

NURAY FARHADI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2024



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOMDA ER STRESİ İLE İLİŞKİLİ
GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KEMOTERAPİ DİRENCİ
İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

NURAY FARHADİ

DANIŞMAN
PROF. DR. SEMRA DEMOKAN

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ BİLİM DALI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nuray Farhadi

İTHAF

Tezimi aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatımda akademik konularda ve bilim insanı olma yolunda bana şans tanıyan, Rektörümüz ve aynı zamanda Onkoloji Enstitüsü Müdürü Sayın Prof.Dr. Osman Bülent ZÜLFİKAR`a teşekkür ederim.

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Hatice Bilge BECERİR`e teşekkürlerimi iletirim.

Eğitim hayatım boyunca bilgi birikimi ve tecrübesini paylaşıp bana yol gösteren, tezimi bitirmem için sabırla çalışan, bana imkan ve olanaklar sağlayarak emeği geçen danışmanım saygıdeğer Prof. Dr. Semra DEMOKAN`a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma hayatıma doğru yön verebilmem adına büyük emeği ve katkıları bulunan, bu alandaki zorluklarla nasıl mücadele etmem gerektiğini sabırla bana öğreten, gelecek meslek hayatımda da bilgilerinden yararlanacağım ikinci danışmanım Sayın Dr.Öğr. Üyesi Mehveş PODA`ya teşekkür ediyorum.

Her zaman laboratuvar ve yazı deneyim tecrübelerini benimle paylaşan ve daima minnettar kalacağım değerli arkadaşlarım Seval TURNA, Tuğçe ÇELİK, Nil LEVENT ve Işıl SANĐU`ya ayrıca teşekkür ederim.

Velhasıl, en önemlisi, hayatta her daim kendi ayaklarım üzerinde güçlü durmama sebep olan, bana her zaman inanan ve güvenen, yalnız bırakmayarak karamsarlığa kapılmama asla izin vermeyen, bana her konuda maddi ve manevi destek olan canımdan çok sevdiğim biricik Aile`me, duaları ve merakları eksilmeyen annem, ablam, babam ve abime çok teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Onkoloji Enstitü`lerinde eğitim-öğrenim görmek, deneysel ve pratik tecrübeler edinmek nasibim oldu. Son olarak, senelerdir hayat felsefesi olarak kullandığım “Dokunabildiğiniz hayatlar kadarsınız” cümlesinin önemini bildirmek isterdim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xix
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Neden Pankreas Kanseri?.....	4
2.1.1 Pankreas Anatomisi ve Fizyolojisi.....	5
2.1.2 Pankreas Kanseri Sınıflandırılması ve Tümör Evreleri.....	6
2.1.3 Pankreas Kanserinin Epidemiyolojisi.....	8
2.1.4 Pankreas Kanserinin Etiyolojisi.....	9
2.1.5 Pankreas Kanseri Tiplerinin Histolojisi.....	10
2.1.6 Pankreas Kanseri Moleküler Biyolojisi ve Patolojisi.....	11
2.1.7 Pankreas Kanseri Kliniği ve Tedavisi.....	13
2.1.8 Gemcitabin.....	14
2.1.9 Gemcitabinin Etki Mekanizması.....	15
2.2 Endoplazmatik Retikulum Yapısı.....	16
2.2.1 Kanser ve Endoplazmik Retikulum Stresi İlişkisi.....	17
2.2.2 Kanser ve Katlanmamış Protein Cevabı İlişkisi.....	18
2.2.3 UPR'nin Ana Bileşenleri.....	22
2.2.4 Kanser Karşıtı Strateji; <i>CHOP</i> Aracılı Apoptozu Hedefleme.....	25
2.2.5 ER Stresine Karşı Tepki.....	26
2.2.6 UPR ve Apoptoz İlişkisi.....	27
2.2.7 UPR ve Metastaz İlişkisi.....	28
2.2.8 UPR ve Anjiyogenez İlişkisi.....	28

2.3 Pankreas Kanseri ve ER Stresi İlişkisi.....	29
2.3.1 Pankreas Kanserinde Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR İlişkisi.....	29
2.3.2 Pankreas Kanserinde İlaç Direnci ve UPR İlişkisi.....	30
2.4 <i>GADD45β</i>	30
2.5 <i>SERPINE1</i>	33
2.5.1 Hücre Göçü, İnvazyonu ve Metastazda <i>SERPINE1</i> in Rolü.....	34
2.6 <i>CHOP</i>	36
2.6.1 <i>CHOP</i> 'un Yapısı ve Özellikleri.....	36
2.6.2 <i>CHOP</i> 'un İfade Profili	38
2.7 CD24 / CD44 Yüzey Belirteçleri.....	39
3.GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1 GEREÇ	
3.1.1 Kullandığımız Ekipman ve Cihazlar.....	40
3.1.2 Kullandığımız Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler.....	41
3.1.3 Kullandığımız Sarf Malzemeler.....	42
3.1.4 Tezde Yararlanılan Veritabanları.....	42
3.1.5 Hücre Kültürü	43
3.1.6 PANC-1.....	44
3.2 YÖNTEM	
3.2.1 PANC-1 Hücrelerinin Bazal Kültür Şartları	45
3.2.2 PANC-1 hücrelerinin Gemsitabinle Muamelesi.....	47
3.2.3 Hücrelerin CD24/CD44 yüzey belirteç tiplerine göre izolasyonu.....	48
3.2.3.2 Hücre Canlılık Testi.....	49
3.2.4 RNA İzolasyonu.....	49
3.2.5 Primer Dizaynı.....	51
3.2.6 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	54
3.2.7. Veri Analizi.....	55
4.BULGULAR	
4.1 Gemsitabin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	56
4.2 İmmünojenik Bulgular.....	57
4.2.1. CD24 VE CD44 Hücrelerinin Mevcudiyeti.....	57
4.1.2.Hücre Canlılık Testi Sonuçları.....	59
4.1.3.Sorting Analiz Sonuçları.....	59

4.2 QRT-PCR Optimizasyon Sonuçları.....	59
4.2.1 LightCycler Roche 480`nin Erime Eğrileri ve Tm Calling eğrileri.....	60
4.3. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	63
4.3.1 <i>GADD45B</i>	63
4.3.2 <i>SERPINE1</i>	65
4.3.3 <i>CHOP</i>	66
5.TARTIŞMA.....	69
KAYNAKLAR.....	76
HAM VERİLER.....	104
FORMLAR.....	105
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	106

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Pankreas neoplazilerinin kısa özeti	7
Tablo 3.1 Kullandığımız ekipmanlar ve cihazlar.....	40
Tablo 3.2 Kullandığımız biyolojik ve kimyasal malzemeler.....	41
Tablo 3.3 Kullandığımız sarf malzemeler.....	42
Tablo 3.4 Yararlanılan veritabanları	42
Tablo 3.5 Hücre Dondurma Solüsyonu içeriği.....	47
Tablo 3.6 Gemsitabin çözeltisi hazırlama ana ve ara stok şablonu.....	48
Tablo 3.7 Gemsitabin uygulanan deney gruplarının şematik gösterimi	49
Tablo 3.8 RNA konsantrasyonları.....	50
Tablo 3.9 Seçilmiş genlerin primer dizileri.....	52
Tablo 3.10 QRT-PCR reaksiyon karışımı.....	54
Tablo 3.11 QRT-PCR aşaması koşulları.....	54
Tablo 4.1 Elde edilen analiz sonuçlarının % değerleri.....	57
Tablo 4.2 GEM uygulanma öncesi ve sonrası sorting analiz sonuçları.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Kanser hücrelerinin nitelikleri.....	3
Şekil 2.2 Pankreas yerleşimi.....	6
Şekil 2.3 Pankreas kanseri evrelerinin anatomik olarak gösterimi.....	8
Şekil 2.4 Pankreas kanserinin gelişim modeli.....	11
Şekil 2.5 Pankreas kanserinin progresyon modeli	12
Şekil 2.6 Gempitabinin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.7 Endoplazmatik retikulum yapısı	16
Şekil 2.8 Endoplazmik retikulumun süper çözünürlüklü görüntüsü.....	17
Şekil 2.9 Kanser evrelerinde UPR katkısı.....	20
Şekil 2.10 Katlanmamış protein cevabı, hücrenin hayatta kalması (a) ve ölümü (b).....	24
Şekil 2.11 ER stresinin apoptotik yolları.....	26
Şekil 2.12 <i>GADD45B</i> geninin kromozom üzerinde yerleşimi	31
Şekil 2.13 <i>GADD45B</i> RNA ekspresyon grafiği.....	32
Şekil 2.14 <i>SERPINE1</i> geninin kromozom üzerinde yerleşimi	33
Şekil 2.15 <i>SERPINE1</i> RNA ekspresyon grafiği.....	34
Şekil 2.16 PAI-1'in bilinen üç yöntemle anjiyogeneze yardımcı olması.....	36
Şekil 2.17 <i>CHOP</i> geninin kromozom üzerinde yerleşimi	37
Şekil 2.18 İnsanda <i>CHOP</i> 'un etki alanının yapısı.	38
Şekil 2.19 <i>CHOP</i> RNA ekspresyon grafiği.....	39
Şekil 3.1 ATCC PANC-1 hücre hattının mikroskop altında görseli.....	44
Şekil 3.2 İvert mikroskop altında PANC-1 hücrelerinin karakteristik görüntüsü.....	46
Şekil 3.3 FACS Aria II cihazıyla hücre akımı saflaştırma görseli.....	48
Şekil 3.4 <i>GADD45B</i> (NM_015675.4) genin lokasyonu.....	52
Şekil 3.5 <i>SERPINE1</i> (NM_000602.5) genin lokasyonu.....	52
Şekil 3.6 <i>CHOP(DDIT3)</i> (NM_004083.6) genin lokasyonu.....	52
Şekil 3.7 <i>GADD45B</i> forward primer dizaynı sağlaması.....	53
Şekil 4.1 Bağlı hücre canlılığı.....	56

Şekil 4.2 Canlılık Analizi.....	57
Şekil 4.3 Tam canlı hücrelerin ayrışma görüntüsü.....	58
Şekil 4.4 Ölmek üzere olan hücrelerin ayrışma görüntüsü.....	58
Şekil 4.5 Optimizasyon plak cihaz çıktısı.....	60
Şekil 4.6 <i>PPIA</i> geni (a) SYBR Green erime ve (b) Tm calling eğrisi analizi.....	61
Şekil 4.7 SYBR Green erime eğrisi	61
Şekil 4.8 <i>GADD45B</i> geni Tm calling eğrisi.....	62
Şekil 4.9 <i>SERPINE1</i> geni Tm calling eğrisi.....	62
Şekil 4.10 <i>CHOP</i> geni Tm calling eğrisi.....	63
Şekil 4.11 <i>GADD45B</i> gen ekspresyon düzeyinin Linearize Livac metodu ile hesaplanması.....	64
Şekil 4.12 Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi ile <i>GADD45B</i> gen ekspresyon değerlendirilmesi.....	64
Şekil 4.13 <i>SERPINE1</i> gen ekspresyon düzeyinin Linearize Livac metodu ile hesaplanması.....	65
Şekil 4.14 Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi ile <i>SERPINE1</i> gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi.....	66
Şekil 4.15 <i>CHOP</i> gen ekspresyon düzeyinin Linearize Livac metodu ile hesaplanması.....	67
Şekil 4.16 Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi ile <i>CHOP</i> gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi.....	67
Şekil 4.17 Relatif gen anlatım düzeyinin ifade değişiklikleri.....	68

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

FDA	Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
PDAC	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PanIN	Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi
IPMN	İntraduktal Papiler Müsinöz Neoplazm
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER ile ilişkili bozunma sistemleri
PANC-1	Pankreatik Duktal Adenokarsinom Hücre Hattı-1
CSC	Kanser Kök Hücreleri
TRAIL	Apoptoz İndükleyici Ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
GEM	Gemcitabin (Gemcitabine- 2'-Deoxy-2',2'-difluorocytidine)
DCK	Deoksisitidin kinaz
GADD45B	Büyüme Durması ve DNA Hasarı İndüklenebilir 45 Beta
SERPINE1	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E Member 1
PAI-1	Plazminojen aktivatör İnhibitörü-1
DDIT 3	DNA Damage Inducible Transcript 3
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
uPA	Ürokinaz Tipi Plazminojeni
tPA	Doku Tipi Plazminojen Aktivatörü
IL-8	İnterlökin 8 (Interleukin 8)
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
TP53	Tumor Protein 53
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded protein response)
TME	Tümör Mikro Ortamı
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
mRNA	Mesajcı Ribonukleik Asit (Messenger RNA)
ATF4	Activating Transcription Factor

APAF1	Apoptoz Proteaz Aktiv Edici Faktör 1
FADD	FAS İlişkili Ölüm Alanı
CA19-9	Karbonhidrat Antijen 19-9
CEA	Dekarsinoembriyonik Antijen
QRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu



ÖZET

Farhadi N. Pankreatik duktal adenokarsinomda ER stresi ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerinin kemoterapi direnci ile ilişkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Onkoloji. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2024

Tüm pankreas kanseri neoplazm tipleri, hızlı nüksetme ve yüksek metastaz yapma kabiliyetine sahiptir, kemoterapi ve radyoterapiye direnç göstermeleriyle de karakterizedirler. Kanser tedavisinde, hücre ölümünü tetiklemek için endoplazmatik retikulum homeostazındaki bozulmalar sonucu oluşan ER stresinden yararlanılabilir. Gelişen tedavi protokollerine rağmen, pankreas kanser hastalarının sağkalım oranı halen düşük düzeyde seyretmektedir. Aktüel tedaviye, primer olarak Gemsitabin (GEM) başlanmakta ve sonraki fazlarda tedavi etkisini arttırabilmek için farklı kemoterapötik ajanlarla kombinasyon tedavileri uygulanabilmektedir. Bu çalışmanın amacı ise, GEM varlığında pankreatik adenokarsinom (PDAC) hücre soyu olan PANC-1 hücrelerinde ER stres faktörlerinin incelenmesidir. Deney dizaynı GEM+, GEM- gruplarını içerecek şekilde yapılmıştır. GEM+ olarak çalışılan grup daha sonra CD24+ ve CD44+ yüzey belirteçleriyle ayrıştırılmıştır. Tüm gruplarda, *GADD45B*, *SERPINE1*, *CHOP* genlerindeki ifade düzeylerinde oluşan değişiklikler QRT-PCR analiz yöntemiyle incelenmiştir. *GADD45B*'in geni hücre döngüsü, hücre sağkalımı, senesens, apoptoz, onkojenik stres gibi çeşitli fizyolojik ve çevresel stres faktörlerine tepki gibi yollarda rol oynadığı bilinmektedir. *SERPINE1* ise, hücre göçünü teşvik edebilmekte veya apoptozu uyarabilmektedir. *CHOP*'un aşırı ekspresyonu antikanser tedavisini temsil edebilir.

Bulgular: Çalışmada, GEM+ grupta *GADD45B* ve *SERPINE1* gen ifadelerinde kontrol grubuna nazaran (ilaç uygulanmamış) 1,34 kat ve 1,44 kat artış olduğu saptanmıştır. Yüzey belirteçlerine (CD24+/CD44+) göre seçilen hücrelerde ise, *GADD45B* ve *SERPINE1* ekspresyonunda 1,8 kat ve 1,58 kat artış saptanmıştır. *CHOP* ekspresyonunda GEM+ ve GEM- grupları karşılaştırıldığında ekspresyonundaki değişimin 0,48 (2,08 kat düşüş); GEM+(CD24+/CD44+) grupla GEM- grup karşılaştırıldığında 0,62 (1,61 kat düşüş) olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: *GADD45B*, *SERPINE1*, *CHOP* genlerinin ilaç-direnç ve ilaç-takip pankreas kanseri araştırmalarında yeni umut verici biyobelirteçler olarak katkıda

bulunabilecekleri ve gelecekteki hedefli tedavilerde erken teşhisde kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Pankreas, Gemcitabin, ER stresi, *GADD45B*, *SERPİNE1*



ABSTRACT

Farhadi N. Investigation of the relationship between the expression levels of genes related to ER stress in pancreatic ductal adenocarcinoma and chemotherapy resistance. Istanbul University Health Sciences Institute, Oncology. Master's Thesis. Istanbul. 2024

All types of pancreatic cancer neoplasms have the ability to relapse rapidly and make metastases, and are also characterized by their resistance to chemotherapy and radiotherapy. The survival rate of pancreatic cancer patients is still low. In cancer treatment, ER stress can be used to trigger cell death. Current treatment is primarily started with Gemcitabine (GEM), and in the following phases, combination treatments with different chemotherapeutic agents can be applied. The aim of this study was to investigate ER stress factors in PANC-1 cells, a pancreatic adenocarcinoma (PDAC) cell line, in the presence of gemcitabine. The experimental design was made to include GEM+ and GEM- groups. The group studied as GEM+ was then separated by CD24+ and CD44+ surface markers. In all groups, changes in the expression levels of *GADD45B*, *SERPINE1*, *CHOP* genes were examined by QRT-PCR analysis. *GADD45B* gene is known to play a role in pathways such as cell cycle, survival, senescence, apoptosis, and response to various environmental stress factors such as oncogenic stress. *SERPINE1* can promote cell migration or induce apoptosis. Overexpression of *CHOP* may represent anticancer treatment. Findings: In the study, *GADD45B* and *SERPINE1* gene expressions were found to be 1.34-fold and 1.44-fold increased in the GEM+ group compared to the control group. In cells selected according to surface markers (CD24+/CD44+), *GADD45B* and *SERPINE1* expressions were found to be 1.8-fold and 1.58-fold increased. When the GEM+ and GEM- groups were compared in *CHOP* expression, the change in expression was determined to be 0.48-fold (2,08-fold decrease); when the GEM+ (CD24+/CD44+) group was compared with the GEM- group, it was determined to be 0.62-fold (1,61-fold decrease). Conclusion: It is predicted that *GADD45B*, *SERPINE1*, *CHOP* genes may contribute as new promising biomarkers in drug-resistance and drug-monitoring pancreatic cancer research and may be used in early diagnosis in targeted therapies in the future.

Keywords: Pankreas, Gemitabin, ER stress, *GADD45B*, *SERPINE1*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada ölümcül maligniteler içinde dördüncü sırada bulunan pankreas kanseri erken evrede metastaz yapabilme kabiliyetine sahip kötü prognozlu neoplazm olarak bilinir (Li, Yang, Kang, Liu, 2019).

EPIC çalışma verilerine göre, vakaların büyük bir kısmı kanserin ileri aşamasında teşhis edildiğinden ve tedavi seçeneğinin kısıtlı olmasından tüm kanser tipleri arasında 5 yıllık sağkalım oranlarının çok düşük olması belirtilmiştir. Erken evre tanısı alan olguların <% 20'si için ilk akla gelen tedavi seçeneğinin cerrahi olmasıdır (Frampas, David ve ark., 2016). Cerrahi müdahale uygulanan pankreas kanseri hastalarının %50'sinde relaps meydana gelmekte, kemoterapi ile tedavi sonrası ilaç direnci gelişimi gözlemlenmekte olup, kemoterapötiklerin hastanın yaşam kalitesini etkileyen yan etkileri meydana getirmesi, araştırmacıların destekleyici yeni yollar keşfetmeleri gerekliliğini ortaya koymuştur (Lam,2010).

Günümüzde cerrahi teknikler, kemoterapi ve radyoterapideki ilerlemelere rağmen, pankreas kanserli hastaların yaşam sürelerine olumlu katkı sağlanamamaktadır. Bunun altında yatan temel nedenlerinden bazıları ise, pankreas kanseri gelişiminde karmaşık hücresel mekanizmalarının varlığı, değişkenlik gösteren pankreas hücre fizyolojileri ve apoptoz sinyallerinde oluşabilen işlev kayıplarıdır. Tanıyı karışık hale getiren ise, hücre döngüsü durdurma sinyallerine duyarsızlaşmayı ve apoptozdan kaçmayı sağlayan moleküler mekanizmaların varlığıdır (Li ve ark., 2019).

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC) hastalarının (kadın ve erkeklerde) %80'inden fazlası hastalık belirtilerinin asemptomatik olması nedeniyle geç teşhis edilerek kanserin ileri evresinde tespit edilir. Hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı neredeyse %5'in altındadır (Siegel ve başkaları, 2020). Pankreas malignitelerinin %90'ından fazlasını oluşturan PDAC, pankreas kanser türleri arasında açık arayla en yaygın olanıdır. Rutin taramayı engelleyen faktörler arasında, PDAC olgularının büyük ölçüde asemptomatik olması, pankreasın anatomik konumuna erişilmesinin zor olması ve erken evre tümörler için tanısal biyobelirteçlerin azlığı sayılabilir. Kemoterapiye karşı gelişen direnç ve hastalığın insidansının giderek artması nedeniyle PDAC'a özgün biyobelirteç ve yeni terapötik moleküler hedeflere acil ihtiyaç duyulmaktadır (K.A. Cronin ve ark. 2022).

Kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı hassasiyetinin artırılmasında kullanılan kemoterapötik ajanlar, tedavide sağlıklı hücrelerde yıkıcı etki gösterebilmekte ve diğer taraftan ilaç direncini azaltabilmektedir (Lam, 2010). Sağkalım oranlarında iyileştirici etkisi bildirilmiş ve standart palyatif kemoterapi ajanı olarak benimsenmiş Gemsitabin (GEM), hücre ölümünü tetikleyebilmekte ve DNA sentezini inhibe edebilmektedir. Günümüzdeki tedavilerin başarısızlığı nedeniyle yeni terapötik ajanlar araştırılmaya devam edilmektedir. Bunun altında çeşitli sebepler yatmaktadır. Yoğunlukla üzerinde durulan ajanlar endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkilidir. ER stresi'ne yol açan nedenler arasında oksijen azlığı, oksidatif stres ve glukoz yoksunluğu gibi birçok patofizyolojik durumlar yatmakta ve ER'deki protein katlama yükü ve kapasitesi arasında dengesizlik de ER homeostazını bozabilmektedir. Bu durum ise, katlanmamış protein yanıtı (UPR) entegre sinyal yolunu aktifleştirebilmektedir (Walter, Ron, 2011). Pankreas kanserlerinde stroma bakımından yoğun tümör mikro ortamı, hipoksik ve metabolitlerden yoksun (Vasseur ve ark., 2010) olması sebebiyle pankreas tümörleri ER stresi ve UPR aktivasyonuna yatkın bulunmaktadır. UPR dinamikleri, kısa bir zamanda büyüyen ve gelişen hipoksik tümörlerde olası tedavi opsiyonu sunmaya devam etmektedir.

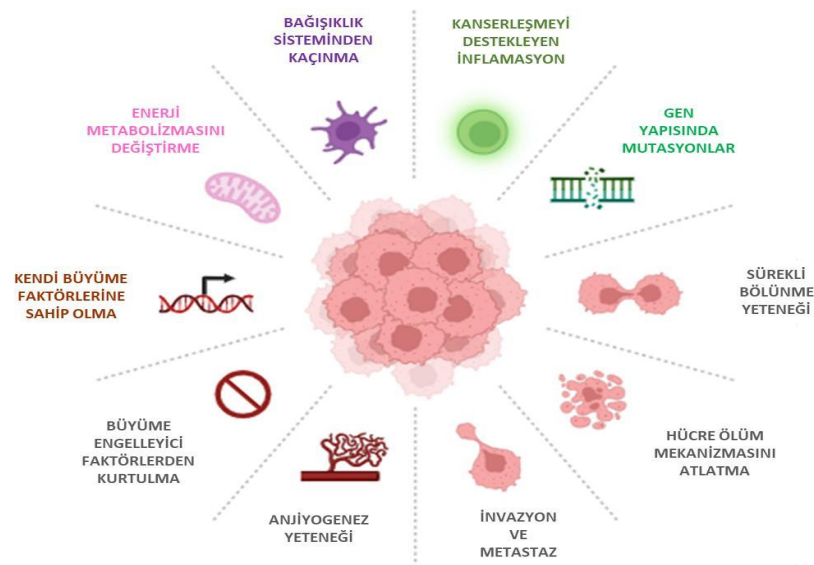
Çalışmada ER stresi ile ilgili (*GADD45B*, *SERPINE1* ve *CHOP* genleri) ve UPR sinyal yollarıyla (*CHOP* geni) ilişkili genler hedef olarak seçilmiştir. Deneysel düzenek olarak, pankreas kanser tedavisi için model bir sistem olan ve ticari olarak elde edilebilen PANC-1 hücre soyu (Deer El ve ark.,2010) seçilmiş ve GEM'in hedef genlerin ekspresyonlarına yaptığı etkiler araştırılmıştır.

Deneyimizde ilaç uygulanan (GEM+) -I grup, ilaç uygulanmış ve yüzey belirteçlerine göre ayrıştırılan (CD24+/CD44+) -II grup ve ilaç uygulanmayan yüzey belirteçlerine göre ayrıştırılmayan ve ilaç (GEM) uygulanmayan grup-III grup (kontrol grup) olacak şekilde belirlenmiştir. PANC-1 hücrelerinde ilaç uygulanan (GEM+) ve ilaç uygulanarak (GEM+) ve yüzey belirteçlerine göre ayrıştırılma yapılan (CD24+/CD44+) hücreler grubunun ekspresyon ifade düzeyleri III kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak detaylı şekilde analiz edilmiş ve QRT-PCR verileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz veriler, *GADD45B*, *SERPINE1* ve *CHOP* gen ekspresyonlarının kanser hücrelerinin ilaca verdiği cevabın takibinde fayda sağlayacağını düşündürmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, vücudun hemen hemen her dokusunda görülebilen, apoptozdan kaçan ve sürekli düzensiz büyüme gösteren hücrelerin anormal çoğalmasıyla yakından ilişkilidir. Her kanser türü, kanserin konumuna, hücrelerdeki genlerin mutasyonlarına ve moleküler yapıya dayalı bireyin kendine özgü davranış biçimine sahip olmasına göre birbirinden ayrt edilir. Anti-tümör ilaçlarla kanserin aradan kaldırılması için yapılan bilimsel çalışmalar kanser türlerini eşsiz yapan farklı faktörler nedeniyle günümüzde yetersiz kalmaya devam etmektedir (Cooper GM, 2000, Sudhakar A,2009). Dünya çapında neredeyse her altı, Türkiyede ise her beş kişinin ölümünden biri kanser sebebiyle sonuçlanmaktadır (McGuire S, 2016). Erken teşhis verilebilmesi sayesinde tüm kanserlerde genel sağ kalım süresinde gözle görülecek derecede uzamış olmasına rağmen, kanserle ilişkili ölümler halen dünya çapında ikinci en büyük ölüm nedeni sayılabilir (Stewart B.W., Wild C.P, 2014).



Şekil 2.1 Kanser hücresinin nitelikleri (Hanahan, & Weinberg, 2011).

Vücudun kontrol mekanizmasının anomaliyalari kanseri geliştirir. İnsan vücudunun bazı hücreleri tüm kanser tiplerinde durmadan bölünerek çevre dokulara yayılır. Normal hücreler yeni hücreleri oluşturabilmek için büyür ve bölünürler. Hücreler yaşlandıkça veya hasara maruz kaldığında apoptoza uğrarlar. Kanser gelişimine zemin hazırlayan bahs ettiğimiz süreçteki bozukluklardır. Ölmeleri gerekmesine rağmen hayatta kalan sürekli bölünüp

çoğalan anormal hücreler tümör adlı yeni kitleler oluşturur. Birçok kanser türü doku kitlelerine sahip katı tümörleri oluşturur. Malign kanserli tümörler yakındaki dokulara yayılabilir veya istila edebilir. Kanser hücrelerinin bazıları büyüyerek lenf veya kan dolaşım sistemi yoluyla vücutta diğer organ ve dokulara göç edebilir. Aktüel belirli ilaçlar kemoterapi tedavisi için halen azlık teşkil etmekte ve yeterli düzeyde sağlanamamaktadır. Kanseri kısıtlayan yeni ilaç geliştirme çalışmaları geleceğe yönelik olarak önümüze gelmekte ve umut vadetmektedir. Kanserle ilgili çalışanlar, kanser karşıtı ajan ve ilaçları geliştirme çabalarına yoğunlaşmış bulunmaktadır (Abu-Surrah ve diğerleri, 2008, Ferraz ve diğerleri, 2009, Ulukaya ve başkaları, 2011).

2.1. Neden Pankreas Kanseri?

Pankreasın malign neoplazmalarının çoğunluğu adenokarsinomlardan ibarettir, en yaygın malignite olan PDAC pankreasa özgüdür. Ameliyata uygun bulunmayan, ileri evrede nonspesifik semptomlarla başvuran pankreas kanseri hastalarının yalnızca %10-15'i cerrahi rezeksiyon adayıdır. Ameliyat sonrası adjuvan sistemik tedavi almalarına rağmen ne yazık ki, çoğu hastada nüks gelişir. Bu kötü prognoz, hastalığın geç teşhisinin, erken evrede tanı konmasını sağlayan biyobelirteçlerin eksikliğinin, erken metastatik yayılımın ve nihayetinde sistemik tedavilere direncin bir sonucudur (Neoptolemos JP. 2011).

Ameliyat sonrasında uygulanan en iyi mevcut standart tedavilerle dahi, olguların %25'inden azının hayatta kalma süresi toplam 5 yıldır (Oettle, Post, Neuhaus ve diğ., 2007). Pankreas kanserleri oldukça metastatik ve agresif bir yapıda olduğundan, teşhis ve tedavi protokollerini iyileştirmek amacıyla tüm dünyada araştırmalar yoğun tempoda devam etmektedir. Hastalarda tedaviye geç başlamanın sebebi pankreas kanserinin erken tanısındaki yetersizlikler ve metastazdan sonra bulunmasıdır (Riva vd, 2016). Son yapılan bilimsel kanser çalışmalarında erken teşhisin verilebilmesindeki zorluklar pankreas kanserindeki 5 yıllık sağkalım oranının %2 ile %9 arasında, yani düşük değerde olduğu göstermiştir (Ilic, 2016). Erken evrede metastaz yapabilme ve agresif tümör oluşumuyla radyoterapi ve kemoterapiye direnç geliştirebilme kabiliyeti pankreas kanserinin öldürücü kanserler arasında yer almasının başlıca nedenlerindedir (He ve diğ. 2012, Ottenhof ve diğ. 2011).

Pankreas kanserinin önemli özelliklerinden biri, tümör etrafında terapötik ajanların verilmesini engelleyen yoğun desmoplastik reaksiyonun olmasıdır (Erkan ve diğerleri, 2012).

PDAC tüm pankreatik kanserlerin %90'undan fazlasını oluşturur. Sık görülen pankreatik malignite olan PDAC`ın insidansı giderek artmaktadır (Torre, L.A. ve ark., 2012). PDAC genellikle kanserin geç evresinde, belirgin klinik semptomların bulunduğu durumlarda teşhis edilir. Bunun altında yatan nedenlerden biri pankreasın özel anatomik konuma sahip olmasıyla ilgilidir. Erken tanı PDAC hastalarında potansiyel tedavi varyantı olarak akla ilk cerrahi rezeksiyon gelir. Hastaların %80`den fazlasında ilk tanı zamanı metastatik veya tekrarlayan durumlar görülmektedir (Koh, E.K., ve ark., 2023). Genellikle karaciğere veya lenf düğümlerine metastaz yapan bu kanser türü (Kern ve diğerleri, 2002) metastazdan sonra ilerlemiş kanserlerde teşhis edilir. Sonuçta PDAC, ilaç direncini yükselten etkili hücre koruyucu mekanizmalara sahip olduğundan kansere karşı terapötikleri etkisiz hale getirebilmektedir. Bu agresif davranışlar ve ilaç direnci nedeniyle, PDAC`ta tahminen medyan sağkalım süresi 6 ay kadar olmaktadır (Fesinmeyer ve diğerleri, 2005).

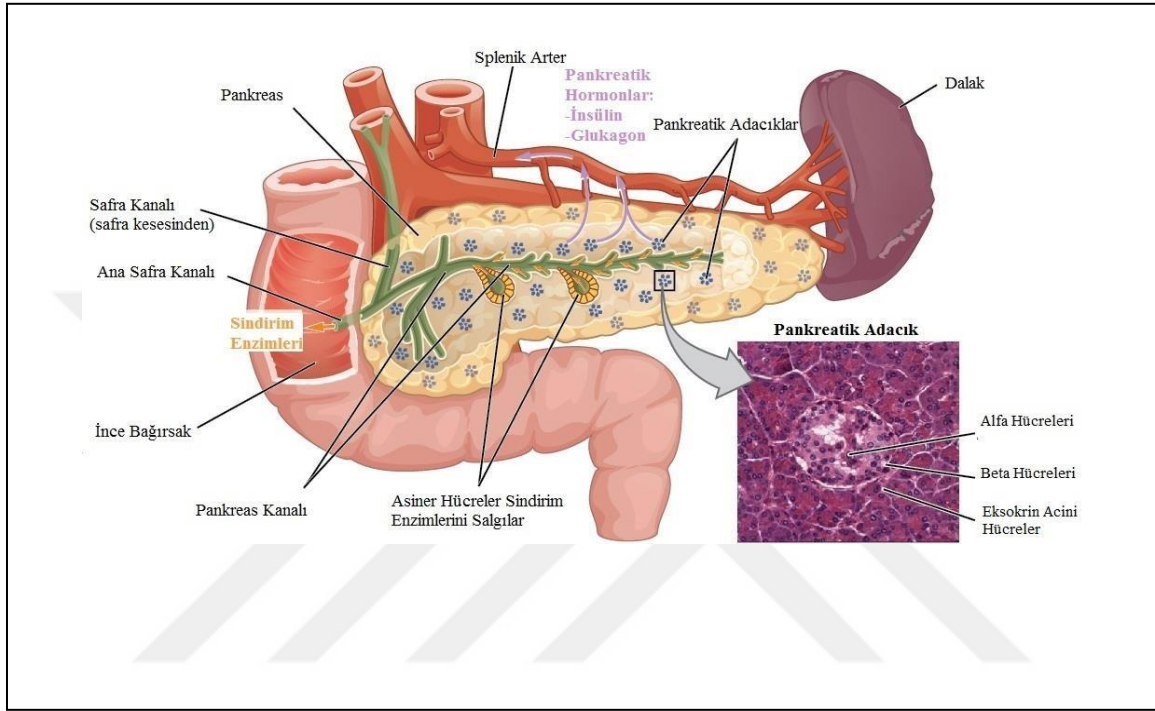
2.1.1 Pankreas Anatomisi ve Fizyolojisi

Endodermal germ tabakasının embriyonik ön bağırsağından meydana gelen, görevi metabolik homeostazı korumak olan (Gittes, 2009), gastrointestinal sistemin bir parçası olan pankreas, sağlıklı yetişkin bireyde ortalama 100 gr ağırlığa sahip, 15 ve 25 sm arası uzunlukta olan; retroperitoneal alanda yerleşmiş, uzun ve lobüler şekilli, sağda onikiparmak bağırsak ve solda dalağa komşu olan karının üst tarafında enlemesine uzanan, besinlerin sindirimini sağlayan enzimleri üreten bir salgı bezi olan glandüler organdır (Röder ve diğerleri, 2016). Total pankreas 2 ana bölümden ibarettir: %95`lik ekzokrin pankreas kısmı ve %1-2`lik endokrin pankreas kısmı (Longnecker 2014).

Pankreas fonksiyonlarının bozukluğu pankreatit, diabetes mellitus, ölüm oranı en yüksek pankreas kanseri gibi bir sıra yaygın hastalıklara sebebiyet vermektedir (Braganza ve ark., 2011, Hezel ve ark., 2006, Polonsky, 2012). Pankreas kanserlerinde ekzokrin tümörler daha yaygın olarak görülmektedir (Vujasinovic vd., 2017).

Endokrin pankreas Langerhans adacıklarında bulunan, vücuttaki kan şekeri seviyelerini düzenlemek için kana insülin, glukagon, somatostatin gibi hormonları, pankreatik polipeptidleri salgılar (Longnecker 2014). Ekzokrin pankreas ise asiner, duktal ve sentroasiner hücrelerden oluşur. Asiner hücreler, kanallar yoluyla duodenuma taşınan sindirim enzimlerini (tripsinojen, kimotripsinojen, lipaz ve amilaz) üretir. Bu enzimler sonradan ince bağırsağa girerek diyet makromoleküllerinin (proteinler, karbonhidratlar ve lipidler) sindirimine yardım

ederler (Keller ve Layer, 2005). Pankreas rejenerasyonunda rol alan sentroasiner hücreler, kanaldan pankreas asinüsüne uzanan özel hücrelerdir. Her iki bölümde olan yıldız hücreleri (PSC'ler), hücre dışı matris salgılayan ve sitokin kaynağı olabilen miyofibroblast benzeri hücrelerdir (Anna C. Lilly, ve başkaları, 2023). Anlatılanlar şekil 2.2`de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Pankreas yerleşimi (Micrograph provided by the Regents of University of Michigan Medical School © 2012).

2.1.2 Pankreas Kanseri Sınıflandırılması ve Tümör Evreleri

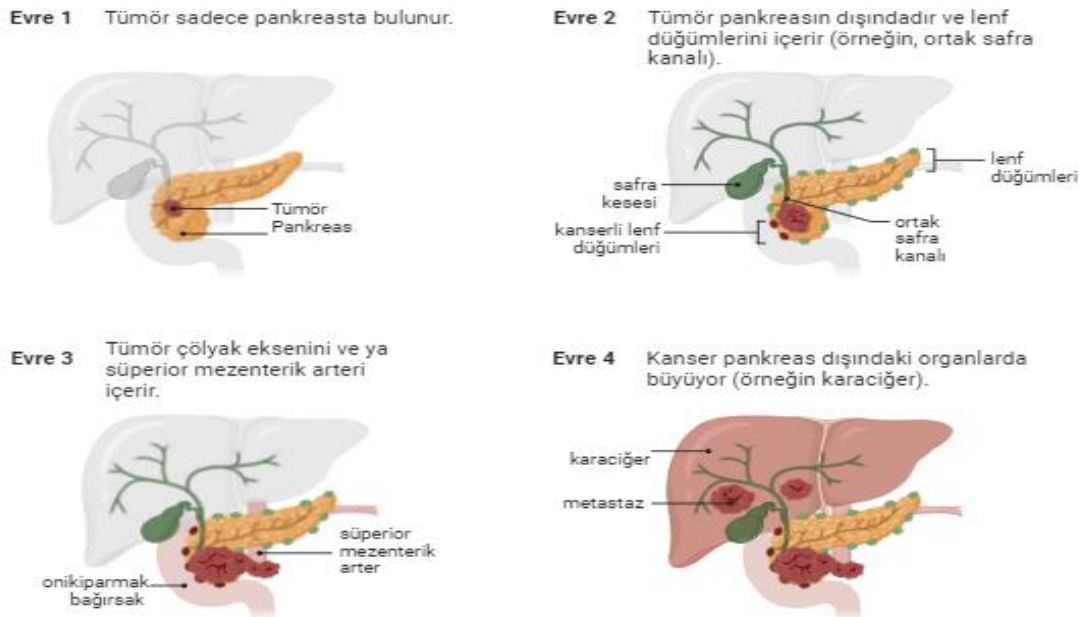
Kansere bağlı ölüm oranı sıralamasında 7'inci sırada yer alan Pankreas kanseri (PK) agresif bir kanser türü olup, yayılım hızı yüksektir (Raimondi S ve ark., 2009). Pankreas kanserinin üç karakteristik belirtisi, hastaların %50'sinden fazlasında en az bir tanesi görülen sarılık, karın ağrısı ve kilo kaybıdır. Pankreas kanserinin belirtileri sinsi başlar ve zaman içinde kademeli olarak ilerler. Bunlara bazen sırta yayılan epigastrik ağrı, kilo kaybı, halsizlik, mide bulantısı ve yorgunluk dahildir (Filippo De Braud ve ark., 2004).

“Pankreas kanseri” monolitik bir hastalık gibi görünsede, aslında pankreas nöroendokrin tümörü gibi düşük dereceli neoplazmalardan, invaziv duktal adenokarsinom gibi oldukça ölümcül karsinomlara kadar geniş yelpazede birçok hastalık şeklinde tezahür eder (Hruban RH ve ark., 2007). Tablo 2.1`de Pankreas neoplazilerinin kısa özeti verilmiştir.

Tablo 2.1. Pankreas neoplazilerinin kısa özeti (Hruban RH, et al 2007).

Tümör Tipi	Brüt görünüm	Ana Özellikler
Asiner hücreli karsinom	Sağlam	Nadir, ekzokrin enzim üretimi, agresiftir.
Adenokarsinom (duktal)	Sağlam	Desmoplastik stromada neoplastik bezlerin yaygın düzenlenmesi, sitokeratin 7 ve 19 üretimi olan duktal fenotip, oldukça agresif
İntraduktal papiller mukuslu neoplazm	Kistik	Yaygın gözükür, kanalların içinde ortaya çıkarak luminal müsin, kolumnar müsin üreten neoplastik hücreler üretir, invaziv karsinoma ilerleyebilir.
Mukuslu kistik neoplazm	Kistik	Kadınlarda daha yaygın olan, invaziv karsinoma dönüşebilen, karakteristik over stroması olan sütunlu müsin üreten neoplastik hücreler
Pankreas intraepitelyal neoplazisi	Mikroskopik	Kanal farklılaşması, invaziv adenokarsinomun öncüsü sayılır, daha küçük pankreas kanallarında ortaya çıkar.
Pankreas nöroendokrin tümörü	Sağlam	Malign, ancak duktal adenokarsinomdan daha az agresif olan tekdüze hücreler tabakalar halinde büyür, tuz ve biber çekirdekleri, sinaptofizin ve kromogranin ekspresyonuyla nöroendokrin farklılaşması yaratır.
Seröz kistadenom	Kistik	Büyük çoğunluğu iyi huylu olan merkezi yıldız şeklinde yara izi, kübik glikojen açısından zengin hücreler
Katı-psödopapiller neoplazm	Katı kistik ve	Kadınlarda daha çok yaygın, eksprese CD10 ve CD99, %10'u agresiftir.

Tümörün büyüklüğüne ve yayılmasına bağlı olarak pankreas kanseri evrelere ayrılır. Evre 1'de tümör sadece pankreasta bulunur, evre 2'de tümörün genişlemiş olduğu ve lenf nodlarına ulaştığı, evre 3'te pankreasın yakınlarındaki süperior mezenterik artere geçiş sağladığı, son olarak evre 4'te ise tümörün yakın ve uzak organlara metastaz yaptığı görülmektedir (Şekil 2.3'de anlatılmıştır) (Morana g. ve ark.,2010).



Şekil 2.3 Pankreas Kanseri Evrelerinin Anatomik Olarak Gösterimi (Morana g. ve ark.,2010, Biorender aracılığıyla çizilmiştir.)

2.1.3 Pankreas Kanserinin Epidemiyolojisi

Yaşam tarzındaki farklılıklar, sosyoekonomik durumlar ve yaşlı nüfusla ilişkilendirilen pankreas kanser hastaları gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkelere nazaran gelişmiş ülkelerde daha sıklıkla görülür (Wong vd., 2017). Pankreas kanseri, ABD'de kanser kaynaklı ölümlerin dördüncü sırasında gelmektedir ve dünya çapında tahmini olarak yılda 330.400 ölüme yol açtığı bilinmektedir (Siegel R ve ark., 2013, Prashanth Rawla ve ark.,2019). Cerrahi rezeksiyon tek küratif seçenek olmaya devam ederken, hastaların %80'inden fazlası rezekte edilemeyecek durumdaki bir tümöral yerleşim ile hastanelere başvurur (Torre L.A ve ark., 2012, Li D ve ark., 2004). Ne yazık ki, pankreas kanser hastaları genellikle altı aydan kısa medyan sağkalımı sergiler ve beş yıllık sağkalım oranı %8'lik vakada görülür (Lennon ve diğerleri, 2014).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization-WHO) 2020 yılında yayımladıkları verilerde, dünya genelinde pankreas kanserinin görülme sıklığına göre Türkiye 26'ncı sıradadır ve buna bağlı ölümler de toplam ölümlerin %1,77'ni teşkil etmektedir (Hyuna Sung ve ark., 2021). Türkiye istatistiklerinde her 69 kişiden bir kişinin pankreas kanserine yakalanma riski taşıdığı belirtilmiştir (Orun, 2017). Bu kanser türü genellikle 50 yaş üstü bireylerde daha sıklıkla gözlemlenir, gençlerde nadiren rastlanır ve erkeklerde görülme sıklığı kadınlara nazaran daha fazladır (Bray vd., 2018). Semptomlarının yetersizliği, erken teşhis ve olumlu sonuçlanabilecek tedavi alternatiflerinin yokluğu sebebiyle pankreas kanseri olgularının %50'sinin tanı konulduktan sonra 6 ay içerisinde hayatını kaybettiği bilinir (Miçaud, 2017). Pankreas kanseri metastazlarının genetik evriminin niceliksel analizi 1) ilk mutasyonun ortaya çıkmasından kaynak hücrenin doğuşuna kadar en az 10 yıl sürer; 2) metastazın başlaması en az beş yıl daha sürebilir; ve 3) metastazla ölüm arasında en iyi ihtimalle yaklaşık 2 sene olabileceğini gösterir (Yachida S., Jones S ve ark., 2010).

2.1.4 Pankreas Kanserinin Etiyolojisi

Pankreas kanseri için çok sayıda etiyolojik risk faktörleri tanımlanmıştır, bunların sırasında bireysel özellikler (yaş, cinsiyet, ırk, kan grubu ve genetik mutasyonlar), yaşam tarzı ve çevresel faktörler (beslenme alışkanlıkları, sebze ve folat oranı düşük diyetler, sigara ve içki içme, fiziksel aktivite azlığı ve obezite) ve metabolik hastalık durumu yer almaktadır. Çevresel faktörlerin başında gelen sigara içme, bir günde tüketilen sigaranın miktarına ilişkin 2-3 defa pankreas kanser riskini yükselttiği bilinmektedir (Harnack ve diğ., 1997). Alkol tüketimi ve pankreas kanser ilerlemesinin aralarındaki bağla ilgili epidemiyolojik araştırmalar mevcuttur. Bu faktörlerin katkısının etkili olmadığına dair bulgular çalışmalarda sunulurken, (Farrow, Davis, ve başkaları, 1990), diğer araştırmacılar orta düzeyde alkol kullanımının kansere sebep olmadığını, haddinden fazla tüketiminin kanserle güçlü bağlantısını göstermektedir (Vecchia ve ark., 2016). Pankreas kanseriyle beslenme arasındaki bağlantıyı anlamak niyeti ile yapılan çalışmalarda, hayvansal yağ ve etten (kızarmış veya ızgara) bol diyet ile pankreas kanseri ilişkisinin olabileceği beyan edilmektedir (Calle ve başkaları, 2003). Sebze, meyve, lif ve vitaminler açısından bol beslenmek önleyici faktör gibi düşünülmektedir (Nkondjock ve diğerleri, 2005). Kahve ve çay tüketiminin kanserle bir alakası bulunmamıştır (Dusek, 2010). Yağ dokularında fizyolojik farklılıklara sebebiyet veren obezite, kronik inflamasyon, insülin direnci ve karsinogenezi başlattığı bildirilmektedir

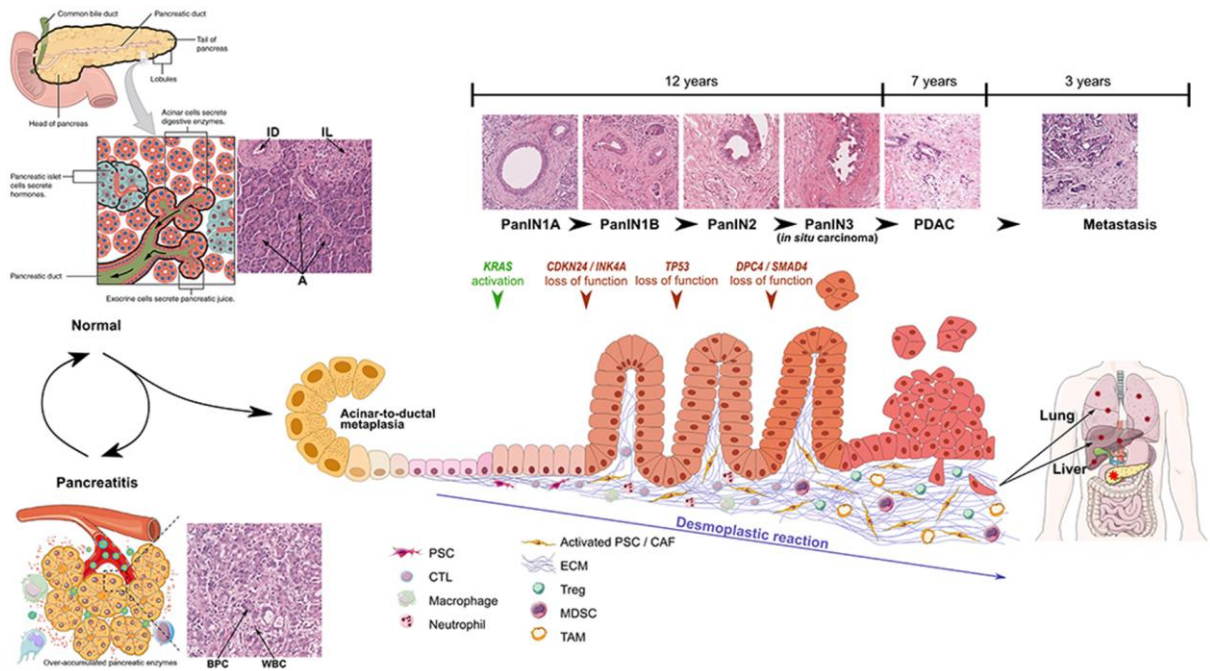
(Cindy, 2015). Uzun süreli tip 2 diyabet ve kronik pankreatitin pankreas riskini yükselttiğine dair çalışmalar mevcuttur. Diğer faktörler arasında, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, kronik hepatit B ve C enfeksiyonu yer alır (Mateos, 2016). Çevresel karsinojenlere maruziyet, pankreas kanseri tehlikesini artırır (Ojajärvi ve ark. 2001). Çinde yapılan yaş ve pankreas kanseri arasındaki ilişkileri irdeleyen bir çalışmada, otuz yaşından sonra insidansın belirgin seviyede yükseldiği, yetmiş-seksen yaşından sonra en üst seviyeye ulaştığı, ortalama tanı yaşının 65 olarak belirlendiği ve elli yaşından evvel tanısı koyulan vaka sayısının 10% olması saptanmıştır (Li, 2009). Irksal kökenin etkisini araştıran ve beş farklı ırk bazında değerlendirme yapan başka bir araştırmada kanser insidansının ABD`de yaşayan Afro-Amerikalılarda olduğu ve arkadan bu grubu Kuzey Avrupalıların, Hawaii`de Polinezyalıların ve Yeni Zelanda`daki Maorilerin izlediği saptanmıştır (Silverman, 2003). Pankreas kanser olgularının 7 ila 10%`inde ailesel öyküsü bulunmaktadır. Pankreas Tarama Kılavuzu'nun 2012 yılında yayımladıkları yayında, 2 kuşak yakınında pankreas vakası bilinen kişilerin, birinci dereceden akrabalarından bir kişinin bile pankreas kanserinden etkilenme ihtimalinin olduğu ifade edilmiştir (Mateos ve Conlon 2016). Aile öyküsü olan birinci dereceli yakınların bazılarında pankreas kanserine ilerleyebilen öncü lezyonlar geliştirme olasılığının kanser geliştirebilme riskine yakınlığının yüksek olduğu kabul edilmiştir (Klein, A.P, 2021).

2.1.5 Pankreas Kanseri Tiplerinin Histolojisi

Bir dizi aşamalı mutasyonu takiben gelişen pankreas adenokarsinomu, normal mukozadan spesifik öncü lezyonlara ve sonuç olarak invaziv maligniteye kadar uzanır (Mohammed ve diğerleri, 2014). PDAC`lar hiperplastik lezyonların gelişimiyle (pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) ve intraduktal papiller müsinöz neoplazm (IPMN)) ortaya çıkar (Grant ve diğ., 2016) IPMN'lerin görüntüsü pankreas kanalına uzanan papilla (parmağa benzeyen) yapısındadır (Hruban, 2001). Pankreatik duktusta yerleşen mikroskopik, non-invazif epitelyal proliferasyonlar pankreatik intraepitelyal neoplazmalar (PanIN-asinarduktal metaplazi) olarak tanımlanır. Asinar hücreler kademeli şekilde KRAS aktivasyonu ve pankreatik yıkımı takip ederek özelliklerini kaybederek duktal özellik kazanırlar (Gooiker ve dostları, 2014). Birikmiş mutasyonlarla birlikte çoğalan anormal hücre birikimleri bu lezyonların dört sınıfta incelenmesine olanak tanır: PanIN-1A, -1B, -2 ve -3.

Sistein proteaz aile üyeleri (kaspazlar) apoptozu düzenler. Değişik uyarıcılarla harekete geçen başlatıcı pro-kaspazların aktivasyonu uygulayıcı pro-kaspazları ayırır, onlar da belirli

substratların ayrılmasını katalize ederek kromatin zenginleşmesi ve apoptotik cisimleri oluşturarak nükleer parçalanmayı yaratabilir. Morfolojik evrim, pankreas intraepitelyal neoplazi olarak adlandırılan öncü lezyonların oluşumuyla başlar ve artan histolojik dereceleri takiben invaziv adenokarsinomaya doğru ilerler. FADD benzeri ICE inhibitör proteinleri (FLIP), cIAP, XIAP ve survivin dahil olmakla apoptoz (IAP) ailesi inhibitörü, tümör nekroz faktörüne bağlı apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) kanser direncine yol açan pro-kaspazların aktivasyonunu inhibe eder (Grant ve ark. 2016).



Şekil 2.4 Pankreas kanserinin gelişim modeli (Sophie Liot, Jonathan Balas, ve ark., 2021)

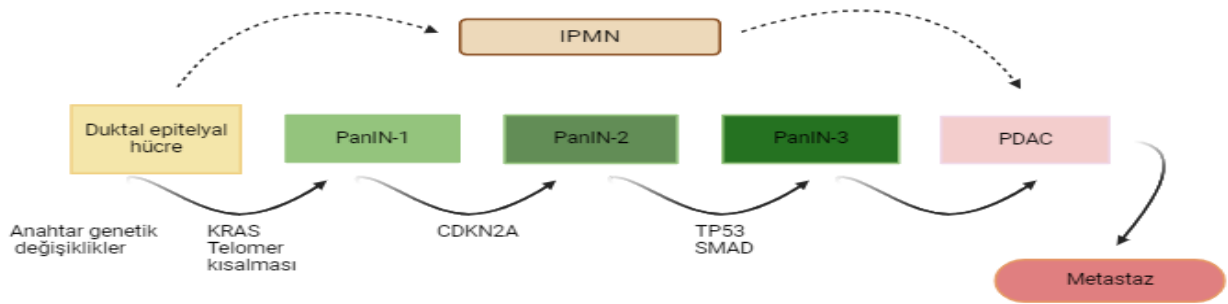
2.1.6 Pankreas Kanseri Moleküler Biyolojisi ve Patolojisi

Tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde somatik mutasyonlar bir araya gelince herhangi bir dokuda kanserleşmeyi tetikleyerek neoplazmaları oluşturur. Biri onkogen (*KRAS*), üçü tümör baskılayıcı (*CDKN2A*, *TP53* ve *SMAD4*) gen olan dört önemli yönetici (“driver-sürücü”) gende oluşan değişiklikler sonucunda pankreas kanserinin geliştiği bildirilmiştir (Hruban RH,2001). Yapılan çalışmalarda, tümör dokusunun %92’sinde *KRAS* onkogeninde somatik mutasyon (Bailey ve ark. 2016), yaklaşık %75’inde *TP53* geninde (Li, 2004 ve Goggins 2005), %50’sinde ise *SMAD4* (Hahn ve ark. 1996) geninde inaktivasyon gözlemlenmiştir.

Bu genlerden üretilen proteinler değişikliğe uğrar ve hücre içerisinde farklı özellikler, ya da artmış aktivite kazanırlar. Mutasyon ve/veya delesyonlar bu genlerin inhibe edici

fonksiyonlarının ortadan kalkmasına neden olur (Friend ve ark. 1988).

Onkogenler proto-onkogen olarak tanınırlar ve hücre döngü ilerlemesini regüle eden genlerin mutasyonları sonrasında belirgin olmaktadır (Sakorafas ve ark. 2000). Tümör supresör genlerin ise hücre proliferasyonunun inhibe edilmesinde rolü vardır. Onkogen ve TSG'lerde olan değişimler, hücre çoğalmasının artması ve apoptozdan kurtulma becerisine sahiptirler (Abramson ve ark. 2007). PDAC için başlıca 4 genetik faktör: onkojenik *KRAS* ve TSG'lerin (*CDKN2A*, *TP53* ve *SMAD4*) inaktivasyonu (Grant ve ark. 2016)



Şekil 2.5 Pankreas kanserinin progresyon modeli (Grant ve ark. 2016, biorender aracılığıyla türkçeleştirilerek çizilmiştir.)

KRAS mutasyonları pankreas kanserinin tanımlayıcı genetik özelliklerinden biridir (Bailey ve ark. 2016). İnsan PDAC vakalarında kodon G12'de bulunan, GTPaz kodlanmasından sorumlu (Downward 2003) *KRAS* genindeki nokta mutasyonları intrinsik GTPaz aktivitesini zayıflatır ve GTPaz aktive edici proteinler (GAP) arasındaki etkileşimi bloke eder. Bunlar proliferasyon artışı, apoptozdan kaçma (sağkalım), tümör mikroçevresinin tazelenmesi süreçlerinde görevi olan sinyal yollarının kalıcı aktivasyonuna sebep olan mutasyonlardır (Pylayeva ve başkaları, 2011).

CDKN2A geninde olan mutasyonlar ileri dereceli PanIN lezyonlarında bulunur (Wilentz, 1998). Tümör supresör olarak bilinen hücre döngüsünün G1 kontrol noktasında rol alan p16 (Lukas ve ark. 1995) ve p53'ün stabilizasyonu ile büyüme durdurulması ya da apoptozisi indüklediği bilinen (McWilliams ve ark. 2011) p14^{ARF} proteinini kodlar (Sherr 2001).

TP53 geni inaktif halde 17'nci kromozomda lokalizedir (Li ve diğ., 2004, Goggins 2005, Hruban ve ark. 2001) ve hücre döngüsü progresyonu, apoptoz, DNA hasar tamiri gibi olayların düzenlenmesinde görev yapan transkripsiyon faktörü (p53'ü) kodlar.

Epitelyal hücre büyümesini zayıflatan (transforme büyüme faktörü beta (TGF- β)) sinyal yolağına yardımcı olan (Miyaki ile Kuroki, 2003) *SMAD4* (*DPC4*) genidir. Hücre döngüsünün karmaşık progresyonuna neden olan *SMAD* inaktivasyonu (Hansel ve ark.2003) ve p53 inaktivasyonu (Maitra ve ark. 2003) *CDKN2A*'daki gen kaybını takiben ortaya çıkarak ileri evre PanIN lezyonlarında bulunmuştur (Maitra, 2003, Wilentz., başkaları, 2000).

2.1.7 Pankreas Kanseri Kliniği ve Tedavisi

Tanısal açıdan zorluk teşkil eden vakaların çoğunluğu lokal ilerlemiş veya metastatik hastalıkla geç başvuru yapmaktadır (McGuigan, A ve ark., 2018). Tanı amaçlı veya erken teşhis için kullanılan güvenilir tümör belirteçleri olmadığından, PDAC'in kesin tanısı spesifik kan veya idrar tahlillerinde ortaya çıkmaz. Bu nedenle, doğru tanı için yüksek çözünürlüklü ultrason, Endoskopik Ultrason (EUS), Bilgisayarlı Tomografi (BT) veya Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) gibi özel görüntüleme yöntemleri gereklidir (Hessmann, E. ve ark., 2020). Pankreas kanseri tanısı için histopatoloji analizi veya sitoloji altın standart sayılır. Cerrahi rezeksiyon yapılamayan hastalar için net bir patolojik tanıya ihtiyaç duyulmaktadır. Histopatoloji veya sitoloji numuneleri elde etmek için kullanılan yöntemler: 1) EUS veya BT kılavuzluğunda biyopsi; 2) asit sitolojisi; ve 3) laparoskopi veya açık cerrahi zamanı yapılan biyopsidir (Zhao, Z. and W. Liu, 2020).

Tüm gastrointestinal malignite formları arasında en kötü sağkalım ile ilişkili olan pankreas adenokarsinomudur. Tanı konulduktan sonra çoğu hasta bir sene içinde ölür. Hayvan modelleri kullanılarak yapılan epidemiyolojik deneyler sonucunda pankreas kanseri insidansının artmasını destekleyen sigara içme ve alkol kullanımının gelişmiş ülkelerde daha fazla olduğu bildirilmiştir. Pankreasın malign lezyonlarının %8'inde kalıtsal kanser sendromları bulunur (Lockhart, AC. ve ark. 2005). Pankreas kanseri için tek potansiyel tedavi seçeneği olan cerrahi rezeksiyonun ve bu tedaviye sonradan adjuvan kemoterapinin eklenmesinin vakaların sağkalımlarını yükselttiği söylenmiştir (McGuigan, başkaları, 2018). Whipple prosedürü (Pankreato-duodenektomi), merkezden uzak veya bütünsel pankreatektomi gibi cerrahi tedavi yöntemleri tümörün yerleşimiyle ilişkili olarak uygulanmaktadır (McGuigan, 2018). Adjuvan tedavi için yalnız GEM veya sadece 5-florourasil (5FU) kemoradyoterapi kullanıma yararlıdır (Jimenez, 2010; Regine, Winter, 2008). PDAC, Pankreas Stellar Hücrelerinin (PSC) yoğun olduğu stroma açısından zengin

karsinomlardan biridir. PSC'ler kanser hücreleriyle çapraz diyalog yoluyla tümör ilerlemesinde önemli rola sahiptir ve kanserle ilişkili fibroblastlara diferansiye olur. Tümör mikro ortamına salınan PSC'den türetilen salgı faktörleri (büyüme faktörleri) EMT'yi teşvik ederek ilaç direncini indükler. PSC'ler EMT'nin yeniden şekillenmesine yardımcı olur ve hücre göçünü uyarabilir. Sadalanan özellikler, insan PDAC tümör modelinde PSC'lerin önemini göstermektedir (Hwang, H.J. ve ark., 2019). Antitümör ilaçlara direnç, kemoterapinin etkinliğini kritik radeye getirebilir. FOLFIRINOX (5-florourasil, oksaliptatin, irinotekan, lökovorin), GEM/nabpaklitaksel ve lipozomal irinotekan/5-florourasil kombinasyonlarının ileri evre PDAC için fayda sağladığı gözlemlenmiştir.

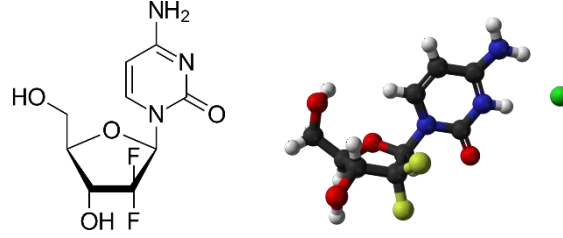
Bu tez yazısında pankreas kanseri hakkında bilgiler, tedavi protokollerinin (cerrahi, adjuvan kemoterapi, radyoterapi ve neoadjuvan tedavi yöntemlerinin) incelenmesi için tekrar değerlendirilmeye alınmıştır (Lockhart, ve ark., 2005). Biyolojik ajanların hedeflediği moleküller veya akıllı moleküller ireliyedönük çalışmaların yardımıyla gelişmeye devam etmektedir. Yeni biyobelirteçlerin bulunması, her bir hastaya özgün doğru tedavinin uygulanabileceği ve hayat şartlarının iyileşmesi üzerine olumlu sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir. Pankreas kanseri ile ilişkili yükü azaltmak için yeni araçların ve dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine adaptasyonla önemli ilerlemeler kaydedilmektedir.

2.1.8 Gemsitabin

Hücre ölümünü tetikleyen, DNA sentezini engelleyerek etki eden kemoterapi ilacı olan gemsitabin (2'-Deoxy-2',2'-difluorocytidine) farklı rejim ve dozlarda klinik çalışmalarda değerlendirilmiş ve medyan sağkalım iyileştirmesiyle ileri evre pankreas kanseri için standart palyatif kemoterapi olarak benimsenmiştir. Mevcut standart bakım kemoterapisi olan GEM, öncelikle hastaya faydalı olacak şekilde onaylanmış ve tek başına veya diğer ilaçlarla (FOLFIRINOX gibi diğer çoklu ilaç rejimleriyle) kombinasyon halinde, sağ kalımı yalnızca mütevazı bir şekilde uzatmıştır (Burriss HA ve ark., 1997, Conroy T ve ark., 2011, Gourgou-Bourgade S,ark., 2013, Peddi PF ve ark.,2012).

GEM-yapay pirimidin nükleozid ön ilacı olup, deoksisitidinin 2' karbonu üzerindeki hidrojen atomlarının yerini florun aldığı sentetik şeklidir. İlk defa 1980'lerin başında Larry Hertel'in "Eli Lilly and Company" firması tarafından bir antiviral ilaç olarak üretilmiş, daha sonra lösemi için denenmiş, 1990 yılının başlarında ise klinik öncesi pankreas kanserinde bir yıllık

sağkalım süresini uzattığı bulunmuştur. 1996 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Gesto, Cerqueira, Fernandes, & Ramos, 2012). Şekil 2.6`da GEM`in kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.6 Gemsitabinin kimyasal yapısı (Gesto ve ark., 2012)

Antimetabolit antineoplastik ajan GEM, 1996 yılında ABD`de FDA tarafından onaylanarak kullanılmış, 1997'deki randomize deneme çalışmasından sonra pankreas kanserinde standart kemoterapötik ajan haline gelmiştir (Heinemann V. ve ark., 2005, Hertel L.W. 1990). Sitotoksik etkilerini gemsitabin trifosfatın DNA'ya dahil edilmesiyle ortaya koyan ve maskeli zincirin sonlandırılmasına yol açan nükleozid pirimidin analogu olan gemsitabin (GEM), ilerlemiş PDA için birinci basamak tedavi olarak tanıtılmıştır (Burris HA, 1997). PDAC hücrelerinde radyosensitiviteyi arttırarak etki eden GEM, metastatik olmayan ve ameliyata uygun olmayan pankreas kanserli hastaların tedavisinde mevcut seçeneklerden sayılan kemoradyoterapi ile birlikte kullanılmaktadır (Waissi, W., ve ark., 2021).

2.1.9 Gemsitabinin Etki Mekanizması

Nükleozidler için moleküler taşıyıcılar (SLC29A1, SLC28A1 ve SLC28A3) aracılığıyla GEM hürelere taşınır ve hidrofilik özellik gösterir. Hücre membranından geçtikten sonra GEM`in yapısına bir fosfat eklenir ve GEM monofosfat (dFdCMP) halini alır. Deoksisitidin kinaz (DCK) enzimi tarafından katalize edilen GEM, kalan enzimler tarafından iki fosfat daha eklenmesinden sonra GEM trifosfat (dFdCTP) olarak aktif hale gelir (Alvarellos ve ark., 2014; Mini, Nobili, Caciagli, Landini, & Mazzei, 2006). Hücre çoğalması esnasında GEM, yeni sentezlenen DNA zincirlerine dahil edilir ve yanına normal bir nükleozid bazının eklenmesine izin verir. Bu, gemsitabin "hatalı" bir baz sayıldığından "maskeli zincir sonlandırmasına" sebep olur, ancak komşusu doğal nükleozidi nedeniyle hücrenin normal onarım sisteminden (baz eksizyon onarımı) kaçır. Bu nedenle, GEM`in hücre DNA'sına dahil

edilmesiyle daha fazla DNA sentezi engellenerek hücre ölümüne yol açar ve tamiri mümkün olmayan hasar oluşturur (Alvarellos ve ark., 2014; Mini ve ark., 2006).

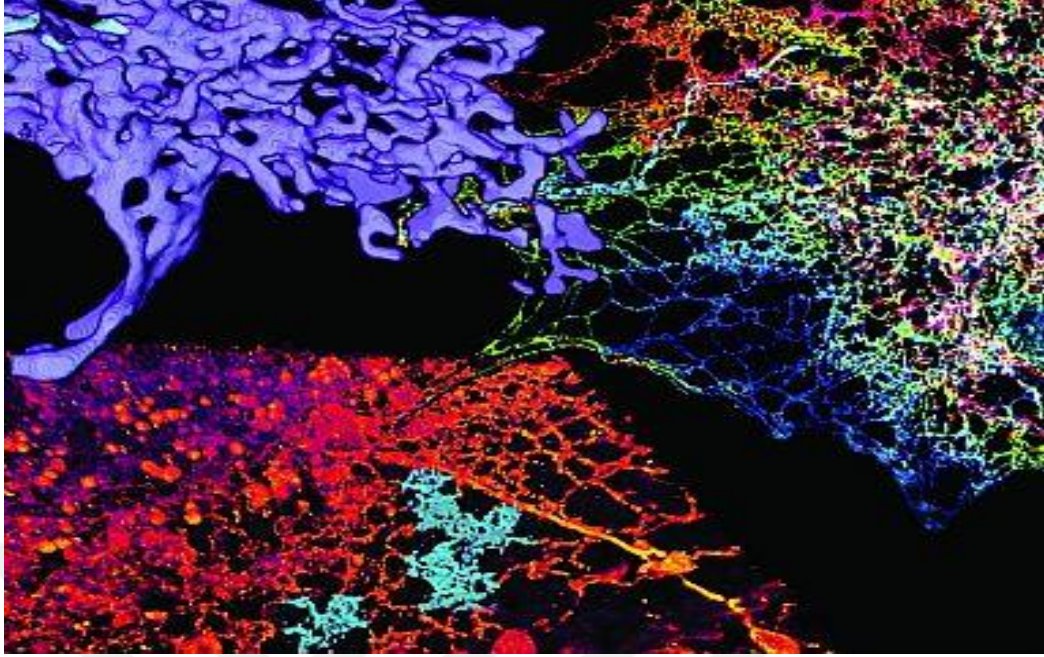
GEM, hastalığın tüm evrelerinde PDAC hastalarına kemoterapi ilacı olarak uygulanırken DNA replikasyonunu ve onarımını inhibe ederek sağkalımda minimal artış göstermektedir (Kobayashi M, Mizuno S, Murata Y,2014). Pankreas kanseri otofaji yoluyla hücrelerin apoptotik yola girmesini önleyen ilaca-gemsitabine yanıt olarak direnç mekanizması oluşturur (Papademetrio D. ve ark.,2014). GEM, rezeke edilemeyen veya metastatik hastalığı olan hastalarda, sağkalım açısından küçük avantaja sahip olmasına rağmen, tedavinin temel taşı sayılır.

2.2 Endoplazmatik Retikulum Yapısı

Hücrelerde lipid biyogenezi, steroid ve kolesterol biyosentezi için uygun ortam sağlayan, karbonhidrat metabolizması, kalsiyum (Ca^{2+}) depolanmasında kalsiyum homeostazının ana düzenleyicisi olan endoplazmik retikulum (ER), sitozol boyunca nükleer membrandan uzanan zarla çevrili tübüller ve yassı sarnıçlardan (kesecikler) oluşan ağ benzeri labirent şeklinde dinamik organeldir (Alberts B, Johnson A, 2000). ER plazma membranından salgılanan zar proteinlerinin taşınma ve entegre edilmesi, katlanması ve translasyon sonrası modifikasyonundan ve Ca^{2+} sinyallemesinden, ilaç detoksifikasyonundan sorumludur [Schröder M, Kaufman R.J 2005]. ER'nin yapısı, lipid transferini teşvik eden membranlar, Golgi aygıtı, vakuoller, mitokondri, ribosomlar, peroksizomlar, geç endozomlar ve lizozomları içerir (G.K. Voeltz (2002). Şekil 2.7`de ER`in yapısı verilmiştir.



Şekil 2.7 Endoplazmatik retikulum yapısı (Sidra Batool, 2022, türkçeleştirilerek alınmıştır.)



Şekil 2.8 Endoplazmik retikulumun süper çözünürlüklü görüntüsü. Periferik ER'nin yoğun kümelenmiş tübül şeklindeki yapılardan oluştuğunu ortaya koyuyor. Bir ER protein belirteci (sağ üst), iç hücresel lipitler (sol alt) ve tübüler matrislerin elektron mikroskobu yeniden yapılandırılması (sol üst) (Nixon-Abell, ve diğerleri, Science.2016). ER: Endoplazmik retikulum

2.2.1 Endoplazmik Retikulum Stresinin Kanserle İlişkisi

Endoplazmik Retikulum Stresi (ER Stresi), glikolizden (glukozun yıkım reaksiyonu) sonra hücrenin glukoz ihtiyacına göre reaksiyonların gerçekleştiği ve lipid sentezi gibi metabolik süreçlerde rol oynayan dinamik tübüler ağ içinde (endoplazmik retikulumda-ER) düzenlenir. Hücredeki ana hücre içi kalsiyum deposu sayılan ER stresi otofagozomların ve peroksizomların biyogenezine katkı sağlar (Hetz, 2012). Ökaryotik hücrelerde toplam proteomun %30'nu oluşturan salgı yolunda sentezlenen proteinlerin uygun şekilde katlanması için ER'deki protein olgunlaşma basamakları önem arz etmektedir. Çevre faktörlerinin ve hücresel sinyallerin aktif entegrasyon yoluyla protein katlanmasının verimliliğinin ve doğruluğunun devamlı olarak ayarlandığı bilinmektedir. Protein katlama gereksinimlerindeki dalgalanmalara uyum sağlayan farklı geri besleme mekanizmaları, salgı yolunun işlevini her yönden etkiler (Ron ve Walter, 2007). ER'de protein katlanması bozulmalarının karşısını alan homeostatik yolun mevcudiyeti, memeli hücrelerinde, katlanmanın farmakolojik inhibisyonunun birkaç ER şaperonunun transkripsiyonel up regülasyonuna neden olduğu eski

bir çalışmada bakılmıştır (Kozutsumi, 1988). Hücreler ER stresi üzerine tamamlayıcı adaptif mekanizmaların bazılarını aktive ederek protein katlanması değişikliklerinin üstesinden gelmek için savaşıyor. UPR, ER lümeninde protein katlama durumu hakkındaki veriyi çekirdeğe ve sitozole ulaştırır (Schröder ve Kaufman, 2005). Geri döndürülemez ER stresinin etkisi altında UPR, hasarlı hücreleri apoptoz yoluyla aradan kaldırır, bu ise stres uyarıcılarının süresi ve yoğunluğu hakkındaki bilgileri entegre eden mekanizmaların varlığını gösterir (Woehlbier ve Hetz, 2011).

2.2.2 Kanser ve Katlanmamış Protein Cevabı İlişkisi

Çevresel faktörlere ek olarak, ER stresini beslemede rol oynayan kanser hücresinin genetik değişiklikleri, UPR (Unfolded Protein Response) yolunun kalıcı aktivasyonunu teşvik eder (Chen; Cubillos-Ruiz, 2021). Örnek olarak, tümörigenezde tümör baskılayıcı genlerin yitirilmesi ve onkogenlerin hiperaktivasyonu, protein sentezini artırarak metabolik açlığı doyurur. ER genişlemesinin hızlı olması çoğalan kanser hücrelerinin bölünebilmesi için gereklidir (Babour ve diğerleri, 2010). Dinamik süreç olan ER stres yanıtlarının düzenlenmesi, hücre kaderinin belirlenmesi UPR'nin süresi ve yoğunluğuyla ilişkilidir.

Daha basit yapıları proteinler sitoplazmada, kompleks yapıya sahip proteinler ise ER'de katlanır (Dobson ve ark., 1998). Oluşan yeni proteinler ER lümeninde düzgün şekilde katlanır, üç boyutlu yapılarına kavuştuktan sonra, ER-yerleşik şaperonlar, oksidoredüktazlar ve glikozile edici enzimlerin yardımıyla çok çeşitli translayon sonrası modifikasyonlara uğrarlar (Oakes SA, 2015, Tu BP. ve ark., 2004). Protein translayonunda N-bağlantılı glikozilasyonu değiştiren bölge olan ER hücre sinyal yollarıyla yakından ilişkilidir (P. Fagone, ve ark., 2009, E. Sammels, 2010).

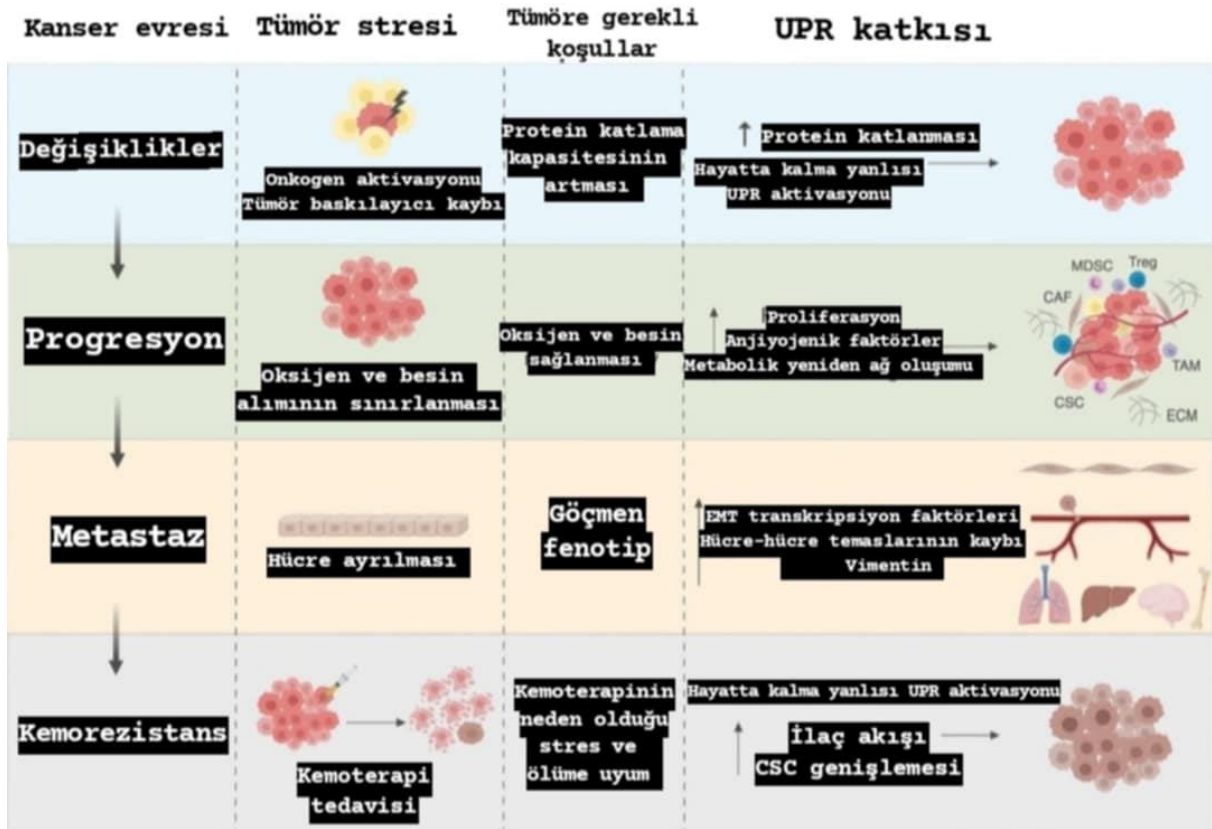
ER'de sıkı kalite kontrolün ardından proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olan, aktiviteleri için kalsiyuma ihtiyaç duyan, kalsiyum tamponlayıcı moleküller şaperon olarak adlanır (Buck ve ark., 2007). Kalsiyum depolarının tükenmesi, besin yoksunluğu, hipoksi, asidik ekstraselüler pH değişiklikleri gibi içsel ve dışsal hücresel yanıtlar ER lümeninde protein katlama verimliliğini bozarak, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin tolere edilebilir bir eşiğin ötesinde birikmesine yol açar, böylece ER stresinin oluşmasına neden olur (Cubillos-Ruiz ve diğerleri, 2017). ER proteinlerinin transkripsiyonunda ve ekspresyonunda artış, çok fazla UPR'nin ER'ye girmesini önleyerek UPR hızının azaltılması ER stresi nedenlerindedir. ER stresi onkogenlerin hiper aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin

düşük seviyelerde ekspresyonuyla UPR yollarını aktifleştirerek güçlendirir (Chen X, Cubillos-Ruiz JR, 2021).

Kalsiyum iyon seviyelerinin tükenmesi, azalan oksijen seviyeleri, viral enfeksiyonlar, besin eksikliği (özellikle glikoz eksikliği), hızlı hücre çoğalması, redoks durumunun bozulması (Pytel D, Seyb K, 2014), şaperon-protein etkileşimlerini teşvik eden şaperon veya hücrel enerji eksikliği, yeterli katlanmayı engelleyen protein mutasyonları ve disülfür bağlarının azalması sebebinden ER`de oluşan proteinler doğru konformasyona ulaşamadıklarından stres uyarıcıları sayılır (Patil C, Walter P 2001.,Marciniak SJ, Zhang K ve ark, 2006).

Normal koşullar altında tüm bu stres sensörleri, ER şaperonu BiP/GRP78 ile kompleks oluşturarak inaktif durumda tutulur. ER lümeni içinde yanlış katlanmış ve açılmamış proteinlerin toplanmasından sonra BiP/GRP78, ER reseptörlerinin lümenal alanlarından salınır (Bertolotti A, Zhang Y,ve ark., 2000).

Hücrenin stresi hissedip, ona yanıt vermesi ve stresi yenmesi hücrenin sağkalımı ve mekanik otofajiyi koruyan hücre homeostazisinin sağlanması için gereklidir. Stres veya UPR, aynı zamanda özelleşmiş hücre ve dokularda inflamatuvar yanıtları tetikleyebilir ve inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde yer alır (S.B. Cullinan, Z. Donna, ve ark., 2003). Şekil 2.9`da UPR`in kanser evrelerinde katkısı gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Kanser evrelerinde UPR katkısı (Emma Madden, Susan E. Logue, ve ark., 2018). (Dönüşüm sırasında ER stresi büyümeyi desteklemek için proteinlere olan talebin artması nedeniyle indüklenir. UPR artan protein katlama kapasitesini sağlar. UPR sinyali, hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre çoğalmasını teşvik ederek tümör oluşumunu destekler. Hızlı büyüme, tümördeki oksijen ve besin maddelerinin kullanılabilirliğini azaltarak daha fazla ER stresine yol açar. Hipoksiye yanıt olarak UPR pro-anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu teşvik ederek anjiyogeneze neden olur. UPR aracılı metabolik yollar yeniden düzenlenerek tümörün besin yoksunluğuyla başa çıkmasına da olanak tanır. Kanser gelişimini desteklemek ve bağışıklıktan kaçmak için çeşitli hücre türleri tümöre eklenir. Böylelikle tümör mikro ortamının (TME) oluşmasıyla sonuçlanır. TME oluşturulduktan sonra hücre ayrılması stresinin üstesinden gelen UPR, tümör hücrelerine yardım ederek epitelyalden mezenkimal geçişi (EMT) sağlar. EMT transkripsiyon faktörü ekspresyonunu artırır ve hücre-hücre bağlantılarını azaltarak metastazı teşvik eder. Uyarlanabilir UPR, kemoterapi tedavisi zamanı hücreden ilaç akışını teşvik ederek tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayarak kemoresistansa neden olur. Kanser hücrelerinde UPR kaynaklı otofaji ve kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) UPR aracılı genişlemesi, tümörün yeniden büyümesini destekler.)

UPR'nin birincil amacı, stresli koşullar altında ER ile ilişkili bozunma (ERAD) sistemlerinin kademesini (anormal proteinlerle başa çıkarak, mRNA çevirisini baskılayarak şaperonları uyarır) (Kadowaki H., Nishitoh H., 2013) ve transkripsiyon faktörleri aracılığıyla ER bileşen

genlerinin ekspresyonunu modüle ederek protein sentezini ve geri kazanımını zayıflatmaktadır. (H.P. Harding, I. Novoa, ve ark., 2000). ERAD ayrıca, uygun ve normal şekilde katlanmış proteinlerin normal hedeflerine taşınabilmesini sağlar (Tsai Y.C., Weissman A.M.,2010).

ER fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik (makrofaj, pankreas beta hücreleri gibi sekretuar hücrelerin farklılaşması) veya patolojik durumlar, hipoglisemi, hiperhomosisteinemi gibi artmış metabolik durumlar, hepatit C gibi enfeksiyonlar (Lai ve ark., 2007), hipodermik hipoksi, besin yoksunluğu gibi hücre dışı çevresel zorluklar, DNA hasarı, oksidatif stress ve metabolik stres gibi çeşitli faktörlerin neden olduğu onkojenik stres, protein salgılanmasında artan talepler, ara katlama formlarının toplanmasını stabilize eden veya teşvik eden salgı yolunun proteinlerindeki mutasyonlar ve kalsiyuma bağlı şaperonlar üzerinde inhibitör etkilerle birlikte kalsiyum seviyelerindeki azalmalar, tümör hücrelerinin UPR'yi bir adaptasyon stratejisi gibi kullanarak büyümesine yardımcı olur (Scott A. Oakes , Am J Pathol.2020).

Tümör hücreleri hızla çoğalan hücreler olduğundan oksijen ve besinlerden yoksun bir ortamda protein ve lipitlere aşırı ihtiyaç duyarlar (Nagelkerke A, et al, 2014). Bu sebepten hayatta kalmak için ER proteinlerinin katlanmasını bozan UPR yanıtını aktive ederek bu yoldan yardım alırlar (H. Claudio,2012). Kanser tedavisinde spesifikliğin elde edilmesine yardımcı olan tümör ve normal hücreler (UPR yolu aktif olmayan) arasındaki bu önemli fark, UPR yolunun hedeflenmesidir. Hücrelerin eşit miktarda ER stresine maruz kalması bile tümör hücrelerinin ölümüne neden olur, bu sonuç tümörojenik olmayan hücreler için geçerli değildir, onların sağkalımı devam eder. Antikanser tedavisinde bu spesifik özellik, UPR'nin uyarlanabilir mekanizmalarını bozarak ER stresini kullanma potansiyelini taşır. Apoptozla sonuçlanabilecek aşırı kontrolsüz ER stresi yaratmak için en basit yol ER'deki yanlış katlanmış proteinlerin miktarını arttırarak protein katlama gereksinimlerinin artırılmasına olanak tanımaktır (Shen X., Zhang K, 2004). ER tarafından protein katlama kapasitelerinin arttırılması kanser hücrelerinin uzun vadede hayatta kalmasına yardımcı olur. Anlatılanlardan anlaşıldığı üzere hücrenin tüm kaderi, yani apoptoza uğrayıp uğramayacağı, hayatta kalıp kalmayacağı veya çoğalıp çoğalmayacağı, UPR yollarının sürecine bağlıdır (Chen X, Cubillos-Ruiz JR (2021).

Meme, pankreas, akciğer, deri, prostat, beyin dahil olmakla insan kanserinin çoğu türünde güçlü ER stres tepkileri belgelenmiştir. Ayrıca, yerinde ER stresi sıklıkla ileri evre hastalık ve kemorezistansla ilişkilidir. Kalıcı ER stresini tolere etme yeteneği, kanser hücresinin hayatta

kalmasını, anjiyogenezi, metastatik kapasiteyi, ilaç direncini ve immünosupresyonu artırır (Wang ve Kaufman, 2014).

Pankreas hücreleri, yüksek hormon ve enzim salgılama işlevleri yerine getirdiğinden gelişmiş ER'ye sahiptir. Tümör hücreleri, UPR gibi adaptif mekanizmaları aktive eden kronik metabolik stres şartlarıyla yüzleşir (Moenner ve ark., 2007). Pankreas kanseri patobiyolojisinde ve inflamasyondaki ER stresinin rolü, kemorezistans ve tümörigenezde önemli faktör olarak geçmektedir (Yadav, 2014). Anti-kanser terapötiklerinden bazıları kronik ER stresini aktive edebilir. İlaça bağlı ER stresi ise, kanser hücrelerinin sağkalımına getirebilir ve sonuçta tümörlerin bazı kemoterapötiklere karşı tepkisiz kalmalarına izin verir (Avril ve diğerleri, 2017). Bütün bunlar göz önüne alınarak, UPR dinamiklerinin potansiyel terapötik hedefler sunabilmeleri belirgindir.

2.2.3 UPR'nin Ana Bileşenleri

ER'de yerleşik üç sensör UPR'yi koordine ederek başlatır: inositol gerektiren enzim 1a (IRE1a; *ERN1* tarafından kodlanır), çift sarmallı RNA aktiveli protein kinaz R (PKR) benzeri ER kinaz (PERK; *EIF2AK3* tarafından kodlanır) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6). TME'de bulunan UPR'nin sürekli aktivasyonu kanser hücrelerinin pro-tümörojenik özelliklerini arttırmakla beraber, anti-tümör bağışıklığını devre dışı bırakarak malign ilerlemeyi ve metastazı kolaylaştırır (Camilla Salvagno, Jessica K. Mandula, ve ark., 2022).

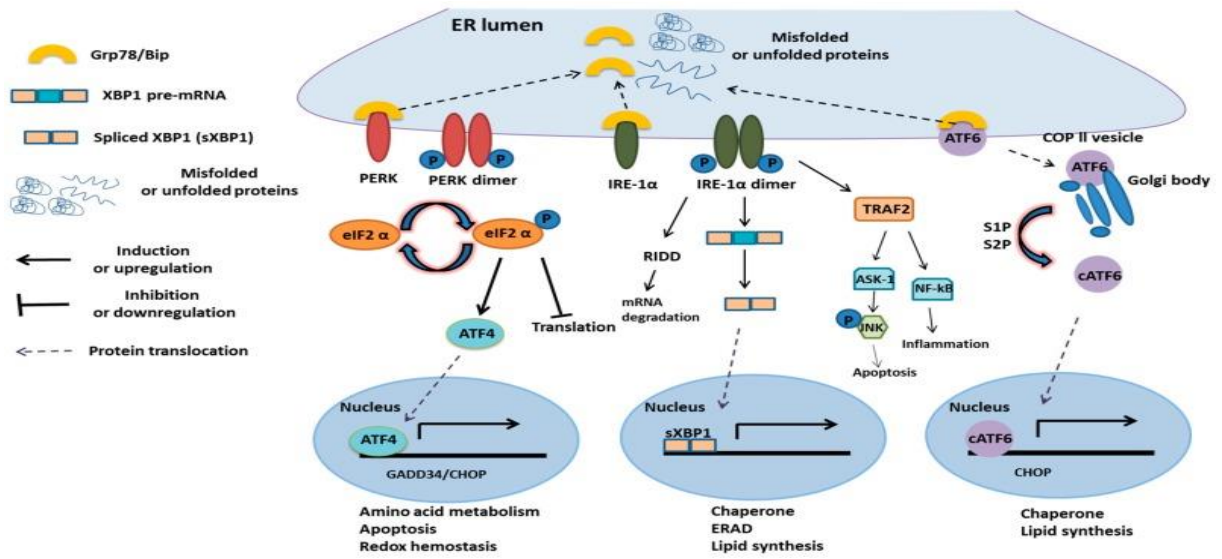
UPR'nin (IRE1a, PERK ve ATF6) alt akış bileşenlerinin hücrel dengeleri sağlıklı hastalık arasındaki hassas dengeyi korur (M. Wang, R.J., Kaufman, 2016).

Isı şoku protein ailesine ait olan immünooglobulin ağır zincir bağlayıcı protein (BiP) veya glikoz düzenlenmiş protein 78 (GRP78) gibi özel şaperonlarla dolu olan ER lümeni (Schwab M. 2011) normal koşullar altında BiP/GRP78 ile kompleks halde inaktif durumda tutulur. ER lümeni içinde yanlış katlanmış ve açılmamış proteinlerin birikmesinden sonra, BiP/GRP78, ER reseptörlerinin lümenal alanlarından salınır (Bertolotti A, ve ark., 2000). BiP/GRP78 ER stres dönüştürücüleri olan IRE1 α , ATF6 ve PERK'i aktive eder. Transmembran protein kinaz IRE1 α , inaktive XBP1'in intronlarını kaldırarak alternatif eklemesiyle XBP1'i aktive eder. XBP1'ler proteinlerin olgunlaşarak katlanması ve ER'den dışarı aktarılması, aynı zamanda hücrenin hayatta kalması için yanlış katlanmış proteinleri değiştirmek veya parçalamak üzere şaperon ve ERAD genlerinin promotörü ile bağlanarak transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Ayrıca, IRE1 α organelde yeni protein üretimini azaltmak için ER hedefli mRNA'ları

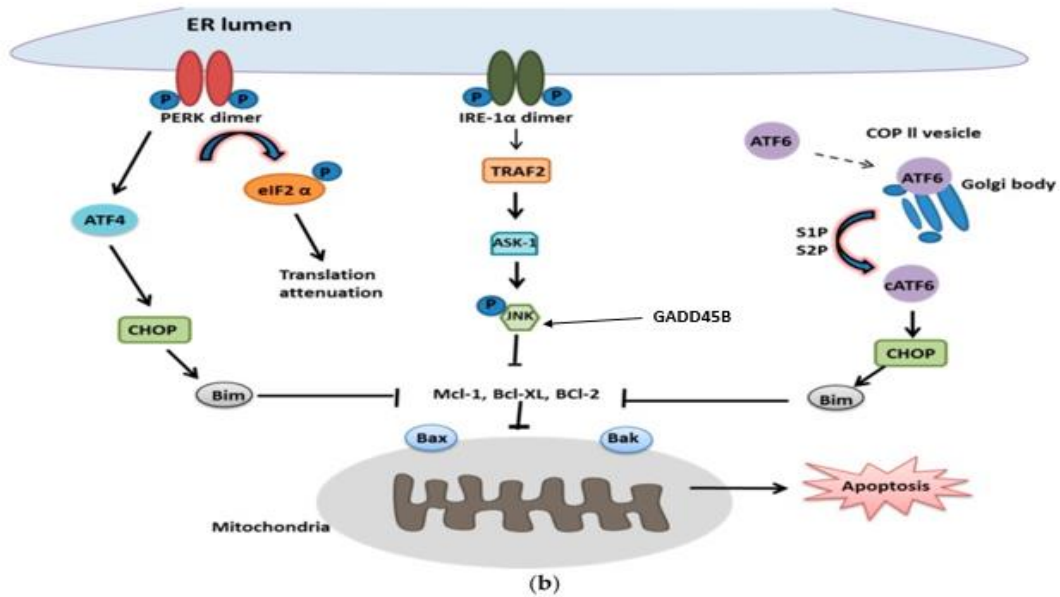
parçalar ve JNK'yi aktive eder. Temel bir lösün fermuar transkripsiyon faktörü olan ATF6, RIP (düzenlenmiş intramembran proteolizi) tarafından aktive edilir, ER membranından Golgi'ye taşındıktan sonra transkripsiyon faktörünü (aktif segment) azade etmek için S1P (Site-1 proteaz), S2P (Site-2 proteaz) proteazları yoluyla kesilir (Li X., Li Z., 2011). ATF6, XBP1 ve CHOP'un transkripsiyonunu indükler (Yokouchi M ve ark., 2008). ATF6 lipid metabolizmasını düzenler, bu da glikoz yoksunluğunda ApoB-100 protein seviyelerini artırır (Szegezdi E., Logue S.E. ve ark.,2006). Yanlış katlanmış proteinler aşırı yüklendiğinde, UPR'nin üç transmembran proteini hücre ölüm sinyallerini tetiklemeye meyillidir. Kanser hücresinin sağkalımını temin eden PERK, serin/treonin sitoplazmik alanına sahip I transmembran ER reseptörü türüdür (Cui W, Ron D, 2011). ER stresi sırasında stres algılayan PERK alanlarının homo-oligomerizasyonu ve otofosforilasyonu başlar (Harding HP, Ron D., 1999). PERK, hücre ölümü sinyalini, CHOP'u ve fosforile edilmiş eIF2 α 'yı inaktive etmek üzere Nrf2'yi uyarır. PERK, eIF2 α 'yı fosforile eder, böylelikle protein sentezini inhibe eder ve ER'deki protein yükünü azaltır. PERK, hayatta kalma için antioksidan tepkisinde rol oynayan genleri yukarı düzenleyen ATF4'ü aktive edebilir. İnaktif eIF2, pro-apoptotik transkripsiyon faktörleri, hücre ölümü sinyallerini tetiklemek için CHOP'u ve Noxa'yı aktive eden transkripsiyon faktörü ATF4'ü indükler. ATF4'ün translasyonu kolaylaştırılır ve aşağı akış CHOP ve ATF3 ekspresyonu indüklenir. PERK-eIF2 α dalı, PERK aktivitesini baskılayabilen p58 IPK'nın yukarı regülasyonu yoluyla negatif geri beslemeye maruz kalır. ATF4, CHOP (C/EBP homolog protein), büyüme durması ve DNA hasarına neden olabilen protein GADD34, amino asit metabolizması ve redoks homeostazı gibi hücre canlılığıyla ilişkili genlerden sorumludur (Wang M., Law M.E, 2018). ER stresi sırasında, Ero1'i (ER oksidoredüktin 1) indükler, kalsiyumun ER'den sitoplazmaya salınmasına, GADD34'ü aktive ederek apoptoza neden olur (Nishitoh H ,2012). GADD34, protein fosfatazın (PP1) α izoformunu hedefler ve dolayısıyla translasyonu artırmak için eIF2 α 'nın defosforilasyonunu teşvik eder (Wang M., Law M.E., ve ark., 2018, Brush M.H., Weiser D.C ve ark., 2003). Yanlış katlanmış ER proteinleri, ubiquitin/proteazom yolundaki bozunma yoluyla sitozole dislokasyon yoluyla ERAD tarafından atılır. Bu sürece katkıda bulunan EDEM (ER bozunmasını artıran α -mannosidaz benzeri protein), bozunma için yanlış katlanmış mannoz-kesilmiş glikoproteinleri hedefler.

Uzun süreli ve aşırı ER stresi, JNK, CHOP ve ATF-3 ve Bcl-2 inhibisyonu ve/veya Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinden Bim'in aktivasyonu yoluyla (CHOP Bim'i uyarır ve

apoptozu tetiklemek için doğrudan mitokondri zarındaki Bax ve Bak'ı aktive eder) apoptozu tetikleyebilir. Apoptozun yürütülmesi, henüz doğası tam olarak belirlenmemiş kaspazları da içerebilir. IRE-1 kapsamlı UPR tarafından fosforile edildiğinde, TRAF 2'yi biriktirir ve JNK'yi fosforile etmek için apoptoz sinyalinin düzenleyen kinaz 1'i (ASK1) aktive eder. Aktive edilmiş JNK, hücre ölümü sinyallemesini tetiklemek için Mcl-1 ve Bcl-XL anti-apoptotik proteinleri inhibe eder. Kesilmiş ATF6 CHOP ekspresyonunu indükleyebilen ve apoptozu açan yollardan biridir. Anlatılanlar şekil 2.10`da detaylı olarak verilmiştir.



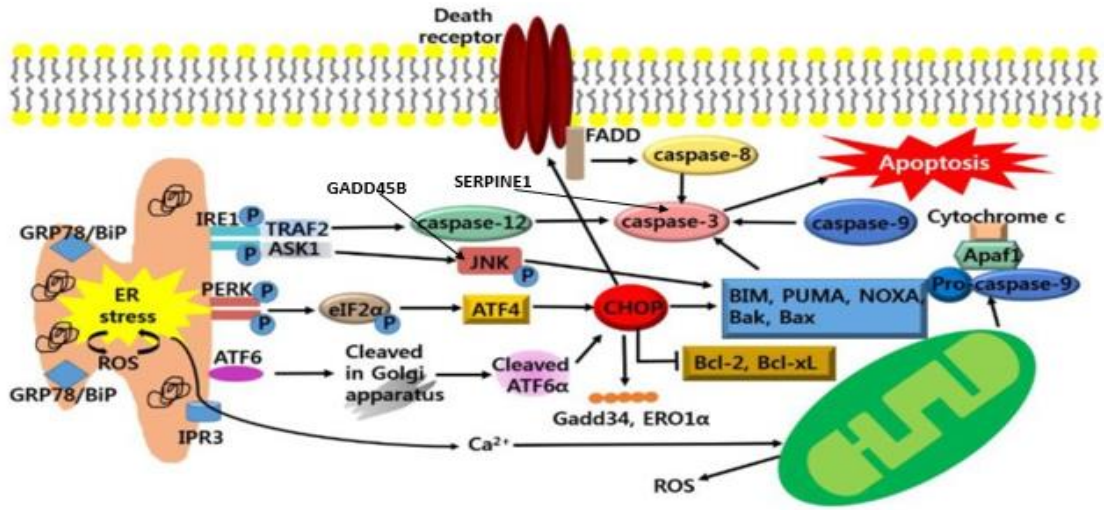
Şekil 2.10 a) Katlanmamış protein cevabı, hücrenin hayatta kalması



Şekil 2.10 b) Katlanmamış protein cevabı, hücre ölümü (Li X.M., Zhang K.Z., Li Z.H,2011)

2.2.4 Kanser Karşıtı Strateji; CHOP Aracılı Apoptozu Hedefleme

Uzamış ER stres koşulu zamanı PERK aktive olur ve eIF2 α 'yı fosforile eder (Cullinan S.B., Diehl J.A.,2006). Fosforile edilmiş eIF2 α apoptotik efektör CHOP'un ifadesini hedefleyen ATF4'ü aktive eder (Liu Z.-W., Zhu H.-T. Ve ark., 2013). Transkripsiyonel olarak CHOP'u indükleyen ATF6 aktive olur (Yokouchi M., Hiramatsu N., ve ark., 2008). CHOP aracılı hücre ölümü, apoptozu güçlendirebilen çeşitli genlerin (örneğin, *GADD34* ve *ERO1 α*) indüklenmesini gerektirir (Oyadomari S., Mori M, 2004). CHOP'un hedefi olan *GADD34*, protein sentezinin yeniden başlatan eIF2 α 'nın defosforilasyonunu teşvik eden bir protein fosfataz alt birimini kodlar ve bu da protein yükünü artırır (Novoa I., Zeng H, ve ark., 2001). Bu sebepten, ER stresi apoptotik yolların aşağı akışını başlatmak için UPR'yi aktive eder. Ek olarak, CHOP'un *Ero1 α* ekspresyonunu yükselttiği ve bu da PDI'nin yeniden oksidasyonunu katalize ederek ER'de hiper-oksidan koşullara yol açtığı düşünülmektedir (Tabas I., Ron D.,2011). CHOP'un neden olduğu *ERO1 α* ekspresyonu ER Ca²⁺ salınım kanalını, inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) reseptörünü (IP3R) aktive eder (Li G., Mongillo M, ve ark., 2009). Daha sonra, ER'den salınan sitoplazmik Ca²⁺, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II'nin (CaMKII) aktivasyonunu tetikler, apoptoz indüklenmesiyle sonuçlanır (Ozcan L., Tabas I , 2010). CHOP aracılı apoptozis, Bid'i (tBid) parçalayıp, mitokondriye taşıyan kaspaz-8 aktivasyonu ile birlikte DR5'i yukarı düzenleyerek ekstrinsik yolda yer alır (Yamaguchi H., Wang H.-G. , 2004, Li H., Zhu H., ve ark.,1998). Ek olarak, CHOP'un anti-apoptotik BCL-2 ve BCL-XL proteinlerinin ekspresyonunu azaltırken, BAX, BAK, BIM (BCL-2 benzeri protein 11), PUMA (apoptozisin p53 yukarı düzenlenmiş modülatörü) ve NOXA (PMAIP1) gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Puthalakath H., O'Reilly L.A. ve ark.,2007, Reimertz C., Kögel D, ve ark., 2003). Aynı zamanda, *GADD45B* proteinleri strese yanıt olarak p38-c Jun N terminal kinaz (JNK), MAP kinaz yollarını uyarır, hücreleri apoptoza, hayatta kalmaya karşı duyarlı hale getirerek güçlü ve seçici bir inhibitörü kodlar. SERPINE1 hücrelerde kaspaz 3'ü inhibe ederek kemoterapi tarafından indüklenen tümör hücresi apoptozuna direnebilir. Bu çalışmalar, CHOP, *GADD45B* ve SERPINE1 gen ekspresyonlarının yukarı düzenlenmesinin kanser karşıtı tedavi için önemli bir hedef olacağını ima etmektedir. ER stresinin apoptotik yolları şekil 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.11 ER stresinin apoptotik yolları (Puthalakath H., O'Reilly L.A., 2007, Reimertz C., Kögel D, 2003).

2.2.5 ER Stresine Karşı Tepki

ER 4 yanıt içeren tepkisel sinyal yoluyla ER stresinin üstesinden gelmek için çalışır (Ron ve Kaufman, 2002). Bunlar: 1) Yeni protein sentezinin yükünü azaltan, uPa'nın haddinden çok toplanmasını önleyen translasyonel zayıflamadır (Harding HP, Calton M, ve ark., 2002). 2) ER şaperon proteinlerini kodlayan genlerin, yani BiP/GRP78 ve GRP94 protein disülfür izomeraz (PDI) ve peptidil-prolil izomeraz enzimlerinin, ER'nin yapısal bileşenlerinin, sarkoplazmik ER Ca²⁺-ATPase 2'nin (SERCA2) yukarı düzenlenmesiyle ER 'de protein katlama kapasitesinin artırılmasıdır (Kozutsumi MY, 1988, Yoshida H, ve ark., 1998, Caspersen C, ve ark. 2000). Sonraki fazda, ERAD bileşenleri, ubiquitin-proteazom sistemi tarafından ER bozunmasını artıran α -mannosidaz benzeri protein (EDEm) dahil olmakla, ER'deki yanlış katlanmış proteinleri ortadan kaldırmak için transkripsiyonel indüklenir (Kopito RR, 1997, Travers KJ, ve ark., 2000, Yoshida H, Matsui T, ve ark., 2003). 3) Antiapoptotik ve bağışıklık yanıtların aracısı olan transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonunu içerir (Pahl HL, ve ark., 1996). ER'deki zar proteinlerinin birikmesiyle tetiklendiğinden ER aşırı yüklenme yanıtı (EOR) olarak adlandırılır. 4) Kontrolsüz ER stresi zamanı meydana gelen ve hasarlı hücreleri seçerek ortadan kaldıran, böylelikle organizmayı koruyan apoptozdur (Ferri ve Kroemer, 2001; Oyadomari S, Araki E., 2002). Apoptozda en az üç apoptoz yolağının rol oynadığı bilinmektedir. a) *CHOP* geninin transkripsiyonel

aktivasyonu, b) inositol gerektiren 1 (Ire1)-TNF reseptörüyle ilişkili faktör 2 (TRAF2)-apoptozis sinyalini düzenleyen kinaz 1 (ASK1)' kompleksinin oluşumuyla aracılık edilen cJUN NH2-terminal kinaz (JNK) yolağının aktivasyonu, c) ER ile ilişkili kaspaz-12'nin aktivasyonu (Urano F, Wang X, ve ark., 2000, Nishitoh H, ve ark., 2002).

2.2.6 UPR ve Apoptoz İlişkisi

ER stresi zamanı hücreler adaptasyon mekanizmalarına etki ederek yaşar veya apoptoza başvurarak intihar eder. Sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan proapoptotik proteinlerin membrana eklenmesi mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişmesine sebep olur (Gorman ve başkaları, 2012).

ER stresi sonucu gelişen apoptozun ileri gelen vasıtası CHOP'tur. CHOP'un indüksiyonu, ER stresiyle ilişkili apoptozu başlatır, işlevinin baskılanması hücreleri apoptozdan koruduğu bilinmektedir (Jing ve diğ., 2012). Bu gen, kanserin ayırt edici özellikleriyle (hücre göçü, proliferasyon ve sağkalım) ilgili çok sayıda geni düzenlediğinden (Jauhainen ve diğerleri, 2012) apoptoza nasıl aracılık ettiği tartışma konusudur. Meme kanserinden türetilen hücrelerden elde edilen *in vivo* verilere göre (Weston ve Puthalakath, 2010) anti-apoptotik BCL-2'nin down regülasyonu ve proapoptotik BIM, PUMA ve BAX'ın uyarılmasının CHOP aracılı apoptozu desteklediği bilinmektedir (Gorman ve diğerleri, 2012) CHOP aktivitesinin artması p38 tarafından fosforilasyona tepkinin sonucudur. Uzun süre devam eden ER stresinde p38 (ASK1'in substratı) IRE1-TRAF2 kompleksine alındıktan sonra IRE1 aracılı ASK1 aktivasyonu ile PERK yolları birleşerek CHOP aktivitesini güçlendirir (Walter ile Ron, 2011).

Bazı çalışmalar, ER stresiyle indüklenen apoptoz aracılığında JNK'nin mühim bir rolü sahip olduğunu gösterir (Verma; Datta, 2012). IRE1 tarafından JNK'nin alımı, hem IRE1, hem de TRAF2 ile etkileşime giren JIK tarafından düzenlenir. IRE1-TRAF2 kompleksi daha sonra ASK1'i alır ve ASK1 aktivasyonuna neden olur ve hücre ölümüne yol açan JNK yolunu düzenler.

ER stresini düzenleyen yollardan biri de, BCL-2 ailesinin ilgili genlerinin UPR bileşenleriyle fiziksel etkileşimleridir. Örnek olarak, ER stresinde IRE1 aktivasyonuna neden olan IRE1 sitozolik alanıyla direk temas eden Bax ve Bak genlerini göstere biliriz (Hetz ve diğerleri, 2006). ER transmembran proteini BAX inhibitörü'nden (BI-1) endoribonükleaz aktivitesini inhibe etmek için doğrudan IRE1'le etkileşime girer. (Lisbona, 2009).

2.2.7 UPR ve Metastaz İlişkisi

Metastazdaki rolü tam aydınlatılmayan UPR'nin primer tümör ilerlemesindeki işlevi iyi bilinmektedir. Kanser hücreleri, uzak doku ve organ ürünlerini yeniden programlamakla metastatik hücrelerin kolonizasyonunu ve sağkalımını basitleştirmek için pre-metastatik niş (PMN) adlanan oluşumu yaratır (Cox ve Hoshino, 2015). Hipoksi zamanı, negatif meme tümörlerinde östrojen reseptörü olan lisil oksidazın (LOX) yukarı regülasyonu kemikte PMN oluşumunu teşvik eder (Cox ve diğerleri, 2015). XBP1, LOX promotörüne bağlanarak LOX ekspresyonunu düzenler ve bu faktörün desteğiyle PMN'ye katkıda bulunma olasılığı artar (Yang ve arkadaşları, 2017).

Kanser hücreleri, metastaz zamanı hücre dışı matris (ECM) ve komşu hücrelerle iletişimi yitirdikten sonra anoikis'e (apoptozun diğer şekline) maruz kalır. Çalışmalar, tümör invazyonu ve metastaz için gerekli olan PERK-eIF2 α ekseninin anoikisi inhibe ettiğini göstermektedir (Chen, Cubillos-Ruiz, 2021). EMT'ye maruz kalan hücrelerde seçici olarak aktive edilen PERK (Feng ve arkadaşları, 2014) ATF4, NRF2 yoluyla antioksidan tepkileri desteklediğinden oksidatif stresi azaltarak metastatik hücrelere katkıda bulunur (Cullinan, 2003).

2.2.8 UPR ve Anjiyogenez İlişkisi

ER stresi ve UPR'i tetikleyen yanlış katlanmış proteinlerle ilişkili olan yetersiz vasküler beslenme hipoksi, besin yoksunluğu, sonuçta az ATP üretimine neden olmaktadır. UPR anjiyogenezi hem down-regüle hem de up-regüle edebilir. XBP1s ve ATF4 VEGF promotörüne bağlanarak onu aktive edebilir (Ghosh, 2010). ATF4'ün, bir sıra insan aort endotel hücre dizilerinde IL-8'i (interlökin-8) transkripsiyonel olarak modüle ettiği bilinmektedir. IL-8, endotelial hücre apoptozunu azaltan MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu teşvik ederek endotelial hücre proliferasyonunu ve damar gelişimini indükler (Li, 2003; Oskolkova, 2008). Akt/GSK/ β -katenin eksen yolu aracılığıyla XBP-1'ler VEGF promotörüne bağlanarak endotelial proliferasyonu sürdürebilir (Zeng ve diğerleri, 2013).

UPR ve anjiyogenez ve de anti-anjiyogenez ile ilişkili diğer bir mekanizma TRAF2-JNK'nin IRE-1 α tarafından aktivasyonu: Spesifik Bcl-2 ailesi proteinlerinin (örneğin, Bim) fosforile edilerek Sitokrom C aracılı apoptotik yollara etki etmesidir (Win, 2014). PERK-ATF4'ün aktivasyonu, apoptotik proteinlerin sentezini artıran CHOP ekspresyonunu tetikler, CHOP anjiyogenezi indükleyen eNOS promotör faktörünü (endotelial nitrik oksit sentaz) inhibe eder (Hsu ve diğerleri, 2019).

2.3 Pankreas Kanseri ve ER stresi İlişkisi

2.3.1 Pankreas Kanserinde Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR İlişkisi

Hipoksi, besin yoksunluğu gibi durumlar nedeniyle ER stresi sergileyen PDAC tümörlerinin aktif UPR profiline sahip olduğu bilinmektedir (Kong ve diğerleri, 2015). Bu adaptif UPR yanıtı tümör oluşumunu ve ilerlemeyi sağlar. Pankreas kanserinde, ER stresi koşulları altında UPR bileşeni GRP78 (BiP)'in yaygın ekspresyonu gözlemlenir ve UPR'nin aktivasyonu üzerine ekspresi daha da artırarak kötü hastalık prognozu, aynı zamanda, yumurtalık kanseri, prostat kanseri ve B hücreli lenfoma gibi çeşitli kanser türlerinin gelişmesi ile ilişkilidir (Robinson ve diğerleri, 2021). PDAC hastalarının kötü prognozla korelasyonu bildirilen GRP78'in PDAC dokusunda artan ekspresyonu görülmüştür (Niu ve diğerleri, 2015). Normal pankreatik duktal hücrelerine nazaran GRP78'in yüksek ekspresyonu PDAC'ın özelliği sayılır, ancak GRP78 seviyelerinin PDAC ilerlemesine nasıl katkı sağladığı halen araştırılmaktadır.

PDAC hücrelerinin çoğalma kapasitesinin korunmasında başka kanser türlerinde (3'lü negatif meme kanseri, kolon ve prostat kanseri) olduğu gibi, IRE1'le ilişkili sinyalleşmenin rolü vardır (Li, 2017). IRE1 ve ATF6 kollarının etkisiyle anterior gradyan protein 2 homologunun (AGR2) indüksiyonu yoluyla UPR proliferasyonun artmasına katkı sağlar (Chevet, 2013).

PERK aktivasyonu, artan tümörigenezle ilişkilendirilmiştir. PERK inhibitörünün kullanıldığı çalışma incelendiğinde, PERK inhibisyonunun PDAC hücresinde apoptozu artırması, PDAC'ın ksenograflarında kullanıldığı zaman ise tümörün yükünü azaltması bildirilmiştir (Atkins, 2013).

PDAC'ın metastaz hedefi sayılan karaciğerle PERK aktivitesinin ilişkilendirildiği bir çalışmada, karaciğerdeki PDAC hücrelerinin, IRE1 aktivasyonuna gerek duymadan UPR'nin PERK kolunun seçici aktivasyonu gösterdiği malum oldu (Pommier ve diğerleri, 2018). Kanser hücrelerinin uykuda olması halinde, T hücresinin azalmasıyla XBP1s'in ekspresyonu kombine şekilde kanser hücrelerinin uyarılmasını, yeniden bölünmesini, metastaz yapabilmesini sağlar. Bu çalışmalarla UPR'nin IRE1 ve PERK kollarının PDAC hücrelerinde aktif olduğu, aktivasyonlarının PDAC ilerlemesini teşvik etmesi vurgulanmaktadır (Hess, 2011)

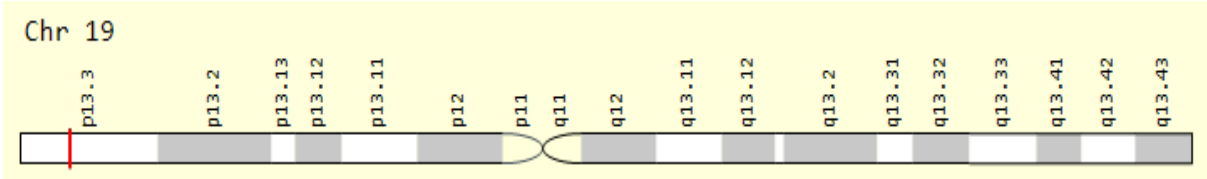
2.3.2 Pankreas Kanserinde İlaç Direnci ve UPR İlişkisi

PDAC tedavisinde en önemli problemler tedavinin sınırlı olması ve kemoterapiye karşı kazanılmış dirençtir. Günümüzde genel olarak bildirilen gempitabin direnci ve kemo direncin öhtesinden gelebilecek kombine tedavilere yönelik araştırmalarda artış gözlemlenmiştir. Etkili kemoterapötik ajan olarak bilinen GEM'in daha agresif bir yapıdaki tümör tipinin yayılımını destekleyebileceği çalışmalarda incelenmiştir (Robinson, 2021). PDAC'ta GEM EMT`yi uyarır, tedavi takibinde inflamatuvar sitokin sinyalleşmesini, hücrelerin hayatta kalmasını ve pro-tümörojenik makrofajların çevre dokulara ilerlemesini destekler (Robinson, 2021).

Belirlenmiş mekanizma UPR'nin hayatta kalma sinyalini kullanarak kanser hücrelerinde kemoterapinin neden olduğu apoptozdan kaçır. PANC-1 hücre soyundan ayrılan CSC benzeri popülasyona GEM maruziyeti sonrası UPR tepkilerinin sergilendiği, fosfo-PERK ve ATF6N ekspresyonunun arttığı izlenilmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). Diğer bir çalışmada gempitabin ile PDAC hücrelerinde köklülükte azalma ve ER stresi ile bağlantılı apoptozu yaradan yağ asidi sentezi inhibitörleri arasındaki sinerjistik etkilerin tanımlanması incelenmiştir (Tadros ve diğerleri, 2017).

2.4 GADD45β (Miyeloid Farklılaşma Birincil Tepkisi 118 - MYD118)

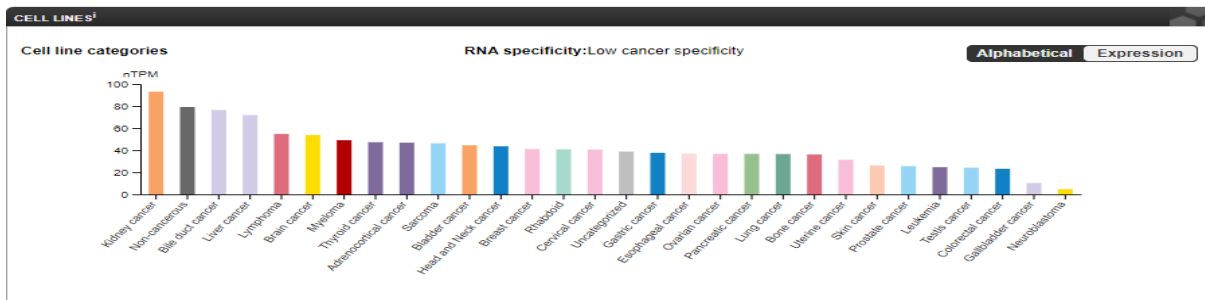
GADD45 ailesi, kanser hücrelerinde hücre sağ kalımının temel araçlarından biridir (Inowa T., Hishikawa K., ve ark,2010). *GADD45B*, ER stresli büyümenin durması koşulları ve DNA'ya zarar veren ajanlarla tedavi sonrasında transkript düzeyleri artan *GADD45* gen ailesinin bir üyesidir. Hem p38, hem de JNK MAPK'lerinin yukarı akış aktivatörü olan MTK1/MEKK4 kinaza bağlanan ve onu aktive eden proteinler aracılığıyla p38/JNK yolunun aktivasyonunu sağlayarak çevresel streslere yanıt verir. Bu genlerin veya protein ürünlerinin işlevi, büyüme ve apoptozu farklı mekanizmalarla düzenler, hücre büyümesini engellemede işbirlikçi olarak işlev görebilirler (RefSeq tarafından Temmuz 2008`de sağlaması yapılmıştır).



Şekil 2.12 GADD45B geninin 19. kromozom üzerindeki yeri gösterilmiştir. (<https://www.genecards.org/> web sitesinden alıntı)

GADD45 (Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Beta 45) gen ailesinin bir üyesi olan *GADD45B* insan kromozomu 19p13.3'te yer alan küçük (18kDa), evrimsel olarak korunmuş, yüksek homolojiye (55%-57%) ve yüksek asitliğe sahip (pH 4.0–4.2) ve öncelikli olarak çekirdeğe yerleşmiş proteinleri kodlamaktadır (Liebermann DA, Hoffman B, Tront JS, ve ark., 2013). *GADD45B* ile ilişkili hastalıklar arasında akciğer kanseri, endometrium kanseri ve ilgili yolları arasında DNA hasarı tepkisinin miRNA düzenlenmesi vardır.

Dört zincirli beta yapraklık bir çekirdeğe, beş alfa heliksine ve iki asidik halkaya sahip yapılandırılmış protein olan (Papa ve ark., 2007) *GADD45B* uzun zamandır stresle ilişkili bir gen olarak kabul edilmesine rağmen (Salvador ve ark., 2013, Liu ve ark., 2015) çalışmalar *GADD45B*'nin p38 mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunun aktivasyonu (Xue vd., 2020), DNA demetilasyonunun modülasyonu (Xiao vd., 2020) ve transkripsiyonun düzenlenmesi (Zipperly vd., 2021) dahil olmak üzere karmaşık işlevleri olduğunu göstermiştir. Kanıtlar aktif onkogenin moleküler yapısı ve hücre tipi ile ilişkili olarak çeşitli sinyal yollarının uyarılması vasıtasıyla *GADD45B*'nin, tümör gelişimini destekleyebileceğini veya baskılama işlevi yapabileceğini göstermektedir (Liebermann DA ve ark., 2011). Tümör ilerlemesindeki rolü tartışmalı olan *GADD45B*, yumurtalık kanserinde onkogen (Gong vd., 2021), ancak karaciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve pankreas kanserinde tümör baskılayıcı gen dir (Hori vd., 2018 ; Huang vd., 2018 ; Do vd., 2019).



Şekil 2.13 *GADD45B* RNA ekspresyon grafiği (<https://www.proteinatlas.org/> web sitesinden alınmıştır.)

Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β tarafından indüklenen (Cretu A, Sha X, et al, 2009) apoptozisin bir efektörü olan *GADD45B* terminal farklılaşma ve apoptotik sitokinler tarafından hızla indüklenir ve tümör oluşumunu düzenler. TGF- β , SMAD'ye bağlı bir şekilde *GADD45B* ekspresyonunu indükler, p38'i aktive eder ve apoptotik hücre ölümünü tetikler (Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, 2003).

GADD45B, farklı sinyal yolları aracılığıyla kanser gelişimini desteklemek veya baskılamak için işlev görebilir (Liebermann DA ve ark., 2011) Transkripsiyonel hedef olarak tanımlanan *GADD45 β* , tümör oluşumunu, kanser hücresi sağ kalımını, apoptozu, invazyonu ve metastazı etkilediği bilinen NF- κ B ile ilişkilidir. *GADD45B* proteinleri strese yanıt olarak p38-c Jun N terminal kinaz (JNK), MAP kinaz yollarını uyarır, böylece, hücreleri apoptoza, hayatta kalmaya veya büyüme durmasına karşı duyarlı hale getirerek (Takekawa M, Saito H. 1998) güçlü ve seçici bir inhibitörü kodlar. (Papa S, Monti SM, Vitale RM, ve ark., 2007). *GADD45B*, MTK1'in N-terminal alanına (MEKK4) (Takekawa M, Saito H. 1998) ve MKK7'ye bağlanır ve proapoptotik MKK7/JNK sinyallemesini bloke ederek kanser hücresinin sağ kalımını destekler (De Smaele E. ve ark., 2001, Tornatore L. ve ark., 2014, Papa S. ve ark., 2004).

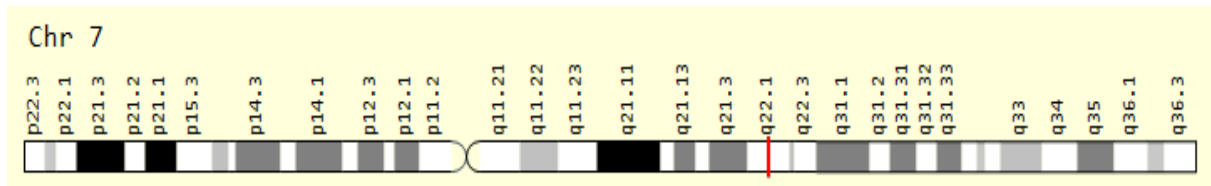
Araştırmalarda EMT ile yakın ilişkileri iyi bilinen p38 ve MAPK yolağı düzenlemesi, *GADD45B*'nin EMT'yi kolaylaştırdığı mekanizmalardan biridir (Kuo CL, Xu J. ve ark., 2020).

Hücre döngüsü durması, DNA onarımı, hücre sağkalımı, senesans ve apoptozisle sonuçlanabilen onkojenik stres de dahil çeşitli fizyolojik ve çevresel strese yanıt olarak stres sinyallemesinde rol oynar (Liebermann DA, Tront JS, ve ark., 2011).

2.5 SERPINE1

1983 yılında bir grup bilim insanı ilk defa kültürlü sığır aort endotel hücreleri tarafından üretilen PAI-1'i keşfederek ona fibrinolitik inhibitör adını verdiler (Loskutoff D.J., Van Mourik J.A., ve ark., 1983). *SERPINE1* ((Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1-PAI-1) geni, plazminojen aktivatör sisteminin (PA) ana düzenleyicisi, *in vivo* fibrinolizi baskılayabilen serin proteaz inhibitörü (SERPIN) süper ailesinin bir klad E üyesini kodlar (Alotaibi FT, ve ark., 2019).

SERPINE1, ürokinaz tipi plazminojeni (uPA) ve doku tipi plazminojen aktivatörünü (tPA) inhibe eder, bu da plazminojenin aktif proteaz plazminine dönüşümünü azaltır (Andreasen PA, Egelund R, ve ark., 2000). *SERPINE1* geni 7q22.1 kromozomda bulunan ve yaklaşık 50 kDa'lık tek zincirli glikoproteini kodlar (Wang S, Cao Q ve ark, 2013), 379 amino asitten oluşur ve öncelikli olarak vasküler endotel hücreleri, yağ hücreleri, megakaryositler ve trombositler, fibroblastlar, hepatositler, düz kas hücreleri tarafından sentezlenir ve salgılanır (Chen T. Y., Zhou ve ark., 2022).



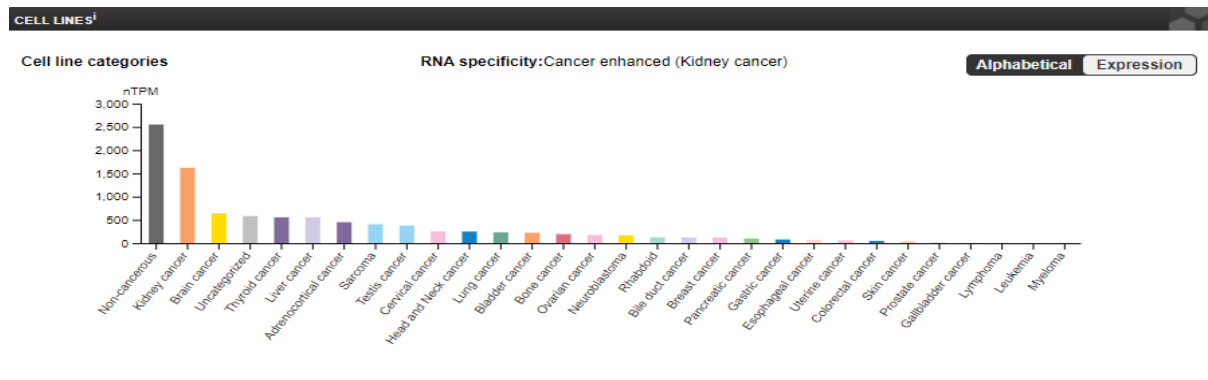
Şekil 2.14 *SERPINE1* geninin 7. kromozom üzerinde yeri gösterilmiştir. (<https://www.genecards.org/> web sitesinden alıntı)

Bu protein ayrıca doğuştan gelen antiviral bağışıklığın bir bileşeni olarak işlev görür. Bu gendeki mutasyonlar sonucunda, PAI-1 eksikliği oluşur. Diğer yandan ise, gen ürününün yüksek konsantrasyonları trombofili ile ilişkili bulunmuştur (RefSeq tarafından sağlama, Ağustos 2020).

SERPINE1'in pankreas kanserinin morbiditesi ile yakından ilişkili olduğunu gösteren bir çalışmada, *IL-8*'in salgılanmasını ve ifadesini düzenlediği ve kanserin ilerlemesini hızlandırdığı bildirilmiştir (Humphries BA., Wang HC, ve ark., 2019). *SERPINE1*'in ekspresyonu epigenetik olarak (Gao S, Nielsen BS ve ark., 2010), ayrıca da SP1, AP1, SMAD proteinleri, TGF- β 1 ve p53 gibi birkaç transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenebilir (Kortlever RM, Higgins PJ ve ark., 2006, Ullisse S. 2009).

PAI-1'in ekspresyonu transkripsiyonel düzeyde hipoksi, TGF- β , TNF- α , hormonlar, sitokinler, proteazlar, büyüme faktörleri tarafından uyarılır (Gils A., Declerck P.J. ve ark., 2004).

SERPINE1, kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyon, kanser, metabolik bozukluklar, yaşlanma, doku fibrozu vb. dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ve *in vivo* aktivitelerle ilişkilidir (Machteld Sillen, Paul J. Declerck, 2021). *SERPINE1* ile ilişkili hastalıklar arasında Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 Eksikliği ve Konjenital Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1 Eksikliği bulunur. Yüksek trombosit sitozolik Ca²⁺'ye yanıt ve gen ifadesi (transkripsiyon) ilgili yolları arasındadır. Gen Ontolojisi (GO) açıklamalarında *SERPINE1* ilişkili olarak sinyal reseptörü ve proteaz bağlanması içerir.



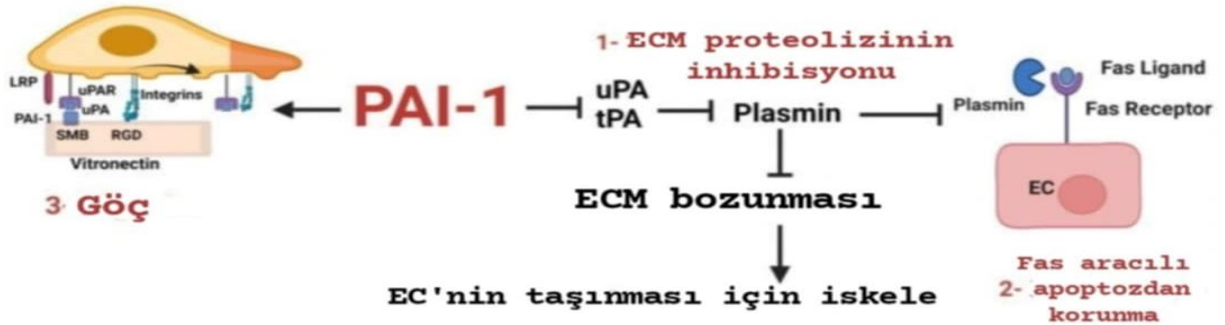
Şekil 2.15 *SERPINE1* RNA ekspresyon grafiği (<https://www.proteinatlas.org/> web sitesinden alıntı)

2.5.1 Hücre Göçü, İnvazyonu ve Metastazda *SERPINE1*'in Rolü

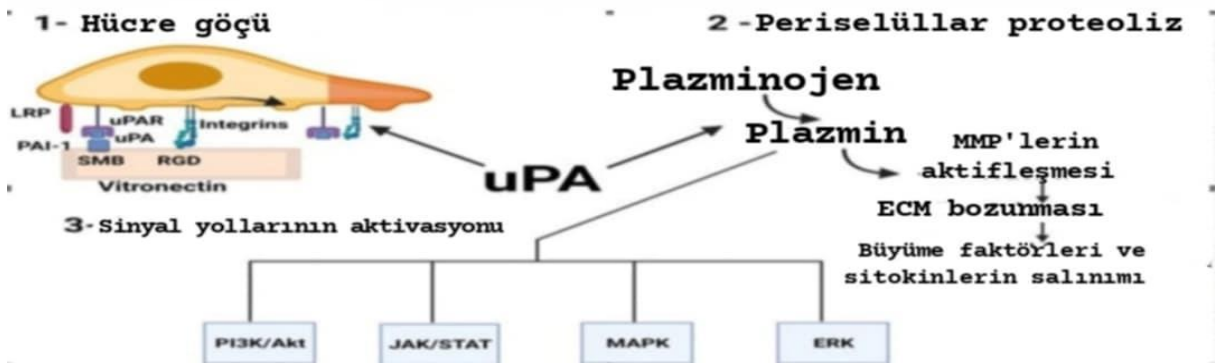
PA sisteminin hücre adezyonu ve göçü üzerindeki etkisi kanser ilerlemesinde önemli rol oynar. Aktif plazmin, çeşitli metalloproteinazların aktivasyonu yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak ECM'yi parçalar (Blasi F, Carmeliet P. ve ark., 2002). *SERPINE1* bozulmuş ECM tümör hücrelerinin diğer doku ve yapılara göçünü kolaylaştırır ve tümör hücrelerinin ECM'ye yapışma/ölme dengesini düzenler (Simone TM, Longmate WM, Simone TM, ve ark., 2015). Normal ve dönüştürülmüş insan keratinositlerinde, *SERPINE1*, EGFR ve TGF- β 'ye yanıt olarak up regüle edilir ve hücre göçü ve invazyonunda artışla ilişkilidir (Wilkins-Port CE, Samarakoon R, ve ark., 2009). *SERPINE1* ayrıca tümör anjiyogenezini teşvik ederek tümör agresifliğine katkıda bulunabilir (Bajou K, Peng H ve ark., 2008).

Yara iyileşme süreci sırasında, TGF- β , hücre göçünü ve yeniden epitelizasyonu uyaran öncü keratinositlerde SERPINE1 ekspresyonunu indükler (Simone TM, Longmate WM ve ark., 2015).

SERPINE1'in pro-anjiyogenez, hücre göçü, büyüme, antiapoptotik aktifliğini göstererek, tümör büyümesi, kanser hücresinin sağkalımı ve metastazı uyarmak için hedeflenen Plazminojen sisteminin u-PA aracılı yolağı vardır. Bu yolak proMMP'lerin plazmin tarafından aktivasyonu, endotel, düz kas ve inflamatuvar hücrelerin uzak bölgelere göç etmesi için ön koşul sayılan hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinin bozunmasına yol açar. Bu nedenle, plazminojen sisteminin ateroskleroz, anevrizma oluşumu, tümör büyümesi, metastaz ve enfeksiyonda rol oynadığı öne sürülmüştür (Duffy ve ark., 2008, Medcalf, 2007). *SERPINE1*, meme (Feng ve ark. 2020), pankreas (Yu ve ark.), mesane, kolon (Khoshdel ve ark. 2016), küçük hücreli olmayan akciğer (Wang ve ark. 2021) ve düşük dereceli gliomalar (Huang ve ark. 2021) dahil olmak üzere çeşitli kanserler için kullanılabilir biyolojik ve prognostik belirteç olarak ileri sürülmüştür. *SERPINE1*'in tümör hücresinin çoğalması ve hücre göçü arasında anahtar işlevi görebileceğine dair çalışmalar yapılmıştır (Law BK, Higgins SP, 2014, Czekay RP, 2011). Giese ve arkadaşları tarafından formüle edilen "göç ve hareket (yayılma) dikotomisi" olarak bilinen olguda, tümör hücresindeki morfolojik değişikliklerin, örneğin sitoskeletal yeniden organizasyonun, hücre hareketliliği ve göçündeki artışla ilişkili olduğu ve hücre çoğalmasıyla uyumsuz bulunduğu fikri desteklenir (Fedotov S, Iomin A.,2007). Hücre çoğalması ve göçü karşılıklı şekilde birbirini dışlayan fenotipler ortaya çıkarır. Göçmen fenotipde hücreler rastgele hareket eder, hücre bölünmesi olmaz. Çoğalan fenotipde ise, kanser hücreleri yayılım göstermez ve yalnızca çoğalma gerçekleşir. Tümör hücreleri belirli bir dokuya ulaştığında, dokuda kolonize olmak ve metastaz yapmak için hücre çoğalmasını aktive edebilirler. Hücrelerin hedef dokuya ulaşması sırasında ölümden koruyan apoptotik sinyallemedeki azalma hücre göçüne eşlik eder. Böylelikle invaziv ve göçmen fenotipi desteklediği bilinen *SERPINE1*'in, tümör hücresi çoğalmasını azalttığı, hücre göçünü arttırdığı ve apoptozu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Pavon MA, Arroyo-Solera I ve ark., 2015). *SERPINE1*, u-PA inhibisyonu ve vitronektin ile etkileşim yoluyla kan pıhtısı oluşumu (pıhtılaşma sistemi) ve bunların çözülmesi/bozunması (fibrinolitik süreç) arasındaki dengeyi sıkı şekilde düzenleyerek hücre göçü ve tümör gelişiminde önemli rol oynar. Şekil 2.16`da gösterilmiştir.



Şekil 2.16 PAI-1'in anjiyogenezde işlevi (Asmaa Anwar Ismail, ve ark., 2021). (1- PAI-1, uPA ve tPA'nın plazmini aktive etmesini engeller, böylece ECM'yi plazmin aracılı proteolizden korur. EC'ye göç etmesi ve çoğalması için dayanıklı iskele sağlar. 2- Fas ligandın çözünür fas olarak salınmasının karşısını alan PAI-1'in plazmin aktivasyonunu engeller. 3- PAI-1, vitronektinle etkileşime girerek EC göçünü destekler).



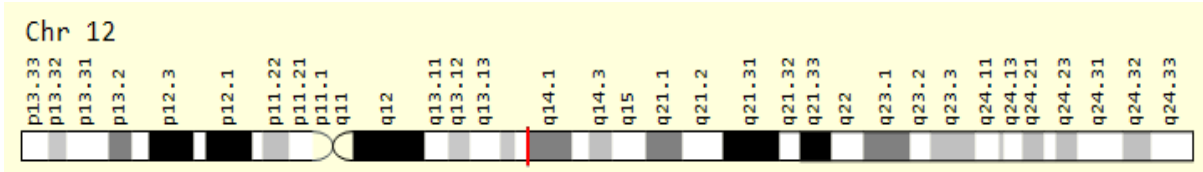
Şekil 2.16.1 uPA'nın etkisi (Asmaa Anwar Ismail, ve ark., 2021, türkçeleştirilmiştir). uPa, hücre-matriks proteinleriyle (vitonektin ve integrinler) etkileşime girerek, plazmin aracılı perisellüler proteolizi başlatarak ve sinyal yollarını aktifleştirerek anjiyogenezi başlatır. 1- Plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörünün (uPAR) vitronektine bağlanma yeri somatomedin B (SMB) domaininde, integrinlerin ise RGD domainindedir. PAI-1 uPA'ya bağlandıkça, uPAR ve integrinlerin vitronektine bağlanması engellenir ve hücre böylelikle genel matrikslerden serbest bırakılır, uPAR ve integrinler temizleme reseptörü lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) aracılığıyla hücrenin ön kenarına geri dönüştürülür. 2- uPa ile aktive edilen plazmin, MMP'leri aktive ettikten sonar perisellüler proteolizi ve izole edilmiş proanjyogenik sitokinlerin ve büyüme faktörlerin salınımını başlatır. 3- Plazmin, tümör proliferasyonu ve göçünde rol alan çeşitli yolların aktivasyonunu başlatır.

2.6 CHOP

2.6.1 Yapısı ve Özellikleri

Büyüme durması DNA hasarı indüklenebilir transkript 3 (*DDIT3*), C/EBP ζ bilinen *CHOP*, insanda 12q13.3 kromozomunda bulunan, 170 aminoasit kalıntısına sahip, 30 kDa'luk

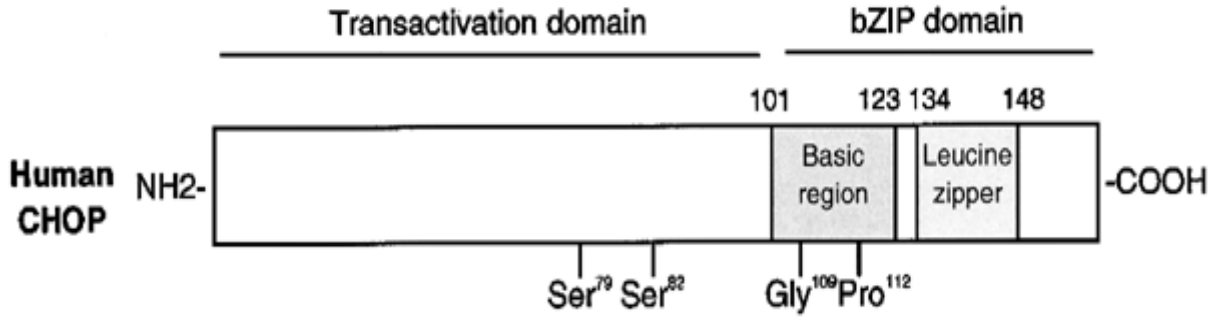
proteindir. CHOP proteini, bir N-terminal transkripsiyonel aktivasyon alanı ve bir bazik amino asit açısından zengin DNA bağlama bölgesini izleyen bir lösün fermuar dimerizasyon motifinden oluşan bir C-terminal bazik lösün fermuar (bZIP (CHOP kaynaklı apoptozis için önemli olan (Maytin EV, ve ark., 2001)) işlevsel alanından oluşur (Ron D. ve ark., 1992, Ubeda M, ve ark., 1996). P38 MAP kinaz ailesi substratları olarak görev yapan 79 ve 82 bitişik serin kalıntılarını barındırır. (Wang XZ and Ron D, 1996).



Şekil 2.17 CHOP geninin 7. kromozom üzerinde yeri gösterilmiştir. (<https://www.genecards.org/> web sitesinden alıntı)

CHOP proteini ilk olarak C/EBP'nin diğer üyeleriyle (örneğin, LAP'nin (karaciğer aktivatör protein) heterodimer oluşturur. C/EBP üyelerin homodimerlerinin ve heterodimerlerinin oluşumuna olanak tanıyan bZIP alanındaki yüksek korunumdur (%90'dan fazla). Diğer C/EBP'lerle birlikte heterodimer oluşturan homodimerleşmeyi güçlü şekilde tercih eden CHOP (Barone MV, ve ark.,1994) prolin ve glisin amino asitlerine sahiptir. CHOP, AP-1'in transkripsiyonel aktivasyonunu artırmak için AP-1 kompleksine bağlanır. (Vallejo M, Ubeda M, 1999). Bu nedenle, CHOP hem C/EBP'nin işlevinin inhibe edicisi, aynı zamanda farklı genlerin aktivatörüdür.

Adipogenez ve eritropoezde rol alan bu protein, endoplazmik retikulum stresi tarafından aktive edilir ve hücre döngüsü durmasını ve apoptozu teşvik eder. (RefSeq tarafından sağlanmıştır, Ağustos 2010) İlgili yolları arasında gen ifadesi ve UPR bulunur. ATF4 ile birlikte, hücrel amino asit metabolik süreçlerinde, mRNA translasyonunda ve ER stresine yanıt olarak katlanmamış protein tepkisinde (UPR) yer alan genlerin ekspresyonunu destekleyerek ER aracılı hücre ölümünü düzenler. TCF7L2/TCF4'e bağlanarak kanonik Wnt sinyal yolağını inhibe eder, DNA bağlama özelliklerini bozar ve transkripsiyonel aktivitesini baskılar. Kaspaz-1 (CASP1) aktivasyonunu indükleyen kaspaz-11 (CASP4/CASP11) indüksiyonu yoluyla inflamatuvar yanıtta düzenleyici rol oynar, bu kaspazlar da inflamatuvar yanıtta yer alan olgun IL1B'ye pro-IL1B aktivasyonunu artırır.

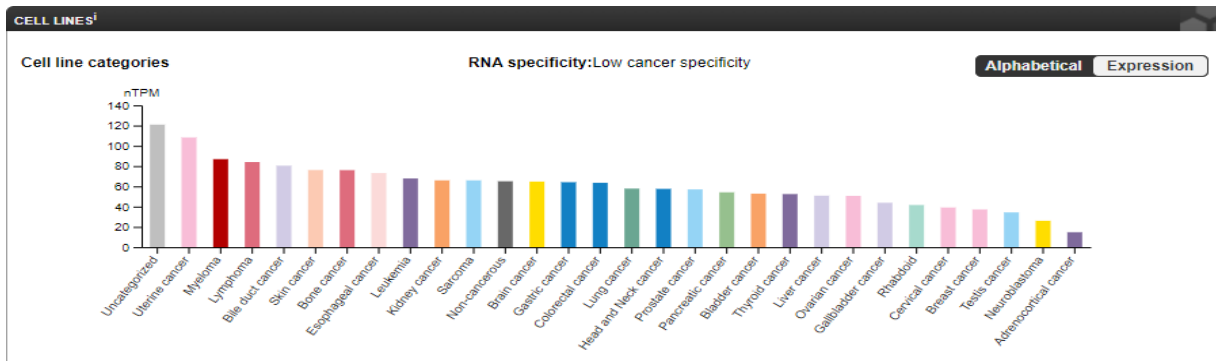


Şekil 2.18 İnsanda CHOP'un etki alanının yapısı (S Oyadomari & M Mori, 2004). CHOP, N-terminal transaktivasyon alanından ve DNA bağlayıcı bazik bir bölge ve bir lösün fermuar dimerizasyon bölgesi içeren bir C-terminal bZIP alanından oluşur. Bazik bölge, konsensüs C/EBP bağlanma bölgesine bağlanmak için gerekli olan korunmuş glisin (109) ve prolin (112) kalıntılarını içerir. Transaktivasyon etki alanındaki iki serin kalıntısı (79 ve 82) p38 MAP kinaz tarafından fosforile edilir ve bu fosforilasyon, gelişmiş transkripsiyonel aktivasyon için gereklidir.

2.6.2 CHOP'un İfade Profili

C/EBP homoloji proteini CHOP normal hücre büyümesi sırasında yaygın olarak düşük seviyelerde, ER stresine yanıt olarak yüksek seviyelerde ifade edilir.

CHOP, stressiz koşullar altında sitozolde, CHOP'un indüklenip çekirdekte birikimiye stress zamanı olur. (Ron D ve Habener JF, 1992). *CHOP* geni ilk defa genotoksik stres tarafından indüklenen genler için yapılan araştırmada memeli hücrelerinde UV ışınlanması ve alkile edici ajanlara (metil metansülfonat (MMS)) yanıt olarak bulundu. Burada birkaç DNA hasarı indüklenebilir transkriptten biri *A153* olarak klonlandı ve *GADD153* olarak tanımlandı (Fornace Jr AJ, ve ark., 1988). Diğer güçlü indükleyicileri protein glikozilasyonunun önünü kesen tunikamisin, kalsiyum depolarını tüketerek stress koşullarını artıran thapsigargin ve disülfür bağı oluşumunu bozan ditiyotreitoldur, o da ER işlevlerini önemli derecede bozar. MMS ER proteinlerinin sistein kalıntılarını alkilleyerek ER protein katlanmasını etkiler ve DNA'ya zarar vermez. Bunlar CHOP indüksiyonunun DNA hasarından daha çok ER stresine duyarlı olduğunu gösteren bulgulardır. CHOP'un enerji metabolizmasını, hücrel çoğalmayı ve farklılaşmayı düzenlediği bildirilmiştir.



Şekil 2.19 *CHOP* RNA ekspresyon grafiği (<https://www.proteinatlas.org/> web sitesinden alıntı)

2.7 CD24 / CD44 Yüzey Belirteçlerinin Pankreas Kanseri ile İlişkisi

Pankreas kanseri tanısında bilinen belli karbonhidrat antijen 19-9 (CA19-9) ve dekarsinoembriyonik antijen (CEA) biyobelirteçlerinin tanı ve takipte yetersiz kalmaları nedeniyle farklı biyobelirteçlerin araştırılması ve kullanılması önem arz etmektedir. Ekzokrin pankreas kanserleri için CD24 ve CD44 tümör belirteçlerindedir (Fong ZV, Winter JM, 2012., Li XP, ve ark.,2015).

Hücre yüzeyinde yoğun şekilde glikozile olan (Jacob J ve ark., 2004), müsin benzeri glikozil fosfatidilinozitol (GPI) bağlantılı (Suzuki T ve ark., 2001) *CD24*, hücelere büyüme ve farklılaşma sinyallerini modüle eden bir protein kodlar (Genecards-The Human Gene Database, 2023). Katı tümörlerde *CD24*'ün aşırı ekspresyonu çeşitli onkojenik sinyal yolları ile bağlantılı bazı solid tümörlerin agresifliği ve metastatik yayılımı ile ilişkilendirilir. Yapılan prelinik çalışmalar sonucu elde edilen veriler incelendiğinde CD24 eksprese eden pankreas kanseri hücrelerinin gemsitabine karşı kematörapötik direnci desteklediği bildirilmektedir (Jia Y., Gu D., ve ark., 2019).

Hücre adezyonu ve göçü, çoğalması ve kemoterapi direncinde yer alan hücre yüzey glikoproteinini kodlayan CD44 geni, hyaluronik asit için reseptör işlevi görür, kolajenler ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi ligandlarla etkileşime girerek hematopoeze ve tümör metastazına yardımcı olur (Genecards-The Human Gene Database, 2024). Pankreas kanseri ve diğer kanser tiplerinde CD44'ün up regülasyonu genel sağ kalımın kötü olması, tümör ilerlemesi ve metastatik fenotip ile ilişkilendirilmiştir (Wood NJ, 2014, Takaishi S ve ark., 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇ

Çalışmalar İstanbul Üniversitesi Prof. Dr. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik ve İmmünoloji bölümlerinin laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Kullandığımız Ekipman ve Cihazlar aşağıda bulunan Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1 Kullandığımız ekipmanlar ve cihazlar

Ekipman/Cihaz	Markası
Bilgisayar	HP
Işık Mikroskobu (Invert)	Olympus CKX41
Santrifüj	Beckman Coulter
Masaüstü Santrifüj	Allegra X-22 Centrifuge, Beckman Coulter
Mikro Santrifüj	Denville 260D
Plate santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-22 Centrifuge
Vorteks	Kermanlar
İnkübatör	Hibrigene Techne
Steril Kabin	Thermo Scientific, HERA
Real Time PCR Cihazı	Roche, LightCycler 480II
Akan Hücre Ölçer ve Saflaştırıcı (Cell sorter)	FACS AriaII, Beckton Dickinson
Otomatik Pipet	Thermo Scientific
Pipetler	Eppendorf
Hassas terazi	KERN, EMB 200-2
Thermal Cycler	Bio-rad T100 Thermal Cycler
Su banyosu	
DNA/RNAspektrofotometre	NanoDrop200 Spectrophotometer, Thermo Scientific

3.1.2 Kullandığımız Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Çalışmanın her adımında faydalandığımız kimyasal ve biyolojik malzemeler aşağıda bulunan tablo 3.2`de listelenmiştir.

Tablo 3.2 Kullandığımız biyolojik ve kimyasal malzemeler

Malzeme Adı	Markası
PANC-1 Hücre Hattı	American Type Culture Collection, Manassas, VA
Penicillin/Streptomycin	Capricorn Sci
Gemcitabin Hidroklorit	Glentham
Fetal Sığır Serum (FBS) South America	Capricorn Sci
Dmem/Ham's F12 50/50 Mix Lglutamine & sodium pyruvate, with 15mM hepes, with phenol red 5	WISENT MULTICELL
Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin, 0,1% EDTA)	WISENT MULTICELL
Dimetilsülfoksit (DMSO)	BIOMATIK
E.Z.N.A.® Total RNA Kit I	Omega
PBS	Sigma
Oligonukleotid - Primer	Bioligo
Syber Green Master Mix	Virostem

3.1.3 Kullandığımız Sarf Malzemeler

Çalışmada yararlandığımız sarf malzemeler aşağıdaki Tablo 3.3’de listelenmiştir.

Tablo 3.3 Kullandığımız sarf malzemeler

Malzeme Adı	Markası
Serolojik pipet 5 ml; 10 ml; 25 ml	Capp
Hücre kültürü flask (T75) Vent Cap	Nest
Hücre kültürü flask (T25) Vent Cap	Nest
PCR Sealing Film 146 × 81 mm	Nest
0.1ml 96 kuyucuk PCR plak	Nest
Filtreli Pipet ucu 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Capp
15 ml centrifuge tüp	Nest
50 ml centrifuge tüp	Nest
Sterile PES şırınga ucu filtre, Pore:0.22(µm) ; Diameter: 25(mm)	Gvs

3.1.4 Tezde Yararlanılan Veritabanları

Çalışmada yararlanılan veritabanları aşağıdaki Tablo 3.4’de listelenmiştir.

Tablo 3.4 Yararlanılan veritabanları

Adı	Web adresi	Kullanım amacı
NCBI / BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Proteinlerin aminoasit dizileri veya DNA dizi bilgilerini karşılaştırmak için kullanılan programları ve veri bankalarını içeren bir platformdur.

Primer3Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3_plus.cgi/	Çoğaltılması istenen hedef DNA dizisi için primer tasarımı yapılan bir programdır.
Ensembl	http://www.ensembl.org	Birçok genoma mahsus olan referans dizilerini içeren bir veri bankasıdır.
UCSC genome browser	http://genome.ucsc.edu/	Birçok genoma ait referans dizilerin bulunduğu ve in silico PCR ile tasarlanan primerlerin kontrolünün yapıldığı programdır.
Reverse complementary	https://reverse-complement.com/	Nukleotid dizisinin ters tamamlayıcısını hesaplayan veri tabanıdır.
The Human Protein Atlas	https://www.proteinatlas.org/	Hücre, doku ve organlardaki tüm insan proteinlerini haritalamayı amaçlayan bir veri bankasıdır.

3.1.5 Hücre Kültürü

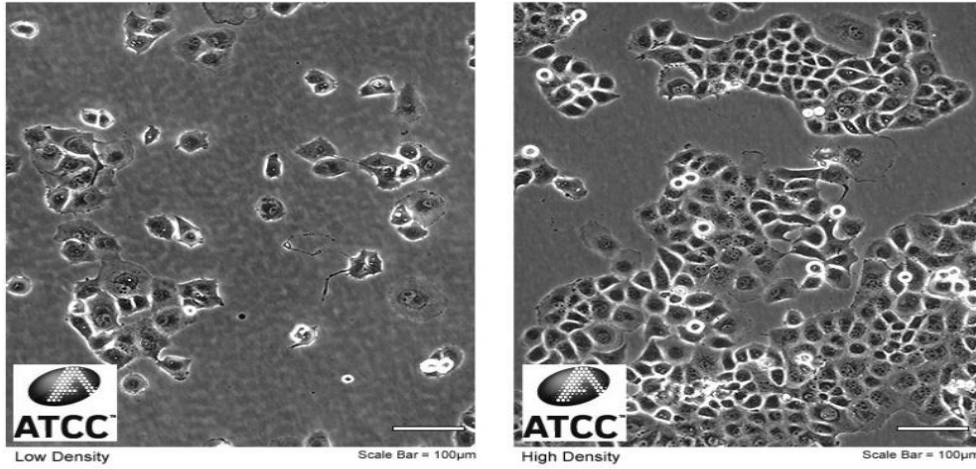
Hücre kültürü; enzim ve hormonların üretimi, enerji metabolizmasının, DNA ve RNA kopyalanmasının incelenmesi, proteinlerin sentezi, hücre döngüsünde çeşitli ilaçların etki mekanizmaları, sinyal yolak mekanizması, hücrelerin beslenme yollarını, enfeksiyonlar, kimyasal değişim, salgılanan özül ürünler gibi birçok amaçlarda kullanılmaktadır. Genellikle tümör hücrelerinden elde edilen hücre hatları in vitro kanser araştırmalarında avantajları sebebiyle kullanılır. Kanser çalışmalarında uygunsuz şartlar altında limitsiz üreme yeteneklerini korumaları, etik kurul onay ve belgesi gerektirmeden ticari elde

edilebilir, kolay uygulanabilir ve homojeniteye sahip olmaları, aynı zamanda donmuş stoklardan rahat kullanılabilir hale gelebilme yetenekleri gibi avantajları olduğundan hücre hatları önemli bir rol model haline gelmektedir.

3.1.6 PANC-1

Hücre kültürüyle çoğaltılmış PANC-1 hücre hattı kullanıldı. Ekzokrin pankreasa özgü PANC-1 hücre hattı insüline proliferatif tepki verir (Deer EL, 2010). Yapılan araştırmada pankreas karsinomundan hücre kültürü ile izole edilmiş pankreas kanser modeline özgün PANC-1 hücre soyu üzerinde çalışılmıştır. İlk kez 1975 yılında Amerikan Tümör Araştırma Enstitüsü tarafından epitelioid karsinomlu 56 yaşındaki beyaz bir erkeğin pankreas kanalından izole edildiği bilinmektedir (Lieber M.,1975). Pankreas kanseri hücrelerinin özelliklerine benzer yapıya sahip PANC1 hücreleri kanser biyolojisi, hücre sinyal iletimi, hücre döngüsü ve kanser tedavisi gibi alanları araştırırken kullanılmaktadır. ATCC PANC-1 hücre hattı mikroskop görüntüsü şekil 3.1`de gösterilmiştir.

ATCC Number: **CRL-1469**™
Designation: **PANC-1**



Şekil 3.1 ATCC PANC-1 hücre hattının mikroskop altında görseli

3.2 YÖNTEM

3.2.1 PANC-1 Hücrelerinin Bazal Kültürü

Bazal hücre kültürünün yapım aşamalarını gerçekleştirmek için, deneylerde PANC-1 hücre soyu kullanıldı. DMEM besiyeri (Wisent Multicell), FBS (Capricorn Scı), Penicillin-Streptomycin antibiyotiği hücre kültüründe kullanılmak için seçildi.

3.2.1.1 Bazal Besiyeri İçeriği ve PBS Çözeltisinin Hazırlanması:

Kullanımdan bir gün evvel hazırlanan taze DMEM besiyeri ertesi gün kullanılmak üzere +4^o C'de, 50 ml falcon tüp içerisinde ağzı parafilmlelenerek saklandı.

İlk olarak 50 ml falcon tüpe 44,5 ml DMEM besiyeri eklenerek üzerine 100x 0,5 ml Penisilin-Streptomisin antibiyotik ve 5 ml PBS eklendikten sonra hazırlanmış çözelti 0,22 µm filtreden geçirilerek bazal besiyeri elde edildi.

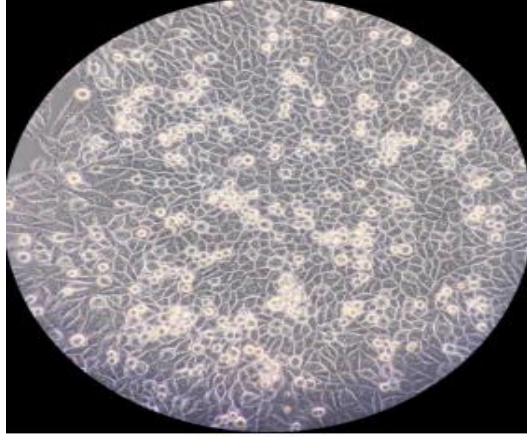
Beş tablet PBS 500 ml steril su içinde vortekslenerek çözüldükten sonra cam şişede 121^o C'de 15 dakika otoklavlandı ve steril edildi.

3.2.1.2 Sıvı Nitrojen Tankından Hücrelerin Alınması ve Çözülmesi:

PANC-1 hücre soyunun bulunduğu kryovial tüp sıvı azot tankından (-196^oC) alındıktan sonra buzun üstüne koyularak çalışacağımız alana steril biçimde getirildi, hücre kültürüne başlandı. Dondurma solüsyonundaki mevcut hücreler 37^oC ısıtılmış su banyosuna alınarak çözümleri sağlandı.

Hücreler, 15 ml falcon tüpe (7 ml bazal besiyeri bulunan) geçirildi. Isıtılan bazal besiyerden 1 ml alınarak kryovial tüpün üst kısmında olası hücreleri temizlemek için yıkandı, falcon tüpe ilave edildikten sonra yavaşça pipetaj yapılarak 6 dak 2500 rpm' de santrifüje bırakıldı, pelletdeki süpernatant ayrıştırıldıktan sonra atıldı. Pelletteki hücelere 5 ml besiyeri eklendi, pipetaj yapılarak hücrelerin kalkınması ve besiyerideki homojenizasyon ayarlandı. İçerisinde DMSO bulunan dondurma solüsyonundan hücrelerin iyice temizlenmesi için 6 dak 2500 rpm' de santrifüj yapıp tekrarlandı ve süpernatant kenarlaştırıldı. 7,5 ml bazal besiyeri pelletteki hücrelerin üzerine eklenerek yavaşça pipetajlandı. 37^oC inkübatörün içine önceden koyulan T25 flaska homojenize olmuş hücreler ekildikten sonra, 37^oC ve 5% CO₂'ye ayarlanmış inkübatörde ekilen hücreler koyularak inkübasyona kaldırıldı. Bazal besiyeri iki

günde bir değiştirildi ve hücre yoğunluğu %95 üzerinde olduğunda hücreler T75 flaska pasajlanarak çoğaltıldı.



Şekil 3.2 İnvirt mikroskop altında PANC-1 hücrelerinin karakteristik görüntüsü

3.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

Her gün flasklarla birlikte invert mikroskop altında incelenen pasajlanarak ekilmiş ve inkübatöre alınmış flask tabanındaki hücrelerin yüzeyi tamamen kaplandığında, 95% oranındaki yoğunluk görüldüyü zaman yeniden pasajlama gerçekleştirildi.

Hücrelerin sayıları çoğaldığından daha büyük flaska geçirebilmek adına, önceki flasklardaki besiyeri çekildi ve kenar edildi, sonrasında uygun olarak 2 ml ve 7 ml PBS`le T25 flask ve T75 flask yıkandı. Flasklarda yıkama tamamlandıktan sonra PBS`ten tamamen arındırıldı, Tripsin/EDTA`yı flasklara ekleyip 3 dak. 37^oC inkübatörde bekleyerek flaskın yüzey kısmına yapışmış hücreler kaldırıldı. Tripsin/EDTA`dan 2 ml T25 flaska, 5 ml T75 flaska koyuldu. İnkübasyondan sonra invert mikroskopla flasklar takip edildi, hücrelerin vaziyetine bakıldı, yüzeyden hücrelerin kalkmasına tam dikkat edildi, bazal besiyerini flasklara ekledikten sonra Tripsin/EDTA`yla inhibe edildi. Bazal besiyerinden 3 ml T25 flasklara, 5 ml T75 flasklara ilave edildi. Son karışım 15 ml falkon tüpe aktarıldıktan sonra yine 6 dak 2500 rpm`de santrifüjlendi. Süpernatant santrifüj sonrası çekildi ve uzaklaştırıldı. Bazal besiyerinden 7 ml pelletteki diğer hücelere eklendi, santrifüj tekrardan yapıldı. 5 ml bazal besiyeri pelletteki mevcut hücelere eklendi, pipetajlanarak homojenize edilen karışım yeni flasklara geçirildi. İçerisinde 7,5 ml besiyeri T25 flasklarda, 15 ml besiyeri T75 flasklarda bulunacak halde bazal besiyeri eklenerek tamamlandı.

3.2.1.4 Hücre Dondurma Solüsyonu Protokolü ve İçeriği

Klasik pasajlama yöntemi uygulanarak hücreler donduruldu. İkinci santrifüj sonrası 5000 µl bazal besiyeri pelletteki hücreler üzerine ilave edildi ve dikkatlice pipetajlandı. Hücre sayımı invert mikroskop altında yapıldıktan sonra üzerine 6400 µl bazal besiyeri, 600 µl DMSO eklendi, vortekslenip, pipetajlanarak homojenize edildi. Tüplerin her birine 2 ml karışım, aynı zamanda 2 milyon hücre olası biçimde dondurma işlemi gerçekleştirildi. Hücreler Katalog no: 5100-001 olan Nalgene markalı Freezing Contanier içerisinde -80 °C'de bir gece boyunca tutulduktan sonra saklanmak üzere -196°C sıvı azot tankına kaldırıldı.

Tablo 3.5 Hücre dondurma solüsyonu içeriği

Madde	Madde miktarı (µl)	Yüzdelik kısım (%)
Bazal Besiyeri	11400	95
DMSO	600	5
Toplam	12000	100

3.2.2 PANC1 Hücrelerinin Gemsitabin ile Muamelesi

3.2.2.1 Gemsitabin Çözeltisinin Hazırlanması

25 mg toz halinde olan gemsitabin 209 µl DMSO`yla pipetaj yapılarak çözündürüldü ve 400 mM konsantrasyon olacak şekilde Ana stok hazırlandı. Ana stoktan 100 µl alınıp 400 µl DMSO`yla pipetaj yapıp seyreltildikten sonra 100 mM konsantrasyona sahip I Ara stok elde olundu. 20 µl I Ara stok`dan alındı, 180 µl DMSO`yla pipetajlanarak seyreltilip, 10 mM konsantrasyona sahip II Ara stok elde olundu. 20 µl, II Ara stok`dan alındı, 180 µl DMSO`yla pipetaj yapılarak seyreltilip 1 mM konsantrasyona sahip III Ara stok elde olundu. III Ara stok`dan 180 µl alındı, 36 ml bazal besiyerine eklenerek homojenize olunduktan sonra son konsantrasyonu 5 µM olan GEM çözeltisi elde edildi.

Tablo 3.6. Gemsitabin çözeltisi hazırlama ana ve ara stok şablonu

Stok Adı	İçeriği	Konsantrasyonu (mM)
Ana stok	25 mg GEM + 209 µl DMSO	400
I Ara stok	100 µl ana stok + 400 µl DMSO	100
II Ara stok	20 µl I ara stok + 180 µl DMSO	10
III Ara stok	20 µl II ara stok + 180 µl DMSO	1

3.2.2.2 Gemsitabin'e Maruz Bırakma/ Gemsitabin ile Muamele Edilmesi

13. Pasaj sayılan inkübatöre koyduğumuz altı adet T25 flask çıkarıldıktan sonra flasklar kenarından serolojik pipetle medyumlar çekilip atıldı. 50 ml falkon tüp için hazırladığımız 5µM 36 ml GEM çözeltisinden (2'şer ml PBS'le yıkanan) flaskların her birine 6 ml koyuldu. Flasklar inkübatöre kaldırıldıktan sonra 72 saat inkübasyon süresi tutuldu.

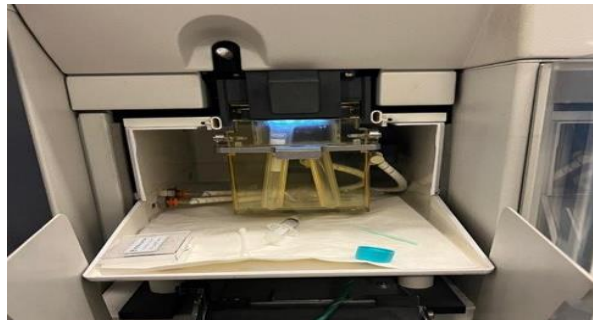
3.2.3 Hücrelerin CD24/CD44 Yüzey Belirteç Tiplerine Göre İzolasyonu

3.2.3.1 Hücrelerin Sayımı ve İzolasyona Hazır Hale Getirilmesi

6 adet T25 flask inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra invert mikroskop altında incelendi, hücreler temiz bazal besiyerine alınarak sayıldı. Flaskların içerisinde olan medyumlar çekilerek 15 ml ağzı parafilmelenen falcon tüplere aktarıldı. İleri adımlarda kullanılması için poşetlere konulan tüpler, -20^o C' ye kaldırıldı.

3.2.3.2 Akan Hücre Ölçerde Hücrelerin Yüzey Belirteçlerine Göre İzolasyonu

4, 5 ve 6 ile numaralandırılmış üç tüp izolasyonu gerçekleştirildi (1 tüpün izolasyonu 75 dakika kadar sürdü). PE boyasıyla boyanmış CD24 ve APC boyasıyla boyanmış CD44 antikoru kullandık.



Şekil 3.3 FACSAriaII, Beckton Dickinson cihazıyla hücre akımı saflaştırma görseli

3.2.3.3 Hücre Canlılık Testi

IC50 değerleri önceden saptanarak GEM dozajı 5 μ M miktarında hücrelere verildi ve 72 saat inkübasyonu gerçekleştirilerek analizler yapıldı, sonra GEM verilen ve hasat edilen hücre grupları Annexin5`le hücre canlılık oranlarına bakıldı. Yüzdelerik değerleri karşılaştırılması için CD24/CD44 yüzey marker`ına göre 4 gruba ayrılarak canlılık analizine bakıldı.

3.2.4 RNA İzolasyonu

Hücreler üç grup şeklinde sınıflandırılarak santrifüj ile çöktürüldü, E.Z.N.A.® Total RNA Kit I; Omega protokolüne birebir şekilde çalışma yapıldı. İzolasyon yapılmadan evvel 48 ml %100 etanol RNA Wash Buffer II`ye eklenerek 5 kat dilue edilerek oda sıcaklığında bekletildi. 20 μ l β -merkaptoetanol her 1 mL TRK Lysis Buffer`a eklendi ve oda sıcaklığında bekletildi. 100 nM konsantrasyona sahip RNA`lar nükleaz içermeyen suyla (“nuclease free”) dilue edilerek alikotlandı ve stok RNA`lar -80 °C`de saklandı. Çalışma anında pelletdeki 80°C`de saklanan hücrelerin gruplara ayrılarak kuru buz üzerinde taşınması gerçekleştirildi.

I Grup: Kültürün son aşamada beş μ M GEMin uygulandığı ve yetmiş iki saat inkübasyona bırakılan hücre grubu

II Grup: GEM uygulanan ve CD24+/CD44+ hücre grubunun CD24/CD44 yüzey marker`ına uygun ayrıştırılması

III Grup: Tripsin/EDTA ile hasat edilerek toplanılan, ek bir işleme maruz bırakılmayan kontrol grubu

Tablo 3.7 GEM uygulanan deney gruplarının şematik gösterimi

GEM uygulanan I grup	GEM uygulanan ve CD24+/CD44+hücre grubuna göre ayrıştırılan II grup	Kontrol III grup
No:1	No:2	No: 7
No:3	No:5	No: 8
No:4	No:6	No: 9

3.2.4.1 Hücre gruplarında RNA eldesi

1. Pellet üzerine 350 µl (7,8,9 numaralı tüplere 700 µl) TRK Lysis Buffer eklendi ve pipetajlandıktan sonra küçük vortexlenerek tekrar buz üzerine koyulup pipetajlandı.
2. Tüplerdeki karışım volümü belirlendi, tüplere 1:1 oranında %70 etanol eklendi. 7,8 ve 9'cu numaralı tüplere 700 µl, 400 µl diğer tüplere etanol ilave edildi.) Tüplerimiz dikkatlice vorteks edildi.
3. 2 ml toplama tüpüne Homogenizer Mini Column konularak lizat kolona yüklendi.
4. 1dak x 10.000 g santrifüjlendi. Toplama tüpündeki birikmiş sıvı kolona tekrar yüklendikten sonra yeniden santrifüjleme işlemi tekrar yapıldı.
5. Toplama tüpündeki birikmiş sıvı ikinci santrifüj sonrası kenar edildi. Kolonların her birine 500 µl RNA Wash Buffer I konuldu ve otuz san x 10.000 g santrifüj edildi.
6. Santrifüjden sonra tüpdeki birikmiş sıvı atılarak kolonların her birine 500 µl RNA Wash Buffer II konuldu ve bir dak x 10.000 g santrifüj yapıldı.
7. Tüpdeki kalan sıvı uzaklaştırıldı ve II yıkama 2 kez tekrarlandı. İkinci tekrardan sonra iki dak x max speed kuru santrifüj sonrası kolonlar kuruduktan sonra 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine kaldırıldı.
8. Kolonlara 40 µl nükleaz içermeyen su konulduktan sonra beş dak oda sıcaklığında bekletildi.
9. İnkübasyondan sonra örnek iki dak x 14.000 g santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpü içerisinde toplanmış örnek kolona yeniden yüklenerek tekrar santrifüjü gerçekleştirildi.
10. NanoDrop™ 2000 ile RNA'ların saflığı ve konsantrasonu ölçüldü.

Aşağıdaki tablo 3.8`de RNA ölçüm sonuçları verilmiştir.

Tablo 3.8. RNA konsantrasyonları

Grup ve Örnek Numarası	Konsantrasyon (ng/ µl)
1.grup / No: 1	935
1.grup / No: 3	794
1.grup / No: 4	605

2.grup / No: 2	187
2.grup / No: 5	240
2.grup / No: 6	266
3.grup / No: 7	1978
3.grup / No: 8	1381
3.grup / No: 9	2041

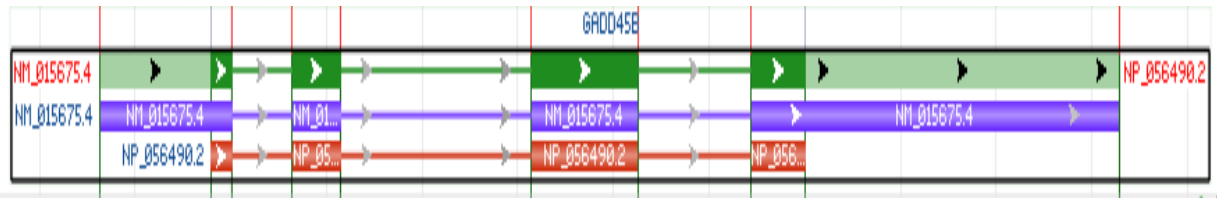
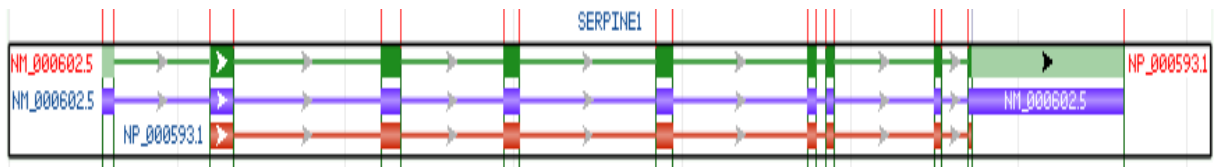
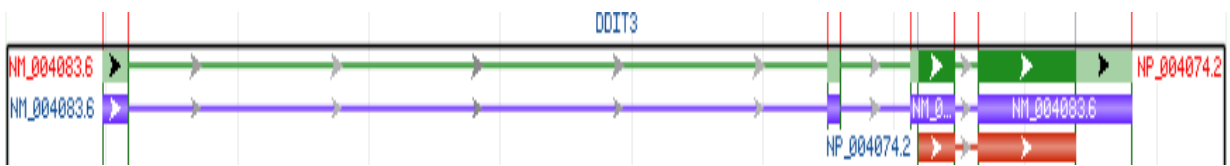
3.2.5 Primer Dizaynı

PCR uygulamasının başarıyla tamamlanabilmesi adına en önemli kriterlerden biri olan Primer tasarımı düzgün tasarlanmadığında PCR'in etkin çalışmamasına sebep olur. Primerlerin tasarlanması için bilinen parametreler göz önüne alınmalıdır. Parametrelere örnek olarak: primerin uzunluğunu, bağlanma süresi ve bağlanma sıcaklığını gösterebiliriz. Bağlanma süresi ve bağlanma sıcaklığı yapılan PCR'ı etkiler. Genellikle primer dizi sekansına spesifik bağlanma gerektiren primerlerin 19-23 baz uzunluğunda tasarlandığı bilinmektedir, çoğaltılan ürünün azalmasına sebep olan bağlanma verimi primer uzunluğuna ters orantılı olduğunda etkilenebilir. Parametrelerden biri erime sıcaklığı (T_m) değeridir. 18-22 baz uzunluğuna sahip tasarlanan primerler için T_m değerinin 54-72°C arasında, ideal olarak ise 58-59°C'de olması spesifik seçilen diziyeye primerlerin sağlam bağlanarak amplifikasyonun verimli olmasını sağlayacaktır. Tasarladığımız primerin her 2 dizisinde T_m değerinin yakınlığı göz önünde bulundurulması gereken hususlardandır. Amplifikasyon veriminin etkilendiği başka bir parametre G/C oranıdır. Optimum G/C oranı %40-%60 olmalıdır. PCR yönteminin son aşamasındaki reaksiyonun gerçekleşmesini polimeraz enzimi için 3'üçlü primerler sağlar.

Seçilen genlerin transkriptlerinin saptanması ve primer dizilerinin tasarlanması National Center for Biotechnology Information Blast ve Primer3 programı kullanıldı. Çalışmada tasarlanmış primerlerin dizaynının sağlanması için National Center for Biotechnology Information ve Reverse Complementary siteleri kullanıldı. Elde edilen diziler Tablo 3.9'da verilmiştir. Genler üzerindeki primer dizilerinin lokasyonları aşağıda gösterilmektedir.

Tablo 3.9 Seçilmiş genlerin dizileri

Gen Adı	Primer Yönü	Primer Dizisi
<i>PPIA</i> (Kontrol gen)	Forward	5`-TTCATCCTAAAGCATAACGGGTCC-3`
	Reverse	3`-TTGCCATCCAACCACTCAG-5`
<i>GADD45B</i>	Forward	5`-CAGAAGATGCAGACGGTGAC-3`
	Reverse	3`-CGTTGTCACAGCAGAAGGAC-5`
<i>SERPINE1</i>	Forward	5`-TCCGGCATCTGTACAAGGAG-3`
	Reverse	3`-GGCTCTCTCCACCTCTGAAA-5`
<i>CHOP</i>	Forward	5`-GTCTAAGGCACTGAGCGTA-3`
	Reverse	3`-ACACTTCCTTCTTGAACACTCT-5`

Şekil 3.4 *GADD45B* (NM_015675.4) genin lokasyonuŞekil 3.5 *SERPINE1* (NM_000602.5) genin lokasyonuŞekil 3.6 *CHOP*(*DDIT3*) (NM_004083.6) genin lokasyonu

2.5.1 Primer Dizaynının Kontrol Edilmesi

Yapılan çalışmada seçilen primerlerin kontrol edilmesi için Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences bölümüne erişilerek analiz kısmına seçtiğimiz mRNA`ya ait transkript numarası (NM numarası) ve forward primer olduğu gibi, revers primerin ise Reverse Complementary sitesinde primerin revers komplementeri çevrilerek alınan revers primer eklendi, hesaplamalar sonucu doğru primerleri kullandığımız tespit edildi. Aşağıda örnek olarak *GADD45B* geni için verilmiştir. (Şekil 3.7`de verilmiştir)

-2672	20/1371(1%)	1351/1371(98%)	Plus/Plus
Query 1	AGATCGCCGAAGCGTCGGACTACCGTTGGTTTCCGCAACTTCCTGGATTATCCTCGCCAA		60
Query 61	GGACTTTGCAATATATTTTTCCGCCTTTTCTGGAAGGATTCGCTGCTTCCC GAAGGTCT		120
Query 121	TGGACGAGCGCTCTAGCTCTGTGGGAAGGTTTTGGGCTCTCTGGCTCGGATTTTGAATT		180
Query 181	TCTCCCTGGGGACTGCCGTGGAGCCGCATCCACTGTGGATTATAATTGCAACATGACGCT		240
Query 241	GGAAGAGCTCGTGGCGTGCACAAACCGCGCAGAAAGATGCAGACGGTGACCGCCGCGGT		300
Sbjct 1	-----CAGAAGATGCAGACGGTGAC-----		20
Query 301	GGAGGAGCTTTTGGTGGCCGCTCAGCGCCAGGATCGCCTCACAGTGGGGGTGTACGAGTC		360

Şekil 3.7 *GADD45B* forward primer dizaynı sağlaması

Sequence ID: Query_4188635 Length: 20 Number of Matches: 1			
Range 1: 1 to 20 Graphics			
NW Score	Identities	Gaps	Strand
-2672	20/1371(1%)	1351/1371(98%)	Plus/Plus
Query 1	AGATCGCCGAAGCGTCGGACTACCGTTGGTTTCCGCAACTTCCTGGATTATCCTCGCCAA		60
Query 61	GGACTTTGCAATATATTTTTCCGCCTTTTCTGGAAGGATTCGCTGCTTCCC GAAGGTCT		120
Query 121	TGGACGAGCGCTCTAGCTCTGTGGGAAGGTTTTGGGCTCTCTGGCTCGGATTTTGAATT		180
Query 181	TCTCCCTGGGGACTGCCGTGGAGCCGCATCCACTGTGGATTATAATTGCAACATGACGCT		240
Query 241	GGAAGAGCTCGTGGCGTGCACAAACCGCGCAGAAAGATGCAGACGGTGACCGCCGCGGT		300
Query 301	GGAGGAGCTTTTGGTGGCCGCTCAGCGCCAGGATCGCCTCACAGTGGGGGTGTACGAGTC		360
Query 361	GGCCAAGTTGATGAATGTGGACCCAGACAGCGTGGTCTCTGCCTCTTGGCCATTGACGA		420
Query 421	GGAGGAGGAGGATGACATCGCCCTGCAAATCCACTTCACGCTCATCCAGTCCCTTCTGCTG		480
Sbjct 1	-----GTCCTTCTCTG		12
Query 481	TGACAAACGACATCAACATCGTGCAGGTTGCGGGCATGCAGCGCTGGCGCAGCTCCTGGG		540
Sbjct 13	TGACAAACG-----		20

Şekil 3.7.1 *GADD45B* revers primer dizaynı sağlaması

3.2.5.2 Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize halde primerler RNAz/DNAz içermeyen saf suyla sulandırılarak yavaşça vorteks edilip, tamamen çözümleri sağlandı. Primerlerin her biri için 100 µM stok çözeltisi alındıktan sonra uzun süreçte saklanması sebebiyle -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.6 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR)

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu için OneStep 2X RT-qPCR Master Mix (Virostem Biotechnology-TR) kullanıldı. Bu kiti kullanmanın avantajı cDNA dönüşümünü yapan enzimi de içinde barındırması ve cDNA yapılmasına gerek duyulmamasıdır. QRT-PCR zamanı cihaz ilk 10 dakikada cDNA dönüşüm aşamasını tamamlıyor ve böylece sonuçlarda hata payı minimuma indiriliyor. PANC-1 hücre hattında ekspresyonu stabil olduğu bilinen *PPIA* kontrol gen olarak seçildi, hedeflenen her gen için spesifik tasarlanmış primerler kullanıldı. Tm sıcaklık değerleri ve Syber Green Master Mix'in aktivasyon sıcaklıklarına dikkat edilerek ROCHE LC 480 cihazında çalışmalarımız gerçekleştirildi.

Buz aküsü üzerinde 96 kuyucuklu palet her bir kuyucuğunda Tablo 3.10'da yer alan mix içerikleri olacak şekilde hazırlandı. Üzeri sealer ile kapatılan 96 kuyucuklu plaka spin edildikten sonra cihaza yerleştirildi.

Tablo 3.10 QRT-PCR reaksiyon karışımı

Virostem 2X Onestep QRT-PCR Master Mix	5 µl
Primer Forward	0,4 µl
Primer Reverse	0,4 µl
RNA	1,25 µl
Su (Nükleaz free)	2,95 µl
Toplam Hacim	10 µl

Tablo 3.11. QRT-PCR koşulları

İnkübasyon	45°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	3 dk	
Döngüler	95°C	15 sn	} 45 döngü
	60°C	30 sn	
Melt Curve	95	3 dk	

3.2.7. Veri Analizi

Gen anlatım düzeyinin relatif değişiminin hesaplanması için Livak metodu kullanılarak istatistiksel analiz edildi. Kontrol ve deneysel örneklerin her biri için ortalama Ct değerleri hesaplandı. 2'er tekrarlı belirlenmiş koşulların ortalamaları alındıktan sonra kontrol ve hedef genler için deneysel ve kontrol örnekler arasında normalizasyon bakılarak ΔCt hesaplaması yapıldı. Sonra kontrol ile hedef gen arasında normalizasyon yapılarak $\Delta\Delta Ct$ hesaplandı. Gen anlatım düzeyinin relatif değişiminin hesaplanması için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ kullanıldı.

Elde edilen verilerin istatistiksel sonuçlarını değerlendirmek için SPSS 22 programı kullanıldı. Ki-kare testi sonucu elde edilen p değerinin 0,05'e (%5) eşit veya küçük olan değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. Deney gruplarındaki değişikliklerin ekspresyon seviyelerine etkileri ANOVA testi ile analiz edildi. ANOVA test hesaplaması uygulanarak hesaplanan P değeri ile sonuçların anlamlandırılması yapıldı.

Veri kümelerimiz arasında korelasyon olmadığını, aksinin varsayımını istatistik kullanarak kanıtlayabiliriz. Hipotezler sıfır (H0) ve alternatif (H1) formlarında belirtilir. Sonuçlardan elde edilen p (olasılık) değeri, gözlemlenen herhangi bir korelasyonun şans eseri olmasının ne kadar olası veya muhtemel olduğunu bir ölçümüdür. Düşük p değerleri sıfır hipotezine karşı güçlü kanıtlar olarak bilinir ve bu zaman sıfır hipotezi (H0) reddedilir. Veri kümeleri arasındaki bağlılık, H0'da belirtilenden önemli derecede farklıdır. P değerleri 0 ile 1 (0%-100) arasında olur. 1'e yakın bir p değeri, şans haricinde korelasyon gözlenmediğini ve boş hipotez varsayımının doğru olduğunu gösterir. P-değeri 0'a yakınsa, gözlemlenen korelasyonun tesadüfi olması olası değildir ve H0'ın yanlış olma ihtimali yüksektir. Bu durumda, veri kümeleri arasında bir korelasyon olmasına ilişkin alternatif (H1) hipotezi kabul edilir.

4 BULGULAR

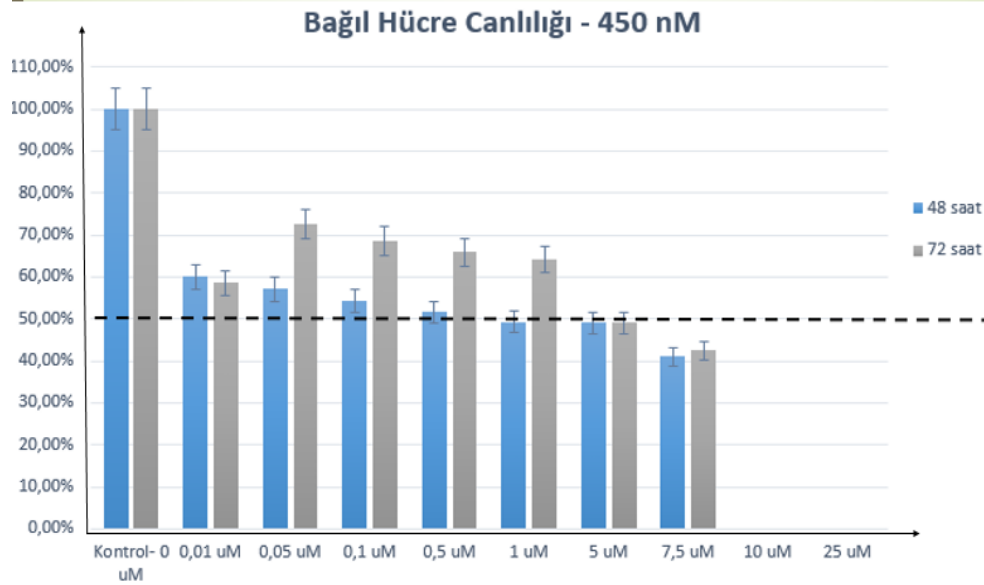
Bu çalışmada PANC-1 hücre hattında Gemsitabin maruziyetinin *GADD45B*, *SERPİNE1* ve *CHOP* genlerinin anlatım düzeylerinde oluşturduğu değişimlerin incelenmesi için QRT-PCR kullanılması amaçlandı.

4.1 Gemsitabin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Spektrofotometrik yöntemlerle farklı doz ve saatlerde Gemsitabin'e maruz bırakılan hücreler için hücre canlılık analizleri sonrası elde olunan bilgiler baz alındı. Spektrofotometrik absorbans (Abs) değerleri kullanıldı, formazan kristallerinin miktarı ve bağlı hücre canlılık oranları hesaplandı. Kontrol grubunun canlılık oranı %100 olarak düşünüldü, her bir deneysel koşulun Abs değerinin tekrarlarının ortalaması alınarak işlemler yapıldı.

$$\Delta\text{Abs (hedef)} = \text{Abs(hedef)} - \text{Abs (blank)}$$

$$\text{Bağıl hücre canlılığı (\%)} = \Delta\text{Abs(hedef)} \times 100\% / \Delta\text{Abs(kontrol)}$$



Şekil 4.1 Bağıl hücre canlılığı (450 nM dalga boyu): 48 ve 72 saat inkübasyon verileri baz alınarak, x ekseninde uygulanmış Gemsitabin dozları ve y ekseninde bağıl hücre canlılık değerleri gösterilmiştir.

IC50 değeri, belirli bir biyolojik veya biyokimyasal prosesi %50 oranında inhibe etmek için gerekli ilaç konsantrasyonunun ölçüsüdür. Bağlı olarak %50 hücre canlılık değerlerine (IC50); 5 μ M konsantrasyona sahip ilaç dozu uygulamasında 72 saat inkübasyon zamanı ulaşılabildiği görüldü. Bu veriler doğrultusunda, optimum ilaç dozu 5 μ M ve inkübasyon süresi 72 saat olarak seçildi.

Tablo 4.1 : Elde edilen analiz sonuçlarının % değerleri.

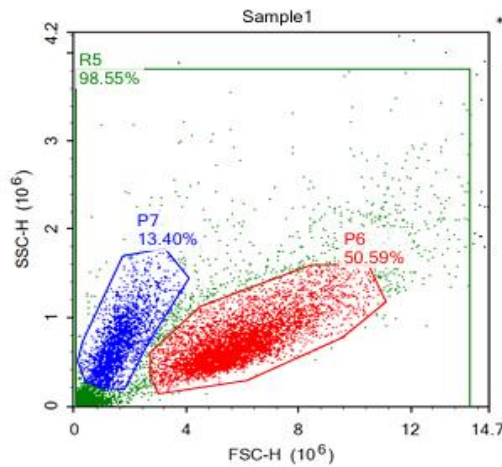
μ M	Kontrol(0)	0,01	0,05	0,1	0,5	1	5	7,5	10	25
48 saat	100%	60,03%	57,06%	54,45%	51,70%	49,31%	49,02%	40,97%	0%	0%
72 saat	100%	58,64%	72,58%	68,51%	65,85%	64,11%	49,06%	42,43%	0%	0%

4.2 İmmünojenik Bulgular

4.2.1. CD24 ve CD44 Hücrelerinin Mevcudiyeti

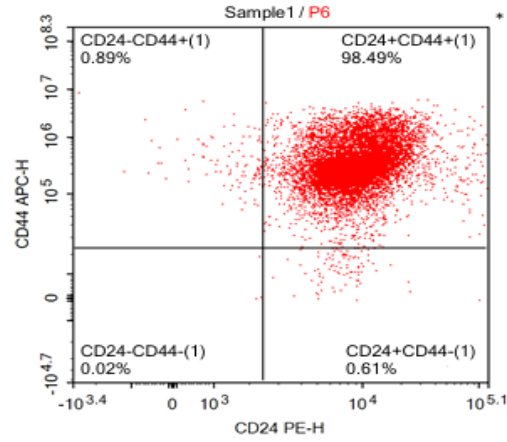
İlk olarak GEM uygulanmadan önce CD24 ve CD44 varlığı PANC-1 hücrelerinde gösterildi. Tripsin/EDTA ile yüzeye tutunmuş hücreler kaldırıldı, sonra hasat edildikere hücrelerin popülasyonları FACS Aria II, Beckton Dickinson cihazına incelenmek için alındı.

Hasat edilen hücrelere bakıldığı zaman tam canlılık gösteren kırmızı hücrelerin oranı %50,59, intihara başlayan mavi hücrelerin oranı %13,40 olarak belirlendi.



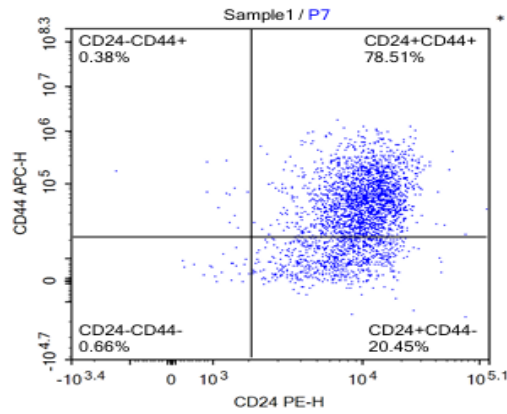
Şekil 4.2 Canlılık Analizi

CD24/CD44 yüzey marker'ına göre gruplandırılan tam canlılık gösteren hücrelerde: %98,49 CD24+/CD44+, %0,6 CD24+/CD44-, %0,02 CD24-/CD44+, %0,89 CD24-/CD44- oranında ayrıştırıldığı gerçeğiyle yüzleşildi.



Şekil 4.3 Tam canlı hücrelerin ayrışma görüntüsü

Ölmeye yüz tutan hücrelerde ise: %78,51 CD24+/CD44+, %20,45 CD24+/CD44-, %0,38 CD24-/CD44+, %0,66 CD24-/CD44- oranında ayrıştırılma gözlemlendi.



Şekil 4.4 Ölmek üzere olan hücrelerin ayrışma görüntüsü

Yeterince hücre olmaması sebebiyle RNA izolasyonu gerçekleştirilemeyen CD24+/CD44- hücre grubunda genlerin ekspresyon değerleri saptanmadığından incelenmeye alınmadı.

4.2.2 Hücre Canlılık Testi Sonuçları

GEM verilen ve hasat edilen hücre grupları Annexin5`le hücre canlılık oranları incelendikten sonra yüzdelik değerleri karşılaştırılması için CD24/CD44 yüzey marker`ına göre 4 gruba ayrılarak canlılık analizine bakıldı.

4.2.3 Sorting Analiz Sonuçları

Tablo 4.2 GEM uygulanma öncesi ve sonrası sorting analiz sonuçları

		GEM (neqativ)	GEM (pozitif)				Fark
CD24	CD44		Ortalama	No:4	No:5	No:6	
-	+	%0,89	%1	%1,9	%0,9	%0,2	(-) %0,11 artış
+	-	%0,61	%8,93	%7,3	%6,6	%12,9	(+) %8,32 artış
+	+	%98,49	%89,3	%89,4	%92,2	%86,4	(-) %9,19 azalış
-	-	%0,02	%0,73	%1,4	%0,3	%0,5	(+) %0,71 artış

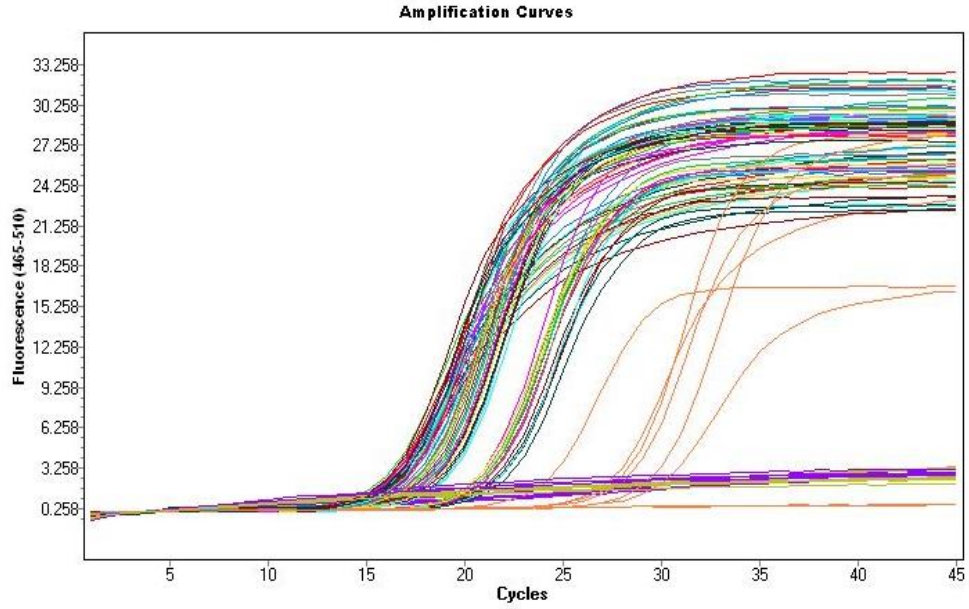
GEM uygulandıktan sonra değerlerde;

CD24-/CD44+ değerinde %0,11 artış, CD24+/CD44+ değerinde %9,19 azalış, CD24+/CD44- değerinde %8,32 artış, CD24-/CD44- değerinde %0,71 artış gözlemlenmiştir.

4.3 QRT-PCR Optimizasyon Sonuçları

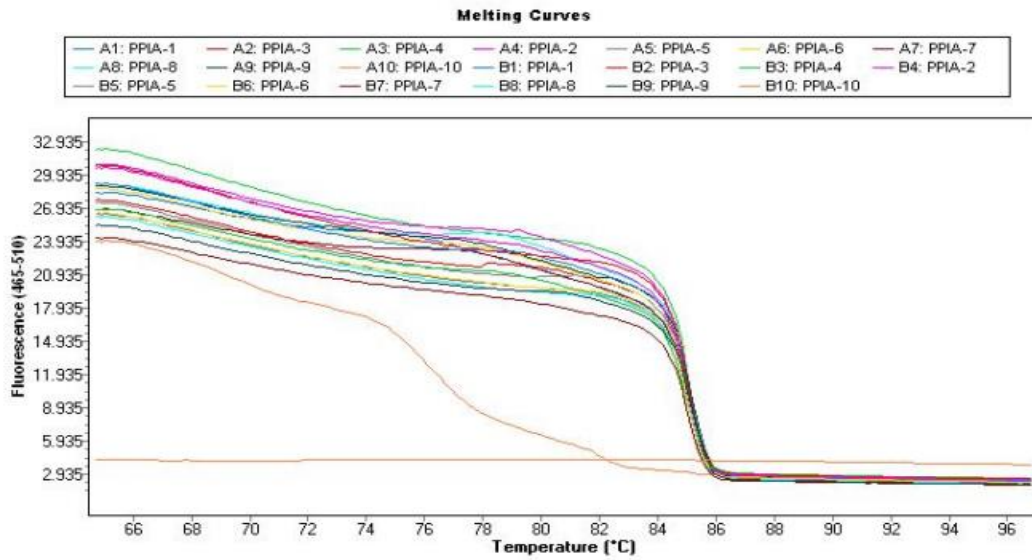
PANC1 hücre soyunda gerçekleştirilen GEM uygulaması sonucu *GADD45B*, *SERPİNE1* ve *CHOP* genlerinin ekspresyon değişimleri incelenmiştir. *PPIA* geni kontrol gen olarak seçilmiş ve değerlendirmeler GEM'e maruz bırakılmayan kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapılmıştır. PANC1 hücreleri üzerinde 5µM konsantrasyonda 72 saat süreyle inkübe edilerek hücre hasadı gerçekleştirilen GEM etkisi bulunan seçilmiş hücrelerden, aynı zamanda GEM ile muamele görmeyen hücrelerin tümünden de RNA izolasyonu yapılmıştır. Spesifik olarak *GADD45B*, *SERPİNE1* ve *CHOP* genlerinin transkriptleri için dizayn edilen primerler kullanılarak QRT-PCR yapılmıştır. Kullanılacak syber green kit seçimi ve primerlerin

kontrolü hedefi ile optimizasyon deneyleri tasarlandı. Kullanılan örneklere ait çıktılar aşağıda verilmiştir.

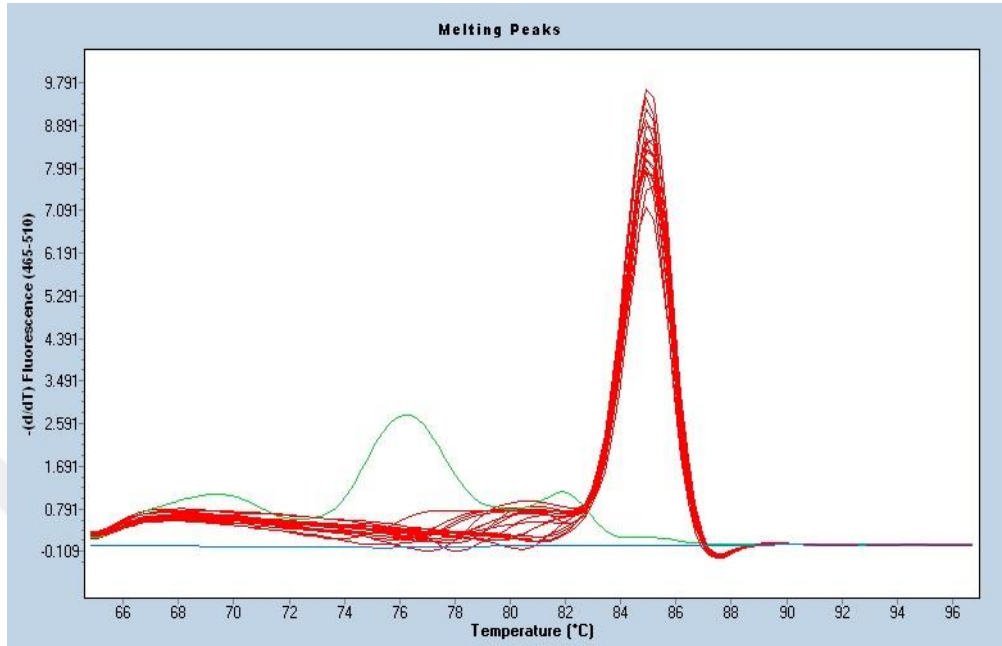


Şekil 4.5 Optimizasyon plak cihaz çıktısı. Farklı renklerde kombine edilmiş örneklere ait cihaz çıktısı incelendiğinde her benzer örnek kümesinin kendi içinde ilk amplifikasyon eğrisine başlangıç giriş noktalarının birbirine yakın olduğu gözlemlendi.

4.3.1 LightCycler Roche 480`nin Erime ve Tm Calling Eğrileri.

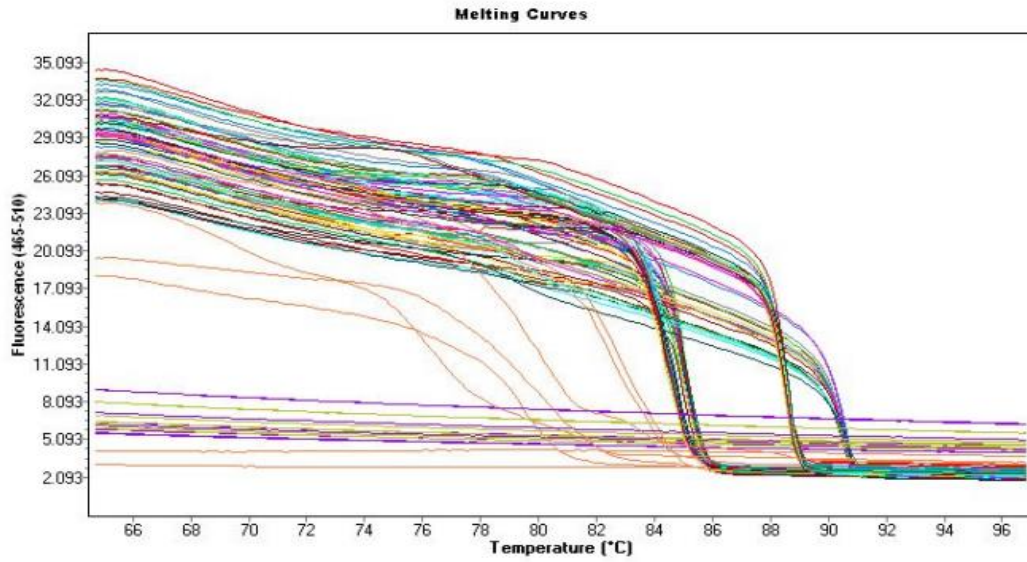


(a)

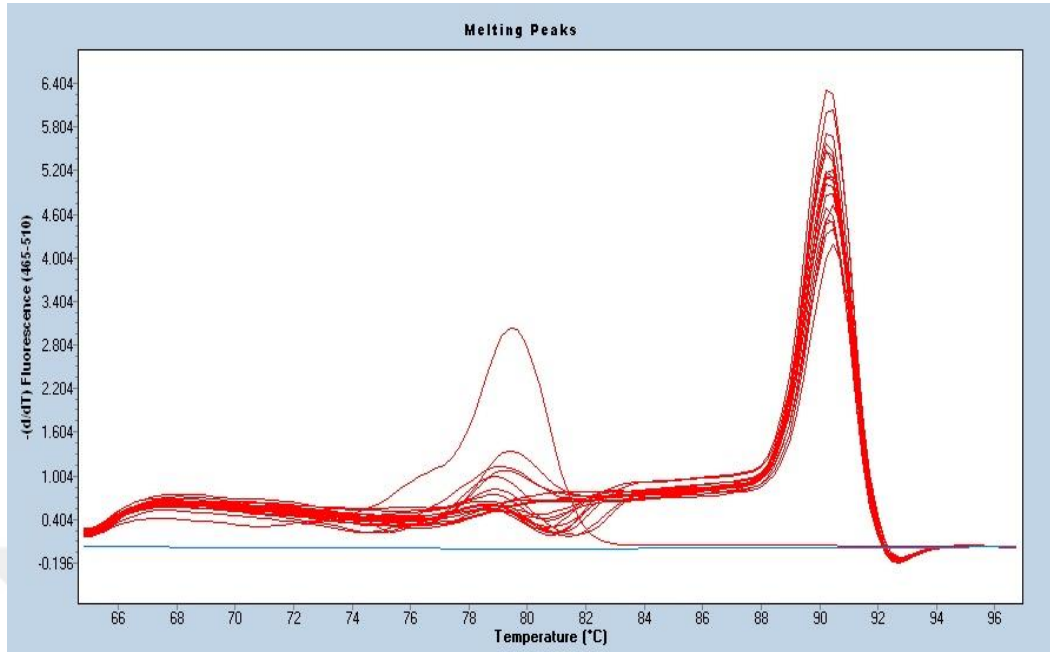


(b)

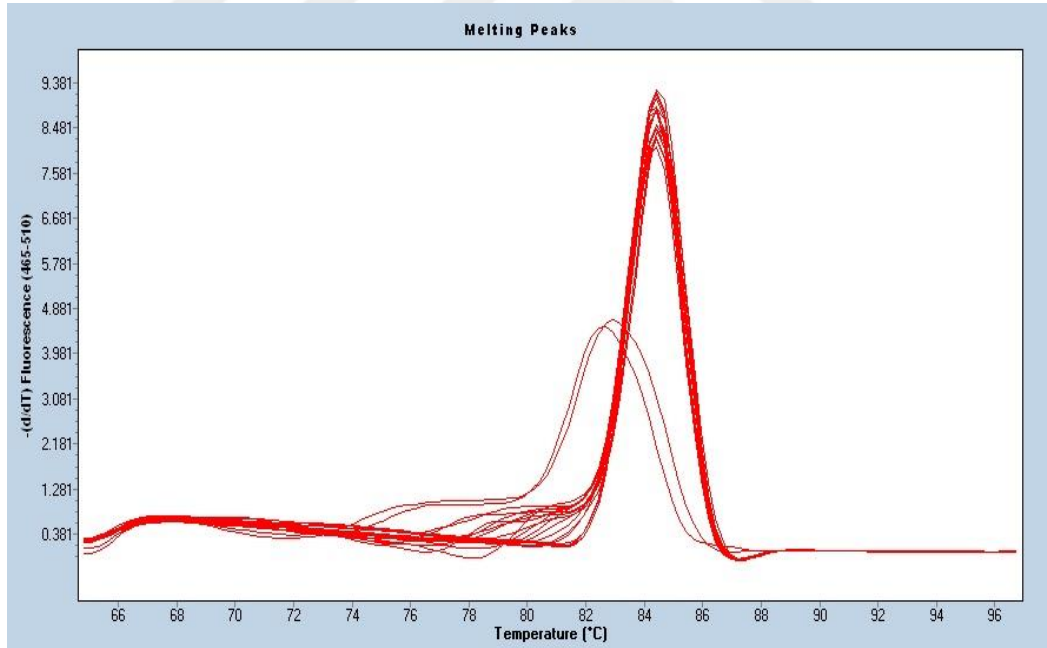
Şekil 4.6 PPIA geni (a) SYBR Green erime ve (b) Tm calling eğrisi analizi



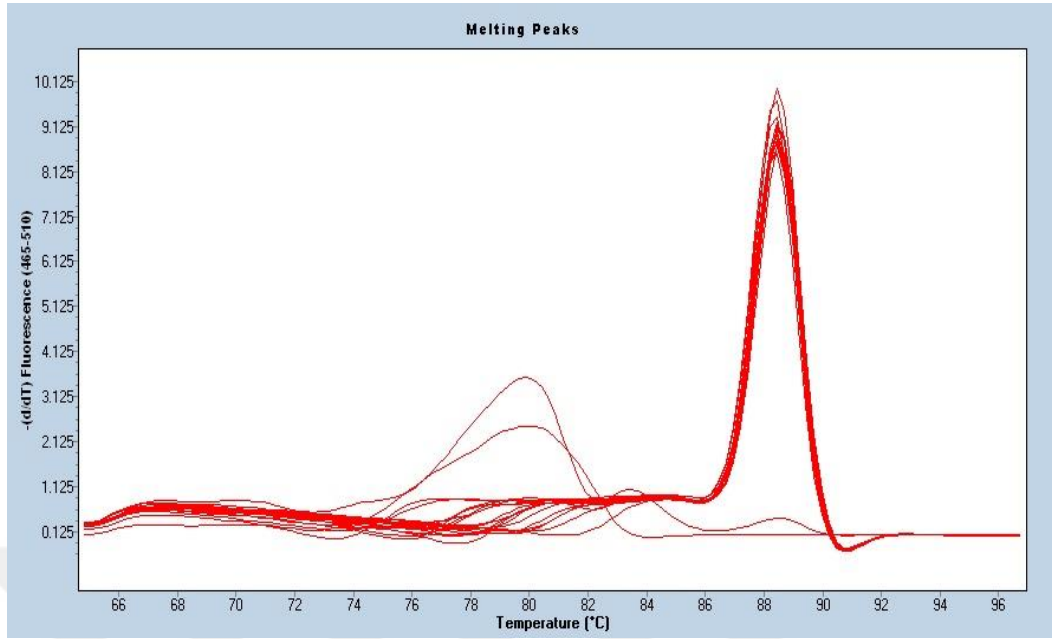
Şekil 4.7 SYBR Green erime eğrisi



Şekil 4.8 *GADD45B* geni Tm calling eğrisi



Şekil 4.9 *SERPINE1* geni Tm calling eğrisi



Şekil 4.10 *CHOP* geni Tm calling eğrisi

4.4. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları

4.4.1 *GADD45B*

GEM uygulanan grubun *GADD45B* geni ekspresyonu düzeyi ilaç verilmeyen kontrol (III grup) grubuna göre karşılaştırıldığı zaman fold change değerinin 1,34 olması saptanmış, bunun ise 1,34 kat artış anlamına geldiği bilinmektedir.

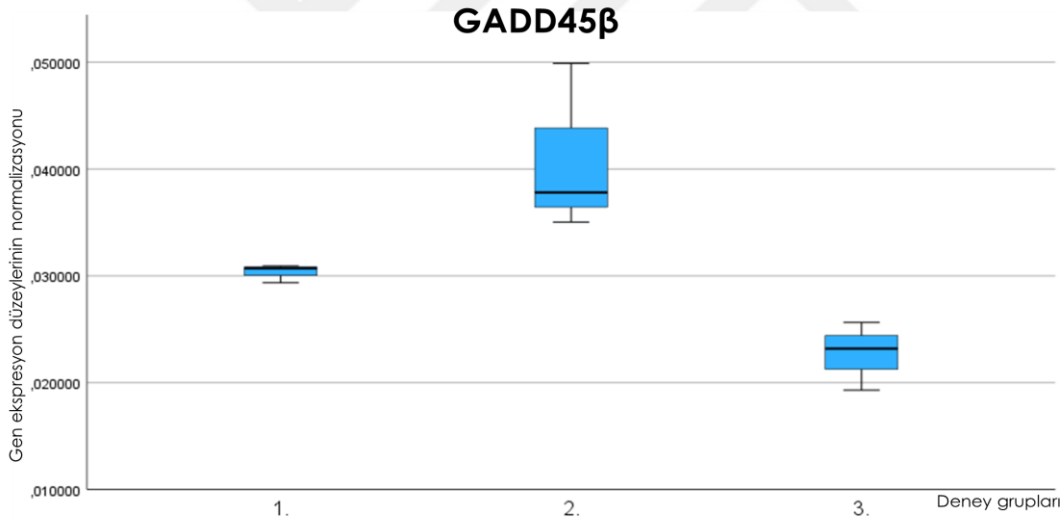
GEM uygulanan hücreler grubu arasından ayrıştırılarak seçilen CD24+/CD44+ hücre grubunda (II grup) *GADD45B* gen ekspresyon düzeyi GEM uygulanmayan (III grup) kontrol grubuna göre karşılaştırıldığı zaman fold change değerinin 1,8 olduğu saptanmış ve bunun 1,8 kat artış anlamı taşıdığı bilinmektedir.

CD24+/CD44+ olan hücre grubunun (II grup) *GADD45B* gen ekspresyon düzeyi, I gruba karşılaştırıldığı zaman fold change değerinin 1,34 olduğu görülmüştür, yani 1,34 kat artış sağlamış demektir.

		GADD45B														
	Sample	Ct1	Ct2	Avg.Ct	Avg. Ct	Linearizasyon PPIA	Sample	Ct1	Ct2	Avg.Ct	Avg. Ct	Linearizasyon GADD45B	Normalizasyon	Ortalama	Expression Fold Change Value (kontrolle göre)	
5 mM	ilaç	PPIA-1	16,00	16,03	16,02	15,90	0,000015101	GADD45B-1	21,02	21,06	21,04	20,94	0,000000464	0,030713144	0,030333333	1,34
		PPIA-3	15,77	15,87	15,82		0,000017286	GADD45B-3	20,88	20,94	20,91		0,000000508	0,029360086		
		PPIA-4	15,78	15,94	15,86		0,000016814	GADD45B-4	20,94	20,81	20,88		0,000000520	0,030926771		
	ilaç+flow	PPIA-2	16,02	16,17	16,10	16,22	0,000014286	GADD45B-2	20,74	21,12	20,93	20,85	0,000000501	0,035036440	0,040914135	1,80
		CD24+/CD44+ PPIA-5	16,09	16,32	16,21		0,000013238	GADD45B-5	20,77	21,09	20,93		0,000000501	0,037812315		
		PPIA-6	16,52	16,19	16,36		0,000011930	GADD45B-6	20,53	20,83	20,68		0,000000595	0,049893649		
	kontrol	PPIA-7	16,02	16,05	16,04	16,11	0,000014893	GADD45B-7	21,25	21,68	21,47	21,58	0,000000345	0,023195681	0,022715757	
		PPIA-8	16,15	16,55	16,35		0,000011972	GADD45B-8	21,55	21,72	21,64		0,000000307	0,025648175		
		PPIA-9	15,92	15,94	15,93		0,000016017	GADD45B-9	21,44	21,81	21,63		0,000000309	0,019903416		

Şekil 4.11 *GADD45B* gen ekspresyon düzeyinin Linearize Livac metodu ile hesaplanması

GADD45B geninin ekspresyon değişikliklerinin ortalamalarının standart sapması Std.Dev.=0,090, p (anlamlılık) değeri, p=0,027 (p<0,05) olduğundan, p değerinde istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi. Kruskal Wallis testi normal dağılım göstermeyen gruplarda üç veya daha fazla sayıda grubun ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılığının test edilmesinde kullanılan bir tekniktir.



Şekil 4.12 Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi ile *GADD45B* gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi. X ekseninde; GEM⁺ 1. grup, GEM⁺ ve CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılan 2. grup, GEM⁻ 3. grup, Y ekseninde ise, *GADD45B* gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu gösterilmiştir.

Şekil 4.12'de verilen bulgularımız sonucu, GEM⁺ ve CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılmış II grup, III kontrol (GEM⁻) grubuyla karşılaştırıldığında, değerlerde artış görülmüş, GEM⁺ I gruba, CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılan II grup ve III kontrol grubu (GEM⁻) arasındaki değerlerde fark belirlenmediği gözlemlenmiştir.

4.4.2 SERPINE1

SERPINE1 gen ekspresyon düzeyi GEM uygulanan (I grup) grubun GEM uygulanmayan (III grup) kontrol grubuna göre bakıldığında fold change değerinin 1,44 olduğu saptanmış ve 1,44 kat artış sağlamıştır. Gen anlatım düzey değerlerinin birin üzerinde olması artma istikametinde anlam ifade etmesi demektir.

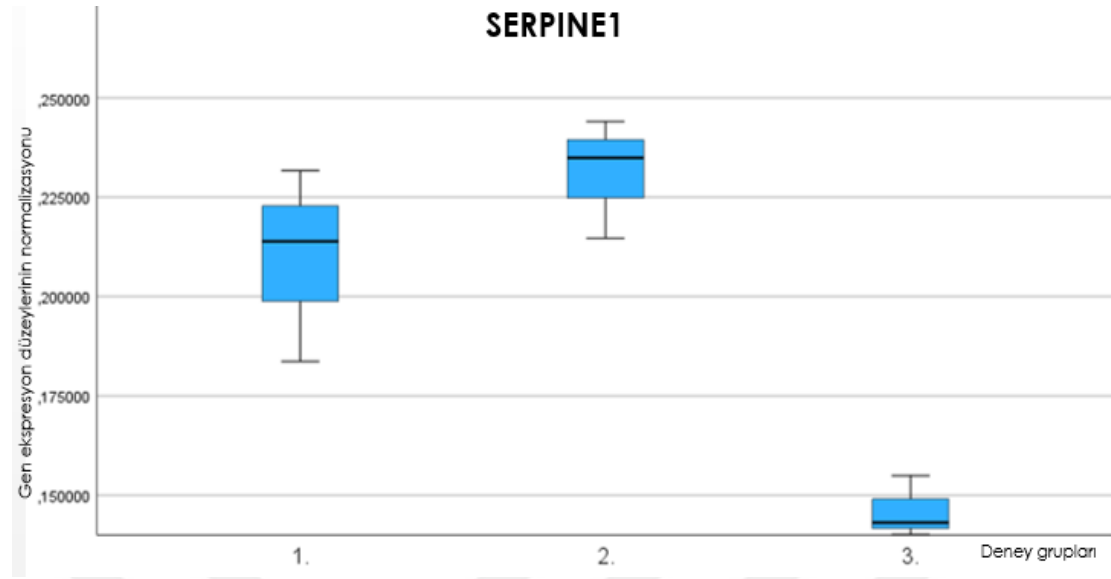
II grubun *SERPINE1* gen ekspresyon düzeyi III grup olan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fold change değerinin 1,58 olduğu saptanmış, bunun ise yaklaşık 1,58 kat artış ifade etmesi demektir.

II grubun *SERPINE1* genin ekspresyonu düzeyinde, yalnız ilaç verilen (I grup) kontrol grubuna kıyasla bakıldığında fold change değeri 1,10 olması dikkate alınmıştır. Bunun ise 1,10 kat artış ifade ettiği manasını taşır. GEM uygulama sonrası bu verilerin CD24⁺/CD44⁺ hücrelerde *SERPINE1* ekspresyonunun artma eğiliminde olmasını gösterdiği aşikardır.

		PPIA				SERPINE1										
		Sample	Ct1	Ct2	Avg.Ct	Avg. Ct	Linearizasyon PPIA	Sample	Ct1	Ct2	Avg.Ct	Avg. Ct	Linearizasyon SERPINE1	Normalizasyon	Ortalama	Expression Fold Change Value (kontrol göre)
5 mM	ilaç	PPIA-1	16,00	16,03	16,02	15,90	0,000015101	SERPINE1-1	18,45	18,47	18,46	18,16	0,000002773	0,183646079	0,209730617	1,44
		PPIA-3	15,77	15,87	15,82		0,000017286	SERPINE1-3	17,76	18,10	17,93		0,000004004	0,231647015		
		PPIA-4	15,78	15,94	15,86		0,000016814	SERPINE1-4	17,84	18,33	18,09		0,000003596	0,213898756		
		PPIA-2	16,02	16,17	16,10	16,22	0,000014286	SERPINE1-2	18,09	18,54	18,32	18,33	0,000003066	0,214641359		
	ilaç+flow CD24 ⁺ /CD44 ⁺	PPIA-5	16,09	16,32	16,21		0,000013238	SERPINE1-5	17,90	18,58	18,24		0,000003230	0,244007940	0,231176662	1,58
		PPIA-6	16,52	16,19	16,36		0,000011930	SERPINE1-6	18,26	18,63	18,45		0,000002802	0,234880687		
	kontrol	PPIA-7	16,02	16,05	16,04	16,11	0,000014893	SERPINE1-7	18,58	18,87	18,73	18,88	0,000002308	0,154963462	0,146066581	
		PPIA-8	16,15	16,55	16,35		0,000011972	SERPINE1-8	19,14	19,17	19,16		0,000001713	0,143090520		
		PPIA-9	15,92	15,94	15,93		0,000016017	SERPINE1-9	18,62	18,91	18,77		0,000002245	0,140145760		

Şekil 4.13 *SERPINE1* gen ekspresyon düzeyinin Linearize Livac metodu ile hesaplanması

SERPINE1 geninin ekspresyon değişikliklerinin ortalamalarına ait standart sapma Std.Dev.=0,041, p değeri, p=0,039 (p<0,05) olduğundan, p değerinde istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi.



Şekil 4.14 Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi ile *SERPINE1* gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi. X ekseninde; GEM⁺ 1. grup, GEM⁺ ve CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılan 2. grup, GEM⁻ 3. grup, Y ekseninde ise, *SERPINE1* gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu gösterilmiştir.

Şekil 4.14`de gösterilen verilen doğrultusunda, GEM⁺ ve CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılmış II grup, III kontrol (GEM⁻) grubuyla karşılaştırıldığında, *SERPINE1* gen ifade düzeylerindeki değerlerin yükseldiği görülmüş, GEM⁺ I gruba, CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılan II grup arasında fark gözükmemiştir.

4.4.3 CHOP

I grubun *CHOP* gen ekspresyon düzeyinin III kontrol grubuna göre kıyasla fold change değerinin 0,48 olduğu saptanmıştır. Bunun yaklaşık 2 kat, yani yarı yarıya azalması anlamı taşıdığı bilinir.

II grubun *CHOP* gen ekspresyon düzeyi III kontrol grubuyla karşılaştırıldığı anda fold change değeri 0,62 olmuştur.

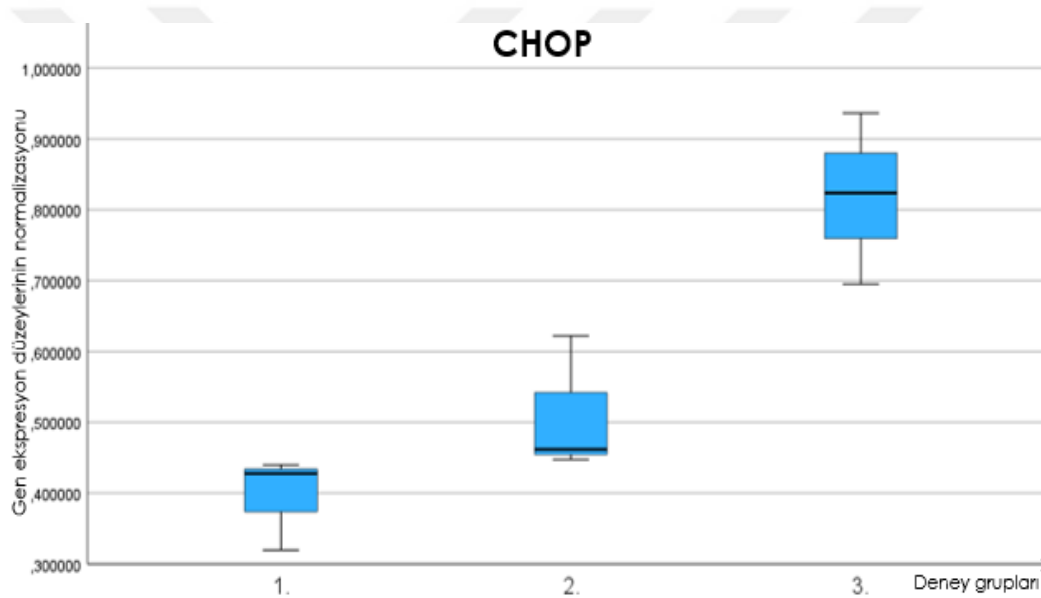
II grubun *CHOP* geninin ekspresyon düzeyi, yalnızca ilaç verilen I kontrol grubuna kıyasla fold change değeri 1,29 olduğu görülmüş ve bunun 1,29 kat artış anlamı ifade etmesi demektir.

Ayrıştırılarak seçilen CD24⁺/CD44⁺ hücrelerinde UPR`in daha yüksek olması, ER stresinin artması ve ER stresi ile ilişkili hücrelerin apoptoza doğru gidebildiği kanısına varılmıştır.

	Sample	Ct1	Ct2	Avg.Ct	Avg. Ct	Linearizasyon PPIA	CHOP				Linearizasyon CHOP	Normalizasyon	Ortalama	Expression Fold Change Value (kontrol göre)		
							Sample	Ct1	Ct2	Avg.Ct					Avg. Ct	
5 mm	ilaç	PPIA-1	16,00	16,03	16,02	15,90	0,000015101	CHOP-1	17,00	17,48	17,24	17,25	0,000006460	0,427797513	0,395789482	0,48
		PPIA-3	15,77	15,87	15,82		0,000017286	CHOP-3	16,84	17,17	17,01		0,000007603	0,439824538		
		PPIA-4	15,78	15,94	15,86		0,000016814	CHOP-4	17,48	17,53	17,51		0,000005376	0,319746395		
	ilaç+flow	PPIA-2	16,02	16,17	16,10	16,22	0,000014286	CHOP-2	16,97	17,45	17,21	17,21	0,000006596	0,461691155	0,510403172	0,62
		CD24+/CD44+ PPIA-5	16,09	16,32	16,21		0,000013238	CHOP-5	16,89	17,55	16,89		0,000008234	0,622005827		
		PPIA-6	16,52	16,19	16,36		0,000011930	CHOP-6	17,43	17,60	17,52		0,000005339	0,447512535		
	kontrol	PPIA-7	16,02	16,05	16,04	16,11	0,000014893	CHOP-7	15,98	16,28	16,13	16,41	0,000013944	0,936272247	0,818274125	
		PPIA-8	16,15	16,55	16,35		0,000011972	CHOP-8	16,49	16,77	16,63		0,000009860	0,823591017		
		PPIA-9	15,92	15,94	15,93		0,000016017	CHOP-9	16,30	16,61	16,46		0,000011131	0,694959110		

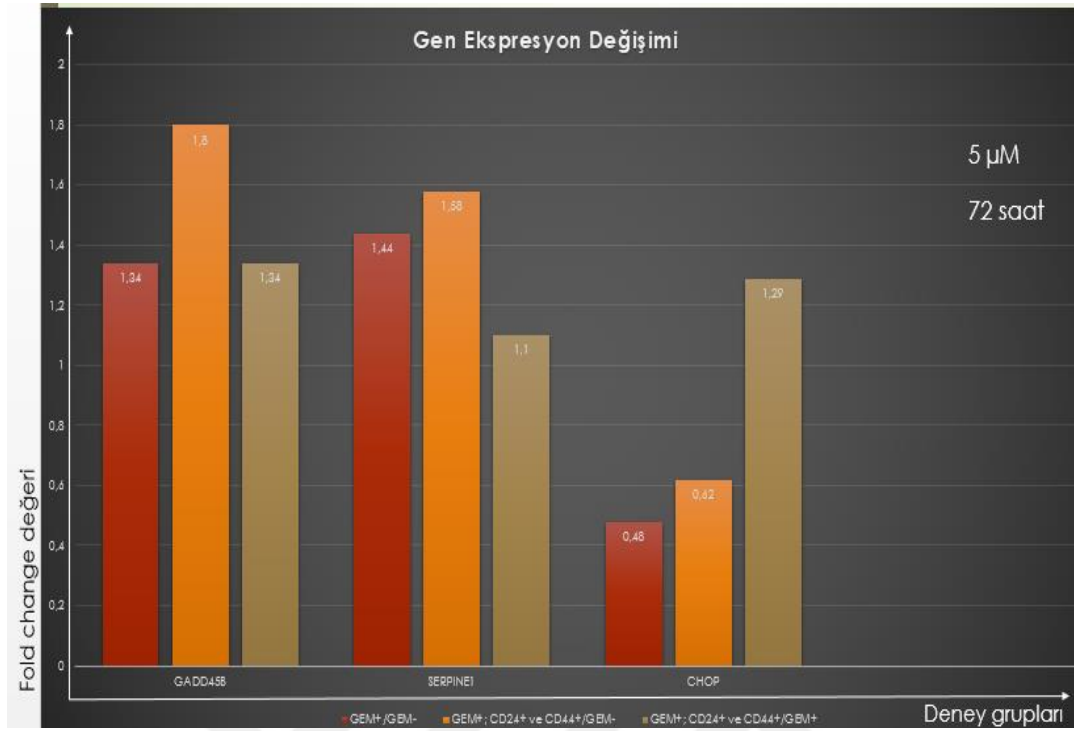
Şekil 4.15 CHOP gen ekspresyon düzeyinin Linearize Livac metodu ile hesaplanması

CHOP geninin ekspresyon değişikliklerinin ortalamalarına ait standart sapma Std.Dev.=0,207, p değeri, p=0,027 (yani p<0,05) olduğundan, istatistiksel olarak anlamlılık göstermiş demektir.



Şekil 4.16 Bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi ile CHOP gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi. X ekseninde; GEM⁺ 1. grup, GEM⁺ ve CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılan 2. grup, GEM⁻ 3. grup, Y ekseninde ise, SERPINE1 gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu gösterilmiştir.

Şekil 4.16`da verilen bulguların değerlendirilmesi zamanı GEM⁺ I grupla ve GEM⁺ ve CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılmış II grupla, III kontrol (GEM⁻) grubu karşılaştırıldığında, anlamlı derecede fark gözükmemekte, GEM⁺ I grupla, CD24⁺/CD44⁺ hücrelerine göre ayrıştırılan II grup arasında fark gözlenmediği belirlenmiştir.



Şekil 4.17 Relatif gen anlatım düzeyinin ifade değişiklikleri. Y ekseninde her bir hedef gen için 72 saat süresinde 5 μ M gemitabine maruz bırakılmış hücre gruplarının fold change değerleri, X ekseninde ise, deney grupları gösterilmiştir.

4 TARTIŞMA

Dünyada kanserden ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olan pankreas kanserinin sonuçları hafifletilemezse, karşıdaki 10 sene içerisinde kansere bağlı ölümlerin II başlıca nedeni olacağı düşünülmektedir. Tedavi seçenekleri kısıtlı olan pankreas kanserinde beş senelik hayatta kalım oranının 5%'in altında olduğu bilinmektedir. PDAC`ta hastalığın evresi ve performans açısından belirlenen ve sitotoksik ajanların ağırlıklı olarak uygulandığı tedavilerin takiplerinde kullanılabilir biyobelirteçler eksik kalmaktadır (Krantz, B.A. ve E.M. O'Reilly, 2018).

Kanserlerin tiplerine, karakterlerine ve evrelerine göre kullanılan standart tedaviler cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapidir. Sınırlı etkinliğe sahip kanser tedavilerinin temel amacı normal hücrelere etki etmeden kanser hücrelerini bulup intihara sürüklemek olmasına rağmen, hem kötü huylu, hem de normal hücrelere etki ettiğinden hastalarda anemi, iştahsızlık, deliryum ve periferik nöropati gibi yan etkilere de sebep olur. Klinik olarak minimum iyileşme sağlayan Gemcitabin, 5-FU ve FOLFIRINOX gibi kemoterapötik ajanlarla tedavilerden başka, cerrahi olarak rezeke edilemeyen vakalarda daha az yan etki gösteren etkili yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Hem adaptif, hem de apoptotik yola sahip olduğu kanıtlanan ER stres yanıtının modülasyonu kanser karşıtı önemli bir strateji olabilir (Gutiérrez-Rodríguez A.G,2018, Cragg G.M, ve ark., 2009). ER, protein sentezi, transportu ve katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması gibi farklı işlevleri vardır. ER'de yoğun protein katlanması talep eden, mutasyona uğrayan, doğru katlanamayan proteinlerin mevcudluğu gibi patolojik stresler, ER'in normal proteinin katlanması kapasitesinde bir dengesizlik oluşturur ve ER stresi gelişir. Hücreler UPR sinyal iletim yoluyla ER stresini algılayabilir ve yanıt oluşturabilir. Tümörler üzerinde ER stresinin iki etkisi bilinmektedir: birincisi, tümör büyümesini çoğaltan uyarlanabilir etkisi ve 2. apoptozu indüklediği bilinen sitotoksiki etkisi.

Tümör oluşumuna bakıldığında zaman, iki ucu keskin bir kılıç olan UPR, yalnızca tümör hücresinin çoğalmasını baskılamakla kalmaz, aynı zamanda hipemik hipoksi, reaktif oksijen türlerinin ve ATP'nin birikmesi ve besin eksikliği gibi olumsuz koşullar altında tümör hücresinin sağkalımını, kanser ilerlemesini ve metastazını da tetikleyebilir. Tümör hücreleri PERK ve aşağı akış sinyalleri, ATF4 ve NRF2 dahil olmakla CHOP'un mRNA kararlılıklarını

azaltarak hayatta kalmak için UPR yolunun avantajlarından yararlanır, ayrıca, ATF6 aracılığıyla mTOR sinyal yolunu up regüle ederler. Kanser hücreleri, UPR aktivasyonu ile mikro çevreye uyum sağlayarak makrofajlar, sitokinler, anjiyojenik faktörler ve büyüme faktörlerini salgırlar.

ER stres sensörlerinin sürekli aktivasyonu, kötü huylu hücrelere daha fazla tümör geliştirme, metastatik beceri ve kemoterapiye karşı ilaç direnci kapasitesi kazandırır. Çalışmalar tümör mikroçevresinde bulunan miyeloid hücrelerin işlevini ER stresinin manipüle ettiğini ve böylece kanser karşıtı koruyucu bağışıklığın gelişimini engellediğini ortaya çıkarmıştır.

UPR aktivasyonu yoluyla ER stres yanıtı ilaç direnci oluşturabilir (Corazzari M, ve ark, 2007). Örneğin, multipl miyelom hücrelerinde UPR'in indüksiyonu ETOPOSİDE direncini artırmıştır (Gray M.D. ve ark., 2005, Koong A.C., ve ark., 2006). ER stresi sürekli devam ederse, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesine neden olur (Malhotra J.D., Kaufman R.J, 2007). Bu bulguların, adaptif işlevi inhibe eden veya apoptotik işlevi uyaran ER stresini hedefleyerek, seçici kanser tedavisi ve ilaç direncinin üstesinden gelmek için etkili strateji olabileceğine dair ipuçları sağlamaya faydası vardır (Chiu H.W., Fang W.H, ve ark., 2012). Bunlar sadece kanser tedavisi için değil, aynı zamanda ER stresiyle ilişkili olduğu bilinen kardiyovasküler, inflamatuvar ve nörolojik hastalıklarda da yeni ilaçların gelecekteki kullanım alanları için önem arz etmektedir (Yoshida H, 2007, Salminen A, 2009).

Antikanser strateji olarak hedeflenen UPR iki yaklaşımı da açıklar (Urta H., Dufey E, 2013):

1. ER stresiyle ilişkili proteinleri inhibe etmek, stresli koşullar altında büyüyen kanserin artık stresle baş edememesine olanak sağlamak (Schröder M., Kaufman R.J, 2005);
2. Kanser hücrelerinde kronik stres oluşturarak dengeyi hücre apoptozuna doğru çevirmek.

Kümülatif kanıtlar, ER stresini kanser karşıtı strateji olarak hedeflemenin ümit verici olduğunu gösterse bile, ER stresinin kanser üzerindeki kesin rolleri ve hücre kaderi üzerinde nasıl etki ettiği konusunda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bu alandaki bilginin artırılması, UPR sinyallemesini düzenleyerek kanseri kontrol etmeye yönelik farmasötik tasarım için elzemdir (Backer J.M. ve ark., 2009). ER stresi üzerine araştırmaların yapılması, birden fazla kanser türünün tanı ve prognozu, aynı zamanda diğer tıbbi uygulamalar için kullanılabilir ve ayrıca kemo-dirençteki rolüne çözüm olabilir (Lee A.S, 2007, Firczuk M., Gabrysiak M, 2013).

Birçok kanser tedavisi için uygulanabilir yeni terapötik hedef, adaptif pro-sağkalım yolunu seçmektir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda UPR'nin seçici kollarını hedef alan küçük

molekül inhibitörlerinin geliştirilmesi, terapötik olarak bu yolu hedeflemenin ulaşılabilir olduğunu göstermektedir.

UPR'nin birincil hedefi tümör genişlemesinin ve tedaviye direncin önlenmesidir. UPR'in uzun süreli strese maruz kalma süresi hücre ölümüne neden olduğu bilindiğinden, bazı maligniteleri tedavi etmek ve tedaviye karşı direnci kırmak için kullanılabilir. Tümör hücreleri, artan glikolitik aktivite ve kan damarlarının yetersiz olması sebebiyle ER stresine ve UPR yanıtının uyarılmasına yol açan asidik, hipoksik ortam yaratır. Bu konuda, ER stresi ile ilişkili UPR sağkalım/ölüm düzenleyicisinin daha iyi anlaşılması önemlidir. Uzun süre devam eden şiddetli ve kalıcı nitelikteki ER stresi üzerine yapılan çalışmalarda, UPR yolunun aktivasyonunun apoptozu indüklediği, tümör ve kanser hücrelerini baskıladığı görünmektedir. Ek olarak, moleküler şaperonları ve strese duyarlı proteinleri hedeflemek ilaç direnciyle başa çıkmanın temel yollarındandır. Esas olarak bu proteinin işlevi diğer proteinlerin hatalı katlanması önüne geçmek ve salgılanan proteinleri düzenlemektir.

Pankreasın anatomik lokasyonundan ve yüksek mortaliteden dolayı, tanıda karşılaşılan zorluklara çözüm bulmak amacıyla biyobelirteç profillemeye üzerine çalışmalar devam ederken hedeflenen genlerin seçilmesi önem arz etmektedir. Çalışmalarımız anlam kazanırsa, pankreas kanseri tanısında kullanılan tümör belirteçlerine alternatif ve destek yeni biyobelirteç panelleri oluşturulabilmesi, ilaç-doza ve ilaç-takip çalışmalarında etkili taramaların yapılması için yeni çalışmaların önünün açılmasına olanak sağlayacaktır.

ER stres kaynaklı apoptozu aracılık eden ilk tanımlanmış protein olan CHOP'un apoptozdaki rolleri hakkında pek çok araştırma yapılmış olsa dahi, apoptozu tam olarak nasıl tetiklediği konusunda bilgimiz kısıtlıdır.

Bulgularımızda, *CHOP* gen ifade düzeyinde diğer genlerden farklı olarak, yalnızca ilaç uygulanmış grupta (GEM+), III kontrol grubuna nazaran (ilaç uygulanmamış GEM-) 0,48 (2,08 kat düşüş) olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerin yüzey belirteçlerine göre seçildiği II grupta (CD24+/CD44+) ise *CHOP* ekspresyonunda 0,62 (1,61 kat düşüş) olduğu saptanmıştır. *CHOP* hedefli tedavilerde CHOP indüksiyonunun çeşitli hastalıklar için yararlı olabileceği gösterilmiştir. Örnek olarak, CHOP'un RNA interferansı, tuzak oligodeoksinükleotidler veya ilaç inhibitörlerinin baskılayıcı etkisi, tip I diyabeti ve beyin iskemisini düzenlemek için mühim potansiyel hedefi olabilir. CHOP gen ifadesinin yüksek ekspresyon düzeyi gelecekte kanser karşıtı tedaviyi kullanabilir. Çeşitli tümör hücrelerinde BİP (ER bağlayıcı immünoglobulin proteini) indüksiyonu gözlemlendiğinden, BİP promotörü tarafından

yönlendirilen CHOP'un aşırı ekspresyonu kanser için özgü tedavide yararlanılabilir. CHOP'un aracılığıyla apoptoz üzerine yapılacak yeni ileriki çalışmalar, ER stresiyle bağlantılı hastalıklara yönelik tedavi seçenekleri için baz oluşturmaktadır (Oyadomari S, Mori M, 2004). Protein katlanması baskılandığı zaman, CHOP'un uyarılması; protein sentezindeki artışa ve nihayet oksidatif strese ve proapoptotik sinyallerin teşvikine neden olur. CHOP'un delesyonu ER stres kaynaklı apoptoza karşı koruyucudur ve bu sebepten kanserle ilgili hastalıkların tedavisinde umut verici hedef olarak düşünülmektedir.

Çalışmalarda, kolorektal kanser (CRC) hücre hatlarında CHOP ekspresyonunun up regüle edilerek hücre apoptozunu indüklediği ve hücre büyümesini baskıladığı gözlemlenmiştir (Kwangho Kim, Hyun-Soo Cho ve diğ., 2022). CHOP, mide kanserinde (GC) kötü prognozla ilişkilidir, CEBPβ'yi doğrudan yukarı düzenleyerek kanser kök hücre özelliğini destekler (Hai Lin, Shufang Liu ve ark., 2020). Bir diğer mide kanseriyle ilgili çalışmada ise, ileri evre GC'de kanserli olmayan dokulara kıyasla CHOP'un ekspresyon düzeyleri down regüle olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmanın Kaplan-Meier sağkalım analizlerinde, pozitif CHOP ekspresyonu olan hastalarındaki genel sağkalım oranının, negatif CHOP ekspresyonu olan hastalara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur (Xiangwen Zhang, Tingting Zhou ve diğ., 2018). McCabe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CHOP ekspresyonunun inflamasyonu, fibrozu ve telafi edici proliferasyonu daha da uyararak karaciğer tümör nodüllerinin gelişimini teşvik edebileceği gösterilmiştir (DeZwaan-McCabeD,2013). Gastrik kardial adenokarsinomunda (GCA) komşu kanserli olmayan dokulara ve normal dokulara kıyasla CHOP ekspresyonu daha düşük düzeyde bulunmuştur (She-Gan Gao ve ark., 2015). Akciğer kanserinde CHOP'un ekspresyonunun azalması kemoterapiye karşı direnç oluşturduğu bildirilmiştir (Wenfeng Tan ve diğ., 2018). Bizim araştırmalarımız sonucuna göre, *CHOP* ekspresyonunun down regüle olduğu görülmüş ve *CHOP* geninin baskılanmasının kemoterapiye karşı direnç gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda bir diğer hedef geni olarak seçtiğimiz *GADD45B* gen ifade düzeyinde ilaç (Gemsitabin) uygulanmış I grupta (GEM+), III kontrol grubuna nazaran (ilaç uygulanmamış) 1,34 kat ekspresyon artışı görmekteyiz. II grupta ise, yüzey belirteçlerine göre hücreler seçildiğinde (CD24+/CD44+) burdaki değişimin daha da egzajere olduğu (*GADD45B* ekspresyonunda 1,8 kat artış) görülüyor.

GADD45B, protein bağlanması ve MTK1/MEKK4 kinazının aktivasyonu aracılığıyla p38/JNK sinyal yolunu aktifleştirerek çevresel streslere tepki verir (Takekawa M, Saito H. 1998). *GADD45B*'nin MAPK yoluyla hücre apoptozunu teşvik ederek kemosenitiviteyi artırabileceğini gösteren fonksiyonel çalışmalar mevcuttur (Xue M., Sun H., ve ark., 2020)

Metastatik tümör lokalize tümöre kıyasla iki belirgin özellik taşır: **1.** Lenf veya kan yoluyla uzak organ metastazına yol açan adhezyon ve hareketle ilgili yolakların aktivasyonu (Örnek olarak WNT, TGF- β yolları (Robert, 2013)). **2.** Stresli mikroçevre veya klinik tedavi ile karşı karşıya kaldığı zaman tümör çoğalmasını teşvik ederek artan çevresel toleransı (Norouzi vd., 2018; Hou vd., 2020). Çevresel stresle ilişkili gen *GADD45B*, pankreas kanserinin tedaviye direnç takibinde rol alabilir. *GADD45B* geninin normal dokularda düşük eksprese oluşunun karsinogenezi teşvik ettiği, malign dokularda ise yüksek ekspresyonunun tümör gelişimine katkı sağlayacağı çalışmalarda gözlemlenmiştir: Örneğin, *GADD45B* geninin yüksek ifade düzeyleri, evre II CRC hastalarında azalmış OS (genel sağkalım) ve PFS'nin (progresyonsuz sağkalım) bağımsız prognostik faktörüdür (Zhao Z, Gao Y., 2018), buna karşın *GADD45B* geninin yüksek ifade düzeyleri, total tiroidektomi ve radyoiyot tedavisi gören papiller tiroid karsinomu hastalarında bağımsız prognostik belirteçtir (Barros-Filho MC, ve ark., 2020). *GADD45B*, insan embriyonik karsinomunun yan popülasyon hücrelerinin (kök hücrelerinin zenginleştirilmiş popülasyonu) kemoterapi direncini ve invaziv büyümesini ortaya çıkarır (Inowa T, Hishikawa K ve diğ., 2010) ve *GADD45B* geninin susturulması kolanjiyokarsinom hücrelerinin invazyonunu ve göçünü azaltır (Myint KZ, Kongpracha P. ve diğ., 2018). Bu sonuçlar, *GADD45B* geninin kötü huylu tümör fenotiplerine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Diğer çalışmalarda yapılan araştırmalar sonucu, *GADD45B* geninin EMT yoluyla kötü huylu kanser fenotiplerine katkıda bulunacağı, pankreas kanseri hücrelerinin istila ve göçünü teşvik edebileceği, uzak doku ve organlara yayılım göstermesiyle ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir (Lanqing Gong ve ark., 2021). Biz de çalışmamızda kemoterapiye dirençli pankreas kanser hastalarından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda *GADD45B* geninin tanı veya tedavi hedefi olabileceğini düşünmekteyiz. Bu genin işlevsel değişiminin altında yatan mekanizmasının karakterize olmaması sebebiyle henüz açıklığa kavuşturulamamış ve bu alanda daha fazla araştırma yapılması için ucu açık hipotezler öne sürülmesi gerekmektedir.

Anti-fibrinoliz zamanı *SERPINE1* geninin trombin aktivitesini sürdürmesi, trombin ve tümör hücrelerinin proteazı yoluyla reseptörü aktive etmesi sağlanır. Bu çalışmada *SERPINE1* gen

ifade düzeyi incelendiğinde I grupta (GEM+), III kontrol grubuna (ilaç uygulanmamış GEM-) nazaran 1,44 kat artış, hücrelerin yüzey belirteçlerine göre seçildiği II grupta (CD24+/CD44+) *SERPINE1* ekspresyonunda 1,58 kat artış saptanmıştır.

SERPINE1, vitronektinle tümör hücreleri arasındaki yapışmayı inhibe edebilir ve daha sonra tümör hücrelerinin diğer ekstraselüler matris substratlarına (örneğin, fibronektin) göçünü uyarabilir (Brooks T. D.ve başkaları, 2000). Ürokinaz enziminin uPA reseptörüne bağlanmasını, hücre adhezyonu ve göçü için gerekli ekstraselüler matris proteinlerinin aşırı bozunmasını, tümör hücrelerinin vitronektine yapışmasını inhibe etmesi *SERPINE1*'in pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkilere sahip olmasını da açıklar. *SERPINE1*, hücrelerin diğer ekstraselüler matris proteinlerine göçünü teşvik ederek apoptozu uyarabilir ve dirençte rol oynayabilir. Ayrıca, hücrelerde kaspaz 3'ü inhibe ederek kemoterapi tarafından indüklenen tümör hücresi apoptozuna direnebilir (Lademann U. A., Rømer M. U, 2008). FasL'nin hücre yüzeyindeki plazmin tarafından parçalanmasını ve ayrılmasını engelleyen *SERPINE1* geninin, FasL aracılı ve kemoterapi kaynaklı apoptozun da karşısını aldığı gözlemlenmiştir. Diğer taraftan LRP-1 ile etkileşim yoluyla anti-apoptotik proteini yukarı düzenlemek için c-Jun/ERK sinyalini indükleyebilmektedir.

SERPINE1'in, birçok kanserin morbiditesiyle yakından ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. *SERPINE1* geninin sitoskeletal yeniden organizasyonu ve glikometabolizmayı teşvik ederek üçlü negatif meme kanserinin ilerlemesini uyarabileceği, IL-8 salgılanmasını ve ifadesini yukarı düzenleyerek pankreas kanserinin ilerlemesini hızlandırabileceği belirlenmiştir (Humphries BA. ve diğ., 2019). *SERPINE1*'in kolon kanserinin patogeneziindeki rolü önceden incelenmiştir ve güncel bir çalışmada, *SERPINE1*'in P38-MAPK yoluyla kolon kanserinin ilerlemesini teşvik edebileceği bulunmuştur (Pranteda A, Piastra V,2020). *SERPINE1* ifadesinin *in vivo* düzenleyici mekanizmasını anlamak hayati önem taşımaktadır. *SERPINE1* geninin meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde (mesane, kolon, küçük hücreli olmayan akciğer, pankreas) kanser ilerlemesini, metabolik değişikliği, metastazı ve hatta terapötik direnci desteklediği gösterilmiştir (Carter JC, Church FC, 2009).

GADD45B ve *SERPINE1* gen anlatım ifade düzeylerinde artış gözlenmesi, PANC-1 hücre hattının süre-doza ilişkisiyle Gemcitabine karşı direnç kazandığını düşündürülebilir. PANC-1 hücre hattının kemoterapötik ajana (GEM) maruziyeti sonrası *GADD45B* ve *SERPINE1* genlerinin ekspresyonunun kontrol grubunun ekspresyonu ile karşılaştırıldığında, bu genlerin

ekspresyonunun apoptozu teşvik ederek kemoterapi duyarlılığını desteklediği düşünülmektedir.

Aktüel olarak, kemoterapik tedavinin yan etkilerinin yüksek olması sebebiyle kullanılmasına devam edilmesine rağmen, bu alanda ilaca karşı direnç çalışmaları anlam ve önem kazanarak tedavi zamanı takibinde halen sıklıkla karşımıza gelmektedir. Gelecekte ilaç-direnç-zaman-takip çalışmalarında da kullanılabilir olmasını düşündüren, bu kapsamda geniş araştırılan *GADD45B*, *SERPINE1* ve *CHOP* genlerinden elde edilen sonuçlardır.

Gen ifade düzeyleri ile ilgili bilgi veren, mRNA-transkriptlerini ölçmek için kullanılan güvenilir yöntemlerden biri olan RT-QPCR daha hassastır ve daha geniş dinamik aralıklı kantifikasyona sahiptir. Kullanılan kit pandemi döneminde dizayn edilip üretilmiş, bu sebepten çok hassas olup, cDNA aşamasına gerek duyulmadan RNA-dan QPCR aşamasının direkt olarak yapılmasına izin vermektedir. SYBR Green I yönteminde seçilen hedef bölgenin amplifikasyonunun olduğu veya primer dimer oluşumuyla meydana gelen özgün olmayan ürün kullanıldığının varsayımını anlamak adına floresan ışımının erime eğrisi analizleri gerçekleşir (Barbara D'haene, 2010). SYBR Green yöntemi kullanılması sonucu genlerin erime eğrileri analizi incelendiğinde sadece birkaç tane pik-tepecik (*peak*) görülmektedir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler ışığında, *GADD45B*, *SERPINE1* ve *CHOP* gen ekspresyonlarının kanser hücrelerinin ilaca verdiği yanıtın takibinde fayda sağlayacağını, ilaç-direnç ve ilaç-takip pankreas kanseri araştırmalarında yeni umutverici biyobelirteçler olarak katkıda bulunabilecekleri ve gelecekteki hedefli tedavilerde erken teşhisde kullanılabilirliğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abramson, M.A., Jazag, A., van der Zee, J.A., Whang, E.E. 2007. The Molecular Biology of Pancreatic Cancer. *Gastrointest. Cancer Res.*, 1: 7–12.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J ea. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- Alotaibi FT, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in endometriosis. *PLoS ONE*. 2019 doi: 10.1371/journal.pone.0219064
- Alvarellos, M. L., Lamba, J., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., Wang, L., Klein, D.J., Klein, T.E. (2014). Pharm GKB summary: gemcitabine pathway. *Pharmacogenomics*, 24(11), 564-574. doi:10.1097/FPC.0000000000000086
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*. 1997;72:1–22.
- Anna C. Lilly, Igor Astsaturov, Erica A. Golemis. Intrapancreatic fat, pancreatitis, and pancreatic cancer. Received: 15 March 2023 / Revised: 29 June 2023 / Accepted: 3 July 2023 / Published online: 15 July 2023 © The Author(s) 2023. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2023) 80:206 <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04855-z>
- Asmaa Anwar Ismail, Baraah Tariq Shaker and Khalid Bajou. The Plasminogen–Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan; 23(1): 337. Published online 2021 Dec 29 doi: 10.3390/ijms23010337
- Atkins, C., Liu, Q., Minthorn, E., Zhang, S. Y., Figueroa, D. J., Moss, K., Stanley, T. B., Sanders, B., Goetz, A., Gaul, N., Choudhry, A. E., Alsaïd, H., Jucker, B. M., Axten, J. M., & Kumar, R. (2013). Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res*, 73(6), 1993-2002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-3109>
- Avril, T., Vauléon, E., & Chevet, E. (2017). Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis*, 6(8), e373. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.72>
- Babour, A., Bicknell, A. A., Tourtellotte, J., & Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell*, 142(2), 256-269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.006>

- Backer J.M., Krivoshein A.V., Hamby C.V., Pizzonia J., Gilbert K.S., Ray Y.S., Brand H., Paton A.W., Paton J.C., Backer M.V. Chaperone-targeting cytotoxin and endoplasmic reticulum stress-inducing drug synergize to kill cancer cells. *Neoplasia*. 2009;11:1165–1173. doi: 10.1593/neo.09878.
- Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.M., Gingras, M.C., Miller, D.K., Christ, A.N., Bruxner, T.J. 2016. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592): 47–52
- Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM, Martial JA, DeClerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell*. 2008;14:324–334.
- Barros-Filho MC, de Mello JBH, Marchi FA, et al. GADD45B transcript is a prognostic marker in papillary thyroid carcinoma patients treated with total thyroidectomy and radioiodine therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:269.
- Barone MV, Crozat A, Tabae A, Philipson L and Ron D (1994) CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev*. 8: 453–464
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000;2:326–32.
- Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:932–943
- Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F., & McMahon, M. J. (2011). Chronic pancreatitis. *Lancet*, 377(9772), 1184-1197. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61852-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61852-1)
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., ve Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.2149>
- Brooks T. D., Slomp J., Quax P. H. A., et al. Antibodies to PAI-1 alter the invasive and migratory properties of human tumour cells in vitro. *Clinical and Experimental Metastasis* . 2000;18(6):445–453. doi: 10.1023/a:1011882421528
- Brush M.H., Weiser D.C., Shenolikar S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and

- promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:1292–1303. doi: 10.1128/MCB.23.4.1292-1303.2003.
- Buck, T.M., Wright C.M., Brodsky, J.L., 2007. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 751-761.
- Burris HA, 3rd, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 1997;15:2403–2413. doi: 10.1200/JCO.1997.15.6.2403.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.*, 348(17):1625-1638.
- Camilla Salvagno, Jessica K. Mandula, Paulo C. Rodriguez, and Juan R. Cubillos-Ruiz. *Trends Cancer*. Author manuscript; available in PMC 2023 Nov 1. Published in final edited form as: *Trends Cancer*. 2022 Nov; 8(11): 930–943. Published online 2022 Jul 8. doi: 10.1016/j.trecan.2022.06.006
- Carter JC, Church FC. Obesity and breast cancer: the roles of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and plasminogen activator inhibitor-1. *PPAR Res.* 2009;2009:345320. doi: 10.1155/2009/345320.
- Caspersen C, Pedersen PS and Treiman M (2000) The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein. *J. Biol. Chem.* 275: 22363–22372
- Chang, D.K., Merrett, N.D., Biankin, A.V. 2008. NSW Pancreatic Cancer Network. Improving outcomes for operable pancreatic cancer: is access to safer surgery the problem? *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 7(1): 1036-1345.
- ChemIDplus and the Drug Information Portal Content Available From PubChem Only Starting December 2022. *NLM Technical Bulletin*. 2022 Jul–Aug. (n.d.). 34 National Library of Medicine - National Institutes of Health. https://www.nlm.nih.gov/pubs/techbull/ja22/ja22_pubchem.
- Chen T. Y., Zhou M., Lin M. Q., Liang S. T., Yan Y., Wang S. M., et al. (2021a, Morrow GB, Mutch NJ. Past, present, and future perspectives of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Semin Thromb Hemost.* 2022. 10.1055/s-0042-1758791

- Chen, X., & Cubillos-Ruiz, J. R. (2021). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 21(2), 71-88. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>
- Chiu H.W., Fang W.H., Chen Y.L., Wu M.D., Yuan G.F., Ho S.Y., Wang Y.J. Monascuspiloin enhances the radiation sensitivity of human prostate cancer cells by stimulating endoplasmic reticulum stress and inducing autophagy. *PLoS ONE*. 2012;7:e40462. doi: 10.1371/journal.pone.0040462.
- Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells-liu-1995-international Journal of Cancer-wiley Online Library. 2021.
- Conroy T, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:1817–1825. doi: 10.1056/NEJMoa1011923.
- Cooper GM. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. ASM Press Sinauer Associates; Washington, D.C. Sunderland, Massachusetts: 2000.,
- Corazzari M., Lovat P.E., Armstrong J.L., Fimia G.M., Hill D.S., Birch-Machin M., Redfern C.P.F., Piacentini M. Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: The role of stress proteins ERDJ5 and ERP57. *Br. J. Cancer*. 2007;96:1062–1071. doi: 10.1038/sj.bjc.6603672.
- Cox, A.D., Fesik, S.W., Kimmelman, A.C., Luo, J., Der, C.J. 2014. Drugging the undruggable RAS: mission possible? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 13(11): 828–851.
- Cox, T. R., Rumney, R. M. H., Schoof, E. M., Perryman, L., Høye, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N. A., Forrest, H., Evans, H. R., Huggins, I. D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., & Erler, J. T. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, 522(7554), 106-110. <https://doi.org/10.1038/nature14492>
- Cragg G.M., Grothaus P.G., Newman D.J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* 2009;109:3012–3043. doi: 10.1021/cr900019j.
- Cretu A, Sha X, Tront J, Hoffman B, Liebermann DA. Stress sensor Gadd45b genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer Ther.* 2009;7(A): 268-276

- Cubillos-Ruiz, J. R., Bettigole, S.E. and Glimcher, L. H.(2017) Tumorigenic and immunosuppressive effects of endoplasmic reticulum stress in cancer. *Cell* 168, 692-706
- Cui W, Li J, Ron D, Sha B. The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;67:423–8
- Cullinan S.B., Diehl J.A. Coordination of er and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2006;38:317–332. doi: 10.1016/j.biocel.2005.09.018.61.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*, 23(20), 7198-7209. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003>
- Czekay RP, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, Klein RM, Higgins CE, Samarakoon R, Higgins PJ. PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int J Cell Biol*. 2011;2011:562481.
- De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of gadd45 β by NF- κ B downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature*. 2001;414(6861):308–313.
- Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*. 2010 May;39(4):425-35. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963. Erratum in: *Pancreas*. 2018 Jul;47(6):e37. PMID: 20418756; PMCID: PMC2860631.
- DeZwaan-McCabe D, Riordan JD, Arensdorf AM, Icardi MS, Dupuy AJ, et al.(2013) The stress-regulated transcription factor CHOP promotes hepatic inflammatory gene expression, fibrosis, and oncogenesis. *PLoS Genet* 9: e1003937 doi:10.1371/journal.pgen.1003937
- Do H., Kim D., Kang J., Son B., Seo D., Youn H., et al. (2019). TFAP2C increases cell proliferation by downregulating GADD45B and PMAIP1 in non-small cell lung cancer cells. *Biol. Res*. 52:35.
- Dobson, C.M., Sali A., Karplus, M., 1998. Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Edit.* 37, 868-893)
- Downward, J. 2003. Targeting, RAS Signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 3(1): 11–22.

- Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol.* 2008;214:283–293
- Dusek, L., Muzík, J., Gelnarová, E., Fínek, J., Vyzula, R., Abrahámová J. 2010. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin. Onkol.*, 23(5): 311-324.
- E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini & T. Mazzei. Cellular pharmacology of gemcitabine Department of Pharmacology, University of Florence, Florence, Italy. *Annals of Oncology* 17 (Supplement 5): v7–v12, 2006 symposium article doi:10.1093/annonc/mdj941
- E. Sammels, J.B. Parys, L. Missiaen, H.D. Smedt, G. Bultynck Intracellular Ca storage in health and disease: a dynamic equilibrium *Cell Calcium*, 47 (4) (2010), pp. 297-314
- Emma Madden, Susan E. Logue, Sandra J. Healy, Serge Manie, Afshin Samali. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. First published: 10 October 2018 <https://doi.org/10.1111/boc.201800050> Citations: 211
- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Kong, B., Esposito, I., Friess, H., & Kleeff, J. (2012). The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med*, 12(3), 288-303. <https://doi.org/10.2174/156652412799218921>
- Farrow, D.C., Davis, S. 1990. Risk of pancreatic cancer in relation to medical history and the use of tobacco, alcohol and coffee. *Int. J. Cancer*, 45(5): 816-820.
- Fedotov S, Iomin A. Migration and proliferation dichotomy in tumor-cell invasion. *Phys Rev Lett.* 2007;98:118101
- Feng Y, Zeng JW, Ma Q, Zhang S, Tang J, Feng JF (2020) Serum copper and zinc levels in breast cancer: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol* 62:126629. [10.1016/j.jtemb.2020.126629](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126629)
- Feng, Y. X., Sokol, E. S., Del Vecchio, C. A., Sanduja, S., Claessen, J. H., Proia, T. A., Jin, D. X., Reinhardt, F., Ploegh, H. L., Wang, Q., & Gupta, P. B. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Discov*, 4(6), 702-715. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd13-0945>
- Ferri KF and Kroemer G (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3: E255–E263

- Fesinmeyer, M. D., Austin, M. A., Li, C. I., De Roos, A. J., & Bowen, D. J. (2005). Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(7), 1766-1773. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-05-0120>
- Filippo de Braud, Stefano Cascinu, Gemma Gatta. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* Volume 50, Issue 2, May 2004, Pages 147-155
- Firczuk M., Gabrysiak M., Barankiewicz J., Domagala A., Nowis D., Kujawa M., Jankowska-Steifer E., Wachowska M., Glodkowska-Mrowka E., Korsak B. GRP78-targeting subtilase cytotoxin sensitizes cancer cells to photodynamic therapy. *Cell Death Dis.* 2013;4:e741. doi: 10.1038/cddis.2013.265.
- Fong ZV and Winter JM: Biomarkers in pancreatic cancer: Diagnostic, prognostic, and predictive. *Cancer J.* 18:530–538. 2012.
- Fornace Jr AJ, Alamo Jr I and Hollander MC (1988) DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8800–8804
- Frapas E., David A., Regenet N., Touchefeu Y., Meyer J., Morlaa O. (2016). Pancreatic carcinoma: Key-points from diagnosis to treatment. Elsevier, 97(12), (s. 1207-1223)
- Friend, S.H., Dryja, T.P., Weinberg, R.A. 1988. Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N. Engl. J. Med.*, 318(10): 618-622
- G. Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatology.* 2004;4(5):454-60. doi: 10.1159/000079824. Epub 2004 Jul 14. PMID: 15256807.
- G.K. Voeltz T.A. Rolls MMRapoport, Structural organization of the endoplasmic reticulum [Review]*EMBO Rep.*, 3 (10) (2002), pp. 944-950
- Gao S, Nielsen BS, Krogdahl A, Sorensen JA, Tagesen J, Dabelsteen S, Dabelsteen E, Andreasen PA. Epigenetic alterations of the SERPINE1 gene in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49:526–538.
- Genecards The Human Gene Database, CD24 Gene- CD24 Molecule. (Updated May 22, 2023) <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD24> & key words= CD24
- Gesto, D. S., Cerqueira, N. M., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2012). Gemcitabine: a critical nucleoside for cancer therapy. *Curr Med Chem*, 19(7), 1076-1087. doi:10.2174/092986712799320682

- Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., & Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*, 5(3), e9575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009575>
- Gils A., Declerck P.J. Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Curr. Med. Chem.* 2004;11:2323–2334. doi: 10.2174/0929867043364595
- Gittes, G. K. (2009). Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol*, 326(1), 4-35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- GM C. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000,
- Goggins, M. 2005. Molecular markers of early pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23(20): 4524-4531
- Gong L., Cai L., Li G., Cai J., Yi X. (2021). GADD45B facilitates metastasis of ovarian cancer through epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther.* 14 255–269. 10.2147/ott.s281450
- Gooiker, G.A., Lemmens, V.E., Besselink, M.G., Bush, O.R., Bonsing, B.A., Molenaar, I.Q., 2014. Impact of centralization of pancreatic cancer surgery on resection rates and mortality. *Br. J. Surg.*, 101: 1000e5
- Gorman, A. M., Healy, S. J., Jäger, R., & Samali, A. (2012). Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther*, 134(3), 306-316. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.02.003>
- Gourgou-Bourgade S, et al. Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: Results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 2013;31:23–29. doi: 10.1200/JCO.2012.44.4869.
- Grant, T.J., Hua, K., Singh, A. 2016. *Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer: Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Editor: Pruitt, K., ABD, volume 144: p. 242-268
- Gray M.D., Mann M., Nitiss J.L., Hendershot L.M. Activation of the unfolded protein response is necessary and sufficient for reducing topoisomerase IIA protein levels and decreasing sensitivity to topoisomerase-targeted drugs. *Mol. Pharmacol.* 2005;68:1699–1707.

- Gutiérrez-Rodríguez A.G., Juárez-Portilla C., Olivares-Bañuelos T., Zepeda R.C. Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discov. Today*. 2018;23:434–437. doi: 10.1016/j.drudis.2017.10.019.
- H. Claudio The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13 (2) (2012), pp. 89-102
- H.P. Harding, I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells *Mol. Cell*, 6 (5) (2000), pp. 1099-1108
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, LT., Rozenblum, E., Weinstein, CL., Fischer, A., Yeo, CJ., Hruban, RH., Kern, SE. 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, 271(5247): 350-353
- Hai Lin, Shufang Liu, Weidong Gao, Hongyu Liu. DDIT3 modulates cancer stemness in gastric cancer by directly regulating CEBP β . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 72, Issue 6, June 2020, Pages 807–815, Published:19 March 2020. <https://doi.org/10.1111/jphp.13243>
- Hanada K, Okazaki A, Hirano N, Izumi Y, Teraoka Y, Ikemoto J, et al. Diagnostic strategies for early pancreatic cancer. *Journal of Gastroenterology*. 2015; 50(2): 147-154.
- Hansel D.E, Kern S.E, Hruban R.H. 2003. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 4: 237-256
- Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I and Ron D (2002) Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**: 575–599
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999;397:271–4.
- Harnack, L.J., Anderson, K.E., Zheng, W., Folsom, A.R., Sellers, T.A., Kushi, L.H. 1997. Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6: 1081– 1086.
- Heinemann, V., Gemcitabine in metastatic breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2005. 5(3): p. 429-43.

- Hertel, L.W., et al., Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro2'-deoxycytidine). *Cancer Res*, 1990. 50(14): p. 4417-22.
- Hess, D. A., Humphrey, S. E., Ishibashi, J., Damsz, B., Lee, A. H., Glimcher, L. H., & Konieczny, S. F. (2011). Extensive pancreas regeneration following acinar-specific disruption of Xbp1 in mice. *Gastroenterology*, 141(4), 1463-1472. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.045>
- Hessmann, E., et al., Microenvironmental Determinants of Pancreatic Cancer. *Physiol Rev*, 2020. 100(4): p. 1707-1751
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20(10), 1218-1249. <https://doi.org/10.1101/gad.1415606>
- Hori T., Saito K., Moore R., Flake G. P., Negishi M. (2018). Nuclear receptor CAR suppresses GADD45B-p38 MAPK signaling to promote phenobarbital-induced proliferation in mouse liver. *Mol. Cancer Res*. 16 1309–1318. 10.1158/1541-7786.mcr-18-0118
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y, Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329-335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- Hruban RH et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am. J. Surg. Pathol* 25, 579–586 (2001)
- Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS. Atlas of tumor pathology. Washington, DC: American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology; 2007. Tumors of the pancreas
- Hsu, S. K., Chiu, C. C., Dahms, H. U., Chou, C. K., Cheng, C. M., Chang, W. T., Cheng, K. C., Wang, H. D., & Lin, I. L. (2019). Unfolded Protein Response (UPR) in Survival, Dormancy, Immunosuppression, Metastasis, and Treatments of Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102518>
- Huang H., Wang Q., Du T., Lin C., Lai Y., Zhu D., et al. (2018). Matrine inhibits the progression of prostate cancer by promoting expression of GADD45B. *Prostate* 78 327–335. 10.1002/pros.23469

- Huang X, Zhang F, He D, Ji X, Gao J, Liu W, Wang Y, Liu Q, Xin T (2021) Immune-Related Gene SERPINE1 Is a Novel Biomarker for Diffuse Lower-Grade Gliomas via Large-Scale Analysis. *Front Oncol* 11:646060. [10.3389/fonc.2021.646060](https://doi.org/10.3389/fonc.2021.646060)
- Humphries BA, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) promotes actin cytoskeleton reorganization and glycolytic metabolism in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2019;17:1142–1154. doi: [10.1158/1541-7786.MCR-18-0836](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0836).
- Hyuna Sung PhD, Jacques Ferlay MSc, ME, Rebecca L. Siegel MPH, Mathieu Laversanne MSc, Isabelle Soerjomataram MD, MSc, PhD Ahmedin Jemal DMV, PhD Freddie Bray BSc, MSc, PhD. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries First published: 04 February 2021 <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Hwang, H.J., et al., Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. 38(1): p. 258.
- Ilic, M., ve Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44), 9694–9705. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>
- Inowa T., Hishikawa K., Matsuzaki Y., Isagawa T., Takeuchi T., Aburatani H., Kitamura T., Fujita T. GADD45 β determines chemoresistance and invasive growth of side population cells of human embryonic carcinoma. *Stem Cells Int*. 2010;2010:782967. doi: [10.4061/2010/782967](https://doi.org/10.4061/2010/782967).
- Jacob J, Bellach J, Grützmänn R, Alldinger I, Pilarsky C, Dietel M, Kristiansen G. Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatology*. 2004;4(5):454-60. doi: [10.1159/000079824](https://doi.org/10.1159/000079824). Epub 2004 Jul 14. PMID: 15256807.
- Jauhainen, A., Thomsen, C., Strömbom, L., Grundevik, P., Andersson, C., Danielsson, A., Andersson, M. K., Nerman, O., Rökvist, L., Ståhlberg, A., & Åman, P. (2012). Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS One*, 7(4), e33208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033208>
- Jia Y., Gu D., Wan J., Yu B., Zhang X., Chiorean E.G., Wang Y., Xie J. The role of GLI-SOX2 signaling axis for gemcitabine resistance in pancreatic cancer. *Oncogene*. 2019;38:1764–1777. doi: [10.1038/s41388-018-0553-0](https://doi.org/10.1038/s41388-018-0553-0).

- Jing, G., Wang, J. J., & Zhang, S. X. (2012). ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Exp Diabetes Res*, 2012, 589589. <https://doi.org/10.1155/2012/589589>
- Jimenez, R. ve C. Fernandez-del Castillo. Tumors of the pancreas. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management. (2010) 9.Baskı. Philadelphia: Saunders Elsevier, s. 1017-1024
- K.A. Cronin, S. Scott, A.U. Firth, H. Sung, S.J. Henley, R.L. Sherman, R.L. Siegel, R.N. Anderson, B.A. Kohler, V.B. Benard, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: National cancer statistics *Cancer*, 128 (2022), pp. 4251-4284
- Kadowaki H., Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*. 2013;4:306–333. doi: 10.3390/genes4030306.
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, SM., Yu, J., Borges, M., Hruban, RH., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., Goggins, M. 2012. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4): 730–733.
- Kaufman RJ (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* 110: 1389–1398
- Kern, S. E., Hruban, R. H., Hidalgo, M., & Yeo, C. J. (2002). An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. *Cancer Biol Ther*, 1(6), 607-613. <https://doi.org/10.4161/cbt.307>
- Khoshdel Z, Naghibalhossaini F, Abdollahi K, Shojaei S, Moradi M, Malekzadeh M. Serum copper and zinc levels among Iranian colorectal cancer patients. *Biol Trace Elem Res*. 2016;170(2):294–299. doi: 10.1007/s12011-015-0483-4.
- Klein, A.P., Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021. 18(7): p. 493-502.
- Kobayashi M, Mizuno S, Murata Y. Gemcitabine-based chemoradiotherapy followed by surgery for borderline resectable and locally unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma: significance of the CA19-9 reduction rate and intratumoral human equilibrative nucleoside transporter 1 expression. *Pancreas*. 2014;43:350–360
- Koh, E.K., et al., Combinatorial immunotherapy with gemcitabine and ex vivo-expanded NK cells induces anti-tumor effects in pancreatic cancer. *Sci Rep*, 2023. 13(1): p. 7656.
- Koong A.C., Chauhan V., Romero-Ramirez L. Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy. *Cancer Biol. Ther.* 2006;5:756–759. doi: 10.4161/cbt.5.7.2973

- Kong, B., Cheng, T., Wu, W., Regel, I., Raulefs, S., Friess, H., Erkan, M., Esposito, I., Kleeff, J., & Michalski, C. W. (2015). Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress 112 characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 6(31), 32154-32160. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5168>
- Kopito RR (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**: 427–430
- Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*. 2006;8:877–884.
- Kozutsumi MY, Segal M, Normington K, Gething MJ and Sambrook J (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**: 462–464
- Krantz, B.A. and E.M. O'Reilly, Biomarker-Based Therapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Emerging Reality? *Clin Cancer Res*, 2018. 24(10): p. 2241-2250.
- Kuo CL, Chou HY, Chiu YC, et al. Mitochondrial oxidative stress by Lon-PYCR1 maintains an immunosuppressive tumor microenvironment that promotes cancer progression and metastasis. *Cancer Lett*. 2020;474:138–150.
- Kwangho Kim, Tae Young Ryu Jinkwon Lee, Mi-Young Son, Dae-Soo Kim, Sang Kyum Kim, and Hyun-Soo Cho. Epigenetic Silencing of CHOP Expression by the Histone Methyltransferase EHMT1 Regulates Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. 2022 Sep 30; 45(9): 622–630. Published online 2022 Jun 24. doi: 10.14348/molcells.2022.0014
- Lademann U. A., Rømer M. U. Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) *Thrombosis & Haemostasis* . 2008;100(6):1041–1046.
- Lai, E.D., Teodoro, T., Volchuk, A., 2007. Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response. *Physiology*. 22, 193-201. Kapoor, A., Sanyal, A.J., 2009. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin. Liver Dis*.13, 581-590
- Lam, W. The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy- induced gastrointestinal toxicity. *Sci. Transl. Med.*, 2. 2010 doi:10.1126/scitranslmed.3001270
- Lee A.S. GRP78 induction in cancer: Therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*. 2007;67:3496–3499. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0325.

- Lennon, A. M., Wolfgang, C. L., Canto, M. I., Klein, A. P., Herman, J. M., Goggins, M., Fishman, E. K., Kamel, I., Weiss, M. J., Diaz, L. A., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Hruban, R. H. (2014). The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? *Cancer Res*, 74(13), 3381- 3389. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-14-0734>
- Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J., & Singh, R. K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*, 170(6), 3369-3376. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369>
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004;**363**:1049–1057
- Li G., Mongillo M., Chin K.-T., Harding H., Ron D., Marks A.R., Tabas I. Role of $ero1-\alpha$ -mediated stimulation of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 2009;186:783–792. doi: 10.1083/jcb.200904060.
- Li, X. X., Zhang, H. S., Xu, Y. M., Zhang, R. J., Chen, Y., Fan, L., Qin, Y. Q., Liu, Y., Li, M., & Fang, J. (2017). Knockdown of IRE1 α inhibits colonic tumorigenesis through decreasing β -catenin and IRE1 α targeting suppresses colon cancer cells. *Oncogene*, 36(48), 6738-6746. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.284>
- Li X.M., Zhang K.Z., Li Z.H. Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective. *J. Hematol. Oncol*. 2011;4:8. doi: 10.1186/1756-8722-4-8.
- Li, D., Morris, J.S., Liu, J., Hassan, M.M., Day, R.S., Bondy, M.L., Abbruzzese, J.L. 2009. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*, 301(24): 2553-2562.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., Abbruzzese, J.L. 2004. Pancreatic cancer. *Lancet*, 363(9414): 1049-1057.
- Li, Y., Yang, X., Kang, X., Liu, S. (2019). The regulatory roles of long noncoding RNAs in the biological behavior of pancreatic cancer. *Saudi Journal of Gastroenterolog*, 25(3):145-151.
- Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Canc* 1975; 15: 741-747.

- Liebermann DA, Hoffman B. Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal*. 2008;3:15. 2. Hoffman B, Liebermann DA. Gadd45 in modulation of solid tumors and leukemia. *Adv Exp Med Biol*. 2013;793:21–33.
- Liebermann DA, Tront JS, Sha X, Mukherjee K, Mohamed-Hadley A, Hoffman B. Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Crit Rev Oncog*. 2011;16:129–40
- Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J. H., Walter, P., Reed, J. C., Glimcher, L. H., & Hetz, C. (2009). BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol Cell*, 33(6), 679-691. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.017>
- Liu B., Zhang Y. H., Jiang Y., Li L. L., Chen Q., He G. Q., et al. (2015). Gadd45b is a novel mediator of neuronal apoptosis in ischemic stroke. *Int. J. Biol. Sci.* 11 353–360. [10.7150/ijbs.9813](https://doi.org/10.7150/ijbs.9813)
- Liu Z.-W., Zhu H.-T., Chen K.-L., Dong X., Wei J., Qiu C., Xue J.-H. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Diabetol*. 2013;12:158. doi: 10.1186/1475-2840-12-158
- Lockhart, A. C., Rothenberg, M. L., & Berlin, J. D. (2005). Treatment for Pancreatic Cancer: Current Therapy and Continued Progress. *Gastroenterology*, 128(6), 1642–1654
- Longnecker, D. 2014. Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, <https://www.pancreapedia.org> – (Erişim tarihi: 11.2.2017
- Loskutoff D.J., van Mourik J.A., Erickson L.A., Lawrence D. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983;80:2956–2960. doi: 10.1073/pnas.80.10.2956
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., Bartek, J. 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375(6531): 503-536
- M. Wang, R.J. Kaufman. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease *Nature*, 529 (7586) (2016), pp. 326-335
- Maitra, A., Adsay, NV., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Hruban, R.H. 2003. Multicomponent analysis of the pancreatic

- adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod. Pathol.*, 16(9): 902–912.
- Malhotra J.D., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* 2007;9:2277–2294. doi: 10.1089/ars.2007.1782.
- Marciniak SJ, Ron D 2006 Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 86:1133–1149.
- Mateos, R.S., Conlon, K.C. 2016. Pancreatic cancer. *Surgery*, 34(6): 282–291.
- Maytin EV, Ubeda M, Lin JC and Habener JF (2001) Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp. Cell Res.* 267: 193–204
- McGuigan A., Kelly P., Turkington R.C., Jones C., Coleman H.G., McCain R.S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), s.4846– 4861.
- McGuire, S. 2016. International Agency for Research on cancer. World Health Organization. World cancer report 2014. Geneva, Switzerland *Advances in nutrition*, 7, 418–419. <https://doi.org/10.3945/an.116.012211>. Genesis
- McWilliams, R.R., Wieben, E.D., Rabe K.G., Pedersen, K.S., Wu, Y., Sicotte, H., Petersen, G.M. 2011. Prevalence of CDKN2A mutations in pancreatic cancer patients: implications for genetic counseling. *Eur J Hum Genet*, 19(4): 472-478.
- Michaud, D.S. 2017. Pancreatic Cancer: Reference Module in Biomedical Sciences, Editörler: Caplan, M., ABD, s. 390–398.
- Miyaki, M., Kuroki T. 2003. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306(4): 799-804.
- Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M., & Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res*, 67(22), 10631-10634. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-1705>
- Mohammed, S., Van Buren, G., 2nd, & Fisher, W. E. (2014). Pancreatic cancer: advances in treatment. *World J Gastroenterol*, 20(28), 9354-9360. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9354>
- Morana G, Cancian L, Pozzi Mucelli R, Cugini C. Staging cancer of the pancreas. *Cancer Imaging*. 2010; 10(1A): 137.

- Mori K (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**: 451–454
- Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Lowy, A.M., Brunton, V.G., Frame, M.C., Evans, T.R., Sansom, O.J. 2010. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(1): 246–251.
- Myint KZ, Kongpracha P, Rattanasingachan P, et al. Gadd45 β silencing impaired viability and metastatic phenotypes in cholangiocarcinoma cells by modulating the EMT pathway. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3031–3041.
- Nagelkerke A, Bussink J, Sweep FCGJ, Span PN (2014) The unfolded protein response as a target for cancer therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1846(2):277–284.
- Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010;304:1073–1081.
- Neoptolemos JP. Adjuvant treatment of pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2011 Sep;47(Suppl 3):S378–80
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A and Ichijo H (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**: 1345–1355
- Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.* 2012;151:217–219. doi: 10.1093/jb/mvr143.22.
- Nixon-Abell J, Obara CJ, Weigel AV, Li D, Legant WR, Xu CS, Pasolli HA, Harvey K, Hess HF, Betzig E, Blackstone C, Lippincott-Schwartz J. Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science.* 2016 Oct 28;354(6311). pii: aaf3928. PMID: 27789813.
- Nkondjock, A., Krewski, D., Johnson, K.C., Ghadirian, P. 2005. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, 114(5): 817-823.

- Novoa I., Zeng H., Harding H.P., Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *Cell Biol.* 2001;153:1011–1022. doi: 10.1083/jcb.153.5.1011.
- Oakes SA, FR P The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015; 10:173–94. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649. Tu BP, JS W Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol.* 2004; 164(3):341–6.
- Oettle H Post S Neuhaus P et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer. *JAMA.* 2007; 297 (3): 267– 277
- Ojajärvi, A., Partanen, T., Ahlbom, A., Boffetta, P., Hakulinen, T., Jourenkova, N., Kauppinen, T., Kogevinas, M., Vainio, H., Weiderpass, E., Wesseling, C. 2001. Risk of pancreatic cancer in workers exposed to chlorinated hydrocarbon solvents and related compounds: a meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.*, 153(9): 841-850
- Orun, Y. (2017). TÜRKİYE De Yaşam Boyu Kansere Yakalanma Riski. *Sosyal Guvence*, (12), 108–124. <https://doi.org/10.21441/sguz.2017.60>
- Oskolkova, O. V., Afonyushkin, T., Leitner, A., von Schlieffen, E., Gargalovic, P. S., Lusic, A. J., Binder, B. R., & Bochkov, V. N. (2008). ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized 117 sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood*, 112(2), 330-339. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-112870>
- Oyadomari S, Araki E and Mori M (2002) Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 7: 335–345
- Oyadomari S., Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11:381–389. doi: 10.1038/sj.cdd.4401373
- Ozcan L., Tabas I. Pivotal Role of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in ER Stress-Induced Apoptosis. *Cell cycle.* 2010;9:223–224. doi: 10.4161/cc.9.2.10596.
- P. Fagone, S. Jackowski, Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function *J. Lipid Res.*, 50 (Suppl(50 Suppl)) (2009), p. S311,
- Pahl HL, Sester M, Burgert HG and Baeuerle PA (1996) Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19 K protein requires its ER retention. *J. Cell Biol.* 132: 511–522

- Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, et al. Gadd45 β mediates the NF- κ B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol.* 2004;6(2):146–153
- Papa S., Monti S. M., Vitale R. M., Bubici C., Jayawardena S., Alvarez K., , De Smaele E, Dathan N, Pedone C, Ruvo M, Franzoso G. (2007). Insights into the structural basis of the GADD45beta-mediated inactivation of the JNK kinase, MKK7/JNKK2. *J. Biol. Chem.* 282 19029–19041. 10.1074/jbc.m703112200
- Papademetrio D, Cavaliere V, Simunovich T. Interplay between autophagy and apoptosis in pancreatic tumors in response to gemcitabine. *Target Oncol.* 2014;9:123–134.
- Patil C, Walter P 2001 Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*13:349–355.
- Pavon MA, Arroyo-Solera I, Tellez-Gabriel M, Leon X, Viros D, Lopez M, Gallardo A, Cespedes MV, Casanova I, Lopez-Pousa A, Mangués MA, Quer M, Barnadas A, Mangués R. Enhanced cell migration and apoptosis resistance may underlie the association between high SERPINE1 expression and poor outcome in head and neck carcinoma patients. *Oncotarget.* 2015;6:29016–29033. doi: 10.18632/oncotarget.5032.
- Peddi PF, et al. Multi-institutional experience with FOLFIRINOX in pancreatic adenocarcinoma. *JOP.* 2012;13:497–501. doi: 10.6092/1590-8577/913.
- Poda M, G. Hasanoğlu, F.Y. Ekici, F.N. Tuncer. Adacık Benzeri Hücre Kümeleşmesinde Gen Anlatım Değişimleri, Differential Expression In SST Gene In Induced Panc-1 Cells Forming Islet-Like Cell Aggregates (ICA). *Deneyisel Tıp Dergisi* 2017: 87-92.
- Polonsky, K. S. (2012). The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med*, 367(14), 1332-1340. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110560>
- Pranteda A, Piastra V, Stramucci L, Fratantonio D, Bossi G. The p38 MAPK signaling activation in colorectal cancer upon therapeutic treatments. *Int J Mol Sci.* 2020 doi: 10.3390/ijms21082773.
- Prashanth Rawla, Tagore Sunkara ve Vinaya Gaduputic. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1): 10–27.
- Puthalakath H., O'Reilly L.A., Gunn P., Lee L., Kelly P.N., Huntington N.D., Hughes P.D., Michalak E.M., McKimm-Breschkin J., Motoyama N. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 2007;129:1337–1349. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.027.

- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer*, 11(11): 761–774.
- Pytel D, Seyb K, Liu M, et al. Enzymatic Characterization of ER Stress-Dependent Kinase, PERK, and Development of a High-Throughput Assay for Identification of PERK Inhibitors. *J Biomol Screen*. 2014;19:1024–34.
- Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer : an overview. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, 6 : 699-708. Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22(1): 50-55.
- Regine W.F., Winter K.A., Abrams R.A., Safran H., Hoffman J.P., Konski A., ... Rich T.A. (2008). Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 299(9), s. 1019-26.
- Reimertz C., Kögel D., Rami A., Chittenden T., Prehn J.H. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: Induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J.Cell Biol.* 2003;162:587–597. doi: 10.1083/jcb.200305149.
- Riva, F., Dronov, O. I., Khomenko, D. I., Huguet, F., Louvet, C., Mariani, P., ... Bidard, F.-C. (2016). Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. *Molecular Oncology*, 10(3), 481– 493. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.006>
- Robinson, C. M., Talty, A., Logue, S. E., Mnich, K., Gorman, A. M., & Samali, A. (2021). An Emerging Role for the Unfolded Protein Response in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/cancers13020261>
- Ron D (2002) Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* **110**: 1383–1388
- Ron D and Habener JF (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6: 439–453
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., Kern, S.E. 1997. Tumorsuppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.*, 57(9): 1731–1734.

- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*, 48(3), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- S.B. Cullinan, Z. Donna, H. Mark, A. Edward, R.J. Kaufman, D.J. Alan, B. Jin, A. Lacombe, S. Castori-Eppenberger, P. Sarmientos Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival *Mol. Cell. Biol.*, 23 (20) (2003), pp. 7198-7209
- Sakorafas, G.H., Tsiotou, A.G., Tsiotos, G.G. 2000. Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treat Rev.*, 26(1): 29-52.
- Salminen A., Kauppinen A., Suuronen T., Kaarniranta K., Ojala J. ER stress in Alzheimer's disease: A novel neuronal trigger for inflammation and alzheimer's pathology. *J. Neuroinflamm.* 2009;6:41. doi: 10.1186/1742-2094-6-41.
- Salvador J. M., Brown-Clay J. D., Fornace A. J., Jr. (2013). Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 793 1–19. 10.1007/978-1-4614-8289-5_1
- Samarakoon R, Higgins CE, Higgins SP, Higgins PJ. TGF-beta1-Induced Expression of the Poor Prognosis SERPINE1/PAI-1 Gene Requires EGFR Signaling: A New Target for Anti-EGFR Therapy. *J Oncol.* 2009;2009:342391.
- Schröder M., Kaufman R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74:739–789. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., Baylin, S.B., Kern, S.E. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.*, 57(15): 3126–3130.
- Schwab M. *Encyclopedia of cancer*. 3rd ed. Springer; Heidelberg ; New York: 2011.
- Scott A. Oakes , *Am J Pathol.* 2020 May; 190(5): 934 946. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.01.010
Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells
- She-Gan Gao, Xiao-Juan Zhu, San-Qiang Li, Zhen-Guo Shi, Zhi-Kun Ma, Shan Shan Zhu, Xiao-Shan Feng. Down-regulation of C/EBP homologous protein (CHOP) expression in gastric cardia adenocarcinoma: Their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* Volume39,Issue3, June2015,Pages391-398. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.11.010>

- Shen X, Zhang K, Kaufman RJ (2004) The unfolded protein response—A stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat* 28(1–2):79–92.
- Sherr, C.J. 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(10): 731–737.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;**63**:11–30
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. [https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21590](https://doi.org/10.3322/caac.21590)
- Silverman, D.T., Hoover, R.N., Brown, L.M., Swanson, G.M., Schiffman, M., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Schwartz, A.G., Liff, J., Pottern, L.M., Fraumeni, J.F Jr. 2003. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*, 14(1): 45-54.
- Simone TM, Higgins CE, Czekay RP, Law BK, Higgins SP, Archambeault J, Kutz SM, Higgins PJ. SERPINE1: A Molecular Switch in the Proliferation-Migration Dichotomy in Wound-”Activated” Keratinocytes. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014;3:281–290.
- Simone TM, Higgins PJ. Inhibition of SERPINE1 Function Attenuates Wound Closure in Response to Tissue Injury: A Role for PAI-1 in Re-Epithelialization and Granulation Tissue Formation *Journal of Developmental Biology.* 2015;3:11–24
- Simone TM, Longmate WM, Law BK, Higgins PJ. Targeted Inhibition of PAI-1 Activity Impairs Epithelial Migration and Wound Closure Following Cutaneous Injury. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4:321–328.
- Stephen, AG., Esposito, D., Bagni, R.K., McCormick, F. 2014. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, 25(3): 272–281.
- Stewart B.W., Wild C.P. *World Cancer Report 2014.* World Health Organization; Lyon, France: 2016.
- Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther.* 2009;1:1–4
- Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri YU, Fujimoto J. CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5567-77. doi: 10.4049/jimmunol.166.9.5567. PMID: 11313396

- Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M., Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7:880–885. doi: 10.1038/sj.embor.7400779.
- Tabas I., Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 2011;13:184. doi: 10.1038/ncb0311-184.
- Tadros, S., Shukla, S. K., King, R. J., Gunda, V., Vernucci, E., Abrego, J., Chaika, N. V., Yu, F., Lazenby, A. J., Berim, L., Grem, J., Sasson, A. R., & Singh, P. K. (2017). De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*, 77(20), 5503-5517. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-16-3062>
- Takaishi S, Okumura T, Tu S, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells.* 2009;27:1006–1020.
- Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell.* 1998;95:521–530
- Tornatore L, Sandomenico A, Raimondo D, et al. Cancer-selective targeting of the NF- κ B survival pathway with GADD45 β /MKK7 inhibitors. *Cancer Cell.* 2014;26(4):495–508.
- Torre, L.A., et al., Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015. 65(2): p. 87- 108
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS and Walter P (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**: 249–258
- Tsai Y.C., Weissman A.M. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer.* 2010;1:764–778. doi: 10.1177/1947601910383011.
- Ubeda M, Vallejo M and Habener JF (1999) CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7589–7599
- Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9:32–71.
- Ulukaya Engin, Ceyda Acilan, ve Yusuf Yilmaz. 2011. “Apoptosis: Why and how does it occur in biology?” *Cell Biochemistry and Function* 29(6): 468–80.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP and Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**: 664–666

- Urrea H., Dufey E., Lisbona F., Rojas-Rivera D., Hetz C. When ER stress reaches a dead end. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* 2013;1833:3507–3517. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.07.024.
- Vasseur, S., Tomasini, R., Tournaire, R., & Iovanna, J. L. (2010). Hypoxia induced tumor metabolic switch contributes to pancreatic cancer aggressiveness. *Cancers (Basel)*, 2(4), 2138-2152. <https://doi.org/10.3390/cancers2042138>
- Vecchia, C.L., Bosetti, C. 2016. Tobacco, alcohol and pancreatic disease: Key findings from global consortia. *Epidemiology Biostatistics and Public Health*, 13(1): e11779-1-e11779-2.
- Verma, G., & Datta, M. (2012). The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death. *J Cell Physiol*, 227(5), 1791-1795. <https://doi.org/10.1002/jcp.22903>
- Vujasinovic M, Valente R, Del Chiaro M, Permert J, Lohr JM. Pancreatic Exocrine Insufficiency in Pancreatic Cancer. *Nutrients* 2017; 9(3).
- Waissi, W., et al., Gemcitabine-Based Chemoradiotherapy Enhanced by a PARP Inhibitor in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(13)
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>
- Wang G., Yang Z.-Q., Zhang K. Endoplasmic reticulum stress response in cancer: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Am. J. Transl. Res.* 2010;2:65–74.
- Wang HC, et al. Pancreatic stellate cells activated by mutant KRAS-mediated PAI-1 upregulation foster pancreatic cancer progression via IL-8. *Theranostics*. 2019;9:7168–7183. doi: 10.7150/thno.36830.
- Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature reviews Cancer*. 2014;14:581–597.
- Wang M., Law M.E., Castellano R.K., Law B.K. The unfolded protein response as a target for anticancer therapeutics. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2018;127:66–79. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.05.003.

- Wang S, Cao Q, Wang X, Li B, Tang M, Yuan W, Fang J, Qian J, Qin C, Zhang W. PAI-1 4G/5G polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8:e56797
- Wang W, Wang X, Luo J, Chen X, Ma K, He H, et al. Serum copper level and the copper-to-Zinc ratio could be useful in the prediction of lung cancer and its prognosis: A case-control study in northeast China. *Nutr Cancer*. 2021;73(10):1908–1915. doi: 10.1080/01635581.2020.1817957.
- Wang, L., Zhang, Y., Wang, W., Zhu, Y., Chen, Y., & Tian, B. (2017). Gemcitabine treatment induces endoplasmic reticular (ER) stress and subsequently upregulates urokinase plasminogen activator (uPA) to block mitochondrial-dependent apoptosis in Panc-1 cancer stem-like cells (CSCs). *PLoS One*, 12(8), e0184110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184110>
- Wang XZ and Ron D (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* 272: 1347–1349
- Wenfeng Tan, Yi Liao, Yang Qiu, Hongxiang Liu, Deli Tan, Tao Wu, Meng Tang, Haidong Wang. miRNA 146a promotes chemotherapy resistance in lung cancer cells by targeting DNA damage inducible transcript 3 (CHOP). *Cancer Letters Volume 428*, 1 August 2018, Pages 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.04.028>
- Weston, R. T., & Puthalakath, H. (2010). Endoplasmic reticulum stress and BCL-2 family members. *Adv Exp Med Biol*, 687, 65-77. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6706-0_4
- Wilentz, R.E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G.J., Kang, M., Goggins, M., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H. 1998. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.*, 58(20): 4740–4744
- Wilkins-Port CE, Ye Q, Mazurkiewicz JE, Higgins PJ. TGF-beta1 + EGF-initiated invasive potential in transformed human keratinocytes is coupled to a plasmin/MMP-10/MMP-1-dependent collagen remodeling axis: role for PAI-1. *Cancer Res*. 2009;69:4081–4091.
- Win, S., Than, T. A., Fernandez-Checa, J. C., & Kaplowitz, N. (2014). JNK interaction with Sab mediates ER stress induced inhibition of mitochondrial respiration and cell death. *Cell Death Dis*, 5(1), e989. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.522>

- Wong, M. C. S., Jiang, J. Y., Liang, M., Fang, Y., Yeung, M. S., ve Sung, J. J. Y. (2017). Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Scientific Reports*, 7(1), 3165. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02997-2>
- Wood NJ. Pancreatic cancer: pancreatic tumour formation and recurrence after radiotherapy are blocked by targeting CD44. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:73.
- Xiangwen Zhang, Tingting Zhou, Wenbin Li, Taotao Zhang, Ninwei Che, Guo Zu. Clinicopathological and prognostic significance of C/EBP homologous protein (CHOP) in advanced gastric cancer. *Pathology - Research and Practice* Volume 214, Issue 8, August 2018, Pages 1105-1109. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.06.005>
- Xiao X. L., Wu X. L., Yang P. B., Hu H. B., Chen Y., Min L., et al. (2020). Status epilepticus induced Gadd45b is required for augmented dentate neurogenesis. *Stem Cell Res*. 49:102102. [10.1016/j.scr.2020.102102](https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102102)
- Xu J, Shi J, Tang W. ROR2 promotes the epithelial-mesenchymal transition by regulating MAPK/p38 signaling pathway in breast cancer. 2020;12.
- Xue M., Sun H., Xu R., Wang Y., Guo J., Li X., et al. (2020). GADD45B promotes glucose-induced renal tubular epithelial-mesenchymal transition and apoptosis via the p38 MAPK and JNK signaling pathways. *Front. Physiol*. 11:1074. [10.3389/fphys.2020.01074](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01074)
- Yachida S., Jones S., Bozic I., Antal T., Leary R., Fu B., et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010;467:1114–1117.
- Yadav, R. K., Chae, S. W., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev*, 19(2), 75-88. <https://doi.org/10.15430/jcp.2014.19.2.75>
- Yamaguchi H., Wang H.-G. Chop is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J. Biol. Chem*. 2004;279:45495–45502. doi: 10.1074/jbc.M406933200.
- Yang, Y., Cheng, B. J., Jian, H., Chen, Z. W., Zhao, Y., Yu, Y. F., Li, Z. M., Liao, M. L., & Lu, S. (2017). XBP1-LOX Axis is critical in ER stress-induced growth of lung adenocarcinoma in 3D culture. *Am J Transl Res*, 9(2), 700-707
- Yeo CJ, Abrams RA, Grochow LB, Sohn TA, Ord SE, Hruban RH, Zahurak ML, Dooley WC, Coleman J, Sauter PK, et al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic

adenocarcinoma: postoperative adjuvant chemoradiation improves survival. A prospective, single-institution experience. *Ann Surg.* 1997;225:621–633; discussion 633-636

Yokouchi M., Hiramatsu N., Hayakawa K., Okamura M., Du S., Kasai A., Takano Y., Shitamura A., Shimada T., Yao J. Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 2008;283:4252–4260. doi: 10.1074/jbc.M705951200.

Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, et al. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem.* 2003;278(44):43001–43007.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T and Mori K (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**: 33741–33749

Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K and Mori K (2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell* **4**: 265–271

Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J.* 2007;274:630–658. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x.

Yu Z, Zhou R, Zhao Y, Pan Y, Liang H, Zhang J-S et al (2019) Blockage of SLC31A1-dependent copper absorption increases pancreatic cancer cell autophagy to resist cell death. *Cell Prolif.* 52:e12568. doi:10.1111/cpr.12568.

Zeng, L., Xiao, Q., Chen, M., Margariti, A., Martin, D., Ivetic, A., Xu, H., Mason, J., Wang, W., Cockerill, G., Mori, K., Li, J. Y., Chien, S., Hu, Y., & Xu, Q. (2013). Vascular endothelial cell growth-activated XBP1 splicing in endothelial cells is crucial for angiogenesis. *Circulation*, 127(16), 1712-1722. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.001337>

Zhang K, Kaufman RJ. Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. 2006.

Zhao, Z. and W. Liu, Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technol Cancer Res Treat*, 2020. 19: p. 1533033820962117

Zhao Z, Gao Y. GADD45B as a prognostic and predictive biomarker in Stage II colorectal cancer. 2018;9:7.

Zipperly M. E., Sultan F. A., Graham G. E., Brane A. C., Simpkins N. A., Carullo N. V. N., et al. (2021). Regulation of dopamine-dependent transcription and cocaine action by Gadd45b. *Neuropsychopharmacology* 46 709–720. 10.1038/s41386-020-00828-z



HAM VERİLER



FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

