Varlığıyla yolumuza ışık tutan bilgileriyle yön gösteren destek olan, Translasyonel Onkoloji bölümüne ekip ruhunu ve yaratıcı düşünmeyi her alanda kazandıran sayın hocamız Preventif Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a,

Tez çalışmam boyunca bana hep destek olan sevgili arkadaşım Caner KARACA'ya,

Translasyonel Onkoloji Bölümüne geldiğim ilk günden beri bana gülümsemesiyle arkadaşlık edip, çalışmalarımnda bana hep destek olan sevgili arkadaşım Nurçin KAYACIK'a,

Hem laboratuvarıda hem de sosyal ortamda bana destek olan tüm çalışma arkadaşlarıma ve tüm Onkoloji Enstitüsü idari personellerine,

Bu süreçte hep yanımda olan destek sağlayan kız kardeşim Hatice Çağla ÖZDAMAR'a,

Canım annem ve babam Sebahat ve Mustafa TÜRKMEN'e,

Enerji kaynağım, biricik tatlı oğlum Alp OĞUZ'a kalpten teşekkürlerimi sunarım..

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ.....	1
1.2 Araştırmanın Amacı.....	2
1.3 Araştırmanın Hipotezi	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi	3
2.2 Kolorektal Kanser Tedavisi	4
2.3. Kolorektal Kanserde FAK-Rho-ROCK Bağlantılı Sinyal Kaskadı	5
2.3.1. FAK-Rho-ROCK Bağlantılı Sinyal Kaskadı	5
2.3.2. Tümör Mikroçevresi (Ekstraselüler Matriks).....	6
2.3.3. Hücre Sertliği	7
2.3.4. Fokal Adezyon Kinaz (FAK) Yapısal Özellikleri	8
2.3.5. Rho-ROCK Yapısal Özellikleri.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	15
3.1. Araştırmanın Tipi	15
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı.....	15
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları	15
3.4. Çalışma Materyali.....	15
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	15
3.6. Veri Toplama Araçları	16
3.6.1. Hücre Kültürü.....	17
3.6.2. Y-15, ROCK inhibitor-2 ve YAP/TAZ inhibitor-2 Çözeltilerinin Hazırlanması	18
3.6.3. Hücre Ekimi Aşamaları.....	19
3.6.4. İlaçların belirlenen dozlarda uygulanması	19
3.6.5. İlaçların Hücre Canlılığını Etkileyen Dozlarının WST-1 yöntemi ile Araştırılması.....	20
3.6.6. İmmunofluoresans Boyama.....	20
3.7. Araştırma Planı	21

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	22
3.9. Araştırmanın Kısıtlılıkları	22
3.10. Etik Kurul Onay	22
4. BULGULAR	23
4.1. Y-15, ROCK inhibitor-2 ve YAP/TAZ inhibitor-2 ilaçlarının Hücre Canlılığına Etkisi.....	23
4.1.2. YAP/TAZ inhibitor -2 İlacının Hücre Canlılığına Etkisi.....	24
4.1.3. ROCK inhibitor -2 İlacının Hücre Canlılığına Etkisi	25
4.2. İkili İlaç Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi.....	26
4.2.1. YAP/TAZ in-2 ve ROCK in-2 İkili İlaç Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi.....	26
4.2.2. YAP/TAZ in-2 ve Y-15 İkili İlaç Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi ...	27
4.2.3. Y-15 ve ROCK in-2 İkili İlaç Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi.....	28
4.3. Üçlü İlaç Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi.....	29
4.3.1. Y-15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 Üçlü ilaç Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi.....	29
4.4. Y-15 ve ROCK in-2 ikili kombinasyonunun EMT Üzerine Etkileri.....	30
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR.....	35
8.EKLER.....	40

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....16

Tablo 2. HCT-116 Hücre hattının karakteristik özellikleri.....17



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Ülkemizde 2020’ de kanser türlerinde her iki cinsiyet ve her yaştan Yeni vaka sayısı.....	3
Şekil 2. Fiziksel kanser niteliklerinin temellendirilmesi.....	7
Şekil 3. FAK'ın moleküler yapısının ve bazı etkileşimlerinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 4. Çekirdekteki FAK işlevleri.....	10
Şekil 5. Rho–ROCK sinyali, tümör ilerlemesini pozitif feedback ile destekler.....	11
Şekil 6. Focal adhesion – KEGG: Kyoto Ency.....	13
Şekil 7. Araştırma planı.....	21
Şekil 8. Y-15 hücre canlılık analizine ait grafik.....	23
Şekil 9. YAP/TAZ in-2 hücre canlılık analizine ait grafik.....	24
Şekil 10. ROCK in-2 hücre canlılık analizine ait grafik.....	25
Şekil 11. YAP/TAZ in-2 ve ROCK in-2 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik.....	26
Şekil 12. YAP/TAZ in-2 ve Y-15 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik.....	27
Şekil 13. Y-15 ve ROCK in-2 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik.....	28
Şekil 14. Y-15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik.....	29
Şekil 15. TGF- β ile indüklenmiş ve indüklenmemiş kolorektal kanser HCT-116 hücrelerinde ROCK in-2 /Y15 inhibitörünün epitelyal mezenkimal dönüşüm üzerindeki etkisi.....	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

μl	Mikrolitre
μM	Mikro molar
nM	Nano molar
nM	Nanometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
IGF-1R	IGF-1 reseptör
EMT	Epitelyal-mezenkimal dönüşüm
FBS	Fötal sığır serum
ml	Mililitre
FAK	Fokal adezyon kinaz
ROCK in-2	ROCK inhibitor-2
YAP/TAZ in-2	YAP/TAZ inhibitor-2
KRK	Kolorektal kanser
m(KRK)	Metastatik kolorektal kanser
ECM	Ekstraselüler matriks
MYPT	Miyozin fosfataz

METASTATİK KOLOREKTAL KANSERDE FAK-Rho-ROCK BAĞLANTILI SİNYAL KASKADI İNHİBİSYONUNUN MEKANOBİYOLOJİK ETKİLERİ

Yüksek Lisans Tezi

Serap TÜRKMEN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Tümör hücreleri, stromal hücreler ile ekstraselüler matriks (ECM) arasındaki karşılıklı biyokimyasal ve fiziksel etkileşimler sonucu tümör mikroçevresindeki ekstraselüler matriks(ECM) yeniden modellenir. Değişen mikroçevre kanser progresyonunu hızlandırır. Mikrotübüller, mikroflamentler ve ara flamentler başta olmak üzere hücre iskeleti elemanları sitoplazmik bileşenler ile birlikte hücrenin viskoelastik davranışlarının regüle edilmesini sağlar. Hücrenin viskoelastik karakterizasyonu için gerçek anlamda ölçülen bir özellik olan hücre sertliği, aktin / miyozin karmaşıklığı ve hücre iskeleti deformasyonu olarak tanımlanmaktadır. Hücreye yapısal dayanıklılık ve sertlik kazandıran bu elemanlar aynı zamanda fiziksel mikroçevreyi biyokimyasal yanıtı dönüştüren sinyal kaskatları olarak da görev alırlar. Rho-ROCK sinyali, aktomiyozin kontraktilitesinin önemli bir düzenleyicisidir ve hücre şekli, hücre iskeleti düzenlenmesi ve dolayısıyla hücre poliferasyonu, farklılaşması, hareketliliği ile hücre bağlanmasını düzenler. FAK kinaz aktivitesi, kanser hücre büyümesi ve metastazı ile ilişkili birçok hücresel süreç için çok önemlidir. FAK aynı zamanda Rho ailesi proteinlerinin aktivasyonuna bağlı bazı düzenleyici proteinlerle etkileşimi ile aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenir. FAK kinaza bağlı tümör hücresi süreçleri, hayatta kalma, çoğalma, göç, istila, epitelyal-mezenkimal geçiş ve anjiyogenezi içerir. FAK-Rho-ROCK ardıl sinyal kaskadı, kanser hücrelerinin büyümesini, göçünü ve istilasını teşvik eder.

Fokal adezyonlar, hücre dışı mekanik ortamlar ile hücre içi biyokimyasal sinyal molekülleri / hücre iskeleti arasındaki etkileşimlerin ana bölgeleridir ve bu nedenle fokal adezyon proteinlerinin mekanotransdüksiyonda önemli roller oynadığı öne sürülmüştür. Hücrenin gerginlik homeostazını korumak için fokal adezyonlarda mekanotransdüksiyonun sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekirken hem yumuşak hem de sert mikro ortamlar kanser gelişiminin farklı adımlarına katkıda bulunur. Bu nedenle, fokal adezyonlardaki mekanotransdüksiyonun doğru anlaşılması, hücresel süreçlerin yanı sıra kanser gelişimi hakkında da önemli bilgiler sağlayacaktır. Bu bilgiler ışığında projemizde metastatik kolorektal kanser (KRK) hücre hattı üzerinde Fokal Adezyon Kinazın (FAK) inhibitörü olan Y-15 ile, Rho-ROCK sinyalizasyonunun ROCK inhibitor-2 ile ve YAP/TAZ proteinlerinin YAP/TAZ inhibitör-2 ile inhibe edilmesi sonucu kolorektal kanserin proliferatif ve metastatik karakteri inhibe edilecektir. Bu kombine tedavi yaklaşımının hücre iskeleti aracılığı ile mezankimal süreçte hücre sertliğini azaltarak hücreye esneklik kazandıran süreci sönmöleyeceğı öngörülmektedir.

Anahtar sözcükler: Kolorektal Kanser; Ekstraselüler matriks(ECM) ; Hücre sertliğı ; FAK-Rho-ROCK Yolağı ; YAP/TAZ Proteinleri ; Y-15 ; ROCK inhibitör-2 ; YAP/TAZ inhibitör-2

Tezin sayfa adedi: 57

Danışman: Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR

MECHANOBIOLOGICAL EFFECTS OF FAK-Rho-ROCK-CONNECTED SIGNAL CASCADE INHIBITION IN METASTATIC COLORECTAL CANCER

Master of Science Thesis

Serap TÜRKMEN

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY, INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Oncology

ABSTRACT

The reciprocal biochemical and physical interactions between tumor cells, stromal cells, and the extracellular matrix (ECM) remodel the extracellular matrix (ECM) in a specific tumor microenvironment. Changing microenvironment accelerates cancer progression. Cytoskeletal elements, especially microtubules, microfilaments and intermediate filaments, together with cytoplasmic components, regulate the viscoelastic behavior of the cell. Cell stiffness, a truly measured property for viscoelastic characterization of the cell, is defined as actin/myosin complexity and cytoskeletal deformation. These elements, which give structural strength and rigidity to the cell, also act as signal cascades that transform the physical microenvironment into a biochemical response. Rho-ROCK signaling is an important regulator of actomyosin contractility and regulates cell shape, cytoskeleton regulation and thus cell proliferation, differentiation, motility and cell attachment. FAK kinase activity is crucial for many cellular processes associated with cancer cell growth and metastasis. FAK also plays an important role in the regulation of the actin cytoskeleton by interacting with some regulatory proteins related to the activation of Rho family proteins. FAK kinase-dependent tumor cell processes include survival, proliferation, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition, and angiogenesis. The FAK-Rho-ROCK successive signaling cascade promotes growth, migration and invasion of cancer cells. Focal adhesions are major sites of interactions between extracellular mechanical environments and intracellular biochemical signaling molecules/cytoskeleton and therefore focal adhesion proteins have been proposed to play important roles in mechanotransduction. While tight regulation of mechanotransduction at focal adhesions is required to maintain the cell's tension homeostasis, both soft and hard microenvironments contribute to different steps of cancer development. Therefore, a proper

understanding of mechanotransduction at focal adhesions will provide important insights into cellular processes as well as cancer development. In the light of this information, in our project, we aimed to prevent colorectal cancer as a result of inhibition of Focal Adhesion Kinase (FAK) inhibitor Y15 on metastatic colorectal cancer (CRC) cell line, inhibition of Rho-ROCK signaling with ROCK inhibitor-2 and YAP/TAZ proteins with YAP/TAZ inhibitor-2. proliferative and metastatic character will be inhibited. It is predicted that this combined treatment approach will dampen the process that gives flexibility to the cell by reducing cell stiffness in the mesenchymal process through the cytoskeleton.

Key words: Colorectal Cancer; Extracellular matrix (ECM) ; Cell stiffness ; FAK-Rho-ROCK Pathway; YAP/TAZ Proteins; Y-15 ; ROCK inhibitor-2; YAP/TAZ inhibitor-2

Number of pages of the thesis: 57

Advisor: Prof. Dr. Yasemin BAŞBINAR

1. GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde diğer kanser türleri arasında üçüncü sırada görülen önemli bir mortalite sebebidir. Önemli bir sağlık sorunu ve bağlantılı sağlık bütçelerine etkisi nedeni ile yeni tedavi yaklaşımları üzerine çalışmaların olduğu bir alandır. Son yıllarda mekanobiyoloji üzerine yapılan çalışmalardan gelen bilgi birikimi bu alanı yeni tedavi hedefleri arasına koymuştur. Hücrenin ana mekanik yapılanması, bazal membran proteinleri ile hücre iskeleti arasındaki yapısal bağlantı ve fonksiyonel sinyal iletiminin gerçekleşmesine fokal adezyonlar öncülük eder. Fokal adezyonlarda ekstrasellüler matriks, integrinler ve hücre iskeleti arasında enzimatik aktiviteye de sahip olan FAK önemli bir aktör olarak ön plana çıkmaktadır. Bu bağlamda bir ilaç hedefi olarak tümör hücrelerinde yapılan mekanistik temelli çalışmalarda FAK hedefli PF-228, PF-271, NVP-TAE 226, CFAK-C4 ve Y-15 gibi ajanlar çoğunlukla tekli halde kullanılmış, buna ek olarak ikili kombinasyon çalışmaları da bulunmaktadır. Y-15 ilacının tekli ve ikili ilaç kombinasyonları uygulaması sonucunda meme ve pankreas kanserlerinde güçlü bir inhibitör olduğu tespit edilmiştir.

ROCK hedefli olarak yapılan çalışmalarda fasudil (HA-1077) ilacının kanser hücrelerinin toplu hareketini bozarak metastazı engellediği görülmüştür. AT13148, anti-kanser ajanı olarak klinik çalışmalarda değerlendirilen ROCK/AKT inhibitörüdür. ROCK inhibitörleri ile akciğer, pankreas kanseri ve lösemi gibi hastalıklarda yapılan birçok çalışma bulunmaktadır ancak henüz kliniğe yansıyan bir aday ilaç önerilememiştir. YAP ve TAZ hippo yollarına yönelik SWI/SNF kompleks ajanları birlikte kullanılarak anti kanser etkinlikleri gözlemlenmiştir. Son yapılan kolorektal kanser çalışmalarında, tekli veya ikili kombinasyon tedavisinde oldukça sık kullanılan bevacizumab ilacının ECM birikimini arttırdığı görülmüştür. Bu doğrultuda hücre sertliğine yönelik yapılan çalışmaların artırılması gerekmektedir.

Yukarıda ismi geçen inhibitörlerin farklı kanser türlerinde tek ajan olarak kullanılması şeklinde planlanan çalışmalar bulunmaktadır, ancak her üç ajanın kolorektal kanserde birlikte kullanılması ile planlanan bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan araştırmalarda FAK-Rho-ROCK ardıl sinyal kaskadını hedef alan bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Bu çalışmada metastatik kolorektal kanser (KRK) hücre hattı üzerinde üçlü ilaç kombinasyonu uygulaması için 8-Point Half Logarithmic Serial Dilution yöntemi kullanılarak, Fokal Adezyon Kinazın (FAK) antikor olan Y-15 ile, Rho-ROCK sinyalizasyonunun ROCK inhibitör-2 ile ve YAP/TAZ proteinlerinin YAP/TAZ inhibitör-1 ile inhibe edilmesi sonucu kolorektal kanserin proliferatif ve metastatik karakterine olan etkisinin incelenmesi ve hücre sertliği ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

1.2 Araştırmanın Amacı

Metastatik kolorektal kanserin kötü prognozu ile ilişkilendirilmiş mekanosensitif Fokal Adezyon Kinaz (FAK), Rho/ROCK ve YAP/TAZ yollarının inhibisyonu ile proliferatif karakteri ve metastatik fenotipe geçiş sürecini sönmöleyecek Y15, ROCK inhibitör-2 ve YAP/TAZ inhibitör-2 ajanlarının kombine kullanımını içeren bir tedavi stratejisi oluşturmaktır.

1.3 Araştırmanın Hipotezi

Metastatik kolorektal kanserde FAK, Rho, ROCK eksenindeki moleküllerin inhibisyonu yanında YAP/TAZ yolağının dual inhibisyonu proliferatif ve metastatik karakteri önler.

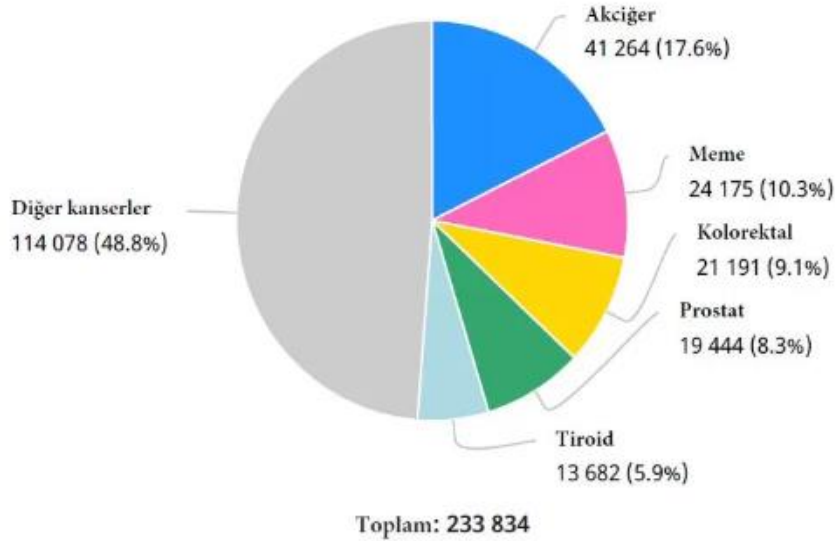
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi

Gelişmekte olan ülkelerde kolorektal kanser (KRK) insidansının 2035 yılında 2.5 milyon yeni vakaya artış göstereceği tahmin edilmektedir. Hastalığın son zamanlarda 50 yaş altındaki bireylerde gözlemlenmesi ve artışı da söz konusudur. Genetik, obezite, çevresel faktörler, radyasyon, enfeksiyon, çeşitli kimyasal maddeler, UV ışınları vb. ile bu artış hızı arasında ilişki bulunmasına rağmen, kesin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır. Kadınlarda en sık teşhis edilen ikinci, erkeklerde ise üçüncü kanser türüdür (1).

Kolorektal kanser (KRK), tüm kanserlerin %10,2'lik insidansı ve %9,2'lik ölüm oranı ile dünyadaki en yaygın üçüncü kanserdir (2).

Kolorektal kanserin kadın ve erkeklerde en sık görülen 3. kanser olması dikkat çekicidir



(3).

Şekil 1. Ülkemizde 2020' de kanser türlerinde her iki cinsiyet ve her yaştan yeni vaka sayısı (3).

2.2 Kolorektal Kanser Tedavisi

Kolorektal kanser için standart tedaviler cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi olmuştur. Bununla birlikte, bu tedavilerin çoğunun büyüyen ve bölünen normal hücreler de dahil olmak üzere herhangi bir hücreye karşı spesifik olmaması ve sitotoksitesi nedeniyle çeşitli yan etkileri vardır. Ayrıca birçok hastada tedavi süreçlerinden sonra hastalığın nüksetmesi söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle, KRK hastalarını tedavi etmek için daha alternatif ve etkili tedavi yöntemlerinin üretilmesi çok önemlidir (4).

Son yıllarda metastatik kolorektal kanser (mKRK) tedavisinde yeni tedavi protokolleri oluşturulmaktadır. Kanser için FAK (Fokal Adezyon Kinaz) hedefleme doğrultusunda yapılan faz çalışmalarının sonuçları, bu yönde inhibitörlerin kombinasyon tedavisinde en iyi tedavi yöntemi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. FAK hedefli ajanlar ve bunlarla yapılan mekanistik temelli farmakodinamik çalışmalar çok çeşitli şekillerde klinik geliştirme sürecine girmektedir ve kanser hastalarının yaşamlarını iyileştirme potansiyeline sahiptir. Bu ajanlar; PF-228, PF-271, NVP-TAE226, Y-15, CFAK-C4 şeklinde sayılabilir. Bunlardan ATP bağımlı olmayanlar Y-15 ve CFAK-C4 olup protein-protein etkileşimini keserek anti-kanser özellik sağlamaktadırlar. ATP bağımlı inhibitörlerden NVP-TAE226 ilacı FAK ve insülin benzeri büyüme faktörü-1(IGF-IR) reseptörünü inhibe eder. Özellikle kolorektal kanser üzerinde PF-271, PF-04554878 etkili ilaçlardır (5). Y-15 ve Temozomide ilaçlarının kombinasyonunun bazı kanser hücrelerinde etkili sonuçlar ortaya koyduğu görülmüştür (6). Y-15 ilacının prelinik farmakodinamik ve stabilite çalışmasında tümör büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Y-15 toksisite çalışması kolorektal kanser ve diğer kanser türlerinde gelecek için bir temel sağlamaktadır (7).

ROCK inhibitörleri ile bazı kanser türleri üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. AT13148, solid tümörlü hastalarda güçlü bir anti-kanser ajanı olarak klinik bir çalışmada değerlendirilen ilk ikili ROCK-AKT inhibitörüdür (8). ROCK inhibisyonu için ROCK inhibitörü olan fasudil (HA-1077), kemoterapi etkinliğini arttırdığı görülmüştür (9).

YAP/TAZ hippo yolağı GPR35 antagonisti olan CID-2745687 ile bloke edilerek kolorektal kanser ve diğer kanserlerde etkili olduğu görülmüştür (10). ARID1A içeren SWI/SNF kompleks proteinleri (ARID1A/SWI/SNF) YAP ve TAZ inhibitörü olarak çalışır. YAP/TAZ son zamanlarda kanserin önlenmesinde hücre mekaniği ile ilişkili olarak

mekanotransdüksiyona karşı doku mikroçevrelerinin yapısal ve mimari özelliklerini etkileyen temel sensörler olarak bilinmektedir (11)

Son yıllarda hücre sertliği ile ilgili çalışmalarda ilerlemiş kolorektal kanser hastalıklarının kombinasyon tedavisinde önemli bir rol oynayan anti-VEGF monoklonal antikoru olan bevacizumab ilacının, doza bağlı bir şekilde kolon kanseri hastalarındaki karaciğer metastazlarında ECM birikimini arttırdığı tespit edilmiştir. Matriks sertliği, fokal adezyon kinaz-yes-ilişkili protein yolu aracılığıyla HSC'lerde lipolizi aktive ettiği gözlemlenmiştir (12).

2.3. Kolorektal Kanserde FAK-Rho-ROCK Bağlantılı Sinyal Kaskadı

2.3.1. FAK-Rho-ROCK Bağlantılı Sinyal Kaskadı

Yapılan araştırmalar sonucu tümör hücreleri, stromal hücreler ve ekstraselüler matriks (ECM) arasındaki karşılıklı biyokimyasal ve fiziksel etkileşimler özel bir tümör mikroçevresinin oluşumu ile sonuçlandığı tespit edilmiştir. Tümör mikroçevresinin tamamlayıcı hücreleri, bağışıklık hücrelerini filtreler. Aynı zamanda beslenmelerini ve desteklenmelerini sağlar ve ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden yapımını ve modellenmesini sağlar. Böylece tümör mikroçevresindeki bu değişimler, kanser progresyonunu hızlandırır. ECM tümör mikroçevresinin hücresel olmayan bir bileşenidir ve tümör hücreleri için hem fiziksel hem biyokimyasal destek sağlar. Mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentler hücrenin temel görevlerini yerine getiren ve yapısal kararlılığını sağlayan temel bileşenleridir. Bu hücre iskeleti elemanları diğer sitoplazmik bileşenler ile birlikte hücrenin viskoelastik davranışlarını gerçekleştirmesini sağlar. Hücrenin viskoelastik karakterizasyonu için gerçek anlamda ölçülen bir özellik olan hücre sertliği, aktin / miyozin karmaşıklığı ve hücre iskeleti deformasyonu olarak tanımlanmaktadır.

Rho-ROCK sinyali, aktomiyozin kontraktilitesinin önemli bir düzenleyicisidir ve hücre şekli, hücre iskeleti düzenlenmesi ve dolayısıyla hücre poliferasyonu, farklılaşması, hareketliliği ile hücre bağlanmasını düzenler. FAK kinaz aktivitesi, kanser hücre büyümesi ve metastazı ile ilişkili birçok hücresel süreç için çok önemlidir. FAK aynı zamanda Rho ailesi proteinlerinin aktivasyonuna bağlı bazı düzenleyici proteinlerle etkileşimi ile aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenir.

FAK kinaza bağlı tümör hücresi süreçleri, hayatta kalma, çoğalma, göç, istila, epitelyal-mezenkimal geçiş ve anjiyogenez içerir. FAK-Rho-ROCK ardıl sinyal kaskadı, kanser hücrelerinin büyümesini, göçünü ve istilasını teşvik eder (13).

2.3.2. *Tümör Mikroçevresi (Ekstraselüler Matriks)*

Tümör hücreleri, stromal hücreler ve ekstraselüler matriks (ECM) arasındaki karşılıklı biyokimyasal ve fiziksel etkileşimler özel bir tümör mikroçevresinin oluşumu ile sonuçlanır.

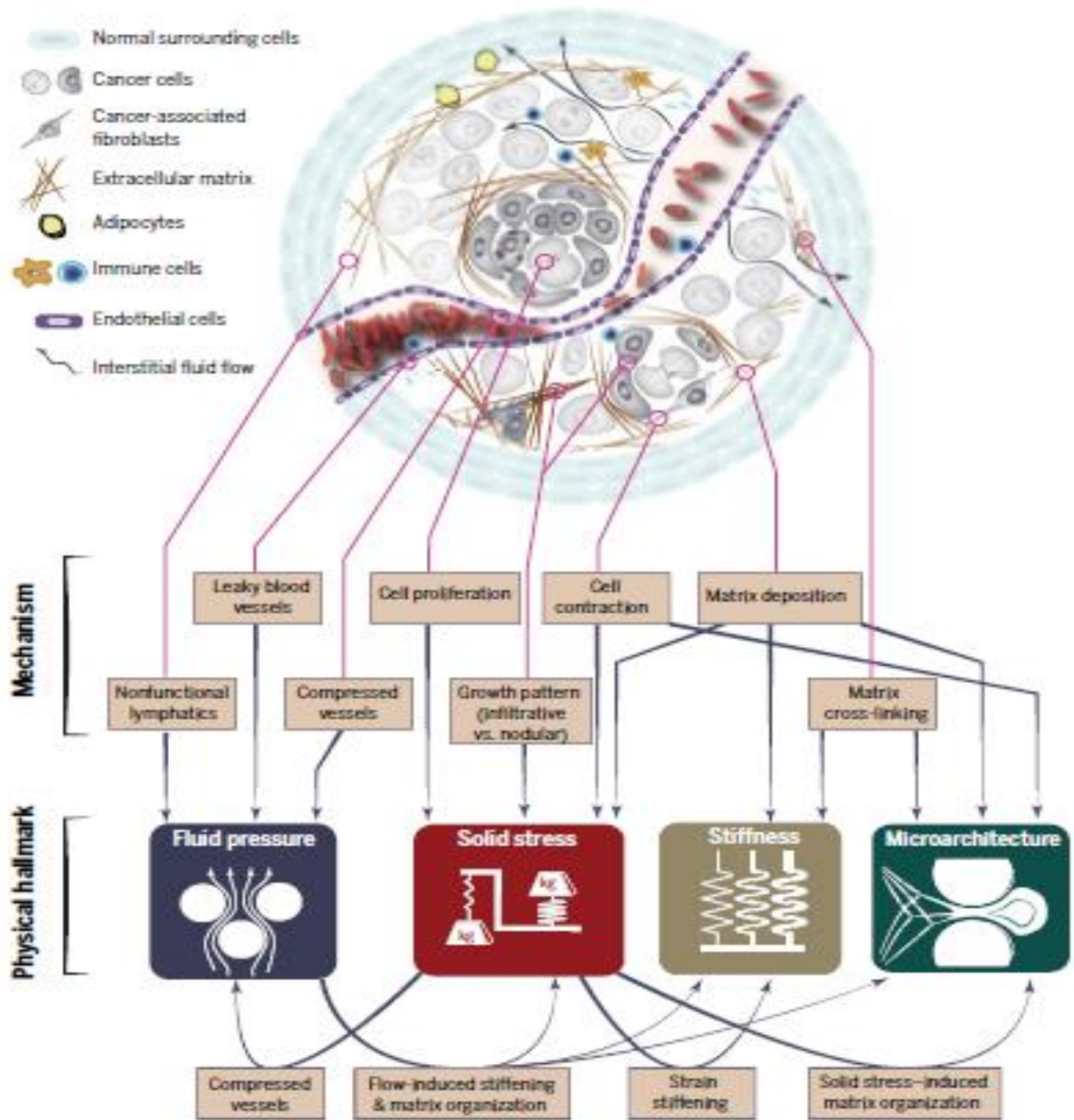
Tümör mikroçevresinin tamamlayıcı hücreleri, bağışıklık hücrelerini filtreler. Aynı zamanda beslenmelerini ve desteklenmelerini sağlar ve ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden yapımını ve modellenmesini sağlar. Böylece tümör mikroçevresindeki bu değişimler, kanser progresyonunu hızlandırır. Metastazla sonuçlanan tümör progresyonu, kanser mortalitesinin temelini oluşturur. Hücreler tarafından fiziksel ve biyokimyasal kuvvetlere karşı verilen yanıtlara ilaç etkileşimi sağlamak metastazı önlemede önemli bir rol oynar (13).

Ekstraselüler matriks (ECM), hücreler tarafından oluşturulan, hücrelerin etrafını çevreleyen, yapısal ve biyokimyasal desteklik sağlayan moleküllerin bir bileşeni olarak tanımlanır (14,15). ECM bileşimi bir organdan diğerine farklıdır. Ama temel işlevleri hücreden hücreye haberleşme sağlamak, hücrelerin yapışmasını sağlamak ve aynı zamanda hücrelerel farklılaşmada rol oynamaktır. ECM tümör mikroçevresinin hücrelerel olmayan bir bileşeni olarak, tümör hücrelerine fiziksel ve biyokimyasal desteklik sağlar (16).

Artan mekanik gerilmeler olarak da tanımlanan katı stresi, ekstraselüler matriks (ECM) ile hücrelerin katı ve elastik elemanları tarafından etkileşim yaratan basınç, çekme ve kesme gibi mekanik kuvvetleri içerir (17). Antikanser terapötikleri tümör hücrelerinin sayılarında azalma sağlar. Böylece tümör mikroçevresindeki katı stres ve bunun sonucunda kan damarlarında baskı azalır (18,19).

Kanser hücrelerindeki etkileşimler; birbirine bağlı mekanizmalar ve farklılıklar sayesinde tümörlerin fiziksel özelliklerinin değişimine neden olur. Sızdıran ve sıkıştırılan kan damarları ve fonksiyonel olmayan lenfatikler; tümör içinde ve kenarında artan interstisyel sıvı basıncı ile sıvı akışına neden olur. Hücrelerel çoğalma, matriks birikimi, hücre kasılması ve anormal büyüme paternleri sıkıştırıcı ve gerilebilir mekanik streslere yol açar.

Matriks birikimi ve çapraz bağlanmalar tümörlerde doku sertliğinin artmasına neden olur. Aynı zamanda hücre kasılması, matriks birikimi ve çapraz bağlanmalar dokuların yapılaşmasını da değiştirir. Ayrıca fiziksel özellikler, birbirleriyle etkileşime girerek, oluşturdukları stresle kan ve lenf damarlarını sıkıştırır ve tümör içinde sıvı basıncının artmasına neden olur. Sıvı akışı fibroblastları aktive eder daha sonra mekanik stres ile doku sertlik derecesi artar ve ECM yapısında değişime neden olur (20).



Şekil 2. Fiziksel kanser niteliklerinin temellendirilmesi (20)

2.3.3. Hücre Sertliği

Bir hücrenin mekanik özellikleri; hücre hareketliliği, yapışma, hücre bölünmesi ve hücresel çoğalma gibi bazı hücresel proseslerde önemli bir rol oynar (21,22, 23,24). Hücreler kendi mikroçevresindeki mekanik değişiklikleri algılar ve bunlara biyokimyasal yanıtlar verir. Hücre mekaniği, tümör oluşumunda, kanser invazyonunda ve metastazda oldukça önemlidir (25). Bunun için, kanser hücrelerinin kazandıkları mekanik değişiklikleri veya ECM etrafındaki

farklı seviyelerde baskıları üzerine yapılan çalışmalar, kanser metastazını aydınlatmada temel oluşturmaktadır (26,27).

Mikrotübüller, mikroflamentler ve ara flamentler hücrenin temel görevlerini yerine getiren ve yapısal kararlılığını sağlayan temel bileşenleridir. Bu hücre iskeleti elemanları diğer sitoplazmik bileşenler ile birlikte hücrenin viskoelastik davranışlarını gerçekleştirmesini sağlar (28). Aktin flamentleri hücre iskeletinin en temel bileşenleridir. Aktin polimerizasyon ve depolimerizasyon süreçleri hücreyi dış streslere karşı duyarlı hale getirir. Hücrenin viskoelastik karakterizasyonu için gerçek anlamda ölçülen bir özellik olan hücre sertliği, aktin/miyozin karmaşıklığı ve hücre iskeleti deformasyonu olarak tanımlanmaktadır (29). Bununla birlikte, özellikle stromal tümörlerde ECM artışının da katkıda bulunduğu matriks sertliğinin artışı buna bağlı olarak kanser stromasında doku sertliğinin daha fazla olduğu bilinmektedir (30,31).

2.3.4. Fokal Adezyon Kinaz (FAK) Yapısal Özellikleri

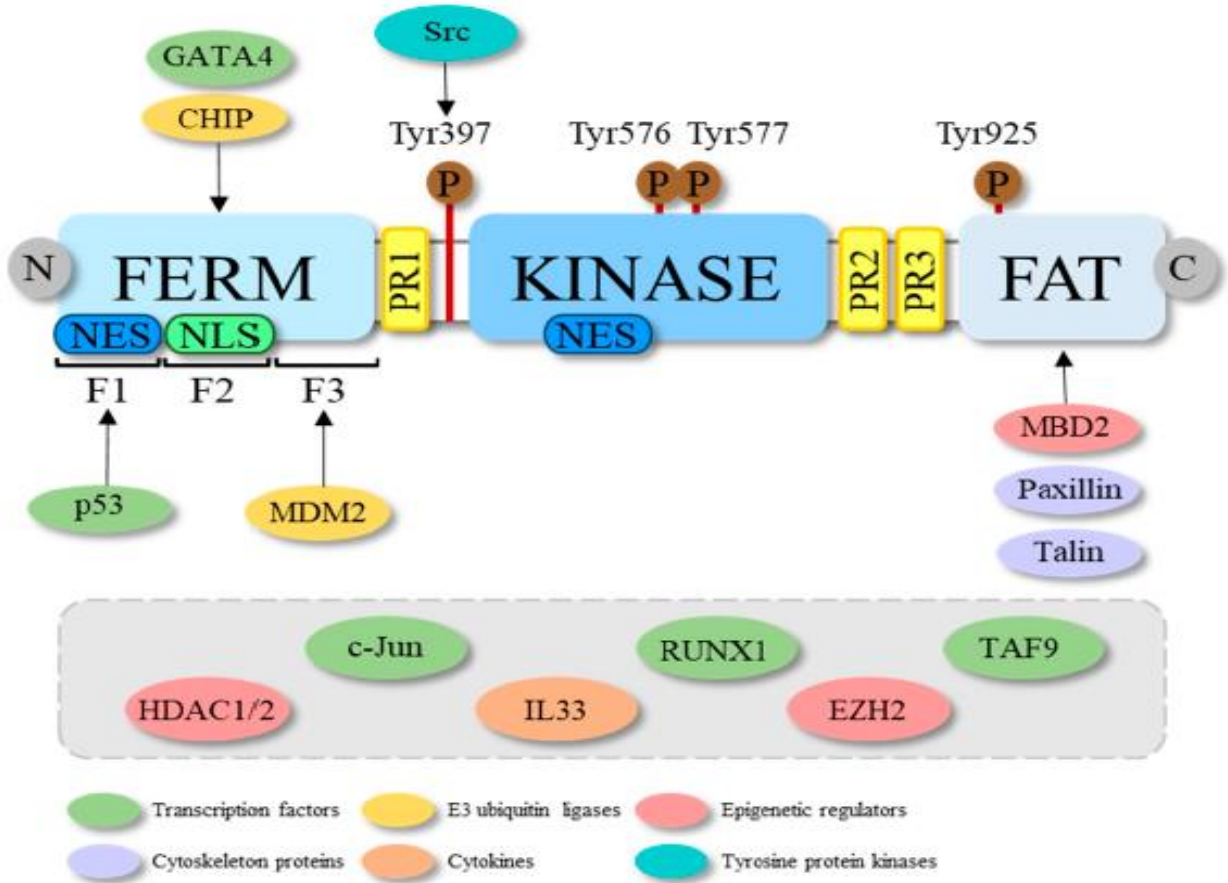
Fokal adezyon kinaz (FAK), hücrenin hayatta kalması, poliferasyonu, apoptozu, göçü ve mekanik transdüksiyonu dahil, farklı hücresel proseslerin düzenlenmesinde görevli, moleküler ağırlığı 125kDa olan reseptör olmayan bir tirozin kinazdır (32). Yaygın bir lokalizasyon ile farklı hücre tiplerinde plazma zarı ve sitoplazma gibi kısımlar için eksprese edilir. FAK, ekstraselüler matrikse (ECM) yanıt olarak sinyal olaylarını düzenleyen fokal adezyon olarak adlandırılan (FAs) diğer hücre altı yapılarla ilişkilendirilen merkezi bir proteindir (33). Aslında FAK uzun bir süre, ilgili noktalarda ilişkili olduğu birkaç proteinle yerleşim gösteren, önemli ölçüde büyüme faktörleri veya integrinler tarafından tetiklenen, yalnızca ekstraselüler sinyallerin merkezi dönüştürücüsü olarak kabul edildi. Son on yılda, vücutta bağımsız kinaz rolü, kinaza bağlı fonksiyonlar ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde FAK ile ilgili beklenmedik yeni durumlar keşfedildi (34,35).

Yapılan birkaç çalışma FAK 'ın anjiyogenezi düzenleme, bağışıklık hücrelerini iyileştirme, ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden şekillenmesi ve epitelyal mezenkimal transformasyon gibi durumları yönetme yeteneğini ortaya koymuştur (36,37). Son yirmi yılda yapılan çalışmalar, FAK'ın kanser gelişimi (farklı tümör türlerini teşvik etme) ve ilerlemesinde önemli bir role sahip protein olduğunu desteklemiştir (38,39).

FAK yapısal olarak; N-terminal FERM alanı, merkezi kinaz alanı ve C-terminal FAT alanı adında 3 ana alan içerir. FERM alanı; aralarında p53 ve GATA 4 olan transkripsiyon faktörlerine bağlı F1, F2 ve F3 olarak üç lob ve E3 ubiquitin ligazlar içerir. FERM alanında F1

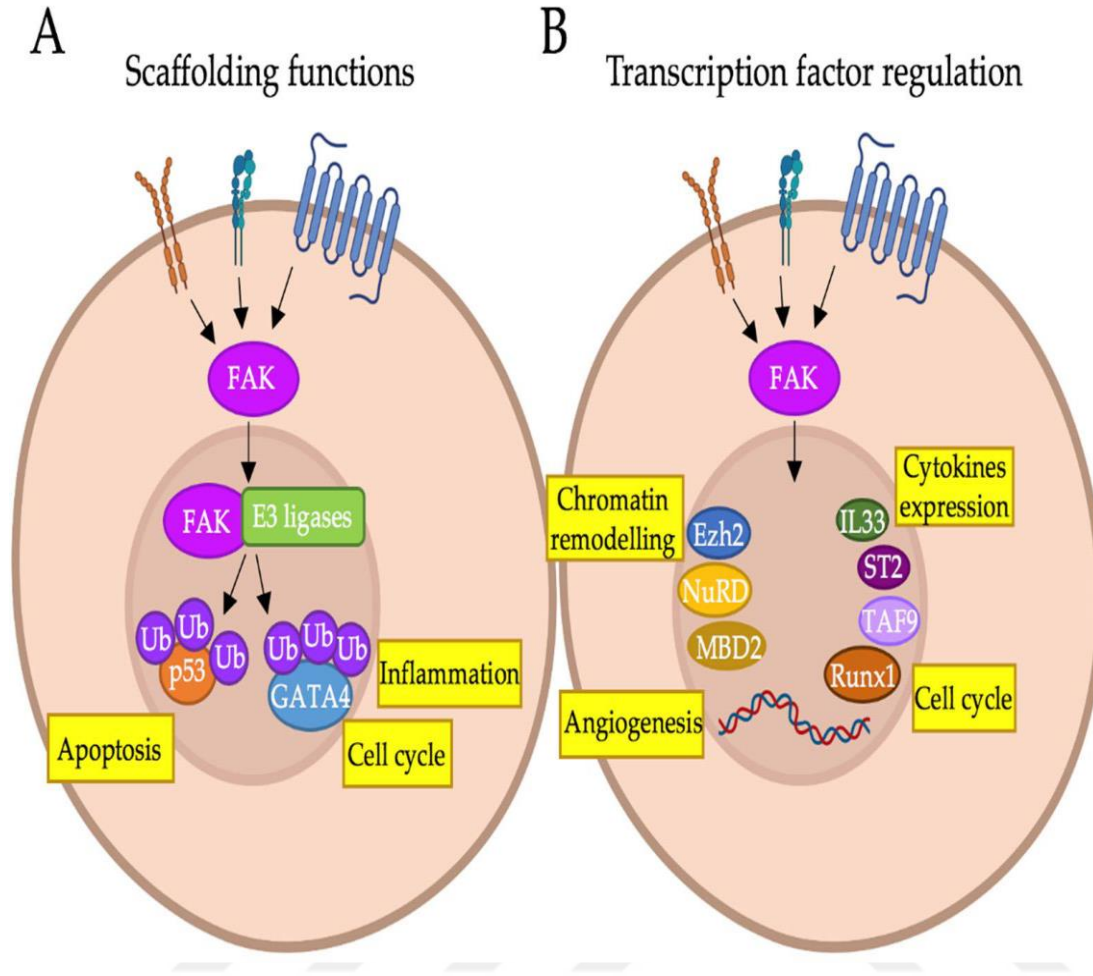
lobunda NES (nükleer export signal) ve F2 lobunda NLS (nükleer localization signal) bölgeleri bulunur. NES aynı zamanda kinaz domain alanında da bulunmaktadır.

FAK yapılaşması, farklı proteinlerin Src homoloji (SH)3 alanı için bağlayıcı alanlarda görev yapan 3 proline-rich (PR) bölgeleri ve ana fosforilasyon bölümleri (P) içerir. Özellikle Tyr397 aktivasyon alanı, Tyr576 ve Tyr577 için ve SH2 alanları için Tyr925 bağlanma bölgesidir (40,41).



Şekil 3. FAK'ın moleküler yapısı ve metabolik etkileşimlerinin şematik gösterimi (40)

Bazı kanıtlar, kinaz aktivitesinin inhibisyonu ile stres sinyallerinin aktivasyonu ve ECM den hücrelerin ayrılması gibi spesifik koşullara yanıt olarak, FAK'ın çekirdeğe yer değiştirebileceğini göstermektedir. Nükleus içinde FAK, çeşitli transkripsiyon faktörlerini kontrol etmektedir (34).



Şekil 4. Çekirdekteki FAK işlevleri (40)

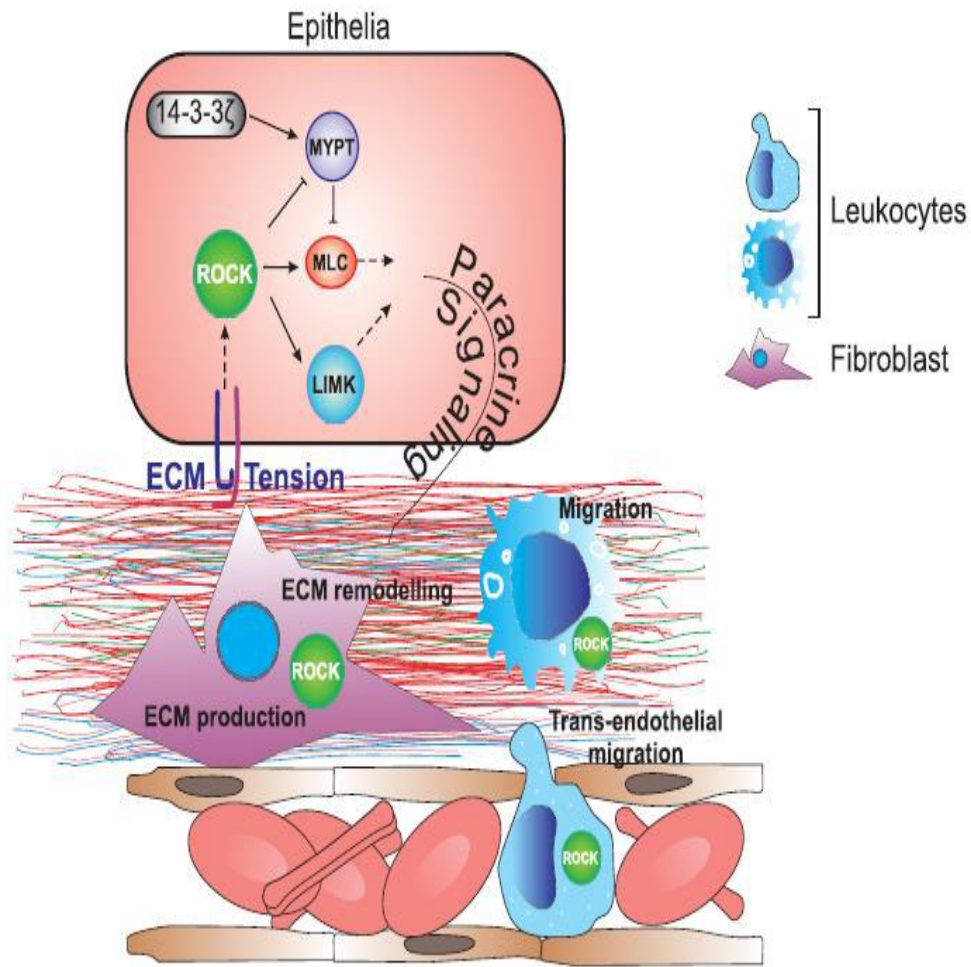
2.3.5. Rho-ROCK Yapısal Özellikleri

Ras homoloji proteinleri 22 küçük GTPazdan oluşan bir ailedir ve Ras süper ailesinin üyeleridir (42). İnaktif bir GDP-bağlı form ile aktif bir GTP-bağlı durum arasında gidip gelirler ve Rho GTPazların en sık çalışılan üç üyesi RhoA, Rac1 ve Cdc42'dir. RhoA, serin-treonin kinaz ailesine ait olan Rho-ilişkili protein kinaz (ROCK) üzerine etki eder. Başlıca biyolojik işlevleri arasında aktin polimerizasyonunun düzenlenmesi, miyozin kontraktilesi, ara filament bağlantısı ve ön-arka polaritenin oluşturulması yer alır. Bu faaliyetler hücre çoğalması, göç, kasılma ve hücre-matriks etkileşimleri gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde esastır (43).

RhoA ve RhoC, Rho ile ilişkili iletim efektörleri özel kinazlar yani ROCK1 ve ROCK2 aracılığıyla temel hücre iskeleti özelliklerini düzenler. ROCK proteinleri; aktin depolimerizasyonunu kontrol eden LM kinaz (LIMK), miyozin ışık zincirini düzenleyici

MLC2, miyozin kontraktilesini düzenleyen MYPT (miyozin fosfataz) kinazları içeren hedef substratlara sahip Ser-Thr kinazlarıdır. RhoA ve ROCK hücrelerin ameboid göçü için gereklilikleri gösterilmiştir (44).

Klinik öncesi kanıtlar kanserlerin malignitesini arttırmada Rho-ROCK sinyalinin rolünü desteklemektedir. Tümör hücreleri büyüme veya metastaz için kendi biyokimyasal savunma olaylarını kullanırlar ve bağışıklık hücrelerinin hedef alanlarındaki mikroçevreden uzaklaşırlar (45,46).



Şekil 5. Rho-ROCK sinyali, tümör ilerlemesini pozitif feedback ile destekler (46)

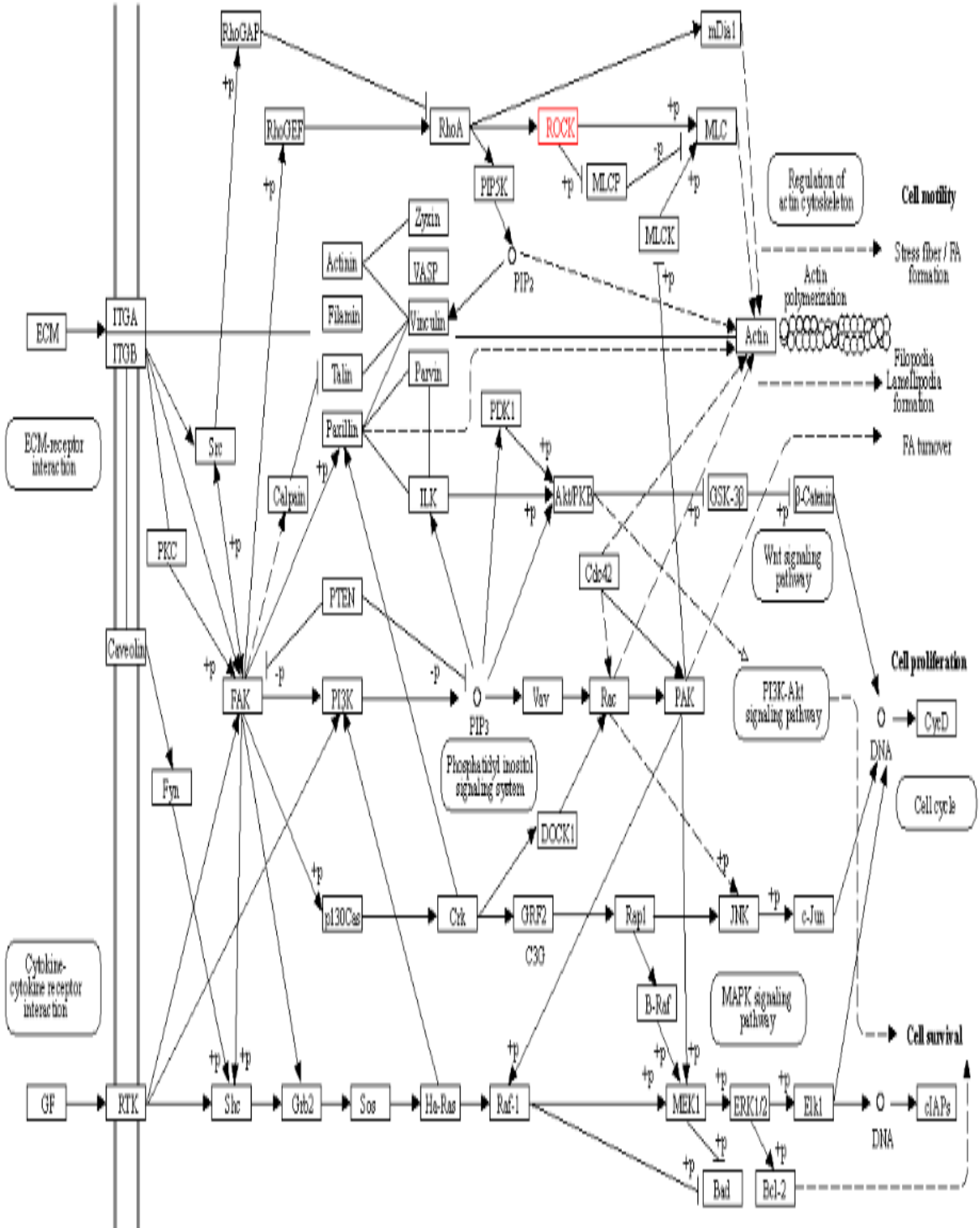
ROCK aktivitesi, aktin polimerizasyonu ve miyozin kontraktilitesi artan epitel hücrelerinde kanonik hedefleri MLC2 ve LIM kinazların fosforilasyonu ile sonuçlanır. Bu da tümör mikroçevresinde ECM bileşenleri için üretimine bağlı olarak parakrin sinyal mekanizmasını başlatır.

Artan ECM üretimi, hücre dışı gerilimi artırır. Bu ROCK proteinini etkinleştirmek için integrin ligasyonu ve aktivasyonu yoluyla geri beslenir. Bu durum mikroçevrenin bağışıklık hücre bileşenleriyle benzerdir (47).

FAK aynı zamanda Rho ailesi proteinlerinin aktivasyonuna bağlı birkaç düzenleyici proteinle de etkileşime girerek aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (48).



FOCAL ADHESION



Şekil 6. Focal adhesion – KEGG: Kyoto Ency (map04510, 10/04/2022 tarihinde alındı)

FAK-Rho-ROCK ardıl sinyal kaskadı, kanser hücrelerinin büyümesini, göçünü ve istilasını teşvik eder. Kanser hücreleri, tipik olarak hücre ölümüne karşı giderek artan bir direnç gösterir. YAP/TAZ proteinleri de kanser hücrelerinin bazı temel özelliklerini güçlendirir. YAP/TAZ sürekli aktivasyonu anormal hücre poliferasyonunu destekler. İnsan kanserlerinde önemli rol üstlenen çeşitli inhibitörler, küçük moleküllerle kanser tedavisi için umut verici bir hedef olarak ortaya çıkmaktadır (49).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu tez çalışması *in vitro* deneysel bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Bu tez çalışması Eylül 2022-Mayıs 2024 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Temmuz 2022	Etik kurul hazırlanması ve onayı
Ekim 2022	Tez önerisinin hazırlanması ve onayı
Ocak-Haziran 2023	Malzeme alımları
Temmuz 2023- Şubat 2024	Hücre kültürü, IC50 dozlarının bulunması
Aralık 2023- Şubat 2024	Elisa, immunfloresan boyamalar
Mart- Mayıs 2024	İstatistik, Tez yazımı

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Bu araştırma ticari olarak sağlanmış kolorektal kanser hücre hattı HCT-116 ile gerçekleştirilecektir. Hayvan veya insan çalışmasını kapsamamaktadır, bu nedenle çalışmaya gönüllü dahil edilmesi de söz konusu değildir.

3.4. Çalışma Materyali

Bu tez çalışması kapsamında American Type Culture Collection'dan (ATCC®) ticari olarak temin edilen insan kolorektal kanser karsinom hücre hattı olan HCT116 (CCL-247™) kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Hücre davranışlarını gösteren, proliferasyon, yara kapanması, FAK, Rho-ROCK bağımlı değişken; Y-15, ROCK inhibitor-2, YAP/TAZ inhibitor-2 ilaçları bağımsız değişkendir.

3.6. Veri Toplama Araçları

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

Çalışma kapsamında kullanılan malzemelerle ilişkili bilgiler aşağıdaki Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 1. Araştırmada kullanılan malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
HCT116 kolorektal kanser hücre hattı	ATCC- HTB-14	<i>In vitro</i> hücre kültürü için kullanıldı.
DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine	Cegrogen Biotech GmbH-E0500-160	Kolorektal kanser hücre hattının kültür edilmesi için kullanıldı.
Penisilin- Streptomisin (10,000U/ml)	Cegrogen Biotech GmbH-P0100-790	Kolorektal kanser hücre hattının kültür edilmesi için kullanıldı.
Fetal sığır serum (FBS)	Cegrogen Biotech GmbH-A0500-3030	Kolorektal kanser hücre hattının kültür edilmesi için kullanıldı.
Trypsin-EDTA (0.05 %) in DPBS (1x)	Cegrogen Biotech GmbH-N0100-720	Hücre kültürü için kullanıldı.
Tripan mavisi	Sigma Aldrich- T8154	Hücrelerin sayımında kullanıldı.
Dimetil sülfoksit (DMSO)	PanReac AppliChem-A3672,0250	İlaç dilüsyonu ve hücre saklama çözeltisinde kullanıldı
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (10X) (PBS)	Cegrogen Biotech GmbH-H0500-550	Kolorektal kanser hücre hattının kültür edilmesi için kullanıldı.
WST-1 reaktifi	Roche- 05015944001	Hücre canlılık reaktifi olarak kullanıldı.
Alexa Fluor-488-goat anti-mouse	Life Technologies-A10667	İmmünofloresans boyamalarda E-kaderin için sekonder antikor olarak kullanıldı.
Hoechst 33342	Thermo Fisher- H3570	Hücrelerin çekirdekleri boyandı
Paraformaldehit solüsyonu%4	ChemCruz- sc281692	İmmünofloresans boyamalarda boyama öncesi hücrelerin fiksasyonunda kullanıldı ve sekonder antikor olarak kullanıldı.

3.6.1. Hücre Kültürü

Bu projede Kolorektal kanserin in vitro koşullarda modellenenilmesi için ticari kolon kanseri hücre hattı HCT-116 (ATCC® CCL-247) kullanılmıştır. HCT 116 (ATCC® CCL-247) hücre hattı yetişkin bir erkek kanser hastasının kolonundan izole edilen Dukes D evresindeki primer kolon kanseridir. Ras proto-onkogeninin 13. kodonunda mutasyona sahiptir. Bu hücre hattı KRAS ve PIK3CA onkogenleri için pozitif yanıt oluştururken BRAF, PTEN ve TP53 onkogenlerinde yabancı tiptir. Bu hücre hatları sağlayıcılarının önerdiği tamamlanmış besi ortamları içerisinde %1 penisilin streptomisin ve %10 Fetal Bovine Serum (FBS) takviyesi ile büyütüp çoğaltılmıştır. Hücreler 37°C derecede nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosfer koşullarını sağlayan hücre kültürü inkübatörü içerisinde kültürlenmiştir. İlk üç tripsinizasyon sonrası elde edilen pasajlar %90 FBS %10 DMSO içerisinde kademeli olarak dondurularak sıvı azot içerisinde saklanmıştır.

Tablo 2. HCT-116 Hücre hattının karakteristik özellikleri

Hücre	Hasta Bilgisi	Doku	Hastalık	Morfoloji	Mutasyon
HCT-116	Yetişkin/Erkek	Kolon	Kolorektal Karsinom	Epitelyal	RAS-kodon 13

Tek tabaka (monolayer) olarak büyüyen hücreler istenilen çoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır.

Hücre pasaj(tripsinizasyon) aşamaları:

1. Flasktaki hücre kültür ortamı flask dik tutularak hücrenin yapıştığı duvara değmeyecek şekilde serolojik pipetle ortamdan uzaklaştırıldı. Ardından hücre tabanına değmeyecek şekilde hücreler 3-4 ml steril fosfat tamponu (Phosphate buffer solution, PBS) flask alt köşesine konuldu ve tüm hücre yüzeyi yıkanabilmesi amacıyla sağ sol kısımlara verilerek yıkandı. Bunun amacı flask içerisindeki ölü hücreleri uzaklaştırmak ve tripsin/EDTA enziminin inhibe olmasını engellemektir.

2. PBS ile yıkama sonrası flask içerisindeki hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için 1 ml tripsin/EDTA enzimi kullanıldı ve 37°C’de (optimum sıcaklıkta) 3 dk (dakika) inkübatöre bırakıldı. Tripsin, hücrelerin birbirine ve zemine tutunmalarını aralarda oluşan protein

kanallarını keserek engelleyen bir enzimdir. Edta ise iyonları tutarak hücrelerin zemine yapışmasını engeller.

3. İnkübasyon işleminin ardından, hücrelerin tripsin/EDTA hasarına uğramaması için hücre süspansiyonu üzerine 2 ml (enzim miktarının 2 katı) hücre kültür ortamı eklendi. Daha sonra hücre süspansiyonu 15ml'lik santrifüj tüplerinde 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi.

4. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 5 ml hücre ortamı iyice pipetaj yapılarak süspanse edildi.

5. Hücreler thoma lamında sayıldı ve hesaplamalar ardından 10^6 hücre 25 cm^2 'lik flask içerisine alınıp hücre devamlılığını sağlamak için pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Ekim yapılmamış hücreler ise bir sonraki deneylerde kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurularak saklandı. Dondurma aşamaları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

Hücre dondurma aşamaları:

1. Tripsin/EDTA enzimi uzaklaştırıldıktan sonra süspanse edilen hücreler sayıldı.
2. Süspanse olarak bulunan hücreler 1500 rpm'de 5 dk boyunca $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Dondurma ortamında DMSO bulunduğu için hücreler ışıktan korunarak çalışıldı.
3. Üzerinden süpernatantı atılan hücrelerin üzerine dondurma ortamından (%90 FBS ve %10 DMSO) 1'er ml eklenip pipetaj yapılarak süspanse edildi. Her tüpe 10^6 hücre eklendi ve önce $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık 2 saat sıcaklığın derecesi düşürülerek $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılan hücreler donduruldu.

3.6.2. Y-15, ROCK inhibitor-2 ve YAP/TAZ inhibitor-2 Çözeltilerinin Hazırlanması

Y-15 ilacı 1,39 mg (0,00139g) olarak kullanım için belirlendi. Bu miktar için çözülmesi gereken hacim 4,89 ml olarak belirlendi. İstenilen hacim doğrultusunda PBS de çözüldü. Ardından mikrosantrifüj tüpler içerisinde uygun hacimlerde (her biri için 200 μl) bölüştürülerek, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ derin dondurucuda saklandı.

ROCK-inhibitor-2 ilacı, 0,99 mg olarak kullanım için belirlendi. Çözülmesi gereken hacmi 600 μl olarak belirlendi. 600 μl lik pipet yardımı ile alınan DMSO çözme işlemi için, içinde ilaç olan ependorfa aktarıldı. Daha sonra mikrosantrifüj tüpler içerisinde uygun hacimlerde (25 μl) paylaştırılarak, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ derin dondurucuda saklandı.

YAP/TAZ inhibitor-2 ilacı, 2,66 mg olarak belirlendi. 2,93 µl hacimde DMSO da çözüldü. Mikrosantrifüj tüplere uygun hacimlerde aktarılarak -80 °C de saklandı.

3.6.3. Hücre Ekimi Aşamaları

1. İnkübatörden çıkarılan flask içerisindeki hücrelerin üzerindeki fazla media alınarak, hücrelerin de flasktan kaldırılabilmesi için PBS uygulanarak tekrardan 5dk için inkübatöre bırakıldı.

2. Juli Br mikroskopta hareketli oldukları görüldü. Falkona aktarıldı ve pasaj 18 olarak adlandırıldılar. 5 dk santrifüj işlemi yapıldı.

3. Thoma lamına (hemositometre) yerleştirilerek tripan mavisi metodu ile 5 karede 704 hücre sayımı (1 ml de $2,816 \times 10^6$) yapıldı.

4. 96 well plate üzerinde kuyu başına 100 µl hacimde 350 µl hücre ve 9,650 µl media konularak hücre ekimi yapıldı.

5. 4×10^6 HCT-116 idame edilmek üzere 25 cm² flaska ekildi.

3.6.4. İlaçların belirlenen dozlarda uygulanması

Literatürdeki IC₅₀ değerlerine göre belirlenen dozlarda ilaç stokları son hacim 1000 µl ye göre hazırlanmıştır.

100 µl Y-15 ilacı, 900 µl media,

2µl ROCK inhibitor-2 ilacı, 998 µl media,

2,93 µl YAP/TAZ inhibitor2 ilacı, 197 µl media oranları oluşturuldu. Bu ilaç dozları 96 lık well plate üzerindeki kuyulara soldan sağa doğru yukarıda belirtilen oranlarda seri dilisyon halinde uygulandı ve inkübatöre bırakıldı.

3.6.5. İlaçların Hücre Canlılığını Etkileyen Dozlarının WST-1 yöntemi ile Araştırılması

İlaçlarımızın kolon kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin araştırılması için tetrazolium tabanlı canlılık testi WST-1 kullanılmıştır. Bu kapsamda HCT-116 hücreleri 104/100 µl derşimde 96-well plate kuyularına ekilmiştir. Hücrelerin plate tabanına tutunmaları ve uygun morfolojiye gelmeleri için inkübatör içerisinde 2 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin ardından hücreler 0,1, 1, 10, 100, 1000 nM (log 10 tabanında) ve 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 nM (log2 tabanında) ilaç dozlarında 48 saat boyunca muamele edilmiştir. 48 saatin sonunda kuyucuklar üzerine 10 µl WST-1 ajanı eklenerek 2,5 saat karanlıkta reaksiyonun tamamlanması için beklenip 440 nm’de spektrofotometrik yöntem ile absorbans değerleri okunmuştur.

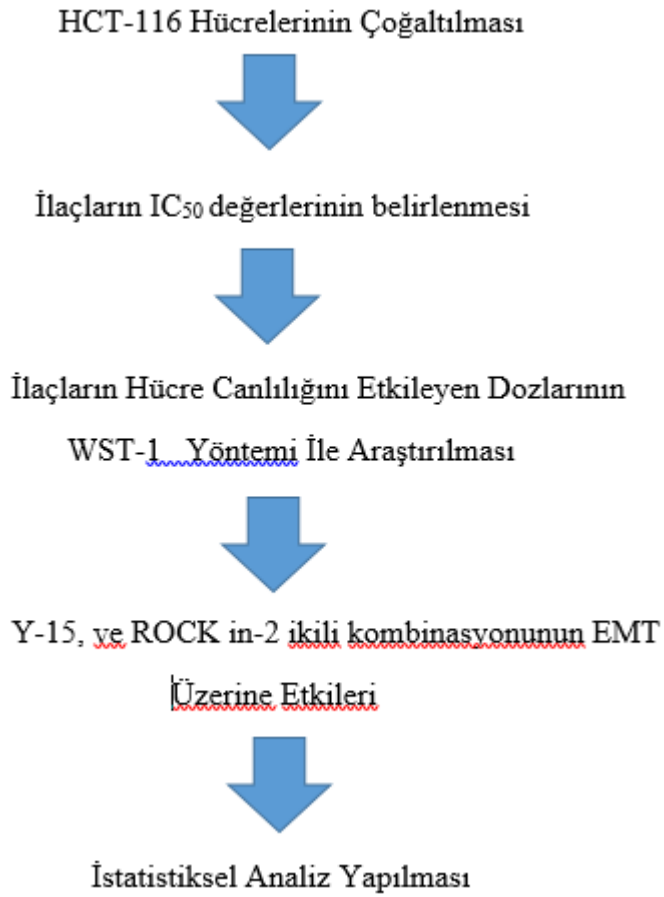
3.6.6. İmmunofluoresans Boyama

Y2 ve Y15 inhibitörlerinin kolorektal kanserde metastaz üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için epitelyal-mezenkimal dönüşümdeki biyobelirteçler olan E-kaderin (epitelyal karakter belirteci) ve N-kaderin (mezenkimal karakter belirteci) miktarları immünofloresan boyama analizi ile değerlendirildi. Analiz kapsamında ilk olarak hücreler 96 kuyucuklu plakalara 100 uL içerisinde ekildi. Hücrelerin plaka tabanına yapışması için gece boyunca 37oC’de %5 CO2 içeren inkübatör ortamına bırakıldı. Daha sonra hücrelerin bir kısmı gece boyunca TGF-beta ile indüklenmiştir. İndüklemeden sonra hücrelere Y2 ve Y15 inhibitörlerinin kombinasyonu 3 µM olacak şekilde 48 saat boyunca uygulanmıştır.

48 saatin sonunda kuyucuklardan hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar bir kez soğuk 1X PBS ile yıkandı. Ardından hücreler %4 paraformaldehit ile 10 dk plaka tabanına fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler tekrardan 1X soğuk PBS ile yıkandı. Fiksasyon sonrasında hücreler 1X PBS içerisinde hazırlanan %1’lik Triton-X100 ile 5 dakika boyunca permeabilize edildi. Daha sonra non-spesifik bağlanmaları engellemek için hücreler 1X PBS içerisinde %5 BSA, %1 Triton-X100 ve %0,1 Tween-20 içeren bloklama solüsyonu ile yaklaşık 1 saat boyunca muamele edildi. Bloklama sonrası hücreler 1X soğuk PBS ile tekrardan yıkandı. Primer antikorlar için blocking solüsyonunda E-kaderin (1:500) ve N-kaderin (1:500) antikorları seyreltilerek over night 4oC’de inkübe edildi. Yüzeydeki antikor kalıntılarını uzaklaştırmak için 3 kez 5’er dakika 1X soğuk PBS ile yıkandı. Sonrasında hücreler Alexa Fluor-488-goat anti-mouse (dilüsyon 1:1000) ve Alexa Fluor-647 goat anti-rabbit (dilüsyon 1:1000) sekonder antikorları ile oda sıcaklığında inkübe edildi (karanlık ortamda bir saat) . Hücreler tekrardan PBS ile yıkandı ve hücre nükleusunu boyamak için boyama tamponu

içerisinde Hoechst 33342 ile 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Nükleus boyama işleminden sonra hücreler son kez 1X soğuk PBS ile yıkandı ve konfokal mikroskobunda (ZEISS, LSM 800, Almanya) görüntüleme işlemi yapıldı. EMT belirteçlerinin değişimi ImageJ yazılımı kullanılarak rölatif floresan yoğunluk analizine göre yapıldı.

3.7. Araştırma Planı



Şekil 7. Araştırma planı

3.8.Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin görselleştirilmesi için GRAPHPAD program kullanıldı. Değişkenlerin ölçümle belirtilmesi ortalama $\pm$ standart sapma, median (ortanca), minimum-maksimum ile sayımla belirtilen değişkenler yüzde dağılım ile değerlendirildi. Hücre kültüründe 3 deney grubu arasındaki anlamlılığın değerlendirilmesi için non-parametrik Mann Whitney U testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için $p \leq 0,05$ ve $p \leq 0.002$ kullanıldı. Şekiller içerisinde verilen «*» işareti p değerinin 0,05'ten küçük olduğunu, «**» işareti p değerinin $p \leq 0.002$ olduğunu göstermektedir.

3.9. Araştırmanın Kısıtlılıkları

Çalışmanın hücre sertliği ve mekanobiyoloji ilişkisini anlama yönünde bilgi alınabilmesi açısından önemli olmasının yanı sıra *in vitro* hücre hatlarının kullanılarak yapılmış olması, elde edilen sonuçların *in vivo* ve hasta temelli klinik deneylerle de doğrulanmasını gerektirmiştir.

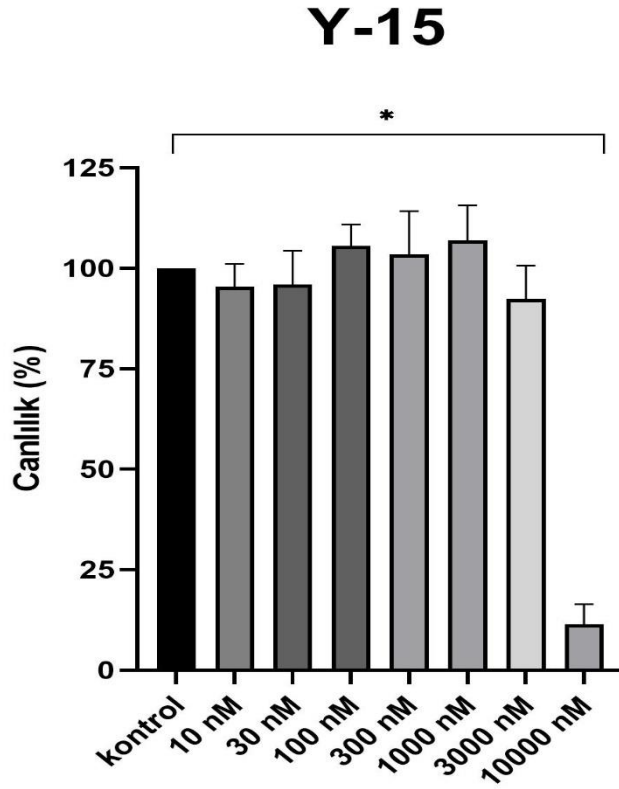
3.10. Etik Kurul Onay

Bu çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul'u tarafından 20.07.2022 tarihinde 2022/23-09 karar no ile etik uygunluğu onayı verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Y-15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 İlaçlarının Hücre Canlılığına Etkisi

4.1.1. Y-15 İlacının Hücre Canlılığına Etkisi

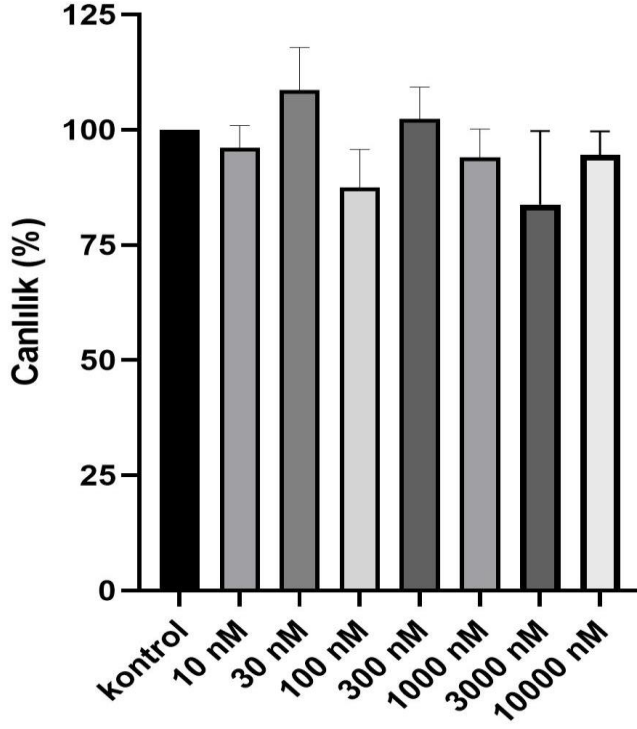


Şekil 8. Y-15 hücre canlılık analizine ait grafik (* işareti $p \leq 0,05$ anlamına gelmektedir).

HCT-116 hücrelerine Y-15 inhibitörü grafikte belirtilen ilaç dozları olan 10– 10000 nM konsantrasyon aralığında uygulandı. Yapılan canlılık analizi sonucu 10000 nM dozunda hücre canlılığının HCT-116 hücreleri için anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p \leq 0,05$).

4.1.2. YAP/TAZ in-2 İlacının Hücre Canlılığına Etkisi

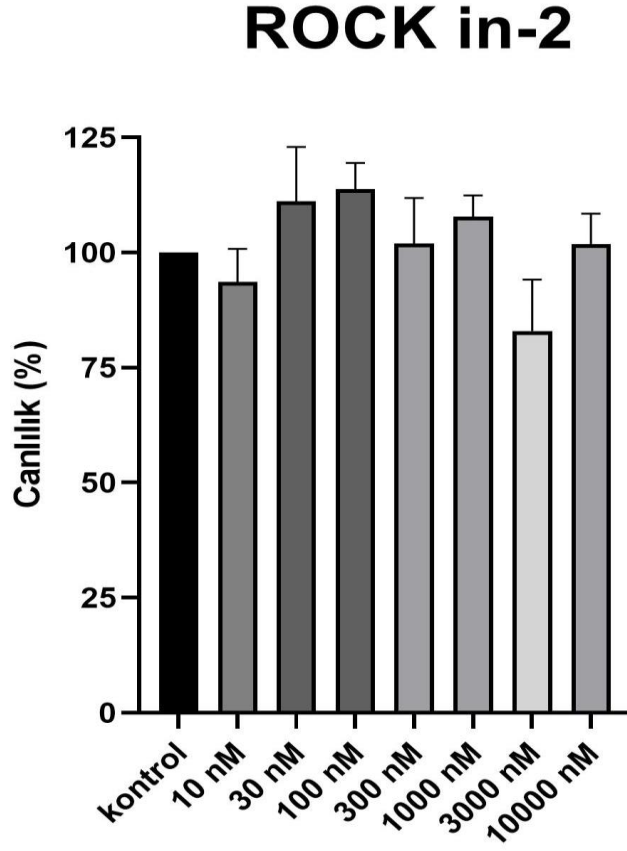
YAP/TAZ in-2



Şekil 9. YAP/TAZ in-2 hücre canlılık analizine ait grafik

HCT-116 hücrelerine YAP/TAZ in-2 grafikte belirtilen ilaç dozları olan 10– 10000 nM konsantrasyon aralığında uygulandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir hücre canlılığı etkisi görülmedi.

4.1.3. ROCK in-2 İlacının Hücre Canlılığına Etkisi



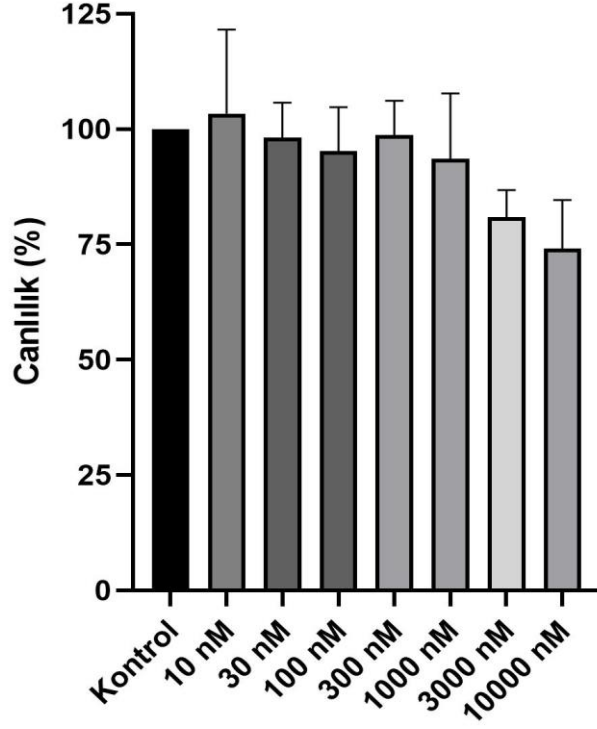
Şekil 10. ROCK in-2 hücre canlılık analizine ait grafik

HCT-116 hücrelerine ROCK in-2 grafikte belirtilen ilaç dozları olan 10– 10000 nM konsantrasyon aralığında uygulandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir hücre canlılığı etkisi görülmedi.

4.2. İkili İlaç Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi

4.2.1. YAP/TAZ in-2 ve ROCK in-2 İkili İlaç Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi

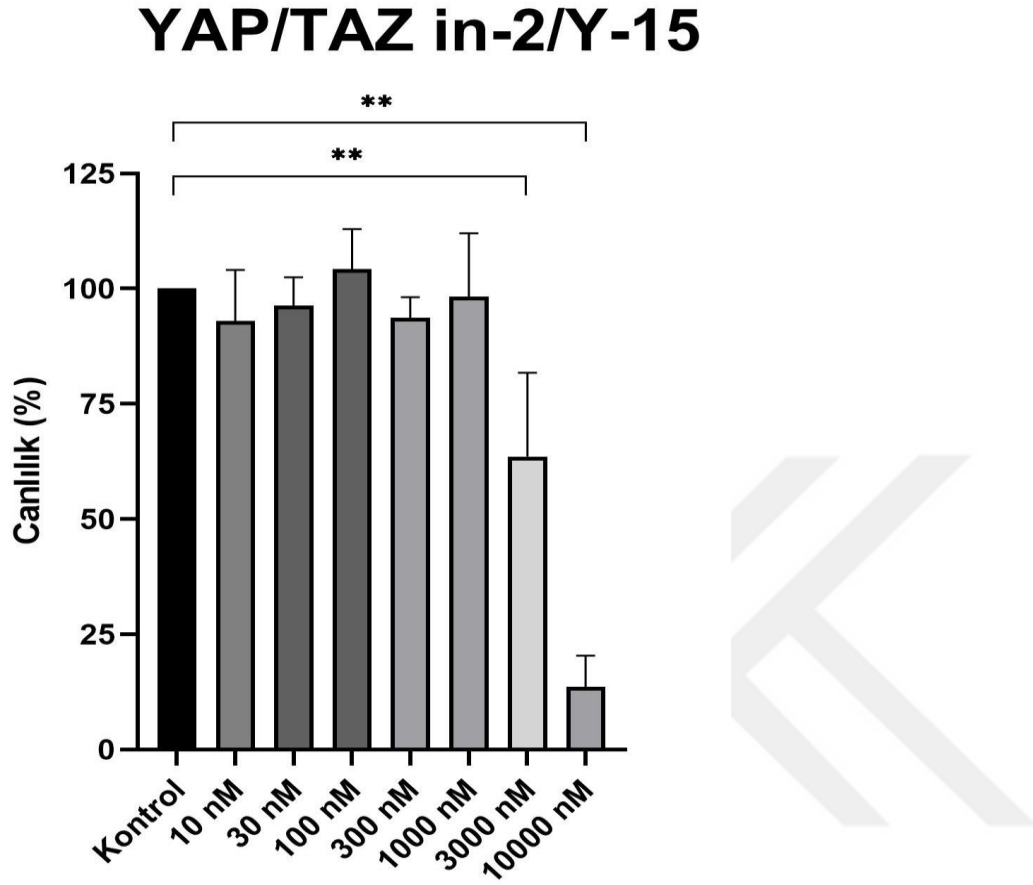
YAP/TAZ in-2/ROCK in-2



Şekil 11. YAP/TAZ in-2 ve ROCK in-2 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik

HCT-116 hücrelerine YAP/TAZ in-2 ve ROCK in-2 grafikte belirtilen ilaç dozları olan 10–10000 nM konsantrasyon aralığında uygulandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir hücre canlılığı etkisi görülmedi.

4.2.2. YAP/TAZ in-2 ve Y-15 İkili İlac Kominasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi

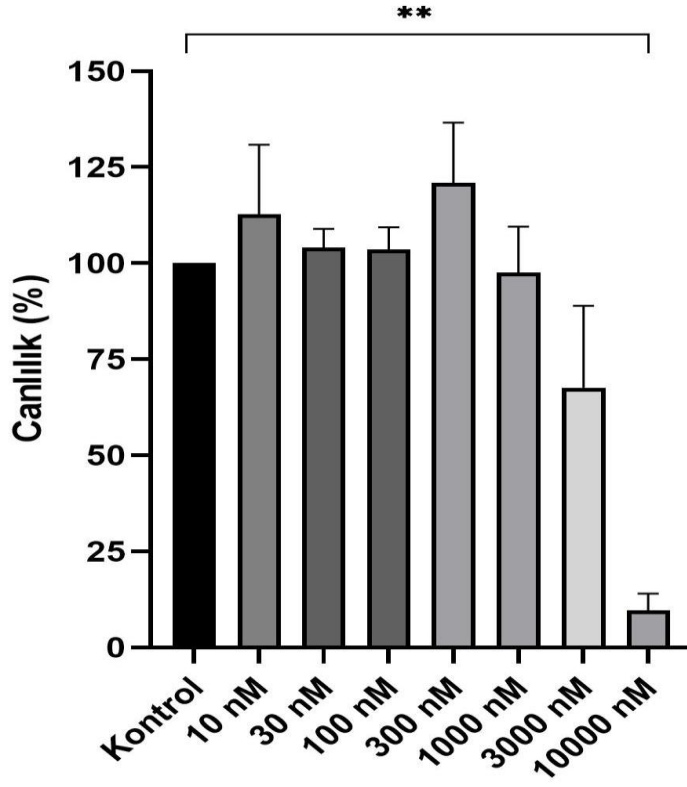


Şekil 12. YAP/TAZ in-2 ve Y-15 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik (* işareti $p \leq 0,05$, ** işareti $p \leq 0.002$ anlamına gelmektedir).

HCT-116 hücrelerine ikili kombinasyon şeklinde YAP/TAZ in-2 ve Y-15 grafikte belirtilen ilaç dozları olan 10– 10000 nM konsantrasyon aralığında uygulandı ve yapılan canlılık analizi sonucu 3000 ve 10000 nM dozunda hücre canlılığının HCT-116 hücreleri için anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p \leq 0,05$).

4.2.3. Y-15 ve ROCK in-2 İkili İlac Kominasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi

Y-15/ROCK in-2



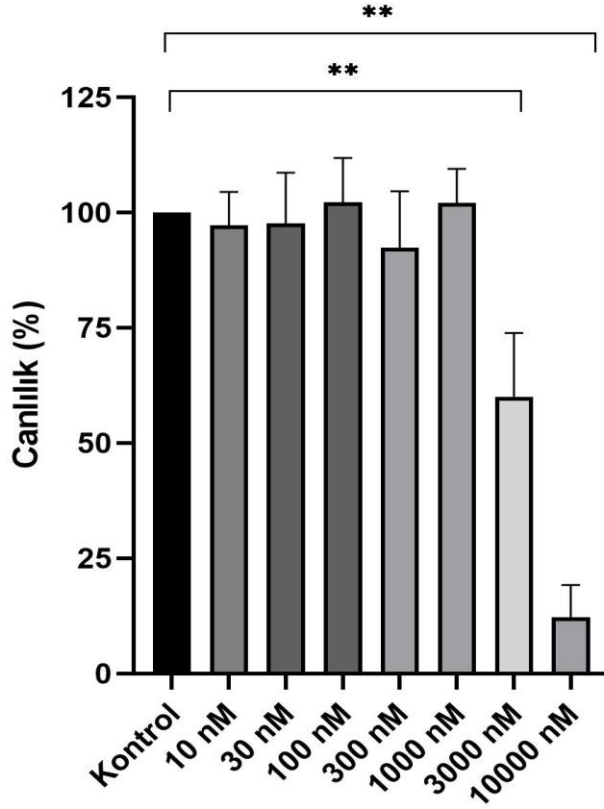
Şekil 13. Y-15 ve ROCK in-2 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik (** işareti $p \leq 0.002$ anlamına gelmektedir).

HCT-116 hücrelerine ikili kombinasyon şeklinde Y-15 ve ROCK in-2 grafikte belirtilen ilaç dozları olan 10– 10000 nM konsantrasyon aralığında uygulandı ve yapılan canlılık analizi sonucu 10000 nM dozunda hücre canlılığının HCT-116 hücreleri için anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p \leq 0.002$).

4.3. Üçlü İlaç Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi

4.3.1. Y-15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 Üçlü ilaç Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi

Y-15/ROCK in-2/YAP/TAZ in-2

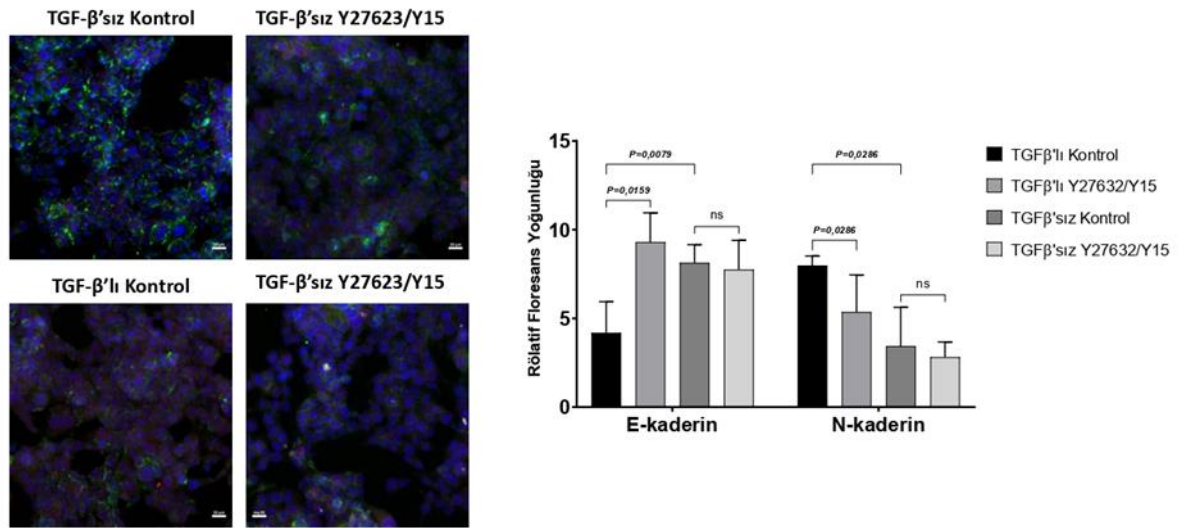


Şekil 14. Y-15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 ilaç kombinasyonlarının hücre canlılık analizine ait grafik (** işareti $p \leq 0.002$ anlamına gelmektedir).

HCT-116 hücrelerine Y-15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 ikili kombinasyon şeklinde grafikte belirtilen ilaç dozları olan 10– 10000 nM konsantrasyon aralığında uygulandı ve yapılan canlılık analizi sonucu 3000 ve 10000 nM dozunda hücre canlılığının HCT 116 hücreleri için anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p \leq 0.002$). Bu etkiler kümülatif olarak değerlendirildiğinde, Y-15 ilacının varlığından dolayı hücre canlılığı üzerinde öldürücü etkisi görülmüştür. YAP/TAZ in-2 ve ROCK in-2 ilaçlarının öldürücü etkisi görülmemiştir.

4.4. Y-15, ve ROCK in-2 ikili kombinasyonunun EMT Üzerine Etkileri

EMT, kanser hücrelerin metastatik sürece geçerken epitelyal hücrelerin mezenkimal hücre formuna geçtiği bir süreç olarak bilinmektedir. Bu süreçte hücrelerin epitelyal karaktere sahip biyobelirteçlerde azalma (E-kaderin vb.) ve mezenkimal biyobelirteçler de ise artma (N-kaderin) görülmektedir. Bu çalışmada ROCK in-2 ve Y15 inhibitörlerinin kombine kullanımının EMT üzerindeki etkisi incelendi. İlk olarak EMT indükleyici olarak bilinen TGF- β ile HCT-116 hücreleri indüklendi. TGF- β ile indüklenen ve indüklenmeyen gruplar karşılaştırıldığında E-kaderin miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü ($P=0,0079$). Aynı şekilde iki grup arasında N-kaderin miktarı karşılaştırıldığında TGF- β ile indüklenen grupta anlamlı bir şekilde artış görüldü ($P=0,0286$). Kombine tedavinin uygulandığı indüklenmiş hücrelerde TGF- β ile indüklenmiş kontrol grubuyla karşılaştırıldığında E-kaderin miktarında anlamlı bir artış ($P=0,0159$), N-kaderin miktarında ise anlamlı bir azalış görüldü ($P=0,0286$). Buna karşın TGF- β ile indüklenmemiş gruplarda aynı etki görülmedi. Sonuç olarak, uygulanan kombine tedavinin spesifik olarak metastatik sürece girmiş hücreler üzerine etki ettiği görülmektedir. Böylece elde edilen sonuçlar, ileri çalışmalar ile kolorektal kanserde metastatik süreci baskılayıcı yeni bir tedavi stratejisinin geliştirilebileceğini göstermektedir.



Şekil 15: TGF- β ile indüklenmiş ve indüklenmemiş kolorektal kanser HCT-116 hücrelerinde ROCK in-2 /Y15 inhibitörünün epitelyal mezenkimal dönüşüm üzerindeki etkisi immünofloresans boyama tekniği ile gösterilmiştir. Bar ölçek= 20 μ m.

5. TARTIŞMA

Hücre mekaniği temelli tümör hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda FAK hedefli PF-228, PF-271, NVP-TAE 226, CFAK-C4 ve Y15 gibi ajanlar genellikle tekli halde kullanılmış, buna ek olarak ikili kombinasyon çalışmaları da bulunmaktadır(50). Bazı çalışmalar FAK'ın ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden şekillenmesini sağlama, bağışıklık hücrelerini filtreleme, epitelyal mezenkimal transformasyon gibi durumları kontrol etme yeteneğini ortaya koymuştur (36,37). NVP-TAE 226 ilacının FAK ve insülin benzeri büyüme faktörü olan IGF-1R reseptörünü inhibe eden özelliği ile, IC₅₀ 5,5 nM olarak uygulanıp ikili inhibisyon etkisi kanıtlanmıştır (50).

ROCK hedefli yapılan çalışmalarda fasudil (HA-1077), hidroksifasudil, AT13148, Y27632, Y39983 ilaçlarının herbirinin ROCK inhibitörü olarak tekli şekilde kullanıldığı, bazılarının ROCK ile birlikte bazı kinazları da inhibe ettiğini gösteren çalışmalar vardır. ROCK inhibisyonu ile birlikte kemoterapiler, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapilerin kombinasyon halinde kullanılmalarının kanser tedavisinde daha etkili olduğu bulunmuştur.

Literatürde Nam ve ark. kolorektal ve melanom modeller üzerinde yaptığı çalışmalarda, Y27632 (intravenöz enjeksiyonlar) kullanımı ile yapılan ROCK blokajının in vivo doksorubisin etkinliğini arttırabildiğini ve antitümör immünitesini indükleyerek tümör yükünü azaltabildiğini göstermiştir (51).

Vennin ve ark. ROCK aktivitesinin artmasıyla birlikte, hücre dışı matrisin (ECM) yeniden şekillenmesini ve pankreas kanseri hücrelerinin istilacı büyümelerini desteklediğini bulmuşlardır. Ayrıca ROCK inhibitörü fasudilin, kanser hücresi toplu hareketini ve metastazı bozduğunu göstermişlerdir.

Rho ile ilişkili protein kinazlar 1 ve 2 (ROCK1 ve ROCK2), aktomiyozin hücre iskeletinin ana düzenleyicileridir bunun yanında kuvvet oluşumu, hücre istilasını, hücre proliferasyonunu ve kasılmayı yönetir. Çok sayıda çalışma, ROCK inhibisyonunun, çeşitli katı kanserlerde in vivo tümör ilerlemesini ve metastazı bozduğunu ortaya koymuştur (52).

Literatürde tümör hücrelerinde FAK-Rho-ROCK sinyal kaskatları ifadelerine yönelik veriler sunulmuş ve FAK-Rho-ROCK sinyal kaskatlarının kanser hücrelerinde büyüme, göç ve istila üzerinde önemli rol oynadığını göstermektedir (13). Ancak, bu ardıl sinyal kaskatlarını

hedef alan kombine bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla FAK-Rho-ROCK sinyal kaskatlarına yönelik farklı ajanların geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Bu nedenle, bu çalışmada klasik olarak uygulanan tedavi seçeneklerinin yanında kolorektal kanser patogeneğinde etkin olan FAK-Rho-ROCK ardıl sinyal kaskadının etkisi Y15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 üçlü inhibisyonu ile tümör hücrelerinin sertliklerinin, proliferatif ve metastatik özelliklerinin azaltılarak, bu ilaçlar ve kombine tedavilerine yönelik hassasiyetin artırılması amaçlanmıştır.

Literatürde YAP/TAZ, hippo yolaklarına yönelik kanser çalışmalarında SWI/SNF kompleks ajanları birlikte kullanılmaktadır. Chang ve ark. kanserin önlenmesinde hücre mekaniği ile ilişkili olarak, mekanotransdüksiyona karşı doku mikroçevrelerinin yapısal ve mimari özelliklerini etkileyen temel sensörler olduğunu göstermişlerdir (11). Çalışmamızda YAP ve TAZ hippo yolaklarının inhibe edilmesi bu anlamda uyumludur.

Huang ve ark. Y15 ve temozolomide ilaçlarının aynı dozlarda ikili ilaç kombinasyonu sonucunda kanser hücrelerinde etkili sonuçlar olduğunu bulmuşlardır (53).

Golubovskaya ve ark. kolon kanseri ve tiroid kanseri gibi birçok kanserde Y15' e duyarlı hatlar tespit etmişlerdir (54).

Golubovskaya ve ark. Y15'in kolon, pankreas, meme kanseri, nöroblastoma ve glioblastoma üzerinde yaptıkları çalışmaları sonucunda, otofosforilasyon aktivitesini inhibe eden, kanser hücrelerinin canlılığını azaltan ve tümör büyümesini bloke eden fokal adezyon kinazın (FAK) güçlü ve spesifik bir inhibitörü olduğunu bulmuşlardır (55). Çalışmamızda FAK yolağının hedef alınması da bu anlamda uyumludur.

Metastatik kolorektal kanserde hücre sertliği ve mekaniği çalışmalarına yönelim artmıştır. Zheng ve ark. bevacizumab ile tedavi edilen 20 kolorektal kanser hastasından alınan eşleştirilmiş tedavi öncesi ve sonrası metastaz örneklerinin değerlendirilmesi sonucu, Bevacizumab tedavisinden önce veya sonra yanıt verenler arasında ECM birikimi açısından bir fark olmamasına rağmen, yanıt vermeyenlerin karaciğer metastazlarında tedaviden sonra tedavi öncesine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek ECM birikimi olduğunu tespit edilmiştir. Matriks sertliğinin, kolorektal kanser karaciğer metastazlarında bevacizumab direncine aracılık etmek için tümör ve stromal hücreler arasında lipid metabolik çapraz iletişimi tetiklediği gösterilmiştir. Yüksek düzeyde aktive olmuş yağ asidi oksidasyon (FAO) yolunun yükseldiğini

bununla birlikte FAK ve YAP inhibisyonu kullanılması sonucu HSC lipolizinin baskılanıp, anti-VEGF tedavisinin etkinliğini arttırdığını bulmuşlardır (56).

Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada mekanosensitif FAK-Rho-ROCK ardıl sinyal kaskatlarının inhibitörlerimiz Y15, ROCK in-2 ve YAP/TAZ in-2 etkileşimi ile hücre sertliğini etkilediği bilinen bir yolağın hücre fenotiplerine ve hücre ölümü üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmamızda HCT 116 hücrelerinde HCT 116 + Y 15 (100µl), HCT 116 + YAP/TAZ in-2 (2,93µl), HCT116 + ROCK in-2 (2µl) gruplarının HCT 116 + Y15/ROCK in-2, HCT 116 + YAP/TAZ in-2/Y15, HCT 116 YAP/TAZ in-2/ROCK in-2 ikili grupları ve HCT 116 + Y15/YAP/TAZ in-2/rock in-2 üçlü grupları ile kıyaslandığında Y15 ilacının hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma sağladığı görüldü. Diğer ilaçların kolorektal kanserde hücre canlılığı üzerinde kombine şekilde veya tekli uygulandıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir etkileri gözlenmedi.

Çalışma sonuçlarına göre, Y15' in kolorektal kanserde FAK aracılıklı sitotoksik bir etki gösterdikleri ve bu açıdan tedavi etkinliğini arttırıcı bir ajan olarak kullanılabilirliği görülmüştür. Bu nedenle KRK tedavi stratejilerinde FAK yolağına yönelik çalışmalarla birlikte farklı inhibitör kombinasyonlarının Rho-ROCK yolakları ile birleştirilerek hücre mekaniğine yönelik ajanların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde diğer kanser türleri arasında üçüncü sırada görülen önemli bir mortalite sebebidir. Metastatik kolorektal kanserde hücre sertliğinin hedef alınmasıyla uyumlu yeni ilaç hedeflerinin ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu doğrultuda çalışmamızın içeriği, metastatik kolorektal kanser (mKRK) hücre hattında FAK-Rho-ROCK sinyal kaskadı inhibisyonu ile meydana gelen aktin/miyozin deformasyonunun ve azalan hücre sertliğinin baskılanmasına yönelik etkisi incelenmiştir.

Literatürde FAK, ROCK ve YAP/TAZ sinyal yolları ayrı şekillerde ilgili inhibitörleri tarafından tekli veya ikili şekillerde inhibe edilerek kanser hücrelerindeki mekanobiyolojik etkileri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ancak metastatik kolorektal kanser için FAK-Rho-ROCK bağlantılı sinyal kaskadının hedeflenmesi ve hücre sertliğine etkisi ile ilişkili bir çalışma yoktur. Bu amaç doğrultusunda çalışmamız, kolorektal kanser hücre hattında FAK-Rho-ROCK bağlantılı sinyal kaskadının Y15+ Rock-in-2+ YAP/TAZ in-2 üçlü inhibisyonunun kanser hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir.

Çalışma sonucunda genel olarak etkili inhibitörün Y15 olduğu görüldü. FAK inhibitörü olan Y15' in, kolorektal kanserde hücre canlılık analizlerinde önemli bir azalmaya neden olmasından dolayı, tedavi etkinliğini arttırıcı bir ajan olarak kullanılabilirliği görülmüştür.

Literatürde belirtildiği gibi FAK, Rho ve ROCK yollarındaki etkileşimlerin sönümlenmesi ve bunların yeniden düzenlenmeleri kolorektal kanserde mekanistik olarak çok önemlidir. Çalışmamızın bu nedenlerden dolayı gelecek çalışmalar için temel oluşturacağı öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1.** Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2019; 394(10207):1467-1480
- 2.** Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A ve ark. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021. doi: 10.3322/caac.21660. Online ahead of print
- 3.** GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC
- 4.** Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. (2018) 68:394–424. doi: 10.3322/caac.21492
- 5.** Development of Focal Adhesion Kinase Inhibitors in Cancer Therapy
- 6.** The Microarray Gene Profiling Analysis of Glioblastoma Cancer Cells Reveals Genes Affected by FAK Inhibitor Y15 and Combination of Y15 and Temozolomide
- 7.** In vivo toxicity, metabolism and pharmacokinetic properties of FAK inhibitor 14 or Y15 (1, 2, 4, 5-benzenetetramine tetrahydrochloride)
- 8.** First-in-human study of AT13148, a dual ROCK-AKT inhibitor in patients with solid tumors
- 9.** Targeting ROCK activity to disrupt and prime pancreatic cancer for chemotherapy
- 10.** GPR35 antagonist CID-2745687 attenuates anchorage-independent cell growth by inhibiting YAP/TAZ activity in colorectal cancer cells
- 11.** Chang L, Azzolin L, Di Biagio D, Zanconato F, Battilana G, Lucon Xiccato R, Aragona M, Giulitti S, Panciera T, Gandin A, Sigismondo G, Krijgsveld J, Fassan M, Brusatin G, Cordenonsi M, Piccolo S. The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ. *Nature*. 2018 Nov;563(7730):265-269. doi: 10.1038/s41586-018-0658-1. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30401838; PMCID: PMC7612964.
- 12.** Matrix Stiffness Triggers Lipid Metabolic Cross-talk between Tumor and Stromal Cells to Mediate Bevacizumab Resistance in Colorectal Cancer Liver Metastases
- 13.** Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64. doi: 10.1126/science.1203543. PMID: 21436443.
- 14.** Michel G, Tonon T, Scornet D, Cock JM, Kloareg B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol*. 2010 Oct;188(1):82-97. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03374
- 15.** Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell* ((4th Eds)). NewYork: Garland Science.

- 16.** Kumar, V., Abbas, A.K., & Aster, J. C. (2015). Robbins and cotran pathologic basis of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders
- 17.** Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol.* 1997 Aug;15(8):778-83. doi: 10.1038/nbt0897-778.
- 18.** Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature.* 2004 Feb 19;427(6976):695. doi: 10.1038/427695a.
- 19.** Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C, Suit HD, Jain RK. Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res.* 1999 Aug 1;59(15):3776-82.
- 20.** Nia HT, Munn LL, Jain RK. Physical traits of cancer. *Science.* 2020 Oct 30;370(6516):eaaz0868. doi: 10.1126/science.aaz0868.
- 21.** Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 22.** Hoffman BD, Crocker JC. Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:259-88. doi: 10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160511
- 23.** Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One.* 2009;4(2):e4632. doi: 10.1371/journal.pone.0004632. Epub 2009 Feb 27.
- 24.** Ladoux B, Nicolas A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep Prog Phys.* 2012 Nov;75(11):116601.
- 25.** Mierke CT. The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation. *Rep Prog Phys.* 2014 Jul;77(7):076602. doi: 10.1088/0034-4885/77/7/076602. Epub 2014 Jul 9.
- 26.** Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1796(2):293-308. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.07.006. Epub 2009 Aug 14
- 27.** Makale M. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007 Dec;81(4):329-43. doi: 10.1002/bdrc.20110.
- 28.** Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater.* 2007 Jul;3(4):413-38. doi: 10.1016/j.actbio.2007.04.002. Epub 2007 May 30.
- 29.** Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 2009 Nov 27;326(5957):1208-12. doi: 10.1126/science.1175862.

30. Ketene AN, Roberts PC, Shea AA, Schmelz EM, Agah M. Actin filaments play a primary role for structural integrity and viscoelastic response in cells. *Integr Biol (Camb)*. 2012 May;4(5):540-9. doi: 10.1039/c2ib00168c. Epub 2012 Mar 26.
31. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jun 24;11(7):512-22. doi: 10.1038/nrc3080.
32. Seong J, Tajik A, Sun J, Guan JL, Humphries MJ, Craig SE, Shekaran A, García AJ, Lu S, Lin MZ, Wang N, Wang Y. Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 26;110(48):19372-7. doi: 10.1073/pnas.1307405110. Epub 2013 Nov 12.
33. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 1;89(11):5192-6. doi: 10.1073/pnas.89.11.5192.
34. Zhou J, Yi Q, Tang L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Jun 11;38(1):250. doi: 10.1186/s13046-019-1265-1.
35. Murphy JM, Jeong K, Lim SS. FAK Family Kinases in Vascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 May 21;21(10):3630. doi: 10.3390/ijms21103630.
36. Lee BY, Timpson P, Horvath LG, Daly RJ. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2015 Feb;146:132-49. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.10.001. Epub 2014 Oct 12.
37. Dawson JC, Serrels A, Stupack DG, Schlaepfer DD, Frame MC. Targeting FAK in anticancer combination therapies. *Nat Rev Cancer*. 2021 May;21(5):313-324. doi: 10.1038/s41568-021-00340-6. Epub 2021 Mar 17.
38. Steinestel K, Trautmann M, Jansen EP, Dirksen U, Rehkämper J, Mikesch JH, Gerke JS, Orth MF, Sannino G, Arteaga MF, Rossig C, Wardelmann E, Grünewald TGP, Hartmann W. Focal adhesion kinase confers pro-migratory and antiapoptotic properties and is a potential therapeutic target in Ewing sarcoma. *Mol Oncol*. 2020 Feb;14(2):248-260. doi: 10.1002/1878-0261.12610. Epub 2019 Dec 21.
39. Panera N, Crudele A, Romito I, Gnani D, Alisi A. Focal Adhesion Kinase: Insight into Molecular Roles and Functions in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 5;18(1):99. doi: 10.3390/ijms18010099.
40. New Insights on the Nuclear Functions and Targeting of FAK in Cancer
41. Arold ST, Hoellerer MK, Noble ME. The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure*. 2002 Mar;10(3):319-27. doi: 10.1016/s0969-2126(02)00717-7.

42. Narumiya S, Thumkeo D. Rho signaling research: history, current status and future directions. *FEBS Lett.* 2018 Jun;592(11):1763-1776. doi: 10.1002/1873-3468.13087. Epub 2018 May 24.
43. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010 Sep;67(9):545-54. doi: 10.1002/cm.20472.
44. Panková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Jan;67(1):63-71. doi: 10.1007/s00018-009-0132-1. Epub 2009 Aug 26.
45. Timpson P, McGhee EJ, Morton JP, von Kriegsheim A, Schwarz JP, Karim SA, Doyle B, Quinn JA, Carragher NO, Edward M, Olson MF, Frame MC, Brunton VG, Sansom OJ, Anderson KI. Spatial regulation of RhoA activity during pancreatic cancer cell invasion driven by mutant p53. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):747-57. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2267. Epub 2011 Jan 25.
46. Guerra FS, Oliveira RG, Fraga CAM, Mermelstein CDS, Fernandes PD. ROCK inhibition with Fasudil induces beta-catenin nuclear translocation and inhibits cell migration of MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Sci Rep.* 2017 Oct 20;7(1):13723. doi: 10.1038/s41598-017-14216-z.
47. Zhang S, Konstantinidis DG, Yang JQ, Mizukawa B, Kalim K, Lang RA, Kalfa TA, Zheng Y, Guo F. Gene targeting RhoA reveals its essential role in coordinating mitochondrial function and thymocyte development. *J Immunol.* 2014 Dec 15;193(12):5973-82. doi: 10.4049/jimmunol.1400839. Epub 2014 Nov 14.
48. Hu YL, Lu S, Szeto KW, Sun J, Wang Y, Lasheras JC, Chien S. FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Sci Rep.* 2014 Aug 12;4:6024. doi: 10.1038/srep06024
49. Gerber DE, Camidge DR, Morgensztern D, Cetnar J, Kelly RJ, Ramalingam SS, Spigel DR, Jeong W, Scaglioni PP, Zhang S, Li M, Weaver DT, Vaikus L, Keegan M, Horobin JC, Burns TF. Phase 2 study of the focal adhesion kinase inhibitor defactinib (VS-6063) in previously treated advanced KRAS mutant non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2020 Jan;139:60-67. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.10.033. Epub 2019 Nov 4.
50. Ma WW. Development of focal adhesion kinase inhibitors in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 Sep;11(7):638-42. doi: 10.2174/187152011796817628. PMID: 21787276.
51. Nam G.-H. et al. Combined Rho-kinase inhibition and immunogenic cell death trigger and propagate immunity against cancer. *Nat. Communications* 2018;9:2165
52. Vennin, C., Rath, N., Pajic, M., Olson, M. F. & Timpson, P. (2020). Targeting ROCK activity to disrupt and prepare pancreatic cancer for chemotherapy Small GTPases, 11(1), 45. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1345712>

53. Huang, G., Ho, B., Conroy, J., ve ark. The Microarray Gene Profiling Analysis of Glioblastoma Cancer Cells Reveals Genes Affected by FAK Inhibitor Y15 and Combination of Y15 and Temozolomide. *Anticancer Agents Med Chem* 14(1):9-17 (2014). [https://doi: 10.2174/18715206113139990141](https://doi.org/10.2174/18715206113139990141).
54. Golubovskaya, V., O'Brien, S., Ho, B. ve ark. Down-regulation of ALDH1A3, CD44 or MDR1 sensitises resistant cancer cells to the FAK autophosphorylation inhibitor Y15. *J Cancer Res Clin Oncol* 141 , 1613-1631 (2015).<https://doi.org/10.1007/s00432-015-1924-3>
55. Golubovskaya, V., Curtin, L., Groman, A. ve ark. In vivo toxicity, metabolism and pharmacokinetic properties of the FAK inhibitor 14 or Y15 (1, 2, 4, 5-benzenetetramine tetrahydrochloride). *Arch Toxicol* 89 , 1095-1101 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1290-y>
56. Zheng, Y., Zhou, R., Cai, J. Ve ark. Matrix Stiffness Triggers Lipid Metabolic Cross-talk between Tumor and Stromal Cells to Mediate Bevacizumab Resistance in Colorectal Cancer Liver Metastases. *Cancer Res* 83(21): 3577–3592 (2023).

8. EKLER

EK-1

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Yasemin Başbınar

Araştırmaya ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	goaek@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	7331-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Metastatik Kolorektal Kanserde FAK-Rho-ROCK Bağlantılı Sinyal Kaskadı İnhibisyonunun Mekanobiyolojik Etkileri
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Yasemin Başbınar Onkoloji Enstitüsü
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2022/23-09	Tarih:20.07.2022			
	Prof.Dr. Yasemin Başbınar'ın sorumlusu olduğu "Metastatik Kolorektal Kanserde FAK-Rho-ROCK Bağlantılı Sinyal Kaskadı İnhibisyonun Mekanobiyolojik Etkileri" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Emel Çalıkoğlu (Başkan Yardımcısı)	Preventif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒

EK-2 ÖZGEÇMİŞ



SERAP TÜRKMEN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telafon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

16 Eylül 2021 - Şu Anda (2 yıl 9 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TRANSLASYONEL ONKOLOJİ (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.89 / 4.0

03 Eylül 2008 - 01 Temmuz 2009 (10 ay)

Yüksek Lisans, Tezsiz Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
EĞİTİM BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOLOJİ EĞİTİMİ (YL) (TEZSİZ)
Diploma Numarası: YL.1434
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.63 / 4.0

08 Eylül 2003 - 12 Temmuz 2007 (3 yıl 11 ay)

Lisans, İkinci Öğretim, SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ PR. (İÖ)
Diploma Numarası: 2.B2.13.2305
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 78.43 / 100.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

A. P. K. B. K. B. P. K. S. O. C. K. H. E. Y. B. TOLGA SEVER, Taraxum And Metformin
Anti-cancer Feature, Tam Metin Bildiri, International Hippocrates Congress On
Medical And Health Sciences, 01 Mart 2019, 03 Mart 2019, 83 - 91.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

SERAP TÜRKMEN, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C
Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu
Reddedildi, 2022 - 2, 01.10.2022 - 30.09.2023.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	ULDB	TEYDEB	Toplam
Hakamlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorluk Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Kabulmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0

