

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**PANKREATİK KANSERDE SUSTURULAN CA9 VE TSPAN8
GENLERİNİN ETKİLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MERVE KARAMAN

BALIKESİR, HAZİRAN - 2018

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**PANKREATİK KANSERDE SUSTURULAN CA9 VE TSPAN8
GENLERİNİN ETKİLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MERVE KARAMAN

**Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Hatice YILDIRIM (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
Prof.Dr. Feray KÖÇKAR
Prof.Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
Doç. Dr. Aylin ER**

BALIKESİR, HAZİRAN - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

MERVE KARAMAN tarafından hazırlanan “**PANKREATİK KANSERDE SUSTURULAN CA9 VE TSPAN8 GENLERİNİN ETKİLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* OLARAK ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28.06.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

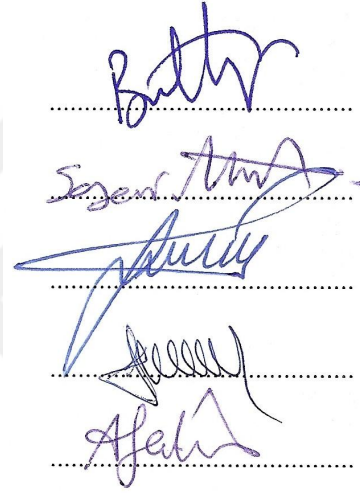
Danışman
Doç.Dr. Hatice YILDIRIM

Üye
Prof.Dr. Sezai TÜRKEK

Üye
Prof.Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof.Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Üye
Doç.Dr. Aylın ER



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK (COST) tarafından 113T075 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

PANKREATİK KANSERDE SUSTURULAN CA9 VE TSPAN8 GENLERİNİN ETKİLERİNİN *IN VITRO* VE *IN VIVO* OLARAK ARAŞTIRILMASI DOKTORA TEZİ

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR. HATİCE YILDIRIM)

BALIKESİR, HAZİRAN – 2018

Pankreas kanseri, özellikle erken tanı eksikliği, agresif davranışı ve mevcut tedavi seçeneklerine direnç nedeniyle önemli bir sağlık problemidir. Hastaların %95'inde ölüme neden olmaktadır ve son yıllarda görülme sıklığı giderek artmaktadır. Tetraspanin 8 (TSPAN8), pankreas kanseri dâhil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde aşırı eksprese olduğu ve birçok kanser türünün metastazında ve invazyonunda rol aldığı bildirilen tetraspanin ailesinin üyesidir. CO₂ ile karbonat arasındaki dengeyi katalize ederek özellikle katı tümörlerde asit-baz homeostazında önemli bir rol oynayan ve karbonik anhidraz ailesinin üyesi olan Karbonik anhidraz 9 (CA9) geninin de birçok kanser tipinde artan ekspresyonu gösterilmiştir. Tümörlerde kötü prognozun göstergesi olan hipoksik koşullarda CA9 ekspresyonu daha da artış göstermektedir. Bu tezin amacı, CA9 ve TSPAN8 genlerinin hücresel düzeydeki ve tümör gelişimindeki etkisini araştırmaktır.

Tez kapsamında, pankreatik kanser hücrelerinde CA9 ve TSPAN8'in endojen ekspresyonunu geçici olarak susturmak için siRNA kullanıldı. CA9 ve TSPAN8 genlerinin siRNA kullanılarak susturulması, hipoksik ve normoksik koşullar altında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinin hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu, migrasyon ve invazyon yeteneklerini azalttı. CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının apoptotik ve otofajik hücresel ölüm yollarına etkileri belirlendi.

CD-1 nude farelerde Panc-1 hücreleri ile oluşturulan ksenograft tümör modelinde sistemik olarak uygulanan lipozomal TSPAN8 siRNA uygulamasının tümör hacminin küçülmesine neden olduğu belirlendi. Liposomal siRNA uygulamasının tümör dokusundaki etkileri histolojik boyamalarla ve apoptozla ilişkili protein seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi ise ELİSA yöntemi ile yapıldı. Liposomal TSPAN8 siRNA uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda bağ doku oluşumunda artışa neden olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızın sonuçları, CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pankreatik kanserde potansiyel tedavi edici etkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

ANAHTAR KELİMELELER: Pankreas kanseri, CA9, TSPAN8

ABSTRACT

EFFECTS OF CA9 AND TSPAN8 GENE SILENCING IN PANCREATIC CANCER, AN *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDY

PH.D THESIS

MERVE KARAMAN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. HATİCE YILDIRIM)

BALIKESİR, JUNE 2018

Pancreatic cancer is an important health problem, especially due to lack of early diagnosis, aggressive behavior and resistance to existing treatment options. It also causes death in 95% of patients and the incidence is increasing in last decades. Tetraspanin 8 (TSPAN8) is a member of the tetraspanin family that is overexpressed in a variety of cancer types, including pancreatic cancer, and is reported to play a role in metastasis and invasion of many cancers. Carbonic anhydrase 9 (CA9) is expressed in solid tumors in response to hypoxia and plays an important role in tumor acid-base homeostasis by catalyzing the balance between CO₂ and carbonate. Hypoxia is considered a sign of poor prognosis in tumors. The aim of this thesis is to investigate the effects of CA9 and TSPAN8 genes on cellular and tumor development.

In this study, siRNA was used to temporarily silence the endogenous expression of CA9 and TSPAN8 in pancreatic cancer cells. The silencing of CA9 and TSPAN8 genes using siRNA showed that Panc-1 and MiaPaca-2 cells growing under hypoxic and normoxic conditions reduced cell proliferation, colony formation, migration, and invasion ability. The effects of silencing of CA9 and TSPAN8 genes on apoptotic and autophagic cellular death pathways were determined.

It was determined that the systemic application of liposomal TSPAN8 siRNA in the xenograft tumor model generated by Panc-1 cells in CD-1 nude mice caused the tumor volume to shrink. The effects of liposomal siRNA in tumor tissue were determined by histological staining and the changes in apoptosis-related protein levels were determined by ELISA method. When compared with the control group of liposomal TSPAN8 siRNA application, there was an increase in connective tissue formation in tumor tissue.

The results of the study suggest that silencing CA9 and TSPAN8 genes may be the potential therapeutic effect of pancreatic cancer.

KEYWORDS: Pancreatic cancer, CA9, TSPAN8

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SEMBOL LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser ve Karsinogenez Süreci.....	2
1.2 Hipoksiya.....	5
1.3 Pankreas Kanseri	7
1.4 Pankreatik Kanselerde Moleküler Düzeydeki Değişimler.....	11
1.5 Pankreas Kanseri Hayvan Modelleri	13
1.6 Karbonik Anhidraz Gen Ailesi.....	14
1.7 Karbonik Anhidraz 9 (CA9, CAIX).....	17
1.8 Tetraspanin Gen Ailesi.....	21
1.9 Tetraspanin 8 (TSPAN8).....	22
1.10 Tezin Amacı	25
2. MALZEME VE YÖNTEM	26
2.1 Kullanılan Malzemeler	26
2.1.1 Çalışmada kullanılan gereçler.....	26
2.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler.....	27
2.2 Çalışmada kullanılan çözeltiler	29
2.2.1.1 Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler.....	29
2.2.1.2 DNA ile ilgili tekniklerde kullanılan çözeltiler.....	30
2.2.1.3 RNA ile ilgili tekniklerde kullanılan çözeltiler.....	30
2.2.1.4 Protein ile ilgili çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	31
2.2.1.5 <i>İn vivo</i> çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	32
2.3 Kullanılan Yöntemler	33
2.3.1 <i>In Vitro</i> Teknikler	33
2.3.1.1 Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması	33
2.3.1.2 Canlı hücrelerin belirlenmesi ve hücre sayımı.....	33
2.3.1.3 Hipoksik ortam oluşturulması	33
2.3.1.4 siRNA transfeksiyonu	34
2.3.1.5 Sitotoksosite deneyi (MTT testi).....	34
2.3.1.6 Hücre canlılığının flow sitometri ile tespit edilmesi	34
2.3.1.7 Klonojenik yöntem.....	35
2.3.1.8 Hücre invazyon yöntemi	35
2.3.1.9 Migrasyon yöntemi (Scratch deneyi).....	36
2.3.1.10 RNA izolasyonu	36
2.3.1.11 RNA jel elektroforezi ve RNA miktar tayini	36
2.3.1.12 Polimeraz zincir reaksiyonları ile cDNA sentezi.....	37
2.3.1.13 Real Time-PCR analizi	37
2.3.1.14 Western Blot.....	40
2.3.1.15 İmunofloresans yöntemi.....	41
2.3.1.16 Flow sitometri ile protein analizi	42

2.3.1.17	siRNA ve kemoterapi ajanlarının beraber uygulanması	42
2.3.2	<i>In Vivo</i> Teknikler	43
2.3.2.1	Farelerin bakımı	43
2.3.2.2	Pankreas kanser modeli oluşturulması	43
2.3.2.3	Lipozomal siRNA'nın hazırlanması	43
2.3.2.4	Lipozomal siRNA'ların uygulanması	44
2.3.2.5	Farelerin sakrifikasyonu ve dokuların elde edilmesi	45
2.3.2.6	Tümör dokusunun histolojik olarak incelenmesi	45
2.3.2.7	Tümör dokuları için ELISA yöntemi	45
2.3.2.8	Tümör dokuları için DNA fragmentasyonu	46
2.3.2.9	Tümör dokularından RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve realtime PCR analizi	46
3.	BULGULAR	47
3.1	Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında CA9 ve TSPAN8 Genlerinin İfadesinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi	47
3.2	Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda CA9 Protein Seviyesindeki Değişimin Western Blot İle Belirlenmesi	52
3.1	Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda TSPAN8 Protein Seviyesindeki Değişimin Western Blot ile Belirlenmesi	53
3.2	Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulması	56
3.3	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Pankreas Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonu ve Canlılığı Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi	65
3.4	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Kapasitesine Olan Etkisinin Belirlenmesi	68
3.5	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinin İnvaziv Karakterlerine Etkisinin Belirlenmesi	71
3.6	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinin <i>In Vitro</i> Migrasyon Özelliklerine Etkisinin Belirlenmesi	75
3.7	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulması ve Apoptoz ile İlişkisinin Belirlenmesi	81
3.7.1	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Apoptoz İlişkili Genlere Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi	81
3.7.2	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Apoptoz İlişkili Proteinlere Etkilerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi	86
3.8	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulması ve Otofaji ile İlişkisinin Belirlenmesi	95
3.8.1	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Otofaji İlişkili Genlere Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi	95
3.8.2	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Otofaji İlişkili Proteinlere Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi	100
3.8.3	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Otofajiye Etkisinin Akridine Orange ile İmmünofloresans Olarak Gösterilmesi	103

3.9	CA9 ve TSPAN8 genlerinin siRNA ile Susturulmasının Kemoterapi Ajanlarıyla Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	108
3.10	Farelerde Tümör Oluşturulması ve Tedavisi	113
3.10.1	Farelerde Pankreas Kanser Modeli Oluşturulması	113
3.10.2	Pankreatik Tümör Modelinin Oluşturulması ve Grupların Belirlenmesi	115
3.10.3	CA9 ve TSPAN8 siRNA'nın <i>invivo</i> transfeksiyonu	116
3.10.4	Farelerde Oluşan Tümörün Büyüklüğünün Belirlenmesi	117
3.10.5	CA9 ve TSPAN8 <i>invivo</i> susturulmasının mRNA seviyesinde belirlenmesi	123
3.10.6	CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Tümör Dokularındaki Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi	124
3.10.7	Tümör Dokularında CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Apoptoz ile İlişkili Bazı Proteinlere Etkisinin Belirlenmesi	127
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	130
5.	KAYNAKLAR	146
6.	EKLER	172

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Hipoksiya ve normoksiyada HIF-1 α geninin regülasyonu.....	6
Şekil 1.2: Pankreas anatomik yapısı ve hücre çeşitleri.....	8
Şekil 1.3: Pankreas kanseri evrelerinde moleküler yollar.....	10
Şekil 1.4: CA9 proteinin 3 boyutlu yapısı	18
Şekil 1.5: CA9'un hücredeki görevi.....	20
Şekil 1.6: Tetraspanin proteininin şematik gösterimi	21
Şekil 1.7: TSPAN8 proteininin hücredeki konumu	23
Şekil 2.1: Liposomal siRNA hazırlanması	44
Şekil 3.1: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen RNA jel görüntüsü.....	47
Şekil 3.2: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen cDNA'nın kalitesinin kontrol edilmesi amacıyla yapılan insan- β -2-mikroglobulin PCR sonucu jel görüntüsü.....	48
Şekil 3.3: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında CA9 ve TSPAN8 mRNA seviyeleri.	48
Şekil 3.4: 0h (kontrol) 8h, 16h ve 24h CoCl ₂ ile indüklenen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen RNA'ların jel görüntüsü.	49
Şekil 3.5: 0h (kontrol) 8h, 16h ve 24h CoCl ₂ ile indüklenen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen cDNA'nın kalitesinin kontrol edilmesi amacıyla yapılan insan- β 2-mikroglobulin PCR sonucu jel görüntüsü.....	49
Şekil 3.6: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile indüklenen Panc-1 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1 α mRNA seviyesi.	50
Şekil 3.7: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile indüklenen Panc-1 hücrelerinde hipoksik koşullarda CA9 mRNA seviyesi. ...	50
Şekil 3.8: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile indüklenen Panc-1 hücrelerinde hipoksik koşullarda TSPAN8 mRNA seviyesi.	50
Şekil 3.9: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile indüklenen MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1 α mRNA seviyesi.	51
Şekil 3.10: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile indüklenen MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullarda CA9 mRNA seviyesi.	51
Şekil 3.11: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile indüklenen MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullarda TSPAN8 mRNA seviyesi.	51
Şekil 3.12: Panc-1 hücre hattında 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki CA9 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.....	52
Şekil 3.13: Miapaca 2 hücre hattında 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki CA9 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.	53

Şekil 3.14: %10 SDS jel kullanılarak ıslak sistemde +4C’de bir gece transferden sonra jein coomasie blue boyama görüntüsü ve membranın poncau ile boyanması (M. Marker).....	54
Şekil 3.15: %15 jel kullanılmış ve ıslak +4C’de bir gece (O/N) sistemle transfer edilmiş örneklerin poncau ile boyanması ve membranın TSPAN8 ile işaretlenmesi.	54
Şekil 3.16: %15 jel kullanılmış ve yarı ıslak transblot sistemle transfer edilmiş örneklerin poncau ile boyanması ve membranın TSPAN8 ile işaretlenmesi.	55
Şekil 3.17: Panc-1 hücre hattında 0saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24saat CoCl ₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki TSPAN8 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.	56
Şekil 3.18: Miapaca 2 hücre hattında 0saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl ₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki TSPAN8 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.....	56
Şekil 3.19: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 siRNA optimizasyon çalışması.	57
Şekil 3.20: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında TSPAN8 siRNA optimizasyon çalışması.	58
Şekil 3.21: MiaPaca-2 hücre hattında 100 nM konsantrasyonda siRNA kullanılarak CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması sonucu protein analizi.	58
Şekil 3.22: Panc-1 hücrelerinde normal oksijen koşullarında CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.	59
Şekil 3.23: Panc-1 hücrelerinde hipoksiyada CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.	60
Şekil 3.24: MiaPaca-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.	61
Şekil 3.25: MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksiyada CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.	62
Şekil 3.26: siRNA uygulanmış Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen cDNAnın kalitesinin kontrol edilmesi amacıyla yapılan insan-β-2 mikroglobilin PCR sonucu jel görüntüsü.....	63
Şekil 3.27: Panc-1 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından CA9 mRNA seviyesinin gösterilmesi.....	63
Şekil 3.28: Panc-1 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından TSPAN8 mRNA seviyesinin gösterilmesi.	64
Şekil 3.29: MiaPaca-2 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından CA9 mRNA seviyesinin gösterilmesi.	64
Şekil 3.30: MiaPaca-2 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından TSPAN8 mRNA seviyesinin gösterilmesi.	64
Şekil 3.31: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	65
Şekil 3.32: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	66

Şekil 3.33: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	66
Şekil 3.34: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	66
Şekil 3.35: Panc-1 hücre hattında siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki etkinin Viacount ile belirlenmesi.	67
Şekil 3.36: MiaPaca-2 hücre hattında siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki etkinin Viacount ile belirlenmesi.	67
Şekil 3.37: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan koloni formasyon testi sonucu.....	68
Şekil 3.38: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan koloni formasyon testi sonucu.....	69
Şekil 3.39: Panc-1 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda oluşan koloni sayısı.....	69
Şekil 3.40: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan koloni formasyon testi sonucu.....	70
Şekil 3.41: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan koloni formasyon testi sonucu.....	70
Şekil 3.42: MiaPaca-2 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda oluşan koloni sayısı.....	71
Şekil 3.43: Panc-1 hücre hattında normal koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.	72
Şekil 3.44: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.	72
Şekil 3.45: Panc-1 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin invazyon kapasitesi.....	73
Şekil 3.46: MiaPaca-2 hücre hattında normal koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.	73
Şekil 3.47: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.	74
Şekil 3.48: MiaPaca-2 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin invazyon kapasitesi.	74
Şekil 3.49: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan migrasyon testinin görüntüsü	76
Şekil 3.50: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan migrasyon testinin görüntüsü	77
Şekil 3.51: Panc-1 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin migrasyon kapasitesi.....	78
Şekil 3.52: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan migrasyon testinin görüntüsü.	79
Şekil 3.53: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan migrasyon testinin görüntüsü.	80
Şekil 3.54: MiaPaca-2 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin migrasyon kapasitesi.	81
Şekil 3.55: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	82

Şekil 3.56: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	83
Şekil 3.57: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	84
Şekil 3.58: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	85
Şekil 3.59: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	87
Şekil 3.60: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	88
Şekil 3.61: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	89
Şekil 3.62: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	90
Şekil 3.63: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	91
Şekil 3.64: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	92
Şekil 3.65: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	93
Şekil 3.66: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.	94
Şekil 3.67: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	96
Şekil 3.68: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	97
Şekil 3.69: Miapaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	98
Şekil 3.70: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	99
Şekil 3.71: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.	100

Şekil 3.72: Panc-1 hücre hattında hipoksiyada CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.	101
Şekil 3.73: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.	102
Şekil 3.74: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksiyada CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.	102
Şekil 3.75: Panc-1 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3-II ve LC3-I protein seviyesinin oranındaki değişimin belirlenmesi.	103
Şekil 3.76: MiaPaca-2 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3-II ve LC3-I protein seviyesinin oranındaki değişimin belirlenmesi.	103
Şekil 3.77: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridine orange ile boyanması.	104
Şekil 3.78: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridin orange ile boyanması.	105
Şekil 3.79: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridin orange ile boyanması.	106
Şekil 3.80: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridin orange ile boyanması.	107
Şekil 3.81: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	108
Şekil 3.82: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	109
Şekil 3.83: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	109
Şekil 3.84: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.	109
Şekil 3.85: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında Cisplatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	110
Şekil 3.86: Panc-1 hücre hattında hipoksiyada Cispatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	111
Şekil 3.87: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında Cispatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	111
Şekil 3.88: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksiyada Cispatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	111

Şekil 3.89: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	112
Şekil 3.90: Panc-1 hücre hattında hipoksiyada Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	112
Şekil 3.91: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulama sının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	112
Şekil 3.92: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksiyada Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.	113
Şekil 3.93: Farelerde tümör modeli oluşturmak için Intraperitoneal (IP) yöntemle Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinin uygulanması.	114
Şekil 3.94: Balb/c ve CD-1 nude farelerde IP ve SC yöntemi kullanılarak yapılan hücre sayısı optimizasyonu.	115
Şekil 3.95: CD-1 fare soyundan deneklere Panc-1 hücreleri subcutan enjekte edildikten 4 hafta sonra tümör oluşumu gözlenen bireylerden bazılarının fotoğrafı.	116
Şekil 3.96: Farelerin ilk ve son günlük ağırlıklarının karşılaştırılması.	117
Şekil 3.97: NT gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.	118
Şekil 3.98: Kontrol siRNA uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.	119
Şekil 3.99: CA9 siRNA uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.	120
Şekil 3.100: TSPAN8 siRNA uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.	121
Şekil 3.101: Gemstabine uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümör lerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.	122
Şekil 3.102: Farelerden çıkarılan tümörlerin büyüklüklerinin karşılaştırılması.	123
Şekil 3.103: CA9 siRNA transfeksyonu sonrası tümör dokusundaki CA9 mRNA seviyesindeki değişimin Realtime PCR ile belirlenmesi.	124
Şekil 3.104: TSPAN8 siRNA transfeksyonu sonrası tümör dokusundaki TSPAN8 mRNA seviyesindeki değişimin Realtime PCR ile belirlenmesi.	124
Şekil 3.105: Fare tümörlerinden elde edilen örnekler ile HE (a, c, e, g, i) ve TUNEL (b, d, f, h, j) boyamalı preparatlar.	126
Şekil 3.106: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Bcl-2 protein seviyesinin ELİSA analizi ile belirlenmesi.	127
Şekil 3.107: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Galektin 3 protein seviyesinin ELİSA analizi ile belirlenmesi.	128
Şekil 3.108: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Kaspaz 8 protein seviyesinin ELİSA analizi ile belirlenmesi.	128

Şekil 3.109: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Kaspaz 9 protein seviyesinin ELİSA analizi ile belirlenmesi.	129
Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci	172
Şekil 6.2: RNA büyüklük belirteci	173
Şekil 6.3: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci	174



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	26
Tablo 2.2: Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler.....	27
Tablo 2.3: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler	27
Tablo 2.4: Protein çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler	28
Tablo 2.5: <i>In vivo</i> çalışmalarda kullanılan kimyasallar.....	28
Tablo 2.6: Hücre Pasajlamada kullanılan çözeltiler.....	29
Tablo 2.7: siRNA transfeksiyonunda kullanılan çözeltiler	29
Tablo 2.8: Sitotoksisite deneylerinde kullanılan çözeltiler	29
Tablo 2.9: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	30
Tablo 2.10: PCR reaksiyonunda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	30
Tablo 2.11: RNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	30
Tablo 2.12: RIPA buffer hazırlanması	31
Tablo 2.13: Western Blot tekniğinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	31
Tablo 2.14: İmmünofloresan yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.....	32
Tablo 2.15: Flowsitometri yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.....	32
Tablo 2.16: <i>In vivo</i> çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.....	32
Tablo 2.17: Kullanılan primerlerin bilgileri.....	37
Tablo 2.18: Apoptotik primerler	38
Tablo 2.19: Otofajik primerler	38
Tablo 2.20: CA9, TSPAN8 ve insan- β -2 mikroglobilin primerleri ile yapılan realtime PCR koşulları	39
Tablo 2.21: Apoptoz ilişkili Bax, Bak, Bcl-2 ve Bcl-xl genler için kullanılan Real time PCR koşulları.....	39
Tablo 2.22: Apoptoz ilişkili Siklin D ve p 27 genleri için kullanılan Real time PCR koşulları	39
Tablo 2.23: Otofaji ilişkili genler için kullanılan Real time PCR koşulları.....	40
Tablo 3.1: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde Bcl-2 ve Bax proteinlerinin floresans ışınma değerleri.....	95
Tablo 3.2: Deneysel olarak tümör modelinin oluşturulması ve grupların belirlenmesi.	116
Tablo 3.3: Farklı deney gruplarından elde edilen preparatların TUNEL analizi sonucu elde edilen Apoptotik İndekslerin karşılaştırılması	126

SEMBOL LİSTESİ

μ l	Mikrolitre
μ M	Mikro Molar
bç	Baz çifti
CA9	Karbonik anhidraz 9
cDNA	Komplementer DNA
ddNTP	Dideoksiribonükleozit Trifosfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGTA	Ethylene glycol tetracetic acid
EMT	Epiteliyal mezenkimal geçiş
FCS	Fetal Bovine Serum
HIF-1	Hipoksi-indüklenebilir faktör
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
ml	Mili Litre
mM	Mili Molar
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA interferans
siRNA	Küçük interferans RNA
TE	Tripsin Edta
TSPAN8	Tetraspanin 8
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VHL	von Hippel-Lindau proteini

ÖNSÖZ

Çalışmalar büyük oranda Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji A.D. araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bilimsel gelişimimi destekleyen, çalışmalarına yön veren, bana her konuda özveri ile katkıda bulunan, huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan, üzerimde büyük emeği bulunan danışman hocam Doç. Dr. Hatice Yıldırım'a;

Merak etmeye, sorgulamaya, çalışmaya ve araştırmaya teşvik eden, çalışmalarımız için laboratuvar olanağı sağlayan kıymetli hocam Prof. Dr. Feray Köçkar'a;

Çalışmalarımı destekleyen ve değerli katkıları bulunan tez izleme komitesi üyesi hocam Prof. Dr. Sezai Türkel'e;

Deneysel çalışmalarında destek veren ve hayatımda iyi ki tanıdım dediğim değerli hocam Dr.Öğr. Üyesi Fatma Bahar Sunay'a;

Bilgi ve deneyimlerini paylaşan, beraber çalışma fırsatı bulduğum hocam Dr. Esra Tokay'a;

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvar olanaklarını sunan hocam Prof. Dr. Mehmet Ünlü'ye;

Tez çalışmalarımı özveri ile izleyen ve nezaketi ile yanımda olan tez izleme komitesi üyesi hocam Doç. Dr. Aylin Er'e;

Maddi ve manevi destekleri için aileme;

Teşekkür ederim.

Merve KARAMAN

BALIKESİR, Haziran 2018.

ÖNSÖZ



1. GİRİŞ

Dünya sağlık örgütü (WHO) 2050 yılında dünya nüfusunun %16'sının kansere yakalanacağını ön görmektedir [1]. Kanser, günümüzde dünyadaki kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en önemli ölüm nedenidir [2]. Geçmişte de kanser insanların yaşamını etkileyen sağlık sorunu olmuştur. Kanser kelimesinin kökeni, Yunanca bir kelime olan Karkinos'dan gelmektedir ve Hipokrat tarafından (M.Ö. 460–370) diğer dokulardan farklı yapıları (vücut yüzeyinde büyüyen, kırmızı, ağrılı, sıcak) tanımlamak için kullanılmıştır [3]. 1858'de Rudolf Virchow'un insan kanser dokusuyla yaptığı çok sayıda histopatolojik deneylerine dayanarak “Reiztheorie” (tahriş kuramı) kurması kanser araştırmaları için bir dönüm noktası olmuştur [4]. 1911'de Peyton Rous, Rous sarcoma virüsünün tavuklarda bir tür kansere neden olduğunu keşfetti [5]. 1915'te, tavşanlarda deriye uygulanan kömür katranı ile ilk kez kanserin indüklenmesi gerçekleştirildi [6]. 20. yüzyılın ortalarına gelindiğinde, bilim adamları kanserin arkasındaki sorunları kimya ve biyolojinin yardımı ile çözmeye başladılar. Watson ve Crick, 1962'de deoksiribonükleik asit (DNA) sarmal yapısındaki çalışmaları ile fizyoloji/tıp Nobel ödülünü aldılar [7]. Bu keşiften sonra bilim insanları, genlerin nasıl işlediğini ve mutasyonlarla nasıl zarar görebileceklerini anladılar. Bilim insanları kansere kimyasalların (kanserojen), radyasyonun, virüslerin neden olabileceğini ve ayrıca kanser genlerinin atalarından miras kalabileceğini tespit etmişlerdir. Günümüzde 100'den fazla karsinojen (kimyasal, fiziksel ve biyolojik) tespit edildi. Çoğu karsinojenin DNA'ya zarar verdiği ve anormal hücre büyümesine yol açtığı bilinmektedir [8]. 1980'lerden günümüze kanser sürecinin anlaşılmasındaki kritik kavramlarda gelişmeler kaydedilmiştir. İlk ve en yaygın olarak kabul gören gelişme, tümör süpresör genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonlarının keşfidir [9]. Birçok çalışma, bu mutasyonların, onkogenlerin fonksiyon kazanımı ve tümör baskılayıcı genlerinin en az ikisinin fonksiyon kaybı ile kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını arttırdığı göstermiştir [10-12]. İkinci kritik gelişme, tümörün büyümeye devam etmesi için kan damarı büyümesini başlatması gerektiğinin keşfedilmesi. Bu gelişme, tümörlerin *in vivo* olarak onkogen aktivasyonunun veya tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunun sonucunda gelişen bir durum olduğu belirlendi. Bu durum vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) keşfiyle ve daha sonra kanser ilerlemesi ve mortalitesi ile ilişkisinin gösterilmesi ile kabul edilmiştir. [13]. Tümörlerdeki anjiyogenez gereksinimi, vasküler endotelyal hücrelerini hedeflemenin yeni bir terapötik strateji oluşturabileceğini düşündürmüştür. Bir anti-VEGF monoklonal antikör olan Bevacizumab, daha önce tedavi edilmesi tam olarak mümkün olmayan metastatik kolorektal kanserli hastalarda, tek başına kemoterapiye göre daha yüksek

sağkalım sağladığı klinik çalışmalarla belirlenmiştir [14]. Son yüzyılın üçüncü büyük kavramsal ilerlemesi kanser hücrelerinin metabolizmasının, normal hücrelerden çok farklı olduğu keşfidir. Kanser hücrelerinde metabolik aktivitelerin değişikliği malign özelliklerin edinilmesini ve korunmasını desteklediği belirlenmiştir [15]. Kanserdeki yeniden programlanmış metabolik yolun klasik örneği, Warburg etkisi veya aerobik glikolizdir [16]. Glikoliz, birçok kanser hücresi ve tümör türünde görülen, normal dokularda ise hipoksiye verilen fizyolojik bir yanıtıdır [17]. Otto Warburg 1920'lerde kanser hücrelerinin oksijen varlığından bağımsız olarak, temelde glikozu kullandığını ve laktat ürettiğini gözlemlemiştir. Özellikle metastatik kanser hücreleri ile glukoz alımında belirgin bir artış söz konusudur. Bu değişikliklere bağlı olarak, Metastatik kanser için başarılı yeni tedavi ve teşhisler bulunmaktadır. Örneğin, ¹⁸F-fluorodeoxyglucose (FDG) pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması, gizli metastazları tanımlamak için % 90'lık bir duyarlılığa sahip olan bir teşhis yöntemidir. Bu test, kanser hastalarının erken teşhisi üzerinde, büyük bir katkı sağlamıştır [18]. Dördüncü büyük kavramsal ilerleme, çok sayıda kanser hücresinin tümör dokusu oluştuğunda tümörün merkezinin aşırı derecede düşük oksijen konsantrasyonuna sahip hipoksi bölgeleri içerdiği ve bu tür intratümöral hipoksinin, hasta mortalitesine yol açan kanser ilerlemesi için önemli bir güç olduğunun keşfiydi [19]. Bu keşifler karsinogenez sürecini anlamak için moleküler temel sağlamıştır.

1.1 Kanser ve Karsinogenez Süreci

Kanser, kontrollü (benign) veya kontrolsüz (malign) hücre proliferasyonu ile karakterize edilen durumları kapsayan genel bir terimdir [2]. Malign tümör oluşumu; normal hücrelerin kontrollü hücre bölünmesi mekanizmalarından kaçması sonucu, kontrol edilemeyen şekilde çoğalması, enerji metabolizması farklılaşması ve komşu dokulara invazyon, angiogenez gibi karakteristik özelliklerin görüldüğü, immün sistemden kaçan, inflamatuvar mikroçevreye sahip, anormal hücrelere dönüşmesi şeklinde tanımlanabilir [3, 20].

Kanser oluşumunda karsinojen miktarı, karsinojen etkisinde kalma süresi, genetik yatkınlık ve uyarıcı etkenlerin varlığı en önemli etmenlerdir. Klinik ve deneysel veriler, bölünme süreci sırasında hücrenin, dinlenme (G_0) evresine göre karsinojenik faktörlere daha duyarlı olduğunu kanıtlamıştır. Bu veriler aynı zamanda onkojenik sürecin, artan hücresel aktiviteye sahip dokularda daha sık olduğunu göstermektedir [20].

Karsinogenez genellikle tek bir hücrenin bir dizi tümörijenik olay sonucunda malign transformasyona yol açtığı çok aşamalı bir süreç olarak kabul edilir. Karsinogenez teorileri; epigenetik ve genetik teoriler (Somatik mutasyon teorisi, doku organizasyonu alan teorisi, vb.), kanser kök hücre teorisi ve çok aşamalı kanser gelişimi teorisi olarak gruplandırılmaktadır. Günümüzde kabul edilen teori, çok aşamalı (multistage) teoridir. Çok aşamalı teoriye göre kanser, aynı hücre popülasyonunda farklı mutasyonlara sahip farklı hücrelerin bir kombinasyonu olarak görülebilir veya bir hücrede meydana gelen ardışık çok aşamalı değişiklikleri içerir [21].

Karsinogenez birçok farklı aşamalı ve değişik karsinojen faktörlerin (kimyasal, fiziksel ve viral) etkisiyle uzun bir sürede gerçekleşir [22]. Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik (onkogenler, antionkogenler vb) değişiklikler, konakçı doku faktörleri ve tümör-konakçı dokunun etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda bir tümör kitlesi ortaya çıkar [20].

Tümör büyümesi ilerledikçe yetersiz oksijen kaynağı nedeniyle vaskülerizasyon meydana gelen alanlar ortaya çıkar. Tümör mikroçevresindeki hipoksiya, çevre dokularda % 5'ten az oksijen ile tanımlanan bir durumdur, bu durumda gen ekspresyonu, metabolizma, genetik stabilite, proliferasyon ve hayatta kalma gibi değişiklikler de dâhil olmak üzere kanser hücresi davranışında ciddi değişiklikler görülür [23-25].

Tümör mikroçevresindeki düşük pH'a rağmen, kanser hücreleri büyümeye devam eder. Asidik ortam, normal hücreler ve tümör antijenlerini tanıyabilen immün hücreler için elverişsizdir. Hücre içi pH'ın azalması, ATP sentezinin bozulmasından, p53 aracılı apoptoza ve çeşitli proteinlerin alternatif yollardan kaspazların aktivasyonunun değişmesine kadar birçok önemli sonuca yol açar [26]. Ek olarak, düşük pH, kanser hücrelerinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunun artmasına neden olur böylece anjiyojenezi indüklenir [27, 28].

Hücrelerin etrafını saran, vücuda yayılan ve metastaz oluşturan hücrelere neden olan mutasyonlar ya da bir kanser hücresinin metastatik olması için hangi özellikleri elde edilmesi gerektiği tam olarak anlaşılammıştır. Bu konu hakkında çeşitli görüşler bulunmaktadır. Bir görüşe göre, vücuttaki kanser hücrelerinin metastaz yapabilmesinin, hücre bölünmesi kontrolünün yitirilmesi için gerekli olan mekanizmalardan daha fazla genetik değişiklik gerektirmediğidir. Daha yaygın olarak kabul edilen bir karşıt görüş, metastazın bir hücre için zor ve çok sayıda yeni mutasyona ihtiyaç duyan karmaşık bir durum olduğudur [29].

Karsinomlar için tümör ilerlemesini temsil eden iki aşamalı metastaz söz konusudur. İlk aşamada, tümör hücreleri köken aldığı epiteliumlarının normal sınırlarından kaçır ve lokal olarak invaziv hale gelir. İkinci aşamada, uzak bölgelere göç eder ve metastaz olarak bilinen süreçte koloniler oluşturmak için göç ettikleri dokuya yerleşirler [30, 31]. Lokal invazyon için, normal olarak epitel hücrelerini bir arada tutan mekanizmaların bozulması gerekir [30].

Bazı mide ve meme karsinomlarında, E-kadherin geni bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır [32, 33]. E-kadherin proteininin birincil işlevi, hücre-hücre adezyonudur, burada, epitel hücrelerini birbirine bağlamak için iki komşu plazma zarına gömülür. Bu adezyon molekülünü barındırmayan tümör hücreleri kültüre konulduğunda ve E-kadherin geni overekspres edildiği zaman, invaziv özelliklerinin bir kısmını yitirirler ve normal hücreler gibi hareketsiz hale gelmeye başlarlar [34-36]. Kanseri, özellikle invazyon için E-kadherin kaybını tercih edebilir [37].

Metastazın hangi aşamalarında hücrelerin değişim geçirdiği ve böylece ek mutasyonların edinildiğini keşfetmek için, bir floresan boya ile kanser hücrelerini etiketlenmiş ve canlı bir hayvanın dolaşımına enjekte edilmiş ve doku içindeki göçü izlenmiştir [38]. Bu deney sonucunda, birçok kanser hücresinin dolaşım boyunca hayatta kaldığı, küçük damarlara yerleştiği ve bunların metastatik veya metastatik olmayan bir tümörden köken alıp almadığına bakılmaksızın, çevreleyen dokuda geliştiği bulunmuştur. Bazı hücrelerin hemen öldüğü; bazılarının farklı dokuya girdiklerinde hayatta kaldığı, ancak büyümeyi başaramadığı; bazılarının ise birkaç kez bölündüğü ve sonra durduğu gözlemlenmiştir. Bu durum metastaz yeteneği olan hücrelerin, metastatik olmayan akrabalarını geride bırakarak, yabancı dokuda büyüebilmesinin hücrelerin metastatik hale gelmesi için edinmesi gereken bir anahtar özellik olduğu düşünülmektedir [38, 39].

Metastatik potansiyel sağlayan değişiklikleri keşfetmek için, son derece malign olan kanser hücrelerinde ifadesi artan genleri araştırmak için DNA mikrodizileri kullanılmıştır [40-42]. Bu mikroarrayler, bir seferde binlerce genin ifadesini belirlemeyi sağlar. Böyle bir çalışmada, yüksek metastatik potansiyele sahip insan ve fare melanoma hücreleri, zayıf metastatik özelliktekilerle karşılaştırılmıştır [43, 44]. Malign ve metastatik karakterdeki hücrelerde RhoC geninin aşırı ekspresyonu olduğu görülmüştür. RhoC, hücre hareketini düzenlediği bilinen bir gen ailesinin bir üyesidir. Hücrede aktin/miyozin kasılmasını teşvik eden bir protein sentezler. [43]. Bu tür metotların büyük ölçüde genişletilmiş kullanımı, insan genom dizisinin mevcudiyeti ile çok daha güçlü bir hale getirilmiştir [45, 46]. Gelecekte, tümör hücrelerinin metastaz yapmasına izin veren moleküler değişiklikler daha net ortaya çıkacaktır [47].

1.2 Hipoksiya

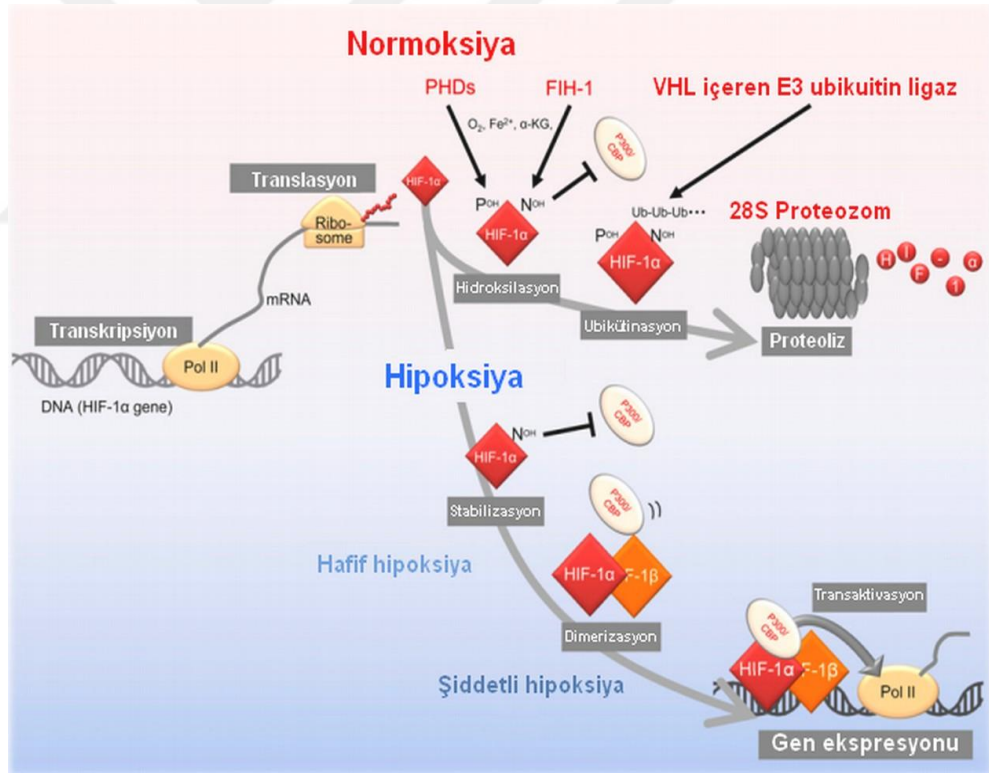
İntratümöral hipoksi, gen ekspresyonunu etkileyebilecek veya hücre ölümüne neden olabilecek kadar şiddetli olabilir ve ayrıca hayatta kalma yollarını aktive eden veya apoptotik yolları inaktive eden mutasyonları taşıyan tümör hücreleri için bir seçim uygulayabilir, bu da hücreleri hipoksiyle indüklenmiş ölümlere karşı dirençli hale getirir [19]. Gen ekspresyonundaki, doku oksijenasyonu üzerine tersine çevrilebilir olan hipoksiden kaynaklanan değişikliklerin aksine, mutasyonlar, başka bir genin yokluğunda bile korunabilecek olan kalıcı bir değişim ile sonuçlanabilir. Ayrıca, hücrelerin hipoksiye direnç kazanmasını sağlayan mutasyonlar, kemoterapi ve radyasyon terapisi de dâhil olmak üzere diğer apoptotik uyaranlara da direnç kazanmasını sağlayabilir [9, 24, 48].

HIF-1'in hipoksiye veya VHL aktivitesinin kaybına yanıt olarak glikoz ve enerji metabolizmasını yeniden programladığı mekanizmalar vardır [49]. İlk olarak, glikoz taşıyıcılarının (hücre dışı glikozu hücrelere taşıyan), glikolitik enzimlerin (glikozu pirüvata dönüştüren) ve laktat dehidrojenaz A'nın (pirüvatu laktat'a dönüştüren) ifadesi artar ve böylece glukozdan laktat'a kadar geri dönüşü artırılır. İkincisi, hipoksi / HIF-1, sitokrom c oksidaz (elektron transport zinciri kompleksi IV) 'ün alt birim bileşiminde COX4-1 alt biriminin ekspresyonundan COX4-2 alt biriminin ekspresyonuna geçişi tetikler, bu da solunum hipoksik koşullarının etkinliğini artırır [50]. Üçüncüsü, pirüvat dehidrojenaz kinaz 1'in (PDK1) ekspresyonu indüklenir, bu da pirüvat dehidrojenaz (PDH)'ın fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna yol açar, böylece mitokondriyal trikarboksilik asit döngüsüne giriş için piruvatın asetil koenzim A'ya dönüşmesini önler. Dördüncü olarak, RCC4 ve RCC10 insan renal karsinom hücre hatlarında yapılan çalışmada, VHL aktivitesinin kaybı, O₂ tüketimi ve elektron transport zinciri aktivitesinde bir azalmaya yol açar [19, 51].

HIF-1, hipoksidede aktif olarak ekspresyonu artan trans etkili bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 transkripsiyon faktörü; oksijene duyarlı HIF-1 α ve yapısal olarak ifade edilen HIF-1 β olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır [52]. HIF-1 α geni, genel olarak normoksik dokularda bile her zaman eksprese edilir, fakat HIF-1 α proteinleri, hipoksik koşullar altında hücrelerde birikir. HIF-1 α , prolinhidroksilaz proteinleri ile hidroksile edilir, bu, hızlı ubiquitinasyon ve proteazomal degradasyon için hedefi HIF-1 α olan E3 ligaz, von Hippel-Lindau proteininin bağlanması için gereklidir. HIF-1 α , post-translasyonel modifikasyonlar (hidroksilasyon ve ubiquitinasyon dahil) ile protein proteazomda hızla bozunmaktadır. Öte yandan, düşük oksijen konsantrasyonları HIF-1 α proteininin stabilitesini artırır. Hipoksidede, PHD aktivitesi inhibe edilir ve HIF-1 α , HIF-1 β ile dimer haline gelir, böylece CA9, GLUT1, 9, 10 gibi hipoksiye yanıt olarak yüzlerce genin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 1.1) [53-56].

Kanserde HIF-1 α ekspresyon seviyesi hem radyasyon direnci, hem de hasta ölümüyle ilgilidir. Kolon, meme, pankreas, böbrek, akciğer ve diğer kanserlerde HIF-1 α seviyesi artmaktadır [57, 58]. Ayrıca servikal karsinomanın erken evresinde HIF-1 α artışı hasta sağkalımı ile ilişkilendirilir [48].

Hipoksiye adaptasyon, sonuçta hasta mortalitesine yol açan kanser gelişiminin birçok önemli yönünü desteklemektedir. Kanser hücrelerinin invazyonu ve metastazı için E-cadherin ekspresyonunun kaybı esastır. Renal hücre karsinomu hattı RCC4'te, HIF-1, TCF3'ü kodlayan genlerin (E12 / E47 olarak da bilinir), ZFHX1A'nın (zinc finger E-box-binding homeobox 1, δ EF1 veya ZEB1 olarak da bilinir) ve ZFHX1B'nin (SIP1 veya ZEB2 olarak da bilinir) transkripsiyonunu aktive eder; E-kaderini kodlayan genin transkripsiyonunu engellemek için promotere bağlandığı bilinmektedir [59]. HIF-1 ayrıca DNA'ya bağlanmadan, MYC'nin SP1 ile etkileşimini bloke ederek DNA hasar onarım proteini MutS α 'nın alt birimlerini kodlayan MSH2 ve MSH6 genlerinin transkripsiyonunu baskılayarak genetik kararsızlığa neden olabilmektedir [60].



Şekil 1.1: Hipoksiya ve normoksiyada HIF-1 α geninin regülasyonu. [49]'dan adapte edildi.

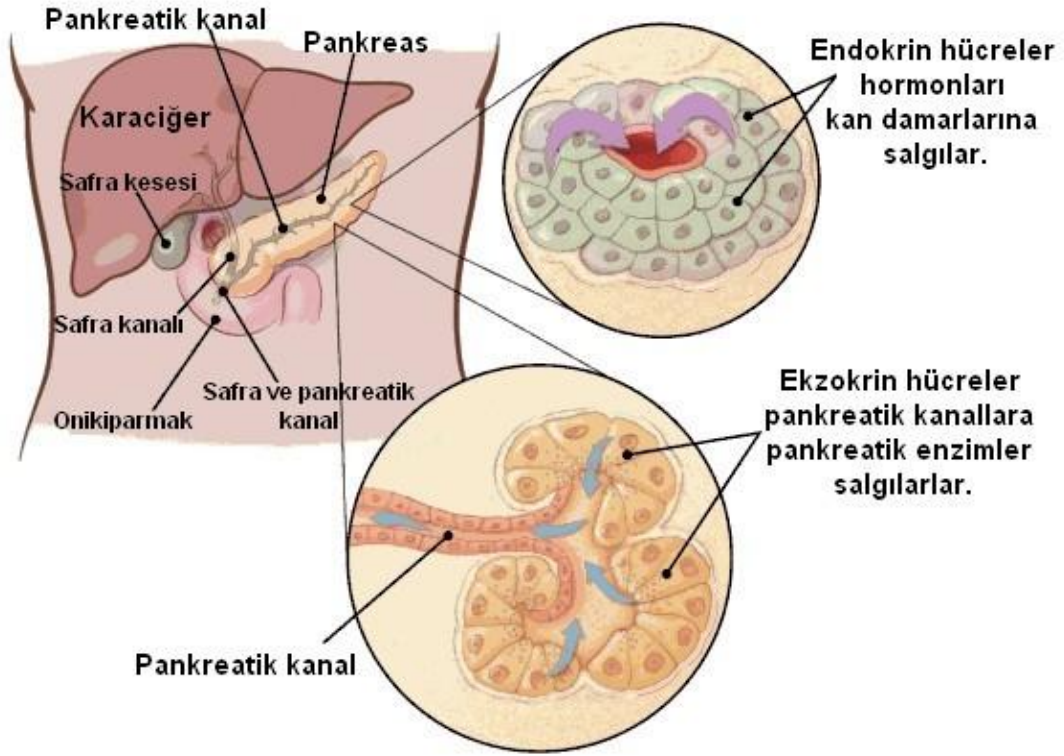
HIF-1'in hedeflenmesi olası bir terapötik stratejidir. PX-478 ile kanser hücre hatlarında HIF-1'in inhibisyonu sadece HIF-1 protein seviyelerini ve sinyallemeyi azaltmakla kalmamış, aynı zamanda hipoksik kanser hücrelerinin radyoterapiye hassasiyetini

arttırmış ve doğrudan tümör hücresi ölümünü sağlamıştır [61]. Chen ve arkadaşları pankreatik kanser hücrelerde HIF-1 ve VEGF siRNA'sı kullanarak yaptığı çalışmada, HIF-1 ve VEGF ekspresyonunun hipoksik koşullar altında NF-KB'ya bağımlı yada bağımsız yollarla inhibe edebildiğini ve aynı zamanda nude farelerde ksenograft modelde mikrodamar yoğunluğunun (MVD) büyümesini inhibe edebileceğini göstermiştir [62].

1.3 Pankreas Kanseri

Pankreas anatomik olarak ikinci ve üçüncü lomber vertebralar hizasında midenin arkasında ve omurganın önünde yer almaktadır, 15 cm uzunluğunda, 60-140 gram ağırlığında sekretuar bir organdır. Pankreas yapısı baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 kısma ayrılır (Şekil 1.2). Pankreas fizyolojik olarak alkali özelliğe sahiptir [63]. Sindirim ve glukoz homeostazında pankreatik sekresyonlar önemli bir rol oynar. Bu sekresyonlar sadece salgılamayı değil, aynı zamanda salgı bezinin hücresel bütünlüğünü de modüle eden bir dizi nöronal ve hormonal sinyal yollarıyla kontrol edilir [64, 65]. Ekzokrin bölüm, pankreasın toplam hacminin yaklaşık % 85'ini oluşturur, buna karşın endokrin pankreas % 2'den daha azını oluşturur. Kalan pankreatik kitle ekstraselüler matriks (% 10) ve duktal hücreler ve kan damarları (% 4) oluşturur [66]. Ekzokrin pankreas, asiner hücrelerden ve pankreas kanallarını (duktal hücreler) oluşturan epitelyal hücrelerden oluşur [67]. Pankreatik asiner hücreleri, ince bağırsakta sindirim sürecinin çoğunluğundan sorumludur ve safra tuzlarıyla birlikte sindirim enzimleri üretir ve onikiparmak barsağına salgılar. Duktal hücreler, enzim aktivitesi için optimum pH sağlamanın yanı sıra, pankreatik kanallar boyunca enzim naklini yönlendiren büyük miktarda alkali su ve bikarbonat karışımı üretir ve onikiparmak barsağına salınır [68]. Endokrin hücrelerin veya pankreas adacıklarının kümeleri, pankreasın endokrin bölümünü oluşturur. Endokrin pankreas, pankreatik adacıklarla (Langerhans adacıkları) ilişkili yoğun kılcıl damar ağı yoluyla doğrudan dolaşımda salgılanan hormonların (insülin, glukagon, somatostatin) üretimini sağlar [66]. Glukagon, insülin ve somatostatin gibi hormonlar, Langerhans adacıklarının α -, β - ve δ - hücreleri ile kan içine salgılanır ve pankreatik endokrin fonksiyonuna aracılık eder [69]. Bu hormonlar, glikoz homeostazını kolaylaştırmak için karaciğer gibi çeşitli hedef organları etkiler [70]. Ekzokrin ve endokrin pankreas bileşenlerinin ayrımı yoktur; pankreatik adacıklar pankreatik asinlerin arasında dağılmıştır ve asiner hücreler bu yapıların kılcıl damarları içinden damar oluşumunu gerçekleştirmektedir [68]. Normal fizyolojik koşullar altında, ekzokrin pankreas, sırasıyla karbonhidratların, proteinlerin ve yağların sindirilmesine yardımcı olan amilaz, proteaz ve lipaz olmak üzere 3 ana tip enzim içeren yaklaşık 1.5 L sindirim sıvısı üretir [66, 71, 72].

Pankreas kanseri olarak nitelendirdiğimiz kanser türü aslında pankreas duktal adenokarsinomdur. Pankreas duktal adenokarsinomu tüm pankreas kansinomlarının %90'nını oluşturmaktadır ve ekzokrin pankreastan köken alır. Ardından görülme sırasına göre seröz/müsinöz kistadenokanserler ve intraduktal müsinöz papiller tümörler gelmektedir. Pankreas tümörleri 2 gruba ayrılmaktadır; Non-endokrin pankreas tümörleri ve Endokrin pankreas tümörleri. Non-endokrin pankreas tümörlerini de benign ve malign olmak üzere ikiye ayırabiliriz [64, 73-75].



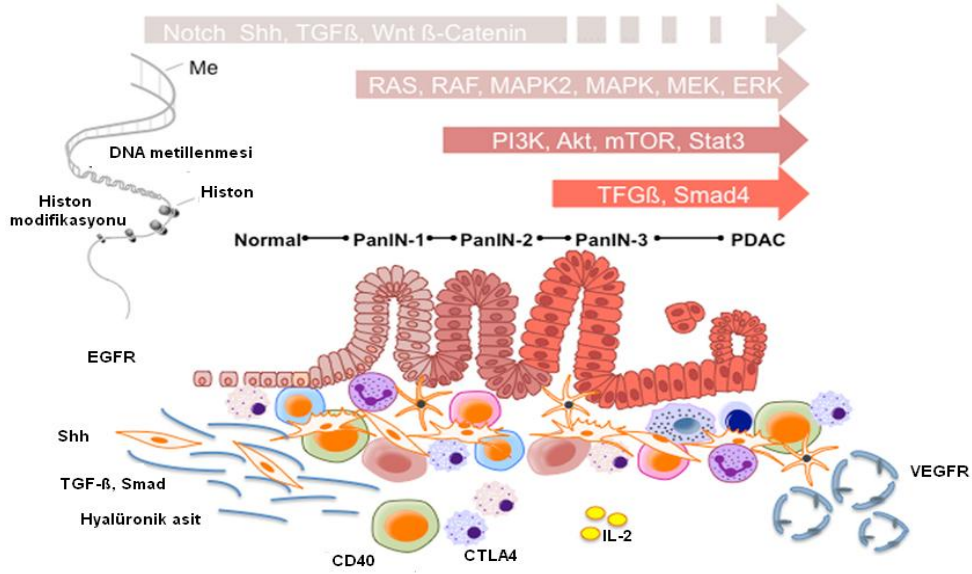
Şekil 1.2: Pankreas anatomik yapısı ve hücre çeşitleri. [76]'dan adapte edildi.

Pankreatik kanserler 4. ölümcül kanser olarak bilinmektedir. Son yıllarda sıklığı giderek artmaktadır. Pankreatik kanser belirti vermeden ilerleyen kanser türlerindedir. Tanısındaki güçlüklerden dolayı tanı konduğunda hastaların %90'ında metastas, %40 olguda lokal yayılım, %50'nin üzerinde uzak yayılım görülmektedir. Pankreas kanseri, lenfatik sisteme, karaciğer, akciğerler ve periton boşluğu gibi uzak organlara hızla yayıldığı için hastaların %95'inin ölümüne neden olmaktadır [77]. Pankreas kanserlerinin saldırgan niteliği ve etkili sistemik tedavilerin yetersizliği nedeniyle pankreas kanserli hastaların teşhisten sonraki sağ kalım süresi 1 yıl olanlar yaklaşık %20 iken 5 yıllık yaşam süresi olanlar sadece %3 oranındadır [78-80].

Pankreas kanserinin erken teşhis edilememesi, tedavisindeki güçlükler ve kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmesi gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Pankreatik kanser için kötü prognozun ana nedenleri arasında erken ve kayda değer semptomların olmaması, hızlı lokal veya uzak metastaz eğilimi ve geleneksel kemoterapötiklere karşı direncinin bulunmasıdır. Günümüzde tedavisinde cerrahi yöntemlerin yanı sıra kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır [76].

Pankreas kanserinin en yaygın karakteristiği başta karaciğer olmak üzere lenf nodlarına çok hızlı metastas yapmalarıdır. Pankreatik kanserlerin %65'inin pankreasın baş kısmında, %16'sının gövdesinde, %14'ünün kuyruk kısmında, %5'inin ise birden fazla odaklı yerleştiği belirlenmiştir. Bu tümörler daha erken zamanda sarılık ve pankreatit ile kendini belli ederler. Pankreasın gövde kısmında ve kuyruk kısmında çıkan tümörler çok geç evrede çıkıp daha kötü bir gidişat gösterirler [81].

Pankreas kanser hücrelerinin kökeni teorik olarak zayıf diferansiye olmuş ductal hücrelerden, de-diferansiye olan asinar ya da adacık (islet) hücrelerinden, progenitor hücrelerden ya da kök hücrelerden köken alabilir. Son yıllarda PanIN (Pancreatic intraepithelial Neoplasia) lerin pre-kanser lezyonlar oluşturduğu ve bunlarında pankreatik adenokarsinomlara sebep olduğu şeklinde bir görüş hâkimdir. PanIN'ler anatomik, patolojik ve moleküler düzeyde en iyi karakterize preneoplastik lezyonlardır [29]. Morfolojik, klinik ve genetik gözlemler temelinde, pankreatik duktal adenokarsinom için bir progresyon modeli önerilmiştir (Şekil 1.3). Hiperplazinin maligniteye ilerlemesinde meydana gelen bir dizi yapısal ve sitolojik değişikliklere göre, duktal lezyonların pankreatik intraduktal neoplazi (PanIN) olarak sınıflandırılması yapılmaktadır [73]. Sitolojik ve yapısal değişimin derecesine göre lezyonlar PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 ve PanIN-3 olarak alt sınıflara ayrılmıştır [74]. PanIN-1 lezyonları düz (1A) veya papiller (1B) olarak derecelendirilir, hücre çekirdeğindeki anormalliklerin ve hücre çekirdeğindeki polaritenin yokluğuyla karakterize edilir ve bu aşamada hücrelerde K-ras mutasyonu görülmektedir. PanIN-2 evresindeki lezyonların oluşumu, PanIN-1 lezyonlarından biraz daha karmaşıktır ve hücre çekirdeğinin polaritesinin kaybı, hücre çekirdeğinde yoğunluk, hücre çekirdeğinde varyasyon (pleomorfizm), hiperkromaz ve psödostratifikasyon gibi daha fazla hücre çekirdeğinde meydana gelen değişiklikler görülmektedir. Ayrıca K-ras mutasyonu ve siklin dependent kinaz 2A (CDK2A ya da p16) kaybı görülmektedir. PanIN-3, pankreatik karsinomlar olarak isimlendirilir ve atipik nükleus, hücrelerin pankreas kanalına tomurcuklanması şeklinde bir görünüm, hücresel proliferasyonun artması ve nadiren p53 mutasyonlarının varlığı ile karakterize edilmektedir [79, 80, 82-84] (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: Pankreas kanseri evrelerinde moleküler yollarlar. [76]'dan adapte edildi.

Pankreatik duktal adenokarsinomunun ayırt edici özelliği, tümör hücrelerini çevreleyen büyük desmoplastik stromadır. Çoğu durumda tümör hacminin % 90'ını oluşturan stroma, yoğun bir şekilde reaktif “kanserle ilişkili” fibroblastlar (CAF'ler), aktive edilmiş pankreatik stellat hücreleri (PSC'ler), dağınık haldeki enflamatuar hücreleri, kısmen çökmüş kılcal damarları, sinir liflerini içerir. Ayrıca bağ doku, interstisyel sıvı ve stromal matriks içine gömülü sayısız sitokin ve büyüme faktörleri bulunmaktadır [85]. Kanser hücreleri de kollajen sentezleme ve salgılama yeteneğinde olan hücrelerdir [86, 87]. Ek olarak matrikste anormal endotel hücreleri, küçük embriyonik hücreleri, kemokin ve sitokin üreterek fibroblastlar ve kanser hücreleri için mitojenik etki gösteren makrofaj hücreleri de bulunur [88]. Pankreas kanser hücrelerinin pankreastaki lokalizasyonlarına bağlı olarak yüksek oranda insüline maruz kalmaktadırlar. Sonuç olarak pankreas kanserinde oluşan bu eşsiz mikroçevre, pankreas kanser hücrelerinin çok hızlı şekilde gelişmelerini ve metastaz yapmalarını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, kemoterapi tedavisi sırasında pankreatik kanserlerde oluşan direnç mekanizması stromanın bu ilaçlara karşı bir bariyer özelliği taşıması sonucunda oluşmaktadır [85].

Yapılan invitro çalışmalarda CAF'ler ve PSC'ler veya PSC içeren ortamlarla birlikte ko-kültüre olan tümör hücreleri ile arasındaki etkileşimin tümör ilerlemesinde bu yapıların önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur [89]. Stroma yeniden modelleme, çoğunlukla onkojenik K-ras sinyalizasyonuna bağlı bir süreçtir, çünkü yerleşik PDAC tümörlerinde akut mutasyona uğramış K-ras kaybı, stroma hücrelerinin hızlı bir şekilde bastırılmasına ve yayılmasına neden olur. Yinede stroma ve duktal kanser hücreleri arasındaki ilişki de tam olarak anlaşılammıştır [90].

1.4 Pankreatik Kanselerde Moleküler Düzeydeki Değişimler

Pankreatik kanserlerin genetik ve fenotipik heterojenliği, genel anlamda etkili olacak tedaviyi belirlemeyi zorlaştırmaktadır. Pankreatik kanser gelişimi ve ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmaların arasındaki etkileşimleri anlamak, hastalığı tedavi etmek için daha seçici ve etkili tedavi modellerinin geliştirilmesinde önemli bir gelişme sağlayacaktır [91, 92].

Ekzon dizileme çalışmaları sonucunda pankreas kanserinde yaygın olarak görülen genetik değişiklikler onkojenik KRAS mutasyonu ve tümör baskılayıcıları olan CDKN2A, TP53 ve SMAD4'ün inaktivasyonudur [93]. Bu değişikliklere ek olarak birçok gende, çok düşük bir frekansta (>% 10) mutasyona uğrar ve bu mutasyonların çoğu tekrarlı değildir. Bu nadir değişikliklerin daha detaylı analiz edildiğinde, transformasyon faktörü- β (TGF- β), WNT, NOTCH ve Hedgehog sinyallerinin yanı sıra hücre döngüsünde S-fazına girişte, sinir hücrelerindeki iletişimde, kromatin yeniden yapılanmasında ve DNA onarımı sırasında değişimler olduğu görülmüştür [92, 94].

Pankreatik kanserler, yaygın bir tümör başlangıcı nedeni olan KRAS onkogeninde aktive edici nokta mutasyonları barındırırlar [95]. KRAS genindeki nokta mutasyonlarının çoğunluğu kodon 12, 13 ve 6'da bulunur [96, 97]. KRAS'ın yapısal aktivasyonuna neden olan bu mutasyonlar, çok sayıda sinyal yolunun kalıcı uyarımına yol açar. Bu sinyal yollarının uyarılması ile artan proliferasyon, apoptosisin baskılanması, metabolizmanın değiştirilmesi, tümör mikroçevresinin değiştirilmesi, bağışıklık yanıtının yok edilmesi ve metastaz dâhil olmak üzere birçok kanser fenotipik özelliğın ortaya çıkması ile sonuçlanır [98]. KRAS sinyal iletimi son derece karmaşık ve dinamik olup, Raf / Mek / Erk, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) / 3-fosfoinositid bağımlı protein kinaz-1 (Pdk1) / Akt, RalGDS / p38MAPK, Rac ve Rho, Rassf1, NF1, p120GAP ve PLC-e gibi çeşitli sinyal yollarının farklı seviyelerde birbiri ile bağlantıları ile ilgilidir [99].

İnsan kanserleri ve transgenik fare modelleri ile yapılan çalışmalarda, RAS'ın aktive olması sonucunda oluşan kanserlerin, organizmayı koruyan adaptif immün yanıtları aşma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir [100]. Bu nedenle, mutasyona uğramış RAS antijenlerine özgü T hücreleri, pankreatik kanserli hastalarda bulunmasına rağmen, bunlar genellikle anjiyondur ve tümöre karşı aktif değildir [96, 101].

Ras ve src onkogenleri birçok transkripsiyon faktörünü (AP-1, Rel/NF- κ B gibi) aktive etmek suretiyle pankreas kanserindeki tümör invazyonu, anjiyogenez ve metastazla ilişkili olan genlerin düzenlenmesini artırır. p53 ve p16 gibi tümör baskılayıcı genler de VEGF ekspresyonunu düzenlemekte rol alırlar [102, 103].

İnvaziv pankreatik kanserli hastaların çoğunda bulunan genetik bir değişiklik olan mutasyona uğramış K-ras'ın tanımlanması papiller ve displastik papiller duktal lezyonlarda bu hiperproliferatif durumların infiltratif duktal karsinomun öncüleri olduğuna dair daha fazla kanıt sağlanmıştır. Örneğin, preneoplastik duktal lezyonların, tipik olarak P16 ve P53 dahil olmak üzere invaziv pankreatik karsinomda değiştirilen genlerdeki mutasyonları içermektedir [95, 97, 99, 104].

Memeli Hedgehog ailesinde Sonic (Shh), Indian (Ihh) ve Desert (Dhh) Hedgehog proteinler yer almaktadır. Bunlar embriyogenez süresince büyümeyi ve birçok organın gelişimini kontrol ederler [105]. Hem pankreatik duktal tümörlerde hem de ileri kanserlerin büyümesinde Hedgehog yolunun kontrol dışı çalıştığı gösterilmiştir [106]. Hedgehog ligandlarının ekspresyonu Transkripsiyonel Target Patched (PTC) geni ve Smoothened (SMO) gen normal insan pankreatik ductus'da belirlenemezken Pankreatik duktal tümörlerde bu proteinlerin aşırı ifade olduğu gözlenmiştir [107]. Çeşitli pankreatik kanser hücre hatlarındaki çalışmalar; En az 2 Hh yolu bileşeninin yanlış ekspre olduğunu göstermiştir. Bunlardan da Shh sinyali pankreatik kanserde önemli bir role sahiptir. Hedgehog sinyal yolağı metastazda da önemli rol oynamaktadır. Hedgehog sinyalinin inhibisyonu pankreatik adenokarsinoma xenografts da sistemik metastazın insidansını küçültebilmektedir [108]. Son zamanlardaki çalışmalar K-RAS ile Hedgehog Sinyal yolları arasında cros-talk ilişkisi olduğunu göstermiştir. Onkogenik K-RAS, Hedgehog sinyal yolunun aktifleşmesinde önemli bir rol oynamaktadır [109].

Pankreas kanseri ile ilgili olarak çeşitli delesyonlar üzerinde de çalışmalar bulunmaktadır. Bunlar DPC (deleted in pancreas cancer) 1/2, 3 ve 4'tür. DPC4 (SMAD4) bir tümör baskılayıcı genidir, TGF- β (transforming growth factor-beta) sinyalizasyon yollarında yer alır ve epitelyal hücre büyümesinin düzenlenmesini azaltarak apoptozisi tetikler [102]. TGF-sinyal yolağında yer alan TGFBR2, BMPR2, SMAD4, SMAD3 genler tüm pankreatik kanserlerde bulunabilir. TGF- β transdüksiyon yolağı hemen hemen tüm pankreatik hücrelerde mutasyona uğramıştır. SMAD4/DPC4 geninin pankreatik kanserlerin %50'sinde delesyonlu ya da mutasyona uğramış olduğu belirlenmiştir [103].

p53 tümör baskılayıcı geni normal hücresel işlevlerde önemlidir ve insan kanserlerinde mutasyonu en çok bildirilen genidir. Pankreas kanserlerinin de %70'inde p53 işlev kaybı olduğu gösterilmiş ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Benzer yolla p16 geninin inaktivasyon şeklindeki mutasyonu da retinoblastoma (Rb) proteininin hiperfosforile olması ile hücre döngüsünün kontrolünün kaybolmasına ve regüle edilemeyen hücre büyümesine neden olmaktadır. Sıklıkla malin melanoma ile ilişkilendirilen bu mutasyonun pankreatik kansere yatkınlığa da neden olduğu belirtilmektedir [105].

1.5 Pankreas Kanserinde Hayvan Modelleri

Klinik çalışmalarda, bir ilacın etkinliği ile ilgili faktörleri belirlemeden önce antikanser ilaç geliştirmenin ilk basamakları *in vitro* ve *in vivo* 'daki verim oranını belirlemek gereklidir. Klinik çalışmalardan önce, antikanser ajanlar genellikle, hücre kültürlerinde ve ksenogreftlerde test edilir. Sitotoksik ajanlar için, bu ksenogreft neoplazmlara karşı aktivite, klinik aktivite ile sadece küçük bir ölçüde ilişkilidir. Hücre kültürü modelleri, yapay bir ortamda olmaları ve bütün bir sistem içinde olmamaları nedeniyle insan kanserlerini tam olarak yansıtamamaktadırlar [110]. Kanserin özelliklerini en iyi şekilde yansıtan *in vivo* modeller, genetik olarak tasarlanmış ya da hastalardan alınan hücrelerin veya dokuların fareye direkt implante edildiği (PDX (heterotopik, ortotopik)) modellerdir. Genel olarak, nude ve immün sistemleri baskılanmış fareler yabancı dokuları ve hücreleri reddetme yeteneğine sahip değildir [111].

PDX modellerinin önemli bir avantajı, hasta tümörlerinin temel özelliklerini muhafaza etmeleridir. Hasta tümörünün histolojik özellikleri, genomik yapısı ve kanser hücrelerinin heterojenliği, PDX tümörlerinde yüksek oranda korunmuştur. PDX tümörleri ayrıca hastadan kaynaklanan stromal ve immün hücreleri içerir. PDX modelleri, hasta tümör parçalarının (doku ya da hücre) immün sistemleri baskılanmış farelere, deri altından veya ortotopik olarak implante edilmesiyle üretilir [92, 111]. Nude farelerde insan pankreatik kanser hücrelerinin implantasyonu sonrasında yapılan tümörijenite testi ile yeni antikanser ilaçların *in vivo* etkinliğinin değerlendirmesi için faydalı olduğu belirlenmiştir [112]. Tümör ksenograft fare modelleri son birkaç yıldır klinik öncesi çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan tümörü ksenograft modelleri, kültürde büyütülen insan tümör hücrelerinin bir fareye ya da bir insan tümör kitlesinin bir fareye transplantasyonu ile oluşturulur. Ksenogreft, atimik olarak nude fareler veya ciddi şekilde bozulmuş bağışıklık yetersizliği olan fareler gibi bağışıklık sistemi baskılanmış fareler tarafından kolaylıkla kabul edilebilir. [113]. Ksenograftlar, tümörlerde mevcut olan genetik ve epigenetik anormallikleri taklit ettikleri, bireyselleştirilmiş moleküler terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde kullanılabilecekleri ve organ mikroçevresini veya tümörünü yeniden üretmek için aynı organa implante edilebildiklerinden farklı avantajlar gösterirler [114].

Pankreas kanseri araştırmalarında kullanılan temel iki yöntem vardır. Bunlardan ilki ortotopik diğeri heterotopik modeldir. Ortotopik tümörler, faredeki uygun organlara transplante edilir. Örneğin, insan pankreas kanseri hücreleri, fare pankreasına enjekte edilir. Ortotopik modellerin avantajları arasında tümör-konak doku etkileşimleri için ilgili alanın kullanımı, metastazların gelişiminin takibi, tedavinin bölgeye özgü çalışma yeteneği, genlerin organ spesifik ekspresyonu ve klinik senaryoların çoğaltılması yer alır. Başlıca

dezavantajlar ortotopik tümör ksenograft jenerasyonunun yoğun, teknik olarak zorlu, pahalı, daha uzun iyileşme süresi gerektirmesi ve tümör hacminin izlenmesi için heterotopik yöneme göre daha iyi görüntüleme yöntemleri gerektirir. Bununla birlikte, artan klinik önemi nedeniyle, kanser araştırmalarında tercih edilen model olarak ortotopik tümör modelleri ortaya çıkmaktadır [115, 116].

Pankreatik kanserde kullanılan *in vivo* modellerden biri olan heterotopik modelde genellikle arka bacakların arka ya da üst kısmı boyunca deri altına (subcutan) hücreler enjekte ederek gerçekleştirilir [115]. En çok kullanılan hücre hatları Panc-1, MiaPaca-2, AsPC-1, Capan-1, Capan-2 ve BxPC-3'dir [117-119]. Uzun yıllardan beri, deri altı (subcutan) ksenograft modeli, hızlı, ucuz, tekrarlanabilir ve anti-kanser ilaçlarını test etmek mümkün olduğu için kanser araştırmada en yaygın kullanılan prelinik fare modeli olarak kabul edilmiştir. Subkutan model ayrıca deneyde kullanılan farelerin, tedaviden önce tümörlere sahip olduklarını gösteren görsel onay sağlama avantajlarına da sahiptir; ve hayvanların hayatta kalmasının tek ölçüsü olduğu intrakaviter modellere kıyasla, zaman içinde tümör cevabını veya büyümesini değerlendirmeyi mümkün kılar [116].

Bu nedenle, PDX modelleri bugüne kadar geliştirilmiş klinik açıdan en etkili kanser modelidir ve hasta insanlarda terapötik sonucu belirleyen yüksek düzeyde öngörülebilir bir ilaç yanıt platformunu temsil eder [110, 112, 120].

1.6 Karbonik Anhidraz Gen Ailesi

Karbonik anhidrazlar (CA'lar; EC 4.2.1.1), karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalize eden bir metaloenzimler ailesidir. Karbonik anhidrazlar 1933'de keşfettiklerinden beri, enzimatik reaksiyonlardan, yapısal biyolojiye, ilaç keşfinden klinik tıbbın anlaşılmasına kadar bir çok bilimsel keşifte yer almıştır. Karbonik anhidrazlar α , β , γ , δ , ζ olmak üzere beş sınıfa ayrılırlar. Omurgalılarda α sınıfı karbonik anhidrazlar bulunur (memelilerde bulunan tek CA sınıfı). Ayrıca α sınıfı beş sınıfın en iyi karakterize edilenidir. β karbonik anhidraz yüksek bitkilerde ve bazı prokaryotlarda, γ sadece archaeobacteria'da, δ ve ζ sınıfları sadece diatomlarda bulunmaktadır [54, 121].

Memelilerde α sınıfı karbonik anhidrazlar karbondioksit ve bikarbonat iyonlarının dengesini koruyarak ortamın pH dengesini sağlamaktadır. Karbonik anhidrazların insanlarda enzimatik aktivite gösteren 16 izoformu vardır [122, 123]. Genomik veri tabanlarında yapılan aramaların sonucunda bu aileye herhangi bir benzer CA dizisi tanımlanmaması nedeniyle sayının artmayacağı düşünülmekte [124].

İnsanlardaki α -CA'nın 12 katalitik formu vardır, bunun yanında katalitik bölgelerinde Zn^{+2} iyonu bulunmayan 3 izoformu vardır (CAVIII, CAX ve CAXI). İşlevleri tam olarak bilinmeyen bu izoformlar CA-ilişkili protein (CA-related proteins (CA-RPs)) olarak adlandırılmaktadırlar [125]. Hücrede sitozolik formda; CA I, II, III, VIII, XIII, mitokondride; CA-VA ile CA-VB ve hücre membranında; CA IV, IX, XII, XIV bulunmaktadır. Ayrıca hücre dışına salınan izoform CA VI bulunmaktadır [126]. Özellikle iki yüzey izoformu CAIX (CA9) ve CAXII tümör oluşumunda önemli rol oynamaktadır [125].

Memelilerde kırmızı kan hücrelerinde hem CA II hem de CA I ekspresyonu vardır. CA II aktivitesinin hızlı kinetiklerinden dolayı kırmızı kan hücrelerinde ekspre edildiği düşünülmektedir buna rağmen enzimin çalışmasında hücre içi mikroçevre etkilidir [127]. Öte yandan, omurgalılarda CO_2 değişiminin kırmızı kan hücrelerinde meydana gelen CA aktivitesi ile sınırlı olmadığı bilinmektedir [128]. Hemolitik anemi erken dönemde kırmızı kan hücrelerinin yok edildiği ve anemiye yol açan bir hastalıktır. Hemolitik anemiye Glukoz-6 fosfat dehidrojenaz eksikliği neden olur [129]. Hasta insanlarda sağlıklılara göre anlamlı derecede düşük CA I ekspresyonu görülmüştür. Hastalardan elde edilen verilerden yola çıkarak CA I'in hemoglobin oranı ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. CA I, fizyolojik açıdan daha uygun izoform olan CA II'den daha düşük aktiviteye sahip olmasına rağmen, CAI ekspresyon seviyesi, hemolitik anemi için bir belirteç olarak kullanılabilir [130].

CA III, onu diğer izozimlerden ayıran çeşitli özelliklere sahiptir. CA III ekspresyonu, hem beyaz hem de kahverengi adipoz dokuda ve iskelet kasında oldukça yüksektir. Bununla birlikte, CA III aktivitesi, diğer dokularda oldukça düşüktür [131]. CA III, hücre fonksiyonunun ötesinde farklı rolleri vardır. CA III'ün, disülfid bağları vasıtasıyla S-glutatifonyon olarak adlandırılan bir işlemde glutatyona bağlanabilen iki reaktif sülfhidril grubu vardır. Bu reaksiyon hücreleri geri dönüşümsüz protein oksidasyonundan korurur [132]. CA III'ün overekspresyonu, hücreleri H_2O_2 kaynaklı apoptozdan korur. Ayrıca, CA III'ün hücreleri oksidatif hasara karşı koruyabileceğini düşünülmektedir [133]. Farelerdeki kas dokusunda CA III geni susturulduğunda, hiperoksik zorlamaya veya kas yorgunluğuna yanıt olarak yabancı tip farelerden farklı bir tepki vermemiştir. CA III ekspresyonunun, normal büyüme, gelişme veya yaşam süresi için gerekli değildir [134, 135]. Bununla birlikte, CA III eksikliğinin mitokondriyal ATP sentezini bozabileceği bulunmuştur [136].

Amino asit dizisine göre, CA VII memelilerde en yüksek oranda korunan CA izozim olarak belirlenmiştir [137]. CA VII, insan tükürük bezinde ve fare serebrum ve serebellumda eksprese edilir [138]. CA VII de γ -aminobütirik asit (GABAA) reseptörlerine bağlanarak kanallar aracılığıyla nöral akıma aracılık edebilen HCO_3 sağlayarak nöronal uyarımda rol oynamıştır [139]. CA VII'nin nöronal uyarıma ve nöbetlerde rol oynadığı hipotezi, membran

permeant sülfonamidlerle inhibe edilerek kanıtlanmıştır [140]. Bu bağlamda, CA VII, nöropatik ağrıyı engellemek için yeni bir ilaç adayı olabilir [141].

Mitokondriyal karbonik anhidrazlar (CAs, EC 4.2.1.1) piruvat metabolizmasında, piruvat karboksilazın pirüvat ve bikarbonatın oksaloasetata dönüşme hızını hızlandırarak önemli bir rol oynar. Bu metabolik yolda sadece glikoliz yoluyla glikozdan gelen piruvat ile çalışır [121]. Hayvanlarda bulunan α -CA izoformları arasında, mitokondrilerde VA ve VB olmak üzere iki adet CA izoenzimi bulunur. Bu izoenzimler, omurgalılarda (örneğin kemirgenlerde) ve omurgasızlarda (örneğin, çekirge) ürejenez, glukoneojenez ve lipogenez gibi çeşitli biyosentez işlemlerinde yer alır [142]. Lipogenez için ve adipositlerin mitokondrilerinde CA VA eklenmesi, piruvatın karboksilasyonu için CA VB gereklidir. Topiramate, insan mitokondriyal izoenzimleri CA VA ve VB'nin inhibitörü olarak hareket etmektedir. Lipogenezde rol oynayan hem mitokondriyal hem de sitosolik CA izozimlerinin inhibisyonu, kilo kaybını kontrol etmek için yeni bir yaklaşım sağlayabilir [121, 142, 143].

CA VI, α karbonik anhidraz ailesi arasında tek hücre dışına salgılanan izoformdur. Tükürükte CA aktivitesinin varlığı bilinmekteydi, ancak aktivitenin eritrositlerde bulunan CAII'nin aktivitesinden kaynaklandığı düşünülüyordu. Farklı bir izoenzim olduğu 1979 yılında CAVI'in keşfiyle anlaşıldı [144]. Parkkila ve arkadaşları tükürükte CA VI salgılanmasının sirkadiyen ritmi izlediğini uyku sırasında düşük seviyede, uyanıklık ve konsantrasyon halinde yüksek seviyede ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir [145]. Frasseto ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, diş çürüğü olan çocukların ağız boşluğundaki CA VI aktivitesinin, çürük olan çocuklarda bulunandan daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur, ancak bu gözlemin istatistiksel anlam sınır değerindedir [146, 147].

İnsanlarda hücre membranı ile ilişkili CA IV, CAIX (CA9), CA XII ve CA XIV olmak üzere 4 farklı karbonik anhidraz izoformu bulunmaktadır. Bu enzimler, ekstraselüler alanda CO₂'i dengelemek için çalışır [148]. Membrana bağlı bir karbonik anhidraz formu olan CA IV ilk olarak sığır akciğerinden saflaştırılmıştır. İnsan CA IV, kalp, beyin, gözün kapilerinde ve eritrositlere lokalize haldedir [149, 150]. CA IV geni susturulan farelerde normallere kıyasla fonksiyonel veya morfolojik farklılıklar görülmemiştir. Bununla birlikte, hem CA IV hemde CA XIV geni susturulan farelerin retinanın ışığa verdiği yanıt, CA XIV susturulan farelerinkiyle karşılaştırıldığında daha büyük bir açıklık görülmüştür. Bu sonuçlardan, CA IV'ün, en azından CA XIV'ün yokluğunda, pH regülasyonunda da önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır [151].

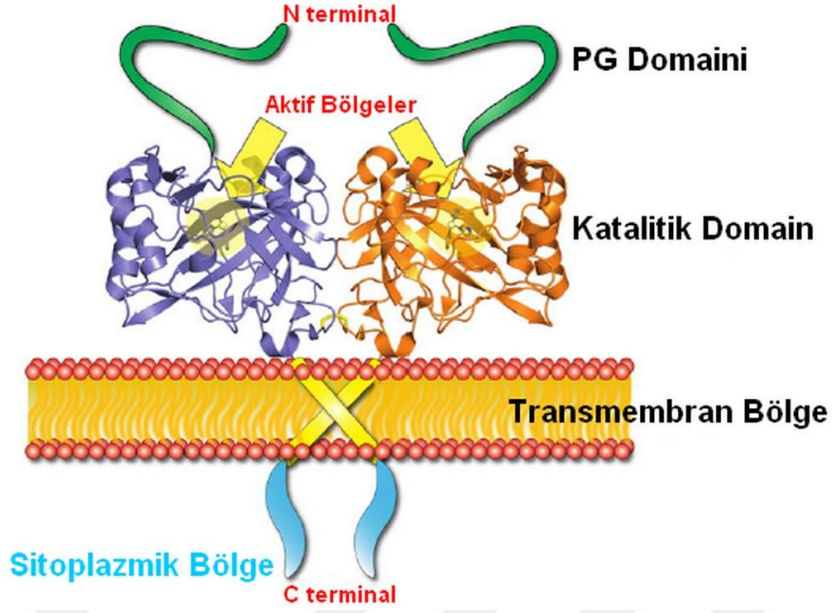
CA IX (CA9) ve CA XII izoformları tümör ilişkili karbonik anhidrazlardır. CAXII ekspresyonu, kolorektal kanser, meme kanseri, akciğer kanseri, servikal kanser, beyin tümörleri, gliomalar, olmak üzere birçok başka tümör ve kanser türlerinde tespit edilmiştir

[152-155]. CA XII'nin ikincil yapısı ve oryantasyonu, CAIX (CA9)'unkine benzer, ancak monomer yapıdadır, proteoglikan yapısından yoksundur ve PKA motifi eksiktir [148]. CAIX'in katalitik aktivitesi, CAIX (CA9)'a kıyasla daha düşüktür ve bu durumun pH kontrolündeki rolünü etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca, meme kanserinde CA XII ekspresyonunun, östrojen reseptörü I (ER α)'nın pozitif olduğu durum ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu durumda meme kanseri hücrelerinde, östrojen response enhancer bölgesine ER α ile bağlanmasıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir [148, 156, 157]. İnsan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'de CA XII'nin geni susturulduğunda, p38 MAPK yolağını etkileyerek invazyon ve migrasyonun azalmasına neden olmuştur. CA XII susturulduğunda matriks metalloproteinaz (MMP) -2, MMP-9 ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (u-PA) ekspresyonu azalmıştır. Bununla beraber, CA XII'un susturulması, metalloproteinazların (TIMP)-2 ve plazminojen aktivatör inhibitörünün (PAI)-1 doku inhibitörünün ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür [158].

1.7 Karbonik Anhidraz 9 (CA9, CAIX)

CA9, karbonik anhidraz ailesine ait kendine özgü yapısı olan bir transmembran proteindir. İlk olarak 1990'ların başlarında keşfedilmiş MN proteini olarak adlandırılmış ve MtTu yarı-viral ajanının endojen bir parçası olduğu öne sürülmüştür [159, 160]. Pastorek ve grubu tarafından cDNA'sını klonlamış ve hCA izoformları arasında yüksek bir dizi homolojisi olduğu ortaya çıkmıştır. Genin CA ailesi üyesi olduğu anlaşılmış ve ailenin 9. üyesi olduğu için CA9 olarak isimlendirilmiştir [54, 161].

Karbonik anhidraz 9 kromozom 9'un p12-13 lokusunda yer almaktadır. 11 ekzon ve 459 aminoasitlik 56 kDa büyüklüğünde protein kodlamaktadır [162]. Bu proteinin 414 amino asitlik kısmı ekstraselüler kısmı olan N-terminal ucunu, 20 aminoasitlik kısmı hidrofobik transmembran kısmını, 25 amino asitlik kısmı da intraselüler kuyruk kısmı olan C-terminal ucunu oluşturmaktadır. Ekstraselüler protein kısmını; 37 aminoasitlik sinyal peptid kısmı, 59 amino asitlik proteoglikan (PG) domaini ve 257 aminoasitlik CA domaini oluşturmaktadır. (Şekil 1.4). Proteoglikan (PG) domaini CA9 proteinin diğer CA ailesi üyelerinden ayıran en önemli özelliğidir [163]. Zavadova ve arkadaşları CA9'un PG domaininin, hücre yapışmasına aracılık etmede önemli bir role sahip olduğunu düşünmüşler. Çalışmada saflaştırılmış ve immobilize edilmiş CA9'un yapısal proteini PG domaine, epitoplarının örtüşmesi sonucu bağlanan monoklonal antikor M75 ile muamelesi sonrasında hücrelerin bağlanma kapasitesini ortadan kaldırmıştır [164].



Şekil 1.4: CA9 proteinin 3 boyutlu yapısı. [54]'ten adapte edildi.

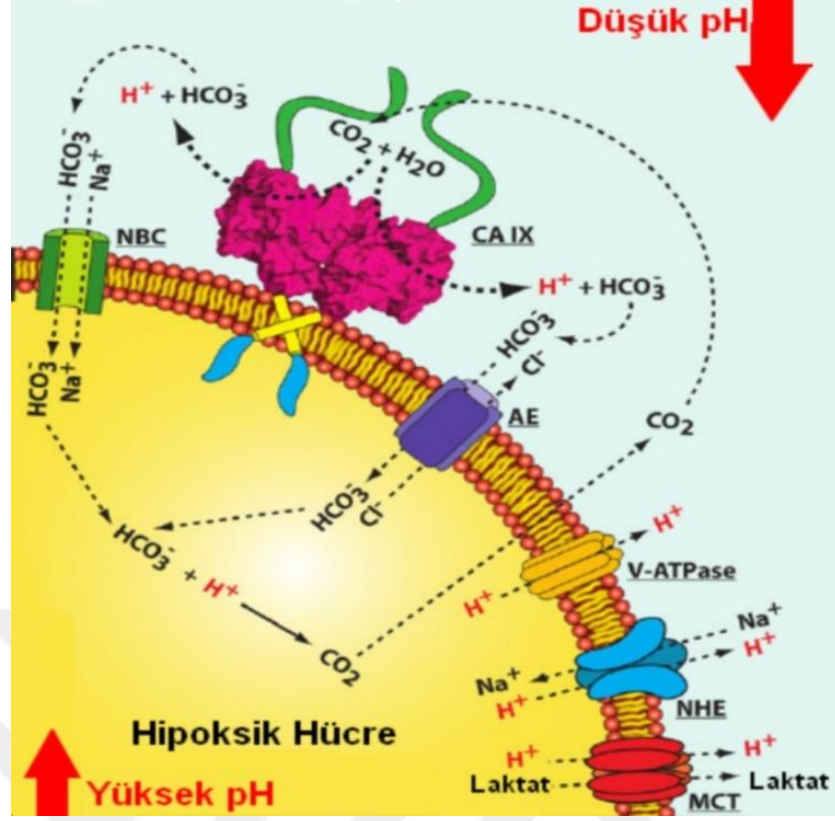
CA9 proteininin ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda kanserli dokularda (serviks karsinomu, meme, baş ve boyun, akciğer, kolon, özofagus, yumurtalık ve beyin tümörleri gibi.) seviyeleri birbirinden farklı olmakla beraber, yüksek seviyede olduğu buna karşın, normal fizyolojik koşullar altındaki sağlıklı dokularda ekspresyonunun olmadığı ancak sindirim sisteminde görevli organların epitelinin iç yüzeyinde oldukça az bir ekspresyonu olduğu görülmüştür [54, 165]. Kanserli ve normal hücrelerden izole edilen CA9 cDNA'sı arasında hiçbir farklılık gözlenmediğinden, enzimin normal ve kanser dokularında benzer işlevlere sahip olduğu öne sürülmüştür [166]. Bazı katı malign tümörlerde sadece kanser hücrelerinin değil, aynı zamanda tümör ile ilişkili stromal hücrelerin de CA9'u eksprese ettiği belirlenmiştir [167, 168]. Ayrıca, birçok tümörde yüksek düzeydeki CA9'un ileri evre veya yüksek dereceli tümörle ve kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Buna karşılık, renal karsinomda yüksek CA9 ekspresyonunun genel olarak iyi bir prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur [163, 169, 170].

Normal dokularda CA9'un, CA'ların temel pH düzenleme işlevinden başka görevleri vardır. Örneğin, CA9'un hücre adezyon süreçlerine katıldıkları ileri sürülmüştür. CA9'un, SLC4 ailesi ($\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ anyon değişim proteini) üyeleri AE1, AE2 ve AE3 ile fonksiyonel ve fiziksel olarak etkileştiği gösterilmiştir. CA9, parietal hücrelerin bazolateral plazma membranında AE2 ile birlikte bulunur. Bu nedenle, bu proteinlerin bir bikarbonat transport yol oluşturduğu düşünülebilir. Hücresel sinyal iletiminden sonra, mide mukozasının parietal hücreleri aktif olarak H^+ 'yı mide lümenine salgılar ve Cl^- aynı zamanda Cl^- kanalları boyunca hareket eder. Asit salgılamasını devam ettirmek için, parietal hücreler, iki birleşmiş

reaksiyonu kullanılarak yüzeyde kaybolan HCl'nin yerini almalıdır. Parietal hücreler bazolateral yüzeyinde, CO₂ komşu kılcal damarlardan hücreye yayılır. Aynı zamanda CA II, HCO₃⁻ ve H⁺ üreten CO₂ dönüşümü reaksiyonunu katalize eder ve böylece parietal hücrelerindeki proton sayısını artırır. Bazolateral membranda ise Cl⁻ / HCO₃⁻ transport proteinleri, Cl⁻'i hücre dışına gönderirken HCO₃⁻ hücre içine alır, böylece hücre içi pH'ı düzenler. CA9, hücre dışındaki HCO₃⁻ katalize eder, AE2-CAII-CA9 bikarbonat transport reaksiyonunun bir parçası olarak gastrik asit sekresyonuna katkıda bulunur (Şekil 1.5) [171].

Düşük oksijen varlığında ortama uyum sağlamak için kanser hücreleri, enerji metabolizmalarını oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize doğru kaydırırlar [172, 173]. Glikolitik yolda, büyük miktarlarda laktik asit ve karbon dioksit üretir, bu da hücre dışı pH'ın azalmasına katkıda bulunur ve bu da tümör mikroçevresindeki asidik ortamın gelişmesine yol açar [174]. Hücresel yaşam döngüsünde biyolojik fonksiyonlarının korunması, hücre içi pH dengesine bağlı olduğundan, kanser hücrelerinin hayatta kalması, bu yaşamsal koşullara uyum sağlama yeteneklerine bağlıdır [175]. CA9 tümör hücrelerinin hipoksik mikroçevrede pH seviyesinin normal şartlarda tutulmasını sağlayarak kanser hücrelerinin bu ortama adapte olmalarını sağlar [176].

Kanser dokularındaki pH regülasyonunda CA9'un rolü, bikarbonat transport reaksiyonlarını içeren bir modele dayanmaktadır. Reaksiyonların hücre dışı bir bileşeni olarak, CA9 karbondioksiti hidrolize eder, böylece anyon değiştirici (AE) protein için HCO₃⁻ sağlar. Daha sonra AE proteinleri, Cl⁻ karşılığında HCO₃⁻ moleküllerini sitoplazmaya taşır. Sitosolde, CA II HCO₃⁻'i, CO₂'ye dönüştürebilir, bu da daha sonra plazma membranından difüze olur ve hücre içinde pH'ın nötralizasyonuna yol açar. Aynı zamanda, CA9 aktivitesi tarafından üretilen protonlar hücre dışı alanın asitleşmesini sağlar [177, 178].



Şekil 1.5: CA9'un hücredeki görevi. [54]'ten adapte edildi.

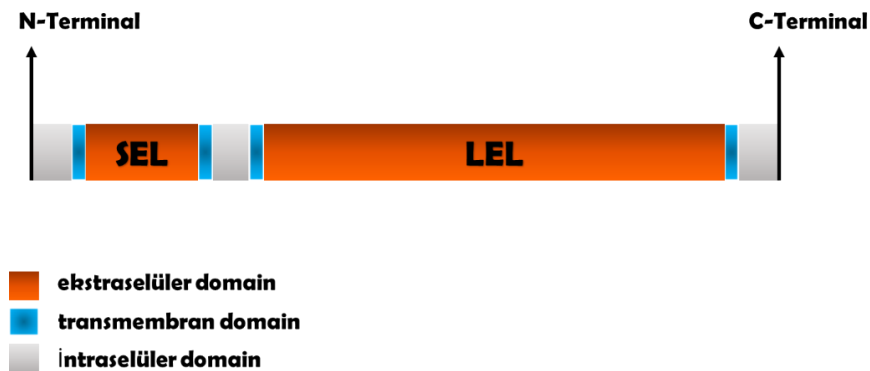
CA9'un transkripsiyonel aktivitesi, çeşitli etki mekanizmalarını kullanan çok sayıda düzenleyici transkripsiyon faktörüne bağlıdır. Yıldırım ve Köçkar'ın çalışmasında CA9'un promoter bölgesi için 5 farklı konstrakt oluşturulmuş. hCA9'un farklı promotör bölgelerinin transkripsiyon aktivitesi karşılaştırıldığında, -116/+38 bölgesinin Hep3B hücrelerinde bazal transkripsiyon aktivitesi için yeterli olduğu bulunmuş. -300 bp ve -500 bp hCA9 promoteri arasında negatif düzenleyici bölge varlığı gösterilmiş [179]. Birçok çalışmada CA9 ekspresyonunun hipoksik koşullara yanıt olarak oluşan Hif-1 α transkripsiyon faktörü ile indüklendiği gösterilmiştir [53]. CA9 promotrounda yer alan HRE (hypoxia response element) bölgesine Hif-1 α transkripsiyon faktörü bağlanması sonucunda hipoksik koşullarda daha çok ekspresyonu olmakta, dolayısıyla kanser hücrelerinin hipoksik koşullara adaptasyonunu kolaylaştırmaktadır [177, 180]. Yıldırım ve arkadaşları'nın çalışmasında HRE bölgesi yönlendirilmiş mutagenез tekniği ile mutasyona uğratılmış ve CA9 ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüş. Çalışma CA9'un HIF-1 α transkripsiyon faktörü ile regüle olduğunu göstermesi açısından önemlidir [181]. Hipoksik ortam ve agresif büyüme, metastaz ve tedaviye yetersiz yanıt ile ilişkilendirilmiştir ve bundan dolayı hipoksi ve CA9 ifadesi arasındaki ilişki, önemli bir olgudur [24, 53, 169].

CA9 transkripsiyonunun, in vitro kültür hücrelerinin yüksek yoğunluğu ile normoksida de başlatılabilmektedir. Fazla hücre yoğunluğu, % 5'ten daha az ve % 1'den daha fazla oksijen ile tanımlanan periküler oksijen seviyelerinin azalmasına neden olur; "hafif hipoksi" olarak adlandırılan bir durum meydana gelir [50, 182]. Bu oksijen seviyeleri, HIF-1'in proteazom bozulmasını tetiklemek için yeterlidir, ancak yine de CA9 ekspresyonu olur. Hafif hipoksida, CA9 ekspresyonu, PI3K yol mekanizması ile uyarılır [183]. CA9 ekspresyonunu başlatmak için sadece HRE elemanı ve promotorda bağlanma (PR1) bölgesi gereklidir [180]. Fazla hücre yoğunluğuna bağlı hafif hipoksinin, CA9 ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde artırarak, gerçek hipoksik koşullar üzerinde etkisi vardır. Ayrıca, CA9 ifadesi, gerçek hipoksik ve hafif hipoksik şartlarda MAPK yolu ile düzenlenir. PI3K ve MAPK sinyal yollarının eş zamanlı inhibisyonu, CA9 transkripsiyon aktivitesinde ciddi bir düşüşe yol açar [180, 183].

1.8 Tetraspanin Gen Ailesi

Tetraspanin proteinleri transmembran 4 süper ailesinin üyeleridir. Tetraspaninler (TSPAN ya da TM4SF) integral membran proteinlerinin büyük bir kısmını oluşturur. İnsanlarda 33, farelerde 34 kuşlarda 35 üyeye sahip olduğu belirlenmiştir [184]. Süngerlerden memelilere kadar birçok türde ifade edilen bu küçük membran proteinleri ilk olarak 1990 yılında insan beyaz kan hücrelerinin yüzeyinde keşfedilmiş ve kısa sürede farklı dokulardaki ekspresyonu da gösterilmiştir [185-187].

Tetraspaninler dört membran geçişli domain (TM1-4) içermektedirler. İntraselüler N- ve terminal-C kısa sitoplazmik kuyrukları ile birçok moleküle ilişkilidirler. Küçük (SEL) ve büyük (LEL) olmak üzere iki ekstraselüler domainleri bulunmaktadır (Şekil 1.6) [188].



Şekil 1.6: Tetraspanin proteininin şematik gösterimi [189]'dan adapte edildi.

Büyük ekstraselüler domainde merkezi rol oynayan yaklaşık olarak 120 aminoasitten oluşan protein-protein interaksyonunu sağlayan bölge bulunur ve bu bölge özellikle integrinlerle bağlanmasını sağlar. Ayrıca evrimsel olarak korunmuş baş domain bulunmaktadır. LEL domaini yerleşim olarak TM3 ve 4 arasındadır, yapısal olarak 4 sistein rezidüsü ve iki tane sistein-sistein-glisin motifine sahip bir domain bulunmaktadır. SEL ise TM1 ve TM2 domaini arasında yer almaktadır [190].

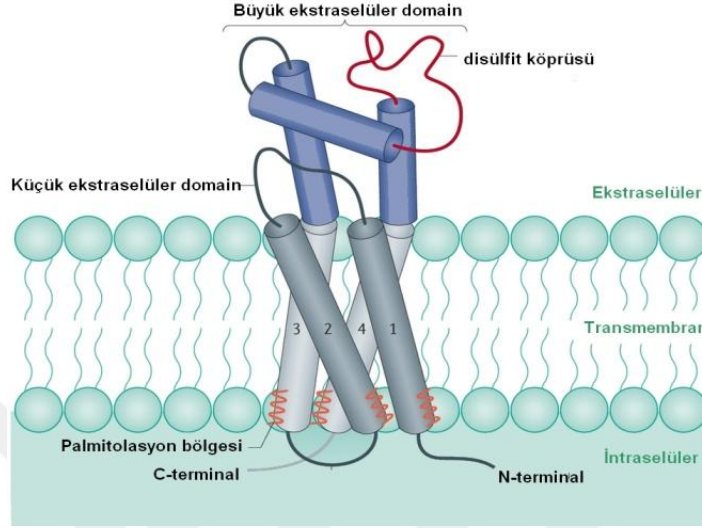
Buna ek olarak tüm tetraspaninlerde palmitolasyon (palmitoylation) ile modifiye edilmiş membranın uç kısmında tetraspanin-tetraspanin interaksyonunu sağlayan sistein rezidüleri bulunmaktadır [191]. Palmitolasyon, genel olarak sistein rezidülerinde meydana gelen post-traslasyonel asetilasyondur [188]. Palmitolasyon tetraspaninleri degedasyondan korurken kolesterol ve ganyositlere bağlanmasını sağlar [102, 192-194]. Palmitolasyon eksikliğinde, tetraspaninin diğer proteinlerle etkileşimlerinde değişimler, hücre içi iletişimde farklılık, biyosentez sırasında kararlılık ve hücre morfolojisinde değişim görülmektedir [195, 196]. Tetraspaninlerin organize domainleri birbirlerine ve diğer yüzey proteinlerine bağlanmalarını sağlayan sistem tetraspanin-enriched mikrodoman (TEMs) ya da tetraspanin ağı olarak adlandırılmaktadır. Bu yapılar hücre membranının bölümlere ayrılmasına (kompartuman) katkı sağlar [197].

Genel olarak; hücre aktivasyonu, büyümesi, farklılaşması, adezyonu ve hareket etmesinde görevli olan tetraspaninlerden bazılarının fonksiyonları daha net aydınlatılmıştır. TSPAN7, CD9 ve CD81 sperm-yumurta birleşmesinde CD9 ve CD151 patojen enfeksiyonunda, CD9, CD151 ve TM4SF12 vasküler fonksiyonların organizasyonunda, CD9 ve CD63 immün yanıt oluşmasında, TSPAN3, TSPAN4 ve TSPAN5 beynin fizyolojik işlevinde, CD151, CD81, CD82 ve TSPAN8 kanserde etkili olduğu gösterilmiştir [198-200]. CD91 ve TSPAN8'in onkojenik aktiviteyi sergiledikleri varsayılırken, CD9'un pro-veya anti-kanser özellikleri hala netleşmemiştir. Bu iki genin aksine CD82 metastaz baskılayıcı olarak davranmaktadır [201].

1.9 Tetraspanin 8 (TSPAN8)

Tetraspanin ailesinin bir üyesi olan TSPAN8, TM4SF3 (transmembran 4 superfamily 3), CO-029, ve farelerde D6.1A olarak da isimlendirilirler [202]. TSPAN8 bütün tetraspaninlerde olduğu gibi dört transmembran domain bulunduran hücre yüzeyi glikoproteinidir (Şekil 1.7) ve insan genomunda kromozom 12 üzerinde bulunmaktadır. Kanser hücrelerinin hayatta kalması, migrasyonu, metastazı ve tümör anjiyogenezi gibi süreçlerde görev alan TSPAN8 ilk olarak mide-bağırsak tümörlerinde belirlenmiş ve yemek

borusu karsinomu, hepatoselüler karsinom, pankreas, kolorektal, karaciğer ve gastrik kanserlerinin çeşitli tiplerinde yüksek derecede ifade edildiği gösterilmiştir [203-206].



Şekil 1.7: TSPAN8 proteininin hücredeki konumu. [201]'den adapte edildi.

DeneySEL verilerden yola çıkılarak, TSPAN8'in kanserdeki rolünü açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. TSPAN8'in kanser hücrelerinin migrasyon ve metastaz özelliklerinde etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir [207]. Metastazda eksozomal tetraspaninlerin merkezi bir rolü olduğuna dair güçlü kanıtlar sunulmaktadır. Eksozomlar ekstra selüler matriksin modüle edilmesiyle invazyon ve hücrelerin hareketini (motiliteyi) kolaylaştırır. TSPAN8 ve CD151'in integrinler ve proteazlar ile ilişkilerinden dolayı, doğrudan eksozomal süreçte devreye girmektedirler. Eksozomlar, enflamatuvar bir yanıtta hematopoietik hücreleri uyarır ve stroma hücrelerinde proteaz ve kemokin / kemokin reseptör ekspresyonunu başlatır [187, 191, 208]. En önemlisi, eksozomlar metastatik olmayan hücrelerde epitel-mezenşimal geçişi (EMT) uyarır. TSPAN8 eksozom oluşumu başlatılan hedef hücrede, CIC (cancer-initiating cells) aktivasyonu ve yeniden programlama için gereklidir [209].

TSPAN8, ADAM12'nin ekspresyonunu artırarak invazyonda hücre adezyon molekülleri ile etkileşimi nedeniyle hücre adezyonu ve hareketliliğinde rol oynadığı gösterilmiştir [209]. TSPAN8 proteinleri, ADAM10'un endoplazmik retikulumdan (ER) çıkışını düzenler. Bir transkripsiyon kofaktörü olan ADAM10, Notch'in kesilerek olgunlaşmasına aracılık eder ve böylece sitoplazmik alanda serbest kalmasını sağlar [210]. ADAM10'un, Notch'in bölünmesine aracılık etmede ve dolayısıyla bir transkripsiyon kofaktörü olan sitoplazmik alanının serbest bırakılmasında kilit rolüne bağlı olarak, TSPAN8

proteinlerinin Notch sinyallemesini düzenlediği düşünölmüştür [211]. TSPAN8 ayrıca EGF sinyallemesine müdahale eder, yaygın koagülopati indükler ve ekzosom sekresyonu yoluyla anjiyogenezini teşvik eder [204, 212].

Nude farelerde TSPAN8'e özđü antikörler, uydulandığında metastaz görölmelerini, hücre motilitesini, anjiyogenezini, ksenograft-tümör büyümesini azalttığı görölmüştür [213, 214]. Ayrıca, TSPAN8 mRNA da son zamanlarda kolorektal kanser (CRC) tespiti için oldukça hassas ve spesifik bir kan biyomarkeri olarak tanımlanmıştır [215]. Genel olarak, bu veriler TSPAN8'in insan karsinomlarında umut verici bir tedavi hedefi olabileceğini desteklemektedir.



1.10 Tezin Amacı

Pankreatik kanserler tanısı ve tedavisi zor olan kanser türlerindedir. Dünya üzerinde 4. ölümcül kanser olarak bilinmektedir. Teşhisin zorluğundan dolayı hastalığın geç evrelerinde tedaviye başlanır, genellikle uzak doku metastazı görülür ve hastaların sağ kalım oranı yaklaşık olarak %5'tir. Pankreas kanserinin moleküler temellerinin aydınlatılması, erken teşhis ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi çok önemlidir. TSPAN8 birçok kanser türünde metastatik karakterden sorumlu bir genidir. Hızla gelişen pankreas kanserinin merkezinde kötü prognoz ile ilişkili hipoksik ortam yer almaktadır. Katı tümörlerde belirteç olarak kullanılan CA9 aynı zamanda tümörün mikroçevresinde oksijen ve pH değişimine adapte olmasını sağlamaktadır. Literatürde birçok araştırmacı tarafından farklı kanser tiplerinde yüksek düzeyde ekspresyon olan genlerin susturulması ile tümör hücrelerin karakteristik özelliklerinde değişiklik olduğu gösterilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda pankreatik kanserlede yüksek düzeyde ifade olan CA9 ve TSPAN8 genlerini hedef aldık. Genlerin *in vitro* ve *in vivo*'da siRNA ile susturulması ve pankreas kanseri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Amacımız doğrultusunda aşağıda belirtilen deney basamaklarının yapılması planlanmıştır.

1-) Pankreas kanser hücre hatları, Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin ifadesinin hipoksik ve normal oksijen koşullarında belirlenmesi.

2-) Hipoksik ve normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının doğrulanması.

3-) Hipoksik ve normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının hücre proliferasyonu, invazyon kabiliyeti ve klonojenik özelliklerindeki etkilerinin belirlenmesi.

4-) Hipoksik ve normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması sonucunda meydana gelebilecek apoptotik ve otofajik ölüm mekanizmalarında etkili genlerin ve proteinlerin seviyelerinin belirlenmesi.

5-) Farelerde xenograft tumor modeli oluşturulması ve tümör oluşturulmuş farelerde CA9 ve TSPAN8 genlerinin lipozomal siRNA'larının uygulaması ile susturulması. Farelerin sakrifikasyonu ile tümör büyüklüğünün belirlenmesi. Tümör dokusunun histokimyasal analizi. Tümör Dokularında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının apoptoz ile ilişkili proteinlere etkisinin belirlenmesi.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Malzemeler

2.1.1 Çalışmada kullanılan gereçler

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
-20°C ve +4°C Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
-80°C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, ABD GFL, Almanya
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair, ABD
DNA elektroforezi	Minicell Primo
Etüv	WTB German, Nüve Türkiye
Hassas Terazı	Sartorius, Almanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Isıtılmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Jel Görüntüleme	UVP, İngiltere
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Luminometre	Thermo, ABD
Mikro santrifüj	Thermo, ABD
Otoklav	Hırayama, Japonya
Otomatik pipetler	Finnpipette
pH Metre	WTW, Almanya
PZR cihazı	Biolab, Thermo
Qubit	İnvitrogen
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa.)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Almanya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Spektrofotometre	Thermo Scientific™ Multiskan GO
Vorteks	Elektromag, Türkiye

2.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler

Çalışmada kullanılan kimyasalların tümü moleküler biyoloji için uygun saflıktadır.

Tablo 2.2: Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler

Kimyasalın Adı	Firma
CA9 siRNA	Santa Cruz
CoCl ₂	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Dulbecco's Modified Eagle's Medyum (DMEM)	Gibco
EDTA	Sigma
Fetal Sığır Serum (FCS)	Sigma
Fosfat tamponu tabletleri (PBS)	Sigma
Kontrol siRNA	Santa Cruz
Opti-MEM	Gibco
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
siLentFect™ Lipid Reagent	BioRad
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Tripsin	Sigma
TSPAN8 siRNA	Santa Cruz
Guava ViaCount Reagent	Merck

Tablo 2.3: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler

Kimyasalın Adı	Firma
DEPC	Fisher Scientific
GeneJET™ RNA Purification Kit	Fermentas
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	BioRad
β -Merkaptoetanol	Sigma
Formaldehid	Sigma
oligodT	Fermentas
Ribolock Inhibitor	Fermentas
Reverse transcriptase enzimi	Fermentas

Tablo 2.4: Protein çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasalın Adı	Firma
Amonyum persülfat	Merck
CA9 antikor (monoklonal, anti-rabbit)	Sigma, Abcam
Mounting medyum	İnvitrogen
Page ruler plus prestained protein ladder (26619)	Thermo
Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo
PVDF Membran	Millipore
Sekonder antikor (monoklonal goat,anti-rabbit)	Abcam
Sekonder Antikor Floresans Dye	invitrogen
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma
Tris	Sigma
β -aktin antikor	Sigma
TSPAN8 antikor (monoklonal anti-goat)	Abcam
Alexa flour 488 (anti rabbit)	İnvitrogen
Alexa flour 568 (goat anti-mouse)	İnvitrogen

Tablo 2.5: *In vivo* çalışmalarda kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Firma
Dublbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Biological Industries (BI)
1,2-dioleoyl- sn-glycero- 3-phosphatidylcholine (DOPC)	Sigma
Tersiyer bütanol	Merck
Tween 20	Sigma
%0,9'luk tuz çözeltisi	Sigma
Dietileter	Merck
Hematoksilen	Merck
Eozin	Merck
ELİSA (Galaktin 3, Bcl-2, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9) ölçüm Kiti	Rel-assay
ApopTag© Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit	Merck Millipore
Ksilen	Sigma

2.2 Çalışmada kullanılan çözeltiler

2.2.1.1 Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler

Tablo 2.6: Hücre Pasajlamada kullanılan çözeltiler

%10 FCS içeren DMEM	45ml DMEM içerisine inaktive ve steril edilmiş FCS'den 5ml eklenir.
FCS	-20°de saklanan FCS 37 C° su banyosunda alt üst edilerek eritilir. 56 C° su banyosunda 30 dk inaktive edilir. 0,22 µm filtre ile steril edildi.
PBS	5 adet PBS tablet dH ₂ O içerisinde çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi. +4C°'de saklandı.
Tripsin EDTA	0,25gr Tripsin 0,2gr EDTA 100 ml 1xPBS içerisinde çözüldü 0,22 µm filtre ile steril edildi. Kısa süreli olarak +4C°'de uzun süreli olarak -20C°'de saklandı.

Tablo 2.7: siRNA transfeksiyonunda kullanılan çözeltiler

siRNA (100 nM)	Liyofilize haldeki siRNA dH ₂ O ile firmanın tavsiye ettiği şekilde çözülür. Çözünmüş siRNA transfeksiyonda kullanılm için optiMem ile sulandırılır
Transfeksiyon ajanı (siLentFect)	OptiMem ile 250:1 oranında sulandırılarak kullanılır.

Tablo 2.8: Sitotoksosite deneylerinde kullanılan çözeltiler

MTT Solüsyonu (5mg/ml)	Liyofilize haldeki MTT den 0,25gr tartılır 50 ml PBS içerisinde çözüldü. 0,22 µm filtre ile steril edildi. Işık almayacak şekilde +4C°'de saklandı.
0,0004M HCl içeren izopropanol	500 ml izopropanol içerisinden 210 µl çekilerek 210 µl saf HCl eklendi. Cam şişede parafilmle sarılarak oda sıcaklığında saklandı.

2.2.1.2 DNA ile ilgili tekniklerde kullanılan çözeltiler

Tablo 2.9: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

5X/L Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu pH:8,00	54g Tris Baz, 27,5g Borik Asit, 20ml 0,5M EDTA (pH:8,00) tartılır. Balon jojeye alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklavlanır
1kb DNA marker	1 µl (DNA ladder):1 µl (yükleme boyası):4 µl (steril distile su) oranlarında hazırlanır.
Etidyum Bromür Stok Solüsyonu	10mg/mL olacak şekilde steril dH ₂ O ile hazırlanır. Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede muhafaza edildi.

Tablo 2.10: PCR reaksiyonunda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

dNTP karışımı (10mM)	dATP, dTTP, dCTP, dGTP nükleotitlerinden 10 µl ve nükleaz içermeyen sudan 60 µl eklenerek 100 µl'ye tamamlandı.
Primer (100pmol/µl)	Ticari olarak alınan liyofilize haldeki primerler steril dH ₂ O ile çözülerek kullanıldı.

2.2.1.3 RNA ile ilgili tekniklerde kullanılan çözeltiler

Tablo 2.11: RNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

10XFA jel tamponu pH:8,00	41,9 gr MOPS (asit içermeyen), 6,8 gr Na-asetat.3H ₂ O, 20 ml 0,5M EDTA 1 lt'ye tamamlandı.
RNA marker	1 µl (DNA ladder):2 µl (yükleme boyası):2 µl (steril distile su) oranlarında hazırlandı.
Etidyum Bromür Stok Solüsyonu	10mg/mL olacak şekilde steril dH ₂ O ile hazırlandı. Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede muhafaza edildi.

2.2.1.4 Protein ile ilgili çalışmalarda kullanılan çözeltiler

2.2.1.4.1 Western blot tekniğindeki çözeltiler

Tablo 2.12: RIPA buffer hazırlanması

Kimyasalın adı	Son konsantrasyon
EDTA	1mM
EGTA	1mM
NaCl	140mM
Proteaz inhibitör kokteyl (Roche)	2 tablet
SDS	%0,1
Sodiumdeoksicholade	%0,1
TrisHCl (ph:8)	10mM
TritonX100	% 1
Son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.	

Tablo 2.13: Western Blot tekniğinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

10X Tris Buffered Saline	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4
Boyama Çözeltisi	0,25g Coomassie Brilliant Mavisi 250,100ml %95'lik Etanol, %10 Asetik Asit
Renk Açma Çözeltisi	%. 7,5 Asetik Asit, % 5 Metanol ve % 87,5 mL distile su hacimce eklendi.
SDS PAGE Ayırma Jeli Tamponu	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), % 10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yığıma Jeli Tamponu	1 M Tris-HCl (pH:6.8), % 10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 (w/v) SDS
Temizleme Tamponu	1M Glycine, % 1SDS, pH 2.5
Western Blot Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol

2.2.1.4.2 İmmüofloresans yönteminde kullanılan çözeltiler

Tablo 2.14: İmmüofloresans yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Triton X 100	PBS ile %0,3 olacak şekilde seyreltilir.
Bovine Serum Albumin (BSA)	1gr tartılır ve üzerine 10ml PBS eklenerek son konsantrasyonu %10 olacak şekilde tamamlanır
Paraformaldehid	Stok çözelti %16'lık olacak şekilde hazırlanır. 16 gr paraformaldehid tartılır üzerine saf su eklenir ve 80°C'de magnetik karıştırıcıda eritilir. Filtreden geçirilerek steril edilir. Kullanılırken %4'e seyreltilir.

2.2.1.4.3 Flowsitometri yönteminde kullanılan çözeltiler

Tablo 2.15: Flowsitometri yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Bovine Serum Albumin (BSA)	1 gr tartılır ve üzerine 10 ml PBS eklenerek son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde hazırlanır.
Formaldehid	PBS ile %4'e seyreltilerek kullanılır.

2.2.1.5 *In vivo* çalışmalarda kullanılan çözeltiler

Tablo 2.16: *In vivo* çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Nötral Tamponlu Formaldehit (%10'luk)	Hacimce 1: 9 oranında, Nötralize edilmiş formalin : % 95'lik alkol olacak şekilde hazırlanır.
Hematoksilen Eozin (HE)	2 gr hematoksilini, 0,2 gr sodyum iyodatı ve 17,6 gr alüminyum sülfatı (x18 H ₂ O), 250 g etilen glikol ve 730 mL distile sudan oluşan bir karışımda çözülür. 20 mL asetik asit eklenir, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. Filtre edilir. Eosin H ₂ O ile çözülür. Çözeltiye % 95 oranında alkol eklenir. Son karışıma birkaç damla asetik asit eklenerek bulanık bir çözelti elde edilir.

2.3 Kullanılan Yöntemler

2.3.1 *In Vitro* Teknikler

2.3.1.1 Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması

Panc-1 ve MiaPaca-2 hücreleri 5 ml medyumda 25 cm² flasklarda, içerisinde % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi. Pasajlama işlemi 75 cm² flaskta büyüyen hücreler yüzeyi % 80 oranında kapladıklarında, içerisindeki medyum (DMEM, Gibco) uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS (sigma) ile yıkandı ve 3 ml Tripsin-EDTA eklendi. 3-5 dakika 37 C° olan CO₂'li inkübatörde Tripsin-EDTA'nın hücreleri yüzeyden kaldırabilmeleri için inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda yüzeyden kalkan hücrelere %10 FCS içeren DMEM eklendi ve falkonlara alınan hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücreler taze %10 FCS'li medyum içinde çözülerek flasklara eşit olarak paylaştırıldı. 75 cm²'lik flaskların son hacmi 15 ml'ye tamamlanarak %5 CO₂'li inkübatörde 37 C° de büyütüldü.

2.3.1.2 Canlı hücrelerin belirlenmesi ve hücre sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, hemositometre lamı kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypanblue (1:1 dilüsyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmaz ve boyanmamış hücreler sayılarak belirtilen formüle [1 ml'deki hücre sayısı = sayılan hücre x sulandırma katsayısı (trypanblue) x 10⁴ (thoma lamının hacmi)] göre hesaplandı.

2.3.1.3 Hipoksik ortam oluşturulması

Hücrelerin bulunduğu ortama 150 µM son konsantrasyonda CoCl₂ eklenerek hücreler hipoksik koşullar için uyarıldı.

2.3.1.4 siRNA transfeksiyonu

75 cm² flaskta büyümekte olan adherent hücreler yüzeyi % 80 oranında kapladıklarında, içerisindeki medyum (DMEM, Gibco) uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez steril PBS (sigma) ile yıkandı ve 75 cm² flasklara tripsinizasyonla hücreleri yüzeyden kaldırmak için 3 ml Tripsin-EDTA eklendi. 3-5 dakika CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Canlı hücre sayısı yukarıda belirtildiği gibi hesaplandı. Hücre sayısı belirlendikten sonra 6 kuyucuklu plaka için hücre sayısı 2x10⁵ hücre / kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Her kuyucuğun son hacim 2 ml olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM medyum ile tamamlanmıştır. Hücre ekiminin ardından 24 saat adherent hücrelerin yüzeye yapışması için bekletildi. 2. gün medyum uzaklaştırıldı optimum ile hücreler yıkandı ve siRNA uygulaması (Silent-Fect) 100 nM son konsantrasyonda uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra sonuçlar alındı.

2.3.1.5 Sitotoksisite deneyi (MTT testi)

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekim yapıldıktan sonra siRNA transfeksiyonları yapıldı ve 24, 48 ve 72 saat sonra MTT solüsyonu eklenerek 4 saat inkübe edildi. Medyum ve MTT solüsyonu uzaklaştırılarak oluşan formazan kristalleri 0,0004 HCl içeren izopropanol ile çözüldü. Spektrofotometre ile 550nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. İstatistikleri MiniTab14 programı ile yapıldı. p<0,05'ten küçük değerler anlamlı olarak alındı.

2.3.1.6 Hücre canlılığının flow sitometri ile tespit edilmesi

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve ertesi günü hücrelere siRNA transfeksiyonları yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı. Pelletler PBS ile yıkandı ve 1X10⁶ hücre/mL olacak şekilde taze PBS ile çözüldü. 50µl alınarak 450µl via count solüsyonu ile karıştırıldı. Flow sitometride (Guava) via count programında okunarak canlı ve ölü hücreler tespit edildi.

2.3.1.7 Klonojenik yöntem

Hücreler %10 FCS içeren medyum içerisinde büyütüldü. Yoğunluğu %80-90 oranına gelen hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Sayılan Panc-1 ve MiaPaca-2 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara 3×10^3 olacak şekilde ekildi. Bir gece inkübatörde tutunmaları için beklendi. Ertesi gün siRNA transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyon 100nM son konsantrasyon olacak şekilde Kontrol, CA9, TSPAN8 (Santacruz) siRNA'larından, optimem (Gibco) ile dilüe edildi ve siLentFect Lipid Reagent kullanılarak (BİORAD) firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Transfeksiyondan sonra hücrelerin büyümesi mikroskop ile gözlemlendi 10. günün sonunda deney sonucu alındı. Koloniler kristal viyole ile 5 dk boyandı. Saf su ile 5 dakikalık 3 yıkama yapıldı. Kolonilerin görüntülenmesi tarayıcıyla (HP) 600 dpi'da ve fotoğraf makinası ile yapıldı. Kolonilerin sayımı clono counter programı ile yapıldı. Her kuyucuk için bütün alan seçilerek sayım yapıldı (kuyucukların %100 alanı sayıldı). Alandaki koloni sayılarına göre grafikler oluşturuldu.

2.3.1.8 Hücre invazyon yöntemi

Matrigel buz üzerinde çözüldü. 3 ml soğuk serum içermeyen media ile 200 µl matrigel 15 ml falkon içinde karıştırıldı ve buzda tutuldu. 12 kuyucuklu plakadaki her kuyucuğa porlu bir yapıya sahip olan insert yerleştirildi. Insert yerleştirilmiş her bir kuyucuğa matrigel-media karışımından 200 µl ilave edildi. 30-60 dk hiç kıpırdatmadan matrigelin polimerleşmesi için inkübatöre bırakıldı. Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, kontrol siRNA ve CA9 siRNA uygulanan hücrelerin sayımı yapıldı ve hücreler ekim için hazırlandı. Hücreler ekim yapılmadan önce polimerleşen matrigelle dokunmadan üzerindeki media uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen media içinde ekim yapıldı. Serum içeren media insert ile kuyucuklu plaka arasındaki alana koyuldu ve 3 gün 37 °C de %5 CO₂ ortamda inkübe edildi. Süre sonunda protokole uygun olarak %4'lük formaldehid ile fiksasyon yapıldı. PBS ile yıkamadan sonra metanol ile hücrelerin permabilizasyonu sağlandı ve PBS ile yıkandı. Giemsa ile 15 dk boyamanın ardından boya uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. İnsertlerin iç yüzeyinde kalan hücreler (diğer tarafa invaze olmayan hücreler) pamuklu çubuk yardımıyla uzaklaştırıldı ve insert lam üzerine alınarak ışık mikroskopunda sayıldı. Fotoğraflanan alan İmageJ programında analiz edildi. Bunun için 5 farklı alandaki hücreler sayılarak alanların ortalamalarından grafik oluşturuldu.

2.3.1.9 Migrasyon yöntemi (Scratch deneyi)

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyuya 500.000 olacak şekilde ekildi, hücrelerin tüm yüzeye tutunması ve kaplanması beklendi. siRNA transfeksiyonları yapıldı. Kontrol hücreleri ve siRNA transfekte edilmiş hücreler standart olacak şekilde 10 µL beyaz pipet ucu yardımıyla kuyucuğun ortasına artı şeklinde çizik atıldı ve inkübatöre geri yerleştirilmeden 0. Saatte fotoğraflandı. Kuyucuklar 24. saatte ve 48. saatlerde yeniden fotoğraflandı. Çizik arasının ne kadar hızlı kapandığı yani hücre göçü iyi bir şekilde fotoğraflanıp takip edildi. Fotoğraflar İmage J programı ile analiz edildi (MRI Wound HealingTool). Kontrol grupları ile siRNA transfekte edilmiş gruplar karşılaştırılarak hücrelerin % göç etmeleri hesaplandı. %alan kapanma oranı= [(0.saat hasar alanı – 24.saat hasar alanı) / 0. saat hasar alanı] X100.

2.3.1.10 RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için Fermentas RNAasy kit kullanıldı. Kısaca, taze hücre pelletleri alındı ya da pellet haline getirilerek RNA izolasyonları için -80 C° dondurucuda saklanan örnekler buz üzerinde dikkatlice çözüldü. Kitteki protokole uygun olacak şekilde RNA izolasyonu yapıldı. RNA örnekleri uzun dönemde -80 C° dondurucuda saklandı. İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayini için Qubit kullanıldı.

2.3.1.11 RNA jel elektroforezi ve RNA miktar tayini

Elektroforez tankı ve aparatları jel dökülmeden önce %0,5'lik SDS ile yıkandıktan sonra DEPC'li sudan geçirildi. Daha sonra etanol ile yıkandıktan sonra peçete üzerinde kurumaya bırakıldı. 0,5 gr agaroz, 5 ml 10X FA jel tampon ve 45 ml DEPC'li su mikrodalgada kaynatıldı ve buharlaşma bitene kadar soğumaya bırakıldı. 900 µl %38'lik formaldehit ve etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Jel donduktan sonra kaset 1XFA jel tamponu ile doldurulan tanka yerleştirildi. 5 µl RNA örneği ve 3 µl 2X yükleme boyası 65°C'de 3-5 dakika bekletildi ve buzda 2dk soğutulduktan sonra kuyulara yüklendi. Daha sonra RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayini için Qubit ve spektrofotometre kullanıldı. Qubit ile uygun tampon çözelti ile RNA örneği karıştırılarak ölçüm alındı. Spektrofotometrik olarak ise 260 nm ve 280 nm'de absorbansları alındı.

2.3.1.12 Polimeraz zincir reaksiyonları ile cDNA sentezi

İlk olarak Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlenmesi gerçekleştirilmiş ikinci basamakta ise gene spesifik primerler ile ilk basamakta elde edilen cDNA kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) gerçekleştirilmiştir. Miktarları belirlenen RNA örneklerinden 1000 ng olacak şekilde RNA kalıbı kullanılarak RT-PCR yapıldı. RT-PCR aşağıdaki tabloya uygun olarak her deney grubu için tekrarlandı. cDNA kalitesi insan-β-2-mikroglobulin spesifik PCR yapılarak kontrol edildi.

2.3.1.13 Real Time-PCR analizi

Real Time PCR için Roche Light Cycler 480 kullanıldı. Elde edilen cDNA'lar ile spesifik primerler (Tablo 3.17, Tablo 3.18, Tablo 3.19) kullanılarak syber green (Roche) ile uygun programlar kullanılarak (Tablo 3.20, Tablo 3.21, Tablo 3.22) Real time PCR gerçekleştirildi. Real time PCR analizlerinde normalizasyon için insan-β-2-mikroglobulin kullanıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi [216]. Sonuçlar MiniTab14 programı ile istatistikî olarak karşılaştırıldı.

$$Ct_{\text{insan-}\beta\text{-2}} - Ct_{\text{örnek}} = \Delta Ct$$

$$\text{Hedef Ct değeri} = 2^{-\Delta Ct}$$

Tablo 2.17: Kullanılan primerlerin bilgileri

Primerin adı	Tm	Dizi	Uzunluk	Erişim numarası
CA9 F	63	5'-TCTCATCTGCACAAGGAACG-3'	350 bp	NM_001216
CA9R	63	5'-ACTTCAGCCGCTACTTCCAA-3'		
TSPAN8 F	63	5'-TCTATGGTCCTGTATTGCCAGAT-3'	139 bp	XM_006719583
TSPAN8 R	65	5'-GACAGCTGCTCCTGACTTATATA-3'		
İns beta-2 F	55	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'	313 bp	NM_004048
İns beta-2 R	55	5'-CATGTCTCCATCCCCTTA-3'		

Tablo 2.18: Apoptotik primerler

Primerin adı	Tm	Dizi	Uzunluk	Erişim numarası
Bax F	52	5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3'	160bp	XM_006723313
Bax R	52	5'-TCCTCTGCAGCTCCATGTTA-3'		
Bak F	52	5'-ACCAGCCTGTTTGAGAGTGG-3'	160bp	NM_001188
Bak R	52	5'-AGTGATGCAGCATGAAGTCG-3'		
Bcl-XL F	52	5'-TCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAA-3'	354bp	Z_23115
Bcl-XL R	52	5'-CCCCATCCCGGAAGAGTTCATTCA-3'		
Bcl-2 F	61	5'-CTGCACCTGACGCCCTTACC-3'	164bp	B_C027258
Bcl-2 R	61	5'-CACATGACCCACCGAACTCAA-3'		
p27 F	62	5'-ATGTCAAACGTGCGAGTGTC-3'	146bp	NM_004064.3
p27 R	62	5'-TCTCTGCAGTGCTTCTCAA-3'		
SiklinD2 F	62	5'-TGGGGAAGTTGAAGTGAAC-3'	174bp	NM_001759.3
SiklinD2 R	62	5'-ATCATCGACGGTGGGTACAT-3'		

Tablo 2.19: Otofajik primerler

Primerin adı	Tm	Dizi	Uzunluk	Erişim numarası
Beklin-1 F	58	5- TGTCACCATCCAGGAACTCA-3	180 bp	XM_005257760.2
Beklin-1 R	58	5-CTGTTGGCACTTTCTGTGGA-3		
LC3-II F	61	5-GAGAAGCAGCTTCTGTTCTGG-3	138 bp	XM_011538652.1
LC3-II R	61	5-GTGTCCGTTACCAACAGGAAG-3		
ATG3 F	55	5-TCACAACACAGGTATTACAGG-3	240 bp	XM_011513074.1
ATG3 R	55	5-TCACCGCCAGCATCAG-3		
ATG5 F	57	5-GGGAAGCAGAACCATACTATTTG-3	223 bp	XM_011536263.1
ATG5 R	57	5-AAATGTACTGTGATGTTCCAAGG-3		
ATG7 F	57	5-AGGAGATTCAACCAGAGACC-3	191 bp	XM_011533286.1
ATG7 R	57	5-GCACAAGCC CAAGAGAGG-3		
ATG12 F	55	5-TCTATGAGTGTGTTTGGCAGTG-3	171 bp	NM_001277783.1
ATG12 R	55	5-ATCACATCTGTTAAGTCTCTTGC-3		

Tablo 2.20: CA9, TSPAN8 ve insan- β -2 mikroglobilin primerleri ile yapılan realtime PCR koşulları

	Döngü	Süre	Sıcaklık
Ön-inkübasyon	1	10'	95 C°
Amplifikasyon	40	10''	95 C°
		10''	51 C°
		10''	72 C°
Erime eğrisi	1	10'	72 C°
Soğuma	1	30''	40 C°

Tablo 2.21: Apoptoz ilişkili genler için kullanılan Real time PCR koşulları

	Döngü	Süre	Sıcaklık
Ön-inkübasyon	1	10'	95 C°
Amplifikasyon	40	10''	95 C°
		10''	55 C°
		15''	72 C°
Erime eğrisi	1	5''	95 C°
		1'	65 C°
Soğuma	1	30''	40 C°

Tablo 2.22: Hücre döngüsü ile ilişkili SiklinD ve p27 genleri için kullanılan Real time PCR koşulları

	Döngü	Süre	Sıcaklık
Ön-inkübasyon	1	10'	95 C°
Amplifikasyon	40	10''	95 C°
		10''	62 C°
		15''	72 C°
Erime eğrisi	1	5''	95 C°
		1'	65 C°
Soğuma	1	30''	40 C°

Tablo 2.23: Otofaji ilişkili genler için kullanılan Real time PCR koşulları

	Döngü	Süre	Sıcaklık
Ön-inkübasyon	1	2'	95 C°
Amplifikasyon	40	15''	95 C°
		40''	52 C°
		15''	72 C°
Erime eğrisi	1	5''	95 C°
		1'	65 C°
Soğuma	1	30''	40 C°

2.3.1.14 Western Blot

Western blot çalışmaları için 6 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. 6 kuyucuklu plakalar için 5×10^5 hücre ekilen hücreler, deney sonunda 100 μ l Ripa buffer (Tablo 2.12) eklenerek kazıyıcı ile kazındı ve eppendorflara aktarıldı. Eppendorf buz üzerinde 45 dk liziz olması için inkübe edildi. Bekleme sürecinde 10 dk'lık aralarla yavaşça pipetaj yapılarak karıştırıldı. 45 dk sonunda 12000 rpm'de +4C° 'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant alınarak yeni eppendorfa aktarıldı. Bu basamakta ya direkt SDS PAGE uygulaması için kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -80 C° de saklandı. Protein miktarı Qubit sistemi kullanılarak belirlendi.

Elektroforez aparatları ve cam levhalar; su, %70 etanol ve izopropanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli (Tablo 2.13) hazırlanarak, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü ve hemen üzerine %90 izopropanol ilave edilerek hava kabarcığı oluşumu engellendi. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak ddH₂O ile yüzey yıkandı ve Whatman 3MM kâğıdı ile yüzey kurutuldu. Ardından yığma jeli (Tablo 2.13) dökülerek yükleme yapılacak kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi. Yığma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarıldı ve kuyucuklardaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için yine ince şeritler halinde kesilmiş Whatman 3MM kâğıdı kullanıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi. Örneklerin yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel, 1X Running Buffer ile doldurulan tankta 90 volt ve 400 mA akım olan elektroforetik sistemde yaklaşık 60-75 dakika yürütüldü.

Islak sistemle yapılacak proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanıldı. Kısaca, jeller, Whatman 3MM kağıt ve PVDF membranlar jel ile aynı boyutlarda

kesilerek sandviç hazırlandı. Bunun için sırasıyla elektrik akımının geleceği yön dikkate alınarak transfer kasedi arasına sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde dizildi. Daha sonra kaset, soğuk transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve bir gece +4°C'de transfer edildi. Trans blot turbo transfer sistemi ile yapılacak proteinlerin transferleri için PVDF (Millipore) membranlar ve sistemle beraber gelen solüsyonlar kullanıldı. PVDF membranlar jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Sistemin iç yüzeyi ve süngerler, 1X transfer buffer ile ıslatıldı. Transfer sırasıyla sünger, membran, jel, sünger, konuldu ve kaset kapatıldı. Jelin kalınlığı büyüklüğü ve yoğunluğuna göre akım ve süresi ayarlanarak yapıldı.

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 10 ml bloklama çözeltisinde 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama yapılarak membran yıkandı, bunun için %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı. Sonra membran primer antikor ile 1 saat oda sıcaklığında veya O/N 4°C de horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. Primer antikorlar (CA9 1: 1000, TSPAN8 1:1000, β-aktin 1:5000 LC3 1: 1000, Baclin-1 1:1000) %5 (w/v) BSA ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS içinde hazırlandı. Süre sonunda primer antikor çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama yapılarak membran yıkandı, bunun için %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı. Daha sonra uygun sekonder antikor kullanılarak [horseradish peroxidase-conjugated, anti-rabbitIgG, anti-mouseIgG ya da anti-goatIgG, 1:2000-1:10,000 oranında sulandırılmış, %5 (w/v) BSA ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS] 1 saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. Son basamakta tekrar yukarıda belirtildiği gibi yıkama işlemleri tekrar edilerek membran yıkandı Membranlar alınarak proteinlerin belirlenmesi için karanlık odaya transfer edildi. Membrana bağlı antikorlarla spesifik olarak işaretlenmiş proteinlerin belirlenmesi için ECL (Enhanced Chemi-Luminescent) kit kullanıldı. Membranlar X-Ray filmi üzerine alınıp ve 10 saniye ile 1 saat arasında değişen sürelerde, sinyal gücüne bağlı olarak, kasetler içinde bekletildi. Daha sonra film banyo edilerek marker işaretlendi. Oluşan bantlar dansitometrik analiz programı İmageJ ile karşılaştırıldı.

2.3.1.15 İmunofloresans yöntemi

24 kuyucuklu plakalara lameller yerleştirildikten sonra her kuyuya hücreler 250.000 olacak şekilde paylaştırıldı. Bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra siRNA uygulamaları yapıldı. İnkübasyondan 48 saat sonra sonuçlar alındı. Medyum uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 2 kere PBS ile yıkandı. %4'lük formaldehit ile hücreler fikse edildi. %10 BSA içeren PBS ile

spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 60 dakika bloklama işlemi gerçekleştirildi. PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra primer antikor ile hücreler nem çemberi (humiditychamber) içerisinde +4°C’de inkübe edildi. Primer antikor uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. 30 dakika sekonder antikor ile muamele edildi. Akridine orange ile boyamada hücrelere 1µg/ml olacak şekilde A.O PBS içerisinde hazırlanarak yaklaşık 10dk oda sıcaklığında muamele edildi. PBS ile yıkama işleminden sonra yuvarlak lameller lamalar üzerine damlatılmış olan 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI, 1/10.000, Sigma) ve anti fade mounting medyum (İnvitrogen) üzerine hücreler arada kalacak şekilde kapatıldı. Görüntüler florasan mikroskobu (Nikon, Japan) kullanılarak elde edildi (40x büyütme).

2.3.1.16 Flow sitometri ile protein analizi

6 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelere ertesi günü siRNA transfeksiyonları yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin ortamında bulunan medyum uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 2 kere PBS ile yıkandı. Hücreler tutundukları yüzeyden Tripsin/EDTA ile kaldırıldı. %4'lük formaldehit ile hücreler fiske edildi. %10 BSA içeren PBS ile spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 60 dakika bloklama işlemi gerçekleştirildi. PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra primer antikor ile hücreler nem çemberi içerisinde +4°C’de inkübe edildi. Primer antikor uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Sekonder antikor 30 dakika uygulandı. PBS ile yıkama işleminden sonra PBS ile çözüldü ve flow sitometri ile okundu.

2.3.1.17 siRNA ve kemoterapi ajanlarının beraber uygulanması

Hücreler (5.000 hücre/kuyucuk), 96 kuyucuklu plakaya ekildi Transfeksiyon 50 nM son konsantrasyon olacak şekilde Kontrol, CA9, TSPAN8 (Santacruz) siRNA’larından, optimum (Gibco) ile dilüe edildi ve siLentFect Lipid Reagent kullanılarak (BİORAD) firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler, farklı konsantrasyonlarda cisplatin (0,5-5-25-50-100 µg/ml) ve epirubisin (0,1-1-10-100-500 µg/ml) eklenerek 24 saat daha inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler MTT solüsyonu eklenerek 4 saat muamele edildi. Medyum ve MTT solüsyonu uzaklaştırılarak oluşan formazan kristalleri 0,0004 HCl içeren izopranoil ile çözüldü. Spektrofotometre ile 550nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. İstatistikleri MiniTab14 programı ile yapıldı. p<0,05’ten küçük değerler anlamlı olarak alındı.

2.3.2 *In Vivo* Teknikler

2.3.2.1 Farelerin bakımı

İmmün sisitemleri baskılanmış inbred CD-1 türü nude fareler Kobay Deney hayvanları A.Ş.'den temin edilmiştir. Etik kurul izni kobay deney hayvanları yerel etik kurulunun 185 protokol numaralı izni alınarak işlemler gerçekleştirilmiştir. Hayvanların rutin bakımı ve barınması da yine Kobay Deney Hayvanları laboratuvarı tarafından sağlanmıştır. Hayvanlar DS Diet VRF1(P) Irr. 10 Kgy Irradiated Diet ile adlibitum (yem ve su sürekli önünde) olarak 12 saat gece 12 saat gündüz ışık periyodunda IVC kafeslerde barındırılmıştır.

2.3.2.2 Pankreas kanser modeli oluşturulması

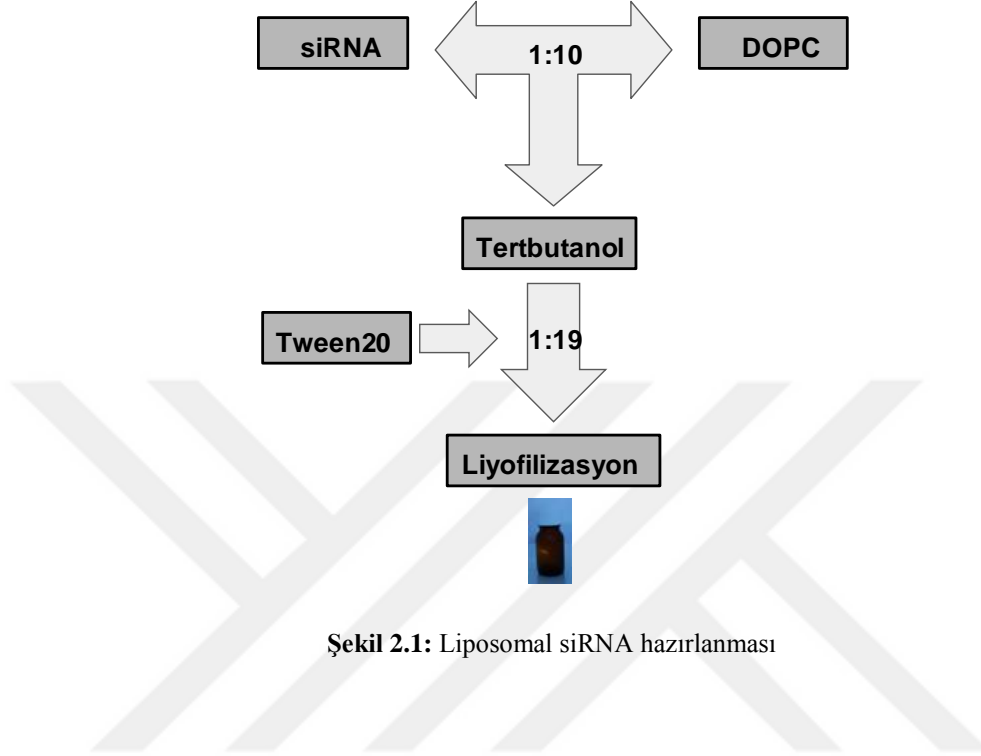
Tümör oluşturmak için tüm farelere Dublbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) içinde süspanse edilmiş 1×10^7 Panc-1 hücresi insülin iğnesi kullanılarak subcutan olarak enjekte edildi. Her bir fare için ayrı bir insülin enjektörü kullanılmış ve subcutan enjeksiyon bölgesi olarak karın bölgesinde sağ diz hizası ile median hattın ortası seçilmiştir.

Enjeksiyondan dört hafta sonra, bakımına devam edilen farelerde oluşan tümörün büyüklüğü fotoğraflanarak belirlenmiştir. Tümör modeli oluşturulan 30 fareden rastgele 6 fare seçildi, negatif kontrol için uygulama yapılmayan NT grubu, siRNA uygulamaları yapılan (siKont, siCA9 ve siTSPAN8) gruplar ve pozitif kontrol için pankreas kanseri tedavisinde kullanılan Gemstabin grubu olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır.

2.3.2.3 Lipozomal siRNA'nın hazırlanması

siRNA'ların *in vivo* taşınması için doğal lipozomlar ile birleştirilmektedir. Bu amaçla, kullanılan siRNA'lar DOPC (1,2-dioleoyl- sn-glycero- 3-phosphatidylcholine, Sigma) ile organik çözücü olan çok miktarda tersiyer bütanol (Merck) varlığında eklenerek 1:10 (w/w) siRNA/DOPC oranında birleştirildi. Daha sonra karışıma 1:19 oranında Tween 20:siRNA/DOPC olacak şekilde çözeltiye Tween 20 (Sigma) eklendi. Söz konusu karışım vorteks ile karıştırıldı ve -20'de kısa bir süre inkube edilerek liyofilizatorde liyofilize edildi (Şekil 7). siRNA örnekleri her bir uygulama için ayrı ayrı dozlar şeklinde hazırlandı. 4 hafta

boyunca haftada iki kez uygulama yapılacağı için, kontrol siRNA için 8 ayrı tüp, CA9 siRNA için 8 ayrı tüp ve TSPAN8 siRNA için 8 ayrı tüpte liyofilizasyon yapıldı. Uygulama öncesi siRNA'lar %0,9'luk tuz çözeltisinde çözülerek taze olarak hazırlandı. Hazırlanan lipozomal siRNA'lar +4°C'de saklandı.



Şekil 2.1: Liposomal siRNA hazırlanması

2.3.2.4 Lipozomal siRNA'ların uygulanması

Fareler holder içine alınarak sabitlenmiştir ardından Gemcitabine ve liposomal siRNA uygulamaları farenin kuyruk veninden 26 Gauge insülin enjektörleri kullanılarak yapılmıştır. Liyofilize haldeki Tween20/siRNA/DOPC karışımları (Kontrol siRNA, CA9 siRNA ve TSPAN8 siRNA) %0.9'luk tuz çözeltisinde çözüldü ve 150 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde kuyruk veninden enjeksiyonları yapılmıştır. Gemcitabine uygulaması 50 mg/kg olacak şekilde kuyruk veninden enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyonlar haftada iki kez olmak üzere 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrası hayvanların rutin bakımlarına devam edilmiştir.

2.3.2.5 Farelerin sakrifikasyonu ve dokuların elde edilmesi

Deney sonunda tüm hayvanlar eterle anestezi altında iken servikal dislokasyon ile ötenazi yapıldı. Tümör dokusu alındı ve fotoğraflandı. Tümör büyüklüğünün belirlenmesinde tümörün “ boy x en x derinlik “ uzunlukları (cm) kullanıldı. Sakrifiye edilen farelerin iç organlarına olabilecek metastaz varlığı kontrol edildi. Farelerin tümör dokuları 3'e ayrıldı; histolojik olarak analiz etmek için %4'luk formaldehit içerisinde, RNA izolasyonu ve ELİSA analizleri için tümör dokuları kuru buza alınıp -80C`de saklandı. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere farelerin kalplerinden kan örnekleri alındı ve kan örneklerinden serum kısmı ayrılarak -80`de saklandı.

2.3.2.6 Tümör dokusunun histolojik olarak incelenmesi, immunohisto kimyasal analizleri

Histolojik inceleme, deneklerde tümör oluştuğunu teyit etmek ve farklı gruplarda tümörün histolojik yapısındaki farklılıklar bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirildi. Farelerden elde edilen tümör dokuları %10'luk nötral tamponlu formaldehit (NTF) ile fikse edildi. Fiksasyonun ardından yıkama işlemi uygulanan dokular, derecesi artan alkollerde dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflaştırıldı. Son olarak sıvı parafin ile infiltrasyonun ardından parafine gömme işlemi ile doku takibi tamamlandı. Parafin doku bloklarından elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin ve eozin (HE) boyaları ile boyandı. HE boyalı preparatlar Olympus BX53 marka ışık mikroskopunda incelendi ve Olympus DP73 marka kamera ile fotoğraflandı.

2.3.2.7 Tümör dokuları için ELISA yöntemi

Tümör dokularından Galaktin 3, Bcl-2, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 proteinlerinin ELISA ile analiz edilmesi için Rel-assay hazır ölçüm kiti üretici firmanın prosedürde belirttiği şekilde yapıldı. -80`de saklanan tümör örnekleri tartıldı, örnekler PBS tamponu içerisinde homojenizatörde yaklaşık 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon işleminden sonra protein miktarları Qubit ile belirlendi. Her bir grup 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı. İstatistiksel analizleri MiniTab14 programı ile yapıldı.

2.3.2.8 Tumor dokulari için DNA fragmentasyonu

TUNEL boyaması için Merck Millipore marka ApopTag© Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit kullanıldı ve boyama işlemi üretici firmanın kit içerisinde yer alan kılavuzunda önerildiği biçimde gerçekleştirildi. Apoptotik hücreler, parafin bloklardan elde edilen ve lizin kaplı lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlerde, transferaz-aracılı dUTP kesik uç işaretlemesi (transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) boyaması ile belirlendi. Çekirdek zıt boyası olarak Mayer'in Hematoksileni kullanıldı. TUNEL boyalı preparatlar Olympus BX53 marka ışık mikroskopunda incelendi ve Olympus DP73 marka kamera ile fotoğraflandı.

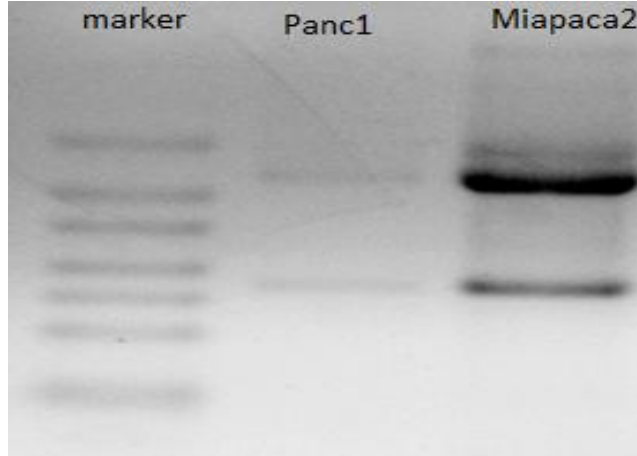
2.3.2.9 Tumor dokularından RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve realtime PCR analizi

-80'de saklanan tumor örnekleri tartıldı ve eşit ağılıkta tumor dokusu alınarak sıvı azotta ezilerek toz haline getirildi. Fermentas RNA izolasyon kitinde belirtilen prosedüre uygun olarak RNA izolasyonları yapıldı. RNA miktarı belirlendikten sonra materyal metot kısmında RNA ilişkili teknikler kısmında 2.3.1.10 ve 2.3.1.11 te verildiği şekilde cDNA sentezi yapıldı ardından Real time PCR analizleri bölüm 2.3.1.13'de belirtildiği gibi tablo 2.16'daki primerler kullanılarak yapıldı.

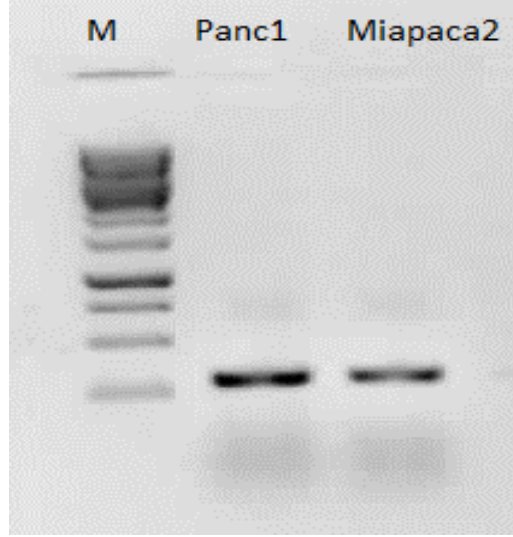
3. BULGULAR

3.1 Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında CA9 ve TSPAN8 Genlerinin İfadesinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

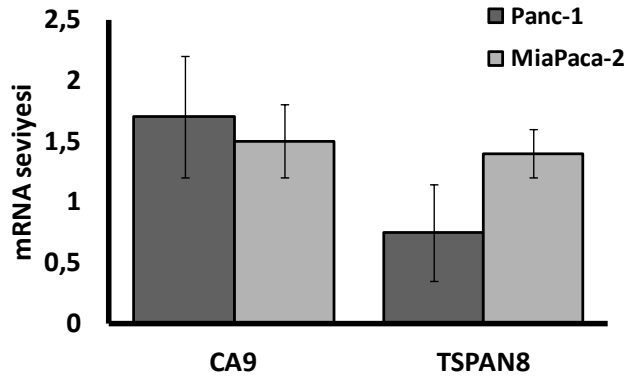
Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin ifadelerini belirlemek için 25cm² 'lik flasklarda büyüyen hücrelerden Fermentas RNA izolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu yapıldı (yöntem 2.3.1.10). Elde edilen total RNA jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 3.1). cDNA sentezi için 1 µg RNA kalıp olarak kullanıldı. Sentezlenen cDNA'nın kalitesi insan-β-2-mikroglobulin primerleri kullanılarak PCR ile kontrol edildi. (Şekil 3.2). CA9 ve TSPAN8 genlerinin mRNA seviyesinde ifadesini belirlemek için genlere özgü primerler kullanılarak tablo 2.19'da belirtilen koşullarda realtime PCR yapıldı. İnsan-β-2-mikroglobulin primerleri kullanılarak elde edilen sonuçlar ile örneklerin sonuçları normalize edildi (tablo 2.16). Elde edilen Ct değerleri $\Delta\Delta Ct$ analiz metoduna göre değerlendirildi. Deney en az 3 tekrarlı yapıldı. Sonuç olarak hücrelerde CA9 ve TSPAN8 genlerin ifadesi mRNA seviyesinde belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.1: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen RNA jel görüntüsü.

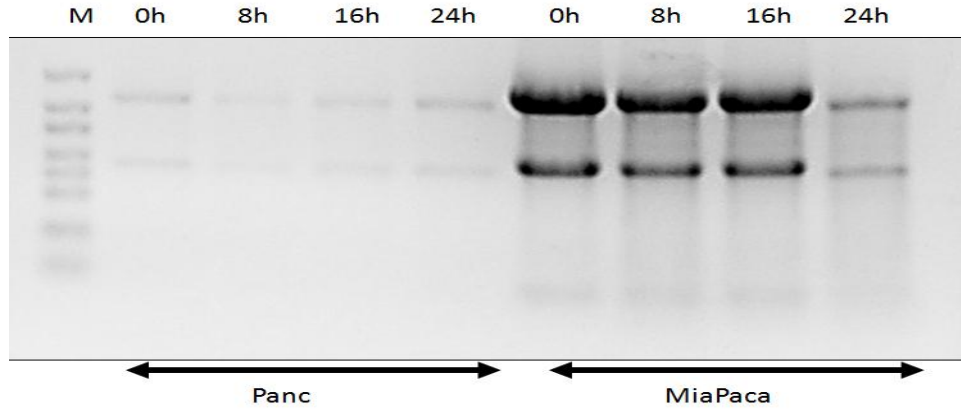


Şekil 3.2: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen cDNA'nın kalitesinin kontrol edilmesi amacıyla yapılan insan- β -2-mikroglobulin PCR sonucu jel görüntüsü.

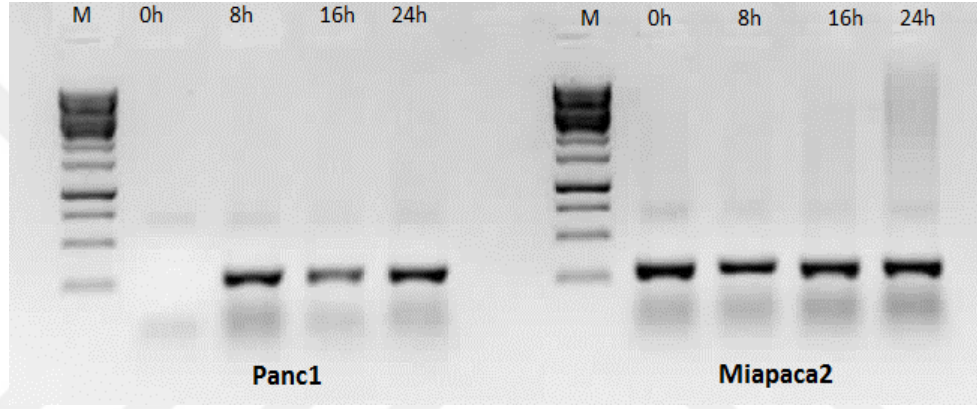


Şekil 3.3: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında CA9 ve TSPAN8 mRNA seviyeleri.

Hipoksik koşullarda Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin ifadesi Realtime PCR analizi ile belirlendi. Hücreler 25 cm² flasklara ekildi. Ertesi gün kontrol grubu hücreleri hariç (0 saat) diğer hücrelerin bulunduğu ortama 150 μ M son konsantrasyonda CoCl₂ eklenerek hücreler hipoksik koşullar için uyarıldı. 8, 16 ve 24 saat sonra hücre pelletleri alınarak bölüm 2.3.1.10'da belirtildiği gibi RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 3.4). cDNA sentezi için 1 μ g RNA kalıp olarak kullanıldı. Sentezlenen cDNA'nın kalitesi insan- β -2-mikroglobulin primerleri kullanılarak yapılan PCR ile kontrol edildi (Şekil 3.5).



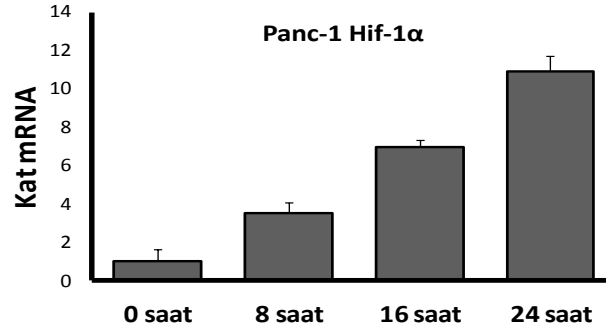
Şekil 3.4: 0h (kontrol) 8h, 16h ve 24h CoCl_2 ile indüklenen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen RNA'ların jel görüntüsü.



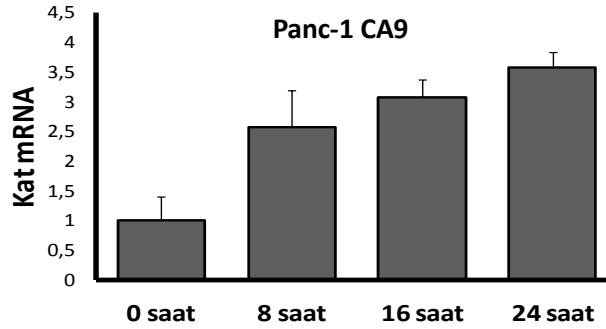
Şekil 3.5: 0h (kontrol) 8h, 16h ve 24h CoCl_2 ile indüklenen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen cDNA'nın kalitesinin kontrol edilmesi amacıyla yapılan insan- β 2-mikroglobulin PCR sonucu jel görüntüsü.

Hipoksik koşulların oluştuğunu kanıtlayabilmek için Real-time PCR ile HIF-1 α 'nın mRNA seviyesi belirlendi. Aynı zamanda hipoksik ortamda CA9 ve TSPAN8 mRNA seviyesindeki değişiklikler Real time PCR ile belirlendi. Hipoksik koşullardaki artışı belirleyebilmek için 8, 16 ve 24 saat zaman aralıkları kullanıldı (Şekil 3.6) İstatistiksel analizleri ONEWAY Anova testi kullanılarak yapıldı. Sonuç olarak CoCl_2 ile uyarılan hücrelerde en yüksek HIF-1 α seviyesinin 24 saat sonunda oluştuğunu ayrıca mRNA seviyesinin zamana bağlı olarak değiştiği görüldü (Şekil 3.6 ve 3.9). CA9 geni promotorundaki HRE bölgesinin varlığı nedeniyle hipoksik koşullarda regüle olmaktadır. 24 saat hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 hücrelerinde CA9 mRNA seviyesi normal koşullarda büyüyen hücreler ile karşılaştırıldığında yaklaşık 6 kat artış olduğu görüldü ve istatistiksel olarak bu artış anlamlı bulundu (Şekil 3.7). 8 ve 16 saat hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 hücrelerinde TSPAN8 mRNA seviyesinde azalma görüldü ve 24 saatte

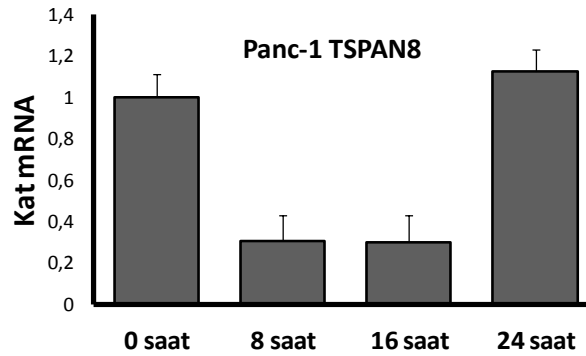
TSPAN8 mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11). MiaPaca-2 hücrelerinde normal oksijen koşulları (0 saat) ile 24 saat hipoksik ortam karşılaştırıldığında CA9'un mRNA seviyesinde 5 katlık bir artışın olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 3.10). MiaPaca-2 hücrelerinde TSPAN8 mRNA seviyesi 24 saat CoCl₂ uygulamasında yaklaşık 1,5 kat artış görüldü ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 3.8).



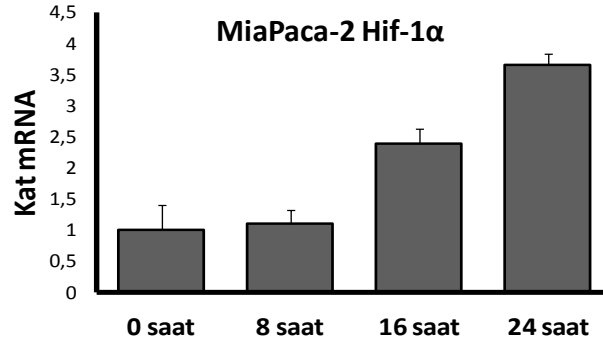
Şekil 3.6: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl₂ ile indüklenen Panc-1 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1 α mRNA seviyesi.



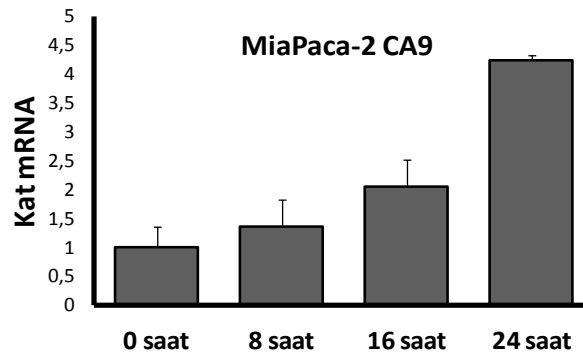
Şekil 3.7: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl₂ ile indüklenen Panc-1 hücrelerinde hipoksik koşullarda CA9 mRNA seviyesi.



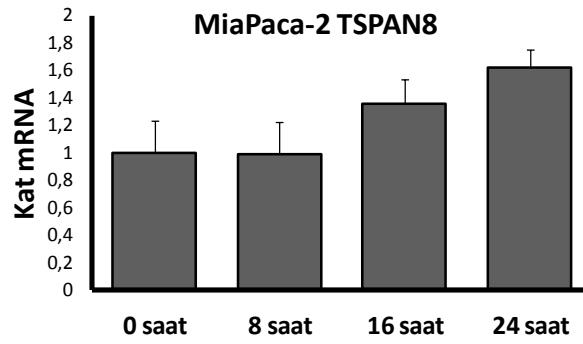
Şekil 3.8: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl₂ ile indüklenen Panc-1 hücrelerinde hipoksik koşullarda TSPAN8 mRNA seviyesi.



Şekil 3.9: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl_2 ile indüklenen MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullarda HIF-1 α mRNA seviyesi.



Şekil 3.10: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl_2 ile indüklenen MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullarda CA9 mRNA seviyesi.

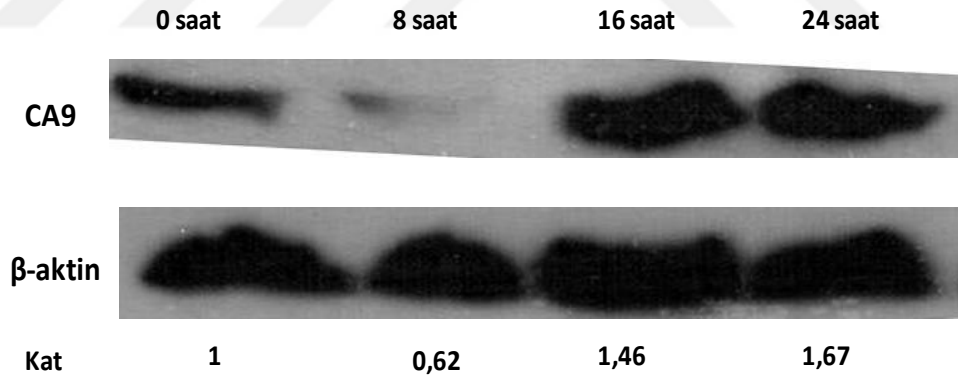


Şekil 3.11: 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl_2 ile indüklenen MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullarda TSPAN8 mRNA seviyesi.

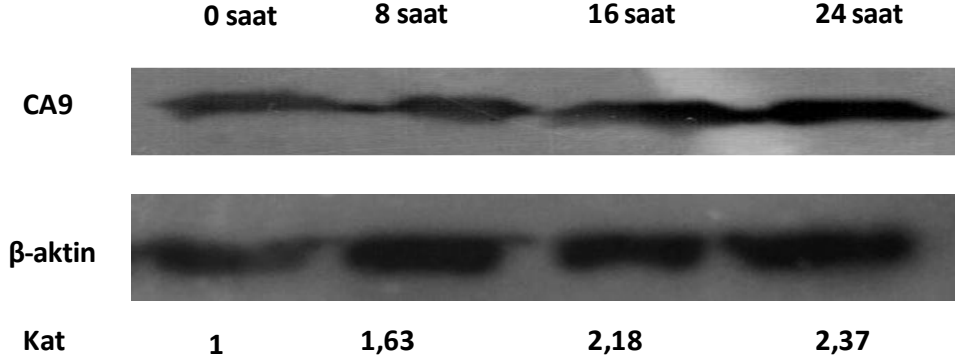
3.2 Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda CA9 Protein Seviyesindeki Değişimin Western Blot İle Belirlenmesi

Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik ortamda CA9 protein seviyesinin zamana bağlı olarak değişimi western blot analizi ile belirlendi. Bunun için farklı saat aralığında hipoksik ortamda büyütülen hücreler bölüm 2.3.1.14’de belirtildiği şekilde RIPA buffer varlığında liziz edilerek protein izolasyonu yapıldı. Protein miktarı Qubit (Invitrogen) sistem ile belirlendi. SDS jele 40 µg protein örneği yüklenerek western blot analizi yapıldı (bölüm 2.3.1.14).

Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında farklı zaman aralıklarında hipoksik koşulların CA9’a etkisi protein seviyesine belirlendi. CA9 ve β-aktin antikorumları ile işaretlenmesi sonucunda elde edilen bantlar dansitometrik olarak analiz edildi. 8, 16, 24 saat hipoksik ortamda büyütülen hücreler hipoksik ortamdaki değişimin belirlenmesi amacıyla 0 saat olan normal koşullardaki grup ile oranlanarak kat değerleri hesaplandı. Hipoksik koşullarda zamana bağlı olarak CA9 protein seviyesinde Panc-1 hücrelerinde 16 saatte 1,4 kat, 24 saatte 1,6 kat artış görülürken (Şekil 3.12) MiaPaca-2 hücrelerinde 16 saatte 2,18 kat, 24 saatte 2,3 kat artış olduğu görüldü (Şekil 3. 13).



Şekil 3.12:Panc-1 hücre hattında 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki CA9 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.

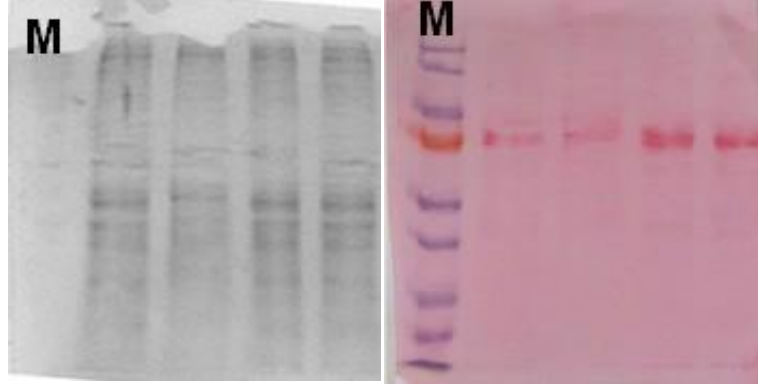


Şekil 3.13: MiaPaca 2 hücre hattında 0 saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24 saat CoCl₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki CA9 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.

3.1 Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda TSPAN8 Protein Seviyesindeki Değişimin Western Blot ile Belirlenmesi

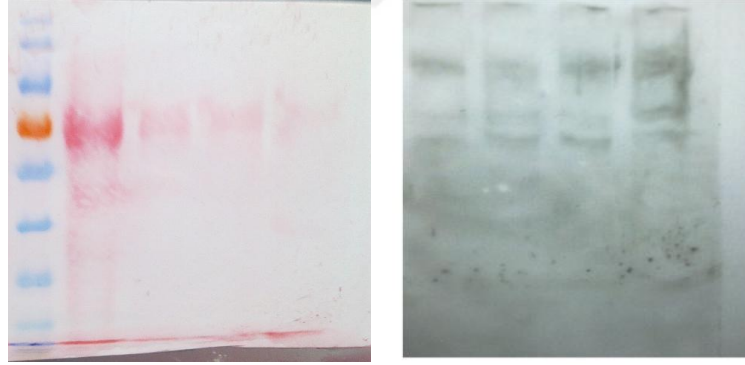
TSPAN8'in protein düzeyinde ifadesi western blot analizi ile Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında belirlendi. Western blot çalışmalarında proteinler Ripa buffer kullanılarak (Bölüm 2.3.1.14) elde edildi. Qubit (invitrogen) kullanılarak protein konsantrasyonu belirlendi. 40µg protein örneği SDS jele yüklendi.

TSPAN8 proteini laboratuvarımızda ilk kez çalıştığımız bir protein olduğu için ilk olarak optimizasyon çalışması yapıldı. Western blot yöntemi ile TSPAN8 proteinini belirlemek için ilk olarak antikor konsantrasyon optimizasyonu denendi. Antikor optimizasyonunda farklı konsantrasyonlarda primer ve sekonder antikor denendi ancak başarılı bir sonuç elde edilemedi. Proteinlerin membrana transferini kontrol edebilmek için Panc-1 hücre hattından elde edilen protein (40µg) örnekleriyle çalışıldı. Membrana transfer edilen jel coomassie blue ile boyandı aynı zamanda transfer yapılan membran da poncau ile boyandı. Kullanılan SDS jelin yoğunluğu ve transfer sistemlerinin optimizasyonu yapıldı. Protein (40µg) örnekleri %10'luk SDS jeli kullanılarak ıslak transfer sisteminde +4°C'de bir gece transfer edildi. Örneklerin yürütüldüğü jelde kısa proteinlerin fazla miktarda olduğu görüldü. Aynı şekilde poncau boyamasında da küçük proteinlerin membrana tam olarak transfer olmadığı görüldü (Şekil 3.14).

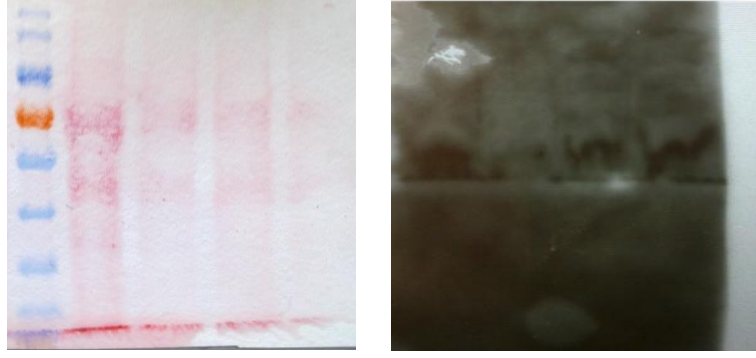


Şekil 3.14: %10 SDS jel kullanılarak ıslak sistemde +4C’de bir gece transferden sonra jein coomasie blue boyama görüntüsü ve membranın poncau ile boyanması (M. Marker).

Islak transfer sistemiyle transferden sonra yarı ıslak sistem olan BioRad Trans Blot Turbo Transfer sisteminde %12,5 ve %15 jel konsantrasyonu ile transfer denendi. %15’lik SDS jelde yürütülen protein örnekleri ıslak sistemde +4C’de transfer edildiğinde ise poncau boyamada kısa protein örneklerinin az miktarda olduğu ayrıca TSPAN8 antikoru ile işaretlemenin 24kDa büyüklüğünde beklenirken farklı büyüklüklerde ve spesifik olmayan bağlanmalar olduğu görüldü. Elde edilen membranların poncau ile boyanması ve TSPAN8 antikoru ile işaretlemenin sonuçları Şekil 3.15 ve 3.16’da görülmektedir.



Şekil 3.15: %15 jel kullanılmış ve ıslak +4C’de bir gece (O/N) sistemle transfer edilmiş örneklerin poncau ile boyanması ve membranın TSPAN8 ile işaretlenmesi.

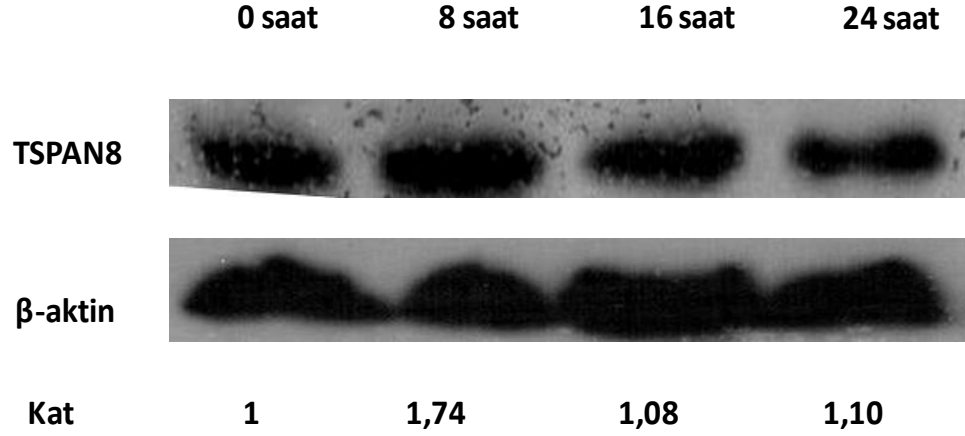


Şekil 3.16: %15 jel kullanılmış ve yarı ıslak transblot sistemle transfer edilmiş örneklerin poncau ile boyanması ve membranın TSPAN8 ile işaretlenmesi.

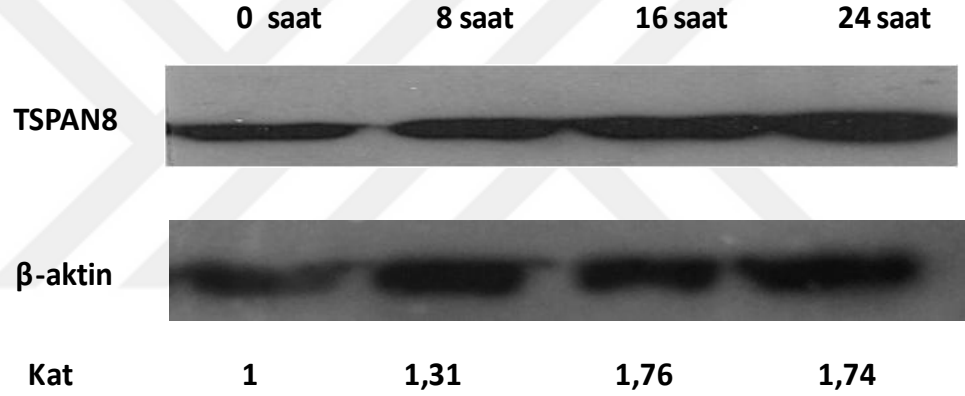
TSPAN8 antikorunun 24 kDa büyüklüğündeki TSPAN8 proteinine bağlanıyor olması gerekirken farklı büyüklüklerdeki proteine bağlanmasının nedeni araştırıldığında, TSPAN8'in protein örneklerinin denatürasyonunun klasik olarak yapılan 95 °C'de 5 dakika olarak yapıldığında multipass protein olduğu için farklı büyüklükte agregatlar oluştuğu tespit edildi. Bunun yerine literatürde belirtildiği gibi TSPAN8 protein örnekleri 75°C'de 5 dakikada denatüre edildi. Yapılan bu değişiklik ile 24 kDa'da doğru yerde bantlar elde edildi. Ayrıca küçük proteinlerin transferinin daha iyi yapılması için transfer buffera SDS eklemeyen transfer yapıldı.

TSPAN8 proteinini işaretleyebilmek için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, protein örneklerinin denatürasyon sıcaklığının 75°C'de 5 dakika olmasına, jel konsantrasyonunun %12,5 olmasına, transfer buffera SDS eklenmemesine, ıslak transfer sisteminde buz üzerinde 120 V'da 2 saat transfer yapılmasına karar verildi. Bu koşullarda yapılan çalışmalar sonucunda TSPAN8 proteini için doğru sonuçlar elde edildi.

Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında TSPAN8'in protein seviyesinde ifadesi belirlendi. TSPAN8 ve β -aktin antikorları ile işaretlenmesi sonucunda elde edilen bantlar dansitometrik olarak analiz edildi. 8, 16, 24 saat hipoksik ortamda büyütülen hücreler hipoksik ortamdaki değişimin belirlenmesi amacıyla 0 saat olan normal koşullardaki grup ile oranlanarak kat değerleri hesaplandı. Hipoksik ortamda büyüyen Panc-1 hücrelerinde TSPAN8 proteininin ifadesinin 8 saatte 1,7 kat, 16 saatte 1,08 kat, 24 saatte 1,1 kat arttığı belirlendi (Şekil 3.17). MiaPaca-2 hücre hattında ise TSPAN8 protein seviyesi, 8 saatte 1,3 kat, 16 saatte 1,7 kat ve 24 saatte 1,7 kat arttığı belirlendi (Şekil 3.18).



Şekil 3.17: Panc-1 hücre hattında 0saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24saat CoCl₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki TSPAN8 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.

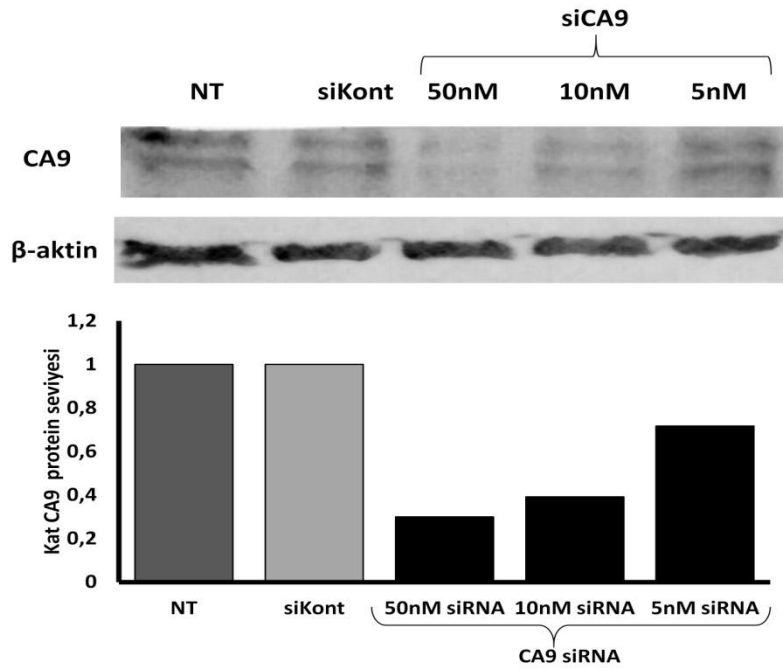


Şekil 3.18: Miapaca 2 hücre hattında 0saat (kontrol) 8 saat, 16 saat ve 24saat CoCl₂ ile uyarılmış hipoksik koşullardaki TSPAN8 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.

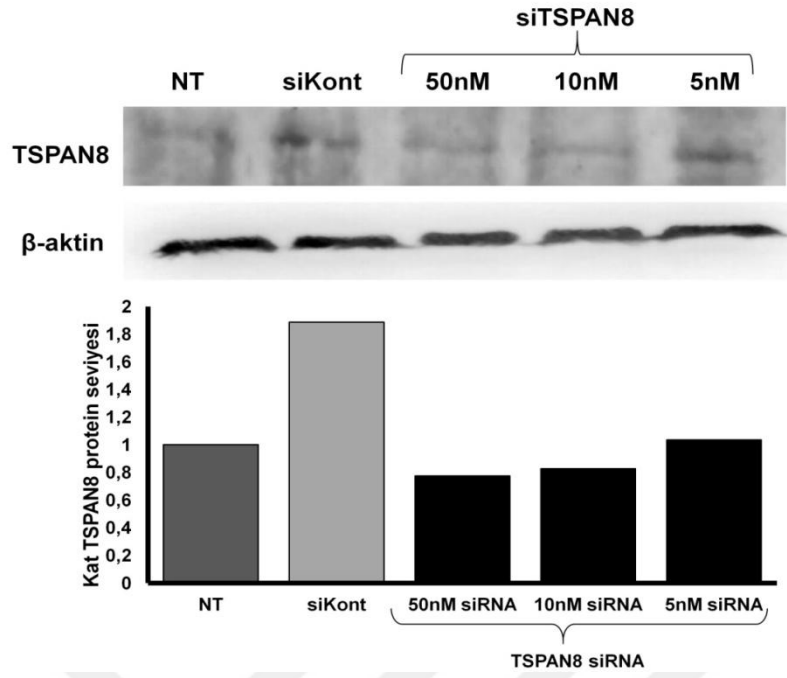
3.2 Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulması

Pankreas kanseri hücre hatları olan Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin spesifik siRNA'ları kullanarak hedeflenen genler susturuldu. Genlere spesifik siRNA'lar Santa Cruz firmasından temin edildi. Transfeksiyon ajanı olarak BIO-RAD Silent-Fect transfeksiyon ajanı kullanıldı ve transfeksiyonlar üretici firmanın belirttiği şekilde yapıldı (bölüm, 2.3.1.4). Susturulmanın doğrulanması mRNA düzeyinde Realtime PCR yöntemi, protein seviyesinde ise western blot yöntemi ile yapıldı.

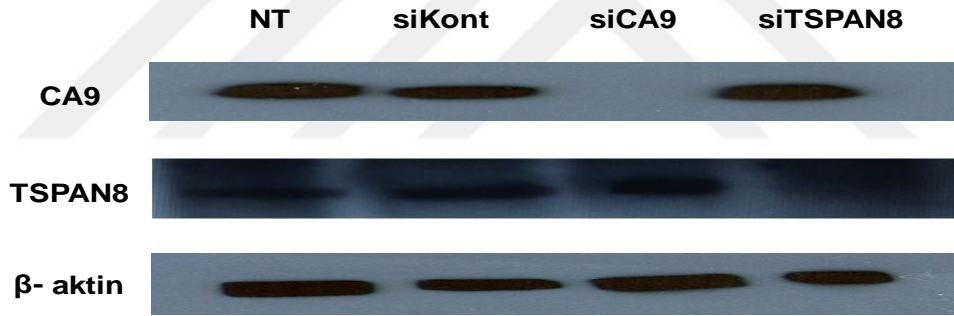
Normal oksijen koşullarında büyüyen MiaPaca-2 hücrelerinde hedef genlerin ifadesinin siRNA miktarına bağlı değişimi western blot ile protein seviyesinde belirlendi. Bunun için 50 nM, 10 nM, 5 nM konsantrasyonlarında siRNA ve üretici firmanın tavsiye ettiği miktarda transfeksiyon ajanı kullanılarak transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra bölüm 2.3.1.14'te belirtildiği gibi hücrelerden protein elde edildi ve membrana aktarıldı. Membranlardaki proteinler CA9, TSPAN8 ve β -aktin antikorları ile işaretlendi ve dansitometrik analizleri yapıldı. Şekil 1.19'da görüldüğü gibi kullanılan siRNA miktarı arttıkça gen ifadesinde azalma oldu. 50 nM siRNA konsantrasyonu CA9 geninin susması için yeterli olurken (Şekil 3.19) TSPAN8 geninin susması için yeterli olmadı (Şekil 3.20). 100 nM siRNA kullandığımızda CA9 ve TSPAN8 genleri başarılı bir şekilde susturuldu (Şekil 3.21).



Şekil 3.19: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 siRNA optimizasyon çalışması.

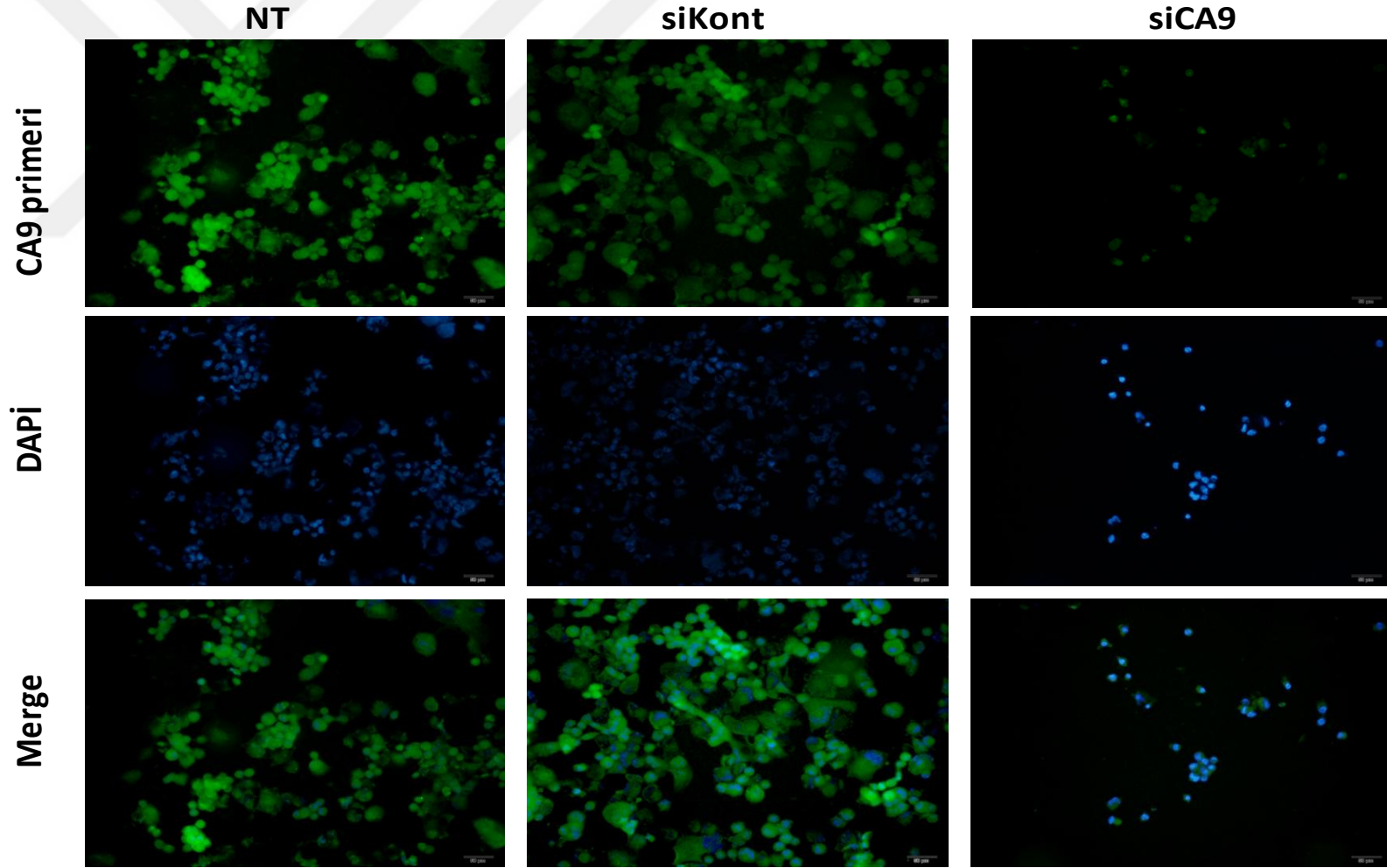


Şekil 3.20: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında TSPAN8 siRNA optimizasyon çalışması.

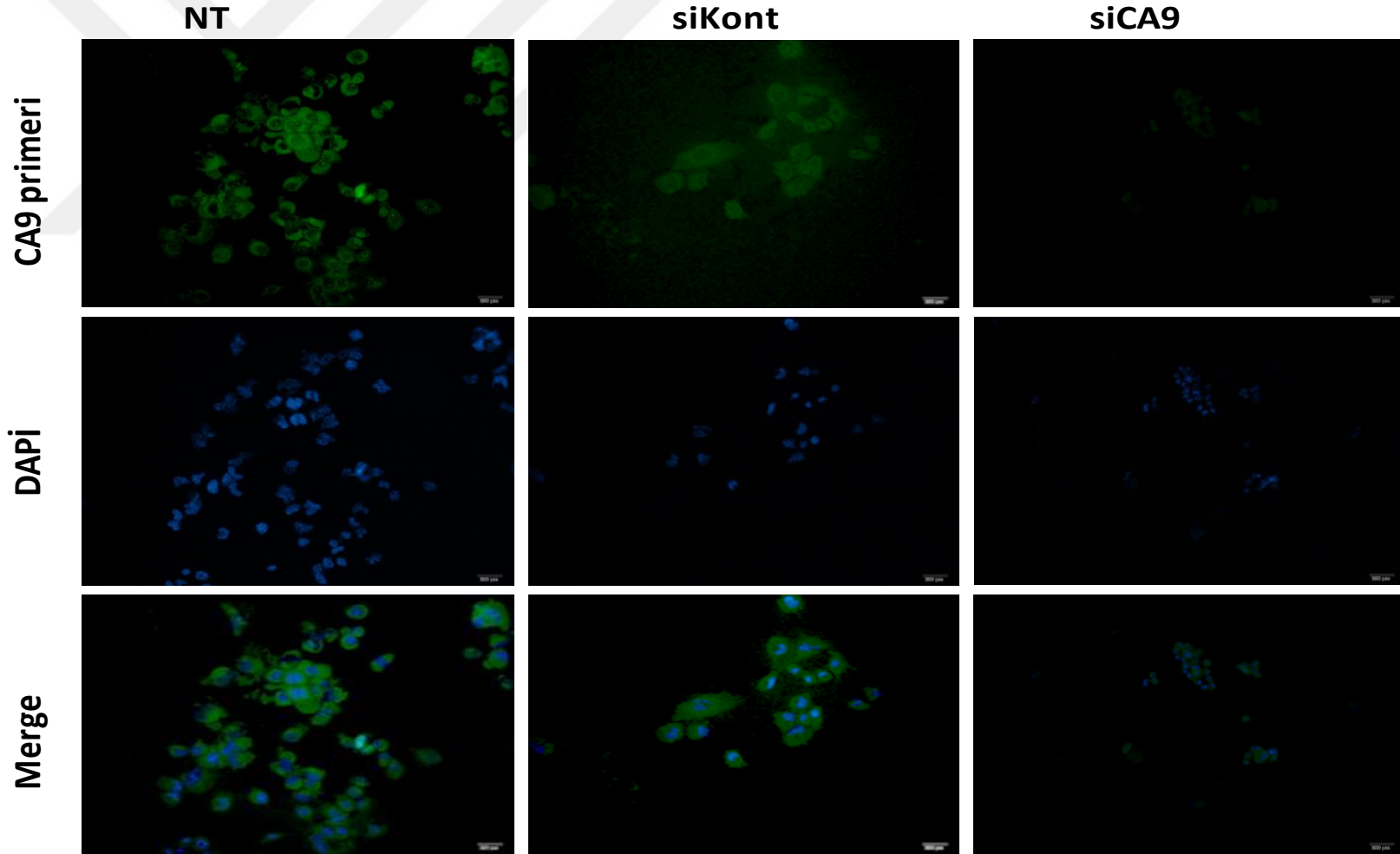


Şekil 3.21: MiaPaca-2 hücre hattında 100 nM konsantrasyonda siRNA kullanılarak CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması sonucu protein analizi.

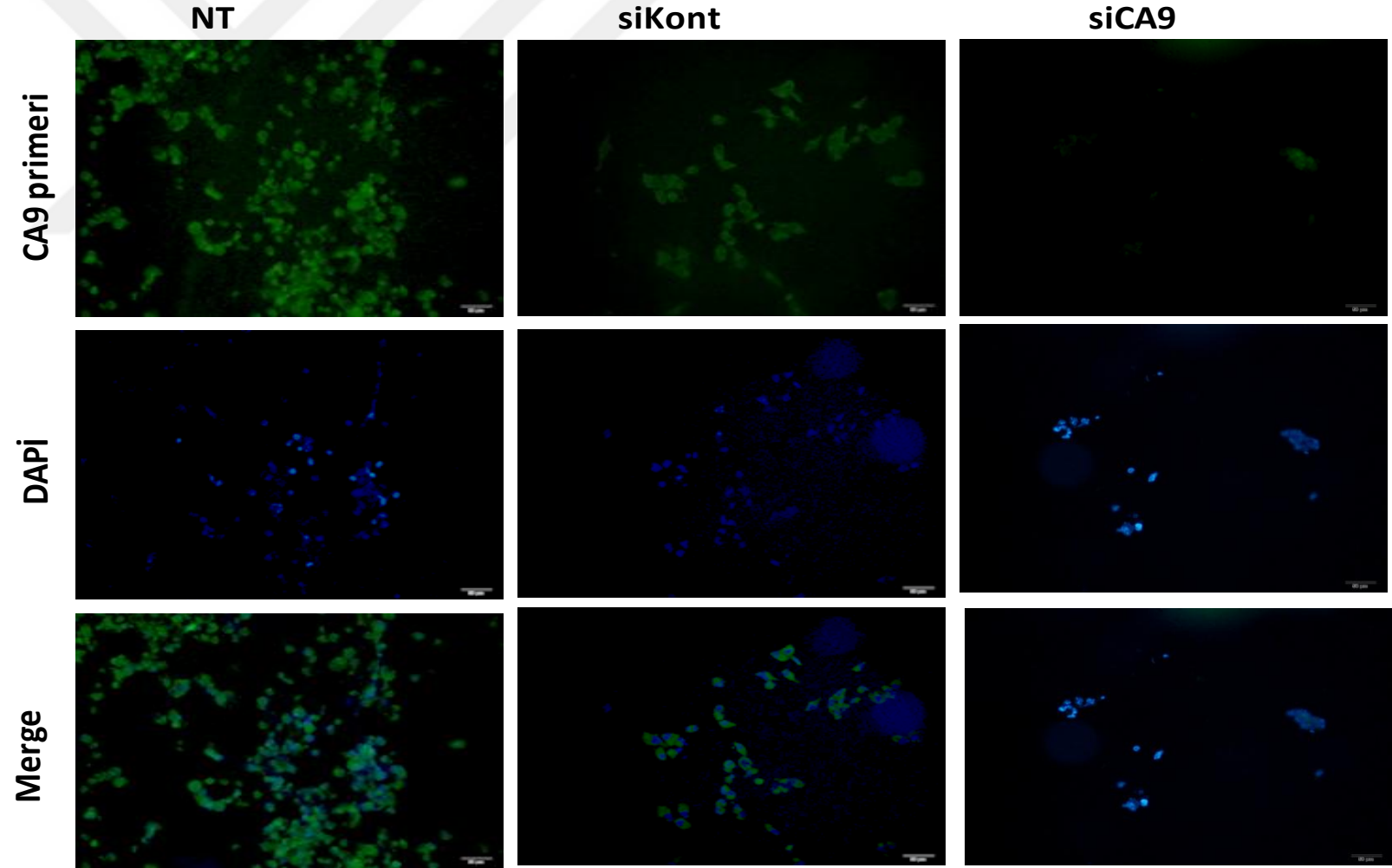
CA9 geninin susturulması protein seviyesinde immunofloresans yöntemi ile doğrulandı (bölüm 2.3.1.15). Kontrol, CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonu bölüm 2.3.1.4'de belirtildiği gibi yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra sırasıyla yöntem 2.3.1.15'de belirtildiği gibi. Primer ve sekonder antikorlar ile işaretlenen proteinler floresans mikroskopunda görüntülendi. Hipoksik ve normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde uygulama yapılmayan (NT) gruplar ile CA9 geni susturulan gruplar karşılaştırıldığında; CA9 siRNA'sı transfekte edilen hücrelerin sayısının azaldığı aynı zamanda yaşayan hücrelerde CA9 genin ifadesinin azaldığı belirlendi (Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24 ve Şekil 3.25).



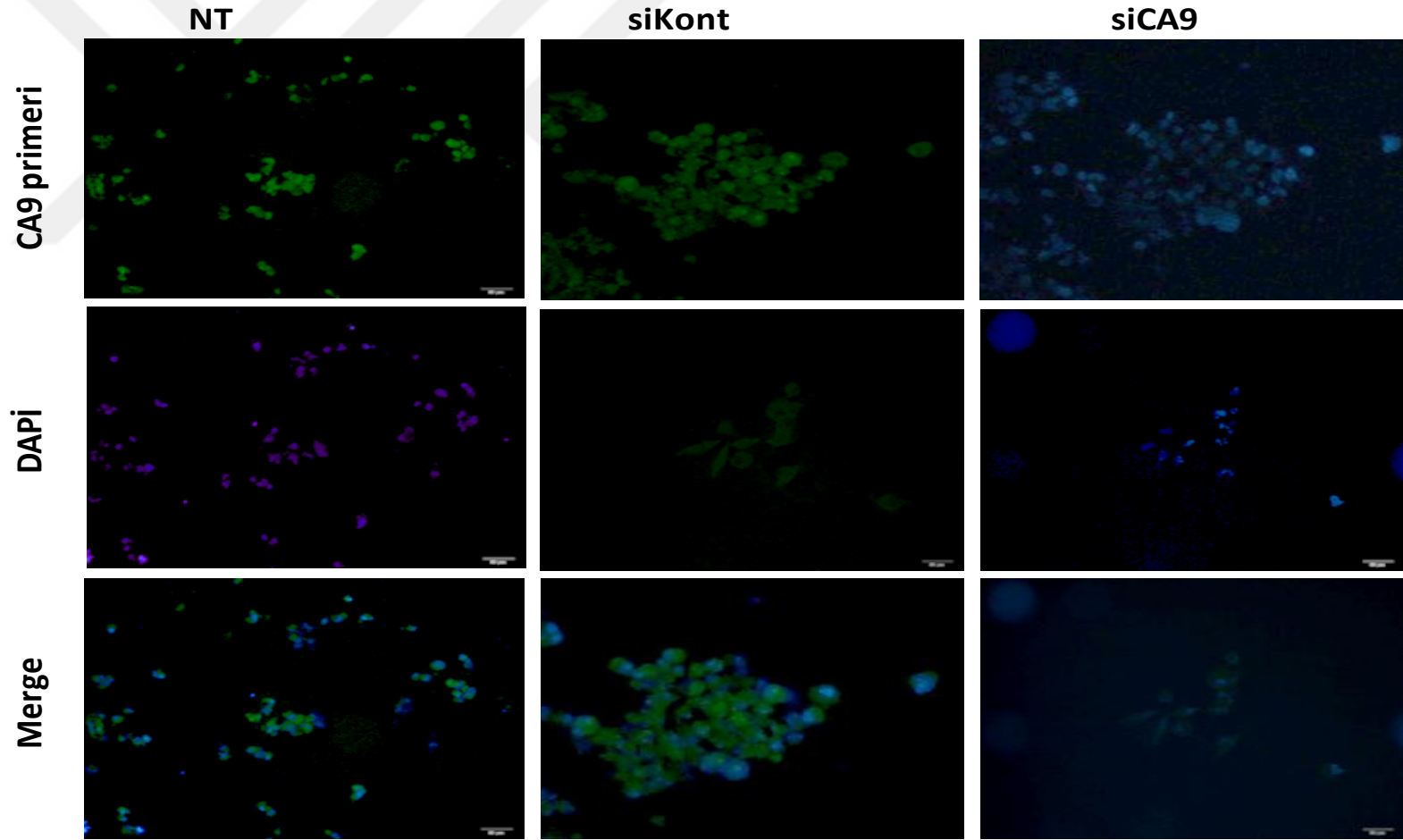
Şekil 3.22: Panc-1 hücrelerinde normal oksijen koşullarında CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.



Şekil 3.23: Panc-1 hücrelerinde hipoksiyada CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.



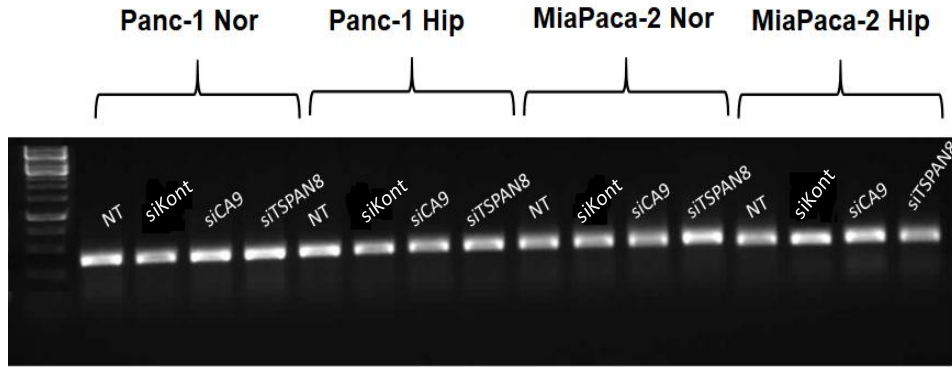
Şekil 3.24: MiaPaca-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.



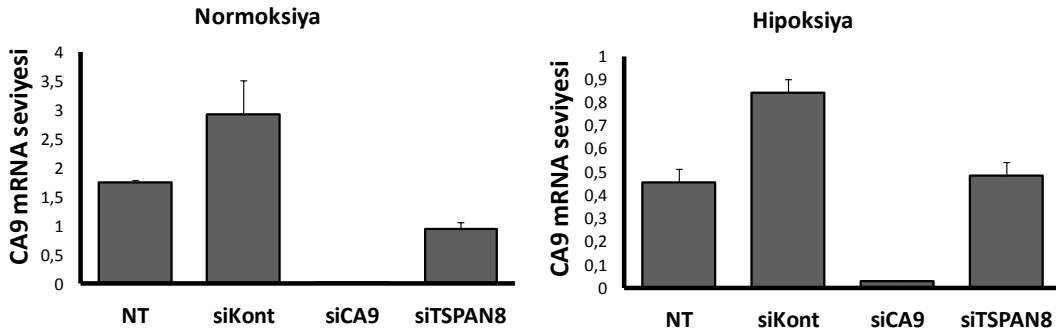
Şekil 3.25: MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksiyada CA9 proteininin immunofloresan yöntemle görüntülenmesi.

CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması mRNA seviyesinde Realtime PCR ile gösterildi. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Bölüm 2.2.1.4’de anlatıldığı gibi siRNA transfeksiyonları yapıldı ve bölüm 2.2.1.3’deki gibi hipoksik koşullar için uyarıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra yöntem 2.2.1.10’da belirtildiği gibi RNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinden 1µg RNA kullanılarak bölüm 2.2.1.12’deki gibi cDNA sentezi yapıldı.

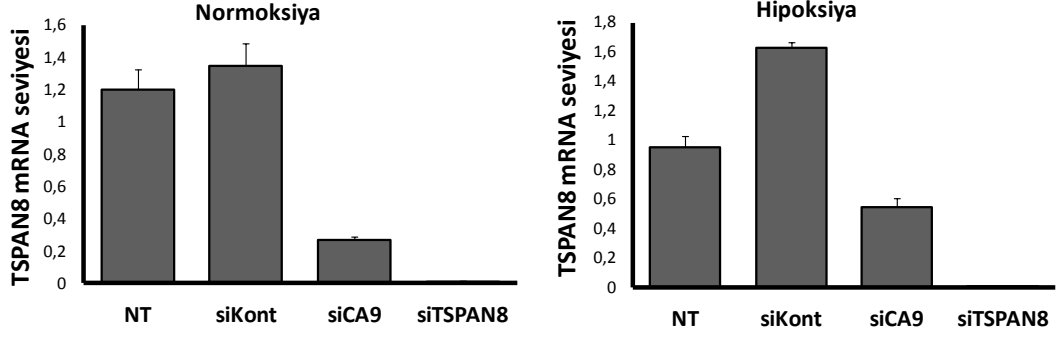
Elde edilen cDNA’nın kalitesini kontrol etmek amacıyla insan-β-2 mikroglobulin primerleri (tablo 2.16) kullanılarak yapılan PCR sonucunun jel görüntüsü Şekil 1.25’de görülmektedir. Şekil 1.26’da Panc-1 hücre hattında ve Şekil 1.27’de MiaPaca-2 hücre hattında, normal oksijen ve hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 siRNA’sı uygulanan gruplarda CA9 ve TSPAN8’e özgü primerler ile yapılan Realtime PCR sonucunda mRNA seviyesinin etkin bir şekilde azaldığı görüldü. Yapılan deneylerde 100 nM siRNA kullanıldı ve deneylerin diğer aşamalarına geçmeden önce mRNA seviyesinde susturmanın olduğu doğrulandı.



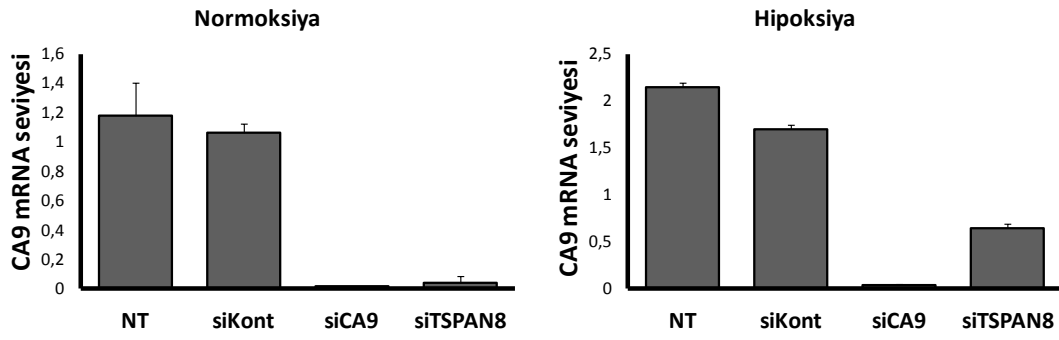
Şekil 3.26: siRNA uygulanmış Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden elde edilen cDNA’nın kalitesinin kontrol edilmesi amacıyla yapılan insan-β-2 mikroglobulin PCR sonucu jel görüntüsü



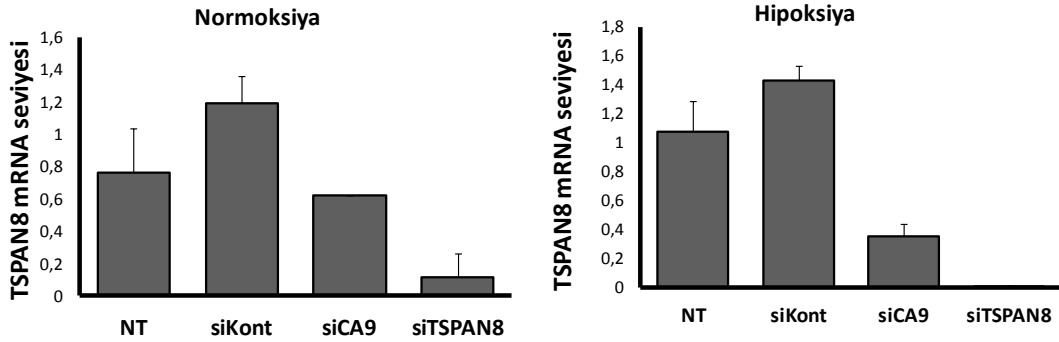
Şekil 3.27: Panc-1 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından CA9 mRNA seviyesinin gösterilmesi.



Şekil 3.28: Panc-1 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından TSPAN8 mRNA seviyesinin gösterilmesi.



Şekil 3.29: MiaPaca-2 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından CA9 mRNA seviyesinin gösterilmesi.

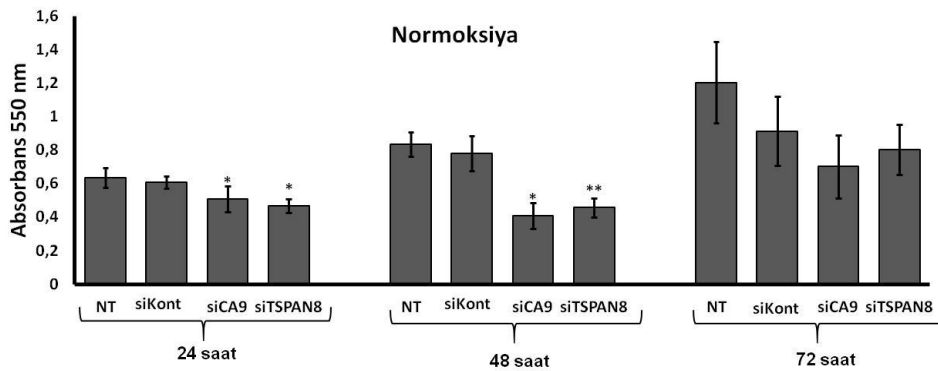


Şekil 3.30: MiaPaca-2 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda, siRNA uygulamasının ardından TSPAN8 mRNA seviyesinin gösterilmesi.

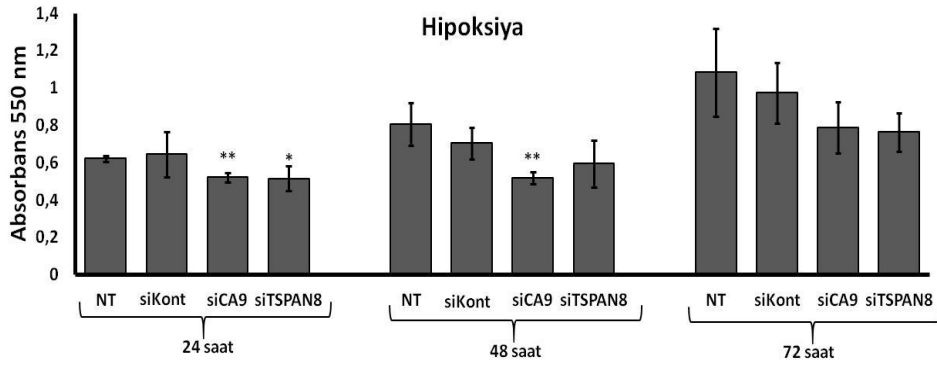
3.3 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Pankreas Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonu ve Canlılığı Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pankreas kanseri hücrelerinin (Panc-1, MiaPaca-2) proliferasyonu ve canlılığı üzerine olan etkisi MTT ve ViaCount® yöntemleri kullanılarak belirlendi. MTT yöntemi için hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekildi, ertesi gün bölüm 2.2.1.3’de belirtildiği şekilde hipoksik ortam oluşturuldu ve bölüm 2.3.1.4’de belirtildiği şekilde transfeksiyonlar en az 4 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin bulunduğu ortama son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde stok MTT solüsyonundan eklendi ve bölüm 2.3.1.5’de belirtildiği gibi sonuçlar alındı.

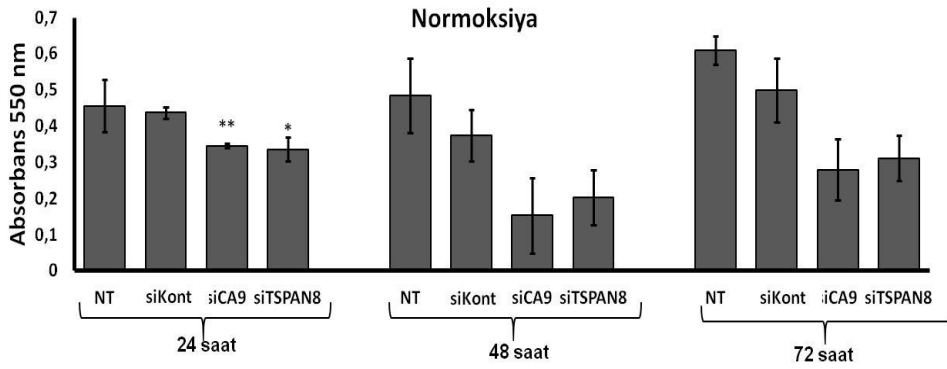
Panc-1 hücrelerinde normal oksijen koşullarında NT grubu, CA9 ve TSPAN8 siRNA’sı uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında hücresel azalmanın en fazla 48. saatte olduğu görülürken 24 saatte etkinin henüz oluşmadığı ve 72. saatte bu etkinin azaldığı görüldü (Şekil 1.28). Panc-1 hipoksik grupları normoksik gruplarla karşılaştırıldığında susturulma sonrasında hücre büyümesindeki azalmanın daha az olduğu görüldü (Şekil 1.28 ve Şekil 1.29). MiaPaca-2 hücre hattında normal koşullarda daha etkin bir hücresel azalma olduğu görülürken (Şekil 1.30) hipoksik koşullarda bu etkinin daha az olduğu görüldü (Şekil 1.31). Hipoksik koşullarda 48 saat sonunda Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerindeki hem CA9 hem de TSPAN8 siRNA uygulanan gruplardaki hücre canlılığındaki azalma kontrol siRNA uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (* $p \leq 0,05$) (** $p \leq 0,01$). Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde, 48 ve 72 saat zaman aralığında, hem hipoksiya hem de normal koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir.



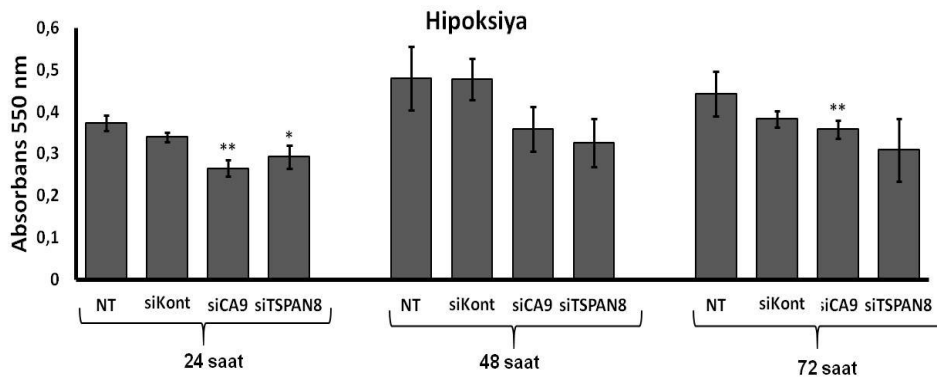
Şekil 3.31: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 3.32: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 3.33: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.

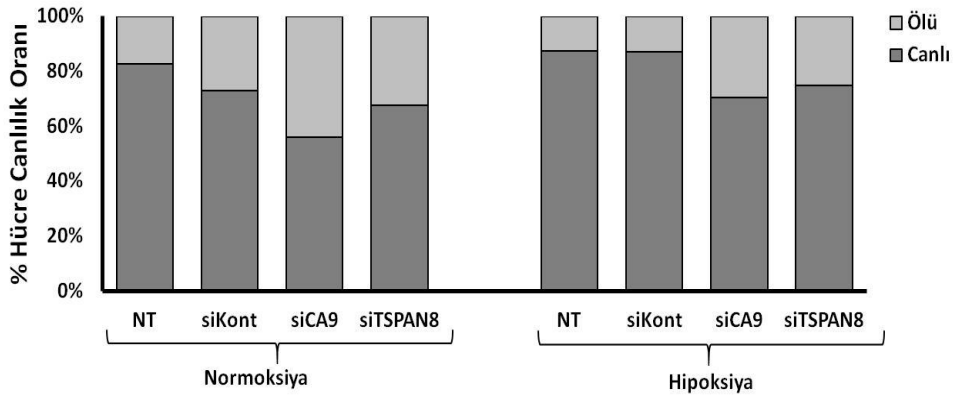


Şekil 3.34: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.

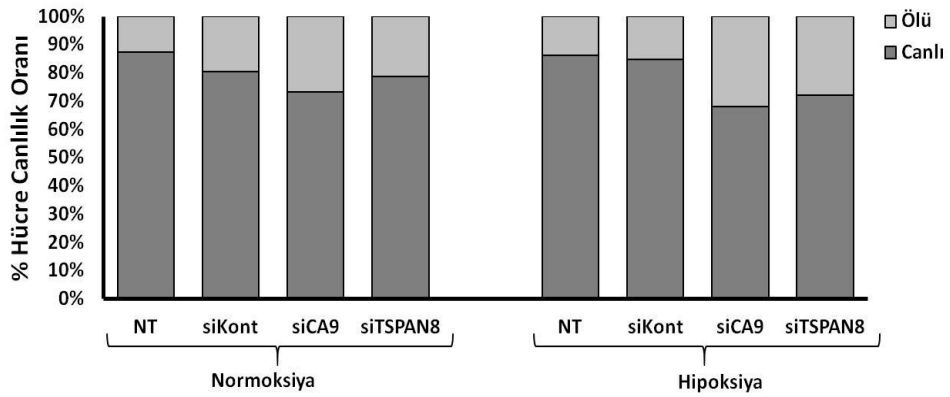
CA9 ve TSPAN8 siRNA'sı kullanarak genlerin susturulmasının hücre canlılığına olan etkisi ikinci olarak Guava ViaCount® ile belirlendi. Guava ViaCount® solüsyonu iki

boya içermektedir. Biri hüresel geçirgenliklerine göre canlı ve canlı olmayan hücreleri ayırt eder. Diğeri çekirdeği boyar ve apoptoza giden hücreler ile diğerlerini ayırır. Guava ViaCount testi canlı, apoptotik ve ölü hücreleri ayırt etmesini sağlar.

6 kuyucuklu plakalara ekilen hücelere ertesi gün bölüm 2.3.1.4’de belirtildiği gibi transfeksiyon yapıldı. Bölüm 2.3.1.6’da belirtildiği gibi hücreler Viacount ile boyanarak hazırlandı. Flowsitometride 1000 hücre sayılarak bu hücrelerin canlı ve ölü oranları belirlendi. Canlı ve ölü hücrelerin yüzdeleri Mansoor ve ark tarafından belirlenen yöntem kullanılarak hesaplamaları yapıldı ve grafikleri çizildi [217]. Sonuçta Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında NT grubu ile siRNA uygulanan gruptaki hücreler karşılaştırıldığında hücrelerin canlılığında azalma olduğu görüldü (Şekil 3.32, Şekil 3.33).



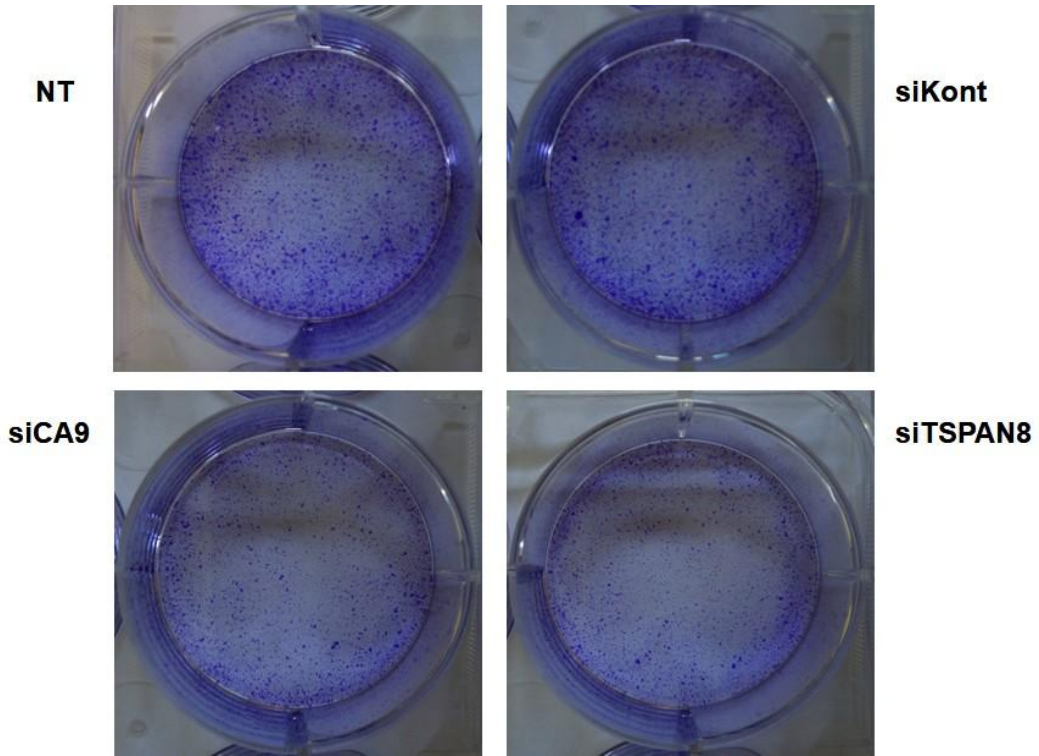
Şekil 3.35: Panc-1 hücre hattında siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki etkinin Viacount ile belirlenmesi.



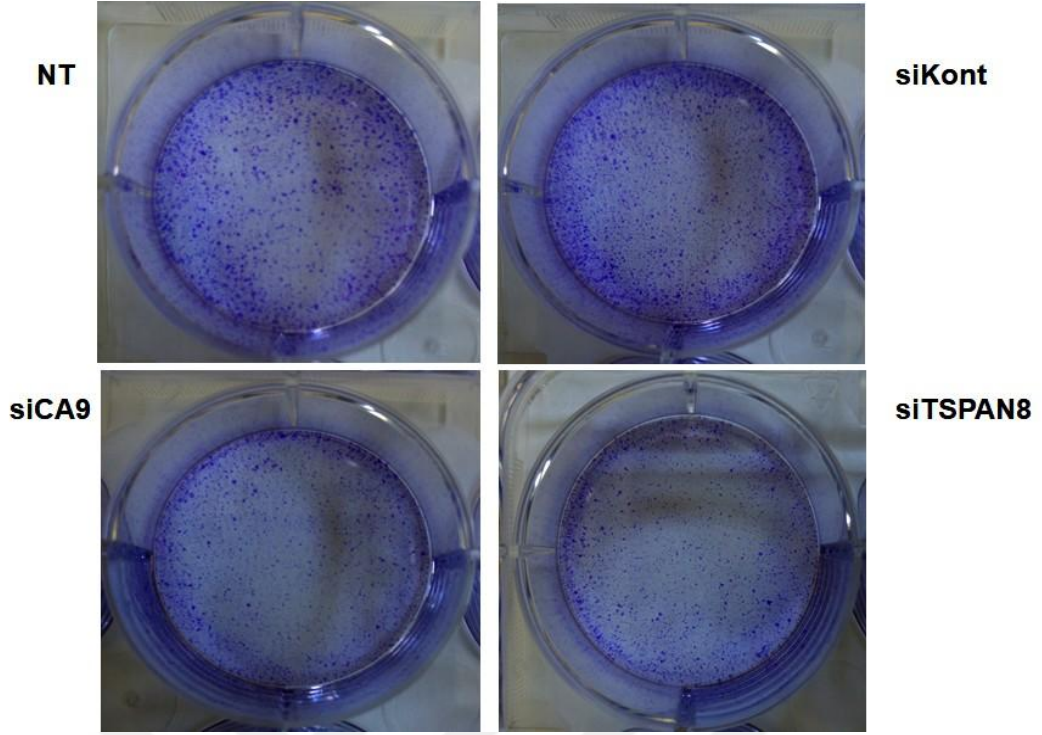
Şekil 3.36: MiaPaca-2 hücre hattında siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki etkinin Viacount ile belirlenmesi.

3.4 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinin Koloni Oluşturma Kapasitesine Olan Etkisinin Belirlenmesi

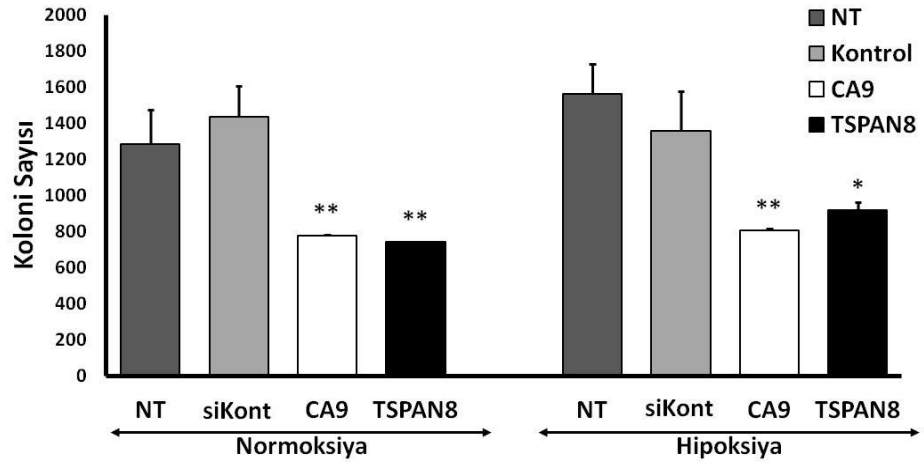
CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının hücrelerin koloni oluşturma kapasitesindeki değişimini belirlemek için koloni formasyon testi bölüm 2.3.1.7’de belirtildiği gibi yapıldı. 6 kuyucuklu plakalarda her kuyuya 3000 hücre ekildikten sonra bölüm 2.3.1.4’de belirtildiği gibi transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 10 gün sonra bölüm 2.3.1.7’de anlatıldığı gibi oluşan koloniler belirlendi. Deneyler birbirinden bağımsız iki tekrarlı yapıldı. Koloniler fotoğraflanarak Şekil 3.34, Şekil 3.35, Şekil 1.37, Şekil 1.38’de gösterildi. Koloniler Colonocounter programı ile sayılarak her hücre hattına ait grafikler yapıldı (Şekil 3.36, Şekil 3.39). Genel olarak bakıldığında her iki hücre hattında da normoksik ve hipoksik koşullarda NT grup ile karşılaştırıldığında CA9 ve TSPAN8 siRNA’ları ile susturulmuş gruplarda koloni oluşturma kapasitesinin düştüğü görüldü. Panc-1 hücrelerinde normoksiya ve hipoksiyada CA9 ve TSPAN8 siRNA uygulanmış gruplardaki koloni sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (**p ≤ 0,01). MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 siRNA’sı uygulanmış gruplar NT ile karşılaştırıldığında koloni oluşturma kapasitelerinde yaklaşık 4 kat azalma olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (*p ≤ 0,05).



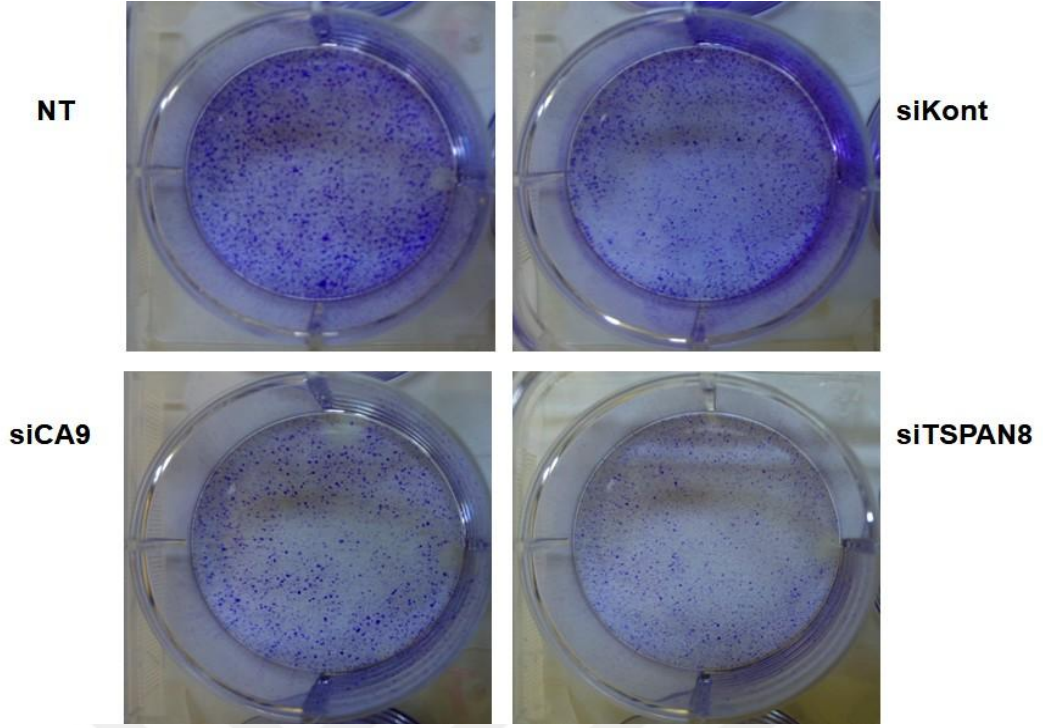
Şekil 3.37: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan koloni formasyon testi sonucu.



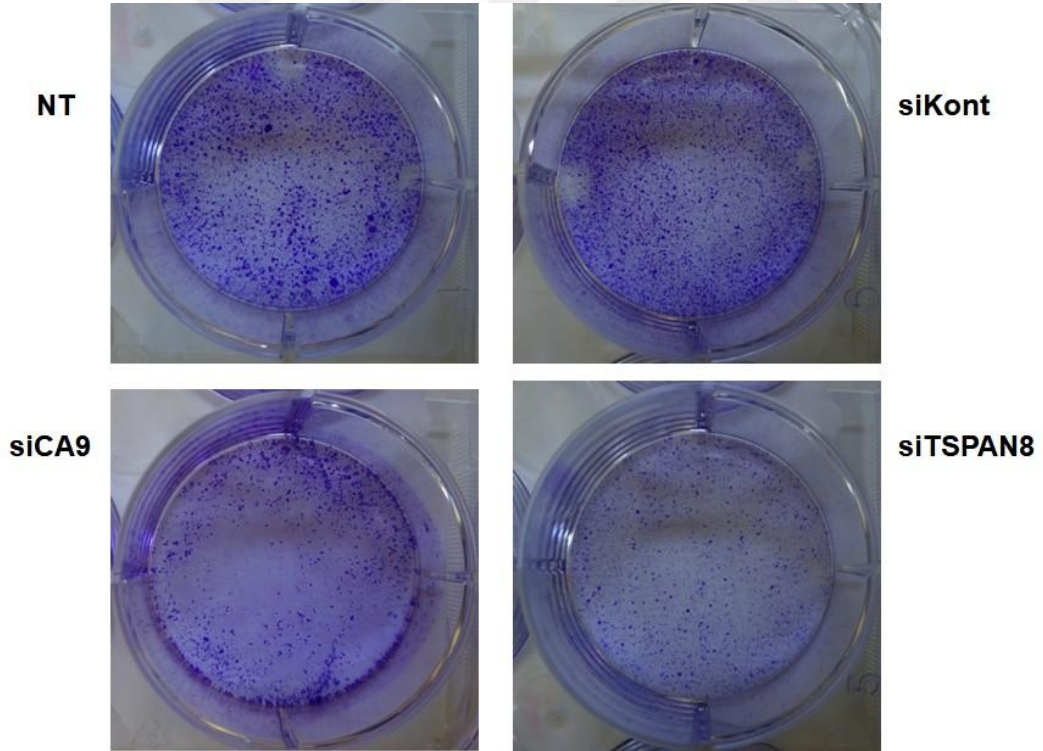
Şekil 3.38: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan koloni formasyon testi sonucu.



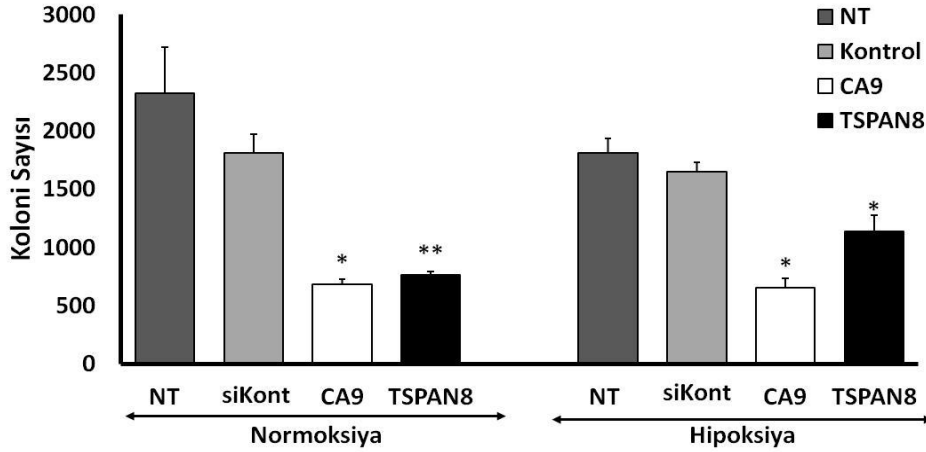
Şekil 3.39: Panc-1 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda oluşan koloni sayısı.



Şekil 3.40: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan koloni formasyon testi sonucu



Şekil 3.41: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan koloni formasyon testi sonucu

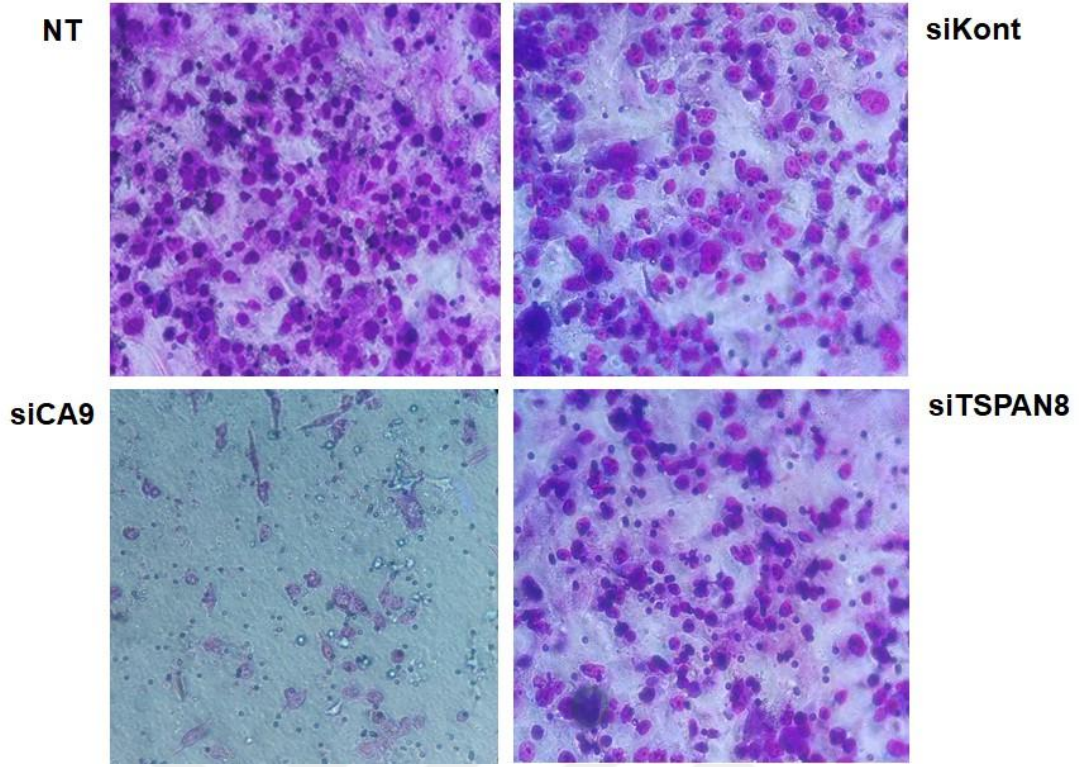


Şekil 3.42: MiaPaca-2 hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda oluşan koloni sayısı.

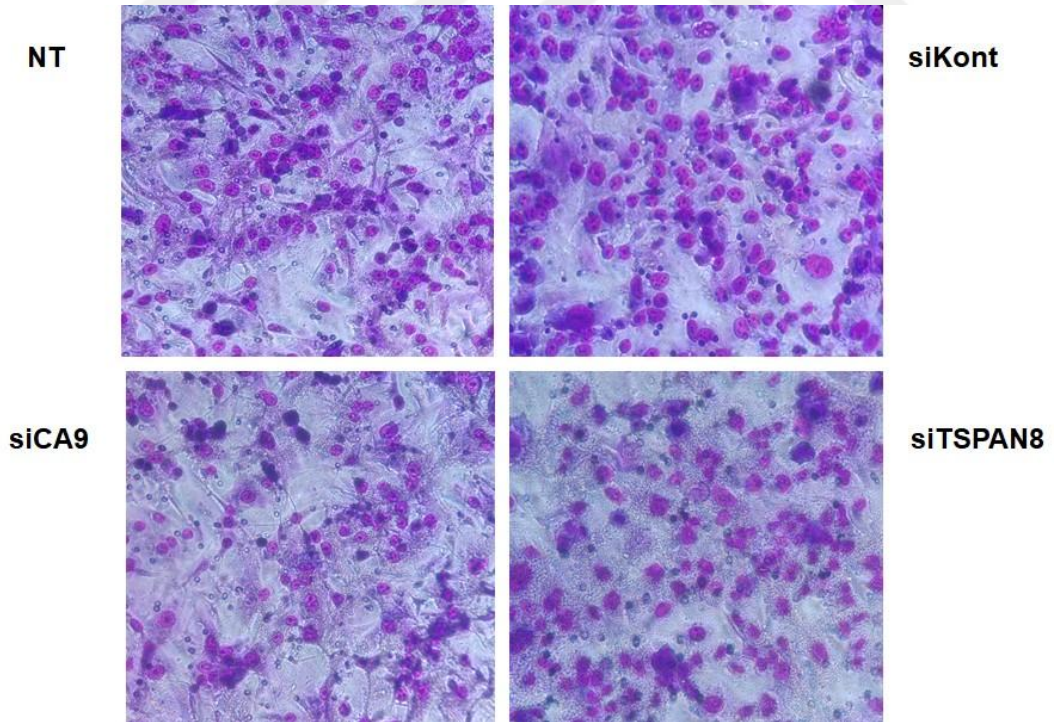
3.5 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinin İnvaziv Karakterlerine Etkisinin Belirlenmesi

CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pankreas kanseri hücrelerinin invazyon karakterine olan etkileri matrigel invazyon yöntemi ile belirlendi. Bölüm 2.3.1.8’de belirtildiği gibi hücreler 25cm²’lik flaslara ekildi. Ertesi gün bölüm 2.3.1.3’de belirtildiği gibi hücreler hipoksik ortam için uyarıldı ardından bölüm 2.3.1.4’de belirtildiği gibi siRNA transfeksiyonları yapıldı. Bölüm 2.3.1.8’de belirtildiği gibi invazyon testi gerçekleştirildi. 3 günlük inkübasyon sonrası hücreler bölüm 2.3.1.8’de belirtildiği gibi boyandı ve görüntüldü. Deneyler birbirinden bağımsız olacak şekilde iki kez tekrarlandı. Her gruptaki invaziv hücreler en az 5 farklı alan oluşacak şekilde fotoğraflandı. Hücreleri sayma işlemi İmageJ programı yardımı ile yapıldı. Her grup için 5 değerın ortalaması alınarak istatistiksel hesaplamaları Minitab14 programı ile yapıldı.

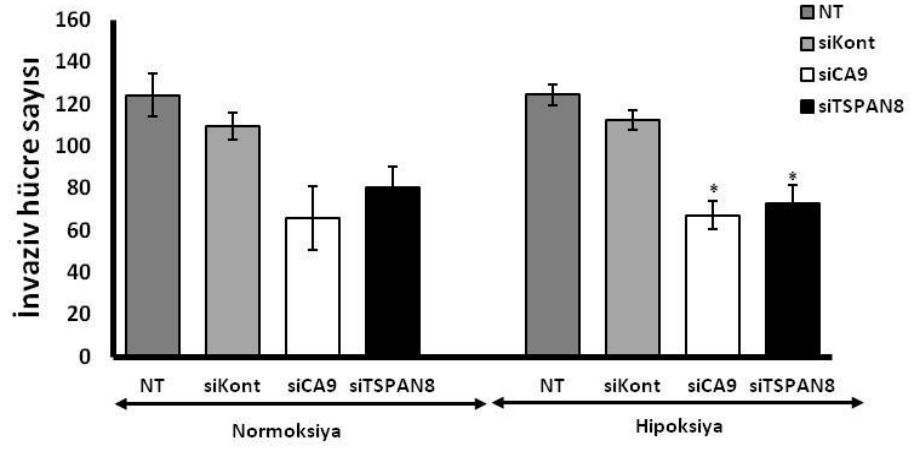
Normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 hücrelerinde CA9 siRNA’sı uygulanmış grup ile NT grubu karşılaştırıldığında siRNA uygulanan gruptaki hücre sayısının yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 3.40 ve Şekil 3.42). Normal ve hipoksik koşullarda büyüyen MiaPaca-2 hücre hattında NT ile CA9 ve TSPAN8 siRNA’sı uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında invaziv hücre sayısının azaldığı görülmektedir ($p < 0,05$) (Şekil 3.45, Şekil 3.46, Şekil 3.47). Genel olarak bakıldığında Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında normal oksijen koşullarında CA9 siRNA’sı ile susturulan hücrelerin invazyon kapasitesinin önemli derecede azaldığı görüldü (Şekil 3.45, Şekil 3.48). Normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullardaki TSPAN8 siRNA’sı transfekte edilen MiaPaca-2 hücrelerinde invazyon kapasitesinin, Panc-1 hücrelerinden daha az olduğu görüldü (Şekil 3.43, Şekil 3.44, Şekil 3.46, Şekil 3.47).



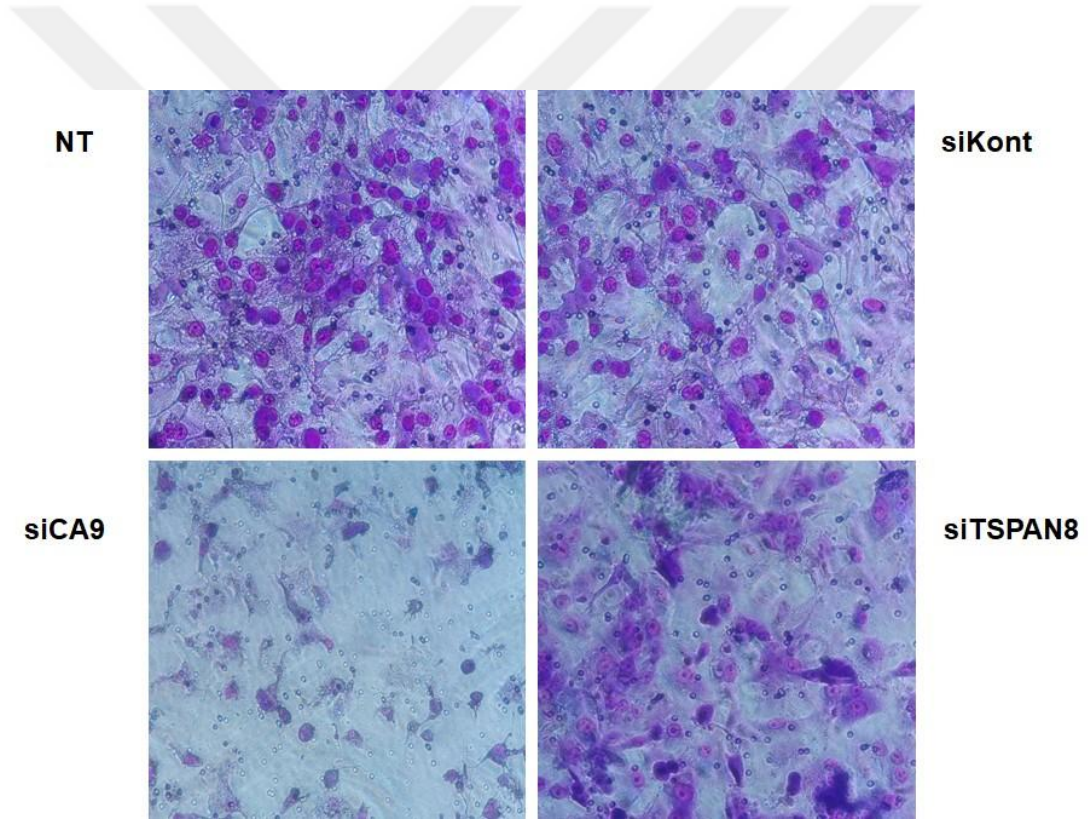
Şekil 3.43: Panc-1 hücre hattında normal koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.



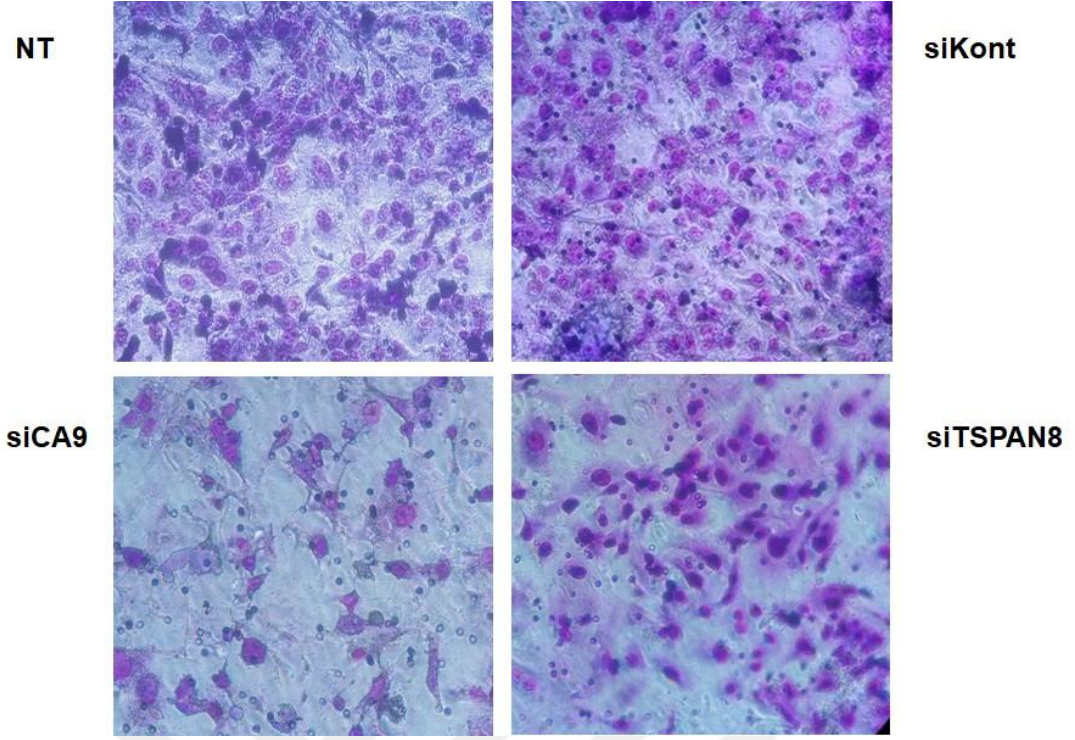
Şekil 3.44: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.



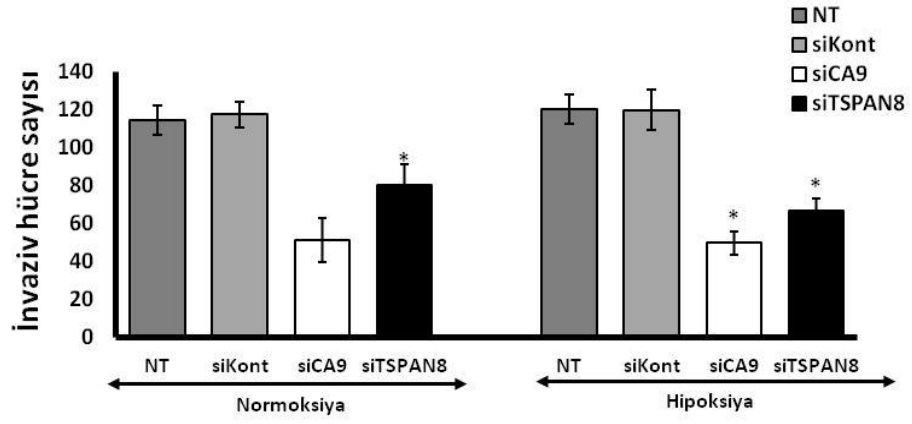
Şekil 3.45: Panc-1 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin invazyon kapasitesi.



Şekil 3.46: MiaPaca-2 hücre hattında normal koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.



Şekil 3.47: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan invazyon testinin görüntüsü.

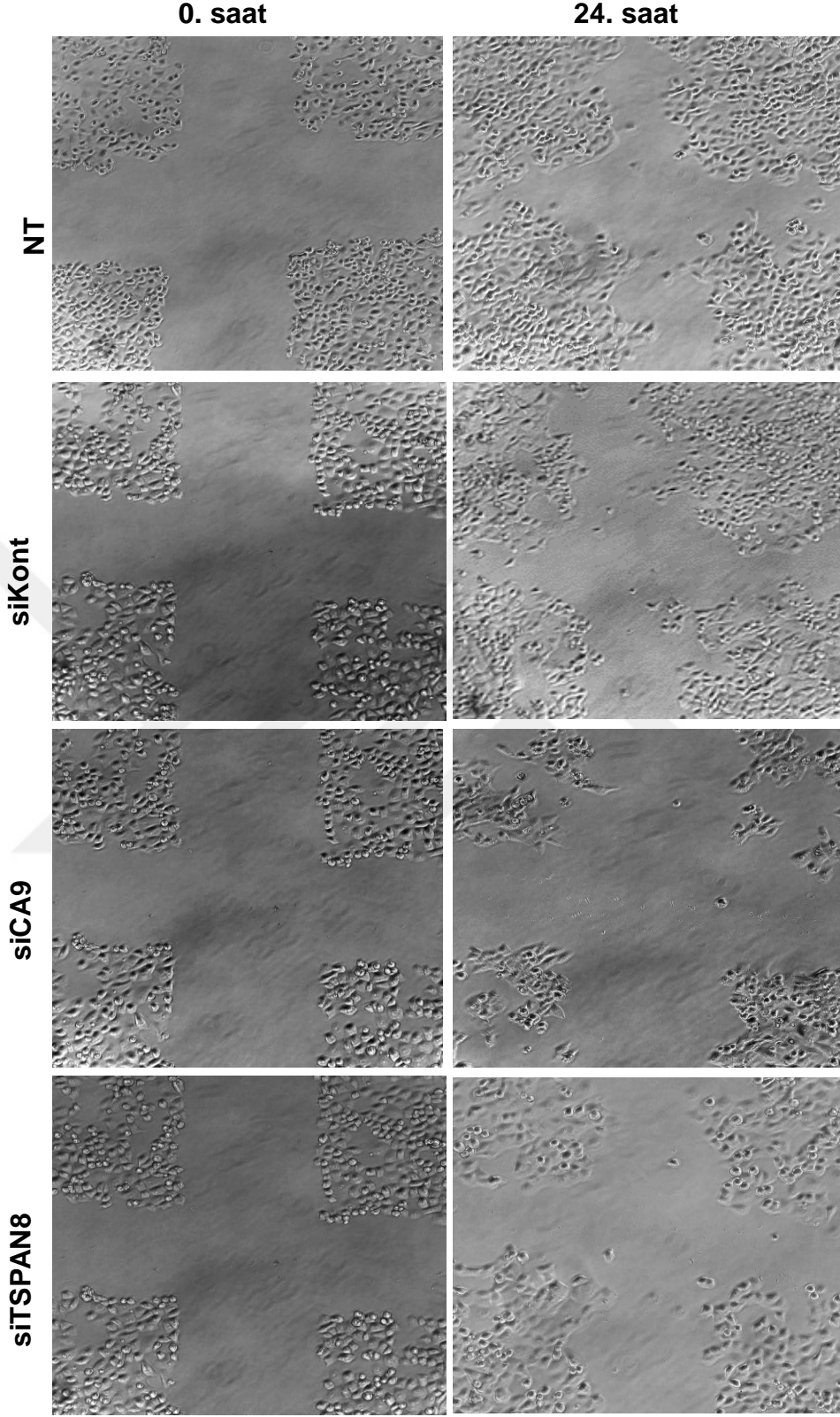


Şekil 3.48: MiaPaca-2 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin invazyon kapasitesi.

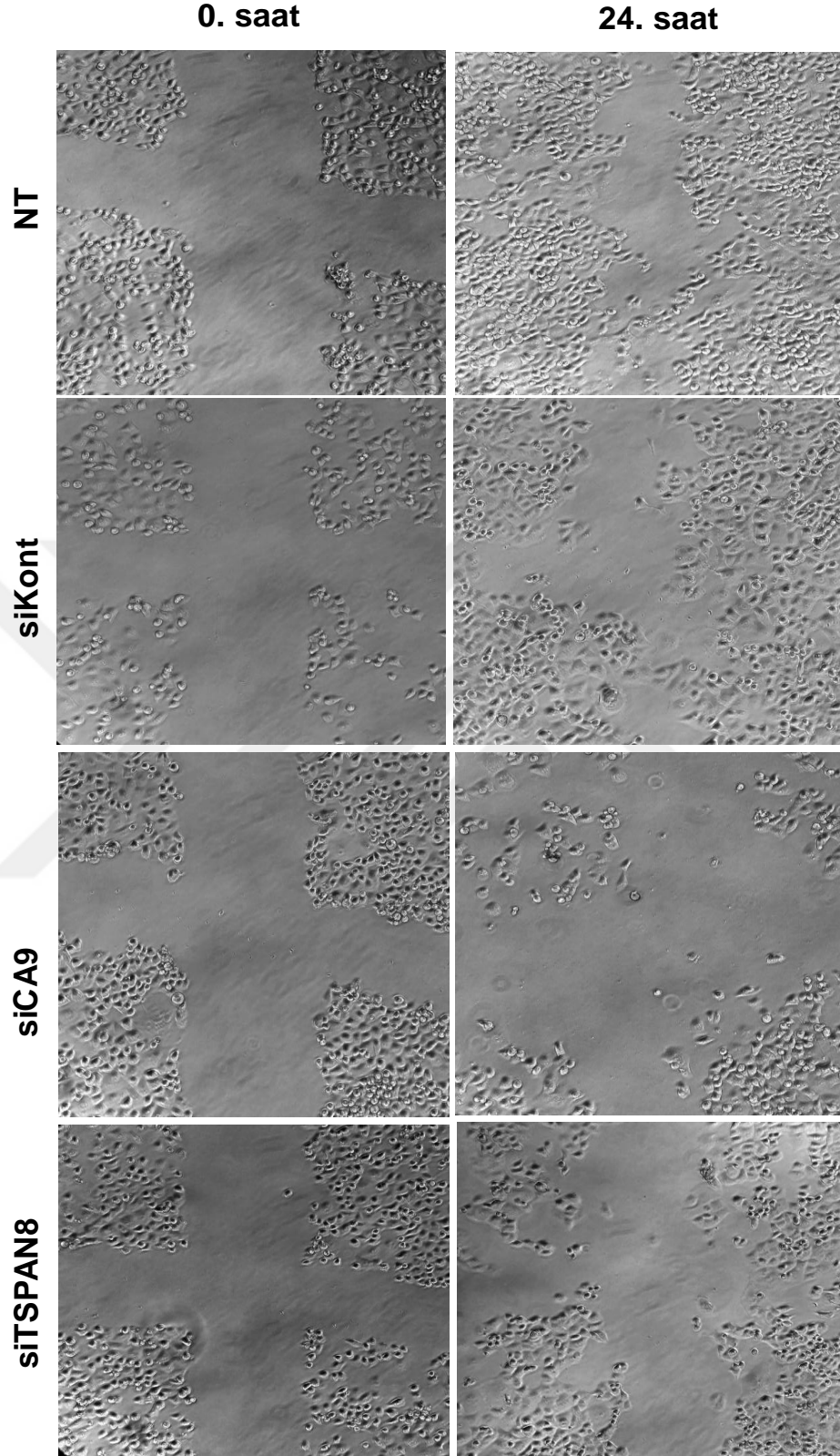
3.6 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 Hücrelerinin *In Vitro* Migrasyon Özelliklerine Etkisinin Belirlenmesi

CA9 ve TSPAN8 siRNA'ları ile susturulan Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde meydana gelebilecek migrasyon kapasitesindeki değişimi belirlemek için scratch testi bölüm 2.3.1.9'da belirtildiği gibi yapıldı. Deneyde 6 kuyucuklu plakalara 5×10^5 hücre/plaka olacak şekilde hücreler ekildi. Ertesi gün bölüm 2.3.1.3'de belirtildiği gibi hipoksik ortam oluşturuldu ve bölüm 2.2.1.4'de belirtildiği gibi siRNA transfeksiyonu yapıldı. Hücreler bölüm 2.3.1.9'da belirtildiği gibi migrasyon testi yapıldıktan sonra analiz edildi.

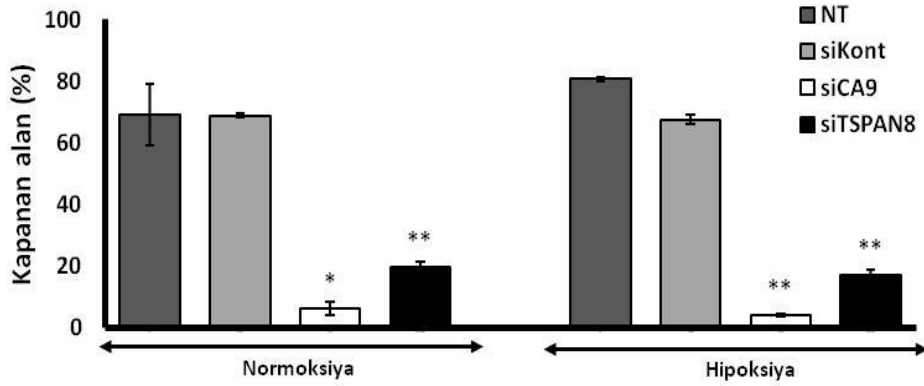
Normal ve hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 hücrelerinde siRNA uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu hücreleri ile kontrol siRNA uygulaması yapılan hücre gruplarında 24 saat sonunda alanın %70-%80 nin kapandığı belirlendi. Panc-1 hücrelerinde normal ve hipoksik koşullarda siRNA transfeksiyonu ile CA9 geni susturulduktan 24 saat sonra alanın yaklaşık %10, TSPAN8 geni susturulduktan 24 saat sonra ise alanın yaklaşık %20 oranında kapandığı belirlendi (Şekil 3.49, Şekil 3.50, Şekil 3.51).



Şekil 3.49: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan migrasyon testinin görüntüsü



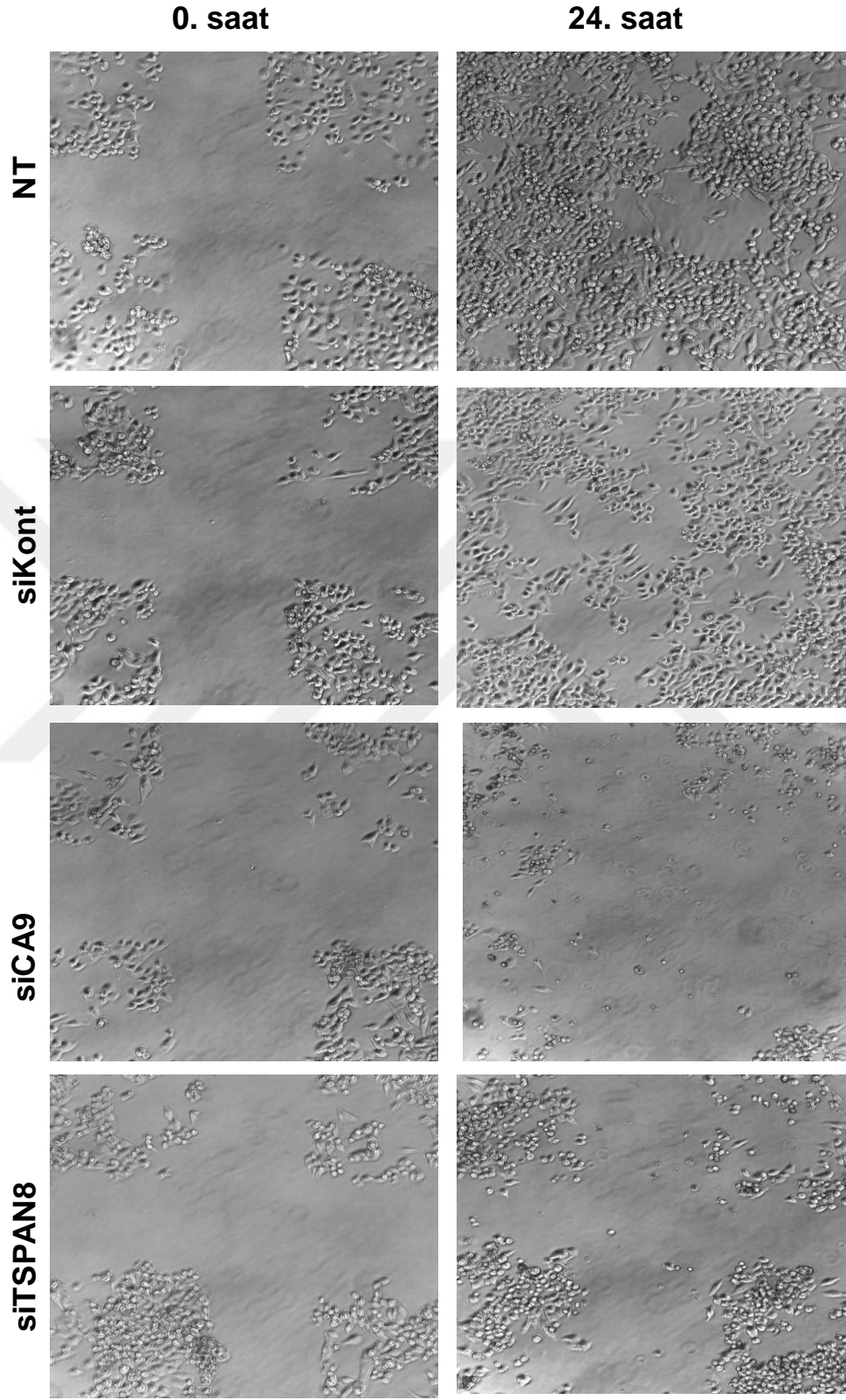
Şekil 3.50: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan migrasyon testinin görüntüsü



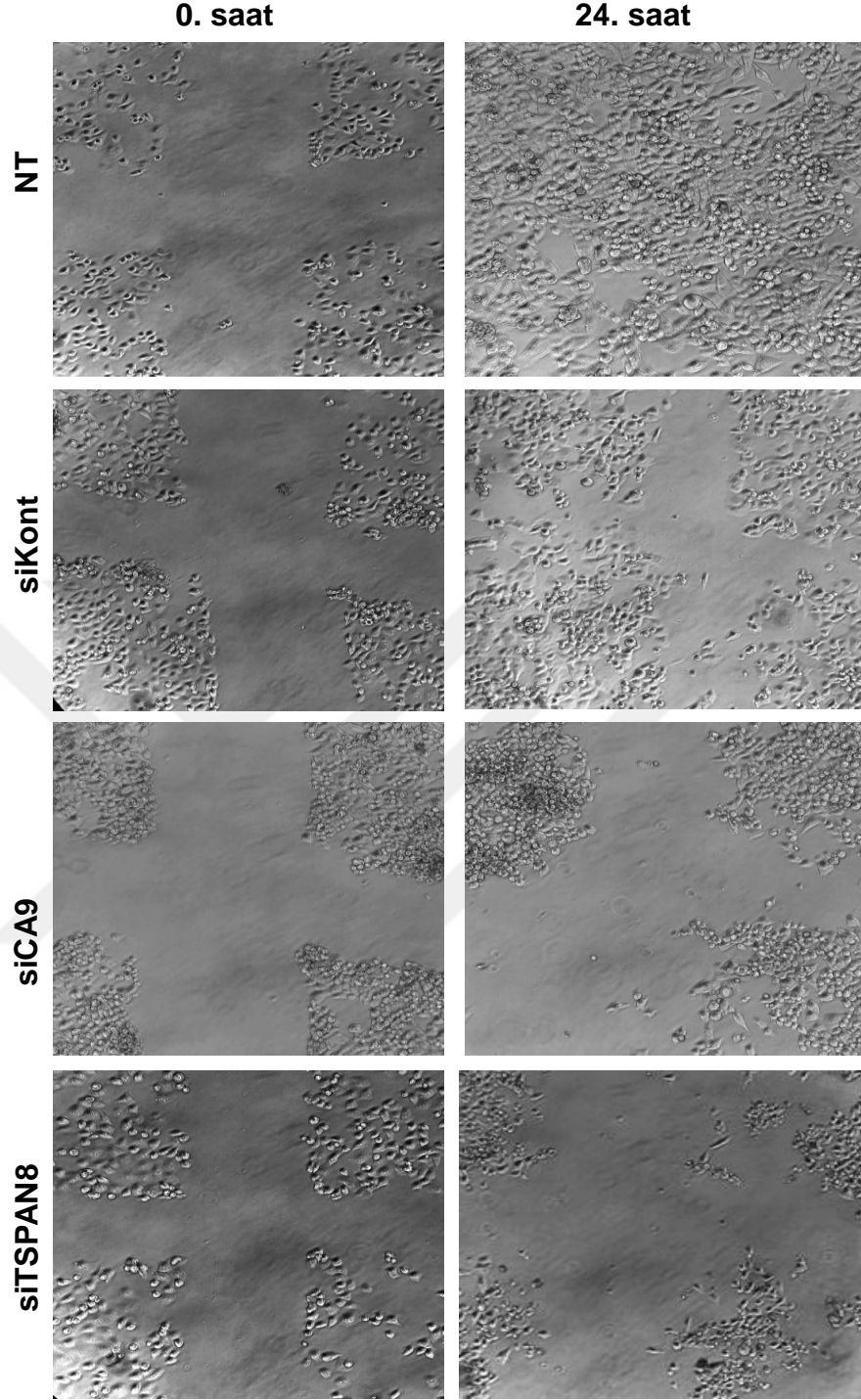
Şekil 3.51: Panc-1 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin migrasyon kapasitesi.

Normal oksijen koşullarında büyüyen MiaPaca-2 hücrelerinde siRNA uygulaması yapılmayan hücrelerde ve kontrol siRNA'sı uygulanmış gruplarda 24 saat sonra hasar verilen alanın tamamının kapandığı görülmüştür. CA9 siRNA'sı uygulanan grupta alan kapanmasının yaklaşık %5 TSPAN8 siRNA'sı uygulanan grupta ise hasarlı alan kapanmasının yaklaşık %40 olduğu tespit edildi (Şekil 3.52, Şekil 3.54)

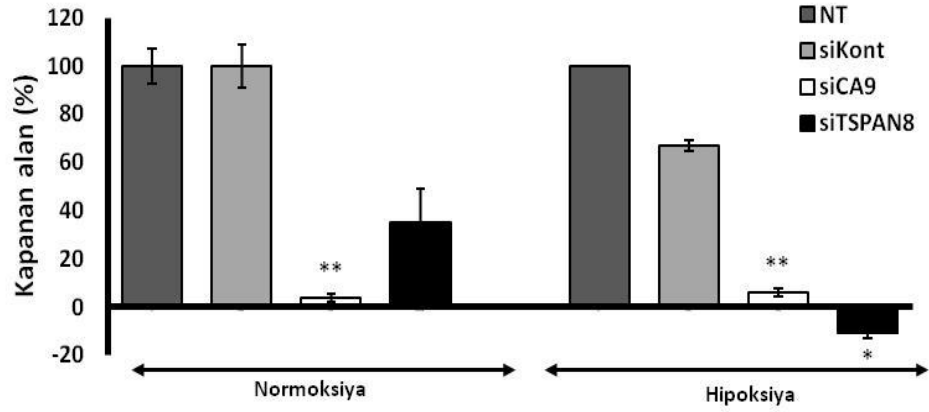
Hipoksik koşullarda büyüyen MiaPaca-2 hücrelerinde siRNA uygulaması yapılmayan NT grubundaki hücrelerin 24 saat sonunda alanın tamamını kapattığı görülürken kontrol siRNA'sı uygulanan gruptaki alan kapanmasının yaklaşık %70 olduğu görüldü. CA9 siRNA'sı uygulanan grupta 24 saatin sonunda alan kapanmasının %10 olduğu görülürken TSPAN8 siRNA'sı uygulanan grupta hasarlı alanın kapanmadığı gibi mevcut hücrelerinde yaklaşık %10 azaldığı görüldü (Şekil 3.53, Şekil 3.54).



Şekil 3.52: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan migrasyon testinin görüntüsü.



Şekil 3.53: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda yapılan migrasyon testinin görüntüsü.



Şekil 3.54: MiaPaca-2 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonundan sonra hücrelerin migrasyon kapasitesi.

3.7 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulması ve Apoptoz ile İlişkinin Belirlenmesi

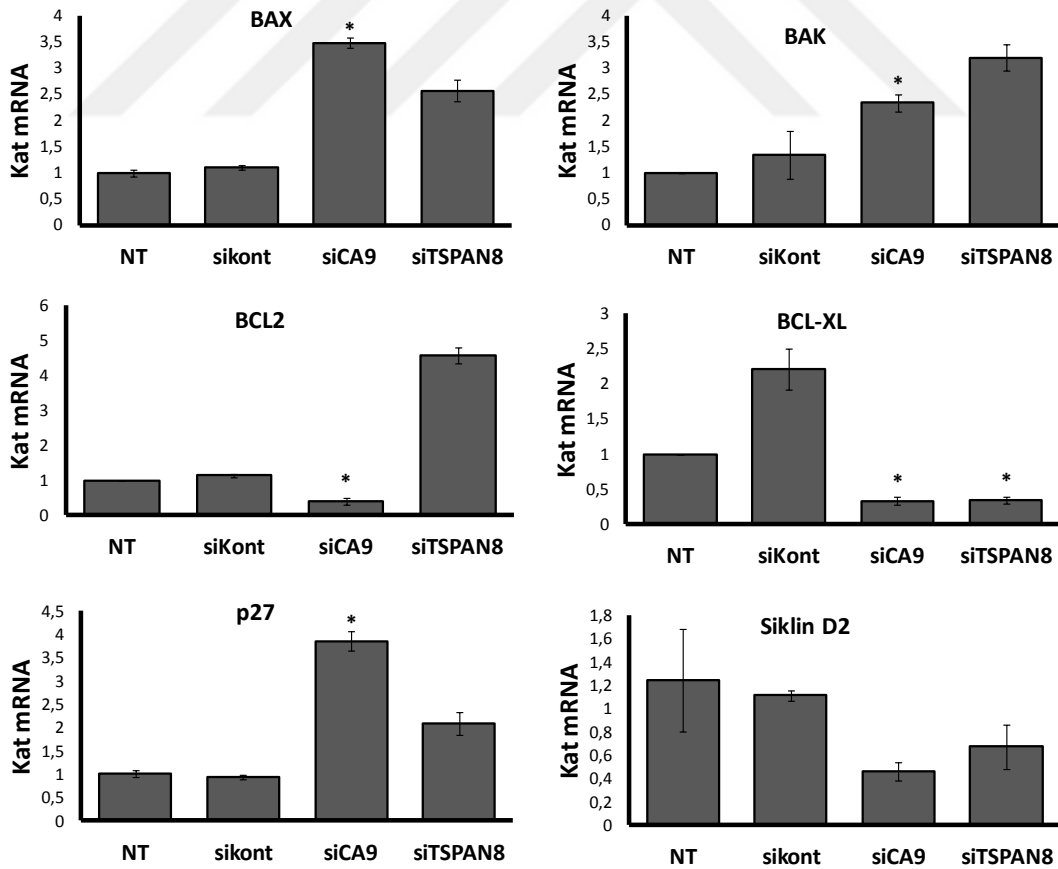
CA9 ve TSPAN8 siRNA'ları kullanılarak Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde susturmanın hücre düzeyindeki etkileri araştırıldığında hem hücre sayısında azalma hem de kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinde azalma olduğu görülmektedir. Hücre düzeyindeki bu değişimden yola çıkarak hangi hücre ölüm yolunu kullandığını tespit etmeye çalıştık. Apoptotik hücre ölüm yolu mRNA seviyesinde Bcl-2 gen ailesine ait anti-apoptotik (Bcl-2 ve Bcl-XL) ve pro-apoptotik (Bax ve Bak) genlerdeki değişimler Realtime PCR, protein seviyesinde anti-apoptotik Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax proteinlerindeki değişimler flowsitometri yöntemi ile incelenmiştir.

3.7.1 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Apoptoz İlişkili Genlere Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

Normal ve hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerine bölüm 2.3.1.4'de belirtildiği gibi CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonu yapılmış ardından bölüm 2.3.1.10'da belirtildiği gibi RNA izolasyonları, bölüm 2.3.1.12'de belirtildiği gibi cDNA sentezleri yapılmıştır. Tablo 2.17' de yer alan anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-XL, proapoptotik Bax, Bak ve hücre döngüsünde görevli p27, siklin D2 genlerine spesifik primerler ile bölüm 2.3.1.13'de belirtildiği realtime PCR yapılarak mRNA seviyesindeki değişimler tespit edildi. Real time PCR analizleri birbirinden bağımsız en az 3 deney tekrarlı ve her deneyde en az 3

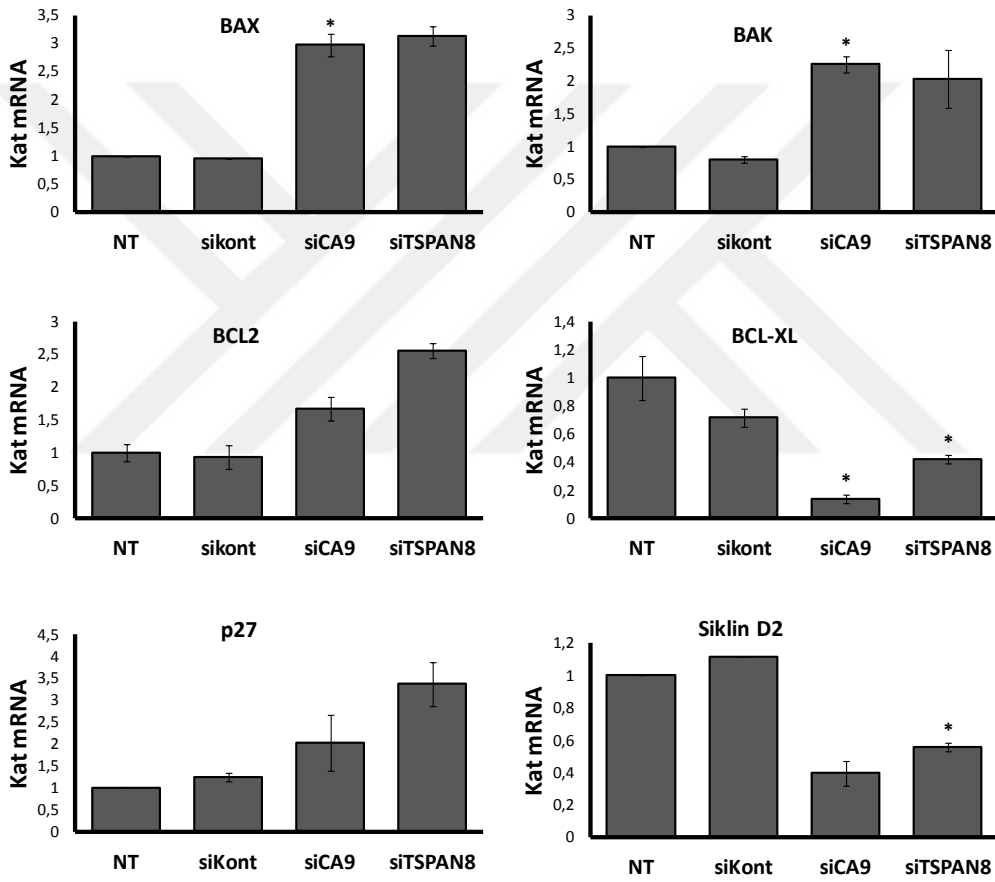
tekrarlı çalışıldı. Normalizasyon için tablo 2.16'da belirtilen insan- β -2-mikroglobulin primerleri kullanıldı. Bölüm 2.3.1.13'de belirtildiği gibi mRNA seviyesi $\Delta\Delta Ct$ değerleri Livak metoduna göre hesaplandı. Livak metoduna göre değerlendirilen gruplar NT ile oranlanarak kat değeri hesaplandı ve grafikler oluşturuldu.

Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan siRNA uygulamalarının mRNA analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tüm gruplarda uygulama yapılmamış olan NT ile kontrol siRNA uygulanan siKont arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Bu durum, kontrol siRNA uygulamasının hücrelerde anlamlı bir etki oluşturmadığını göstermektedir. NT grubu ile karşılaştırıldığında, CA9 ve TSPAN8 siRNA'sı ile susturulan hücrelerde Bax ve Bak mRNA seviyesi artarken Bcl-2 ve Bcl-XL mRNA seviyesinin arttığı görüldü ve CA9 siRNA'sı uygulanan gruplardaki değişimin anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). TSPAN8 siRNA'sı uygulandığında Bcl-XL mRNA seviyesinde meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). CA9 siRNA'sı ile susturulan hücrelerde hücre döngüsünde görevli p27 mRNA seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı, siklinD2 seviyesinin ise azaldığı görüldü (Şekil3.55).



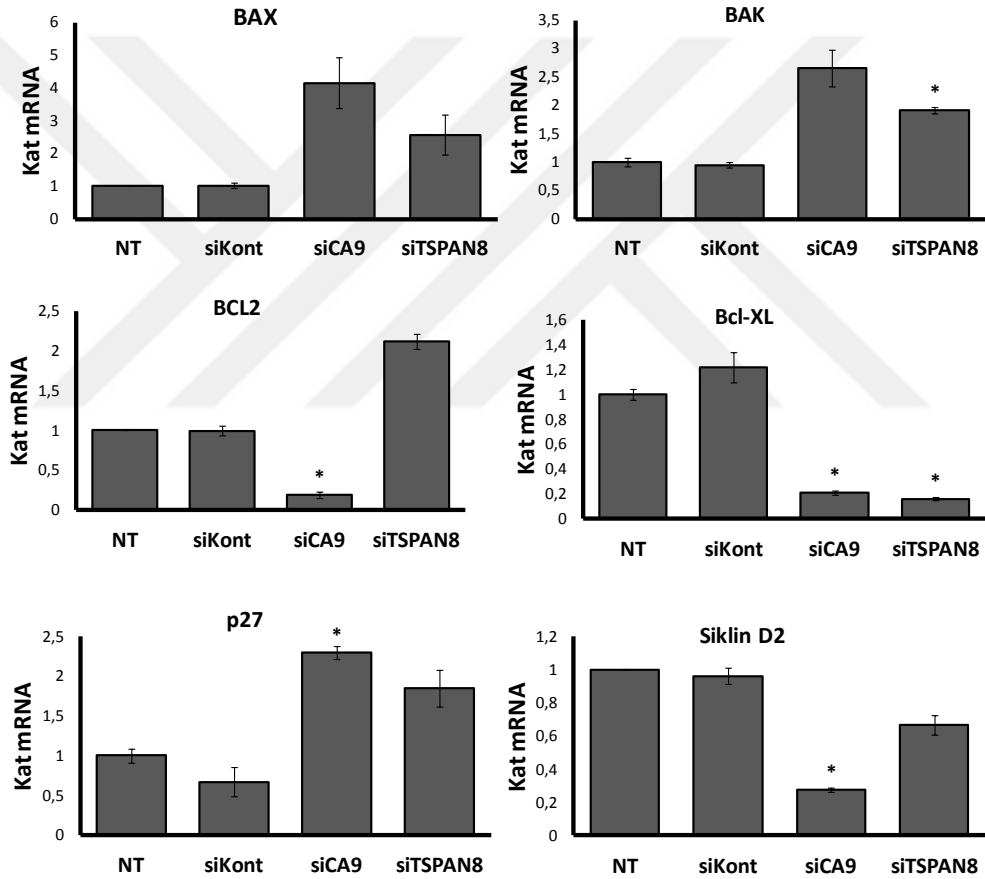
Şekil 3.55: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

Panc-1 hipoksiyada hiçbir grupta NT grubu ile siKont grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). NT grubu ile karşılaştırıldığında, CA9 ve TSPAN8 siRNA'sı ile susturulan hücrelerde normal oksijen koşullarında olduğu gibi Bax ve Bak mRNA seviyesi artarken Bcl-2 ve Bcl-XL mRNA seviyesinin arttığı görüldü. CA9 siRNA'sı uygulandığında Bax ve Bak mRNA'sındaki değişimin anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bcl-XL mRNA seviyesinde meydana gelen azalmanın hem CA9 hemde TSPAN8 siRNA'sı uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). CA9 ve TSPAN8 siRNA'sı ile susturulan hücrelerde hücre döngüsünde görevli p27 mRNA seviyesinin arttığı, siklinD2 seviyesinin ise azaldığı görüldü (Şekil3.56).



Şekil 3.56: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

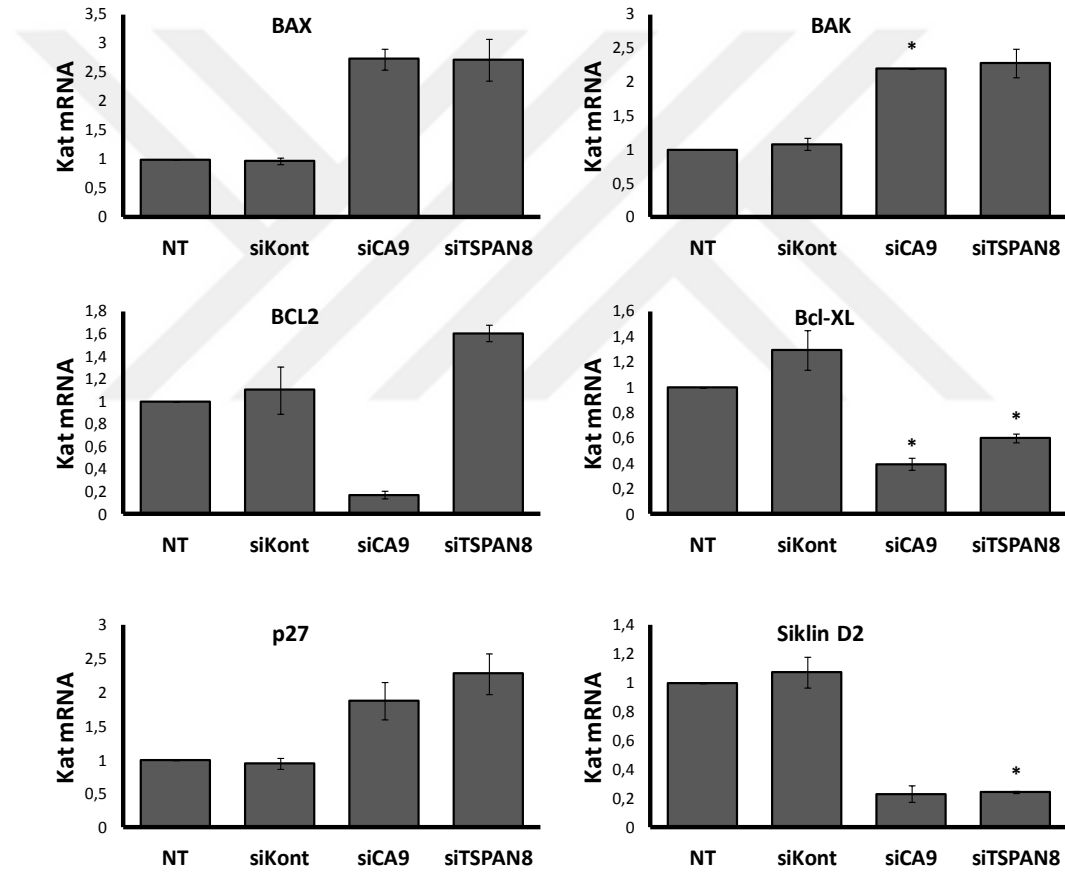
MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan siRNA uygulamalarının mRNA analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tüm gruplarda uygulama yapılmamış olan NT ile kontrol siRNA uygulanan siKont arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). CA9 ve TSPAN8 siRNA uygulanan gruplar kontrol siRNA uygulanan siKont grubu ile karşılaştırıldıklarında Bax, Bak ve p27 mRNA seviyesinde artış olduğu, Bcl-2 ve Bcl-XL mRNA seviyesinde ise azalma olduğu görüldü. CA9 susturulduğunda Bcl-2, Bcl-XL ve siklin D2 mRNA seviyesinde meydana gelen azalma ve p27 mRNA seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). TSPAN8 sustuğunda ise Bak mRNA seviyesindeki artışın ve Bcl-XL seviyesindeki artışın anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 3.57).



Şekil 3.57: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

MiaPaca-2 hücre hattında hipoksiyada yapılan siRNA uygulamalarının mRNA analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tüm gruplarda uygulama yapılmamış olan NT ile kontrol siRNA uygulanan siKont arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). CA9 siRNA uygulanan gruplar kontrol siRNA uygulanan siKont grubu

ile karşılaştırıldıklarında Bax, Bak ve p27 mRNA seviyesinde artış olduğu, Bcl-2, Bcl-XL ve siklinD2 mRNA seviyesinde ise azalma olduğu görüldü. TSPAN8 siRNA uygulanan gruplar kontrol siRNA uygulanan siKont grubu ile karşılaştırıldıklarında Bax, Bak, Bcl-2 ve p27 mRNA seviyesinde artış olduğu, Bcl-XL ve siklinD2 mRNA seviyesinde ise azalma olduğu görüldü. CA9 siRNA uygulanan grup kontrol siRNA uygulanan siKont grubu ile karşılaştırıldıklarında Bak mRNA seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).TSPAN8 siRNA uygulanan gruplar kontrol siRNA uygulanan siKont grubu ile karşılaştırıldıklarında siklinD2 mRNA seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Bcl-XL mRNA seviyesindeki artışlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 3.58: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

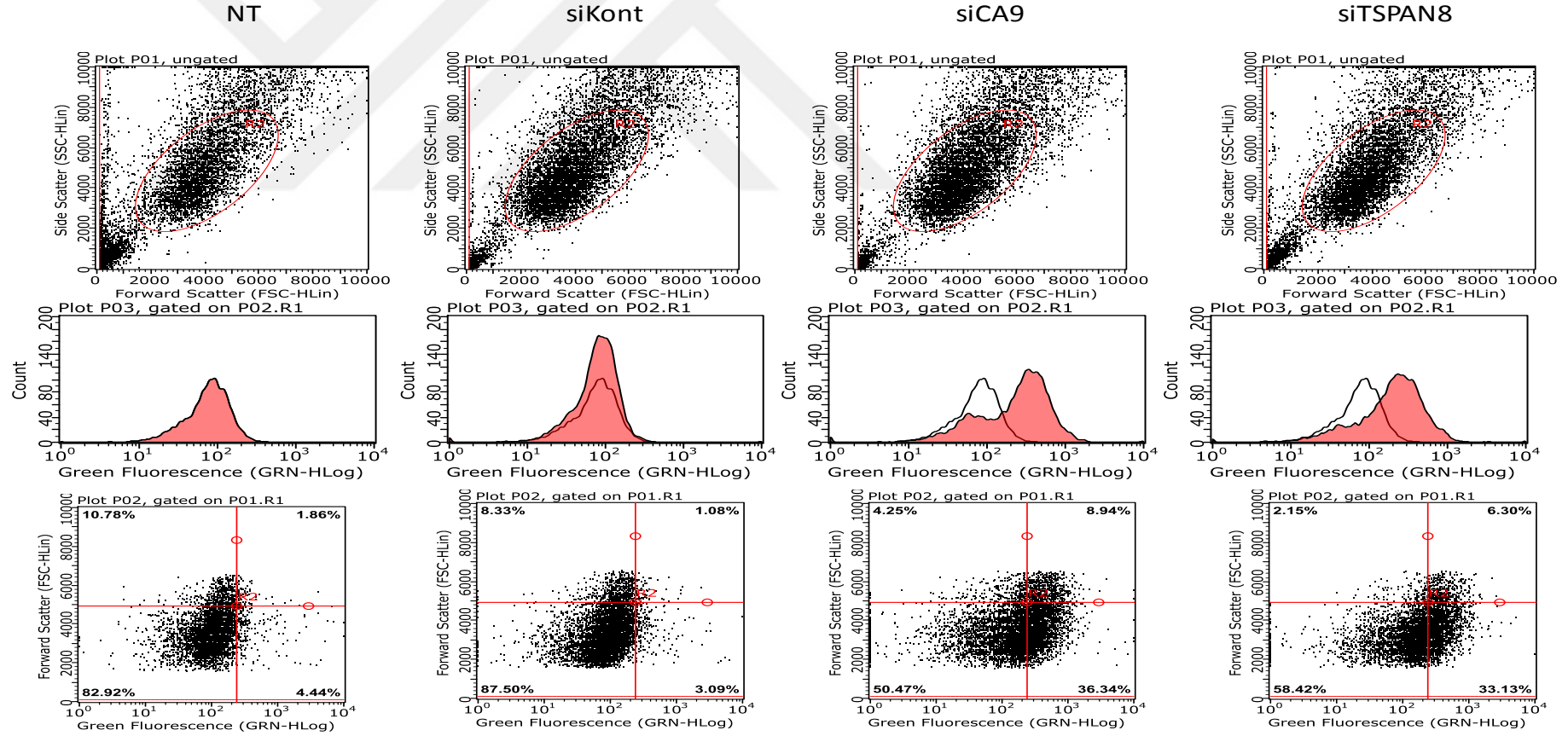
3.7.2 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Apoptoz İlişkili Proteinlere Etkilerinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi

Normal ve hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerine bölüm 2.3.1.4'de belirtildiği gibi CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonu yapılmış ardından bölüm 2.3.1.16'da belirtildiği gibi tripsinizasyonla flask yüzeyinden kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Fiksasyon işleminden sonra spesifik olmayan bağlanmaların engellemek için %5BSA içeren PBS ile bloklama işlemi yapıldı. Hücreler primer (anti-apoptotik Bcl-2, proapoptotik Bax) ve sekonder antikor ile işaretlendikten sonra Flowsitometri ile ölçümleri yapıldı. Flow sitometrinin programından elde edilen grafikler kullanıldı.

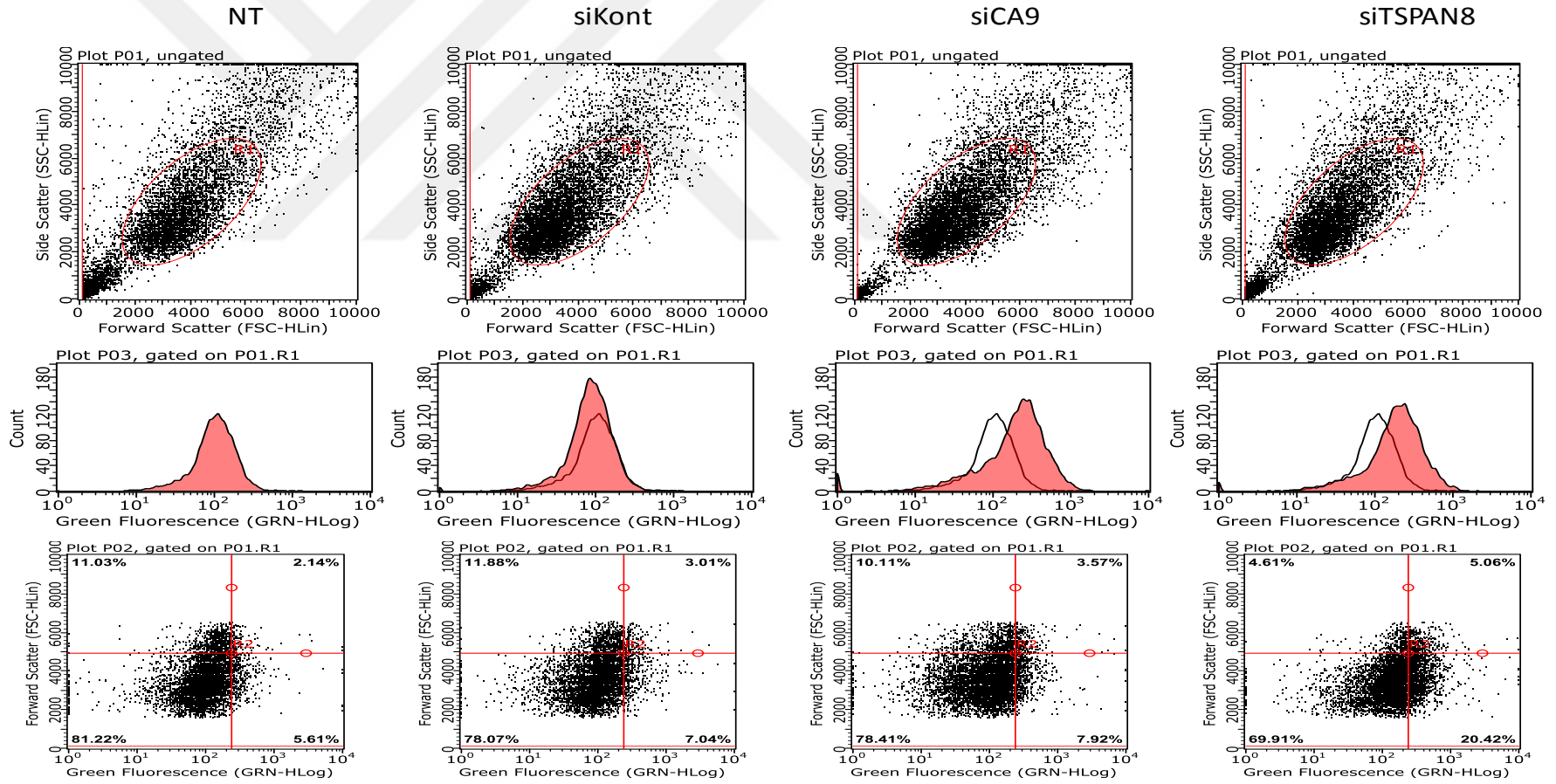
Protein ekspresyonunu tespit edebilmek için farklı grafikler kullanıldı. Doğru hücre topluluğunu tespit edebilmek için (kapı alma) ilk sırada görüldüğü gibi hücre granülitesi (side scatter) ve büyüklüğü (Forward scatter) grafiği kullanıldı. İkinci sırada görülen histogram grafiğinde ise seçilen hücre popülasyonunun protein ekspresyonunu göstermektedir. Üçüncü sırada görülen quadrant grafikte ise NT grubunda bulunan hücre popülasyonunun en yoğun olduğu bölge sol altta kalacak şekilde alan dörte ayrıldı ve diğer gruptaki hücrelerin değişimi alanlara düşen hücrelerin yüzdeleri olarak belirlendi.

Normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 hücre hattına bakıldığında siCA9 ve siTSPAN8 uygulanmış hücreler NT hücreler ile karşılaştırıldığında antiapoptotik Bcl-2 geninin ekspresyonunun arttığı görüldü (Şekil 3.59). Hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 hücrelerinde NT ile karşılaştırılan siCA9 uygulanmış hücrelerde Bcl-2 ekspresyonunun değişmediği görülürken siTSPAN8 uygulanmış hücreler NT ile karşılaştırıldığında Bcl-2 ekspresyonunun arttığı görüldü (Şekil 3.60). NT ile karşılaştırıldığında CA9 ve TSPAN8 genleri susturulan hem normal hemde hipoksik ortamda büyüyen Panc-1 hücrelerinde Proapoptotik Bax protein seviyesinde etkili bir değişim olmadığı görüldü (Şekil 3.61, Şekil 3.62).

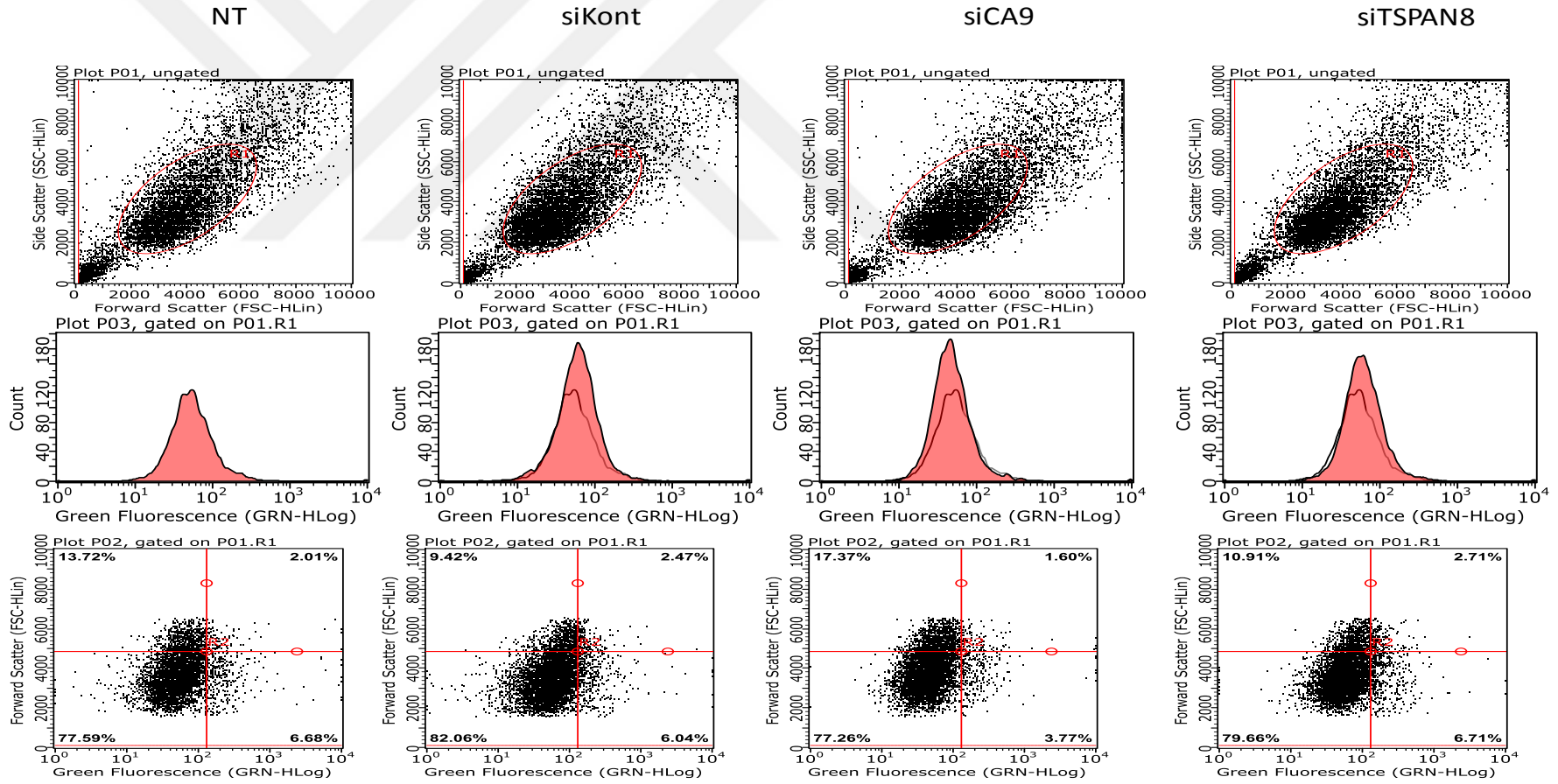
Normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda büyüyen MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genleri susturulduğunda Bcl-2 proteininin ekspresyonunun arttığı tespit edildi (Şekil 3.63, Şekil 3.64). Bax proteininin ekspresyonu hem hipoksik hemde normal oksijen koşullarında büyüyen hücrelerde CA9 siRNAsı uygulandığında 2 katlık bir artışa neden olduğu TSPAN8 siRNA'sı uygulandığında ise 3 katlık bir artışa neden olduğu görüldü (Şekil 3.65, Şekil 3.66 ve Tablo 3.1).



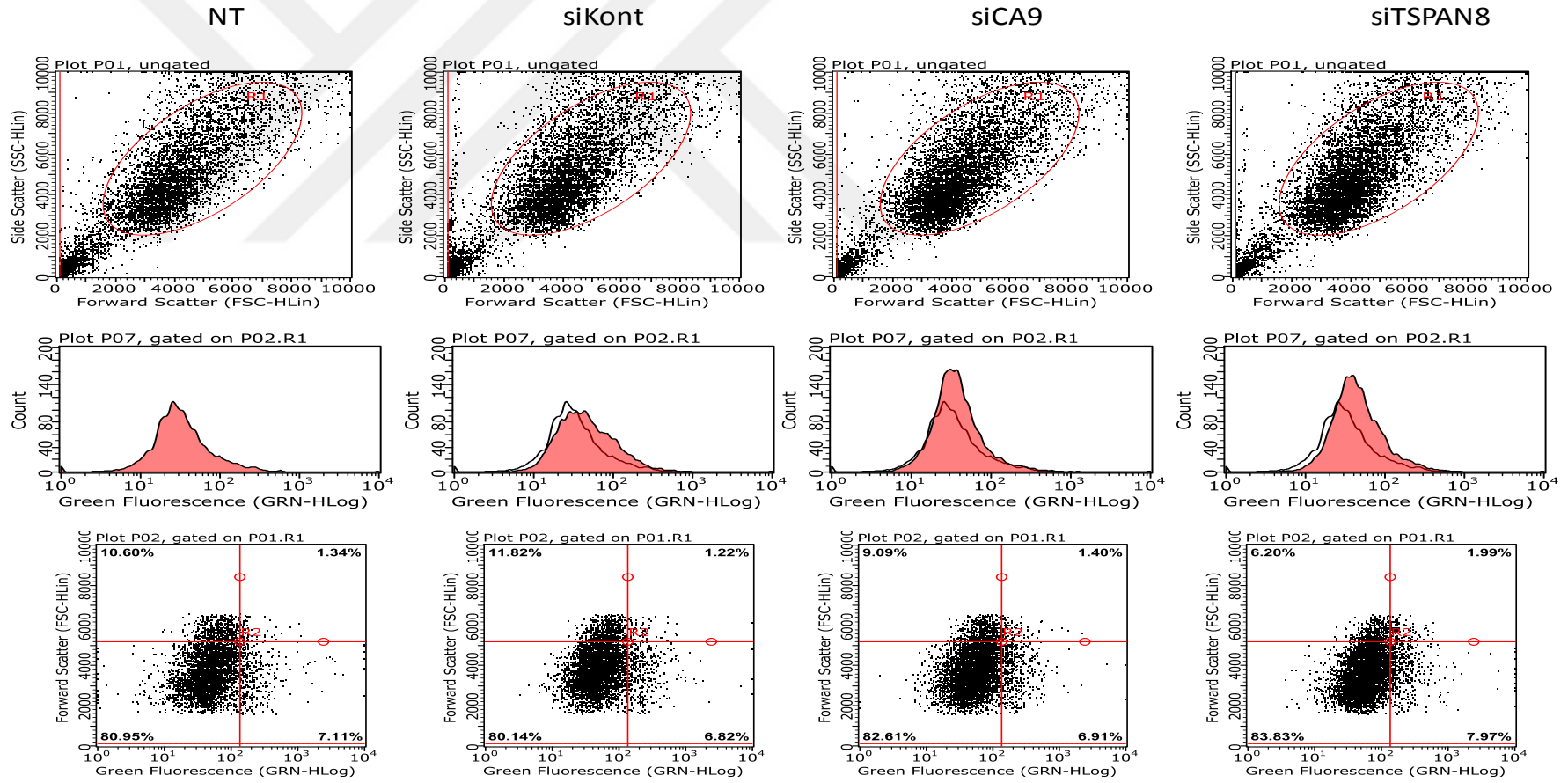
Şekil 3.59: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.



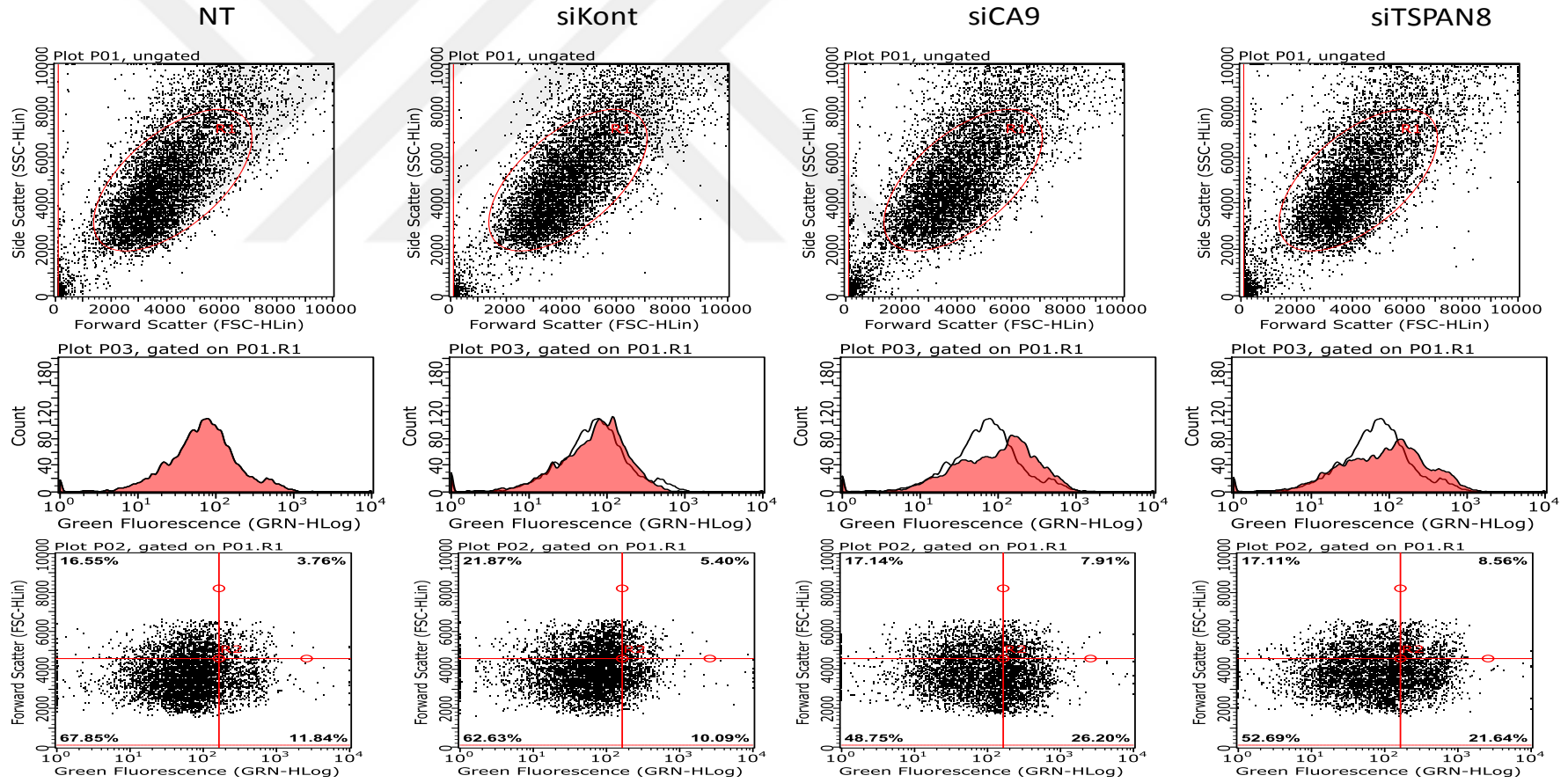
Şekil 3.60: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.



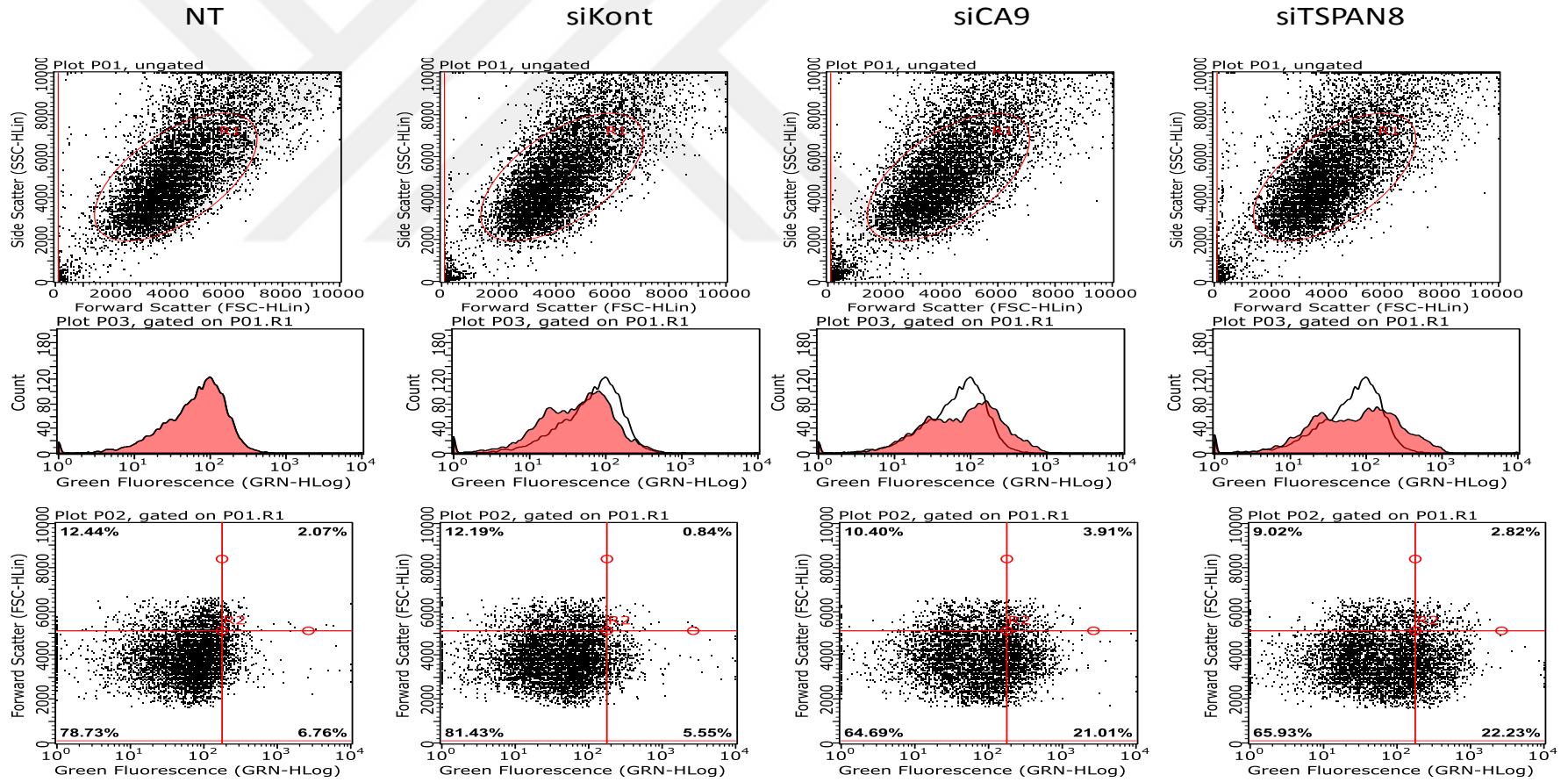
Şekil 3.61: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.



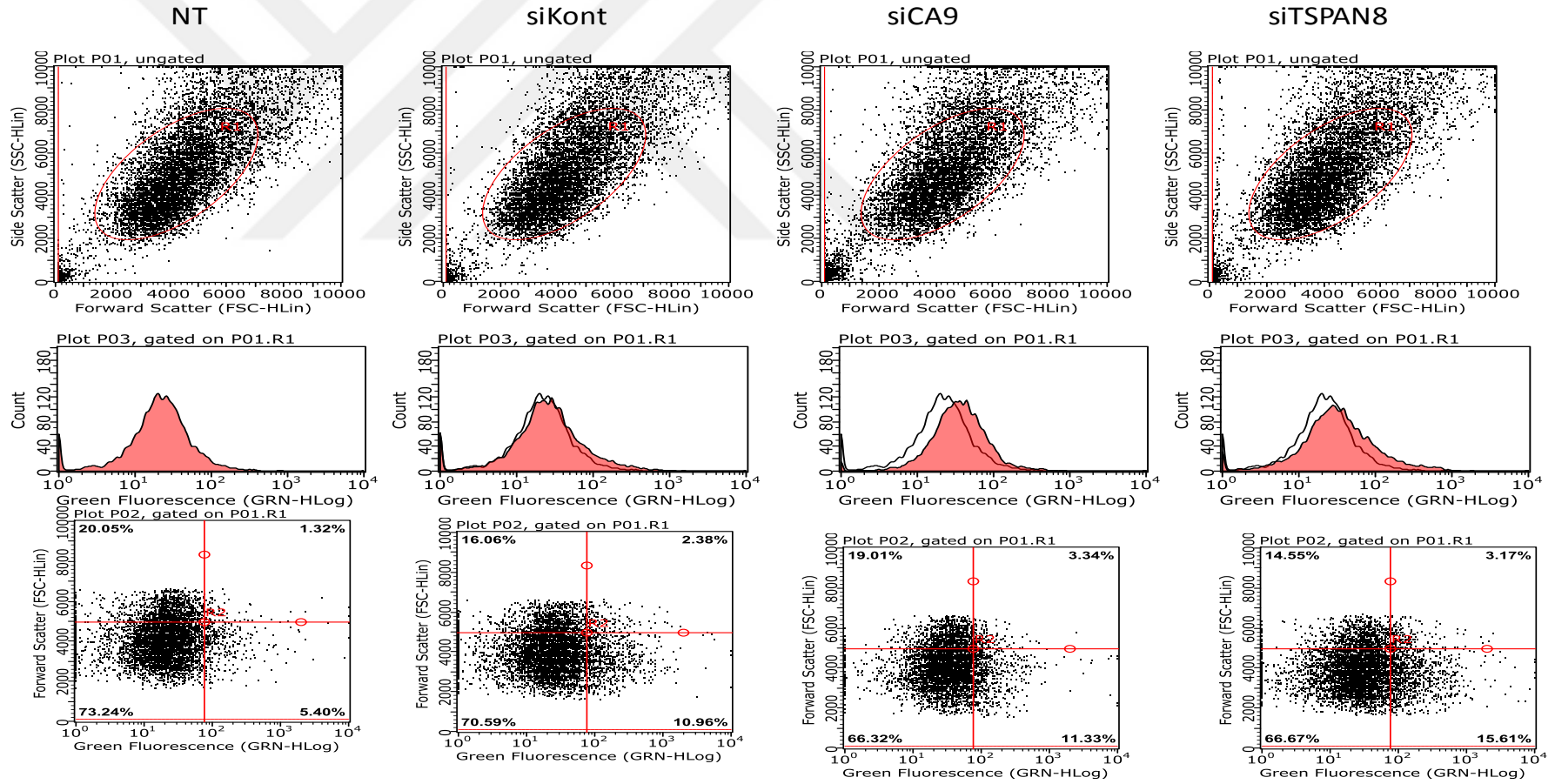
Şekil 3.62: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.



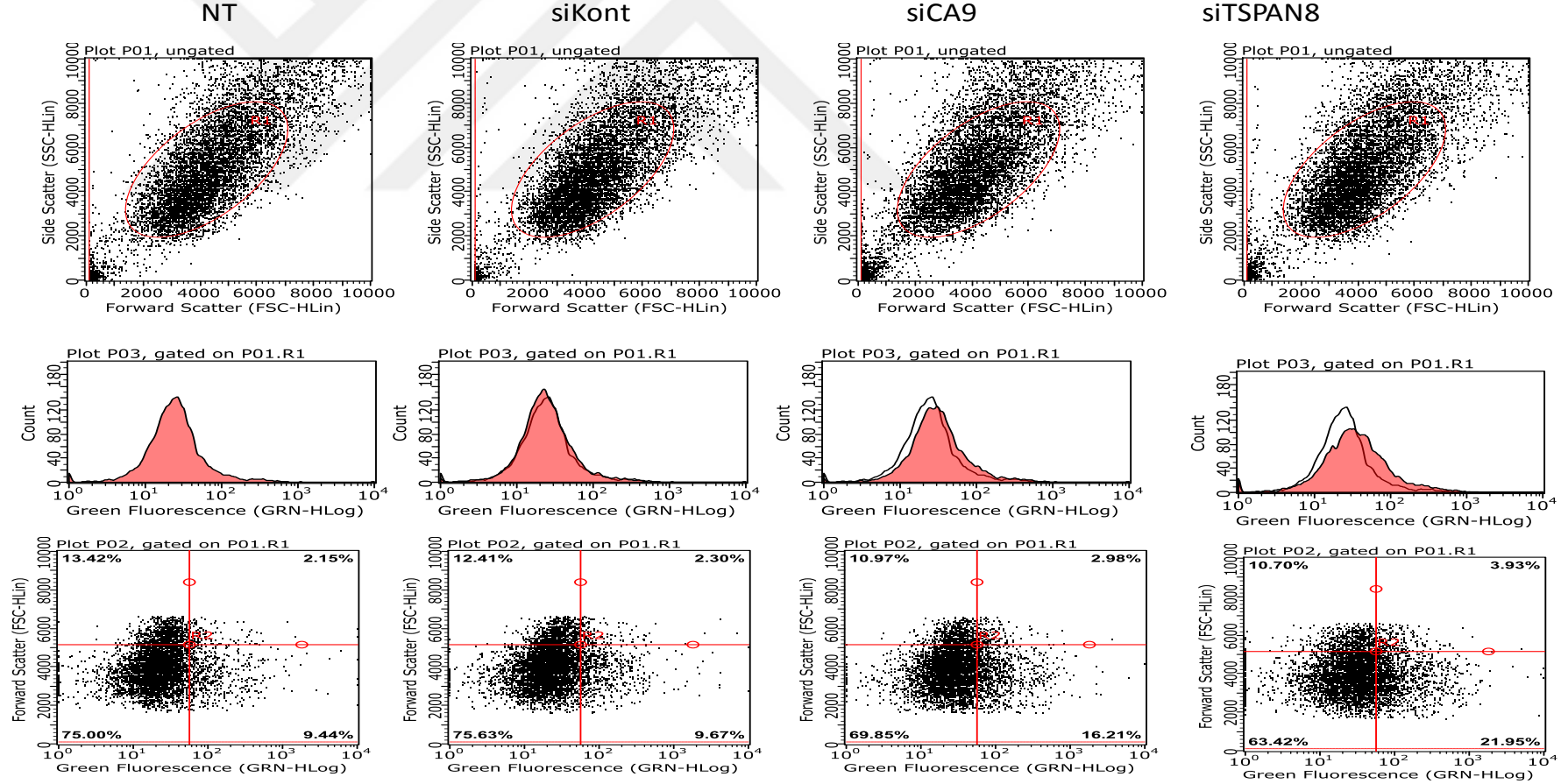
Şekil 3.63: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.



Şekil 3.64: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının anti-apoptotik Bcl-2 proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.



Şekil 3.65: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.



Şekil 3.66: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının pro-apoptotik Bax proteinine etkisinin Flowsitometri ile gösterilmesi.

Tablo 3.1: Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde Bcl-2 ve Bax proteinlerinin floresans ışımaya değerleri.

Hücre hatları	Gruplar	%Bcl-2 floresans	% Bax floresans
Panc-1 Normoksiya	NT	4,44	6,68
	siKont	3,09	6,04
	siCA9	36,34	3,77
	siTSPAN8	33,13	6,71
Panc-1 Hipoksiya	NT	6,61	7,11
	siKont	7,04	6,82
	siCA9	7,92	6,91
	siTSPAN8	20,42	7,97
MiaPaca-2 Normoksiya	NT	11,84	5,40
	siKont	10,09	10,96
	siCA9	26,20	11,33
	siTSPAN8	21,64	15,61
MiaPaca-2 Hipoksiya	NT	6,76	9,44
	siKont	5,55	9,67
	siCA9	21,01	16,21
	siTSPAN8	22,23	21,95

3.8 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulması ve Otofaji ile İlişkisinin Belirlenmesi

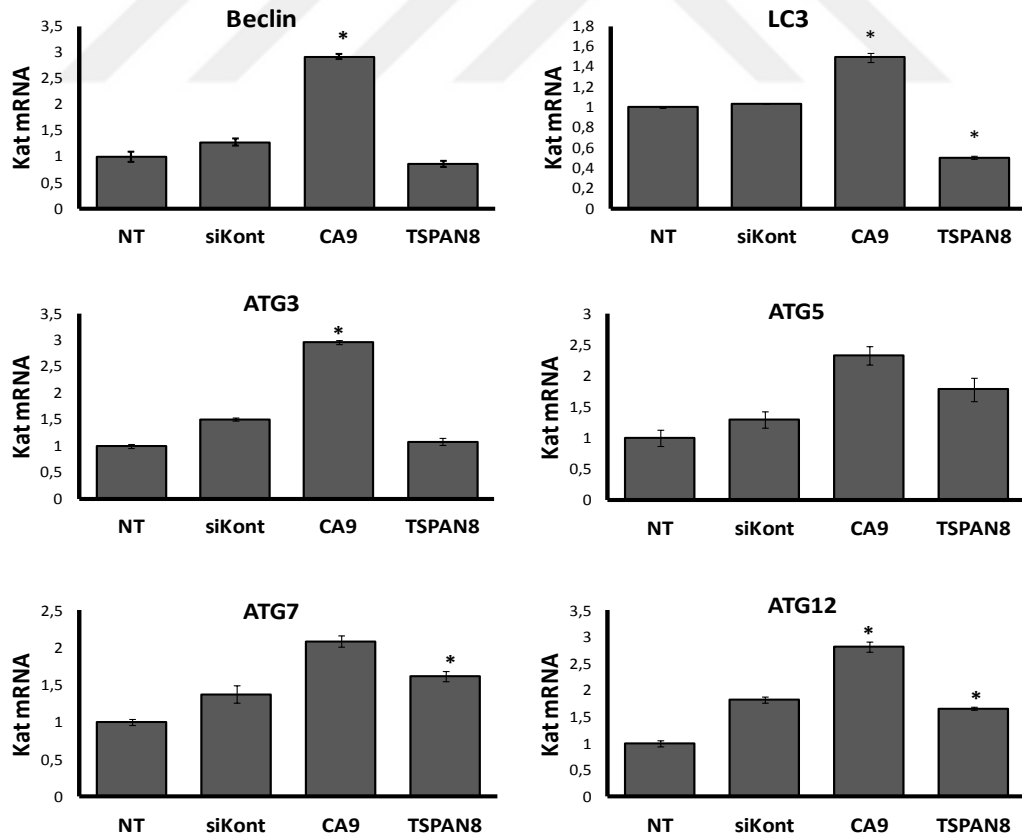
CA9 ve TSPAN8 siRNA'ları kullanılarak Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerindeki değişimi apoptotik yol ile ilişkisi incelendikten sonra bir diğer ölüm yolu olan otofajik yol ile ilişkisi incelendi. Otofajik hücre ölümünü incelemek için LC3-II, Beklin-1, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12 genlerindeki değişimi mRNA seviyesinde belirlemek için spesifik primerleri kullanılarak Realtime PCR yapıldı. Otofajik yolda görevli LC3 ve Beklin proteinlerinin seviyeleri western blot analizi ile tespit edildi. Son olarak otofajik yolda oluşabilecek asidik veziküllerin tespiti için akridine orange boyaması yapıldı ve floresans mikroskobu ile görüntüldü.

3.8.1 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Otofaji İlişkili Genlere Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının otofaji ile ilişkisi mRNA düzeyinde LC3-II, Beklin-1, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12 primerleri (tablo 2.18) ile yapılan Realtime PCR analizi ile belirlendi. Hücrelerden bölüm

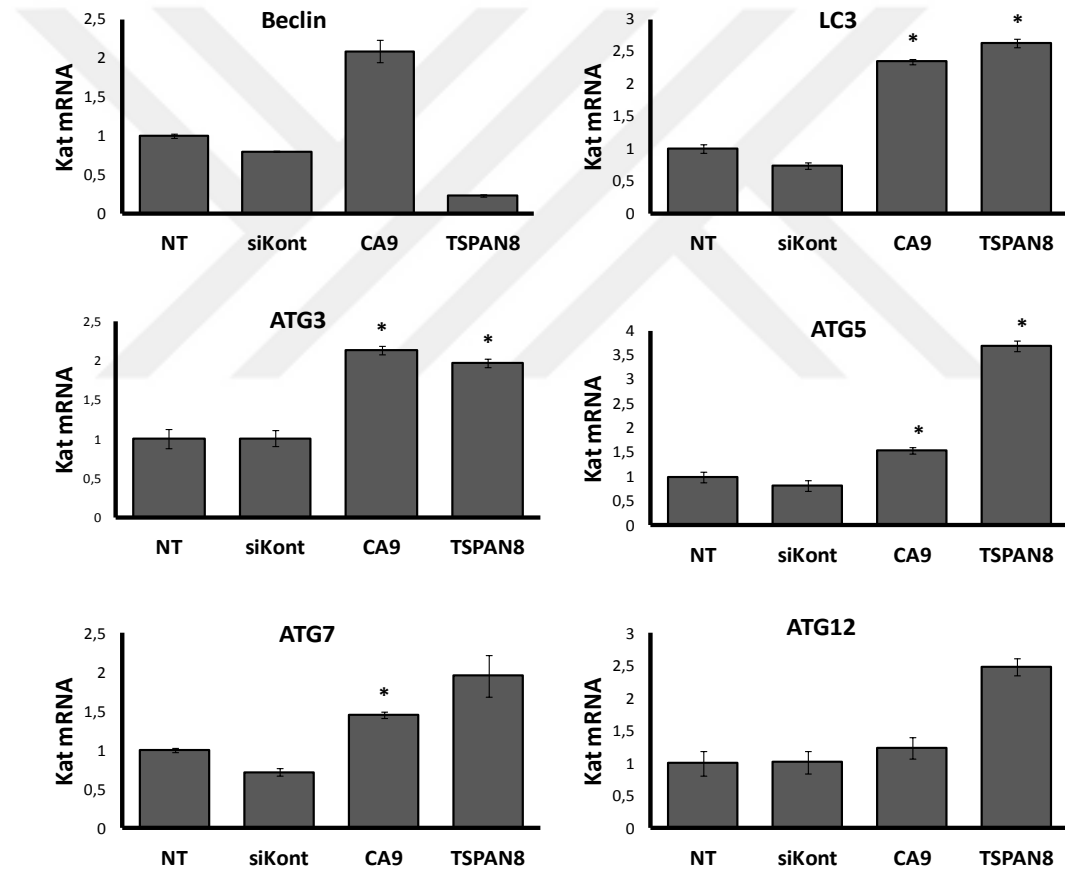
2.3.1.10'da anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar ile bölüm 2.3.1.12'de belirtildiği gibi cDNA sentezi yapıldı. cDNA'lar kullanılarak tablo 2.18'de belirtilen otofajik primerler ile Realtime PCR analizleri yapıldı. Bölüm 2.3.1.13'de belirtildiği gibi sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi. İstatistiksel analizleri Minitab14 programında (oneway anova) yapıldı anlamlı değer olarak $p<0,05$ kabul edildi. Her primer için ayrı oluşturulan kat grafikleri uygulama yapılmayan NT grup ile siKont, siCA9 ve siTSPAN8 gruplarının $\Delta\Delta Ct$ değerleri oranlanarak oluşturuldu.

Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında yapılan siRNA uygulamalarının mRNA analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tüm gruplarda uygulama yapılmamış olan NT ile kontrol siRNA uygulanan siKont arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). NT grubu ile karşılaştırıldığında, CA9 ve TSPAN8 siRNA'sı ile susturulan hücrelerde Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12 mRNA seviyesinin arttığı görüldü. CA9 sustuğunda Beklin-1, LC3, ATG3 ve ATG12 mRNA seviyesinde meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). TSPAN8 sustuğunda LC3 de meydana gelen azalış, ATG7 ve ATG 12'deki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).



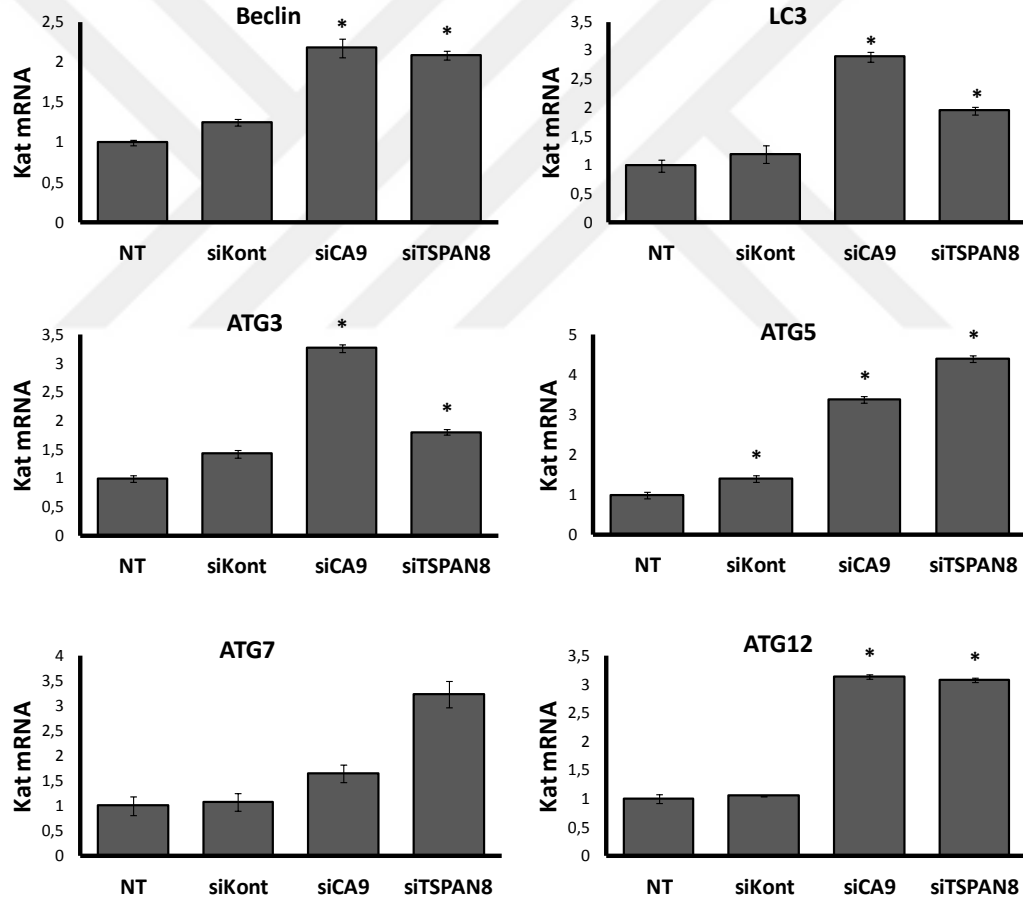
Şekil 3.67: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

Panc-1 hücre hattında hipoksiyada tüm gruplarda uygulama yapılmamış olan NT ile kontrol siRNA uygulanan siKont arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). NT grubu ile karşılaştırıldığında, CA9 siRNA'sı ile susturulan hücrelerde Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12 mRNA seviyesinin arttığı görüldü. TSPAN8 siRNA'sı ile susturulan hücrelerde, LC3, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12 mRNA seviyesinin arttığı, Beklin-1 mRNA seviyesinin azaldığı görüldü. CA9 sustuğunda LC3, ATG3, ATG5 ve ATG7 mRNA seviyesinde meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). TSPAN8 sustuğunda LC3, ATG3 ve ATG 5'te meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).



Şekil 3.68: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

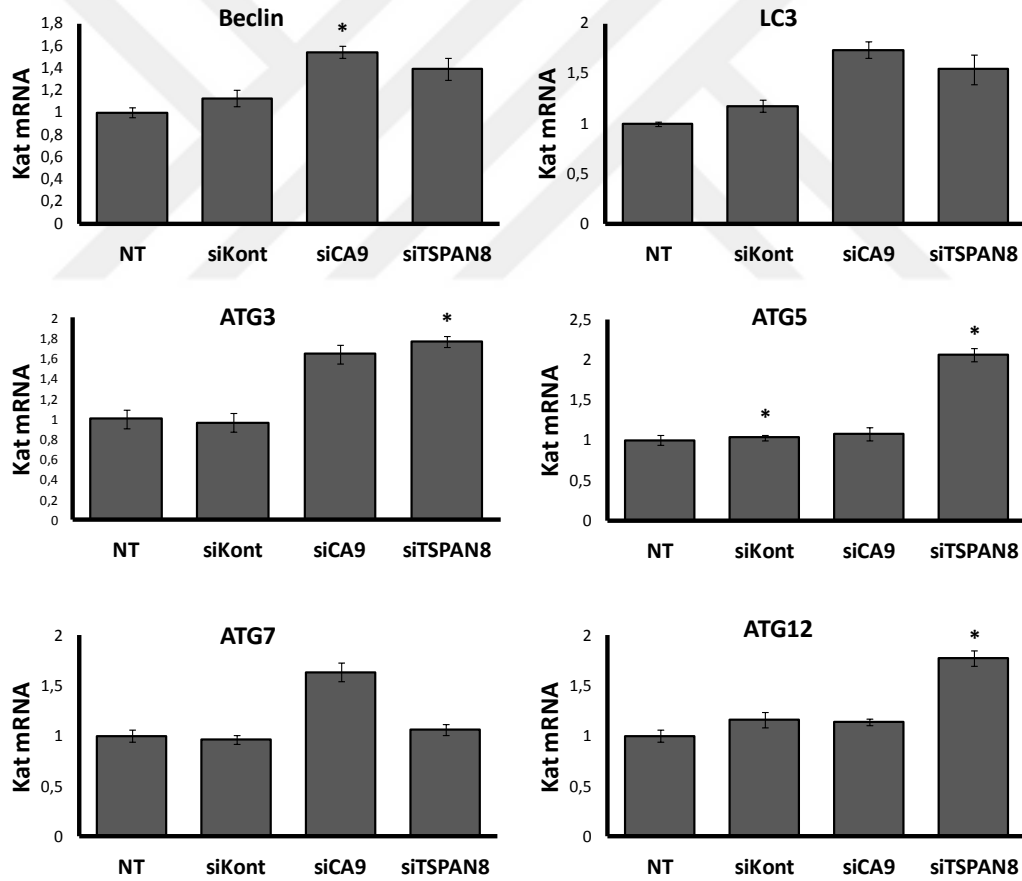
Normal oksijen koşullarında büyüyen MiaPaca-2 hücrelerinde otofaji ilişkili genlerdeki (Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12) mRNA seviyelerinin karşılaştırıldığında, genel olarak tüm gruplarda kontrol siRNA ile hiçbirşey uygulanmamış NT grup arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). MiaPaca-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında NT grubu ile karşılaştırıldığında, CA9 ve TSPAN8 siRNA'sı uygulanan gruplarda Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12 mRNA seviyelerinin arttığı görüldü. Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5 ve ATG12 seviyesinde meydana gelen azalmanın hem CA9 hemde TSPAN8 siRNA'sı uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). ATG7 mRNA seviyesindeki artış hem CA9 hemde TSPAN8 siRNA'sı uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 3.69: Miapaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

Hipoksik koşullarda büyüyen MiaPaca-2 hücrelerinde otofaji ilişkili genlerdeki (Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5, ATG7 ve ATG12) mRNA seviyelerinin karşılaştırıldığında, genel olarak tüm gruplarda kontrol siRNA ile hiçbirşey uygulanmamış NT grup arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). NT grubu ile karşılaştırıldığında, CA9 siRNA'sı uygulanan gruplarda Beklin-1, LC3, ATG3 ve ATG7 mRNA seviyelerinin arttığı görüldü. TSPAN8 siRNA'sı uygulanan gruplarda ise Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5 ve ATG12 mRNA seviyelerinin arttığı görüldü.

CA9 sustuğunda Beklin-1 mRNA seviyesinde meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). TSPAN8 sustuğunda LC3, ATG3, ATG5 ve ATG12'de meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Diğer gruplardan farklı olarak NT grubu ile karşılaştırıldığında kontrol siRNA'sı uygulanan gruptaki ATG5 mRNA'sında meydana gelen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

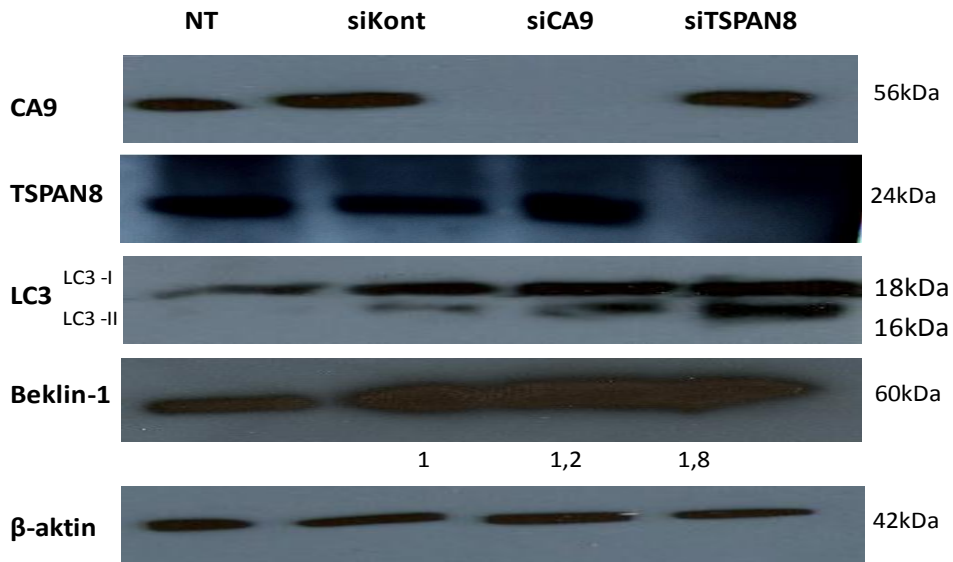


Şekil 3.70: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının bazı otofaji ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

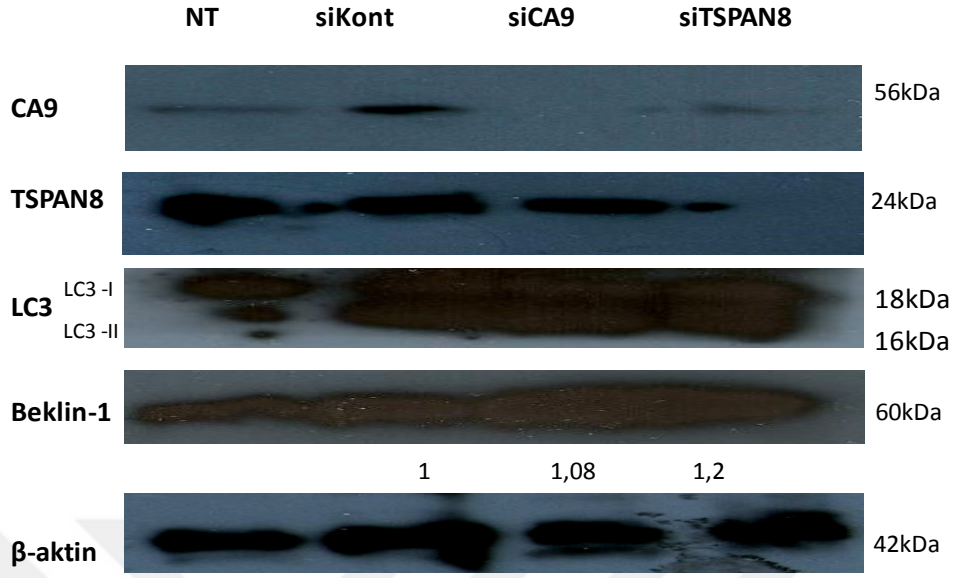
3.8.2 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Bazı Otofaji İlişkili Proteinlere Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi

Normal ve hipoksik koşullarda büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında CA9 ve TSPAN8 siRNA transfeksiyonu ile susturulduğunda otofajik yolda görevli LC3 ve Beklin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot analizi ile belirlendi. Panc-1 ve MiaPaca-2 hücreleri bölüm 2.3.1.14 'de belirtildiği şekilde RIPA buffer kullanılarak lizis edildi ve protein izolasyonu yapıldı. 40 µg protein SDS jele yüklenerek western blot analizi yapıldı. TSPAN8 ve CA9 siRNA transfeksiyonu sonrasında susturulmanın doğrulanması için spesifik antikörleri ile işaretlendi. Western sonucunda elde edilen bantlar her iki genin etkin bir şekilde sustuğu görüldü. Membranlar temizleme (strip-off) tamponu kullanılarak antikordan temizlendi ve LC3 ve Beklin-1 antikörleri ile işaretlendi. Normalizasyon yapmak için β-aktin ile işaretlendi. Bantlar Image J programı kullanılarak dansimetrik olarak analiz edildi. LC3-II/LC3-I oranı dansimetrik değerler kullanılarak hesaplandı ve grafikler oluşturuldu. Beklin-1 proteinde meydana gelen değişim Kontrol siRNA grubu ile CA9 siRNA ve TSPAN8 siRNA'sı uygulanan gruplara oranlanarak kat olarak hesaplandı ve değerleri şeklin altında belirtildi.

Panc-1 hücrelerinde normal oksijen koşullarında, kontrol siRNA uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, TSPAN8 siRNA uygulanan grupta LC3-II seviyesinin 1,5 kat arttığı görüldü (Şekil 3.72).

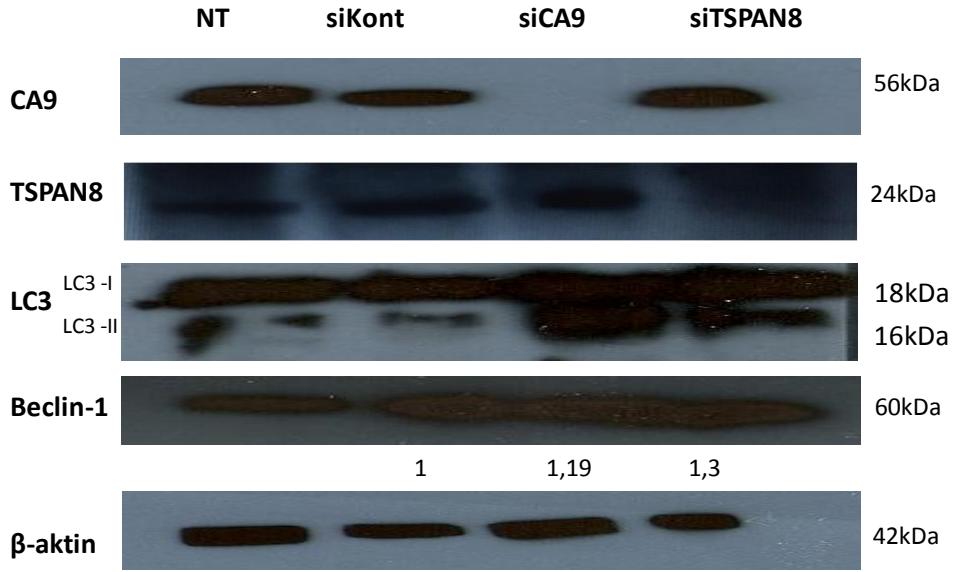


Şekil 3.71: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.

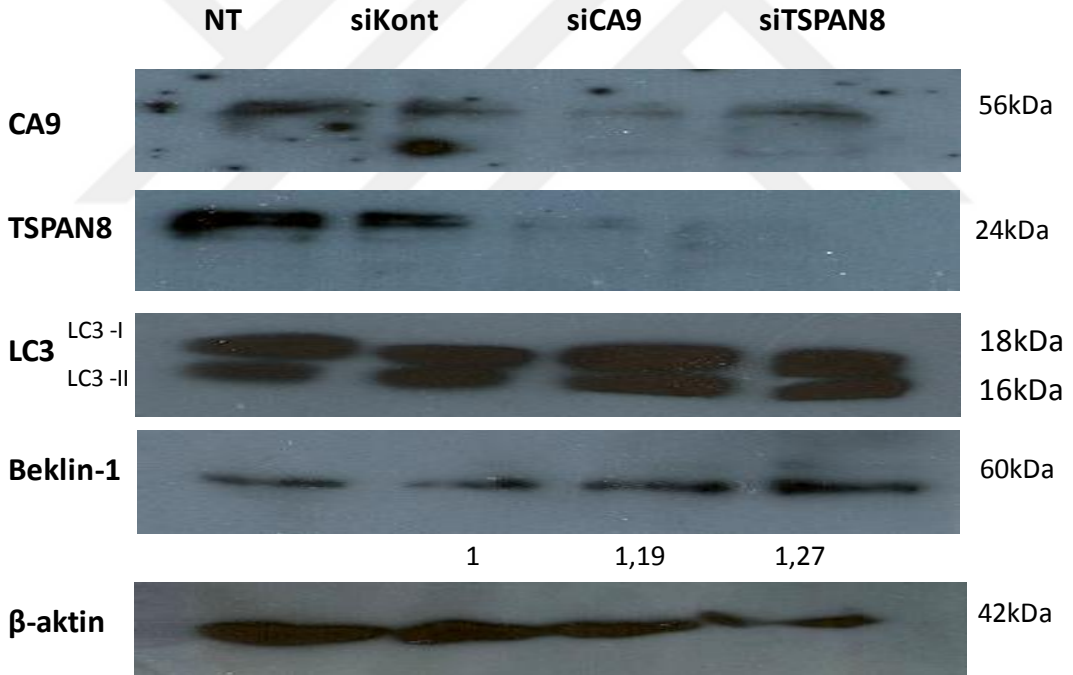


Şekil 3.72: Panc-1 hücre hattında hipoksiyada CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.

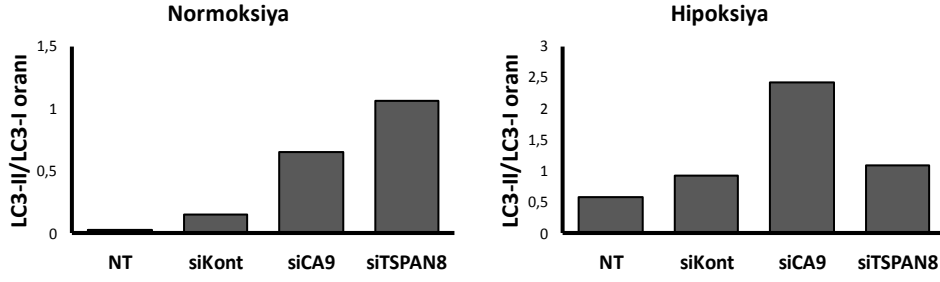
MiaPaca-2 hücrelerinde normoksiyada elde edilen sonuçta aynıdır ve TSPAN8 siRNA uygulanan grupta LC3-II bandında 1,5 kat bir artış görüldü (Şekil 3.74). Hipoksik koşullarda NT ve kontrol siRNA uygulanan gruplarda da LC3-II bandının güçlü olduğu ve TSPAN8 veya CA9 siRNA uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında belirgin bir artış olmadığı görüldü (Şekil 3.73 ve Şekil 3.75). Beklin-1 protein seviyesindeki değişimler analiz edildiğinde ise LC3-II'de görüldüğü kadar belirgin bir artış veya azalma olmadı (Şekil 3.72, Şekil 3.73, Şekil 3.74 ve Şekil3. 75).



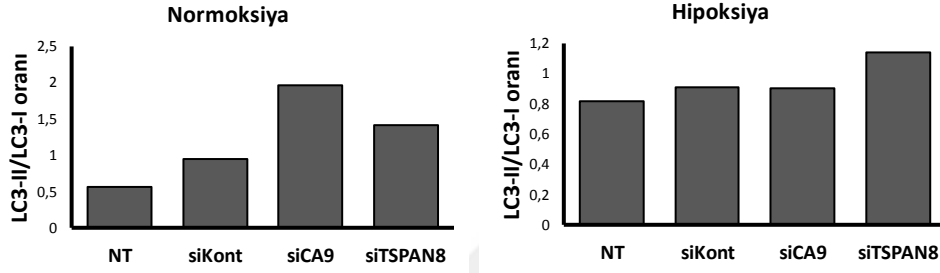
Şekil 3.73: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.



Şekil 3.74: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksiyada CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3 ve Beklin 1 protein seviyesine etkisinin gösterilmesi.



Şekil 3.75: Panc-1 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3-II ve LC3-I protein seviyesinin oranındaki değişimin belirlenmesi.

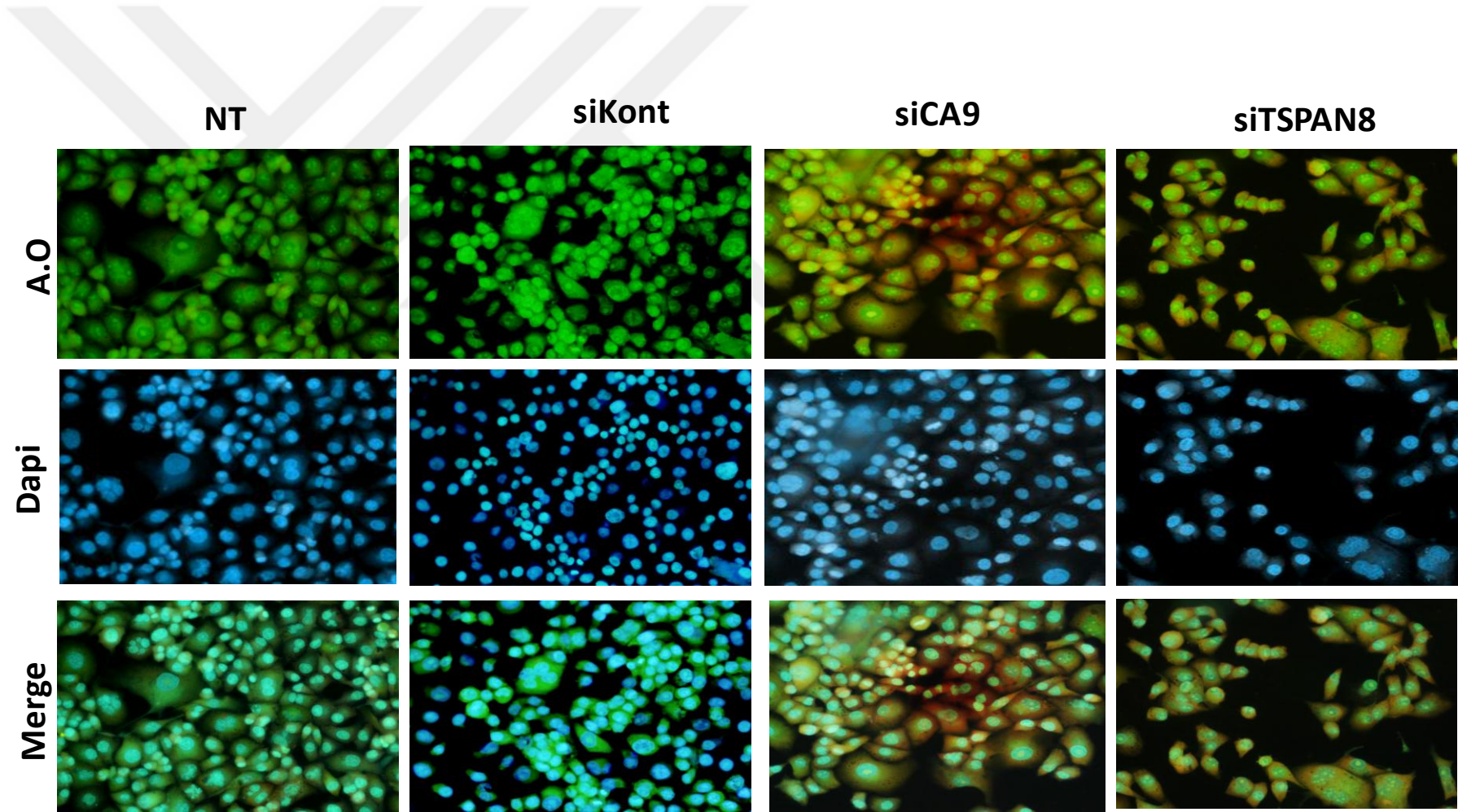


Şekil 3.76: MiaPaca-2 hücre hattında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının LC3-II ve LC3-I protein seviyesinin oranındaki değişimin belirlenmesi.

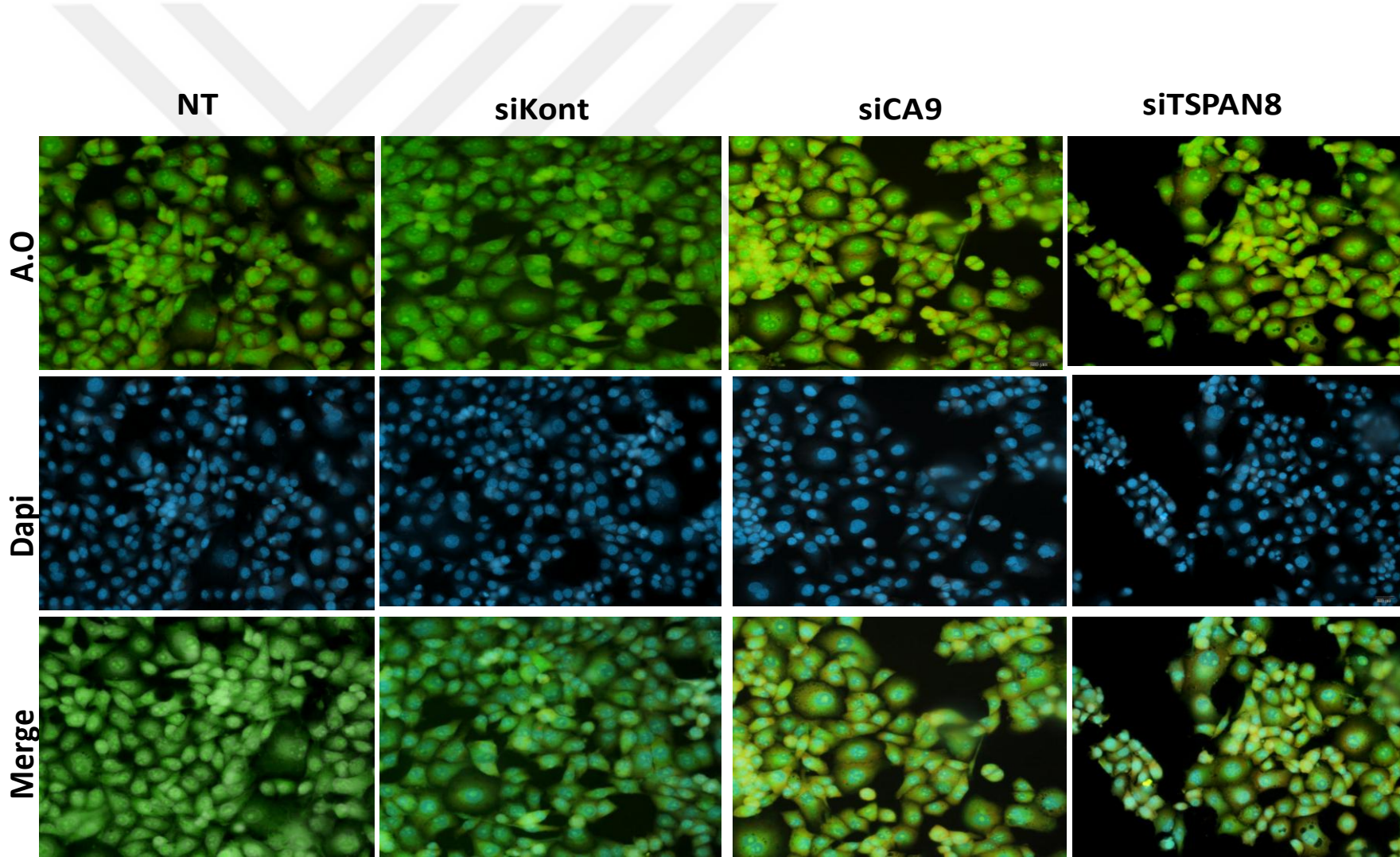
3.8.3 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Otofajiye Etkisinin Akridine Orange ile İmmünofloresans Olarak Gösterilmesi

Hipoksik ve normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerini susturmak için bölüm 2.3.1.4'de belirtildiği gibi transfeksiyon yapıldı. Ardından bölüm 2.3.1.15'de belirtildiği gibi akridin orange boyası ile boyanarak immunofloresans yöntemiyle gösterildi. Akridin orange hücrelerde pH seviyesinin düşük olduğu asidik kısımların kırmızı olarak nötral pH seviyesinin görüldüğü kısımların ise yeşil olarak görüntülenmesini sağlar [218, 219].

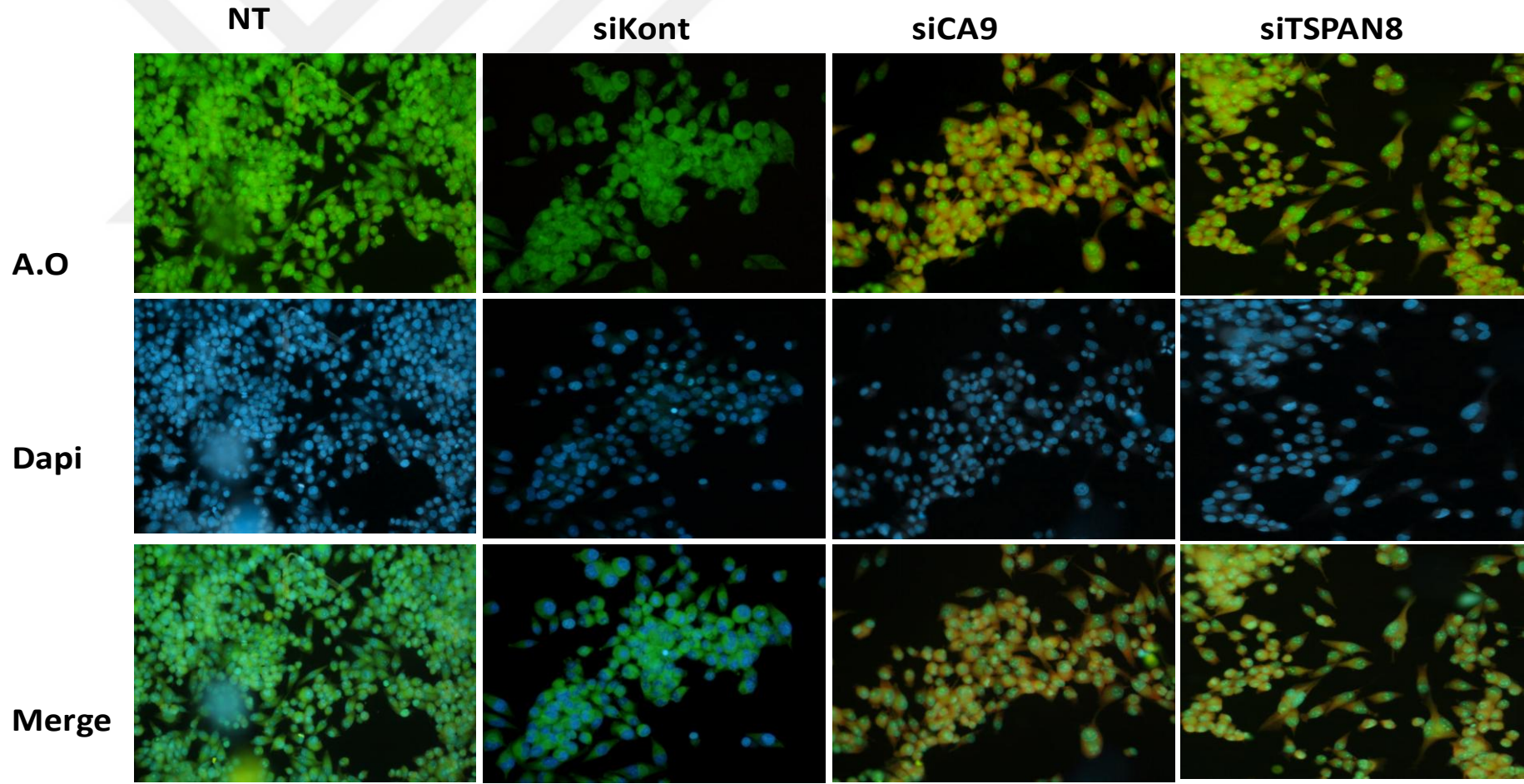
Hipoksik ve normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 siRNA'sı uygulanan gruplarda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında yeşil rengin kırmızıya dönüştüğü görüldü. Bu renk değişimi siRNA uygulanan gruplarda hücresel yanıt sonucu asidik vezikül artışı gösterdi (Şekil 3.56, Şekil 3.57, Şekil 3.58, Şekil 3.59). Normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde özellikle CA9 geni susturulduğunda asidik vezikül artışının daha fazla olduğu görüldü. (Şekil 3.56, Şekil 3.58).



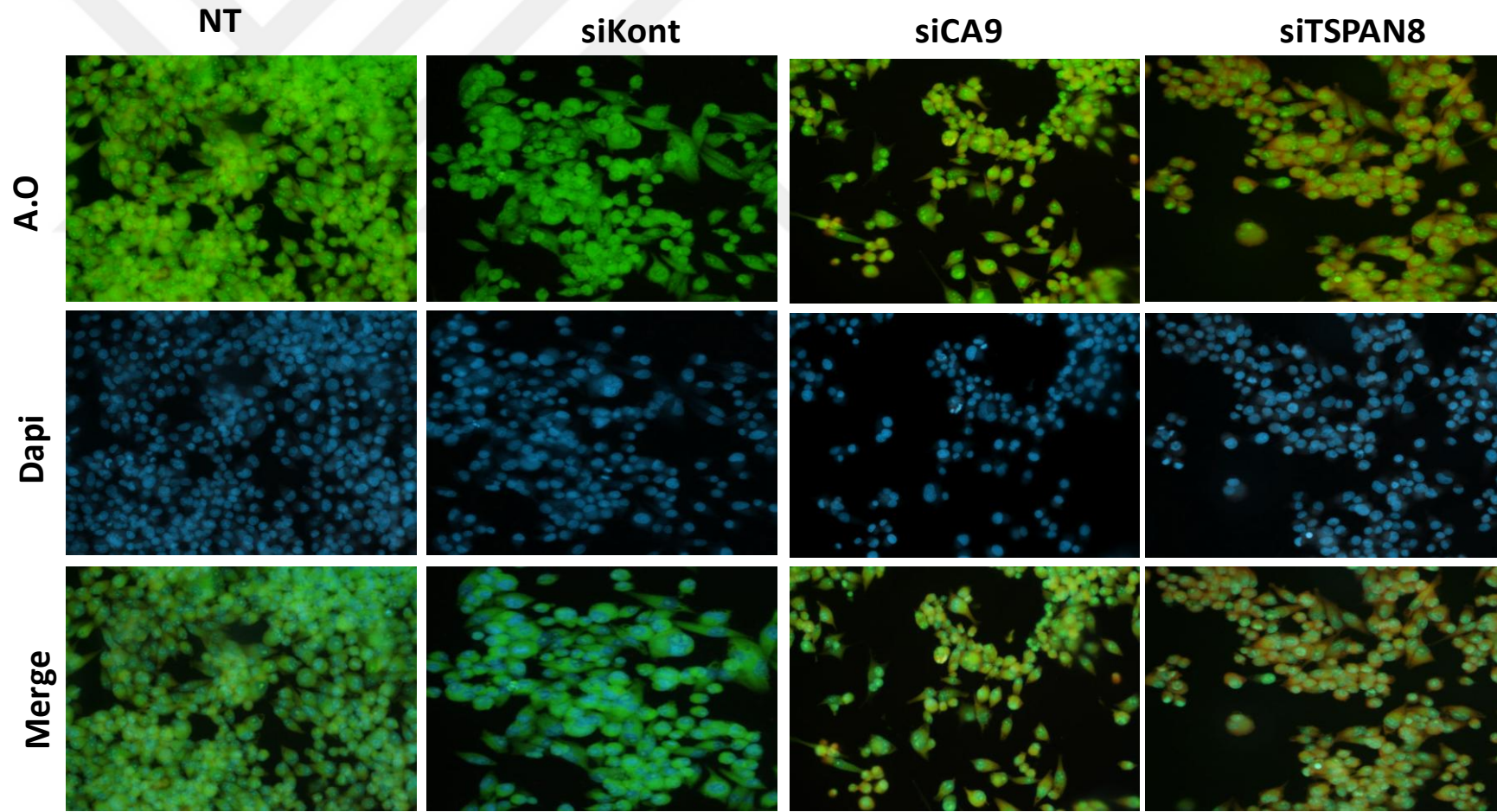
Şekil 3.77: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridine orange ile boyanması.



Şekil 3.78: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridin orange ile boyanması.



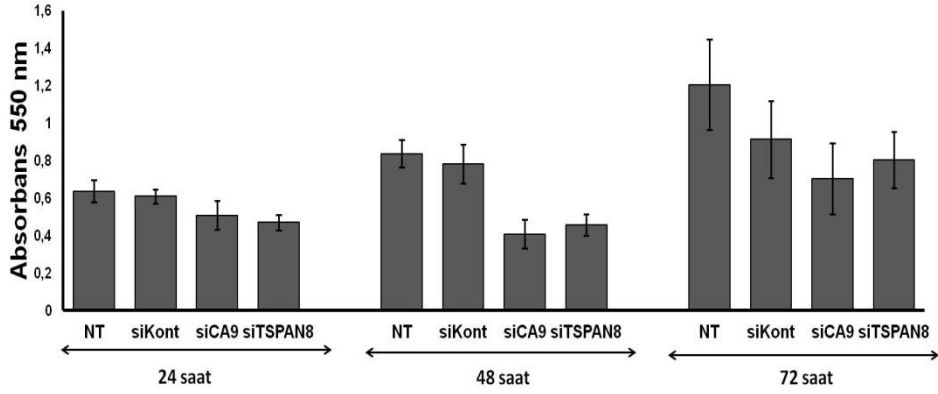
Şekil 3.79: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridin orange ile boyanması.



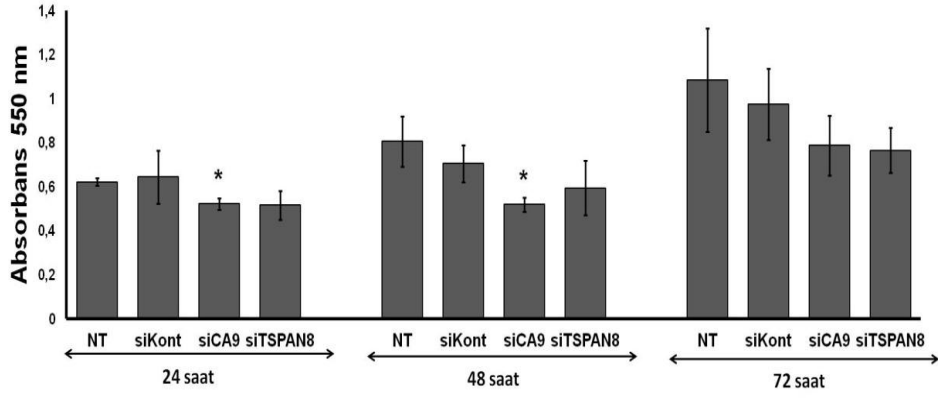
Şekil 3.80: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması ve akridin orange ile boyanması.

3.9 CA9 ve TSPAN8 genlerinin siRNA ile Susturulmasının Kemoterapi Ajanlarıyla Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

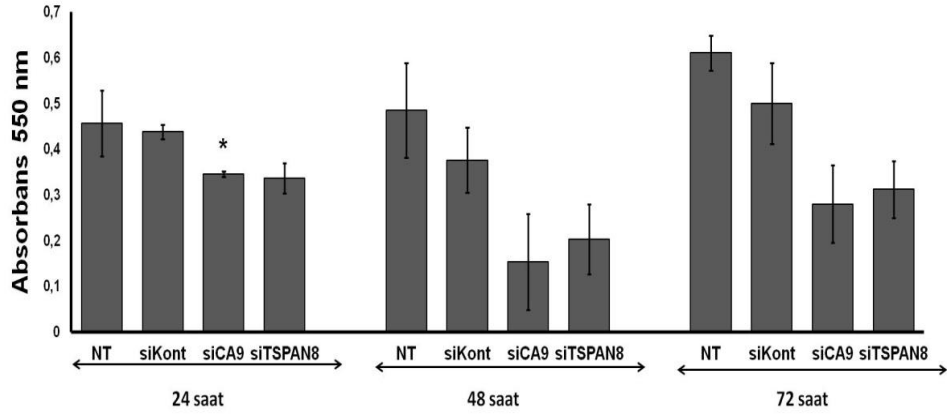
Normal ve hipoksik oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin siRNA ile susturulmasının kemoterapi ajanlarına (Cisplatin ve Epirubicin) bağlı proliferatif etkinin belirleyebilmek için bölüm 2.2.1.17’de belirtildiği gibi 50 nM siCA9 veya 50 nM siTSPAN8 ile beraber kemoterapi ajanları uygulandı. 50 nM siRNA’nın Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi MTT yöntemi ile belirlendi. İstatistiksel analizleri MiniTab14 programıyla ONEWAY Anova testi kullanılarak yapıldı (Şekil 3.81-3.84). 24. saatte CA9 ve TSPAN8 siRNA’sı uygulanan gruplarda hücresel azalmanın başladığını 48. saatte azalmanın daha etkili olduğu ve bu etkinin 72. saatte daha az olduğu görüldü. Kontrol siRNA uygulanmış grup ile NT grup arasında anlamlı bir fark görülmediği için sadece kemoterapi ajanları ile CA9 ve TSPAN8 siRNA’sı uygulanmış gruplar karşılaştırılmıştır (Şekil 3.85-3.92).



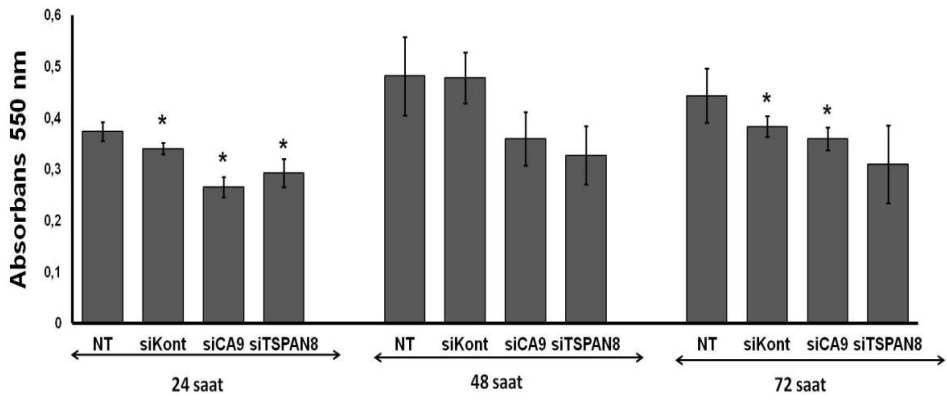
Şekil 3.81: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 3.82: Panc-1 hücre hattında hipoksik koşullarda 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 3.83: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarındaki 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.

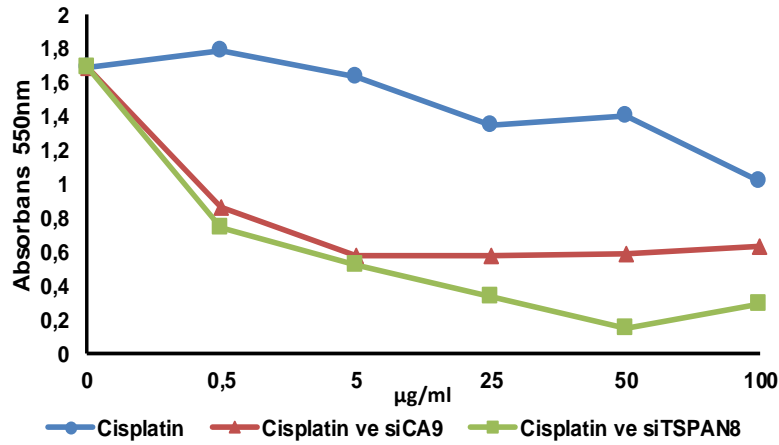


Şekil 3.84: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksik koşullarda 50 nM siRNA uygulamanın hücre büyümesindeki 24, 48 ve 72 saat sonraki etkinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.

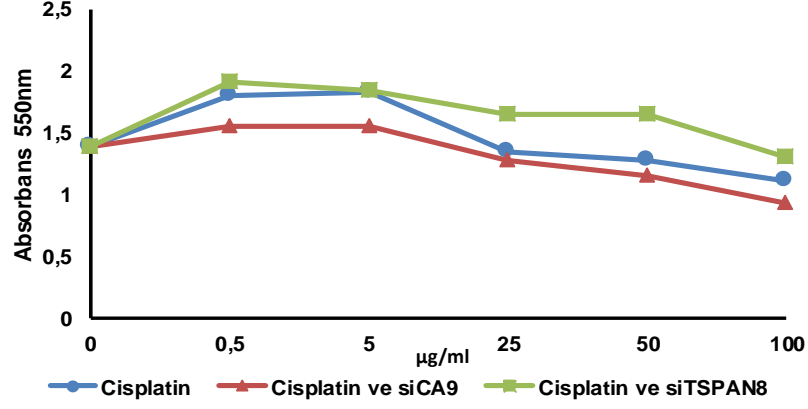
Cisplatin (0,5-5-25-50-100 µg/ml) ve epirubicin (0,1-1-10-100-500 µg/ml) uygulanan transfekte edilmemiş hücreler, kontrol grubu olarak kabul edildi. MTT hücre canlılığı testine göre, cisplatin ve epirubicin uygulamasının sitotoksik etkinliği doz bağımlı bir şekilde azaldığı görüldü (Şekil 3.85 - 3.92).

Cisplatin uygulaması doza bağlı olarak Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre proliferasyonunu azalttı (Şekil 3.85, Şekil 3.88). Normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 siRNA'sının uygulanmasıyla Panc-1 hücre proliferasyondaki azalmanın daha fazla olduğu görüldü. Hipoksik koşullarda sadece cisplatin uygulanan grup ile cisplatin ve TSPAN8 siRNA'sı uygulanan grup karşılaştırıldığında azalmaya neden olmadığı görülmüştür (Şekil 3.86).

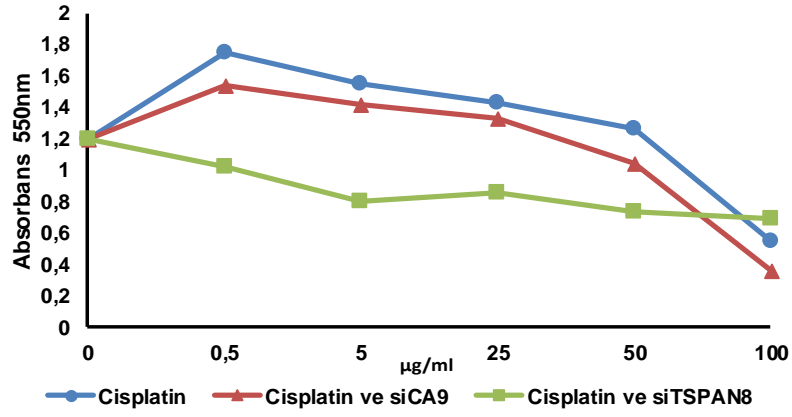
Sadece epirubicin uygulaması, siRNA ile kombine uygulaması ile karşılaştırıldığında Panc-1 normoksiyada (Şekil 3.89) azalma olduğu görülmüştür. MiaPaca-2 hücrelerine sadece epirubicin uygulamasının proliferasyonu azaltıcı etkisi olduğu görülürken kombinasyonların bir etkisi olmamıştır (Şekil 3.90-3.92).



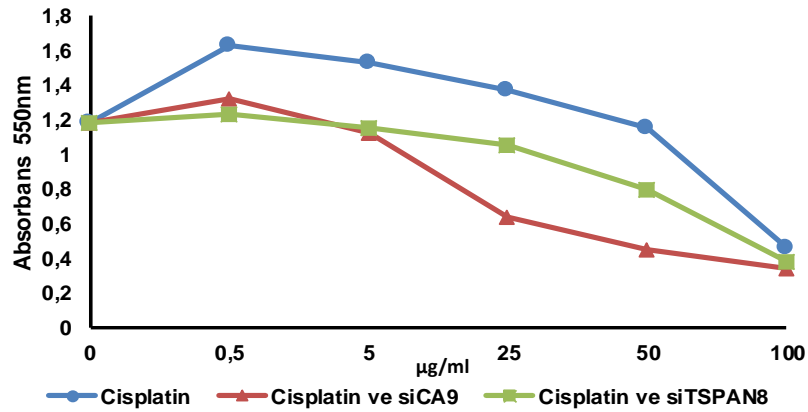
Şekil 3.85: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında Cisplatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.



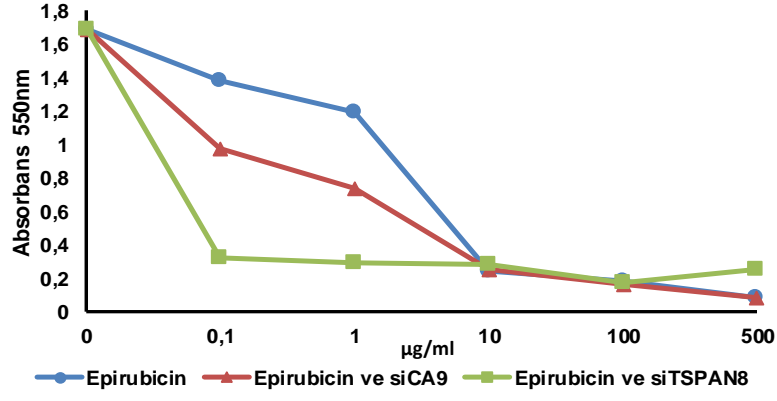
Şekil 3.86: Panc-1 hücre hattında hipoksiyada Cisplatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.



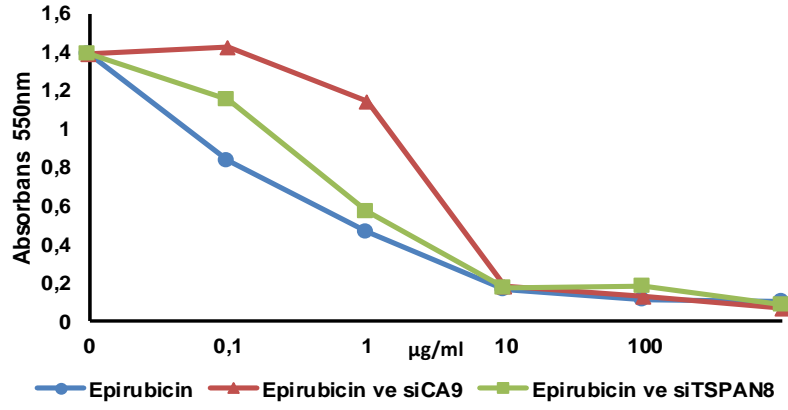
Şekil 3.87: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında Cisplatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.



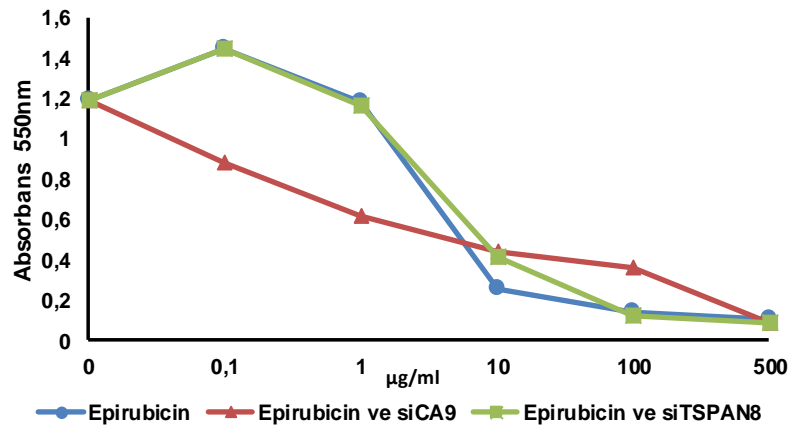
Şekil 3.88: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksiyada Cisplatin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.



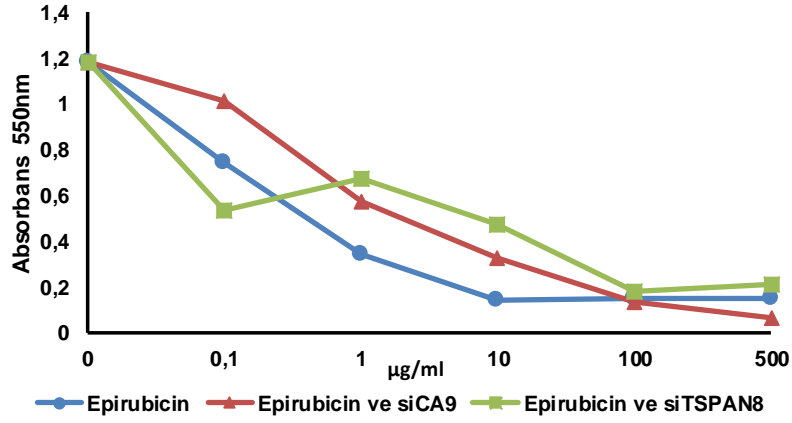
Şekil 3.89: Panc-1 hücre hattında normal oksijen koşullarında Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.



Şekil 3.90: Panc-1 hücre hattında hipoksiyada Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.



Şekil 3.91: MiaPaca-2 hücre hattında normal oksijen koşullarında Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.

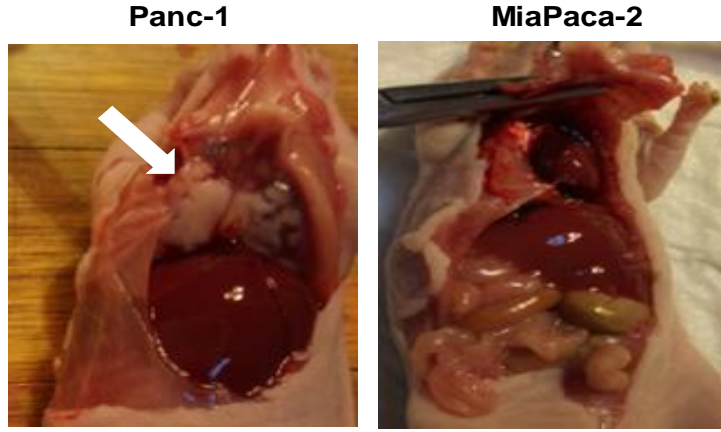


Şekil 3.92: MiaPaca-2 hücre hattında hipoksiyada Epirubicin, CA9 siRNA'sı ve TSPAN8 siRNA'sı uygulamasının proliferatif etkisinin belirlenmesi.

3.10 Farelerde Tümör Oluşturulması ve Tedavisi

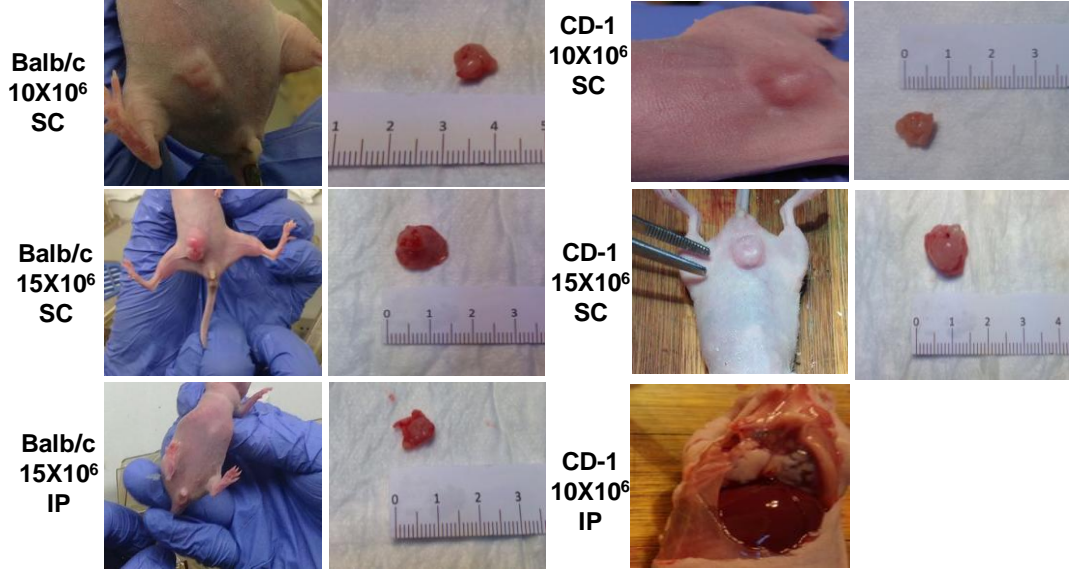
3.10.1 Farelerde Pankreas Kanseri Modeli Oluşturulması

Farelerde ksenograft pankreas kanser modelini oluşturmak için daha önce yapılan çalışmalar incelediğinde birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Kullanılacak hücre hattının, hücre hattını uygulama şeklinin ve çalışılacak fare soyunun optimizasyonu yapıldı. Kullanılacak hücre hattını belirlemek için intraperitoneal (IP) yöntemle CD-1 fare soyunda Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerini 10×10^6 olacak şekilde uygulandı (Şekil 3.93). Panc-1 hücreleri uygulanan farede Şekil 3.93'de görüldüğü gibi diyaframında tümör oluştuğu görülürken MiaPaca-2 hücreleri uygulanan farede tümör oluşumu görülmedi.



Şekil 3.93: Farelerde tümör modeli oluşturmak için Intraperitoneal (IP) yöntemle Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinin uygulanması.

Panc-1 hücrelerinin uygulandığı sayı 10×10^6 ve 15×10^6 , uygulama yöntemi subcutan (SC) ve intraperitoneal (IP), fare soyu CD-1 ve Balb/C olarak Şekil 3.95'te görüldüğü gibi yapıldı. CD-1 nude fareler ve Balb/C nude farelerde tümör oluşma kapasitesi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark görülmedi. IP yöntem uygulanarak farelere verilen hücrelerin tümör oluşması aşamasında gözlemlenemediği için tümör gelişimin takibi açısından uygun olmadığı görüldü. SC yöntemde ise fare deri altına verilen hücrelerin tümör oluşumunun görülebilmesi avantaj sağladı. CD-1 nude fareler ve Balb/C nude farelerde 1×10^7 Panc-1 hücresi uygulandığında 4 haftada tümörün istenilen büyüklüğe ulaştığı görüldü (Şekil 3.94). Bu sonuçlardan yola çıkarak CA9 ve TSPAN8 siRNA'sının *in vivo*'daki etkileri CD-1 nude farelere subcutan yöntemle 1×10^7 Panc-1 hücresi uygulanarak oluşturulan tümör modelinde araştırıldı.

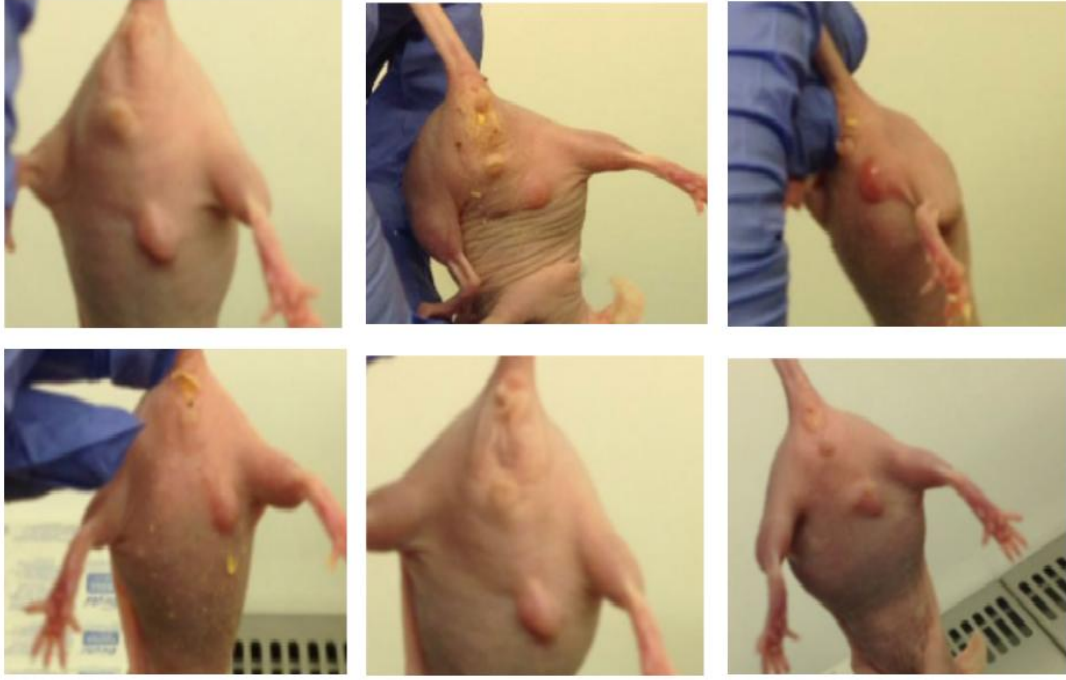


Şekil 3.94: Balb/c ve CD-1 nude farelerde IP ve SC yöntemi kullanılarak yapılan hücre sayısı optimizasyonu.

3.10.2 Pankreatik Tümör Modelinin Oluşturulması ve Grupların Belirlenmesi

In vivo deneylerde, 8 haftalık 18 dişi ve 12 erkek fare olmak üzere toplamda 30 fare kullanıldı. Farelerin ağırlıkları tartılarak belirlendi. Ardından her grupta 6 fare olacak şekilde rastgele 5 farklı gruba ayrıldı. Bölüm 2.3.2.2’de belirtildiği gibi farelere subcutan yöntem ile 1×10^7 Panc-1 hücre enjekte edildi. 4 hafta boyunca fareler DS Irradiated Diet ile ad libitum (yem ve su sürekli önünde) olarak 12 saat gece 12 saat gündüz ışık periyodunda IVC kafeslerde barındırıldı.

Tümör oluşumu Panc-1 hücrelerinin enjeksiyonunu takiben ikinci haftadan itibaren enjeksiyon bölgelerinde görülmeye başladı ve 4. hafta sonunda % 83 oranında (30 farenin 25 tanesinde) farklı büyüklüklerde tümör oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.95). Bu bireylerde tümörün iç kısımda oluşmuş olabileceği düşünülerek her deney grubu kafesine eşit olarak paylaştırıldı, diğer fareler rastgele olarak gruplara ayrıldı (Tablo 3.2).



Şekil 3.95: CD-1 fare soyundan deneklere Panc-1 hücreleri subcutan enjekte edildikten 4 hafta sonra tümör oluşumu gözlenen bireylerden bazılarının fotoğrafı.

Tablo 3.2: Deneysel olarak tümör modelinin oluşturulması ve grupların belirlenmesi.

CD-1 Nude Mice					
Deneysel Grupları	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
	Non-treated (NT)	KontrolsiRNA (siKONT)	CA9-siRNA (siCA9)	TSPAN8-siRNA (siTSPAN8)	Gemcitabine
1-4. haftalar	Farelerin tartılarak ağırlıklarının belirlenmesi 1X10 ⁷ Panc-1 hücrelerinin subcutan yöntemle enjeksiyonu, 4 hafta boyunca farelerin bakımı, tümör oluşumunun kontrolü				
İlaç ve siRNA uygulaması	Uygulama yok	150µg/kg siKONT	150µg/kg siCA9	150µg/kg siTSPAN8	50mg/kg Gemcitabine
5-8.haftalar	-	Haftada iki kez	Haftada iki kez	Haftada iki kez	Haftada iki kez
	8. hafta sonunda farelerin tartılarak ağırlıklarının belirlenmesi, sakrifiye edilmesi				

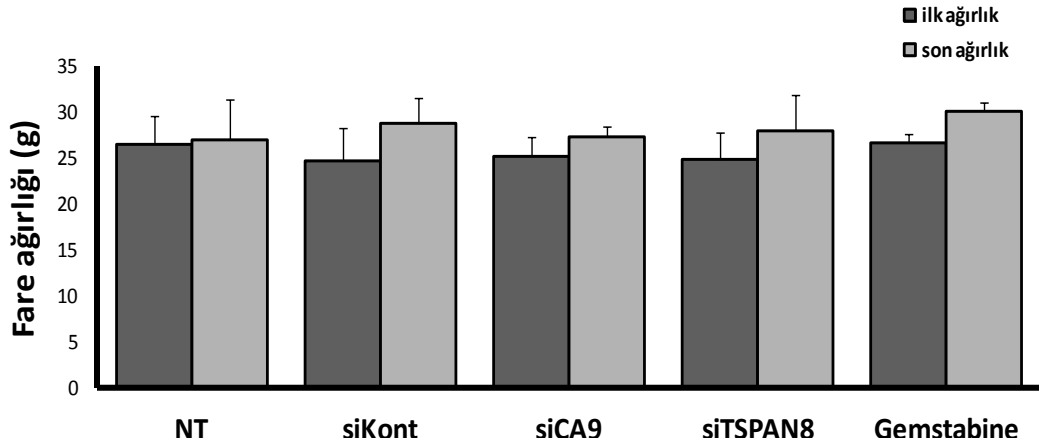
3.10.3 CA9 ve TSPAN8 siRNA'nın invivo transfeksiyonu

Fareler tartılarak ağırlıkları belirlendi. Ardından bölüm 3.10.2'de belirtildiği gibi gruplar oluşturuldu. Non-Treated (NT) grubu 3 dişi 3 erkek fare ile oluşturuldu. NT grubu ilaç veya siRNA uygulaması yapılmamış olan kontrol grubudur. siRNA uygulanan gruplarda 4 dişi 2 erkek fare kullanılmıştır. Bölüm 2.3.2.4'de belirtildiği gibi liposomal siRNA'lar

hazırlandı. Liyofilize haldeki siRNA'lar kullanılmadan önce %0,9 iyonik tuz içeren çözelti ile çözülüp son konsantrasyonu 150 µg/kg olacak şekilde sisitemik olarak kuyruk veninden verildi. Pankreas kanseri tedavisinde rutin olarak kullanılan Gemcitabine grubunda 3 dişi 3 erkek fare ile çalışıldı. Gemstabine grubunda yer alan farelere 4 hafta boyunca haftada iki kez 50mg/kg olacak şekilde ilaç verildi (Tablo 3.2).

3.10.4 Farelerde Oluşan Tümörün Büyüklüğünün Belirlenmesi

Deney süresince farelerin genel sağlık durumları ve ağırlık durumları kontrol edildi. Deneye başlanan ilk gün ve son günkü farelerin ağırlıkları kullanılarak grafik oluşturuldu (Şekil 3.97). İlk gün tüm farelerin ağırlıklarının ortalama değeri $25,56 \pm 3,3$ olduğu son gün ise tüm farelerin ortalama ağırlığı $27,42 \pm 4,6$ olduğu tespit edildi.

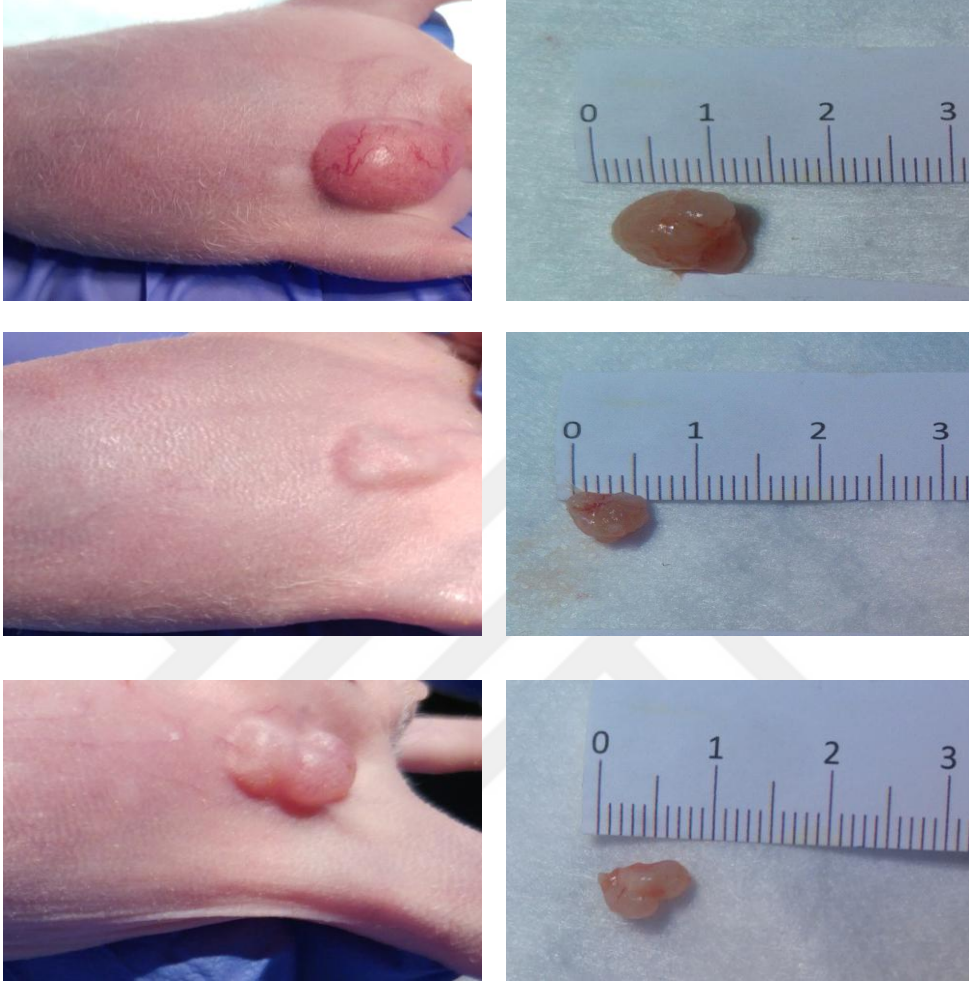


Şekil 3.96: Farelerin ilk ve son günkü ağırlıklarının karşılaştırılması.

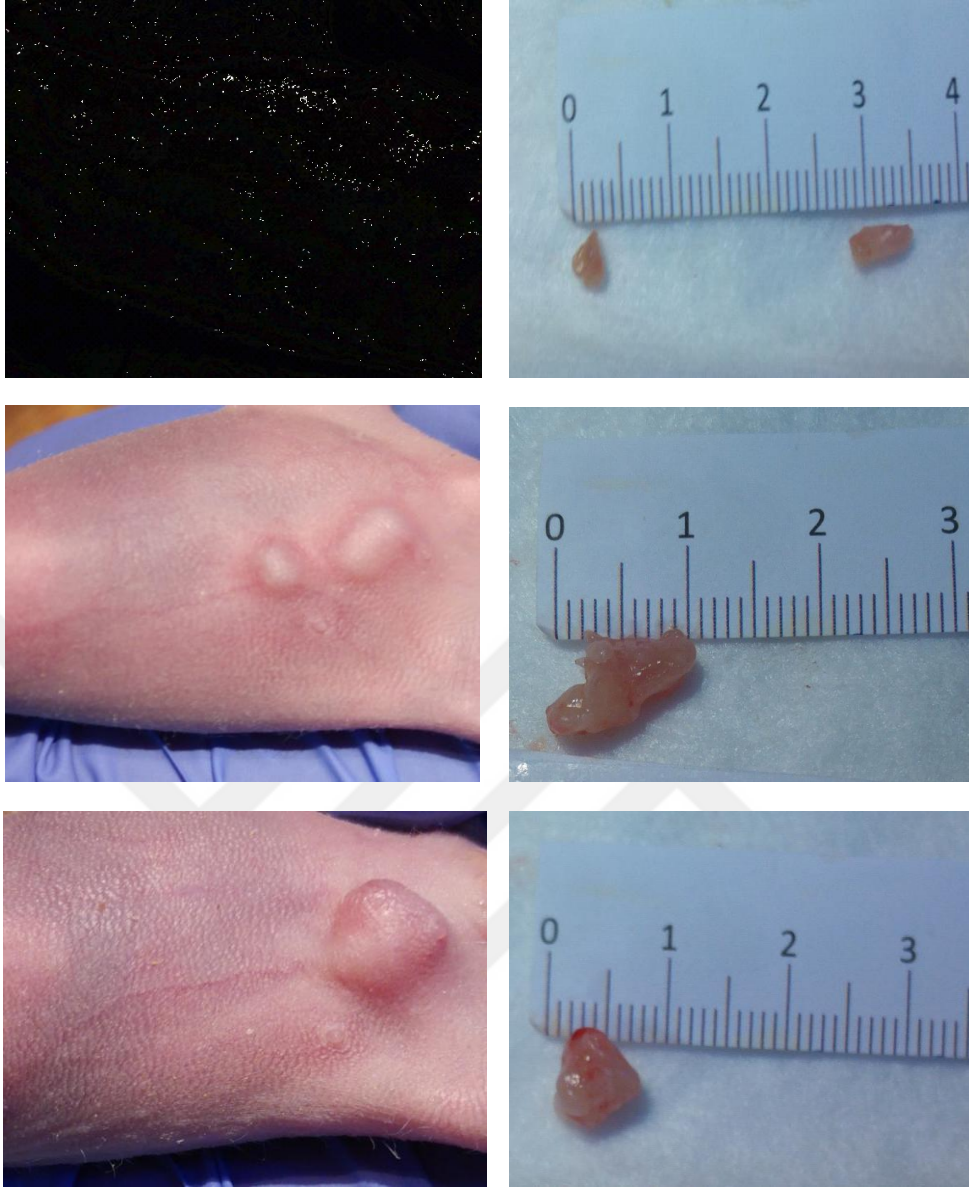
Dört hafta boyunca tümör oluşumu gözlemlendi ve sonraki dört hafta boyunca siRNA transfeksiyonları ve gemstabine tedavileri yapıldı. 8 haftanın sonunda fareler sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrasında tümörleri makroskopik olarak incelediğimizde düzensiz şekilli ve nodüler yapıda, kapsülsüz, genel olarak tüm alanların homojen beyazımtırak-pembe renkte, sıkı bir doku yapısında olduğu tespit edildi (Şekil 3.98-3.102). Tümör yüzeylerinde sekonder bir oluşum, enfeksiyon ya da nekroz gözlenmedi. Farelerin iç organlarında makroskopik olarak tümör varlığı araştırıldığında NT grubu, Gemcitabine grubu, kontrol siRNA ve CA9 siRNA uygulanan gruplarındaki farelerde tümörün diyaframa metastaz yaptığı belirlendi. TSPAN8 siRNA uygulanan grupta ise metastaza rastlanmadı.

Tümör büyüklükleri kumpas ile ölçüldü “en X boy X derinlik” olarak hesaplandı. NT grubu ile karşılaştırıldığında kontrol siRNA grubu, CA9 siRNA grubu ve Gemcitabine

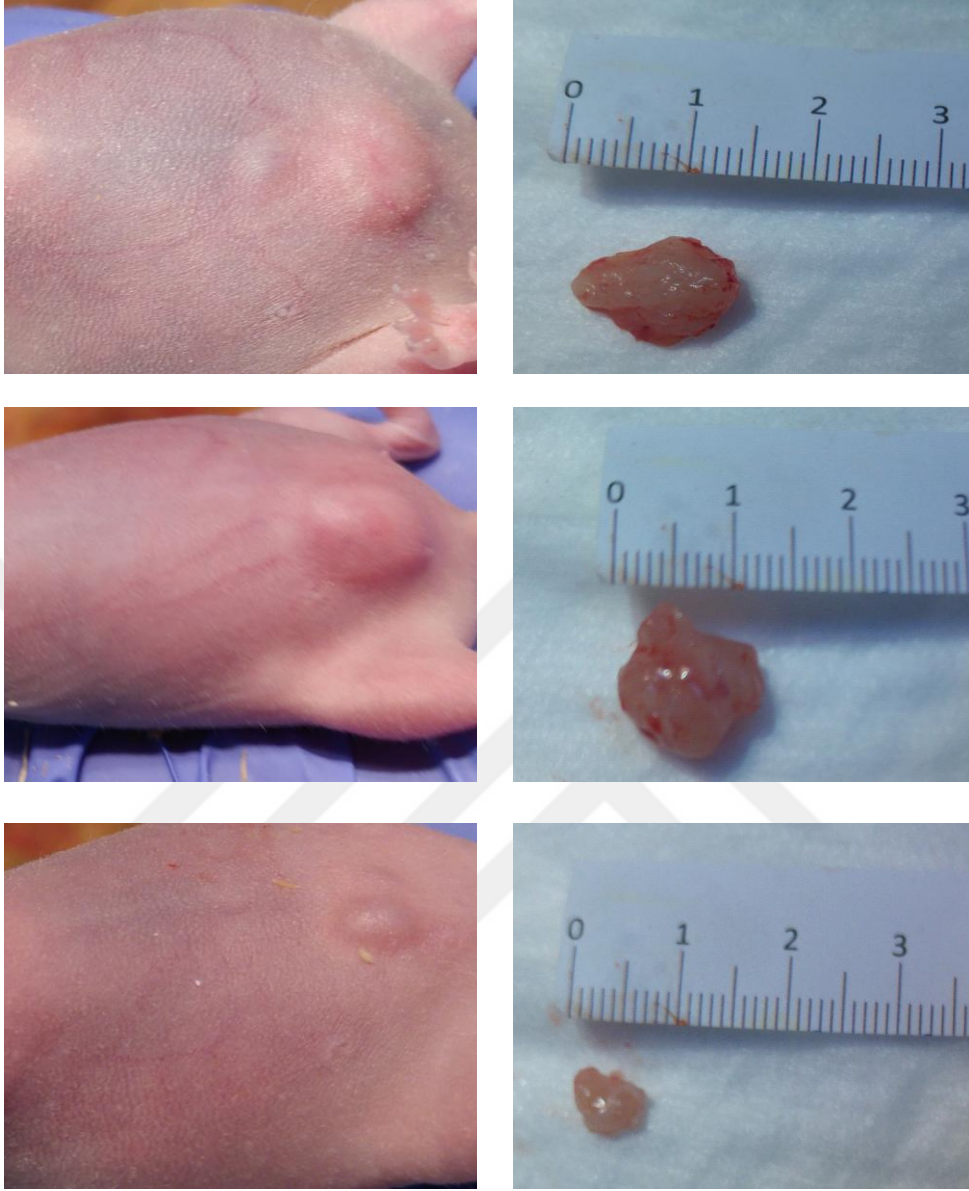
grubuna ait tümör büyüklükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak TSPAN8 siRNA uygulanan grupta gözlenen tümör büyüklüğündeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.103).



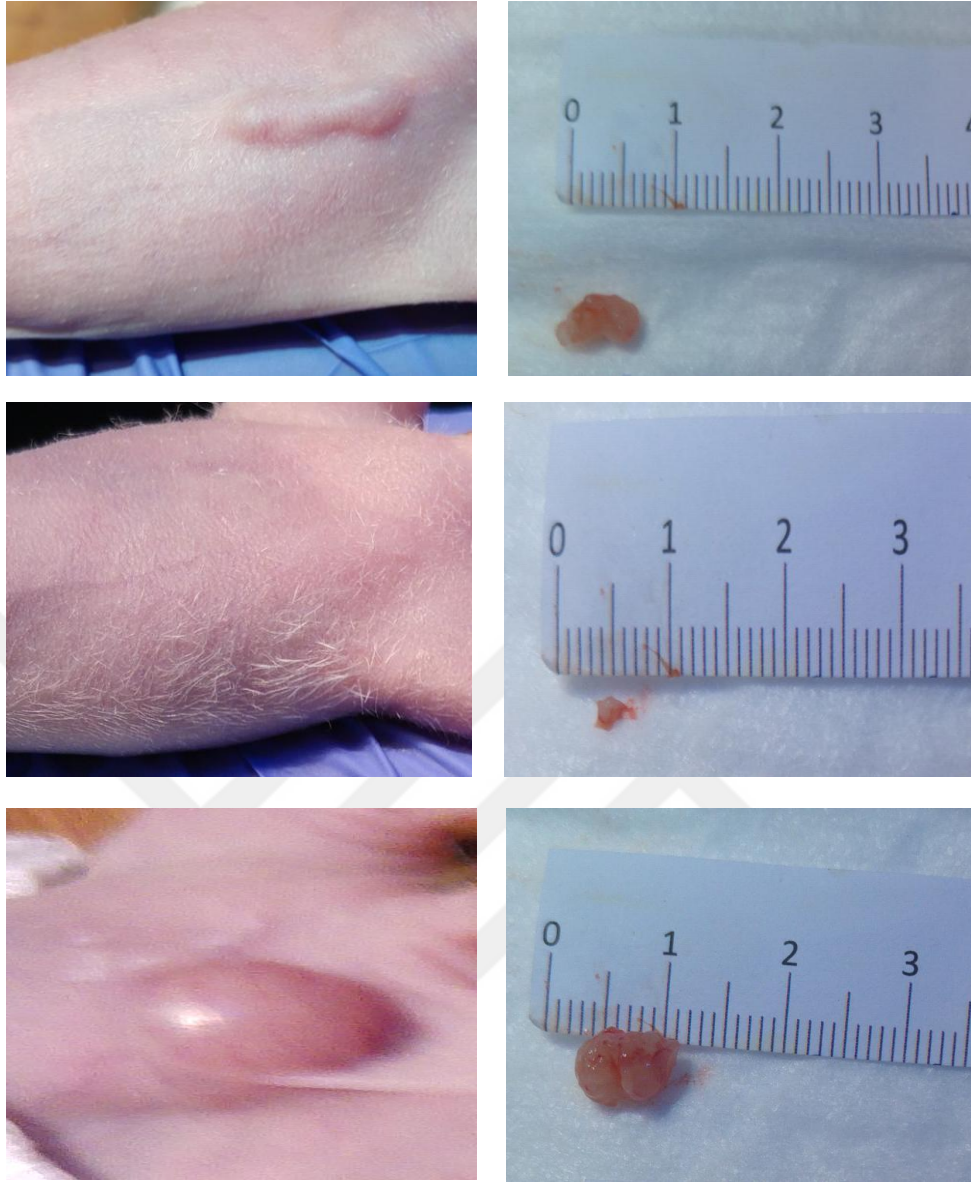
Şekil 3.97: NT gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.



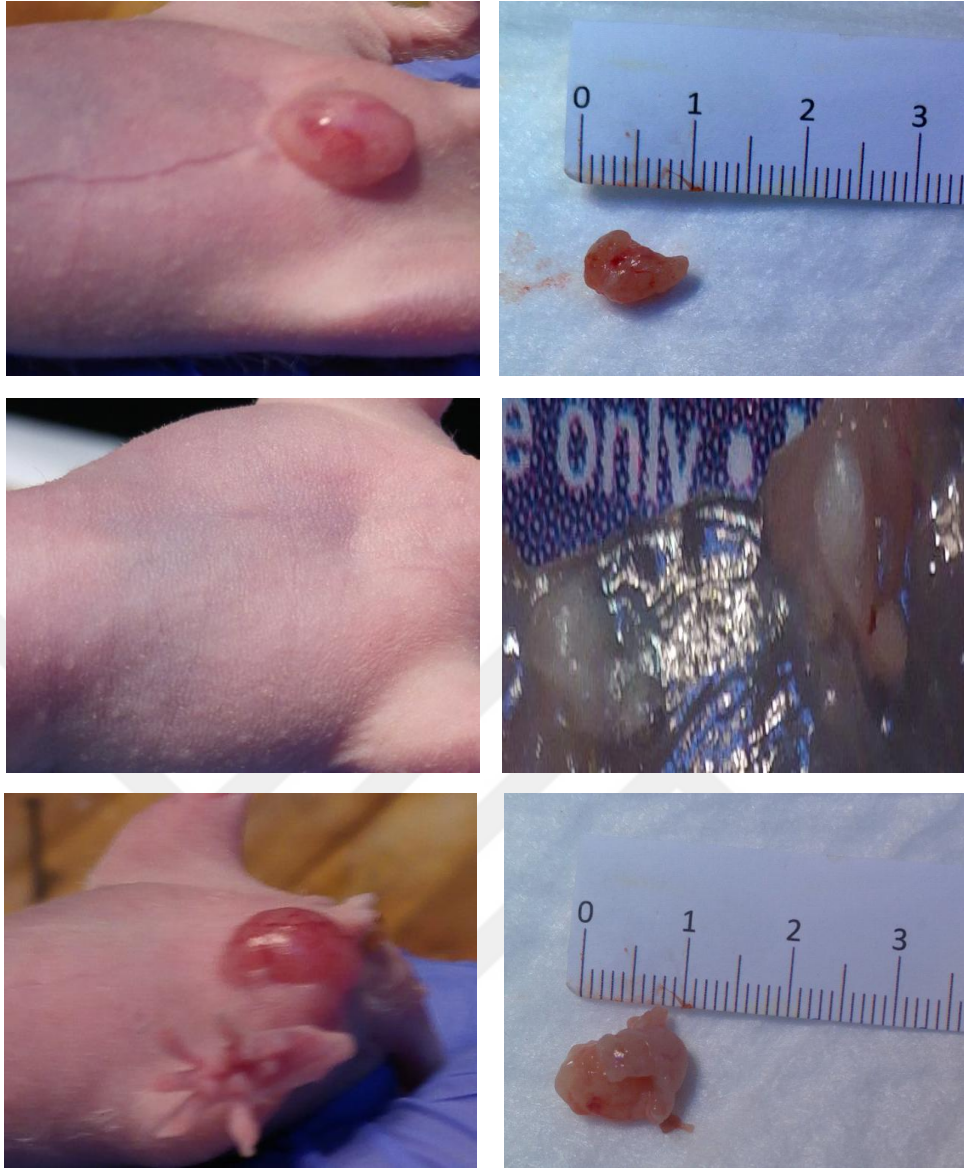
Şekil 3.98: Kontrol siRNA uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.



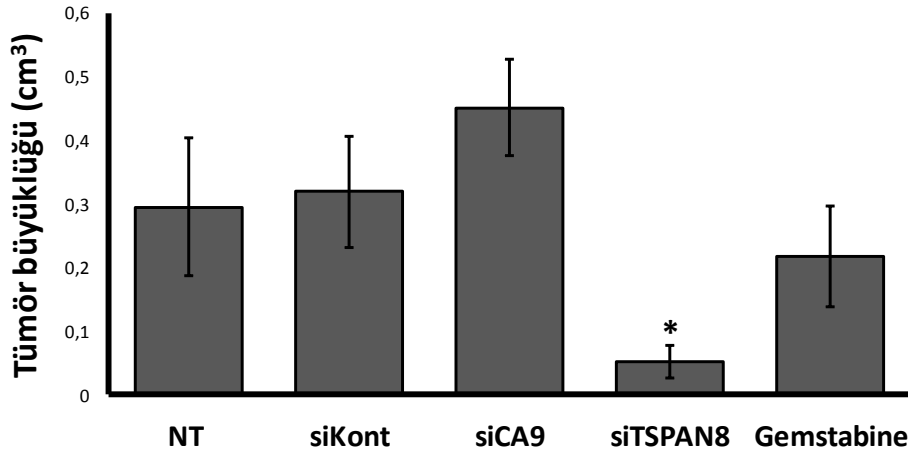
Şekil 3.99: CA9 siRNA uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.



Şekil 3.100: TSPAN8 siRNA uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.



Şekil 3.101: Gemstabine uygulanmış gruplarda yaşayan deneklerin tümörlerinin sakrifiye edilmeden önceki ve sakrifiye edilip tümör çıkarıldıktan sonraki görüntüleri.

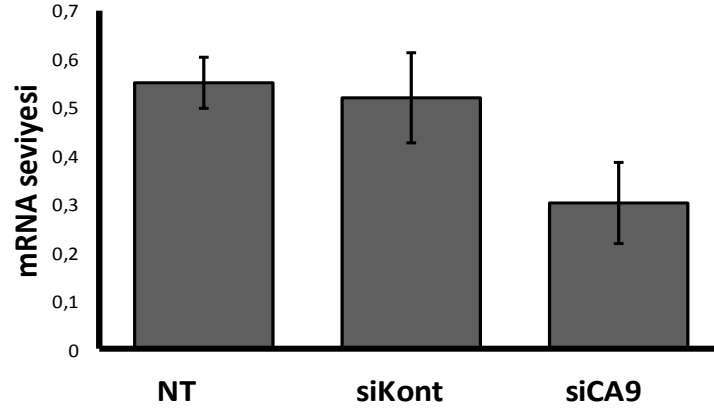


Şekil 3.102: Farelerden çıkarılan tümörlerin büyüklüklerinin karşılaştırılması.

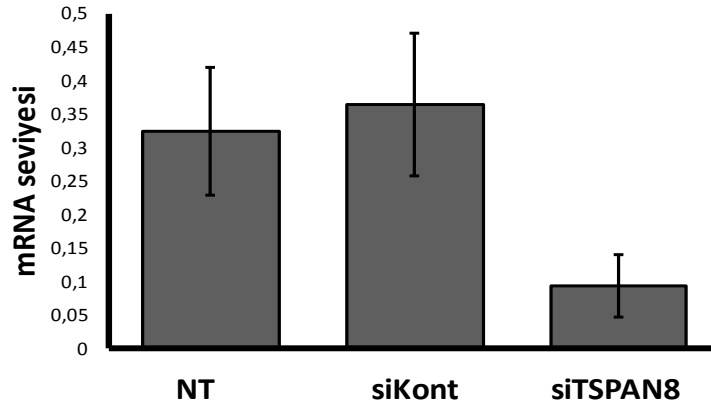
3.10.5 CA9 ve TSPAN8 *in vivo* susturulmasının mRNA seviyesinde belirlenmesi

siRNA uygulanan tümör dokularında mRNA seviyesinde meydana gelebilecek farklılığı belirlemek için Realtime PCR yapıldı. Sakrifikasyondan sonra RNA izolasyonu için -80C°'de saklanan tümör dokusundan bölüm 2.3.2.9'da belirtildiği gibi RNA izolasyonu yapıldı. Ardından bölüm 2.3.2.9'da belirtildiği gibi cDNA elde edildi. Tablo 2.16'daki genlere özgü primerler ile bölüm 2.3.2.9'da anlatıldığı gibi Realtime PCR yapıldı. Real time PCR analizleri birbirinden bağımsız en az 3 tekrarlı ve her deney grubu en az 3 tekrarlı çalışıldı. Normalizasyon için tablo 2.16'de belirtilen insan β -2-mikroglobulin primerleri kullanıldı. Bölüm 2.3.1.13'de belirtildiği gibi mRNA seviyesi $\Delta\Delta Ct$ değerleri Livak metoduna göre hesaplandı. Livak metoduna göre değerlendirilen gruplarda kullanılan CA9 ve TSPAN8 genlerine özgü primerler ile mRNA seviyesinde ekspresyonu belirten grafikler oluşturuldu.

NT ile karşılaştırıldığında CA9 siRNA'sı uygulanan farelerde CA9 seviyesinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Aynı şekilde TSPAN8 siRNA'sı uygulanan fareler ile NT uygulanan fareler karşılaştırıldığında TSPAN8 mRNA seviyesinde bir azalma olduğu görüldü.



Şekil 3.103: CA9 siRNA transfeksiyonu sonrası tümör dokusundaki CA9 mRNA seviyesindeki değişimin Realtime PCR ile belirlenmesi.



Şekil 3.104: TSPAN8 siRNA transfeksiyonu sonrası tümör dokusundaki TSPAN8 mRNA seviyesindeki değişimin Realtime PCR ile belirlenmesi.

3.10.6 CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Tümör Dokularındaki Etkisinin Histolojik Olarak İncelenmesi

Tümör dokularının histolojik olarak incelenmesi, farelerde tümör oluşumunu doğrulamak ve gruplar arasında tümörün histolojik yapısında olası belirlemek için yapıldı. Farelerden alınan tümör dokuları bölüm 2.3.2.6'da belirtildiği gibi parafine gömülü kesitler hematoxilen ve eozin (HE) boyaları ile boyandı ve mikroskopta görüntülendi.

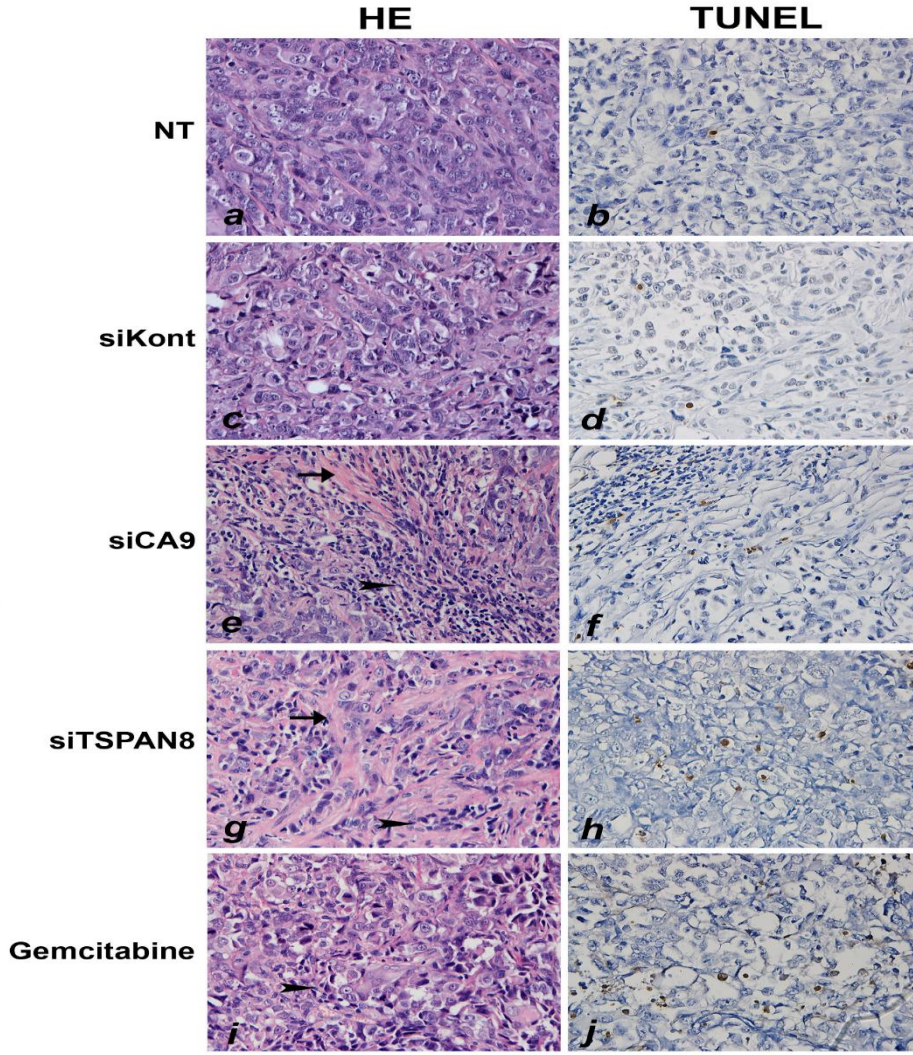
Tümör dokularının histolojik yapısı incelendiğinde, tüm deneklerde tümör oluştuğu doğrulanmış oldu (Şekil 3.106 a, c, e, g, i). Yine farklı deney grupları arasında tümörün histolojik yapısında bazı farklılıklar izlendi. Deneklerin herhangi bir tedavi almadığı NT grubu ve sadece kontrol siRNA'nın uygulandığı siKont gruplarından elde edilen kesitlerde

(Şekil 3.106 a ve c) çok sayıda tümör hücresinin bulunduğu ve tümör dokusunun daha invazif olduğu, sınırlarının daha belirsiz olduğu gözlemlendi. siCA9, siTSPAN8 ve Gemcitabine gruplarında ise tümör dokusunda ve tümörün sınırlarında belirgin fibrozis ile beraber tümör hücresi sayısının azalmış olduğu görüldü (Şekil 3.106 e, g, I (oklar ile gösterilmekte)). Yine, bu gruplarda dokuya çok sayıda immün hücrenin infiltre olduğu gözlemlendi (Şekil 3.106 e, g, I (ok başları ile gösterilmekte)). Tümör morfolojisindeki bu bulgular, siCA9, siTSPAN8 ve Gemcitabine ile tedavi edilen gruplarda tümör hücrelerinin ölümünün indüklendiğini desteklemektedir.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL boyaması yapıldı. TUNEL boyaması için Merck Millipore marka ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit kullanıldı ve boyama işlemi üretici firmanın kit içerisinde yer alan kılavuzunda önerildiği biçimde gerçekleştirildi. TUNEL boyalı preparatlar mikroskopta görüntülendi ve fotoğraflandı. Apoptotik indeksin (API) belirlenmesi için, her denek için, tümörün farklı seviyelerinden alınan en az 2 farklı kesitte, en az 4 farklı alanda en az 200 adet tümör hücresi çekirdeği değerlendirildi ve apoptotik çekirdeklerin sayısı ile normal çekirdeklerin sayısı kaydedildi. AI, her denek için, apoptotik çekirdek yüzdesinin hesaplanması ile belirlendi. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılması, grup içerisinde yer alan deneklerin API'lerinin ortalamasının karşılaştırılması ile gerçekleştirildi.

Tümör Dokusundaki Apoptoz ve Apoptotik İndeks (API) bulguları kısaca özetlersek, NT grubunda AI %5,01±1,08 (ortalama ± standart sapma), siKont grubunda API %5,62±2,27, siCA9 grubunda API %12,28±4,19, siTSPAN8 grubunda API %13,23±2,99 ve Gemcitabine grubunda API %11,91±4,08 olarak bulundu (Tablo 3.3).

Gruplar arasında farklılık bulunup bulunmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis testi uygulandığında anlamlı farklılığın bulunduğu ($p=0,11$) görüldü. Anlamlılığın hangi gruplar arasındaki farklılıktan kaynaklandığını belirlemek için gruplar ikişer ikişer Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. NT grubu ile siKont grubu arasında anlamlı fark görülmezken ($p=0,773$), siCA9 grubunda, siTSPAN8 grubunda ve Gemcitabine grubunda API hem NT grubuna (sırasıyla $p=0,034$, $p=0,021$ ve $p=0,021$) hem de siKont grubuna oranla (sırasıyla $p=0,034$, $p=0,021$ ve $p=0,043$) anlamlı olarak artmıştı. siCA9 ve siTSPAN8 ile siCA9 ve Gemcitabine arasında ise anlamlı fark görülmedi (sırasıyla $p=0,289$ ve $p=0,724$). Yine siTSPAN8 grubundaki API ile Gemcitabine grubundaki API arasındaki fark da anlamsız bulundu ($p=0,564$).



Şekil 3.105: Fare tümörlerinden elde edilen örnekler ile HE (a, c, e, g, i) ve TUNEL (b, d, f, h, j) boyamalı preparatlar.

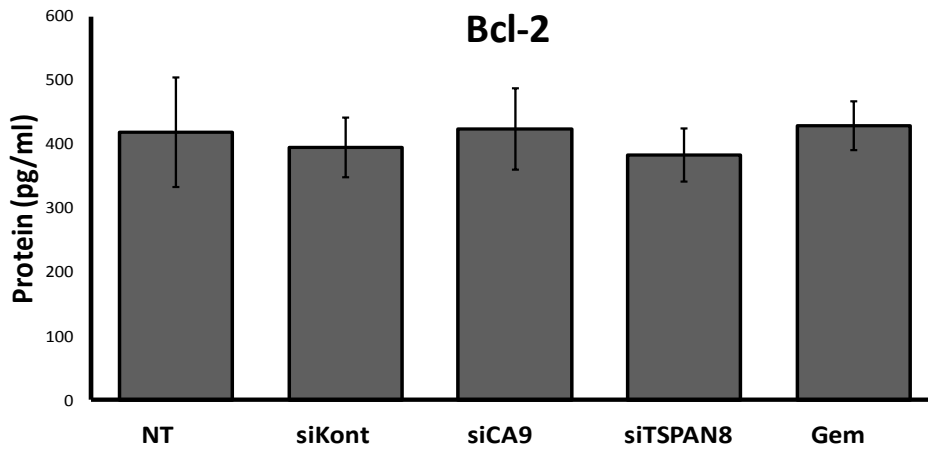
Tablo 3.3: Farklı deney gruplarından elde edilen preparatların TUNEL analizi sonucu elde edilen Apoptotik İndekslerin karşılaştırılması

GRUP	ORTALAMA API%	STANDART HATA
NT	5,01	1,08
siKont	5,62	2,27
siCA9	12,28	4,19
siTSPAN8	13,23	2,99
Gemcitabine	11,91	4,08

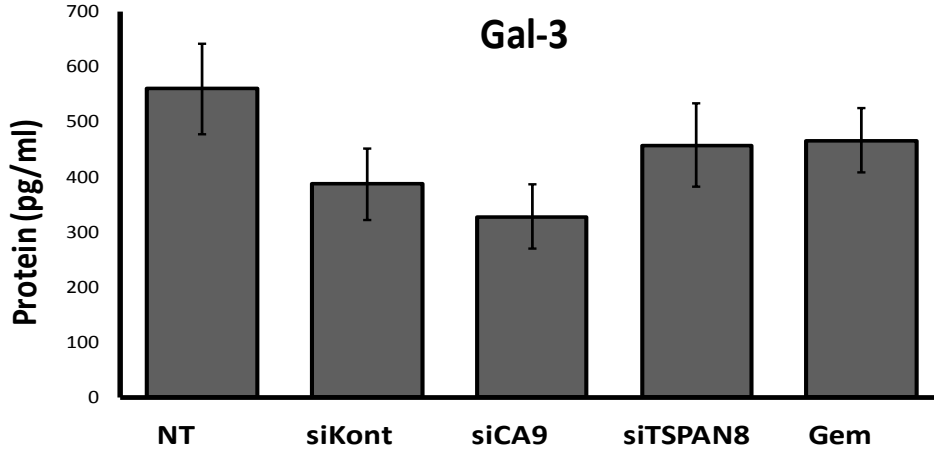
3.10.7 Tümör Dokularında CA9 ve TSPAN8 Genlerinin Susturulmasının Apoptoz ile İlişkili Bazı Proteinlere Etkisinin Belirlenmesi

CA9 ve TSPAN8 susturulmasıyla tümör dokularındaki apoptotik protein seviyelerindeki değişiklikler ELISA analizleri ile belirlenmiştir. ELISA analizleri için bölüm 2.3.2.7’de belirtildiği gibi RelAssay ELISA kitleri üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde kullanıldı. İstatistiksel analizleri ONEWAY Anova testi ile gerçekleştirildi.

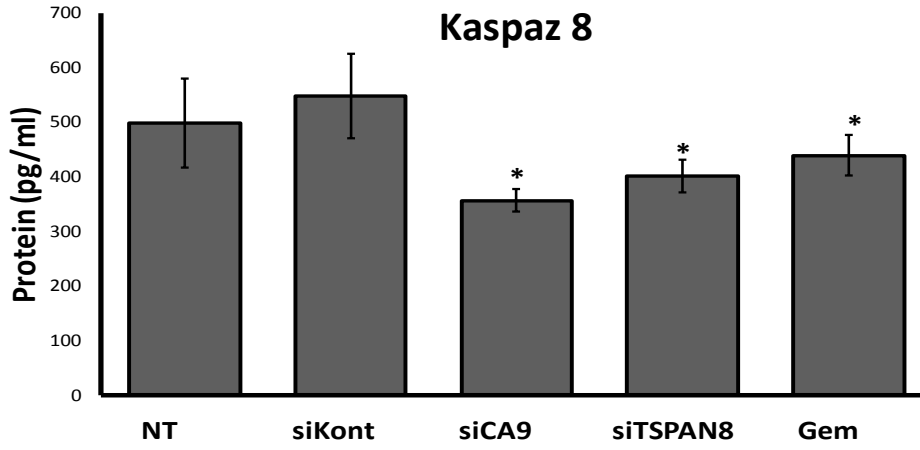
Tümör dokularındaki Bcl-2 proteini, siCA9 ve siTSPAN8 gruplarının kontrol grupları ile karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmektedir (Şekil 3.107). Tümör dokularına NT ile karşılaştırıldığında siKont, siTSPAN8 ve Gemstabile gruplarında anlamlı bir değişim görülmezken CA9 siRNA’sı uygulanan grupta Galektin-3 seviyesinin azaldığı görülmektedir (Şekil 3.108). Kaspaz 9 protein seviyesinin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ise hem CA9 siRNA uygulanan grupta hem de TSPAN8 siRNA uygulanan gruplarda arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.109). Kaspaz 8 protein seviyesi ise bu gruplarda kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 3.110). İstatistiksel analizleri ONEWAY Anova testi kullanılarak yapılmıştır.



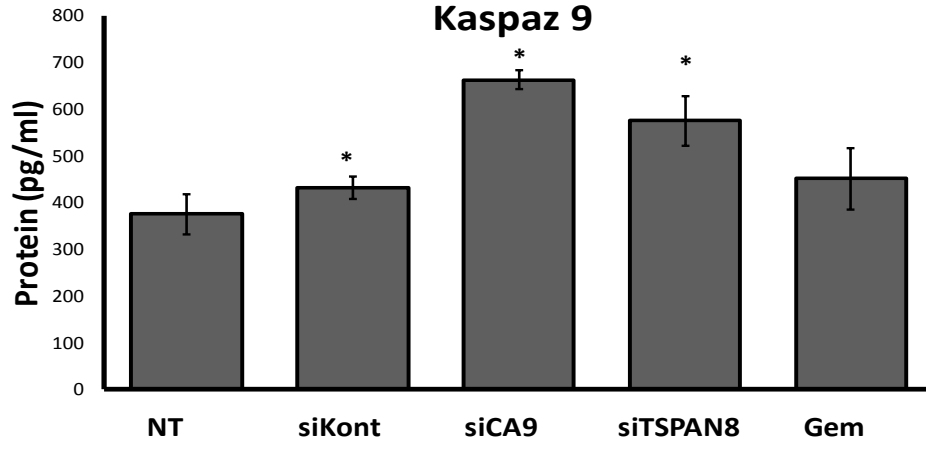
Şekil 3.106: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Bcl-2 protein seviyesinin ELISA analizi ile belirlenmesi.



Şekil 3.107: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Galektin 3 protein seviyesinin ELİSA analizi ile belirlenmesi.



Şekil 3.108: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Kaspaz 8 protein seviyesinin ELİSA analizi ile belirlenmesi.



Şekil 3.109: Tümör dokularında apoptoz ilişkili Kaspaz 9 protein seviyesinin ELİSA analizi ile belirlenmesi.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser hücre biyolojisinin, özellikle de değişen kanser hücresi metabolizmasının ve bozulan DNA hasar onarım mekanizmasının daha açık bir şekilde anlaşılması, klinik öncesinde güçlü ve yeni terapötik stratejiler geliştirmeyi mümkün kılmaktadır [8, 9]. Yakın geçmişte bakıldığında, genomik değişikliklerin kapsamlı atlası, pankreatik kanser dâhil olmak üzere kanser alt tiplerinin moleküler sınıflandırılması, klinik öncesi model sistemlerin geliştirilmesi gibi yenilikler klinikte daha başarılı sonuçlar elde edilmesinde, yeni ilaçların ve tedavi yöntemlerinin keşfinde yararlı olmaktadır [91].

Pankreas kanseri erken tanı ve etkili bir tedavi yönteminin olmaması nedeniyle mortalite oranı en yüksek kanser tiplerindedir. Pankreas duktal adenokarsinomunun 2030 yılına kadar kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedeni haline geleceği tahmin edilmektedir. [63, 67, 92]. Günümüzde pankreatik kanserin tedavisinde cerrahi yöntemlerin yanı sıra kemoterapi ve radyoterapi tedavisi uygulanmaktadır. Pankreatik kanserinin geç teşhis edilmesinin yanı sıra, kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmesi gibi sorunlar bulunmaktadır. Pankreatik adenokarsinom (PDAC) genellikle hastalığın son aşamalarında teşhis edildiği için, hastaların büyük bir bölümünde tanı anında karaciğer başta olmak üzere başka organlarda metastas görülür [75, 220].

Çalışmamızda Panc-1 ve MiaPaca-2 hücreleri hem *in vitro* deneyler için hem de *in vivo* deneyler için kullanılmıştır. Bu iki sistemde de iyi çalışılabilecek hücre hatları literatürdeki çalışmalardan yola çıkılarak tespit edilmiştir. Panc-1 hücre hattı epitelyal karakterlidir ve pankreasın duodenal çeperinden köken alır. Panc-1 hücreleri non-endokrin pankreas kanser modeli olarak *in vitro* çalışmalarda kullanılan bir hücre tipidir. Panc-1 hücreleri HER₂/neu fazla derecede ifade eden ve ER (östrojen reseptör) negatif olan hücrelerdir. Stahle ve arkadaşları yaptıkları matrijel ile migrasyon assay çalışmasında Panc-1 hücre hattının BxPC-3 hücre hattından 5 kat daha fazla göç yeteneğinin olduğunu göstermişlerdir [74]. Nude farelerle yapılan çalışmalarda farklılık göstermekle beraber pankreas kanseri hücrelerinin subcutan enjeksiyon yöntemi ile verilmesi sonucu tümörün geliştiği anlaşılmaktadır. MiaPaca-2 hücreleri nude farelerde daha hızlı tümör oluşturdukları ve soft agar kültürlerinde daha iyi koloniler oluşturmaları ile Panc-1 hücrelerinden ayrılmaktadır. Düşük yoğunlukta ekilen MiaPaca-2 hücreleri bile etkili koloniler oluşturmaktadır [74, 79, 80, 95, 99, 220]. MiaPaca-2 hücreleri hücre kültüründe hızlı büyüyen ve agresif yapıdaki hücrelerdir. MiaPaca-2 hücreleri K-ras, P16 ve P53 genleri açısından mutant iken SMAD4 geni açısından yabanıl tiptedir. Matsuo ve arkadaşlarının pankreas kanserinin anjiyogenez özelliklerini

araştırdığı çalışmada BxPC-3 hücrelerinin yüksek seviyede IL-1 α ve IL-8 salgıladıkları görülürken MiaPaca-2 ve Capan-2 hücrelerinde bu salgılanmanın çok düşük seviyede gerçekleştiği görülmüştür [63, 84, 97].

Hem MiaPaca-2 hemde Panc-1 hücrelerinde epitelyal markerler CK5.6 ve AE1 / AE3 ve mezenkimal işaretleyici vimentinin ifadesi, bu hücrelerin epitelyal-mezenkimal hücreler olarak karakterize edilmesini sağlamaktadır [221]. Bir epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) programının aktivasyonu, epitelyal kanser hücreleri tarafından malign bir fenotipin elde edilmesi için gerekli mekanizmadır ve EMT'nin ayırt edici özelliği, epitelyal homotipik adezyon molekülü E-kaderin kaybı ve mezenkimal belirteç vimentin kazanımıdır [222]. Panc-1 hücrelerinde E-kaderin ifadesi bulunmamaktadır. EMT'nin pankreatik kanserde ilaç direncine neden olduğu ve E-kaderin ekspresyonunun artmasının birçok tümör tipinde artmış sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [223].

Pankreas kanserlerinde özellikle dikkat çeken hipoksiya, aslında tüm katı tümörlerin genel bir özelliğidir ve tümör fenotipi ile tümör hücrelerinin ilerleyişini güçlü şekilde etkilemektedir. Hipoksiya, ortamdaki oksijenin azalmasıdır. Tümörlerdeki oksijen yetersizliği yani hipoksik koşullar, tümör saldırısını kolaylaştıran hücre dışı ortamın asidifikasyonu ile bağlantılıdır. Ayrıca hipoksiya, asidik pH ile ilişkili olarak tümör büyümesini arttırıcı bir faktördür. Özellikle katı tümörlerde tümörün merkezinin oldukça hipoksik olması bu ortamdaki hücrelerin uyum sağlayabilmesi için bir takım stratejiler geliştirmesi gerekir [49, 50]. Hipoksiyanın ya doğrudan kanser hücrelerindeki pro-invasiv yolakların aktivasyonuna neden olduğu ya da kanser hücreleri ve stromal hücreler arasında pro-invasiv interaksiyonları etkileyerek dolaylı olarak invaziv özellikleri arttırdığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur [69, 182].

Tetraspaninler kendi kendileriyle veya çok çeşitli transmembran proteinler ve sitozolik proteinler ile interaksiyonları olan transmembran 4 protein ailesidir [31]. Tetraspanin domainleri TEM (tetraspanin enriched membrane microdomain) adı verilen bölgelerde bulunurlar. Tetraspaninler integrinlerin bölümlendirilmesi (kompartümanlara ayırma), geri dönüştürülmesi ve sinyalizasyonlarını düzenleyerek hücrelerin yayılması ve migrasyonunda görev alan önemli proteinlerdir. Hücre içi protein trafiğini düzenleyerek hücrelerin adezyonunda görev alırken, matriks metalo proteinazlar (MMPs) gibi bazı proteinlerin biyosentezini ve aktivasyonlarını modüle ederek de invazyonda rol oynamaktadırlar [184, 203]. Bu temel aktiviteler genel olarak tüm tetraspaninler için geçerli iken özellikle CD82 gibi bazı tetraspaninlerin metastazı baskıladıkları, CD151 ve TSPAN8 gibi bazılarının ise metastazı promote ettikleri gösterilmiştir [186, 224]. CD151 genel olarak tüm kanser tiplerinde metastazı arttırırken, özellikle gastrointestinal tümörlerde yüksek

ekspresyon seviyesi görülen TSPAN8 spesifik olarak gastrointestinal tümörlerin metastazında etkilidir. Bu özellikleri ile TSPAN8 ekspresyonu, tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu kanserlerde biyobelirteç olarak gösterilmektedir [204, 205, 225].

Karbonik anhidraz ailesinin tümör ilişkili üyesi CA9 hipoksik koşullarda ekspresyonu artan Hif-1 transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir. Aynı zamanda yüksek hücre yoğunluğunda, çevresel hipoksiya meydana gelir ve bu durumda da CA9'un transkripsiyonunun arttığı belirlenmiştir [183]. Hipoksiya ile indüklenen proteinler özellikle CA9, anti-kanser terapiler için potansiyel bir hedef olarak gösterilmiştir [54]. CA9'un normal dokulardaki sınırlı ekspresyonu varken katı tümörlerde overekspresyonu ve hücre dışı katalitik alanın olması, bu proteini mükemmel bir terapötik hedef haline getirir. [53, 166]. CA9'un hipoksiya ile regülasyonu konusunda çalışmalar bulunmasına rağmen, TSPAN8'in hipoksik koşullardan nasıl etkilendiği konusunda bilgi oldukça sınırlıdır [166, 178, 180].

Çalışmada, hipoksi ile indüklenen genlerden bir tanesi olan ve kanser biyomarkeri olarak öne çıkan CA9, ayrıca birçok kanser türünün metastazında kilit rol üstlenen TSPAN8 genlerinin susturulmasının *in vitro* hücre hatlarında ve *in vivo* ksenograft tümörlerde etkileri incelendi. Çalışmada kimyasal olarak kobalt klorür (CoCl_2) kullanılarak hipoksik koşullar oluşturuldu, hem CA9'un hemde TSPAN8'in ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler belirlendi. Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde hem hipoksik hem normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının hücre canlılığına ve hücrelerin invazyon, migrasyon, klonojenik özelliklerine etkileri belirlendi. Bu genlerin susturulmasının apoptoz ilişkili proteinlerde ve otofaji ilişkili proteinlerde meydana getirdiği değişikliklerde hipoksik ve normal oksijen koşullarında çalışıldı. Farklı kanser tiplerinde yüksek düzeyde ekspre olan CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının tümör üzerinde durdurucu hatta azaltıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir [54, 226, 227].

Çalışmanın ilk basamağında hipoksik ve normoksik koşullarda büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin ekspresyon seviyesi tespit edildi. Gen ekspresyon seviyeleri her hücrede farklı olabilmektedir. Normal oksijen koşullarında büyüyen Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 ve TSPAN8 genlerin ekspresyonu mRNA seviyesinde tespit edebilmek için RNA izolasyonu yapıldı ve RNA kalitesi öncelikle spektrofotometre ile absorbansları ölçülerek daha sonra RNA jelinde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 3.1). Başlangıçta aynı sayıda ekilen hücrelerden Fermentas RNA izolasyon kiti ile elde edilen Panc-1 RNA'sının MiaPaca-2 RNA'sına göre daha az olduğu görüldü. Bölüm 2.3.1.12'de belirtildiği gibi cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'nın kalitesini kontrol

etmek için referans gen olan insan- β -2-mikroglobulin primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 3.2). Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinden iyi miktarda cDNA elde edildiği görüldü. CA9 mRNA seviyesinin Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde hemen hemen aynı olduğu görüldü. TSPAN8 mRNA seviyesinin Panc-1 hücrelerinde MiaPaca-2 hücrelerine göre ifadesinin daha az olduğu görüldü. Bu farklılığın hücrelerde farklı düzeylerde olan gen ekspresyonuna bağlı olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik ortamda CA9 ve TSPAN8 genlerin ekspresyonu mRNA seviyesinde tespit edebilmek için hücrelere 150 μ M son konsantrasyonda CoCl₂ eklenerek hipoksik ortam için uyarıldı 8, 16 ve 24 saat zaman aralıklarında çalışıldı.

Kong ve arkadaşları, Panc-1 hücreleri dahil olmak üzere farklı pankreatik kanser hücrelerinde Hif-1 α protein seviyesindeki artışı 0, 6, 12, 24 ve 48 saatte göstermişlerdir. Panc-1 hücrelerinde 0 ve 6 saatte Hif-1 α proteininde değişim görülmezken 12 saatten sonra artış meydana gelmiştir. Ayrıca çalışmada, CoCl₂'ün farklı konsantrasyonlarında Hif-1 α protein seviyesindeki artışı rapor etmişlerdir. Bu çalışmaya göre 150 μ M CoCl₂'ün hipoksik koşullar için en uygun konsantrasyon olduğu söylenebilir [228].

Hipoksik ortamın oluştuğunu kanıtlayabilmek için Hif-1 α mRNA seviyesi belirlendi. Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde Hif-1 α mRNA seviyesinin zamana bağlı olarak arttığı görüldü. Panc-1 hücrelerinde TSPAN8 mRNA seviyesinin 0 saate göre 8 ve 16 saatte azaldığı, 24 saatte ise arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. MiaPaca-2 hücrelerinde TSPAN8 mRNA seviyesinde anlamlı bir fark görülmedi. Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik ortamın oluşması ile hipoksiya marker olan CA9 geninin mRNA seviyesinde zamana bağlı olarak arttığı doğrulandı.

Panc-1 hücrelerinde TSPAN8 protein seviyesinde anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 3.17). MiaPaca-2 hücre hattında TSPAN8 protein seviyesi 0 saate göre 16 ve 24 saat sonunda 1,7 kat artmıştır (Şekil 3.18). Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde CA9 protein seviyesi zamana bağlı olarak artmıştır. Özellikle 24 saat sonunda CA9 protein seviyesi 0 saate göre yaklaşık 2 katlık bir artış olduğu görüldü (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Normoksik koşullarda hücre yoğunluğu arttığında CA9 ekspresyonu artarken, hipoksik koşullarda hücre yoğunluğu arttığında CA9 ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir [229]. Li ve arkadaşları tarafından pankreatik kanser hücrelerinde CA9'un ekspresyonu ve lokalizasyonu tespit edilmiş. Yapılan çalışmada hem mRNA seviyesinde hemde protein seviyesinde CA9'un ekspresyon seviyesi en yüksekten en düşüğe sırasıyla AsPC-1, MiaPaca-2, BxPC-3, Panc-1 şeklindedir [230].

RNA interferansı (RNAi), hücre kültürlerinde miRNA yada siRNA'ların transfeke edilerek aktarılması sonucu tamamlayıcı mRNA'nın bozulmasına neden olduğu bir mekanizmadır [231]. siRNA'lar, hedef genleri susturma kolaylığından dolayı gen fonksiyonunu incelemek, hedef tanımlamayı, hedef doğrulamayı sağlamak ve terapötik uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır [231-233].

Farklı hücre hatlarında hedef genler farklı miktarda siRNA uygulanarak susturulabilmektedir. Örneğin, HeLa hücrelerinde Retinoblastoma geni (Rb) 100 nM siRNA ile susturulurken, diğer hedef genler 20 nM yada 5nM siRNA uygulaması ile verimli bir şekilde susturulduğu gösterilmiştir [234]. Robertson ve arkadaşlarının meme kanseri hücre hatları ile yaptığı çalışmada 200, 100, 50, 10 ve 0,1 nM siRNA kullanılarak hipoksik ve normoksik şartlarda CA9 susturulması optimize edilmiş. Buna göre MDA-MB-468 hücrelerinde CA9'un tamamen sustuğu en düşük siRNA konsantrasyonu 100nM olarak belirlenmiştir [235].

CA9 ve TSPAN8 genleri MiaPaca-2 hücre hatlarında 50 nM, 10 nM ve 5 nM siRNA uygulanarak susturulmuştur (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20). Farklı miktarda siRNA uygulanması ile genlerin susturma seviyeleri birbirinden farklı olmuştur. Bu şekildeki azalma bize hem uygun dozu gösterirken hemde siRNA'nın hedef gene olan özgünlüğünü göstermektedir. siRNA'nın hücelere yetersiz transfeksiyonu sonucu mRNA seviyelerinin % 70-75'ten daha az azalması ile genin biyolojik işlevi ile ilgili yetersiz veya yanlış sonuçlar almaya yol açmaktadır [236]. mRNA ve protein seviyesinde elde ettiğimiz sonuçlarda 100 nM siRNA ile CA9 ve TSPAN8 genlerinin etkili bir şekilde sustuğu belirlendi (Şekil 3.21). Çalışmada yapılan deneylerde 100nM siRNA kullanarak gen susturması sonucu meydana gelen etkiler araştırıldı.

Hem siRNA'nın etkisini tespit edebilmek hemde siRNA transfeksiyonu sırasında hücrelerde sitotoksik etki olup olmadığını tespit edebilmek için hücre canlılık tesleri yapıldı. MTT testi hücre canlılığı ve sitotoksik etkilerin belirlenmesinde uzun yıllardır kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Kantitatif ve güvenilir bir yöntem olan Flow sitometrede yapılan via count analizi ile doğrudan bir popülasyondaki hücre sayısının canlı ve ölü hücrelerin ayrı ayrı sayıları belirlendi.

MTT testinde CA9 ve TSPAN8 genlerinin siRNA ile susturulması hücrelerde 24 saatte önemli bir değişikliğe neden olmazken 48 saat ve 72 saatte hem hipoksik hem de normal oksijen koşullarında hücrelerin ölümüne sebep olduğu gösterildi. 48 saatteki hücresel ölümü ViaCount yöntemiyle araştırıldığında MTT testine benzer sonuçlar elde edildi. Özellikle CA9 geninin susturulması sonrası Panc-1 hücrelerinin proliferasyonunun, normal koşullardaki hücrelerde hipoksik koşullardaki hücelere göre daha az olduğu görüldü.

Ayrıca, Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik şartlarda CA9 geni susturulduğunda normal oksijen şartlardaki ile karşılaştırıldığında proliferasyonun arttığı görüldü. Bu da bize birkez daha hipoksik ortamda CA9'un ifadesini arttığını ve hücrelerdeki artan CA9 ekspresyonunun meydana gelen ölümün azalmasını sağlayabileceğini gösterdi. Her iki yöntemde de 48 saat sonrasında gen susturmanın pankreas kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı görüldü (Şekil 3.31-Şekil 3.34)

CA9'un tümör hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır [235, 237]. Buna karşı olarak Lou ve arkadaşlarının fare meme kanserinin agresif türü olan 4T1 hücreleri ve insan meme kanser hücre hatlarında yaptığı çalışmada, shRNA ile CA9 susturulduğunda normal ve hipoksik ortamdaki hücrelerin proliferasyonunda azalma görülmüştür [238]. Benzer şekilde, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarındaki CA9 ekspresyonunun RNAi stratejisi ile susturulması sonucunda, hücre proliferasyonunu 48 saatte azalttığını 72 saat ve sonrasında ise bu etkinin ortadan kalktığını göstermişler [235]. LS174T kolon karsinom hücre hattında yapılan çalışmada kontrol hücrelerine kıyasla CA9 susturulmuş grupta proliferasyon oranı azalmıştır [237].

Kanser hücrelerinin metastazı, hücrenin doku içinde hareket etmesine ve sonunda uzak organlarda ikincil tümörlerin gelişimiyle sonuçlanan karmaşık bir süreçtir [239]. Kanser hücrelerinin invazyonunda yer alan mekanizmalar oldukça karmaşıktır ve birçok genetik ve mikroçevresel faktör tarafından etkilenir. Kanser hücrelerindeki hipoksiya, çoğu katı tümörün önemli bir olgusudur, epitelyal-mezenşimal geçişi (EMT) ve tümör hücresi invazyonunu desteklediği bilinmektedir [240]. Tümör invazyonu, tümörle ilişkili mortaliteden sorumlu olan metastaz oluşumuna önemli ölçüde katkıda bulunur. Kanser hücresi migrasyon için bazal membran ve stromadan geçmesi gereklidir [241].

Pankreas kanseri hücrelerinin CA9 ve TSPAN8 susturulduktan sonra göç ve invaziv yeteneklerini değerlendirmek için, bazal membrandaki hücrelerin invazyonunu taklit eden Matrigel invazyon analizi gerçekleştirildi. CA9 ve TSPAN8 sustuğunda hücrelerin invazyon kapasitesinin azaldığı görüldü. Hücrelerin iki boyutlu olarak migrasyon kapasitesini belirleyen scratch assay sonucunda CA9 ve TSPAN8 susturulmuş hücrelerde hücrelerin migrasyon özelliklerinin azaldığını hatta hipoksik ortamdaki MiaPaca-2 hücrelerinde TSPAN8 geninin susturulması sonucu migrasyon alanının açıldığı görüldü. Ayrıca kanser hücrelerinin metastas yaptığı organdaki gelişme kapasitesini belirlemek için koloni formasyon testi yapıldığında CA9 ve TSPAN8 susturulmuş hücrelerde koloni oluşturma kapasitesinin NT ve Kontrol siRNA uygulanmış hücrelere göre azaldığı belirlendi. Bu veriler, önceki çalışmaların sonuçlarını desteklemekte ve CA9 ekspresyonu ile TSPAN8

ekspresyonunun kanserin artan metastaz oranı arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir.

Bazı migrasyon çalışmalarında, matrigel® ile MiaPaca-2 ve Panc-1 hücrelerinin invaziv karakteri gösterilmiştir. Panc-1 hücrelerinin göçünün kollajen tip I ile kaplanmış transwell® plakalarında MiaPaca-2 hücrelerinden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada hem MiaPaca-2'nin hemde Panc-1 'in EMT potansiyeline sahip olduğunu, ancak bu potansiyelin Panc-1 'de daha fazla olduğunu göstermektedir [221, 242].

İntegrin aktivasyonu aracılığı ile tetraspanin aracılı motilitenin artmasına bağlı olarak kanser hücrelerinde metastazi indükledikleri düşünülen CD151 ve TSPAN8 genleri ASML (Ascites, Solid, Metastases, Lung) hücrelerinde knockdown edilerek yapılan çalışmada bu genlerin birbirinden farklı mekanizmalarla çalıştıkları gösterilmiştir. Buna göre bu genlerin knockdown edilmesinin hücrelerin invazyon ve migrasyon özelliklerine etkilerinin incelenmesi sonucunda, CD151 knockdown edilmiş hücrelerde invaze olan hücre sayısında ve migrasyonda artış görülürken, TSPAN8 knockdown edilmiş ASML hücrelerinde invaze olan hücre sayısı ve hücrelerin migrasyonunun azaldığı gösterilmiştir [185].

Melanoma hücre hatlarında yapılan çalışmada TSPAN8 geninin siRNA ile susturulmasının hücrelerin yaşamını, proliferasyonunu yada migrasyonunu değiştirmezken, özellikle invazyon özelliklerinin azalmasına sebep olduğu gösterilmiş ve TSPAN8 geni invazyon mediatörü olarak önerilmiştir [243].

Hipoksik koşulların CD9 (TSPAN29) ekspresyonu ve keratinositlerin migrasyonu üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, CD9 ekspresyonunun azaldığı ve migrasyon özelliklerinin arttığı belirlenmiştir. CD9'un overekspre edilmesi ise bu etkiyi tersine çevirerek migrasyonu azaltmıştır. p38/MAPK yolağının hipoksiya ile aktive olduğunun da gösterildiği bu çalışmada hipoksik koşullarda yolak inhibitörleri kullanıldığında CD9 ekspresyonunun arttığı ve keratinosit migrasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir. Özetle bu çalışmada tetraspanin 29 (CD9)'un ekspresyonunun hipoksiyadan etkilendiği ve buna bağlı olarak keratinositlerin migrasyonunu değiştirdiği belirlenmiştir [244]. Hipoksik koşullarda tetraspaninlerin nasıl etkilendiğini göstermesi açısından bu çalışma oldukça önemlidir.

İnsan ve fare böbrek kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada CA9 geninin susturulması için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Buna göre CA9 inhibisyonu hem shRNA ile mRNA seviyesinde hem de CA9 spesifik enzim kullanılarak aktivite düzeyinde yapılmıştır. Bu çalışmada *in vitro* hücre hatlarında CA9 geninin susturulmasının hücrelerin radyasyona hassasiyetini arttırdığı ve klonojenik özelliklerini azalttığı belirlenmiştir [177].

SCC-9 ağız kanseri hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada CA9 geninin overekspresyonunun hücrelerin migrasyon özelliklerini anlamlı şekilde arttırdığı, CA9 geninin siRNA ile susturulmasının ise migrasyon özelliklerini azalttığı belirlenmiştir [245, 246].

HT-1080 fibrosarkom hücrelerinde CA9 geni shRNA ile susturulduğunda, MMP-3, MMP-9, integrin-3, tip IV kollajen ve ROCK1 gen ekspresyonunun azalması ile beraber hücre invazyonu ve göçünün de azalmasına yol açmıştır. CA9 susturulan hücrelerdeki azalan invazyon / migrasyon kapasitesinin nedeninin hücrelerin invadopodia oluşumu ve bazal membranın açılması için gerekli olan MMP-9'un seviyesinin azalması ile ilgili olabileceği düşünülmüş [229].

CA9 inhibitörü U-104 75 nM son konsantrasyonda uygulandığında 24 saat sonunda hücrelerin migrasyonunun %40 oranında azaldığı görülmüş. U-104 uygulanan 4T1 hücreleri ile hem 4T1 hücrelerinde aktif MMP-2'nin düşük seviyelerde olduğu belirlenmiş, bu da CA9 enzim aktivitesinin MMP-14'ün aktivasyonu için önemli olduğunu göstermektedir. MMP-14, diğer MMP'ler tarafından da ayrılan tip I kollajen, fibronektin, laminin ve vitronektin gibi diğer substratları parçalayabilmektedir, ancak MMP-14, spesifik olarak MMP-2'yi ayırmak ve etkinleştirmek için tarif edilen tek proteazdır [247]. Özellikle serum ve dokularda bulunan bir hücrenin adezyon ve yayılma faktörü olan vitronektinin parçalanması, integrin ailesinin belirli üyeleri tarafından tanınması ve bir hücre-substrat yapışma molekülü olarak görevli olduğu için önemlidir [248, 249].

Fare meme kanseri hücre hattında CA9 geni shRNA ile susturulduğunda invazyonda ve metastasta azalma olduğu görülmüş. Mekanizması araştırıldığında CA9'un MMP14 ile hücre içi (IC) domenindeki potansiyel fosforilasyon rezidüleri aracılığıyla birleştiğini ve CA9'un MMP14 katalitik aktivitesi için gerekli olan hidrojen iyonlarına doğrudan katkıda bulunarak MMP14 aracılı kollajen yıkımını arttırdığı gösterilmiş. MMP14 ile CA9'un birleşmesi özellikle ilginç bir bulgudur çünkü MMP14 matriks degradasyonu, tümör hücresi invazyonu ve metastazında yer alan bir hücre yüzeyi metaloproteaz enzimidir [250].

CA9, kanser hücresi migrasyonu / invazyonunda, Rho / ROCK sinyal yolağı aracılığıyla β -katenin ile etkileşime girer, bu durum hücreler arası adezyonun dengesizleşmesine neden olur. CA9, E-cadherin aracılı hücre-hücre adezyonunu, β -katenine bağlanmasıyla azaltır ve hareket eden hücrelerin lamellipodisinde bikarbonat taşıyıcıları ile fiziksel etkileşim ve fonksiyonel işbirliği yoluyla hücre göçünü artırır [251]. CA9 susturulmuş hücrelerde MMP9'un azaldığı belirlenmiştir. Özellikle, CA9 susturulmuş hücrelerde ROCK1 seviyesinin düşürülmesi, MMP9 downregülasyonundan sorumlu mekanizma olabilir. ROCK1 (Y27632) ve RhoA / ROCK (simvastatin)'in spesifik

inhibitörlerinin, MMP9 mRNA seviyesini azalttığı görülmüş [229]. MMP9, invadopodia oluşumunda ve bazal membranın bozulmasında önemli bir rol oynadığından, CA9-susturulmuş hücrelerde azalması, adezyon / invazyon sürecindeki CA9 önemi belirlenmiş [252]. CA9'un hareketli hücrelerin lamellipodial uzantılarının pH düzenleyici mekanizmalarına katılması yoluyla hücre göçünü kolaylaştırdığı gösterilmiştir [253].

CA9 tarafından düzenlenen moleküler yolları açıklamak için, bir HT-1080 insan fibrosarkom hücre hattında hipoksik ve normoksik ortamda CA9 shRNA ile susturulmuş ve microarray analizi yapılmış. CA9 susturulmuş hücreler, kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında, 62 genin downregüle olduğu 47 genin ise upregüle olduğu toplamda 109 gende istatistiksel olarak anlamlı ve en az 2 katlık bir değişim olduğu tespit edilmiş. Microarray analizi sonucunda Matriks metalloproteinaz familyasının (MMP3 ve MMP9) iki üyesi ve sıklıkla tümör fenotipi ile ilişkili olan kolajen tip IV α 2 genlerindeki artış kantitatif RT-PCR ile doğrulanmış [229]. Mikroarray analizi, CA9'un susturulmasının hücre dışı matriks ile hücrelerin etkileşiminde rol oynayan integrin β 3, kollajen tip IV α 2 ve α 1, sitokinesis 9 (DOCK9), fermitin familyası üyesi 2 (FERMT2) Rho ile ilişkili ve protein kinaz 1 (ROCK1) gibi çeşitli moleküllerin downregülasyonu ile sonuçlandığını ortaya çıkarmıştır. Aksine, CA9 susturulmuş hücrelerde MMP2 ve MMP3, upregüle edildiği gösterilmiştir. MMP2 ve MMP3'ün protonlanması aktivitelerini ve proteolizini etkilemektedir. CA9, hücre dışı protonların üretilmesiyle asidik hücre pH'nı dengelediğinden, susturulması, MMP2 ve MMP3 aktivitesinin azalmasına ve dolayısıyla ekspresyonunu artmasına neden olduğu düşünülmektedir [254, 255]. Ayrıca, MMP2 aracılı kollajen lizisi β 3 integrin ile MMP2 etkileşimine bağlıdır ve böylece daha düşük β 3 integrin alt birim ekspresyonu, MMP2 inaktivasyonuna ve CA9 susturulmuş hücrelerin invazyonunun azalmasına neden olmaktadır [229, 256]. CA9 susturulmuş HT-1080 hücrelerinde adezyon ve invazyonu etkileyecek bir diğer molekül ADAM10'dur. ADAM10, hücre-hücre adezyon anahtar molekülü E-kadherin dahil olmak üzere birçok hücre yüzey molekülünün etkileşmesi ile hareket eder [257]. Bu bulgular CA9'un fokal adezyon da dahil olmak üzere hücre göçünü bir çok yönüyle etkilediğini göstermektedir. Çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz veriler, CA9'un kanserinin kötü prognostik göstergesi olarak gösteren önceki çalışmaları desteklemektedir.

Çalışmada CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında hipoksik ve normal oksijen koşullarında apoptotik genler ve proteinler üzerine etkileri hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde belirlenmiştir.

Genel olarak CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması proapoptotik olan genlerin (Bcl-2, Bcl-XL) ekspresyonunu azalttığı, apoptotik (Bax, Bak) genlerin ekspresyon

seviyesini ise arttırdığını gözlemlendi. Bu verilerden farklı olarak Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde normoksik koşullarda TSPAN8 siRNA'sı uygulanan grupta NT gruba göre Bcl-2 mRNA'sında 5 katlık bir artış görüldü. Panc-1 hipoksiyada ise CA9 siRNA'sı uygulanan grupta NT gruba göre Bcl-2 mRNA'sında 1,5 katlık bir artış görüldü.

CA9 ve TSPAN8 genleri susturulduğunda meydana gelen hücre ölümünün apoptotik yolla ilişkisini protein seviyesinde araştırdığımızda, Panc-1 normoksiya ve hipoksiyada antiapoptotik gen olan Bcl-2'nin normoksiyada 9 kat, hipoksiyada TSPAN8 siRNA'sı uygulanan grupta ise yaklaşık 3,5 kat arttığı, apoptotik Bax geninin ekspresyonunda değişim olmadığı görüldü. MiaPaca-2 hücrelerinde normoksiyada antiapoptotik Bcl-2'nin 2 kat arttığı apoptotik gen olan Bax'ın da 2 kat arttığı, hipoksiyada ise Bcl-2'nin 3 kat artarken Bax mRNA'sının yaklaşık 1,5 kat artışı görüldü.

Vidlickova ve arkadaşları tarafından PI ve FITC boyamayla yapılan flow sitometri analizinde CA9-negatif hücrelerle CA9-pozitif hücreler karşılaştırıldığında CA9-negatif hücrelerde %14 apoptoz görülürken CA9 pozitif hücrelerde %6 apoptoz görülmüş. Normoksik koşullarda düşük, hipoksik koşullarda ise yüksek CA9 ekspresyonu görülen CGL3 hücreleri kullanılan çalışmada Sikloheksimit ile apoptoz uyarılmış. Protein sentezinin inhibitörü olan sikloheksimit (CHX) etkin ve hızlı bir şekilde apoptozu tetikleyebilen sitotoksik ajanlardandır. CA9-pozitif hücre alt popülasyonunda CA9-negatif olandan daha düşük apoptoz oluşumu bulunmuş. Sikloheksimit ile apoptoz uyarıldığında CA9-negatif hücrelerde %21 oranında apoptoz görülürken CA9-pozitif hücrelerde %15 oranında apoptoz görülmüş. Bu etkinin mekanizması araştırıldığında hücre membranındaki CA9 seviyesinin artmış bir ektodomain değişiminden dolayı, hücre ölümünün ilerlemesi sırasında ADAM17'nin düştüğü gösterilmiş. Metalloproteinaz inhibitörleri, CA9 ektodomainin değişimini azalttığı, ancak apoptozu azaltmadığı görülmüş. Bu bulgular, hücre dışında CA9 ektodomaininin artan seviyesinin, etkili bir antitümör terapisinin bir göstergesi olarak faydalı olabileceğini düşündürmekle beraber bunun aksine, yüksek bir CA9 ektodomain, otokrin / parakrin sinyal potansiyeliyle ilaç direnci ve tümör ilerlemesi gibi istenmeyen etkiler oluşturabileceğini de göstermektedir [258].

Özellikle CA9 gen ekspresyonunun diğer kanser tipleri ile karşılaştırıldığında böbrek kanserlerinde ve gastrointestinal tümörlerde daha yüksek olması, bu hücrelerde gen ekspresyonunun susturulmasının hücrelerin yaşamını daha çok etkilediği ve ölümüne yol açtığını göstermektedir. Sindirim sisteminde sindirim kanalına dâhil olmayan ancak sindirimle ilişkili yapılardan bir tanesi olan pankreasın kanseri ile ilgili olarak, Panc-1 ve MiaPaca-2 pankreas kanser hücre hatlarında CA9 geninin susturulmasının hücrelerde ölüme sebep olması bu anlamda beklenen sonuçlardandır [177, 180].

Sun ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada malignant glioma hücrelerinde TSPAN8'in siRNA ile susturulmasının hücrelerin proliferasyonunu, koloni formasyon özelliklerini ve migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada TSPAN8 geninin susturulmasının hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada TSPAN8 geninin susturulmasının glioma tedavisinde kullanılan temozolomide (TMZ) için hassasiyeti arttırdığı gösterilmiştir [203].

Tez çalışmasında, genel olarak hücre siklusu inhibitör proteini olarak da adlandırılan ve insanlarda CDKN1B geni tarafından kodlanan p27^{Kip1} (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) mRNA seviyesi de analiz edilmiştir. p27 siklin bağımlı kinaz inhibitör proteinlerinden Cip/Kip ailesine ait bir proteindir. p27 proteini cyclin E-CDK2 veya cyclinD/CDK4 komplekslerine bağlanarak aktivasyonlarını engeller ve G1 safhasında hücre siklusunu kontrol eder. Hücrelerde p27 protein seviyesinin yüksek olması genellikle hücrenin G1 fazında durdurulması anlamına gelir [26, 31]. Siklin D2 (G1/S-specific cyclin-D2) proteini insanlarda CCND2 geni tarafından kodlanır, CDK4/6 ile kompleks oluşturur ve hücrelerin G1/S geçişinde önemlidir. Spesifik olarak, Siklin D2, CDK4 veya CDK6 ile bir kompleks oluşturur ve aktivitesi G1 / S geçişi için gerekli olan kompleksin bir düzenleyici alt birimi olarak işlev görür [259]. Siklin D2, insan fibroblastlarında büyümenin durmasını düzenler ve Siklin D2 hücre döngüsünden kaçışı teşvik eder ve kanser hücrelerinde proliferatif olmayan düzeyde kalmasını sağlar [260]. Siklin D2'nin ekspresyonu, p27'nin ekspresyonunun azalmasıyla birlikte artmaktadır [261].

Dong ve arkadaşları, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde TSPAN8 geninin downregüle edilmesinin hücre döngüsü kontrol noktası kinazlarının ve Siklin D1'in susturulduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta, TSPAN8 susturmanın G2 / M faz hücre döngüsünün durdurulmasına ve hücre çoğalmasının önlenmesine neden olduğunu göstermişlerdir [206].

Otofaji hücrel strese (örneğin besin yokluğu ya da ilaç uygulaması) cevap olarak enerji kaynaklarını dengelemek (homeostasi korumak) için hücrenin kendisini kontrollü olarak parçalanmasıdır [262]. Otofajik yolda anahtar düzenleyici proteinlerden biri olan Beklin 1, otofajik vakuol oluşumunu başlatmak için gereklidir [263]. Bcl-2 aile proteinleri, Beklin 1 üzerindeki bağlanma bölgesine (BH3) bağlanarak Beklin1'i inhibe eder ve sonuçta otofajinin inhibisyonuna neden olur. Beklin 1 ailesinin proteinlerinin ATG (AuTophagy-related) proteinleri ile düzenlenmesi, otofajinin bir başka göstergesidir. ATG proteinleri, başlangıçtan olgunlaşma aşamasına kadar otofajik yolda görevli temel proteinlerdir ve otofagozom formasyonunda önemli rol oynarlar. Yapılan araştırmalar iki tür LC3 proteini, LC3-I ve LC3-II olduğunu göstermektedir. LC3-I sitoplazmik formdur ve otofagozom

(autophagosome) yapısı oluşurken kesilerek işlenir ve LC3-II formu oluşur. Dolayısıyla, LC3-II'nin miktarı, otofagozom oluşumu kapsamı ile ilişkilidir [264].

Çalışmamızda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 hücre hatlarında hipoksik ve normal oksijen koşullarında otofajik proteinler üzerine etkileri hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde belirlendi, ayrıca otofagozom yapısının oluşumunun göstergesi olan akridine orange boyaması ile asidik vesiküller görüntülendi.

Genel olarak CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması mRNA seviyesinde otofajik yolda görevli olan Beklin-1, LC3, ATG3, ATG5, ATG7, ATG12 genlerinin ekspresyonunu arttırdığını gördük. Bu verilerden farklı olarak Panc-1 hücrelerinde normoksik koşullarda TSPAN8 siRNA'sı uygulanan grupta NT gruba göre Beklin-1 ve LC3 mRNA seviyesinin azaldığı görüldü. Erken otofajin belirteci olan Beklin-1 ve geç otofajinin belirteci olan LC3 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmesi nedeniyle, ATG genlerindeki değişimler sadece mRNA seviyesinde belirlendi.

Panc-1 hücrelerinde hipoksik koşullarda CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulması Beklin-1 protein seviyesinde artışa neden olduğu görüldü. LC3 mRNA'sı hem CA9 hem de TSPAN8 susturulan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı. Bu etki protein düzeyinde western blot analizi ile gösterildi.

MiaPaca-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulduğu hücrelerde Beklin-1 mRNA seviyesi kontrol grubundan kıyasla artış göstermektedir. Aynı şekilde western blot analizleri Beklin-1 protein seviyesindeki artışı doğruladı. MiaPaca-2 normoksiyada LC3 mRNA'sı CA9 geni susturulan hücrelerde daha belirgin olmak üzere kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış gösterdi. Bu artış yine western blot analizi ile protein düzeyinde doğrulandı. MiaPaca-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında ATG5 mRNA düzeyinde hem CA9 hem de TSPAN8 susturulan hücrelerde arttı. Bu artış CA9 geni susturulmuş olan hücrelerde ATG3 geni içinde izlenmektedir.

MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullar altında TSPAN8 geni susturulmuş olan hücrelerde Beklin-1 seviyesi hem mRNA hem de protein düzeyinde kontrol grubuna göre arttı. LC3 mRNA seviyesinde TSPAN8 geni susturulan hücrelerde belirlenen artış, protein düzeyinde hem CA9 hem de TSPAN8 susturulmuş olan hücrelerde izlenmiştir. MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksik koşullarda mRNA düzeyinde analiz edilen ATG3 ve ATG5 genlerinin ekspresyon seviyesinin özellikle TSPAN8 susturulan hücrelerde artış gösterdiği bulundu.

Sonuç olarak, CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının Panc-1 ve MiaPaca-2 hücrelerinde hem normal oksijen koşullarında hem de hipoksiyada otofaji ile

ilişkilendirilmesi amacıyla hem qRT-PCR analizleriyle mRNA seviyesinde, hem de western blot analizi ile protein seviyesinde incelendi. Buna göre genel anlamda hipoksik koşullarda hücre ölümünde otofajik yolağın devreye girdiği görülmektedir. MiaPaca-2 hücrelerinin Panc-1 hücrelerine göre otofajik cevabı daha net gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle TSPAN8 geni susturulan hücrelerdeki otofajik daha belirgindir.

Hipoksik koşullarda MiaPaca-2 hücreleri ile yapılan çalışmada, metastazı baskılayan genlerden olan ve tetraspanin ailesinin üyesi KAI1/CD82 (TSPAN 27) ekspresyonunun arttığı ve hücrelerin metastaz yeteneklerinin azalmasına rağmen primer tumor oluşturma yeteneklerinin bu durumdan etkilenmediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada MiaPaca-2 hücrelerinde hipoksiya ile otofajinin de uyarıldığı gösterilmiştir [265].

Apoptozun baskılandığı ve hücrenin apoptotik olarak ölmesi mümkün olmayan durumlarda hücreler otofajik ölüm yolunu tercih edebilirler [266]. Bunun dışında otofaji; apoptoza paralel olarak hücre ölümüne yol açabilir, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptoz için bir ön koşul olabilir [267]. Apoptoz ve otofajinin birlikte çalıştığını gösteren çalışmalar vardır. Bunlardan ilki arsenik tiroksit ile muamele edilen T-lenfosit lösemisinde hem apoptotik hem de otofajik yolak aktive olarak hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir [268]. Yine İmatinib ile tedavi edilen Kaposi sarkomasında ve MG132 adlı proteozom inhibitörü ile muamele edilen PC3 prostat kanser hücrelerinde ölümün apoptoz ve otofaji ile gerçekleştiği gösterilmiştir [269].

Kanserde birçok farklı mekanizma olması nedeniyle, kanserin ilaca direncinin üstesinden gelmek ve apoptozu arttırmak için kombinasyon terapisi giderek daha önemli hale gelmektedir. siRNA ile antikanser ilaçların birlikte verilmesi, siRNA ile antikanser ilaçlarının aynı anda, kanser hücresi popülasyonuna aktarılmasını sağlar, böylelikle sinerjistik etkiler oluştururlar [270].

CA9 ve TSPAN8 siRNA'larının cisplatin ve epirubicin kemoterapi ajanları ile beraber etkisini araştırdığımızda yaptığımız çalışmada kemoterapi ajanı ile siRNA'nın etkisini görebilmek için 50 nM siRNA kullanıldı. 50 nM siRNA'nın sitotoksitesisi MTT yöntemi ile tespit edildi ve 48 saat sonunda siRNA uygulanan grupların proliferasyonunda azalma meydana geldi. Pankreatik kanser hücre hatlarında cisplatin uygulamasının bazı ilaçların inaktivasyonu, DNA hasarıyla ve apoptoz modülasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [271]. Doksorubisinin analogu olan epirubisin (4'-epidoksorubisin), DNA topoizomera II'nin inhibitörüdür, tek başına veya çeşitli malignitelerin tedavisinde diğer sitotoksik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır [272].

Beh ve arkadaşları, Bcl-2 siRNA ve paklitaksel kombinasyonu sonucu, Bcl-2'nin susturulmasının HeLa hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirdiğini ve bunun, NT hücrelerle karşılaştırıldığında bir HeLa hücresinde hücre proliferasyonunda önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu bulmuştur [273].

TSPAN8 veya CA9'un siRNA ile cisplatinin Panc-1 hücrelerinde beraber uygulanması sonrası, hücrelerin sadece cisplatin uygulanan hücelere kıyasla % 50'den fazla oranda proliferasyonu azaldı. Bu etki, MiaPaca-2 hücrelerinde, cisplatin ile CA9 siRNA'sı uygulandığında tespit edilememiştir. Benzer şekilde, epirubisin ile siRNA'yı hedefleyen TSPAN8 tedavisi de sadece epirubisin ile tedavi edilen hücelere kıyasla hücre canlılığının azalmasına neden olmadı.

Whitehurst ve arkadaşları hedeflenen genin susturulmasının, akciğer kanseri hücrelerini paklitaksel konsantrasyonuna duyarlı bir yanıt için gerekli olan dozdan çok daha düşük dozlarda duyarlı hale getirdiğini bulmuşlardır. Bu araştırmacılar ayrıca hücre sayısındaki azalmanın hücre ölümüne dayandığını ortaya koymuştur [274]. Ayrıca, çoklu ilaç taşıyıcısı (MDR1) hedefleyen siRNA uygulamalarının hücrelerin ilaç direncini azaltmak için *in vitro* olarak kullanılmıştır [275].

MCF-7 hücreleri ve SKBR-3 hücrelerine 50 nM IKKε siRNA transfekte edilmiş ve ardından farklı konsantrasyonlarda cisplatin veya doksorubisin ile inkübasyon yapılmış. IKKε susturulan, MCF-7 ve SKBR-3 hücrelerinde cisplatin ve doksorubisine karşı duyarlılığının değişmediği görülmüş [276]. A2780CP ve C13 hücrelerinde yapılan çalışmada ise IKKε'nin susturulması hücreleri cisplatine karşı duyarlı hale getirirken IKKε'nin overekspresyonu hücreleri cisplatin'e dirençli hale getirmiştir [277].

Kanser tedavisi için RNAi'nin bir avantajı, potansiyel olarak yabancı tip aleli etkilemeden bir hastalık allelini potansiyel olarak susturmak ve böylece tümöre özgü terapiye ulaşmaktır. Hastalık gelişiminde yer alan çoklu hedefler, hayvan modellerinde siRNA ile anti-tümör aktivitesi için test edilmiştir. Raf-1 ve Bcl-2 gibi hücre proliferasyonunu ve apoptozunu düzenleyen genler, sentetik siRNA ile susturulduğunda, tümör büyümesinin azalmasına yol açtığı görülmüştür [278, 279]. Bununla beraber, VEGF'nin veya CXCR4'ün RNAi aracılı susturulması, tümör büyümesini veya metastazını önlediği gösterilmiştir [280, 281].

Nude fareler *in vivo* deney modeli olarak kullanılan bağışıklık sistemi baskılanmış tüysüz kemirgenlerdir [282]. Nude fareler immünoloji, patoloji, genetik, viroloji, parazitoloji, dermatoloji, diabetes ve endokrinoloji gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

Ayrıca kanser araştırmalarında tümörün gelişimi, büyümesi, metastas özelliği ve tedavisi konusunda nude fareler en iyi model organizmalardır [283].

CD-1 nude farelerde insan Panc-1 hücreleri kullanılarak oluşturulan tümörün tedavi edilmesi amacıyla CA9 ve TSPAN8 siRNA'ları kullanıldı. Panc-1 hücreleri subcutan yöntemle farelere uygulandıktan 4 hafta sonra tümör oluşumu görüldü. Liposomal hale getirilip liyofilize edilen siRNA'lar (kontrol siRNA, CA9 siRNA ve TSPAN8 siRNA) 4 hafta süresince haftada iki kez kuyruk veninden 150mg/kg olacak şekilde enjekte edildi. Bu sırada pozitif kontrol olarak bir grup fareye de gemcitabine verildi. Çalışmamız sonucunda sakrifiye edilen hayvanlardan elde edilen tümörler incelendiğinde TSPAN8 siRNA uygulanan gruptaki hayvanlarda tümör büyüklüğünde anlamlı bir küçülme olduğu belirlendi. CA9 ve TSPAN8 hedef genlerinin tümör dokusundaki ekspresyonları mRNA analizleri ile gösterildi. Buna göre kontrol grubu ve Kontrol siRNA uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında, liposomal CA9 siRNA uygulanan gruptan elde edilen tümörlerdeki CA9 mRNA seviyesi anlamlı şekilde az bulundu. Benzer olarak TSPAN8 siRNA uygulanan gruptaki TSPAN8 mRNA seviyesinin de az olduğu gösterildi. İmmunohistokimyasal analizler ile tümör dokularındaki tümör hücrelerinin varlığı doğrulanarak, özellikle TSPAN8 siRNA uygulanan gruptaki deneklerden elde edilen tümörlerin histolojik incelemesinde bağ dokusunda bir artış gözlemlendi. Aynı şekilde TSPAN8 siRNA uygulanan gruptaki ve CA9 siRNA uygulanan gruptaki tümör dokularındaki apoptotik hücrelerdeki artış TUNEL analizleriyle gösterildi. Tümör dokusunda Kaspaz 8, Kaspaz 9, Galektin3 ve Bcl-2 protein seviyesindeki değişimler ELİSA analizleriyle gösterildi.

İnsan böbrek kanser hücre hattı kullanılarak oluşturulan xenograft fare tümör modelinde, kontrol grubunda (kontrol shRNA) meydana gelen tümör büyüklükleri ile shRNA ile CA9 geni susturulmuş hücrelerin verildiği deneklerde oluşan tümör büyüklükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı, ancak bu farelere radyasyon terapisi verildiğinde CA9 geni susturulan farelerin tümör boyutunun kontrol grubuna göre %78,7 oranında küçüldüğü belirlenmiştir [177].

Bir diğer çalışmada CA9 knockout farelerle çalışılmıştır. Bu araştırmada knockout olan farelerde ve embriyolarında normal olmayan bir büyüme, davranışsal farklılık, üremelerinde azalma ya da yaşam sürelerinde bir değişim gözlenmemiştir. Bunun yerine CA9'un normal hücrelerde fizyolojik olarak gerekli olduğu gastrik epitelyal hücrelerinde beklenileceği gibi hiperplazi görülmüştür [284]. Bu sonuçlar gastrik epitelyumun morfogenezisi ve dinamik homeostasinin koordinasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir.

CA9'un direkt ya da indirekt olarak beyin için yeni bir fonksiyonu olabileceği öne sürülmüş olan çalışmada yine CA9 knock-out fareler kullanılmıştır. Çalışmada bir yıl boyunca takip edilen Car9-/- ve yabancı tipteki fareler karşılaştırılmıştır. Morfolojik analizlerde Car9-/- olan farelerde vakuoler dejeneratif değişim olduğu görülmüştür. Fareler davranışsal olarak incelendiğinde Car9-/- olan farelerde anormal lokomotif aktivitesi ve hafıza testinde zayıf performans göstermişlerdir. [285].

İnsan karaciğer kanser hücreleriyle bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde oluşturulan orthotopik tümör modelinde kanser hücrelerine kalıcı olarak TSPAN8 geni transfekte edilmiştir. TSPAN8 over ekspresyonu olan gruplarda tümörün karaciğer içine metastası tespit edilmiştir [193]. Bir diğer çalışmada HT29 hücre hattı kullanılarak oluşturulan tümörün tedavisinde TSPAN8 spesifik monoklonal antikor kullanıldığı ve tümörün küçüldüğü gösterilmiştir [214].

Gastrointestinal kanserlerde yüksek ekspresyon seviyesi gösterilen TSPAN8, tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu kanserlerde biyobelirteç olarak gösterilmektedir. Tümör ilişkili TSPAN8 geninin ekspresyonunun regülasyonu ile ilgili ilk çalışma 2016 yılında Sarkar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada TSPAN8'in metastaz ve invazyona neden olduğu bilinen AEG-1 gen ekspresyonu üzerinde önemli bir role sahip olduğu savunulmuş ve bu mekanizmayı aydınlatmak amaçlanmıştır [226].

CA9 ekspresyonunun tümör büyüklüğü ile ilişkili olduğu servikal ve ağız kanserlerinde gösterilmiştir. Hastalardaki tümör büyüklüğü arttıkça CA9 ekspresyon seviyesinin arttığı görülmüştür [286, 287].

Sonuç olarak, pankreas kanseri hücre hatlarında CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının hücrelerin yaşamsal özelliklerinde değişikliğe sebep olduğu, özellikle hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu azalttığı belirlenmiştir. CA9 ve TSPAN8 genlerinin susturulmasının hücrelerde apoptotik ve otofajik yollarda görevli proteinlerde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. Panc-1 hücreleri kullanılarak oluşturulan xenograft tümörlerde liposomal olarak verilen TSPAN8 siRNA uygulamasının tümörün küçülmesine sebep olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak CA9 ve TSPAN8 genlerinin pankreas kanserinin tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Bray, F. and Moller, B. "Predicting the future burden of cancer." *Nat Rev Cancer*. 6(1), 63-74,(2006).
- [2] You, W. and Henneberg, M. "Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection." *Evol Appl*. 11(2), 140-152,(2018).
- [3] Sigerist, H.E. "The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer." *Bull N Y Acad Med*. 8(11), 642-53,(1932).
- [4] Virchow, R. "Reizung und Reizbarkeit." *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*. 14(1), 1-63,(1858).
- [5] Epps, H.L.V. "Peyton Rous: father of the tumor virus." *J Exp Med*. 201(3), 320,(2005).
- [6] Fujiki, H. "Gist of Dr. Katsusaburo Yamagiwa's papers entitled "Experimental study on the pathogenesis of epithelial tumors" (I to VI reports)." *Cancer Sci*. 105(2), 143-9,(2014).
- [7] Kyle, R.A. and Shampo, M.A. "Wilkins, Crick, and Watson: Nobel Prize for work on the structure of DNA." *Mayo Clin Proc*. 73(4), 362,(1998).
- [8] Sudhakar, A. "History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods." *J Cancer Sci Ther*. 1(2), 1-4,(2009).
- [9] Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med*. 10(8), 789-99,(2004).
- [10] Kopnin, B.P. "Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis." *Biochemistry (Mosc)*. 65(1), 2-27,(2000).
- [11] Lee, E.Y. and Muller, W.J. "Oncogenes and tumor suppressor genes." *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(10), a003236,(2010).
- [12] Berger, A.H., Knudson, A.G., and Pandolfi, P.P. "A continuum model for tumour suppression." *Nature*. 476(7359), 163-9,(2011).

- [13] Ferrara, N., et al. "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer." *Nat Rev Drug Discov.* 3(5), 391-400,(2004).
- [14] Ferrara, N., Hillan, K.J., and Novotny, W. "Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy." *Biochem Biophys Res Commun.* 333(2), 328-35,(2005).
- [15] Lunt, S.Y. and Vander Heiden, M.G. "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation." *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27, 441-64,(2011).
- [16] Ortega, A.D., et al. "Glucose avidity of carcinomas." *Cancer Lett.* 276(2), 125-35,(2009).
- [17] Bui, T. and Thompson, C.B. "Cancer's sweet tooth." *Cancer Cell.* 9(6), 419-20,(2006).
- [18] Shaw, R.J. "Glucose metabolism and cancer." *Curr Opin Cell Biol.* 18(6), 598-608,(2006).
- [19] Semenza, G.L. "Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis." *IUBMB Life.* 60(9), 591-7,(2008).
- [20] Baba AI, C.C., *Chapter 2, CARCINOGENESIS.* , in *Comparative Oncology.*2007, The Publishing House of the Romanian Academy: Bucharest.
- [21] Paduch, R. "Theories of cancer origin." *Eur J Cancer Prev.* 24(1), 57-67,(2015).
- [22] Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. "Rules for making human tumor cells." *N Engl J Med.* 347(20), 1593-603,(2002).
- [23] Mucaj, V., Shay, J.E., and Simon, M.C. "Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism." *Int J Hematol.* 95(5), 464-70,(2012).
- [24] Masoud, G.N. and Li, W. "HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy." *Acta Pharm Sin B.* 5(5), 378-89,(2015).
- [25] Wigerup, C., Pahlman, S., and Bexell, D. "Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer." *Pharmacol Ther.* 164, 152-69,(2016).

- [26] Guo, G., et al. "Local Activation of p53 in the Tumor Microenvironment Overcomes Immune Suppression and Enhances Antitumor Immunity." *Cancer Res.* 77(9), 2292-2305,(2017).
- [27] Finley, S.D. and Popel, A.S. "Effect of tumor microenvironment on tumor VEGF during anti-VEGF treatment: systems biology predictions." *J Natl Cancer Inst.* 105(11), 802-11,(2013).
- [28] Cui, Y. and Guo, G. "Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment." *Int J Mol Sci.* 17(11),(2016).
- [29] Seyfried, T.N. and Huysentruyt, L.C. "On the origin of cancer metastasis." *Crit Rev Oncog.* 18(1-2), 43-73,(2013).
- [30] Wai Wong, C., Dye, D.E., and Coombe, D.R. "The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis." *Int J Cell Biol.* 2012, 340296,(2012).
- [31] Agaesse, G., et al. "p53 targets TSPAN8 to prevent invasion in melanoma cells." *Oncogenesis.* 6(4), e309,(2017).
- [32] Chan, A.O. "E-cadherin in gastric cancer." *World J Gastroenterol.* 12(2), 199-203,(2006).
- [33] Singhai, R., et al. "E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer." *N Am J Med Sci.* 3(5), 227-33,(2011).
- [34] St Hill, C.A. "Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis." *Front Biosci (Landmark Ed).* 16, 3233-51,(2011).
- [35] van Roy, F. "Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer." *Nat Rev Cancer.* 14(2), 121-34,(2014).
- [36] Lecuit, T. and Yap, A.S. "E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics." *Nat Cell Biol.* 17(5), 533-9,(2015).
- [37] Bruner, H.C. and Derksen, P.W.B. "Loss of E-Cadherin-Dependent Cell-Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10(3),(2018).

- [38] Tran Cao, H.S., et al. "Real-time imaging of tumor progression in a fluorescent orthotopic mouse model of thyroid cancer." *Anticancer Research*. 30(11), 4415-22,(2010).
- [39] Aki, R., et al. "Color-coded fluorescence imaging of lymph-node metastasis, angiogenesis, and its drug-induced inhibition." *Journal of Cellular Biochemistry*. 115(3), 457-63,(2014).
- [40] Welch, D.R. "Microarrays bring new insights into understanding of breast cancer metastasis to bone." *Breast Cancer Res*. 6(2), 61-4,(2004).
- [41] Reyes, I., et al. "DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines." *Biomedica*. 27(2), 190-203,(2007).
- [42] Chen, S., et al. "Exploration of the mechanism of colorectal cancer metastasis using microarray analysis." *Oncol Lett*. 14(6), 6671-6677,(2017).
- [43] Wang, W., et al. "Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis." *Br J Cancer*. 90(12), 2349-55,(2004).
- [44] Wu, M., et al. "RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells." *Breast Cancer Res Treat*. 84(1), 3-12,(2004).
- [45] Wang, W., et al. "Identification of gene expression profiling in hepatocellular carcinoma using cDNA microarrays." *Dig Dis Sci*. 54(12), 2729-35,(2009).
- [46] Mohamed, M.M., et al. "Inflammatory breast cancer: New factors contribute to disease etiology: A review." *J Adv Res*. 5(5), 525-36,(2014).
- [47] Alberts B, J.A., Lewis J, et al, *The Molecular Basis of Cancer-Cell Behavior*, in *Molecular Biology of the Cell*2002, Garland Science: New York.
- [48] Nalwoga, H., et al. "Strong Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha) Is Associated with Axl Expression and Features of Aggressive Tumors in African Breast Cancer." *PLoS One*. 11(1), e0146823,(2016).
- [49] Koyasu, S., et al. "Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge." *Cancer Sci*. 109(3), 560-571,(2018).

- [50] Zhang, J. and Zhang, Q. "VHL and Hypoxia Signaling: Beyond HIF in Cancer." *Biomedicines*. 6(1),(2018).
- [51] Bao, B., et al. "The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness." *Biochim Biophys Acta*. 1826(2), 272-96,(2012).
- [52] Jaakkola, P., et al. "Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation." *Science*. 292(5516), 468-72,(2001).
- [53] Sedlakova, O., et al. "Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors." *Front Physiol*. 4, 400,(2014).
- [54] Supuran, C.T., et al. "Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one." *Med Res Rev*,(2018).
- [55] Tang, C., et al. "Montelukast inhibits hypoxia inducible factor-1 α translation in prostate cancer cells." *Cancer Biol Ther*, 1-7,(2018).
- [56] Raykhel, I., et al. "BAMBI is a novel HIF1-dependent modulator of TGF β -mediated disruption of cell polarity in hypoxia." *J Cell Sci*,(2018).
- [57] Yang, M.H., et al. "Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis." *Nat Cell Biol*. 10(3), 295-305,(2008).
- [58] Cannito, S., et al. "Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells." *Carcinogenesis*. 29(12), 2267-78,(2008).
- [59] Krishnamachary, B., et al. "Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B." *Cancer Res*. 66(5), 2725-31,(2006).
- [60] Koshiji, M., et al. "HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression." *Mol Cell*. 17(6), 793-803,(2005).
- [61] Schwartz, D.L., et al. "The selective hypoxia inducible factor-1 inhibitor PX-478 provides in vivo radiosensitization through tumor stromal effects." *Mol Cancer Ther*. 8(4), 947-58,(2009).

- [62] Chen, C. and Yu, Z. "siRNA targeting HIF-1alpha induces apoptosis of pancreatic cancer cells through NF-kappaB-independent and -dependent pathways under hypoxic conditions." *Anticancer Research*. 29(4), 1367-72,(2009).
- [63] Pittman, M.E., Rao, R., and Hruban, R.H. "Classification, Morphology, Molecular Pathogenesis, and Outcome of Premalignant Lesions of the Pancreas." *Arch Pathol Lab Med*. 141(12), 1606-1614,(2017).
- [64] Chandra, R. and Liddle, R.A. "Recent advances in pancreatic endocrine and exocrine secretion." *Curr Opin Gastroenterol*. 27(5), 439-43,(2011).
- [65] Cesmebasi, A., et al. "The surgical anatomy of the lymphatic system of the pancreas." *Clin Anat*. 28(4), 527-37,(2015).
- [66] Martini F, N.J., Bartholomew EF., *Fundamentals of Anatomy & Physiology*2017, Boston, MA: Pearson.
- [67] Bastidas-Ponce, A., et al. "Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development." *Development*. 144(16), 2873-2888,(2017).
- [68] Gorelick FS, J.J., *The pancreatic acinar cell: structure-function relationships.*, in *Physiology of the Gastrointestinal Tract.*, A.D. Johnson L, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH., Editor 1994, NY: Raven Press: New York. p. 1343-1366.
- [69] Chandra, R. and Liddle, R.A. "Modulation of pancreatic exocrine and endocrine secretion." *Curr Opin Gastroenterol*. 29(5), 517-22,(2013).
- [70] Chamokova, B., et al. "The clinical value of secretin-enhanced MRCP in the functional and morphological assessment of pancreatic diseases." *Br J Radiol*. 91(1084), 20170677,(2018).
- [71] Fieker, A., Philpott, J., and Armand, M. "Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future." *Clin Exp Gastroenterol*. 4, 55-73,(2011).
- [72] Berry, A.J. "Pancreatic enzyme replacement therapy during pancreatic insufficiency." *Nutr Clin Pract*. 29(3), 312-21,(2014).
- [73] Cubilla, A.L. and Fitzgerald, P.J. "Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer." *Cancer Res*. 36(7 PT 2), 2690-8,(1976).

- [74] Hruban, R.H., et al. "Progression model for pancreatic cancer." *Clin Cancer Res.* 6(8), 2969-72,(2000).
- [75] Raimondi, S., et al. "Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection." *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 24(3), 349-58,(2010).
- [76] Wormann, S.M. and Algul, H. "Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer." *Front Oncol.* 3, 282,(2013).
- [77] Bosetti, C., et al. "Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology." *Mol Carcinog.* 51(1), 3-13,(2012).
- [78] Vaccaro, V., et al. "Molecular and genetic bases of pancreatic cancer." *Curr Drug Targets.* 13(6), 731-43,(2012).
- [79] Grant, T.J., Hua, K., and Singh, A. "Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer." *Prog Mol Biol Transl Sci.* 144, 241-275,(2016).
- [80] Kamisawa, T., et al. "Pancreatic cancer." *The Lancet.* 388(10039), 73-85,(2016).
- [81] Andren-Sandberg, A. "Tumors of the body and tail of the pancreas." *N Am J Med Sci.* 3(11), 489-94,(2011).
- [82] Iovanna, J., et al. "Current knowledge on pancreatic cancer." *Front Oncol.* 2, 6,(2012).
- [83] Kang, R. and Tang, D. "Autophagy in pancreatic cancer pathogenesis and treatment." *Am J Cancer Res.* 2(4), 383-96,(2012).
- [84] Mann, K.M., et al. "KRAS-related proteins in pancreatic cancer." *Pharmacol Ther.* 168, 29-42,(2016).
- [85] Guerra, C. and Barbacid, M. "Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma." *Mol Oncol.* 7(2), 232-47,(2013).
- [86] Bachem, M.G., et al. "Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells." *Gastroenterology.* 128(4), 907-21,(2005).
- [87] Korc, M. "Pancreatic cancer-associated stroma production." *Am J Surg.* 194(4 Suppl), S84-6,(2007).

- [88] Bayne, L.J., et al. "Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer." *Cancer Cell*. 21(6), 822-35,(2012).
- [89] Xie, D. and Xie, K. "Pancreatic cancer stromal biology and therapy." *Genes Dis*. 2(2), 133-143,(2015).
- [90] Collins, M.A., et al. "Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice." *J Clin Invest*. 122(2), 639-53,(2012).
- [91] Ying, H., et al. "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Genes Dev*. 30(4), 355-85,(2016).
- [92] Bailey, P., et al. "Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer." *Nature*. 531(7592), 47-52,(2016).
- [93] Hezel, A.F., et al. "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Genes Dev*. 20(10), 1218-49,(2006).
- [94] Jones, S., et al. "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses." *Science*. 321(5897), 1801-6,(2008).
- [95] Bryant, K.L., et al. "KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation." *Trends Biochem Sci*. 39(2), 91-100,(2014).
- [96] Kubuschok, B., et al. "Naturally occurring T-cell response against mutated p21 ras oncoprotein in pancreatic cancer." *Clin Cancer Res*. 12(4), 1365-72,(2006).
- [97] Lemstrova, R., et al. "Dysregulation of KRAS signaling in pancreatic cancer is not associated with KRAS mutations and outcome." *Oncol Lett*. 14(5), 5980-5988,(2017).
- [98] Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., and Bar-Sagi, D. "RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web." *Nat Rev Cancer*. 11(11), 761-74,(2011).
- [99] Eser, S., et al. "Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer." *Br J Cancer*. 111(5), 817-22,(2014).
- [100] Clark, C.E., Beatty, G.L., and Vonderheide, R.H. "Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: insights from genetically engineered mouse models of cancer." *Cancer Lett*. 279(1), 1-7,(2009).

- [101] Weijzen, S., Velders, M.P., and Kast, W.M. "Modulation of the immune response and tumor growth by activated Ras." *Leukemia*. 13(4), 502-13,(1999).
- [102] Jones, P.H., Bishop, L.A., and Watt, F.M. "Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes." *Cell Adhes Commun*. 4(4-5), 297-305,(1996).
- [103] Calhoun, E.S., et al. "BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets." *Am J Pathol*. 163(4), 1255-60,(2003).
- [104] Bournet, B., et al. "Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities." *Eur J Cancer*. 54, 75-83,(2016).
- [105] Ingham, P.W. and McMahon, A.P. "Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles." *Genes Dev*. 15(23), 3059-87,(2001).
- [106] Lau, J., Kawahira, H., and Hebrok, M. "Hedgehog signaling in pancreas development and disease." *Cell Mol Life Sci*. 63(6), 642-52,(2006).
- [107] Levy, L. and Hill, C.S. "Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF- β) target genes and distinguishes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses." *Mol Cell Biol*. 25(18), 8108-25,(2005).
- [108] Morris, J.P.t., Wang, S.C., and Hebrok, M. "KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Nat Rev Cancer*. 10(10), 683-95,(2010).
- [109] Lauth, M. and Toftgard, R. "Hedgehog signaling and pancreatic tumor development." *Adv Cancer Res*. 110, 1-17,(2011).
- [110] Hidalgo, M., et al. "A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer." *Mol Cancer Ther*. 10(8), 1311-6,(2011).
- [111] Gao, D. and Chen, Y. "Organoid development in cancer genome discovery." *Curr Opin Genet Dev*. 30, 42-8,(2015).
- [112] Hidalgo, M., et al. "Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research." *Cancer Discov*. 4(9), 998-1013,(2014).

- [113] Ding, Y., et al. "Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice." *Pancreas*. 39(3), 283-92,(2010).
- [114] Grippo, P.J. and Sandgren, E.P. "Modeling pancreatic cancer in animals to address specific hypotheses." *Methods Mol Med*. 103, 217-43,(2005).
- [115] Bardeesy, N., et al. "The genetics of pancreatic adenocarcinoma: a roadmap for a mouse model." *Semin Cancer Biol*. 11(3), 201-18,(2001).
- [116] Bardeesy, N. and DePinho, R.A. "Pancreatic cancer biology and genetics." *Nat Rev Cancer*. 2(12), 897-909,(2002).
- [117] Freeman, J.W., Mattingly, C.A., and Strodel, W.E. "Increased tumorigenicity in the human pancreatic cell line MIA PaCa-2 is associated with an aberrant regulation of an IGF-1 autocrine loop and lack of expression of the TGF-beta type RII receptor." *J Cell Physiol*. 165(1), 155-63,(1995).
- [118] Miknyoczki, S.J., et al. "The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma." *Clin Cancer Res*. 5(8), 2205-12,(1999).
- [119] Aubert, M., et al. "Decrease of human pancreatic cancer cell tumorigenicity by alpha1,3galactosyltransferase gene transfer." *Int J Cancer*. 107(6), 910-8,(2003).
- [120] Tentler, J.J., et al. "Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development." *Nat Rev Clin Oncol*. 9(6), 338-50,(2012).
- [121] Supuran, C.T., Di Fiore, A., and De Simone, G. "Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity." *Expert Opin Emerg Drugs*. 13(2), 383-92,(2008).
- [122] McDonald, P.C., et al. "Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics." *Oncotarget*. 3(1), 84-97,(2012).
- [123] Ward, C., et al. "New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer." *Cancer Treat Rev*. 39(2), 171-9,(2013).
- [124] Hilvo, M., et al. "Recent advances in research on the most novel carbonic anhydrases, CA XIII and XV." *Curr Pharm Des*. 14(7), 672-8,(2008).

- [125] Winum, J.Y., Colinas, P.A., and Supuran, C.T. "Glycosidic carbonic anhydrase IX inhibitors: a sweet approach against cancer." *Bioorg Med Chem.* 21(6), 1419-26,(2013).
- [126] Aspatwar, A., Tolvanen, M.E., and Parkkila, S. "Phylogeny and expression of carbonic anhydrase-related proteins." *BMC Mol Biol.* 11, 25,(2010).
- [127] Gilmour, K.M. "Perspectives on carbonic anhydrase." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 157(3), 193-7,(2010).
- [128] Swenson, E.R. "Respiratory and renal roles of carbonic anhydrase in gas exchange and acid-base regulation." *EXS*, (90), 281-341,(2000).
- [129] Chiang, W.L., et al. "Alternations in quantities and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient individuals." *Clin Chim Acta.* 314(1-2), 195-201,(2001).
- [130] Kuo, W.H., et al. "Differential expression of carbonic anhydrase isoenzymes in various types of anemia." *Clin Chim Acta.* 351(1-2), 79-86,(2005).
- [131] Carter, N.D., *Hormonal and Neuronal Control of Carbonic Anhydrase III Gene Expression in Skeletal Muscle*, in *The Carbonic Anhydrases* T.R.E. Dodgson S.J., Gros G., Carter N.D., Editor 1991, Springer: Boston, MA.
- [132] Chai, Y.C., et al. "Identification of an abundant S-thiolated rat liver protein as carbonic anhydrase III; characterization of S-thiolation and dethiolation reactions." *Arch Biochem Biophys.* 284(2), 270-8,(1991).
- [133] Raisanen, S.R., et al. "Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis." *FASEB J.* 13(3), 513-22,(1999).
- [134] Thomas, J.A. and Mallis, R.J. "Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls." *Exp Gerontol.* 36(9), 1519-26,(2001).
- [135] Kim, G., et al. "Carbonic anhydrase III is not required in the mouse for normal growth, development, and life span." *Mol Cell Biol.* 24(22), 9942-7,(2004).
- [136] Liu, M., et al. "A quantitative study of bioenergetics in skeletal muscle lacking carbonic anhydrase III using ³¹P magnetic resonance spectroscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(1), 371-6,(2007).

- [137] Pilipuityte, V. and Matulis, D. "Intrinsic thermodynamics of trifluoromethanesulfonamide and ethoxzolamide binding to human carbonic anhydrase VII." *J Mol Recognit.* 28(3), 166-72,(2015).
- [138] Supuran, C.T. "Carbonic anhydrase inhibition and the management of neuropathic pain." *Expert Rev Neurother.* 16(8), 961-8,(2016).
- [139] Bruno, E., et al. "In Vivo Evaluation of Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors as Potential Anticonvulsant Agents." *ChemMedChem.* 11(16), 1812-8,(2016).
- [140] Ruusuvoori, E., et al. "Carbonic anhydrase isoform VII acts as a molecular switch in the development of synchronous gamma-frequency firing of hippocampal CA1 pyramidal cells." *J Neurosci.* 24(11), 2699-707,(2004).
- [141] Asiedu, M., et al. "Acetazolamide and midazolam act synergistically to inhibit neuropathic pain." *Pain.* 148(2), 302-8,(2010).
- [142] Supuran, C.T. "Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity." *Expert Opin Emerg Drugs.* 17(1), 11-5,(2012).
- [143] Picard, F., et al. "Topiramate reduces energy and fat gains in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats." *Obes Res.* 8(9), 656-63,(2000).
- [144] Leinonen, J., et al. "Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle." *Caries Res.* 33(3), 185-90,(1999).
- [145] Parkkila, S., Parkkila, A.K., and Rajaniemi, H. "Circadian periodicity in salivary carbonic anhydrase VI concentration." *Acta Physiol Scand.* 154(2), 205-11,(1995).
- [146] Sengul, F., et al. "Carbonic Anhydrase VI Gene Polymorphism rs2274327 Relationship Between Salivary Parameters and Dental-Oral Health Status in Children." *Biochem Genet.* 54(4), 467-475,(2016).
- [147] Borghi, G.N., et al. "Relationship among alpha amylase and carbonic anhydrase VI in saliva, visible biofilm, and early childhood caries: a longitudinal study." *Int J Paediatr Dent.* 27(3), 174-182,(2017).
- [148] Waheed, A. and Sly, W.S. "Carbonic anhydrase XII functions in health and disease." *Gene.* 623, 33-40,(2017).

- [149] Sender, S., et al. "Localization of carbonic anhydrase IV in rat and human heart muscle." *J Histochem Cytochem.* 46(7), 855-61,(1998).
- [150] Wistrand, P.J., et al. "Carbonic anhydrase IV activity is localized on the exterior surface of human erythrocytes." *Acta Physiol Scand.* 165(2), 211-8,(1999).
- [151] Ogilvie, J.M., et al. "Carbonic anhydrase XIV deficiency produces a functional defect in the retinal light response." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(20), 8514-9,(2007).
- [152] Parkkila, S., et al. "Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors." *J Histochem Cytochem.* 48(12), 1601-8,(2000).
- [153] Parkkila, S., et al. "Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cancer cells in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(5), 2220-4,(2000).
- [154] Yoo, C.W., et al. "Carbonic anhydrase XII expression is associated with histologic grade of cervical cancer and superior radiotherapy outcome." *Radiat Oncol.* 5, 101,(2010).
- [155] Ilie, M.I., et al. "Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis." *Int J Cancer.* 128(7), 1614-23,(2011).
- [156] Watson, P.H., et al. "Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma." *Br J Cancer.* 88(7), 1065-70,(2003).
- [157] Barnett, D.H., et al. "Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer." *Cancer Res.* 68(9), 3505-15,(2008).
- [158] Hsieh, M.J., et al. "Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway." *Eur J Cell Biol.* 89(8), 598-606,(2010).
- [159] Zavada, J. and Zavadova, Z. "An unusual transmissible agent--MaTu." *Arch Virol.* 118(3-4), 189-97,(1991).
- [160] Opavsky, R., et al. "Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships." *Genomics.* 33(3), 480-7,(1996).

- [161] Pastorek, J., et al. "Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment." *Oncogene*. 9(10), 2877-88,(1994).
- [162] Hilvo, M., et al. "Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes." *J Biol Chem*. 283(41), 27799-809,(2008).
- [163] Innocenti, A., et al. "The proteoglycan region of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX acts as an intrinsic buffer optimizing CO₂ hydration at acidic pH values characteristic of solid tumors." *Bioorg Med Chem Lett*. 19(20), 5825-8,(2009).
- [164] Zavadova, Z. and Zavada, J. "Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment." *Oncol Rep*. 13(5), 977-82,(2005).
- [165] Ilardi, G., et al. "Histopathological determinants of tumor resistance: a special look to the immunohistochemical expression of carbonic anhydrase IX in human cancers." *Curr Med Chem*. 21(14), 1569-82,(2014).
- [166] Pastorekova, S., et al. "Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts." *Gastroenterology*. 112(2), 398-408,(1997).
- [167] Brockton, N.T., et al. "High stromal carbonic anhydrase IX expression is associated with nodal metastasis and decreased survival in patients with surgically-treated oral cavity squamous cell carcinoma." *Oral Oncol*. 48(7), 615-22,(2012).
- [168] Fiaschi, T., et al. "Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells." *Cell Cycle*. 12(11), 1791-801,(2013).
- [169] Kalavska, K., et al. "Prognostic value of intratumoral carbonic anhydrase IX expression in testicular germ cell tumors." *Oncol Lett*. 13(4), 2177-2185,(2017).
- [170] Saenz-de-Santa-Maria, I., et al. "Clinically relevant HIF-1alpha-dependent metabolic reprogramming in oropharyngeal squamous cell carcinomas includes coordinated activation of CAIX and the miR-210/ISCU signaling axis, but not MCT1 and MCT4 upregulation." *Oncotarget*. 8(8), 13730-13746,(2017).

- [171] Morgan, P.E., et al. "Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters." *Am J Physiol Cell Physiol.* 293(2), C738-48,(2007).
- [172] Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science.* 324(5930), 1029-33,(2009).
- [173] Liberti, M.V. and Locasale, J.W. "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?" *Trends Biochem Sci.* 41(3), 211-218,(2016).
- [174] Epstein, T., Gatenby, R.A., and Brown, J.S. "The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand." *PLoS One.* 12(9), e0185085,(2017).
- [175] Gatenby, R.A. and Gillies, R.J. "A microenvironmental model of carcinogenesis." *Nat Rev Cancer.* 8(1), 56-61,(2008).
- [176] Chien, M.H., et al. "Tumor-associated carbonic anhydrase XII is linked to the growth of primary oral squamous cell carcinoma and its poor prognosis." *Oral Oncol.* 48(5), 417-23,(2012).
- [177] Duivenvoorden, W.C., et al. "Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9) sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation." *Oncol Rep.* 34(4), 1968-76,(2015).
- [178] Logsdon, D.P., et al. "Regulation of HIF1alpha under Hypoxia by APE1/Ref-1 Impacts CA9 Expression: Dual Targeting in Patient-Derived 3D Pancreatic Cancer Models." *Mol Cancer Ther.* 15(11), 2722-2732,(2016).
- [179] Yildirim, H. and Kockar, F. "TGF-beta upregulates tumor-associated carbonic anhydrase IX gene expression in Hep3B cells." *Cell Biol Int.* 33(9), 1002-7,(2009).
- [180] Barathova, M., et al. "Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype." *Br J Cancer.* 98(1), 129-36,(2008).
- [181] yildirim, H., Karaman, M., and Kockar, F., *The role of hypoxia response element in TGFβ-induced carbonic anhydrase IX expression in Hep3B human hepatoma cells.* Vol. 69. 2017. 3-3.
- [182] Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. "The impact of O₂ availability on human cancer." *Nat Rev Cancer.* 8(12), 967-75,(2008).

- [183] Kaluz, S., et al. "Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1 alpha stabilization: a role for phosphatidylinositol 3'-kinase." *Cancer Res.* 62(15), 4469-77,(2002).
- [184] Nazarenko, I., et al. "Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation." *Cancer Res.* 70(4), 1668-78,(2010).
- [185] Yue, S., Mu, W., and Zoller, M. "Tspan8 and CD151 promote metastasis by distinct mechanisms." *Eur J Cancer.* 49(13), 2934-48,(2013).
- [186] Wang, H., et al. "Tspan8, CD44v6 and alpha6beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells." *Int J Cancer.* 133(2), 416-26,(2013).
- [187] Yue, S., et al. "Joint features and complementarities of Tspan8 and CD151 revealed in knockdown and knockout models." *Biochem Soc Trans.* 45(2), 437-447,(2017).
- [188] Hemler, M.E. "Tetraspanin functions and associated microdomains." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(10), 801-11,(2005).
- [189] Kashef, J., et al. "Expression of the tetraspanin family members Tspan3, Tspan4, Tspan5 and Tspan7 during *Xenopus laevis* embryonic development." *Gene Expression Patterns.* 13(1), 1-11,(2013).
- [190] Muzio, G., et al. "Inhibition of cytosolic class 3 aldehyde dehydrogenase by antisense oligonucleotides in rat hepatoma cells." *Chem Biol Interact.* 130-132(1-3), 219-25,(2001).
- [191] Gesierich, S., et al. "Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility." *Clin Cancer Res.* 11(8), 2840-52,(2005).
- [192] Kanetaka, K., et al. "Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma." *J Hepatol.* 35(5), 637-42,(2001).
- [193] Kanetaka, K., et al. "Possible involvement of tetraspanin CO-029 in hematogenous intrahepatic metastasis of liver cancer cells." *J Gastroenterol Hepatol.* 18(11), 1309-14,(2003).

- [194] Gesierich, S., et al. "Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029." *Cancer Res.* 66(14), 7083-94,(2006).
- [195] Sanders, S.S. and Hayden, M.R. "Aberrant palmitoylation in Huntington disease." *Biochem Soc Trans.* 43(2), 205-10,(2015).
- [196] Fredericks, G.J. and Hoffmann, P.R. "Selenoprotein K and protein palmitoylation." *Antioxid Redox Signal.* 23(10), 854-62,(2015).
- [197] Zhu, Y., et al. "Multi-factorial modulation of colorectal carcinoma cells motility - partial coordination by the tetraspanin Co-029/tspan8." *Oncotarget.* 8(16), 27454-27470,(2017).
- [198] Reyes, R., et al. "Tetraspanin CD9: A Key Regulator of Cell Adhesion in the Immune System." *Front Immunol.* 9, 863,(2018).
- [199] Murru, L., et al. "Tetraspanins shape the synapse." *Mol Cell Neurosci.*(2018).
- [200] Malla, R.R., et al. "Exosomal tetraspanins as regulators of cancer progression and metastasis and novel diagnostic markers." *Asia Pac J Clin Oncol.*(2018).
- [201] Hemler, M.E. "Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages." *Nat Rev Cancer.* 14(1), 49-60,(2014).
- [202] Heiler, S., Wang, Z., and Zoller, M. "Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push." *World J Gastroenterol.* 22(26), 5971-6007,(2016).
- [203] Pan, S.J., et al. "Tetraspanin 8-ricor-integrin alpha3 complex is required for glioma cell migration." *Int J Mol Sci.* 16(3), 5363-74,(2015).
- [204] Wei, L., Li, Y., and Suo, Z. "TSPAN8 promotes gastric cancer growth and metastasis via ERK MAPK pathway." *Int J Clin Exp Med.* 8(6), 8599-607,(2015).
- [205] Kim, T.K., et al. "Generation of a human antibody that inhibits TSPAN8-mediated invasion of metastatic colorectal cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 468(4), 774-80,(2015).
- [206] Dong, Z., et al. "Overexpression of TSPAN8 Promotes Tumor Cell Viability and Proliferation in Nonsmall Cell Lung Cancer." *Cancer Biother Radiopharm.* 31(10), 353-359,(2016).

- [207] Zoller, M. "Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis." *Nat Rev Cancer*. 9(1), 40-55,(2009).
- [208] Rana, S., et al. "Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility." *Int J Biochem Cell Biol*. 43(1), 106-19,(2011).
- [209] Maisonia-Beset, A., et al. "Tetraspanin 8 (TSPAN 8) as a potential target for radio-immunotherapy of colorectal cancer." *Oncotarget*. 8(13), 22034-22047,(2017).
- [210] Charrin, S., et al. "Tetraspanins at a glance." *J Cell Sci*. 127(Pt 17), 3641-8,(2014).
- [211] Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. "Notch signaling at a glance." *J Cell Sci*. 126(Pt 10), 2135-40,(2013).
- [212] Zhu, H., et al. "CO-029 is overexpressed in gastric cancer and mediates the effects of EGF on gastric cancer cell proliferation and invasion." *Int J Mol Med*. 35(3), 798-802,(2015).
- [213] Greco, C., et al. "E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma." *Cancer Res*. 70(19), 7674-83,(2010).
- [214] Ailane, N., et al. "Effect of an anti-human Co-029/tspan8 mouse monoclonal antibody on tumor growth in a nude mouse model." *Front Physiol*. 5, 364,(2014).
- [215] Rodia, M.T., et al. "Systematic large-scale meta-analysis identifies a panel of two mRNAs as blood biomarkers for colorectal cancer detection." *Oncotarget*. 7(21), 30295-306,(2016).
- [216] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method." *Methods*. 25(4), 402-8,(2001).
- [217] Mansoor, T.A., et al. "Apoptosis inducing activity of benzophenanthridine-type alkaloids and 2-arylbenzofuran neolignans in HCT116 colon carcinoma cells." *Phytomedicine*. 20(10), 923-9,(2013).
- [218] Ling, L.U., et al. "The role of reactive oxygen species and autophagy in safingol-induced cell death." *Cell Death Dis*. 2, e129,(2011).

- [219] Peng, W., et al. "Knockdown of autophagy-related gene LC3 enhances the sensitivity of HepG2 cells to epirubicin." *Experimental and Therapeutic Medicine*. 9(4), 1271-1276,(2015).
- [220] Yu, X., et al. "Targeted drug delivery in pancreatic cancer." *Biochim Biophys Acta*. 1805(1), 97-104,(2010).
- [221] Gradiz, R., et al. "MIA PaCa-2 and PANC-1 - pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors." *Sci Rep*. 6, 21648,(2016).
- [222] Kalluri, R. and Weinberg, R.A. "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest*. 119(6), 1420-8,(2009).
- [223] Arumugam, T., et al. "Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer." *Cancer Res*. 69(14), 5820-8,(2009).
- [224] Wang, Z., et al. "CD44v6-competent tumor exosomes promote motility, invasion and cancer-initiating cell marker expression in pancreatic and colorectal cancer cells." *Oncotarget*. 7(34), 55409-55436,(2016).
- [225] Tarnowski, M., et al. "HNF1B, TSPAN8 and NOTCH2 gene polymorphisms in women with gestational diabetes." *J Matern Fetal Neonatal Med*, 1-6,(2017).
- [226] Akiel, M.A., et al. "Tetraspanin 8 mediates AEG-1-induced invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma cells." *FEBS Lett*. 590(16), 2700-8,(2016).
- [227] El Kharbili, M., et al. "Tetraspanin 8 is a novel regulator of ILK-driven beta1 integrin adhesion and signaling in invasive melanoma cells." *Oncotarget*. 8(10), 17140-17155,(2017).
- [228] Kong, F., et al. "STK33 promotes growth and progression of pancreatic cancer as a critical downstream mediator of HIF-1alpha." *Cancer Res*,(2017).
- [229] Radvak, P., et al. "Suppression of carbonic anhydrase IX leads to aberrant focal adhesion and decreased invasion of tumor cells." *Oncol Rep*. 29(3), 1147-53,(2013).
- [230] Li, Y., et al. "Roles of Carbonic Anhydrase IX in Development of Pancreatic Cancer." *Pathol Oncol Res*. 22(2), 277-86,(2016).

- [231] Dallas, A. and Vlassov, A.V. "RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential." *Med Sci Monit.* 12(4), RA67-74,(2006).
- [232] Castanotto, D. and Rossi, J.J. "The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics." *Nature.* 457(7228), 426-33,(2009).
- [233] Jackson, A.L. and Linsley, P.S. "Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application." *Nat Rev Drug Discov.* 9(1), 57-67,(2010).
- [234] Semizarov, D., et al. "Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(11), 6347-52,(2003).
- [235] Robertson, N., Potter, C., and Harris, A.L. "Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion." *Cancer Res.* 64(17), 6160-5,(2004).
- [236] Cheng, A., Magdaleno, S., and Vlassov, A.V. "Optimization of transfection conditions and analysis of siRNA potency using real-time PCR." *Methods Mol Biol.* 764, 199-213,(2011).
- [237] Chiche, J., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. "Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer." *J Cell Mol Med.* 14(4), 771-94,(2010).
- [238] Lou, Y., et al. "Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors." *Cancer Res.* 71(9), 3364-76,(2011).
- [239] Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." *Nat Rev Cancer.* 2(8), 563-72,(2002).
- [240] Jung, H.Y., Fattet, L., and Yang, J. "Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis." *Clin Cancer Res.* 21(5), 962-968,(2015).
- [241] Vanharanta, S. and Massagué, J. "Origins of Metastatic Traits." *Cancer Cell.* 24(4), 410-421,(2013).
- [242] Deer, E.L., et al. "Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines." *Pancreas.* 39(4), 425-35,(2010).

- [243] Berthier-Vergnes, O., et al. "Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel mediator of invasion." *Br J Cancer*. 104(1), 155-65,(2011).
- [244] Yang, Z.Z., et al. "Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas." *Biomaterials*. 35(19), 5226-39,(2014).
- [245] Yang, G., et al. "The hypoxia-mimetic agent CoCl₂ induces chemotherapy resistance in LOVO colorectal cancer cells." *Mol Med Rep*. 13(3), 2583-9,(2016).
- [246] Lee, S.Y., et al. "A theranostic micelleplex co-delivering SN-38 and VEGF siRNA for colorectal cancer therapy." *Biomaterials*. 86, 92-105,(2016).
- [247] Barbolina, M.V. and Stack, M.S. "Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis." *Semin Cell Dev Biol*. 19(1), 24-33,(2008).
- [248] Seger, D., Gechtman, Z., and Shaltiel, S. "Phosphorylation of vitronectin by casein kinase II. Identification of the sites and their promotion of cell adhesion and spreading." *J Biol Chem*. 273(38), 24805-13,(1998).
- [249] Seger, D., Seger, R., and Shaltiel, S. "The CK2 phosphorylation of vitronectin. Promotion of cell adhesion via the alpha(v)beta 3-phosphatidylinositol 3-kinase pathway." *J Biol Chem*. 276(20), 16998-7006,(2001).
- [250] Swayampakula, M., et al. "The interactome of metabolic enzyme carbonic anhydrase IX reveals novel roles in tumor cell migration and invadopodia/MMP14-mediated invasion." *Oncogene*. 36(45), 6244-6261,(2017).
- [251] Turner, N.A., et al. "Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels." *FASEB J*. 19(7), 804-6,(2005).
- [252] Sansone, P., et al. "Cyclooxygenase-2/carbonic anhydrase-IX up-regulation promotes invasive potential and hypoxia survival in colorectal cancer cells." *J Cell Mol Med*. 13(9B), 3876-87,(2009).
- [253] Csaderova, L., et al. "The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration." *Front Physiol*. 4, 271,(2013).

- [254] Brooks, P.C., et al. "Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3." *Cell*. 85(5), 683-93,(1996).
- [255] Monaco, S., et al. "Modulation of the proteolytic activity of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A) on fibrinogen." *Biochem J*. 402(3), 503-13,(2007).
- [256] Rupp, P.A., et al. "Matrix metalloproteinase 2-integrin alpha(v)beta3 binding is required for mesenchymal cell invasive activity but not epithelial locomotion: a computational time-lapse study." *Mol Biol Cell*. 19(12), 5529-40,(2008).
- [257] Maretzky, T., et al. "ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(26), 9182-7,(2005).
- [258] Vidlickova, I., et al., *Apoptosis-induced ectodomain shedding of hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX from tumor cells: A double-edged response to chemotherapy*. Vol. 16. 2016.
- [259] Padar, A., et al. "Inactivation of cyclin D2 gene in prostate cancers by aberrant promoter methylation." *Clin Cancer Res*. 9(13), 4730-4,(2003).
- [260] Matsubayashi, H., et al. "Methylation of cyclin D2 is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues." *Clin Cancer Res*. 9(4), 1446-52,(2003).
- [261] Susaki, E., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. "Cyclin D2 translocates p27 out of the nucleus and promotes its degradation at the G0-G1 transition." *Mol Cell Biol*. 27(13), 4626-40,(2007).
- [262] Beljanski, V., Chiang, C., and Hiscott, J. "The intersection between viral oncolysis, drug resistance, and autophagy." *Biol Chem*. 396(12), 1269-80,(2015).
- [263] Pattingre, S. and Levine, B. "Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer?" *Cancer Res*. 66(6), 2885-8,(2006).
- [264] He, C. and Klionsky, D.J. "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." *Annu Rev Genet*. 43, 67-93,(2009).

- [265] Wu, C.Y., et al. "Overexpression of KAI1 induces autophagy and increases MiaPaCa-2 cell survival through the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases." *Biochem Biophys Res Commun.* 404(3), 802-8,(2011).
- [266] Zhu, H. and Zhang, Y. "Life and Death Partners in Post-PCI Restenosis: Apoptosis, Autophagy, and The Cross-talk Between Them." *Curr Drug Targets*,(2016).
- [267] Eisenberg-Lerner, A., et al. "Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them." *Cell Death Differ.* 16(7), 966-75,(2009).
- [268] Qian, W., et al. "Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1." *Leuk Res.* 31(3), 329-39,(2007).
- [269] Basciani, S., et al. "Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells." *FEBS Lett.* 581(30), 5897-903,(2007).
- [270] Saraswathy, M. and Gong, S. "Recent developments in the co-delivery of siRNA and small molecule anticancer drugs for cancer treatment." *Materials Today.* 17(6), 298-306,(2014).
- [271] Mezencev, R., et al. "Acquired resistance of pancreatic cancer cells to cisplatin is multifactorial with cell context-dependent involvement of resistance genes." *Cancer Gene Therapy.* 23(12)(1476-5500 (Electronic)), 446-453,(2016).
- [272] Plosker, G.L. and Faulds, D. "Epirubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cancer chemotherapy." *Drugs.* 45(5)(0012-6667 (Print)), 788-856,(1993).
- [273] Beh, C.W., et al. "Efficient delivery of Bcl-2-targeted siRNA using cationic polymer nanoparticles: downregulating mRNA expression level and sensitizing cancer cells to anticancer drug." *Biomacromolecules.* 10(1), 41-8,(2009).
- [274] Whitehurst, A.W., et al. "Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells." *Nature.* 446(7137), 815-9,(2007).
- [275] Liu, G., Wong-Staal, F., and Li, Q.X. "Development of new RNAi therapeutics." *Histol Histopathol.* 22(2), 211-7,(2007).

- [276] Qin, B. and Cheng, K. "Silencing of the IKKepsilon gene by siRNA inhibits invasiveness and growth of breast cancer cells." *Breast Cancer Res.* 12(5), R74,(2010).
- [277] Guo, J.P., et al. "Deregulation of IKBKE is associated with tumor progression, poor prognosis, and cisplatin resistance in ovarian cancer." *Am J Pathol.* 175(1), 324-33,(2009).
- [278] Yano, J., et al. "Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer." *Clin Cancer Res.* 10(22), 7721-6,(2004).
- [279] Pal, A., et al. "Systemic delivery of RafsiRNA using cationic cardiolipin liposomes silences Raf-1 expression and inhibits tumor growth in xenograft model of human prostate cancer." *Int J Oncol.* 26(4), 1087-91,(2005).
- [280] Takei, Y., et al. "A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics." *Cancer Res.* 64(10), 3365-70,(2004).
- [281] Liang, Z., et al. "Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis." *Cancer Res.* 65(3), 967-71,(2005).
- [282] Szadvari, I., Krizanova, O., and Babula, P. "Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment." *Physiol Res.* 65(Supplementum 4), S441-S453,(2016).
- [283] Frohlich, M., et al. "[Experimental research following intratumor bleomycin use in the nude mouse model of oral mucosa cancer and the clinical pilot study]." *Arch Geschwulstforsch.* 56(2), 125-34,(1986).
- [284] Gut, M.O., et al. "Gastric hyperplasia in mice with targeted disruption of the carbonic anhydrase gene Car9." *Gastroenterology.* 123(6), 1889-903,(2002).
- [285] Pan, P.W., et al. "Brain phenotype of carbonic anhydrase IX-deficient mice." *Transgenic Res.* 21(1), 163-76,(2012).
- [286] Liao, S.Y., et al. "Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group study." *Gynecol Oncol.* 116(3), 452-8,(2010).
- [287] Yang, J.S., et al. "Carbonic anhydrase IX overexpression regulates the migration and progression in oral squamous cell carcinoma." *Tumour Biol.* 36(12), 9517-24,(2015).



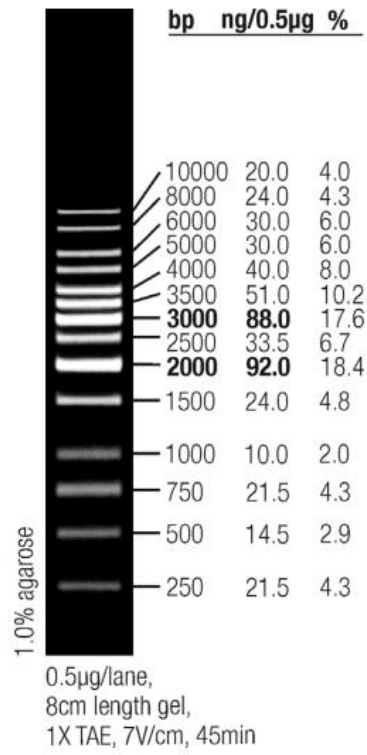


EKLER

6. EKLER

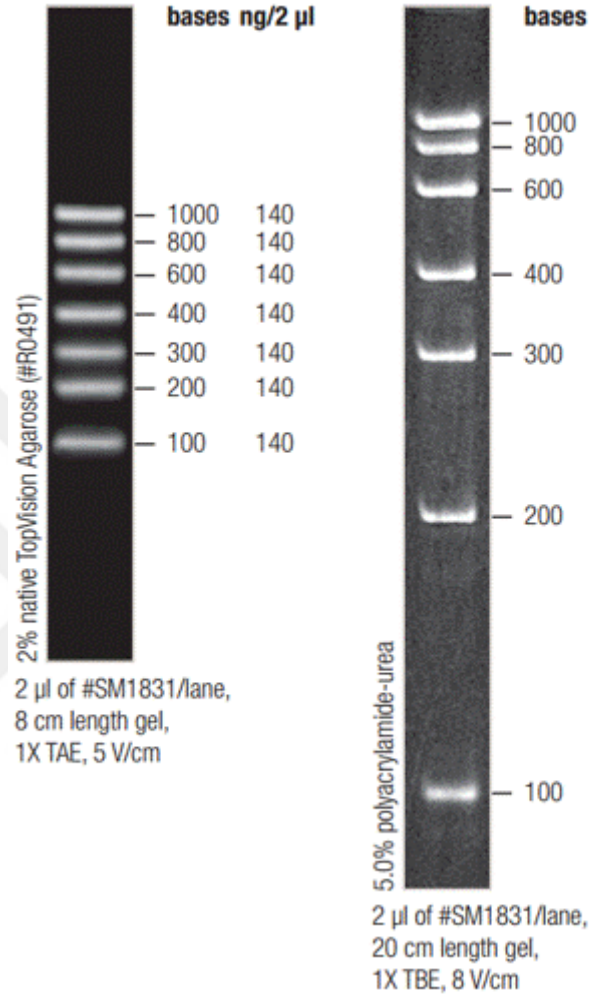
EK A. DNA Çalışmalarında Kullanılan Büyüklük Belirteci

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



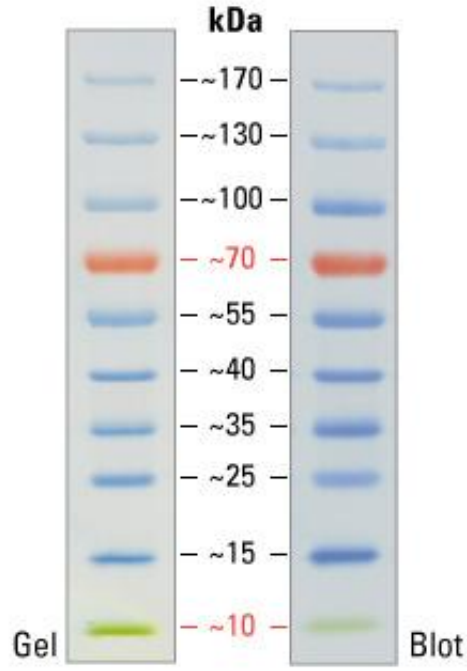
Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci

EK B. RNA Çalışmalarında Kullanılan Büyüklük Belirteci



Şekil 6.2: RNA büyüklük belirteci

EK C. Protein Çalışmalarında Kullanılan Büyüklük Belirteci



Şekil 6.3: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci

