



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



[Yüksek Lisans Tezi]

**[PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOM GELİŞİMİNDE
İNSÜLİN ve TNF α 'NIN ROLÜ]**

[Sinem KARAKUŞ]

[Biyoloji Anabilim Dalı]

[Moleküler Biyoloji Programı]

DANIŞMAN
[Prof. Dr.] Selda OKTAYOĞLU

[Haziran, 2025]

İSTANBUL

Bu çalışma, [10.06.2025] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Biyoloji Anabilim Dalı], [Moleküler Biyoloji Programı]nda [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Selda OKTAYOĞLU] (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
[Fen Fakültesi]

[Doç. Dr.] [Birsen ELİBOL YÜCESOY]
[Medeniyet Üniversitesi]
[Tıp Fakültesi]

[Doç. Dr.] [Ayşe KARATUĞ KAÇAR]
[İstanbul Üniversitesi]
[Fen Fakültesi]

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2024-40360 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 2022-B02-22391 numaralı TÜSEB projesi ile desteklenmiştir. |

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

| |
|--|
| |
|--|

ÖNSÖZ

Öncelikle, yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda duran, desteğini bir an bile eksik etmeyen, beni sadece akademik olarak yetiştirmekle kalmayıp aynı zamanda kendimi her şekilde geliştirmek için ihtiyacım olan motivasyonu sağlayan, pes etmemeyi, sorunların üstesinden gelmenin birden fazla yolu olduğunu ve bana farklı bakış açılarından bakabilmeyi öğreten, araştırmaya, öğretmeye ve öğrenmeye olan hevesini, azmini ve merakını örnek aldığım çok sevgili danışmanım Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Laboratuvara geldiğim ilk günden beri güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen, bütün sorularımı itinayla cevaplayan, yeri geldiğinde bir hoca yeri geldiğinde bir abla olabilen ve kendime olan güvenimi arttıran Araş. Gör. Dr. Merve ERÇİN'e çok teşekkür ederim.

Çok sevdiğim ekip arkadaşlarımdan Uzm. Biyolog Ertan ÇELİK'e her şeyin üstesinden gelebileceğime dair güveni verdiği ve gerektiğinde bir abi gibi yaklaştığı için; yüksek lisansta bulduğum kız kardeşlerim diyebileceğim Handan Mina DOĞU'ya beni hiç yalnız bırakmadığı için; ELİF GÜZEY'e dostluğu ve desteği için teşekkür ederim. Laboratuvarında geçirdiğim günleri daha keyifli kılan arkadaşlarım Şeyma Nur SEYHAN, Sena MERİÇ, Begüm KÜÇÜKER ve Ayşe Nur ESMER'e teşekkür ederim.

Ayrıca, yüksek lisansım boyunca bana destek olan Araş Gör. Dr. Merve YILDIRIM'a, Araş Gör. Öyküm GENÇ AKAR'a, Dr. Cansu ÖZAL COŞKUN'a ve hocalarım Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT, Prof Dr. FÜSUN ÖZTAY, Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ KAÇAR ve Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR'a teşekkür ederim.

qPCR cihazı ve Nanodrop'un kullanımına olanak sağlayan Genel Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN'a ve membran görüntüleme cihazı ile florimetre cihazlarının kullanımına olanak sağlayan Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR'a teşekkür ederim.

Çocukları olduğum için hayatım boyunca gurur duyduğum annem Serpil KARAKUŞ ve babam Sadık KARAKUŞ'a bütün eğitim hayatım boyunca gösterdikleri maddi manevi destekleri için ne kadar teşekkür etsem yetersiz kalır. Hep daha iyisini yapabileceğime dair sonsuz bir inanca sahip olan abim Onur Sadık KARAKUŞ'a, kendinden önce beni düşünen canım kardeşim Ömürcan KARAKUŞ'a ve elini omzumdan hiç çekmeyen, yanımda olduğunu hep hissettiğim ablam Sibel KARAKUŞ'a teşekkür ederim.

Son olarak da asla pes etmediğim için kendime teşekkür ederim. |

Haziran 2025

|Sinem KARAKUŞ|

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|---|-----------|
| ÖNSÖZ | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| ŞEKİL LİSTESİ | vii |
| TABLO LİSTESİ..... | ix |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ | x |
| ÖZET | xii |
| SUMMARY | xiv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL KISIMLAR..... | 3 |
| 2.1. PANKREAS KANSERİ | 3 |
| 2.1.1. Pankreas Kanserinde İnsülin Direncinin Etkisi | 4 |
| 2.1.2. Pankreas Kanseri ve İnflamasyonun İlişkisi..... | 5 |
| 2.2. KANSER KÖK HÜCRELERİ..... | 7 |
| 2.2.1. Pankreatik Duktal Adenokarsinom ile İlişkili Kanser Kök Hücre Belirteçleri | 8 |
| 2.2.1.1. CD24..... | 8 |
| 2.2.1.2. CD44..... | 8 |
| 2.2.1.3. CD133..... | 9 |
| 2.2.1.4 ALDH1 | 9 |
| 2.2.1.5 c-MET | 10 |
| 2.3. JAK/STAT SİNYAL YOLAĞI | 11 |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM..... | 14 |
| 3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ | 14 |
| 3.2. HÜCRE CANLILIK ÖLÇÜMÜ | 14 |
| 3.3. KANSER KÖK HÜCRE BELİRTEÇ GENLERİN İFADELENME SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ..... | 15 |
| 3.3.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini | 15 |
| 3.3.2. Komplementer DNA Eldesi | 16 |
| 3.3.3. qPCR Tekniği ile Gen İfadeleme Seviye Analizi..... | 17 |
| 3.4. HEDEF PROTEİN SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.1. Hücre Fraksiyonlarının İzolasyonu ve Fraksiyonların Total Protein Miktarının Tayini..... | 18 |
| 3.4.1.1. Sitoplazmik Fraksiyon Eldesi | 18 |
| 3.4.1.2. Nüklear Fraksiyon Eldesi | 19 |
| 3.4.1.3. Membran Fraksiyon Eldesi..... | 19 |
| 3.4.1.4. Bradford Yöntemi ile Total Protein Miktarının Ölçülmesi..... | 20 |
| 3.4.2. Western Emdirimi Yöntemi | 20 |
| 3.4.2.1. Hedef Proteinlerin İşaretlenmesi..... | 22 |
| 3.4.3. ELISA..... | 23 |
| 3.5. AKIM SİTOMETRİK ANALİZLER | 24 |
| 3.5.1. Hücre Döngüsü Analizi | 24 |
| 3.5.2. Apoptotik ve Nekrotik Hücre Popülasyonların Belirlenmesi..... | 25 |
| 3.5.3. c-Met İşaretlemesi ile Kanser Kök Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi | 26 |
| 3.6. SFER OLUŞTURMA TESTİ | 26 |
| 3.7. İNVAZYON TESTİ..... | 27 |
| 3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER..... | 27 |
| 4. BULGULAR..... | 28 |
| 4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI..... | 28 |
| 4.2. PANKREATİK KANSER KÖK HÜCRE OLUŞUMU İLE İLİŞKİLİ BULGULAR | 29 |
| 4.2.1. Kanser Kök Hücre Belirteç Genlerin İfadeleme Düzeyleri..... | 29 |
| 4.2.2. Hücre Döngüsü Bulguları..... | 29 |
| 4.2.3. Apoptotik, Nekrotik ve Canlı Hücre Popülasyonlarındaki Değişimler..... | 30 |
| 4.2.4. Pankreas Kanseri Belirteç Proteinlerinin Seviyelerindeki Değişimler..... | 31 |
| 4.2.5. Kendini Yenileme Yeteneğindeki Değişimler..... | 32 |
| 4.2.6. İnvazyon Yeteneğindeki Değişimler | 34 |
| 4.2.7. c-Met ⁺ Hücre Popülasyonundaki Değişimler | 34 |
| 4.3. IRS1/JAK/STAT SİNYAL YOLAĞINDAKİ DEĞİŞİMLER | 35 |
| 4.4. EPİTELİYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ İLE İLGİLİ BULGULAR..... | 36 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 38 |
| KAYNAKLAR..... | 54 |
| EKLER | 76 |
| ÖZGEÇMİŞ | 77 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1.** İnsülin ve IGF'nin yönlendirdiği pankreas kanseri gelişimiyle ilgili hücresel yollar şematize edilmiştir (Trajkovic-Arsic ve diğ., 2013).....5
- Şekil 2.2.** Pankreas kanserinde TNF α NF- κ B sinyal yolağı üzerinden etki gösterir (Chen ve diğ., 2022).....7
- Şekil 2.3.** HGF/c-MET sinyalinin etkilediği sinyal yolları (Delitto ve diğ., 2014).....10
- Şekil 2.4.** İnsülinin IR-A ve IR-B aracılığıyla aktifleştirdiği sinyal yolları (Ramasubbu ve Devi Rajeswari, 2023).11
- Şekil 2.5.** JAK/STAT aktivasyonunda yer alan moleküller ve bu aktivasyonun EMT üzerindeki etkisi (Jin, 2020).13
- Şekil 4. 1.** **A.** 48 saat süre ile 1-1000 nM insülinin ve **B.** 0.1-10 ng/ml TNF α 'nın hTERT-HPNE hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri. ***p<0.001 K'ye göre, +p<0.05 ve +++p<0.001 1 nM I'ye göre, ###p<0.001 10 nM I'ye göre, x p<0.05 ve xxxp<0.001 20 nM I'ye göre, ^ap<0.05 ve ^{aaa}p<0.001 100 nM I'ye göre, ^{bb}p<0.001 200 nM I'ye göre. K: Kontrol, I: İnsülin.28
- Şekil 4.2.** Pankreatik kanser ve CSC belirteçlerinin mRNA ifadenme seviyeleri (2^{- $\Delta\Delta$ CT}). *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 K'ye göre; #p<0.01 ve ###p<0.001 20 nM I'ye göre; ^bp<0.05 ve ^{bb}p<0.01 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol I: İnsülin.29
- Şekil 4.3.** Deney gruplarında hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücre popülasyonlarındaki değişimler. *p<0.05 ve ***p<0.001 K'ye göre; ###p<0.001 20 nM I'ye göre, K: Kontrol, I: İnsülin.30
- Şekil 4.4.** Apoptotik ve nekrotik hücrelerin deney gruplarına göre değişimi. **p<0.01 ve ***p<0.001 K'ye göre; ++p<0.01 ve +++p<0.001 20 nM I'ye göre; ###p<0.001 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin.31
- Şekil 4.5.** Sitoplazmik CK19 ile sitoplazmik ve nükleer SMAD4 protein seviyelerinin deney gruplarına göre değişimleri. **A.** Üst panelde CK19 ve yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin protein bantları ve alt panelde bu bantların optik yoğunluğunu yansıtan grafik yer almaktadır. **B.** Sitoplazmik ve nükleer SMAD4 seviyelerinin ELISA bulgularını içermektedir. *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 K'ye göre; #p<0.01 ve ###p<0.001 20 nM I'ye göre; ^bp<0.05 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin.32
- Şekil 4.6.** **A.** Kanser hücre hatları BxPC-3 ve PANC-1 kontrol örnekleri ve hTERT-HPNE hücrelerinde yapılan deney gruplarına göre sfer fotoğrafları. **B.** İnsülin ve TNF α konsantrasyonlarının sfer büyüklüğü ve sfer sayısı üzerindeki etkileri.

| | |
|--|----|
| ***p<0.001 K'ye göre; ###p<0.001 20 nM I'ye göre, ^{aaa} p<0.001 0.5 ng/ml TNFα'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin..... | 33 |
| Şekil 4.7. İnsülin ve TNFα'nın invaziv hücre sayıları üzerine etkisi. **p<0.01 ve ***p<0.001 K'ye göre, ###p<0.001 20 nM I'ye göre. K: Kontrol, I: İnsülin. | 34 |
| Şekil 4.8. c-Met ⁺ hücre popülasyonun gruplara göre değişimini gösteren grafik. *p<0.05 K'ye göre. K: Kontrol, I: İnsülin. | 35 |
| Şekil 4.9. p-JAK2 (Tyr1007/1008), p-STAT3 (Tyr705) ve p-IRS1 (Ser307) seviyelerinin deney gruplarına göre değişimi. A. Sol üst panelde p-JAK2 (Tyr1007/1008) ile yükleme kontrolü olarak kullanılan JAK2 protein bantlarını gösteren western emdirim bantları ve sol alt panelde bu batların optik yoğunlukları ile hesaplanan p-JAK2 (Tyr1007/1008) seviyelerini gösteren grafik yer almaktadır. B. Sitoplazmik ve nüklear p-STAT3 (Tyr705) ile p-IRS-1 (Ser307) seviyelerini gösteren ELISA bulguları verilmiştir. *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 K'ye göre; #p<0.01 ve ###p<0.001 20 nM I'ye göre; +p<0.05 ve +++p<0.001 0.5 ng/ml TNFα'ya göre. K: Kontrol, tam medyum uygulanmış hücreler. I: İnsülin. | 36 |
| Şekil 4.10. Epiteliyal-mezenkimal geçiş protein seviyelerinin deney gruplarına göre değişimi. *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 K'ye göre; #p<0.01 20 nM I'ye göre, ^β p<0.05 ve ^{βββ} p<0.001 0.5 ng/ml TNFα'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin. | 37 |
| Şekil 5.1. Mevcut yüksek lisans tez projesinden elde edilen bulgular şematize edilmiştir. Şekil, BioRender.com sayfası kullanılarak hazırlanmıştır. | 53 |

TABLO LİSTESİ

| | Sayfa No |
|--|----------|
| Tablo 3.1. cDNA eldesi için yürütülen programın basamakları. | 16 |
| Tablo 3.2. qPCR analizleri için kullanılan primerler dizileri (5'→3') | 17 |
| Tablo 3.3. qPCR programı. | 18 |
| Tablo 3.4. Nükleer fraksiyon izolasyonu protokolündeki B tamponunun içeriği..... | 19 |
| Tablo 3.5. SDS-PAGE jellerinin içerikleri. | 21 |
| Tablo 3.6. 10X tank tamponu içeriği. | 21 |
| Tablo 3.7. Towbin Tamponu içeriği. | 22 |
| Tablo 3.8. Çalışmada kullanılan antikorlar ve uygulama konsantrasyonları. WB: Western Emdirimi; E:ELISA | 23 |
| Tablo 3.8 (DEVAM) Çalışmada kullanılan antikorlar ve uygulama konsantrasyonları. WB: Western Emdirimi; E:ELISA | 24 |

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

| | |
|----------|--------------------|
| % | : Yüzde |
| mg | : Miligram |
| mL | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| nm: | : Nanometre |
| ng | : Nanogram |
| °C | : Santigrat Derece |
| α | : Alfa |
| β | : Beta |
| Δ | : Delta |
| μ L | : Mikrolitre |

Kısaltmalar Açıklama

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| ALDH1 | : Aldehit Dehidrojenaz 1 |
| APS | : Amonyum Persülfat |
| BSA | : Sığır Serum Albumin |
| cDNA | : Komplementer DNA |
| CK19 | : Sitokeratin-19 |
| c-MET | : Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü |
| c-Myc | : Hücresel Myc |
| CO ₂ | : Karbondioksit |
| CSC | : Kanser Kök Hücresi |
| DEPC | : Dietil Pirokarbonat |
| DMSO | : Dimetilsülfoksid |
| EDTA | : Etilendiamintetraasetik Asit |
| EGF | : Epidermal Büyüme Faktörü |
| ELISA | : Enzim Bağlı İmmünoresorbent Tekniği |
| EMT | : Epitelial Mezenkimal Geçiş |
| FITC | : Floresein İzotiyosiyanat |

| | |
|--------------------------------|---|
| HCl | : Hidroklorik Asit |
| HGF | : Hepatosit Büyüme Faktörü |
| HRP | : Yaban Turpu Peroksidazı |
| I | : İnsülin |
| IGF-1 | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü - 1 |
| IGF1R | : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü – 1 Reseptörü |
| IL-1β | : İnterlökin 1 β |
| IL-6 | : İnterlökin-6 |
| IR | : İnsülin Reseptör |
| IRS1 | : İnsülin Reseptörü Substratı - 1 |
| JAK | : Janus Kinaz |
| K | : Kontrol |
| kDa | : Kilodalton |
| MgCl₂ | : Magnezyum Klorür |
| NaCl | : Sodyum Klorür |
| NF-κB | : Nükleer Faktör- κ B |
| PBS | : Fosfat Tamponlu Salin |
| PDA | : Pankreatik Duktal Adenokarsinom |
| PI | : Propidyum İyodür |
| p-IRS1 | : Fosforile İnsülin Reseptörü Substratı - 1 |
| p-JAK | : Fosforile Janus Kinaz |
| p-STAT | : Fosforile Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü |
| RT-qPCR | : Kantitatif Gerçek Zamanlı Geri Çevrim Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| SDS | : Sodyum Dodesil Sülfat |
| SLUG | : Çinko Parmak Proteini SNAI2 |
| SMAD4 | : SMAD Ailesi Üyesi 4 |
| SNAIL | : Çinko Parmak Proteini SNAI1 |
| STAT | : Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü |
| T2D | : Tip 2 Diyabet |
| TBS | : Tris-Tamponlu Salin |
| TEMED | : Tetrametiletildiamin |
| TNF-R1 | : Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1 |
| TNF-R2 | : Tümör Nekroz Faktör Reseptör 2 |
| TNFα | : Tümör Nekroz Faktör Alfa |

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOM GELİŞİMİNDE İNSÜLİN ve TNF α 'NIN ROLÜ]

[Sinem KARAKUŞ]

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

[Biyoloji Anabilim Dalı]

Danışman: Prof. Dr. [Selda OKTAYOĞLU]

[Tip 2 diyabet (T2D)'in insidansı ve kanser gibi potansiyel komplikasyonları dünya çapında şaşırtıcı bir hızla artmaktadır. Mevcut bilgilere göre, pankreas kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde diyabet, obezite ve beslenme alışkanlıkları arasında önemli bir bağlantı bulunmaktadır. Bu etkenlerin pankreas kanseri ile ilişkisine dair önerilen teoriler arasından kronik inflamasyon, insülin direnci, hiperglisemi, insülin/insülin benzeri büyüme faktörü eksenindeki anormallikler öne çıkmaktadır. Kapsamlı çalışmalara rağmen, T2D ve pankreas kanseri arasındaki kesin etkileşim belirsizliğini korumakta ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut yüksek lisans tez çalışması kapsamında sağlıklı insan pankreası türevli kanal hücrelerine insülin sinyalini uyaracak seviyede insülin tek başına ve ayrıca proinflamatuvar bir sitokin olan Tümör Nekroz Faktör α (TNF α) ile birlikte uygulanarak bu hücrelerin malign transformasyonunun epiteliyal karakterden mezenkimal karaktere geçiş (EMT), sfer oluşturma kabiliyeti, kanser kök hücre (CSC) belirteçlerini ifade etme seviyeleri ve karsinogenez ile ilişkili moleküler mekanizmaların araştırılması ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle insülin ve TNF α sinyalinin pankreatik duktal hücreleri pankreatik adenokarsinom (PDA) hücrelerine dönüştürme olasılığı ve ilaveten ilgili moleküler mekanizma araştırılmıştır. Tez kapsamında hücre kültürü, western emdirimi, ELISA, akım sitometri ve qRT-PCR yöntemleri kullanılmıştır.

Sonuç olarak, normal insan pankreatik kanal hücrelerinde düşük seviyeli kronik insülin uyarısının IRS1 aracılığıyla sırasıyla JAK2 ve STAT3 aktivasyonunu sağlayarak CSC, EMT ve karsinogenez ile ilgili hedef genlerin ifadenmesini sağlayabileceği ilk defa bu çalışma ile

gösterilmiştir. Normal insan pankreatik kanal hücrelerinde düşük seviyeli kronik TNF α uyarısının IRS1'i serin 307 bakiyesinden fosforlayarak insülin direncine neden olabileceği gösterilmiştir. Normal insan pankreatik kanal hücrelerinde düşük seviyeli kronik insülin ile uyarılan CSC oluşumu, EMT ve karsinogenez gelişiminin TNF α uyarısının etkisiyle p-IRS (Ser307)'un nükleusa geçişi ile birlikte ileri seviyeye taşıyabileceği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.

Bu çalışma, PDA seviyelerinin klinik takibi için nüklear STAT3 ve IRS1'in kullanımının biyobelirteç olarak önerilebileceği ve ayrıca p-IRS1 (Ser307)'un PDA tedavisi için hedeflenebilecek potansiyel bir molekül olarak tanıtılması yönleriyle özgün bir çalışmadır. |

Haziran 2025, |92.| sayfa.

Anahtar kelimeler: |Epiteliyal mezenkimal geçiş, insülin, JAK/STAT yolağı, kanser kök hücresi, karsinogenez, p-IRS1 (Ser307), pankreatik kanal hücresi, TNF α . |

SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

**[THE ROLE OF INSULIN and TNF α in the DEVELOPMENT of
PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA]**

[Sinem KARAKUŞ]

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biology]

Supervisor : [Prof. Dr.] [Selda OKTAYOĞLU]

The incidence of type 2 diabetes (T2D) and its potential complications such as cancer are increasing at an astonishing rate worldwide. According to current knowledge, there is an important link between diabetes, obesity and dietary habits in the development and progression of pancreatic cancer. Some of the proposed theories regarding the relationship of these factors with pancreatic cancer include chronic inflammation, insulin resistance, hyperinsulinemia, hyperglycemia and abnormalities in the insulin and insulin-like growth factor axis. Despite extensive studies, the exact interaction between T2D and pancreatic cancer remains unclear and further research is needed.

Within the scope of the current master's thesis project, it is aimed to demonstrate the malignant transformation of these cells by investigating the transition from epithelial to mesenchymal (EMT) character, the ability to form sphere, the expression levels of cancer stem cell (CSC) markers, and the molecular mechanisms associated with carcinogenesis by administering insulin to the duct cells of human pancreas at the level that would stimulate insulin signaling alone and in combination with a proinflammatory cytokin Tumor Necrosis Factor- α (TNF α). Thus, the possibility of insulin and TNF α signaling to transform pancreatic ductal cells into pancreatic adenocarcinoma cells and in addition, the relevant molecular mechanism will be investigated.

Cell culture, western blotting, ELISA, flow cytometry and qRT-PCR methods were within the scope of the thesis.

In conclusion, this study has shown for the first time that chronic low-level insulin stimulation in normal human pancreatic duct cells can activate JAK2 and STAT3 via IRS1, respectively, and thus enable the expression of target genes related to CSC, EMT and carcinogenesis. It has been shown for the first time that chronic low-level TNF α stimulation in normal human pancreatic duct cells can phosphorylate IRS1 from the serine 307 residue, causing insulin resistance. This study has shown for the first time that chronic low-level insulin-induced CSC formation, EMT and carcinogenesis in normal human pancreatic duct cells can be carried to an advanced level together with the transfer of p-IRS (Ser307) to the nucleus under the effect of TNF α stimulation.

This study is an original study in that the use of nuclear STAT3 and IRS1 can be suggested as biomarkers for clinical monitoring of PDA levels and also introduces p-IRS1 (Ser307) as a potential molecule that can be targeted for PDA treatment.

June 2025, 92. pages.

Keywords: Epithelial-mesenchymal transition, insulin, JAK/STAT pathway, cancer stem cell, carcinogenesis, p-IRS1 (Ser307), pancreatic duct cell, TNF α .

1. GİRİŞ

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDA), insidansı her yıl yaklaşık %1 oranında artan ve 2030 yılına kadar kanserden kaynaklanan ölüm oranları arasında ikinci sıraya yükseleceği ön görülen bir kanser çeşididir. Çoğu hastada, PDA oluşumu ve ilerlemesi sırasında belirgin semptomlar gözlenmediği için hastalık tespit edilememektedir ve pankreas tümör hücrelerinin ileri invaziv karakterleri dolayısıyla oldukça hızlı ilerler. Tanı koyulabilen hastaların %50'sinde hastalığın ilerlediği tespit edilmiştir fakat bu seviyede mevcut sitotoksik tedavilerin orta düzeyde etkili olduğu bilinmektedir (Park ve diğ., 2021).

Pankreatik duktal adenokarsinom risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet ve genetik faktörlerin yanı sıra diyabet öne çıkmaktadır. Pankreas kanseri hastalarında şiddetli periferik insülin direnci ile karakterize edilen tip 2 diyabet (T2D) sıklıkla birlikte görülür. Hiperinsülinemi ya da artmış insülin seviyesi PDA hastalarında sık gözlenen bir durum olup PDA hastalarının %80'inde diyabet ve bozulmuş insülin toleransı görülmektedir (Pannala ve diğ., 2009).

İnsülin direncinin hücre içi mekanizması, diyabetik veya diyabetik olmayan pankreas kanseri hastalarından ve kontrol deneklerinden alınan iskelet kası biyopsilerinde araştırılmıştır (Liu ve diğ., 2000). Ancak, pankreatik kanal hücrelerinde periferik insülin direnci sebebiyle oluşan insülin sinyali ve ilişkili moleküler mekanizmaların hedeflenmesine ya da açıklanmasına yönelik yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu konu ile ilgili olarak ulaşılan net bilgi, pankreas kanseri hücrelerinin periferik insülin seviyesini ve dolayısıyla hiperinsülinemi artırabilecek moleküller sentezlediği, insülinin ise tümörijenik inflamasyon, lipid ve glukoz metabolizmasını yeniden programlama, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ile apoptozdan kaçma, kanser metastazını aktive etme ve tümör mikro çevre oluşumu gibi durumlarda etkili olarak pankreas kanseri başlangıcına ve PDA gelişiminin devam etmesine yol açabileceğidir (Deng ve diğ., 2022). Periferik insülin direnci ve pankreas kanseri vakaları arasındaki korelasyon göz önünde bulundurulduğunda pankreatik kanal hücrelerinde gelişen insülin ve inflamatuvar sinyaller ile ilişkili moleküler mekanizmaların aydınlatılması, erken tanı ve tedavi için hedeflenebilecek yeni aday moleküllerin belirlenmesi için önemli ve gereklidir.

Literatürdeki mevcut bilgilerden ve eksikliklerden yola çıkılarak bu tez çalışmasında sağlıklı insan pankreasına ait kanal hücrelerine insülin sinyalini uyaracak seviyede insülin tek başına

ve ayrıca proinflamatuvar bir sitokin olan $TNF\alpha$ ile birlikte uygulanarak bu hücrelerin malign transformasyonu ve ilişkili moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. |



2. GENEL KISIMLAR

2.1. PANKREAS KANSERİ

Pankreas, ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahip karma bir salgı organıdır. Pankreasın büyük bir bölümünü ekzokrin salgı yapan asiner hücreler ile kanal hücreleri oluştururken küçük bir kısmını glukoz homeostazının sağlanmasında görev alan hormonların salgılandığı “Langerhans Adacıkları” adlı endokrin bölgeler oluşturmaktadır (Da Silva Xavier, 2018). Pankreatik adenokarsinom çoğunlukla duktal karakteristik gösterse de küçük bir kısmı asiner kaynaklı adenokarsinom olarak ortaya çıkabilmektedir (Cherri ve diğ., 2021).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2021 yılında yayınladığı verilere göre görülme sıklığı sıralamasında 12. sırada bulunan pankreas kanseri, kanser sebepli ölüm sıralamasında 6. sırada yer alır (Sung ve diğ., 2021). Pankreas kanserinin, kanser kaynaklı ölüm sıralamasında her yıl oranını arttırdığı bilinmektedir ve 2030 yılına kadar ikinci sıraya yükseleceği tahmin edilmektedir. Pankreas kanseri hastalarında en sık görülen çeşidi ise PDA'dır (Grigorescu ve diğ., 2024)

Pankreatik duktal adenokarsinomun risk faktörleri arasında yaşam tarzı, alkol, tütün ve türevlerinin kullanımı, kronik pankreatit, obezite ve diyabet yer almaktadır. Bireysel olarak bu risk faktörlerinin etkisi farklılık gösterse de PDA etiyolojisinde diyabet ve obezite çoğunlukla ön plandadır. PDA, belirgin semptomlara sahip değildir ve hücreler oldukça invazivdir. Bu sebeple hastalığın tanısını koymak zor olmakla birlikte tanı koyulabildiğinde ise hastalığın oldukça ileri safhalarda olduğu ve çoğu zaman da metastaz yaptığı gözlenmektedir. Tedavilerin ileri safhalarda çok etkili olmaması hastalığın ölümcüllüğünün yüksek, beş yıllık sağ kalım oranının diğer solid tümörlere nazaran daha düşük olmasına yol açmaktadır (Tonini ve diğ., 2021; Halbrook ve diğ., 2023) PDA'nın etiyolojisi, etkili olduğu hücresel süreçler ve moleküler mekanizmalar hakkında yeterli bilgiye sahip olunmadığı için sağ kalım yüzdesi ve yaşam kalitesini artıran etkili bir tedavi yöntemi henüz bulunmamıştır. PDA tedavilerinin etkinliği hastalığın hangi seviyede teşhis edildiği ile doğru orantılıdır. Ameliyatla tümörün alınması sonrası kemoterapi ile tedaviye devam edilmesi günümüzde tedaviye yardımcı olduğu bilinen mevcut terapi yöntemi olarak yer alsa da hastaların sadece %10 ila 20'sinde ameliyatla tümör alınabilir durumdadır, geriye kalan kısımda kanser ya çok ileri safhalarda ya da metastaz yapmış haldedir. Radyoterapi ve sistemik kemoterapi gibi tedavi yöntemlerinin yanı sıra, bazı

kemoterapi ilaçlarının kombine kullanımı ile yapılan tedaviler de sağ kalımı artırmaya yönelik gözle görülür katkı sağlayamamıştır (Orth ve diğ., 2019; Cherri ve diğ., 2021).

2.1.1. Pankreas Kanseri İnsülin Direncinin Etkisi

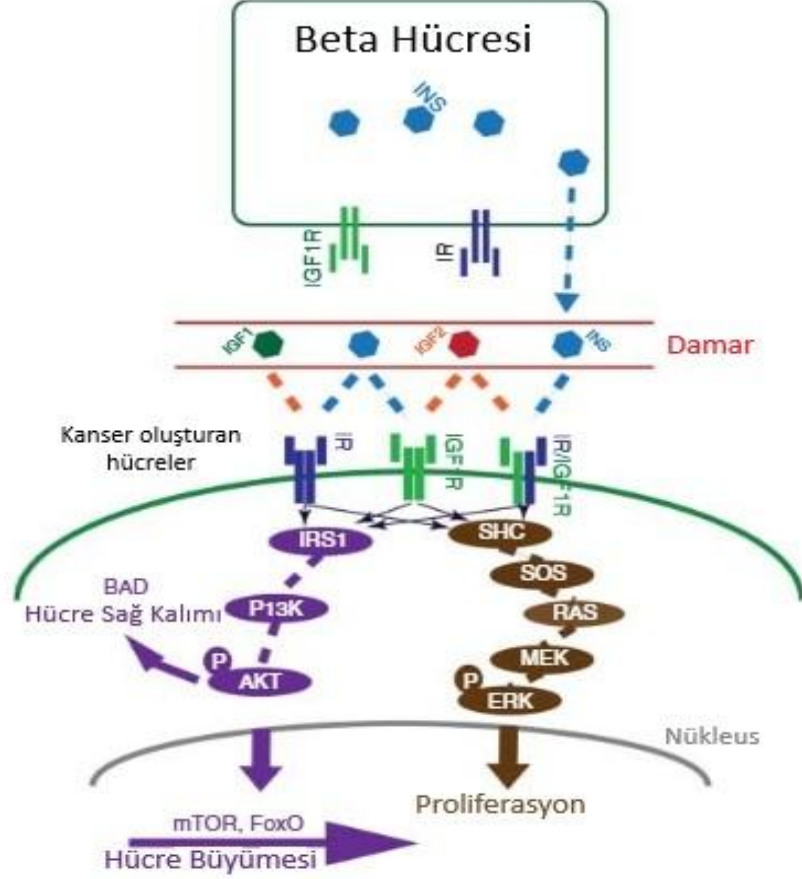
Tip 2 diyabetin pankreas kanseri için risk faktörü olduğu bilinse de bu iki patoloji arasındaki ilişki henüz tamamen aydınlatılmamıştır. T2D hastalarında görülen metabolik bozukluklar sadece hiperglisemiye değil aynı zamanda obezite, insülin direnci veya hiperinsülinemiye içermektedir ve bu bozuklukların sadece biri bile pankreas kanseri riskini artırmaya yeterlidir (Toledo ve diğ., 2022).

İnsülin ve PDA ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda inflamatuvar bir çevrede hiperinsülinemi ve pankreas kanseri arasında nedensel bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Gao ve diğ., 2015). Hiperinsülineminin PDA'ya neden olabileceği gibi PDA'nın da periferik insülin direncini indükleyerek hiperinsülinemi, hatta diyabete sebep olabileceği bilinmektedir (Deng ve diğ., 2022). Pankreas kanseri hastalarının dokularında yapılan bazı çalışmalar, dokularda meydana gelen insülin direncinin varlığını ortaya koymuştur. Örneğin; Wang ve ekibi (2017) PDA'dan salgılanan mikro-RNA'ların PI3K/Akt/FOXO1 sinyal yolağını aktive ederek normal koşullarda insülin tarafından kandaki glukozun kas hücrelerine taşınmasını engellediğini bildirmiştir.

Hiperinsülinemi, T2D koşullarında pankreasa yağ depolanmasını ve pankreatik yağ dokuyu inflamatuvar faktörlerin salgılanması yönünde aktive ederek pankreatik duktal hücrelerin mikroçevresinde kronik inflamasyonu indükler. Hiperinsülineminin bu inflamasyon indükleyici özelliğinin diyabet ve pankreatit durumlarında daha da arttığı ve etkili olduğu bildirilmiştir (Deng ve diğ., 2022; Zhang ve diğ., 2021). İnsülin uyarısını takiben pankreatik yağ dokusu sürekli bir şekilde pankreastaki inflamasyonu artırıp onkogenik mutasyon ve PDA başlangıcına sebep olabilecek IL-6, IL-1 β ve TNF α gibi inflamatuvar sitokinlerin salınmasını sağlar (Brocco ve diğ., 2020; Russo ve diğ., 2018).

İnsülinin yanı sıra IGF-1 de pankreatik kanser gelişiminde rol alır. Normal koşullarda karaciğerde sentezlenen IGF-1'in hücre büyümesi ile ilişkili olduğu, apoptozu inhibe etmek ve proliferasyonu artırmakla görevli olduğu bilinmektedir (Yu ve Rohan, 2020; Pollak, 2008). IGF-1 ile birlikte reseptörleri de pankreas kanseri çalışmalarda oldukça sık hedeflenir. IGF-1

reseptörlerinin hedeflenmesiyle yapılan çalışmalara ek olarak insülin reseptörleri (IR) de PDA için hedeflenen proteinler olmuştur ve bu iki reseptör grubunun en çok etki ettiği iki yolak PI3K/AKT ile MEK/ERK sinyal yollarıdır (**Şekil 2.1**) (Trajkovic-Arsic ve diğ., 2013).



Şekil 2.1. İnsülin ve IGF'nin yönlendirdiği pankreas kanseri gelişimiyle ilgili hüresel yollar şematize edilmiştir (Trajkovic-Arsic ve diğ., 2013).

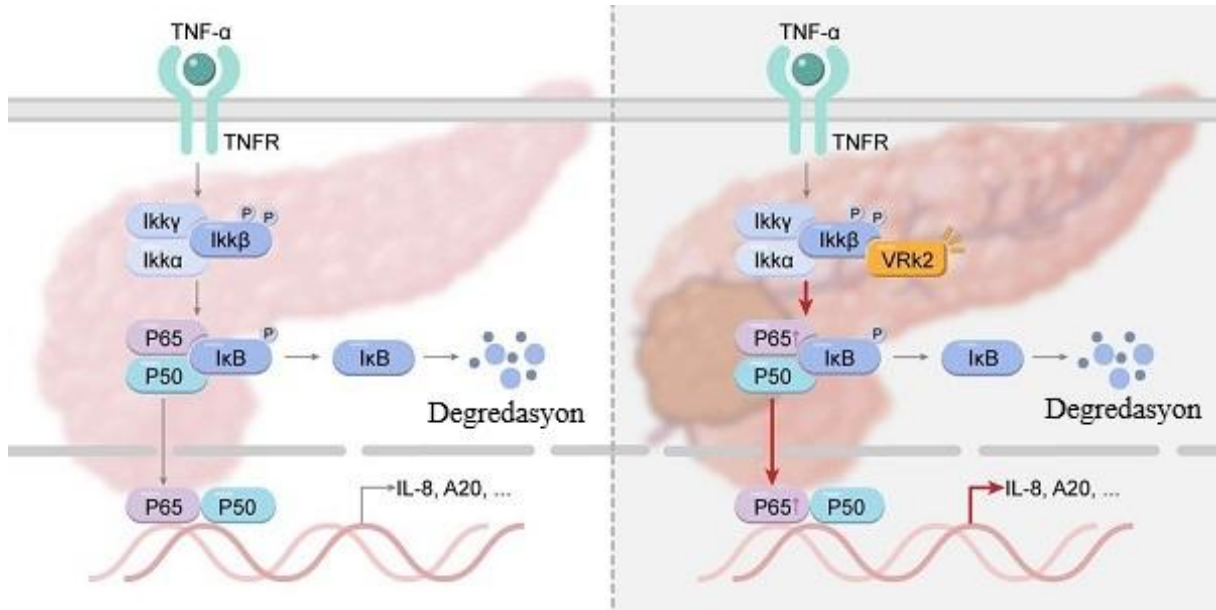
2.1.2. Pankreas Kanseri ve İnflamasyonun İlişkisi

Kanser üzerine yapılan çalışmalarda inflamasyonun pankreas kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün gelişimi, ilerlemesinde ve metastazında etkili olduğunu ortaya konmuştur (Padoan ve diğ., 2019; Shi ve Xue, 2019). Pankreas kanseri için risk faktörü olan alkol veya sigara tüketimi, diyabet ve dolaylı olarak obezite ya da pankreatit, inflamasyonun ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Shi ve Xue, 2019). İnflamasyon, dolaylı ya da direkt olarak pankreas kanseri gelişimine yol açabilir. Obezite ve diyabetle ilişkili olan kronik inflamasyon, meta-inflamasyon olarak da tanımlanır ve kanserle inflamasyon arasındaki ilişkiyi anlatır

(Hotamisligil, 2017). Örneğin; obez hastaların çoğunda anti-inflamatuar bir adipokin olan adiponektinin salgısında azalma gözlenirken pro-inflamatuar adipokin olan leptinin üretimi artar. Hatta M2 anti-inflamatuar makrofajların M1 pro-inflamatuar makrofajlara değişerek yağ dokuya geçmesi, TNF α ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını tetiklemektedir. Bu gibi değişimlerin DNA hasarı oluşturarak kronik inflamasyonda etkili olduğu ve kanser gelişimine yardımcı olduğu bilinmektedir (Porta ve diğ., 2018).

Hücre büyümesi ve farklılaşması, metabolizma, inflamasyon ve bağışıklık dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer alan sitokinler, tümör mikro çevresini düzenlerken kanser hücrelerini direkt olarak etkiler (Roshani ve diğ., 2014). Örneğin; pro-inflamatuar sitokinlerden olan IL-6, aynı zamanda pro-tümörjenik bir etkiye de sahiptir. PDA hastalarında yapılan çalışmalarda serumdaki IL-6 seviyesinin tümörün hangi aşamada olduğu ve sağ kalım süresi hakkında bilgi vererek bu sitokinin hastalık belirteci olarak kullanılabileceği belirtilirken pankreas kanseri ve kanser ilişkili fibroblastlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise IL-6'nın tümör migrasyonu ve invazyonunu artırmasının yanı sıra epitelial-mezenkimal geçiş (EMT)'i indüklediği gösterilmiştir (Yako ve diğ., 2016; Feng ve diğ., 2018).

Pro-inflamatuar bir sitokin olarak tanımlanan bir başka protein olan TNF α , inflamasyon ile ilişkili hastalıklarda önemli bir role sahipken aynı zamanda pankreas kanseri patogenezi de etkilidir. TNF α ; TNF-R1 (p55) ve TNF-R2 (p75) adlı iki farklı hücre yüzey reseptörü üzerinden hücre içi sinyali iletir. TNF-R1 ve TNF α bağlandıktan sonra NF- κ B ve c-JUN (Transkripsiyon faktörü Jun) sinyal yollarının aktifleşmesine yol açan bir takım hücre içi olayı tetikler (Chen, 2002). TNF-R2 ise çoğunlukla bağışıklık hücrelerinde bulunur ve kanonik olmayan NF- κ B sinyal yolağını indükler (Moatti ve Cohen, 2021). Pankreas kanserinde TNF α 'nın karsinogenezi nasıl regüle ettiği üzerine yapılan bir çalışmada TNF α tarafından uyarılan TNF-R2 seviyelerinin pankreas kanseri hücrelerinde yüksek olduğu ve TNF-R2'nin de NF- κ B sinyal yolağı aracılığıyla kanser hücrelerinde metastaz ve proliferasyonda etkili olduğu gösterilmiştir (Gao ve diğ., 2023) Ek olarak Chen ve ekibi (2022) VRk2'nin de TNF α /NF- κ B sinyal yolu üzerinden pankreas kanserinin gelişimini arttırdığı ortaya koymuştur (**Şekil 2.2**).



Şekil 2.2. Pankreas kanserinde TNF α NF- κ B sinyal yolağı üzerinden etki gösterir (Chen ve diğ., 2022).

2.2. KANSER KÖK HÜCRELERİ

Normal kök hücreler veya progenitör hücelere benzerlik gösteren kanser kök hücreleri (CSC), tümör oluşumu ve büyümesine yol açan kendini yenileme yetileri ve farklılaşma özellikleriyle karakterize edilirler (Yu ve diğ., 2012). CSC'ler kanser başlangıcı, ilerlemesi, metastaz ve ilaç direncine yol açmaktadır (Safa, 2020). Radyoterapi, kemoterapi ya da kemoterapik ilaçların birlikte kullanılmasıyla kanser gerilese de CSC'ler ilaçlara direnç geliştirip kanserin tekrar nüksetmesine neden olabilirler. Kanser hücreleri arasında küçük bir popülasyonu oluşturan CSC'ler, kendini yenileme ve heterojen kanser hücrelerine farklılaşabilme özelliklerinden dolayı kanserin tekrar ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Phi ve diğ., 2018)

Kanser kök hücrelerinin tümör gelişimi, metastaz, hücre proliferasyonu ve ilaç dirençliliği gibi kanser hücreleri için oldukça önemli süreçlerde etkili olduğu bilinmektedir (Chang, 2016). İlk kez 1994 yılında insan akut myeloid lösemi ile ilgili yapılan bir çalışmada kök hücrelerin kanserdeki rolünün keşfedilmesinin ardından meme, beyin, akciğer, pankreas, karaciğer, mide ve kolon kanseri gibi birçok kanser türünde kök hücre popülasyonlarının varlığı gösterilmiştir (Lapidot ve diğ.,1994; Chang, 2016). Tümör içerisinde oldukça küçük bir popülasyonu oluşturan bu hücreler, bazı hücre yüzey belirteçleri ile tespit edilebilir. PDA'da kök hücre

özelliği gösteren hücre popülasyonları ilk kez CD24, CD44 ve ESA belirteçleri ile tanımlanmıştır (Bubin ve diğ., 2023).

2.2.1. Pankreatik Duktal Adenokarsinom ile İlişkili Kanser Kök Hücre Belirteçleri

Kanser tedavilerinde yer alan kemoterapi veya radyoterapinin CSC'leri hedeflemede yeterince etkili olmaması sebebiyle bu hücreleri başka belirteçler yardımıyla hedeflemek olası terapötik tedaviler için olanak sağlayabilir (Talukdar ve diğ., 2023). Ayrıca, bu yolla kanserin erken safhalarda tanısının yapılması, yeni ilaçların keşfi ve kanser hastalarının yaşam kalitesinin artırılması da mümkün olabilir.

2.2.1.1. CD24

İlk defa B lenfosit belirteci olarak tanımlanan CD24 proteini, CD24 geni tarafından kodlanır (Lim ve diğ., 2005). Tümör hücrelerinde oldukça fazla ifadelenen CD24, tümör hücrelerinin makrofajlar tarafından fagositozunun yapılmasını engeller. Ayrıca, tümör hücrelerinin metastazında etkili olduğu da bilinir. Düşük CD24 seviyesi, tümör hücrelerinin proliferasyonunu azaltıp apoptozu aktifleştirirken yüksek CD24 seviyesinde ise tümör hücrelerinin büyümesi ve metastazı tetiklenmektedir (Zhuo ve Wang., 2019).

Pankreas kanserinde CD24'ün etkili olduğu, PDA köklülüğü üzerinde yapılan bir çalışmada keşfedilmiştir (Li ve diğ., 2007). Ek olarak CD24'ün fazla ifadelenmesi sonucu N-kaderin seviyelerinin azalarak E-kaderin seviyelerinin arttığı bilinmektedir. Daha invaziv bir karakter gösteren CD24⁺ tümör hücrelerinin EMT'yi tetiklediği ve PI3K/Akt ve MAPK hücre sinyal yollarını etkileyerek hücre büyümesi ile ilgili sinyalleri artırdığı bilinmektedir (Nakamura ve diğ., 2017).

2.2.1.2. CD44

CD44, normal koşullarda hücre-hücre etkileşimleri, hücre migrasyonu, hücre iskeletinin dış matrikse bağlanması gibi hücresel süreçlerde yer alan bir transmembran glikoproteindir (Briede

ve diğ., 2021). Birçok liganda bağlansa da hyaluronik asit CD44'ün ana ligandıdır ve bu sayede hücrenin ekstrasellüler matriks üzerinde hareketini sağlar (Bubin ve diğ., 2023).

Ekstrasellüler matriks adezyon molekülü olan CD44, tümör hücreleri tarafından fazla eksprese edilir ve bu yüzden CSC'ler için önemli bir belirteç olarak kabul görür. Tümör migrasyonu, invazyon ve metastaz gibi süreçlerde etkili olsa da tek başına CD44 ifadenmesi, CSC belirteci olarak kabul edilmemektedir (Yaghobi ve diğ., 2021; Bubin ve diğ., 2023). CD24 veya CD133 gibi diğer CSC belirteçleri ile birlikte değerlendirilerek analiz edilmelidir (Bubin ve diğ., 2023).

2.2.1.3. CD133

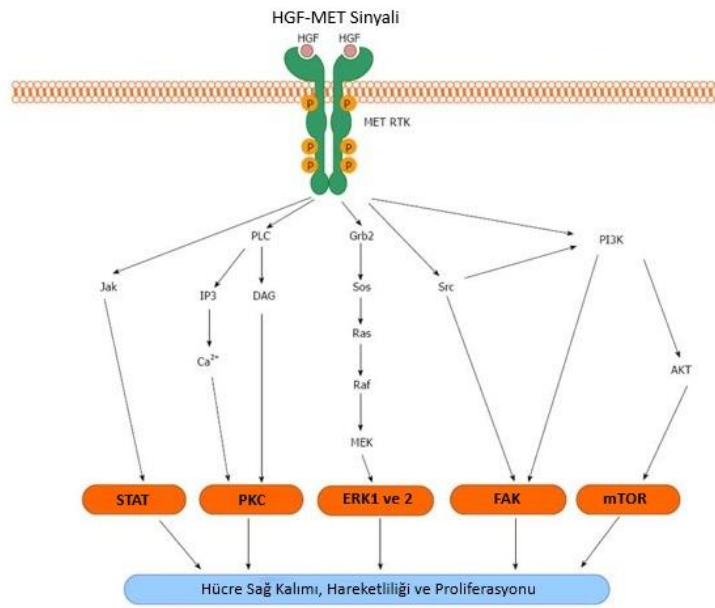
Kanser kök hücre belirteçleri arasında en öne çıkan belirteç olan CD133, normal hücrelerde membran organizasyonunda görev alır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ile ilişkili olmasının yanı sıra birçok kanser çeşidinde varlığı tespit edilmiştir (Bubin ve diğ., 2023). Pankreatik duktal adenokarsinomda CD133'ün yüksek seviyelerde tümör oluşumunu indüklediği ve CSC belirteci olarak kullanılabilceği fareler üzerinde yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Hermann ve diğ., 2007). Bu çalışmaya göre, CD133⁺ hücrelerin çok küçük bir popülasyon olmasına rağmen oldukça tümörjenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir.

2.2.1.4 ALDH1

Asetaldehit dehidrogenaz ailesinin bir üyesi olan ALDH1, normal durumlarda retinalin retinoik aside dönüştürülmesinde görev alır. Karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında yer alır ve hücrenel bir lipaz olarak birçok doku için doku farklılaşması ve gen seviyelerinin değişiminde önemli bir rol oynar. Normal dokularda düşük miktarda bulunurken öncül kanser hücrelerinde ALDH1 ifadesinin artış göstermesi ve CSC özelliklerinin korunup kanseri uyarması sebebiyle CSC'leri normal hücrelerden ayıran bir belirteç olarak kabul edilir (Wei ve diğ., 2022).

2.2.1.5 c-MET

Hepatosit büyüme faktörü (HGF)'nin reseptörü olan c-MET, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. HGF ve reseptörü c-MET'in bağlanması sonucu, c-MET'in yapısında meydana gelen değişimler birçok sinyal yolağının efektör moleküllerini etkiler (**Şekil 2.3.**). Bu moleküllerden bilinenler Src, mitojen ilişkili kinaz, PI3K, AKT, STAT ve NF κ B'dir (Delitto ve diğ.,2014). HGF/c-MET ilişkisi embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve organ gelişimi gibi önemli fizyolojik süreçlerde yer almaktadır (Bubin ve diğ., 2023).



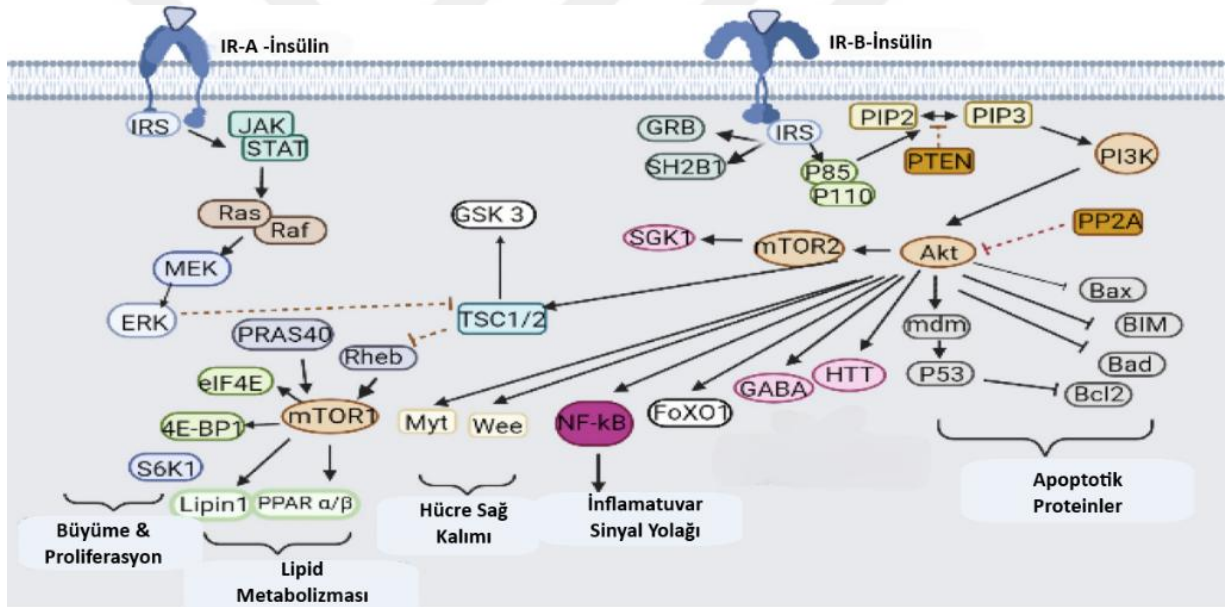
Şekil 2.3. HGF/c-MET sinyalinin etkilediği sinyal yolları (Delitto ve diğ., 2014).

Birçok kanser türü için CSC belirteci olarak kabul gören c-MET, PDA için de önemli bir belirteçdir. c-MET ifadenmesi ve aktivitesi metastaz ve tümör büyümesi için gerekli olduğu gibi aynı zamanda kötü prognozla ilişkilidir (Li ve diğ., 2011). Ek olarak, c-Met ifadesinin pankreatik tümörler üzerindeki etkileri hastalardan alınan pankreatik kanser hücrelerinin farelere ksenograf transplantasyonu yoluyla yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. c-MET⁺ hücre popülasyonunun aynı zamanda CD44, CD24, CD133 ve ALDH1 gibi pankreatik CSC belirteçlerini de bulundurduğu fakat c-MET⁺ hücre grubunun, CD133⁺ ya da CD44⁺ CSC'lere nazaran daha fazla tümör oluşumuna sebep olduğu ve c-MET seviyesi düşük hücre popülasyonla karşılaştırıldığında sfer oluşumu gözlemlendiği için c-MET ifadenmesi ve

aktivitesinin CSC popülasyonunu korumak için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Herreros-Villanueva ve diğ., 2012).

2.3. JAK/STAT SİNYAL YOLAĞI

JAK/STAT sinyal yolağı interlökinler, hormonlar, ilişkili reseptörleri ve interferonlar olmak üzere birçok uyaran tarafından düzenlenir. Ligandın reseptöre bağlanmasıyla JAK proteinleri fosforilasyon ile aktif formlarına dönüşerek sitoplazmada yer alan STAT proteinlerinin fosforlanıp aktifleşmesini sağlar. STAT proteinlerinin sitoplazmada dimerleşip nükleusa geçerek hedef genlerinin ifadenmesini etkilediği bilinmektedir (Manni ve Min, 2022).



Şekil 2.4. İnsülinin IR-A ve IR-B aracılığıyla aktifleştirdiği sinyal yolları (Ramasubbu ve Devi Rajeswari, 2023).

Normal koşullarda JAK/STAT sinyal yolağı embriyonik hücre gelişimi, kök hücre devamlılığı, hücre içi denge ve inflamasyon kaynaklı cevabın oluşturulmasında görev alır. Kanser gibi anomaliler sebebiyle JAK/STAT sinyal yolağında meydana gelen değişimler, bu yolağın hücre ölümü, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve immün regülasyonda etkili olmasını sağlar (Bubin ve diğ., 2023). PDA' da STAT3 proteini rol alır ve JAK proteinlerinin STAT3'ü Tyr705 bakiyesinden fosforile etmesi yoluyla aktif hale gelir (Bubin ve diğ., 2023). CSC'lerin oluşumu

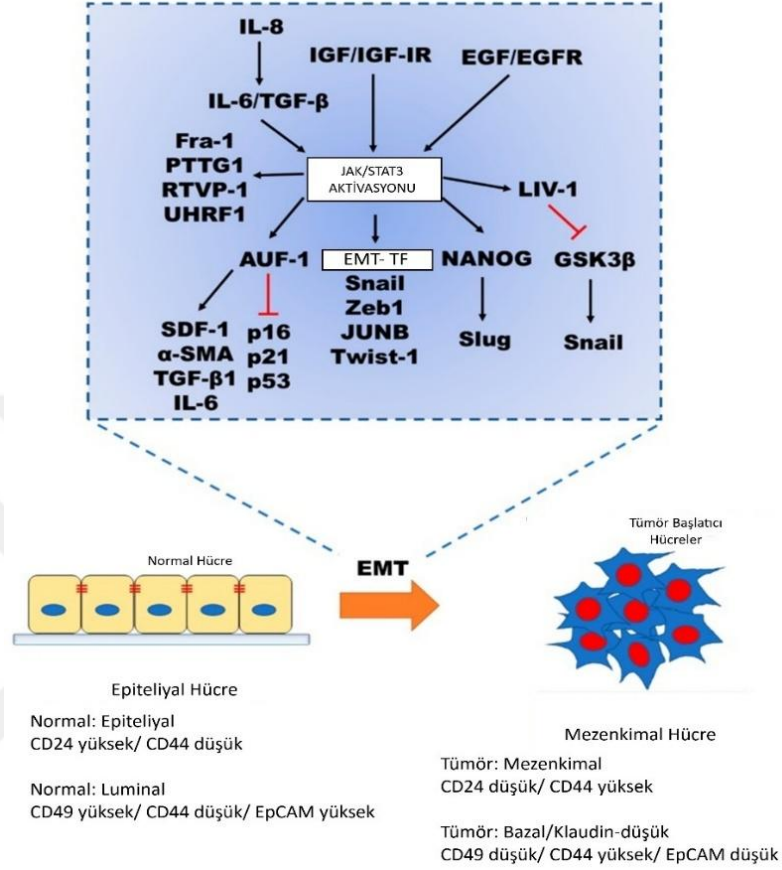
ve kansere ilaç direncinin sağlanması için JAK/STAT sinyal yolunun ya da JAK/STAT yolağı ile etkileşime giren sinyal yolaklarının aktifleşmesinde hücre dışı uyaranları ve bazı hücre içi sinyalleri rol oynar. CSC'ler kanser gelişimi ve tedavilere dirence sebep olduğu için bu yolakların aydınlatılması önem taşımaktadır.

IL-6 sitokin ailesinin STAT3 aktivasyonunu ve CSC'lerin metastazı, devamlılığı, kendini yenilemesi ve sağ kalımı için ana sinyal yolaklarından biri olan JAK/STAT yolağı, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi birçok molekül tarafından uyarılabilir (Yang ve diğ., 2020). Örneğin; JAK/STAT sinyal yolunun aktifleşmesine sebep olan IL-6 sitokin ailesinin STAT3 aktivasyonunu ve kanser kök hücre popülasyonunu belirgin bir şekilde arttırdığı bilinir (Jin, 2020). Aynı zamanda JAK1/STAT3 yolu üzerinden meme ve kolorektal kanser kök hücre popülasyonunu artırarak EMT'yi uyardığına dair bulgular da vardır (Zhang ve diğ., 2018).

Bu sinyal yolu CSC'lerin köklülük özelliklerinin artmasını sağlar. Örneğin, kök hücre belirteci olan Oct4'ün M2 makrofaj polarizasyonu ile JAK/STAT yolağıyla ilişkili sitokinlerin salınmasına yol açarak yumurtalık kanseri ve akciğer kanserinde CSC'lerin artışı sağladığı ortaya konmuştur (Lu ve diğ., 2020). Th17 hücrelerinin STAT3 bağımlı bir sinyal yolu ile IL-17'nin sekresyonunu sağlayarak yumurtalık, kolorektal ve mide kanserinde, ayrıca MAPK sinyal yolu ile de pankreas kanserinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Chen ve diğ., 2021). JAK/STAT sinyali, STAT3'ün bağışıklık baskılayıcı özelliği ve tümör mikro çevresinde fazla bulunmasına rağmen, STAT1/2'nin interferonlar yardımıyla bağışıklığı tetikleyip anti-kanser bir cevap oluşturulmasını sağlaması sebebiyle iki taraflı bir etkiye sahiptir (Borlongan ve Wang, 2023). Bu sebeple JAK/STAT yolağı üzerine yapılan çalışmalarda bu özellik de göz önüne alınmalıdır.

STAT proteinleri kanser patogeneziyle farklı şekillerde ilişkilendirilmektedir. Bunun sebebi STAT1 ve STAT3 proteinlerinin görevlerindeki farklılıktan kaynaklanır. Kanser araştırmalarında en sık çalışılan STAT proteini olan STAT3, EMT ve kanser gelişimiyle birlikte anılır (Yu, 2009). Örneğin, IL-6/JAK2/STAT3 yolağı aktifleştğinde fokal adezyon kinaz aktivasyonu ile hücre mobilitesi artarken EMT indükleyici faktörlerin yukarı yönlü düzenlenmesi ile de EMT uyarılarak metastaz artar (Sullivan ve diğ., 2009). Yapılan bir başka çalışmada ise prostat kanserinde IL-6/JAK2/STAT3 yolağı çalışılmış, IL-6 ve IGF ile IGF-IR aktivasyonu sonucu STAT3/NANOG/Slug eksenini üzerinden EMT'nin şiddetlendiği

gösterilmiştir (Yao ve diğ., 2016). **Şekil 2.5**'de JAK/STAT aktivasyonunda yer alan moleküller ve bu aktivasyonun EMT üzerindeki etkisi özetlenmiştir.



Şekil 2.5. JAK/STAT aktivasyonunda yer alan moleküller ve bu aktivasyonun EMT üzerindeki etkisi (Jin, 2020).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada insan normal pankreas kanal epitel hücre soyu hTERT-HPNE hücreleri (ATCC, CRL-4023, pasaj 3-10) 2 mM L-glutamin, 5.5 mM D-glikoz ve 1.5 g/L sodyum bikarbonat, %25 Medyum M3 Bazı, %5 FBS, 10 ng/ml insan rekombinant EGF ve 750 ng/ml puromisin içeren DMEM medyum içinde %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklığındaki inkübatörde tutularak çoğaltılmıştır. Medyum değişimleri üç günde bir gerçekleştirilmiştir. Zeminin doluluk oranı %80'e ulaştığında hücreler %0,25 Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve pasajlanmıştır. Pasajlama işlemlerinde ilk olarak medyum ortamdan uzaklaştırılmış, hTERT-HPNE hücreleri kalsiyum ve magnezyum bulundurmeyen fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır. Ardından hücreler, %0,25 Tripsin-EDTA ile 37°C'de üç dakika inkübe edilip süre sonunda tam medyum eklenerek Tripsin-EDTA'nın etkisi durdurulmuştur (Ligr ve diğ., 2014).

Çalışmada kapsamında dört farklı deney grubu oluşturulmuştur:

1. Tam medyum uygulanan kontrol grubu (K),
2. İnsülin sinyalinin uyarılmasını sağlamak için düşük konsantrasyonda insülin (I; 20 nM, Wang ve diğ., 2019) uygulanan grup,
3. TNF α (T; 0.5 ng/ml, ön denemelerin sonuçlarına göre belirlenmiştir) uygulanan grup,
4. Düşük konsantrasyonda insülin + TNF α (20 nM I + 0.5 ng/ml TNF α) uygulanan grup.

İnsülin ve TNF α tam medyum içerisinde çözülerek hücrelere uygulanmış ve 48 saat standart kültür şartlarında inkübe edilmiştir.

3.2. HÜCRE CANLILIK ÖLÇÜMÜ

Hücre canlılığını etkilemeyen insülin ve TNF α konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için MTT canlılık testi uygulandı. Bu test, hücrelerin metabolik aktivitesine bağlı olarak hücrelerin canlılığı, sitotoksosite ve proliferasyon hakkında fikir veren kolorimetrik bir testtir. MTT ya da diğer adıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür reaktifi, sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur ve metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından formazan olarak adlandırılan mor-mavi kristallere dönüştürülür. Suda çözünmeyen bu formazan kristalleri

dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürüldükten sonra 570 nanometre dalga boyunda absorban ölçülür (Ghasemi ve diğ., 2021).

Kısaca, 1×10^4 hücre 96 kuyulu plakalara ekildi. Zemin %80 konfluensiye ulaştığında hücelere 200 µl hacimde ilgili madde uygulamaları yapıldı. 48 saat inkübe edildikten sonra hücre medyumuna 5 mg/ml konsantrasyondaki stok MTT'den 60 µl eklenip 4 saat boyunca ışık almayacak şekilde inkübe edildi. Ardından kuyudaki medyum uzaklaştırılıp 100 µl DMSO eklendi. Oluşan kristallerin çözündürülmesi için 5 dakika 250 rpm'de orbital karıştırıcıda karıştırıldı. Çözünen kristallerin absorbanı 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.3. KANSER KÖK HÜCRE BELİRTEÇ GENLERİN İFADELENME SEVİYELERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Deney şartları hTERT-HPNE hücrelerine 48 saat süreyle uygulandıktan sonra CSC belirteç gen ifadenme seviyelerinin deney gruplarındaki değişiminin belirlenebilmesi için *Oct4*, *Nanog*, *CD133*, *CD24*, *CD44*, *CK19* ve *c-myc* genlerinin ifadenme seviyeleri gerçek zamanlı geri çevrim polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği kullanılarak ölçüldü. Teknik aşağıdaki adımlar takip edilerek uygulandı (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2021).

3.3.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

hTERT-HPNE hücrelerine 48 saat boyunca deney şartlarının uygulanmasını takiben medyum uzaklaştırıldı. Kuyular kalsiyum ve magnezyum bulundurmeyen soğuk PBS ile yıkandıktan sonra her kuyuya 1 ml One Step RNA Reagent (Biobasic Canada) eklendi. Buz üzerinde pipetaj ve kazıma yapılarak hücre içeriğinin açığa çıkması sağlandı.

Hücre bileşeni karışımı steril mikrosantrifüj tüplerine toplandıktan sonra 15 saniye yüksek hızda vortekslendi ve tüpler 5 dakika boyunca buzda bekletildi. Mikrosantrifüj tüplerine 200 µl kloroform ilave edilip tekrar 15 saniye yüksek hızda vortekslendi ve 5 dakika buzda bekletildikten sonra +4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 rpm hızda santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında mikrosantrifüj tüplerindeki sıvı iki faza ayrılmış durumdadır. Üst fazda kloroformla birlikte nükleik asitler yer alır. DNA, beyaz bir tortu halinde mikrosantrifüj

duvarlarına yapışmış haldeyken alt fazda ise Trizol, proteinler ve diğer hücre bileşenleri bulunur. RNA içeren üst fazdaki kısım, tortu haldeki DNA'ya dokunulmadan ayrı mikrosantrifüj tüplerinde toplandı. Toplanan miktara eşit hacimde izopropanol eklenip elde yavaşça karıştırıldı ve buzda 10 dakika bekletilmesinin ardından 10 dakika boyunca +4°C, 12.000 rpm hızda santrifüjlendi ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılıp dietil pirokarbonat (DEPC) bulunduran su ile hazırlanmış soğuk %78'lik etanolden 1 ml eklenerek örnekler 15 saniye boyunca yüksek hızda vortekslendi. Daha sonra +4°C, 7600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolün örneklerden uzaklaşması için 30 dakika boyunca mikrosantrifüj tüpleri kapakları açık olacak şekilde havalandırması açık olan laminar hava akış kabininde kurumaya bırakıldı. Pelet, DEPC'li su ile çözüldü. DNA'nın denatürasyonu için DNaz I (Thermo) eklendikten sonra 30 dakika boyunca 37°C kuru blok ısıtıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası DNaz aktivitesinin durdurulabilmesi için 15 mM EDTA kullanıldı. Örnekler 5 dakika boyunca buzda bekletildikten sonra EDTA eklendi ve 75°C kuru blok ısıtıcıda 5 dakika inkübasyona bırakıldı. RNA örnekleri 5 dakika buzda bekletildikten sonra Nanodrop cihazı (Shimadzu Biotech, BioSpec-nano) kullanılarak miktar tayini ve saflıklarının ölçümü yapıldı.

3.3.2. Komplementer DNA Eldesi

RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) elde etmek için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo) kullanıldı ve kullanım talimatlarına göre ilerlendi. 10 µl mastermix ile 1 µg RNA içeren 10 µl hacimli tüp içeriği karıştırılıp vortekslendi. cDNA eldesi için uygulanan termal döngüleyici (Qiagen) uygulama basamakları **Tablo 3.1**'de yer almaktadır. cDNA çevrimi sonrası elde edilen cDNA'ların miktar tayini Nanodrop cihazı (Shimadzu Biotech, BioSpec-nano) kullanılarak belirlendi.

Tablo 3.1. cDNA eldesi için yürütülen programın basamakları.

| Ayarlar | 1.Basamak | 2.Basamak | 3.Basamak | 4.Basamak |
|----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Sıcaklık | 25°C | 37°C | 85°C | 4°C |
| Zaman | 10 dakika | 120 dakika | 5 dakika | Bekleme |

3.3.3. qPCR Tekniği ile Gen İfadeleme Seviye Analizi

Kanser kök hücrelere özgün genlerin analizi için 300 ng cDNA, primer karışımı ve SYBR Green (AbmGood) PCR tüplerine DEPC'li su ile son hacim 10 µl olacak şekilde eklendi. İnternal kontrol gen olarak 18s rRNA, kontrol grup olarak ise tam medyum uygulanan hTERT-HPNE hücreleri kullanıldı. Primer dizileri **Tablo 3.2**'de yer almaktadır.

Tablo 3.2. qPCR analizleri için kullanılan primerler dizileri (5'→3')

| Gen | Forward Primer | Reverse Primer | Kaynak |
|---------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| <i>CD24</i> | GGTTGGCCCCAAATCCAAC | GACCACGAAGAGACTGGCTG | Sun ve diğ., 2019 |
| <i>CD44</i> | TGAATATAACCTGCCGCTTTG | GCTTTCTCCATCTGGGCCAT | Zhou ve diğ., 2016 |
| <i>CD133</i> | CAACGAGTCCTTCCTATA | CTCTCCAACAATCCATTC | Sun ve diğ., 2019 |
| <i>Nanog</i> | GTCTTCTGCTGAGATGCCTCA CA | CTTCTGCGTCACACCATTGCTAT | Page ve diğ., 2009 |
| <i>Oct4</i> | CCATGCATTCAAACGAGGT | CCTTTGTGTTCCCAATTCCT | Gholizadeh-Ghaleh Aziz ve diğ., 2019 |
| <i>CK19 (KRT19)</i> | CATGAAAGCTGCCTTGGAAGA | CATGAAAGCTGCCTTGGAAGA | Stachelscheid ve diğ., 2009 |
| <i>c-myc</i> | CGAGGAGAATGTCAAGAGGC GAAC | GCTTGGACGGACAGGATGTATGC | Song ve diğ., 2019 |
| <i>18s rRNA</i> | GTGGAGCGATTTGTCTGGTT | CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG | Ricci ve diğ., 2009 |

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu Biorad CFX96 kullanılarak yapılmıştır. Uygulanan qPCR programı **Tablo 3.3**'te yer almaktadır.

Tablo 3.3. qPCR programı.

| qPCR Basamakları | Sıcaklık | Süre | |
|------------------------|----------|--------|--------------------------|
| Ön Denatürasyon | 94 C | 10 dk | |
| Denatürasyon | 95 C | 15 sn. | 39 döngü tekrarlanır. |
| Primerlerin Bağlanması | 55 C | 30 sn. | |
| Uzama | 72 C | 30 sn. | |
| Final Uzama | 72 C | 5 dk. | |

3.4. HEDEF PROTEİN SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Sitoplazmik, nüklear ve membran fraksiyonlarında belirlenen hedef proteinlerin miktarlarında meydana gelen değişimlerin tespit edilebilmesi için Western emdirme veya ELISA yöntemi kullanıldı. Yöntem aşağıdaki adımlar takip edilerek gerçekleştirildi (Celik ve diğ., 2022).

3.4.1. Hücre Fraksiyonlarının İzolasyonu ve Fraksiyonların Total Protein Miktarının Tayini

3.4.1.1. Sitoplazmik Fraksiyon Eldesi

6 kuyulu plakalara ekilen hTERT-HPNE hücreleri deney şartlarının 48 saat uygulanması sonrasında %0.25 Tripsin-EDTA ile kaldırılıp 15 ml'lik falkon tüplerinde toplandı. Hücre medyumları daha sonra kullanılmak üzere ayrı tüplerde toplanıp -20°C'ye kaldırıldı. Toplanan hücreler, 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra PBS ile yıkayıp 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 3000 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmelerini takiben süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Pelet miktarına göre uygun hacimde proteaz ve fosfataz içeren Lizis Buffer (Thermo) eklendi. Hücrelerin lizis buffer içerisine dağılmasını sağlamak için pelet dağılına dek tüpler vortekslendi. Ardından 30 dakika süreyle buzda bekletildi. Bu süre içerisinde 10 dakikada bir defa olmak üzere toplam 3 kez vortekslendi ve 5 kez 10 saniye boyunca ultrasonikasyon uygulandı. Son olarak +4°C, 13.000 rpm hızda 10

dakika süreyle santrifüjlenip süpernatanta geçmiş olan sitozolik fraksiyon mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp daha sonra kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı.

3.4.1.2. Nükleer Fraksiyon Eldesi

Nükleer fraksiyon izolasyonu için sitoplazmik fraksiyon eldesinden sonraki hücre peletleri kullanılarak Abcam Nükleer Fraksiyon İzolasyon Protokol adımları takip edildi. Pelet miktarına göre mikrosantrifüj tüplerine B tamponu ve 4.6 M NaCl karışımı uygulandı. B tamponunun içeriği **Tablo 3.4**'te verilmiştir. Bu karışım 374 μl B tamponu üzerine 26 μl 4.6 M NaCl eklenerek hazırlandı. Tüplerdeki pelet dağılına dek pipetaj yapıp vortekslendi. Ardından örnekler 5 saniye boyunca 10 kez ultrasonikasyon uygulaması yapıldı. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyon sürecinde 10 dakikada bir kez vorteks yapıldı.

Tüpler 24.000 g hızda $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatanta geçen nükleer fraksiyon ayrı mikrosantrifüj tüplerine alınarak daha sonra kullanılmak üzere -20°C 'de muhafaza edildi.

Tablo 3.4. Nükleer fraksiyon izolasyonu protokolündeki B tamponunun içeriği.

| B Buffer İçeriği | Konsantrasyon |
|-------------------|---------------|
| HEPES | 5mM |
| MgCl ₂ | 1.5 mM |
| EDTA | 0.2 mM |
| DTT | 0.5 mM |
| %26 Gliserol | %26 |

3.4.1.3. Membran Fraksiyon Eldesi

Membran fraksiyon eldesi için Membran, Nükleer & Sitoplazmik Protein Ekstraksiyon Kit (Biobasic Canada) kullanıldı. Kit protokolüne göre önce hücreler %0.25 Tripsin- EDTA ile kaldırılıp 15 ml'lik tüplerde toplandı. Ardından hücreler üç kez 500 μl soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 1.5 ml'lik tüplere alındı, hücre peleti miktarına göre kit içeriğindeki proteaz-

fosfataz inhibitörü, DTT ve PMSF eklenmiş A solüsyonundan eklendi. Solüsyonun hücrelere nüfuz etmesi için örnekler vorteksledi. Peletin iyice dağılması sağlandıktan sonra 20 dakika boyunca +4°C’de roller üzerinde inkübe edildi. Peletin çökmemesi için inkübasyonun 10. dakikasında örnekler tekrar vorteksledi. Daha sonra tüpler 12.000 rpm, +4°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sitoplazmik fraksiyon olarak elde edilen süpernatant toplandı. Aynı işlem yapılarak B solüsyonu ile nükleer fraksiyonu elde edilirken C solüsyonu ile de membran fraksiyonu elde edildi. Örnekler -20 °C’de saklandı.

3.4.1.4. Bradford Yöntemi ile Total Protein Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen sitoplazmik, nükleer ve membran proteinlerinin miktar tayini Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu yöntem Coomassie parlak mavi boyası ile proteinler arasındaki etkileşimi yansıtan kolorimetrik bir testtir (Kielkopf ve diğ., 2020).

Bu yöntem için öncelikle Bradford reaktifi hazırlandı. Coomassie parlak mavisi G-250 boyasından 25 mg tartılıp 12,5 ml %95 etanol ve 25 ml %85 fosforik asit (H₃PO₄) eklendikten sonra reaktif karışım içerisinde çözündürüldü ve son olarak filtre kağıdı ile süzüldü. Standard grafik oluşturmak için 1,46 mg/ml konsantrasyondaki BSA’dan 55 µl alınıp 945 µl ultra saf su ile karıştırıldı. Bu işlem ile 80 µg/ml’lik BSA elde edilmiş oldu. Daha sonra seri dilüsyon ile 40, 20, 10 ve 8 µg/ml’lik standartlar hazırlandı. 1 µl alınıp üzerine 159 µl ultra saf su eklenerek sulandırılan örnekler ile 160 µl hacimli standartlar 96 kuyulu plakalara koyulduktan sonra 40 µl Bradford reaktifi ile karıştırıldı. Pipetaj yapılarak boya ile örneklerin/standartların iyice karışması sağlandı. 595 nm dalga boyunda optik yoğunlukları alındıktan sonra standartların absorbansları ile bir “Standart Grafiği” oluşturulup örneklerin absorbans değerleri bu grafiğe göre hesaplamaya alındı ve örneklerin protein miktarları tayin edildi.

3.4.2. Western Emdirimi Yöntemi

Bu yöntem için sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren poliakrilamid jeller, hedef proteinlerin molekül ağırlıklarına bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. Jeller, **Tablo 3.5**’te belirtilen içerikler ve oranlarına göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.5. SDS-PAGE jellerinin içerikleri.

| Kullanılan Malzemeler | %3 Üst Jel (Yükleme) | %7,5 Alt Jel (Yürütme) | %10 Alt Jel (Yürütme Jeli) | %12 Alt Jel (Yürütme Jeli) |
|---|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Ultra Saf Su | 3,262 ml | 5,425 ml | 4,81 ml | 3,545 ml |
| Akrilamid/Bis-akrilamid (37,5:1) %40 (w/v) | 412,5 µl | 1,875 ml | 2,49 ml | 2,997 ml |
| Tris HCl pH:8.8 | - | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| Tris HCl pH:6.8 | 980 µl | - | - | - |
| %10 SDS | 50 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| APS | 50 µl | 66 µl | 66 µl | 66 µl |
| TEMED | 8 µl | 8 µl | 8 µl | 8 µl |

Yürütme tamponu 10X stok Tank Tamponu'nun 1X'e dilüe edilmesi ile elde edildi. 10X tank tamponu içeriği **Tablo 3.6'**da belirtilmiştir.

Tablo 3.6. 10X tank tamponu içeriği.

| Malzemeler | 10X Tank Tamponu |
|---|-------------------------|
| Trizma Bazı | 60 gr |
| SDS | 10 gr |
| Glisin | 144 gr |
| 1 L ultra saf su ile karıştırılıp pH 8.0'e ayarlanmıştır. | |

48 saat süreyle deney şartları uygulandıktan sonra izole edilen hücre fraksiyonları, %5 Laemli- β -merkaptoetanol ile karıştırılarak 95°C'de 5 dakika denatüre edildi. Yürütme tamponu ile dolu tank içine yerleştirilmiş jellerin kuyularına örnekler yüklendikten sonra elektroforez işlemi üç aşamada gerçekleştirildi. İlk adımda 70V'de 30 dakika, ardından 100V'de 45 dakika ve son olarak 120V'de yürütme devam ettirildi.

Jellerin membranlara aktarılmasında hedef proteinlerin moleküler ağırlığı baz alınarak yarı-ıslak veya ıslak aktarım gerçekleştirildi. Islak aktarım tamponu olarak %20 metanol içeren yürütme tamponu kullanılırken yarı ıslak aktarımda Towbin tamponu (**Tablo 3.7**) kullanıldı. Kullanılan membranlar da proteinlerin molekül ağırlığına göre seçildi. 20 kDa'dan büyük

proteinler için 0.45 µm por çaplı PVDF membran tercih edilirken daha küçük proteinler için 0.22 µm por çaplı PVDF membran kullanıldı. Yarı ıslak aktarım, Transblot Turbo cihazında (Biorad) 8 dakika boyunca 25 V, 2,5 A'da gerçekleştirilirken ıslak aktarım için 720 dakika boyunca 4°C'de 80 A, 100V'de aktarım yapıldı.

Tablo 3.7. Towbin Tamponu içeriği.

| Malzemeler | Towbin Tamponu (1 L) |
|---|----------------------|
| Trizma Bazı | 36,3 gr |
| Glisin | 22,5 gr |
| EDTA | 730,5 mg |
| Etanol | 200 ml |
| %10 SDS | 5 ml |
| Ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. pH: 8.3 | |

3.4.2.1. Hedef Proteinlerin İşaretlenmesi

Aktarımı yapılan membranlar aktarım tamponunun uzaklaştırılması için birkaç kez ultra saf suda yıkandıktan sonra 1X TBS bulunan falkon tüplerinin içine alınarak kuruması engellendi. Membranlar işaretleme için kullanılan antikora uygun %5 BSA veya %5 yağsız süt tozunun %10 Tween 20 ve TBS ile hazırlanmış TBS-T içinde çözündürülmesiyle hazırlanan bloklama solüsyonu ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Primer antikolar 1,5 ml bloklama solüsyonu ve 3,5 ml TBS içeren 5 ml'lik solüsyon içerisinde uygun konsantrasyonlarda sulandırıldı. Primer antikolar, membranların bulunduğu falkon tüplerine aktarıldıktan sonra 1 gece boyunca +4°C'de inkübe edildikten sonra membranlar 1 saat oda ısısında tutuldu. Ardından primer antikor ortamdan uzaklaştırıldı ve membranların 3 kez TBS-T ile yıkanmasını takiben primer antikora bağlanan HRP işaretli sekonder antikolar membranlara uygulandı. Sekonder antikorun 1 saat oda ısısında inkübe edilmesinden sonra 3 kez TBS-T ve 2 kez TBS ile yıkama yapıldı. Membranlar Luminol (Thermo) ile işaretlenerek Biorad ChemiDoc cihazında görüntülendi. Normalizasyon için sitoplazmik fraksiyonlarda β-aktin, nükleer fraksiyonlarda TFIIB, membran fraksiyonunda ise sodyum potasyum ATPaz bantların yoğunluğu analizde kullanıldı. Çalışmada kullanılan antikolar ve konsantrasyonları **Tablo 3.8**'de yer almaktadır.

3.4.3. ELISA

Western emdirimi yöntemi ile membranlarda çok düşük seviyelerde çıkan veya hiç görüntü alınamayan hedef proteinler için ELISA yöntemi uygulandı.

Bağlanma tamponu olarak kullanılan karbonat tamponunun hazırlanması için 0,105 gr sodyum bikarbonat ile 0,9274 gr sodyum karbonat 100 ml ultra saf suda çözündürüldü ve pH 9.4'e ayarlandı. Örnekler hazırlanan karbonat tamponunda 2 µg protein içerecek şekilde sulandırıldıktan sonra 96 kuyulu ELISA plakalarına 100 µl hacimle eklendi ve bir gece +4°C'de bekletilen proteinlerin kuyu zeminine bağlanması sağlandı. Ertesi gün 1 saat oda ısısında bekletildikten sonra örnekler uzaklaştırılıp kuyular yıkama tamponu (PBS-T) ile yıkandı. %3 BSA içeren PBS'ten oluşan blok solüsyonundan her kuyuya 100 µl eklendikten sonra tekrar bir saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Blok solüsyonu içerisinde hazırlanan primer antikolar, bir saat sürenin sonunda blok solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra kuyulara uygulandı. Primer antikor iki saat oda ısısında inkübasyondan sonra kuyulardan uzaklaştırılıp sekonder antikor uygulaması yapıldı. İki saat inkübasyonun ardından kuyular yıkanıp 90 µl TMB substratı (Elabscience) uygulandı. Renk değişimi gözlenene kadar inkübasyon gerçekleştirildi. Tepkimenin durdurulması için 50 µl 0.1 M HCl kullanıldı.

Tablo 3.8. Çalışmada kullanılan antikolar ve uygulama konsantrasyonları. WB: Western Emdirimi; E:ELISA

| Antikor Adı | Konak | Dilüsyon Oranı | Marka |
|--------------|--------|----------------|-------------------------|
| Vimentin | Tavşan | 1:1000 (WB) | St. Johns Laboratory |
| E-kaderin | Tavşan | 1:400 (WB) | Santa Cruz |
| N-kaderin | Tavşan | 1:400 (WB) | Santa Cruz |
| SNAIL(SNAI1) | Tavşan | 1:1000 (WB) | St. Johns Laboratory |
| SLUG(SNAI2) | Tavşan | 1:1000 (WB) | St. Johns Laboratory |

Tablo 3.8 (DEVAM) Çalışmada kullanılan antikorlar ve uygulama konsantrasyonları. WB: Western Emdirimi; E:ELISA

| Antikor Adı | Konak | Dilüsyon Oranı | Marka |
|--|------------|----------------------------|----------------------|
| p-STAT3 (Tyr705) | Tavşan | 1:2500 (E) | Affinity |
| STAT3 | Tavşan | 1:500 (E) | Affinity |
| SMAD4 | Tavşan | 1:1000 (E) | Affinity |
| p-JAK2 (Tyr1007/1008) | Tavşan | 1:1000 (E) | Affinity |
| JAK2 | Tavşan | 1:1000 (E) | Affinity |
| CK19 | Tavşan | 1:1000 | Affinity |
| IRS1 | Tavşan | 1:1000 (E) | Santa Cruz |
| p-IRS1 (Ser307) | Tavşan | 1:2000 (E) | St. Johns Laboratory |
| β -Aktin | Tavşan | 1:1500 (WB), 1:1250 (E) | Elabscience |
| TFII β | Fare | 1:10000 (E) | Biolegend |
| Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz | Fare | 1:1000 (WB) | Novus |
| Anti-Tavşan Sekonder Antikor (HRP Konjuge) | Keçi (IgG) | 1:5000 (WB) | Invitrogen |
| Anti-Tavşan Sekonder Antikor (HRP Konjuge) | Keçi (IgG) | 1:1000 (E) | Genetex |
| Anti-Fare Sekonder Antikor (HRP Konjuge) | Keçi (IgG) | 1:1000 (E) | Genetex |
| Anti-Fare Sekonder Antikor (HRP Konjuge) | Keçi (IgG) | 1:10000 (WB) | Invitrogen |

3.5. AKIM SİTOMETRİK ANALİZLER

3.5.1. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsünün farklı aşamalarında bulunan hücrelerin oranı PI, 7-AAD, Hoechst 33342 ve DAPI gibi DNA bağlayıcı boyalar kullanılarak belirlenebilir. G₁'deki hücrelerden iki kat daha fazla DNA'ya sahip olan G₂'deki hücreler iki kat daha parlak floresan verir. Hücre döngüsü, floresans yoğunluğundaki farklılıklar genellikle daha küçük olduğundan, logaritmik bir ölçek

kullanan çoğu akış sitometrisinin aksine genellikle doğrusal bir ölçekte ölçülür. Birçok akış sitometrisi yazılım programı hücre döngüsü fazlarını doğru bir şekilde tespit etmek için algoritmalar sunmaktadır (Kim ve Sederstrom, 2015).

Kısaca, 6 kuyulu plakalara ekimi yapılmış olan hücrelerin doluluk oranı %80'e yaklaşıncaya deney şartları 48 saat boyunca uygulandı ve deney bitiminde hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılıp falkon tüplerine toplandı. Hücre sayımının ardından hücreler 70 µm çaplı süzgeçlerden geçirildi. PBS ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra akım sitometri tüplerine her bir kuyudan 5×10^5 hücre alınıp %70 etanol içerisinde fikse edilmek üzere bir gece +4°C'de inkübe edildi. Fiksasyonu takiben hücreler PBS ile yıkanıp 5µg/ml RNase A (New England Biolabs) uygulanmasının ardından 37°C'de 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Tüpler 3000 rpm hızda 5 dakika süreyle santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırıldı ve PI (Cayman) uygulandı. +4°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra analiz için akım sitometri cihazı (BD FACS Callibur) kullanıldı. Analiz FL2 kanalında yapıldı (Gezginci-Oktayoglu ve diğ. 2021).

3.5.2. Apoptotik ve Nekrotik Hücre Popülasyonlarının Belirlenmesi

Hücrelerin apoptotik veya nekrotik ölüm oranlarının belirlenebilmesi için hücreler Annexin, 7-AAD, PI gibi boyalar tarafından işaretlenmektedir. Annexin, erken apoptoz evresinde hücrelerin plazma zarının dış tarafındaki kısımlara bağlanarak hücrelerin işaretlenmesini sağlarken 7-AAD ise membran bütünlüğünün bozulmuş hücrelerin boyanmasını sağlamaktadır (Zimmerman ve Meyer, 2011)

Bu çalışmada %80 konfluensiye ulaşan ve 48 saat boyunca deney şartları uygulanmış hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 3×10^5 hücre, 70 µm çaplı süzgeçlerden geçirildi. Ardından Annexin V/7-AAD Apoptoz Tespit Kiti (Elabscience) kullanıldı. Kitte yer alan yönergeler takip edildi. Hücrelerin yıkama işleminin 10X konsantrasyonda olan Annexin V Bağlama Solüsyonu 1X konsantrasyonda kullanıldı. 100 µl'de 2,5 µl Annexin ve 2,5 µl 7-AAD boyası yer alacak şekilde uygulama solüsyonu hazırlanıp hücrelere uygulandı ve 15 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1x Bağlama Solüsyonu ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücrelere 250 µl bağlama solüsyonu 250 µl ise PBS içerisinde %2 formaldehit fiksatif eklenerek 10 dakika boyunca +4°C'de fikse edildi.

Fiksasyon işlemi sonrasında hücreler PBS ile yıkandı ve analize alınmadan önce 50 µg/ml konsantrasyonda RNase A uygulandı ve 15 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Analizler dot plotta quadrant kapı kullanılarak gerçekleştirildi ve hücre popülasyonları yüzde olarak hesaplandı.

3.5.3. c-Met İşaretlemesi ile Kanser Kök Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi

Kanser kök hücre belirteci olarak bilinen c-Met’i bulduran hücre popülasyonu oranının belirlenebilmesi için akım sitometrik analiz yapıldı. 6 kuyulu plakalara ekilmiş hTERT-HPNE hücreleri %80 yoğunluğa ulaştıklarında deney şartları 48 saat boyunca uygulandı. Deney bitiminde her kuyudan 5×10^5 hücre alınarak işaretlendi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp %2 FBS içeren PBS’ten oluşan işaretleme tamponu eklendi. Hücreler 70 µm çaplı süzgeçlerden geçirildi. FITC işaretli c-Met (Invitrogen, 11-8858-42) antikoru 5 µl/test olacak şekilde hazırlandı. İzotip kontrol olarak kullanılan FITC işaretli sıçan IgG1 kappa izotip kontrol antikoru (Invitrogen, 11-4301-81) 1 µl/test olacak şekilde kullanıldı. Antikorlar işaretleme tamponu içerisinde hazırlandı. Her örneğe 100 µl antikor uygulaması yapıldıktan sonra tüpler, 20 dakika boyunca oda ısısında ışık görmeyecek bir ortamda inkübe edildi. PBS ile yıkanan örnekler işaretleme tamponu içerisinde analize alındı. Analiz akım sitometri cihazı (BD, FACS, Callibur)’nın FL1 kanalı kullanılarak yapıldı (Wang ve diğ. 2018).

3.6. SFER OLUŞTURMA TESTİ

Bu test için hücreler 6 kuyulu plakalara ekilip 48 boyunca deney şartları uygulandı ve hücreler %0.25 Tripsin-EDTA ile kaldırılarak sayıldı. Sfer oluşumunun gerçekleşmesi için hücrelerin düşük tutunma yüzeyine sahip kuyulara ekilmesi gerekmektedir. Bu sebeple 96 kuyulu bir plaka Anti-Adherence Rinsing Solution (Stem Cell Technologies) kullanılarak kaplandı. Her kuyu içine 100 µl solüsyon koyulduktan sonra kuyularda oluşan hava kabarcıklarının yok edilmesi için 2500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi. Ardından plaka 2 saat oda ısısında bekletildi. Kuyular PBS ile yıkandı ve hücreler 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF), 20 ng/ml temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), %4 BSA, 1X B27 ve 1X N2 içeren düşük glukozlu DMEM’de hazırlanmış 200 µl medyum içerisinde kuyu başına 100 hücre gelecek şekilde ekildi. Ekimden sonraki ikinci gün kuyu kenarlarına veya dibine dokunmadan 100 µl medyum çekilip 100 µl taze medyum eklendi. Bu işlem 14 gün boyunca devam ettirildikten sonra mikroskopik

gözlem yapıp oluşan sferler görüntülendi. Mikroskopik analizlerde her kuyu mikroskopun (Nikon, Eclipse Ti-U) 20X objektif ve X10 oküler sistemi ile görüntülenerek kamera (Nikon, Digital Sight) ile fotoğraflandı. NIS-Elements BR 3.1 programında sferlerin boyutu ölçüldü 50 μm ve üzeri olanlar koloniler sfer olarak kabul edilip analize alındı (Zhao ve diğ., 2019).

3.7. İNVAZYON TESTİ

İnvazyon deneyi için Corning Biocoat Tumor Invasion System kullanıldı. Bunun için kitin uygulama talimatları takip edildi. Kısaca, 8.0 μm por büyüklüğüne sahip PET membran taşıyan insertler bulunduran 24 kuyulu plakalar -20°C 'den oda ısısına alındı. Ardından steril ortamda insertlerin iç kısmına 500 μl ılık PBS eklendi. 2 saat boyunca CO_2 'li etüve inkübasyon işleminden sonra insertler ekim için kullanıma hazır hale geldi.

Hücreler, 6 kuyulu plakalara ekilip %80 konfluensiye ulaştıklarında 48 saat boyunca deney şartları uygulandı. Ardından hücreler %0,25 Tripsin-EDTA ile kaldırılıp sayıldı. Transwell sistemin alt kısmına her kuyuya 750 μl %10 FBS içeren düşük glukoz içerikli DMEM eklendi. İnsertlerin içindeki PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra insertlerin iç kısmına 500 μl serumsuz düşük glukoz içerikli DMEM eklenip her insert içine 2×10^4 hücre ekildi. 24 saat standart kültür koşullarında inkübe edildikten sonra plakanın içindeki medyumlar ortamdan uzaklaştırıldı. Kuyuların ve insertlerin PBS ile yıkanmasının ardından insertlerin iç kısımları kulak çubuğu yardımıyla kazınarak kaplama solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı. Son olarak insertler, DAPI içeren kapatma ortamı (Thermo) içinde lamlar üzerine kapatıldı ve floresan mikroskopta (Nikon, Eclipse Ti-U) görüntülendi. İnvaziv özellik gösteren hücreler mikroskopta parlak mavi gözükmetedir. 10X objektif, X10 oküler ve Nikon Digital Sight kamera kullanılarak fotoğraflar kaydedildikten sonra mavi ışığa yapan hücreler sayıldı.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

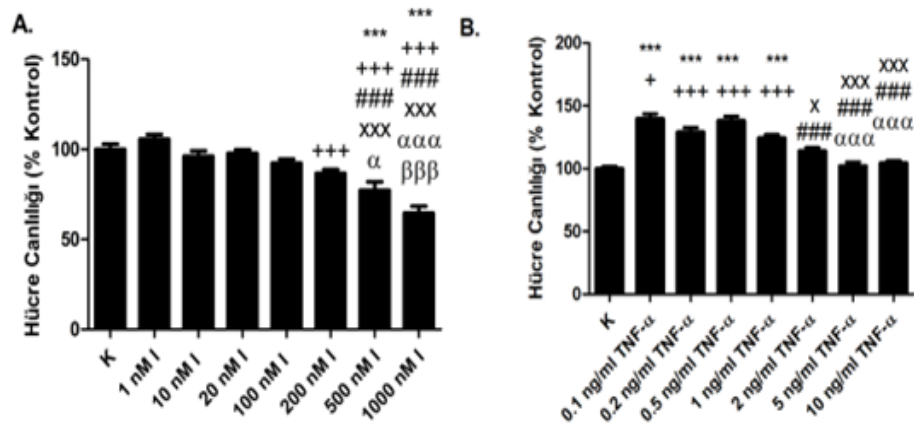
Tüm deneyler, üç kez tekrarlandı. Analizler Graphpad programında yapıldı. One Way ANOVA testi sonrası Bonferonni testi ile çoklu kıyaslamalar yapıldı. Analizlerden elde edilen sonuçlar ortalama \pm SEM olarak hesaplanarak $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. |

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIĞI BULGULARI

Proje kapsamında yapılan çalışmalar boyunca hTERT-HPNE hücrelerinin canlılığının etkilenmeyeceği insülin ve TNF α konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için MTT canlılık testi uygulandı. Bu kapsamda 1,10,20,100,200,500 ve 1000 nM insülin konsantrasyonları ile 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 ve 10 ng/ml konsantrasyonlarda TNF α hücrelere uygulandıktan 48 saat sonra hücre canlılığı MTT testi ile ölçüldü.

1, 10, 20 ve 100 nM insülin uygulamasının hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı fakat 500 ve 1000 nM insülin uygulamalarının hücre canlılığında anlamlı azalmalara yol açtığı tespit edildi (Şekil 4.1: A). İnsülin uygulamalarının yapıldığı plakaların hücre canlılığı ölçümünde 20 Nm I; TNF α uygulamalarının yapıldığı plakaların MTT ölçümlerinde ise 0.5 ng/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında meydana gelen düşme meyli dikkat çekmektedir (Şekil 4.2: B). Bu verilerden yola çıkarak mevcut çalışmadaki deney şartlarında insülin sinyalinin uyarabilecek, hücre canlılığına zarar vermeyen konsantrasyon olan 20 nM, TNF α uygulaması için ise 0.5 ng/ml konsantrasyonun kullanılması uygun görüldü.

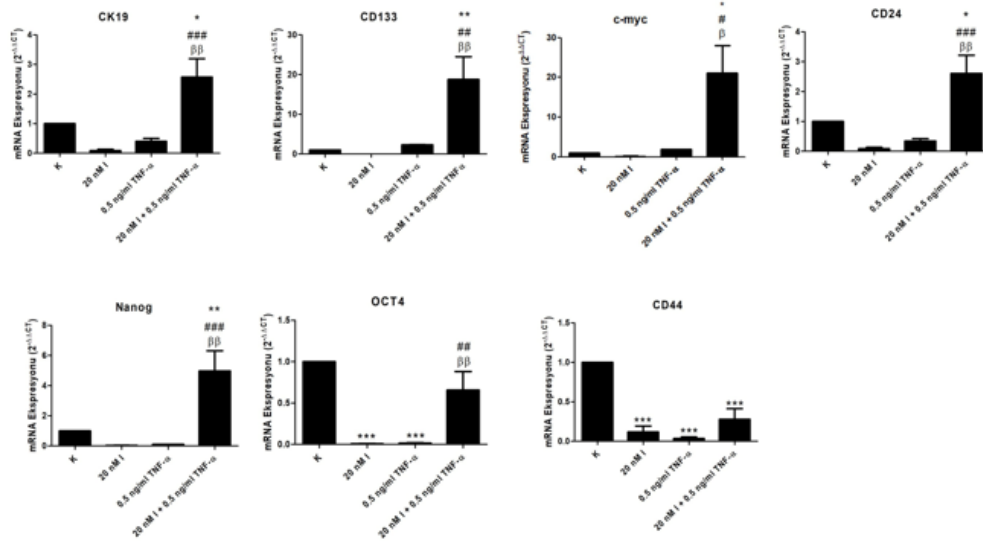


Şekil 4. 1. A.48 saat süre ile 1-1000 nM insülinin ve B. 0.1-10 ng/ml TNF α 'nın hTERT-HPNE hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri. ***p<0.001 K'ye göre, +p<0.05 ve +++p<0.001 1 nM I'ye göre, ###p<0.001 10 nM I'ye göre, ^xp<0.05 ve ^{xxx}p<0.001 20 nM I'ye göre, ^αp<0.05 ve ^{ααα}p<0.001 100 nM I'ye göre, ^{βββ}p<0.001 200 nM I'ye göre. K: Kontrol, I: İnsülin.

4.2. PANKREATİK KANSER KÖK HÜCRE OLUŞUMU İLE İLİŞKİLİ BULGULAR

4.2.1. Kanser Kök Hücre Belirteç Genlerin İfadeleme Düzeyleri

Pankreatik duktal adenokarsinom ile ilişkisi daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konan belirteçlerden CSC ile ilişkilendirilen *CK19*, *CD133*, *c-Myc*, *CD24*, *Nanog*, *OCT4*, *CD44* ve genlerinin mRNA düzeyinde ifadenme seviyelerindeki değişimler ölçüldü. Elde edilen bulgulara göre mRNA düzeyinde *CK19*, *CD133*, *c-Myc*, *CD24* ve *Nanog*, sadece 20 nM I + TNF α grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. *OCT4* gen ifadenme seviyesinde 20 nM I ve TNF α grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma ortaya çıkarken, 20 nM I + TNF α grubu ise insülin ve TNF α gruplarına kıyasla artış göstermiştir. *CD44* ve genleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 4.2).

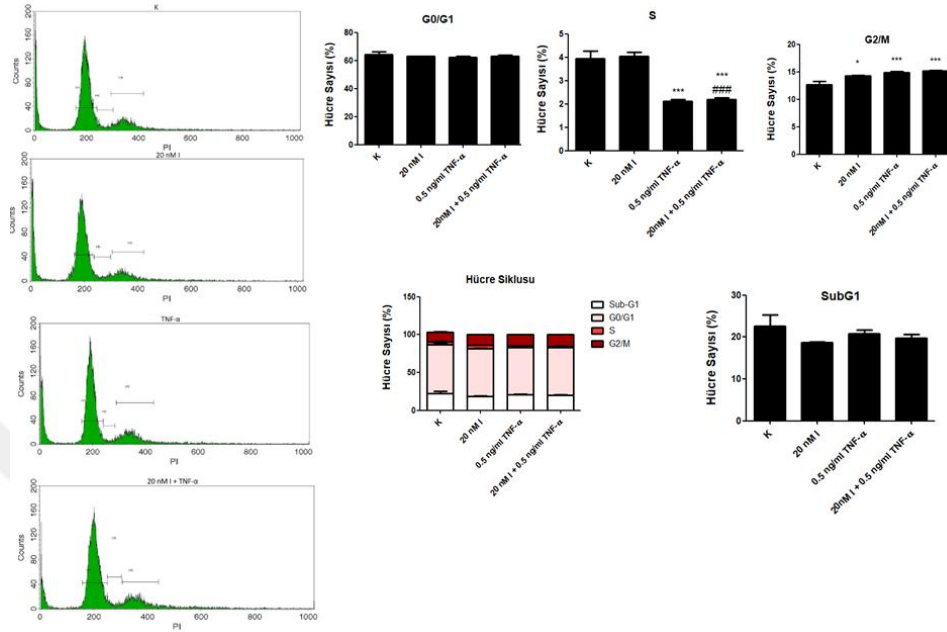


Şekil 4.2. Pankreatik kanser ve CSC belirteçlerinin mRNA ifadenme seviyeleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ K'ye göre; ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ 20 nM I'ye göre; β $p < 0.05$ ve $\beta\beta$ $p < 0.01$ 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol I: İnsülin.

4.2.2. Hücre Döngüsü Bulguları

Hücre döngüsü analizi PI ile işaretlenen hücrelerin akım sitometri tekniği belirlenmesi yoluyla yapıldı. Elde edilen bulgulara göre S fazındaki hücreler TNF α grubunda K grubuna göre

anlamli bir azalma) 20 nM I + TNF α grubu ise K ve 20 nM I grubuna göre azalma göstermiştir. G₂/M fazında ise bütün gruplar kontrole göre anlamlı artış sergilemiştir (Şekil 4.3).

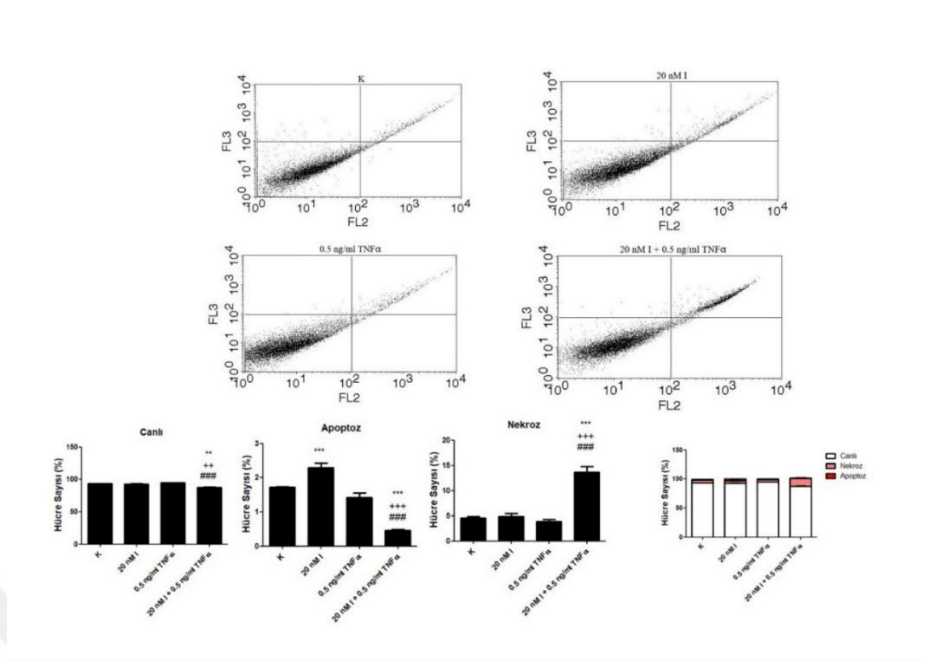


Şekil 4.3. Deney gruplarında hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücre popülasyonlarındaki değişimler. * $p < 0.05$ ve *** $p < 0.001$ K'ye göre; ### $p < 0.001$ 20 nM I'ye göre, K: Kontrol, I: İnsülin.

4.2.3. Apoptotik, Nekrotik ve Canlı Hücre Popülasyonlarındaki Değişimler

Apoptoz hücre membranında bozulmaya neden olmadan apoptotik cisimcikler halinde hücrelerin programlı ölümü olarak karakterize olurken nekrotik ölümden ise hücrelerin membran yapısı bozulur, hücre içeriği ekstraselüler matrikse salınarak çevre hücreler ve dokular için inflamatuvar bir etkiye sebep olabilir (Su ve diğ., 2015). Bu sebeple çalışmamızdaki deney grupları hücrelerin ölüm oranlarının ne derecede değişim gösterdiği önem arz etmektedir.

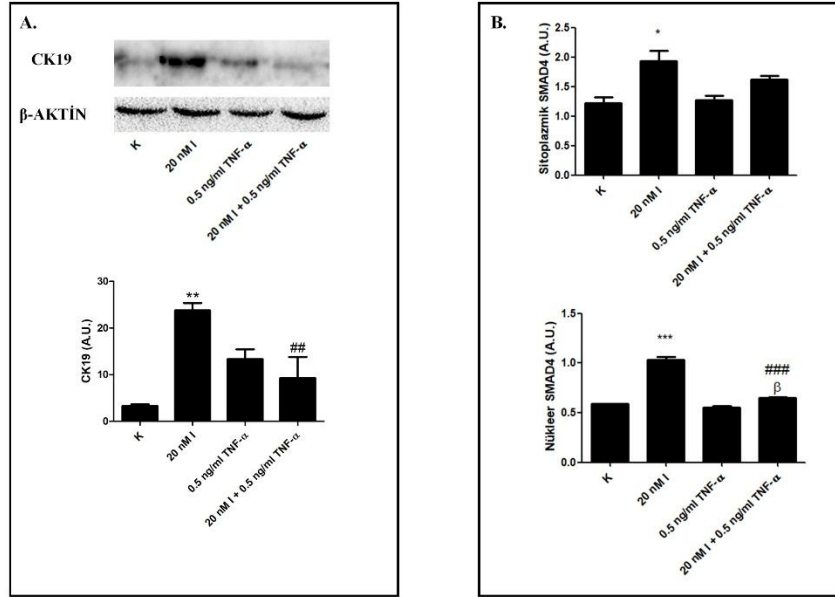
Elde edilen bulgular, canlı hücre popülasyonunda insülin ve TNF α 'nın eş uygulandığı grupta diğer gruplara göre anlamlı bir azalma gösterdiğini ortaya koymuştur. Ek olarak nekrotik hücrelerin işaretlenmesiyle elde edilen verilerde ise yine insülin ve TNF α 'nın birlikte uygulanmasıyla nekrotik hücre popülasyonunda diğer gruplara göre anlamlı artış gözlenmiştir. Erken apoptoza yönelik veriler ise sadece 20 nM I uygulanan grupta kontrol grubuna göre belirgin bir artış olduğunu göstermiş fakat 0.5 ng/ml TNF α ile insülinin eş olarak uygulandığı grupta bütün gruplara göre anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin deney gruplarına göre değişimi. ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ K'ye göre; ++ $p < 0.01$ ve +++ $p < 0.001$ 20 nM I'ye göre; ### $p < 0.001$ 0.5 ng/ml TNFα'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin.

4.2.4. Pankreas Kanseri Belirteç Proteinlerinin Seviyelerindeki Değişimler

Pankreatik duktal adenokarsinomun tanısında CK19 ve nükleer SMAD4 seviyelerindeki değişimler önem taşır (Zapata ve diğ, 2007). Pankreatik kanser belirteci olan nükleer ve sitoplazmik SMAD4 seviyeleri ELISA yöntemi ile sitoplazmik CK19 seviyesindeki değişimler ise western emdirimi yöntemi ile belirlendi. Elde edilen bulgular 20 nM insülin uygulanan hTERT-HPNE hücrelerinde CK19 seviyesinin belirgin olarak yükseldiğini 20 nM I + TNFα grubunda ise 20 nM I grubuna göre azaldığını göstermektedir. Ayrıca, sitoplazmik SMAD4 protein seviyesinin 20 nM I deney grubunda arttığı tespit edildi. Nükleer SMAD4 seviyesi ise 20 nM I grubunda belirgin şekilde artarken 20 nM I + TNFα grubu, 20 nM I grubuna göre azalma; TNFα grubuna göre ise artış göstermiştir. CK19 ve nükleer SMAD4 değişiminin korelasyonu dikkat çekmektedir (Şekil 4.5).



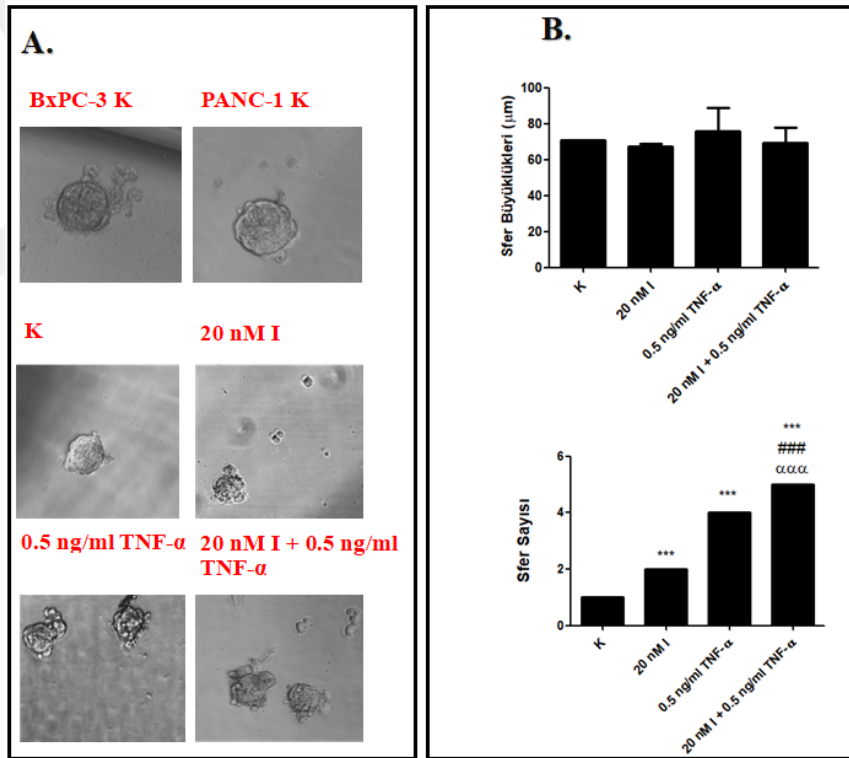
Şekil 4.5. Sitoplazmik CK19 ile sitoplazmik ve nükleer SMAD4 protein seviyelerinin deney gruplarına göre değişimleri. **A.** Üst panelde CK19 ve yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin protein bantları ve alt panelde bu bantların optik yoğunluğunu yansıtan grafik yer almaktadır. **B.** Sitoplazmik ve nükleer SMAD4 seviyelerinin ELISA bulgularını içermektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ K'ye göre; ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ 20 nM I'ye göre; β $p < 0.05$ 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin.

4.2.5. Kendini Yenileme Yeteneğindeki Değişimler

Kanser kök hücreleri, tabana yapışık olmayan bir ortamda büyüme faktörleri ve diğer gerekli besinlerle desteklenmiş serum içermeyen bir medyum uygulandığında üç boyutlu küresel bir yapı oluşturma kapasitelerine sahiptir (Zhou ve diğ., 2015). Sfer oluşturma testi, CSC'lerin kendini yenileme özelliği hakkında bilgi verdiği için kanser ilişkili çalışmalarda oldukça sık kullanılır ve bu yolla kök hücre özelliği gösteren hücre popülasyonlarının tanımlanması sağlanır. Bu hücreler, kök hücre özelliğine sahip küçük bir grup olarak tümör başlangıcını, ilerleyişi ve çevre organlara metastazına sebep olmaktadır (Cao ve diğ., 2011).

Bu bilgi ışığında deney gruplarında kök hücre özelliğindeki hücre popülasyonunun fazla olduğu deney gruplarının belirlenebilmesi için sfer oluşum testi yapıldı. Elde edilen bulgulara göre insülin ve TNF α uygulamalarının oluşan sfer büyüklüğü üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı tespit edilirken sfer sayıları üzerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Deney şartları

uygulanan hücrelerden geliştirilen sferlerin tüm gruplarda kontrol grubuna göre sayıca artış gösterdiği, 20 nM I + TNF α grubunda sfer sayısının 20 nM I grubuna göre anlamlı olarak arttığı, 20 nM I + TNF α grubunun ek olarak TNF α grubuna göre de daha fazla sfer oluşturduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.6 (B)**). Pankreas kanseri hücre hatları olan BxPC-3 ve PANC-1'in kontrol örneklerinde gözlenen sferlerle karşılaştırıldığında hTERT-HPNE hücrelerinin oluşturduğu sferlerin ve sadece insülin veya sadece TNF α uygulanan grupların morfolojik olarak kanser hücre hattı sferlerine benzemediği fakat 20 nM I + TNF α grubundaki sfer morfolojisinin kanser hücrelerinin oluşturduğu sferlere benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca kanser hücrelerinin oluşturduğu sfer boyutlarının daha büyük olduğu gözlenmiştir (**Şekil. 4.6**). Gruplarda gözlenen bu değişiklikler sonucu, CSC benzeri popülasyonun 20 nM I + TNF α grubunda en yüksek olduğu değerlendirilmiştir.

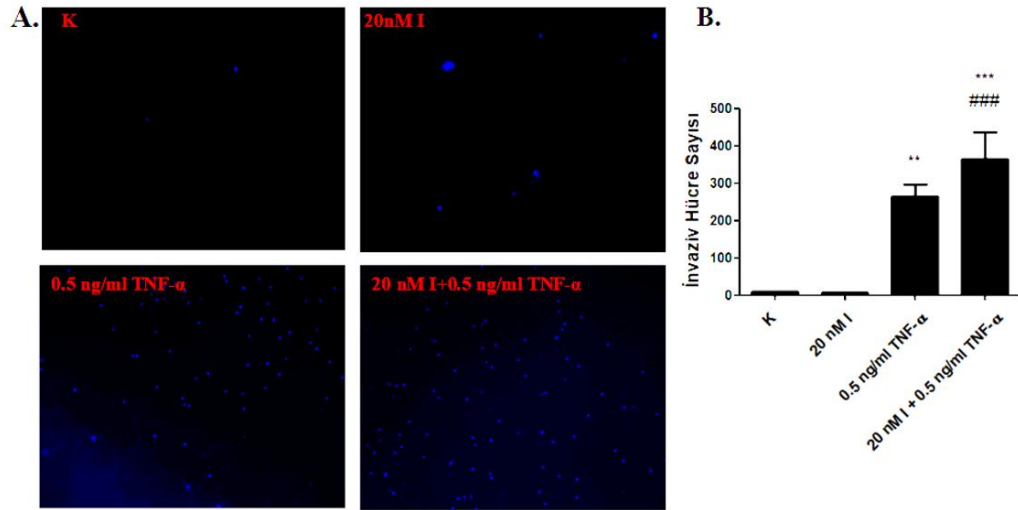


Şekil 4.6. A. Kanser hücre hatları BxPC-3 ve PANC-1 kontrol örnekleri ve hTERT-HPNE hücrelerinde yapılan deney gruplarına göre sfer fotoğrafları. B. İnsülin ve TNF α konsantrasyonlarının sfer büyüklüğü ve sfer sayısı üzerindeki etkileri. ***p<0.001 K'ye göre; ###p<0.001 20 nM I'ye göre, ###p<0.001 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin

4.2.6. İnvazyon Yeteneğindeki Değişimler

Kanser hastalarında ölüme sebep olan ve kanserin önemli özelliklerinden biri olan metastazın ilk adımı, tümör invazyonu olarak da adlandırılan kanser hücrelerinin primer tümörden uzaklaşarak göç etmesiyle karakterize edilir (Clark ve Vignjevic, 2015). İnvazyon analizinin yapılması CSC'lerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Böylece metastaz yapabilecek mobil hücre popülasyonu belirlenebilir.

Metastatik özellik gösterebilecek mobil hücre popülasyonu oranının bulunabilmesi için invazyon testi yapıldı. Elde edilen bulgular, invaziv hücre sayısının TNF α ve 20 nM I + TNF α gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, 20 nM I + TNF α grubunun ise kontrol grubuna göre ve 20 nM I grubuna göre anlamlı olarak arttığını göstermektedir (**Şekil 4.7**)

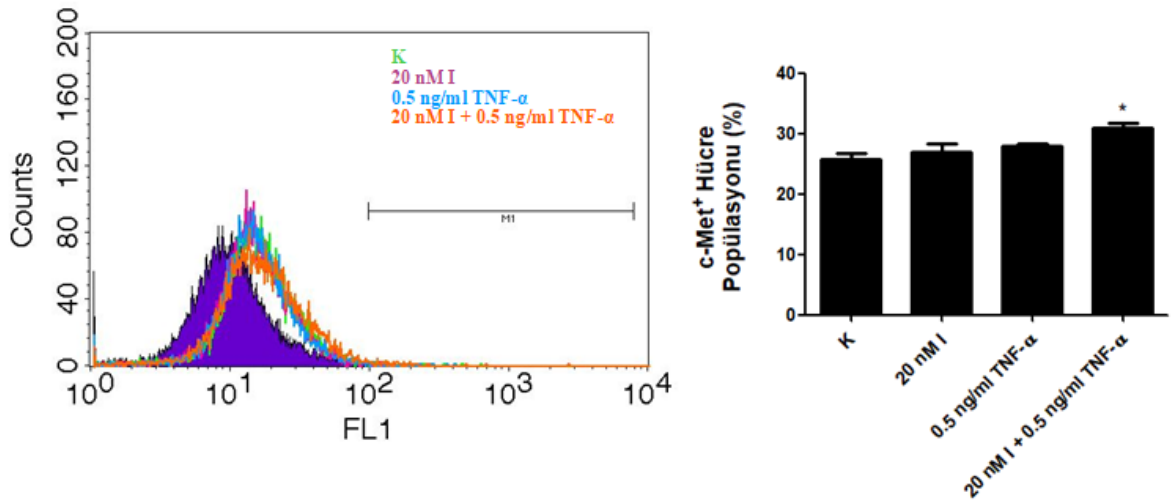


Şekil 4.7. İnsülin ve TNF α 'nın invaziv hücre sayıları üzerine etkisi. **p<0.01 ve ***p<0.001 K'ye göre, ###p<0.001 20 nM I'ye göre. K: Kontrol, I: İnsülin.

4.2.7. c-Met⁺ Hücre Popülasyonundaki Değişimler

Reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan c-Met hem normal hem de malignant hücrelerde bulunan bir proto-onkogen olarak kabul görür ve ligandı olan hepatosit büyüme faktörü ile gerçekleşen c-Met stimülasyonunun hücre hareketi, invaziv özellikleri ve metastaz da dahil olmak üzere kanser hücreleri için önemli birçok biyolojik aktivitenin gerçekleşmesinde etkisi vardır (Li ve diğ., 2011). Pankreas tümör hücrelerinde c-Met'in CSC popülasyonunda bulunduğu bilinmektedir (Suzuki ve diğ., 2004).

c-Met bulunduran popülasyonun belirlenmesinin deney gruplarındaki CSC popülasyonu hakkında bilgi vereceği öngörülerek c-Met⁺ hücre popülasyonu, membrana yerleşik c-Met'in işaretlenmesi ve akım sitometri yöntemiyle analiz edilmesiyle belirlendi. Buna göre, sadece 20 nM I + TNF α grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış) tespit edildi (**Şekil 4.8.**) Bu bulgu CSC karakterli hücrelerin 20 nM I + TNF α grubunda artış gösterdiğini ve tümorigenezi başlatabileceğini işaret etmektedir.

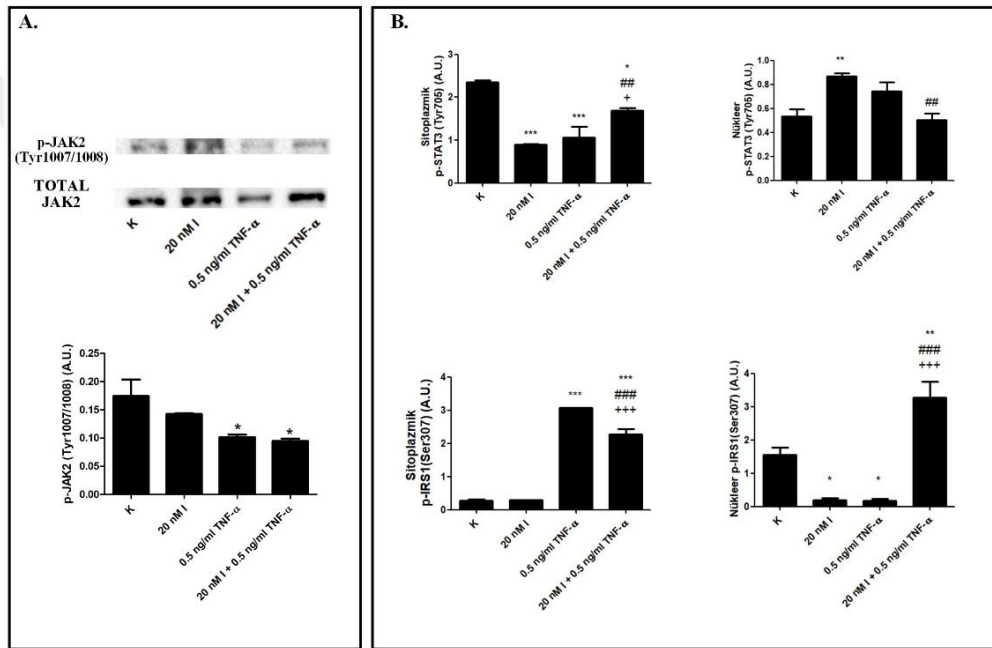


Şekil 4.8. c-Met⁺ hücre popülasyonunun gruplara göre değişimini gösteren grafik. *p<0.05 K'ye göre. K: Kontrol, I: İnsülin.

4.3. IRS1/JAK/STAT SİNYAL YOLAĞINDAKİ DEĞİŞİMLER

Bu yolağın insülin ve/veya TNF α ile uyarılan tümorigenez ile ilişkisini araştırabilmek için IRS1/JAK/STAT sinyal yolağında aktif rol alan proteinlerin seviyeleri belirlendi. Elde edilen bulgular JAK2'nin aktif formu p-JAK2 (Tyr1007/1008) seviyesinin TNF α uygulanan gruplarda anlamlı bir azalma gösterdiğine işaret etmektedir. STAT3'ün aktif formu p-STAT3 (Tyr705)'ün sitoplazmik seviyelerinin ise bütün gruplarda kontrole göre azalma gözlenirken insülin ve TNF α 'nın birlikte uygulandığı grupta p-STAT3 seviyesinin tekli uygulamalara kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi. STAT3 aktif formuna geçtiği zaman dimerleşerek nükleusa geçmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak p-STAT3 (Tyr705) seviyesi nüklear fraksiyonda da ölçüldü. Nüklear p-STAT3 (Tyr705) seviyesinin 20 nM I grubunda belirgin bir şekilde artarken

TNF α ile birlikte uygulandığı grupta bu seviyenin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.9). Ek olarak sitoplazmik ve nükleer fraksiyonda p-IRS-1(Ser307) seviyeleri ölçüldü. Bulgular, p-IRS-1(Ser307) seviyesinin sitoplazmik fraksiyonda TNF α uygulanan grupta arttığını insülin ile birlikte TNF α uygulanan grupta hem kontrol hem de sadece insülin uygulanan gruba göre anlamlı bir artış olsa da sadece TNF α grubuna göre azaldığını göstermektedir. Nükleer fraksiyonda ise sadece insülin ve sadece TNF α uygulanan gruplar, kontrole göre anlamlı azalma gösterirken eş uygulandıkları grupta p-IRS1 (Ser307) seviyesinin bütün gruplara göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.9).



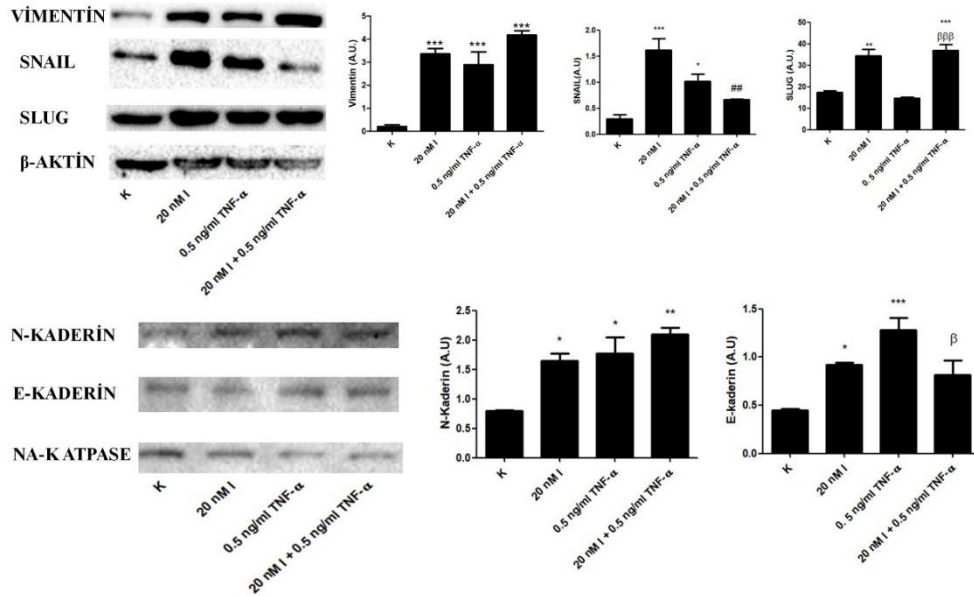
Şekil 4.9. p-JAK2 (Tyr1007/1008), p-STAT3 (Tyr705) ve p-IRS1 (Ser307) seviyelerinin deney gruplarına göre değişimi. **A.** Sol üst panelde p-JAK2 (Tyr1007/1008) ile yüklem kontrolü olarak kullanılan JAK2 protein bantlarını gösteren western emdirim membranı ve sol alt panelde bu bantların optik yoğunlukları ile hesaplanan p-JAK2 (Tyr1007/1008) seviyelerini gösteren grafik yer almaktadır. **B.** Sitoplazmik ve nükleer p-STAT3 (Tyr705) ile p-IRS-1 (Ser307) seviyelerini gösteren ELISA bulguları verilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ K'ye göre; ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ 20 nM I'ye göre; + $p < 0.05$ ve +++ $p < 0.001$ 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol, tam medyum uygulanmış hücreler. I: İnsülin.

4.4. EPİTELİYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ İLE İLGİLİ BULGULAR

Epitelial-mezenkimal geçiş, kanser hücrelerinin metastazı ile ilişkilendirilen hücresel bir süreçtir. Bu aşamada hücrelerde N-kaderinde artış, E-kaderin seviyesinde azalma ve EMT ilişkili transkripsiyon faktörlerinde değişimler meydana gelmektedir. Deney gruplarında

EMT'yi belirlemek amacıyla Vimentin, Slug, Snail, E-kaderin ve N-kaderin seviyelerindeki değişimler ölçüldü. Elde edilen bulgular Vimentin seviyesinin tüm gruplarda kontrol grubuna oranla anlamlı bir artış gösterdiğine işaret etmektedir (**Şekil 4.10**). Bir EMT transkripsiyon faktörü olan Snail ise en fazla 20 nM I grubunda gözlenmiştir, TNF α grubunda da yine kontrol grubuna göre anlamlı bir artış belirlenmiş olsa da 20 nM I grubundan daha az bir artış olduğu tespit edilmiştir. 20 nM I + TNF α deney grubunda ise sadece 20 nM I grubuna göre Snai seviyesinin azaldığı belirlenmiştir. EMT'yi yönlendiren diğer transkripsiyon faktörü olan Slug proteininde ise 20 nM I grubu kontrol grubuna göre, 20 nM I + TNF α grubu ise hem kontrol grubu hem de TNF α grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (**Şekil 4.10**).

İlaveten, EMT'nin değerlendirilebilmesi için sıkça kullanılan N-kaderin ve E kaderin seviyelerindeki değişimler de ölçüldü. N-kaderin seviyelerinin bütün gruplarda kontrol grubuna göre arttığı, E-kaderin seviyelerinin ise 20 nM I ve TNF α gruplarında kontrole göre artarken 20 nM + TNF α grubunda ise sadece TNF α uygulanan gruba göre azaldığı belirlendi (**Şekil 4.10**).



Şekil 4.10. Epitelial-mezenkimal geçiş proteinlerinin deney gruplarına göre değişimi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ K'ye göre; ## $p < 0.01$ 20 nM I'ye göre, β $p < 0.05$ ve $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$ 0.5 ng/ml TNF α 'ya göre. K: Kontrol, I: İnsülin.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tip 2 diyabet insidansı ve kanser gibi potansiyel komplikasyonları dünya çapında şaşırtıcı bir hızla artmaktadır. Mevcut bilgilere göre, pankreas kanserinin gelişimi ve ilerlemesiyle diyabet, obezite ve beslenme alışkanlıkları arasında önemli bir bağlantı vardır. Bu etkenlerin pankreas kanseri ile ilişkisine dair önerilen teoriler arasından kronik inflamasyon, insülin direnci, hiperglisemi ve insülin/IGF-1 sinyalindeki anormallikler öne çıkmaktadır. İnsülin ve inflamasyon ile korale olarak gelişen PDA patogenezi açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmada literatürde ilk kez insülin ve TNF α 'nın sinerjistik etkisiyle uyarılması muhtemel olan PDA'nın moleküler sinyal yolağında insülin direncine bağlı olarak farklı yönlenebilecek olan IRS1/JAK2/STAT3 yolağına odaklanılmıştır.

Pankreatik duktal adenokarsinom hücreleri mikroskop altında pankreas kanal benzeri yapılar oluşturdukları için bu ismi almıştır ve insanlarda en ölümcül maligniteler arasındadır (Siegel ve diğ., 2021). PDA'nın, K-RAS'taki ilk aktive edici gen mutasyonundan sonra pankreas intraepitelyal neoplazileri (PanIN)'nin gelişimi yoluyla pankreas kanal hücrelerinden kaynaklanabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (Ray ve diğ., 2011). Pankreas kanal hücrelerine ek olarak, pankreas asiner hücreleri asiner-duktal metaplazi yoluyla PDA gelişimine katkıda bulunur (Zhu ve diğ., 2007). Asiner-duktal metaplazide pankreas asiner hücreleri, kanal belirteçlerini ifade eden bir embriyonik progenitör fenotipe dediferansiye olabilirler (Storz, 2017). Asiner hücre plastisitesinin PDA oluşumunda önemli bir rol oynadığı kavramı üzerinde durulmaktadır (Shi ve diğ., 2013; Kopp ve diğ., 2016). Asiner hücreler pankreas hasarı sırasında, örneğin pankreatit sırasında inflamatuvar sinyaller aldığında, asiner-duktal metaplazi meydana gelebilir. Fare modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, PDA'nın köken aldığı hücrenin olgun asiner hücre olduğunu ve pankreatit kaynaklı asiner-duktal metaplazinin PDA başlangıcının olası bir mekanizması olarak önermektedir (Shi ve diğ., 2013). Gerçekten de pankreatit, insanlarda PDA için en önemli risk faktörüdür (Gukovsky ve diğ., 2009; Becker ve diğ., 2014). Ancak, pankreatitin PDA gelişimini nasıl hızlandırdığı iyi anlaşılmamıştır. Asiner-duktal metaplazide K-RAS hiperaktivitesi ve artmış inflamatuvar sinyalleme (Hezel ve diğ., 2008; Liou ve diğ., 2013; Liou ve diğ., 2016) onkojenik K-RAS'ın iç veya dış stres sinyallemesinin, inflamatuvar sitokinlerin veya epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nü aktive eden büyüme faktörlerinin varlığında, asiner hücreler kendiliğinden kanal benzeri yapılara dönüşebilir. Örneğin, Sox9 normalde asiner hücrelerde ifade edilmez (Seymour ve

diğ., 2007), ancak hiperaktif K-RAS varlığında, asiner-duktal metaplazi sırasında kanal ve sentro-asiner hücrelerde Sox9'un daha yüksek ifadesi indüklenir ve Sox9 PanIN'lerde yüksek seviyelerde ifade edilir (Kopp ve diğ., 2012; Morris ve diğ., 2010; Prévot ve diğ., 2012).

Bu çalışmada pankreatik duktal adenokarsinomun primer olarak pankreatik duktal hücrelerden köken alabileceği düşünülerek sağlıklı insan pankreas duktal hücre hattı hTERT-HPNE hücreleri kullanıldı. hTERT-HPNE hücre hattı, hTERT genini içeren bir retroviral ifade vektörü (pBABEpuro) ile transdüksiyon yoluyla insan pankreas kanal hücrelerinden geliştirilmiştir. Transfekte hücreler telomeraz için pozitif hale gelmiş, kültür ortamında yaşlanmaksızın 150'den fazla kez çoğalmaya devam edebilmiştir (Lee ve diğ., 2003). hTERT-HPNE hücrelerinin, asiner-duktal metaplazi sırasında oluşan aracı hücrelerin özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir; bunlar arasında farklılaşmamış fenotipleri, Nestin ifadesi ve aktif Notch sinyalleme öne çıkmaktadır (Lee ve diğ., 2005). Bu özellikleri hTERT-HPNE hücrelerini PDA patogenezinin araştırılması için ideal kılmaktadır.

Obezite ve T2D nedeniyle artan pankreas kanseri insidansı, bağımsız bir kanser risk faktörü olan hiperinsülinemi ile yakından ilişkilidir. Önceki çalışmalar, insülin üretiminin azaltılmasının K-RAS mutant farelerde pankreas PanIN prekanseröz lezyonlarını baskıladığını göstermiştir. Ancak, patofizyolojik ve moleküler mekanizmalar bilinmemektedir ve özellikle hiperinsülineminin PanIN öncü hücrelerini doğrudan mı yoksa dolaylı mı etkilediği belirsizdir. K-RAS G12D ifadenmesi gösteren pankreas asiner hücrelerindeki insülin reseptörleri (IR)'nin glikoz homeostazi için vazgeçilmez olduğu, ilaveten diyet kaynaklı hiperinsülinemi ve obezite bağlamında hiperinsülinemi kaynaklı PanIN oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Patogenez mekanizması; güçlendirilmiş sindirim enzimi protein translasyonu, lokal inflamasyonun tetiklenmesi ve in vivo PanIN metaplazisine atfedilmiştir. In vitro insülin uygulaması doz bağımlı olarak tripsin ve IR'ye bağlı bir şekilde asiner-duktal metaplazi oluşumunu artırmıştır (Zhang ve diğ., 2023). Bu bilgiler ışığında pankreatik kanal hücrelerinde karsinogenezi in vitro taklit edebilmek amacıyla çalışmamızda insülin sinyalini uyarabilecek düşük konsantrasyonda insülin (20 nM; Wang ve diğ., 2019) ve inflamatuvar yanıtı başlatan, aynı zamanda insülin direnci gelişimine katkıda bulunan merkezi sitokin TNF α (de Luca ve Olefsky, 2008) hücre canlılığını etkilemeyen 0.5 ng/mL konsantrasyonda tek başına ve kombinasyon halinde hTERT-HPNE hücrelerine 48 saat süreyle uygulandı.

Tümör heterojenliği; farklı hastaların tümörlerinde, aynı tümörde ya da birincil ve ikincil tümör arasında gözlenen hücre tipi farklılıkları olarak tanımlanır ve intra-tümöral ya da inter-tümöral olarak iki şekilde ortaya çıkar (Proietto ve diğ., 2023). Aynı tümör içerisindeki farklılıklar olarak ortaya çıkan intra-tümöral heterojenite, kanserin ilerlemesi ve tedavinin çoğunlukla başarısız olmasının temel sebebidir (Proietto ve diğ., 2023). Tümör dokusu, tek tip hücre formunda yer almaktan ziyade farklı hücre alt tipleri, büyüme hızı ve oranı, hücre yüzey belirteci, terapiye direnç, genetik ve epigenetik değişimler gibi önemli karakteristik özelliklerde değişikliğe ve farklılara sahip hücre popülasyonlarına sahiptir (Plaks ve diğ., 2015). Tümör heterojenitesinin anlaşılması için kullanılan modellerden biri olan CSC modeli ise bir tümör içerisinde CSC popülasyonu olarak adlandırılan oldukça küçük fakat kendini yenileme ve farklılaşma özelliği gösteren bir hücre grubunun bulunduğunu anlatmaktadır (Kapoor-Narula ve Lenka, 2022). CSC'ler, normal kök hücrelere benzer hücrelerle ortak özelliklerinin yanı sıra onlardan farklı özelliklere de sahiptir. Örneğin; sağlıklı dokulardaki kök hücreler rejenerasyon ve tamir ile ilgili durumlarda görev alırken CSC'ler ilaveten yüksek seviyede ilaca direnç göstermek ve tümör oluşumunu başlatmak veya durdurmak gibi özelliklere sahiptir (Reya ve diğ., 2007). CSC'lerin keşfedilmelerinin ardından meme, prostat, pankreas ve yumurtalık kanseri gibi solid tümörlerde CSC'lerin varlığı bildirilmiştir (Al-Hajj ve diğ., 2003; Maitland ve diğ., 2007; Zhang ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2007). CSC'ler, kendini yenileme özelliği ile tümör içerisindeki popülasyonlarını koruyabilmektedir. Bu hücreler, simetrik bölünme ile ya iki adet CSC ya da asimetrik bölünmeyle bir adet CSC ve bir de normal kanser hücresi oluşturabilirler (Matsui, 2016). Böylece hücre çoğalması, tümör oluşumu ve gelişimine yol açarlar. Bir hastanın primer tümör kitlesinden izole edilen kanser kök hücrelerinin, bağımsızlık yetmezliğinden kaynaklanan hastalıkları olan farelere enjekte edildiğinde bu farelerde yeni tümörlerin oluştuğu gözlenmiştir (Huntly ve Gilliland, 2005). Aynı zamanda CSC'lerin metastazdaki rolü de yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Metastaz temelde tümör hücrelerinin birincil tümörden farklı bir noktaya göç etmesi olarak bilinir ve bu migrasyon çoğunlukla CSC'lerin birincil tümörden ayrılması, kan akışıyla başka bir organa göç etmesi ve orada tekrar kolonize olarak daha agresif karakterize edilen ikincil tümörü oluşturmasıyla gerçekleşir (Shiozawa ve diğ., 2013). Kanser kök hücrelerinin keşfiyle birlikte kemoterapi ya da radyoterapi gibi geleneksel kanser tedavi sorunlarına CSC temelli bir yaklaşım geliştirilmeye odaklanılmıştır. Tedavi sonrası tümörün tekrar ortaya çıkması bu sorunların başında gelmektedir (Alison ve diğ., 2011). CSC'lerin hedeflenmesiyle üretilcek yeni tedavilerin

kullanımı bu sorunların çözümü olabilir. Bu hedeflenmenin sağlanabilmesi ve daha etkili tedavilerin tasarlanması için CSC'lerin tanımlanması, özel belirteçlerinin ve ilişkili sinyal yollarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Lee ve diğ., 2021) CSC'lerin tanımlanması ve izolasyonu için özellikle kullanılan belirteçlerden pankreas kanseri için tercih edilenler CD24, CD44 ve ESA olsa da yeni belirteçlerin keşfi için araştırmalar devam etmektedir (Bubin ve diğ., 2023).

Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda yer alan deney gruplarındaki CSC popülasyonlarını tespit edebilmek amacıyla *Oct4*, *Nanog*, *CD133*, *CD24*, *CD44*, *CK19* ve *c-myc* genlerinin ifadenme seviyelerindeki değişimler ölçüldü. Kandaki seviyelerinin yanı sıra hücre içi mRNA seviyelerinin de kanser belirteci olarak kullanıldığı *CK19* meme, karaciğer ve pankreas gibi birçok tümör için aynı zamanda CSC belirteci olarak da ele alınmaktadır (Zhuo ve diğ., 2021; Abdelaziz ve diğ., 2022; Haerberle ve Esposito, 2019). Çalışmamızda *CK19* gen ifadenme seviyesinin 20 nM insülin ve TNF α 'nın kombine uygulandığı grupta belirgin bir artış gösterdiği tespit edildi. PDA belirteci olarak kullanılan bir diğer gen *CD133*'tür. Bu belirtecin pankreatik duktal adenokarsinomda aşırı eksprese edildiği, primer tümörün boyutuna (T), bölgesel lenf nodu tutulumuna (N) ve uzak metastazın (M) olup olmasına göre belirlenen klinik TNM evresi, tümör farklılaşması ve zayıf prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kim ve diğ., 2012; Li ve diğ., 2015). Bulgularımız *CD133* gen ifadenme düzeyinin de *CK19* ile benzer şekilde 20 nM insülin ve TNF α 'nın birlikte uygulandığı deney grubunda oldukça belirgin bir artış gösterdiğine dikkat çekmektedir. Bir onkogen olarak tanımlanan *c-myc* ifadesi, normal hücrelerde kontrol altında tutulurken kanser hücrelerinde bu ifadenmenin kontrol edilemediği ve aşırı ifade edildiği bilinir (Sorolla ve diğ., 2020). K-RAS'ın aşağı akış molekülü olan bu onkogenin aşırı ifadenmesi pankreas kanserinde oldukça sık karşılaşılan bir olgu olduğu ve bu kanser hücrelerinin daha agresif bir karakter gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Schleger ve diğ., 2002). Bu bağlamda, bulgularımızda *c-myc* gen ifadesinin de 20 nM insülin ve TNF α 'nın birlikte uygulandığı grupta artış göstermesi *CK19* ve *CD133* ile birlikte ele alındığında karsinogenezin bu grupta olabileceğine işaret etmektedir. Çoğu kanser hücresinde bulunan hücre yüzey proteini *CD24* ise hücre adezyonu ve metastazla ilişkili olup tümör prognozu ve tanısında kullanılacak bir belirteç olabilir (Lee ve diğ., 2010). Çalışmamızda yine 20 nM insülin ve TNF α grubunda *CD24* gen ifadenmesinin artış gösterdiği belirlenmiştir. Diğer genlerdeki değişikliklerle olan uyumu, düşük insülin ve

TNF α 'nın sinerjistik etkisinin karsinogeneze yol açabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Normal kanser hücrelerine nazaran CSC'lerde belirgin bir şekilde ifade edildiği bilinen Nanog normal koşullarda Sox-2 ve Oct4 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek kendini yenileme ve embriyonik kök hücre pluripotensisini düzenlerken kanser kök hücreleri için hücre proliferasyonu, tümörün yeniden ortaya çıkması, invaziv özellik ve tedavi direnci ile ilişkilidir (Vasefifar ve diğ., 2022). He ve ekibin (2012) yaptığı çalışmaya göre CD133⁺ hücrelerin aynı zamanda yüksek seviyede *Nanog* ifade ettiği ve metastatik özellik gösterdikleri ortaya konmuştur. Çalışmamızda da benzer olarak yüksek *CD133* seviyesiyle uyumlu olarak 20 nM I ve TNF α 'nın birlikte uygulandığı grupta *Nanog* gen ifadenme seviyesi yüksektir. Bütün kök hücrelerde ortak bulunan ve normal koşullarda embriyonik kök hücre belirteci olarak kullanılan *Nanog*, *Oct4* ve *Sox-2*'nin tümör farklılaşması ve kendini yenilemesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Herrerros-Villanueva ve diğ., 2014). Yapılan çalışmalara göre bu genlerin tümör farklılaşma aşaması üzerinde etkisi olduğu ve tümör oluşumu, metastazı, tedavi direnci ve tekrardan ortaya çıkmasını tetiklediği gösterilmiş, ileri evrelerdeki kanser vakalarında daha fazla eksprese edilirken erken evrelerde bu ifadenme seviyelerinin düşük olduğu belirtilmiştir (Ben-Porath ve diğ., 2008; Bernhardt ve diğ., 2012). Çalışmamızda ise *Nanog* ifadesi insülin ve TNF α 'nın birlikte uygulandığı grupta artarken *Sox-2*'nin kontrol grubuna göre bütün gruplarda azaldığı, *Oct4*'ün ise sadece insülin ve sadece TNF α uygulanmış gruplarda azalırken birlikte uygulandığı grupta artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kök hücrelerin pluripotensitesinin korunması Sox2, Oct4 ve Nanog'un ifade seviyesine bağlıdır. Organogenez sırasında, bu transkripsiyon faktörlerinin değişen ifadesi bu kök hücrelerin pluripotensisini kaybetmesini ve soy seçimine yönelmesini etkiler. Sox2, Oct4 ve Nanog'un pluripotent kök hücrelerin soy seçimindeki etkisi bilinmektedir. Soy seçiminde, embriyonik kök hücreler Sox2, Oct4 ve Nanog'un etkisi altında nöroektodermal veya mezoendodermal soylara farklılaşmak için pluripotensilerini kaybederler. Wnt-3a, aktin, fibroblast büyüme faktörü ve retinoik asit gibi diğer faktörler bu seçim sürecinde pozitif ve negatif kontrole sahiptir (Swain ve diğ., 2020). Fu ve ekibi (2016) Oct4, Sox2 ve Nanog ifadenme seviyelerinin yalnızca oral skuamöz hücreli karsinom gelişimiyle değil aynı zamanda prognozuyla da olası ilişkisini incelemek amacıyla kapsamlı bir gözlemsel bir çalışma yapmıştır. Elde edilen bulgulara göre Oct4 ile Sox-2 normal dokuda ve tümöre bitişik normal dokuda eksprese edilmektedir. Ancak, Oct4 ifadesinin normal dokuda daha yüksek olduğu, Sox2'nin ise tümöre bitişik normal dokuda aşırı ifadenme

gösterdiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar, yüksek Sox2 ifadesine sahip hücrelerin erken moleküler değişikliklere ev sahipliği yapabileceği ve sonunda preinvaziv lezyonlar geliştirmek için alan karsinogenezine katkıda bulunabileceği hipotezini desteklemektedir. Her iki çalışma da Oct4 ifadelenmesinde farklılık gözlemlense de Nanog, bu transkripsiyon faktörlerinin sinerjik katkısının tartışmalı bir yönünü gösteren tutarlı, daha zayıf bir ifadelene göstermiştir. Benzer bir gözlem, yalnızca Sox-2'nin oral karsinogenezdeki potansiyel rolünü savunmakla kalmayan (de Vicente ve diğ., 2019a), aynı zamanda displazik lezyonlarda kök hücre popülasyonunun bazal hücre katmanından suprabazal katmana genişlemesindeki katkısına dair hipotez sağlayan, oral potansiyel olarak kötü huylu bir bozukluk olan lökoplaki ile ilgili birkaç klinik çalışmada bildirilmiştir. Ancak, diğer bir çalışma, oral potansiyel olarak kötü huylu bozukluklardaki Nanog ifadesinin kötü huylu dönüşüm riskinin erken bir öngörücüsü olarak kullanılabileceğini öne sürmektedir (de Vicente ve diğ., 2019b). Hem sitoplazmik hem de nükleer Nanog, normal bitişik epitelin bundan mahrum bırakıldığı oral epitel displazik lezyonlarda gözlemlenmiştir. Ek olarak, oral displazilerde Nanog'un pozitif immünoaktivitesi, oral kansere ilerleme riskinin artmasıyla da ilişkilidir. Benzer şekilde, oral kanser öncesi lezyonlarda, oral kansere bitişik epitel kanser dışı dokularda ve oral karsinom örneklerinde Oct4 ve Sox2'nin tutarlı bir şekilde birlikte ifadeleneği gözlemlenmiş ve bu transkripsiyon faktörlerinin tümör başlangıcında muhtemelen ikamet eden kök hücrelerde pluripotensinin restorasyonu ve nihayetinde CSC'lere dönüşümleri yoluyla sinerjistik katkısı olduğu düşünülmüştür (Bissels ve diğ., 2016; Qiao ve diğ., 2014). Çalışmamızda elde edilen bulgular, düşük insülin ile birlikte TNF α uygulanan hTERT-HPNE hücrelerinde artış gösteren *Nanog* ve *Oct4* ifadesinin bu grupta karsinogenezini ilerletme potansiyeli taşıyan CSC popülasyonunun varlığına işaret etmektedir.

CD44 hücre-hücre etkileşimlerine, hücre iskeletinin hücre dışı matrikse yapışmasına ve hücre göçüne katılan kinaz olmayan bir transmembran glikoproteindir (Briede ve diğ., 2021). CD44 kolajen, kondroitin, osteopontin ve fibronektin dahil olmak üzere çeşitli ligandlara bağlanır (Chen ve diğ., 2018), ancak ana ligandı hücre dışı matriksin bol miktarda bulunan bir bileşeni olan hiyaluronik asittir. CD44 ve hiyaluronik asit arasındaki etkileşim, transmembran molekülünde konformasyonel değişikliklere neden olur ve bunu nihayetinde hücresel çoğalmayı, yapışmayı, göçü ve kötü huylu hücreler için invazyonu artıran çoklu hücre içi moleküler sinyal yollarının (Ras, MAPK, PI3K) aktivasyonu izler. Hou ve ekibi (2014) ile Askan ve ekibi (2021) PDA vakalarının %37-42,7'sinde yüksek bir *CD44* ifadeleneği bildirmiştir. Her iki çalışmada da *CD44* taşıyan hücre sayıları, daha önce karsinom hücreleri

için %0,2-0,8 seviyesinde olduğu belirlenen (Li ve diğ., 2007) değeri önemli ölçüde aşmıştır. Bu nedenle, yalnızca *CD44*'ün varlığının CSC'leri tespit etmek için yeterli olmadığı belirtilmektedir. *CD44*'ün başka bir CSC belirteci, örneğin *CD24* veya *CD133*, ile birlikte tespiti gereklidir. Özellikle *CD133*, ilk çalışmalardan bu yana PDA için belirgin bir CSC belirteci olarak değerlendirilmektedir (Hermann ve diğ., 2007). Çalışmamızda kurduğumuz deney gruplarında *CD44*'ün diğer CSC belirteç genlerinden farklı olarak düşük insülin ile birlikte TNF α uygulanan hTERT-HPNE hücrelerinde düşük seviyelerde eksprese edildiği ortaya konmuştur. Tüm bulgular bir arada değerlendirildiğinde düşük insülin ile birlikte TNF α uygulanan hTERT-HPNE hücrelerinde karsinogenezin *CD133*, *CD24*, *Nanog*, *CK19* ve *Oct-4* etkisiyle gerçekleştiği öne sürülebilir.

Kanser, kontrol edilemeyen bir hücre büyümesi ve bölünmesi ile karakterize edilir. Bu durum, normal hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının kanser hücrelerinde doğru çalışmamasından kaynaklanmaktadır. Bir onkogenin aktivasyonu ya da belli tümör baskılayıcıların kaybı, hücreyi ve metabolizmayı sürekli çoğalacak şekilde yeniden programlamaya götürür (Regle ve diğ., 2012). Kanser hücreleri için karakteristik özellikler içerisinde yer alan aşırı hücre bölünmesi ve çoğalması, genellikle kanser hücrelerinde meydana gelen genetik değişimlerden kaynaklanır (Lewis, 2010). G₁, S, G₂ ve M fazı olarak dört aşamada gerçekleşen hücre döngüsünde bir de G₀ fazı olarak adlandırılan bir aşama vardır. G₀ fazında yer alan hücreler bölünme hazırlığında olmayan hücrelerdir. Hücre döngüsü, oldukça karmaşık bir sistem tarafından kontrol edilmekte olup hücrenin bölünmeye hazır olup olmamasına göre bölünme sürecine girer. Bu kontrol sisteminde yer alan proteinler ve genler önem taşımaktadır. Kanser hücrelerinde ise bu kontrol sisteminde görevli proteinler ve genler mutasyona uğradıkları için bölünme kontrol edilemez. Bu bilgiden yola çıkarak çalışmamızda kurduğumuz deney gruplarında hücrelerin hücre döngüsünün hangi fazında olduğu akım sitometrik yöntemle gösterildi. Bulgular doğrultusunda sadece TNF α ile insülin ve TNF α 'nın eş uygulandığı gruplarda S fazındaki hücre popülasyonlarında anlamlı azalma gözlenirken yine bu iki grupta G₂/M fazındaki hücre popülasyonlarında artış olduğu görüldü. İnsülin uygulanan grup ise S fazında bir değişiklik göstermezken G₂/M fazında bir miktar artış göstermiştir. Gao ve ekibinin yaptığı bir çalışmada (2023) TNF-R2 ifadenin seviyesinin artmasının NF- κ B sinyal yolu ile hücre proliferasyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Bu bulgu ile benzer olarak çalışmamızdaki deney gruplarında da TNF α uygulaması ile hücrelerin M fazına geçişi gözlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, insülinin PDA metastazı ve hücre proliferasyonunda PI3K/AKT sinyal yolağı

aracılığıyla etki gösterdiği ortaya konmuştur (Wu ve diğ., 2023). İnsülin uygulanan grupta da G₂/M geçiş fazındaki hücre popülasyonunun artmış olması insülinin de PDA hücre proliferasyonunda etkili olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, karsinogenez belirteci olarak da yorumlanabilen hücre proliferasyonunun insülin ve TNF α 'nın sinerjistik etkisi ile sentez fazından G₂/M fazına geçişi indüklediği söylenebilir. CSC belirteçlerinden biri olan CD133'ün hücre proliferasyonu üzerine etkisinin gözlemlendiği bir çalışmada, en fazla artışın TNF α tarafından indüklenen NF- κ B sinyal yolağı ilişkili genlerde olduğu gözlenmiş ve CD133'ün bu yol üzerinden etki ettiğini gösterilmiştir (Simbulan-Rosenthal ve diğ., 2024). Literatürdeki bilgiler ve çalışmamızdaki bulgular uyumlu olarak hücre döngüsünde TNF α 'nın hücre siklusunun G₂/M fazına geçişi üzerindeki etkisini göstermektedir. G₂/M'deki artış sadece hücre proliferasyonunun arttığını göstermemektedir. G₂/M fazı, hücrelerin bölünme evresine geçmeden hemen önce kontrol edildiği hücre döngüsü kontrol noktalarından biridir. Hücreler, bölünme evrelerinin belirli aşamalarında hücre kontrol noktaları olarak adlandırılan evrelerde belirli proteinler ve reseptörler yardımıyla dikkatlice regüle edilirler (Dipaola, 2002). Bu sebeple çalışmamızdaki G₂/M fazındaki artışın aynı zamanda bu kontrol noktasında kalmış hücre popülasyonu olabilme ihtimalini de ortaya çıkardı. Bu duruma bir açıklama getirmek için ek olarak Annexin/7-AAD işaretlemesi yapılarak nekrotik ve apoptotik hücreler işaretlendi. Bulgular, sadece insülinin uygulandığı deney grubunda apoptozun kontrol grubuna göre belirgin şekilde arttığı fakat TNF α ile eş uygulandığı apoptotik hücre popülasyonunda bir azalma göstermiştir. Bununla birlikte insülin ve TNF α 'nın eş uygulamasının nekrotik hücre popülasyonunun artmasına sebep olduğu görülmüştür. Bu durumda G₂/M geçişindeki artışla birlikte nekrotik popülasyondaki artış bu hücrelerin G₂/M kontrol noktasından sonra ölüme gittiği yönünde bir bilgi vermektedir. Sadece TNF α uygulanan grupta sentez fazından G₂/M'e geçiş gerçekleşirken bu grupta ölüm gözlenmemesi sadece TNF α 'nın hücre bölünmesini indüklediğini gösterir. Yapılan çalışmalara göre G₂/M kontrol noktasında görevli gen ifadenme seviyelerindeki artışın şiddetli pankreas kanseri ile ilişkili olduğunu, G₂/M kontrol noktasında hücrelerin tutuklanmasının pankreas kanseri sağkalımını da azalttığını ve kanserin patolojisinin belirlenmesinde de etkilidir (Oshi ve diğ., 2020). Ek olarak insülin ve TNF α 'nın eş uygulanması ile hücrelerin ölmesi, hücre içeriğinin çevredeki hücreler üzerinde inflamatuvar etkiye sebep olmaktadır. Bu durum da karsinogenezine bu grupta daha şiddetli bir fenotipe değişmesine yol açabileceği yönünde yorumlanabilir.

Çalışmamızda PDA belirteç genlerinin yanı sıra klinikte yaygın olarak kullanılan proteinler arasından sitoplazmik CK19 ile sitoplazmik ve nükleer SMAD4 seviyelerindeki değişimler belirlendi. Normal pankreatik hücelere nazaran PDA hücrelerinde CK19 proteinin aşırı yüksek seviyelerde olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (de Albuquerque ve diğ., 2012). Çalışmamızda CK19'un kontrol grubuna göre 20 nM I grubunda belirgin olarak yükseldiği TNF α varlığında ise bu artışın baskılandığı tespit edilmiştir. CK19 PDA seviyesinden bağımsız olan bir biyobelirteçtir. Bu sebeple çalışmamızda tespit edilen CK19 gen ifadenme seviyeleri ile zıt olan protein seviyelerindeki değişimler karsinogenez seviyesi ile ilgili bir bilgi sağlamamaktadır. Ancak, insülinin tek başına PDA gelişimini başlatabileceği açıktır. SMAD4, kolorektal kanser örneklerinin üçte birinde ve pankreas tümörlerinin yarısında mutasyona uğramış bulunan gastrointestinal maligniteye özgü bir tümör baskılayıcı genidir. SMAD4'ün allelik delesyon veya intragenik mutasyonla inaktivasyonu esas olarak insanlarda PDA'nın ileri evresinde meydana gelir. Karsinogenez sırasında TGF- β 1 kanser ilerlemesi üzerinde iki fazlı bir etki göstermek için otokrin ve/veya parakrin bir şekilde hareket edebilir. Tümör oluşumunun erken dönemlerinde, TGF- β 1 hücre döngüsü ilerlemesini baskılamak ve tümör büyümesini engellemek için işlev görür. Bunun aksine, kanser hücreleri daha sonra TGF- β 1 antagonistinin ifadesini artırarak, TGF- β 1 reseptörünü mutasyona uğratarak veya SMAD4 genini inaktive ederek TGF- β 1 aracılı büyüme inhibisyonuna karşı direnç geliştirmeye adapte olurlar. Daha sonra, TGF- β 1 tümör baskılamada işlevini durdurur ve tümör hücrelerinde EMT'yi teşvik ederek veya anjiyojenik fenotipi indükleyerek tümör metastazını artırma rolüne geçer (Muraoka-Cook ve diğ., 2004). TGF- β 1'in SMAD'ye bağımlı ve SMAD'den bağımsız, kanonik olmayan yollar aracılığıyla sinyalleme kaskadlarını iletmediği bilinmektedir. Bir dizi çalışma, TGF- β 1'in Ras/Erk (p44/42), PI3K/Akt ve JNK aracılığıyla kanonik olmayan SMAD bağımsız yollarını aktive edebileceğini bildirmiştir (Xie ve diğ., 2004). Ancak, TGF- β tarafından Erk, Akt veya p38 MAPK aktivasyonunun genel etkisi ve biyolojik sonuçları yetersiz bir şekilde karakterize edilmiştir. SMAD4 inaktivasyonu veya delesyonu üzerine TGF- β 1, kanonik SMAD'ye bağımlı yol yerine, SMAD'den bağımsız bir yol aracılığıyla sinyal verebilir ve bu da tümör hücrelerinde görülen fenotipik değişikliklere yol açabilir. SMAD4 yabanıl tip PDA hücreleri p38 MAPK ve TGF β 1 sinyallemesinin aktivasyonunun artması ve c-Jun, c-Fos, Hes1 NF- κ B transkripsiyon faktörü genleri için daha yüksek ifade seviyelerinin edinilmesiyle Nestin, SMA, CD44 genlerini yüksek ifade eden daha çok fibroblast benzeri morfoloji sergiler. Buna karşılık, PDA hücrelerinde SMAD4 inaktivasyonu daha iyi farklılaşmış epitel benzeri morfoloji

sergiler ve yüksek aktivasyon p-44/42 ve PI3K/Akt sinyalleme yollarıyla E-kaderin, CD133, VEGF, EGFR ve Sp-1 ifadelerinde genel bir artışa yol açar (Chen ve diğ., 2014). SMAD4 baskılanan PDA hastalarında düşük sağ kalım oranlarının yanı sıra metastaz ile ilaç direncinin arttığı gösterilmiştir (Racu ve diğ., 2022). Çalışmamızda elde edilen veriler düşük seviyeli insülin uygulanan grupta SMAD4 seviyesinin anlamlı bir artış gösterdiğini, insülin ile birlikte TNF α uygulanmasının ise bu artışı baskıladığını ortaya koymaktadır. Yukarıda detaylandırılan bulgularla birlikte değerlendirildiğinde insülinin erken seviyedeki PDA fenotipini uyarırken, insülin ile birlikte TNF α uygulamasının karsinogenezi daha ileriye taşıyor olduğu fikri öne çıkmaktadır.

Kanser kök hücreleri kendini yenileme yetileri sayesinde kanseri başlatma ve ilerletme potansiyeli olan hücrelerdir (Safa, 2020). CSC'lerin bu yetilerini göstermek amacıyla en sık tercih edilen testlerden biri sfer oluşturma testidir (Bahmad ve diğ., 2018). Çalışmamız kapsamında CSC'lerin hangi deney grubunda daha yoğun olduğunun gösterilmesi ve karsinogenezin hangi grupta başlayabileceğinin desteklenmesi amacıyla sfer oluşturma testi yapıldı. Sfer boyutları gruplar arasında değişiklik göstermese de sfer sayıları arasında belirgin farklar gözlemlendi. Düşük seviyeli insülin veya TNF α uygulamasının sfer sayısını artırdığı belirlenmiş olsa da bu iki uyarının birlikte uygulanmasının daha fazla sfer oluşumuna neden olduğu belirlendi. Bu artış CSC popülasyonunun 20 nM I + TNF α grubunda daha yüksek olduğu düşüncesini desteklemektedir. İlginç bir yaklaşım olarak TNF α , PDA hastalarının kemoterapötik tedavisini iyileştirmek için potansiyel olarak yararlı bir terapötik yaklaşım olarak önerilmiştir. Al-Zoubi ve ekibinin yaptığı çalışmada (2014), TNF α 'nın PDA lipogenezine, inflamasyonuna ve metastazına çok hedefli bir katılım sağladığı ve TNF α 'nın tümör içine uygulanmasının insan PDA'sında yeni bir tedavi yaklaşımı olarak potansiyeli olabileceği önerilmiştir. Bu çalışma doğrudan PDA dokusunda yapıldığından sağlıklı pankreatik duktal hücreler üzerindeki etkileri göz ardı edilmiştir. Ancak, çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular sözü geçen çalışmanın aksine TNF α 'nın yeni CSC oluşumuna sebep olarak PDA patogenezi ilerletebileceğine işaret etmektedir. Pankreatik duktal adenokarsinom metastatik potansiyeli yüksek olan agresif bir kanser çeşididir (Ayres Pereira ve Chio, 2019). Yapılan çalışmalar, PDA'da birincil tümör kütle oluşumu tamamlanmadan önce hücrelerin erken aşamalarda yayılarak metastaza yol açtığını göstermiştir (Paez ve diğ., 2012). Ayrıca erken aşamalarda metastaz yapan bu hücrelerin kullanılan terapilere karşı oldukça dirençli

olduğu, metastaz yaptıkları bölgeye göre klonal bir farklılık gösterdikleri belirtilmiştir (Sosa ve diğ., 2014; Maddipati ve diğ., 2015).

Bir kanser hücresi metastatik hücre olarak tanımlanması ve birincil tümörü terk edebilmesi için pro-metastatik özellikler olarak tanımlanan bazı özelliklere sahip olmalıdır (Ayres Pereira ve Chio, 2019). Pro-metastatik özelliklerden en çok çalışılmış olanı EMT'dir. Kanser invazyonu ve metastazında ana rolü üstlenen bu süreç, epitel hücrelerin özelleşmiş hücre-hücre bağlantıları, polarite ve göç yeteneği gibi mezenkimal hücre özellikleri kazanarak ana tümör kütesinden uzaklaşması ve başka dokulara yerleşimi ile tanımlanır (Thiery, 2002). EMT'nin PDA için tümör oluşumunda ve ilaç direncindeki etkisi gösterilmiştir (Rasheed ve diğ., 2010; Zhou ve diğ., 2017). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda tamamen mezenkimal özellik göstermeden metastaz ve invazyona yol açtığı belirtilen bir hücre fenotipi de tanımlanmıştır (Jolly ve diğ., 2015). Bu hücresel durum yarı EMT olarak da tanımlanır ve bu fenotipteki hücrelerin epitel hücre özelliklerini protein seviyesinde tamamen kaybetmeden migrasyon gösterdikleri belirtilmiştir. Kanda tek hücre yerine kümeler halinde göç edilmesini sağlayan bu yarı EMT durumu, toplam kanda kümeleneşmiş hücre oranında çok küçük bir kısmı kapsasa da metastaz üzerindeki etkisi oldukça fazladır (Aceto ve diğ., 2014). Çalışmamız kapsamında hücrelerin hem migrasyon hem de invazyon kapasitelerini gözlemek amacıyla transwell invazyon testi yapıldı. Bulgular, TNF α 'nın invaziv hücre sayısını artırdığını, ancak en fazla invazyonun 20 nM I + TNF α grubunda meydana geldiğini göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda CD133 ifadesinin metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Maeda ve diğ., 2008). Ayrıca CD24'ün de metastazı önemli derecede etkilediği belirtilmiştir. Bu açıdan invazyon testinden elde edilen bulgular CSC belirteç genlerinden CD133 ve CD24 gen ifadeleri ile uyumlu bir değişim göstermiştir. Hem CSC popülasyonu açısından hem de invaziv hücre sayısı açısından 20 nM I + TNF α grubunun öne çıktığı görülmektedir. Diğer bir ifadeyle gen, protein ve fonksiyon düzeyinde bu grupta gözlenen uyumlu değişimler karsinogenezin bu grupta ortaya çıktığına ışık tutmaktadır.

C-mezenkimal-epitelyal geçiş faktörü, HGF reseptörü olarak da bilinen proto-onkogen *met* tarafından kodlanan bir reseptör tirozin kinazdır. Bu reseptör çoğalma, apoptoz, hareketlilik ve morfogenez dahil olmak üzere çeşitli önemli hücresel tepkileri düzenler (Gherardi ve diğ., 2012; Trusolino ve diğ., 2010). Normal koşullar altında, c-Met yolunun aktivasyonu homeostazı korumak için düzenlenir, ancak tümör oluşumu sırasında c-Met sinyalleşmesi

düzensiz hale gelir. Bu yolun düzensizliği, c-Met aşırı ifadesi, genomik amplifikasyon, mutasyon veya alternatif ekleme dahil olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla meydana gelebilir (Cipriani ve diğ., 2009). Pankreas kanserinde artan transkripsiyon, konstitütif c-Met aktivasyonunun en yaygın nedenlerinden biri olan c-Met'in aşırı ifadeleneşine yol açar ve bu artan c-Met, birden fazla mekanizma aracılığıyla tümör oluşumunu ve gelişimini teşvik eder (Comoglio ve diğ., 2008). Pankreas tümör dokularındaki c-Met ifadesi, bitişik dokulara göre 5-7 kat daha yüksektir (Yu ve diğ., 2006). c-Met'in pankreatik CSC'leri tanımlamak için bir belirteç olduğu ve daha yüksek tümör oluşturma potansiyeline sahip kanser hücre popülasyonunda c-Met'in yüksek olduğu bildirilmiştir. XL184 ile c-Met'in inhibisyonu, pankreatik CSC'lerin kendini yenileme kapasitesini engellemiştir. Obez olmayan diyabetik şiddetli kombine immün yetmezliği olan (NOD SCID) farelerde oluşturulan pankreas tümörlerinde, c-Met inhibisyonu tümör büyümesini yavaşlatmış, CSC popülasyonunu azaltmış ve metastaz gelişimini engellemiştir (Herreros-Villanueva ve diğ., 2012). Çalışmamızda elde edilen bulgular insülin ve TNF α 'nın birlikte uygulandığı normal insan pankreatik kanal hücre popülasyonunda c-Met⁺ hücre popülasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, diğerleriyle birlikte değerlendirildiğinde insülin ve TNF α 'nın birlikte normal insan pankreatik kanal hücrelerinde kanserleşmeye yol açabileceği hipotezini desteklemektedir.

Kanser hücrelerinde EMT, metastaza ve terapötiklere dirençte katkıda bulunan artan invazivlik ve tümör başlatma kapasitesi sağlar. Bununla birlikte, epitel ve mezankimal durumlar arasında gezinen hücresel plastisite ve hibrit veya kısmi bir E/M fenotipinin sürdürülmesi, kanser ilerlemesi için daha da önemli görünmektedir. Diğer temel EMT transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, iyi karakterize edilmiş Snail ailesi proteinleri Snail (SNAI1) ve Slug (SNAI2), hem fizyolojik hem de patolojik EMT'de önemli roller oynar. Genellikle birlikte anılmalarına rağmen, birçok senaryoda işlevlerinde farklılık gösterirler. Slug ifadesi her zaman tam EMT veya E-kaderin kaybıyla ilişkili değildir. Örneğin, Slug meme epitel hücreleri progenitör hücre soyunun farklılaşmasında, DNA hasarı tepkilerinde, hematopoetik kök hücrelerinin kendini yenilemesinde ve pulmoner fibroz ve ateroskleroz gibi patolojilerde önemli roller oynar. Bu perspektifte, Slug'un meme epitel hücrelerinde ve meme kanserinde bazal epitel hücreleri ve kök hücrelerde "EMT olmayan faktör" olarak işlevlerini de vurgulayan Slug ve E-kaderin'in birlikte ifade edildiğini gösteren raporlar sunulmuştur. Slug ve E-kaderin'in normal meme bezinde ve meme kanseri/kök hücrelerinde iş birliği yapabileceği öne sürülmekte ve bu tür

Slug⁺/ E-kaderin^{düşük+} "bazal benzeri epitel" hücrelerinin işlevsel olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. Bu nedenle, Slug bir EMT faktörü olmaktan çok bazal epitel hücre fenotipi sürücüsü olarak kabul edilebilir (Sterneck ve diğ., 2020). Çalışmamızda, düşük seviyeli insülin uygulanan normal insan hTERT-HPNE hücrelerinde Vimentin, Snail, Slug ve N-kaderin'e ilaveten E-kaderin seviyesinde de artış belirlenmiş ve bu grupta epitel ve mezenkimal durumlar arasında gezinen ara form hücrelerin olduğu değerlendirilmiştir. TNF α uygulanan hücrelerde ise Vimentin, Snail, N-kaderin'e ilaveten E-kaderin seviyesinde de artış belirlenmiş ve bu grupta epitelial ve mezenkimal hücrelerin bulunduğu değerlendirilmiştir. İnsülin ile birlikte TNF α uygulanan hücrelerde ise Vimentin, Slug ve N-kaderin seviyelerinde artış belirlenmiş ve bu grupta baskın fenotipi mezenkimal hücrelerin oluşturduğu değerlendirilmiştir. İnsülin veya TNF α tek başına EMT'yi uyarırsa da ikisinin sinerjistik etkisi mezenkimal fenotipe geçişi ilerletmektedir.

Obezite, makrofajların ve yağ hücrelerinin işlev bozukluklarını ve uygunsuz sitokin üretimini belirleyen sistemik bir inflamatuvar duruma neden olur (Wang ve Trayhurn, 2006). Sonuç olarak, daha yüksek TNF α seviyeleri çeşitli mekanizmalar aracılığıyla insülin direncini belirler. Çalışmalar, TNF α 'nın neden olduğu insülin direncinin anormal insülin sinyallemesine, insülin direnci olan kişilerde doku ve plazma TNF α seviyelerinin aşırı artışına dayandığını ve TNF α nötralizasyonunun insülin direncini iyileştirdiğini vurgulamaktadır (Hossain ve diğ., 2010; Swaroop ve diğ., 2012). Kronik inflamasyon, insülin direncinin gelişimine önemli bir katkıda bulunur (Nandipati ve diğ., 2017; Xu ve diğ., 2003). İki ana inflamasyon yolu olan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve nüklear faktör-kappa B (NF- κ B), insülin direncinin ilerlemesinde önemli roller oynar. MAPK'ler, c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK), p38 ve hücre dışı sinyalle ilişkili kinaz (ERK) olarak adlandırılan üç ayrı memeli protein kinaz ailesidir. MAPK'lerin aktivasyonu, IRS-1'in serin fosforilasyonunu indükler, bu da aşağı akış PI3K-AKT yolunun bozulmasına ve insülin sinyal iletimi transdüksiyonunda bir azalmaya yol açar (Fujishiro ve diğ., 2003). I κ B kinaz inhibitörü (IKK)- β 'nin aktivasyonunda proinflamatuvar sitokinlerin aracılığı, metabolik inflamasyon ve insülin direncini birbirine bağlayan temel bir mekanizma olarak kabul edilmiştir (Arkan ve diğ., 2005). Çalışmalar, TNF α 'nın IKK- β aktivasyonunu indüklediğini, bunun da doğrudan IRS-1'in serin kalıntısını hedef aldığını veya NF- κ B'ye bağlı bir şekilde IRS-1'den tirozin fosfat gruplarını hızla uzaklaştırdığını ve sonuçta insülin direncine yol açtığını göstermiştir (Fernández-Veledo ve diğ., 2006; Zabolotny ve diğ., 2008). Çalışmamızda insülin ile birlikte TNF α varlığında uyarılan karsinogenezin moleküler

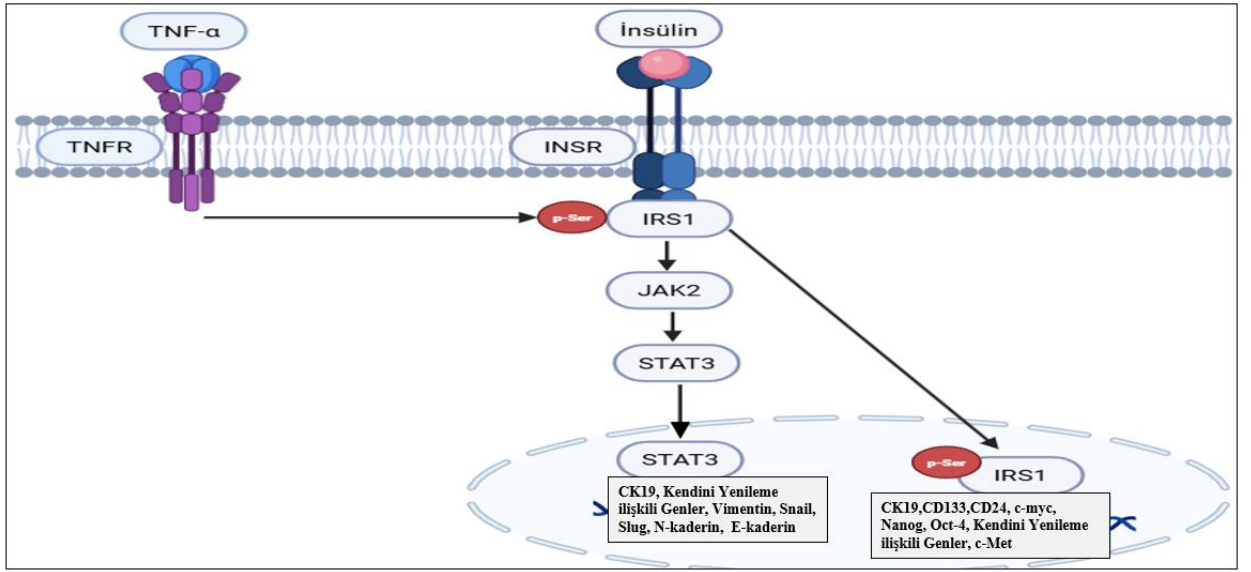
mekanizmasında p-IRS1 (Ser307) ile JAK2 ve STAT3 aktivasyonundaki değişimler araştırıldı. Elde edilen bulgular, TNF α uygulanan grupların sitoplazmik fraksiyonunda insülin direnci belirteci olan p-IRS1 (Ser307)'un arttığını göstermektedir. Bu bulgu yukarıda bahsedilen bulgular ile uyumludur. Ayrıca, bu çalışma ile ilk kez p-IRS1 (Ser307)'un insülin ile birlikte TNF α uygulanan grupta pankreatik kanal hücrelerinde nükleusa geçtiği gösterilmiştir. İnsülin sinyal yollarının bir adaptör proteini olan IRS1, birçok inflamasyonla ilişkili kanserin ilerlemesiyle ilişkilidir. Oksidatif stresin IRS1 ifadesini düzenlediği ve IRS1'in yukarı regülasyonunun kolanjiyokarsinomun ilerlemesini indüklediği gösterilmiştir. İki farklı hücre hattında siRNA uygulamasıyla IRS1'in devre dışı bırakılması proliferasyon, hücre döngüsü ilerlemesi, göç, invazyon, kök hücre karakteri ve oksidatif strese direnç özelliklerinin inhibisyonuna yol açmıştır. Dahası bir transkriptomik çalışma, KKKU-213B kolanjiyokarsinom hücre hattında IRS1'in baskılanmasının hücresel işlevlerde yer alan çeşitli genlerin ve yolların ifadenme seviyelerini azalttığını göstermiştir. Bu bulgular, IRS1'in oksidatif stres ve kolanjiyokarsinom ilerlemesi arasındaki bağlantıda anahtar bir molekül olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, IRS1 ve ilgili genlerin kolanjiyokarsinom terapisi için prognostik belirteçler ve terapötik hedefler olarak kullanılabilceği önerilmiştir (Kaewlert vd., 2024).

İlaveten bulgularımız, insülin ile uyarılan STAT3 aktivasyonunun TNF α varlığında baskılandığını göstermektedir. STAT3'ün anormal aktivasyonu, hücre çoğalması, anjiyogenez, metastaz, bağışıklık baskılanması ve kök hücre karakterinin teşviki dahil olmak üzere çok sayıda süreç yoluyla tümör büyümesini ve gelişimini teşvik eder. Bu süreçler yoluyla STAT3, PDA tümör oluşumunda ve ilerlemesinde önemli bir itici güç görevi görür. Örneğin, interlökin 6 (IL-6) ve STAT3, metastazın teşvikinde kritik roller oynar (Huang ve diğ., 2011; Nagathihalli ve diğ., 2016). Prolaktin (PRL) hormonunun Panc-1 ve MiaPaca2 PDA hücre göçünü ve tümör büyümesini artırmak için STAT3 aktivasyonunu indüklediği bildirilmiştir (Dandawate ve diğ., 2020). STAT3, kanser hücrelerinde programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) gen ifadesini doğrudan düzenleyerek, bağışıklık gözetiminden kaçan pankreas tümörlerinin oluşumunda hayati bir rol oynar (Bu ve diğ., 2017; Lefler ve diğ., 2022). Dahası STAT3, tümör metabolizmasını ve kanserle ilişkili fibroblastları (CAF'ler) düzenleyerek, tümör büyümesini, gelişimini ve ilerlemesini destekleyen bir mikro ortamı teşvik edebilir. Bu, STAT3'ün pankreas kanseri üzerindeki geniş etkisini kısaca göstermektedir. Ancak, bu verilerin hepsi mevcut PDA hücreleriyle yapılan çalışmalardan sağlanmışır. Sağlıklı insan pankreatik kanal hücrelerinde STAT3 aktivitesinin karsinogenezi başlatabilme potansiyeli bilinmemektedir. Çalışmamızda

elde edilen bulgular, insülin ile uyarılan STAT3 aktivasyonunun TNF α varlığında baskılanmasının karsinogenezi ilerlettiğini düşündürmektedir. Bu durumda, STAT3 aktivasyonunun karsinogenezin öncül adımlarında rol alması sonraki adımlarda ise STAT3 aktivitesinin baskılanıyor olma olasılığı ortaya çıkmaktadır. Bu noktada TNF α aracılı insülin sinyal blokasyonunun söz konusu karsinogenezin ilerlemesinde etkin bir rol oynadığı düşünülebilir. İnsülin ve TNF α ile birlikte uyarılan karsinogenezin ortak hücre içi sinyalizasyonun IRS1, JAK2 ve STAT3'ü kapsadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak,

- Normal insan pankreatik kanal hücrelerinde düşük seviyeli kronik insülin uyarısının IRS1 aracılığıyla sırasıyla IRS1, JAK2 ve STAT3 aktivasyonunu sağlayarak CSC, EMT ve karsinogenez ile ilgili hedef genlerin ifadenmesini sağlayabileceği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.
- Normal insan pankreatik kanal hücrelerinde düşük seviyeli kronik TNF α uyarısının IRS1'i Ser307 bakiyesinden fosforlayarak insülin direncine neden olabileceği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.
- Normal insan pankreatik kanal hücrelerinde düşük seviyeli kronik insülin ile birlikte TNF α uyarısının p-IRS1 (Ser307)'un nükleusa geçerek CSC, EMT ve karsinogenez ile ilgili hedef genlerin ifadenmesini teşvik edebileceği ve ileri seviyeli PDA benzeri bir fenotip oluşumunu sağlayabileceği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. (**Şekil 5.1**).



Şekil 5.1. Mevcut yüksek lisans tez projesinden elde edilen bulgular şematize edilmiştir. Şekil, BioRender.com sayfası kullanılarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma, PDA seviyelerinin klinik takibi için nükleer STAT3 ve IRS1 seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesinin biyobelirteç olarak önerilebileceği ve ayrıca p-IRS1 (Ser307)'nin PDA tedavisi için hedeflenebilecek potansiyel bir molekül olarak tanıtılması yönleriyle özgün ve kuvvetli bir çalışmadır. Diğer taraftan, çalışmanın sağlıklı kanal hücreleriyle yapıldığı göz önünde bulundurulduğunda, söz konusu hedeflerin netleştirilebilmesi için insan tümör dokusunda validasyon yapılması gerekliliği çalışmanın kısıtlı yönünü temsil etmektedir. |

KAYNAKLAR

- [Abdelaziz, L. A., Ebian, H. F., Harb, O. A., Nosery, Y., Taha, H. F., & Nawar, N., 2022, Clinical significance of cytokeratin 19 and OCT4 as survival markers in non-metastatic and metastatic breast cancer patients. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 26(1), 78–87.
- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Haber, D. A., & Maheswaran, S., 2014, Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158(5), 1110–1122.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2003, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3983–3988.
- Alison, M. R., Lim, S. M., & Nicholson, L. J., 2011, Cancer stem cells: problems for therapy?. *The Journal of pathology*, 223(2), 147–161.
- Al-Zoubi, M., Chipitsyna, G., Saxena, S., Sarosiek, K., Gandhi, A., Kang, C. Y., Relles, D., Andreisendecki, J., Hyslop, T., Yeo, C. J., & Arafat, H. A., 2014, Overexpressing TNF-alpha in pancreatic ductal adenocarcinoma cells and fibroblasts modifies cell survival and reduces fatty acid synthesis via downregulation of sterol regulatory element binding protein-1 and activation of acetyl CoA carboxylase. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 18(2), 257–268.
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., & Karin, M., 2005, IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature medicine*, 11(2), 191–198.
- Askan, G., Sahin, I. H., Chou, J. F., Yavas, A., Capanu, M., Iacobuzio-Donahue, C. A., Basturk, O., O'Reilly, E. M., 2023, Pancreatic cancer stem cells may define tumor stroma characteristics and recurrence patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*; 21(1), 385.

- Ayres Pereira, M., & Chio, I. I. C., 2019, Metastasis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: *Current Standing and Methodologies. Genes, 11(1), 6.*
- Bahmad, H. F., Cheaito, K., Chalhoub, R. M., Hadadeh, O., Monzer, A., Ballout, F., El-Hajj, A., Mukherji, D., Liu, Y. N., Daoud, G., & Abou-Kheir, W., 2018, Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional *in vitro* Culturing of Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells. *Frontiers in oncology, 8, 347.*
- Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., Lucas, A. L., 2014, Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol. Aug;20(32):11182–98.*
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., & Weinberg, R. A., 2008, An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics, 40(5), 499–507.*
- Bernhardt, M., Galach, M., Novak, D., Utikal, J., 2012, Mediators of induced pluripotency and their role in cancer cells- current scientific knowledge and future perspectives. *Biotechnol J.; 7:810–821.*
- Bissels, U., Diener, Y., Eckardt, D., Bosio, A., 2016, Characterization and classification of stem cells. In: Regenerative Medicine – From Protocol to Patient. *Cham, Switzerland: Springer International Publishing; p. 1-25.*
- Borlongan, M. C., & Wang, H., 2023, Profiling and targeting cancer stem cell signaling pathways for cancer therapeutics. *Frontiers in cell and developmental biology, 11, 1125174.*
- Briede, I., Balodis, D., Gardovskis, J., & Strumfa, I., 2021, Stemness, Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma: The Intricate Network. *International journal of molecular sciences, 22(23), 12891.*
- Brocco, D., Florio, R., De Lellis, L., Veschi, S., Grassadonia, A., Tinari, N., & Cama, A., 2020, The Role of Dysfunctional Adipose Tissue in Pancreatic Cancer: A Molecular Perspective. *Cancers, 12(7), 1849.*

- Bu, L. L., Yu, G. T., Wu, L., Mao, L., Deng, W. W., Liu, J. F., Kulkarni, A. B., Zhang, W. F., Zhang, L., & Sun, Z. J., 2017, STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC. *Journal of dental research*, 96(9), 1027–1034.
- Bubin, R., Uljanovs, R., & Strumfa, I., 2023, Cancer Stem Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *International journal of molecular sciences*, 24(8), 7030.
- Cao, L., Zhou, Y., Zhai, B., Liao, J., Xu, W., Zhang, R., Li, J., Zhang, Y., Chen, L., Qian, H., Wu, M., & Yin, Z., 2011, Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC gastroenterology*, 11, 71.
- Celik, E., Ercin, M., Bolkent, S., Gezginci-Oktayoglu, S., 2022, Metformin induces mitochondrial remodeling and differentiation of pancreatic progenitor cells into beta-cells by a potential mechanism including suppression of the T1R3, PLC β 2, cytoplasmic Ca²⁺, and AKT. *J Physiol Biochem*. Nov; 78(4):869-883.
- Chang, Jenny C. MD., 2016, Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine* 95(1S): p S20-S25, September
- Chen J, Qiao K, Zhang C, Zhou X, Du Q, Deng Y, Cao L., 2022. VRK2 activates TNF α /NF- κ B signaling by phosphorylating IKK β in pancreatic cancer. *Int J Biol Sci*; 18(3):1288-1302.
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., Freeman, J.W., 2018, The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. *J Hematol Oncol*; 11:64.
- Chen, G. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*, 296(5573), 1634–1635.
- Chen, P., Hsu, W. H., Han, J., Xia, Y., DePinho, R. A., 2021, Cancer stemness meets immunity: From mechanism to therapy. *Cell Rep*. 34 (1), 108597.
- Chen, Y. W., Hsiao, P. J., Weng, C. C., Kuo, K. K., Kuo, T. L., Wu, D. C., Hung, W. C., & Cheng, K. H., 2014, SMAD4 loss triggers the phenotypic changes of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *BMC cancer*, 14, 181.
- Cherri, S., Noventa, S., Zaniboni, A., 2021, Pancreatic adenocarcinoma: Beyond first line, where are we? *World J Gastroenterol*; 27(17): 1847-1863

- Chu, X., Tian, W., Ning, J., Xiao, G., Zhou, Y., Wang, Z., Zhai, Z., Tanzhu, G., Yang, J., & Zhou, R., 2024, Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 170.
- Cipriani, N. A., Abidoye, O. O., Vokes, E., Salgia, R., 2009, MET as a target for treatment of chest tumours. *Lung Cancer*. 63:169–79.
- Clark, A. G., & Vignjevic, D. M., 2015, Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology*, 36, 13–22.
- Comoglio, P. M., Giordano, S., & Trusolino, L., 2008, Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(6), 504–516.
- Da Silva Xavier, G., 2018, The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of clinical medicine*, 7(3), 54.
- Dandawate, P., Kaushik, G., Ghosh, C., Standing, D., Ali Sayed, A. A., Choudhury, S., Subramaniam, D., Manzardo, A., Banerjee, T., Santra, S., Ramamoorthy, P., Butler, M., Padhye, S. B., Baranda, J., Kasi, A., Sun, W., Tawfik, O., Coppola, D., Malafa, M., Umar, S., ... Anant, S., 2020 Diphenylbutylpiperidine Antipsychotic Drugs Inhibit Prolactin Receptor Signaling to Reduce Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Gastroenterology*, 158(5), 1433–1449.e27.
- de Albuquerque, A., Kaul, S., Breier, G., Krabisch, P., & Fersis, N., 2012, Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Breast Cancer Patients: A Step Forward in Personalized Medicine. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 7(1), 7–12.
- de Luca, C., & Olefsky, J. M., 2008, Inflammation and insulin resistance. *FEBS letters*, 582(1), 97–105.
- de Vicente, J. C., Donate-Pérez Del Molino, P., Rodrigo, J. P., Allonca, E., Hermida-Prado, F., Granda-Díaz, R., Rodríguez Santamarta, T., & García-Pedrero, J. M., 2019, SOX2 Expression Is an Independent Predictor of Oral Cancer Progression. *Journal of clinical medicine*, 8(10), 1744.

- de Vicente, J. C., Rodríguez-Santamarta, T., Rodrigo, J. P., Allonca, E., Vallina, A., Singhania, A., Donate-Pérez Del Molino, P., & García-Pedrero, J. M., 2019, The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *Journal of clinical medicine*, 8(9), 1376.
- Delitto, D., Vertes-George, E., Hughes, S. J., Behrns, K. E., Trevino, J. G., 2014, c-Met signaling in the development of tumorigenesis and chemoresistance: Potential applications in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 20(26): 8458-8470
- Deng, J., Guo, Y., Du, J., Gu, J., Kong, L., Tao, B., Li, J., & Fu, D., 2022, The Intricate Crosstalk Between Insulin and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Review From Clinical to Molecular. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 844028.
- DiPaola R. S., 2002. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest: commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. cancer res.*, 8: 3512-3519, 2002. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(11), 3311–3314.
- Feng, R., Morine, Y., Ikemoto, T., Imura, S., Iwahashi, S., Saito, Y., & Shimada, M., 2018, Nab-paclitaxel interrupts cancer-stromal interaction through C-X-C motif chemokine 10-mediated interleukin-6 downregulation in vitro. *Cancer science*, 109(8), 2509–2519.
- Fernández-Veledo, S., Nieto-Vazquez, I., Rondinone, C. M., & Lorenzo, M., 2006, Liver X receptor agonists ameliorate TNF α -induced insulin resistance in murine brown adipocytes by downregulating protein tyrosine phosphatase-1B gene expression. *Diabetologia*, 49(12), 3038–3048.
- Fu, T. Y., Hsieh, I. C., Cheng, J. T., Tsai, M. H., Hou, Y. Y., Lee, J. H., Liou, H. H., Huang, S. F., Chen, H. C., Yen, L. M., Tseng, H. H., & Ger, L. P., 2016, Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 45(2), 89–95.

- Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Abe, M., Shojima, N., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., & Asano, T., 2003, Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(3), 487–497.
- Gao, M., Ma, Y., Liu, D., 2015, High-fat Diet-Induced Adiposity, Adipose Inflammation, Hepatic Steatosis and Hyperinsulinemia in Outbred CD-1 Mice. *PLoS One* 10 (3), e0119784.
- Gao, Z., Zhang, Q., Chen, H., Chen, J., Kang, J., Yu, H., Song, Y., & Zhang, X., 2023, TNFR2 promotes pancreatic cancer proliferation, migration, and invasion via the NF- κ B signaling pathway. *Aging*, 15(16), 8013–8025.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Ercin, M., Sancar, S., Celik, E., Koyuturk, M., Bolkent, S., & Bolkent, S., 2021, Aspartame induces cancer stem cell enrichment through p21, NICD and GLI1 in human PANC-1 pancreas adenocarcinoma cells. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 153, 112264.
- Ghasemi, M., Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I., 2021, The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12827.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., Vande Woude, G., 2012, Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*. 12:89–103.
- Gholizadeh-Ghaleh Aziz, S., Fardiyazar, Z., Pashaei-Asl, F., Rahmati-Yamchi, M., Khodadadi, K., & Pashaiasl, M., 2019, Human amniotic fluid stem cells (hAFSCs) expressing p21 and cyclin D1 genes retain excellent viability after freezing with (dimethyl sulfoxide) DMSO. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 19(1), 43–51.
- Grigorescu, R. R., Husar-Sburlan, I. A., & Gheorghe, C., 2024. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors. *Life*, 14(8), 980.

- Gukovsky, I., Li, N., Todoric, J., Gukovskaya, A., Karin, M., 2013, Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. Jun; 144(6):1199–209.e4.
- Haeberle, L., & Esposito, I., 2019, Pathology of pancreatic cancer. *Translational gastroenterology and hepatology*, 4, 50.
- Hakam, A., Fang, Q., Karl, R., Coppola, D., 2003, Coexpression of IGF-1R and c-Src proteins in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* 48 1972–1978.
- Halbrook, C. J., Lyssiotis, C. A., Pasca di Magliano, M., & Maitra, A., 2023, Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell*, 186(8), 1729–1754.
- He, A., Qi, W., Huang, Y., Feng, T., Chen, J., Sun, Y., Shen, Z., & Yao, Y., 2012, CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study. *Experimental and therapeutic medicine*, 4(3), 435–441.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., Heeschen, C., 2007, Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*; 1:313–323.
- Herreros-Villanueva, M., Bujanda, L., Billadeau, D. D., & Zhang, J. S., 2014, Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 20(9), 2247–2254.
- Herreros-Villanueva, M., Zubia-Olascoaga, A., & Bujanda, L., 2012, c-Met in pancreatic cancer stem cells: therapeutic implications. *World journal of gastroenterology*, 18(38), 5321–5323.
- Hezel, A. F., Gurumurthy, S., Granot, Z., Swisa, A., Chu, G. C., Bailey, G., Dor, Y., Bardeesy, N., & Depinho, R. A., 2008, Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms. *Molecular and cellular biology*, 28(7), 2414–2425.
- Hossain, M., Faruque, M.O., Kabir, G., Hassan, N., Sikdar, D., Nahar, Q., Ali, L., 2010, Association of serum TNF α and IL-6 with insulin secretion and insulin resistance in IFG

- and Biomarkers in Metabolic Syndrome. IGT subjects in a Bangladeshi population. *International Journal of Diabetes Mellitus*.;2:165-168. DOI: 10.1016/j.ijdm.2010.08.004
- Hotamisligil G. S., 2017, Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542(7640), 177–185.
- Hou, Y., Chao, Y., Tung, H., Wang, H., Shan, Y., 2014, Coexpression of CD44-positive/CD133-positive cancer stem cells and CD204-positive tumor-associated macrophages is a predictor of survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*; 120:2766–2777.
- Huang, C, Yang, G, Jiang, T, Zhu, G, Li, H, Qiu, Z., 2011, The effects and mechanisms of blockage of STAT3 signaling pathway on IL-6 inducing EMT in human pancreatic cancer cells in vitro. *Neoplasma*. 58:396–405.
- Huntly, B.J.; Gilliland, D.G., 2005, Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat. Rev. Cancer* 5, 311–321
- Janssen J. A. M. J. L., 2021 Hyperinsulinemia and Its Pivotal Role in Aging, Obesity, Type 2 Diabetes, Cardiovascular Disease and Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 7797.
- Jin W., 2020, Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells*, 9(1), 217.
- Jolly, M. K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., Onuchic, J. N., & Levine, H., 2015, Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Frontiers in oncology*, 5, 155.
- Kaewlert, W., Sakonsinsiri, C., Lert-Itthiporn, W., Ungarreevittaya, P., Pairojkul, C., Pinlaor, S., Murata, M., & Thanan, R., 2023, Overexpression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) Relates to Poor Prognosis and Promotes Proliferation, Stemness, Migration, and Oxidative Stress Resistance in Cholangiocarcinoma. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2428

- Kapoor-Narula, U., & Lenka, N., 2022, Cancer stem cells and tumor heterogeneity: Deciphering the role in tumor progression and metastasis. *Cytokine*, 157, 1Vas55968.
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L., 2020, Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, (4), *pdb.prot102269*.
- Kim, H. S., Yoo, S. Y., Kim, K. T., Park, J. T., Kim, H. J., & Kim, J. C., 2012, Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance. *International journal of clinical and experimental pathology*, 5(8), 754–761.
- Kim, K. H., & Sederstrom, J. M., 2015, Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Current protocols in molecular biology*, 111, 28.6.1–28.6.11.
- Kim, S. K., Kim, H., Lee, D. H., Kim, T. S., Kim, T., Chung, C., Koh, G. Y., Kim, H., & Lim, D. S., 2013, Reversing the intractable nature of pancreatic cancer by selectively targeting ALDH-high, therapy-resistant cancer cells. *PloS one*, 8(10), e78130.
- Kopp, J. L., Grompe, M., Sander, M., 2016, Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. *Nat Cell Biol.* Mar;18(3):238–45.
- Kopp, J. L., von Figura, G., Mayes, E., Liu, F. F., Dubois, C. L., Morris, J. P., 4th, Pan, F. C., Akiyama, H., Wright, C. V., Jensen, K., Hebrok, M., & Sander, M., 2012, Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 22(6), 737–750.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., Dick, J. E., 1994, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.*;367:645–648.
- Lee, H. J., Choe, G., Jheon, S., Sung, S. W., Lee, C. T., & Chung, J. H., 2010, CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 5(5), 649–657.

- Lee, J.W., Lee, H.-Y., 2021, Targeting cancer stem cell markers or pathways: A potential therapeutic strategy for oral cancer treatment. *Int. J. Stem Cells* 14, 386–399.
- Lee, K. M., Nguyen, C., Ulrich, A. B., Pour, P. M., & Ouellette, M. M., 2003, Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(4), 1038–1044.
- Lee, K. M., Yasuda, H., Hollingsworth, M. A., & Ouellette, M. M., 2005, Notch 2-positive progenitors with the intrinsic ability to give rise to pancreatic ductal cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 85(8), 1003–1012.
- Lee, Y., Fluckey, J. D., Chakraborty, S., & Muthuchamy, M., 2017, Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced insulin resistance causes alterations in cellular bioenergetics and activation of inflammatory signaling in lymphatic muscle. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(7), 2744–2759.
- Lefler, J. E., MarElia-Bennett, C. B., Thies, K. A., Hildreth, B. E., 3rd, Sharma, S. M., Pitarresi, J. R., Han, L., Everett, C., Koivisto, C., Cuitino, M. C., Timmers, C. D., O'Quinn, E., Parrish, M., Romeo, M. J., Linke, A. J., Hobbs, G. A., Leone, G., Guttridge, D. C., Zimmers, T. A., Lesinski, G. B., Ostrowski, M. C., 2022, STAT3 in tumor fibroblasts promotes an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer. *Life science alliance*, 5(11), e202201460.
- Lewis, B., 2010, Cell Cycle Control in Pancreatic Cancer Pathogenesis. In: *Pancreatic Cancer*. Springer, New York, NY.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., & Simeone, D. M., 2007, Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research*, 67(3), 1030–1037.
- Li, C., Wu, J. J., Hynes, M., Dosch, J., Sarkar, B., Welling, T. H., Pasca di Magliano, M., & Simeone, D. M., 2011, c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology*, 141(6), 2218–2227.e5.

- Li, X., Zhao, H., Gu, J., & Zheng, L., 2015, Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a systematic review and meta-analysis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(10), 12084–12092.
- Ligr, M., Wu, X., Daniels, G., Zhang, D., Wang, H., Hajdu, C., Wang, J., Pan, R., Pei, Z., Zhang, L., Melis, M., Pincus, M.R., Saunders, J.K., Lee, P., Xu, R., 2014, Imbalanced expression of Tif1 γ inhibits pancreatic ductal epithelial cell growth, *American journal of cancer research*, 4(3), 196–210.
- Lim, S. C., & Oh, S. H., 2005, The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathology, research and practice*, 201(7), 479–486.
- Liou, G. Y., Döppler, H., DelGiorno, K. E., Zhang, L., Leitges, M., Crawford, H. C., Murphy, M. P., & Storz, P., 2016, Mutant KRas-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Acinar Cells Upregulates EGFR Signaling to Drive Formation of Pancreatic Precancerous Lesions. *Cell reports*, 14(10), 2325–2336.
- Liou, G. Y., Döppler, H., Necela, B., Krishna, M., Crawford, H. C., Raimondo, M., & Storz, P., 2013, Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- κ B and MMPs. *The Journal of cell biology*, 202(3), 563–577.
- Liu, J., Knezetic, J. A., Strömmer, L., Permert, J., Larsson, J., & Adrian, T. E., 2000, The intracellular mechanism of insulin resistance in pancreatic cancer patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(3), 1232–1238.
- Lu, C. S., Shiau, A. L., Su, B. H., Hsu, T. S., Wang, C. T., Su, Y. C., Tsai, M. S., Feng, Y. H., Tseng, Y. L., Yen, Y. T., Wu, C. L., & Shieh, G. S., 2020, Oct4 promotes M2 macrophage polarization through upregulation of macrophage colony-stimulating factor in lung cancer. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 62.
- Maddipati R., Stanger B.Z., 2015, Pancreatic cancer metastases harbor evidence of polyclonality. *Cancer Discov.* 5:1086–1097.
- Maeda, S., Shinchi, H., Kurahara, H., Mataka, Y., Maemura, K., Sato, M., Natsugoe, S., Aikou, T., & Takao, S., 2008, CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and

vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 98(8), 1389–1397.

Maitland, N.; Bryce, S.; Stower, M.; Collins, A., 2007, Prostate cancer stem cells: A target for new therapies. In *Cancer Stem Cells: Novel Concepts and Prospects for Tumor Therapy*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 155–179

Manni, W., & Min, W., 2022, Signaling pathways in the regulation of cancer stem cells and associated targeted therapy. *MedComm*, 3(4), e176.

Moatti, A., & Cohen, J. L., 2021, The TNF α /TNFR2 Pathway: Targeting a Brake to Release the Anti-tumor Immune Response. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 725473.

Morris, J. P., Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C., Hebrok, M., 2010, Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest*. Feb;120(2):508–20.

Muraoka-Cook, R. S., Kurokawa, H., Koh, Y., Forbes, J. T., Roebuck, L. R., Barcellos-Hoff, M. H., Moody, S. E., Chodosh, L. A., Arteaga, C. L., 2004, Conditional overexpression of active transforming growth factor beta1 in vivo accelerates metastases of transgenic mammary tumors. *Cancer Res*. 64 (24): 9002-9011.

Nagathihalli, N. S., Castellanos, J. A., VanSaun, M. N., Dai, X., Ambrose, M., Guo, Q., Xiong, Y., & Merchant, N. B., 2016, Pancreatic stellate cell secreted IL-6 stimulates STAT3 dependent invasiveness of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer cells. *Oncotarget*, 7(40), 65982–65992.

Nakamura, K., Terai, Y., Tanabe, A., Ono, Y. J., Hayashi, M., Maeda, K., Fujiwara, S., Ashihara, K., Nakamura, M., Tanaka, Y., Tanaka, T., Tsunetoh, S., Sasaki, H., & Ohmichi, M., 2017, CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. *Oncology reports*, 37(6), 3189–3200.

- Nandipati, K. C., Subramanian, S., & Agrawal, D. K., 2017, Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Molecular and cellular biochemistry*, 426(1-2), 27–45.
- Orth, M., Metzger, P., Gerum, S., Mayerle, J., Schneider, G., Belka, C., Schnurr, M., & Lauber, K., 2019, Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiation oncology (London, England)*, 14(1), 141.
- Oshi, M., Newman, S., Tokumaru, Y., Yan, L., Matsuyama, R., Endo, I., Katz, M. H. G., & Takabe, K., 2020. High G2M Pathway Score Pancreatic Cancer is Associated with Worse Survival, Particularly after Margin-Positive (R1 or R2) Resection. *Cancers*, 12(10), 2871.
- Padoan, A., Plebani, M., & Basso, D., 2019, Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 676.
- Páez, D., Labonte, M. J., Bohanes, P., Zhang, W., Benhanim, L., Ning, Y., Wakatsuki, T., Loupakis, F., & Lenz, H. J., 2012, Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(3), 645–653.
- Page, R. L., Ambady, S., Holmes, W. F., Vilner, L., Kole, D., Kashpur, O., Huntress, V., Vojtic, I., Whitton, H., & Dominko, T., 2009, Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning and stem cells*, 11(3), 417–426.
- Pannala, R., Basu, A., Petersen, G. M., & Chari, S. T., 2009, New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *The Lancet. Oncology*, 10(1), 88–95.
- Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M., 2021, Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, 326(9), 851–862.
- Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y. G., Lee, S. H., Jun, N., Kim, K. S., Lee, Y. K., & Kwon, H. Y., 2018, Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem cells international*. 5416923.

- Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z., 2015, The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell stem cell*, 16(3), 225–238.
- Pollak M. 2008, Insulin, insulin-like growth factors and neoplasia. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 22 625–638.
- Porta, C., Marino, A., Consonni, F. M., Bleve, A., Mola, S., Storto, M., Riboldi, E., & Sica, A., 2018, Metabolic influence on the differentiation of suppressive myeloid cells in cancer. *Carcinogenesis*, 39(9), 1095–1104.
- Prévot, P. P., Simion, A., Grimont, A., Colletti, M., Khalaileh, A., Van den Steen, G., Sempoux, C., Xu, X., Roelants, V., Hald, J., Bertrand, L., Heimberg, H., Konieczny, S. F., Dor, Y., Lemaigre, F. P., & Jacquemin, P., 2012, Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut*, 61(12), 1723–1732.
- Proietto, M., Crippa, M., Damiani, C., Pasquale, V., Sacco, E., Vanoni, M., & Gilardi, M., 2023, Tumor heterogeneity: preclinical models, emerging technologies, and future applications. *Frontiers in oncology*, 13, 1164535.
- Qiao, B., He, B., Cai, J., & Yang, W., 2013, The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(1), 28–37.
- Racu, M.-L., Lebrun, L., Schiavo, A. A., Van Campenhout, C., De Clercq, S., Absil, L., Minguignon Perez, E., Maris, C., Decaestecker, C., Salmon, I., & D’Haene, N., 2022, The Role of *SMAD4* Inactivation in Epithelial–Mesenchymal Plasticity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: The Missing Link? *Cancers*, 14(4), 973.
- Ramasubbu, K., & Devi Rajeswari, V., 2023, Impairment of insulin signaling pathway PI3K/Akt/mTOR and insulin resistance induced AGEs on diabetes mellitus and neurodegenerative diseases: a perspective review. *Molecular and cellular biochemistry*, 478(6), 1307–1324.
- Rasheed, Z. A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., Hong, S. M., Koorstra, J. B., Rajeshkumar, N. V., He, X., Goggins, M., Iacobuzio-Donahue, C., Berman, D. M., Laheru, D., Jimeno, A., Hidalgo, M., Maitra, A., & Matsui, W., 2010, Prognostic

significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(5), 340–351.

Ray, K. C., Bell, K. M., Yan, J., Gu, G., Chung, C. H., Washington, M. K., & Means, A. L., 2011, Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to Kras(G12D)-initiated tumorigenesis in a mouse model. *PloS one*, 6(2), e16786.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L., 2001, Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.

Ricci, E.P., Mure, F., Gruffat, H., Decimo, D., Medina-Palazon, C., Ohlmann, T., Manet, E., 2009, Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2, *Nucleic Acids Research*, 37(15), 4932-43.

Roshani, R., McCarthy, F., & Hagemann, T., 2014, Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. *Cancer letters*, 345(2), 157–163.

Russo, L., & Lumeng, C. N., 2018, Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*, 155(4), 407–417.

Safa A. R. 2020, Resistance to drugs and cell death in cancer stem cells (CSCs). *Journal of translational science*, 6(3), 341.

Schleger, C., Verbeke, C., Hildenbrand, R., Zentgraf, H., & Bleyl, U., 2002, c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 15(4), 462–469.

Seymour, P. A., Freude, K. K., Tran, M. N., Mayes, E. E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., & Sander, M., 2007, SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1865–1870.

Shi, G., DiRenzo, D., Qu, C., Barney, D., Miley, D., Konieczny, S. F., 2013, Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene*. Apr;32(15):1950–8

- Shi, J., & Xue, J., 2019, Inflammation and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chinese clinical oncology*, 8(2), 19.
- Shiozawa, Y., Nie, B., Pienta, K. J., Morgan, T. M., & Taichman, R. S., 2013, Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacology & therapeutics*, 138(2), 285–293.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A., 2021, Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(1), 7–33.
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Islam, N., Haribabu, Y., Alobaidi, R., Shalamzari, A., Graham, G., Kuo, L. W., Sykora, P., & Rosenthal, D. S., 2024, CD133 Stimulates Cell Proliferation via the Upregulation of Amphiregulin in Melanoma. *Cells*, 13(9), 777.
- Song, K., Dai, L., Long, X., Cui, X., Liu, Y., & Di, W., 2019, Sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 displays anti-epithelial ovarian cancer activities in vitro and in vivo. *OncoTargets and therapy*, 12, 4437–4449.
- Sorolla, A., Wang, E., Golden, E., Duffy, C., Henriques, S. T., Redfern, A. D., & Blancafort, P., 2020, Precision medicine by designer interference peptides: applications in oncology and molecular therapeutics. *Oncogene*, 39(6), 1167–1184.
- Sosa, M. S., Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J. A., 2014, Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature reviews. Cancer*, 14(9), 611–622.
- Stachelscheid, H., Urbaniak, T., Ring, A., Spengler, B., Gerlach, J. C., & Zeilinger, K., 2009, Isolation and characterization of adult human liver progenitors from ischemic liver tissue derived from therapeutic hepatectomies. *Tissue engineering. Part A*, 15(7), 1633–1643.
- Sterneck, E., Poria, D. K., & Balamurugan, K., 2020, Slug and E-Cadherin: Stealth Accomplices?. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 138.
- Storz P. 2017, Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 14(5), 296–304.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q., 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*, 14, 48.

- Sullivan, N. J., Sasser, A. K., Axel, A. E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T. M., & Hall, B. M., 2009 Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*, 28(33), 2940–2947.
- Sun, Y., Lai, X., Yu, Y., Li, J., Cao, L., Lin, W., Huang, C., Liao, J., Chen, W., Li, C., Yang, C., Ying, M., Chen, Q., & Ye, Y., 2019, Inhibitor of DNA binding 1 (Id1) mediates stemness of colorectal cancer cells through the Id1-c-Myc-PLAC8 axis via the Wnt/ β -catenin and Shh signaling pathways. *Cancer management and research*, 11, 6855–6869.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F., 2021, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. Feb 4.
- Suzuki, A., Nakauchi, H., & Taniguchi, H., 2004, Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes*, 53(8), 2143–2152.
- Swain, N., Thakur, M., Pathak, J., & Swain, B., 2020, SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 24(2), 368–373.
- Swaroop, J. J., Rajarajeswari, D., & Naidu, J. N., 2012, Association of TNF α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *The Indian journal of medical research*, 135(1), 127–130.
- Talukdar, J., Srivastava, T. P., Sahoo, O. S., Karmakar, A., Rai A. K., Sarma, A., Gogoi, G., Alqatani, M. S., Dhar, R., Karmakar S., 2023, Cancer stem cells: signaling pathways and therapeutic targeting. *MedComm – Oncology*. 2:e62.
- Thiery J. P., 2002, Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer*, 2(6), 442–454.
- Toledo, F. G. S., Chari, S., & Yadav, D., 2021, Understanding the Contribution of Insulin Resistance to the Risk of Pancreatic Cancer. *The American journal of gastroenterology*, 116(4), 669–670.

- Tonini, V., & Zanni, M., 2021, Pancreatic cancer in 2021: What you need to know to win. *World journal of gastroenterology*, 27(35), 5851–5889.
- Trajkovic-Arsic, M., Kalideris, E., & Siveke, J. T., 2013, The role of insulin and IGF system in pancreatic cancer. *Journal of molecular endocrinology*, 50(3), R67–R74.
- Trusolino, L., Bertotti, A., Comoglio, P. M., 2010, MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.*11:834–48.
- Vasefifar, P., Motafakkerzad, R., Maleki, L. A., Najafi, S., Ghrobaninezhad, F., Najafzadeh, B., Alemohammad, H., Amini, M., Baghbanzadeh, A., & Baradaran, B., 2022, Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression. *Gene*, 827, 146448.
- Wang, B, Trayhurn, P., 2006, Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflügers Archiv.* 452:418-427.
- Wang, G., Yin, L., Peng, Y., Gao, Y., Gao, H., Zhang, J., Lv, N., Miao, Y., & Lu, Z., 2019, Insulin promotes invasion and migration of KRASG12D mutant HPNE cells by upregulating MMP-2 gelatinolytic activity via ERK- and PI3K-dependent signalling. *Cell proliferation*, 52(3), e12575.
- Wang, L., Zhang, B., Zheng, W., Kang, M., Chen, Q., Qin, W., Li, C., Zhang, Y., Shao, Y., & Wu, Y., 2017, Exosomes derived from pancreatic cancer cells induce insulin resistance in C2C12 myotube cells through the PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *Scientific reports*, 7(1), 5384.
- Wang, L., Zuo, X., Xie, K., & Wei, D., 2018, The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1692, 31–42.
- Wang, M., Li, J., Lim, G. E., & Johnson, J. D., 2013, Is dynamic autocrine insulin signaling possible? A mathematical model predicts picomolar concentrations of extracellular monomeric insulin within human pancreatic islets. *PloS one*, 8(6), e64860.

- Wei, Y., Li, Y., Chen, Y., Liu, P., Huang, S., Zhang, Y., Sun, Y., Wu, Z., Hu, M., Wu, Q., Wu, H., Liu, F., She, T., & Ning, Z., 2022, ALDH1: A potential therapeutic target for cancer stem cells in solid tumors. *Frontiers in oncology*, 12, 1026278.
- Wu, K., Chen, H., Fu, Y., Cao, X., & Yu, C., 2023, Insulin promotes the proliferation and migration of pancreatic cancer cells by up-regulating the expression of PLK1 through the PI3K/AKT pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 648, 21–27.
- Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., & Moses, H. L., 2004, Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 6(5), 603–610.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H., 2003, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1821–1830.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H., 2003, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1821–1830.
- Yaghobi, Z., Movassaghpour, A., Talebi, M., Abdoli Shadbad, M., Hajiasgharzadeh, K., Pourvahdani, S., & Baradaran, B., 2021, The role of CD44 in cancer chemoresistance: A concise review. *European journal of pharmacology*, 903, 174147.
- Yako, Y. Y., Kruger, D., Smith, M., & Brand, M., 2016, Cytokines as Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Systematic Review. *PloS one*, 11(5), e0154016.
- Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, J. A., Qin, H., & Benveniste, E. N., 2018, Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 189, 4–13.

- Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., & Cui, H., 2020, Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 8.
- Yao, C., Su, L., Shan, J., Zhu, C., Liu, L., Liu, C., Xu, Y., Yang, Z., Bian, X., Shao, J., Li, J., Lai, M., Shen, J., & Qian, C., 2016, IGF/STAT3/NANOG/Slug Signaling Axis Simultaneously Controls Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness Maintenance in Colorectal Cancer. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 34(4), 820–831.
- Yu, H., & Rohan, T., 2000, Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(18), 1472–1489.
- Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R., 2009, STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews. Cancer*, 9(11), 798–809.
- Yu, J., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ishikawa, N., Ogura, Y., Yamada, D., Egami, T., Fujita, H., Ohashi, S., Nagai, E., & Tanaka, M., 2006, Overexpression of c-met in the early stage of pancreatic carcinogenesis; altered expression is not sufficient for progression from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 12(24), 3878–3882.
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G., 2012, Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(12), 2144–2151.
- Zabolotny, J. M., Kim, Y. B., Welsh, L. A., Kershaw, E. E., Neel, B. G., & Kahn, B. B., 2008, Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 283(21), 14230–14241.
- Zapata, M., Cohen, C., & Siddiqui, M. T., 2007, Immunohistochemical expression of SMAD4, CK19, and CA19-9 in fine needle aspiration samples of pancreatic adenocarcinoma: Utility and potential role. *CytoJournal*, 4, 13.
- Zhang A. M. Y., Wellberg E. A., Kopp J. L., Johnson J. D., 2021, Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer. *Diabetes Metab. J.* 45 (3), 285–311.

- Zhang, A. M. Y., Xia, Y. H., Lin, J. S. H., Chu, K. H., Wang, W. C. K., Ruitter, T. J. J., Yang, J. C. C., Chen, N., Chhuor, J., Patil, S., Cen, H. H., Rideout, E. J., Richard, V. R., Schaeffer, D. F., Zahedi, R. P., Borchers, C. H., Johnson, J. D., & Kopp, J. L., 2023, Hyperinsulinemia acts via acinar insulin receptors to initiate pancreatic cancer by increasing digestive enzyme production and inflammation. *Cell metabolism*, 35(12), 2119–2135.e5.
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H. C., Matei, D., Schilder, J. M., Yan, P. S., Huang, T. H., & Nephew, K. P., 2008, Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer research*, 68(11), 4311–4320.
- Zhang, X., Hu, F., Yang, X., and Liu, L., 2018, Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Cell Death Dis.* 9 (2), 25.
- Zhao, H., Yan, C., Hu, Y., Mu, L., Huang, K., Li, Q. ... Qin, J., 2019, Sphere-forming assay vs. organoid culture: Determining long-term stemness and the chemoresistant capacity of primary colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology*, 54, 893-904.
- Zhou X, Wang G, Sun Y., 2015, A Reliable Parameter to Standardize the Scoring of Stem Cell Spheres. *PLOS ONE* 10(5): e0127348.
- Zhou, J. Y., Chen, M., Ma, L., Wang, X., Chen, Y. G., & Liu, S. L., 2016, Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget*, 7(7), 7657–7666.
- Zhou, P., Li, B., Liu, F., Zhang, M., Wang, Q., Liu, Y., Yao, Y., & Li, D., 2017, The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Molecular cancer*, 16(1), 52
- Zhu, L., Shi, G., Schmidt, C. M., Hruban, R. H., & Konieczny, S. F., 2007 Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American journal of pathology*, 171(1), 263–273.

Zhuo, J, Wang, X., 2019, Combination of targeting CD24 and inhibiting autophagy suppresses the proliferation and enhances the apoptosis of colorectal cancer clls. *Mol Med Rep.* 20:539–48.

Zhuo, J., Lu, D., Lin, Z., Yang, X., Yang, M., Wang, J., Tao, Y., Wen, X., Li, H., Lian, Z., Cen, B., Dong, S., Wei, X., Xie, H., Zheng, S., Shen, Y., & Xu, X., 2021, The distinct responsiveness of cytokeratin 19-positive hepatocellular carcinoma to regorafenib. *Cell death & disease*, 12(12), 1084.

Zimmermann, M., Meyer, N., 2011. Annexin V/7-AAD Staining in Keratinocytes. In: Stoddart, M. (eds) *Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology*, vol 740. Humana Press. sf. 57–63

EKLER

|



ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler | |
|------------------|--|
| Adı Soyadı | Sinem KARAKUŞ |
| Doğum Yeri | |
| Doğum Tarihi | Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz. |
| Uyruğu | <input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer: |
| E-Posta Adresi | |
| Web Adresi | |

| Eğitim Bilgileri | |
|------------------|-------------------------------|
| Lisans | |
| Üniversite | Eskişehir Teknik Üniversitesi |
| Fakülte | Fen Fakültesi |
| Bölümü | Biyoloji |
| Mezuniyet Yılı | 01.10.2021 |

| Yüksek Lisans | |
|---------------|-------------------------|
| Üniversite | İstanbul Üniversitesi |
| Enstitü Adı | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Biyoloji |
| Programı | Moleküler Biyoloji |

| Doktora | |
|---------------|-------------------------|
| Üniversite | İstanbul Üniversitesi |
| Enstitü Adı | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Anabilim Dalı Adı |
| Programı | Program Adı |

| Makale ve Bildiriler | |
|----------------------|--|
| | |