

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ABEMACİCLİB VE PALBOCİCLİB' İN MIA PaCa-2 VE Capan-2 PANKREAS
KANSERİ HÜCRELERİNDE AMPK' NİN ETKİLEŞİMDE OLDUĞU ÜST VE
ALT SİNYAL YOLAKLARI İLE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Börteçine SEVGİN

1402060036

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

HAZİRAN 2020

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ABEMACİCLİB VE PALBOCİCLİB' İN MIA PaCa-2 VE Capan-2 PANKREAS
KANSERİ HÜCRELERİNDE AMPK' NİN ETKİLEŞİMDE OLDUĞU ÜST VE
ALT SİNYAL YOLAKLARI İLE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BÖRTEÇİNE SEVGİN

1402060036

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Prof. Dr. Elif Damla ARISAN (Gebze Teknik Üniversitesi)

HAZİRAN 2020

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapmış olduğum tüm lisans, yüksek lisans ve laboratuvar hayatım boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına ışık tutan, derslerine girmekten son derece keyif aldığım, her konuda yardım ve anlayışı gösteren, öğrencilerine ve yapılan çalışmalara verdiği önem sayesinde en iyisini yapmamızı teşvik eden, bu çalışma ile yetkinlikler kazanmamı sağlayan, çalışma azmi ile kendisini her konuda örnek aldığım, olaylara farklı açıdan yaklaşımına hayranlık duyduğum, her zaman sevgi, saygı ve güler yüzü ile hatırlayacağım çok kıymetli, saygıdeğer proje danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca derslerimizin verimli geçmesinde yüksek katkıları olan, sabrıyla, azmiyle, üstün bilgi ve tecrübeleriyle öğrencilerini destekleyen ve yanında olan çok kıymetli, saygıdeğer tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı ve yol gösterici olan, desteklerini hiç esirgemeyen, derslerin verimli ve bilimle geçmesini sağlayan çok kıymetli, saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN-ÜNSAL, Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN-YERLİKAYA'ya,

Laboratuvar çalışmalarında hiçbir zaman bilgilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her konuda yardımcı olan laboratuvarı adeta evimiz gibi hissettiren yeri geldiğinde gülüp eğlendiğimiz Araş. Gör. Özge BERRAK-RENCÜZOĞULLARI, Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ-KILBAŞ, Araş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN, Araş. Gör. Alp AYAN ve Araş. Gör. Sinan MERİÇ'e

Laboratuvar çalışmalarını birlikte gerçekleştirmekten ve beyin fırtınası yapmaktan keyif aldığım, gülüp eğlendiğim, her koşulda bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen, iyi ki proje grup arkadaşım dediğim, üniversitenin bana kazandırmış olduğu çok sevdiğim, çok kıymetli dostum Mervenur ÇOBAN'a,

Laboratuvar ortamında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, yeri geldiğinde gülüp eğlendiğim, yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen, ayırım yapmaksızın tüm lisans ve yüksek lisans çalışma arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, duydukları sonsuz sevgi ve güven ile her konuda desteklerini arkamda hissettiğim, sahip olduğum en büyük hazinem sevgili ailem, canım annem Sevil SEVGİN'e, canım babam Meral SEVGİN'e, üniversitenin ilk yıllarında beni her konuda koşulsuz destekleyen ve motive eden canım anneannem merhume Mesude ÖZLEM'e, canım babaannem Emine SEVGİN'e ve canım dedem Baki SEVGİN'e en içten saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK 1001 Projesi (Proje no: 118Z100, 2018-2021) tarafından desteklenmiştir. Bu proje kapsamında verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a ve projem için çalışma olanağı sağlayan İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarına teşekkürü borç bilirim.

Haziran, 2020

Börteçine SEVGİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR	vi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Pankreas Kanserinin Epidemiyolojisi	1
1.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri	3
1.2.1. Pankreas Kanseri ve Obezite İlişkisi	6
1.3. Pankreas Kanseri Terapi Modelleri	7
1.4. Pankreas Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar ...	9
1.4.1. Hücre Döngüsü	9
1.5. Doğal Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri	10
1.5.1. Palbociclib ve Abemaciclib	11
1.6. Hücre Yaşlanması	13
1.7. PI3K/ AKT/ mTOR	14
1.8. AMPK Sinyal Yolağı	15
1.9. Apoptoz	17
1.9.1. Mitokondri/ Sitokrom C Aracılı Hücre Ölümü (İntrinsik Yolak)	18
1.9.2. Ölüm Sinyalleri Aracılığı İle Hücre Ölümü (Ekstrinsik Yolak)	19
1.10. Amaç	20
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	21
2.1 Materyaller	21
2.1.1 Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri	21
2.1.2 Cihazlar	22
2.1.3 Hücre Kültürü Donanımları	22
2.1.4 Kimyasal Maddeler	22

2.1.5	Çözeltiler	22
2.2	Yöntemler	22
2.2.1	Hücre Kültürü.....	22
2.2.2	Hücrelerin Dondurulması.....	23
2.2.3	Hücre Açılması.....	23
2.2.4	Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)	24
2.2.5	Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesinin İncelenmesi.....	24
2.2.6	Hücre Akış Sitometrisi Çalışmaları	24
2.2.7	Protein İfadesinin Belirlenmesi	25
2.2.8	Senescence β -Galactosidase Boyama Yöntemi İle Hücre Yaşlanma durumunun Belirlenmesi.....	28
2.2.9	Oil Red O Boyama ile Lipid Damlacıklarının Işık Mikroskopunda Tespit Edilmesi 29	
2.2.10	BODIPY® 493/503 Boyama ile Lipid Damlacıklarının Floresans Mikroskopunda Tespit Edilmesi.....	29
2.2.11	Apoptotik Hücre Ölümünün DİOC6, DAPI ve PI Floresans Boyamalarla Tespit Edilmesi	29
2.2.12	siRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi	30
2.2.13	İstatistiksel Analiz	31
3.	SONUÇLAR.....	32
3.1	MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde abemaciclib ve palbociclib uygulaması hücre canlılığını azaltmaktadır.	32
3.2	Abemaciclib ve palbociclib uygulaması MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerine ket vururken AMPK siRNA uygulaması koloni oluşturma potansiyellerini arttırmaktadır.	33
3.3	Abemaciclib uygulanan Capan-2 hücreleri hücre döngüsünün G1 fazında tutulu kalırken, MIA PaCa-2 hücreleri palbociclib uygulamasında G1 fazında tutulu kalmaktadır.	37
3.4	Abemaciclib ve palbociclib MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde hücre yaşlanması sürecini tetiklemektedir.	42
3.5	Abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde AMPK ile ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları üzerinden hücre sağkalım sürecine farklı etki mekanizmaları olduğu görülmektedir.	43

3.6	Abemaciclib ve palbociclib, MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde AMPK değişimine bağlı olarak yağ asidi biyosentezine etki ederek hücre içi lipid profillerinde azalma sağlamıştır.	49
3.7	Abemaciclib ve palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde artan senesens ve döngüde takılı kalma süreci nedeni ile hücre ölüm kararının daha geç bir süreçte alındığı ve ölüm sinyal mekanizmasının aktif olduğu gözlemlenmiştir.	54
4.	TARTIŞMA	59
5.	KAYNAKLAR	75
6.	EKLER.....	87
6.1	Ek A: Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar	87
6.2	Ek B: Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller	88
6.3	Ek C: Kullanılan Kimyasal Maddeler	89
6.4	Ek D: Kullanılan Çözeltiler	93
7.	ÖZGEÇMİŞ	95

KISALTMALAR

ACC:	Asetil KoA Karboksilaz
ACLY:	ATP Sitrat Liyaz
AK:	Adenokarsinoma
AKT (PKB):	Protein kinaz B
AMPK:	AMP-Aktive Edici Protein Kinaz
ATCC:	Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATP:	Adenozin trifosfat
BCL-XL:	B-hücre lenfoma-ekstra büyük
BCL-2:	B-hücre lenfoma
BRAF:	B-Raf protoonkogen
BSA:	Sığır serum albumin
CDK:	Sikline bağımlı kinaz
CDK1:	Sikline bağımlı kinaz-1
CDK2:	Sikline bağımlı kinaz-2
CDK 4/6:	Sikline bağımlı kinaz 4/6
CLB:	Hücre özütlemeye tampon
COX-2	siklooksijenaz-2
c-Myc:	Miyelositomatozis viral onkogen homologu
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DİOC6	3,3' Diheksiloksakarbosiyanin İyodür
DMEM:	Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DSÖ:	Dünya sağlık örgütü
E2F:	Transkripsiyon faktörü
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit

EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FASN:	Yağ asidi sentaz
FBS:	Fetal sığır serumu
FGFR1:	Fibroblastik büyüme faktörü reseptörü 1
GDP:	Guanozin difosfat
GTP:	Guanozin trifosfat
KPC	Pankreatik duktal adenokarsinom modeli
HRAS:	Protoonkogen
KRAS:	Protoonkogen
MAPK:	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MEK (MAPKK):	Mitojenle aktive olan kinaz
MMP-7:	Matriks metalloproteinaz-7
mTOR:	Memeli rapamisin hedefi
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NET:	Nöroendokrin tümörler
p16 (CDKN2A):	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
p16 INK4a:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
p53:	Apoptozun-tümör-ilişkili proteini-53
p70s6k:	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PBS:	Fosfat tamponlu tuz
PD-0332991:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü bir ajan
PDK1	Fosfoinositid bağımlı kinaz
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-fosfat
PI3K α :	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa
PPAR γ :	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama
RAF:	Proto-onkogen serin/treonin-protein kinaz
RAS:	Rat sarkoma viral onkogen homolog

RB:	Retinonoblastoma
RNA:	Ribonükleik asit
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
Ser:	Serin
siRNA:	Küçük engelleyici RNA
TBS:	Tris tamponlu tuz
TBS-T:	TBS-tween
TEMED:	Tetrametiletildiamin
Thr:	Treonin
TP53:	P53 geni
Tyr:	Tirozin

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%:	Yüzde
°C:	Derece
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
g:	Santrifüj kuvveti
gr:	Gram
kDa:	Kilodalton
L:	Litre
M:	Molar
ml:	Mililitre
mm:	Milimetre
nm:	Nanometre
pH:	Hidrojen derecesi
rpm:	Dakikadaki dönüş sayısı
sa:	Saat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 2018 yılında GLOBOCAN tarafından pankreas kanserinin cinsiyete göre ve ülkelere özgü insidansı standardize edilmiş oranları gösterilmektedir (yeniden düzenlenmiştir) [4].	2
Şekil 2 Pankreas kanserine sebep olan genetik mutasyonlar ve sağkalım oranlarının incelenmesi (yeniden düzenlenmiştir) [26].	6
Şekil 3 Hücre döngüsünde yer alan siklin-CDK ilişkisi ve Retinoblastoma [41].	10
Şekil 4 CDK4/6 inhibitörlerinin etki mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [54].	12
Şekil 5 PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [60].	15
Şekil 6 AMPK sinyalizasyon mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [65].	17
Şekil 7 Ekstrinsik ve intrinsik ölüm sinyal yolları (yeniden düzenlenmiştir) [74].	19
Şekil 8 MIA PaCa-2 hücre hattı [76]	21
Şekil 9 Capan-2 hücre hattı [77]	22
Şekil 10 CDK4/6 inhibitörlerinin (0-10 μ M) MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde, hücre canlılığına olan etkisinin araştırılması.	32
Şekil 11 CDK4/6 inhibitörlerinin doza bağımlı bir şekilde MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi.	34
Şekil 12 Seçili dozlarda Abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi.	35
Şekil 13 AMPK sessizleştirme uygulamasının MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelleri üzerine etkisinin incelenmesi.	36
Şekil 14 Abemaciclib'in 24 saat uygulamasına takiben MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisinin araştırılması.	37
Şekil 15 Abemaciclib'in artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanması sonucunda MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde hücre siklusunun düzenlenmesinde rol alan c-Myc ve p-Rb ifadelerinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.	38
Şekil 16 Palbociclib'in 24 saat uygulamasına takiben MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisinin araştırılması.	39
Şekil 17 Palbociclib'in artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanması sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerindeki c-Myc, Siklin D2, CDK4, p21 ve p-Rb ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.	40

Şekil 18 CDK4/6 inhibitörlerinin p-Rb aktivitesine etkilerinin belirlenmesi.....	41
Şekil 19 Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin 24 saat uygulamasına takiben Capan-2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisinin araştırılması.....	42
Şekil 20 CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde hücre yaşlanması üzerine etkisinin araştırılması.....	43
Şekil 21 Artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanan abemaciclib'in MIA PaCa-2 hücre hattında AMPK ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	44
Şekil 22 Artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanan Palbociclib'in MIA PaCa-2 hücrelerinde AMPK ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	45
Şekil 23 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre sağkalım yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi..	46
Şekil 24 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin Capan-2 hücrelerinde hücre sağkalım yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi..	48
Şekil 25 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 hücrelerinde AMPK ilişkili aşağı sinyal yolakları olan yağ asidi sentez ve lipogenez yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi.	49
Şekil 26 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin Capan-2 hücrelerinde AMPK ilişkili aşağı sinyal yolakları olan yağ asidi sentez ve lipogenez yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi.	51
Şekil 27 a) CDK4/6 inhibitörlerinin 24 saat seçili dozlarda uygulanmasının ardından MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin içerisindeki yağ damlacıkları floresans özellikteki BODIPY® 493/503 ve b) Oil Red O çözeltisi ile muamelelerinin ardından tanımlanmıştır. iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.....	52
Şekil 28 a) CDK4/6 inhibitörlerinin 24 saat seçili dozlarda uygulanmasının ardından Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinin içerisindeki yağ damlacıkları floresans özellikteki BODIPY® 493/503 ve b) Oil Red O çözeltisi ile muamelelerinin ardından tanımlanmıştır. iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.....	53
Şekil 29 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 hücrelerinde apoptoz sinyal yolağında rol alan belirteçler üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	54
Şekil 30 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerindeki mitokondriyel membran potansiyeli, DNA	

kondenzasyonu, ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.	55
Şekil 31 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin Capan-2 pankreas kanseri hücrelerindeki mitokondriyel membran potansiyeli, DNA kondenzasyonu, ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.	56
Şekil 32 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde Annexin V/PI hücre ölümü analizi.).	57
Şekil 33 Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde Annexin V/PI hücre ölümü analizi.	58
Şekil 34 Tez kapsamında incelenen AMPK'nın etkileşimde olduğu alt ve üst sinyal yolları ile ilişkili regülasyonlarının abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerindeki etkisinin şematik gösterimi.	74

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Kullanılan Cihazların Listesi.....	87
Table 2 Hücre Kültürü Donanımları.....	88
Table 3 Kullanılan Kimyasalların Listesi.....	89
Tablo 4 Kullanılan Antikor Listesi.....	90
Tablo 5 Yürütme Jelinin Hazırlanması.....	94



ÖZET

Pankreas kanseri, dünya nüfusu arasında insidansı ve mortalite oranı son yıllarda önemli ölçüde artmakta olup en yaygın dördüncü kanser türüdür. Erken teşhisi ve tedavi imkanı son derece kısıtlı olan pankreas kanseri, terapötik stratejilere karşı son derece dirençli olduğundan bazı tedavi yöntemlerinin yetersiz kalmasında rol alan ve sıklıkla görülen *KRAS*, *SMAD*, *TP53*, *CDK2NA* gibi mutasyonların varlığında hücre proliferasyonunu artırarak agresif profil izlemektedir. Bu durum kanserin yaygın özelliklerinden biri olduğundan CDK' yı hedefleyen yeni ajanlar yeni tedavi yöntemleri için ilgi çekici bir seçenek olmuştur. Spesifik CDK4/6 inhibitörleri olan palbociclib ve abemaciclib, hücre çoğalmasını G1 fazında tutulu kalmasını sağlayarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu indükleyerek önemli bir anti-kanser özelliğine sahiptirler. Anti-kanser etkileri sayesinde tümör oluşumuna dahil olan hücre sağkalımı ve ölümünde rol alan çeşitli moleküler hedefler bildirilmiştir. Agresif Pankreas kanseri hücreleri kullanılarak yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, aktiflenen CDK4 ile zıt etkileşimde olduğu bilinen evrimsel olarak korunan bir hücre içi enerji sensörü olan AMPK'nın aktivasyonundaki değişikliklerin hücre tipiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu anlamda kanserin temel özellikleri arasında bilinen enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi kritik önem taşımaktadır. Tez kapsamında farklı genomik özelliklere sahip MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücre hatlarında CDK4/6 inhibitörlerinin AMPK'nın etkileşimde olduğu üst ve alt sinyal yolları üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Farklı stres koşullarının, hücrelerde hayatta kalma/ölüm kararında kritik olan AMPK aktivitesini tetiklediği gösterilmiştir. Hücresel enerji ile etkileşimleri nedeniyle AMPK aktivitesi, kanser hücrelerinde mTOR sinyalini veya lipid metabolizmasını değiştirmektedir. Bu çalışmada, hücrelerdeki PI3K/AKT/mTOR sinyal eksenini modüle ederek hücre döngüsünün G1 fazında tutulu kalmalarını sağlayıcı ajanlar olan iki farklı CDK4/6 inhibitörünün etkisi karşılaştırılmıştır. MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerindeki metabolik farklılıklardan dolayı palbociclib ve abemaciclib'in her kanser hücresindeki etkileri aynı olmamakla birlikte farklı moleküler mekanizmalar üzerinden yanıt oluşturduğu dikkati çekmiştir. Palbociclib uygulanan hücrelerde hücre açlığının AMPK aktivitesinin artışı ile korelasyon gösterirken abemaciclib uygulanan hücrelerde hücre

açılığının mTOR üzerinden metabolik olarak sensör mekanizma ile algılandığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu tetikleyen yağ asidi biyosentezinin baskılanması terapötik açıdan kritik önem taşımaktadır. Bu nedenle her iki CDK4/6 inhibitörünün, hücre ölüm mekanizmasını genişletmek için hücrelerdeki farklı mekanizmaları indüklediği sonucuna varılmıştır.

Son derece agresif profile sahip pankreas kanseri hücreleri için umut vaad edici çalışmalar olmakla birlikte klinik uygulamalar öncesinde pankreas kanseri farklı hücre tiplerinde CDK4/6 inhibitörlerinin moleküler hedeflerinin geniş ölçekli olarak tanımlanmasına yönelik bulgular sağlaması ve bu bulguların olası tedavi seçeneklerinin başarılarının arttırılmasına yönelik olarak yeni kombine tedaviler için önemli hücresel hedeflerin ayırt edilmesini sağlama potansiyeli taşımaktadır.

ABSTRACT

The incidence and mortality rate of pancreatic cancer among the world population has increased significantly in recent years and is the fourth most common cancer type. Pancreatic cancer is highly resistant to therapeutic strategies, with early diagnosis and the possibility of treatment being extremely limited, and it increases the cell proliferation by the presence of mutations such as *KRAS*, *SMAD*, *TP53*, *CDK2NA*, which play an important role in cell aggressiveness. Since this is one of the common features of cancer, new agents targeting CDK have been an interesting option for new treatment methods. Specific CDK4/6 inhibitors palbociclib and abemaciclib have an important anti-cancer feature by reducing cell proliferation and inducing apoptosis by arresting cell proliferation in the G1 phase. Thanks to its anti-cancer effects, various molecular targets involved in cell survival and death, which are involved in tumor formation, have been reported. In vitro and in vivo studies using aggressive pancreatic cancer cells suggest that changes in the activation of AMPK, an evolutionarily conserved intracellular energy sensor known to be in opposite interaction with activated CDK4, may be associated with the cell type. Deregulating of known cellular energy metabolism is one of the main features of cancer. Within the scope of the thesis, it is aimed to investigate the effects of CDK4/6 inhibitors on the upstream and downstream signalling related cascades of AMPK in MIA PaCa-2 and Capan-2 pancreatic cancer cells with different genomic properties.

Different stress conditions have been shown to trigger AMPK activity, which is critical in the decision of survival/death in cells. Due to their interaction with cellular energy, AMPK activity alters the mTOR signal or lipid metabolism in cancer cells. In this study, the effects of two different CDK4/6 inhibitors, which are the agents that enable the cell cycle to remain in the G1 phase by modulating the PI3K/AKT/mTOR signal axis in cells, were compared. It is noteworthy that due to the metabolic differences in MIA PaCa-2 and Capan-2 cells, palbociclib and abemaciclib do not have the same effects on each cancer cell but produce responses through different molecular mechanisms. Palbociclib was correlated with increased AMPK activity of cell starvation in treated cells. It was determined that cellular starvation is detected by the metabolic sensor

mechanism on mTOR in abemaciclib treated cells. Accordingly, suppression of fatty acid biosynthesis that triggers proliferation of pancreatic cancer cells is therapeutically critical. It is therefore concluded that both CDK4/6 inhibitors induce different mechanisms in cells to expand the cell death mechanism.

Promising studies for pancreatic cancer have the potential to enable large-scale identification of molecular targets of CDK4/6 inhibitors in different cell types of pancreatic cancer prior to clinical applications and to enable them to distinguish important cellular targets for new combined treatments in order to increase the success of possible treatment options for these findings.

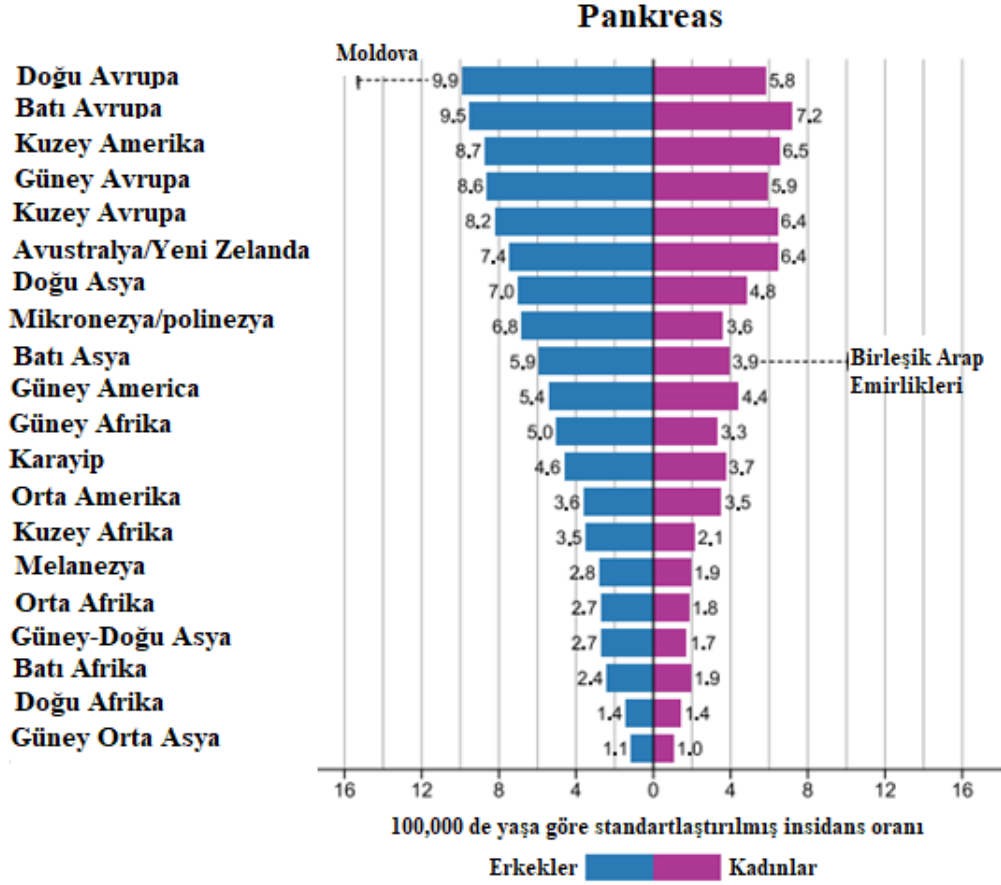
1. GENEL BİLGİLER

1.1. Pankreas Kanserinin Epidemiyolojisi

Pankreas kanserinin insan sağlığı açısından olumsuz etkisi olup, Dünya nüfusu arasında insidansı ve mortalite oranı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca erken teşhisi ve tedavi imkanı son derece kısıtlı olan pankreas kanseri, terapötik stratejilere karşı son derece dirençli olduğundan bazı tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı agresif bir kanser türü olarak bilinmektedir. Erkeklerde kadınlara göre biraz daha yaygın olup son zamanlarda neredeyse görülme sıklığı eşit düzeye ulaşmıştır. İleri yaşlarda (60 yaş ve üzeri) daha sık ortaya çıkan pankreas kanseri, tüm kanserlerin %2'sini ve kansere bağlı ölümlerin %5'ni kapsamaktadır. Semptomları az olup hızlı ilerleyen kanser türleri arasında, pankreas kanseri ilk sıralarda yer almaktadır [1]. ABD'de en sık görülen üçüncü sırada yer alan kanser türüdür. Sanayileşmiş ülkelerde daha sık karşılaşılan küresel kanser ölümlerinin yedinci nedenidir. GLOBOCAN 2018 dünyadaki verilerine göre, pankreas kanserine yakalanan yeni vaka sayısı 458,918' e ulaşırken, 432,224 bireyin ölümüne (tüm ölümlerin %4,5'i) neden olarak 2018'de dördüncü sırada yer almıştır [2].

Erkeklerde (243,033 vakada %5,5) kadınlardan (215,885 vakada %4) daha yaygın olduğu istatistiksel olarak kanıtlanmıştır. Erkeklerde, Orta ve Doğu Avrupa'da özellikle Letonya ve Moldova Cumhuriyeti (15,3), Estonya (14,2), Macaristan'da (12,9), Uruguay (12,0) ve Japonya (11,7) ülkelerinde pankreas kanseri oluşum riski yüksektir. En düşük oranlar Gine (0,23) ve Malawi (0,30) 'da rastlanmıştır. Kadınlarda pankreas kanseri görülme sıklığı en yüksek olan bölgeler Batı Avrupa (7,2), Kuzey Amerika (6,5), Kuzey Avrupa ve Avustralya/Yeni Zelanda'dır (eşit: 6,4) olup yine kadınlarda pankreas kanserine yakalanma riski en düşük olan (%1'den az) bölgeler Doğu Afrika ve Güney Doğu Asya'dır. Komor Afrika ve Sao Tome ve Principe Afrika bölgelerinde hem erkek hem kadınlarda pankreas kanserine yakalanan vaka bulunmamıştır (Şekil 1).

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2017 yılında yayınlanan Pankreas Kanseri'nden ölenleri sayısı 3,386 olup Türkiye'deki toplam ölümlerin %0,85'ini oluşturmaktadır. Türkiye'de en çok karşılaşılan ilk 10 kanser arasında yer almaktadır [3].



Şekil 1 2018 yılında GLOBOCAN tarafından pankreas kanserinin cinsiyete göre ve ülkelere özgü insidansı standardize edilmiş oranları gösterilmektedir (yeniden düzenlenmiştir) [4].

Pankreas kanseri nedeni karmaşık ve çok faktörlü olması sebebiyle potansiyel risk faktörlerinin belirlenmesine ve erken tanı için yeni kullanılan araçların geliştirilmesine rağmen görülme sıklığının artacağı tahmin edilmektedir ve 2040 yılında 355,317 yeni vakanın daha olacağı düşünülmektedir [2].

Amerikan Kanser Derneği'nin 2019 ABD'deki pankreas kanseri tahminlerine göre de yaklaşık 56,770 kişiye (29,940 erkek ve 26,830 kadın) pankreas kanseri teşhisi konulacağı ve yaklaşık 45,750 kişi (23,800 erkek ve 21,950 kadın) pankreas kanserinden öleceği düşünülmektedir [5].

1.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreasın duktal adenokarsinomu olarak bilinen pankreas kanseri, her ne kadar etiyolojisi kesin olarak bilinmese de son zamanlarda yapılan araştırmalar %25-30 pankreas kanseri vakasının sigara içme nedenine bağlarken %10'luk kısmının genetik faktörlere bağlı olduğunu ifade etmektedir [6] [7]. Bunun yanı sıra pek çok faktöründe etkili olabileceği unutulmamalıdır. Risk faktörlerinin çoğu direkt olarak hastalığa sebep olmaz ancak bu faktörlere maruz kalma düzeyi genellikle kanserin gelişmesini etkilemektedir. Bazı durumlarda, kanser gelişim riskini azaltabilecek veya belirsiz bir etkiye sahip olan faktörler olabilir. Böylece kontrol edilebilir risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan kaçınılması, ailesinde pankreas kanseri öyküsü bulunan, yüksek risk taşıyan bireyler için özellikle önem taşımaktadır [8]. Yaş, cinsiyet, sigara tüketimi, uzun süreli alkol tüketimi, obezite, aile öyküsü, kronik pankreatit ve geçmişte batın bölgesine radyasyon uygulamaları önem risk faktörlerindendir.

Aralarından en önemli risk faktörü olarak tanımlanabilecek olan sigara tüketimi içenlerde içmeyenlere göre 2,2 kat daha fazla pankreas kanseri riski vardır. Sigara içenlerde görülen pankreas kanserinde “fingerprint” yöntemi ile sigara içmeyenlere kıyasla daha fazla mutasyon saptanmıştır [9].

Sigara içerisinde yer alan N-nitrozaminlerin ve çeşitli metabolitlerinin pankreas üzerinde karsinojenik etkileri yer almaktadır. N-nitrozaminlerin oluşturduğu metabolitlerin hücre içerisinde DNA kırıklarına yol açarak K-ras mutasyonuna neden olduğu, ayrıca kanser oluşumunda anjiyogenezde rol oynayan siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin aktivitesini arttırdığı bilinmektedir [10] [11].

Pankreas kanseri riski, yaş ilerledikçe artar. Pankreas kanser neredeyse 45 yaş ve üzerindeki hastalarda görülmektedir. Kimyasal karsinojenler olarak bilinen bireylerin çalışma ortamlarında fazla maruz kaldığı benzin, metalurjik kokular ve böcek ilaçlarında pankreas kanseri riskini arttırdığına dair kanıtlar yer almaktadır. Bunun yanı sıra nikelin, artan DNA metilasyonuna neden olduğu ve buna bağlı olarak DNA onarımını inhibe ettiği ve reaktif oksijen üretimi yoluyla apoptozu indüklediği belirtilmektedir. Ek olarak az sayıda çalışma olmasına rağmen kadmiyuma ve arsenik metallerine maruz kalındığında pankreas kanseri riskini ve ölüm oranı arasında bir

bağlantı bulunmaktadır. Kadmiyum, insan pankreasında birikerek farklı karsinogenez basamaklarına etki ederek DNA onarımını önleyen ve genomik instabiliteye neden olan bir karsinojendir [4].

Coğrafik konum ele alındığında, Afrikalı Amerikalıların pankreas kanseri görülme sıklığı beyazlardan biraz daha fazladır. Bunun nedenleri kesin bilinmemekle birlikte kısmen, diyabet, sigara ve aşırı kiloluk gibi pankreas kanseri için diğer bazı risk faktörleriyle ilişkilendirilebilir [12] [13].

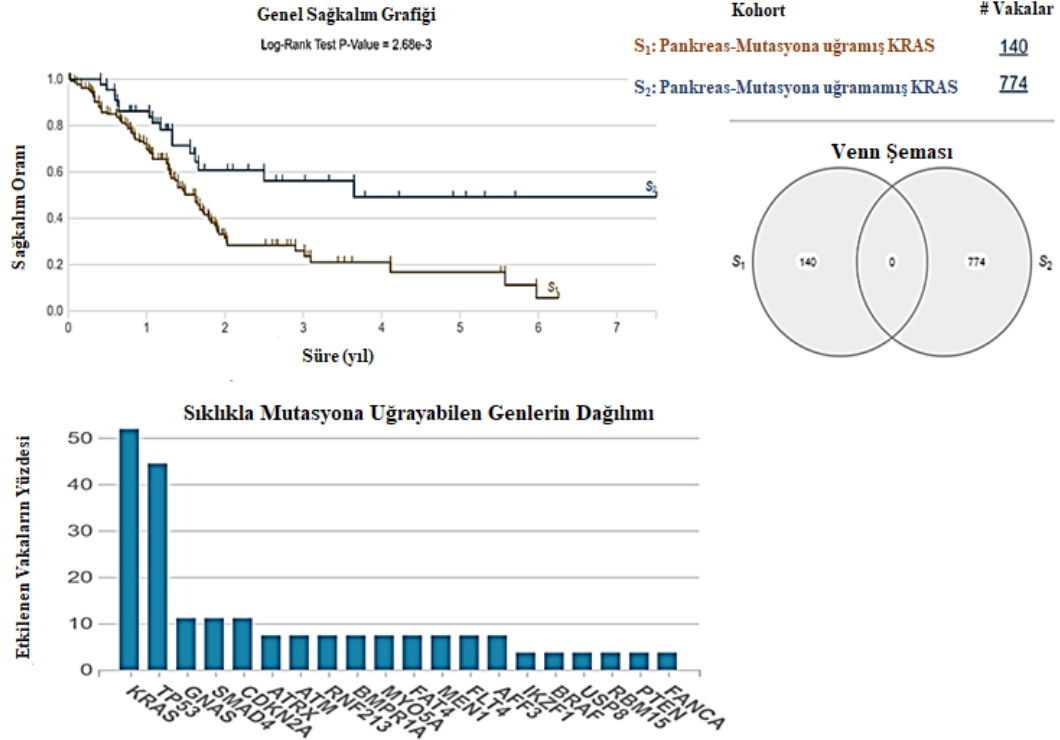
Pankreasın uzun süreli iltihaplanması olarak bilinen kronik pankreatit (KrP), ekzokrin ve endokrin glandüler pankreatik parankimde, ilerleyici ve geri dönüşümsüz hasara neden olan ve fibrozisle sonuçlanan bir süreçtir. Kronik pankreatit, sıklıkla alkol kullanımı ve sigara kullanımıyla birlikte görülür. Sigara; pankreatik bikarbonat sekresyonunu inhibe ederek doku iskemisini indükler. Tütün ürünlerinin detoksifikasyonunda rol oynayan üridin 5-difosfat glukroniltransferaz (UGT1A7) gen polimorfizmi olan sigara içicilerde KrP daha sık görülmektedir [14]. Kronik pankreatit, pankreas kanseri riskini kronik pankreatit olmayanlara göre 2,71 kat daha fazla artırmaktadır.

Pankreas kanserinin %5-10'u ailesel öyküye dayanmakta olup kalıtsal genetik mutasyonlar ebeveynden çocuğa geçebilmektedir. Aile içerisinde etkilenen bireylerin sayısına bağlı olarak risk 4,46-32 kat artmaktadır [15]. Pankreas kanserine neden olabilecek genetik hastalıklar aşağıdaki gibidir (Şekil 2).

- **BRCA1 ve BRCA2** genlerindeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal prostat, meme ve yumurtalık kanserine neden olurken pankreas kanseri riskinde arttırmaktadır [16]. **BRCA1** veya **BRCA2** germline mutasyonlarının taşıyıcıları, pankreas kanseri riskinin arttırırken, **BRCA2** mutasyonu taşıyıcıları için risk daha fazladır [17].
- **PALB2** geninde meydana gelen mutasyon ailesel pankreas kanseri türlerinin %1-3'ünde bildirilmiştir. **PALB2** genindeki mutasyonlar kalıtsal meme kanserine neden olurken her pankreas kanseri hastalarında germline **PALB2** mutasyonu olduğu tespit edilmemiştir ancak **BRCA2** mutasyonu ile ortak olduğu saptanmıştır [18] [19].

- **p16/CDKN2A** genindeki mutasyonların neden olduğu **ailesel atipik multipl mol melanom (FAMMM)** sendromu, cilt ve göz melanomları ile ilişkilidir. **CDKN2A** geninde mutasyonla doğan bireyler, 38 kat artmış pankreas kanseri riskine sahip olup bu mutasyona sahip bireylerin %50 si pankreas kanserine yakalanmaktadır [20] [21].
- **Kalıtsal pankreatit**, Katyonik tripsinojen genindeki (**PRSS1**) mutasyonlar, otozomal dominant iken, serin proteaz inhibitör genindeki (**SPINK1**) mutasyonlar otozomal resesif formudur. Bu mutasyonlar pankreas kanseri riskini arttırmaktadır.
- DNA tamir genlerinde (**MLH1** veya **MSH2**) bir mutasyonun neden olduğu kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser (HNPCC) olarak da bilinen **Lynch sendromu**, pankreas kanseri insidansının gözlendiğı otozomal dominant bir hastalıktır [22].
- Hücre çoğalması ve polaritesinin düzenlenmesinde rol alan **STK11/LKB1** genindeki meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan **Peutz-Jeghers sendromu**, otozomal dominant bir hastalıktır [23]. Sindirim sistemindeki poliplerle ve diğerk bazı kanserlerle de bağlantılıdır. Bu hastaların pankreas kanserine yakalanma riski 132 kat fazladır [24].

Bugüne kadar yayınlanmış çalışmalar, şaşırtıcı şekilde özellikle solunum yolları alerjisi olmak üzere alerji görülen bireylerde pankreas kanseri riskinde bir azalma olduğunu göstermiştir [25].



Şekil 2 Pankreas kanserine sebep olan genetik mutasyonlar ve sağkalım oranlarının incelenmesi (yeniden düzenlenmiştir) [26].

1.2.1. Pankreas Kanseri ve Obezite İlişkisi

Pankreas kanserine neden olabilecek faktörler arasında yer alan beslenme alışkanlığı son derece kritik öneme sahiptir. Yüksek yağlı, yüksek karbonhidratlı, çok fazla kırmızı ve işlenmiş et (sosis ve domuz pastırması gibi) tüketimi obeziteyi ve lipogenezi tetiklerken pankreas kanseri riskini de arttırmaktadır. Lifli, meyve ve sebze tüketiminin ise pankreas kanseri riskini düşürdüğü ifade edilmekte olup beslenme alışkanlıklarıyla ilişkisi belirsizliğini devam ettirmektedir [12]. Ancak son yıllarda lipogenezin çoklu doymamış yağ asitleri ve oruç ile inhibe etmekte ve bu etkilere kısmen lipogenezi inhibe eden (büyüme hormonu, leptin) veya uyaran (insülin) hormonlar aracılık etmektedir. SREBP-1'in, çeşitli hormonların ve besin maddelerinin pro- veya anti-lipojenik etkisinde kritik bir ara madde olduğunu göstermiştir. bir başka transkripsiyon faktörü, PPAR- γ 'dır. Her iki transkripsiyon faktörü, hipertrigliseridemi ve obezite gibi bozuklukların düzenlenmesinde moleküler hedeflerdir [27].

Son birkaç yılda, artmış vücut kitle indeksinin (BKİ veya BMI), pankreas kanseri gelişme riskindeki artışla ilişkili olduğu ortaya koyulmuş olup diyabet hastalığından bağımlı veya bağımsız bir şekilde gelişebilmektedir. 12 kohort çalışmasından ve bir vaka kontrol çalışmasından elde edilen verilerin analizi, pankreas kanseri riskinin BMI> 35 olan bireylerde 18,9 olan BMI> 35 olanlara göre 1,55 kat (%95 CI = 1,16 – 2,07) daha yüksek olduğu gösterilmiştir [28]. BMI'si yüksek olan hastalarda önemli kilo kaybının pancreas kanseri riskini azaltacağı ifade edilmektedir. Aynı zamanda Fiziksel aktivite, pankreas kanseri riskini %55 oranında azalttığı görülmüştür [8].

1.3. Pankreas Kanseri Terapi Modelleri

Kanserin türüne, evresine ve diğer faktörlere bağlı olarak, pankreas kanseri olan bireyler için tedavi seçenekleri; cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi olup, malignite aşamalarına bağlı olarak bu yöntemler tek başlarına ya da birlikte kullanılmaktadır.

Cerrahi yöntemlerde, muayene ve testlerin sonuçları tüm kanseri ortadan kaldırmak (rezeke etmek) hedeflendiğinden potansiyel olarak küratif cerrahi uygulanırken; testler kanserin tamamen alınamayacak durumda olduğunu gösterdiğinde palyatif cerrahi yapılabilmektedir. Bu ameliyat semptomları hafifletmek ve tıkalı bir safra kanalı veya bağırsak gibi bazı komplikasyonları önlemek için yapılmaktadır [29].

Pankreas kanseri tedavisinde en sık kullanılan radyasyon türü dış ışın radyasyon tedavisi olup, vücudun dışındaki bir kaynaktan gelen radyasyon kansere odaklanmaktadır. Tümörü küçültmek ve tamamen çıkarılmasını kolaylaştırmak için ameliyattan önce (neoadjuvan tedavi) kemoterapi ile birlikte radyasyon verilebilir veya kanserin yeniden oluşma olasılığını azaltmak için ameliyattan sonra (adjuvan tedavi) radyasyon verilebilir. Bazı durumlarda radyasyon, kemoterapinin birlikte verildiği kemoradyasyon uygulaması sağlanır.

- Neoadjuvan ve adjuvant terapi de, ileri metastatik pankreas kanserinde kemoterapi uygulamaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Damar içine enjekte edilen veya ağız yoluyla alınan bir anti-kanser ilacı olup kan dolaşımına girer ve vücudun hemen hemen tüm bölgelerine ulaşır.
- Gemcitabine (Gemzar)

- 5-florourasil (5-FU) veya Kapesitabin (Xeloda)
- Oksaliplatin (Eloxatin)
- Albumin bağılı paklitaksel (Abraxane)
- Kapesitabin (Xeloda)
- Cisplatin
- İrinotekan (Camptosar)

En yaygın kullanılan kemoterapi ajanlarıdır [30].

Hedefe yönelik geliştirilen Erlotinib (Tarceva), hücrelerin büyümesine yardımcı olan *EGFR* adlı kanser hücrelerinde bir proteini hedef alan bir ilaçtır. Gemsitabin ile birlikte kullanımının istatistiksel olarak önemli yaşamsal yarar gösterdiği belirtilmiştir [31].

Son zamanlarda immunoterapinin kanser gelişimini azaltıcı etkisi tartışılmaktadır. PD-1 inhibitörü olarak bilinen Pembrolizumab (Keytruda), normalde bu hücrelerin vücuttaki normal hücrelere saldırmasını önleyen T hücreleri adı verilen bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bir kontrol noktası proteini olan PD-1'i hedefleyen bir ilaçtır. PD-1'i bloke ederek, bu ilaç pankreas kanseri hücrelerine karşı bağışıklık tepkisini artırır ve tümörün küçülmesi hedeflenmektedir [32].

Gelecek yeni tedavilerin geliştirilmesinde, pankreas kanserinin genetiği ve moleküler biyolojisinin anlaşılmasında kayda değer bir ilerleme olduğu için son umut verici olup pankreas kanserlerinin büyük çoğunluğunda *KRAS* geninin mutasyona uğradığı saptanmış olup *KRAS* proteinini hedef alan inhibitörler, büyük ölçüde başarısız olmuştur. Daha yeni stratejiler MEK, ERK ve AKT gibi alt sinyal yollarını hedeflemeye odaklanılmıştır [33] [34].

1.4. Pankreas Kanseri Oluşumu ve Tedavisinde Temel Moleküler Mekanizmalar

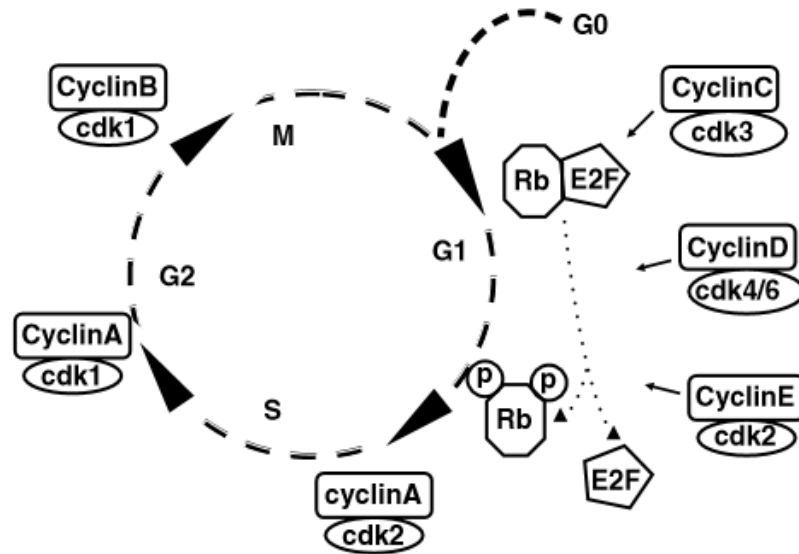
1.4.1. Hücre Döngüsü

Hücresinin bölünerek iki yavru hücre oluşturması ve her yavru hücrenin iki yavru hücre meydana getirmesi şeklinde devam eden hücre çoğalması siklik form gösterir. Bu süreç G1, S ve G2 interfaz evreleri ve M (mitoz) evresinde yer alan profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarını içermektedir [35]. [36].

Hücrelerin çoğu olgun evrede olup uyku hali olarak adlandırılan (G0) hücre bölünme evresinde değildir [37]. G0 fazında yer alan belli bir hacme ve sayıya ulaşmış hücreler büyüme faktörleri veya mitojenler ile indüklenerek hücre devrine geçişleri sağlanır. Hücrelerin, hücre devrinin farklı fazlarından geçişleri siklinler adı verilen proteinler tarafından koordine edilerek sikline bağımlı kinazlarla (CDK) beraber işlev yaparlar. Siklinler, kendi CDK'larının katalitik alt ünitesine bağlanarak konformasyonel değişikliğine yol açtığından aktif formları oluşur. Böylece serin/treonin olarak bilinen bu kinazlar fosforilasyonları ile hücre devrinin düzenli bir şekilde ilerleyişi sağlanır [38].

G1 fazına geçişte, siklin D ve CDK4/6 birlikte rol oynar. Hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. RNA ve protein sentezi olur. Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır ve böylece Siklin E ekspresyonu artış göstererek G1 den S fazına geçiş sağlanmaktadır. Siklin A-CDK2 S fazı için önemlidir. Hücreler DNA sentezinden sonra G2 fazına girerek Siklin B-cdk1 kompleksinin aktivitesi artar böylece mitozu giriş sağlar. Siklin B-cdk1 kompleksi mitozu ilerleten faktör (MPF) olarak da ifade edilmektedir. Geç S fazında siklin B sentezlenmeye başlar ve sentez mitoz boyunca devam eder, mitoz tamamlandığında siklin B düzeyi hızla düşer. Hücre devrinde fazlara geçişte kontrol noktaları son derece kritik rol oynamakta olup DNA hasarına veya yanlış replike olma durumlarında cevap mekanizması geliştirerek hücre devrinin tutulu kalmasına ve onarılmadığı takdirde apoptoz emri verilmektedir [39]. Bu süreçte rol alan tumor baskılayıcı genlerden Retinoblastoma (*Rb*) ve *TP53* geni son derece önemlidir [38].

Herhangi bir kontrol noktasında hasarlı DNA tespit edilirse, kontrol noktasının aktivasyonu protein *p53* üretiminin artmasını teşvik ederek hücre döngüsünün tutulu kalmasını ve böylece hasarlı DNA için onarım mekanizmalarını başlatır. Aksi takdirde DNA onarılamazsa, hücrenin apoptoza girmesini ve hücre çoğalmasını önler [42]. Bu sebeple kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasında hücre devri moleküllerini hedef alan terapötik stratejiler kritik önem taşımaktadır [43].



1.5. Doğal Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri

10

p19'dan oluşan INK4 ailesidir. INK4 proteinleri, CDK4 ve CDK6 bileşenleri ile etkileşerek siklin D komplekslerini spesifik olarak inhibe eder ve Rb proteinin fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsünü G1 fazında durdurur [41]. KIP ailesi inhibitörleri hem siklinlerle hemde onların ilişkide olduğu CDKlarla ilişki kurarlar. Böylece G1/S geçişte rol alan CDK2-Siklin E ile ATP bağlanan yeri bloke ederek kinaz aktivitesini engellemiş olurlar [38] [45]. p21 ifadesi, *TP53* tümör baskılayıcı geninin transkripsiyonel kontrolü altında olup aynı zamanda p21 çoğalan hücre nükleer antijenine (PCNA) bağlanarak DNA hasarına karşı bir yanıt mekanizması oluşturarak DNA sentezini inhibe eder [37] [37].

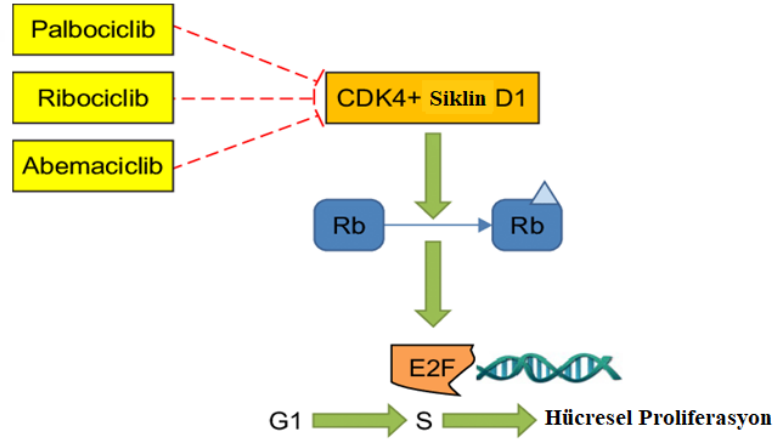
1.5.1. Palbociclib ve Abemaciclib

Hücre döngüsünün düzensizliği, yüksek metastatik potansiyeli olan kanser hücrelerinde sınırsız çoğalmaya neden olduğundan sikline bağımlı kinazları hedefleyen yeni ajanlar yeni tedavi yöntemleri için ilgi çekici bir seçenek olmuştur. Bunlar arasında palbociclib (PD-0332991) piyasadaki adı Ibrance olup oral yolla alınabilen spesifik olarak CDK4/6 inhibitörü olarak bilinmektedir [46]. Farmosötik özelliği ele alındığında piridopirimidin bileşikler tarafından geliştirilmiştir. hücre çoğalmasını G1 fazında tutulu kalmasını sağlayarak ve Rb 'nın fosforilasyonunu engelleyerek DNA sentezini baskılar (Şekil 4) [47] [46]. Aksi durumda mitojenlerin etkisiyle sağ kalımı tetikleyen PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ile ilişkili CDK4/6 aktivitesindeki artış tümör agresifliği ile doğrudan ilişkilidir [48] [49].

Palbociclib, daha çok menopoz sonrası kadınlarda görülen östrojen reseptörü (ER) pozitif/HER2 negatif ileri meme kanseri tedavisinde kullanılan bir ilaç olup letrozol (bir aromataz inhibitörü) veya selektif östrojen reseptör modulatorlerinden Fulvestrant ve tamoksifen gibi ilaçların kombinasyonu halinde etkinliği artırılır [50] [51]. İn vivo olarak, meme kanseri ksenogreflerinde önemli ölçüde antitümör aktivitesini baskılandığı gösterilmiştir. Meme kanseri dışında ilerlemiş solid tümörlerde Hodgkin dışı lenfoma, multiple miyelom, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda, çocuklarda görülen akut lenfoblastik lösemide, akciğer, pankreatik ve metastatik kolorektal kanserli hastalarda palbociclib çeşitli Kombine terapilerle klinik çalışmalarda yer aldığı ve başarılar elde edildiği ifade edilmiştir [52].

Bir diğer CDK4/6 inhibitörü olan abemaciclib (LY2835219) piyasada Verzenio isimiyle bilinmekte olup oral yolla alınabilen spesifik olarak CDK4 ve 6'yı inhibe ederek erken G1'de retinoblastoma (Rb) protein fosforilasyonunu inhibe ederek CDK aracılı G1-S faz geçişini önlemektedir [53]. Böylece kanser hücresinin çoğalmasını inhibe etmektedir. CDK4 ve CDK6'nın yanı sıra, gen transkripsiyonunu, embriyogenezi ve hücrel çoğalmayı düzenleyen CDK9'u hedefleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. HR - pozitif, HER2-negatif endokrin tedavilere direnç gösteren metastatik meme kanseri hastalarında tek başına veya kombine terapi halinde verilerek başarılı sonuçlar elde edilmiştir [54]. Meme kanseri tedavisinin yanı sıra melanom, lenfoma, neoplazm, solid tümör ve glioblastom tedavisini inceleyen çalışmalarda da kullanılmıştır [55].

Abemaciclib, palbociclib aktivitesiyle karşılaştırıldığında tümör hacmi regresyonunun %70'ini doza bağımlı şekilde uygulandığında güçlü antitümör aktivitesi göstermektedir. Ayrıca Abemaciclib, palbociclib'e kıyasla kan-beyin bariyerinden olası geçişi sağlamıştır [51].



Şekil 4 CDK4/6 inhibitörlerinin etki mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [54].

1.6. Hücre Yaşlanması

Hücresel yaşlanma, potansiyel olarak onkojenik strese maruz kalmış hücrelerde meydana gelen esasen geri dönüşümsüz hücre proliferasyonunun tutulu kalmasını ifade etmektedir. Bundan 35 yıl önce Leonard Hayflick ve Paul Moorhead, normal insan fibroblastlarının belli sayıda hücre bölünmesinin ardından gelişme ve bölünme yeteneklerini yitirdiğini (proliferasyon sonu ya da Hayflick Limiti), ancak metabolik olarak aktif kaldığını en sonunda ölüme gittiklerini gözlemlemişlerdir [56] [57].

Hücresel yaşlanmanın moleküler mekanizması ele alındığında lineer kromozomların uçlarını kapatan DNA-protein yapıları olan telomerler, her hücre bölünmesiyle kısalır, Bu kısalık kritik bir noktaya ulaştıkça ve korunabilirse hücre bölünmesi tutulu kalarak yaşlanma başlar. Oksidatif stres, DNA hasarı ve bazı onkogenlerin aktivasyonu ile uyarılan p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, p27 gibi CDK'ler ile p53 ve RB gibi tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesiyle birlikte CDK oluşumu engellenir G0 ya da G1'den S fazına geçişi durdurulur.[57] [58]. Böylece, yaşlanma benign tümör lezyonlarından malign tümörlere ilerlemeyi engelleyen fizyolojik bir tümör baskılayıcı mekanizma gelişir [58].

Yaşlanmış hücreler hacimsel olarak iki katına çıkarak genişler ve düz bir morfolojiye sahip olurlar. Bu değişiklikler, yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) olarak adlandırılan bir özellik olan çok sayıda proinflatuar sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve proteazın salgılanmasını içermektedir. SASP, hem kanserin gelişiminde hem de yaralanma karşısında doku onarımını veya rejenerasyonu destekleyen parakrin aktiviteye sahiptir [56] [58]. Ayrıca Yaşlanma ile ilişkili beta-galaktosidaz, hücresel yaşlanmanın bir biyobelirteci olup, yaşlanmış hücrelerde pH 6 da endojen lizozomal beta-galaktosidaz birikimi ve aşırı ekspresyonu ile karakterizedir [58].

1.7. PI3K/ AKT/ mTOR

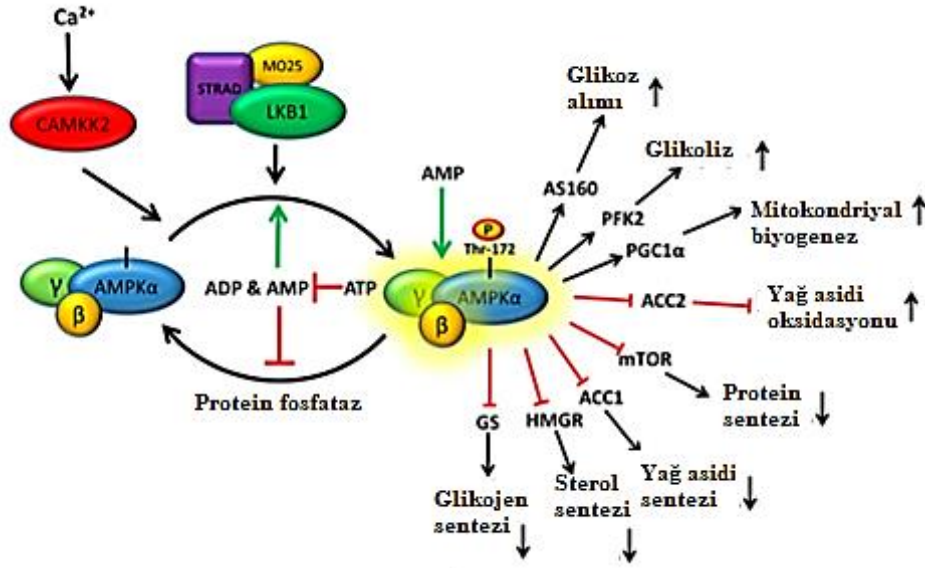
PI3K (Fosfatidilinositol-3-kinaz) hem G proteini bağı reseptör (GPCR) hem de reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar) tarafından aktive edilmektedir. Otofosforile olan reseptör PI3K 'in alt birimi olan p85 ve p110 proteinini aktifleştirerek sinyalizasyonu başlatır. p85, insülin reseptör substratları (IRS1,2) tarafından indirekt olarak da aktive edilebilir veya RAS aktivasyonu da PI3K'da dolaylı bir aktivasyonuna neden olabilir. Sonrasında fosfatidilinositol-4,5- bifosfat (PIP2)'ı fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3)'a dönüştür. fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) tarafından ise PIP3 defosforile edilerek zıt yönde düzenlenir. fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından AKT (protein kinaz B) treonin308 amino asitinden fosforile olarak aktifleşmesini sağlar. Bu kaskat, AKT proteininin mTORC2 tarafından doğrudan serin473 den fosforile olmasıyla da gerçekleşir [59]. AKT'ın alt sinyal yolağı efektörlerinden en önemlisi mTOR (Rapamisin'in memeli hedefi)'dir. AKT, mTOR'u tüberoz skleroz 2 (TSC2)'nin doğrudan fosforilasyonu veya AMPK'nın inhibisyonu ile aktive edilmektedir. p-AKT, TSC1 ve TSC2 kompleksini içeren protein dimerinin, büyümeyi baskılayıcı etkilerini engelleyerek RAS homoloğu Rheb'in mTOR'u aktive etmesine neden olmaktadır. Rheb, Ras'a benzer bir yapı gösteren GTP hidrolizleyebilen özelliği sayesinde hücre büyümesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan önemli bir hücre membran proteinidir. Fosforile edilmiş mTORC1, aşağı sinyal iletim efektörleri; ökaryotik translasyon başlama faktörü supresörü (4EBP1) ve p70S6 kinaz (S6K) aracılığıyla hücre büyümesini, hücre siklusu devamlılığını ve hücre metabolizması için gerekli proteinlerin translasyonunu sağlamaktadır (Şekil 5) [60] [61].

Kanser hücrelerindeki üçüncü tip yakıt kaynağını oluşturan ve asetil-CoA üretimine bağlı olarak trikarboksilik asit/Krebs (TCA) döngüsüne katılan yağ asitleri tümör genezi tetiklediği bilinmektedir. TCA döngüsü, hücrelerde oksidatif fosforilasyon için merkezi rol oynayan biyoenerji, biosentetik ve redoks dengesini sağlamaktadır. Yağ asidi sentezi için gerekli olan asetil-CoA'lar mitokondride oluşmakta olup sentezi sitoplazmada gerçekleşmektedir. Bu nedenle Asetil-CoA'ların mitokondriden sitozole taşınmaları için mitokondrial Asetil CoA Sitrat Sentetaz enzimi aracılığı ile okzalasetat ile birleşerek sitrat meydana gelir. Sitrat, trikarboksilat transport sistemi aracılığı ile sitoplazmaya geçer. Sitoplazmaya transfer edilen sitrat, Sitrat Liyaz ve ATP harcanması ile yeniden okzalasetat ve Asetil CoA ya ayrılmaktadır. Sitoplazmaya gelen Asetil CoA yağ asidi sentezine (FASN) katılır. Sitoplazmadaki okzalasetat ise Malat Dehidrogenaz enzimiyle malata dönüşerek dikarboksilat transport sistemi aracılığı ile tekrar mitokondri içerisine taşınır. Taşınan malat, okzalasetata dönüşerek döngü tamamlanmış olur. Yağ asidi sentezi malonil CoA ile başlamaktadır. Malonil CoA ise asetil CoA dan sentezlenmektedir. Asetil-CoA, hem yağ asidi sentez yolu hem de TCA döngüsü için substrattır (Şekil 6) [66].

AMPK, rapamisin kompleksinin (mTORC) memeli hedefinin aktivitesini azaltarak transkripsiyon faktörü sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1c (SREBP1c) ekspresyonunu baskılayarak, inhibe formları ACC1^{Ser79} ve ACC2^{Ser212} fosforilasyonunu teşvik ederek FASN ekspresyonunu azaltır böylece lipid sentezini inhibe eder [64] [67].

Hem lipid homeostazında fosfatidik asit (PA) ve diaçilgliserol (DAG) seviyesini kontrol eden enzim olarak hem de lipid metabolizması enzimlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu kontrol eden protein olarak fonksiyon gösteren Lipin-1, en fazla adipoz doku ve iskelet kasında eksprese olur [68].

Adipojenik farklılaşma, glikoz homeostazında anahtar rol oynadığı, kanser hücrelerinin farklılaşmasında ve poliferasyonunda kilit rol oynadığı bilinen peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör gamma (PPAR- γ) ile etkileşimde olduğu bilinmektedir. PPAR- γ ekspresyonu meme kanseri, prostat kanseri, glioblastom hücre hatlarında, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, yumurtalık kanseri ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli insan kanseri tiplerinde tanımlanmıştır [69]. AMPK'nın karaciğer kanseri hücrelerinde PPAR- γ ekspresyonunu inhibe ederek yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [70].



Şekil 6 AMPK sinyalizasyon mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [65].

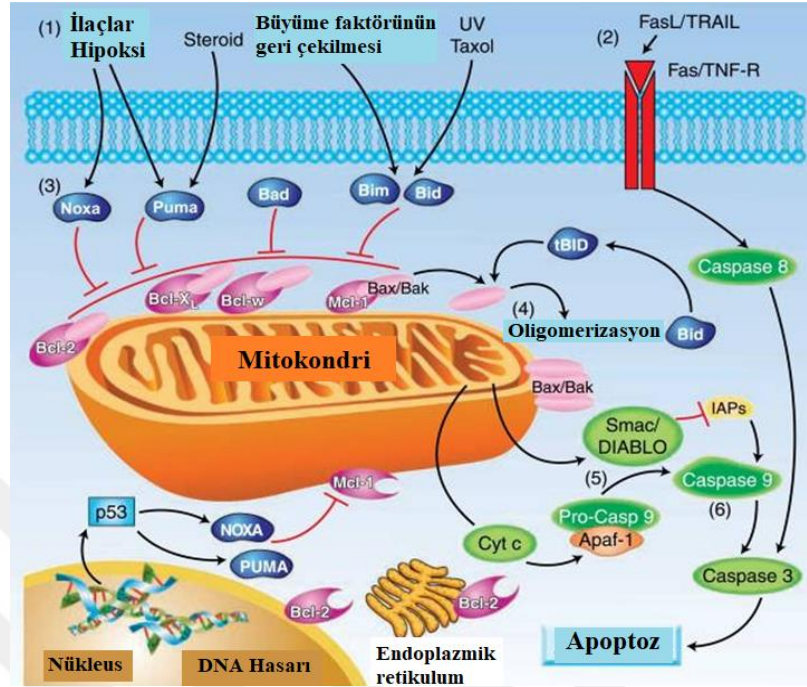
1.9. Apoptoz

Hücrelerde apoptoz gerçekleşirken hücre dışında ölüm faktörleri adı verilen sinyali alır veya DNA hasarı ya da oksidatif stres gibi içsel fiziksel/kimyasal etkenler tarafından indüklenir. Apoptoz mekanizması intrinsik (içsel yolak) ve ekstrinsik (dışsal yolak) olmak üzere aktive olabilir. [71]

1.9.1. Mitokondri/ Sitokrom C Aracılı Hücre Ölümü (İntrinsik Yolak)

Bu hücre ölüm yolağı dışarıdan gelen uyartılara (FAS, TNF) duyarlı değildir. DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyartı, apoptozun intrinsik yolağını mitokondrinin dış membranına etki eden Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla indüklemektedir [72].

Bcl-2 transmembran bir bölgeye sahiptir ve mitokodri dış zarı, nükleus zarı ve endoplazmik retikulum zarında yer almaktadır. Bcl-2 her ne kadar apoptozu baskılıyor ise de bu protein ile ilişkili bazı diğer proteinler apoptozu desteklemektedir. Bid ve Bim BH3 proteinleri Bax ve Bak proteinlerinin aktivasyonunu ve böylece bu proteinlerin sitoplazmadan mitokondrinin dış membranına translokasyonunu indüklerler. Bax ve Bak proteinleri burada transmembran por oluşturur ve membranın yapısını bozarak sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını sağlar. Bunu takiben mitokondriden sitokrom c, prokaspaz 9 ve Smac/DIABLO sitoplazmaya salınır. Sitozole sitokrom c ve prokaspaz 9 Apaf-1 adaptör proteinine bağlanarak apoptozom kompleksini oluştururlar. Kaspazlar sisteince zengin aspartat proteazlardır. Bunlar prokaspazlar adı verilen inaktif enzimler olarak sentez edilirler ve aktif olabilmeleri için aspartat residüsünde kesilmeleri gerekir. Apoptozomda prokaspaz 9 aktif formu olan kaspaz 9'a dönüşerek kaspaz kaskadını başlatır ve kaspaz 3, 6 ve 7 efektör kaspazlarının aktivasyonu sonucunda apoptoz meydana gelir. sitozole salınan Smac/DIABLO, antiapoptotik protein apoptoz proteinleri inhibitör (IAP)'lerinden X-kromozoma bağlı apoptoz protein inhibitörü (XIAP) ile interaksiyona girer. Bu sayede XIAP kaspaz 9, 3 ve 7'yi inhibe edemez ve apoptoz gerçekleşir [73]. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (Şekil 7).



Şekil 7 Ekstrinsik ve intrinsik ölüm sinyal yolları (yeniden düzenlenmiştir) [74].

1.9.2. Ölüm Sinyalleri Aracılığı İle Hücre Ölümü (Ekstrinsik Yolak)

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Böylece reseptörler konformasyonel değişikliğe uğrayarak oligomerize olur. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid kesilime uğrayarak dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder ve böylece her iki yolda da kaspaz kaskadı oluşarak aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur ve apoptoz gerçekleşir [71] [75]

1.10. Amaç

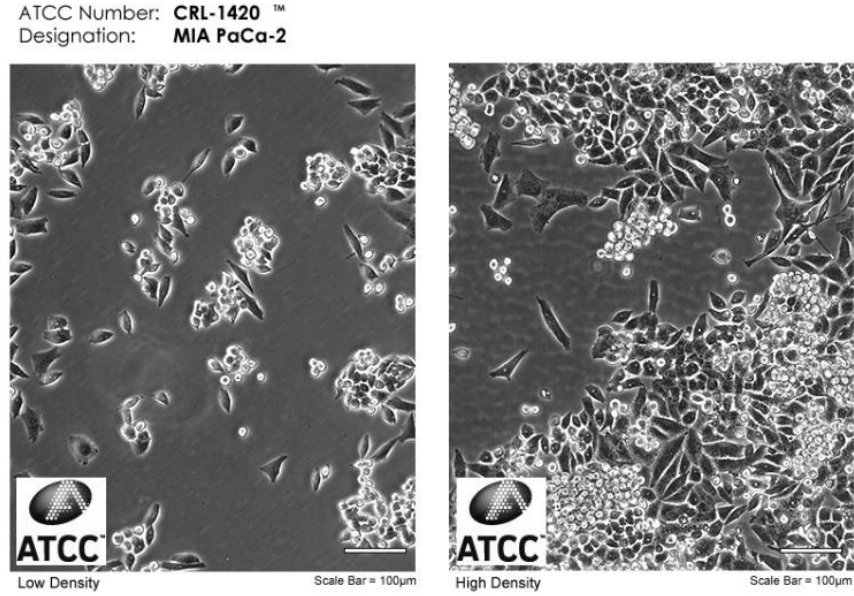
Farklı genomik ve biyolojik özellikleri açısından önemli bir inceleme modeli olarak değerlendirilebilecek pankreas kanseri hücre hatlarında (MIA PaCa-2 ve Capan-2) CDK4/6 inhibitörü olarak bilinen palbociclib ve abemaciclib'in ortak veya farklı terapötik hedeflerinin tanımlanması amaçlanmış olup, AMPK ilişkili alt ve üst sinyal yollarında görülen değişimlerin lipid metabolizması, hücre sağkalımı ve ölümü üzerine etkileri modellenecektir. Böylece CDK4/6 inhibisyonuna doğrudan bağlı olmayan etkilerin farklı yollar üzerindeki etkileşimlerin gösterilmesi mümkün olabilecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri

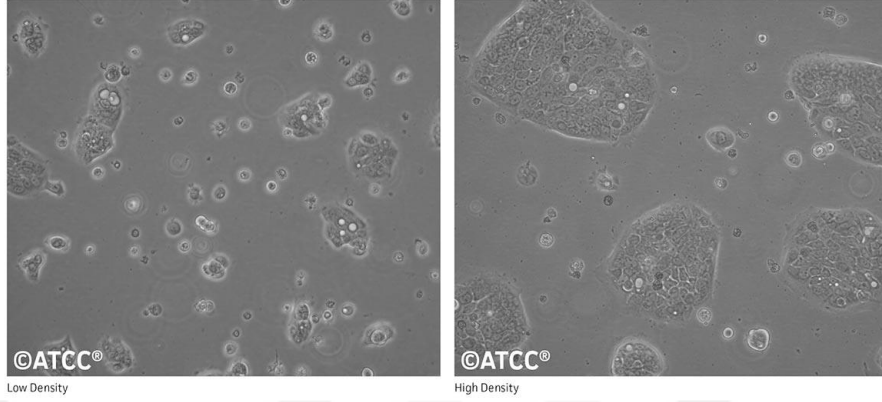
MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420), insan pankreas karsinom hücre hattı olup 1975 yılında 65 yaşındaki Kafkas erkeğin pankreas tümör dokusundan elde edilmiştir. Doğal tip SMAD4 genine, mutant *KRAS* 'a (12 Cys^{101, 107, 110, 128}), mutant *TP53*'e (248 Trp^{101, 107, 108, 110}) ve *CDKN2A/p16*'nın homozigot delesyonuna sahip olan MIA PaCa-2 hücre hattı son derece metastatik özelliğe sahiptir. Kullanılan cihazlar Ek A bölümünde yer almaktadır (Şekil 8).



Şekil 8 MIA PaCa-2 hücre hattı [76]

Capan-2 (ATCC HTB-80), insan pankreas duktal adenokarsinoma hücre hattı olup 1975 yılında 56 yaşındaki Kafkas bir erkeğin primer tümöründen elde edilmiştir. Doğal tip *TP53* genine ve normal seviyede SMAD4 protein ifadesine sahip olup mutant *KRAS*'ı (12 Val^{88, 101, 114}) ve yüksek seviyede Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) ifadesine sahiptir (Şekil 9).

ATCC Number: HTB-80
Designation: Capan-2



Şekil 9 Capan-2 hücre hattı [77]

2.1.2 Cihazlar

Kullanılan cihazlar EK A bölümünde yer almaktadır.

2.1.3 Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler Ek B bölümünde yer almaktadır.

2.1.4 Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar Ek C bölümünde yer almaktadır.

2.1.5 Çözeltiler

Kullanılan çözeltiler ve içerikleri Ek D bölümünde yer almaktadır.

2.2 Yöntemler

2.2.1 Hücre Kültürü

Yapılan çalışmada MIA PaCa-2 (ATCC CRL-1420) ve Capan-2 (ATCC HTB-80) pankreas kanseri hücre hatları DMEM besiyerine, %10 fetal sıgır serumu (FBS), 10 U/ml penisilin/streptomisin eklenerek 0,22 μ M por ϕ apına sahip şırınga filtre sisteminden geçirilerek hazırlanmış ve hücrelere uygulanmıştır. Hazırlanmış olan hücreler 37°C' de, %95 nem içeren %5 CO₂ bulunan atmosfer ortamında inkübe edilmiştir. Hücrelerin proliferasyonu, pasajlanmaları ve takip işlemleri ters bakışlı mikroskop ile izlenmiş olup besiyeri her 2-3 günde bir hücre durumlarına bağlı olarak değiştirilmiştir.

2.2.2 Hücrelerin Dondurulması

Petrilerde yüzeye yapışarak çoğalmış olan hücreler 1 ml tripsin-EDTA yardımıyla hücrelerin yapıştıkları yüzeyden enzimatik olarak kaldırılması sağlanmıştır. Tripsin-EDTA aktivitesi, kullanılan tripsin-EDTA kadar 1 ml besiyeri ile inhibe edildikten sonra 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Besiyeri ile pipetaj yapılan hücreler süspansiyon halde olup Neubauer hemositometresi yardımıyla sayımları yapılmıştır. Hücreler sayıldıktan sonra krio tüplere 9:1 oranında hazırlanmış olan FBS-DMSO içeren dondurma besiyeri ile karıştırılarak konmuştur. Düşük pasaj numarasına sahip hücrelerin saklanması amacıyla gerçekleştirilen dondurma yöntemi, önce -80°C buzdolabında sonrasında daha uzun süre saklamak için -196°C sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir.

2.2.3 Hücre Açılması

İki yöntem bulunmakta olup her iki yöntemden de yararlanılmıştır. Birinci yöntem; -80°C krio tüpler içerisinde bulunan FBS-DMSO içeren besiyeri ile dondurulmuş olan hücre hatları çabuk bir şekilde çözündürülerek ve besiyeri eklenerek hücreler santrifüj tüplerine alınmıştır. 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. DMSO'ün hücre canlılığına olan negatif etkisi azaltılmaya çalışılmıştır. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır ve besiyeri ile pellet çözölmüştür. Kullanılacak olan 25 cm² 'lik petrilere 3 ml besiyeri veya 75 cm² 'lik petrilere 5 ml besiyeri konularak hücre sayımından sonra hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. İkinci yöntem; petrilere besiyeri eklenmiştir. Krio içerisinde bulunan FBS-DMSO içeren besiyeri ile muamele edilmiş hücreler direkt olarak petrilere aktarılmıştır. Petriler etüve konulmuştur. Hücreler yüzeyi kaplayana kadar 2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir.

2.2.4 Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)

Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücrelerde artan dehidrojenaz enzimi ile MTT ayrırıcının (sarı) tetrazolyum halkasını parçalayarak formazan tuzu (mor) üretmesi sonucu görülen renk değişiminin kolorimetrik yöntemle saptanması işlemine dayanmaktadır. Hücreler 96 kuyucuklu petrinin her bir kuyucuğuna homojen bir şekilde 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler petri kabına yapıştıktan sonra palbociclib ve abemaciclib (0-10 μM) artan dozlarda 24 saat boyunca muamele edilmiştir. 24 saat sonunda 10 μl MTT ayrırıcı eklenmiştir. 4 saat sonunda MTT ayrırıcı eklenmiş besiyeri hücrelerden uzaklaştırılıp, her bir kuyucuğa 100 μl DMSO eklenmiştir ve karanlıkta 5 dakika boyunca bekletildikten sonra mikropilaka okuyucuda, ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm’ de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.5 Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesinin İncelenmesi

6 kuyucuklu petri kaplarına her bir kuyuda 3×10^3 MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücre sayısı olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonunda yapışan hücrelere belirlenen dozlarda palbociclib ve abemaciclib uygulanmıştır. Besiyeri üç günde bir yenilenmiştir. On gün sonunda kolonilerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Koloni oluşumunu gösterebilmek için boyama yönteminden yararlanılmıştır. Öncelikle besiyeri uzaklaştırılmıştır. İki kez 1X PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyon için metanol/asetik asit (3:1) karışımından her bir kuyuya 1 ml konulmuştur ve 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonunda metanol/asetik asit karışımı uzaklaştırılmıştır ve hücreler 500 μl %0,5 kristal viyole ile 30 dakika boyunca boyanması sağlanmıştır. Distile su ile fazla boya kalıntıları uzaklaştırılmıştır ve boyayı alan hücreler görünür hale gelmiştir. Bio-rad Chemidoc cihazında görüntüsü alınmıştır.

2.2.6 Hücre Akış Sitometrisi Çalışmaları

2.2.6.1. Hücre Siklusunun Propidyum İyodür (PI) Boyama İle Belirlenmesi

6 kuyucuklu petri kaplarına 5×10^4 hücre olacak şekilde MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücre hatları ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 37°C’ de bir gece inkübe edilmiştir. Yapışan hücrelere belirlenen dozlarda MIA PaCa-2 için 1 μM abemaciclib ve 2 μM palbociclib, Capan-2 için 7,5 μM abemaciclib ve 7,5 μM palbociclib ilaç uygulamaları 24 saat

boyunca gerçekleştirilmiştir. Tripsinize edilen hücreler 7 gün boyunca %70 etanol içerisinde +4°C’de tutulmuştur. Etanol uzaklaştırılıp fikse olan hücreler 1X PBS içerisinde çözündürülüp 40 µg/µl PI boyası ve 20 µg/µl RNase ilave edilerek 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Akış hücre sitometrisi ile analizler gerçekleştirilmiştir.

2.2.6.2. Hücre Ölümü Analizleri: Annexin V-Propidyum İyodür (PI) Boyama İle Apoptoz Testi

Ele alınan pankreas kanseri hücreleri 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm hücre petrilere ekilmiştir. Gece boyunca yapışması beklenen hücrelere seçili doz ve zaman diliminde ilaç uygulamasını takiben uygulama yapılır. Hücreler önce 1x PBS ile yıkanarak, daha sonra tripsin uygulamasının ardından hücreler 300 g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerinden PBS atıldıktan sonra Annexin V 100 µl süspansiyon çözeltisi (10 mM HEPES, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl_2 500 ml ddH₂O içerisinde çözülür) ile karıştırılmış olup, 2’er µl Annexin V ve/veya PI eklendikten 15 dakika karanlıkta bekletildikten sonra hücre akış sitometresinde analizleri yapılmıştır.

2.2.7 Protein İfadesinin Belirlenmesi

2.2.7.1 Total Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonu için hücreler 5×10^5 hücre olacak şekilde 100 mm’lik petri kaplarına ekilmiştir. Belirlenen dozlarda abemaciclib ve palbociclib hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra kazıyıcılar ve 1X TBS yardımıyla petri yüzeyinden kaldırılmıştır. +4°C’de santrifüjleme işlemiyle hücre pelleti elde edilip, toplam protein içeriği eldesi için lizis tamponu (Ek D) içerisine alınan hücreler 20 dakika oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 20 dakika 13200 rpm’de +4°C’de santrifüjlenen örneklerin üst fazı yeni bir tüpe alınarak -80°C’de saklanmıştır.

2.2.7.2 Bradford Yöntemi İle Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5 µg/ µl olan sıgır serum albumin (BSA) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri hazırlanırken; 96 kuyucuklu petrilere iki tekrarlı olmak üzere sırası ile 1,5-3-4,5-6 ve 7,5 µg/µl BSA olacak şekilde protein standardı oluşturulmuştur. Blank kabul edilen

kuyucuklara protein standartı konulmamıştır. Elde edilen protein örneklerinden 1 µl alınarak kuyulara yerleştirilmiştir. Blank, standartların ve örneklerin yer aldığı kuyucuklara 200 µl Bradford çözeltisi eklenerek karanlıkta 5 dakika beklendikten sonra 595 nm de ELISA okuyucuda ölçümü yapılmıştır. Standartların absorbans-konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin denklemi kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları tespit edilmiştir.

2.2.7.3 SDS-PAGE Jel Hazırlanması

SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforez) proteinlerin moleküler ağırlıklarını analiz etmek için kullanılmaktadır. %4 yükleme, %12'lik ve %15'lik ayırma SDS jeli (Ek D) hazırlanmıştır. İlk kuyucukta protein belirteci olmak üzere proteinler hücre hatlarına ve ilaç dozlarına göre yüklenmiştir. Örnekler 80 voltta yürütme tamponuyla (Ek D) beraber yürütülmüştür.

2.2.7.4 Protein Örneklerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de yürütülmesi

SDS protein indirgeme (5x Laemmli) tamponu, 45 µg protein örnekleri ile 1:4 oranında karıştırılarak 95°C' de 5 dakika bekletilip, buza alınmıştır. SDS jelin İlk kuyucuğunda protein belirteci olmak üzere protein örnekleri sırasıyla hücre hatlarına ve ilaç dozlarına göre yüklenmiştir. Örnekler 80 voltta yürütme tamponuyla (Ek D) beraber yürütülmüştür.

2.2.7.5 Proteinlerin Membrana Transferi ve Bloklama

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli boyutunda kesilen ve metanol ile aktive edilen poliviniliden fluorid (PVDF) membranlar 1X transfer tamponunda (Ek D) bir süre bekletilmiştir. Hedef proteinimiz 40 kDa ve aşağısında ise genellikle 0,2 µm por büyüklüğüne sahip olan membranlar tercih edilmiş, 40 kDa ve üzerindeki proteinler için genellikle 0,45 µm por çapındaki membranlar tercih edilmiştir.

Proteinlerin membrana transferi 2 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

- **Islak Transfer Yöntemi**

Transfer işlemi, dikeyde filtre kağıtları arasına membran altta jel üste kalacak şekilde sandviç modeli oluşturulmuştur. Sandviğin dikey pozisyonda tamamen 1X transfer tamponunun içinde olacak şekilde akıma maruz bırakılmıştır.

- **Yarı-Islak Transfer Yöntemi**

Transfer işlemi, yatayda filtre kağıtları arasına membran altta jel üste kalacak şekilde sandviç modeli oluşturulmuştur ve sandviç yatayda az miktarda transfer tampon içerisinde tutularak pierceTM power blotter transfer sisteminde alınmıştır. Transfer işlemi sonrası membranlar, 1 saat oda sıcaklığına, %5' lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1X TBS) içerisinde bekletilerek bloklama yapılmıştır.

2.2.7.6 Primer ve sekonder antikorlar ile işaretleme

Bloklama işleminden sonra membranlar, belirlenen birincil antikorla (1:1000; antikor: %5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C inkübe edilmiştir. Birincil antikor işaretlemesinden sonra membranlar ikincil antikora alınmadan önce 15'er dakika 3 kez 1X TBS-T çözeltisi ile yıkanıp, birincil antikorla uyumlu ikincil antikorla (1:3000; antikor: %5 süt solüsyonu) 1 gece boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir.

2.2.7.7 Bantların görüntülenmesi

Sekonder uygulamanın ardından 15'er dakikalık TBS-T ile iki kez yıkama ve 15 dakikalık TBS ile yıkama sonrasında membranlar, kemiluminesans madde (ECL) ile karanlık oda da dakika 3 dakika boyunca muamele edildikten sonra kemiluminesans ışımlar ChemiDocTM Imaging System, Bio-Rad ile görüntülenmiştir.

2.2.7.8 PathScan® Sandwich ELISA Yöntemi İle Protein İfadelerinin Belirlenmesi

Hücre siklusunda rol alan tümör baskılayıcı olarak bilinen Phospho-Rb (Ser807/811) protein ifadeleri PathScan® sandwich ELISA kit sayesinde tayin edilmiştir. 100 mm'lik petri kaplarına ekilen MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas hücre hatları %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında her iki hücre hatları için kontrol ve belirlenen ilaç dozlarında

24 saat abemaciclib ve palbociclib uygulamasını takiben ELİSA kit protokolüne göre protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bradford yöntemi ile tayin edilen protein örnekleri çok kuyucuklu örnek yüklüme preperatına 50 µg ve 2 tekrarlı olacak şekilde her bir hücre hattına ait kondüsyonlar için hesaplanmıştır. Örnekler, mavi renkteki örnek seyreltici tamponu ile 1:1 oranda dilue edilmiştir. Örnek kuyulara konulduktan sonra plaka, bir gece boyunca 4° C'de inkübe edilmiştir. Her kuyu 200 µl 1X yıkama tamponu ile 4 kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µl yeşil renkteki belirleme antikoru eklenip plaka 37° C'de etüvde 1 saat bekletilmiştir. Yıkamalardan sonra her kuyucuğa kırmızı renkteki 100 µl HRP-bağlı ikincil antikor eklenip plaka 37° C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yıkama işlemleri tekrarlandıktan sonra her kuyucuğa 100 µl TMB substrat eklenip plaka 37° C'de 10 dakika etüvde bektirilmiştir. Sonra her kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu eklenip 30 dakikayı geçirmeden 450 nm absorbans değerinde ELISA okuyucuda sonuç alınmıştır.

2.2.8 Senescence β-Galactosidase Boyama Yöntemi İle Hücre Yaşlanma durumunun Belirlenmesi

MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas hücreleri 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilerek ilaç uygulamasına takiben üst besiyeri toplanmış olup ardından hücreler 1x PBS ile iki kez yıkanmıştır. 1ml 1X Fiksasyon Solüsyonu ile 10 dakika boyunca oda sıcaklığında fikse edilen hücreler, 2 kez 1X PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kit içerisindeki protokole göre hazırlanan β-Galactosidase Boyama Solüsyonu kuyucuklara 1 ml olacak şekilde uygulanmıştır. 1 gece 37° C de karanlıkta bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda ışık mikroskopuyla görüntü alınmıştır.

2.2.9 Oil Red O Boyama ile Lipid Damlacıklarının Işık Mikroskopunda Tespit Edilmesi

MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas hücreleri 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilerek ilaç uygulamasına takiben üst besiyeri toplanmış olup ardından hücreler 1x PBS ile iki kez yıkanmıştır. 1X PBS ile yıkamanın ardından %4 paraformaldehit içerisinde 30 dakika boyunca sabitlenmiştir. Önceden ısıtılmış %0,25 Oil Red O çözeltis ddH₂O ile seyreltilip filtrelenmiştir. Boya uygulaması yapılan hücreler 45 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Ardından 1X PBS ile yıkanan kuyular ters bakışlı ışık mikroskopunda görüntülenmiştir.

2.2.10 BODIPY® 493/503 Boyama ile Lipid Damlacıklarının Floresans Mikroskopunda Tespit Edilmesi

MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas hücreleri 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilerek ilaç uygulamasına takiben üst besiyeri toplanmış olup ardından hücreler 1x PBS ile iki kez yıkanmıştır. 1X PBS ile yıkamanın ardından %4 paraformaldehit içerisinde 30 dakika boyunca sabitlenmiştir. 1mg/ml BODIPY boyası 1X PBS ile seyreltilerek hücrelere uygulanmıştır. 20 dakika boyunca etüvde inkübe edilmiştir. BODIPY boyamanın son 10 dakikasında nükleusu boyayan ve DNA kondensasyonuna bağlı olarak DNA kırıklarının tespit edilmesinde rol alan 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda floresan ters bakışlı mikroskop aracılığıyla iki farklı floresan boyamalar hücreler üzerinde karşılaştırılıp görüntülenmiştir.

2.2.11 Apoptotik Hücre Ölümünün DiOC6, DAPI ve PI Floresans Boyamalarla Tespit Edilmesi

MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücreleri 12 kuyucuklu petrilere her bir kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece yapışmaları beklendikten sonra seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörleri 24 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saat sonunda 5 mg/ml propidyum iyodür (PI) içeren medya ile değiştirilmiştir ve 30 dakika boyunca etüvde inkübe edilmiştir. Floresan mikroskopunda Ölü hücrelerin boyandığı eksitasyon 536 nm, emisyon 617 nm de kırmızı renk olarak gözlenmiştir. 24 saat ilaç uygulamasının ardından hücreler 4 nm 3,3' Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC6) içeren medya ile

değiştirilmiştir ve 15 dakika boyunca etüvde bekletilmiştir. Floresan mikroskopunda sağlıklı mitokondri potansiyeline sahip hücreler; eksitasyon 488 nm, emisyon 525 nm de yeşil renk olarak gözlenmiştir. Yine aynı şekilde 24 saat ilaç uygulamasının ardından hücreler 5 mg/ml DAPI içeren medya ile değiştirilmiştir ve 10 dakika boyunca etüvde bekletilmiştir. Floresan mikroskopunda; DNA kondensasyonuna bağlı olarak DNA kırıklarının eksitasyon 350 nm, emisyon 470 nm de mavi renk olarak gözlenmiştir.

2.2.12 siRNA Yöntemi ile Gen Sessizleştirilmesi

2.2.12.1 Hücrelerin Hazırlanması

6 kuyucuklu petri kaplarına ekilen MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas hücre hatları %50 yoğunluğa ulaştıklarında SignalSilence® AMPK α 2 siRNA I, SignalSilence® AMPK α 2 siRNA II ve SignalSilence® Control siRNA (Florescein Conjugate), CST transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattı için belirlenen ilaç uygulamaları, transfeksiyon işleminden 48 saat sonra taze besiyerlerinde hazırlanarak 24 saatlik inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. 100 nM AMPK α 2 siRNA (CST) uygulamaları için üretici firma koşullarına göre lipozomal ajanlar (Fugene HD ve İN-fect) 1:3 ve 1:6 oranlarda optimize edilerek transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. AMPK α 2 siRNA I ve AMPK α 2 siRNA II FBS içermeyen besiyeri içerisinde belirtilen oranda hazırlanıp, 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından, hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri üzerine damla damla eklenip, petri kabı halkasal hareketlerle nazikçe çalkalanmıştır. AMPK α 2 siRNA 48 saat boyunca uygulanmıştır. Bu süre sonunda siRNA içeren besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler için belirlenen dozlarda abemaciclib ve palbociclib içeren besiyeri eklenmiştir.

2.2.12.2 siRNA Transfeksiyonu

100 nM AMPK α 2 siRNA (CST) uygulamaları için üretici firma koşullarına göre lipozomal ajanlar (Fugene HD ve İN-fect) 1:3 ve 1:6 oranlarda optimize edilerek transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. AMPK α 2 siRNA I ve AMPK α 2 siRNA II FBS içermeyen besiyeri içerisinde belirtilen oranda hazırlanıp, 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından, hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri üzerine damla damla eklenip, petri kabı halkasal hareketlerle nazikçe çalkalanmıştır. AMPK α 2 siRNA 48 saat boyunca uygulanmıştır. Bu süre sonunda siRNA içeren besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler için belirlenen dozlarda abemaciclib ve palbociclib içeren besiyeri eklenmiştir.

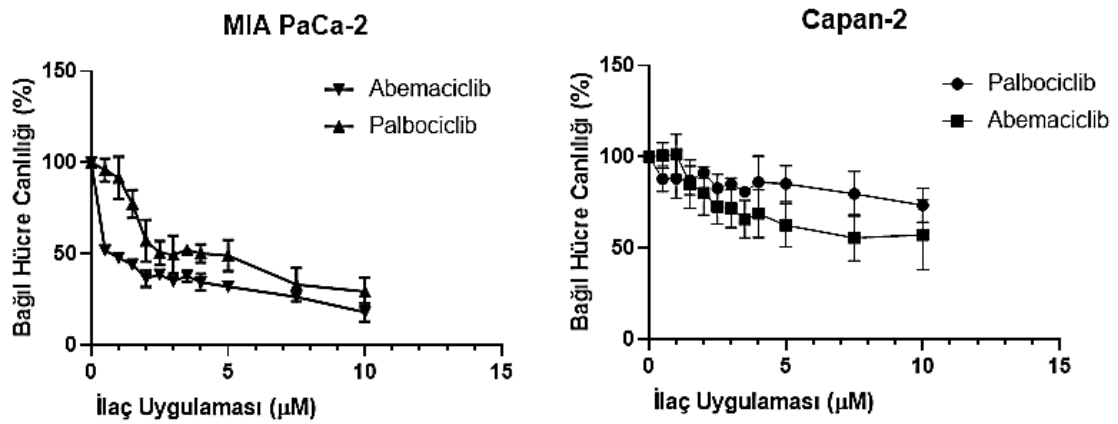
2.2.13 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçlarının sayısal verileri GraphPad Prism v 6.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, ABD) programı aracılığı ile iki yönlü ANOVA istatistiksel analizi tarafından gerçekleştirilmiş olup her bir grafikte elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur. İstatistiksel olarak anlamlılık değerleri sırasıyla **** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$ olarak ifade edilmiştir. Tüm immüno blotlama sonuçları en az iki kez tekrarlanmış olup protein ifadelerindeki değişimlerin katlanma miktarları ImageJ (Java 1.8.0_112) programı tarafından hesaplanmıştır.

3. SONUÇLAR

3.1 MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde abemaciclib ve palbociclib uygulaması hücre canlılığını azaltmaktadır.

Abemaciclib (LY-2835219) ve palbociclib (PD-0332991)'in hücre canlılığına olan etkilerinin gösterilebilmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır. Farklı genomik özelliklere sahip MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücre hatlarına 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0-10 μ M) ilaç uygulanmıştır.



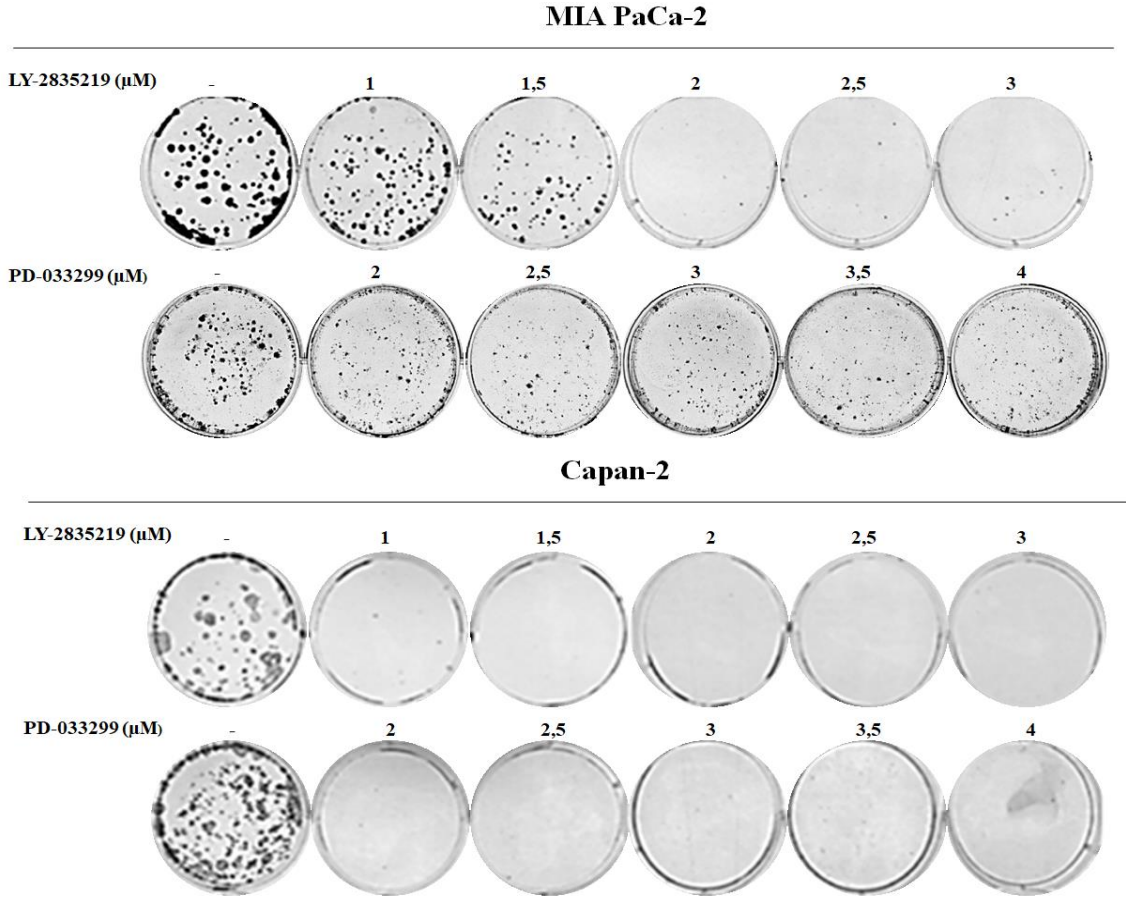
Şekil 10 CDK4/6 inhibitörlerinin (0-10 μ M) MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde, hücre canlılığına olan etkisinin araştırılması. Hücreler 24 saat boyunca belirlenen ilaç dozları ile muamele edildikten sonra 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre örnekler kendi içinde 5 tekrar olacak şekilde en az 4 kez tekrarlanmıştır. Lineer grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=5).

MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde doza bağımlı olarak canlılığın ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerine oranla azaldığı her iki ilaç uygulamasında gösterilmiştir (Şekil 10). MIA PaCa-2 hücre hattı ele alındığında artan ilaç dozlarına bağlı olarak anlamlı ölçüde hücre canlılığını inhibe ettiği gösterilmiş olup her iki ilaç için benzer sitotoksite cevapları verdiği görülmüştür. Capan-2 hücre hattı ele alındığında her iki ilaç uygulaması arasında ılımlı cevap mekanizması geliştirdiği ve palbociclib'e kısmi olarak duyarsız olup abemaciclib'e duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler ile ilgili mutasyon taşıma durumlarına göre hücrelerin CDK4/6 inhibitörlerine 24 saat uygulama süresi boyunca vermiş oldukları cevaplar farklılık göstermektedir. Bu sebeple MIA PaCa-2 hücre hattı için abemaciclib ve palbociclib uygulamalarında %50 canlılık

değeri göz önünde bulundurularak 1 μ M abemaciclib ve ikinci doz olarak 2 μ M abemaciclib belirlenmiştir. Palbociclib için 2 μ M ve ikinci doz olarak 3 μ M belirlenmiştir. Capan-2 hücre hattında aynı şekilde %50 canlılık oranı göz önünde bulundurularak abemaciclib ve palbociclib uygulamaları için ortak doz 7,5 μ M olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu ilaç dozlarının MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir.

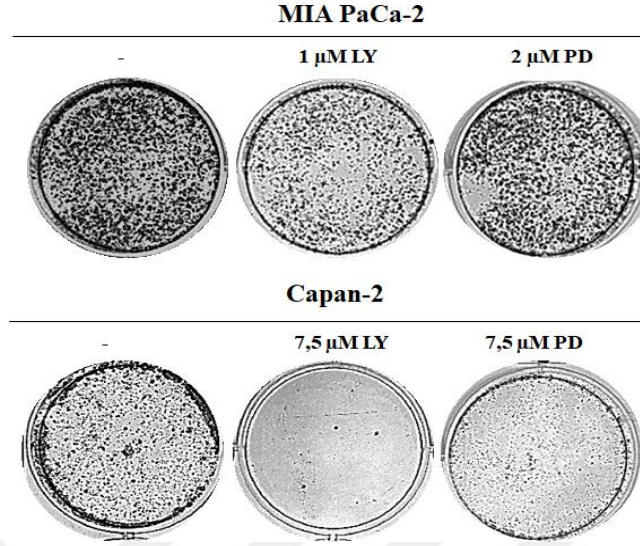
3.2 Abemaciclib ve palbociclib uygulaması MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerine ket vururken AMPK siRNA uygulaması koloni oluşturma potansiyellerini arttırmaktadır.

Abemaciclib ve Palbociclib'in koloni oluşturma kabiliyeti üzerindeki etkileri doza bağımlı bir şekilde MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde irdelenmiştir. İlaç uygulama saati 24 saat olduğundan bu sürenin sonunda üst medya değiştirilmiştir. Hücreler tarafından absorbe edilen ilaçların etkinliği 14. günde kristal viyole ile muamele edilerek ışık mikroskopunda koloni oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. Şekil 11 de görüldüğü üzere belirlenen dozlarda ilaçlanan hücreler doza bağımlı bir şekilde MIA PaCa-2 hücrelerinde hem abemaciclib hem de palbociclib uygulaması, uygulama yapılmamış kontrol hücrelere göre koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Capan-2 hücrelerinde ise abemaciclib ve palbociclib doza bağımlı bir şekilde koloni oluşumuna ket vurucu etki göstermiştir. Her ne kadar MIA PaCa-2 hücre hattının iki ilaç uygulamasını takiben koloni oluşumları azalmış olsa da her iki hücre hattında özellikle palbociclib uygulamasında abemaciclib'e göre az duyarlı olduğu gösterilmiştir. Böylece koloni formasyonu deneyi ile MTT hücre canlılığında tespit edilen dozlardan daha düşük dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin hücre bölünmesi konusunda azaltıcı etkileri belirlenmiştir. Bu nedenle her iki ilacın hücre tiplerinde doza bağımlı etkisinin irdelenmesinin anlamlı sonuçlar sağlama potansiyeli bulunmaktadır.



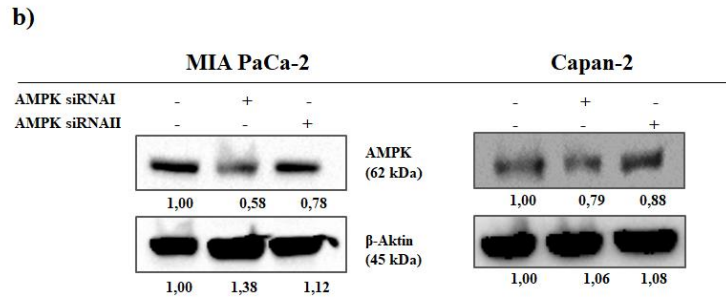
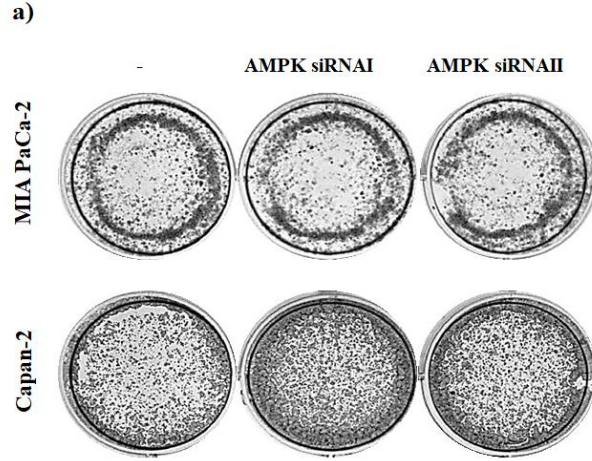
Şekil 11 CDK4/6 inhibitörlerinin doza bağımlı bir şekilde MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi. Pankreas kanseri hücre hatlarında 24 saat abemaciclib ve palbociclib uygulamasını takiben koloni formasyonu 3000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen 6-kuyucuklu petrilerde incelenmiştir. 14 gün boyunca bekletilen ve yeni besiyeri ile ortamı değiştirilen petrilerde yer alan koloniler fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. Sonuçlar iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.

MTT testini sonucunda belirlenen abemaciclib ve Palbociclib'in iki farklı doz uygulamasıyla MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelleri tekrar incelenmiş olup benzer şekilde koloni oluşumlarının azaldığı görülmüştür (Şekil 12). Bu çalışma kapsamında ele alınan pankreas kanseri hücrelerinde özellikle abemaciclib'in %50'nin üzerinde koloni oluşumlarını azaltması önemli bir terapötik etki göstermiştir. Palbociclib ise kısmi etkili terapötik sonuçlar sağlamaktadır.



Şekil 12 Seçili dozlarda Abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi. Pankreas kanseri hücre hatlarında 24 saat abemaciclib ve palbociclib uygulamasını takiben koloni formasyonu 3000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen 6-kuyucuklu petrilerde incelenmiştir. 14 gün boyunca bekletilen ve yeni besiyeri ile ortamı değiştirilen petrilerde yer alan koloniler fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. Sonuçlar iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.

AMPK susturma işlemine bağlı olarak her iki hücre hattı üzerindeki koloni oluşturma potansiyellerine etkisi irdelenmiştir. %50 yoğunlukta 6-kuyucuklu petrilere ekilen MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücreleri 1:6 oranlarında 48 saatlik AMPK siRNA I ve AMPK siRNAII transfeksiyonu, transfeksiyon işleminden 48 saat sonra %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin'li RPMI medya değişimi neticesinde hücrelerde sitotoksik bir etki oluşturmamıştır. Koloni oluşumu 10 gün boyunca besiyeri yenilenecek devam etmiştir. Koloniler kristal viyole ile fikse edildikten sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. AMPK susturma işlemi sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerinde susturma işlemi uygulanmayan kontrol hücrelerine kıyasla koloni oluşturma potansiyellerinde bir değişiklik olmadığı görülürken Capan-2 hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla özellikle AMPK siRNAI uygulamasında koloni oluşumlarının artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 13a).

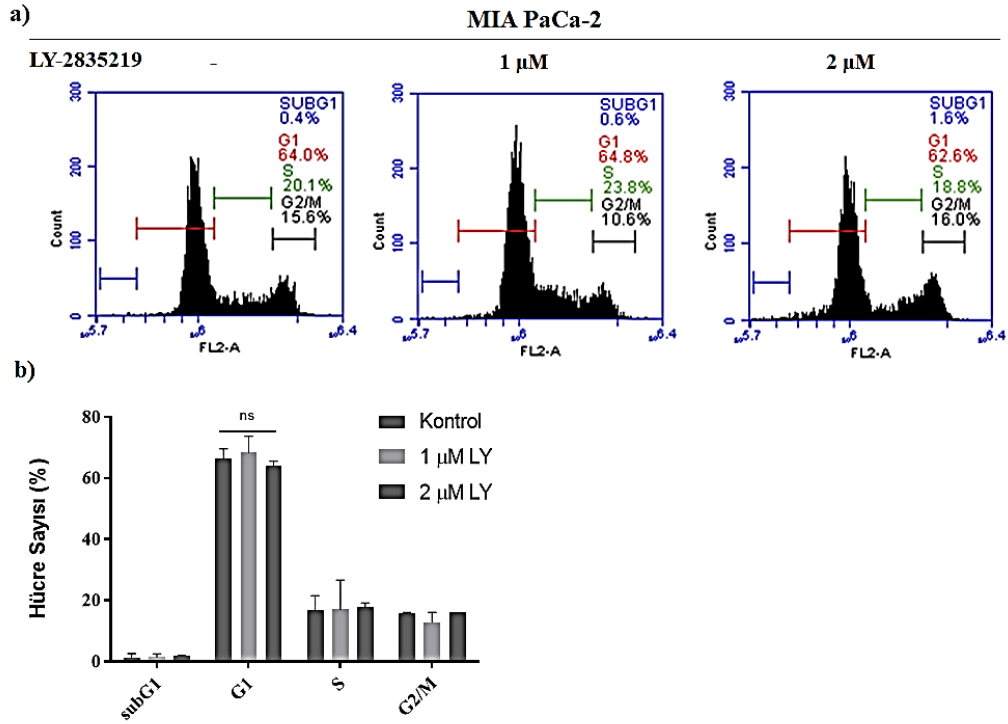


Şekil 13 AMPK sessizleştirme uygulamasının MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyelleri üzerine etkisinin incelenmesi. a) %50 yoğunlukta 6-kuyucuklu petrilere ekilen MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücreleri 1:6 oranlarında lipozom türevli ajan ile 48 saatlik AMPK siRNA I ve AMPK siRNAII transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup yeni besiyeri ile ortamı değiştirilen petrilere 10 gün boyunca bekletilen koloniler fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. b) MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücreleri lipozom türevli ajan ile 48 saatlik AMPK siRNA I ve AMPK siRNA II transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup, AMPK protein ifadelerindeki değişimler immunoblotlama yöntemiyle gösterilmiştir. β-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Elde edilen immunoblotlama sonuçları ışığında AMPK siRNA I'in AMPK siRNA II'ye göre her iki hücre hattında da daha efektif bir AMPK susturmasına neden olduğu belirlenmiştir. AMPK proteini seviyelerinde ise anlamlı bir azalma sağlamıştır (Şekil 13b).

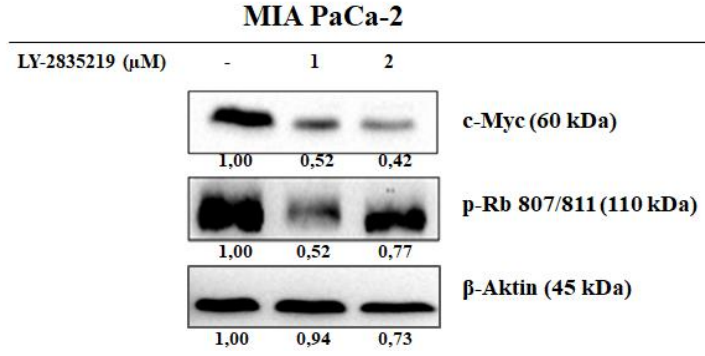
3.3 Abemaciclib uygulanan Capan-2 hücreleri hücre döngüsünün G1 fazında tutulu kalırken, MIA PaCa-2 hücreleri palbociclib uygulamasında G1 fazında tutulu kalmaktadır.

24 saat boyunca %25-50 oranında etkili olan dozlar her bir hücre hattı için uygulanmış olup ardından hücre döngüsünde ilaçların etkisini irdeleyebilmek için propidyum iyodür (PI) ile hücreler muamele edilerek hücre akış sitometrisinde analizleri gerçekleştirilmiştir. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde abemaciclib uygulamasını takiben 1 μ M ilaç dozunda ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine kıyasla G1 evresinde sırasıyla %0,8’lik tutuklu kalma söz konusuyken, 2 μ M ilaç dozunda G2/M evresinde %0,4’lük tutuklu kalma meydana gelmiştir. Bu veriler doğrultusunda MIA PaCa-2 hücre hattına uygulanan abemaciclib’in 1 μ M ve 2 μ M uygulanan ilaç dozlarının hücre döngüsünde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 14).

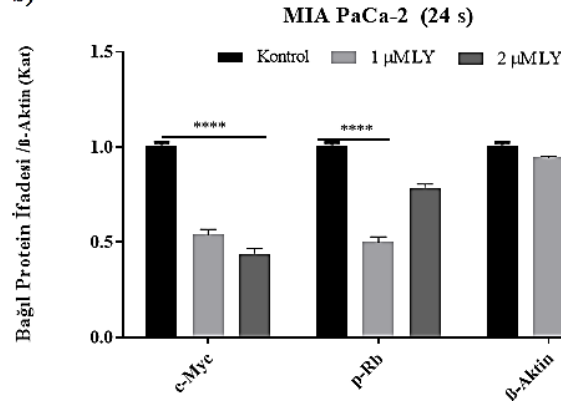


Şekil 14 Abemaciclib’in 24 saat uygulamasına takiben MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisinin araştırılması. a) PI boyaması sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre döngüsünde hücre popülasyonlarının dağılımları incelenmiştir. b) Her bir şekil 2 farklı biyolojik örneğin ortalaması $\pm$ standard hatası şeklinde değerlendirilmiştir (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

a)

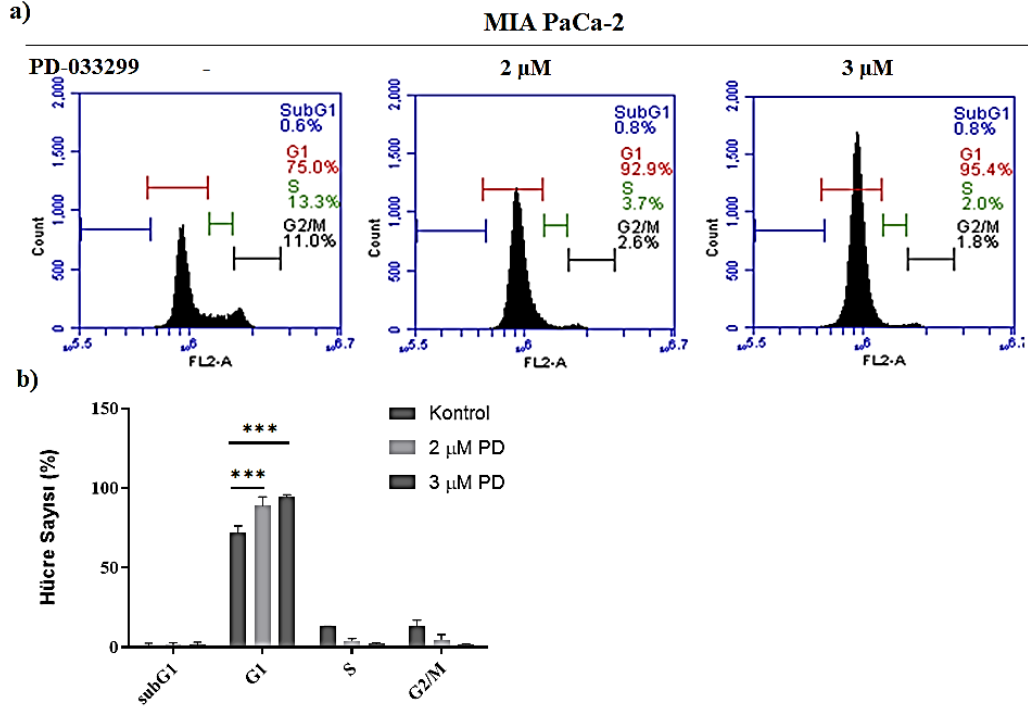


b)



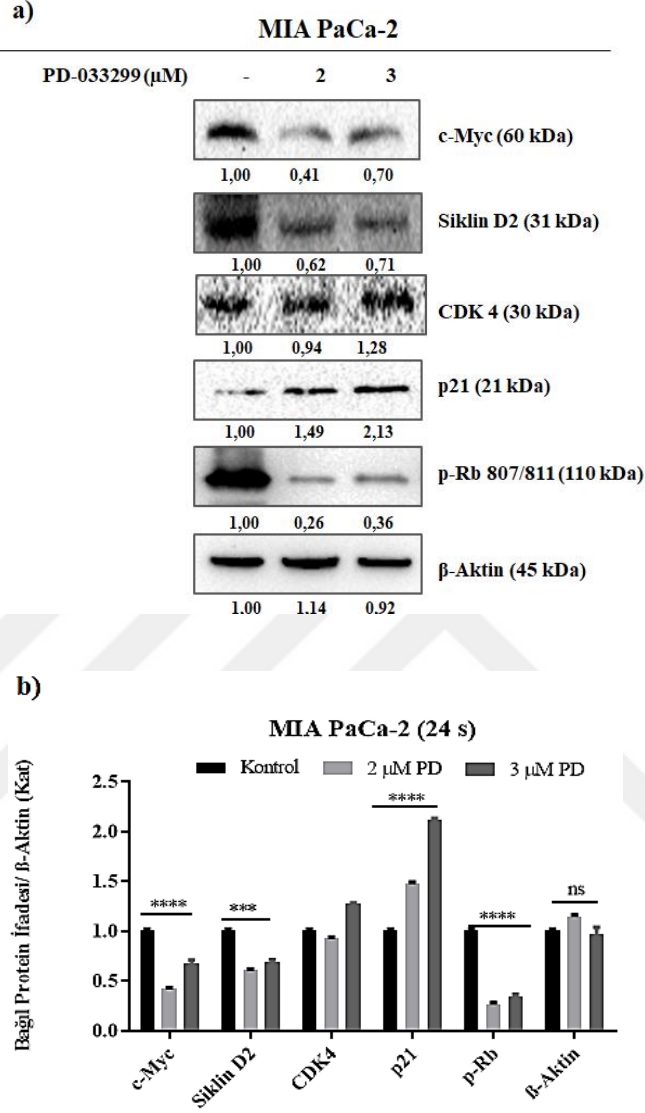
Şekil 15 Abemaciclib'in artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanması sonucunda MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde hücre siklusunun düzenlenmesinde rol alan c-Myc ve p-Rb ifadelerinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. a) ve β -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır b) Bağlı protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Abemaciclib'in doza bağımlı 24 saatlik uygulamasının ardından MIA PaCa-2 hücrelerinde, tümör gelişiminde rol oynayan proto-onkogen olarak bilinen c-Myc ifadesinin doza bağımlı bir şekilde azaltması hücre sağ kalımını azaltıcı etkileri konusunda bilgi sağlamıştır. Rb fosforilasyonları hücrelerde ilaçlar tarafından meydana gelen hücre siklusunda tutulu kalma durumu kontrol edilmiştir. Tümör baskılayıcı olarak bilinen Rb'nin hipofosforile durumu aktif formunu ifade etmektedir. Abemaciclib uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinde doza bağımlı olarak Rb ifadesinin hipofosforile olduğu ve seçili doz olarak belirlenen 1 μ M abemaciclib uygulamasının daha etkili olduğu görülmüştür (Şekil 15).



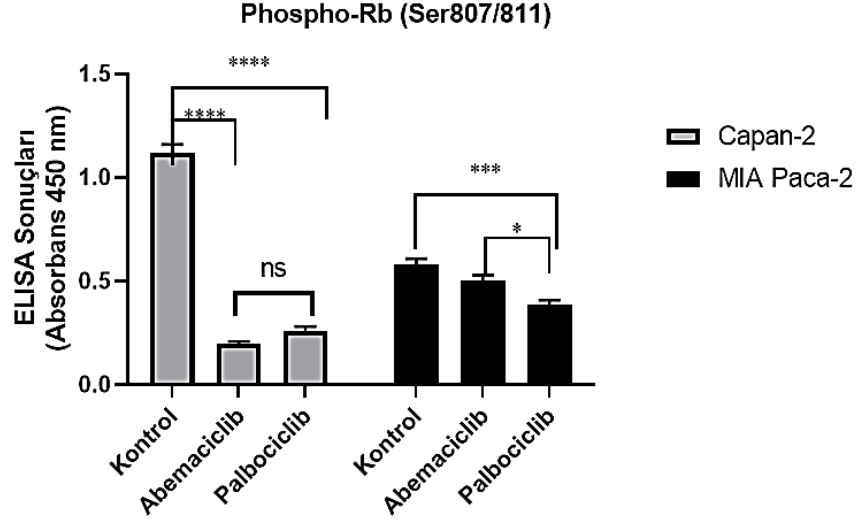
Şekil 16 Palbociclib'in 24 saat uygulamasına takiben MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisinin araştırılması. a) PI boyaması sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre döngüsünde hücre popülasyonlarının dağılımları incelenmiştir. b) Her bir şekil 2 farklı biyolojik örneğin ortalaması $\pm$ standard hatası şeklinde değerlendirilmiştir (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde doza bağımlı olarak sırası ile 2 ve 3 μ M uygulama sonucunda 93.2 ± 1.5 ve 96.2 ± 1.8 oranında G1 fazında tutuklu kalma meydana gelmiştir (Şekil 16). Palbociclib'in doza bağımlı 24 saatlik uygulamasının ardından MIA PaCa-2 hücrelerinin G1 fazında tutuklu kaldığını destekleyici immunoblotlama çalışmaları yapılmıştır (Şekil 17). MIA PaCa-2 hücrelerinde, hücre sağkalımında rol alan c-Myc ifadesinde doza bağlı azalışın anlamlı olduğu görülmektedir. Hücre siklusunda siklinler, kendi siklin bağımlı kinazlarının (CDK) regüle edici alt üniteleri olup faz geçişine ve hücre bölünmesinde rol oynamaktadır. Doza bağımlı palbociclib uygulamasında MIA PaCa-2 kontrol hücrelerine kıyasla CDK4 ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, siklin D2 ve p-Rb ifadesindeki azalışın anlamlı olduğu görülmektedir. Ayıca Siklin-CDK aktivitesini düzenleyen iki inhibitör ailesinden biri olan p21 ifadesindeki anlamlı artış hücre siklusunda tutuklu kalma durumunun moleküler mekanizması konusunda bilgi sağlayıcı bir veri sağlamıştır.



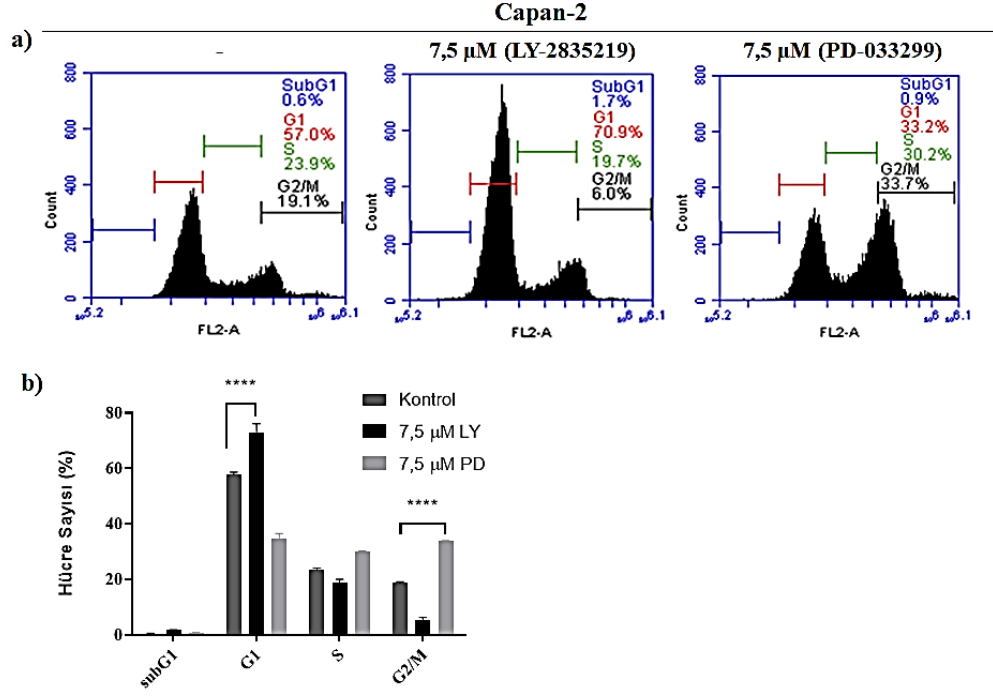
Şekil 17 Palbociclib'in artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanması sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerindeki c-Myc, Siklin D2, CDK4, p21 ve p-Rb ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. a) ve β -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır b) Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Yapılan p-Rb immunoblotlama çalışmalarını desteklemek amacıyla seçili dozlarda abemaciclib ve palbociclib uygulamasını takiben MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerindeki p-Rb ifadesi ELISA yöntemiyle gösterilmiştir (Şekil 18). MIA PaCa-2 hücre hattında 2 μ M olarak belirlenen seçili dozun, 1 μ M olarak belirlenen Abemaciclib'e kıyasla daha fazla hipofosforile. iken Capan-2 hücrelerinde ise kontrole kıyasla her iki ilacın eşit düzeyde Rb hipofosforilasyonuna neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 18 CDK4/6 inhibitörlerinin p-Rb aktivitesine etkilerinin belirlenmesi. Her bir hücre hattı 1×10^6 hücre olacak şekilde 100 mm çaplı hücre kültürü petrilere ekilmiştir. Ardından seçili ilaç konsantrasyonları ile 24 saat boyunca bekletilmiş ve total protein izolasyonu (her bir örnek için 50µg) ELISA testini sağlayan firmanın önerilerine göre gerçekleştirilmiştir (PathScan® Phospho-Rb (Ser807/811) Sandwich ELISA Kit #7959). Her bir kolon grafik en az iki biyolojik testin oranı olarak ortalama $\pm$ std hata olarak sunulmuştur (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

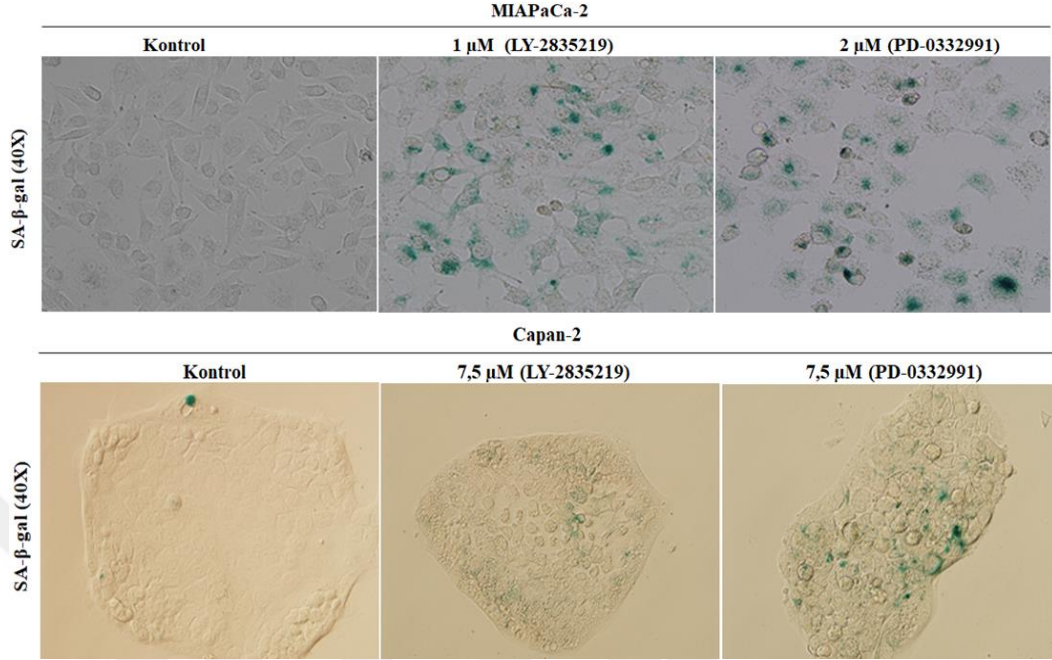
Capan-2 hücreleri ele alındığında abemaciclib uygulamasını takiben 7,5 µM ilaç dozunda ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine kıyasla G1 evresinde sırasıyla %13,9'luk bir tutuklu kalma söz konusuyken 7,5 µM palbociclib ilaç dozunda G2/M evresinde %14,6'luk bir tutuklu kalma söz konusudur. Bu veriler sonucunda seçilen dozlarda uygulama yapılan hücrelerde kontrol hücrelere göre anlamlı düzeyde hücre canlılığını azalttığı ve hücre siklusunda G1 veya G2/M fazında tutuklu kalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19 Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin 24 saat uygulamasına takiben Capan-2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisinin araştırılması. a) PI boyaması sonucunda Capan-2 hücrelerinde hücre döngüsünde hücre popülasyonlarının dağılımları incelenmiştir. b) Her bir şekil 2 farklı biyolojik örneğin ortalaması $\pm$ standard hatası şeklinde değerlendirilmiştir (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

3.4 Abemaciclib ve palbociclib MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde hücre yaşlanması sürecini tetiklemektedir.

CDK4/6 inhibitörleri olarak bilinen abemaciclib ve palbociclib ilaçları hücre döngüsünün G1 fazını tutuklu kalmasını sağlayarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Ayrıca hücrelerde hücre yaşlanması durumunda CDK4/6'ların inhibe olduğu bilinmektedir. Bu nedenle CDK4/6 inhibitörlerinin etkin dozlarının irdelenmesiyle hücre yaşlanması açısından indükleyici rolleri MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde kontrol hücrelere göre gösterilmiştir. MIA PaCa-2 ve Capan-2 ilaç uygulanmış hücrelerde ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerine kıyasla pozitif SA- β -gal boyama görülmesi dikkati çekmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde abemaciclib ve palbociclib neredeyse aynı pozitif etkiyi gösterirken Capan-2 hücrelerinde özellikle palbociclib uygulamasında belirgin bir şekilde pozitif boyama saptanmıştır. Bu veriler hücre siklusunda uzun süre tutuklu kalma sonucunda hücresel yaşlanmanın hücre ölümünden daha önce meydana gelebileceğini de düşündürmüştür (Şekil 20).

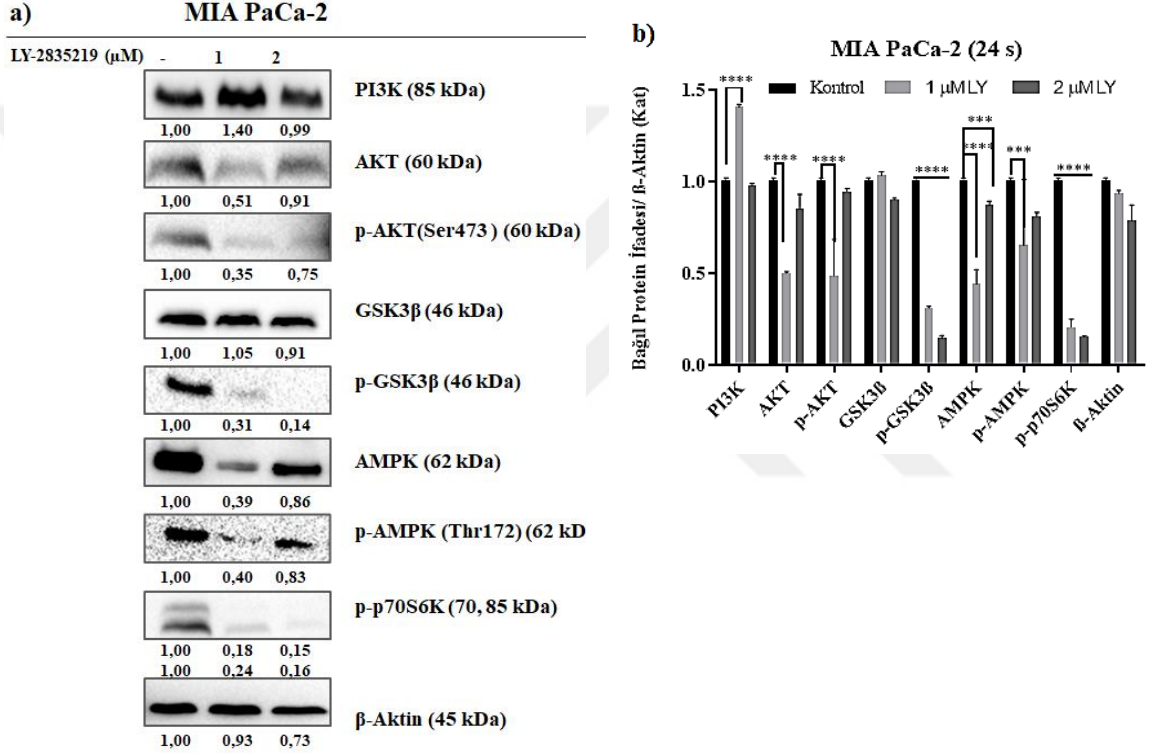


Şekil 20 CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde hücre yaşlanması üzerine etkisinin araştırılması. Senesens boyama 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilen hücreler, ilaç uygulamasına takiben gerçekleştirilmiştir. Yıkamanın ardından fiks edilen hücreler β -gal uygulamasının ardından ışık mikroskopunda incelenmiştir. Sonuçlar iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.

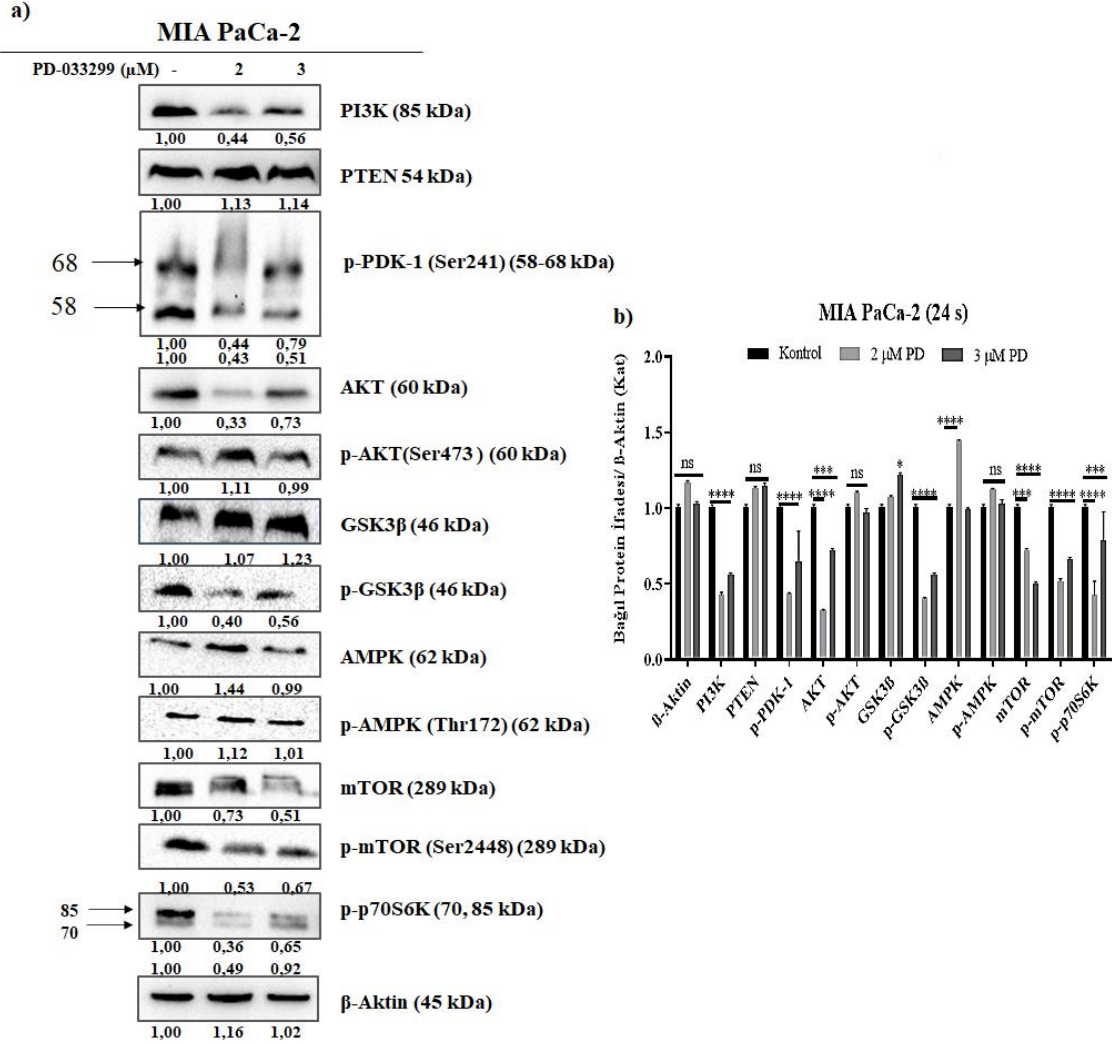
3.5 Abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde AMPK ile ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları üzerinden hücre sağkalım sürecine farklı etki mekanizmaları olduğu görülmektedir.

KRAS, *TP53* ve *CDK2N/p16* genlerinin mutasyonuna sahip yüksek metastatik profil gösteren MIA PaCa-2 hücre hattı öncü, iyi bir pankreas kanseri modeli oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple ilk olarak 24 saat uygulanan abemaciclib ve palbociclib'in doza bağımlı hücre sağkalımına etkisi MIA PaCa-2 hücrelerinde irdelenmiştir. Abemaciclib uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinde PI3K ifadesinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, major değişiklikler değerlendirildiğinde abemaciclib'in AKT inhibisyonu aracılığıyla hücre sağ kalımına ket vurma potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Abemaciclib uygulaması sonucunda GSK3 β inhibe edici fosforilasyonun (Ser9) MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde azalıyor olması dikkati çekmiştir. Hücresel enerji homeostazında rol alan AMPK ifadesi doza bağımlı olarak MIA PaCa-2 hücrelerinde araştırılmıştır.

Abemaciclib AMPK aktivitesini düşük doz uygulamasında (1 μ M) azaltırken, daha yüksek dozda (2 μ M) uygulama sonucunda AMPK aktivasyonuna (kontrol hücrelere oranla) belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Farklı hücresel süreçlerde rol alan mTOR tarafından aktive edilebilen ve ribozomlarda protein sentezini indükleyen p70S6K aktivitesi doza bağımlı abemaciclib uygulamasını takiben azalması anlamlı sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 21).



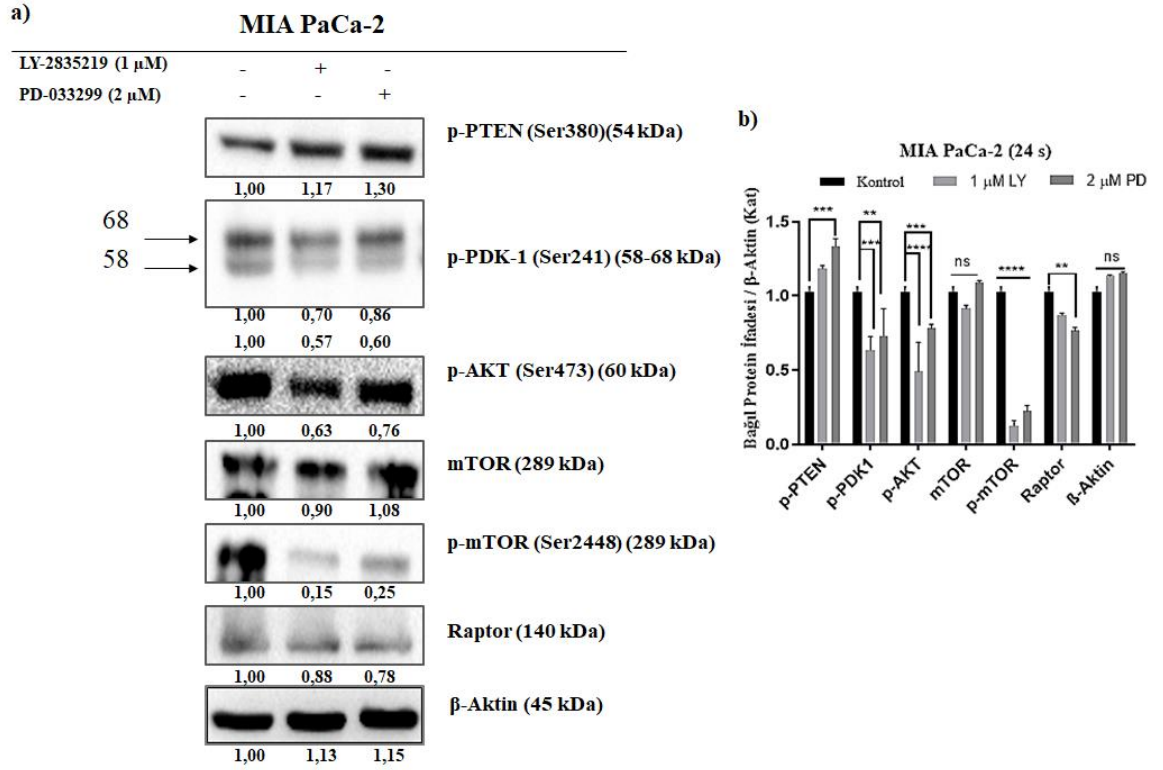
Şekil 21 Artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanan abemaciclib'in MIA PaCa-2 hücre hattında AMPK ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. a) ve β -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Bağlı protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).



Şekil 22 Artan dozlara bağlı olarak 24 saat boyunca uygulanan Palbociclib'in MIA PaCa-2 hücrelerinde AMPK ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. a) ve β-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Bağıl protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması ± standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (** p ≤ 0.0001, *** p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.01).**

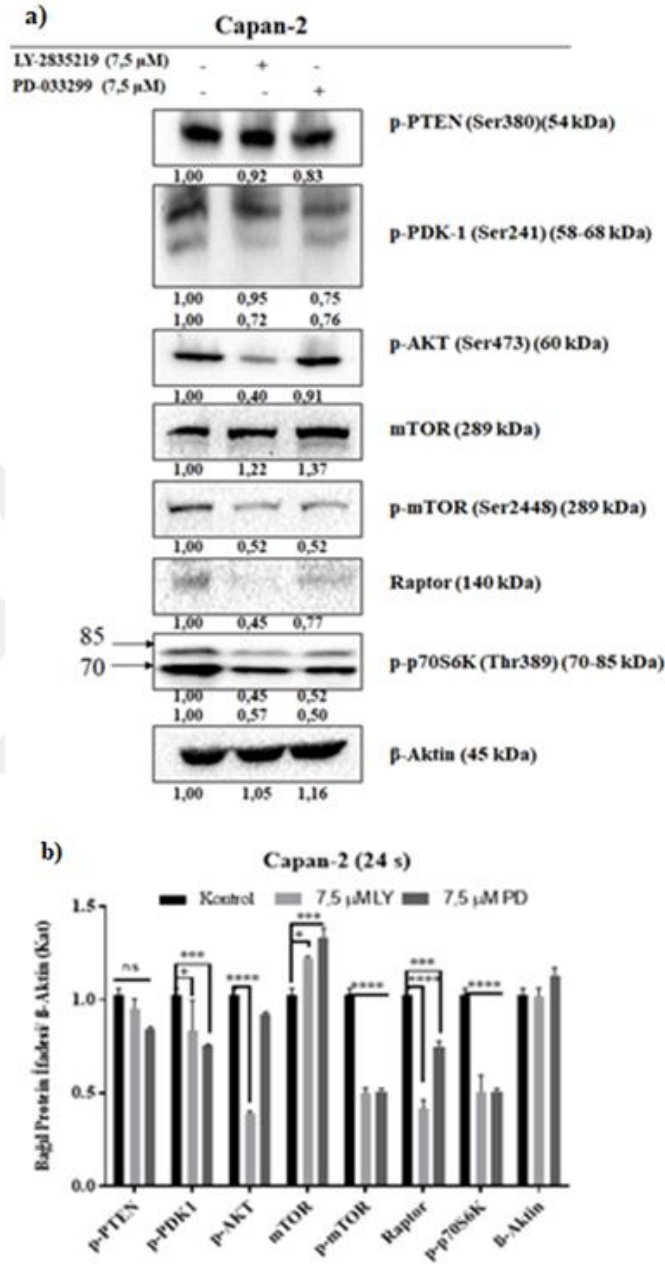
MIA PaCa-2 hücrelerinde tümör baskılayıcı rolü olan PTEN seviyeleri, doza bağımlı palbociclib uygulaması yapılmayan kontrol hücrelere göre değişmemiştir. Doza bağımlı palbociclib uygulamasında her ne kadar p-AKT inhibisyonunda anlamlı değişiklik gözlenmese de PI3K inhibisyonu aracılı olarak p-PDK-1 ifadesinde azalma hücre sağ kalımına ket vurma potansiyeli olduğunun göstergesidir. palbociclib uygulaması sonucunda GSK3β inhibe edici fosforilasyonun (Ser9) MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde azalıyor olması dikkati çekmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde doza bağımlı

olarak palbociclib çok anlamlı olmayan miktarda AMPK aktivasyonuna (kontrol hücrelere oranla) neden olmuştur. Hücre enerji metabolizmasında, ribozomal biyogenez ve otofajide rol alan mTOR sinyal kaskadı irdelenmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde doza bağımlı palbociclib uygulamasında p-mTOR aktivitesinde ve p70S6K aktivitesinde azalma anlamlı sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 22).



Şekil 23 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre sağkalım yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. a) ve β-Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Bağıl protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması ± standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

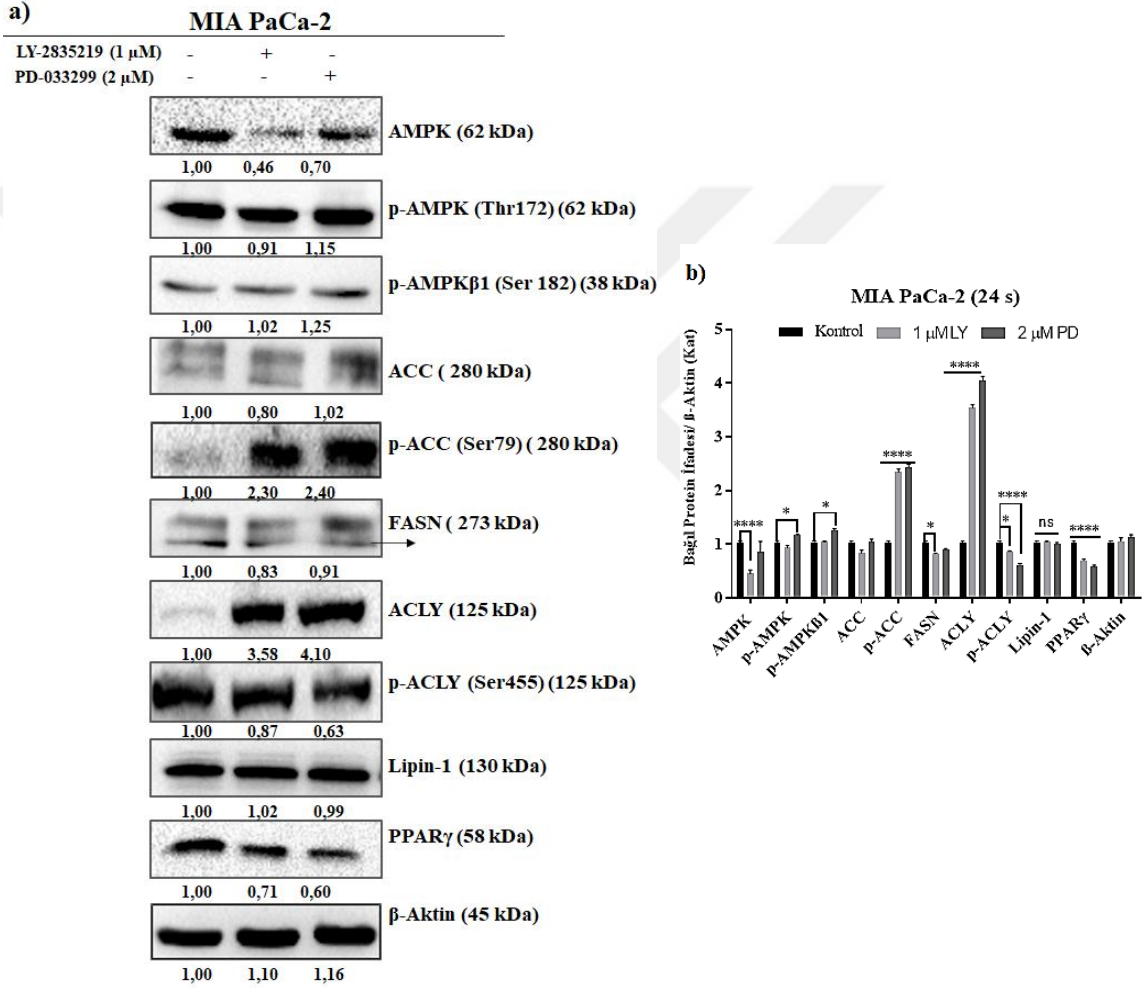
MIA PaCa-2 hücre hattına uygulanan palbociclib ve abemaciclib için başta belirlenen iki farklı doz arasından ılımlı ve orta düzeyli sitotoksik etki gösteren her iki ilaç için tek doz belirlenmiştir. olup *KRAS* mutasyonuna sahip düşük metastatik profil gösteren Capan-2 hücre hattı çalışmalara dahil edilmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde p-PTEN Ser380 fosforilasyon ifadesi her iki ilaç tarafından arttırılmakta olup, Capan-2 hücrelerinde bu etki gözlenmemiştir. Palbociclib bu hücrelerde p-PTEN seviyesini azaltmıştır. p-PTEN Ser380 de görülen fosforilasyon fosfataz aktivitesine ve tümör supressör etkisine ket vurucu olarak gösterilmektedir. LKB1 tarafından PTEN'in Ser380'de fosforile ediliyor olması AMPK fosforilasyonu ile aynı ekseninde bulunan LKB1'in aşağı sinyal yolu ile AKT sinyal kaskadına etki ederek hücrelerde metabolik karar alma sürecine katıldığını göstermektedir. Buna bağlı olarak palbociclib uygulamasında her iki hücre hattında AMPK Thr 172 ile korelasyon gösteren p-PDK-1 ifadesinin azaldığı görülürken AKT fosforilasyon (kontrol hücrelerine kıyasla) ifadesinde ise anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Abemaciclib uygulanan her iki hücre hattı palbociclib'in tersine p-PDK1, p-AKT ifadelerinde azalma anlamlı sonuç olarak değerlendirilmiştir. CDK4/6 inhibitörleri arasındaki AMPK ilişkili sinyal kaskadlarının düzenlenmesindeki rolünün daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için AMPK aşağı sinyal yolları irdelenmiştir. CDK4/6 inhibitörleri uygulanan her iki hücre hattında mTOR Ser2448 fosforilasyon ifadesi azalmıştır. Ayrıca CDK4/6 inhibitörleri uygulanan PRAS40 ile etkileşime girerek mTOR aktivasyonunda rol alan Raptor ifadesi MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde azalmıştır. Buna bağlı olarak p-p70S6K ifadesi Capan-2 hücrelerinde anlamlı bir azalma görülmektedir (Şekil 23-24).



Şekil 24 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin Capan-2 hücrelerinde hücre sağkalım yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. a) ve β -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Bağlı protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

3.6 Abemaciclib ve palbociclib, MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde AMPK değişimine bağlı olarak yağ asidi biyosentezine etki ederek hücre içi lipid profillerinde azalma sağlamıştır.

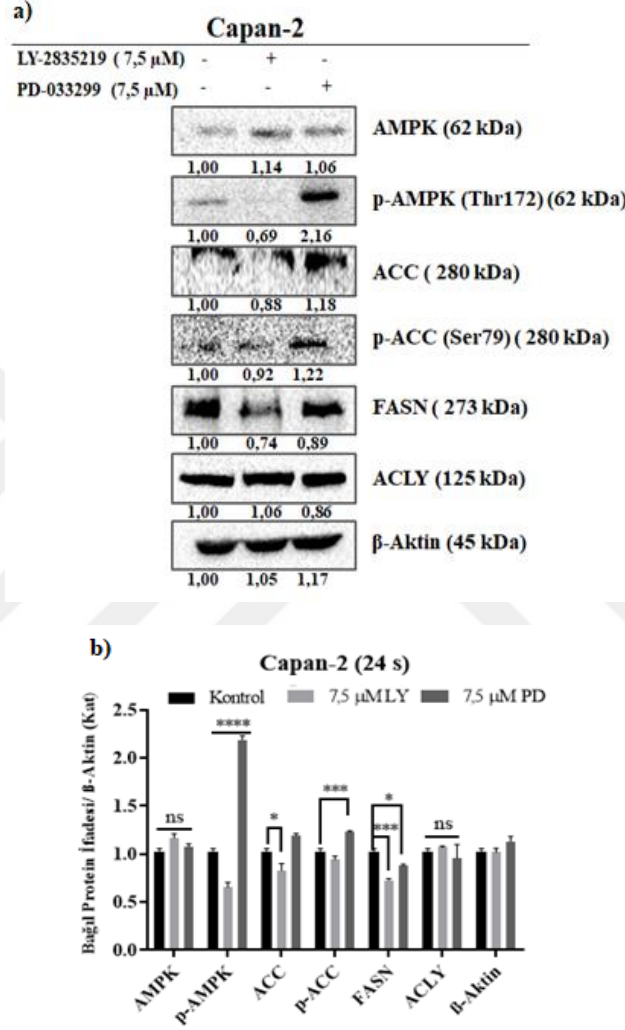
Seçili dozlarda abemaciclib ve palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde AMPK ilişkili moleküler sinyal yollarının düzenlenmesindeki etkilerinin daha iyi bir şekilde incelenmesi ve lipid düzenlenmesi üzerine etkileri irdelenmiştir.



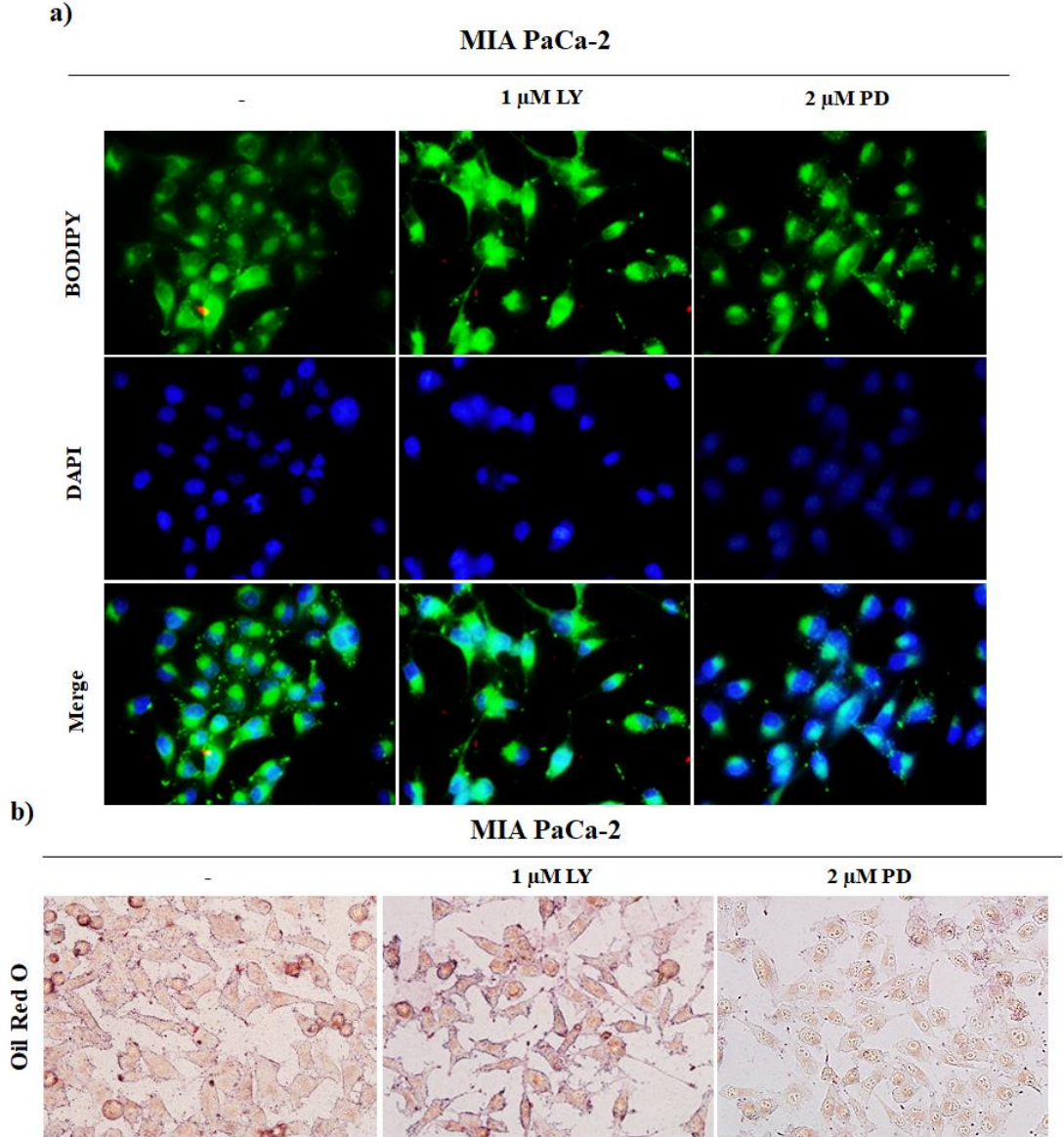
Şekil 25 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 hücrelerinde AMPK ilişkili aşağı sinyal yolları olan yağ asidi sentez ve lipogenez yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. a) ve β -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Bağıl protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Seçili dozlarda abemaciclib ve palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde AMPK ilişkili moleküler sinyal yollarının düzenlenmesindeki etkilerinin daha iyi bir şekilde incelenmesi ve lipid düzenlenmesi üzerine etkileri irdelenmiştir. Palbociclib, MIA PaCa-2 hücrelerinde fosforile AMPK (Thr172) ifadesi çok anlamlı olmayan miktarda AMPK aktivasyonuna (kontrol hücrelere oranla) neden olurken Capan-2 hücrelerinde belirgin bir şekilde artış görülmüştür. Ancak abemaciclib uygulanan Capan-2 hücrelerin p-AMPK ifadesinde azalma görülmüştür. AMPK'nın alt birimlerinden biri olan düzenleyici isoform $\beta 1$, glikojene bağlanmaya aracılık eden bir karbonhidrat bağlayıcı module sahip olup α ve γ alt birimlerinin bağlanmasında bir iskele görevi görerek fosforile aktif formları AMPK α ile korelasyon göstermektedir. Palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinde Fosforile AMPK $\beta 1$ (Ser182) ifadesinde anlamlı artış görülmüştür. ACC fosforilasyonu, MIA PaCa-2 hücrelerinde hem abemaciclib hemde palbociclib uygulamasında benzer şekilde artış gösterirken Capan-2 hücrelerinde sadece palbociclib uygulamasında artış göstermiştir. p-ACC (Ser79) inhibe formundaki ifade artışı CDK4/6 inhibitörlerine cevap mekanizması bakımından ve AMPK ile beraber çalışan ACC'nin stres durumunda tetiklendiğinin göstergesi olup, fizyolojik olarak açlık veya ciddi stres koşullarında artan AMPK ve ACC fosforilasyonları lipid biyosentezinin azalmasının göstergesidir. ACLY, sitosolik sitratın asetil CoA ve oksaloasetata dönüşümünü katalize ederek de novo lipogeneze rol oynayan anahtar bir enzimdir. ACLY'nin çeşitli tümör tiplerinde düzenlenmesi, yağ asidi sentezini arttırır. ACLY fosforilasyonu, palbociclib uygulamasında MIA PaCa-2 hücrelerinde (kontrol hücrelerine kıyasla) azalırken abemaciclib uygulamasında değişiklik görülmemiştir. Her iki ilaç uygulamasında Capan-2 hücrelerindeki ACLY ifadesi değişmezken ilginç bir şekilde her iki ilaç uygulamasında MIA PaCa-2 hücrelerinde artışa sebep olmuştur. Bununla ilişkili olarak yağ asidi sentezini katalizleyen FASN ve aynı zamanda adipogeneze rol alan Lipin-1 protein ifadesi MIA PaCa-2 hücrelerinde herhangi bir değişkenlik gözlenmezken, palbociclib uygulamasına kıyasla abemaciclib uygulanan Capan-2 hücrelerinde FASN ifadesinde belirgin bir azalış görülmüştür.

MIA PaCa-2 hücrelerinde adiposit olgunlaşmasında rol alan ve Lipin-1 tarafından module edilen PPAR γ (peroksizom-proliferatör ile aktive edilmiş reseptör γ) ifadesinde her iki CDK4/6 inhibitörü tarafından anlamlı bir azalış görülmüştür (Şekil 25-26).



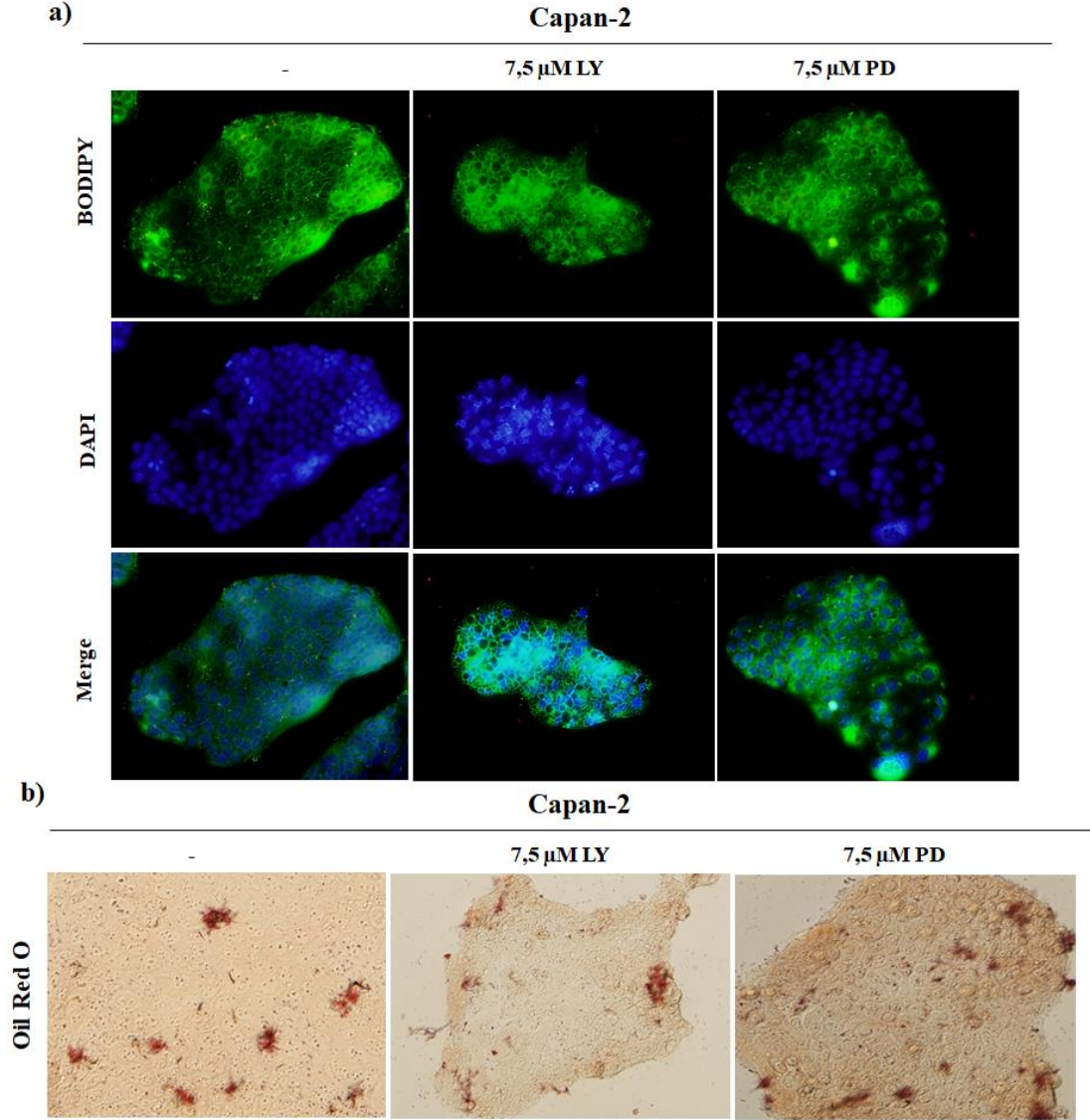
Şekil 26 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin Capan-2 hücrelerinde AMPK ilişkili aşağı sinyal yolları olan yağ asidi sentez ve lipogenez yolağına olan etkisinin immunoblotlama yöntemi ile incelenmesi. a) ve β -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Bağıl protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).



Şekil 27 a) CDK4/6 inhibitörlerinin 24 saat seçili dozlarda uygulanmasının ardından MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin içerisindeki yağ damlacıkları floresans özellikteki BODIPY® 493/503 ve b) Oil Red O çözeltisi ile muamelelerinin ardından tanımlanmıştır. iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.

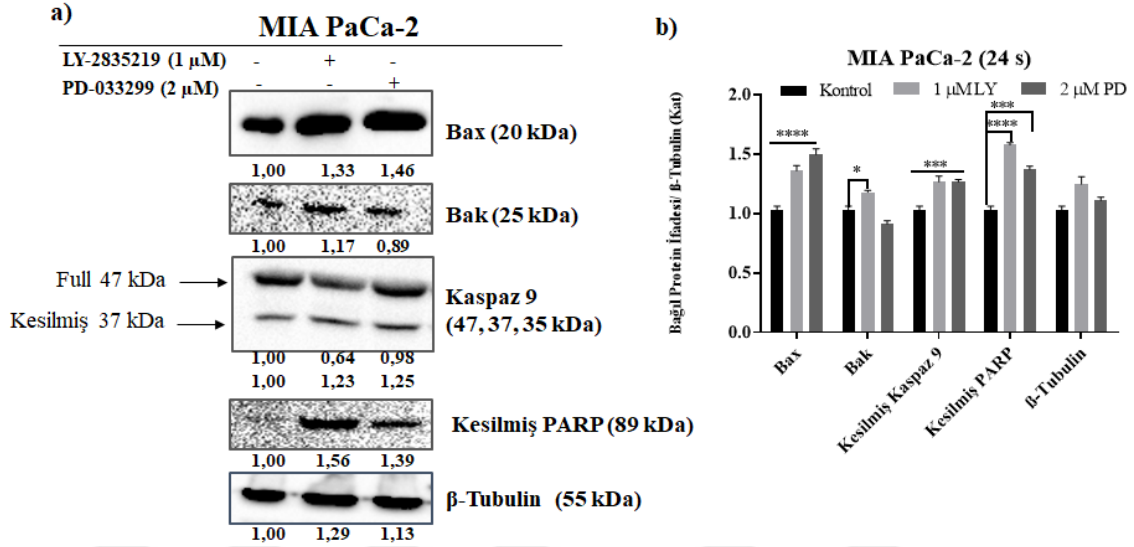
CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücre hatlarında hücre içi lipid profilleri üzerine etkisi Oil Red O boyama ve floresans bir prob olan BODIPY® 493/503 boyama ile lipid damlacıklarının gösterilmesi amaçlanmıştır. Nötral lipidlerin gösterimi için BODIPY ve nükleus gösterimi için DAPI boyası eş zamanlı olacak şekilde hücrelere uygulanarak boya tutulumları sırası ile ışık ve floresan mikroskopta incelenmiştir. Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörleri uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinde

kontrole kıyasla Oil Red O tutulumunun ve lipit damlacıklarını gösteren yeşil floresan oranında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Capan-2 hücrelerinde ise palbociclib uygulamasına kıyasla abemaciclib uygulamasının ardından boyama tutulumunda ve yeşil floresan oranında azalma daha belirgin bir şekilde görülmüştür (Şekil 27-28). Bu veriler immunoblotlama deneylerini destekler nitelikte olup ilaçların lipid dropletleri üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermiştir.



Şekil 28 a) CDK4/6 inhibitörlerinin 24 saat seçili dozlarda uygulanmasının ardından Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinin içerisindeki yağ damlacıkları floresans özellikteki BODIPY® 493/503 ve b) Oil Red O çözeltisi ile muamelelerinin ardından tanımlanmıştır. iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.

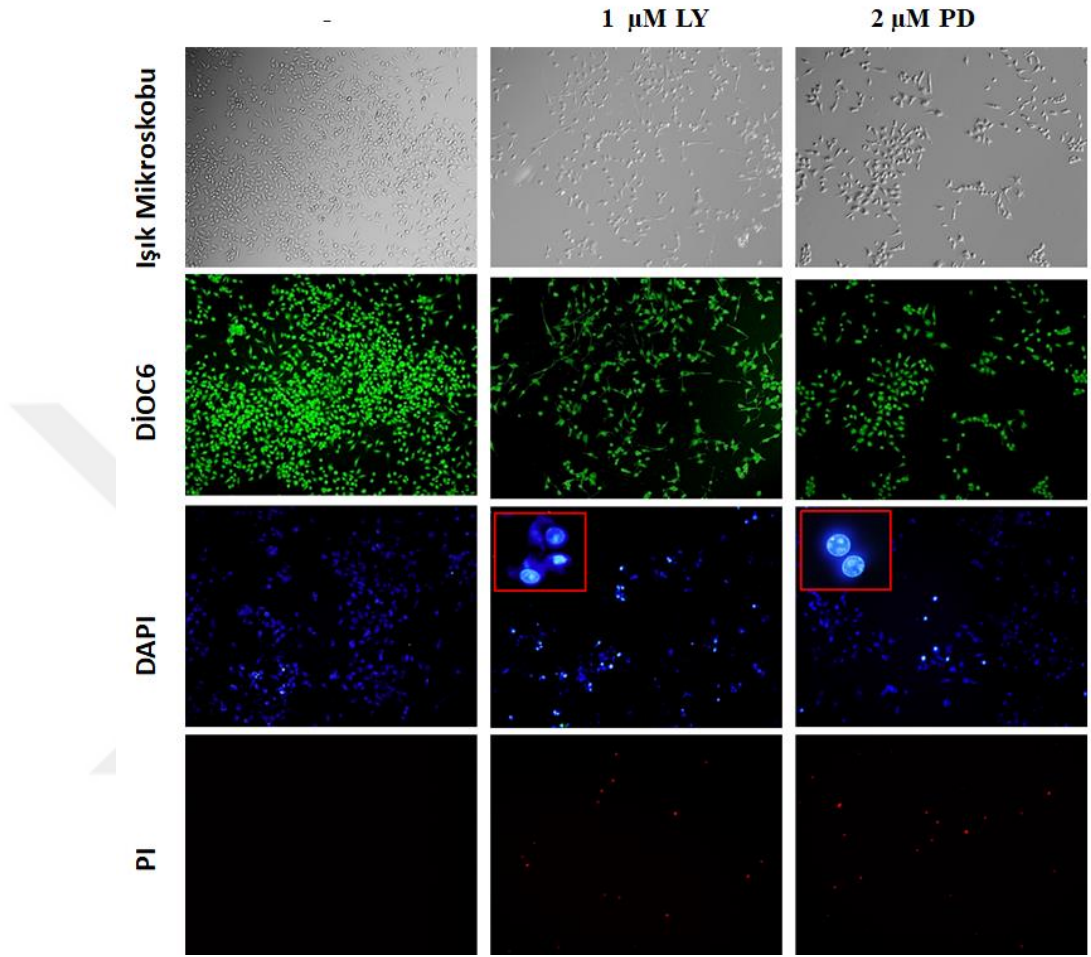
3.7 Abemaciclib ve palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde artan senesens ve döngüde takılı kalma süreci nedeni ile hücre ölüm kararının daha geç bir süreçte alındığı ve ölüm sinyal mekanizmasının aktif olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 29 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 hücrelerinde apoptoz sinyal yolağında rol alan belirteçler üzerindeki etkisinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. a) ve β -Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. b) Bağlı protein ifade miktarları GraphPad programı kullanılarak sütun grafik haline getirilmiştir Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2) (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Apoptozun öncü markırlarından Bax, Bak'ı aktive eder ve Bax ile Bak birlikteliği mitokondride por oluşumunu sağlayarak apoptoz sinyalinin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. MIA PaCa-2 hücrelerinde Bax ifadesi her iki CDK4/6 inhibitörleri tarafından artış gösterirken, Bak ifadesi ise abemaciclib uygulamasında anlamlı artış gösterdiği görülmüştür. Apoptozun gerçekleşmesinde rol alan efektör kaspazlardan kaspaz 9'un aktif formu olan kesilmiş kaspaz 9 ifadesi her iki CDK4/6 inhibitörleri tarafından artış göstermiştir. Son olarak apoptozun gerçekleştiği PARP'ın fragmentlerine ayrılmasına bağlı olarak kesilmiş PARP miktarlarındaki artış immunoblotlama ile Şekil 29 de gösterilmiştir.

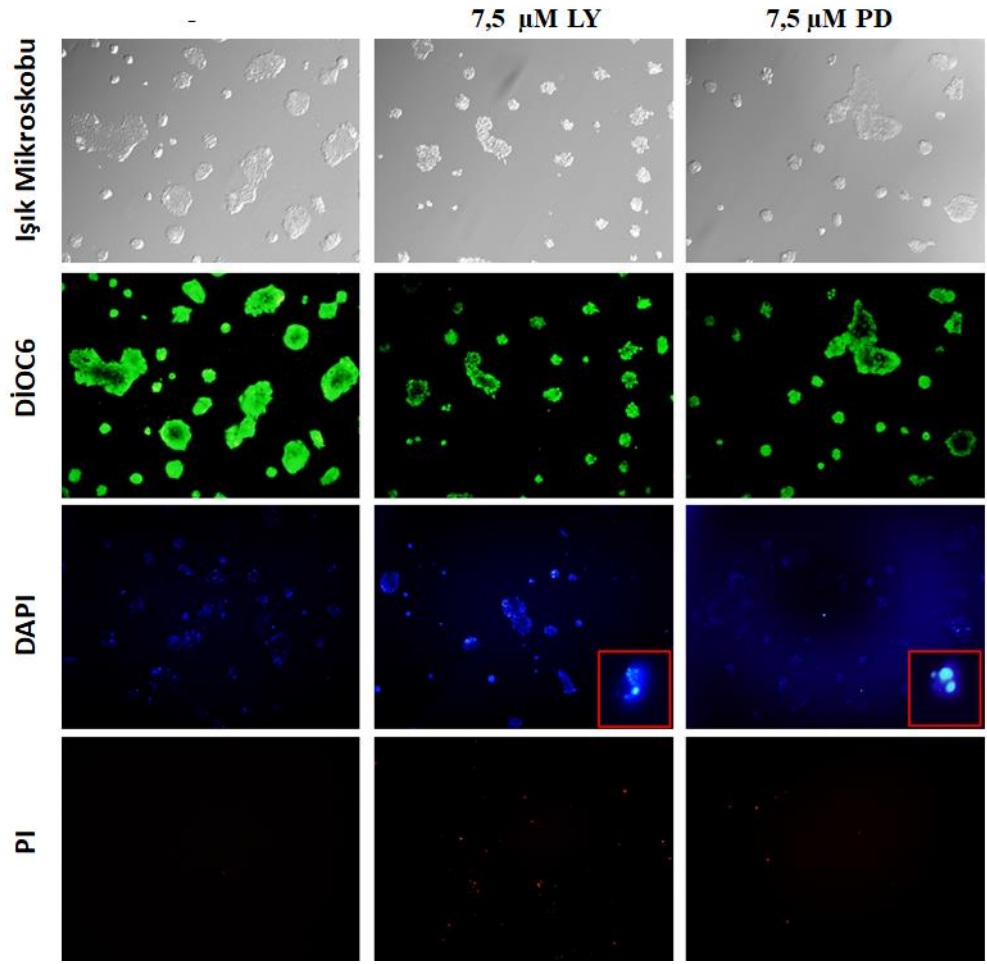
MIA PaCa-2



Şekil 30 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerindeki mitokondriyel membran potansiyeli, DNA kondenzasyonu, ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.

24 saat boyunca seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörleri uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli bozularak apoptotik hücre ölümünün tetiklendiği ve hücre canlılığının azaldığı DiOC6 boyama ile gözlenmiştir. Ayrıca apoptozun belirlenmesindeki bir diğer belirteç olan nukleustaki DNA fragmentasyonunun CDK4/6 inhibitörleri uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinde özellikle abemaciclib'in palbociclib' kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca MIA PaCa-2 uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin ölü hücre sayısını arttırdığı PI boyama ile tespit edilmiştir (Şekil 30).

Capan-2

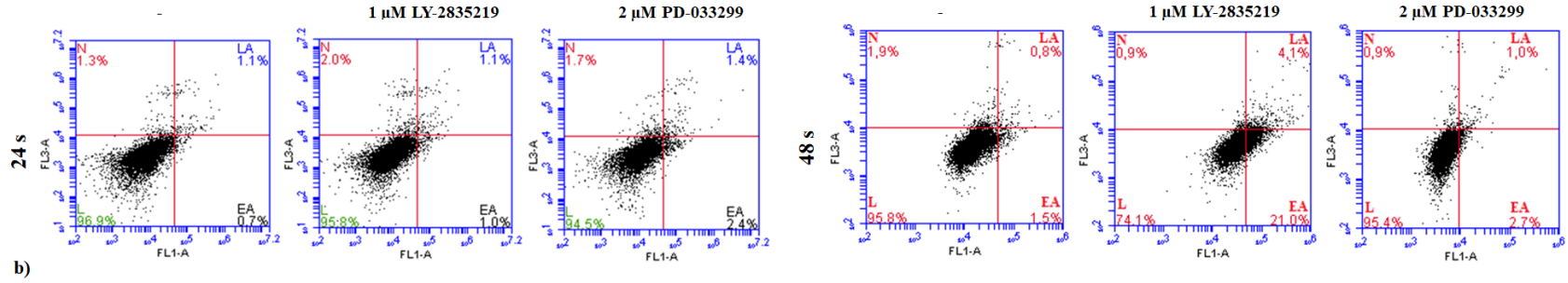


Şekil 31 Seçili dozlarda 24 saat boyunca uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin Capan-2 pankreas kanseri hücrelerindeki mitokondriyel membran potansiyeli, DNA kondenzasyonu, ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.

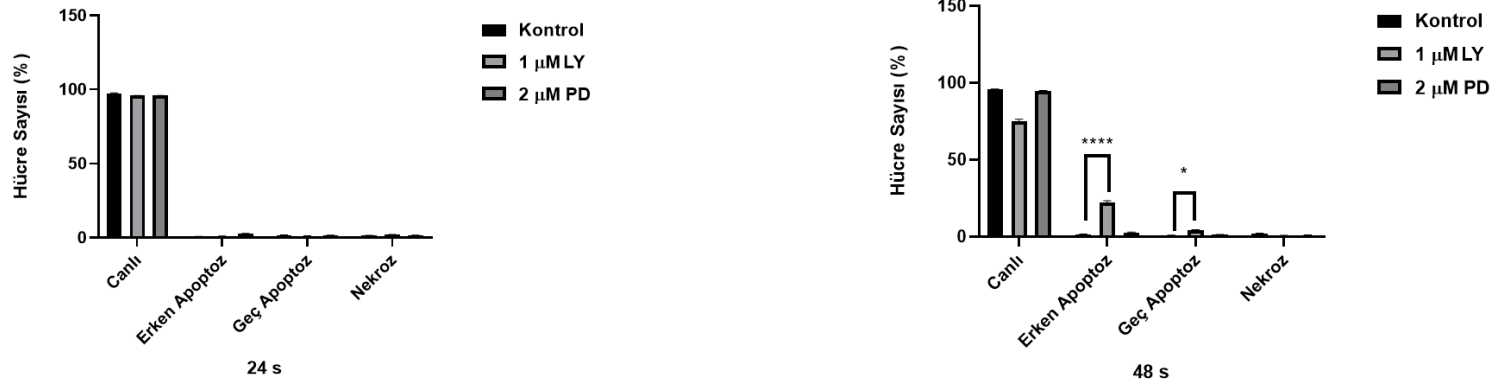
24 saat boyunca seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörleri uygulanan Capan-2 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli bozularak apoptotik hücre ölümünün tetiklendiği ve hücre canlılığının azaldığı DIOC6 boyama ile gözlenmiştir. Ayrıca apoptozun belirlenmesindeki bir diğer belirteç olan nukleustaki DNA fragmentasyonunun CDK4/6 inhibitörleri uygulanan Capan-2 hücrelerinde özellikle abemaciclib'in palbociclib'e kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca Capan-2 hücrelerine uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinden özellikle abemaciclib'in ölü hücre sayısını arttırdığı PI boyama ile tespit edilmiştir (Şekil 31).

a)

MIA PaCa-2

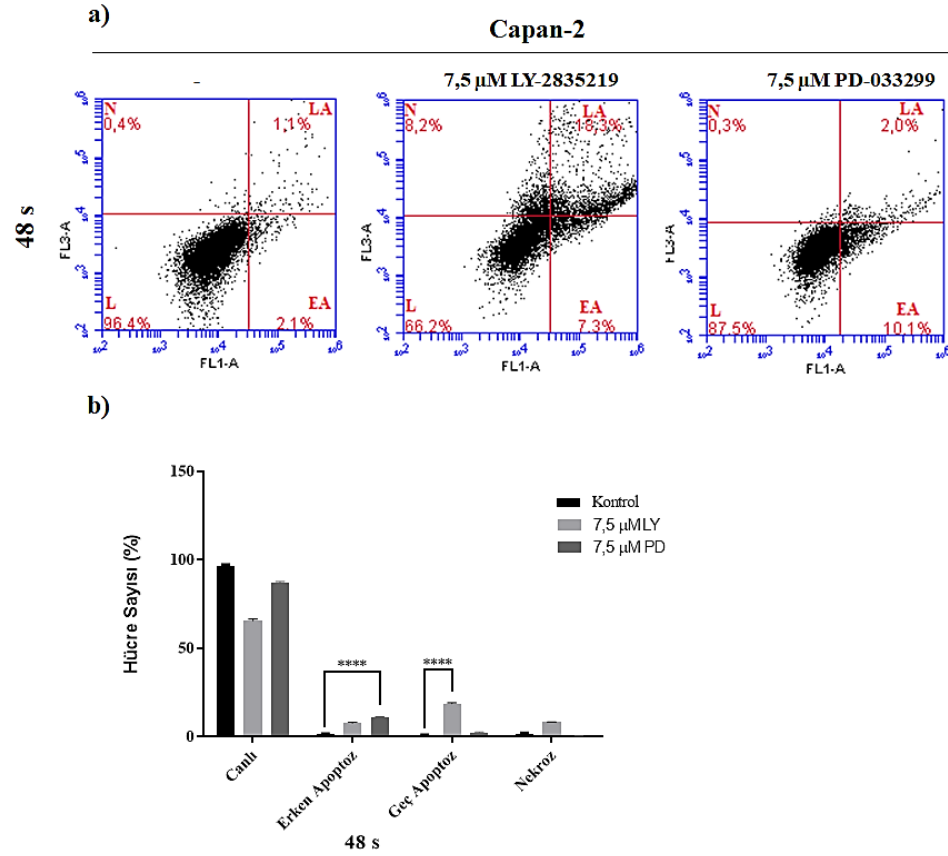


b)



Şekil 32 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde Annexin V/PI hücre ölümü analizi. a) Bu deney kapsamında abemaciclib ve palbociclib'in seçili dozlarında MIA PaCa-2 hücre hatlarında 24 ve 48 saat boyunca uygulanması sonucunda Annexin V ve PI boyaması hücrelere gerçekleştirilmiştir. Dört bölmeli grafik FL-1 ve FL-3' de boyama uyumlandırmasının ardından elde edilen kapıda 20000 olayın okunması ile çizilmiştir. b) Her bir kolon grafik en az iki biyolojik testin oranı olarak ortalama $\pm$ std hata olarak sunulmuştur (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

AnnexinV/PI boyamasının seçili dozların 24 saat uygulanması sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerinde tetiklenen hücre ölümü oranında anlamlı bir fark kontrol hücrelerine oranla gösterilememiştir. Ancak apoptotik hücre ölümünün gösterilebilmesi zamana bağımlı olarak seçili dozlarda bir çalışma ile irdelenmiştir. 48 saat boyunca her iki ilaç uygulaması yapılmış olup abemaciclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde apoptotik hücre ölümü popülasyonlarına etkisi %20 düzeyinde artış göstermiştir (Şekil 32-33). Ancak palbociclib uygulamasında MIA PaCa-2 hücrelerinde değişiklik gözlenmezken Capan-2 hücrelerinde %9 düzeyinde artış gözlenmiştir. Artan senesens ve hücre siklusunda takılı kalma süreci nedeni ile hücre ölüm kararının daha geç bir süreçte alındığını, ancak hücrenin moleküler markırlarının değişimi nedeni ile hücre ölümü emiri konusunda aktif olduğunu göstermektedir.



Şekil 33 Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde Annexin V/PI hücre ölümü analizi. a) Abemaciclib ve palbociclib'in seçili dozlarda Capan-2 hücre hatlarında 48 saat boyunca uygulanması sonucunda Annexin V ve PI boyaması hücrelere gerçekleştirilmiştir. Dört bölmeli grafik FL-1 ve FL-3' de boyama uyumlandırmasının ardından elde edilen kapıda 20000 olayın okunması ile çizilmiştir. b) Her bir kolon grafik en az iki biyolojik testin oranı olarak ortalama $\pm$ std hata olarak sunulmuştur (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$)

4. TARTIŞMA

Günümüzde var olan verilere göre, kanser gelişiminin çok kompleks bir süreç olduğu görülmekte olup tüm dünyada sıklıkla görülen son yüzyıl içerisinde ölüm nedenleri arasında yükselen bir sıralama ile en önemli sağlık problemlerinden biri haline gelmiştir. Hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalması olarak ifade edilen kanser, invazyon ve hücrelerin orjinden ya da primer bölgeden vücudun diğer bölgelerine yayılması ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Giderek artan yaşlı nüfus oranı ve ilerleyen teknoloji ile birlikte çevresel karsinojenlere maruz kalmaya bağlı olarak kanser oranının doğrusal olarak artmaya devam edeceği düşünülmekte olup dünya çapında kanserden kaynaklı ölümlerin, 2030 yılında yaklaşık 13,1 milyon ölümle %70 oranında bir artışla artmaya devam edeceği öngörülmektedir [78] [79] [80] [81].

Tezde konu alan pankreas kanseri, dünya nüfusu arasında insidansı ve mortalite oranı son yıllarda önemli ölçüde artmaktadır. Erkeklerde kadınlara göre biraz daha yaygın olup son zamanlarda neredeyse görülme sıklığı eşit düzeye ulaşmıştır [4] [2] [82]. Bunu sağlayan risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, sigara tüketimi, uzun süreli alkol tüketimi, aile öyküsü, kronik pankreatit, geçmişte batin bölgesine radyasyon uygulamaları ve son zamanlarda araştırma konusu olan obezitenin yer aldığı bilinmektedir [12] [13] [80].

Pankreas kanserinde tedavi öncelikli yöntem, cerrahi olarak tümörün çıkarılması olup ameliyat sonrası dönemde kemoterapi ve radyoterapi neredeyse hastaların tümünde ihtiyaç haline gelmektedir. Ancak lokal ileri evrede kemo-radyoterapi ile kitle boyutlarında küçülme sağlanarak cerrahi şans elde edilebilmektedir. Erken teşhisi ve tedavi imkanı son derece kısıtlı olan pankreas kanseri, terapotik stratejilere karşı son derece dirençli olduğundan bazı tedavi yöntemlerinin yetersiz kalmasında rol alan ve sıklıkla görülen *KRAS*, *SMAD*, *TP53*, *CDK2NA* gibi mutasyonların varlığında agresif profil izlemektedir [83] [84] [85] [86] [87]. Bu sebeple pankreas kanseri hücrelerinde ilaçların etkinlik düzeylerini olumsuz yönde etkilemektedir. En büyük sorun haline gelen bu durum yeni terapi modellerinin gelişmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır.

Hücre döngüsünün düzensizliği, yüksek metastatik potansiyeli olan kanser hücrelerinde anormal hücre proliferasyonunu teşvik etmektedir [88] [89] [90]. Bu durum kanserin yaygın özelliklerinden biri olduğundan CDK'yı hedefleyen yeni ajanlar yeni tedavi yöntemleri için ilgi çekici bir seçenek olmuştur. Spesifik CDK4/6 inhibitörleri olan palbociclib ve abemaciclib, hücre çoğalmasını G1 fazında tutulu kalmasını sağlayarak ve Rb 'nın fosforilasyonunu engelleyerek DNA sentezini baskıladıkları ve bu sayede hücre proliferasyonunu azaltarak apoptozu indüklemeleri önemli bir anti-kanser özelliğine sahip olduklarının göstergesidir. Anti-kanser etkileri sayesinde tümör oluşumuna dahil olan hücre sağkalımı ve ölümünde rol alan çeşitli moleküler hedefler bildirilmiştir. Bu hedefler doğrultusunda CDK4/6 'yı aktive edecek olan siklinlerin, PI3K/Akt/mTOR, Ras/MAPK ve diğer proteinlerin oluşturduğu sinyal kaskadı sayesinde uyarıldığı bilinmektedir [91] [92] [93]. Ayrıca hücre içi major enerji sensörü olarak görev alan adenosin monofosfat aktive protein kinaz (AMPK) gibi moleküler hedeflerin aktivitesindeki değişimler hücre agresifliğinde önemli roller oynamaktadır. Genellikle AMPK aktivitesindeki azalma tümör oluşumunu indüklediği bilinmekle birlikte hücre siklusundaki düzensizlikler nedeniyle aktiflenen CDK4 ile AMPK arasındaki zıt etkileşim, güncel terapötik hedefler içerisinde klinikte yer alan CDK4/6 inhibitörlerinden palbociclib'in AMPK ilişkili etkileri dikkati çekmektedir [94] [95] [62]. Aktif CDK4, glikolizi arttırarak, AMPKα2 alt biriminin doğrudan fosforilasyonu yoluyla AMPK aktivitesini inhibe eder ve yağ asidi oksidasyonunu baskılayıcı etkiler göstermektedir [96] [97]. Ayrıca siklin D1, CDK4'ten bağımsız olarak mitokondriyal disfonksiyona sebep olabileceği, asetil-CoA karboksilaz gibi mitokondride yer alan proteinlere etki ederek lipojenik enzimlere doğrudan bağlanabilir olduğu ve yağ asidi sentezine katılabileceği belirtilmiştir [98] [99] [100].

İlk olarak CDK4/6 inhibitörleri daha çok menopoz sonrası kadınlarda görülen östrojen reseptörü (ER) pozitif/HER2 negatif ileri meme kanseri tedavisinde in vivo olarak, meme kanseri ksenogreflerinde önemli ölçüde tümör aktivitesini baskıladığı gösterilmiş olup tek başına veya kombine terapi ajanı olarak tercih edilebilmektedir. Palbociclib ile benzer yapısal özellik gösteren abemaciclib CDK4/6 dışında CDK9 etki ettiği gösterilmiş olup farklı moleküler hedefleri nedeni ile terapötik anlamda dikkati çekmektedir [88] [101] [102]. Meme kanseri dışında ilerlemiş solid tümörlerde Hodgkin

dışı lenfoma, multiple miyelom, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda, çocuklarda görülen akut lenfoblastik lösemide, akciğer, pankreatik ve metastatik kolorektal kanserli hastalarda da klinik çalışmaların hala daha sürdürüldüğü ve bir takım başarıların elde edildiği bildirilmiştir [91] [103] [104] [105]. Kanser hücrelerindeki metabolik farklılıklardan dolayı palbociclib ve abemaciclib'in her kanser hücresindeki etkileri aynı olmamakla birlikte farklı moleküler mekanizmalar üzerinden yanıt oluşturmaktadır. Bu bilgiler ışığında literatürde özellikle pankreas kanseri panel hücrelerinde kısıtlı araştırmaların olması sebebiyle yeni araştırmaların olmasına bağlı olarak tez kapsamında farklı genomik özelliklere sahip MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücre hatlarında CDK4/6 inhibitörlerinin AMPK'nın etkileşimde olduğu üst ve alt sinyal yolları üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerine uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin hücre canlılığına olan etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde doza bağımlı (0-10 μ M) olarak 24 saat uygulama sonucunda bağıl hücre canlılığının ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerine oranla azaldığı her iki ilaç uygulamasında gösterilmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde her iki ilaç için benzer sitotoksikite cevapları verdiği görülürken abemaciclib (1 μ M) ve palbociclib (2 μ M) için sırasıyla %48 ve %58 oranında hücre canlılığı saptanmıştır. Capan-2 hücrelerinde abemaciclib (7,5 μ M) ve palbociclib (7,5 μ M) için sırasıyla %60 ve %80 oranında hücre canlılığı saptanırken MIA PaCa-2 hücrelerine kıyasla daha dirençli bir profil sergilemiştir. Ayrıca Capan-2 hücreleri palbociclib'e kısmi olarak duyarsız olup abemaciclib'e duyarlı olduğu saptanmıştır (Şekil 10). Her iki CDK4/6 inhibitörünün hücreler üzerindeki etkisinin farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak *KRAS*, *TP53* ve *CDK2N/p16* genlerinin mutasyonuna sahip yüksek metastatik profil gösteren MIA PaCa-2 hücrelerinin, *KRAS* mutasyonuna sahip düşük metastatik profil gösteren Capan-2 hücre hattından daha düşük ilaç dozlarında etkili olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum daha önceki yapılan çalışmalar doğrultusunda anjiyojenik potansiyeli ve tümör oluşumunu tetikleyen siklooksijenaz-2 (COX-2) ifadesinin MIA PaCa-2 hücrelerinde yok denecek kadar az olması ve Capan-2 hücrelerinde yüksek olması CDK4/6 inhibitörlerine karşı direnç mekanizmasının gelişmesine neden olabileceğini düşündürmektedir [106] [107] [108]. Literatürde yer alan hücre canlılığı testi

çalışmalarında HCC1806, MCF-7, MDMB-231 ve MDMB-436 meme kanseri hücrelerine 1-2,5-5-10 μ M palbociclib dozları uygulanmış olup roskovitin (1000 nM) ile kombine tedavisi gerçekleştirilirken A549 akciğer kanseri hücrelerinde 500 nM uygulanan palbociclib trametinib (25nM) ile kombine tedavisi gerçekleştirilmiştir [109] [110]. BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2, PANC-1 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerine uygulanan palbociclib'in zamana ve doza bağlı (0,5-5-10 μ M) olarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir [111] [112]. Ayrıca yapılan bir başka çalışmada palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 ve PANC-1 pankreas kanseri hücreleri için etkili dozların 2 μ M ve 3 μ M olduğu ifade edilmiştir [113]. Abemaciclib ile yapılan hücre canlılığı testi çalışmaları ele alındığında; MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 0,1-1-10 μ M dozları zamana bağlı olarak uygulanırken T47-D meme kanseri hücrelerinde 50 nM uygulanarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir [114] [102]. Farklı bir çalışmada meme kanseri (MDA-MB-453) ve endometriyal kanser (AN3CA ve KLE) hücrelerine uygulanan 500 nM abemaciclib'in hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [115] [116]. Bu anlamda MTT testi için belirlenen abemaciclib ve palbociclib dozlarının etkinlikleri yaptığımız çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Hücre canlılık testini destekleyeci bir başka çalışmada hücrelere uygulanan abemaciclib ve palbociclib'in koloni oluşturma kabiliyeti üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücre siklusunda kontrol hücrelere göre tutuklu kalmayı sağlayan CDK4/6 inhibitörlerinin koloni oluşumunu azalttığı görülmüştür. Capan-2 hücreleri MIA PaCa-2 hücrelerine kıyasla her iki ilacın düşük dozlarına maruz bırakıldığında daha hassasiyet göstermiş olup doza bağımlı bir şekilde koloni oluşturma potansiyellerine ket vurmuştur (Şekil 11). MTT testi sonucunda belirlenen her bir ilaç için seçili tek doz çalışmalarında MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde %50'nin üzerinde koloni sayısında azalma görülmüş olması seçili dozların etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 12). Ayrıca bu çalışma sayesinde MTT hücre canlılığında tespit edilen dozlardan daha düşük dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin hücre bölünmesi konusunda azaltıcı etkileri belirlenmiştir. Ele alınan pankreas kanseri hücrelerinin genelinde abemaciclib daha etkili bir terapötik etki gösterirken palbociclib'in kısmi terapötik etki gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde palbociclib'in doza bağımlı uygulamasının MIA PaCa-2 (2-3 μ M) ve Capan-2 (0,5-1-2 μ M) pankreas kanseri hücrelerinde koloni oluşumlarını azalttığı görülürken bir başka

çalışmada MIA PaCa-2 ve PANC-1 hücrelerine uygulanan abemaciclib'in ket vurucu etkisi tespit edilmiştir [111] [117] [113]. A549, H2030 ve HCC15 akciğer kanseri hücrelerine uygulanan palbociclib'in (500 nM) koloni formasyonuna kısmi terapötik etkisi gösterilirken hepatosellüler kasinom hücrelerinde ise doza bağımlı olarak uygulanan palbociclib'in ket vurucu etkisi dikkati çekmiştir [110] [118]. Buna bağlı olarak abemaciclib'in palbociclib'e kıyasla daha etkili olduğu ve genelde palbociclib'in kombine terapilerde daha çok başarı elde ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiş olup elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Yapılan bazı araştırmalar doğrultusunda AMPK'nin bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiği tümör hücresi proliferasyonunu ve hücre döngüsünü etkilediği ileri sürülmekteyken bazı araştırmacılar tarafından sağkalım faktörü olarak işlev gördüğü ileri sürülmekte olup bu konudaki çalışmalar sinyal yolları üzerindeki etki mekanizması ile ilişkili olarak değerlendirilmektedir [119] [120] [95]. Bu bilgiler ışığında AMPK susturma işlemine bağlı olarak her iki hücre hattı üzerindeki hücre proliferasyonuna etkisi koloni oluşturma potansiyelleri incelenerek irdelenmiştir (Şekil 13a). MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde siRNAI hedefi %50 oranında AMPK ifadesinde azalmaya neden olduğu immunoblotlama yöntemiyle gösterilmiştir (Şekil13b). MIA PaCa-2 hücrelerinde AMPK siRNA uygulanmayan kontrol hücrelerine kıyasla koloni oluşturma potansiyellerinde bir değişiklik olmadığı görülürken Capan-2 hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla özellikle AMPK siRNAI uygulamasında koloni oluşumlarının artış gösterdiği görülmüştür. Bu durum Capan-2 hücrelerinde AMPK ifadesindeki azalışın hücre proliferasyonunu tetikleyerek agresif bir özellik kazandırabilceğini düşündürmekte olup bu kapsamda halen çalışmalara devam edilmektedir. Daha önce yapılan pankreas kanseri panel hücre hatlarındaki çalışmalarda AMPK aktivite ifadesi, Capan-2 hücrelerinde MIA PaCa-2 hücrelerine kıyasla daha az olduğu immunoblotlama tekniği ile gösterilmiş olup uygulanan AMPK siRNA ile ifadesinin daha da azalmış olması Capan-2 hücrelerinin proliferasyonuna arttırabileceği düşüncesini desteklemektedir [119] [121]. Ayrıca KPC transgenik olarak tasarlanmış fareler üzerindeki in vivo çalışmalarda AMPK ifadesindeki azalışın pankreas kanser hücrelerinde invazif ve metastatik profil kazanmasını tetiklediği ileri sürülmüştür [120] [122] [123].

CDK4/6 inhibitörlerinin seçilen dozlarında 24 saat uygulamasına takiben PI boyama ile analiz edilen hücre siklusunda hücre popülasyonlarının dağılımları üzerindeki etkileri her iki hücre hattında da değerlendirilmiş olup ilaçların etkisi irdelenmiştir. Doza bağımlı (1 ve 2 μ M) olarak uygulanan abemaciclib'in MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde hücre siklusunda tutuklu kalmaya neden olmadığı ve SubG1 oranlarında kontrol hücrelere göre artış sağladığı tespit edilmiştir (Şekil 14). Hücre akış sitometri çalışmalarını destekleyici bir başka çalışma olan immunoblotlama yöntemiyle hücre siklusunda rol alan proteinlerdeki değişiklikler irdelenmiştir. Abemaciclib uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerindeki c-Myc ifadesinin doza bağımlı bir şekilde azalması ve tümör baskılayıcı olarak bilinen Rb'nin hipofosforile oluşu hücre sağkalımını azaltıcı etkileri konusunda bilgi sağlamıştır (Şekil 15). Doza bağımlı (2 ve 3 μ M) olarak uygulanan palbociclib'in MIA PaCa-2 hücrelerinde G1 fazında tutuklu kalma meydana gelmiştir (Şekil 16). Doza bağımlı olarak uygulanan palbociclib ise MIA PaCa-2 hücrelerindeki CDK4 ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemesine rağmen aktif form kazanmasında kritik rol oynayan regüle edici alt ünitelerinden siklin D1 ve hücre sağkalımında rol oynayan c-Myc ifadesinde azalışa, p-Rb hipofosforilasyonuna ve siklin-CDK aktivitesini düzenleyen iki inhibitör ailesinden biri olan p21 ifadesinde anlamlı artışa neden olarak hücre siklusunda tutuklu kalma durumunun moleküler mekanizması konusunda bilgi sağlayıcı bir veri sağlamıştır (Şekil 17). Bu anlamda elde edilen immunoblotlama sonuçları hücre akış sitometrisi çalışmalarını desteklemektedir. p-Rb immunoblotlama çalışmalarını desteklemek amacıyla ELISA yönteminden yararlanılmış olup seçili dozlarda uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerindeki p-Rb ifadelerini benzer şekilde hipofosforile ettiği tespit edilmiştir (Şekil 18). Yapılan çalışmalarda akciğer kanseri, meme kanseri ve pankreas kanseri (BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2 ve Capan-2) hücrelerinde palbociclib ve abemaciclib'in Rb hipofosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiş olup paralel sonuçlar elde edilmiştir [111] [117] [114] [124]. Ayrıca Capan-2 hücrelerine uygulanan abemaciclib'in (7,5 μ M) kontrol hücrelere kıyasla G1 fazında tutuklu kalma söz konusuysa palbociclib (7,5 μ M) uygulamasında G2/M fazında tutuklu kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 19). Bu veriler sonucunda seçilen dozlarda uygulama yapılan hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla anlamlı düzeyde hücre canlılığını azalttığı ve hücre

siklusunda G1 veya G2/M fazında tutuklu kalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. CDK4/6 inhibitörü olarak adlandırılan abemaciclib ve palbociclib'in kanser hücrelerindeki etkisinin sadece G1 fazında tutuklu kalmadığı ve buna bağlı olarak çeşitli CDK'lara affinite gösterebildikleri literatürde yer almaktadır. Abemaciclib diğer CDK inhibitörlerinden farklı olarak tipik bir Cdc2 benzeri kinazı olmayan transkripsiyonel CDK olarak bilinen tümör farklılaşmasında rol alan CDK9'u inhibe etme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak palbociclib ve bir başka CDK4/6 inhibitörü olan ribociclib çalışmalarında bu etkinin yok denecek kadar az olduğu bulgusuna varılmıştır [101] [88] [102]. Ayrıca 1 µM abemaciclib uygulanan çoklu miyelom (RPMI 8226) hücrelerinde apoptotik ölümle ilişkili subG1 popülasyonunda artış gözlemlendiği saptanırken MCF-7 meme kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarda abemaciclib'in hücre döngüsünde rol alan CDK1/siklin B ve CDK2/siklin E/A' inhibisyonu sayesinde G2 fazındaki hücreleri bloke ederek adaptif yanıtı önlediği bildirilmiştir. Hatta p-Rb yokluğunda bile sitotoksikite gösterip kanser hücrelerinde hücre yaşlanmasını veya apoptozu indüklediği ifade edilmiştir [125] [91] [126]. Palbociclib ve ribociclib'e maruz kalan kanser hücreleri daha çok G1 fazında tutuklu kaldıkları saptanırken abemaciclib'in aksine çok az hücre ölümüne ve daha çok hücre yaşlanmasını tetikledikleri ifade edilmiştir. Her ne kadar palbociclib'in abemaciclib'e kıyasla Siklin E/A tarafından yönlendirilen CDK2 ve siklin B/A tarafından aktive edilen CDK1 gibi diğer kinazlara karşı bariz aktivite göstermezken yapılan bir başka çalışma da MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı olarak G2/M fazında tutuklu kalabildikleri gösterilmiş olup yine meme kanseri hücrelerinde G1'den S fazına geçişte rol alan CDK2' ye etki ederek anti-proliferatif etkisi yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [127] [128]. CDK4/6 inhibitörleri MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinin sahip olduğu genomik özelliğe bağlı olarak hücre siklusunda farklı etki mekanizmaları geliştirdikleri görülmekte olup literatür bilgilerine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Hücresel yaşlanma, potansiyel olarak onkojenik strese maruz kalmış hücrelerde meydana gelen esasen geri dönüşümsüz hücre proliferasyonunun tutulu kalmasını sağlarken CDK4/6 inhibitörleri tarafından da tetiklenmektedir. Ayrıca Yaşlanma ile ilişkili beta-galaktosidaz, hücresel yaşlanmanın bir biyobelirteci olup, yaşlanmış hücrelerde pH 6 da endojen lizozomal beta-galaktosidaz birikimi ve aşırı ekspresyonuyla

karakterizedir [56] [129]. Abemaciclib ve palbociclib'in hücre yaşlanması açısından indükleyici rolleri, MIA PaCa-2 hücrelerinde neredeyse aynı pozitif (β -Gal +) etkiyi gösterirken Capan-2 hücrelerinde özellikle palbociclib uygulamasında belirgin bir şekilde pozitif boyama saptanmıştır (Şekil 20). Ancak Erken evre yaşlanma, hücreyi transformasyona karşı korurken uzun süreli yaşlanma çoğunlukla kanser gelişimini desteklediği bir başka çalışmada ifade edilmektedir. Bunun sebebi büyümeleri her ne kadar durdurulsa da metabolik olarak aktif olmaları hücre dışı matrisi değiştiren matris metaloproteinazların (MMP) ekspresyonunu arttırabileceğini ve enflamatuar sitokinler olan IL-6 ve IL-8'in yanı sıra enflamatuar hücreleri çeken kemokinleri eksprese ederek çevredeki komşu hücreleri etkileyebileceğinden tümör oluşumunu tetikleyebileceği bildirilmiştir [56] [130] [131]. Ancak bu verilerin aksine bazı araştırmacılar tarafından terapi modeli olarak geliştirilip kanser hücrelerinde yaşlanmayı teşvik ederek kemoterapilerin kaçınılmaz toksisite ve istenmeyen yan etkilerini azaltabileceği vurgulanmıştır [56] [132] [133]. Hatta palbociclib uygulaması sonucunda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, AGS mide kanseri hücrelerinde ve MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde hücre yaşlanmasını tetikleyerek ilgili moleküler mekanizmaların kontrolü dahilinde terapötik stratejilerin geliştirildiği gösterilmiştir [134] [135].[136]. Görüldüğü üzere kanser gelişimi sırasında yaşlanmanın düzenlenmesi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte karmaşıklığı tartışma konusudur. Ayrıca yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidazın (SA-gal-gal) pozitif boyaması dışında yaşlanan hücrelerin moleküler özellikleri genellikle p21 ve/veya p16 gibi doğal hücre döngüsü inhibitörlerinin ifadesindeki artış ile ilişkili olup aynı zamanda epigenetik çalışmalar dahilinde ifade edilebilmektedir [137] [138].

Yapılan çalışmalar ve bilgiler doğrultusunda abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerindeki AMPK değişimine bağlı olarak hücre sağkalım sürecine etki mekanizmaları immunoblotlama yöntemiyle desteklenmeye çalışılmıştır (Şekil 21-22). Pankreas kanseri panel hücre hatları arasından MIA PaCa-2, sahip olduğu mutasyonlara bağlı olarak metastatik profil gösteren iyi bir pankreas kanseri modeli olabileceği düşünülmüş ve öncelikli olarak doza bağımlı iki farklı doz ile abemaciclib ve palbociclib'in terapötik mekanizmaları irdelenmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde PTEN seviyeleri palbociclib için uygulama yapılmayan kontrol hücrelere göre değişmemiştir.

Major değişiklikler değerlendirildiğinde palbociclib'in PI3K ve abemaciclib'in AKT inhibisyonu aracılı olarak hücre sağ kalımına ket vurma potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Abemaciclib ve palbociclib uygulaması sonucunda GSK3 β inhibe edici fosforilasyonun (Ser9) MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde azalıyor olması dikkati çekmektedir. Hatta önceki yapılan çalışmalarda palbociclib'in koloni oluşturma potansiyelleri her ne kadar kontrole kıyasla azalmış olsa da artan dozlarda belli seviyede kalıp direnç mekanizması oluşturma sebebi olarak GSK3 β 'i inhibe eden Ser9 fosforilasyonunun gerçekleşmemesinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca palbociclib uygulanan kolon kanseri ve meme kanseri hücrelerinde de benzer durum gözlemlenmiştir [139] [103] [140].

Hücre sağkalım ve ölümü konusunda MIA PaCa-2 hücrelerinde doza bağımlı olarak abemaciclib ve palbociclib'in terapotik mekanizmaları açısından AMPK fosforilasyonu araştırılmıştır. Palbociclib, MIA PaCa-2 hücrelerinde çok anlamlı olmayan miktarda AMPK aktivasyonuna (kontrol hücelere oranla) neden olmuştur. Abemaciclib ise doza bağımlı bir şekilde AMPK aktivitesini düşük doz uygulamasında (1 μ M) azaltırken, daha yüksek dozda (2 μ M) uygulama sonucunda AMPK aktivasyonuna (kontrol hücelere oranla) belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Fosforile edilmiş mTORC1, aşağı sinyal iletim efektörleri; ökaryotik translasyon başlama faktörü supresörü (4EBP1) ve p70S6 kinaz (S6K) aracılığıyla hücre büyümesini, hücre siklusu devamlılığını ve hücre metabolizması için gerekli proteinlerin translasyonunu sağlamaktadır [141] [142]. Buna bağlı olarak MIA PaCa-2 hücrelerinde p-mTOR aktivitesinde (palbociclib) ve p70S6K (hem abemaciclib hem palbociclib) aktivitesinde azalma anlamlı sonuç olarak değerlendirilmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerine uygulanan abemaciclib ve palbociclib için başta belirlenen iki farklı doz arasından ılımlı ve orta düzeyli sitotoksik etki gösteren her iki ilaç için tek doz belirlenmiş olup *KRAS* mutasyonuna sahip düşük metastatik profil gösteren Capan-2 hücre hattı çalışmalara dahil edilmiştir (Şekil 23-24). MIA PaCa-2 hücrelerinde p-PTEN Ser380 fosforilasyon ifadesi her iki ilaç tarafından arttırılmakta olup, Capan-2 hücrelerinde bu etki gözlenmemiştir. PTEN, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağıyla ilişkili olup tümör baskılayıcı rolü PTEN'in Ser380'de fosforile ediliyor olması AMPK fosforilasyonu ile aynı eksen de bulunan LKB1'in aşağı sinyal yolu ile AKT sinyal kaskadına etki ederek hücrelerde metabolik karar alma sürecine katıldığını

göstermektedir [143] [144] [145]. Buna bağlı olarak palbociclib uygulamasında her iki hücre hattında AMPK Thr 172 ile korelasyon gösteren p-PDK-1 ifadesinin azalması kritik önem taşıyken abemaciclib uygulanan her iki hücre hattında p-PDK1 ve p-AKT ifadelerinde azalma anlamlı sonuç olarak değerlendirilmiştir. CDK4/6 inhibitörleri arasındaki AMPK ilişkili sinyal kaskadlarının düzenlenmesindeki rolünün daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için AMPK aşağı sinyal yolları irdelenmiştir. CDK4/6 inhibitörleri uygulanan her iki hücre hattında mTOR Ser2448 fosforilasyon ifadesi, PRAS40 ile etkileşime girerek mTOR aktivasyonunda rol alan Raptor ifadesinin ve buna bağlı olarak p-p70S6K ifadesinin Capan-2 hücrelerinde anlamlı bir şekilde azalması kritik önem taşıyırken kanser hücrelerinde protein sentezi, hücre sağkalımı ve proliferasyonu azaltıcı etkisi dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalarda palbociclib uygulanan PSN1 ve CFPAC-1 pankreas kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak p-AKT ve p-S6K ifadelerinde azalış saptanırken MIA PaCa-2 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik göstermemesi elde edilen sonuçlardaki kısmi etkisi açısından benzerlik göstermektedir [146]. Ayrıca doza bağımlı abemaciclib ve palbociclib uygulanan akciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada p-p70S6K ifadesindeki azalışın hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkisi üzerinde durulmuştur [135] [147]. Abemaciclib ve palbociclib uygulanan hepatosellüler karsinom (HCC) hücrelerinde AMPK aktivasyonunun indüklenerek CDK4/6 'dan bağımsız bir şekilde tümör oluşumlarının azaldığı in vitro ve in vivo olarak Huh7 ksenograft farelerde gösterilmiştir. Ancak aynı çalışmada Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinde doza bağımlı olarak uygulanan abemaciclib'in özellikle 15 µM dozunda AMPK aktivitesini azaltmasına rağmen tümör oluşumunu engellediği görülmektedir [148]. Hatta AMPK'dan bağımsız bir şekilde çeşitli mutasyonların (*TSC2^{+/+}/P53^{-/-}* ve *TSC2^{-/-}/P53^{-/-}*) oluşturulduğu MEF hücrelerinde mTORC1'in baskılanabileceği gösterilmiştir [149]. Bu çalışmalar elde ettiğimiz sonuçlara paralellik göstermektedir. Panc-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücreleriyle yapılan çalışmada AMPK aktivitesindeki kaybın kanser hücreleri üzerinde Isı şok faktörü 1 (HSF-1) sinyal yolağına bağlı olarak invazif ve metastatik profil kazanmalarını tetiklemiştir. Bu çalışmaların aksine AMPK aktivasyonunun anti-tümörjenik etkilerinin yanı sıra pro-tümörjenik etkilerinin olduğunu savunan çalışmalarda mevcuttur [120] [150]. Kanser temel özellikleri arasından

bilinen enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi son derece kritik önem taşımaktadır. Bu anlamda enerji metabolizmasında rol alan kanser hücrelerindeki AMPK aktivasyon seviyelerinin araştırılması gerekmektedir. MIA PaCa-2 hücrelerindeki AMPK aktivasyonunun Capan-2 hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir [119]. Aynı çalışma da uygulanan AMPK inhibitör çalışmalarıyla apoptotik sürecin hızlandırıldığı dikkati çekmiştir. Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada *KRAS* mutasyonlarındaki farklılıklar göz önünde bulundurularak pankreas kanseri hücrelerindeki AMPK inhibisyonuna bağlı olarak aerobik glikolizi azalttığı ve kısmen malign fenotipi baskıladığı ifade edilmiştir [151]. Literatürde yer alan bu çalışmalara bağlı olarak kanser hücrelerindeki AMPK anlatım seviyelerinin belirlenmesi gerektiği, uygulanan ilaçların AMPK aktivasyonuna ne şekilde etki ettiği ve diğer sinyal yollarına bağlı olarak ne şekilde sağkalım ölüm sinyali oluşturdıkları terapötik hedef anlamında önem arz etmektedir. Birçok araştırmacı tarafından tartışma konusu olan kanser hücrelerindeki AMPK seviyeleri üzerindeki terapötik strateji merak konusu olup halen daha metabolik süreçteki etki mekanizması araştırılmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda yaptığımız çalışmaların hücre açlığı sonucunda azalan p-mTOR Ser2448/mTOR oranı AMPK aktivitesinin artışı ile palbociclib uygulanan hücrelerde korelasyon sağlamakta olup, abemaciclib uygulanan hücrelerde hücre açlığının mTOR üzerinde metabolik olarak sensör mekanizma ile algılandığını göstermektedir.

Ayrıca küçük molekül kinaz inhibitör tedavisine karşı ortaya çıkan direncin değişen lipid metabolizmasının yeniden düzenlenmesi ve PI3K/AKT/mTOR sinyal kaskadı ile ilişkili olarak kanser hücrelerinin proliferasyonuna ve hayatta kalmasını destekleyen kritik bir mekanizma olduğu bilinmektedir [152] [153] [154]. Buna bağlı olarak seçili dozlarda abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde AMPK'nın alt moleküler sinyal yollarından biri olan lipid düzenlenmesi üzerine etkileri irdelenmiştir (Şekil 25-26). Palbociclib, MIA PaCa-2 hücrelerinde fosforile AMPK (Thr172) ifadesi çok anlamlı olmayan miktarda AMPK aktivasyonuna (kontrol hücrelere oranla) neden olurken Capan-2 hücrelerinde belirgin bir şekilde artış görülmüştür. Ancak abemaciclib uygulanan Capan-2 hücrelerinde p-AMPK ifadesindeki azalma dikkat çekmiştir. AMPK'nın alt birimlerinden biri olan düzenleyici izoform $\beta 1$, glikojene bağlanmaya aracılık eden bir karbonhidrat bağlayıcı module sahip olup α ve γ alt birimlerinin

bağlanmasında bir iskele görevi görerek fosforile aktif formları AMPK α ile korelasyon göstermektedir. Yapılan bir çalışmada AMPK β 1 ifadesindeki artışın lipogenezi baskılayarak p53 mutant fare modellerinde tümör progresyonunu sınırlayıcı etkisinin olabileceği ifade edilmiştir [155] [156]. Bununla ilişkili olarak palbociclib, MIA PaCa-2 hücrelerinde fosforile AMPK β 1 (Ser182) aktivasyonuna (kontrol hücrelere oranla) neden olmuştur. Kanser hücrelerindeki üçüncü tip yakıt kaynağını oluşturan ve asetil-CoA (ACC) üretimine bağlı olarak trikarboksilik asit/ krebs (TCA) döngüsüne katılan yağ asitleri, tümörgenezi tetiklediği bilinmektedir [66] [154] [157]. ACC fosforilasyonu, MIA PaCa-2 hücrelerinde hem abemaciclib hemde palbociclib uygulamasında benzer şekilde artış gösterirken Capan-2 hücrelerinde sadece palbociclib uygulamasında artış göstermiştir. p-ACC (Ser79) inhibe formundaki ifade artışı CDK4/6 inhibitörlerine cevap mekanizması bakımından ve AMPK ile beraber çalışan ACC'nin stres durumunda tetiklendiğinin göstergesi olup. fizyolojik olarak açlık veya ciddi stres koşullarında artan AMPK ve ACC fosforilasyonları lipid biyosentezinin azalmasının göstergesidir [158] [159] [160]. ACLY, sitosolik sitratın asetil CoA ve oksaloasetata dönüşümünü katalize ederek de novo lipogeneze rol oynayan anahtar bir enzimdir. ACLY'nin çeşitli tümör tiplerinde düzenlenmesi, yağ asidi sentezini arttırmaktadır. Pankreas kanseri hücreleriyle yapılan çalışmada ACLY ifadesindeki baskılanmanın tümör oluşumunda rol alan Warburg etkisini azaltacağı yönünde bilgiler mevcuttur [154] [161] [162]. Bu anlamda ACLY fosforilasyonu, palbociclib uygulamasında MIA PaCa-2 hücrelerinde (kontrol hücrelerine kıyasla) azalması anlamlı olarak değerlendirilmiştir Her iki ilaç uygulamasında Capan-2 hücrelerindeki ACLY ifadesi değişmezken ilginç bir şekilde her iki ilaç uygulamasında MIA PaCa-2 hücrelerinde artışa sebep olmuştur. Bununla ilişkili Lipit metabolizması ve aynı zamanda adipogeneze rol alan Lipin-1 protein ifadesi MIA PaCa-2 hücrelerinde herhangi bir değişkenlik gözlenmezken, abemaciclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde yağ asidi sentezini katalizleyen FASN ifadesindeki azalışın lipit metabolizmasına olan etkisini anlamada belirleyici rol oynamaktadır. Hatta pankreas kanseri hücreleriyle yapılan çalışmalarda FASN inhibisyonun apoptotik süreci hızlandırdığı ifade edilmiştir [154] [163] [164] [165]. Bu bilgiler bir sonraki kısımda yer alan hücre ölümü çalışmalarını destekler niteliktedir. MIA PaCa-2 hücrelerinde adiposit olgunlaşmasında rol alan ve Lipin-1 tarafından

module edilen PPAR γ (peroksizom-proliferatör ile aktive edilmiş reseptör γ) ifadesinde her iki CDK4/6 inhibitörü tarafından azalış görülmüştür. Pankreas kanseri ve karaciğer kanseri hücreleriyle yapılan çalışmalarda PPAR γ ifadesindeki aşırı ekspresyonun hücre proliferasyonunu desteklediği, apoptozu inhibe ettiği ve hücrelerde lipid birikimine yol açarak enerji metabolizmasının yeniden düzenlendiği bildirilmiştir [69] [166] [167] [168]. Bu durumda abemaciclib ve palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerindeki PPAR γ 'daki azalışın anlamlı olabileceğini düşündürterek yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ancak aşırı PPAR- γ kaybının da kanser hücrelerindeki proliferasyonu arttırdığı bilinmektedir. Kemoterapötik ilaçların PPAR- γ ekspresyonunu indükleyerek küçük hücreli olmayan akciğer kanserini inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca CDK4/6 inhibitörleri uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerindeki hücre içi lipid profilleri, Oil Red O boyama ve floresans bir prob olan BODIPY® 493/503 boyama ile lipid damlacıklarındaki değişimlerin gösterilmesi amaçlanmıştır (Şekil 27-28). Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörleri uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde kontrole kıyasla Oil Red O tutulumunun ve lipid damlacıklarını gösteren yeşil floresan oranında azalma palbociclib'e kıyasla abemaciclib uygulamasında daha belirgin olmuştur. Bu veriler immunoblotlama deneylerini destekler nitelikte olup ilaçların lipid damlacıkları üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda BODIPY® 493/503 boyama ile belirlenen SK-BR-3 ve MDA-MB-361 meme kanseri hücrelerindeki lipid damlacıklarındaki artışın kanserin kötü prognozunu etkilediğini göstermiştir. Bir başka çalışmada ise Oil Red O ve BODIPY® 493/503 boyama ile pankreas β hücrelerindeki fonksiyon bozukluklarının hücre içerisindeki lipid birikiminden kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca elde edilen MIA PaCa-2 sonuçlarıyla benzerlik gösteren PPAR γ 'nın aşırı ekspresyonuna bağlı olarak lipid damlacıklarının oluşumundaki indükleyici etkisi Oil Red O ve BODIPY® 493/503 boyama ile gösterilerek yapılan in vivo çalışmalarla desteklenmiştir.[169] [170] [168].

Söz konusu hücre canlılığının nasıl azaldığı konusuna ilişkin mekanizma tarafından tetiklenen hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlayabilmek için apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişime bağlı olarak içsel yolak aracılı apoptotik süreçte apoptozun öncü markırlarından Bax, Bak'ı aktive eder ve Bax ile Bak birlikteliği

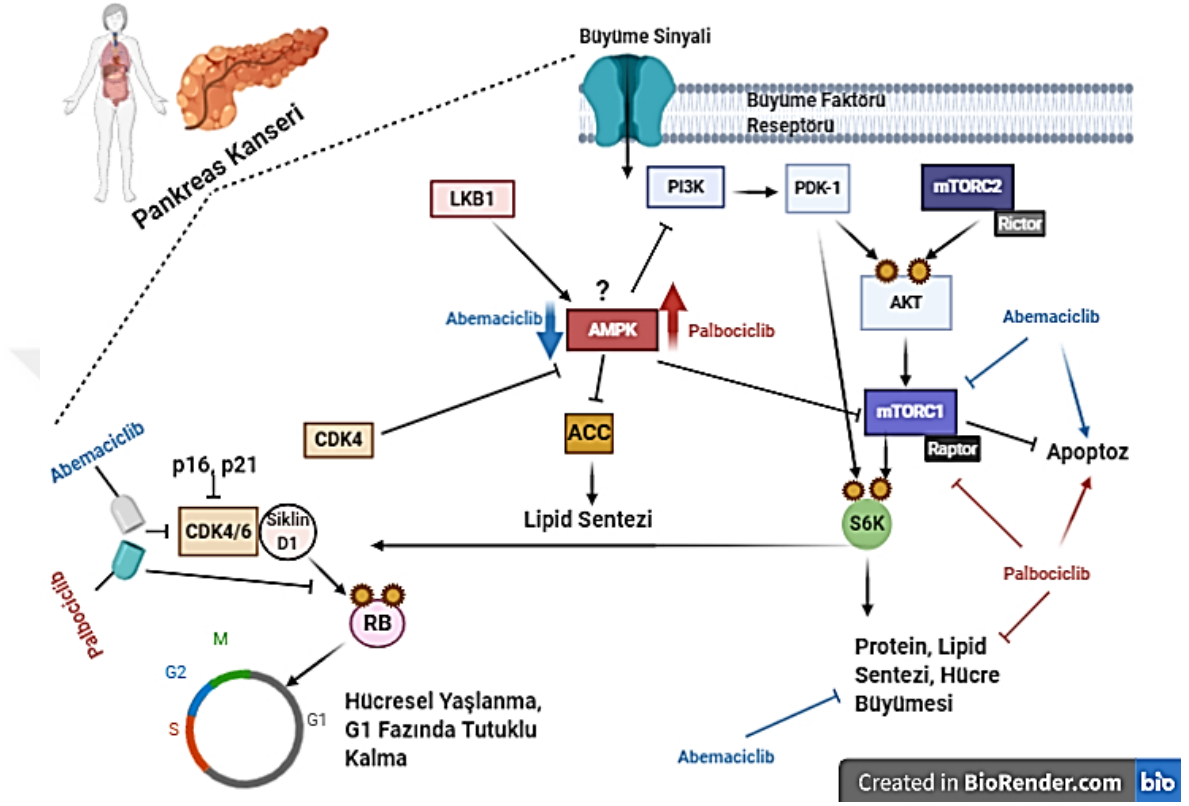
mitokondride por oluşumunu sağlayarak apoptoz sinyalinin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır [171] [172]. MIA PaCa-2 hücrelerinde mitokondriye bağlı içsel yolak üzerinden Bax ve Bak ifadesindeki artışa bağlı olarak, efektör kaspazlardan kaspaz 9'un aktif formu olan kesilmiş kaspaz 9 ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca kaspazların hedefi PARP'ın fragmentlerine ayrılması son aşama olarak apoptozun gerçekleşmesinde kritik önem taşımaktadır [173] [174] (Şekil 29). İmmunoblotlama çalışmalarını destekleyici floresan çalışmaları ele alındığında seçili dozlarda uygulanan CDK4/6 inhibitörlerinin MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptotik hücre ölümünü tetiklediği ve hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde abemaciclib'in palbociclib'e kıyasla hücre ölümünü arttırdığı ve buna bağlı olarak DNA fragmentasyonunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 30-31). Ayrıca abemaciclib uygulanan A549 akciğer kanseri hücrelerinde otofajinin inhibisyonuna bağlı olarak sitoplazmik vakuol oluşumuna neden olduğu görülmüş ve atipik hücre ölümüne neden olabileceği bildirilmiştir. Meme kanseri hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada ise 1 µM uygulanan abemaciclib'in p-Rb hipofosforilasyonuna ilişkin apoptotik hücre ölümünü tetiklediği ve buna bağlı olarak hücre içerisinde vakuol oluşumuna neden olduğu ifade edilmiştir [175] [176]. Hatta önceki BODIPY® 493/503 boyama çalışmalarında abemaciclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde aynı vakuol oluşumları dikkat çekmiştir. Bu sebeple Yapılan çalışmalar literatür verileriyle paralellik göstermekte olup vakuol oluşumlarının altta yatan mekanizması ayrı bir araştırma konusudur.

Annexin V/PI boyamasının seçili dozların 24 saat uygulanması sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerinde tetiklenen hücre ölümü oranında anlamlı bir fark gösterilemediğinden apoptotik hücre ölümünün gösterilebilmesi zamana bağlı olarak seçili dozlarda bir çalışma ile MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde irdelenmiştir (Şekil 32-33). 48 saat boyunca her iki ilaç uygulaması yapılmış olan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerine uygulanan abemaciclib'in apoptotik hücre ölümü popülasyonlarına etkisi %20 düzeyinde artış göstermiştir. 48 saatlik palbociclib uygulamasını takiben Capan-2 hücrelerinde kısmi apoptotik hücre ölümünde artışa neden olurken MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre ölümü oranında anlamlı bir fark görülememiştir. Benzer şekilde

liposarkom hücrelerine (IB115 ve IB111) uygulanan 1 ve 2 μM palbociclib'in her ne kadar hücre döngüsünü tutulu kalmasını sağlasa da bu doz aralıklarında kısmi apoptotik etkinin olduğu hatta IB114 ve IB136 hücrelerinde bu etkinin görülemediği belirlenmiş olup artan ilaç dozlarında (8 ve 16 μM) apoptotik ölümün tetiklendiği bildirilmiştir. Ayrıca Capan-2 hücreleriyle benzer sonuçlar elde edilen meme kanseri hücreleriyle yapılan çalışmada uygulanan 0,5 ve 2 μM abemaciclib dozlarının geç apoptotik süreci tetiklediği ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada ise abemaciclib ve palbociclib'in karşılaştırmalı etkileri ksenograft böbrek karsinom hücrelerinde ve agresif germinal merkez kaynaklı B hücreli lenfomalarda ele alınmış olup zamana ve doza bağlı olarak abemaciclib'in hücre ölümünü tetikleme konusunda daha etkili olduğu ancak palbociclib'in kısmi etkili olduğu annexin V/PI, kesilmiş kaspaz 3 ve PARP kesilimini arttığını gösteren immunoblotlama sonuçları ile desteklenmiştir [177] [178] [179] [55]. Bu kapsamda yapılan çalışmaların literatürdeki verilerle uyumlu olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar ile birlikte her ne kadar 24 saat seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörleri uygulamasıyla annexin V/PI boyaması sonucunda MIA PaCa-2 hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı bir değişikliğin gösterilememesi artan senesens ve hücre siklusunda takılı kalma süreci nedeni ile hücre ölüm kararının daha geç bir süreçte alındığını, ancak hücrenin moleküler markırlarının değişimi nedeni ile hücre ölümü emiri konusunda aktif olduğunu gösterdiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak elde edilen bulgulara göre, CDK4/6 inhibitörü olan abemaciclib ve palbociclib'in biyolojik aktiviteleri, hedef profilleri ve farklı genotip özelliklere sahip pankreas kanseri hücrelerinin enerji metabolizmasındaki değişikliklere bağlı olarak hücre sağkalım inhibisyonu ve hücre ölümünü indükleme yetenekleri bakımından farklı moleküler hedefleri etkiledikleri görülmüştür. Palbociclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerindeki AMPK aktivitesine bağlı olarak kanser hücrelerinin enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesinde rol alan yağ asitleri biyosentezine etki ederek hücre içi lipid profillerinde azalmaya neden olduğu buna bağlı olarak hücre proliferasyonuna ket vurulan metabolik olarak aktif yaşlanmış kanser hücreleri için önemli bir veri elde edilmiştir. Ancak abemaciclib uygulanan MIA PaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde mTOR inhibisyonuna bağlı olarak enerji metabolizmasının düzenlendiği

yağ asitleri biyosentezine etki ederek ve lipid profillerinin azalmasına bağlı olarak apoptotik süreci hızlandırdığı sonucuna varılmıştır (Şekil 34).



Şekil 34 Tez kapsamında incelenen AMPK'nın etkileşimde olduğu alt ve üst sinyal yolları ile ilişkili regülasyonlarının abemaciclib ve palbociclib'in MIA PaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerindeki etkisinin şematik gösterimi.

Son derece agresif profile sahip pankreas kanseri hücreleri için umut vaad edici çalışmalar olmakla birlikte bir sonraki çalışma konusu olarak in vivo fare modellemeleri ile desteklenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca klinik uygulamalar öncesinde pankreas kanseri farklı hücre tiplerinde CDK4/6 inhibitörlerinin moleküler hedeflerinin geniş ölçekli olarak tanımlanmasına yönelik bulgular sağlaması ve bu bulguların olası tedavi seçeneklerinin başarılarının arttırılmasına yönelik olarak yeni kombine tedaviler için önemli hücresel hedeflerin ayırt edilmesini sağlama potansiyeli taşımaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] V. Göral, “Pankreas Kanseri : Patogenez ve Tanı,” no. Tablo 2, pp. 407–414.
- [2] P. Rawla, “Epidemiology of Pancreatic Cancer : Global Trends , Etiology and Risk Factors,” vol. 10, no. 1, pp. 10–27, 2019.
- [3] “worldlifeexpectancy.com turkey-pancreas-cancer.” [Online]. Available: <https://www.worldlifeexpectancy.com/turkey-pancreas-cancer>.
- [4] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018.
- [5] “cancer.org.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/key-statistics.html>.
- [6] S. Iodice, S. Gandini, P. Maisonneuve, and A. B. Lowenfels, “Tobacco and the risk of pancreatic cancer: A review and meta-analysis,” *Langenbeck’s Arch. Surg.*, vol. 393, no. 4, pp. 535–545, 2008.
- [7] “American Cancer Society 2018.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>.
- [8] G. A. Decker *et al.*, “Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening,” *Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 6, no. 4, pp. 246–254, 2010.
- [9] M. A. Erdek, E. K. Fishman, and R. H. Hruban, “NIH Public Access Recent Progress in Pancreatic Cancer,” *CA Cancer J Clin.*, vol. 63, no. 5, pp. 318–348, 2014.
- [10] L. J. Harnack, K. E. Anderson, W. Zheng, A. R. Folsom, T. A. Sellers, and L. H. Kushi, “Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: The Iowa women’s health study,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 6, no. 12, pp. 1081–1086, 1997.
- [11] D. Hoffmann, A. Rivenson, R. Abbi, and E. L. Wynder, “A Study of Tobacco Carcinogenesis : Effect of the Fat Content of the Diet on the Carcinogenic Activity of 4- (Methylnitrosamino) -1- (3-Pyridyl) -1-Butanone in F344,” 1993.
- [12] A. B. Lowenfels, P. Maisonneuve, and P. G. Lankisch, “Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer,” *Gastroenterol. Clin. North Am.*, vol. 28, no. 3, pp. 673–685, 1999.
- [13] D. T. Silverman *et al.*, “Why do black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than white Americans?,” *Epidemiology*, 2003.
- [14] E. Korkut, “Kronik Pankreatit Etiyolojileri,” vol. 4, no. 1, pp. 77–80, 2011.
- [15] M. J. Lynch HT, Lanspa SJ, Fitzgibbons RJ Jr, Smyrk T, Fitzsimmons ML, *Familial Pancreatic Cancer(Part 1)*. JNCI, 1989.
- [16] M. Goggins *et al.*, “Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas,” *Cancer Res.*, 1996.

- [17] H. A. Risch *et al.*, "Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: A kin-cohort study in Ontario, Canada," *J. Natl. Cancer Inst.*, 2006.
- [18] M. D. Tischkowitz *et al.*, "Analysis of the Gene Coding for the BRCA2-Interacting Protein PALB2 in Familial and Sporadic Pancreatic Cancer," *Gastroenterology*. 2009.
- [19] E. P. Slater *et al.*, "PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families," *Clin. Genet.*, 2010.
- [20] S. J. Rulyak, T. A. Brentnall, H. T. Lynch, and M. A. Austin, "Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome," *Cancer*, 2003.
- [21] R. R. McWilliams *et al.*, "Prevalence of CDKN2A mutations in pancreatic cancer patients: Implications for genetic counseling," *Eur. J. Hum. Genet.*, 2011.
- [22] A. K. Rustgi, "The genetics of hereditary colon cancer," *Genes and Development*. 2007.
- [23] S. E. Korsse *et al.*, "Pancreatic cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome patients: A large cohort study and implications for surveillance," *J. Med. Genet.*, 2013.
- [24] F. M. Giardiello *et al.*, "Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome," *Gastroenterology*, 2000.
- [25] R. S. Greenberg, J. B. Schoenberg, L. M. Pottern, R. N. Hoover, and J. F. F. Jr, "Diabetes mellitus other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer," vol. 80, pp. 1830–1837, 1999.
- [26] "The Cancer Genome Atlas Program." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>.
- [27] S. Kersten, "Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis," *EMBO Rep.*, vol. 2, no. 4, pp. 282–286, 2001.
- [28] A. A. Arslan *et al.*, "Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: A pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan)," *Arch. Intern. Med.*, 2010.
- [29] M. Wagner, C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess, and M. W. Büchler, "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma," *Br. J. Surg.*, 2004.
- [30] D. Mahalingam, K. R. Kelly, R. T. Swords, J. Carew, S. T. Nawrocki, and F. J. Giles, "Emerging drugs in the treatment of pancreatic cancer," *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 2009.
- [31] E. Van Cutsem *et al.*, "Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer," *J. Clin. Oncol.*, 2009.

- [32] “Immunotherapy for Pancreatic Cancer/American Cancer Society 2019.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/treating/immunotherapy.html>.
- [33] J. L. Yap, S. Worlikar, A. D. MacKerell, P. Shapiro, and S. Fletcher, “Small-Molecule Inhibitors of the ERK Signaling Pathway: Towards Novel Anticancer Therapeutics,” *ChemMedChem*. 2011.
- [34] E. A. Collisson *et al.*, “A Central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Cancer Discov.*, 2012.
- [35] J. J. Tyson and B. Novak, “Regulation of the eukaryotic cell cycle: Molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions,” *J. Theor. Biol.*, vol. 210, no. 2, pp. 249–263, 2001.
- [36] X. Liu, Y. Chen, Y. Li, R. B. Petersen, and K. Huang, “Targeting mitosis exit: A brake for cancer cell proliferation,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1871, no. 1, pp. 179–191, 2019.
- [37] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, “The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer,” *Cell Prolif.*, vol. 36, no. 3, pp. 131–149, 2003.
- [38] M. K. Stella Pelengaris, *The Molecular Biology of Cancer*. 2006.
- [39] K. J. Barnum and M. J. O’Connell, “Cell cycle regulation by checkpoints,” *Methods in Molecular Biology*. 2014.
- [40] O. Stevaux and N. J. Dyson, “A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 684–691, 2002.
- [41] C. Giacinti and A. Giordano, “RB and cell cycle progression,” *Oncogene*, vol. 25, no. 38, pp. 5220–5227, 2006.
- [42] A. Manuscript, “Modes of p53 Regulation Jan-Philipp,” vol. 137, no. 4, pp. 609–622, 2013.
- [43] B. Gabrielli, K. Brooks, and S. Pavey, “Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies,” *Front. Pharmacol.*, vol. 3 FEB, no. February, pp. 1–6, 2012.
- [44] Y. T. Kim and M. Zhao, “Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma,” *Yonsei Medical Journal*. 2005.
- [45] N. Bailon-Moscoso, G. Cevallos-Solorzano, J. Romero-Benavides, and M. Ramirez Orellana, “Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies,” *Curr. Genomics*, 2017.
- [46] K. A. Cadoo, A. Gucalp, and T. A. Traina, “Palbociclib: An evidence-based review of its potential in the treatment of breast cancer,” *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2014.
- [47] A. McCartney *et al.*, “Mechanisms of Resistance to CDK4/6 Inhibitors: Potential Implications and Biomarkers for Clinical Practice,” *Front. Oncol.*, vol. 9, no. July, pp. 2–9, 2019.

- [48] M. Liu, H. Liu, and J. Chen, "Mechanisms of the CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) and its future application in cancer treatment (Review)," *Oncol. Rep.*, vol. 39, no. 3, pp. 901–911, 2018.
- [49] S. Pernas, S. M. Tolaney, E. P. Winer, and S. Goel, "CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 10, pp. 1–15, 2018.
- [50] M. R. Nathan and P. Schmid, "A Review of Fulvestrant in Breast Cancer," *Oncol. Ther.*, 2017.
- [51] B. AKTAS, "CDK inhibitors in hormone receptor positive advanced breast cancer," *Marmara Med. J.*, vol. 28, no. 4, p. 35, 2015.
- [52] "Clinical Trials Using Palbociclib," *National Cancer Institute*. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/intervention/palbociclib>.
- [53] M. P. Goetz *et al.*, "MONARCH 3: Abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer," *J. Clin. Oncol.*, 2017.
- [54] S. P. Corona and D. Generali, "Abemaciclib: A CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HEer2- advanced breast cancer," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 12, pp. 321–330, 2018.
- [55] Y. Tanaka *et al.*, "Abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, exerts preclinical activity against aggressive germinal center-derived B-cell lymphomas," *Cancer Sci.*, vol. 111, no. 2, pp. 749–759, 2020.
- [56] J. Campisi, "Aging, Cellular Senescence, and Cancer," *Annu. Rev. Physiol.*, 2013.
- [57] M. K. Stella Pelengaris, *Telomeres and Senescence*. .
- [58] A. Calcinotto, J. Kohli, E. Zagato, L. Pellegrini, M. Demaria, and A. Alimonti, "Cellular senescence: Aging, cancer, and injury," *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 2, pp. 1047–1078, 2019.
- [59] B. A. Hemmings and D. F. Restuccia, "The PI3k-PKB/Akt pathway," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 3–5, 2015.
- [60] R. Dienstmann, J. Rodon, V. Serra, and J. Tabernero, "Picking the point of inhibition: A comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 13, no. 5, pp. 1021–1031, 2014.
- [61] J. S. L. Yu and W. Cui, "Proliferation, survival and metabolism: The role of PI3K/AKT/ mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination," *Dev.*, vol. 143, no. 17, pp. 3050–3060, 2016.
- [62] D. G. Hardie, "The AMP-activated protein kinase pathway - New players upstream and downstream," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. 23, pp. 5479–5487, 2004.
- [63] T. Kawaguchi, M. Hayakawa, H. Koga, and T. Torimura, "Effects of fucoidan on proliferation, AMP-activated protein kinase, and downstream metabolism- and cell cycle-associated molecules in poorly differentiated human hepatoma HLF cells," *Int. J. Oncol.*, vol. 46, no. 5, pp. 2216–2222, 2015.

- [64] Q. Wang, S. Liu, A. Zhai, B. Zhang, and G. Tian, "AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 41, no. 7, pp. 985–993, 2018.
- [65] R. A. K. Srivastava, S. L. Pinkosky, S. Filippov, J. C. Hanselman, C. T. Cramer, and R. S. Newton, "AMP-activated protein kinase: An emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 12, pp. 2490–2514, 2012.
- [66] N. M. Anderson, P. Mucka, J. G. Kern, and H. Feng, "The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism," *Protein Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 216–237, 2018.
- [67] S. Galic, K. Loh, L. Murray-Segal, G. R. Steinberg, Z. B. Andrews, and B. E. Kemp, "AMPK signaling to acetyl-CoA carboxylase is required for fasting-and cold-induced appetite but not thermogenesis," *Elife*, vol. 7, pp. 1–22, 2018.
- [68] T. Lipin, P. Family, and F. Fosfataz, "Lipin Protein Ailesi," *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.*, vol. 7, no. 3, pp. 102–107, 2018.
- [69] G. Kristiansen *et al.*, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 21, pp. 6444–6451, 2006.
- [70] W. J. Lee *et al.*, "AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 340, no. 1, pp. 291–295, 2006.
- [71] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [72] D. R. Schultz and W. J. Harrington, "Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level," *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 32, no. 6, pp. 345–369, 2003.
- [73] B. P. Eckelman, G. S. Salvesen, and F. L. Scott, "Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family," *EMBO Rep.*, vol. 7, no. 10, pp. 988–994, 2006.
- [74] M. H. Kang and C. P. Reynolds, "Bcl-2 Inhibitors: Targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy," *Clin. Cancer Res.*, 2009.
- [75] Z. Hongmei, "Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review," in *Apoptosis and Medicine*, 2012.
- [76] "https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1420.aspx?geo_country=tr#characteristics."
- [77] "https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-80.aspx?geo_country=tr#characteristics."
- [78] "WHO-Cancer."
- [79] P. S. Roy and B. J. Saikia, "Cancer and cure: A critical analysis," *Indian Journal of Cancer*. 2016.

- [80] L. A. Torre, R. L. Siegel, E. M. Ward, and A. Jemal, "Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2016.
- [81] L. Rahib, B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, and L. M. Matrisian, "Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states," *Cancer Research*. 2014.
- [82] "Pancreatic Cancer: Statistics." [Online]. Available: <https://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/statistics>.
- [83] S. Goel, M. J. DeCristo, S. S. McAllister, and J. J. Zhao, "CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest," *Trends Cell Biol.*, vol. 28, no. 11, pp. 911–925, 2018.
- [84] M. P. Di Magliano and C. D. Logsdon, "Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression," *Gastroenterology*, 2013.
- [85] W. Zhang *et al.*, "Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma," *Sci. Signal.*, 2014.
- [86] Z. Wang *et al.*, "SMAD4 Y353C promotes the progression of PDAC," *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–12, 2019.
- [87] J. Cicenias, K. Kvederaviciute, I. Meskinyte, E. Meskinyte-Kausiliene, and A. Skeberdyte, "KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 mutations in pancreatic cancer," *Cancers*. 2017.
- [88] A. Marra and G. Curigliano, "Are all cyclin-dependent kinases 4/6 inhibitors created equal?," *npj Breast Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 1–9, 2019.
- [89] G. H. Williams and K. Stoeber, "The cell cycle and cancer," *Journal of Pathology*. 2012.
- [90] T. Otto and P. Sicinski, "Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*. 2017.
- [91] K. Tamura, "Differences of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, palbociclib and abemaciclib, in breast cancer," *Jpn. J. Clin. Oncol.*, vol. 49, no. 11, pp. 993–998, 2019.
- [92] D. Presti and E. Quaquarini, "The PI3K/AKT/mTOR and CDK4/6 pathways in endocrine resistant HR+/HER2- metastatic breast cancer: Biological mechanisms and new treatments," *Cancers (Basel)*., 2019.
- [93] Sobhani *et al.*, "Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer," *Cells*, vol. 8, no. 4, p. 321, 2019.
- [94] L. Fajas and I. C. Lopez-Mejia, "CDK4, a new metabolic sensor that antagonizes AMPK," *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 5, no. 5, pp. 1–2, 2018.
- [95] G. Zadra, J. L. Batista, and M. Loda, "Dissecting the dual role of AMPK in cancer: From experimental to human studies," *Molecular Cancer Research*. 2015.

- [96] M. E. Klein, M. Kovatcheva, L. E. Davis, W. D. Tap, A. Koff, and O. Health, “simple as once thought,” vol. 34, no. 1, pp. 9–20, 2019.
- [97] I. C. Lopez-Mejia *et al.*, “CDK4 Phosphorylates AMPK α 2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation,” *Mol. Cell*, 2017.
- [98] J. P. Alao, “The regulation of cyclin D1 degradation: Roles in cancer development and the potential for therapeutic invention,” *Molecular Cancer*. 2007.
- [99] K. G. Núñez, J. Gonzalez-Rosario, P. T. Thevenot, and A. J. Cohen, “Cyclin D1 in the liver: Role of noncanonical signaling in liver steatosis and hormone regulation,” *Ochsner Journal*. 2017.
- [100] S. Kamarajugadda *et al.*, “Cyclin D1 represses peroxisome proliferator-activated receptor alpha and inhibits fatty acid oxidation,” *Oncotarget*, 2016.
- [101] F. Morales and A. Giordano, “Overview of CDK9 as a target in cancer research,” *Cell Cycle*. 2016.
- [102] N. O’Brien *et al.*, “Preclinical activity of abemaciclib alone or in combination with antimitotic and targeted therapies in breast cancer,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 5, pp. 897–907, 2018.
- [103] J. Zhang, L. Zhou, S. Zhao, D. T. Dicker, and W. S. El-Deiry, “The CDK4/6 inhibitor palbociclib synergizes with irinotecan to promote colorectal cancer cell death under hypoxia,” *Cell Cycle*, vol. 16, no. 12, pp. 1193–1200, 2017.
- [104] D. J. Lee and J. F. Zeidner, “Cyclin-dependent kinase (CDK) 9 and 4/6 inhibitors in acute myeloid leukemia (AML): a promising therapeutic approach,” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 28, no. 11, pp. 989–1001, 2019.
- [105] P. K. Gopalan *et al.*, “CDK4/6 inhibition stabilizes disease in patients with p16-null non-small cell lung cancer and is synergistic with mTOR inhibition,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 100, pp. 37352–37366, 2018.
- [106] E. L. Deer *et al.*, “Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines,” *Pancreas*. 2010.
- [107] M. T. Yip-Schneider, “Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas,” *Carcinogenesis*, 2000.
- [108] M. A. Molina, M. Sitja-Arnau, M. G. Lemoine, M. L. Frazier, and F. A. Sinicrope, “Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: Growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs,” *Cancer Res.*, 1999.
- [109] E. Raspé *et al.*, “CDK 4 phosphorylation status and a linked gene expression profile predict sensitivity to palbociclib,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 9, no. 8, pp. 1052–1066, 2017.
- [110] M. Ruscetti *et al.*, “NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination,” *Science (80-.)*, vol. 362, no. 6421, pp. 1416–1422, 2018.

- [111] J. Franco, A. K. Witkiewicz, and E. S. Knudsen, “CDK4/6 inhibitors have potent activity in combination with pathway selective therapeutic agents in models of pancreatic cancer,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 15, pp. 6512–6525, 2014.
- [112] F. Liu and M. Korc, “Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 10, pp. 2138–2148, 2012.
- [113] O. Rencuzogulları, P. O. Yerlikaya, A. Ç. Gürkan, E. D. Arisan, and D. Telci, “Palbociclib, a selective CDK4/6 inhibitor, restricts cell survival and epithelial-mesenchymal transition in Panc-1 and MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 121, no. 1, pp. 508–523, 2020.
- [114] C. Yang *et al.*, “Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence,” *Oncogene*, vol. 36, no. 16, pp. 2255–2264, 2017.
- [115] J. Hu, J. Shen, and J. Sun, “CDK4/RB/E2Fs axis as potential therapeutic target of endometrial cancer,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 125, no. January, p. 109870, 2020.
- [116] B. B. Li *et al.*, “CDK4/6 inhibition triggers anti-tumor immunity,” *Nature*, vol. 548, no. 7668, pp. 471–475, 2017.
- [117] T. Dhir *et al.*, “Abemaciclib is effective against pancreatic cancer cells and synergizes with HuR and YAP1 inhibition,” *Mol. Cancer Res.*, 2019.
- [118] J. Bollard *et al.*, “Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, restricts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma,” *Gut*, vol. 66, no. 7, pp. 1286–1296, 2017.
- [119] H. Q. Duong, J. S. Hwang, H. J. Kim, Y. S. Seong, and I. Bae, “BML-275, an AMPK inhibitor, induces DNA damage, G2/M arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells,” *Int. J. Oncol.*, vol. 41, no. 6, pp. 2227–2236, 2012.
- [120] K. Chen *et al.*, “Loss of AMPK activation promotes the invasion and metastasis of pancreatic cancer through an HSF1-dependent pathway,” *Mol. Oncol.*, 2017.
- [121] H. Motoshima, B. J. Goldstein, M. Igata, and E. Araki, “AMPK and cell proliferation - AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer,” *J. Physiol.*, vol. 574, no. 1, pp. 63–71, 2006.
- [122] W. Duan *et al.*, “Desmoplasia suppression by metformin-mediated AMPK activation inhibits pancreatic cancer progression,” *Cancer Lett.*, 2017.
- [123] W. Duan *et al.*, “Metformin suppresses the invasive ability of pancreatic cancer cells by blocking autocrine TGF- β 1 signaling,” *Oncol. Rep.*, 2018.
- [124] C. Thangavel *et al.*, “Therapeutic challenge with a CDK 4/6 inhibitor induces an RB-dependent SMAC-mediated apoptotic response in non-small cell lung cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 1402–1414, 2018.
- [125] M. Hafner *et al.*, “Therapeutically advantageous secondary targets of abemaciclib identified by multi-omics profiling of CDK4/6 inhibitors,” *bioRxiv*, p. 211680, 2017.

- [126] N. Iriyama *et al.*, “The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects and induces autophagy in multiple myeloma cells,” *Leuk. Lymphoma*, vol. 59, no. 6, pp. 1439–1450, 2018.
- [127] B. Jingwen, L. Yaochen, and Z. Guojun, “Cell cycle regulation and anticancer drug discovery,” *Cancer Biol. Med.*, 2017.
- [128] D. Cretella *et al.*, “Pre-treatment with the CDK4/6 inhibitor palbociclib improves the efficacy of paclitaxel in TNBC cells,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [129] B. Y. Lee *et al.*, “Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase,” *Aging Cell*, 2006.
- [130] M. Collado, M. A. Blasco, and M. Serrano, “Cellular Senescence in Cancer and Aging,” *Cell*. 2007.
- [131] Y. Cai *et al.*, “Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice,” *Cell Res.*, no. March, pp. 1–16, 2020.
- [132] S. Lee and J. S. Lee, “Cellular senescence: A promising strategy for cancer therapy,” *BMB Reports*. 2019.
- [133] C. Nardella, J. G. Clohessy, A. Alimonti, and P. P. Pandolfi, “Pro-senescence therapy for cancer treatment,” *Nature Reviews Cancer*. 2011.
- [134] C. A. Valenzuela, L. Vargas, V. Martinez, S. Bravo, and N. E. Brown, “Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells,” *Exp. Cell Res.*, 2017.
- [135] A. M. Heilmann, R. M. Perera, V. Ecker, B. N. Nicolay, C. H. Benes, and N. J. Dyson, “NIH Public Access,” vol. 74, no. 14, pp. 3947–3958, 2015.
- [136] S. Vijayaraghavan *et al.*, “CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin e negative cancers,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. May, pp. 1–17, 2017.
- [137] Y. Kong, H. Cui, C. Ramkumar, and H. Zhang, “Regulation of senescence in cancer and aging,” *J. Aging Res.*, vol. 2011, 2011.
- [138] D. A. Tumbarello and C. E. Turner, “Hic-5 Contributes to Transformation Through a RhoA / ROCK-dependent Pathway,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 211(3), no. May, pp. 736–747, 2006.
- [139] S. Korur *et al.*, “GSK3 β Regulates Differentiation and Growth Arrest in Glioblastoma,” *PLoS One*, 2009.
- [140] Z. L. Teo *et al.*, “Combined CDK4/6 and PI3K α inhibition is synergistic and immunogenic in triple-negative breast cancer,” *Cancer Res.*, vol. 77, no. 22, pp. 6340–6352, 2017.
- [141] Y. X. and L. X. Guiqin Hou, Peirong Xu, “No TitlemTOR/p70S6K signaling pathway constitutively activated in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 9.

- [142] N. Hay and N. Sonenberg, "Upstream and downstream of mTOR," *Genes and Development*. 2004.
- [143] D. Zhong, X. Liu, F. R. Khuri, S. Y. Sun, P. M. Vertino, and W. Zhou, "LKB1 is necessary for Akt-mediated phosphorylation of proapoptotic proteins," *Cancer Res.*, 2008.
- [144] H. Huang *et al.*, "AKT-dependent and -independent pathways mediate PTEN deletion-induced CNS axon regeneration," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 3, 2019.
- [145] C. Jia *et al.*, "Crosstalk of LKB1-regulated and PTEN-regulated signals in liver morphogenesis and tumor development in mice," *Hepatol. Commun.*, vol. 1, no. 2, pp. 153–167, 2017.
- [146] X. Chai, H. Chu, X. Yang, Y. Meng, P. Shi, and S. Gou, "Metformin Increases Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine by Reducing CD133+ Cell Populations and Suppressing ERK/P70S6K Signaling," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. March, pp. 1–11, 2015.
- [147] L. M. Litchfield *et al.*, "Combined inhibition of PIM and CDK4 / 6 suppresses both mTOR signaling and Rb phosphorylation and potentiates PI3K inhibition in cancer cells," vol. 11, no. 17, pp. 1478–1492, 2020.
- [148] F. S. Hsieh *et al.*, "Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6-independent manner," *Mol. Oncol.*, vol. 11, no. 8, pp. 1035–1049, 2017.
- [149] A. Kalender *et al.*, "Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner," *Cell Metab.*, 2010.
- [150] M. G. Bonini and B. N. Gantner, "The multifaceted activities of AMPK in tumor progression - Why the 'one size fits all' definition does not fit at all?," *IUBMB Life*. 2013.
- [151] M. Hu *et al.*, "AMPK inhibition suppresses the malignant phenotype of pancreatic cancer cells in part by attenuating aerobic glycolysis," *J. Cancer*, vol. 10, no. 8, pp. 1870–1878, 2019.
- [152] W. W. Feng and M. Kurokawa, "Lipid metabolic reprogramming as an emerging mechanism of resistance to kinase inhibitors in breast cancer," *Cancer Drug Resist.*, pp. 1–17, 2019.
- [153] Y. Liu, R. Wang, L. Zhang, J. Li, K. Lou, and B. Shi, "The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway," *Oncol. Lett.*, vol. 13, no. 6, pp. 4685–4690, 2017.
- [154] N. Koundouros and G. Poulgiannis, "Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 122, no. 1, pp. 4–22, 2020.
- [155] V. P. Houde *et al.*, "AMPK β 1 reduces tumor progression and improves survival in p53 null mice," *Mol. Oncol.*, 2017.
- [156] F. M. R. and D. G. H. Diana Vara-Ciruelos, "The strange case of AMPK and cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde?," *OPEN Biol.*

- [157] J. Luo *et al.*, “Acetyl-CoA carboxylase rewires cancer metabolism to allow cancer cells to survive inhibition of the Warburg effect by cetuximab,” *Cancer Lett.*, 2017.
- [158] E. Yuan *et al.*, “Aged oolong tea reduces high-fat diet-induced fat accumulation and dyslipidemia by regulating the AMPK/ACC signaling pathway,” *Nutrients*, vol. 10, no. 2, 2018.
- [159] K. Fang *et al.*, “Diosgenin ameliorates palmitic acid-induced lipid accumulation via AMPK/ACC/CPT-1A and SREBP-1c/FAS signaling pathways in LO2 cells,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 19, no. 1, p. 255, 2019.
- [160] F. Li *et al.*, “BET inhibitor JQ1 suppresses cell proliferation via inducing autophagy and activating LKB1/AMPK in bladder cancer cells,” *Cancer Med.*, vol. 8, no. 10, pp. 4792–4805, 2019.
- [161] A. Carrer *et al.*, “Acetyl-CoA metabolism supports multistep pancreatic tumorigenesis,” *Cancer Discov.*, 2019.
- [162] H. Zong, Y. Zhang, Y. You, T. Cai, and Y. Wang, “Decreased Warburg effect induced by ATP citrate lyase suppression inhibits tumor growth in pancreatic cancer,” *Med. Oncol.*, 2015.
- [163] J. Swierczynski, A. Hebanowska, and T. Sledzinski, “Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer,” *World J. Gastroenterol.*, 2014.
- [164] K. Nishi *et al.*, “Inhibition of fatty acid synthesis induces apoptosis of human pancreatic cancer cells,” *Anticancer Res.*, vol. 36, no. 9, pp. 4655–4660, 2016.
- [165] S. Tadros *et al.*, “De Novo lipid synthesis facilitates gemcitabine resistance through endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer,” *Cancer Res.*, 2017.
- [166] S. Polvani, M. Tarocchi, S. Tempesti, L. Bencini, and A. Galli, “Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer,” *World Journal of Gastroenterology*. 2016.
- [167] K. Tachibana, D. Yamasaki, K. Ishimoto, and T. Doi, “The role of PPARs in cancer,” *PPAR Research*. 2008.
- [168] M. Aprile *et al.*, “PPAR γ Δ 5, a Naturally Occurring Dominant-Negative Splice Isoform, Impairs PPAR γ Function and Adipocyte Differentiation,” *Cell Rep.*, vol. 25, no. 6, pp. 1577-1592.e6, 2018.
- [169] R. Varshney, R. Varshney, R. Mishra, S. Gupta, D. Sircar, and P. Roy, “Kaempferol alleviates palmitic acid-induced lipid stores, endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell dysfunction through AMPK/mTOR-mediated lipophagy,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 57, pp. 212–227, 2018.
- [170] A. Kourtidis, R. Jain, R. D. Carkner, C. Eifert, M. J. Brosnan, and D. S. Conklin, “An RNA interference screen identifies metabolic regulators NR1D1 and PBP as novel survival factors for breast cancer cells with the ERBB2 signature,” *Cancer Res.*, 2010.
- [171] A. Peña-Blanco and A. J. García-Sáez, “Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis,” *FEBS Journal*. 2018.

- [172] D. Westphal, G. Dewson, P. E. Czabotar, and R. M. Kluck, “Molecular biology of Bax and Bak activation and action,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2011.
- [173] L. Vela, O. Gonzalo, J. Naval, and I. Marzo, “Direct interaction of bax and bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation,” *J. Biol. Chem.*, 2013.
- [174] M. L. Würstle, M. A. Laussmann, and M. Rehm, “The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome,” *Experimental Cell Research*. 2012.
- [175] M. K. Hino H1, 2, Iriyama N3, Kokuba H4, Kazama H1, Moriya S1, Takano N1, Hiramoto M1, Aizawa S2, “Abemaciclib induces atypical cell death in cancer cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes.”
- [176] E. S. Knudsen, J. Hutcheson, P. Vail, and A. K. Witkiewicz, “Biological specificity of CDK4/6 inhibitors: Dose response relationship, in vivo signaling, and composite response signature,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 27, pp. 43678–43691, 2017.
- [177] A. Laroche-Clary, V. Chaire, M. P. Algeo, M. A. Derieppe, F. L. Loarer, and A. Italiano, “Combined targeting of MDM2 and CDK4 is synergistic in dedifferentiated liposarcomas,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [178] R. Torres-Guzmán *et al.*, “Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 41, pp. 69493–69507, 2017.
- [179] J. Small, E. Washburn, K. Millington, J. Zhu, and S. L. Holder, “The addition of abemaciclib to sunitinib induces regression of renal cell carcinoma xenograft tumors,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 56, pp. 95116–95134, 2017.

6. EKLER

6.1 Ek A: Çalışma Kapsamında Kullanılan Cihazlar

Tablo 1 Kullanılan Cihazların Listesi

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
Akış hücre sitometrisi	AC6531180147	BD Biosciences
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
Chemidoc görüntüleme cihazı	1708280	Bio-Rad
Derin dondurucu	2041D	Arçelik
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore Direct q5UV
Dondurucu (-80°C)	U725	New Brunswick Scientific
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Elektroforez sistemi	1658004	Bio-Rad
Elektroforez transfer sistemi	170-4155	Bio-Rad
Elisa okuyucu	EN 61326	Bio-Rad
Floresan atamaçlı invert	1X71	Olympus
Güç kaynağı	1645050	Bio-Rad
Hassas tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometri	Z359629	Sigma Aldrich
İnkübatör	51026280	Thermo Scientific
İnkübatör	EN 025	Nüve
İnvert mikroskop	XDS-1B	SOIF
Kar-buz makinesi	AF80	Scotsman
Manyetik karıştırıcı	SB162	Stuart Equipment
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (2µl-20µl)	CJ17240	Thermo Scientific
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200µl-	T27274	Thermo Scientific

1000µl)		
Optik mikroskop	701	Ivymen
Otoklav cihazı	OT40L	Nüve
Otoklav cihazı	OTO32	Nüve
pH metre	N315	SEM/Mettler
Santrifüj cihazı	5417R	Eppendorf
Santrifüj cihazı	5810R	Eppendorf
Santrifüj cihazı	22331	Eppendorf
Sıvı azot tankı	Arpege 40	Air Liquide
Tüp rotasyon aleti	SRT9D	Stuart Equipment
Vorteks	SA8	Stuart Equipment

6.2 Ek B: Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller

Table 2 Hücre Kültürü Donanımları

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
100 mm petri	93100	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
Enjektör	21G	ASTRAJECT
FBS	10500-064	Gibco
Kriyovial tüp	V7634	NUNC
MIA PaCa-2 hücre hattı	CRL-1420	ATCC
Capan-2 hücre hattı	HTB-80	ATCC
Penisilin/Streptomisin	15140-122	GIBCO

RPMI besiyeri	21875	GIBCO
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Tripsin-EDTA	P10-0231	Pan Biotech

6.3 Ek C: Kullanılan Kimyasal Maddeler

Table 3 Kullanılan Kimyasalların Listesi

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
2-merkaptetanöl	M7522	Sigma-Aldrich
Akrilamid/Bis-akrilamid %30 Çözelti	A9099	Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Asetik asit	27225	Sigma-Aldrich
Coomasie mavisi	A3480	Applichem
DAPI	D1306	Invitrogen
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
Disodyum EDTA	2937	Applichem
DMSO	D5879	Sigma Aldrich
Etanol	A3452	Sigma Aldrich
Glisin	3570	Calbiochem
Hidrojen peroksit	K39218400838	Merck
Hidroklorik asit	K43804717239	Merck
İzopropanol	K44518295321	Merck
Luminol	A2185	Applichem

M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent	78501	Thermo Scientific
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
MTT	M2128-5G	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	26619	Thermo Scientific
Propidyum iyodür	P4170	Sigma-Aldrich
Ponceau kırmızısı	A1405	Applichem
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	A3452	Applichem
Sığır serum albumin	A2153	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	A2941	Applichem
SuperBlock™ T20 Blocking Buffer	37536	Thermo Scientific
TEMED	A1148 0100	Applichem
Tris-baz	648310	Calbiochem
Tris-HCl	648317	Calbiochem
Tween	20 S6740684 348	Merck
Yağsız süt tozu	SC-2325	Santa-Cruz Biotechnology

Tablo 4 Kullanılan Antikor Listesi

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
ACC	3676	Cell Signaling Technology
ACLY	4332	Cell Signaling Technology

AKT	9272	Cell Signaling Technology
AMPK	5831	Cell Signaling Technology
Bak	12105	Cell Signaling Technology
Bax	2772	Cell Signaling Technology
β -Aktin	4970	Cell Signaling Technology
β -Tubulin	2146	Cell Signaling Technology
CDK4	12790	Cell Signaling Technology
c-Myc	5605	Cell Signaling Technology
FASN	3180	Cell Signaling Technology
GSK3 β	9315	Cell Signaling Technology
Kaspaz 9	9502	Cell Signaling Technology

Kesilmiş PARP	9541	Cell Signaling Technology
Lipin-1	5195	Cell Signaling Technology
mTOR	2983	Cell Signaling Technology

p21	2947	Cell Signaling Technology
p-ACC	11818	Cell Signaling Technology
p-ACLY	4331	Cell Signaling Technology
p-AKT	9271	Cell Signaling Technology
p-AMPK	2535	Cell Signaling Technology
p-AMPK β 1	4178	Cell Signaling Technology
p-GSK3 β	9336	Cell Signaling Technology
PI3K	4292	Cell Signaling Technology
p-mTOR	5536	Cell Signaling Technology
PPAR γ	2435	Cell Signaling Technology
p-p70S6K	9208	Cell Signaling Technology
p-PTEN	9549	Cell Signaling Technology
p-Rb	8516	Cell Signaling Technology
PTEN	9188	Cell Signaling Technology
Raptor	2280	Cell Signaling

		Technology
Siklin D1	3741	Cell Signaling Technology

6.4 Ek D: Kullanılan Çözeltiler

%70 Etanol: 100 ml 70 ml saf etanole 30 ml distile su eklenerek hazırlanır.

Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml için): 9 ml Fetal sıgır serumu (FBS) ve 1 ml Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH₃)₂SO) ile birlikte hazırlanan medya 0,22 mm'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20°C'de muhafaza edilir.

Yağsız süt tozu (%5): Süt tozu 2,5 g tartılır ve 50 ml 'ye kadar TBS-T ile tamamlanır.

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8): 1000 ml için 60,55 gr Tris bazı 500 ml distile su içerisinde çözündükten sonra 6 N HCl kullanılarak pH'sı 8,8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 1000 ml için 181,65 g Tris bazı 500 ml distile su içerisinde çözündükten sonra 6 N HCl kullanılarak pH'sı 8,8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

%10 (w/v) APS (amonyum persulfat): 10 ml 1 gr APS 10 ml distile su içerisinde hazırlanır. -20°C'de saklanması gerekmektedir.

10X Tris Tampon Çözeltisi (TBS) Hazırlanışı: 88 gr NaCl, 24 gr Tris-Baz konulur pH:7,6 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1 L'ye tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS' e dönüştürülür.

10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı (pH 7,4) Sodyum klorür (NaCl) 80,0 gr, Potasyum klorür (KCl) 2,0 gr, Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) 14,4 gr ve Mono potasyum fosfat (KH₂PO₄) 2,4 gr tartılarak 600 ml kadar distile su ile çözündürülüp pH ölçüldükten sonra 1000 ml distile suya tamamlanır.

Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için): M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent 10 ml Roche®, PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli 1 tablet Roche®, proteaz inhibitör kokteyli 1 tablet 15'lik falkonda çözündürülüp 1,5 ml'lik ependorflara bölüştürülür. +4°C'de muhafaza edilir.

5X Laemmli Tamponunun Hazırlanışı (10 ml için): 1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8) ,2,0 ml Bromofenol mavisi (%1(ağırlık/hacim)), 0,5 ml Gliserol, 5,0 ml β-merkaptoetanol ve 2,5 ml Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC₁₂H₂₅SO₄) 2,0 gr ile hazırlanıp 1,5 ml'lik ependorflara bölüştürülerek -20°C'de muhafaza edilir.

TBS-Tween Hazırlanışı: 1X TBS içine 500 µl Tween 20 konularak hazırlanır.

Yürütme Tamponunun Hazırlanışı: 30,3 gr Tris-Baz, 144 gr Glisin ve 1 gr SDS tartılarak 1000ml distile su içinde çözünür. Hazırlanan 10X yürütme tamponu hazırlanır. Jel yürütmesi sırasında 1X' e dönüştürülür.

Transfer Tamponunun Hazırlanışı: 100 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 200 ml metanol konularak distile su ile 1000 ml' e tamamlanır.

Tablo 5 Yürütme Jelinin Hazırlanması

İçerik (2 jel için)	Alt Jel (%12'lik)	Alt jel (%15'lik)	Üst Jel
Distile su	3,4 ml		3,075 ml
Tris HCL	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml	1,125 ml (0,5 M, pH 6,8)
%10 SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	5 ml	0,67 ml
Amonyum persülfat (APS)	0,08 ml	0,08 ml	0,05 ml
TEMED	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml

7. ÖZGEÇMİŞ



1. Adı Soyadı: Börtetine SEVGİN

İletişim Bilgileri:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBİGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

Telefon: 0538 295 44 74

E-posta: bortecinesevgin@gmail.com

2. Doğum Tarihi: 17.03.1996

3. Ünvanı: Yüksek Lisans Öğrencisi/ Biyolog

4. Öğrenim Durumu:

Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2014-2018
Lisans/Yandal	Matematik-Bilgisayar	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2015-2017
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2018-2020

5. Yönetilen Lisans ve Yüksek Lisans Tezleri

5.1 Lisans Tezi

“Celastrol’ün LNCaP, DU145 ve PC3 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Otofaji ve Apoptoz Sinyal Yolakları Üzerinden Terapötik Etkisinin Araştırılması” İstanbul Kültür Üniversitesi, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN.

5.2 Yüksek Lisans Tezi

“Abemaciclib ve Palbociclib’in MIA PaCa-2 ve Capan-2 Pankreas Kanseri Hücrelerinde AMPK’nın Etkileşimde Olduğu Üst ve Alt Sinyal Yolakları ile İlişkili Etkilerinin Araştırılması” İstanbul Kültür Üniversitesi, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN.

6. Ulusal ve Uluslararası Projeler

1. “Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında CDK4/6 İnhibitörleri Palbociclib ve Abemaciclib’in AMPK’nın Etkileşimde Olduğunu Üst ve Alt Sinyal Yolakları İlişkili Global Protein ve Lipid Profilleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması” (TÜBİTAK 1001 Projesi, Proje no:118Z100, 2018-2021, Bursiyer).

7. Yayınlar

1. Elif Damla Arisan^{a,b,*}, Özge Rencuzogullari^b, Mervenur Coban^{b,1}, **Bortecine Sevgin**^{b,1}, Pinar Obakan-Yerlikaya^b, Ajda Çoker-Gürkan^b, Narçin Palavan-Unsal^b “The role of the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in the decision of the celastrol-induced cell death mechanism related to the lipid regulatory pathway in prostate cancer cells” Phytochemistry Letters, 2020 Oct. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.06.007>

8. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Börteçine Sevgin, Mervenur Çoban, Kübra Şentürk, Elif Damla Arisan, Özge Rencuzogullari, Pelin Ozfiliz, Pinar Obakan-Yerlikaya, Ajda Coker-Gurkan, Narçin Palavan-Unsal, Celastrol’ün prostat kanseri hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı ile ilişkili olarak epitelyal-mezenkimal hücre tranzisyonu üzerine etkisi, VI. Kök Hücre Sempozyumu Kitabı, Marmara Üniversitesi, 5-6 Mayıs 2017, İstanbul-Türkiye. (Poster sunum: **Börteçine Sevgin**, Mervenur Çoban, Kübra Şentürk)

Elif Damla Arisan, Mervenur Çoban, **Börteçine Sevgin**, Esra Nebiler, Sahra Aras, Özge Rencüzoğulları, Pelin Özfiliz-Kılbaş, Pinar Obakan-Yerlikaya, Ajda Çoker-Gürkan, Narçin Palavan-Ünsal, Kanser hücrelerinde FASN hedefli terapötik stratejilerin hücre sağ kalım ve ölüm sinyal yolakları açısından incelenmesi, İstinye Üniversitesi 2.

Moleküler Kanser Zirvesi, 23-24 Mart 2019, İstanbul-Türkiye. (Sözlü Sunum: Elif Damla Arisan)

Bortecine Sevgin, Merve Nur Coban, Pınar Obakan-Yerlikaya, Ajda Coker-Gurkan, Narcin Palavan Unsal, Elif Damla Arisan, Increased Senescence and G1 Cell Cycle Arrest Determines AMPK Mediated Therapeutic Responses in MIA PaCa-2 Pancreatic Cells against CDK4/6 Inhibitors, Cell Death: Degeneration and Regeneration Sysposium, Marmara University GEMHAM, 3-4 October 2019, Istanbul-Turkey. (Poster Sunum: **Bortecine Sevgin**)

Merve Nur Coban, **Bortecine Sevgin**, Pınar Obakan-Yerlikaya, Ajda Coker- Gurkan, Narcin Palavan Unsal, Elif Damla Arisan, CDK4/6 Inhibitors Modulate PI3K/AKT/mTOR and AMPK Signaling to Alter Lipid Metabolism in PANC-1 Pancreatic Cell Line, Cell Death: Degeneration and Regeneration Sysposium, Marmara University GEMHAM, 3-4 October 2019, Istanbul-Turkey. (Poster Sunum: Merve Nur Coban)

Ebrar Karakaya, Nida Usanmaz, **Bortecine Sevgin**, Merve Nur Coban, Pınar Obakan Yerlikaya, Ajda Coker Gürkan, Narcin Palavan Ünsal, Elif Damla Arisan, Investigation of the effect of CDK4/6 inhibitors on cell survival and AMPK-related signalling pathway in HEK-293 wt and MEF cell lines, Cell Death: Degeneration and Regeneration Sysposium, Marmara University GEMHAM, 3-4 October 2019, Istanbul-Turkey. (Poster Sunum: Ebrar Karakaya, Nida Usanmaz)

9. Çalışma ve Araştırma Deneyimleri

2015-2020, Öğrenci asistanlığı, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü.

01.06.2017-19.06.2017 T.C Sağlık Bakanlığı Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilimdalı, Prof. Dr. Tunç AKKOÇ, Pediatrik Allerji/İmmünoloji Bilim Dalı, Yaz Stajı.

07.08.2017-18.08.2017, Nesiller Genetik Tanı Merkezi–Sitogenetik, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Uzm. Dr. Gülay ÖZGÖN, Yaz Stajı.

10. Etkinlikler

10.1 Yurt Dışında Gerçekleştirilen Etkinlikler

Elif Damla Arisan, Ajda Coker-Gürkan ve Pınar Obakan-Yerlikaya, DAP Genomics Mind the Milk Project, Sharjah AUS NewVenture Entrepreneurship Competition, 3-6 February 2019, Sharjah, United Arab Emirates. (Sözlü ve poster sunumu: **B. Sevgin**, M. Coban, R. Giray)

11. Ödüller ve Burslar

İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Bölüm Üçüncülüğü (2014-2018)

TUBİTAK, 1001 Araştırma Projesi, Bursiyer (2018-2021)

Sharjah AUS NewVenture Entrepreneurship Competition, Semi finalist (3-6 February 2019)

Merve Nur Coban*, Bortecine Sevgin, Pınar Obakan-Yerlikaya, Ajda Coker- Gurkan, Narcin Palavan Unsal, Elif Damla Arisan, CDK4/6 Inhibitors Modulate PI3K/AKT/mTOR and AMPK Signaling to Alter Lipid Metabolism in PANC-1 Pancreatic Cell Line, Cell Death: Degeneration and Regeneration Sysposium, Marmara University GEMHAM, 3-4 October 2019, Istanbul-Turkey, En İyi Poster Ödülü

12. Aldığı Sertifikalar

Matematik-Bilgisayar Yandal Sertifikası, İstanbul Kültür Üniversitesi, 2015-2017

13. Katıldığı Bilimsel Kongre/Seminer/Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

- “Nanotechnology and Tissue Engineering”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 19-20 Aralık 2014
- “Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlara”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 8 Aralık 2015
- “Mesleğim ve Kariyerim Semineri”, IEEE Öğrenci Kulübü, 2 Mart 2016
- “XIIIth IUGEN International Molecular Biology and Genetics Students Winter School”, İstanbul Üniversitesi, 4-6 Mart 2016
- “Bilimsel Düşünce ve Etik/Morite İlişkisi”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 10 Mart 2016
- “Tüp Bebek (IVF) Kariyer Günü”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 2 Mayıs 2016
- “IEEE IKU 1.Bilim ve Kariyer Günü”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 14 Ekim 2016
- “II. Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 9 Aralık 2016
- “VI. Kök Hücre Sempozyumu”, Marmara Üniversitesi, 5-6 Mayıs 2017

- “Career Lab’19”, Koç Üniversitesi (AIChE), 16-17 Mart 2019
- “Cell Death: Degeneration and Regeneration Symposium”, Marmara University, 3-4 October 2019

