

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**PANC-1 VE PANC10.05 PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
PALBOCİCLİB VE ABEMACİCLİB UYGULAMASIYLA PI3K/AKT/mTOR VE
AMPK SİNYAL EKSENİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE NUR ÇOBAN

1402060018

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

HAZİRAN 2020

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**PANC-1 VE PANC10.05 PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
PALBOCİCLİB VE ABEMACİCLİB UYGULAMASIYLA PI3K/AKT/mTOR VE
AMPK SİNYAL EKSENİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE NUR ÇOBAN

1402060018

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Jüri üyeleri: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

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

HAZİRAN 2020

ÖNSÖZ

Tez çalışmam, lisans ve lisansüstü eğitimim süresince, çok değerli fikirlerini, tecrübelerini benimle paylaşan, her daim desteğini hissettiğim, bende hayranlık uyandıran, yenilikçi olmam konusunda beni destekleyen, ömür boyu kendimizi geliştirmemizi bizlere aşılayan, her aşamada yol gösterici olan, bugün yetişmemde çok büyük emeği geçen güler yüzlü, önüme ışık tutan, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a,

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgilerini, deneyimlerini ve desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda hissettiğim ve kıymetli zamanlarını ayıran çok değerli danışman hocam Doç.Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya,

Eğitim hayatım boyunca beni destekleyen ve yol göstericilikleri ile her daim önüme ışık tutan Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a,

Laboratuvarda çalıştığım süre boyunca bilgilerini, tecrübelerini ve çok değerli zamanlarını benden esirgemeyen, her türlü yardımda bulunan, güler yüzleri ve hoş sohbetleriyle yanımda olan değerli hocalarım Araş. Gör. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI, Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ-KILBAŞ, Araş.Gör Burcu AYHAN ŞAHİN, Araş. Gör. Alp AYAN, Araş. Gör. Sinan MERİÇ'e,

Hem akademik hem günlük yaşantım boyunca en yakınım olan, hep destekçim olan ve bunu bana hissettiren, ne zaman vazgeçecek olsak birbirimizi ayağa kaldırmayı her gün yeni bilgi öğrenip birbirimizle paylaşmayı ilke edindiğim, kalbi güzel canım dostum, proje arkadaşım, meslektaşım Börteçine SEVGİN'e,

Laboratuvar ortamında yardımlarını esirgemeyen, laboratuvarda benimle birlikte çalışan tüm lisansüstü ve lisans çalışma arkadaşlarıma,

Tez yazma sürecim ve bütün hayatım boyunca yanımda olan beni her zaman destekleyen ve biliyorum ki desteklemeye devam edecek olan, bana güvendiklerini ve hep arkamda olduklarını hissettiren, benim büyük şansım olan canım ailem, sevgili annem Nuran ÇOBAN’a, babam Abdurrahman ÇOBAN’a ve ağabeyim Emre ÇOBAN’a en içten saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın uygulama kısmında TÜBİTAK 1001 - 118 Z 100 nolu proje ile beni destekleyen TÜBİTAK’a ve projem için çalışma olanağı sağlayan İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü araştırma laboratuvarına teşekkürü borç bilirim.

Haziran, 2020

Merve Nur ÇOBAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR	vi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xv
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Pankreas Kanseri	1
1.2. Pankreas Kanserinin Epidemiyolojisi	3
1.3. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri	5
1.4. Pankreas Kanseri Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	8
1.4.1. KRAS Mutasyonu	8
1.4.2. TP53 ve PTEN	9
1.4.3. Hücre Döngüsü.....	10
1.4.4. Siklinler ve Sikline Bağımlı Kinazlar (CDKlar).....	10
1.4.5. Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKi)	12
1.4.6. CDK4/6 İnhibitörü Olan Palbociclib ve Abemaciclib'in Kansere Etkisi	12
1.4.7. Hücre Yaşlanma.....	15
1.4.8. Pankreas Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri	16
1.5. Hücre Ölümü ve Sağkalımı ile İlişkili Sinyal Yolları	18
1.5.1. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu	18
1.5.2. AMPK Sinyal Yolu	20
1.5.3. Apoptoz	23
1.5.4. Otofaji	26
1.6. AMAÇ	28
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	29
2.1. Materyaller	29
2.1.1. Pankreas Kanseri Hücre Hatları ve Özellikleri	29
2.1.2. Cihazlar	29

2.1.3.	Hücre Kültürü Donanımları	29
2.1.4.	Kimyasal Maddeler	29
2.1.5.	Kullanılan Antikor ve kitler	29
2.1.6.	Çözeltiler	29
2.2.	Yöntemler	30
2.2.1.	Hücre Kültürü.....	30
2.2.2.	Hücrelerin Dondurulması.....	30
2.2.3.	Hücrelerin Çözülmesi.....	30
2.2.4.	Hücre Canlılığın MTT Testi ile Belirlenmesi	30
2.2.5.	Koloni Formasyon Deneyi	31
2.3.	Floresan Mikroskopu.....	31
2.3.1.	Propidyum İyodür (PI) Boyama ile Ölü Hücrelerin Tayini	32
2.3.2.	2 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile Apoptotik Hücrelerin Tayini	32
2.3.3.	DiOC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişikliklerin Gösterilmesi	32
2.3.4.	Senesens β -Galaktosidase boyama	33
2.4.	Hücre içi lipid profillerindeki değişimlerin incelenmesi.....	33
2.4.1.	Oil-Red O boyama	33
2.4.2.	BODIPY® 493/503 boyama	33
2.5.	Hücre Akış Sitometrisi	34
2.5.1.	Hücre döngüsünde tutulu kalan popülasyonların Propidyum İyodür (PI) Boyama ile Belirlenmesi.....	34
2.5.2.	Annexin V/ PI Analizi ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi	34
2.6.	Total Protein İzolasyonu	34
2.6.1.	Protein Miktarının Bradford Analizi ile Belirlenmesi	35
2.6.2.	SDS-PAGE Jel Hazırlanması.....	35
2.6.3.	Protein Örneklerinin Hazırlanması	36
2.6.4.	Proteinlerin Membrana Transferi.....	36
2.6.5.	Bloklama işlemi ve Primer-Sekonder Antikorla İşaretleme	37
2.6.6.	Protein Bantların Görüntülenmesi.....	37
2.6.7.	PathScan® Phospho-Rb (Ser807/811) Sandwich ELISA Kit.....	38
2.7.	İstatistiksel Analizler	38
3.	SONUÇLAR.....	39

3.1. PANC-1 ve Panc10.05 Hücre Hatlarında palbociclib ve abemaciclib hücre çoğalmasını inhibe etmektedir.....	39
3.2. CDK4/6 İnhibitörleri olan palbociclib ve abemaciclib uygulaması PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında koloni oluşturma potansiyeline doza bağlı bir şekilde ket vurmuştur.....	40
3.3. Hücre siklusunda ana kontrol noktası olarak görev alan Retinoblastoma proteini CDK4/6 inhibitörleri uygulaması sonucu PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında farklı yanıt mekanizması geliştirmiştir.....	43
3.4. Palbociclib ve abemaciclib hücre döngüsü tutulmasında sinerjistik etki göstermektedir.	45
3.5. CDK4/6 inhibitörleri PANC-1 ve Panc 10.05 hücre hatlarında hücre sel yaşlanmanın tetiklenmesinde farklılık göstermektedir.....	52
3.6. Apoptotik popülasyonlar üzerindeki etkinin belirlenmesi amacıyla CDK4/6 inhibitörleri uygulamasını takiben pankreas kanseri hücre hatlarında erken ve geç ölüm kararı süreci farklılık göstermektedir.	53
3.7. Palbociclib ve abemaciclib pankreas kanseri hücre hatlarında hücre sağkalım ve ölümünü tetikleyici etki göstermektedir.	59
3.8. Palbociclib ve abemaciclib uygulaması ile birlikte her iki pankreas kanseri hücre hattı AMPK ile ilişkili üst ve alt sinyal kaskadında bulunan PI3K/Akt/mTOR tarafından modüle edilmektedir.....	64
4. TARTIŞMA.....	71
5. KAYNAKLAR.....	92
6. EKLER.....	102
6.1. EK A: Cihazlar	102
6.2. EK B: Hücre Kültürü Donanımları.....	103
6.3. EK C: Kimyasal Malzemeler	104
6.4. EK D: Kullanılan Antikor ve Kitler	105
6.5. EK E: Çözeltiler	108
ÖZGEÇMİŞ	110

KISALTMALAR

AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
AK:	Adenokarsinoma
AKT (PKB):	Protein kinaz B
AMP:	Adenozin monofosfat
AMPK:	AMPK-aktive protein kinaz
APAF-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APS:	Amonyum persülfat
APO-1:	Apoptoz antijeni-1
ATCC:	Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATG:	Otofaji ilişkili protein
ATP:	Adenozin trifosfat
Bak:	Bcl-2 antagonist protein
Bax:	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2:	B-hücre lenfoma
Bcl-xl:	B-hücre lenfoma-ekstra büyük
Beclin-1:	Bcl-2 etkileşimli protein
BH:	Bcl-2 Homoloji 3
Bid:	BH3-etkileşim bölgesi ölüm antagonisti
BRCA1/2:	Meme Kanseri Duyarlılık proteini Tip1/2
BSA:	Sığır serum albumin
BT:	Bilgisayarlı tomografi
CCND:	D-tipi siklinler
CDK:	Sikline bağımlı kinaz
CDK1:	Sikline bağımlı kinaz-1
CDK2:	Sikline bağımlı kinaz-2
CDK 4/6:	Sikline bağımlı kinaz 4/6

CDKi:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
CLB:	Hücre özütleme tamponu
c-Myc:	Miyelositomatossis viral onkogen homoloğu
Cip/Kip:	CDK inhibitör protein/kinaz inhibitör protein
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DİOC ₆ :	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DISC:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DR:	Ölüm Reseptörü
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
eIF2:	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 α
eIF4E:	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4E
ER:	Östrojen Reseptörü
ERBB2 (HER2):	Reseptör protein tirozin kinaz
FADD:	Fas-ilişkili ölüm domeni
FasL:	Fas-Ligandı
FBS:	Fetal sığır serumu
GDP:	Guanozin difosfat
GSK-3 β :	Glikojen sentaz kinaz-3 β
GTP:	Guanozin trifosfat
HRAS:	Protoonkogen
IAP:	Apoptoz inhibitor protein
IPMN:	İntraduktal papiller müsinöz neoplazi

KRAS:	Protoonkogen
LC3:	Mikrotübül ilişkili protein-hafif zincir 3
LKB-1:	Karaciğer ilişkili kinaz B-1
LY-2835219:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü (Abemaciclib)
MAPK:	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MMP:	Mitokondri membran potansiyeli
MRCP:	Manyetik rezonans kolanjiyopankretografinin
MRI:	Manyetik rezonans görüntüleme
mTOR:	Memeli rapamisin hedefi
mTORC1/C2:	mTOR kompleks ½
MTT:	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NRAS:	Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog
p16 (CDKN2A):	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
p16 INK4a:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
p53:	Apoptozun-tümör-ilşkili proteini -53
PanINS:	Pankreatik intra epitelyal neoplaziler
PARP:	Poli-ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu tuz
PD-0332991:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü bir ajan (Palbociclib)
PDAC:	Pankreatik duktal adenokarsinoma
PDK1:	Fosfoinositid bağımlı kinaz 1
PET:	Pozitron emisyon tomografisi
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-fosfat
PI3Kα:	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa
PP:	Pankreatik polipeptit
PTEN:	Fosfotaz ve tensin homoloğu

PVDF:	Poliviniliden florid
Ras:	Rat sarkoma viral onkogen homolog
Rb:	Retinonoblastoma
ROS:	Reaktif oksijen türevi
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
Ser:	Serin
TBS:	Tris tamponlu tuz
TBS-T:	TBS-tween
TEMED:	Tetrametiletildiamin
Thr:	Treonin
TNF- α :	Tümör nekroz faktörü α
TP53:	P53 geni
TRADD:	Ölüm domain ile ilişkili TNFRSF1A
Tsc1/2:	Tuberoskleroz kompleks 1/2
Tyr:	Tirozin
ULK-1:	Unc51 benzeri kinaz-1

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.Pankreasın endokrin ve ekzokrin yapısı.	1
Şekil 2.Pankreas Adenokarsinomasının ilerleyiş modeli [5].	2
Şekil 3.Pankreatik duktal adenokarsinomda (PDAC) genomik değişikliklerin düzenlenmesi (TCGA datasından alınmıştır).	3
Şekil 4.Dünya çapında pankreas kanseri için tahmini yaş standardı insidans oranlarını göstermektedir (yeniden düzenlenmiştir) [18].	5
Şekil 5.Mutant K-Ras GTP-GDP hidrolizinin normal hücre ve PDAC hücrelerinde gösterilmesi [39].	8
Şekil 6.Hücre döngüsü ilerlemesinde sikline bağlı kinazlar (CDK'lar) ve bunların düzenleyici partner proteinleri, siklinler ve CDK inhibitörleri [50].	11
Şekil 7.CDK4/6 inhibitörlerinin moleküler mekanizması (türkçeleştirilmiştir) [60].	14
Şekil 8.Hücre yaşlanmanın moleküler mekanizması [63].	15
Şekil 9.PI3K/AKT/mTOR sinyal mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [84].	20
Şekil 10.AMPK sinyalizasyonu ve metabolik fonksiyonları (yeniden düzenlenmiştir) [95].	23
Şekil 11.Apoptotik yolun mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [104].	26
Şekil 12.Otofajinin düzenlenmesi [99].	28
Şekil 13.Palbociclib ve Abemaciclib'in (0-10µM) PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin MTT Testi ile incelenmesi.	39
Şekil 14.Pankreas kanseri hücre hatları 3x10 ³ hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyucuklu petrilere ekilerek 24 saat boyunca seçili dozlarda abemaciclib (LY-2835219) uygulamasını takiben koloni formasyonu incelenmiştir.	41
Şekil 15.Pankreas kanseri hücre hatları 3x10 ³ hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyucuklu petrilere ekilerek 24 saat boyunca seçili dozlarda palbociclib (PD-0332991) uygulamasını takiben koloni formasyonu incelenmiştir.	42
Şekil 16.PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında seçili dozlarda palbociclib ve abemaciclib uygulamasının koloni oluşturma potansiyeline etkisinin incelenmesi.	43
Şekil 17.Pankreas kanseri hücre hatlarında CDK4/6 inhibitörlerinin ELISA testi ile Retinoblastoma aktivitelerinin incelenmesi.	44

Şekil 18.PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında CDK4/6 inhibitörü abemaciclib'in (LY-2835219) artan dozlarda 24 saat uygulaması sonrası hücre siklusunda hücre popülasyonlarının tutulu kalması üzerine etkisinin incelenmesi.	45
Şekil 19.PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında CDK4/6 inhibitörü palbociclib'in (PD-0332991) artan dozlarda 24 saat uygulaması sonrası hücre siklusunda hücre popülasyonlarının tutulu kalması üzerine etkisinin incelenmesi.	46
Şekil 20.Panc 10.05 pankreas kanseri hücre hattında CDK4/6 İnhibitörleri palbociclib (PD-0332991) ve abemaciclib'in (LY-2835219) seçili dozlarda 24 saat uygulaması sonrasında hücre siklusunda hücre popülasyonlarının tutulu kalması üzerine etkisinin incelenmesi.....	47
Şekil 21.Hücre siklusu kontrolünde görev alan moleküler hedeflerin palbociclib (PD-0332991) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immubolotlama ile irdelenmesi.....	48
Şekil 22.Hücre siklusu kontrolünde görev alan moleküler hedeflerin palbociclib (PD-0332991) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immubolotlama ile irdelenmesi.....	49
Şekil 23.PI3K/AKT/mTOR sinyal kaskadında görev alan moleküler hedeflerin palbociclib (PD-0332991) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immubolotlama ile irdelenmesi.	50
Şekil 24.PI3K/AKT/mTOR sinyal kaskadında görev alan moleküler hedeflerin abemaciclib (LY-2835219) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immubolotlama ile irdelenmesi.	51
Şekil 25.3x10 ⁵ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilen hücreler, ilaç uygulamasına takiben Senescence β -Galactosidase Staining Kit #9860 (CST) ile boyama gerçekleştirilmiştir.....	53
Şekil 26.PANC-1 hücre hattında Annexin V/PI hücre ölümü analizi.....	55
Şekil 27.Panc 10.05 hücre hattında 24 saat CDK4/6 inhibitörü uygulanması sonucu Annexin V/PI hücre ölümü analizi.....	56
Şekil 28.Apoptoz sinyal yolunda bulunan önemli moleküler hedeflerin CDK4/6 inhibitörleri uygulanmasıyla etkisinin incelenmesi.	57

Şekil 29.Otofaji sinyal yolunda bulunan önemli moleküler hedeflerin CDK4/6 inhibitörleri uygulaması sonucu etkilerinin irdelenmesi.....	58
Şekil 30. PANC-1 hücre hattında CDK4/6 inhibitörlerinin hücre sağkalımı, mitokondriyal membran potansiyeline ve hücre ölümüne etkisinin ışık ve floresan mikroskopunda incelenmesi.....	61
Şekil 31.CDK4/6 inhibitörlerinin Panc10.05 hücre hattında hücre sağkalımı, mitokondriyal membran potansiyeline ve hücre ölümüne etkisinin ışık ve floresan mikroskopunda incelenmesi.....	63
Şekil 32. Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin etkilerinin PANC-1 hücre hattında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu üzerinde protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi.....	64
Şekil 33.Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin Panc10.05 hücre hattında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu üzerinde protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi.....	65
Şekil 34.CDK4/6 inhibitörlerinin seçili dozlarda etkilerinin PANC-1 hücre hattında AMPK ve lipid metabolizması ile ilişkili önemli moleküler hedeflerin protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi.....	66
Şekil 35.CDK4/6 inhibitörlerinin seçili dozlarda etkilerinin Panc10.05 hücre hattında AMPK ve lipid metabolizması ile ilişkili önemli moleküler hedeflerin protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi.....	67
Şekil 36.BODIPY (4,4-difloro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indasen)-DAPI beraber (sol panel) ve Oil Red O boyama (sağ panel) sonucu PANC-1 hücrelerinde CDK4/6 inhibitörleri açısından değerlendirilmesi.....	69
Şekil 37.BODIPY (4,4-difloro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indasen)-DAPI beraber (sol panel) ve Oil Red O boyama (sağ panel) sonucu Panc10.05 hücrelerinde CDK4/6 inhibitörleri açısından değerlendirilmesi.....	70
Şekil 38. Palbociclib ve abemaciclib'in olası AMPK aktivasyonu ile birlikte AKT/mTOR sinyal yoluna etkilerinin şematize olarak gösterilmesi.....	90

TABLO LİSTESİ

Tablo 6.1. Kullanılan cihazlar listesi.	102
Tablo 6.2 Hücre doku kültüründe kullanılan malzemeler.....	103
Tablo 6.3. Kullanılan kimyasal maddelerin listesi.....	104
Tablo 6.4. İmmunoblotlama yönteminde kullanılan antikorlar ve kitlerin listesi.	108



ÖZET

Pankreas duktal adenokarsinoma (PDAC), pankreas tümörlerinin yaklaşık % 85'ini oluşturan ve en sık görülen pankreas kanseri türüdür. Günümüzde pankreas kanseri yüksek mortalite oranına sahiptir ve sağkalım oranı oldukça düşüktür. Genetik ve biyolojik olarak farklı mutasyonlar içermesi nedeniyle kanserin birçok alt tipi farklı agresiflik düzeyleri ile ilişkilendirilmektedir ve agresif doğası gereği, kanser mortalite istatistiklerinde dördüncü sırada yer almaktadır. Hücre içerisindeki sinyal mekanizmalarındaki bozulmalar devamlı proliferasyonla ve sağkalımla sonuçlanmaktadır. Pankreas kanseri gelişiminde rol oynayan KRAS genindeki mutasyon hücre sağkalımı ile ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu aktive etmektedir. Ayrıca hücre siklusunda görev alan CDK2NA'da ki ve tümör supresör *TP53* deki aktivasyon kaybı kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Hücre içerisinde enerji sensörü olarak mevcudiyetini koruyan ve hücre siklusu ile etkileşimde olan AMPK'nin değişimi kanser agresivitesinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Hücre döngüsündeki ve ilişkide bulunduğu sinyal yollarındaki bu kararsızlık ve sürekli proliferasyon kanser tedavisinde CDK inhibitörlerinin terapötik olarak etkinliklerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan CDK4/6 inhibitörleri olan palbociclib ve abemaciclib tek başına veya kombine tedavilerle tercih edilen önemli terapötik ajanlardır. Pek çok kanser tipinde de etkileri araştırılan bu küçük molekülü inhibitörler birçok sinyal mekanizmasının regülasyonunda önemlidir.

Bu çalışmada seçili pankreas kanseri hücre hatlarında CDK4/6 inhibitörleri palbociclib ve abemaciclib uygulaması sonucu potansiyel terapötik yetkinliklerinin AMPK'nde ilişkide olduğu alt ve üst sinyal yollarındaki protein ve lipid profilleri üzerine etkileri incelenmiştir. Metabolik yeniden programlamanın, kanser hücrelerini farklı ortamlara daha uyumlu hale getiren kanserlerin önemli bir özellik olarak karşımıza çıktığı ve bunu modüle eden AMPK'nin bu süreçte karar mekanizmasında önemli bir role sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Lipit sentezinin arttığı bilinen pankreas kanserinde lipit sentez sürecinin bastırılmasının kanser tedavisi için önemli bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Hücrelerde enerji metabolizmasının yeniden programlanması yolu ile CDKi'lerin pankreas kanserinde AMPK alt ve üst yolları ile ilişkili olarak bir terapötik hedef olabileceği ortaya konmuştur.

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common type of pancreatic cancer that accounts for about 85% of pancreatic tumors. Today, pancreatic cancer has a high mortality rate and the survival rate is very low. Many subtypes of cancer are associated with different levels of aggressiveness because they contain genetically and biologically different mutations, and by their aggressive nature, cancer ranks fourth in mortality statistics. Disruptions in signal mechanisms within the cell result in continuous proliferation and survival. Mutation in the KRAS gene, which plays a role in the development of pancreatic cancer, activates the PI3K / AKT / mTOR signaling pathway associated with cell survival. In addition, the activation loss in CDK2NA and tumor suppressor TP53 in the cell cycle causes uncontrolled cell proliferation. The change of AMPK, which maintains its presence as an energy sensor in the cell and interacts with the cell cycle, plays an important role in the development of cancer aggression. This instability and continuous proliferation in the cell cycle and in the signal pathways interacts with allows the therapeutic efficacy of CDK inhibitors to be improved in cancer treatment. Palbociclib (PD-0332991) and abemaciclib (LY-2835219), which are CDK4 / 6 inhibitors used in the treatment of breast cancer, are important therapeutic agents preferred alone or with combine treatments. Small molecule inhibitors, whose effects are investigated in many types of cancer, are important in the regulation of many signaling mechanisms.

In this study, the effects of potential therapeutic competencies on the protein and lipid profiles in the AMPK, which are associated with the application of CDK4 / 6 inhibitors palbociclib and abemaciclib in selected pancreatic cancer cell lines, were investigated. Concluded that metabolic reprogramming is an important feature of cancers that make cancer cells more compatible with different environments and AMPK, which modulates it, has an important role in the decision-making mechanism in this process. In pancreatic cancer, which is known to increase lipid synthesis, suppressing the lipid synthesis process is thought to be an important target for cancer treatment. Reprogramming energy metabolism in cells, it has been demonstrated that CDKi can be a therapeutic target in relation to AMPK lower and upper pathways in pancreatic cancer.

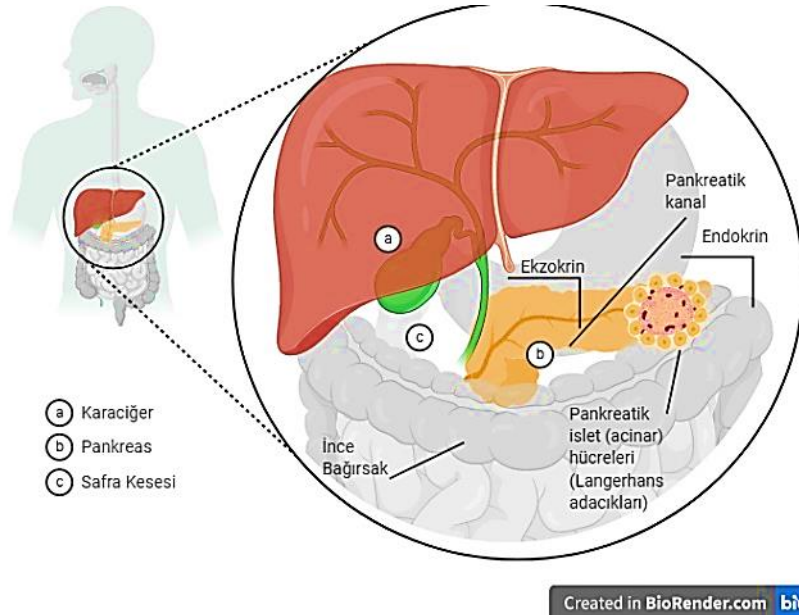
1. GENEL BİLGİLER

1.1. Pankreas Kanseri

Pankreas duktal adenokarsinoma (PDAC), pankreas tümörlerinin yaklaşık % 85'ini oluşturan ve en sık görülen pankreas kanseri türüdür. Batı ülkelerinde onuncu en yaygın kanser türüdür, ancak agresif doğası gereği kanser mortalite istatistiklerinde dördüncü sırada yer almaktadır [1].

Pankreasın 2 ana hücre türü vardır: Tüm pankreasın %85 ini ekzokrin pankreas, %2 sini endokrin pankreas oluştururken kalan kısmını da ekstrasellüler matriks ve damarlar oluşturmaktadır. Ekzokrin hücreler, pankreastaki hücrelerin çoğunu ve kanalları oluşturur. Endokrin hücreler, pankreastaki hücrelerin çok daha küçük bir yüzdesini oluşturur. Bu hücreler, adacıklar (Langerhans adacıkları) ve küçük kümeler halinde bulunur. Bu adacıklar insülin ve glukagon (kan şekeri seviyelerinin kontrolüne yardımcı olan) gibi önemli hormonlar (Pankreatik polipeptit (PP)) üretir ve bunları doğrudan kana salar [2].

Pankreas kanseri pankreasın hem ekzokrin hem de endokrin hücrelerinden köken alan farklı malignant tümörlerini kapsar (Şekil 1).

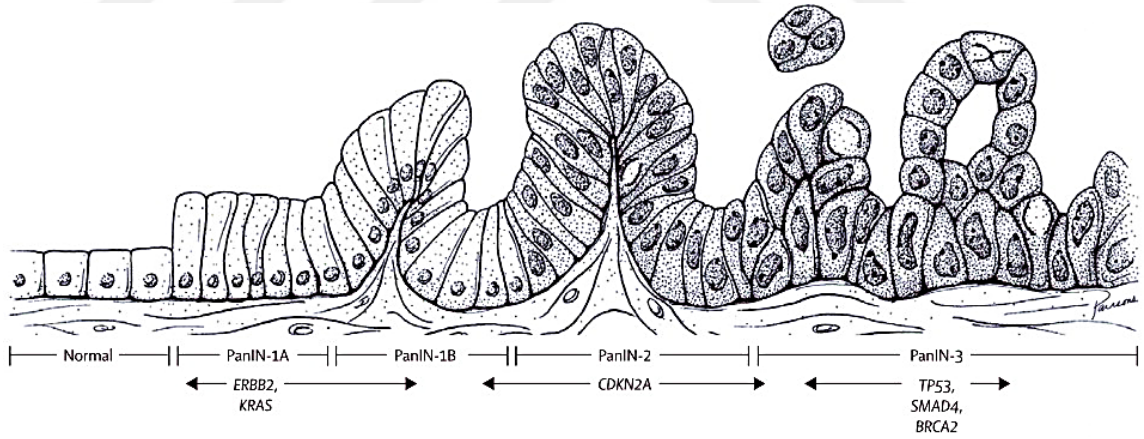


Şekil 1. Pankreasın endokrin ve ekzokrin yapısı.

Pankreas duktal adenokarsinomların karsinogeneğinde, pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanINs) olarak da adlandırılan neoplastik non-invaziv lezyonlardan, invaziv karsinomaya geçiş gör÷lmektedir (Şekil 2). Pankreatik kanallarda bulunan PanIN'ler, 5 mm'den küçük, mikroskobik lezyonlardır. 1 cm'den büyük olan intraduktal papiller mucus neoplazmadan (IPMN) bu özelliklerinden dolayı farklılık gösterirler [3].

PanIN'lerin erken evrelerinde (PanIN-1A, 1B), telomer kısalması ve onkogen K-RAS'ta mutasyonlar gözlenmektedir. Ara evrede (PanIN-2) p16 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu ve geç evrede (PanIN-3) ise p53, SMAD4 (DPC4) ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu görülür (Şekil 2). Klonal seçim ile kazanılmış tüm bu özellikler invaziv duktal adenokarsinoma dönüşümün temelini oluşturmaktadır [4].

IPMN'ler, intraduktal papiller büyümesi ve kalın mukus sekresyonu ile karakterize olan neoplazmalardır.



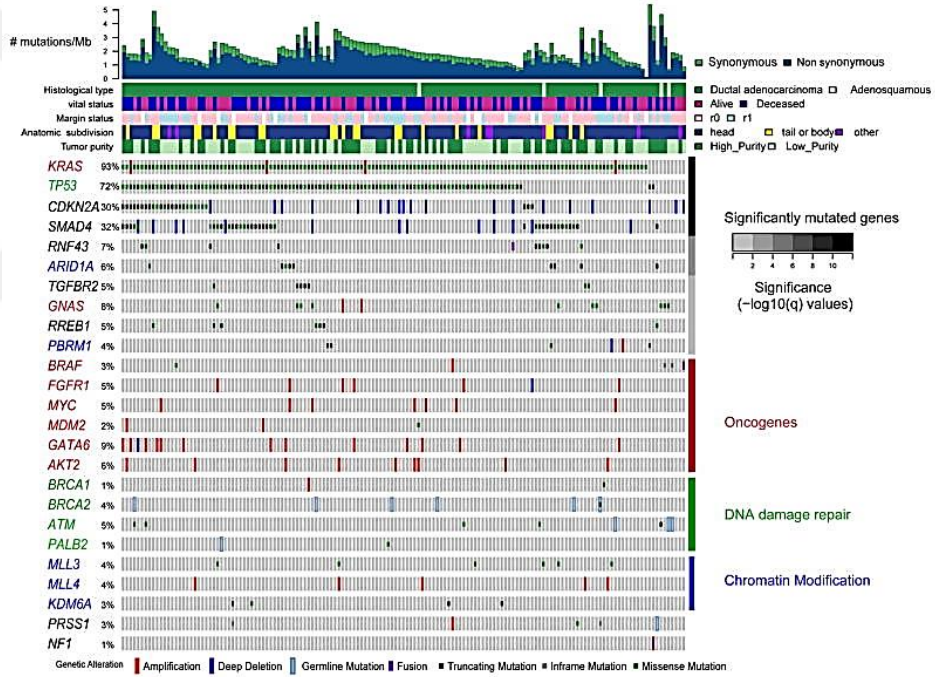
Şekil 2. Pankreas Adenokarsinomasının ilerleyiş modeli [5].

Patolojik olarak, IPMN'lerin invaziv karsinomlara kadar uzayabilecek farklı derecelerde displaziler gösterebildikleri tespit edilmiştir.

Epitelyal displazi derecelerine göre, IPMN'ler düşük dereceli displazi (adenom veya benign), orta dereceli displazi (sınır) ve yüksek dereceli displazi (malign) olarak sınıflandırılabilir. Ana kanal IPMN'lerin yaklaşık %60'ı yüksek derece displazi gösterir ve yaklaşık %45'i invaziv karsinom ile ilişkilendirilir [6].

IPMN'lerin yaklaşık %50'sinde KRAS onkogenini aktive eden nokta mutasyonları görülürken, KRAS mutasyonu sıklığında displazi derecesine bağlı olarak artış gözlenmektedir[7][8].

BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CDKN2A, APC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PRSS1 ve *STK11* gibi genlerdeki mutasyonların pankreas kanseri gelişiminde rol oynadığı tespit edilmiştir (Şekil 3) [9]. Dört ana gen olan *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* ve *CDKN2A* da ki kalıtsal genetik mutasyonlardaki değişimin ayrıca pankreas kanseri riskinin artmasında önemli faktör olduğu gösterilmiştir [10].



Şekil 3. Pankreatik duktal adenokarsinomda (PDAC) genomik değişikliklerin düzenlenmesi (TCGA datasından alınmıştır).

1.2. Pankreas Kanserinin Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri; sağkalım oranları, yaş, cinsiyet, kanser türü, tanı anında evreleme, tümör boyutu, tedavi yöntemleri, sağlık sistemlerinin farklılıkları ve bulunabilirliği gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Yaşam tarzı da en belirleyici etkenler arasındadır [11].

Agresif bir malignite olan pankreas kanseri gelişmiş ülkelerde kanser ölüm nedenleri arasında yedinci ve ABD'de en yaygın kanser ölümleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır [12]. GLOBOCAN istatistiksel verilerine göre pankreas kanseri ile ilgili olarak 2018 yılı içerisinde 458.918 yeni vaka tespit edilmiş olup bu vakalarda 2018'de 432.242 ölüme (kanserin neden olduğu tüm ölümlerin% 4.5'i) neden olan 11. en yaygın kanseri olarak sıralanmıştır [13] [14]. Avrupa ülkelerinde yüksek görülme sıklığı ile en yüksek insidans oranları Orta Avrupa, Kuzey Amerika, Arjantin'de gözlenmekle birlikte en düşük insidans oranları ise Afrika ve Doğu Asya ülkelerinde gözlenmiştir [3].

Erkek bireylerde pankreas kanseri riski kadınlardan daha yaygındır ve Orta-Doğu Avrupa'da ve Japonya'da yüksektir (Şekil 4). En düşük oranlar Gine ve Malawi'de kaydedilmiştir [14]. Kadınlarda pankreas kanseri insidansının en yüksek olduğu bölgeler Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa ve Avustralya / Yeni Zelanda'dır. Kadınlarda pankreas kanseri riski en düşük olan bölgeler Doğu Afrika ve Güneydoğu Asya'dır [14]. Kadın ve erkek bireylerde sigara içme prevalansındaki zamansal eğilimlerin pankreas kanseri mortalitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Gelişmiş ülkelerde, özellikle erkeklerde sigara içmenin azalması, pankreas kanserinde mortalite eğilimlerindeki azalmaya katkıda bulunduğu yaygın olarak kabul edilmektedir [15] [16]. Türkiye'de 2013 verilerine göre yıllık insidans erkeklerde ve kadınlarda farklılık göstermekle birlikte tanı anında hastalarda %52 oranında yayılmış hastalığın gözleendiği, %26 oranında ki hasta popülasyonunda ise bölgesel yayılımın olduğu yapılan araştırmalar sonucu tespit edilmiştir. Hastaların %15-20'sinde tümörün cerrahi olarak çıkarılabilir aşamada olduğu tespit edilmiştir [17].

Bu veriler doğrultusunda pankreas kanserinin bir yıllık genel sağ kalım oranının %26 olduğu, beş yıllık sağkalım oranının ise %6 olduğu tespit edilmiştir. Hastaların %70'inin sıklıkla 55-84 yaş aralığında olduğu gözlenmektedir [17].

2018'de tahmini yaş standardize mortalite oranları (Dünya)



Şekil 4.Dünya çapında pankreas kanseri için tahmini yaş standardı insidans oranlarını göstermektedir (yeniden düzenlenmiştir) [18].

1.3. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreas kanseri için çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Değiştirebilir faktörler ve değiştirilemez faktörler olarak ikiye ayrılabilir [19].

Değiştirilebilir risk faktörleri arasında sigara içme, alkol, obezite, diyet faktörleri ve toksik maddelere maruz kalma yer almaktadır.

- **Sigara içiciliği** en önemli risk faktörleri arasında gelmektedir. Milyonlarca insan dünya çapında tütün içmekte ve dünyada pankreas kanseri için en önemli çevresel faktörü olarak temsil edilmektedir. Sigara içme miktarı ve süresiyle doğru orantılı olarak artmaktadır [16]. Sigara içen gruplar içmeyenlere göre 2 kat daha risk altında bulunduğu istatistiksel verilerce tespit edilmiştir [20]. 2012 yılında, Avrupa Kansere Yönelik Olası Araştırma (EPIC) çalışmasında ki verilere göre günde içilen her beş sigara için pankreas kanseri riskinin arttığını ve pasif sigara içiminin pankreas kanseri riskini % 50 oranında artırabildiğini göstermiştir [21].

- **Alkol tüketimi** ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda ağır alkol tüketiminin mevcut sigara içenler arasında pankreas kanseri riskinde anlamlı bir artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur [22].
- **Obezite**, pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türleri için artmış risk ile ilişkili olmakla birlikte bazı çalışmalar obezitenin pankreas kanseri insidansını ve mortalitesini artırdığına yöneliktir [23]. Ayrıca hareketsizlik yağ birikimine ve aşırı kiloya katkıda bulunabildiği için pankreas kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Besin tüketiminde özellikle kırmızı etlerde sıklıkla bulunan nitrit veya N-nitrozo bileşiklerindeki kanserojenlerin pankreas kanseri riskini arttırmayla ilişkilendirilmesi mümkün olmaktadır [24]. İnsan pankreasında biriktiği bilinen ve bir metal olan, karsinogenezin farklı aşamalarında etki gösterdiği bilinen, DNA onarımını inhibe eden ve genomik instabiliteye neden olan kadminyumun pankreas kanseri riskini ve mortalitesini arttırdığı da istatistiksel verilerce desteklenmiştir [25] [26].

Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında ise cinsiyet, yaş, etnik köken, *diyabetes mellitus*, ailede pankreas kanseri öyküsü, genetik faktörler, kronik enfeksiyonlar ve kronik pankreatit bulunmaktadır.

- **Cinsiyet** ayırımına bakıldığında pankreas kanserinin erkeklerde kadınlardan daha yaygın olduğu tespit edilmiştir [14]. Pankreas kanseri, erkeklerde daha çok çevresel veya mesleki risk faktörlerinin yanı sıra ağır sigara içme alışkanlığı ve erkeklerde yüksek alkol alımı gibi yaşam tarzları nedeniyle daha fazla görülmekle birlikte erkeklerde ve kadınlarda kanser insidansını ve mortalitesini etkileyen henüz keşfedilmemiş genetik faktörlerin olması da mümkündür.

- **Yaş**

Pankreas kanserinin ağırlıklı olarak daha yaşlı bir popülasyonu etkilediği, hastaların çoğunun 50 yaşın üzerinde olduğunu bilinmektedir. Risk yaşla birlikte artar ve en yüksek görüldüğü yaş grubu 60 ila 80 yaş arasında gerçekleşir [27].

- **Etnik köken**

Yapılan çalışmalar arasında ırklar arasında pankreas kanseri insidansında önemli bir faktör ve farklılıklar olabileceğini ortaya çıkarmaktadır. Afrikalı-Amerikalılar için pankreas kanseri insidans oranları Kafkas ırkında daha yüksek iken, Asyalı-Amerikalılar ve Pasifik Adalarında görülme sıklığı en düşüktür. Genel olarak pankreas kanseri riski, siyah insanlarda diğer ırk gruplarından daha fazladır ve ırklar arasında pankreas kanseri insidansındaki farklılıklar diyet, alkol, sigara ve D vitamini yetersizliği gibi değiştirilebilir risk faktörlerine bağlanabilmektedir [28].

- ***Diyabetes mellitus***, özellikle Asya toplumunda ve hispanik erkeklerde beyaz ırk ve siyah ırk ile karşılaştırıldığında pankreas kanseri gelişme riskinde 2 kat artış ile sonuçlanmaktadır [29] [30]. Pankreas kanseri riski diyabet süresi ile azalır ancak diyabet tanısı konduktan sonra uzun yıllar boyunca pankreas kanseri riskinin devam ettiği belirtilmektedir [31].

- **Aile öyküsü**, pankreas kanseri gelişiminde diğer faktörlerden biridir. Pankreas kanseri olan bireylerin yaklaşık % 5-10'unun ailede pankreas kanseri öyküsü olduğu bildirilmiştir [32]. Pankreas kanseri olan ailelerin yapılan analizler sonucu, ailesel pankreas kanseri olan bireylerin birinci derece akrabalarının genel popülasyona göre dokuz kat daha fazla pankreas kanseri riskine sahip olduğunu göstermektedir [33] [34].

- **Genetik faktörler ve mutasyonlar**

Pankreas kanseri riskinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır. Pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %10'unda genetik varyasyonlar veya hastalığın gelişimindeki değişiklikler gibi bazı genetik yatkınlıklar bulunmaktadır [35] [36].

- **Pankreatit**

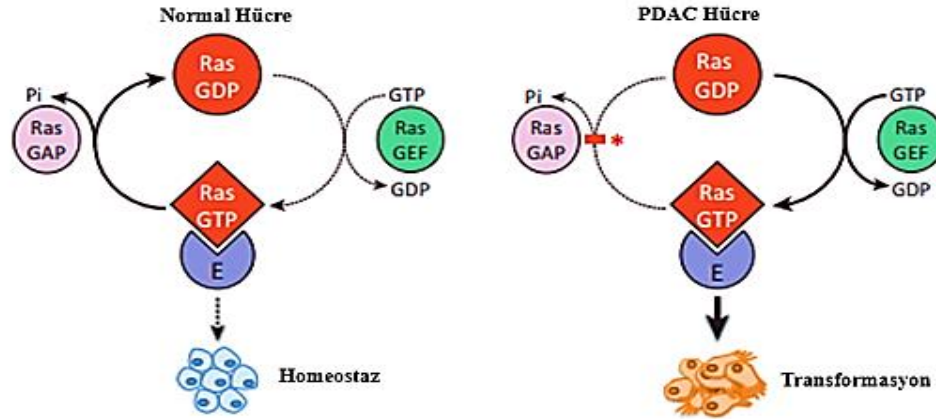
Akut veya kronik olabilen ve pankreas hasarını indükleyen pankreasın iltihaplanması sonucu gözlenmektedir. Akut pankreatit pankreasın tamamen yok edilmesiyle sonuçlanan şiddetli, tükenmeyen ağrıların malabsorpsiyonu ile sonuçlanan ilerleyici, yıkıcı bir inflamatuvar süreci indükleyerek kronik pankreatite yol açabilmektedir [37].

1.4. Pankreas Kanserinde Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

1.4.1. KRAS Mutasyonu

Hücre büyümesinde hücre bölünme aktivitesi açısından oldukça önemli bir yeri olan RAS proteini, membrandan başlayan büyüme faktörü sinyalinin birçok kilit sinyal yollarından biridir. KRAS, Ras proto-onkogen ailesinin bir parçası olmakla birlikte NRAS ve HRAS proteinleri de ailenin üyesi olarak bilinmektedir. KRAS proteinleri ikili moleküler anahtarlar şeklinde işleve sahiptir (Şekil 5). RAS proteini, Guanozin trifosfata (GTP) bağlandığında, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve hücre göçü gibi aktiviteleri düzenleyen moleküller ile birlikte etkileşime girmektedir. Aktive formunu kazanmakla birlikte GTPaz aktive eden proteinler (GAPlar) GTP'nin GDP'ye hidrolizini katalize eder ve sinyali sonlandırır [38].

Moleküler profillemeye çalışmaları sonucunda KRAS mutasyonunun tümör baskılayıcı gen olan sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A'nın (CDKN2A) (veya INK4A / ARF) pankreas kanserinde inaktive olduğu gösterilmiştir [39].



Şekil 5. Mutant K-Ras GTP-GDP hidrolizinin normal hücre ve PDAC hücrelerinde gösterilmesi [39].

KRAS, TP53, MYC (miyelositomatoz onkogen hücresel homolog) ve LKB1 (karaciğer kinaz B1) de meydana gelen mutasyonlar sadece artan PDAC proliferasyonunda değil, glikoz metabolizmasının değiştirilmesinde de rol oynamaktadır [40].

1.4.2. *TP53* ve *PTEN*

Transkripsiyon faktörü ve bir tümör baskılayıcı gen olan *TP53* geni çeşitli sinyal yollarının ana düzenleyicisi olarak görev almaktadır [41]. Bölünme sırasında hasarlı DNA moleküllerini tanıyarak hücre bölünmesini G1'den S fazına geçişte durdurarak, DNA hasarının tamirini sağlamak için bekletir [42].

Tümör baskılayıcı p53, genomik stabiliteyi sürdürme de ve tümörün önlenmesinde önemli bir rol oynar ve hücre döngüsünü durdurma, DNA onarımı, yaşlanma ve apoptozu indükleme yeteneğindedir [41] [43]. Hücresel stres olmadığı durumlarda düşük düzeyde p53, reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerini ve meydana gelen DNA hasarını azaltan anti-oksidan aktiviteyi uyarmaktadır [44]. *TP53* geni, insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında mutasyona uğramakta ve p53 fonksiyonunu etkileyen diğer genlerdeki mutasyonlar, normal p53 genini koruyan birçok tümörde görülmemektedir [45].

Mutasyona uğramış p53'ün PDAC'de invazyon ve metastazı teşvik ettiği moleküler temelli sistematik çalışmalarda açıklanmış olmakla birlikte hem murin modelinde hem de insan PDAC hücrelerinde kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olarak invazyon ve metastaz üzerindeki etkilerini arttırdığı tespit edilmiştir [46].

PI3K/ Akt sağkalım yolunun negatif bir regülatörü olan ve pankreas kanserinde delesyona uğramış bir başka tümör baskılayıcı gen olan fostofaz ve tensin homolog geni olarak isimlendirilen PTEN, tirozin fosfataz aktivitesi üstlenen bir proteini kodlar [47]. PTEN, lipid sinyalleme ara maddelerini defosforile ederek PI3K'e bağlı sinyalleme devresini devre dışı bırakarak tümör baskılayıcı görevini gerçekleştirir [43]. Pankreas kanseri gelişimi ve ilerlemesi sırasında tümör baskılayıcı SMAD4 ile sinerjik olarak işbirliği yaptığı bilinen PTEN'in pankreatik tümör oluşumunda başlıca tümör baskılayıcılardan biri olduğu gösterilmiştir. Pankreas kanserinde PTEN'de ki fonksiyonel kayıp önemli bir sıklıkta saptanmamış olsa da örneklerin % 70'inde immünohistokimyasal analizleri sonucu düşük PTEN ekspresyonu bildirilmiştir [48].

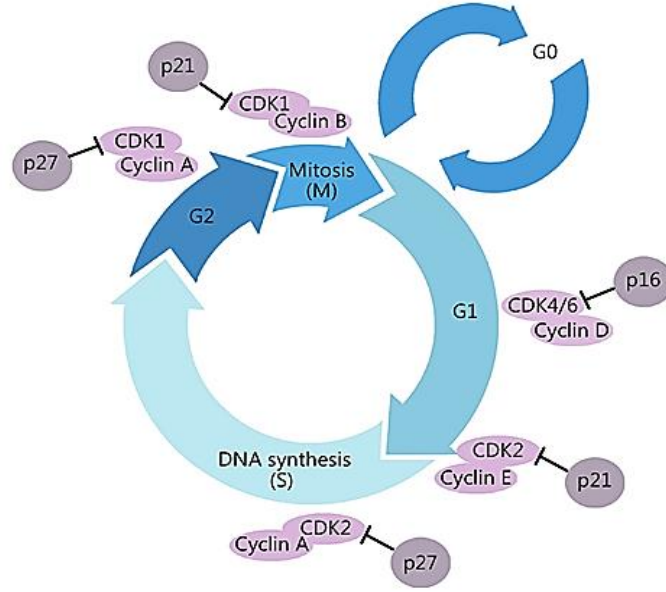
1.4.3. Hücre Döngüsü

Kanser anormal hücre çoğalması ile karakterize edilmektedir. Hücre çoğalması hücrenin üreyerek iki yavru hücre oluşturmasını içerir. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları (“check-points”) tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre bölünmesi, DNA replikasyonu ve replike olmuş kromozomların iki ayrı hücreye ayrılması ile birbirini izleyen iki süreçten oluşmaktadır. Aslında hücre bölünmesi mitoz bölünme süreci ve interfaz olarak iki aşamaya bölünmektedir. Mitoz evresi profaz, metafaz, anafaz ve telofaz aşamalarını içerirken; interfaz evresi de G1, S ve G2 fazlarından oluşmaktadır. Hücrenin genetik materyali S fazında (DNA sentezi) replike olur. M fazı hücrenin iki yavru hücreyi meydana getirdiği fazdır, mitoz ve sitokinez evrelerini içerir.

1.4.4. Siklinler ve Sikline Bağımlı Kinazlar (CDKlar)

Hücrelerin, hücre devrinin farklı fazlarından geçişi “siklinler” adı verilen proteinler tarafından düzenlenmektedir. Siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK’ler) ile işlev yapmaktadır. Siklin proteinin konsantrasyonu genindeki transkripsiyona bağımlıdır. Siklinler ile CDK’lerin eşleşmesi spesifiktir ve siklinler kendi CDK’lerinin regüle edici alt üniteleridir. Siklinin, CDK’ye bağlanmasıyla birlikte siklin-CDK kompleksinde CDK’nin katalitik alt ünitesinde konformasyonel değişikliği indükler ve aktif yer ortaya çıkar.

Hücre döngüsü esnasında CDK’lerin konsantrasyonlarında değişim olmaz. CDK protein seviyesi hücre döngüsü boyunca sabit kalırken, siklinlerin seviyeleri artıp azalarak CDK’ları periyodik olarak aktive eder. Farklı siklinler, hücre döngüsünün farklı fazlarında görev alırlar (Şekil 6). Şimdiye kadar dokuz CDK tanımlanmış olup bunlardan beş tanesi hücre döngüsü boyunca aktiftir. Örneğin; G1 fazında CDK4, CDK6 ve CDK2; S fazında CDK2, M fazında ise CDK1 aktive olmaktadır. CDK aktive olduğunda bazı aşağı akış proteinleri fosforile etmektedir. CDK7, siklin H ile birlikte CDK aktive edici kinaz olarak davranır [49].



Şekil 6.Hücre döngüsü ilerlemesinde sikline bağlı kinazlar (CDK'ler) ve bunların düzenleyici partner proteinleri, siklinler ve CDK inhibitörleri [50].

İnsan tümörlerinde hücre devri regülatörlerini kodlayan genler çoğu kez mutasyona uğramaktadır ve bu da hücre devrinin hatalı regülasyonunun kansere sebep olabileceğini göstermektedir. Kanserde bulunan mutasyonlar, siklinlerin çoklu ekspresyonunu ve CDK genlerinin amplifikasyonlarını içerir. Örneğin CDK4/6 da bulunan mutasyon pankreas kanseri gelişimine sebep olmaktadır. G1 kontrol noktasından geçişin kontrolünü sağlayan siklin D-CDK kompleksinin anahtar proteini Retinoblastoma proteini (Rb) dir [50].

Rb, G1-S fazı geçişi sırasında moleküler bağ olarak işlev yapmaktadır. Rb spesifik DNA dizisine bağlanmaz, onun yerine S fazı için gerekli olan genlerin ekspresyonu için önemli olan E2F transkripsiyon faktörü ailesinin aktivitesini regüle eder [50]. CDK'lerin aktiviteleri fosforilasyon/defosforilasyon yoluyla da düzenlenebilmektedir. Doğal CDK inhibitörleri (p15, p18, p19, p21 ve p27) siklinler aracılığıyla ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'lerin aktivitelerini inhibe etmektedir.

1.4.5. Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKi)

Kanser; apoptoz (programlanmış hücre ölümü), hücre döngüsü kontrolü kaybı ve büyüme sinyallerinin aşırı ifadesi ile sonuçlanan kontrolsüz bir büyümedir. İnsan genomunda 20 farklı sikline bağımlı kinaz (CDK) ailesi üyesi vardır. CDK'ler hücre döngüsü geçişlerini ve transkripsiyon dahil diğer önemli hücresel fonksiyonları kontrol eder. Normal dokularda hücre siklusu ilerlemesini siklinler; sikline bağımlı kinazları (CDK) ve düzenleyici proteinleri, bir fazdan diğerine hücre ilerlemesini düzenleyen kompleksleri aktive eder. Kontrolsüz CDK aktivitesi genomik kararsızlığa sebep olmaktadır. Bu yüzden CDK'ler hücre döngüsünün ana regülatörü olarak işlev görmektedir. Hücre siklusunun kontrolü sırasında doğal CDKi 'leri etkiyi tersine döndürme noktasında kritik rol oynamaktadır. Siklin-CDK aktivitesini regüle eden iki önemli inhibitör ailesi mevcuttur; p16^{INK4a} ve p21 (Cip/Kip) aileleri. INK proteinleri CDK4/6' ya bağlanarak siklin D' ye bağlanmayı engeller ve p-RB proteininin fosforilasyonu engellerek G1-S fazı geçişinin durdurulmasından sorumludur. p21 ailesi üyeleri p21^{cip1} (CDKN1A), p21^{kip1}, p21^{kip2} hem siklinlerle hemde onlarla ilişkide bulunan CDK'lerle birlikte özellikle CDK2 ve siklin E ve ATP bağlanan yeri bloke eder böylece kinaz aktivitesini engeller.

Bu inhibitörlerin ubiquitin aracılı yıkımı inhibitörlerin hücre döngüsü sırasında gerekli zamanlarda mevcut olmasını sağlar. Serin/treonin kinaz olan CDK ve siklin aktivitesinin hücre döngüsünde düzensizliği genellikle kanserin önemli bir özelliği olan hücrelerin sınırsız çoğalması ile ilişkilendirilmektedir ve CDK'lerin kanserlerde over eksprese olması durumu anti-kanser ajanlar olarak CDK inhibitörlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır [51] [52].

1.4.6. CDK4/6 İnhibitörü Olan Palbociclib ve Abemaciclib'in Kanser Üzerine Etkisi

Hücre döngüsü ilerlemesinde G1'den S fazına geçiş sırasında sikline bağımlı kinazların (CDK) ve D-tipi Siklinlerin (CCND) anahtar rolü 20 yıldan uzun bir süre önce keşfedilmiştir. CDKi, hücre döngüsündeki kontrolsüz hücre çoğalmasını engellemede ve tümör baskılanmasındaki işlevlerinden dolayı kanser gelişiminde hedef olmaktadır.

Hücre siklusu baskılanarak hücre içerisinde değişen sinyalizasyon mekanizmasını anlayabilmek içinde kritik rol oynamaktadır. Bilinen ve tedavide en yaygın kullanılmakta olan sikline bağımlı kinaz (CDK) 4/6 inhibitörleri abemaciclib, palbociclib ve ribociclibdir (Şekil 7). Hücre döngüsü ilerlemesini durdurmaya yönelik olan bu ilaçlar hücre yaşlanmasını indükler ve sitotoksik T hücreleri aracılı bir etki ile kanser hücresi bozulmasını teşvik edebilmektedir. Etki mekanizmaları, p-Rb aktivitesinde bir artış ile CCND-CDK4 / 6 komplekslerinin önemli ölçüde inaktivasyonuna yol açan CDK 4 ve 6 ATP cebine bağlanmaya dayanır. Bu yol aracılığıyla G1 fazı durmaktadır. Hücre döngüsü ilerlemesine müdahale, tümör hücrelerinde artan apoptoza neden olur [53]. Palbociclib ve ribociclib kimyasal yapıda benzerken, abemaciclib diğer iki CDK4 / 6'den farklı ve daha yüksek bir CDK4 / 6 bağlama gücüne sahiptir [54] [55] [56].

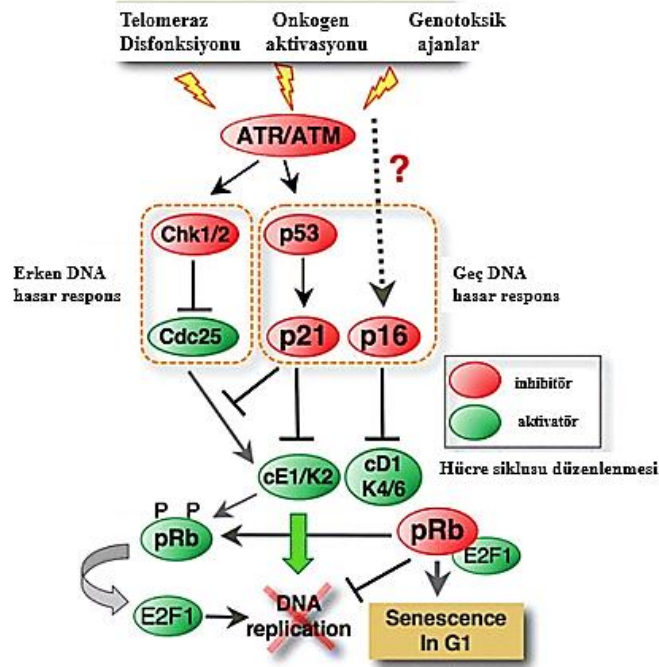
Daha spesifik olarak abemaciclib, kompleks CDK4 / siklin D1 için diğer iki bileşiğe kıyasla daha yüksek seçicilik göstermektedir ve CDK4'e karşı CDK6'ya göre 14 kat daha güçlü olduğu tespit edilmiştir.

Palbociclib (PD 0332991; Pfizer, Inc) ve abemaciclib (LY2835219; Eli Lilly and Company) şu anda ileri metastatik hormon reseptörü pozitif (HR, +)/ HER2-negatif meme kanseri tedavisi için onay almış CDK4/6 inhibitörleridir [57].

Palbociclib (PD 0332991) oral olarak alınabilen bir CDK4/6 inhibitörüdür. CDK4 ve CDK6 siklin-D1 aktivitesini kuvvetli bir şekilde inhibe etmektedir. Palbociclib'in, Rb pozitif hücreler üzerinde proliferasyona karşı etki gösterdiği ve bir dizi kanser hücre hattında seçici olarak G1 tutulmasına yol açtığı tespit edilmiştir. İlaç, siklin D1'in artan ekspresyonu veya p16 kaybı ile indüklenen yüksek derecede aktif hücrelerde güçlü aktivite göstermekle birlikte, Rb kaybı ilaç direncine neden olmaktadır. Genel olarak, Rb pozitifliği palbociclib etkinliğinin önemli bir biyobelirteçidir. Palbociclib'in neden olduğu CDK4 ve CDK6'nın inhibisyonu, Ser780 / Ser795'te Rb fosforilasyonunun tamamen bastırılmasına yol açmaktadır [50]. Ayrıca, radyasyon tedavisi ve palbociclib kombinasyonu, ayrı ayrı uygulamalara göre her iki tedaviye kıyasla potansiyel tedaviye olumlu etki sağlamıştır.

1.4.7. Hücresel Yaşlanma

Hücresel yaşlanma (senesens), farklı metabolik aktivite ve hücre morfolojisindeki değişikliklerle birlikte yaşanan primer hücrelerde telomer hasarı tarafından tetiklenen G1 fazında (G1 çıkışı) geri dönüşümsüz olarak hücre döngüsü durması olarak tanımlanmaktadır [61] [62]. DNA hasarı sonrasında hücreler, hücre döngüsü ilerlemesini engellemek ve DNA onarımını başlatmak için bir sinyal kaskadını aktive etmektedir. DNA hasar yanıtının (DDR) ilk adımlarına ATM ve ATR'nin p53 ve p21 dahil olmak üzere birçok faktörün aktivasyonuna yol açan eylemleri aracılık etmektedir. Bu faktörler birlikte, Cyclin-CDK kompleksleri olarak hücre döngüsü aktivitelerini inhibe ederek hücre döngüsü ilerlemesini durdurur [63].



Şekil 8.Hücresel yaşlanmanın moleküler mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [63].

Siklin E1-Cdk2 kompleksleri DNA replikasyonu başlangıcını, bir takım replikasyon proteinlerini doğrudan fosforile ederek kontrol eder.

DNA hasarına maruz kalan çoğalan hücrelerde telomer hasarı veya aktif onkogenler tarafından tetiklenen ATM / p53 / p21 yolu, yaşlanma ile ilişkili G1 tutuklanmasında merkezi bir rol oynar (Şekil 9) [63] [64]. Yapılan çalışmalar sonucu siklin D1 aktivasyonu gösteren ve yaşlanan fibroblastların önemli bir kısmının tetraploid yapıdaki hücrelerin G1 fazında tutulu kalmadığı, bu fazda tutuklu kalmamanın aksine G2/M' de hücre döngüsünü durduğunu bildirmektedir.

G1 fazında tutulu kalmamanın ve G2 fazında tutulu kalma mekanizmasının p21'in aktivasyonu ile birlikte gerçekleştiği ve bu durumda hücrelerde siklin D1 ve E1 birikimi gözlemlendiği tespit edilmiştir. Hasara uğramış olan telomerlerin özellikle G2 noktasında DNA hasarı mekanizmasını aktive ettiği ve p53/p21 bağımlı hücre döngüsü durmasına neden olduğu gözlenmiştir. [65] [66] [67].

Yaşlanan hücrenin yaşayabildiği fakat DNA sentezlemeyi durdurduğu bilinmektedir. Bu durumda [3H] -timidin veya 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) bileşimi gösterememektedir. Bu hücreler karakteristik morfolojik değişiklikler elde etmekle birlikte sitoplazmik vakuolleri fazla olan farklı gen ekspresyon profili ile tanımlanabilir. Ayrıca yaşlanan hücrelerin tespiti için en yaygın biyobelirtecini hücre içerisindeki lizozomal aktivite olduğu bilinmektedir. Asidik pH de, (pH 5.5-6.0) hücresel yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidazın (SA- β -gal) artan aktivitesi ile karakterize bir biyokimyasal analiz yoluyla tanımlanabilmektedir [68].

1.4.8. Pankreas Kanserinin Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Pankreas kanseri tanısı oldukça zor olan kanser türü arasındadır. Hastalıkla ilgili spesifik olmayan semptomlar ve daha birçok faktör sebebiyle özellikle hastalığın ilerleyen evrelerinde tanı ve tedavi zorluğu ortaya çıkmaktadır. Tanı ve tedavi için cerrahi yöntemlerle çeşitli tümör belirteçleri ile görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır [69]. Tarama için gelişmiş manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve manyetik rezonans kolanjiyopankretografinin (MRCP), endoskopik ultrason (EUS) bulgularıyla en iyi tanıyı ortaya koyduğu saptanmıştır.

BT ve MR+MRCP öncelikle tercih edilir. ERCP tanıda esas olarak kabul edilse de günümüzde MRCP non-invaziv olması sebebiyle tercih edilmektedir [70]. Bununla birlikte endoskopik ultrason, bilgisayarlı tomografi (BT) ve MRI ile karşılaştırıldığında 2 cm'den küçük pankreatik lezyonları tanımlamak için daha yüksek bir duyarlılığa sahiptir. Endoskopik ultrason ayrıca pankreas lezyonlarını daha da karakterize edilmesine yardımcı olmak için ince iğne aspirasyonu ile kombine edilebilir [71] [72] .

Tanı için başka bir önemli yöntem pozitron emisyon tomografisi (PET) dir ve daha çok metastatik lezyonların varlığını tespit etmek için kullanılır. Hastaya az miktarda radyonüklid madde ile işaretli glikoz enjekte edilir ve glikozun biriktiği yerler tespit edilir. Kanseri hücreler daha çok glikoz topladığından daha koyu renkte görünür ve bu şekilde tespit edilir.

Tanı için kullanılan ve önemli bir biyobelirteç olan serum kanser antijeni 19-9 (CA 19-9), ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından pankreas kanserinin rutin yönetiminde kullanım için onaylanmıştır [73]. Serum kanser antijeni ile ilişkili adezyon molekülü 1 (CEACAM1), serum makrofaj inhibitör sitokin 1 (MIC-1) apolipoprotein A1, gibi aşırı ifade edilen genlerin protein ürünleri, genomik, epigenetik moleküler belirteçler sıklıkla kullanılmaktadır [74].

Pankreas kanseri tedavisi; cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi olmak üzere 3 ayrı yöntemden oluşmaktadır. Whipple prosedürü pankreas kanseri için cerrahi tedavinin en bilinen yöntemidir ve son zamanlarda uygulanan bu yöntemle yüzde 20'nin üzerinde 5 yıllık sağkalım oranları bildirilmiştir. Cerrahi operasyonun amacı, R1 rezeksiyonlarına kıyasla anlamlı derecede iyi bir sağkalım ile ilişkili olduğundan R0 rezeksiyonu (kesip çıkarma) elde etmektir [75].

Pankreas kanseri tedavisinde en sık kullanılan radyoterapi genellikle kemoterapiyle birlikte radyasyon tedavisi daha etkili olacağı için aynı anda uygulanır ve adjuvan (cerrahi sonrası) ve neo-adjuvan (cerrahi öncesi) tedavi olarak sınıflandırılır. Kemoterapi uygulaması ile pankreas kanseri hücrelerinin büyümesini ve bölünmesini durdurmak amacıyla kemoterapi yani ilaç tedavisi yapılmaktadır.

Pankreas kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları gemsitabin, 5-fluorasil, kapesitabin, sisplatin, irinotecan ve oksaliplatindir.

Bu ilaçların işlevi, reaktif bölgelerinin hücre DNA veya RNA'sındaki nükleotitlerle etkileşime girmelerini sağlayan çapraz bağlanma mekanizmasına dayanmaktadır. Bu şekilde hücre döngüsünün kesintiye uğraması kanser hücrelerinde apoptoza neden olur [60].

Pankreas kanserinde tanı ve tedavi zorluğunun farkındalığı gerçekleştirilmek istenen hedefe yönelik tedavilerinde ritmini belirlemede önemlidir. Özellikle spesifik belirlenen genler, proteinler ve kanserin hayatta kalmasına katkıda bulunan mikroçevreyi hedef alan tedavi stratejileri hedef alınarak gerçekleştirilmelidir.

1.5. Hücre Ölümü ve Sağkalımı ile İlişkili Sinyal Yolakları

1.5.1. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu

PI3K/AKT sinyal yolu, hücresel metabolizmada, tümör gelişiminde, büyüme ve proliferasyonda, metastaz ve hücre iskeletini yeniden düzenleme gibi bir çok olayda rol oynamaktadır ve hücre içi hücre sinyalizasyonun önemli bir parçasıdır [76]. İnsan kanserlerinin çoğunda bu sinyal yolunda pek çok değişim tespit edilmiştir.

PI3K sinyal yolu reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve reseptör tirozin kinazlardan bağımsız olarak aktive olabilir. RTK'lar fosfotidil inositol 3 kinaz'ı (PI3K) aktive eder. PI3K'ler PIP2 (fosfatidilinositol (4,5) bifosfatı) fosforilleyerek PIP3'e (fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfat) dönüştürür. Fosfotidil inositol bir membran komponentidir[77].

PIP3'ün PIP2'ye geri dönüşünü sağlayan, bu sinyal yolunun aktivasyonu ile zıt çalışan fosfataz ve tensiz homoloğu (PTEN) ana aşağı regülasyon proteinidir.

3 sınıftan oluşan PI3K'lerden; Sınıf I PI3K'ler, bir katalitik (CAT) alt birimden (yani, p110) ve bir adaptör / düzenleyici alt birimden (yani p85) oluşan heterodimerlerdir [78].

Hücresel yaşam ve ölüm mekanizmaları olmak üzere birçok hücresel fonksiyonun gerçekleştirilmesinde ana regülatör olarak görev alan AKT (PKB/Akt) bir serin/ threonin kinazdır ve AKT son derece korunmuş 3 üyeye sahiptir: AKT1, AKT2 ve AKT3 [77].

PI3K aktivasyonu, substrat fosfatidilinozitol-4,4-bisfosfattan (PI-4,5-) ikinci mesajcı fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfatın (PI3,4,5-P3) üretilmesine yol açar. AKT, PIP3 vasıtasıyla hücre zarına taşınır (Şekil 10). Burada fosfoinositide-bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından Thr308 bölgesine fosfat eklenir.

AKT / PKB, tek başına hücre sağkalımı ve hücre döngüsü ilerlemesi ile ilgili çeşitli hücre süreçlerini düzenlemektedir [78]. Pro-apoptotik proteinlerin işlevini bloke ederek hücrelerin hayatta kalmasını teşvik eden AKT, Bcl-2 aile üyelerinin, Bax proteininin ve Bim proteininin işlevini veya ifadesini negatif olarak düzenler. AKT ayrıca, FoXO ve p53 gibi transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkilerle BH3 proteinlerinin ekspresyonunu da inhibe eder. AKT, Mdm-2'nin fosforilasyonu yoluyla p53 bozulmasını destekleyebilir.

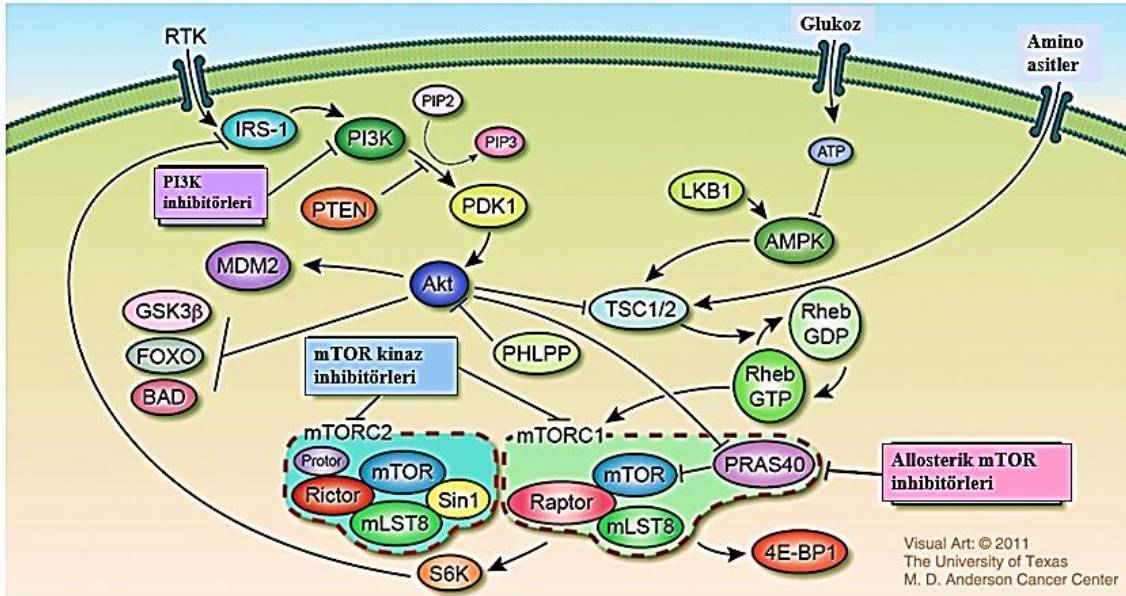
AKT ayrıca, yüksek oranda korunmuş bir N-terminal düzenleyici bölgesinde GSK3 izoformlarını fosforile edebilir ve kinazı inaktive edebilir, böylece GSK3 ile apoptoz ve glikoz metabolizmasını düzenler. AKT'ın alt sinyal yolunda rapamisininin hedefi ile etkileşimde olduğu bilinen mTOR, bir serin/treonin protein kinaz olup hücre büyümesi, hücre döngüsünün devamlılığı, besinlerin hücre içine alınımı, protein sentezi ve otofajiyi düzenlemede görevlidir [79].

mTOR proteini, anjiyogenez ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden 289-kDa'lık bir serin/treonin kinazdır ve mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki kompleksten oluşur [80] [81]. mTORC1 translasyon başlatma ve ribozom biyogenezinin kritik regülatörüdür. mTORC1 genellikle deregüle edildiğinde hücre proliferasyonu ve kanser progresyonu ile ilişkilidir ve mTORC1 kompleksi RAPTOR (mTOR'un düzenleyici ilişkili proteini), mLST8 (GβL olarak da bilinir) ve PRAS40 proteinlerini içerir [81] [82].

Memeli hücrelerinde fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) ve serine/treonine kinaz AKT, mTOR'u iki mekanizma (mTOR'un direk fosforilasyonu ve TSC2'nin inaktivasyonu) ile aktive eder. Ayrıca AMPK'nın inaktivasyonunda AKT aktivasyonunu tetiklemektedir. mTOR aktivasyonunun negatif düzenleyicileri arasında, PI3K-AKT sinyal yolu ve tübero skleroz kompleksi (TSC) 1 (hamartin) ve TSC2 (tuberin) sinyallerini inhibe eden fosfataz ve tensin homologu (PTEN) bulunmaktadır [78].

TSC inaktivasyonu sayesinde GTP-bağılı Rheb proteinini mTORC1 ile interaksiyona girer; bu sayede mTORC1, p70-S6 kinaz (S6K) ve ökaryotik başlatıcı faktör 4E bağlayıcı protein (4E-BP)'nin fosforilasyonuna neden olarak hücre büyüme ve proliferasyonunu sağlayan protein translasyonunun indüklenmesini sağlar [83].

S6K ve ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E) bağlayan protein 1'i (4E-BP1) aktive edebilir, S6K ribozomal S6'yı aktive edebilir ve protein sentezini ve hücre büyümesini destekleyebilir. mTOR'un, lipid ve sterol biyosentezini düzenlemek için sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1 (SREBP1) yoluyla metabolizma üzerindeki önemli etkiye sahip mekanizmalar olduğu bilinmektedir [84].



Şekil 9.PI3K/AKT/mTOR sinyal mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [84].

1.5.2. AMPK Sinyal Yolu

Adenozin monofosfat (AMP) aktive edici protein kinaz (AMPK), hücrenin birçok metabolik stres durumlarında aktive olarak hücredeki enerji homeostazını düzenleyen kritik bir serin/treonin protein kinazdır [85].

Üç ana alt birimden oluşan AMPK, katalitik α -alt birime (α -1 ve α 2), bir iskelet β -alt birime (β 1 ve β 2) ve bir düzenleyici γ -alt birime (γ 1, γ 2 ve γ 3) sahiptir [86]. AMPK, hücre içerisindeki AMP/ADP: ATP oranındaki değişimle birlikte, düşük glukoz seviyesinde duyarlılık göstermektedir.

Yağ asidi, protein ve kolesterol sentezi, glikoz alımı süreçleri gibi enerji gerektiren ve ATP tüketimine sebep olan aktivasyonlarda metabolik fonksiyonların yeniden düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır [87].

AMPK, AMP:ADP oranındaki değişim ile birlikte AMP ve ADP, AMPK'nin γ -alt biriminde bulunan Thr 172'ye bağlanarak AMPK'nin fosforilasyonunu arttırarak aktive eder [86] [88].

AMPK'yi aktive edebilen ve fosforilasyonundan sorumlu ana kinazlardan biri olan LKB1 (serin-threonine karaciğer kinaz B1) önemli bir tümör supresör olarak görev almaktadır [86]. LKB1, AMPK'nin Thr172 residüsünü fosforile ederek aktivasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca CaMKK β (Ca²⁺/calmodulin-bağımlı protein kinaz β)'de AMPK'nin fosforile olmasına aracılık etmektedir [86].

CaMKK β , ATP/ADP/AMP seviyelerinin değişmesinden bağımsız bir şekilde hücre içerisindeki Ca²⁺ konsantrasyonunun artmasıyla aktivasyonu sağlamaktadır ve AMPK'yi bu şekilde fosforilasyon yolu ile aktive edebilmektedir. İskelet kaslarının özellikle egzersiz ile birlikte yoğun bir şekilde kasılma işlemiyle AMP ve ADP seviyelerinde artış meydana gelirken ATP oranında azalma gözlenmektedir. AMPK aktivitesiyle birlikte protein, yağ asitleri, glikojen ve kolesterol sentezi gibi yapılar inhibe edilir. Bununla birlikte yağ asidi oksidasyonu süreci, kanda glukoz seviyesinin düzenlenmesi ve hasarlı hücrelerin otofaji ile yok edilmesi işlemi aktive edilir (Şekil 12) [89] [90]. Glikoliz regülatörü olarak bilinen AMPK, aerobik glikoliz ile karakterize edilmiş pankreas kanseri oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır [86].

AMPK, kolesterol, yağ asitleri (FA) ve trigliseritlerin (TG) sentezini inhibe ederek yağ asidi β -oksidasyonunu aktive etmektedir. İnhibi edici AMPK fosforilasyonu yağ asidi sentezini iki farklı şekilde düzenleyebilmektedir.

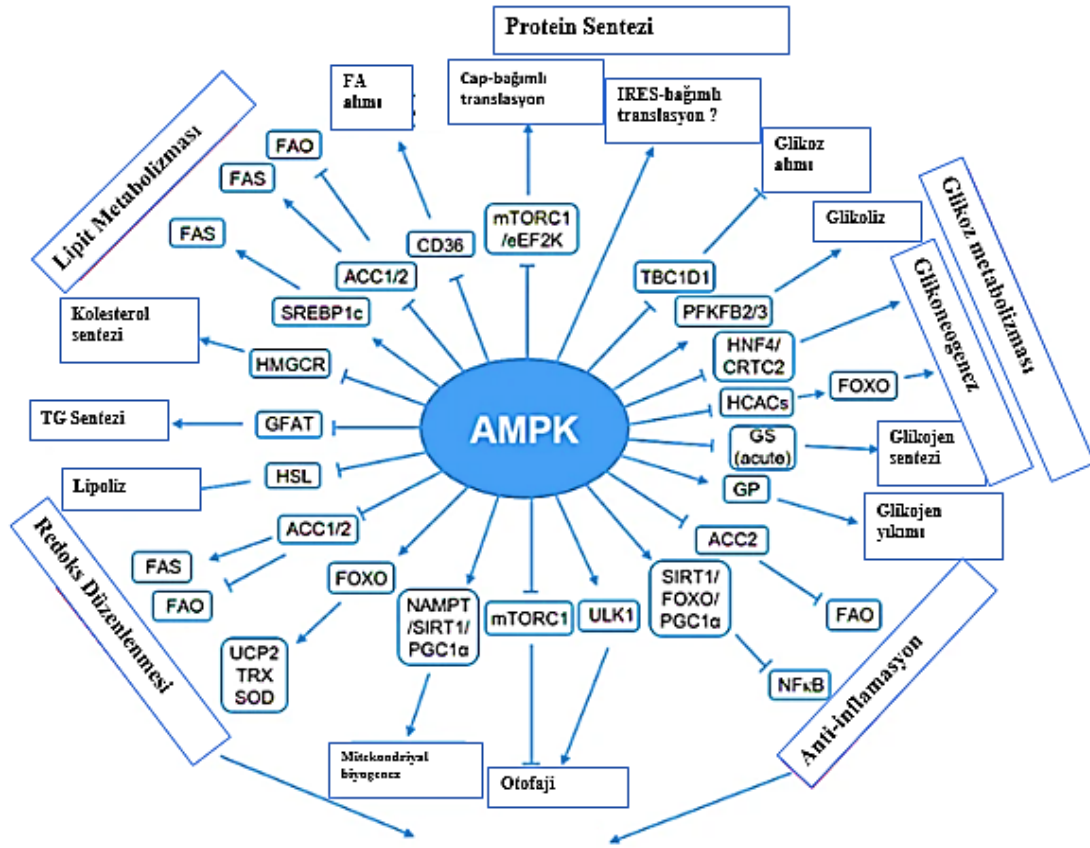
Bu yollardan bir tanesi Asetil CoA'nın Malonil CoA'ye karboksillemesi yağ asidi sentezlenmesi ve bu reaksiyon ile birlikte Asetil-CoA karboksilaz 1 (ACC1) ile katalizlenmesi olarak gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon yağ asidi sentezinin hız sınırlayıcı basamağı olarak görev almaktadır [86] [91].

AMPK bu enzimi inhibe ederek yağ asitlerinin sentezini engeller. Hücrelerde aşırı miktarda FA'nın birikmesi Triaçil Gliserol (TAG) olarak depolanmasına neden olur.

FA'lar hücre içine alınarak karnitin palmitoilttransferaz-1 (CPT-1) ile mitokondri içine alınır. Bu olay sonrası yağların β -oksidasyonu gerçekleşmektedir [86].

AMPK, CPT-1'in aktivitesini artırma yolu ile ve asetil-CoA karboksilaz 2 (ACC2)'nin fosforilasyonu da malonil-CoA oluşumunu engelleyerek yağ asidi sentezini baskılamaktadır. Bunun yanında AMPK serbest yağ asidi miktarını, yağ asitlerinin beta oksidasyonu yolu ile kontrol etmektedir. Bu kontrol ile birlikte lipogenez yani yağların yapımı ya da lipoliz yani yıkımı arasındaki dengenin sağlanması şeklinde olmaktadır [86].

Bir serin / treonin kinaz olan ve ribozomal protein sentezinde önemli bir rol oynadığı bilinen mTOR'un iskelet kas kütlelerinin korunmasında önemi büyüktür [86] [92]. Bunun yanı sıra hücresel enerji ihtiyacına bağlı olarak AMPK protein sentezinin gerçekleşmesinde rol alan mTOR'u inhibe ederek protein sentezini durdurma görevini üstlendiği bilinmektedir [87] [93]. Ayrıca hücredeki hasarlı proteinlerin yok edilmesinden sorumlu olan otofaji işleminde bir serin/treonin protein kinaz olarak görev alan ULK1/2 AMPK tarafından fosforile olarak aktive olur. Hasar gören hücrelerde otofaji işlemi AMPK tarafından da bu süreçle regüle edilebilmektedir [94].



Şekil 10.AMPK sinyalizasyonu ve metabolik fonksiyonları (yeniden düzenlenmiştir) [95].

1.5.3. Apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak ifade edilen bu terim doku homeostazının merkezi bir düzenleyicisidir. Fizyolojik hücre ölümü olarak görülen bu süreç hasarlı ve enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılması için gereklidir.

Özellikle kanser olmak üzere çoklu hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır [96]. Apoptoz bir çok mediatörün ekspresyonu ile p53 tarafından doğrudan transkripsiyonel olarak regüle edilir. Bunun yanı sıra kalsiyum, Bcl-2 ailesi, mitekondride bulunan sitokrom c gibi moleküller de rol oynamaktadır ve apoptotik süreç boyunca hücre içerisine kalsiyum girişi artmaktadır. Hedefler, dış (ekstinsik) ve iç (intrinsik) sinyallere cevap veren apoptozun iki önemli yolundaki proteinleri kodlayan genleri içerir.

Apoptozu teşvik eden proteinler pro-apoptotik proteinler, buna karşı apoptoza antagonist olan proteinler anti-apoptotik proteinler olarak bilinmektedir. Apoptozun gerçekleşme mekanizması bir grup sistein proteaz olan kaspazlara dayanmaktadır. Kaspazlar pro-formlar olarak sentezlenir ve aspartat residülerindeki peptit bağları kırılarak proteolitik kesimle birbirini aktifleştirmektedir. Kaspazlar birbirini ayırdığı ve aktive ettiği için, bir proteaz kaskadı yoluyla bir amplifikasyon mekanizması meydana gelerek apoptotik hücre ölümünün uygun şekilde yürütülmesini sağlar. Ayrıca, kaspazlar nükleer laminler, DNaz inhibitörleri veya hücre iskelet proteinleri gibi sayısız substratları proteolitik kesime uğratarak morfolojik değişikliklerine yol açar [97]. Kaspazların 3 farklı tipi vardır: Başlatıcı kaspazlar (2,8,9,10), efektör kaspazlar (3,6,7) ve inflamatuvar kaspazlar (1,4,5,11,12,13,14).

Aktive olduklarında DNA tamiri ve replikasyon için gerekli enzimleri inaktive ederek DNA'da geri dönüşümsüz bir parçalanma meydana gelir [98] [99].

Kaspaz aracılı apoptoz için 2 farklı yolun aktive olduğu bilinmektedir.

- Ektrinsik (dışsal) yol (Hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla hücre ölümü)
- İntrinsik (içsel) yol (Mitokondri aracılı apoptoz)

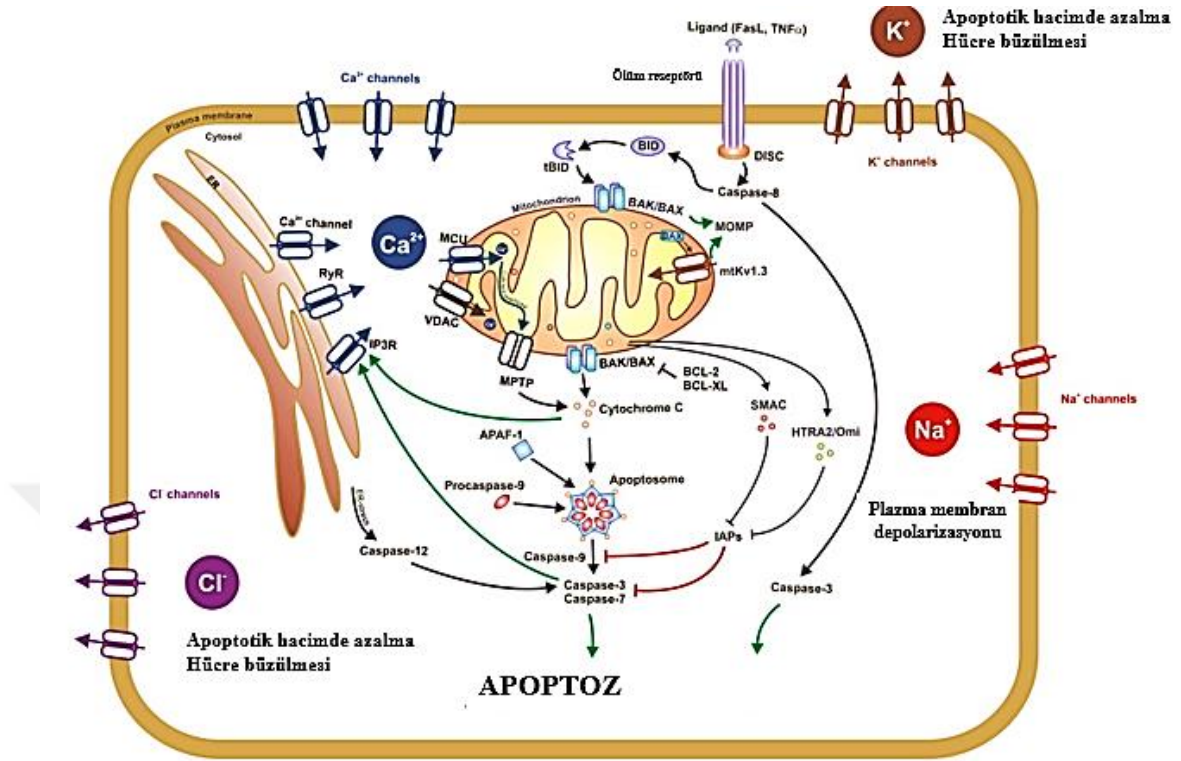
Ektrinsik yolak, hücre yüzey reseptörleri tarafından tetiklenen hücre yüzeyinde ölüm ligandlarının ölüm reseptörleri (DR) ile yani reseptöre özgü ligandlar tarafından aktive edilerek başlar. Bu hücre ölüm reseptörleri ailesine üye olan Fas hücre ölümü yüzey reseptörü (CD95; veya APO-1), Fas ligandı (FasL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper aile üyesi TNF α , TNFR1 en bilinen ölüm ligandlarıdır [100] [101]. Ölüm reseptörü ligasyonu meydana gelirken ligand reseptöre bağlandığında reseptörde meydana gelen konformasyonel değişiklik ile birlikte Fas ilişkili ölüm motifli protein (FADD) ve TNF reseptör ilişkili ölüm motif proteini (TRADD) spesifik ölüm motifine bağlanarak ölümüne neden olan sinyal kompleksi (DISC), "kompleks I" ve "kompleks II" reseptörün hücre içi kuyruğuna dinamik bir multiprotein kompleksinin kurulmasına izin verir. Böylece prokaspaz 8 aktive olarak kaspaz 8 aktif öncü kaspaz halini alır. Kaspaz 8'in aktive olması diğer efektör kaspazların (3,6,7) aktive olmasına neden olur ve süreç apoptotik ölümle sonuçlanır (Şekil 11).

Kaspaz 8'in katalitik olarak inaktif olan c-FLIP ile oligomerizasyonunu modülere ederek kaspaz 8 'i inhibe ettiği ve süreci tersine çevirdiği bilinmektedir [102].

İntrinsik yolak; DNA hasarı, reaktif oksijen türleri, radyasyon, çeşitli kemoterapötik ajanlar, sitokinler gibi hücrel strese yanıt olarak hücre içerisinden başlatılır. Bu yol mitokondri dış membranında bulunan Bcl-2 (B-hücre lenfoma 2) anti-apoptotik protein ailesi tarafından indüklenir. Bcl-2 ailesinin her üyesi Bcl-2 homoloji (BH) domeni içermekle birlikte mitokondrinin dış membranında lokalize olmuştur ve zar geçirgenliğini kontrol etmektedir. Mitokondriyal dış zarın geçirgenliği, pro-apoptotik proteinlerin mitokondriden salınıp salınmadığını belirler. Yalnızca pro-apoptotik proteinler BH3 domaini içermektedir. Bax ve Bak'ın aktivasyonu, Bid'in kaspaz 8 veya 10 ile dönüştürülmesi ile t-Bid'e kesilimi Bcl-2 proteinini inaktive ederek PUMA, NOXA veya diğer BH3 başlatıcı proteinlerinin aktivasyonu yoluyla gerçekleşir. Böylece pro ve anti-apoptotik proteinler arasında ki denge mitokondri aracılı apoptoz yanıtının gerçekleşmesi için kritik rol oynamaktadır [102].

Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyerek zar potansiyelini değiştirir. Bu değişiklik mitokondri membranındaki porlardan elektron transfer zincirinde kritik rol oynayan sitokrom-c nin por yüzeyinden salınmasına neden olur. Ayrıca Smac/DIABLO, Endo-G (Endonükleaz-G) ve apoptoz indükleyici faktörün (AIF) salınımını uyarır. Sitokrom-c apoptoz indükleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır sitozolde apoptotik proteaz aktive eden faktör 1 (Apaf-1) adaptör proteini ile bağlanarak apoptozom kompleksi oluşturur.

Apoptozom kompleksi pro kaspaz 9'u aktif formu olan kaspaz 9'a dönüştürerek kaspaz-kaskadını aktive eder ve pro-kaspaz 3'ü aktif kaspaz 3 haline getirir. Smac/DIABLO, apoptoz inhibitor proteini (IAP) inaktive ederek kaspaz 9, 3 ve 7' nin inhibe olmasını engeller böylece apoptoz gerçekleşir (Şekil 13) [99] [102] [103].



Şekil 11. Apoptotik yolun mekanizması (yeniden düzenlenmiştir) [104].

1.5.4. Otofaji

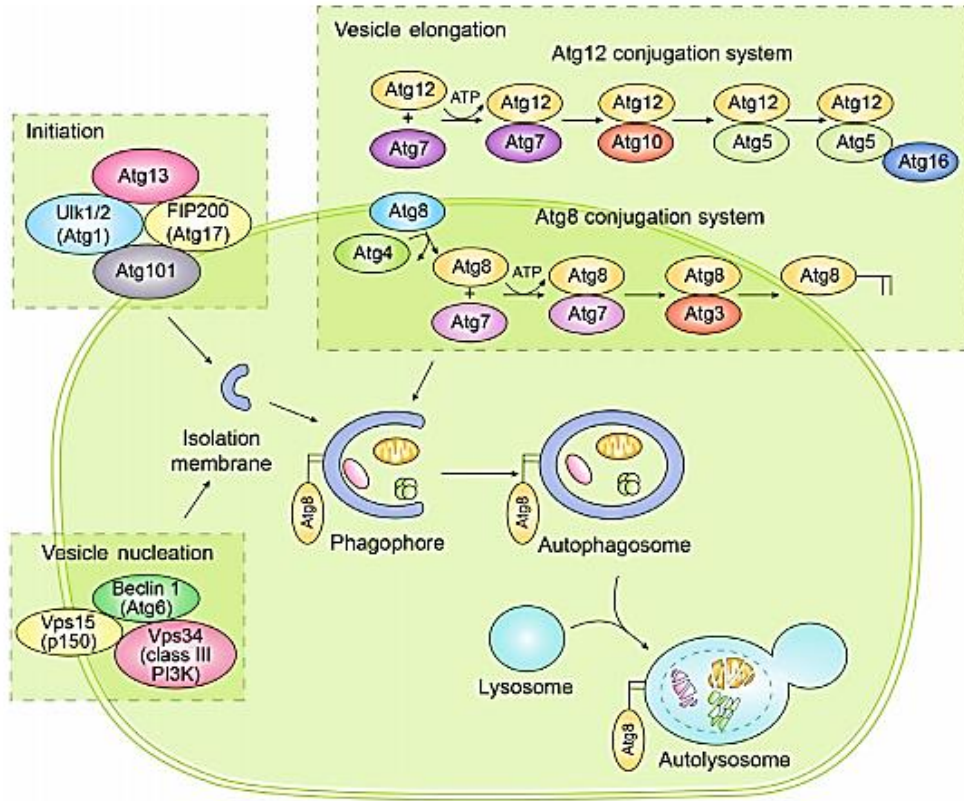
Otofaji, besin yoksunluğu veya metabolik stres sırasında sitoplazmik bileşenlerin bozulmasını, ATP'nin geri dönüşümünü ve hücrel biyosentezin korunmasını içeren evrimsel olarak korunmuş bir hayatta kalma mekanizması olarak tanımlanmaktadır. Hücreler, anabolik ve katabolik yollarını değiştirerek hücre içi ortamındaki değişikliklere yanıt verir. Hücrel materyalin katabolizmasında iki ana yol vardır: lizozomal degradasyonla sonuçlanan çok enzimli proteazom sistemi ve otofaji [105].

Otofajinin dört farklı mekanizma şeklinde gerçekleştiği bilinmektedir. Bunlar; makrotofaji, mikrotofaji, şaperon aracılı otofaji ve Atg5/7'den bağımsız makrotofaji şeklindedir. Makrotofaji, hasarlı organellerin yok edilmesinde önemli role sahiptir. Mikrotofaji, lizozom membranının içe kıvrılması ile alınan içeriğin lizozom tarafından parçalanması şeklindedir.

Şaperon aracılı otofajide gerçekleşen durumda ise özel bir etiket olan KFERQ ile etiketleme ile birlikte taşınmasını gerçekleştirmektedir [106].

Otofajinin açlık sürecinde tetiklenmesi için AKT-mTOR sinyalinin inhibisyonuna ve tip III PI3K hVPS34/Beclin 1 (Drosophila'da Atg6 ve Mayada Atg6/Vps30)'nın da aktivasyonunun gerçekleşmesi gerekmektedir [107]. Memelilerde otofaji aktivasyonu için ULK 1'in aktive olması gerekmektedir. Bu aktivasyonun gerçekleşmesiyle birlikte ULK1/2, Atg13, FIP200 ile bir kompleks oluşturur. Otofagozomal yapının oluşmasında bu üçlü kompleksin önemli olduğu düşünülmektedir (Şekil 12) [108]. mTOR'un inhibisyonu ile birlikte ULK1/Atg1'i serbest bırakır, ULK1/Atg1 de Atg9'un golgiden endozoma yeniden dağılma mekanizmasını uyarır. Atg 7'nin aktivasyonu ile Atg 12 aktive olup Atg 5 ile bağ gerçekleştirir ve bu birleşmeyle Atg 16 da bu kompleksle bir araya gelerek Ag12-Atg5-Atg16 3'lü kompleksi oluşur. Bu üçlü kompleks ise vezikül genişlemesi için ortam hazırlar [109] [110]. Otofaji aktivasyonu sonrasında, LC3 proteininin, bir yağ molekülü olan fosfatidiletanolamin ile bağ yaparak yağ moleküllerinin otofajik zarlara taşınması ve zar uzamasının gerçekleşmesi ile birlikte otofajik uyarımın gerçekleştiğini gösteren bir belirteç olmaktadır.

Otofaji uyarımı sonrası LC3 moleküler ağırlığının değiştiği gözlenmektedir. LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmesi şeklindedir. P62 (p62/SQSTM1) proteini özellikle bazı übikitinlenmiş proteinlerin, otofajik zarlarla sarılmalarına neden olan önemli bir sitoplazmik otofaji reseptörü olarak bilinmektedir. Hücre içerisindeki anormal yapıları tanıyan p62 otofaji tarafından yıkım sürecini gerçekleştirmektedir. Otofagozoma taşıdığı proteinlerle birlikte p62 proteininin kendisi de lizozmda yıkım sürecine dahil olmaktadır.



Şekil 12.Otofajinin düzenlenmesi [99].

1.6. AMAÇ

Bu çalışmada farklı genomik ve biyolojik özelliklere sahip olan PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hatlarında CDK4/6 inhibitörleri olan palbociclib ve abemaciclib'in potansiyel terapötik yetkinliklerinin AMPK'inde ilişkide olduğu alt ve üst sinyal yollarındaki protein ve lipid profilleri üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

Bu amaçla tez çalışması kapsamında literatürde farklılığı ifade edilen her iki CDK4/6 inhibitörü arasındaki ortak hedefler ve farklı hedeflerin tanımlanması ve farklı sinyal mekanizmaları üzerindeki etkileri gösterilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyaller

2.1.1. Pankreas Kanseri Hücre Hatları ve Özellikleri

PANC-1 (ATCC® CRL1469™), pankreas kanseri hücre tipi olup 56 yaşında bir erkek bireyden elde edilmiştir. Hücreler adherant epitel hücreleridir. Karyotip, 63 olan hipertriploid kromozom sayısına sahiptir. Üç farklı marker kromozomu ve küçük bir halka kromozomu vardır. KRAS (12Asp) mutasyonu, TP53 (273.His) mutasyonu, CDKN2A/p16 homozigot delesyonu ve Doğal tip SMAD/DPC4 genine sahip olan PANC-1 hücre hattı yüksek derecede metastatik ve agresif bir hücre hattıdır.

Panc10.05 (ATCC® CRL-2547™), pankreas kanseri hücre tipidir ve yetiştin erkek bir bireyden elde edilmiştir. Adherent epitel hücre tipindedir. Kodon 12'de bir KRAS onkogen mutasyonu sergiler; buradaki bir GGT -> GAT mutasyonu, glisin yerine aspartik asit değişim ile sonuçlanır. Ayrıca TP53 genindeki mutasyonda mevcuttur.

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. Kullanılan Antikor ve kitler

Kullanılan antikor ve kitler Ek D bölümünde yer almaktadır.

2.1.6. Çözeltiler

Kullanılan çözeltiler ve içerikleri Ek E bölümünde yer almaktadır.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre Kültürü

PANC-1 VE Panc 10.05 pankreas kanseri hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC® CRL-2547™ ve ATCC® CRL-1469™) katalog numarasıyla alınmıştır. Hücreler % 10 fetal sığır serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 ve DMEM besiyerinde, %5 CO₂ ve 37 °C'lik nemli etüvde büyütülmüştür. Hücreler yoğunlaştığında eski besiyeri atılarak 1X fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra % 0,25'lik tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Eşit miktarda besiyeri kullanılarak enzim inaktivasyonu sağlandıktan sonra hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml besiyerinde çözöldükten sonra hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve ana stok hücreleri ile yapılacak deneyler doğrultusunda gerekli olan hücrelerin uygun petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. Hücrelerin Dondurulması

Petri kabında yapışmış halde duran hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Kullanılan tripsin-EDTA ile eşit miktarda besiyeri kullanılarak enzim aktivitesi inhibe edilmiş ve 15 ml'lik tüp içerisinde toplanan hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml PBS içerisinde çözölerek hücre sayımı yapılmıştır. Yaklaşık 1×10^6 hücre üzerine 1 ml dondurma medyası eklenerek hücreler kriyo tüplerine aktarılmış sıvı azot tankında saklanmıştır.

2.2.3. Hücrelerin Çözölmesi

Sıvı azottan çıkarılan hücreler hızlı bir şekilde çözölerek dondurma medyası üzerine besiyeri eklenmiştir. Hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve medya atılmıştır. Hücreler 1 ml besiyerinde çözölerek 25 veya 75 cm²' lik petrilere ekilmiştir.

2.2.4. Hücre Canlılığın MTT Testi ile Belirlenmesi

PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hatları hücre sayma cihazı (EVE™ Automated Cell Counter, NanoEnTek) ile total hücre sayılarak 96 kuyulu petri kabına her kuyuda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir.

İlacın 24 saat sonunda ki etkinliğini ölçmek için ekimden 24 saat sonra hücrelere farklı dozlarda (0,05µM-10µM) palbociclib ve abemaciclib ile muamele edilmiştir. İlaç uygulandıktan 24 saat sonra hücrelerin üzerine 10 µL MTT boyası (3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5Diphenyltetrazolium Bromide) uygulanmıştır. MTT boyası uygulanan hücreler 4 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda oluşan formazan kristalleri üzerine 100 µL DMSO uygulanmıştır. Petri 5 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Spektrofotometrik tayin için 570nm ve 655 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığı belirlenmiştir.

2.2.5. Koloni Formasyon Deneyi

Pankreas kanseri hücre hatları olan PANC-1 ve Panc 10.05 hücreleri tripsinizasyonla kaldırılarak sayımı gerçekleştirilmiştir. 6 kuyulu petriye her kuyuda 3×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan 24 saat sonra control grubu ve farklı dozlarda palbociclib ve abemaciclib ile muamele edilmiş gruplar oluşturulmuştur. İlaç uygulamasından 24 saat sonra hücrelerde bulunan mevcut medya uzaklaştırılıp yerine yeni medya eklenmiş ve 10 gün boyunca besiyerleri 2 gün arayla değiştirilerek hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. 10.gün hücreler Metanol/Asetik Asit karışımı (3:1) ile 10 dakika fikse edilmiş ve %0,5 Kristal Viyole ile 15 dakika inkübe edilmiştir. Görüntüler Chemidoc cihazında ve her bir koloni ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.

2.3. Floresan Mikroskobu

Hücrelerin canlılığı için kullanılan yöntemlerden biri de floresan boyalarla hücre canlılığını göstermektir. Bu nedenle pankreas kanseri hücre hatları PANC-1 ve Panc 10.05 100.000/kuyu olacak şekilde 12'lik hücre petrilere ekimleri gerçekleştirildikten bir gün sonra farklı kondüsyonlara tabi tutulmuştur. Bu uygulamadan 24 saat sonrasında farklı floresan boyaları uygulanmıştır.

2.3.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama ile Ölü Hücrelerin Tayini

Propidyum İyodür (PI) Boyama (hücre ölümünün belirlenmesi) ile ilaca maruz kalan ölü hücrelerin hücre membrane permabilitelerinin bozulması sonucu propidyum iyodür boyasını hücre içine almaları esasına dayanır. Ekimden 24 saat sonra petri belirlenmiş dozlarda Palbociclib ve Abemaciclib (μM) ile muamele edilmiştir. İlaçlamadan 24 saat sonra Propidyum iyodür boyası son konsantrasyonu 5mg/mL olacak şekilde PBS içerisinde hazırlanmış ve hücreler üzerine 1 μL uygulanmıştır. Boya uygulanan hücreler 30 dakika 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler Floresan mikroskobu ile 536 nm/Em: 617 nm olacak şekilde inceleme yapılmıştır.

2.3.2. 2 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile Apoptotik Hücrelerin Tayini

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyası DNA'da AT bölgelerine bağlanarak mavi ışıma yapan bir floresan belirteçtir. Hücreler sayımları yapılarak 12 kuyulu petri kaplarına her bir kuyuda 1 $\times 10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra petri belirlenmiş dozlarda Palbociclib ve Abemaciclib ile muamele edilmiştir. İlaçlama yaptıktan 24 saat sonra 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) son konsantrasyon 5mg/mL olacak şekilde PBS içinde hazırlanarak hücreler üzerine 1 μL olarak uygulanmıştır. Petri 37°C'de %5CO₂ içeren etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler floresan mikroskop altında 10X büyütmede incelenmiştir.

2.3.3. DiOC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişikliklerin Gösterilmesi

Hücre canlılığının tespiti için ve buna bağlı mitekondri membran potansiyelinin değişimini incelemek için başka bir floresan işaretleyici DiOC6'dır. (3,3' Dihexyloxacarbocyanine Iodide) Hücrelerin hücre sayma cihazı ile sayımları yapılarak 12 kuyulu petri kaplarına her bir kuyuda 1 $\times 10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir.

Ekimden 24 saat sonra petri belirlenmiş dozlarda Palbociclib ve Abemaciclib ile muamele edilmiştir. İlaçlama yaptıktan 24 saat sonra 3,3' diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DİOC6) boyası son konsantrasyon 4mM olacak şekilde PBS ile hazırlanmış ve direkt hücrelerin üzerine 1µL uygulanmıştır. 37°C'de ve %CO₂ içeren etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler floresan mikroskobu ile 10X büyütmede incelenmiştir.

2.3.4. Senesens β-Galaktosidase boyama

3x10⁵ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilen hücreler, ilaç uygulamasını takiben üst besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 1X PBS ile iki kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından Senescence β-Galactosidase Staining Kit #9860 (CST) belirtilen protokole göre fikse edilen hücreler β-gal uygulamasının ardından mikroskopik olarak incelenmiştir.

2.4. Hücre içi lipid profillerindeki değişimlerin incelenmesi

2.4.1. Oil-Red O boyama

Hücreler 1x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petri kabına ekilmiştir. Ertesi gün yapışan hücreler daha önce doz aralıkları belirlenmiş olan abemaciclib ve palbociclib ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücrelerin üzerinden besiyeri alındıktan sonra, 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra %4 paraformadehid içerisinde 1 saat boyunca fikse edilmiştir. Önceden ısıtılmış 0.25% Oil Red O çözeltisi (%0,5 Oil Red O propilen glikol içerisinde hazırlanır ve işlem öncesinde ddH₂O ile seyreltilir) hücreler ile birlikte 45 dakika boyunca 37 °C etüvde inkübe edilmiştir. 1X PBS ile yıkanan örnekler ters bakışlı ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (Olympus, Tokyo, Japan).

2.4.2. BODIPY® 493/503 boyama

1x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petri kabına ekilen hücreler belirlenen ilaçlarla 24 saat muamele edilmiş olup 24 saat sonunda hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 30 dakika boyunca %4 paraformaldehid ile sabitlenen hücreler ilaç uygulamasına istinaden her bir lipid boya maddeleri 10 ng/ml son konsantrasyon olacak şekilde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Floresan ters akışlı mikroskop aracılığıyla örnekler analiz edilmiştir (Olympus, Tokyo, Japan).

2.5. Hücre Akış Sitometrisi

2.5.1. Hücre döngüsünde tutulu kalan popülasyonların Propidyum İyodür (PI) Boyama ile Belirlenmesi

Pankreas kanseri hücreleri 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petri kabına ekilmiştir. Gece boyunca yapışması beklenen hücreler daha önce doz aralıkları tanımlanan abemaciclib ve palbociclib ile 24 saat muamele edilmiştir. 24 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırılıp 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu sürecin sonunda hücreler %70 etanol ile sabitlenerek 1 hafta $+4^{\circ}\text{C}$ ’de inkübe edilmiştir. 1 hafta sonunda hücreler öncelikle 500g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant atılmış pelletin üzerine 1X PBS eklenmiştir. Pellet yavaşça kaldırılmış ve hücreler etanolden arındırılmıştır. 1X PBS ile yıkanarak $40 \mu\text{g/ml}$ PI ile boyanan hücreler, 30 dakika karanlıkta tutulduktan sonra örneklerin hücre akış sitometresinde okuması ve analizi gerçekleştirilmiştir.

2.5.2. Annexin V/ PI Analizi ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Pankreas kanseri hücreleri PANC-1 ve Panc 10.05, 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm petri kabına ekilmiştir. Gece boyunca yapışması beklenen hücreler daha önce doz aralıkları tanımlanan abemaciclib ve palbociclib ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile kaldırılır ve hücreler 500 g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet üzerinden PBS uzaklaştırıldıktan sonra FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (#556547, BD Pharmingen™) belirtilen protokole göre uygulama yapıldıktan sonra hücre akış sitometrisinde okutma ve analizi gerçekleştirilmiştir.

2.6. Total Protein İzolasyonu

Her bir pankreas hücresi 1×10^6 hücre olacak şekilde 100 mm çaplı hücre kültürü petrilere ekilmiştir ve uygun miktarda besi ortamında bekletilmiştir. Belirlenen doz ve zamanda ilaç uygulaması gerçekleştirilmiştir. İlaç uygulamasından 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri atılarak, hücrelerin üzerine soğuk 1X PBS eklenmiştir. Hücreler kazıyıcılar ve 1X PBS yardımı ile petri yüzeyinden kaldırılmıştır.

Ardından hücreler mikrofüj tüpünde toplanmıştır ve 2 dakika 13200 rpm' de santrifüj edilerek, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Üzerine hücre özütleme tamponu (PhosSTOP, Roche® fosfataz inhibitör koktail ve cOmplete EDTA-free, Roche® proteaz inhibitör koktail tabletleri çözündürülmüş Complete Lysis-M, Thermo Fischer) yaklaşık 50 µl olarak eklenmiştir (pellet yoğunluğuna göre daha az olabilir). Örnekler oda sıcaklığında, 15 dakika sallayıcının üstünde bekletildikten sonra 16400 rpm' de, 15 dakika +4°C' de santrifüjlenerek ayrıştırılmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir mikrofüj tüpüne alınarak ve -80°C' de saklanmıştır.

2.6.1. Protein Miktarının Bradford Analizi ile Belirlenmesi

Total proteinlerin kantifikasyonu için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 ile farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerine bağlanan konsantrasyonu bilinen standart bir proteinden (BSA) konsantrasyonu bilinmeyen proteinin tayini için kullanılır. 1,5 µg/µL BSA (Bovine Serum Albumin) solüsyonu standart eğri çizmek için 96 kuyucuklu plaklara 2 tekrar olmak üzere 1,5,3, 4,5 6 ve 7,5µL konmuştur. Total proteinden iki tekrar olmak üzere 1 µL konmuştur. Her kuyu üzerine 200 µL Bradford solüsyonu eklenir ve 5 dakika oda ısında karanlıkta inkübe edilmiştir. 96 kuyulu plak Microplate Reader cihazında 595nm dalga boyunda ölçüm yapılır (OD 595 nm.) Aleti sıfırlamak için sadece Bradford solüsyonu konan (blank) kuyucuğu alete tanıtılarak sıfırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki BSA'nın 595 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine göre standart bir eğri çizilir. R² değerinin hesaplanması ve standart eğrinin analizi gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ve absorbansı belirlenen örneklerin konsantrasyonu standart eğri grafiği kullanılarak belirlenmiştir.

2.6.2. SDS-PAGE Jel Hazırlanması

İzole edilen ve kantifikasyonu yapılan proteinlerin ifadesinin incelenmesi için SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi kullanılmıştır.

SDS-PAGE elektroforez sisteminde kullanılacak tüm kaset ve cam malzemeler distile su ile yıkandı. Jel dökmek için kaset sistemleri hazırlandı.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılacak çözeltiler ve tampon solüsyonlar hazırlandı. %10 ve %12'lik ayırma jeli içeriği hazırlandı (Ek D de içerikler belirtilmiştir).

Yükleme jeli için belirlenen oranlarda jel içeriği hazırlanır (Ek D) %10 APS ve TEMED aynı anda jel içeriğine eklenerek alt jel üzerine üst jel karışımı mikropipet yardımıyla eklenir. Daha sonra 1X SDS-PAGE yürütme tamponu yürütmenin yapılacağı elektroforez tankına eklenir. Jel elektroforezin gerçekleşeceği kasete yerleştirilir.

2.6.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması

İzole edilen proteinlerin immunoblot yöntemi ile gösterimi için her bir örnek 5X Laemli (Protein indirgeme tamponu) ile muamele edilir. Protein indirgeme tamponu içerisinde bulunan gliserol yoğunluğa bağlı olarak proteinlerin jelde kuyu boyunca yürümesini sağlar, β -mercaptoetanol proteinlerin üç boyutlu yapısını bozar, SDS proteinleri negatif yükleyerek elektroforetik ortamda proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışmasını sağlar. Tris-HCL tampon çözelti olarak ortam pH'sını dengeler. Bromofenol mavisi proteinleri boyayarak jel kuyucuğunda görünür kılmaktadır. Bradford yöntemi ile oluşan standart eğri profili sonucunda 5:1 oranında 5X Laemli ile karıştırılarak kuyucuk başına 35 μ g olarak hesap edilen örnekler 95°C'de 5 dakika denatürasyona tabi tutulur. Denatürasyon sonrası soğutmalı santifirüjde 30 sn santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Hazırlanan protein örnekleri buza alınır. Jel kuyularından bir tanesine protein marker yüklenir. Daha sonra protein örnekleri yüklenir.

Protein marker ve hazırlanan örnekler 80V'da 2,5 saat SDS içeren yürütme tamponu içerisinde yürütülmüştür (Ek E).

2.6.4. Proteinlerin Membrana Transferi

SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler jelden daha stabil bir yapı olan poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte membran por çapı 0,45 μ M olan membran metanol içerisinde 2 dakika aktif hale getirilmiştir. Tank içerisi 1X Western blotlama tamponu ile dolduruldu ve ısınmayı önlemek adına tank etrafına buz yerleştirildi.

Transfer işlemi 300mA’de 60 dakika gerçekleştirildi (Ek E). Transfer sonrası %5 yağsız süt ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı.

2.6.5. Bloklama işlemi ve Primer-Sekonder Antikorla İşaretleme

Membrana transfer edilmiş ve süt ile bloklama işlemi gerçekleştirilmiş olan protein örnekleri hedef birincil antikorlarla 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Hedef anti-rabbit/mouse antikorlar Cell Signalling Technology ‘den temin edilmiştir (Ek D).

1 gece primer antikor ile mualemenin ardından sekonder antikora alınmadan önce yıkama işlemi gerçekleştirilir. 1X TBS yıkama tamponu ile membran 2 kez 15 dakika çalkalayıcıda düşük devirde (rpm) çalkalanır. Ardından HRP ile konjuge edilmiş sekonder anti-rabbit/mouse antikoru ile 1 gece +4°C’de inkübe edilir.

2.6.6. Protein Bantların Görüntülenmesi

Sekonder antikorla muamele edilen membranın kemilüminisans çekimi için ECL solüsyonu hazırlanmıştır. Membranın çekimi için sekonder sonrası yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Membran yıkaması 2 kez 15 dakika 1X-TBS-T yıkama tamponu ile ve 1 kez 1X-TBS yıkama tamponu ile 15 dakika çalkalayıcıda düşük devirde (rpm) çalkalanır. Ardından çekim için karanlık ortamda membran ECL solüsyonu ile 3 dakika inkübe edilmiş ve membran görüntüleme cihazına yerleştirilmiştir. Membrandan elde edilen bant görüntülerinin ImageJ programı ile analizi gerçekleştirilmiştir.

2.6.7. PathScan® Phospho-Rb (Ser807/811) Sandwich ELISA Kit

Tümör baskılayıcı protein olan Retinoblastoma (Rb) hücre döngüsünün G1-fazı içindeki ilerlemesini kontrol ederek hücre çoğalmasını düzenlemektedir. Bu bağlamda pankreas kanseri hücre hatlarında kullanılan CDK4/6 inhibitörü olan Palbociclib ve Abemaciclib'in Retinoblastoma protein seviyesine etkisinin incelenmesi amacı ile PathScan® Phospho-Rb (Ser807/811) Sandwich ELISA Kit #13152 katalog numarasıyla temin edilmiş ve kullanılmıştır.

100'lük petri kaplarına yaklaşık 1×10^6 tane olacak şekilde pankreas kanseri hücreleri ekilmiş olup belirlenen dozlarda 24 saat Palbociclib ve Abemaciclib uygulamasını takiben ELİSA kit protokolüne göre protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bradford ile protein konsantrasyonu belirlenen örnekler mikrosantrifüj tüpüne 1: 1 oranında protein örneği ve hücre lizis tampon eklenerek seyreltilmiştir. Bu amaçla bradfordta okutulan protein miktarları her kuyucuk için normalize edilmiş ve belirlenen oranda kullanılmıştır. Plaka, 2 saat 37° C'de inkübe edilmiştir. Her kuyu 200 µl, 1X Yıkama Tamponu ile 4 kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 µl Detection Antibody eklenip plaka 37° C'de 1 saat bekletilmiştir. Yıkamalardan sonra her kuyucuğa 100 µl HRP-bağlı sekonder 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 bektirilmiş sonra her kuyucuğa 100 µl STOP Solüsyonu eklenip 30 dakika içinde 450 nm'de absorbans değerinde okutulmuştur.

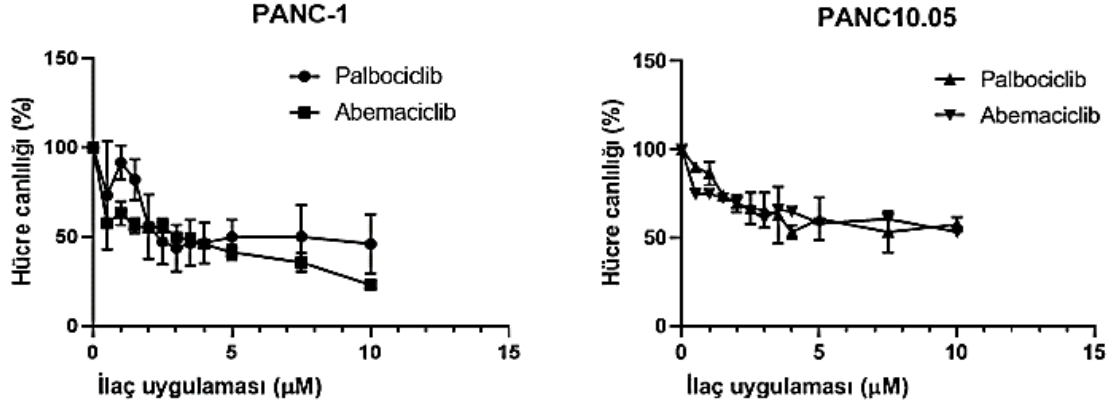
2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerin yapılabilmesi amacıyla sonuçlardaki veriler GraphPad Prism 8 programı aracılığı ile çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. İmmunoblot sonuçları ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Tüm test sonuçları ilgili şekillerin altında istatistiksel anlamlılık sınırları, p değerleri ile birlikte sırasıyla *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 belirtirmiştir.

3. SONUÇLAR

3.1. PANC-1 ve Panc10.05 Hücre Hatlarında palbociclib ve abemaciclib hücre çoğalmasını inhibe etmektedir.

PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hatlarına 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0-10 μ M) CDK4/6 inhibitörleri palbociclib (PD-0332991) ve abemaciclib (LY-2835219) uygulanmıştır. Hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiş olup yapılan hücre canlılığı testine göre PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hatlarının her iki ilacada benzer sitotoksosite cevabı verdiği gözlenmiştir (Şekil 13).



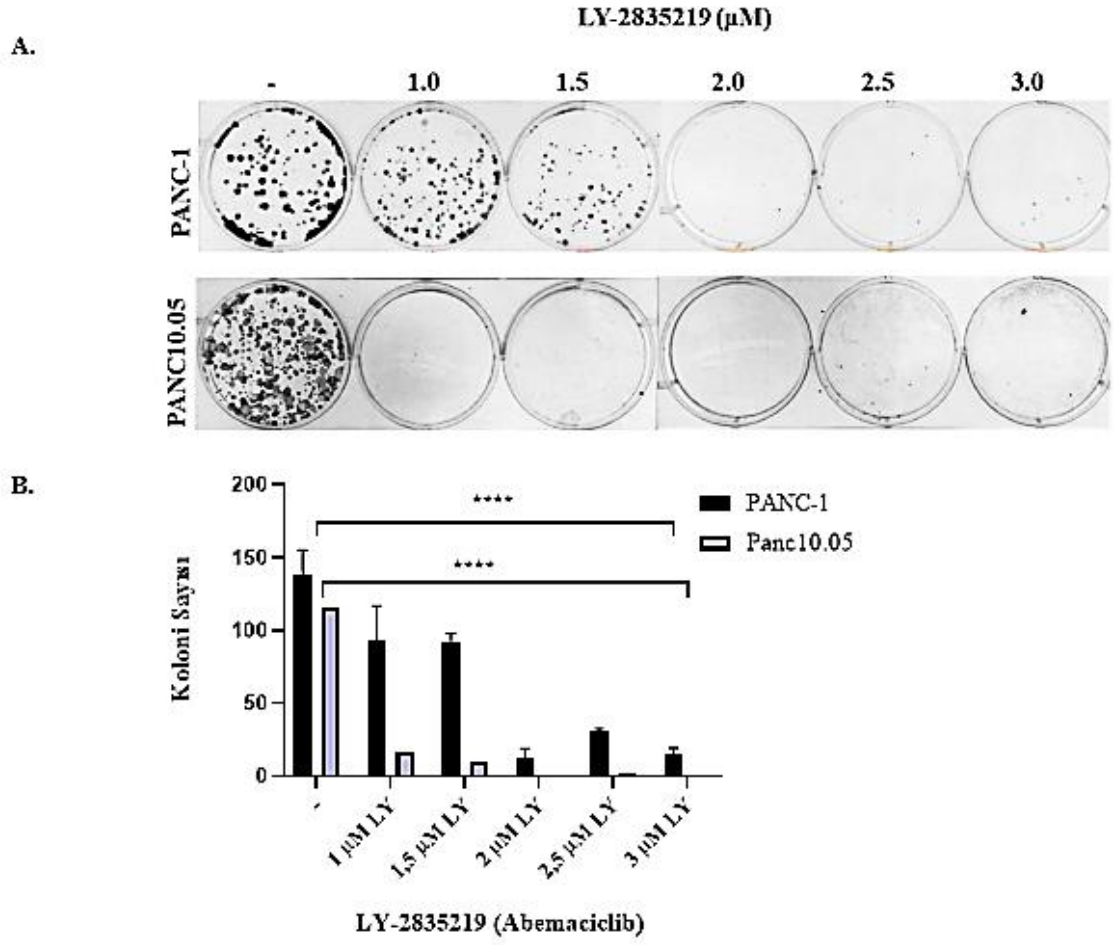
Şekil 13. Palbociclib ve Abemaciclib'in (0-10 μ M) PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin MTT Testi ile incelenmesi. Hücreler 24 saat boyunca ilaç dozları ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu deney kendi içinde örnekler 5 tekrar olacak şekilde en az 4 kez tekrarlanmış ve sonuçları değerlendirilmiştir.

MTT Grafikleri, PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatları için 5 tekrarlı 4 farklı deneyin sonucu alınarak oluşturulmuş olup ortalama $\text{std} \pm \text{hata}$ grafiği olarak değerler sunulmuştur. Bağlı hücre canlılığı analizi hiç uygulama yapılmayan hücrenin %100 canlı olarak kabulüne yönelik olarak hesaplanmıştır. Hücreler CDK4/6 inhibitörleri ile inkübe edildikten sonra 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile analiz edilmiştir. Doza bağlı ilaç uygulaması sonucunda her iki hücre hattında da benzer sitotoksikite değerleri görülmesine karşı PANC-1 hücre hattında abemaciclib hücre canlılığına doğrudan ket vurduğu gözlenmiştir.

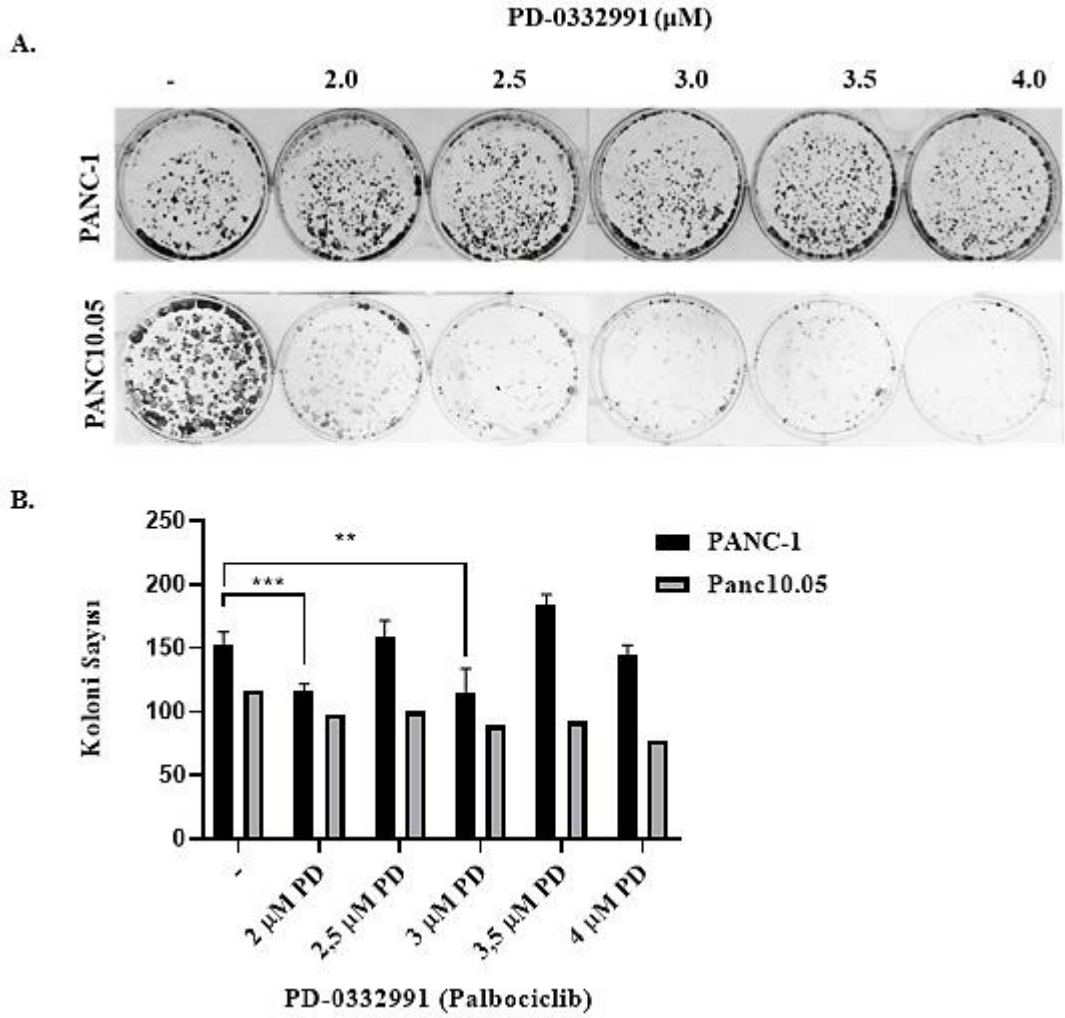
3.2. CDK4/6 İnhibitörleri olan palbociclib ve abemaciclib uygulaması PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında koloni oluşturma potansiyeline doza bağlı bir şekilde ket vurmuştur.

Koloni formasyon testi *in vitro* ortamda kemoterapötik bir ajanın hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri hakkında ipucu veren bir yöntemdir. Bir koloni en az 50 hücrenin bir araya gelerek oluşturduğu popülasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem sayesinde hem ilacın etkinliği hemde maruz kalan kanser hücrelerinin bölünme ve sağkalım potansiyelleri belirlenmiş olur. Bu bağlamda koloni formasyonu deneyi ile MTT hücre canlılığında tespit edilen dozlardan daha düşük dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin hücre bölünmesi konusunda azaltıcı etkileri belirlenmiştir.

PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hatları 6 kuyucuklu petri kabına her kuyuda 3×10^3 hücre olacak şekilde ekilip belirlenen dozlarda abemaciclib ($1-3 \mu\text{M}$) ve palbociclib ($1-4 \mu\text{M}$) ile 24 saat inkübe edilmiştir. MTT hücre canlılığı verilerinin desteklenmesi amacı ile iki hücre hattında farklı dozlarda ilaçlar 24 saat boyunca uygulandıktan sonra koloni oluşumu 14 gün boyunca besiyeri yenilenerek devam etmiştir. Hücre siklusunda kontrol hücrelere göre tutuklu kalmayı sağlayan CDK4/6 inhibitörlerinden abemaciclib koloni oluşumuna Panc10.05 hücre hattı ile birlikte kontrol hücrelere oranla ket vurucu etki göstermiştir (Şekil 14). Palbociclib koloni formasyonunu azaltmış olup PANC-1 hücrelerinde Panc 10.05 hücre hattına göre daha dirençli bir fenotip sergilemiştir (Şekil 15).

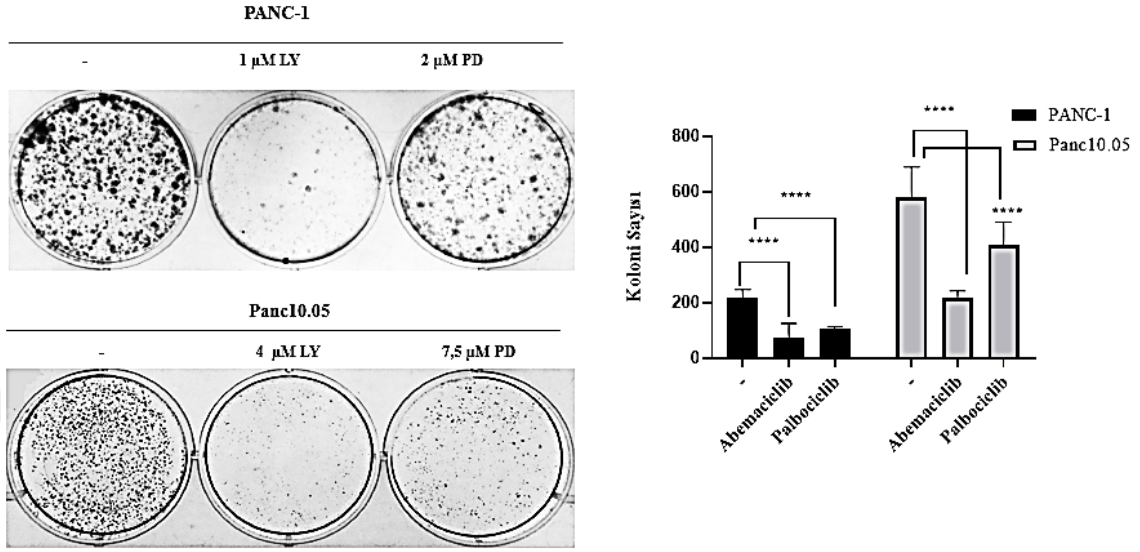


Şekil 14. Pankreas kanseri hücre hatları 3×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyucuklu petrilere ekilerek 24 saat boyunca seçili dozlarda abemaciclib (LY-2835219) uygulamasını takiben koloni formasyonu incelenmiştir. 14 gün boyunca bekletilen ve yeni besiyeri ile ortamı değiştirilen petrilere yer alan koloniler fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. B) Koloni sayısı graphpad programı kullanılarak sütun grafik elde edilmiştir. Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2). Her bir deney için 3000 hücre ekimi yapılmıştır. (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$)



Şekil 15. A) Pankreas kanseri hücre hatları 3x10³ hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyucuklu petrilere ekilerek 24 saat boyunca seçili dozlarda palbociclib (PD-0332991) uygulamasını takiben koloni formasyonu incelenmiştir. 14 gün boyunca bekletilen ve yeni besiyeri ile ortamı değiştirilen petrilere yer alan koloniler fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. B) Koloni sayısı graphpad programı kullanılarak sütun grafik elde edilmiştir. Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması ± standart hatası olarak sunulmuştur (n=2). Her bir deney için 3000 hücre ekimi yapılmıştır. (** p ≤ 0.0001, *** p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.01)**

Aynı deneye PANC-1 ve Panc 10.05 hücre hattı için seçili dozlarda koloni formasyon testi ile yinelenmiş olup MTT testi verilerine göre seçilen 4 μM abemaciclib ve 7,5 μM palbociclib sonuçlarında da her iki ilaç seçili dozlarda koloni formasyonuna ket vurmuştur (Şekil 16).

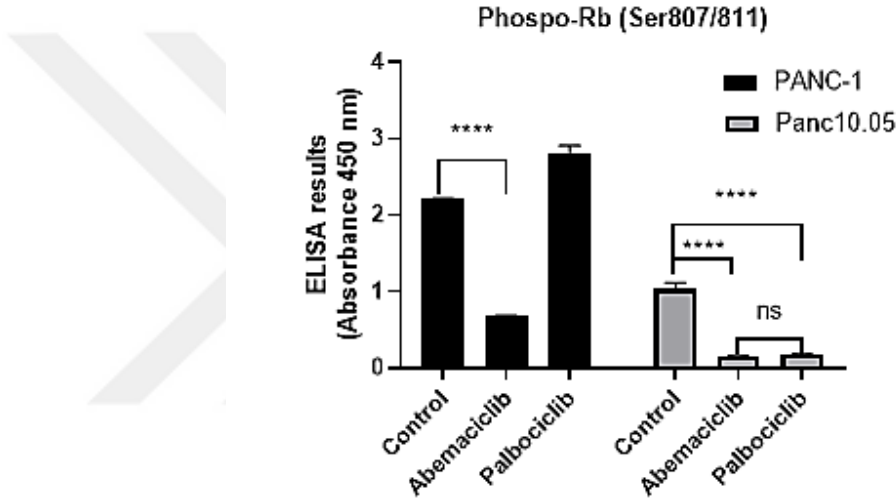


Şekil 16. A) PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında seçili dozlarda palbociclib ve abemaciclib uygulamasının koloni oluşturma potansiyeline etkisinin incelenmesi. 14 gün boyunca bekletilen ve yeni besiyeri ile ortamı değiştirilen petrilere yer alan koloniler fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. B) Koloni sayısı graphpad programı kullanılarak sütun grafik elde edilmiştir. Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması $\pm$ standart hatası olarak sunulmuştur (n=2). Her bir deney için 3000 hücre ekimi yapılmıştır (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

3.3. Hücre siklusunda ana kontrol noktası olarak görev alan Retinoblastoma proteini CDK4/6 inhibitörleri uygulaması sonucu PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında farklı yanıt mekanizması geliştirmiştir.

Retinoblastoma (Rb) hücre döngüsünün G1-fazı içindeki ilerlemesini kontrol ederek hücre çoğalmasını düzenleyen tümör baskılayıcı özelliği olan bir proteindir. Pankreas kanseri hücre hatlarında kullanılan CDK4/6 inhibitörü olan palbociclib ve abemaciclib'in retinoblastoma protein seviyesine etkisinin incelenmesi amacı ile PathScan® Phospho-Rb (Ser807/811) Sandwich ELISA Kit#13152 katalog numarasıyla temin edilmiş ve kullanılmıştır.

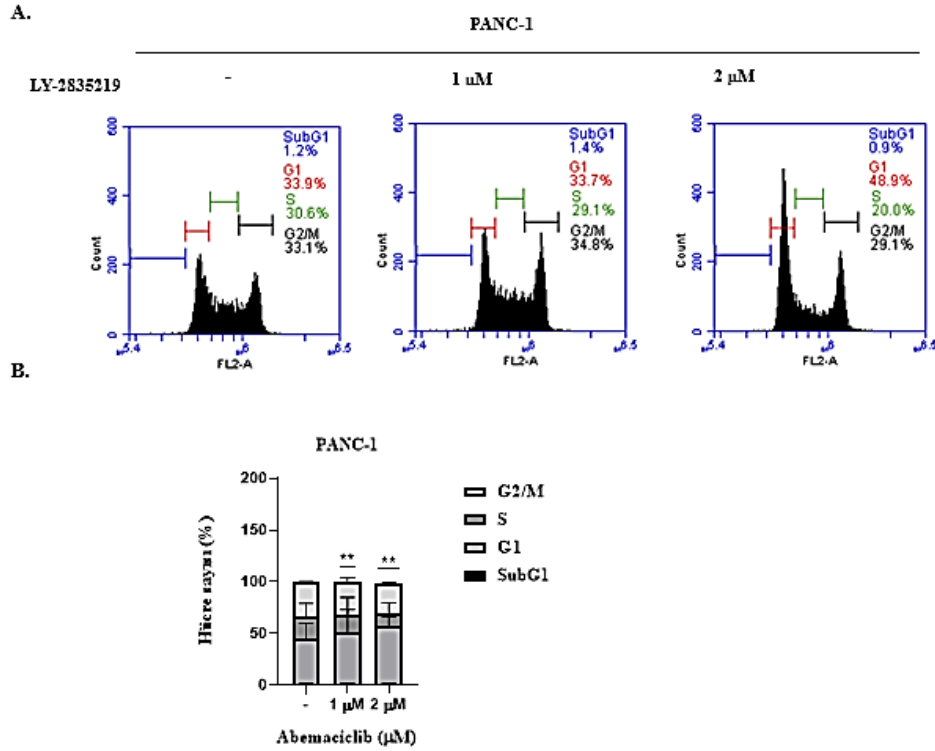
Rb fosforilasyonları hücrelerde ilaçlar tarafından meydana gelen hücre siklusunda takılı kalma durumu kontrol edilmiştir. Bu anlamda test sonucundaki verilere göre PANC-1 hipofosforilasyonu açısından her iki ilacın farklı yetkinliklerde olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle abemaciclib uygulamasının Rb hipofosforilasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Pankreas kanseri hücre hatlarında CDK4/6 inhibitörlerinin ELISA testi ile Retinoblastoma aktivitelerinin incelenmesi. 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 50 µg) ELİZA testini (PathScan® Phosho Rb (Ser807/811) Sandwich ELISA Kit #7959), (n = 2, **** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

3.4. Palbociclib ve abemaciclib hücre döngüsü tutulmasında sinerjistik etki göstermektedir.

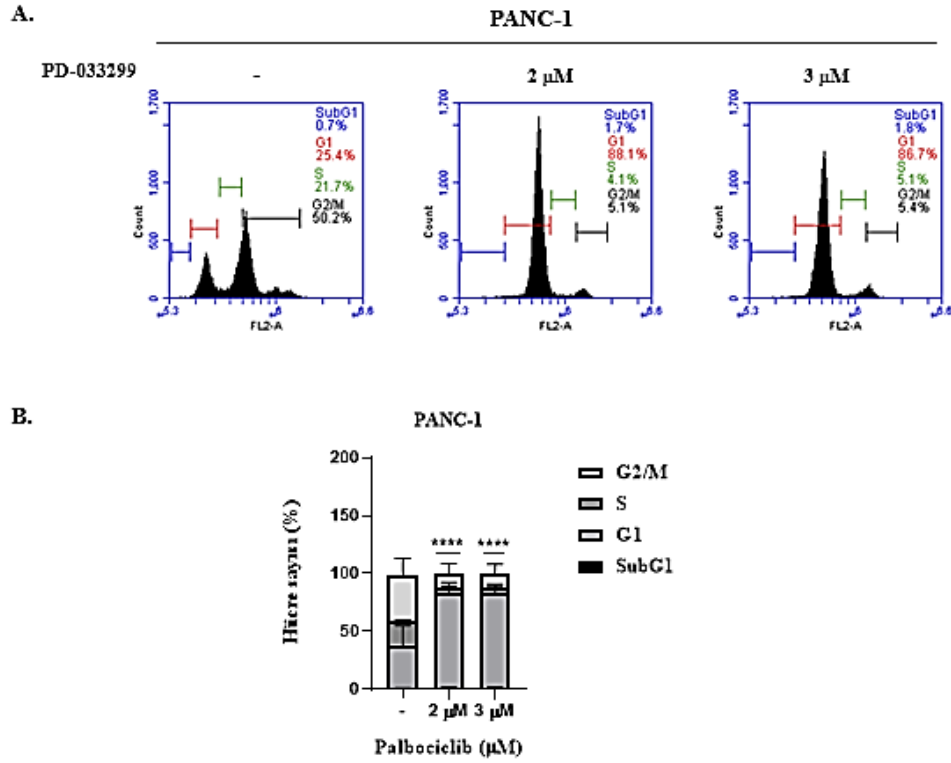
Palbociclib ve abemaciclib in pankreas kanseri hücre hatlarında hücre döngüsü tutulması üzerine etkisinin irdelenmesi amacıyla hücre akış sitometrisi kullanılmıştır. Belirlenmiş ve artan dozlarda CDK4/6 inhibitörleri palbociclib (2 μ M ve 3 μ M) ve abemaciclib (1 μ M ve 2 μ M)’in 24 saat hücrelere uygulanmasını takiben hücreler analiz için %70 etanol ile 1 hafta boyunca fiks edilmiştir.



Şekil 18.PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında CDK4/6 inhibitörü abemaciclib'in (LY-2835219) artan dozlarda 24 saat uygulaması sonrası hücre siklusunda hücre popülasyonlarının tutulu kalması üzerine etkisinin incelenmesi. Her bir şekil 2 farklı biyolojik örneğin ortalaması $\pm$ standard hatası şeklinde değerlendirilmiştir (n=2), (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

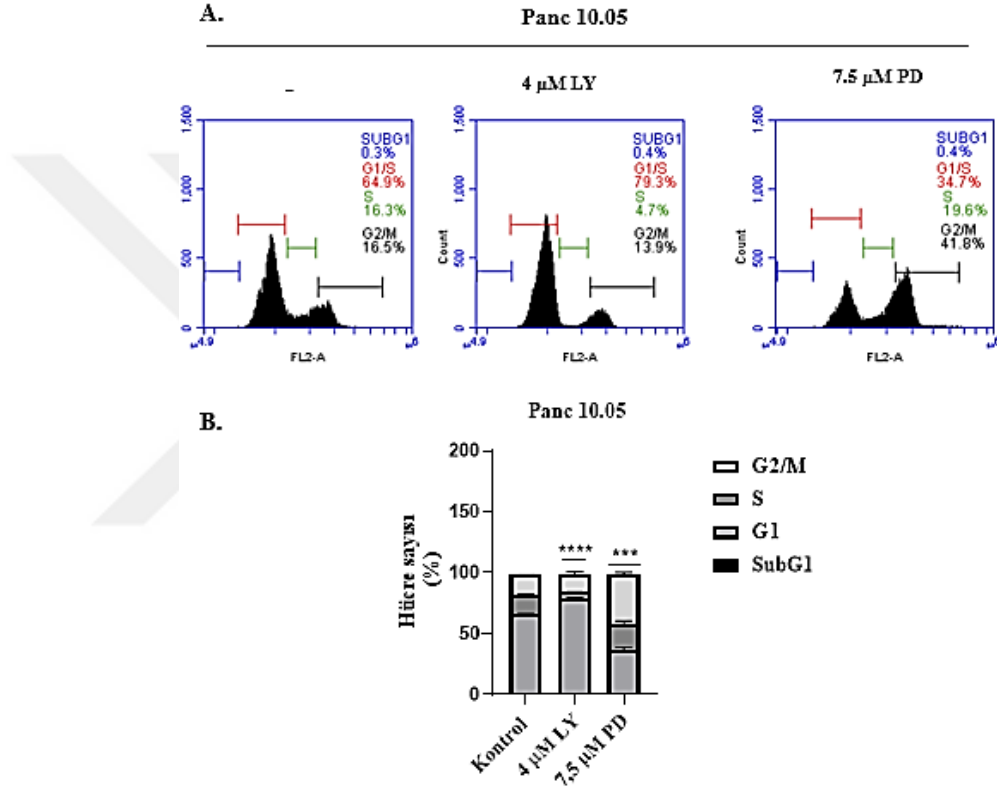
PI boyaması sonucunda her iki CDK4/6 inhibitörü için PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında abemaciclib (LY-2835219) uygulaması sonrası doza bağımlı bir şekilde hücre siklusunda G1 fazında tutuklu kalma oranının arttığı gözlenmiştir (Şekil 18).

Uygulama yapılmayan kontrol grubunda G1 fazında %33,9 luk bir popülasyon tutulu kalmaktayken 1 μ M abemaciclib uygulaması ile %33,7 lik bir popülasyonun G1 fazında tutulu kaldığı gözlenmiştir. 2 μ M abemaciclib uygulaması sonrası bu oran %48,9 luk bir popülasyonu etkilediği gösterilmiştir. Palbociclib (PD-03332991) uygulaması sonucu %89,4 $\pm$ 1,3'lık bir popülasyonda G1 fazında tutuklu kalmaya neden olmuştur. Doz artımı sonucunda %87,3 $\pm$ 1,8 oranında hücre siklusu G1 fazında tutuklu kalmış olup önemli bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 19).



Şekil 19.PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında CDK4/6 inhibitörü palbociclib'in (PD-0332991) artan dozlarda 24 saat uygulaması sonrası hücre siklusunda hücre popülasyonlarının tutulu kalması üzerine etkisinin incelenmesi. Her bir şekil 2 farklı biyolojik örneğin ortalaması $\pm$ standard hatası şeklinde değerlendirilmiştir (n=2), (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

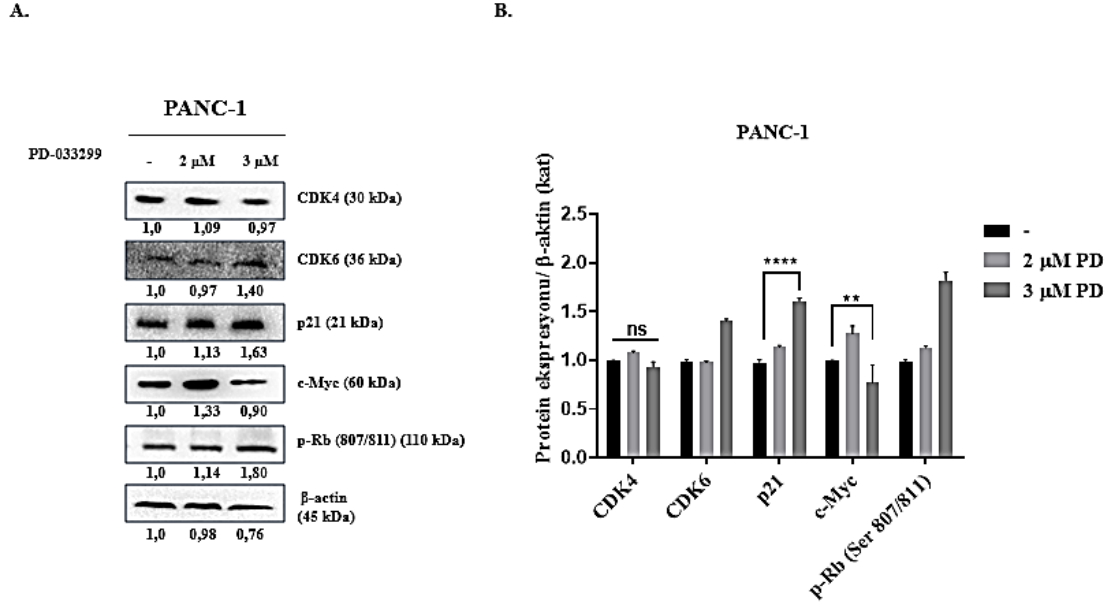
Panc10.05 hücre hattı için hem abemaciclib (4 μ M) hemde palbociclib (7,5 μ M) için seçili dozlarda uygulama gerçekleştirilmiştir. Her iki ilaca da benzer düzeyde cevap veren Panc 10.05 pankreas kanseri hücre hattında ise abemaciclib'in seçilen dozda, uygulama yapılmayan kontrol hücrelere göre daha fazla hücrenin G1 fazında tutuklu kalmasına neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Panc 10.05 pankreas kanseri hücre hattında CDK4/6 İnhibitörleri palbociclib (PD-0332991) ve abemaciclib'in (LY-2835219) seçili dozlarda 24 saat uygulaması sonrasında hücre siklusunda hücre popülasyonlarının tutulu kalması üzerine etkisinin incelenmesi. Her bir şekil 2 farklı biyolojik örneğin ortalaması $\pm$ standard hatası şeklinde değerlendirilmiştir (n=2), (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Benzer sitotoksosite oranına sahip seçili palbociclib dozu uygulaması ise %41,8 lik popülasyon artışıyla belirgin düzeyde Panc 10.05 hücrelerinin G2/M fazında tutuklu kalmasına neden olmuştur (Şekil 20).

Palbociclib uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun (2µM ve 3µM) hücre siklusundaki cevap mekanizmasını irdellemek için PANC-1 hücre hattında hücre siklusunda yer alan hedef proteinlerin ifade seviyeleri incelenmiştir (Şekil 21).

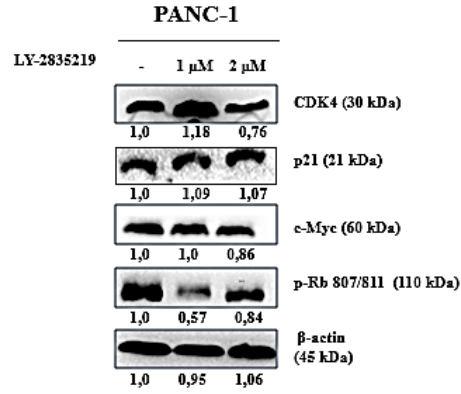


Şekil 21. Hücre siklusu kontrolünde görev alan moleküler hedeflerin palbociclib (PD-0332991) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immübolotlama ile irdelenmesi. A) Her bir yükleme için 30-50 µg protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β-actin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B) Western Blot sonuçlarına göre elde edilmiş protein miktarlarının İmageJ programı kullanılarak normalize edilmesi (**** p ≤ 0.0001, *** p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.01).

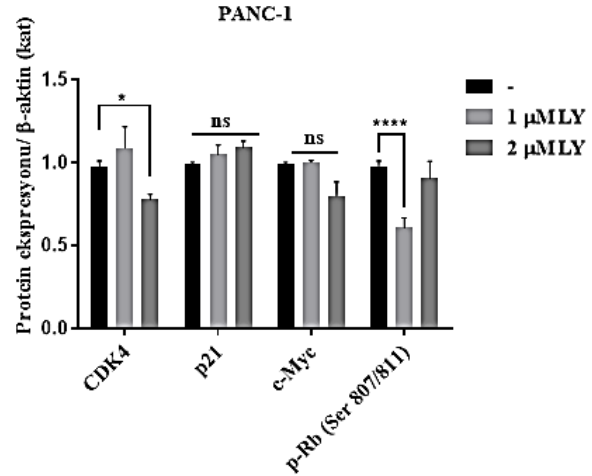
Palbociclib'in PANC-1 hücre hattında CDK4 ifade seviyesinde özellikle 3 µM palbociclib uygulaması sonrası azalma gözlenmiştir. c-Myc ifade seviyesinin 3 µM palbociclib uygulaması ile azaldığı p21 ifade seviyesinin ise arttığı gözlenmiştir. Benzer uygulama PANC-1 hücre hattında abemaciclib için gerçekleştirilmiştir. Abemaciclib uygulamasının Rb fosforilasyonunu doza bağlı şekilde azalttığı CDK4 ifade seviyesinde yine doza bağlı bir şekilde azalma gözlenmiştir (Şekil 22).

Palbociclib uygulamasının Rb fosforilasyonuna ket vurmadığı ancak abemaciclib uygulamasının Rb fosforilasyonunu doza bağlı şekilde azalttığı, 1 μ M abemaciclib uygulaması Rb fosforilasyonunu palbociclib uygulamasına göre azalttığı gözlenmiştir. Her iki ilaç uygulaması sonucu CDK4 ifade seviyesindeki azalmanın yanı sıra p21 protein ifadesinde artış gözlenmiştir. Proto-onkogen olan c-Myc protein ifade seviyesinde doza bağlı azalma her iki ilaç uygulaması sonucunda da gözlenmiştir.

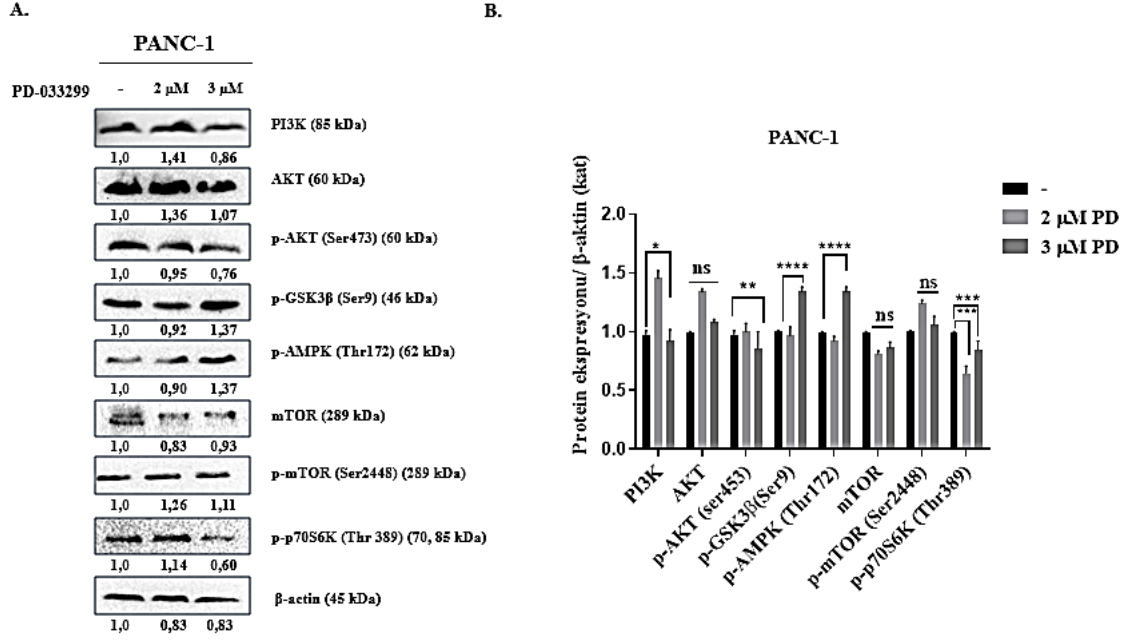
A.



B.



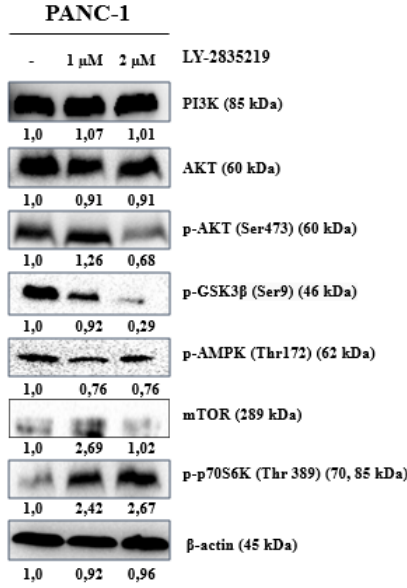
Şekil 22.Hücre siklusu kontrolünde görev alan moleküler hedeflerin palbociclib (PD-0332991) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immubolotlama ile irdelenemesi. A) Her bir yükleme için 30-50 μ g protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β -actin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B) Western Blot sonuçlarına göre elde edilmiş protein miktarlarının İmageJ programı kullanılarak normalize edilmesi (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).



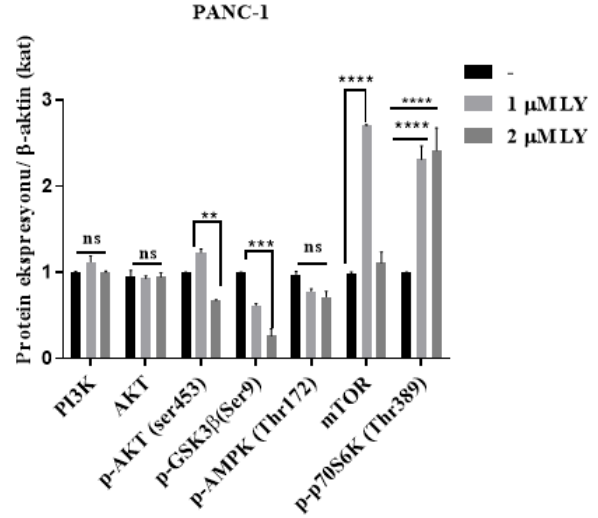
Şekil 23.PI3K/AKT/mTOR sinyal kaskadında görev alan moleküler hedeflerin palbociclib (PD-0332991) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immubolotlama ile irdelenmesi. A) Her bir yükleme için 30-50 μ g protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β -actin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B) Western Blot sonuçlarına göre elde edilmiş protein miktarlarının İmageJ programı kullanılarak normalize edilmesi (** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).**

Palbociclib'in PANC-1 hücre hattında Rb fosforilasyonuna ket vurmadığı ancak abemaciclib uygulamasının Rb fosforilasyonunu doza bağlı şekilde azalttığı fakat her iki ilacında hücre siklusunda G1 fazında tutuklu kalmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar irdelendiğinde c-Myc ifade seviyesinin azalması hücre sağkalımı ile ilgili majör regülatör görev alan Akt sinyal kaskadına etkisi açısından öncü bilgi sağlamıştır ve PI3K/Akt sinyal kaskadının palbociclib (Şekil 23) ve abemaciclib (Şekil 24) uygulaması sonrası doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.

A.



B.



Şekil 24.PI3K/AKT/mTOR sinyal kaskadında görev alan moleküler hedeflerin abemaciclib (LY-2835219) uygulamasıyla seçilen iki farklı dozun 24 saat içerisinde oluşturduğu cevap mekanizmasının immubolotlama ile irdelenmesi. A) Her bir yükleme için 30-50 μ g protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β -actin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B) Western Blot sonuçlarına göre elde edilmiş protein miktarlarının İmage J programı kullanılarak normalize edilmesi.

Palbociclib ve abemaciclib'in AKT inhibisyonu aracılı olarak hücre sağ kalımına ket vurma potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde abemaciclib uygulaması sonucunda GSK3 β inhibe edici fosforilasyonun (Ser9) PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde abemaciclib uygulaması ile doza bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 24). Palbociclib uygulaması sonucunda ise GSK3 β (Ser9) fosforilasyonunda anlamlı değişiklik olmaması CDK4/6 inhibitörlerinin hücre tipine bağlı olarak apoptotik etkileri açısından bir moleküler hedef olarak GSK3'ün kritik olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca hücre sağkalımı ve ölümü ile ilgili sinyal kaskadından önemli bir yeri olan AMPK protein ifade seviyesi palbociclib ve abemaciclib'in terapötik mekanizmaları açısından iki farklı doz ile AMPK fosforilasyonu irdelenmiş olup palbociclib seçili olan iki doz için PANC-1 hücrelerinde AMPK fosforilasyonunu (Thr172) arttırdığı sonucuna varılmıştır (Şekil 23).

Abemaciclib ise doza bağımlı bir şekilde AMPK aktivitesini düşük doz uygulamasında (1 μ M) azaltırken, daha yüksek doz (2 μ M) uygulaması sonucunda hem anlamlı düzeyde bir AMPK aktivasyonuna (kontrol hücrelere oranla) neden olmamıştır (Şekil 24).

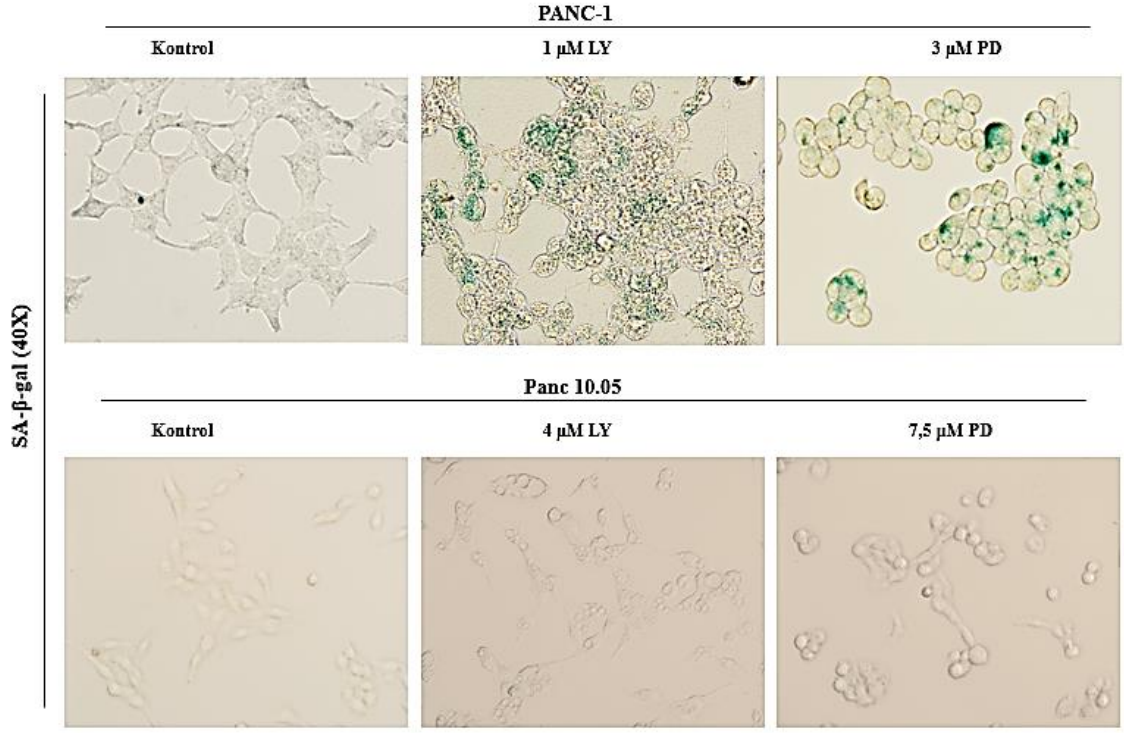
Bu etki mTOR sinyal kaskadı açısından irdelenmiş olup mTOR aktivitesinde azalma palbociclib uygulamasını takiben belirlenmiştir ve mTOR fosforilasyonunda (Ser2448) da azaldığı gözlenmiştir. Bu etki aşağı sinyal yolağında bulunan p70S6K'nin fosforilasyon aktivitesinde benzer bir şekilde azalmaya neden olmuştur. Tersine abemaciclib uygulaması p70S6 aktivitesinde PANC-1 hücrelerinde artışa neden olmuştur.

3.5. CDK4/6 inhibitörleri PANC-1 ve Panc 10.05 hücre hatlarında hücrel yaşlanmanın tetiklenmesinde farklılık göstermektedir.

Hücrel yaşlanma (senesens), farklı metabolik aktivite ve hücre morfolojisindeki değişikliklerle birlikte yaşlanan hücrelerde G1 fazında (G1 çıkışı) geri dönüşümsüz olarak hücre döngüsü durması ve hücre proliferasyonunu durdurduğu olarak bilinmektedir. Bu etkiyi belirlemek için yapılan hücre siklusu akış sitometrisi analizi ile desteklenmiştir. Ayrıca hücrel yaşlanma sonucu CDK4/6'nın inhibe olduğu bilinmektedir.

CDK4/6 inhibitörlerinin senesens açısından indükleyici rolleri PANC-1 ve Panc10.05 hücrelerinde incelenmiştir ve kontrol hücrelere göre hücrel yaşlanma süreçleri kıyaslanmıştır (Şekil 25). Daha önce belirlenen dozlarda 24 saat palbociclib ve abemaciclib uygulamasını takiben Senescence β -Galactosidase Staining Kit #9860 (CST) belirtilen protokole göre boya uygulaması gerçekleştirilmiştir.

PANC-1 hücre hattında seçili dozlarda palbociclib ve abemaciclib ilaç uygulaması ile birlikte senesensin kontrol hücre grubuna göre artmakta olduğu SA- β Gal ile pozitif boyanan hücreler sonucu gözlenmiştir. Bu nedenle hücrelerde CDK4/6 inhibitörlerinin bu hücrelerde CDK4/6'ı inhibe edebildiği sonucuna varılmıştır. PANC-1 hücre hattında bu şekilde gözlenen etkinin hücre ölümü olgusundan önce hücrel senesensin ilk 24 saat içerisinde daha belirgin bir şekilde görüldüğü sonucuna varılmıştır. Panc10.05 hücrelerinde ise hem kontrol hemde seçili dozlarda ilaç uygulanan hücrelerde senesens ile ilgili pozitif boyama saptanmamıştır.



Şekil 25.3x10⁵ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilen hücreler, ilaç uygulamasına takiben Senescence β-Galactosidase Staining Kit #9860 (CST) ile boyama gerçekleştirilmiştir. Bir gece β-gal uygulamasının ardından ışık mikroskopunda incelenmiştir. Sonuçlar iki ayrı biyolojik tekrarın bir tanesinin sonucu olarak sunulmuştur.

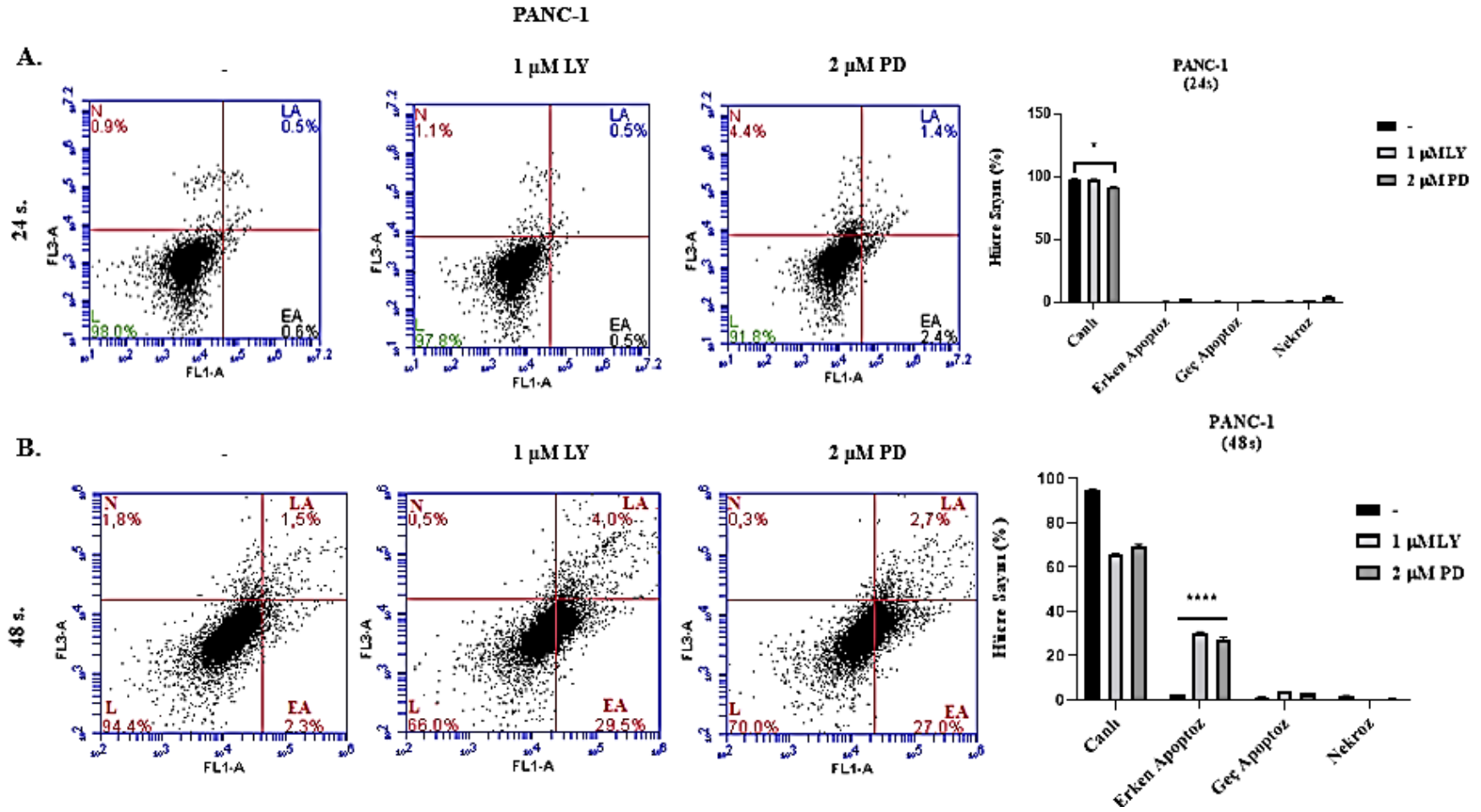
3.6. Apoptotik popülasyonlar üzerindeki etkinin belirlenmesi amacıyla CDK4/6 inhibitörleri uygulamasını takiben pankreas kanseri hücre hatlarında erken ve geç ölüm kararı süreci farklılık göstermektedir.

CDK4/6 inhibitörlerinin etkin dozlarının irdelenmesi ve hücre ölümü karar mekanizmasında detaylı bir şekilde rollerinin belirlenmesi amacıyla Annexin V/PI analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde her iki CDK4/6 inhibitörü için seçilen doz birden fazla hücre sağkalımı-ölüm testi ile hücre hattı spesifik olarak incelenmiştir. Yapmış olduğumuz öncü deneylerde AnnexinV/PI boyama sonucunda seçili dozların 24 saat uygulama sonucunda hücre ölümünde erken ve geç apoptotik popülasyonlar üzerinde özellikle PANC-1 hücrelerinde kontrol hücrelere göre etkili olmadığı tespit edilmiştir.

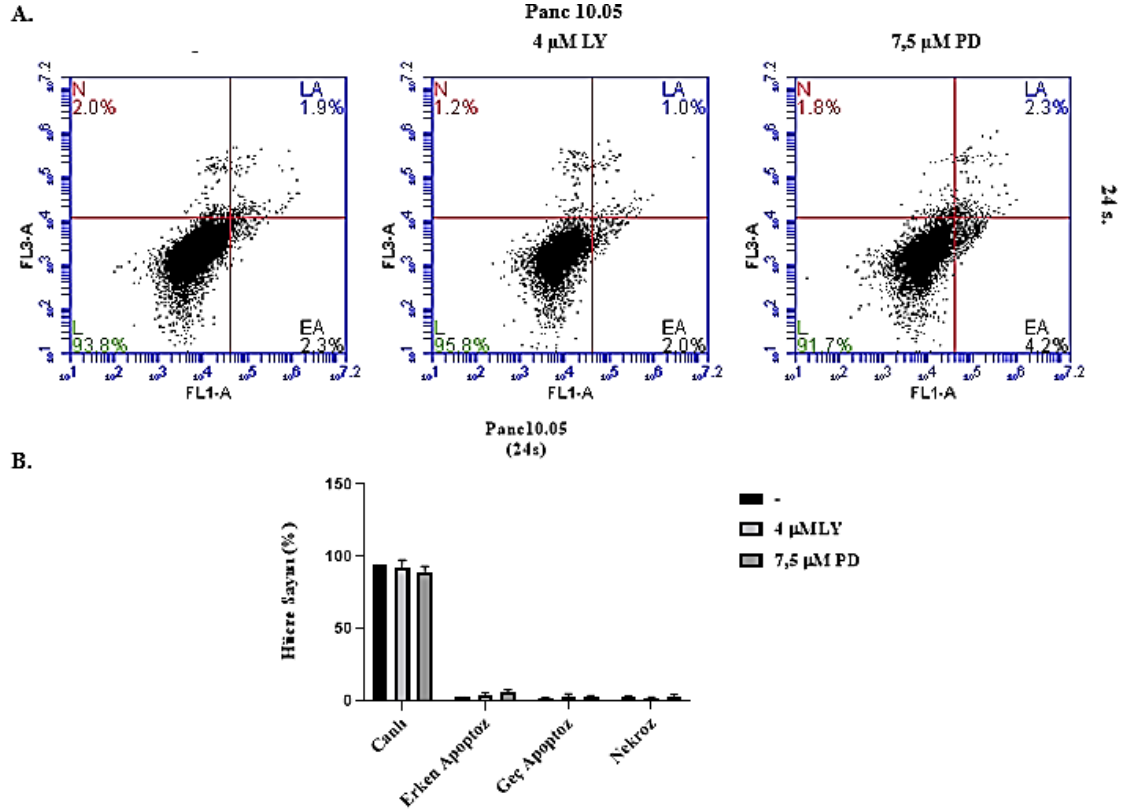
Bu durum hücre siklusundaki tutuklu kalmanın seçili zaman diliminde belirgin bir apoptoz cevabını tetiklemediğini göstermiştir. PANC-1 hücrelerinde sadece 2 μ M palbociclib uygulaması %10 oranında tüm ölüm oranı kararında etkili olmuştur (Şekil 26). PANC-1 hücrelerinde G1 fazında abemaciclib seçili dozda tutuklu kalmaya neden olmakla birlikte daha yüksek doz uygulaması durumunda (2 μ M) ölüm oranının değişmediği saptanmıştır. Palbociclib uygulaması ise PANC-1 hücrelerinde olduğu üzere Panc 10.05 hücrelerinde %10 oranında kontrol hücrelere oranla hücre ölümünü arttırmıştır (Şekil 27).

Apoptotik hücre ölümünün gösterilebilmesi amacı ile seçili dozlarda 48 saat boyunca PANC-1 hücre hattında uygulama yapılmış ve yeniden apoptotik hücre ölümü popülasyonları irdelenmiştir (Şekil 27). Bu kapsamda, PANC-1 hücrelerinde ilk 24 saat uygulama sonrasında her iki ilaç uygulamasını takiben geç ve erken apoptotik ölüm cevabında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak palbociclib ve abemaciclib için farklı bir etki 48 saat uygulama sonucunda gözlenmiştir. PANC-1 hücrelerinde %30 düzeyinde abemaciclib etki düzeyini arttırmış olup, palbociclib uygulaması da benzer şekilde %20 oranında hücre ölümünü 24 saat uygulamasına göre arttırmıştır (Şekil 27).

Panc10.05 hücrelerinde hücre akış sitometrisinde hücre siklusu çalışması sonucunda G1 fazında abemaciclib seçili dozda tutuklu kalmaya neden olmakla birlikte daha yüksek doz uygulaması durumunda (4 μ M) ölüm oranının değiştirmedeği saptanmıştır. Bu durum hücre yaşlanma ile de irdelenmiş olup Panc10.05 hücre hattında herhangi bir hücre yaşlanma cevabı gelişmediği tespit edilmiştir (Şekil 25) bu yüzden hücrelerde erken ve geç apoptotik popülasyonlarda anlamlı olarak artış görülmemesinin, hücre ölümü olgusu ve hücre yaşlanmanın ilk 24 saat içerisinde herhangi bir etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Palbociclib uygulaması ise PANC-1 hücrelerinde olduğu üzere Panc10.05 hücrelerinde %10 oranında kontrol hücreler oranla hücre ölümünü arttırmıştır (Şekil 27).



Şekil 26. PANC-1 hücre hattında Annexin V/PI hücre ölümü analizi. Dört bölmeli grafik FL-1 ve FL-3’de boyama uyumlandırmasının ardından elde edilen 20000 olayın okunması ile çizilmiştir. A) 24 saat CDK4/6 inhibitörü uygulaması sonucu. B) 48 saat CDK4/6 inhibitörü uygulaması sonucu. Deney iki kez tekrarlanış olup seçilen şekiller sunulmaktadır (n=2, **** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

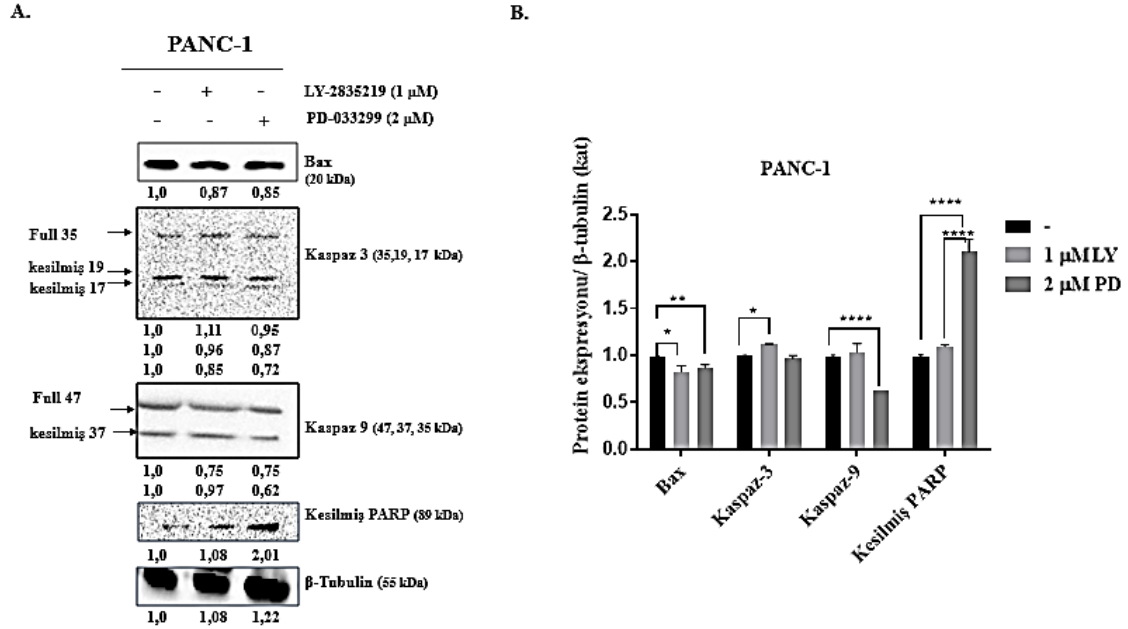


Şekil 27. Panc 10.05 hücre hattında 24 saat CDK4/6 inhibitörü uygulanması sonucu Annexin V/PI hücre ölümü analizi. A) Bu deney kapsamında Annexin V ve PI boyaması hücrelere 48 saat boyunca CDK4/6 inhibitörlerinin uygulanması sonucunda gerçekleştirilmiştir. B) Her bir kolon grafik en az iki biyolojik testin oranı olarak ortalama $\pm$ std hata olarak sunulmuştur (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Hücrelerde apoptotik ölüm mekanizmasının aktivitesini daha iyi irdeleyebilmek için Annexin V/ PI sonuçlarından yola çıkarak apoptotik yolda önemli olan moleküler hedefler immublotlama yöntemi ile incelenmiştir.

Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyerek zar potansiyelini değiştirmektedir. Bu anlamda PANC-1 hücre hattında Bax pro-apoptotik proteinin ifade seviyesinde kontrol grubuna göre CDK4/6 inhibitörü uygulaması sonucunda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bu sonuca ek olarak efektör olarak görev alan Kaspaz 9'un ifade seviyesinde de anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş olup abemaciclib uygulamasının protein ifade seviyesini azalttığı gözlenmiştir.

Apoptoz sinyalinin en önemli ve son hedefi olan PARP'ın fragmentasyonu kritik olup palbociclib uygulaması sonucu PARP ifade seviyesinde artış gözlenmiştir (Şekil 28).

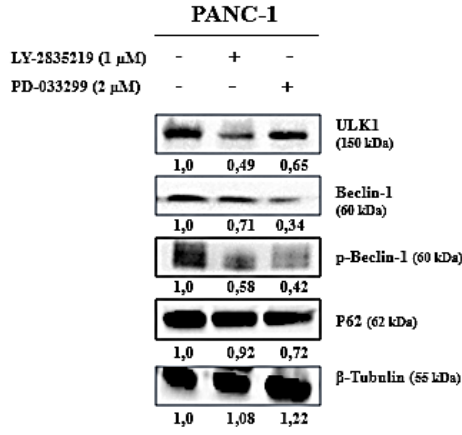


Şekil 28. Apoptoz sinyal yolunda bulunan önemli moleküler hedeflerin CDK4/6 inhibitörleri uygulanmasıyla etkisinin incelenmesi. Yükleme başına 30-50 µg protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β-tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (**** p ≤ 0.0001, *** p ≤ 0.001, ** p ≤ 0.01).

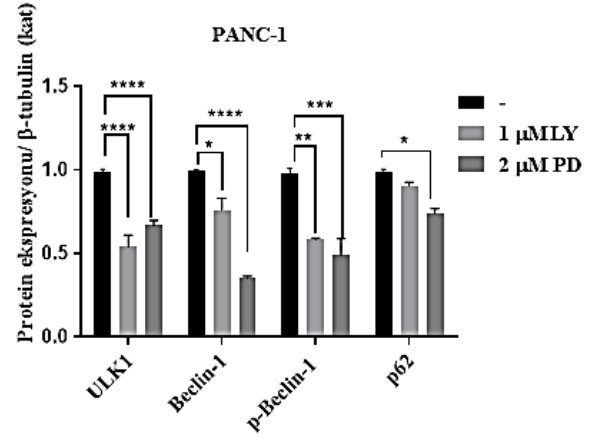
Bu sonuçlarla uyumlu olarak PANC-1 hücre hattında 24 ve 48 saat lik CDK4/6 inhibitörü uygulaması sonucu Annexin V/PI sonucunda da hücre ölümünün tetiklenmesinde özellikle 24 saatte etki görülmediği sonucuna varılmıştır. CDK4/6 inhibitörleri uygulaması sonucu hücre siklusunda takılı kalma süresinin uzaması ve hücrelerin hücresel yaşlanma sürecine giriyor olmaları apoptotik ölüm mekanizmasında gecikme olduğu sonucuna varılmıştır.

PANC-1 hücre hattında 24 saatlik CDK4/6 inhibitörü uygulaması sonrası apoptoz kararının geç alındığı sonucuna varılmıştır fakat mTOR fosforilasyonunda özellikle doz bağımlı gerçekleştirilen immunoblotlama analizleri sonrası palbociclib uygulaması ile azalma görülüyor olması aynı deney düzeneği bu kez otofajik belirteçlerin taranmasına yönelik olarak kullanıldı.

A.



B.



Şekil 29. Otofaji sinyal yolunda bulunan önemli moleküler hedeflerin CDK4/6 inhibitörleri uygulaması sonucu etkilerinin irdelenmesi. Yükleme başına 30-50 μ g protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β -tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Otofajinin aktivasyonu için öncelikle memelilerde ULK 1'in aktive olması gerekmektedir ve PANC-1 hücre hattında palbociclib uygulaması sonucu abemaciclib uygulamasına göre ULK 1 aktivasyonunu az düzeyde arttırmıştır. Beclin-1 ifade seviyesi her iki CDK4/6 inhibitörü uygulanması sonucu azalmıştır. P62, hücre içindeki anormal yapıları tanıyan ve otofaji tarafından yıkımlarına yol açan bir protein olmakla birlikte PANC-1 hücre hattında palbociclib uygulaması sonucu p62 (SQSTM1) yıkımının gerçekleştiği kontrol hücrelere göre ifade düzeyinde azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 29).

3.7. Palbociclib ve abemaciclib pankreas kanseri hücre hatlarında hücre sağkalım ve ölümünü tetikleyici etki göstermektedir.

Hücrelerde her iki CDK4/6 inhibitörü için seçilen doz birden fazla hücre sağkalımı ve hücre ölümü testi ile incelenmiştir. Bu kapsamda, PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında fluoresan mikroskopu ile hücre ölümü, DNA kırıkları, mitokondri membran potansiyeli kaybı gösterilmiştir (Şekil 30). 3,3'Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC6) boyama ile mitokondri membran potansiyel (MMP) kaybı belirlenmiştir. DiOC6 boyası pozitif yüklü bir boya olup negatif yüklü mitokondriler tarafından tutunmasını sağlar ve mitokondri membran potansiyeli bozulmuş apoptotik hücrelerde boya tutunamaz.

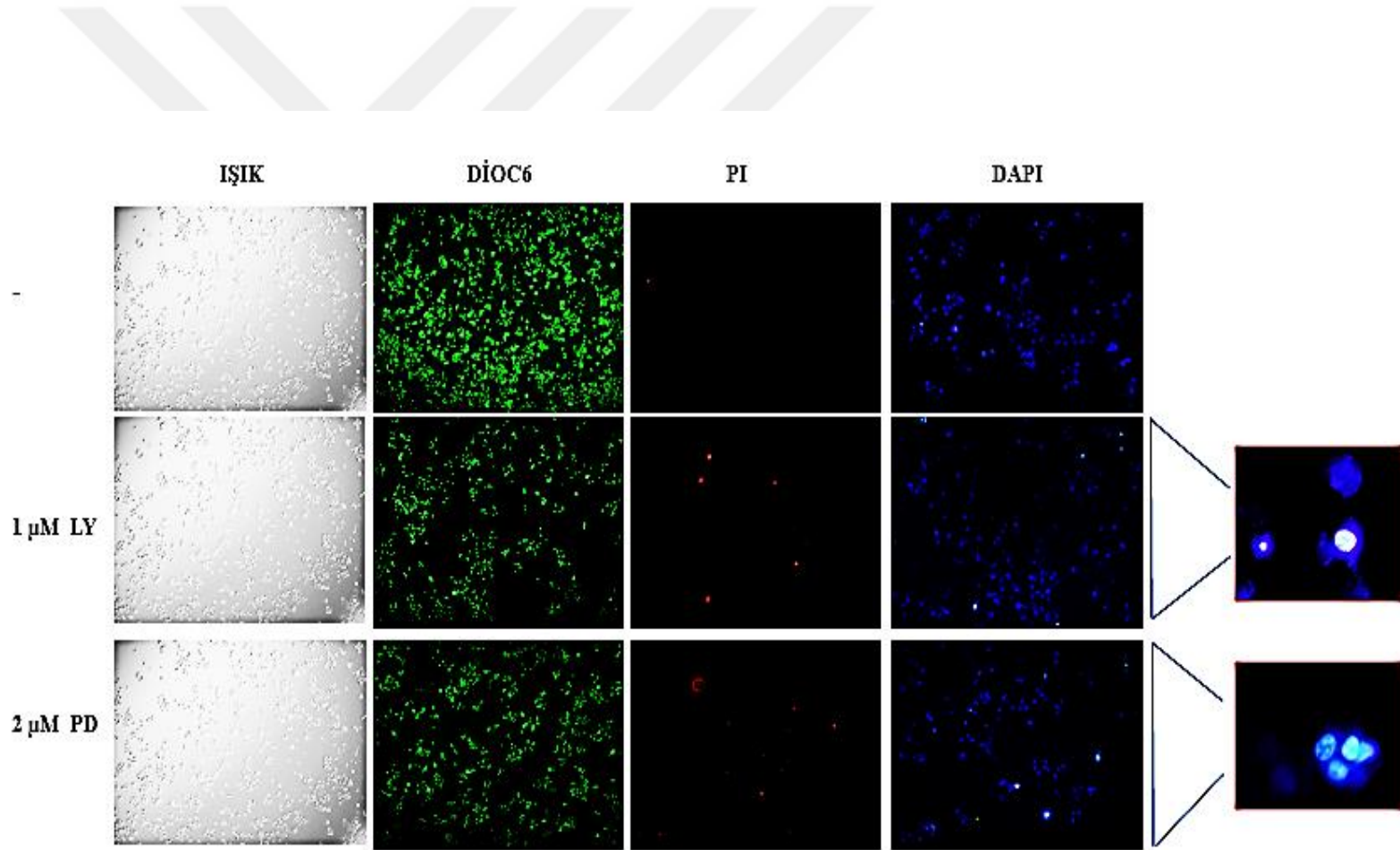
PANC-1 hücre hattı 24 saat boyunca 1 μ M abemaciclib ve 2 μ M palbociclib ile muamele edilmiştir. 24 saat sonunda DiOC6 (4mM) ile boyama gerçekleştirilmiştir ve fluoresan mikroskopunda incelenmiştir. Her iki ilaç uygulaması sonrası hücre morfolojisinde gözle görülür değişime sebep olmakla birlikte abemaciclib uygulamasının hücre morfolojisindeki değişimle birlikte hücre sayısında da kontrol grubuna kıyasla gözle görülür bir azalma meydana getirdiği ve bu şekilde mitokondri membran potansiyeli (MMP) kaybında artış ile içsel yolak aracılığıyla apoptotik hücre ölümünün temel göstergesi mitokondri membran potansiyelinin bozulması ile apoptotik ölüm belirlenmiştir.

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama (DNA kırıklarının belirlenmesi) hücrelerde kemoterapötik ajanların neden olduğu DNA kondensasyonunu gözlemlemek için gerçekleştirilir. DAPI DNA'ya bağlanabildiğinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Apoptotik süreçte DNA kırıkları ve DNA kondensasyonu boyanın nükleusta birikimiyle parlak ışıma olarak gözlenir.

Propidyum İyodür (PI) boyama ile ilaca maruz kalan ölü hücrelerin hücre membran permabilitelerinin bozulması sonucu propidyum iyodür boyasını hücre içine almaları esasına dayanır. Apoptotik ölümün belirlenmesi için kullanılan propidyum iyodür fluoresan probu ve DNA kırığının yani nüklear kondensasyonun belirlenmesi için kullanılan DAPI fluoresan probu ile PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında her iki ilaca bağlı değişimi incelenmiştir (Şekil 30).

PANC-1 pankreas kanser hücre hattında abemaciclib ve palbociclib uygulamasıyla PI ve DAPI fluoresan boyama ile irdelenen hücre ölümü ve DNA kırıklarının belirlenmesiyle (Şekil 30) 1 μ M abemaciclib uygulaması ile PI boyamada hücre ölümünün arttığı, DAPI ile boyandığında ise DNA kırıklarının olduğu gözlenmiştir. DNA kırıkları 40X büyütmede daha net gözlenmiştir. Her iki ilaç uygulaması ile fluoresan boyama sonucuna bağlı olarak DNA hasarına sebep olmaktadır ve PI boyamada hücre ölümünde artış gözlenmiştir.



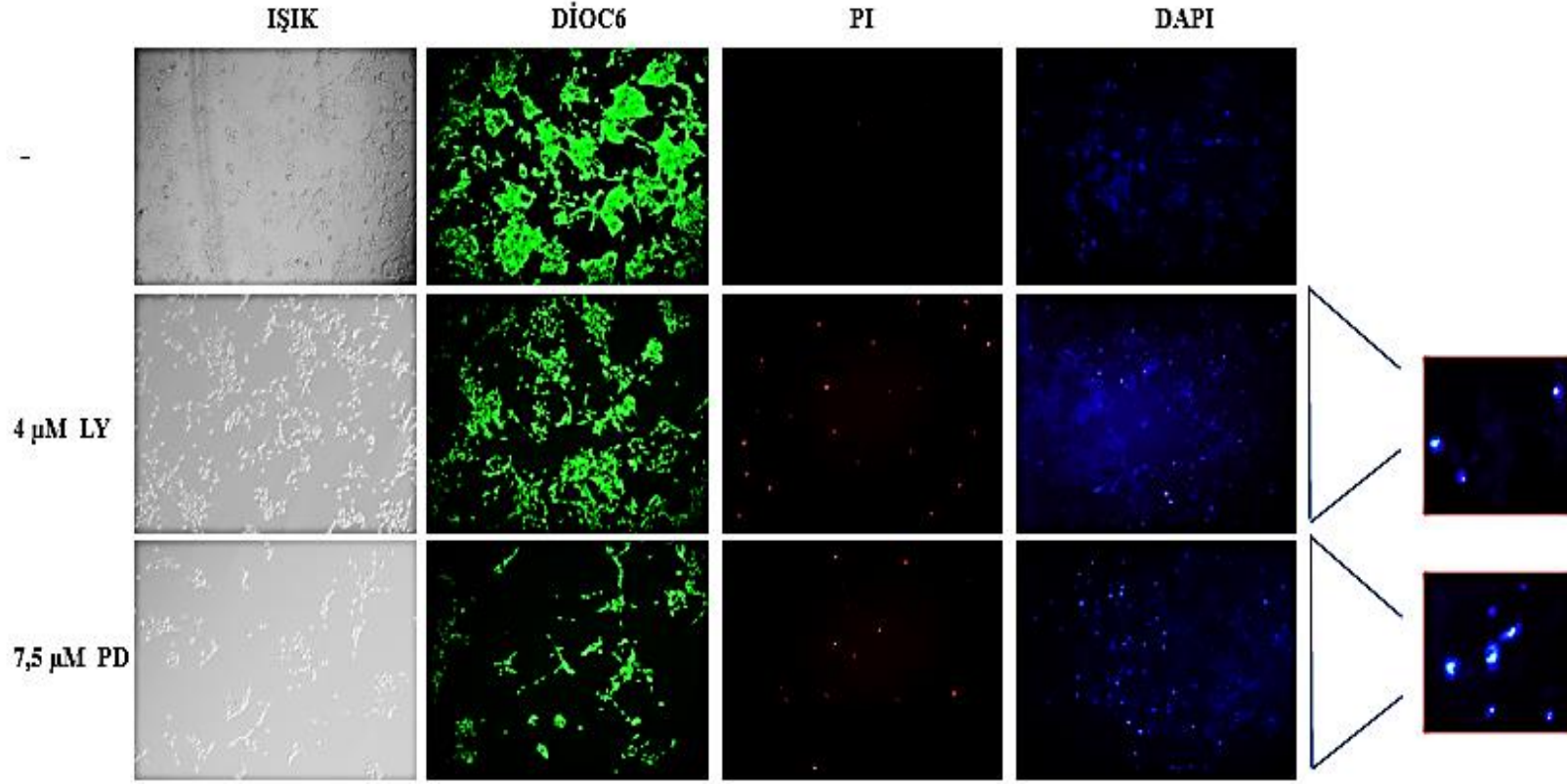


Şekil 30.PANC-1 hücre hattında CDK4/6 inhibitörlerinin hücre sağkalımı, mitokondriyal membran potansiyeline ve hücre ölümüne etkisinin ışık ve floresan mikroskopunda incelenmesi. Abemaciclib (1 μ M LY-2835219) ve palbociclib (2 μ M PD-0332991) PANC-1 hücrelerine 24 saat boyunca uygulandı. DiOC6, Propidium iyodür (PI) ve DAPI ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelendi (x10-x40).

Benzer şekilde Panc 10.05 pankreas kanseri hücre hattında floresan mikroskobu ile hücre ölümü, DNA kırıkları ve mitokondri membran potansiyeli kaybı gösterilmiştir (Şekil 31). 24 saat abemaciclib ve palbociclib uygulaması sonrası Panc 10.05 hücrelerinde mitokondri membran potansiyelinde (MMP) bozulmaya ve hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur. Palbociclib uygulaması sonrası MMP değişimi abemaciclib uygulamasına göre hücre morfolojisinde ve sayısında belirgin şekilde azalma olduğu ve MMP kaybında ki artışın apoptotik hücre ölümünde tetiklediği gözlenmiştir.

Apoptotik ölümün belirlenmesi için kullanılan Propidyum iodide (PI) floresan probu ve DNA kırığının yani nükleer kondensasyonun belirlenmesi için kullanılan DAPI floresan probu ile Panc10.05 hücrelerinde her iki ilaç uygulaması sonucu değişimi incelenmiştir.

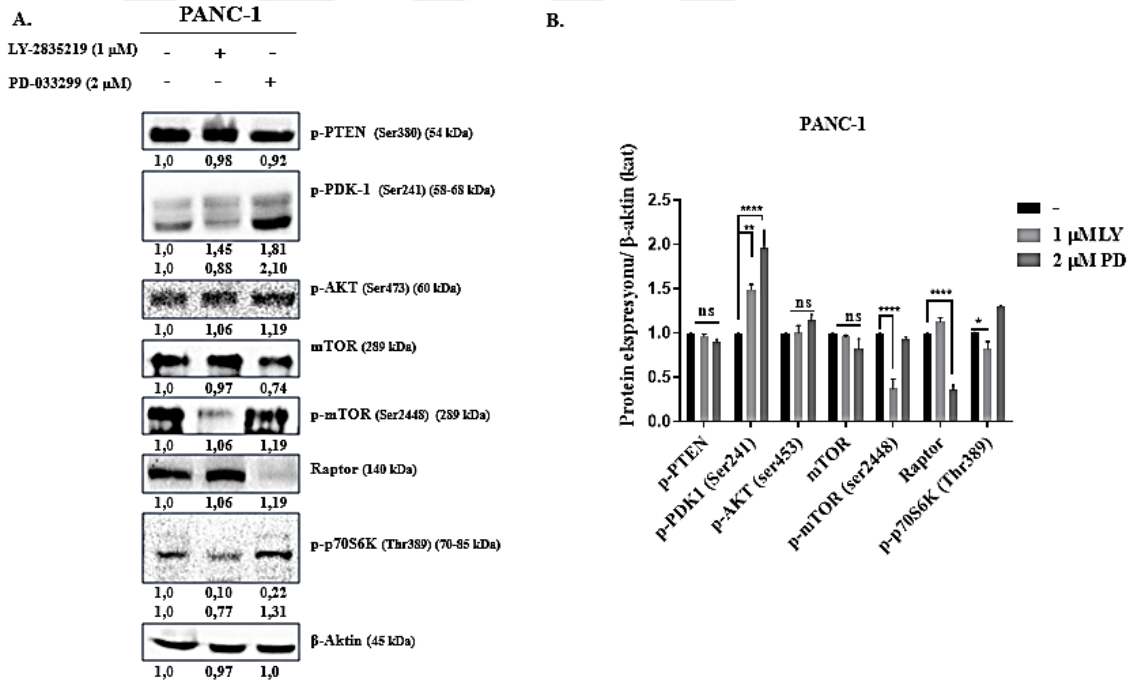
Abemaciclib uygulamasıyla tetiklenen hücre ölümünün palbociclib uygulamasına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Her iki CDK4/6 inhibitörü DNA kırıkları oluşumunu tetiklerken palbociclib, abemaciclibe göre geç zamanlı apoptoz belirteci olan DNA kırığı oluşumunu daha fazla tetiklemiştir.



Şekil 31.CDK4/6 inhibitörlerinin Panc10.05 hücre hattında hücre sağkalımı, mitokondriyal membran potansiyeli ve hücre ölümüne etkisinin ışık ve floresan mikroskobunda incelenmesi. Abemaciclib (4 µM LY-2835219) ve palbociclib (7,5 µM PD-0332991) Panc10.05 hücrelerine 24 saat boyunca uygulandı. DİOC6, Propidium iyodür (PI) ve DAPI ile boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (x10-x40).

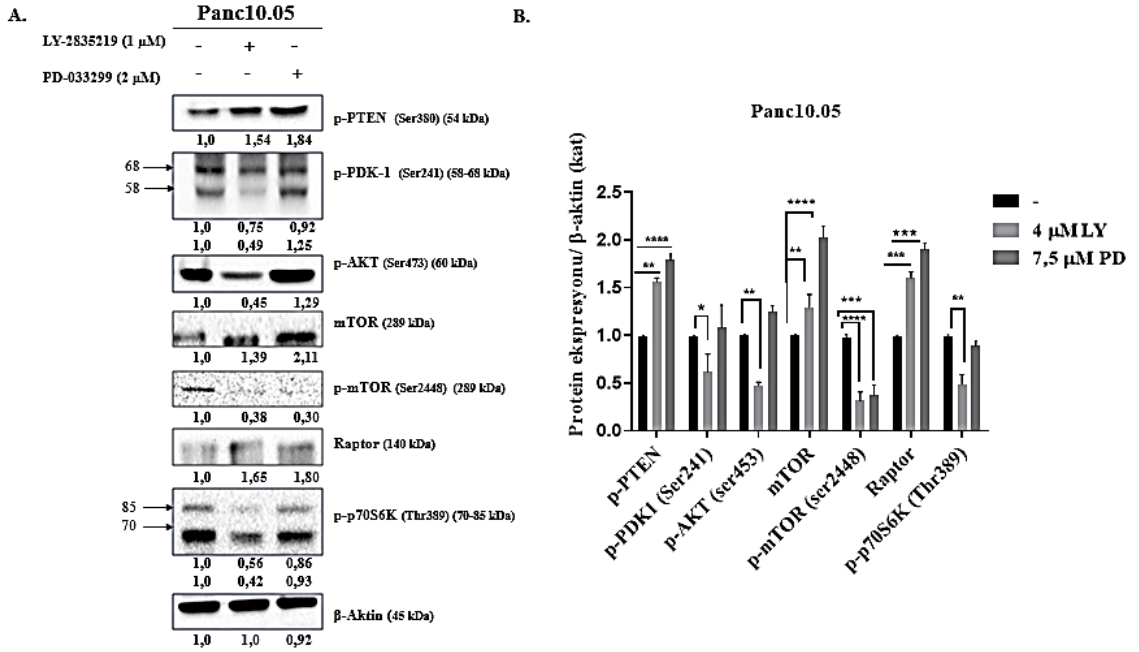
3.8. Palbociclib ve abemaciclib uygulaması ile birlikte her iki pankreas kanseri hücre hattı AMPK ile ilişkili üst ve alt sinyal kaskadında bulunan PI3K/Akt/mTOR tarafından modüle edilmektedir.

Abemaciclib ve palbociclib arasındaki AMPK ilişkili moleküler sinyal yollarının düzenlenmesinde etkilerinin daha iyi bir şekilde incelenmesi için AMPK aşağı sinyal yolları incelenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen immunoblotlama sonuçlarına göre mTOR fosforilasyonu sadece PANC-1 hücrelerinde palbociclib uygulaması sonrasında korunmakla birlikte bu hücrelerde Raptor'un ifadesi azalmıştır (Şekil 32).



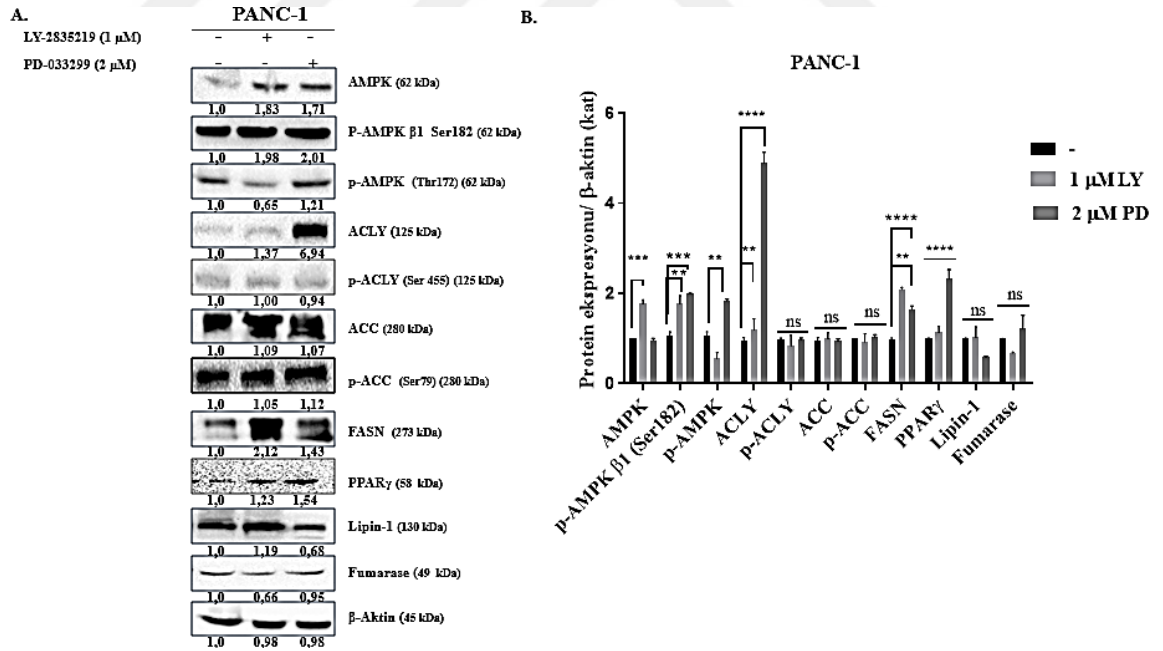
Şekil 32. Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin etkilerinin PANC-1 hücre hattında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu üzerinde protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi. Her bir yükleme için 30-50 µg protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

PANC-1 ve Panc10.05 hücrelerinde mTOR Ser2448 fosforilasyonu CDK 4/6 inhibitörleri uygulaması sonucunda azalmıştır (Şekil 32 ve 33). Hücre açlığı sonucunda azalan p-mTOR Ser2448/mTOR oranı AMPK aktivitesinin artışı ile palbociclib uygulanan hücrelerde korelasyon göstermekte olup, abemaciclib uygulanan hücrelerde hücre açlığının mTOR üzerinde metabolik olarak sensör mekanizma ile algılandığını göstermektedir. CDK4/6 inhibitörü olarak abemaciclib AMPK fosforilasyonunu PANC-1 hücre hattında kontrol gruba kıyasla azaltmakta olup Pan10.05 hücre hattında kontrol gurubuna kıyasla anlamlı derecede ifade düzeyine etkisi gözlenmemiştir. AKT, fosfotidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforillenerek aktive olmaktadır. Fosfotidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 'in fosforile halinde (p-PDK1) abemaciclib uygulaması ile azalma görülürken palbociclib uygulaması sonucu ters etki görülmüştür. Bu durum AKT'ın (Ser453) fosforilasyonunda azalmayı engellediğini göstermektedir.



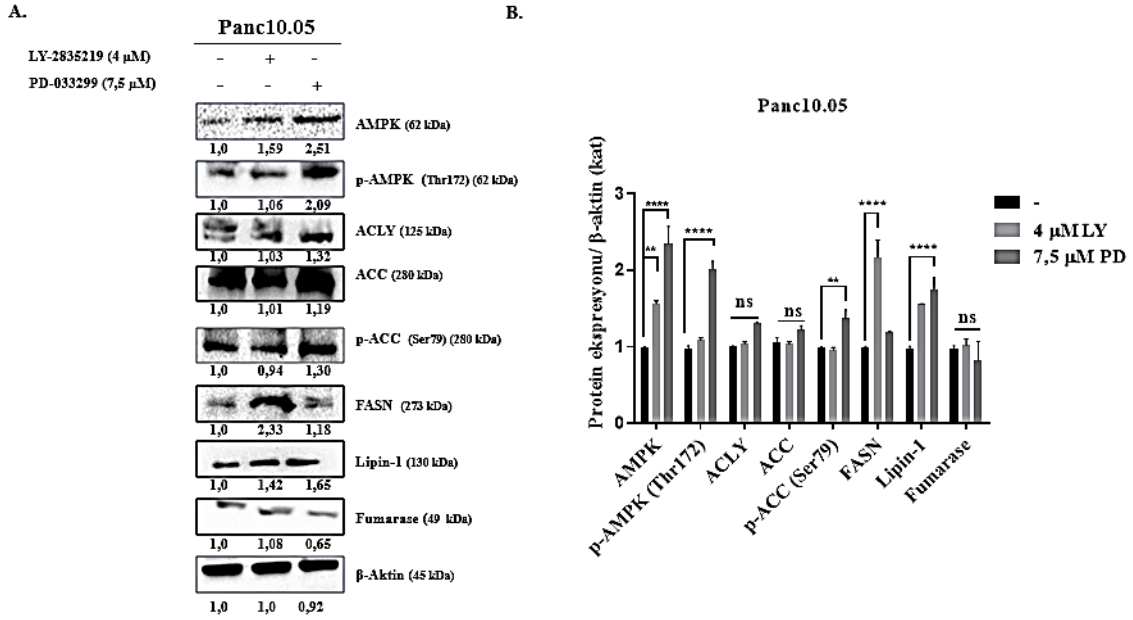
Şekil 33.Seçili dozlarda CDK4/6 inhibitörlerinin Panc10.05 hücre hattında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu üzerinde protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi. Her bir yükleme için 30-50 μ g protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

Ayrıca lipid profilleri ve CKD4/6 inhibitörlerinin terapötik yetkinliklerini göstermek amacıyla hücre içerisinde biriken lipid tipleri hücre ölüm ve sağkalımı kararı üzerinde etkilidir. Bu sebeple AMPK ile ilişkide olan lipid ve yağ asidi metabolizması moleküler hedefleri tanımlanmıştır. PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde mTOR defosforilasyonunu takiben p70S6K ifade seviyesi azalmıştır. Hem abemaciclib hem de palbociclib için PANC-1 ve Panc10.05 hücrelerinde seçili dozlar uygulaması sonrası mTOR/AMPK ve lipid düzenlenmesi ile ilgili sinyal hedeflerinin hücre tipine bağlı düzenlenmesi irdelenmiştir (Şekil 34 ve 35). Kontrol grubu ve ilaç uygulaması gerçekleştirilen hücrelerde p-ACC (Ser79) miktarları aktiftir. Bu durumun tersine, ACC fosforilasyonu PANC-1 hücrelerinde sadece abemaciclib veya palbociclib 24 saat boyunca seçili dozlarda uygulama sonrasında artış göstermiştir (Şekil 34). P-ACC ifade seviyeleri PANC-1 ve Panc 10.05 hücre hatlarında benzerlik göstermektedir.



Şekil 34. CDK4/6 inhibitörlerinin seçili dozlarda etkilerinin PANC-1 hücre hattında AMPK ve lipid metabolizması ile ilişkili önemli moleküler hedeflerin protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi. Her bir yükleme için 30-50 μ g protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

CDK4/6 inhibitörlerinin her ikisinde hem Panc-1 hem de Panc10.05 hücrelerinde benzer ACC inaktifleyici fosforilasyonu tetiklemelerinin yanısıra ATP sitrat liyazın (ACLY) birikimine neden olmuştur. Ek olarak aktif AKT sinyali PANC-1 ve hücre hatlarında devam etmekte olup, bu etki lipogenez ile ilişkili ACLY fosforilasyonunu azaltmış ve hücrenin ilaca karşı sitostatik etkisine neden olmuştur (Şekil 34).

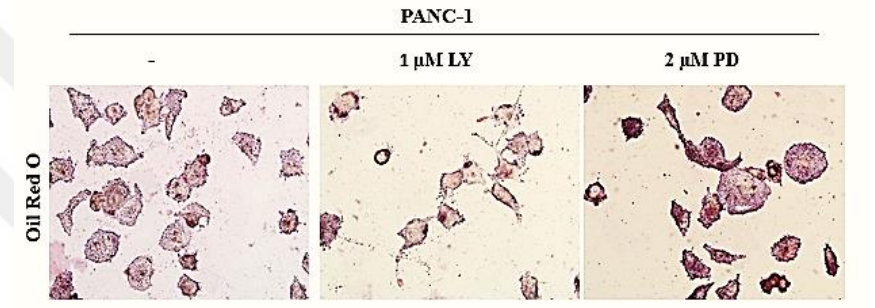
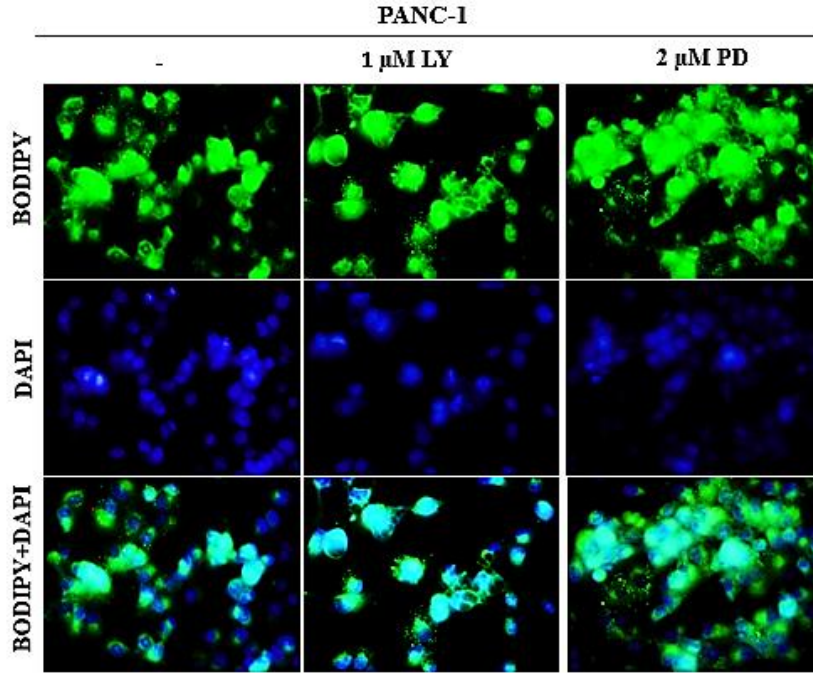


Şekil 35. CDK4/6 inhibitörlerinin seçili dozlarda etkilerinin Panc10.05 hücre hattında AMPK ve lipid metabolizması ile ilişkili önemli moleküler hedeflerin protein ifade seviyesindeki değişikliklerin immunoblotlama ile gösterilmesi. Her bir yükleme için 30-50 µg protein kullanılmış olup %10-12 SDS-PAGE jellerinden sonuç elde edilmiştir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (**** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

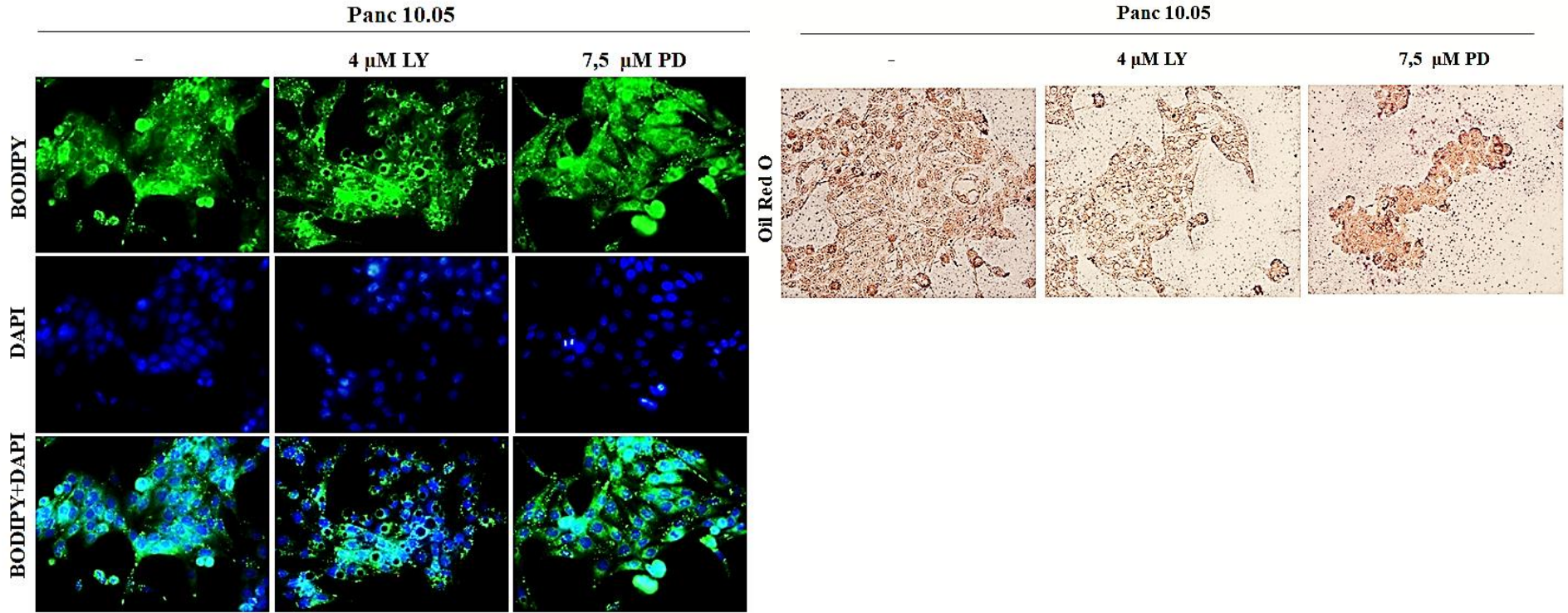
Lipid metabolizmasının homeostazının sürdürülmesinde çift yönlü fonksiyona sahip olan Lipin-1, PANC-1 hücre hattında 2 µM palbociclib uygulaması sonucu azalmış olup Panc10.05 hücre hattında tam tersi bir etki gözlenmiştir (Şekil 35). Lipin-1 aracılı düzenlenen PPARγ (peroksizom-proliferatör ile aktive edilmiş reseptör γ) PANC-1 hücre hattında artan ifade seviyesi şeklinde gözlenmiştir.

Trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün mitokondriyal enzimi olarak kabul edilen Fumarase ifade seviyesi PANC-1 hücre hattında abemaciclib uygulaması ile azalırken (Şekil 34) Panc 10.05 hücre hattında her iki ilaç uygulamasını takiben gözlenmiştir (Şekil 35).

CDK4/6 inhibitörlerinin hücrelerde lipid içeriğine olan etkisinin daha net bir şekilde anlaşılması için Oil Red O boyama ve floresan bir prob olan ayrıca nötral lipidlerin gösterimi için kullanılan BODIPY® boyası DAPI ile eş zamanlı olacak şekilde uygulanmıştır. Palbociclib ve abemaciclib için lipid tutulumları açısından hücrelerde farklı cevaplara neden olmuştur. PANC- ve Panc10.05 hücrelerinde görülen sonuçlara göre palbociclib uygulamasına ardışık Oil Red O tutulumu hücrelerde kontrol hücrelere benzer şekilde kalırken, abemaciclib uygulamasının ardından boyama tutulumunda azalma görülmüştür. Bu sonuçlar ile BODIPY® yoğunluğu, tüm hücrelerde farklılıklar göstermekte birlikte CDK4/6 inhibitörlerinin yeşil floresan oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. PANC-1 hücrelerinde nötral lipidlerin miktarını kontrol hücrelerine göre azaltmasına rağmen (Şekil 36), Panc10.05 hücrelerinde palbociclib nötral lipidlerin tutulumunu ve miktarını azaltmıştır (Şekil 37). Bu süreç AMPK/mTOR sinyal yolağı ile etkileşimin bir sonucu olma potansiyelinde olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 36. BODIPY (4,4-difloro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indasen)-DAPI beraber (sol panel) ve Oil Red O boyama (sağ panel) sonucu PANC-1 hücrelerinde CDK4/6 inhibitörleri açısından değerlendirilmesi. DAPI çekirdek boyaması için kullanılmıştır. BODIPY (sol panel) boyası doğal lipidlerin boyanmasını sağlamıştır. Oil Red O (sağ panel) boyaması ile ışık mikroskopunda hücredeki lipid içeriği gösterilmiştir.



Şekil 37.BODIPY (4,4-difloro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indasen)-DAPI beraber (sol panel) ve Oil Red O boyama (sağ panel) sonucu Panc10.05 hücrelerinde CDK4/6 inhibitörleri açısından değerlendirilmesi. DAPI çekirdek boyaması için kullanılmıştır. BODIPY (sol panel) boyası doğal lipidlerin boyanmasını sağlamıştır. Oil Red O (sağ panel) boyaması ile ışık mikroskopunda hücredeki lipid içeriği gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA

Kanser düzenli olmayan hücre büyümesi, invazyon ve hücrelerin orjin noktasından vücudun başka bölgelerine yayılması ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Kanser vakaları son yıllarda özellikle kanser tiplerine göre oldukça artış göstermekle birlikte sayının ileri ki yıllarda artacağı istatistiksel verilerle hesaplanmıştır.

Pankreas kanseri, dünyadaki en ölümcül malignitelerden biridir ve kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır. Son yıllarda yapılan istatistiksel analizlere göre 5 yıllık sağkalım oranı % 6'dan fazla olmamakla birlikte hastaların % 80'inden fazlası tanı anında lokal veya metastaz gösterir ve bu nedenle potansiyel olarak küratif cerrahi tedavi için uygun görülmemektedir. Cerrahi operasyon geçirecek hastaların % 70'inde bir yıl içinde metastatik olarak hastalık geliştirdikleri tespit edilmiştir. Pankreas kanserinin tanı ve tedavisinde ki bu zorluklar pankreas kanserini 21. yüzyılda kanserler arasında ele alınması gereken “kanseri kralı” ve “en zor taş” yapmaktadır. Bu nedenle, pankreas kanseri metastazının biyolojisi ve genetiğinin daha iyi anlaşılması için daha hassas ve spesifik belirteçlerin veya hedeflerin keşfi oldukça önem arz etmektedir [1] [111].

Pankreas kanserinde en yaygın olarak mutasyona uğramış genler, tümörlerin % 90'ından fazlasında meydana gelen KRAS ve doğal sikline bağımlı kinaz inhibitörü olan p16^{INK4a} CDKN2A'dır (vakaların >% 90'ında inaktive edildiği tespit edilmiştir). KRAS geninde bulunan bu mutasyon PI3K/AKT sinyal yolunu yeniden düzenleyerek hücre sağkalımı ile birlikte hücre göçündeki mekanizmaları tetikleyebilmekte ve bir çok sinyal kaskadını aktive etmektedir. Bununla birlikte sıklıkla görülen CDK2NA (p16) ve TP53'ün aktivasyon kaybı kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olmaktadır [112].

Hücre bölünmesini yönlendiren CDK'ler pek çok kanser tipinde sıklıkla hiperaktiviteyle sonuçlanan ve proliferatif sinyalin devamlılığı, iyi bilinen bir malignitenin ayırt edici özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. CDK'lerin inhibisyonunun kontrol edilemeyen hücresel çoğalmayı durdurması gerektiği düşüncesi göz önüne alındığında ve kanserde bu sistemin aktive olmaması durumu CDK'lerin farmakolojik inhibitörlerini geliştirmeyi hedef haline getirmiştir.

CDK 4 /6, hücre döngüsünün G1 fazından S fazına hücrel geçişini spesifik olarak düzenler ve CDK4 / 6 inhibitörleri, G1 hücre döngüsü durmasını indükleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde bloke eder. Hali hazırda geliştirilen bu ajanlar araştırma laboratuvarlarından klinik çalışmalara geçmiştir ve en iyi bilinen üç CDKi şuan metastatik meme kanserinin tedavisi için FDA onayı almıştır. Bu üç CDK4/6 inhibitörü; palbociclib (PD-0332991, Ibrance; Pfizer), ribociclib (LEE-011; Novartis) ve abemaciclib (LY-2835219; Elli Lilly) tir. Her üç ajan da, daha önceden belirlenmiş standartlarda tedavi için kullanılan anti-östrojen tedavisine ek CDK4/6 inhibitörleri eklendiğinde sağkalımda iyileşmeler gösteren klinik çalışmaların sonuçlarına dayanarak östrojen reseptörü (ER) pozitif meme kanseri tedavisinde kullanılmakla birlikte aromataz inhibitörleri (AI'ler) veya fulvestrant gibi endokrin tedavisi ile birlikte kullanım için onaylanmıştır [54] [56].

Abemaciclib benzer bir hasta popülasyonunda mono-terapi olarak kullanım için onaylanmıştır. Transgenik hayvanlarda yapılan çalışmalar, siklin D1 eksikliğinin güçlü ve spesifik olarak meme epitel proliferasyonunu bozduğunu ve bu dokudaki CDK4 / 6 yolu için önemli bir rol oynadığını göstermiştir [54]. Ayrıca siklin D1 ve CDK4, çeşitli murin meme tümörlerinin oluşumu ve büyümesi için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Meme kanserinde CDK4/6 inhibitörlerinin ilk klinik öncesi çalışması, azalmış Rb fosforilasyonu ve hücre döngüsü durması ile kanıtlandığı gibi, insan meme kanseri hücrelerinin büyük bir kısmının palbociclib'e duyarlı olduğunu göstermiştir [54].

CDK4 / 6 inhibitörlerine karşı direnç geliştiren durumlarda kombine tedavilerin önemi ön plana çıkmaktadır. Örneğin, meme kanserinde nerdeyse tüm tümörler uzun süreli tedaviden sonra bu ajanlara direnç kazanırlar ve altta yatan mekanizmalar da tam olarak anlaşılamamıştır.

CDK4 / 6 aktivitesi, siklin D gen amplifikasyonu ve CDKN2A kaybı dahil olmak üzere çeşitli genomik değişiklikler yoluyla kanserlerde yukarı regüle edilir ve bu değişiklikleri barındıran kanserlerin farmakolojik CDK4 / 6 inhibisyonuna en duyarlı olması gerektiği düşünülmektedir.

Ancak bazı çalışmalar bu teoriyi çürütmektedir. Örneğin, meme kanseri için palbociclib'in klinik çalışmalarında, CCND1 amplifikasyonu ve p16 ekspresyonu kaybı CDK4 / 6 inhibitörünü cevapsız bırakma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir [113]. Palbociclib, yapılan çalışmalarda Rb pozitif hücrelerde etkili olurken, Rb negatif kanserlerde başarısız olduğu gösterilmiştir. p16 (INK4A) (CDKN2A) ve dolayısıyla Rb yolundaki fonksiyon kaybı mutasyonları PDAC'de ortak olarak gösterilmekle birlikte hastalığın hızlı ilerlemesinin önemli bir nedeni olarak sunulmuştur [113]. Bu susturma CDK4 / 6'yı aktive ederken, p16 (INK4A) yetersiz PDAC'de yine de farmakolojik CDK4 / 6 inhibisyonuna dirençli olduğu gösterilmiştir [114].

Palbociclib ve IGF1 reseptör inhibitörleri ile kombinasyon ve pankreas kanseri primer tümör eksplantlarında tümör hücrelerine karşı güçlü sitotoksiste göstermiştir. Abemaciclib, insan ksenograftlarında tümör büyümesinde azalmaya yol açan CDK4 / 6'yı inhibe eder, ancak şu ana kadar pankreas kanseri için spesifik bir hedef olarak gösterilmemiştir [114].

Kanser hücrelerindeki metabolik farklılıklardan dolayı ilaçlara yanıt mekanizması da değişmektedir ve bu sebeple kanser hücrelerindeki etkileri aynı olmamaktadır.

Bu çalışma kapsamında palbociclib ve abemaciclib'in genomik ve biyolojik özellikleri açısından farklılık gösteren; KRAS, TP53 ve CDK2N/p16 (HD) gibi mutasyonlar içeren PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında hücre sağkalım ve ölümü ile ilişkili sinyal yolalarının ele alınmasıyla birlikte hücre içi enerji sensörü olarak görev alan AMPK gibi moleküler hedeflerin özellikle palbociclib gibi küçük moleküller ile bu aktiviteyi regüle ederek yağ asidi metabolizmasına etkileri gösterilmiştir.

PANC-1 ve Panc10.05 hücre hatlarında 24 saat palbociclib ve abemaciclib'in artan dozlarda uygulanması sonucu IC₅₀ değerleri yapılan analizler göz önünde bulundurularak hücre canlılığına etkiyi belirlememizi sağlayan MTT testi sonucunda PANC-1 hücre hattı için ilk olarak her iki ilaç içinde iki farklı doz aralığı belirlenmiştir (1 µM-2µM LY-2835219 ve 2µM-3µM PD-0332991). Seçilen bu dozlar hücre canlılığını %50-55 aralığında azaltmıştır. Spesifik hedefler belirlemek amacıyla her ilaçtan tek doz seçme yoluna gidilmiştir. PANC-1 hücre hattı için seçili dozlarda 1 µM LY %55 ve 2 µM PD %50 oranında hücrelerde canlılığı azaltmıştır.

Panc10.05 hücre hattı için ise doza bağımlı bir süreç denenmemiş olup her ilaçtan hücre canlılığını azaltan iki spesifik doz belirlenmiştir.

Abemaciclib (LY-2835219) 4 μ M doz %57.5 canlılık oranını azaltırken 7,5 μ M PD canlılık oranının %52 oranında azaltmıştır. İlk sonuçlar kapsamında PANC-1 hücre hattında daha düşük dozlarda CDK4/6 inhibitörü uygulamasının Panc 10.05 hücre hattında ise daha yüksek dozlarda uygulanmasının her iki hücre hattı karşılaştırıldığında ilaca duyarlılıklarını anlamamızı ve PANC-1 hücrelerinin daha düşük dozda CDK4/6 inhibitörlerine daha duyarlı olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Her iki CDKi uygulamasının hücre hatları arasında benzer sitotoksikite göstermelerine rağmen doz aralıklarında farklılık olmasının hücreler üzerindeki etkinin farklı olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür (Şekil 13).

Ayrıca CDK4/6 inhibitörlerinin hücre bölünmesi konusunda azaltıcı etkileri PANC-1 hücre hattında MTT testi ile doğru orantılı olduğu ve seçilen doz aralıklarının belirlenmesinde önemli bir etken olmuştur. İçerdiği mutasyonlardan dolayı (*TP53*, *KRAS* ve *CDKN2/p16*) agresif hücre modeli olduğunu ve metastatik profil sergilediği bilinen PANC-1 hücre hattında ilaç uygulaması yapılmayan hücrelere göre ilaçların %50'nin üzerinde koloni sayısında azalma görülmüş olması seçili dozların etkili olduğunu göstermektedir. Bu kapsamda abemaciclib (LY-2835219), palbociclib (PD-0332991) uygulamasına göre etkili olmuştur (Şekil 14 ve 15). Panc 10.05 hücre hattında seçili dozlarda abemaciclib (4 μ M LY-2835219) uygulamasının palbociclib (7,5 μ M PD-0332991) uygulamasına göre benzer şekilde etkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 16).

Bu çalışma kapsamında ele alınan pankreas kanseri hücrelerinde abemaciclib (LY-2835219) etkili bir terapötik olarak gösterilmiştir. Hücrelere palbociclib (PD-0332991) uygulanması ise kısmi etkili terapötik sonuçlar sağlamaktadır.

Meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada palbociclib'in tek başına çok düşük dozlarda bile etkili olduğu ve enzatulamid isimli bir ajanla kombine halinde uygulanmasının sitostatik etkiyi arttırarak hücre proliferasyonunda azalmayı tetiklediği ve palbociclib ile indüklenen G1 tutuklanmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir [115].

Pankreas kanserinde PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında gerçekleştirilen düşük dozlarda palbociclib (PD-0332991) uygulamasının hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir [116]. Abemaciclib (LY-2835219) uygulaması sonucunda ise pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada tek başına abemaciclib uygulamasının (0,5 μ M ve 0,98 μ M IC₅₀ değerine göre etkin doz aralıkları) hücre canlılığını azalttığı [117] ve bu tez kapsamında seçilen dozlarla benzer doz aralığına ve efektifliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak bu veriler, hücre sağkalımı ve metastazla ilişkili sinyal ekseninde seçilen doz aralıklarının hücre canlılığını azaltma kabiliyeti nedeniyle dikkat çekici bir terapötik strateji olduğunu vurgulamaktadır.

Hücre siklusunda ana regülatör olarak görev alan Retinoblastoma (Rb) proteini, hücre döngüsünün G1-fazı içindeki ilerlemesini kontrol ederek hücre çoğalmasını düzenleyen tümör baskılayıcı özelliği olan bir proteindir. Pankreas kanseri hücre hatlarında kullanılan CDK4/6 inhibitörü olan palbociclib (PD0332991) ve abemaciclib (LY-2835219)'in retinoblastoma protein seviyesine etkisinin incelenmesi amacı ile gerçekleştirilen ELISA sonuçlarına göre Rb fosforilasyonları ve hücrelerde ilaçlar tarafından meydana gelen hücre siklusunda takılı kalma durumunda PANC-1 hücre hattında Rb hipofosforilasyonu açısından her iki ilacın farklı yetkinliklerde olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle abemaciclib uygulamasının Rb hipofosforilasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 17). Benzer şekilde Panc10.05 hücre hattında da abemaciclib ve palbociclib uygulaması Rb hipofosforilasyonuna neden olmuştur (Şekil 17). Rb'nin fonksiyonel kaybının hücresel CDK4/6 inhibitörlerinin yüksek düzeyde ekspresyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

Spesifik olarak, Rb kaybı, p16^{INK4a} birikmesine yol açan kendi replikasyon stresini indükleyeceğinden yüksek seviyelerde p16^{INK4a} eksprese eden ve hala hücre döngüsü boyunca ilerleyen herhangi bir tümörün CDK4 / 6 inhibisyonuna dirençli olacağını düşündürmektedir [51]. Bir çok kanser tipinde görülen p16 kopya sayısı silinmesi ve DNA metilasyonu sonucu etkisiz hale gelme potansiyelindedir. Yapılan çalışmalar p16 delesyonu olan kanser hücrelerinin delesyon bulunmayan hücrelere göre palbociclibe daha duyarlı olacağı yönündedir [118].

Fakat yapılan başka bir çalışmada p16 susturulduğunda, Rb kontrolsüz çoğalmaya izin veren bir regülatör olarak işlevsiz kalmaktadır [117]. Bu sebeple agresif özellik gösteren ve p16 kaybı bulunan PANC-1 hücre hattında palbociclib'in Rb hiperfosforilasyonunu tetiklediği düşünülmektedir (Şekil 17). CDK4 'ün palbociclib ile inhibisyonunun, Rb'yi aşırı eksprese eden pankreatik tümörde apoptozu önemli ölçüde indüklediğini ve hastadan türetilen ksenograft modellerinde gemsitabin ile kombinasyonunun apoptotik etkiyi arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, CDK4/6 inhibitörlerini içeren bir kombinasyon terapisinin Rb-pozitif pankreatik tümörlerde faydalı olabileceğini ve Rb'nin bu stratejiden en fazla yararlanacak hastaları seçmek için bir araç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir [113]. İnhibitör gemsitabin ile kombinasyon halinde uygulandığında epitelial bir tümör ksenograftında etkinin arttırıldığına yöneliktir [113] [114].

Palbociclib (PD-0332991) ve abemaciclib (LY-2835219)'in hücre hatlarında moleküler etkileri Rb fosforilasyonu ile modellendiğinde hücre siklusunda G1 fazında tutuklu kalmaya neden olduğunda göstermiştir.

PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde abemaciclib (LY-2835219) doza bağımlı bir şekilde hücre siklusunda G1 fazında tutuklu kalma oranını arttırmaktadır (Şekil 18). Palbociclib (PD-0332991) %89,4 G1 fazında tutuklu kalmaya neden olmuştur (Şekil 19). Doz artımı sonucunda %87,1 oranında hücre siklusu G1 fazında tutuklu kalmış olup, önemli bir değişiklik görülmemiştir. Abemaciclib uygulamasındaki etki palbociclib ile karşılaştırıldığında G1 fazında tutuklu kalma oranı palbociclib kadar efektif olmadığı söylenebilir. Literatürde MIA PaCa-2 ve PANC-1 hücre hatları kullanarak gerçekleştirilen çalışmalar doğrultusunda palbociclib (PD-0332991) uygulamasının G1 fazında tutuklu kalmayı indüklediği gösterilmiştir [116].

Her iki ilaca da benzer düzeyde cevap veren Panc10.05 pankreas kanseri hücrelerinde ise abemaciclib'in seçilen dozda uygulama yapılmayan kontrol hücrelere göre daha fazla hücrenin G1 fazında yaklaşık %79,3 oranında tutuklu kalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 20). Benzer sitotoksite oranına sahip seçili palbociclib dozu uygulaması ise belirgin düzeyde G2/M fazında Panc 10.05 hücrelerinin tutuklu kalmasına neden olmuştur.

Bu sonuçlar hücre siklusunda takılı kalma durumunun doza ve hücre hattına bağlı değişkenlik gösterme nedeninin hücresel yaşlanma mekanizması ile ilişkili olup olamacağını düşündürmüştür.

Hücrelerde senesens durumunda CDK4/6'nın inhibe olduğu bilinmektedir. CDK4/6 inhibitörlerinin senesens açısından indükleyici rolleri hücre hatlarında irdelenmiş olup özellikle PANC-1 hücre hattında seçili dozlarda palbociclib ve abemaciclib uygulamasının hücresel yaşlanmayı tetiklediği fakat Panc10.05 hücrelerinde ise hem kontrol hemde ilaç uygulanan hücrelerde, hücresel senesens ile ilgili pozitif boyama saptanamadığı gözlenmiştir (Şekil 25). Hücresel yaşlanma sonucu hücre döngüsü düzenleyici proteini olan p21'in artan ekspresyonu kaydedilmiştir [119].

Bu literatür doğrultusunda PANC-1 hücre hattında doza bağımlı bir şekilde her iki CDK4/6 inhibitörü uygulaması sonucu hücre siklusunda görev alan proteinlerin immunoblotlamaları sonucu p21 ifade düzeyinin artıyor olması hücresel senesensin tetiklediğinin başka bir kanıtı niteliği olabileceğini düşündürmüştür (Şekil 21 ve 22).

Her iki ilaç (PD-0332991 ve LY-2835219) için seçilen iki farklı dozun hücre siklusundaki cevap mekanizmasını irdelemek için PANC-1 hücre hattında hücre siklusunda yer alan hedef proteinlerin ifade seviyeleri incelendiğinde abemaciclib (LY-2835219) uygulamasının Rb fosforilasyonunu palbociclib (PD-0332991) uygulamasına göre azalttığı gözlenmiştir (Şekil 22). Bu sonuç retinoblastoma elisa sonucuyla uyumluluk göstermektedir. Ve bu sonuç bize hücre hatlarında ilaç duyarlılıklarının farklı olduğuna yönelik bilgiler sağlamıştır. İlaç uygulamasını takiben CDK4 ifade seviyesindeki azalmanın yanı sıra p21 protein ifadesinde artış ve proto-onkogen olan c-Myc protein ifade seviyesinde doza bağlı azalma her iki ilaç uygulaması sonucunda da gözlenmiştir.

Akciğer kanseri hücre hattı olan H460 hücrelerinde abemaciclib'in 10 µmol/L uygulaması sonucu Rb fosforilasyonunu azalttığı ve p21 ifade seviyesini arttırdığı gözlenmiştir [120]. Dördüncü evre küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) hastalarda tek ajan veya kombine terapilerle etkin tedavi için uygulanan abemaciclib ksenograft modellerinde Rb fosforilasyonunun inhibe edilmesi ve G1 hücre döngüsü durması ile ilişkilendirilmiştir.

Ayrıca, kanser hastalarında tek bir ajan olarak 150 veya 200 mg Q12H abemaciclib kullanıldığında dozları, deri keratinositlerinde sürekli biyokimyasal inhibisyon (azaltılmış fosforile Rb) ve fenotipik G1 tutuklanması tümör biyopsileriden alınan örneklerde gözlenmiştir [121].

Palbociclib'in (PD-0332991) PANC-1 hücre hattında Rb fosforilasyonuna ket vurmadağı ancak abemaciclib (LY-2835219) uygulamasının Rb fosforilasyonunu doza bağılı şekilde azalttığı fakat her iki ilacında hücre siklusunda G1 fazında tutuklu kalmaya neden olduğı sonucuya uyumluluk göstermektedir. c-Myc ifade seviyesinin iki ilaç arasında farklı doz aralıklarında azalması hücre sağkalımı ile ilgili ana regülatör görev alan AKT sinyal kaskadına etkisi açısından öncü bilgi sağlamıştır (Şekil 23 ve 24).

PI3K/AKT/mTOR kompleksi üzerinde ilaçların potansiyel etkisini değerlendirmeyi amaçladık. AKT'nin, diğer kinazlar tarafından tamamen aktive edildiğı ve PDK1, mTORC2 gibi farklı hedeflerle tetiklendiğı bilindiğı gibi bu yol ile ilişkili çeşitli transkripsiyon faktörleri hücrelerin anabolik aktivitesini PI3K/AKT/mTOR sinyal ekseninde kontrol altında tutmak için kritik hedefler olduğı bilinmektedir [122].

PI3K/AKT sinyal kaskadının her iki ilaç (PD-0332991 ve LY-2835219) uygulamasıyla doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda palbociclib ve abemaciclib'in artan dozlarda AKT inhibisyonu aracılı olarak hücre sağ kalımına ket vurma potansiyeli olduğı belirlenmiştir.

Hücre sağkalımı ve ölümü ile ilgili sinyal kaskadında önemli bir yeri olan AMPK'nin palbociclib ve abemaciclib uygulaması ile PI3K/AKT/mTOR sinyal ekseninde ne gibi değişikliklere neden olduğunu anlayabilmek için ilaçların seçili dozlardaki etkisinin hangi şekilde etkilendiğini inceledik.

Meme kanseri hücre hattı olan MCF-7aro ve T47Daro hücrelerinde yapılan çalışmada abemaciclib, palbociclib ve ribociclib uygulaması sonucu mTOR yolunda görev alan özellikle mTOR fosforilasyonunun ve p70S6K ve S6 protein ifade seviyelerinde ayrıca G2/M fazı için gerekli proteinlerin ifade seviyelerinde önemli derecede azalma olduğı gösterilmiştir. Ancak CDK4/6 inhibisyonu siklinE1/CDK2 aracılı Rb fosforilasyonunu tetiklediğı ve CDK4/6 direncine yol açan hücre döngüsü ilerlemesine yardımcı bir mekanizma olduğı sonucunu göstermiştir.

Ayrıca bu çalışmada palbociclib'in hastadan oluşturulmuş ksenograft modellerinde (PDX) Ki67 hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir [123].

Meme kanserinde Rb ve siklin D1 ekspresyonu, p16INK4 kaybı bulunan MDA-MB231 ve HCC38 hücre hatlarında buna göre, palbociclib uygulamasının bu hücrelerde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmada tek başına 0,5 µM palbociclib uygulamasının ve 10 nM paklitaksel ile kombinasyonu uygulandığında PI3K/AKT sinyal kaskadında tek başına düşük dozda palbociclib uygulamasının p-AKT ifade seviyesini azalttığı paklitaksel ile kombinasyon halinde protein ifade seviyesinde anlamlı bir azalma gözlemlendiği kaydedilmiştir [124]. Ayrıca bu etkinin palbociclib ve paklitakselin ardışık kombinasyonu AKT/mTOR yolunun palbociclib aracılı indüksiyonunu inhibe etmesi ile ilişkili olabileceği ve bu mekanizmaların glikoz metabolizmasında etkilediği sonucuna varılmıştır. Literatürde MDA-MB231 ve HCC38 hücre hatlarıyla yapılan başka bir çalışmada 0,5 ve 1 µM palbociclib uygulamasının p-AKT ifade seviyelerini saat bazında (2-6 saat aralığında ilaç uygulamasıyla) azaldığı gösterilmiştir [125] [123].

Palbociclib ve abemaciclib'in terapötik mekanizmaları açısından AMPK fosforilasyonu irdelenmiş olup palbociclib seçili olan iki dozlarda AMPK fosforilasyonunu (Thr172) arttırdığı sonucuna varılmıştır. Abemaciclib ise doza bağımlı bir şekilde AMPK aktivitesini düşük doz uygulamasında (1 µM) azaltırken, daha yüksek doz (2 µM) uygulaması sonucunda hem anlamlı düzeyde bir AMPK aktivasyonuna (kontrol hücrelere oranla) neden olmamıştır. Ayrıca p-AMPK (Thr172) da görülen artan miktarda fosforilasyon palbociclib'in AMPK aktivasyonuna neden olduğunu göstermektedir. Hepatasellüler karsinoma hücre hatları olan HuH7 ve Hep3B hücre hatlarında artan dozlarda palbociclib uygulamasının AMPK ifade seviyesini arttırdığı bu fosforilasyonun aktivasyonu ile aşağı sinyal yolunda bulunan ULK'ın ifade seviyesini ve PARP kesilimini artırarak otofajik ve apoptotik ölüm karar mekanizması üzerinde rol oynadığı gösterilmiştir [126].

AMPK aktivasyonu koloni sayısındaki ilişkili olarak artmakta ancak GSK3β yi inhibe eden Ser9 fosforilasyonu gerçekleşmediği durumlarda koloni sayısında azalma görülmektedir.

Hücre metastazı ve göçü ile ilişkili olarak c-Myc ifadesinin 2 μ M palbociclib uygulamasıyla artıyor oluşu koloni sayısında azalma görülmemesi ile potansiyel ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu etkinin pankreas kanseri hücre tiplerinde hangi farklılık nedeni ile ortaya çıktığı tam olarak bilinmemektedir. Benzer şekilde palbociclib ve abemaciclib uygulaması sonucunda GSK3 β inhibe edici fosforilasyonun (Ser9) PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde abemaciclib (LY-2835219) uygulaması ile doza bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Palbociclib (PD-0332991) uygulaması sonucunda ise GSK3 β (Ser9) fosforilasyonunda anlamlı değişiklik olmaması CDK4/6 inhibitörlerinin hücre tipine bağlı olarak apoptotik etkileri açısından bir moleküler hedef olarak GSK3'ün kritik olduğunu düşündürmüştür [127].

Yumurtalık kanseri hücre hatları PA-1, OVCAR3' te yapılan bir çalışmadan metforminle tetiklenen AMPK aktivasyonun AKT fosforilasyonunu, p-mTOR ifade seviyelerini azaltarak GSK3 β 'nın fosforilasyon yoluyla siklin D1 düzeylerini yıktığı gözlenmiştir [128]. Bu anlamda AMPK fosforilasyonunun tetiklenmesi kritik olabilmektedir.

Kanser hücrelerinin CDK4 / 6 inhibitörleri ile ilk karşılaşmalarında hücrelerde G1 fazında tutulu kalmayı tetiklediği bilinmektedir. CDK4 / 6 inhibisyonu sonrası hücreler ya hücrel yaşlanma sürecine girer ya da sitotoksik ilaçlara maksimum duyarlı oldukları zaman S fazına aynı anda girer. İkinci olarak S veya M fazında aktif sitotoksik bir ilaçla tedavi edilen kanser hücreleri, sırasıyla G2 / M veya M kontrol noktasında tutulu kalırlar ya da hücrelerin apoptoz mekanizması devreye girmektedir [129]. Panc10.05 hücre hattında G2/M fazında tutulu kalma süreci bu sonuç ile ilişkilendirilebilir. Farklı kolon kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmada yüksek konsantrasyonda (10 μ M) palbociclib (PD-0332991) uygulaması sonucu G1 fazında tutuklu kalmanın aksine G2/M fazında da durdurucu etki gözlemlendiği ve bu sonucun zamana bağlı olarakta değişkenlik gösterebileceği belirtilmiştir [130].

Artan dozlarda 0.5, 1 ve 2 μ M palbociclib (PD-0332991) uygulamasının BxPC3, AsPC-1, PL5, PL45, MIA PaCa-2, Capan-2 ve Hs766t pankreas kanseri hücre hatlarında 5-Bromo-2'deoksiüridin uygulaması sonucu hücre siklusu analizi yapıldığı ve AsPC-1, Capan-2 gibi hücre hatlarında proliferasyona ket vurduğu Hs766t, MIA PaCa-2 gibi hücrelerin daha dirençli olduğu gösterilmiştir.

Bu sonuçlar, dirençli modellerde Rb'nin fosforilasyonunun CDK4 / 6'dan bağımsız olmasıdır ve hücre siklusuna ve proliferasyona etkisinin farklı cevap mekanizması geliştirdiği yönündedir şeklinde açıklanabilir [55] [130]. Hücre proliferasyonuna ket vurucu etkisinin daha net belirlenmesi adına gerçekleştirilen koloni oluşturma testi sonucu Capan-2, PL45, Hs766t ve PL5 hücre hatlarında palbociclib (PD-0332991) uygulamasının koloni potansiyeline ket vurduğu özellikle bu etkinin Capan-2 ve PL45 hücre hatlarında görüldüğü gözlenmiştir [55]. Abemaciclib uygulamasının *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda p-Rb inhibisyonuna ve hücresel yaşlanmaya neden olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca meme kanseri ve melanom dahil diğer tümör modellerinde yapılan uygulamalar sonucunda da *in vivo* ve *in vitro* denemeler sonucu total Rb ifadesinde azalma tespit edilmiştir [117]. Meme kanseri hücre hattın olan MCF7 hücrelerinde yapılan çalışmada palbociclib'in (PD-0332991) G1-fazında takılı kalmayı arttırması ve hücresel yaşlanmayı indüklediği *in vitro* çalışmalarda ve *in vivo* ksenograft modellerinde gösterilmiştir [131]. Sitotoksik ilaçlara önceden maruz kalmadan kısmen onarılmış DNA hasarının varlığı, CDK4 / 6 inhibisyonuna bağlı G1 tutuklu kalma sürecinde hücrelerin yaşlanma veya apoptoza uğrama oranını arttığı bilinmektedir [57], [117]. Bu kapsamda hücrelerin hücre siklusunda takılı kalma durumları ve hücresel yaşlanmaya geçiş süreçleri farklılık gösterebilmektedir.

Apoptotik hücre ölümüne geçişlerini irdeleyebilmek amacıyla seçili dozlarda PANC-1 hücre hattında 24 ve 48 saat boyunca uygulama yapılan ve apoptotik hücre ölümü popülasyonları Annexin V/PI analizi yöntemi ile irdelenen PANC-1 hücrelerinde 24 saatlik CDKi uygulaması sonucu erken apoptotik fazda %10 luk bir artış gözlenirken 48 saat ilaç uygulaması sonrası ise %30 düzeyinde özellikle abemaciclib etki düzeyini arttırmış olup, palbociclib uygulaması da benzer şekilde %20 civarında hücre ölümünü 24 saat uygulamaya göre arttırmıştır (Şekil 28). Ayrıca bu sonuçlar hücre siklusunda uzun süre tutuklu kalma sonucunda hücresel senesensin hücre ölümünden daha önce meydana gelebileceğini de düşündürmüştür. Yine bu sonuç bize özellikle PANC-1 ve Panc10.05 hücrelerinde 24 saatlik uygulama sonrası apoptotik ölümün meydana gelmemesinin neden olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 29).

Hücrelerde erken ve geç apoptotik popülasyonlarda anlamlı olarak artış görülmemesinin, hücre ölümü olgusu yerine hücrel senesensin ilk 24 saat içerisinde daha belirgin bir şekilde görülmesi olabileceği kanısına varılmıştır.

Hücrel yaşlanma ve apoptoz sürecinin DNA hasarı, stres gibi genellikle benzer faktörler tarafından tetiklendiği bilinmektedir [62] [132].

Yaşlanma ve apoptoz kararında hücrenin hangi yolu seçtiği çoğunlukla tam olarak anlaşılamamış bir süreç olmakla birlikte bu kararlar için anahtar mekanizmalar mevcut olmalıdır. Yaşlanan hücrelerin ekstrinsik ve intrinsik apoptoza dirençli olduğu son çalışmalarla desteklenmiş olup bunun Bcl-2 ailesi proteinlerinin yukarı regülasyonunun bir sonucu olduğunu ileri sürülmektedir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin inhibe edilmesi yaşlanan hücrelerde apoptozu indüklediğinden bu durumun son derece mekanistik karar sürecinde önemli olduğu vurgulanmıştır [133].

Rb-pozitif hücrelerde yaşlanmaya yol açan hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonu olduğu gösterilmiş ve ana etki mekanizmasının bu yol olduğu bilinen abemaciclib (LY-2835219)'in bir çok kanser tipinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [117].

Bu amaçla Bcl-2 ailesi üyesi olan pro-apoptotik proteinlerin ve kesilmiş PARP miktarlarına bakılmıştır. Bax, pro-apoptotik protein miktarının her iki ilaç uygulamasının sonucu belirgin bir şekilde değiştirmedeği fakat PARP kesiliminin özellikle palbociclib (PD-0332991) uygulaması sonrası arttığı gözlenmiştir (Şekil 28). Ayrıca abemaciclib ve palbociclib uygulaması sonucu kesilmiş kaspaz-3 artışının apoptotik mekanizmanın devrede olduğunu gösteren başka bir kanıt niteliğindedir. Literatürde abemaciclib (LY-2835219) uygulanan MIA PaCa2, PANC-1 ve Hs766t hücrelerinde, apoptotik yolda kritik görev alan kesilmiş kaspaz-3 düzeylerinde artış gözlenmiştir [117].

PANC-1 ve Panc10.05 pankreas kanseri hücre hattında floresan mikroskobu ile hücre ölümü, DNA kırıkları, mitokondri membran potansiyeli kaybı gösterilmiş olup her iki hücre hattında da CDKi uygulamasını ve DİOC6 boyamasını takiben MMP deki azalma ve DAPI boyama sonucu DNA kırıklarındaki artış hücrelerde iç apoptotik yolağın inhibitörler tarafından aktive edilebilme potansiyeli olduğunu göstermektedir (Şekil 30 ve 31).

Elde edilen bu sonuçlarla birlikte artan senesens ve hücre siklusunda takılı kalma süreci nedeni ile hücre ölüm kararının 24 saatten daha geç bir süreçte alındığını, ancak hücrenin moleküler markırlarının değişimi nedeni ile hücre ölümü emri konusunda aktif olduğunu düşündürmektedir. Yapılan araştırmalarda apoptozun tetiklenmediği bazı durumlarda uyarıcının türüne göre hatta hücre içerisindeki stres yanıtı ve açlık seviyelerinin değişkenlik gösterdiği süreçlerde otofajinin hücre ölümüne doğrudan ya da dolaylı olarak yol açtığı belirtilmektedir [106].

Hepataselüler karsinoma hücre hatlarında yapılan bir çalışmada palbociclib (PD-0332991)'in apoptoz ve otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Bu kapsamda PANC-1 hücre hattında palbociclib (PD-0332991) ve abemaciclib (LY-2835219) 'in apoptotik mekanizmada farklı etkiler göstermesi bu ilaçların aynı zamanda otofajik ölüm mekanizmasındaki etki sürecini anlayabilmek adına otofajik markılardan ULK1'nın palbociclib uygulaması sonucu ifade seviyesinin artıyor oluşu apoptoz-otofaji geçiş süreci hakkında bilgiler sağlamaktadır (Şekil 29). Beclin-1 ifade düzeyinde ki azalma ve p62 protein miktarındaki azalma otofajik ölüm mekanizmasını konusunda da aktif bir süreç işlediğini göstermektedir [115]. Otofajinin yaşlanmayı destekleyen SASP üretiminde yararlı olan büyük miktarlarda geri dönüştürülmüş amino asitler ürettiği bildirilmiştir [134]. Bu literatüre göre PANC-1 hücre hattında hücre yaşlanma düzeyindeki artış otofaji ve yaşlanma süreci arasında paralel bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Ancak pankreas kanserinde yapılan çalışmada PaSC hücre hattında p62 (SQSTM1) protein ifade seviyesindeki azalma artmış otofajiyi gösterirken yaşlanmış bir hücre fenotipini indüklememiştir [135]. Panc10.05 hücre hattında hücre yaşlanmanın tetiklenmemesi bu sonuca bağlanabilir fakat otofajik markırların bu hücre hattında doğrulanması gerekmektedir.

CDK4 hücre döngüsü ilerlemesinin pozitif düzenleyicisi rolünün yanı sıra, diğer sinyal yolları ile ilişkili görevlere sahiptir. Yukarıda bahsedilen çalışma sonuçları PANC-1 hücre hattı için hem abemaciclib hem palbociclib uygulamasının artan dozlarda hücre içerisindeki hücre döngüsünde sorunlar açısından önemli yollardan biri olan Rb-CDK4/6-siklin-D'yle birlikte çalışan AMPK'nın etkileşimde bulunduğu tüm yollar içerisinde özellikle hücre siklusundaki birçok sağ kalım ve ölüm veya metabolit süreçlerle de ilişkili olarak görülen sinyal yollarına etkisi incelendi ve sonuçlar bizim için öncü bulgular niteliğindedir.

AMPK hücre içi korunmuş bir enerji sensörü olduğu bilinmektedir ve AMPK'nin doğrudan inhibisyon yoluyla hücresel substrat kullanımının önemli bir regülatörü olduğu düşünülmüştür. Literatürde pankreas kanseri hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, azalan AMPK aktivitesinin agresif hücre tipi ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir [136]. Hücrelerin hayatta kalma, büyüme ve çoğalmaları ile ilişkili hücre sinyal yollarında kritik rol oynamaktadır [137]. AMPK'nın α alt biriminde bulunan Thr172 residüsü üst sinyal kaskadları için önemli bir hedef olup, fosforilasyon yoluyla AMPK aktivitesinde artışa neden olur [92]. Bu yüzden AMPK enerji homeostazı düzenleyici rolü nedeni ile hücre içerisinde yaşanan stres ilişkili olaylara yanıt veren moleküler hedeftir. Lipid metabolizmasındaki rolü ve PI3K/AKT ve mTOR sinyal kaskadındaki rolü bu açıdan dikkat çekmektedir.

Hücre sağkalımını kontrol eden PI3K/AKT ve mTOR sinyal yolundaki önemli moleküler hedefler irdelenmiştir. PTEN'deki fonksiyonel kayıp önemli bir sıklıkta saptanmamış olsa da örneklerinin %70'inde immünohistokimyasal analizleri sonucu düşük PTEN ekspresyonu bildirilmiştir [48]. 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 gösteriyor olabilir.

Ayrıca AMPK alt ünitelerinden biri olan düzenleyici görev üstlenen $\beta 1$ formu glikojene bağlanmaya aracılık eden bir karbonhidrat bağlayıcı modüle ve α alt birimlerinin bağlanmasını kolaylaştırmak için bir iskele görevi gören modüle sahiptir. AMPK aktivitesi $\beta 1$ formunun fosforile olması yoluyla aktive olmaktadır [95].

PANC-1 hücre hattında AMPK $\beta 1$ in fosforilasyonunun artması da AMPK aktivitesini tetiklendiğinin bir kanıtı niteliğindedir. Bu etki mTOR sinyal kaskadı açısından irdelenmiş olup mTOR aktivitesinde azalma palbociclib uygulamasını takiben belirlenmiştir ve mTOR fosforilasyonunda (Ser2448) da azaldığı gözlenmiştir.

Hepatasellüler karsinoma hücre hatları Hep3B ve Huh7’de palbociclib uygulaması ile AMPK’nın alt sinyal yolları (mTORC1, ULK1, p53) aktivasyonunun Thr172 residüsündeki fosforilasyondaki artışla meydana geldiği ve bu aktivasyonun hücre hatlarında palbociclibe duyarlılığı modellediği gözlenmiştir [126].

Bu etki aşağı sinyal yolağında bulunan p70S6K’nin fosforilasyon aktivitesinde benzer bir şekilde azalmaya neden olmuştur. Tersine abemaciclib uygulaması p70S6 aktivitesinde PANC-1 hücrelerinde artışa neden olmuştur. Ancak bu durum sadece palbociclib tarafından AMPK Thr172 fosforilasyonunun arttığı PANC-1 hücrelerinde görülmekte olup (Şekil 34), Panc 10.05 hücrelerinde palbociclib AMPK aktivitesini arttırmasına rağmen PTEN fosforilasyonunda böyle bir etki görülmemiştir (Şekil 35). Palbociclib uygulaması sonrasında p-PDK1 fosforilasyonu AKT ve AMPK aktivasyonu ile PANC-1 hücrelerinde gözlenmiştir. P-PDK aktivitesi ile AMPK Thr 172 aktivitesi birbirine korelasyon göstermektedir. Benzer etki Panc10.05 hücrelerinde gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar kapsamında şu an faz 2 çalışmasında olan ve monoterapi olarak kullanılan abemaciclib (LY2835219) metastatik pankreas kanseri hastalarında PI3K inhibitörü (NCT02981342) ile kombinasyon halinde hücresel sağkalım yolağına etkisi araştırılmaktadır. Bu çalışma ile ilgili olarak, abemaciclibin CDK4 / 6’nın daha seçici bir inhibitör rolünün anlaşılması hedeflendiği öngörülmektedir [117].

Abemaciclib ve palbociclib arasındaki AMPK ilişkili moleküler sinyal yollarının düzenlenmesinde etkilerinin daha iyi bir şekilde incelenmesi için AMPK aşağı sinyal yolları incelenmiştir.

Bu amaçla gerçekleştirilen immunoblotlama sonuçlarına göre mTOR fosforilasyonu sadece PANC-1 hücrelerinde palbociclib uygulaması sonrasında korunmakla birlikte bu hücrelerde Raptor'un ifadesinin azalması dikkati çekmiştir. PANC-1 ve Panc 10.05 hücrelerinde mTOR Ser2448 fosforilasyonu CDK 4/6 inhibitörleri uygulaması sonucunda azalmıştır. Hücre açlığı sonucunda azalan p-mTOR Ser2448/mTOR oranı AMPK aktivitesinin artışı ile palbociclib uygulanan hücrelerde korelasyon göstermekte olup, abemaciclib uygulanan hücrelerde hücre açlığının mTOR üzerinde metabolik olarak sensör mekanizma ile algılandığını göstermektedir. CDK4/6 inhibitörü olarak abemaciclib PANC-1 hücre hattında belirgin düzeyde AMPK fosforilasyonunu azaltıcı etki göstermektedir. Bu sonuç AMPK fosforilasyonunun tamamen azalmasının üst sinyal yolağında yer alan PTEN/PI3K/AKT sinyal kaskadı ile ilişkilendirilmiştir. AMPK enerji ihtiyacına göre protein sentezi için önemli olan mTORC2 kompleksini inhibe eder ve mTOR fonksiyonlarının durmasına neden olmaktadır [86] [87]. Bu yüzden seçilen pankreas kanseri hücrelerinde CDKi'lerinin metabolik enerji yollarında yeniden programlanmaya neden olduğu söylenebilir. Bu sebeple AMPK lipogenezi ve metabolik yeniden programlanmayı hedef alarak kanser hücrelerinin sağ kalımına ket vurma potansiyelindedir. Metabolizmayı yeniden düzenlemek için glikoliz inhibitörleri ve metformin, AICAR ve resveratrol gibi AMPK aktivatörleri kullanılarak tümör oluşumu ve kemorezistans için güçlü terapötik ajanlar olarak önerilen bu kimyasallar aktif metabolik düzenleyiciler olarak kullanılabilir [128] [138]. Palbociclib uygulamasıyla birlikte halen devam eden AKT sinyali PANC-1 ve Panc 10.05 hücrelerinde lipogenezle ilişkili ATP Sitrat Liyaz (ACLY) ser456 hedefinin fosforilasyonuna özellikle PANC-1 hücre hattında azaltıcı etki göstermiştir (Şekil 34). Lipid profilleri ve ilaç yetkinliklerinin irdelenebilmesi için gerçekleştirilen öncü çalışmalar içerisinde biriken lipid tiplerinin hücre ölüm kararı üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [139].

AMPK'nin iskelet kasındaki yağ asidi oksidasyonunu asetil CoA karboksilaz (ACC) 2'nin fosforilasyonu ile düzenlediği düşünülmektedir. ACC, her biri ayrı genler tarafından kodlanan ve doku dağılımlarında farklılık gösteren 2 izoformda, ACC-1 ve ACC-2'de bulunur.

ACC1 birçok dokuda eksprese edilir, ancak sitozolde mevcut olduğuna ve yağ asidi sentezini düzenlediğine inanılan karaciğer ve yağ gibi lipojenik dokularda yüksek oranda eksprese edilir. Yapılan çalışmalar bu döngü için ACC1'in farelerden genetik olarak silinmesi embriyonik süreçte letaliteyi geliştirmesi sebebiyle ACC1'in bu anlamda kritik olduğu yönündedir [87] [139].

p-ACC'nin ser79 fosforilasyonunun her iki CDKi uygulaması sonrası artıyor olması her iki hücre hattı içinde anlamlılık ifade etmektedir. Abemaciclib için hem de palbociclib seçili dozlar için mTOR/AMPK ve lipid düzenlenmesi ile ilgili sinyal hedeflerinin hücre tipine bağlı düzenlenmesi irdelenmiş olup p-ACC düzeylerinin artması ilaçlara cevap mekanizmasında AMPK'yle beraber çalışan ACC'nin stres durumunda tetiklendiğini göstermektedir. Fizyolojik olarak açlık veya ciddi stres koşullarında artan AMPK ve ACC fosforilasyonları nedeni ile lipid biyosentezinin azalmasına işaret etmektedir.

PANC-1 hücrelerinde bazal ACC miktarlarının çok fazla miktarda olması hücrenin CDK4/6 inhibitörlerine verdiği cevabı etkileme potansiyelindedir. Özellikle AMPK total protein düzeyinin azalması ve AMPK benzeri ACC de görülen aktivasyonu azaltıcı fosforilasyon düzeyindeki artış terapötik olarak lipid deregülasyonunun önemini göstermektedir [140]. MIA PaCa-2 ve PANC-1 pankreas kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmada AMPK'nin aktivasyon kaybının metastatik profili tetiklediği gösterilmiştir [136]. AMPK'nin bu yoldaki işlevi özellikle mTOR aracılı lipid yeniden programlama için TSC2 ve mTORC1 alt birimi Raptor'u fosfo-inaktif ederek mTOR'u negatif olarak düzenler. Bu düzenlemeyi AMPK, glikoliz, otofaji ve FAO gibi biyoenerjetik süreçleri teşvik ederken, FA sentezi gibi enerjisel olarak maliyetli anabolik süreçleri birlikte inhibe eder. Palbociclib'in çalışmalarda AMPK'nin aktivasyonunu indüklediği ve CDK4'ün, doğrudan AMPK α 2'yi antagonize ederek FAO'yu baskıladığı gösterilmiştir [141].

ACC alt yolağında bulunan FASN protein ifade seviyesi PANC-1 hücre hattında abemaciclib uygulamasıyla artmakta olup palbociclib uygulaması hiç uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre anlamlılık ifade etmemektedir. FASN'nin ifade seviyesinin artıyor olması onun bir onkogen gibi davranarak apoptotik yolağı inhibe ettiği bilinmektedir.

Ayrıca FASN, mTORC1 sinyali yoluyla gen ekspresyonu ve protein ekspresyonu seviyelerinde sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1'in (SREBP1) ana regülatörünü aktive ettiği gösterilmiştir. Aktif SREBP1, FASN, ACC1, ACLY ve CD36 gibi çeşitli FA sentez genlerinin ekspresyonunu indükleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu etki PANC-1 hücre hattında abemaciclib uygulaması sonrası FASN'deki ifade artışının nedeni olarak söylenebilir [140].

Ayrıca abemaciclib uygulamasının fosforile AMPK ifade seviyesinin değiştirmemesi, FASN'in ACC fosforilasyonuna etki etmemesi, ACLY ifade seviyesini arttırması ve dolayısıyla FASN'i engeleyecek bir fosforile olmuş AMPK'nin bulunmaması durumu FASN'nin çalışmasını durduramadığı ve aktivasyonunun arttığını göstermektedir [95].

mTOR sinyal kaskadında alt hedefinde yer alan PPAR γ insülin duyarlılığını artırarak glikoz metabolizmasında rol oynar bu sebeple diyabetin potansiyel bir terapötik hedefi haline gelmiştir. Aynı zamanda PPAR'lar, metabolik hastalıklarda ilaçların geliştirilmesi için moleküler hedeflerdir ve PPAR'lar kanser hücresi büyümesinin düzenlenmesinde de rol oynar [142].

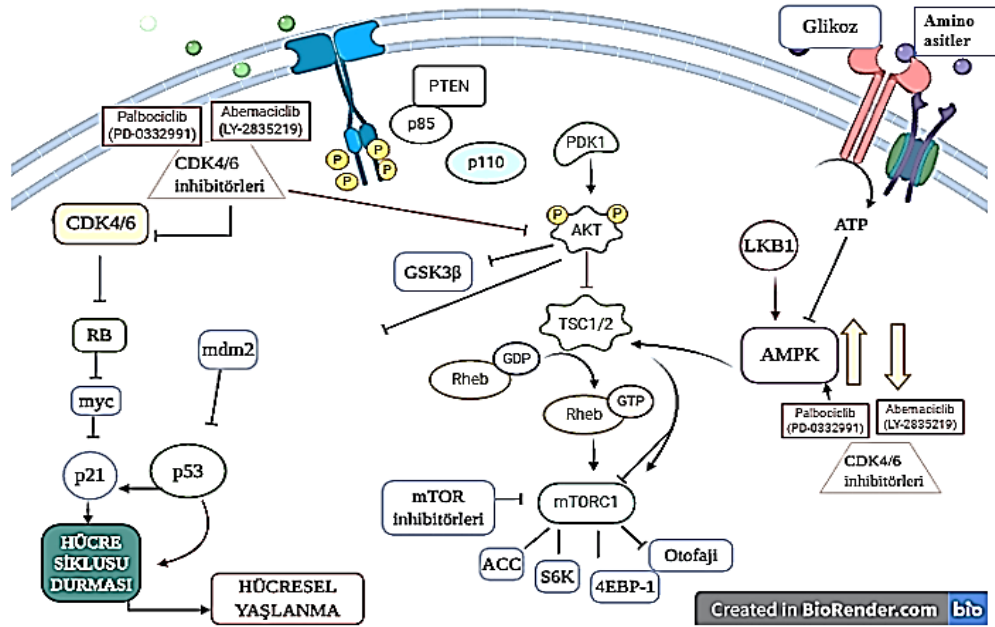
PPAR γ ifade seviyesinde PANC-1 hücre hattında abemaciclib ve palbociclib uygulaması sonucu artış gözlenmekle birlikte bu etki palbociclib uygulaması sonucu daha fazladır. Lipid metabolizmasının homeostazının sürdürülmesinde çift yönlü fonksiyona sahip olan Lipin-1, PANC-1 hücre hattında 2 μ M palbociclib uygulaması sonucu azalmış olup Panc10.05 hücre hattında tam tersi bir etki gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar metabolik değişimlerde hücre döngüsünü büyük bir rol oynadığına yönelik olmakla birlikte özellikle CDK4 yalnızca hücre metabolizma ve hücre döngüsü ilerlemesi arasındaki dengede değil çoğalma ve farklılaşma gibi olaylarda da metabolik regülatör olarak kabul edilmektedir. CDK4'ün bu işlevleri ve aktivasyonu PPAR- γ (peroksizom-proliferatör ile aktive edilmiş reseptör γ) 'nın aktivitesini tetikleyerek yağ dokusu farklılaşmasını teşvik ettiği gözlenmiştir [142] [143].

İn vivo modellerden PDX (pankreas kanseri hastalarından izole edilen ksenograft modelleri) elde edilen sonuçlar doğrultusunda palbociclib'in hücre döngüsü ifade düzeylerini azaltırken yağ asidi metabolizması ve PPAR sinyalizasyonu ile ilgili hedeflerin ifade düzeylerini arttırdığını göstermektedir [123]. PPAR- γ PANC-1 hücre hattında artan ifade seviyesi şeklinde gözlenmiştir.

Trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün mitokondriyal enzimi olarak kabul edilen Fumarase ifade seviyesi PANC-1 hücre hattında abemaciclib uygulaması ile azalırken (Şekil 34) Panc 10.05 hücre hattında her iki ilaç uygulamasını takiben gözlenmiştir (Şekil 35).

Hücrelerdeki lipid birikimini anlayabilmek için gerçekleştirilen Oil Red O boyama CDK4/6 inhibitörlerinde uygulamaya bağlı olarak lipid damlacıklarının gösterilmesi amacıyla kullanılmıştır.

PANC-1 hücre hattında özellikle abemaciclib uygulaması sonrası hem hücre canlılığı azalmıştır hemde hücre içerisindeki lipid damlacıklarında azalma söz konusu olmuştur (Şekil 36). Benzer sonuç Panc10.05 hücre hattında da gözlenmiştir (Şekil 37). Hepatasellüler karsinoma hücre hatları olan HuH7 ve HepG2 hücreleriyle yapılan çalışmada AMPK aktivasyonu ile indüklenen hücrelerde, hücre içi nötr lipid içeriğinin azaldığı gözlenmiştir [144]. Lipid dropletlerinin hücre içerisinde tanımlanması için kullanılan BODIPY boyama sonucunda her iki hücre hattında da abemaciclib uygulaması sonucu lipid dropletlerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda AMPK aktivasyonu ile birlikte lipid yeniden programlanmanın hücreler arası etkilerinin farklı olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Sonuçlar kapsamında hücrelerin metabolik yollar üzerindeki düzenlenme etkileri konusunda CDK4/6 inhibitörlerinin seçici etki gösterebileceğini düşündürmektedir.



Şekil 38. Palbociclib ve abemaciclib'in olası AMPK aktivasyonu ile birlikte AKT/mTOR sinyal yoluna etkilerinin şematize olarak gösterilmesi.

Sonuç olarak pankreas kanseri için lipid tipleri ile ilişkili verilerin eldesi yeni nesil terapötik süreçlerde yeni hedeflerin geliştirilmesini sağlama potansiyeli göstermektedir. Benzer moleküller olmasına karşın seçilen CDK4/6 inhibitörlerinin aynı hedefleri etkilemekle birlikte farklı hedeflere de yönelebildiğini göstermiştir. Ayrıca AMPK'nın birçok mekanizmada ve sinyal yolları ile ilişkisinde kritik önem taşıdığı dikkat çekmiştir. Seçilen CDK4/6 inhibitörlerindeki bulgularımızdan bir tanesi Rb'den bağımsız şekilde etkilerin gözlemlendiği durumlarda ilaçlar arasındaki mekanistik farklılıkların özellikle abemaciclib (LY-2835219) uygulamasının AMPK'dan bağımsız şekilde mTOR inhibisyonuna neden olduğu ve PI3K/AKT sinyal mekanizmasına etki ettiğine yöneliktir. Metabolik yeniden programlamanın, kanser hücrelerini farklı ortamlara daha uyumlu hale getiren ve kanser tiplerinde önemli bir özellik olarak karşımıza çıktığı ve bunu modüle eden AMPK'nın bu süreçte karar mekanizmasında önemli bir role sahip olduğu kanısına varılmıştır (Şekil 38). Lipit sentezinin arttığı bilinen pankreas kanserinde lipit sentez sürecinin bastırılmasının kanser tedavisi için önemli bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

Hücrelerde enerji metabolizmasının yeniden programlanması yolu ile CDK4/6 inhibitörlerinin pankreas kanserinde AMPK alt ve üst yolları ile ilişkili olarak bir terapötik hedef olabileceği ortaya konmuştur. Gelecekteki çalışmalar CDK4/6 inhibitörlerinin PI3K/AKT/mTOR ve AMPK sinyal ekseninin çeşitli PI3K/AKT veya mTOR inhibitörleri ile kombine olarak veya AMPK aktivitesini arttıran AICAR, metformin gibi ilaçların kombinasyonu yolu ile yeniden incelenebileceğine yönelik olabilir. Bu modellemeler aynı zamanda *in vitro* verilerden yola çıkarak *in vivo* koşullar altında terapiye yön verme anlamında daha kapsamlı çalışmaların ortaya çıkmasında ve bu öncü çalışmaların geliştirebileceğini gösterme niteliğindedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] A. L. Mihaljevic, C. W. Michalski, H. Friess, and J. Kleeff, “Molecular mechanism of pancreatic cancer - Understanding proliferation, invasion, and metastasis,” *Langenbeck’s Arch. Surg.*, vol. 395, no. 4, pp. 295–308, 2010.
- [2] S. A. ElSayed and S. Mukherjee, *Physiology, Pancreas*. 2018.
- [3] R. H. Hruban, M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern, “Progression model for pancreatic cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 8, pp. 2969–2972, 2000.
- [4] R. E. Wilentz *et al.*, “Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 7, pp. 2002–2006, 2000.
- [5] R. H. Hruban, M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern, “Progression model for pancreatic cancer,” *Clinical Cancer Research*. 2000.
- [6] E. G. Dumlu, D. Karakoç, and A. Özdemir, “Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: Current perspectives,” *Int. Surg.*, vol. 100, no. 6, pp. 1060–1068, 2015.
- [7] T. P. Zanto, K. Hennigan, M. Östberg, W. C. Clapp, and A. Gazzaley, “NIH Public Access,” vol. 46, no. 4, pp. 564–574, 2011.
- [8] T. Abe *et al.*, “Genome-wide allelotypes of familial pancreatic adenocarcinomas and familial and sporadic intraductal papillary mucinous neoplasms,” *Clin. Cancer Res.*, 2007.
- [9] S. Solomon, S. Das, R. Brand, and D. C. Whitcomb, “Inherited pancreatic cancer syndromes,” *Cancer Journal (United States)*. 2012.
- [10] A. P. Klein, “Genetic susceptibility to pancreatic cancer,” *Mol. Carcinog.*, 2012.
- [11] M. Lambe, S. Eloranta, A. Wigertz, and P. Blomqvist, “Pancreatic cancer; reporting and long-term survival in Sweden,” *Acta Oncol. (Madr.)*, 2011.
- [12] J. Ferlay *et al.*, “Global Cancer Observatory: Cancer Today.,” *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.*, 2018. .
- [13] M. Ilic and I. Ilic, “Epidemiology of pancreatic cancer,” *World Journal of Gastroenterology*. 2016.
- [14] 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.*, 2018.
- [15] W. Weiss and M. A. Benarde, “The temporal relation between cigarette smoking and pancreatic cancer,” *Am. J. Public Health*, 1983.
- [16] M. Ezzati, S. J. Henley, A. D. Lopez, and M. J. Thun, “Role of smoking in global

- and regional cancer epidemiology: Current patterns and data needs,” *Int. J. Cancer*, 2005.
- [17] K. Helvacı, Ü. Üyetürk, Ö. Sönmez, İ. Türker, and Ü. Yalçıntaş Arslan, “Evaluation Of Demographic And Clinicopathological Characteristics Of Panreatic Adenocarcinoma Patients,” *Acta Oncol. Turc.*, 2016.
 - [18] P. Rawla, T. Sunkara, and V. Gaduputi, “Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors,” *World J. Oncol.*, 2019.
 - [19] S. Midha, S. Chawla, and P. K. Garg, “Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review,” *Cancer Letters*. 2016.
 - [20] M. Alavanja *et al.*, “Tobacco smoke and involuntary smoking,” in *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 2004.
 - [21] A. Vrieling *et al.*, “Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition,” *Int. J. Cancer*, 2010.
 - [22] F. Rahman, M. Cotterchio, S. P. Cleary, and S. Gallinger, “Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: A case-control study,” *PLoS One*, 2015.
 - [23] E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond, and M. J. Thun, “Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. Adults,” *N. Engl. J. Med.*, 2003.
 - [24] A. J. Beaney, P. J. R. Banim, R. Luben, M. A. H. Lentjes, K. T. Khaw, and A. R. Hart, “Higher meat intake is positively associated with higher risk of developing pancreatic cancer in an age-dependent manner and are modified by plasma antioxidants: A prospective cohort study (EPIC-Norfolk) using data from food diaries,” *Pancreas*. 2017.
 - [25] G. G. Schwartz and I. M. Reis, “Is cadmium a cause of human pancreatic cancer?,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2000.
 - [26] G. Bertin and D. Averbeck, “Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review),” *Biochimie*, 2006.
 - [27] C. K. (eds). Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, “SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute,” *SEER Cancer Stat. Rev. 1975-2013, Natl. Cancer Institute. Bethesda, MD*, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based Novemb. 2015 SEER data submission, posted to SEER web site, April 2016., 2016.
 - [28] D. Yadav and A. B. Lowenfels, “The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer,” *Gastroenterology*, 2013.

- [29] D. Li, H. Tang, M. M. Hassan, E. A. Holly, P. M. Bracci, and D. T. Silverman, "Diabetes and risk of pancreatic cancer: A pooled analysis of three large case-control studies," *Cancer Causes Control*, 2011.
- [30] K. F. Liao, S. W. Lai, C. I. Li, and W. C. Chen, "Diabetes mellitus correlates with increased risk of pancreatic cancer: A population-based cohort study in Taiwan," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012.
- [31] C. Bosetti *et al.*, "Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium," *Ann. Oncol.*, 2014.
- [32] D. M. Parkin, L. Boyd, and L. C. Walker, "The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010," *Br. J. Cancer*, 2011.
- [33] A. P. Klein *et al.*, "Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds," *Cancer Res.*, 2004.
- [34] J. Benzel and V. Fendrich, "Familial pancreatic cancer," *Oncol. Res. Treat.*, 2018.
- [35] P. Ghiorzo, "Genetic predisposition to pancreatic cancer," *World Journal of Gastroenterology*. 2014.
- [36] C. Shi, J. A. Daniels, and R. H. Hruban, "Molecular characterization of pancreatic neoplasms," *Advances in Anatomic Pathology*. 2008.
- [37] B. Etemad and D. C. Whitcomb, "Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments," *Gastroenterology*, 2001.
- [38] M. P. Di Magliano and C. D. Logsdon, "Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression," *Gastroenterology*, 2013.
- [39] K. L. Bryant, J. D. Mancias, A. C. Kimmelman, and C. J. Der, "KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation," *Trends in Biochemical Sciences*. 2014.
- [40] I. Regel *et al.*, "Energy metabolism and proliferation in pancreatic carcinogenesis," *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2012.
- [41] N. Rivlin, R. Brosh, M. Oren, and V. Rotter, "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis," *Genes and Cancer*. 2011.
- [42] M. G. GÜLSAR *et al.*, "Tümörögenezde P53Geni VeGenetikTedavi Yaklaşımlari," *Mühendislik Bilim. ve Tasarım Derg.*, vol. 4, no. 2, p. 133, 2016.
- [43] G. Khemlina, S. Ikeda, and R. Kurzrock, "Molecular landscape of prostate cancer: Implications for current clinical trials," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 41, no. 9, pp. 761–766, 2015.
- [44] A. a Sablina, A. V Budanov, G. V Ilyinskaya, S. Larissa, J. E. Kravchenko, and P. M. Chumakov, "The antioxidant function of the p53 tumor suppressor Anna," *Nat Med*, vol. 11, no. 12, pp. 1306–1313, 2005.

- [45] C. J. Sherr and F. McCormick, "The RB and p53 pathways in cancer," *Cancer Cell*. 2002.
- [46] S. Weissmueller *et al.*, "Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor β signaling," *Cell*, 2014.
- [47] S. Phin, M. W. Moore, and P. D. Cotter, "Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer," *Front. Oncol.*, 2013.
- [48] H. Wang *et al.*, "Loss of phosphatase and tensin homolog expression is associated with recurrence and poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma," *Hum. Pathol.*, 2013.
- [49] I. Foster, "Cancer: A cell cycle defect," *Radiography*. 2008.
- [50] B. Jingwen, L. Yaochen, and Z. Guojun, "Cell cycle regulation and anticancer drug discovery," *Cancer Biol. Med.*, 2017.
- [51] B. García-Reyes *et al.*, "The emerging role of cyclin-dependent kinases (CDKs) in pancreatic ductal adenocarcinoma," *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
- [52] M. E. Law, P. E. Corsino, S. Narayan, and B. K. Law, "Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer therapeutics," *Mol. Pharmacol.*, 2015.
- [53] E. A. Musgrove, C. E. Caldon, J. Barraclough, A. Stone, and R. L. Sutherland, "Cyclin D as a therapeutic target in cancer," *Nature Reviews Cancer*. 2011.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] T. K. Eggersmann, T. Degenhardt, O. Gluz, R. Wuerstlein, and N. Harbeck, "CDK4/6 Inhibitors Expand the Therapeutic Options in Breast Cancer: Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib," *BioDrugs*, vol. 33, no. 2, pp. 125–135, 2019.
- [57] M. O. Frederick *et al.*, "Abemaciclib is Active in Preclinical Models of Ewing's Sarcoma via Multi-pronged Regulation of Cell Cycle, DNA Methylation, and Interferon Pathway Signaling," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 151–161, 2018.
- [58] A. S. Clark *et al.*, "Palbociclib (PD0332991) - A selective and potent cyclin-dependent kinase inhibitor: A review of pharmacodynamics and clinical development," *JAMA Oncol.*, vol. 2, no. 2, pp. 253–260, 2016.
- [59] D. A. Schaer *et al.*, "The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade," *Cell Rep.*, vol. 22, no. 11, pp. 2978–2994, 2018.

- [60] A. Lambert *et al.*, “An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma,” *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2019.
- [61] T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi, and D. S. Peeper, “The essence of senescence,” *Genes and Development*. 2010.
- [62] R. Salama, M. Sadaie, M. Hoare, and M. Narita, “Cellular senescence and its effector programs,” *Genes and Development*. 2014.
- [63] V. Gire and V. Dulic, “Senescence from G2 arrest, revisited,” *Cell Cycle*. 2015.
- [64] F. A. Mallette, M. F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre, “The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence,” *Genes Dev.*, 2007.
- [65] R. E. Verdun, L. Crabbe, C. Haggbloom, and J. Karlseder, “Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle,” *Mol. Cell*, 2005.
- [66] O. V. Leontieva, F. Lenzo, Z. N. Demidenko, and M. V. Blagosklonny, “Hyper-mitogenic drive coexists with mitotic incompetence in senescent cells,” *Cell Cycle*, 2012.
- [67] M. V. Blagosklonny, “Cell cycle arrest is not senescence,” *Aging*. 2011.
- [68] M. Collado, M. A. Blasco, and M. Serrano, “Cellular Senescence in Cancer and Aging,” *Cell*. 2007.
- [69] M. I. Canto *et al.*, “International cancer of the pancreas screening (CAPS) consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer,” *Gut*, 2013.
- [70] D. Oguz, “Pankreas: Tani ve Tedavide Endoskopik Yaklasimler,” *Türk Radyoloji Semin.*, 2019.
- [71] K. Unger *et al.*, “Metabolomics based predictive classifier for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Oncotarget*, 2018.
- [72] H. Sistem and P. Hastal, “2825Sp,” pp. 215–230, 2002.
- [73] A. McGuigan, P. Kelly, R. C. Turkington, C. Jones, H. G. Coleman, and R. S. McCain, “Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes,” *World Journal of Gastroenterology*. 2018.
- [74] V. Göral, “Pankreas Kanseri : Patogenez ve Tanı,” *1. Göral V. Pankreas Kanseri Patog. ve Tanı. (Tablo 2)*407-414., no. Tablo 2, pp. 407–414.
- [75] 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.
- [76] P. Toren and A. Zoubeidi, “Targeting the PI3K / Akt pathway in prostate cancer : Challenges and opportunities (Review),” pp. 1793–1801, 2014.

- [77] T. F. Franke, C. P. Hornik, L. Segev, G. A. Shostak, and C. Sugimoto, "PI3K / Akt and apoptosis : size matters," pp. 8983–8998, 2003.
- [78] C. Porta, C. Paglino, and A. Mosca, "Targeting PI3K / Akt / mTOR signaling in cancer," vol. 4, no. April, pp. 1–11, 2014.
- [79] A. M. Arsham and T. P. Neufeld, "Thinking globally and acting locally with TOR," *Current Opinion in Cell Biology*. 2006.
- [80] T. Nishimoto, "Upstream and downstream of GTPase.," *Biol. Chem.*, vol. 381, no. 5–6, pp. 397–405, 2004.
- [81] D. A. Guertin and D. M. Sabatini, "Defining the Role of mTOR in Cancer," *Cancer Cell*. 2007.
- [82] W. J. Oh and E. Jacinto, "mTOR complex 2 signaling and functions," *Cell Cycle*. 2011.
- [83] X. Xu, L. Ye, K. Araki, and R. Ahmed, "MTOR, linking metabolism and immunity," *Seminars in Immunology*. 2012.
- [84] B. M. Emerling and A. Akcakanat, "Targeting PI3K/mTOR signaling in cancer," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 24, pp. 7351–7359, 2011.
- [85] C. Frezza *et al.*, "Metabolic profiling of hypoxic cells revealed a catabolic signature required for cell survival," *PLoS One*, 2011.
- [86] C. KİSMİROĞLU, S. CENGİZ, and M. YAMAN, "AMPK'nin Biyokimyası: Etki Mekanizmaları ve Diyabetin Tedavisindeki Önemi," *Eur. J. Sci. Technol.*, 2020.
- [87] H. M. O'Neill, "AMPK and exercise: Glucose uptake and insulin sensitivity," *Diabetes and Metabolism Journal*. 2013.
- [88] B. Xiao *et al.*, "Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP," *Nature*, 2011.
- [89] T. Kim, J. Davis, A. J. Zhang, X. He, and S. T. Mathews, "Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009.
- [90] S. M. Jeon, "Regulation and function of AMPK in physiology and diseases," *Experimental & molecular medicine*. 2016.
- [91] T. D. Calamaras, C. Lee, F. Lan, Y. Ido, D. A. Siwik, and W. S. Colucci, "Post-translational modification of serine/threonine kinase LKB1 via adduction of the reactive lipid species 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) at lysine residue 97 directly inhibits kinase activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 50, pp. 42400–42406, 2012.
- [92] M. M. Mihaylova and R. J. Shaw, "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism," *Nature Cell Biology*. 2011.

- [93] S. Hoppe *et al.*, “AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009.
- [94] M. Kosztelnik *et al.*, “Suppression of AMPK/aak-2 by NRF2/SKN-1 downregulates autophagy during prolonged oxidative stress,” *FASEB J.*, 2019.
- [95] Q. Wang, S. Liu, A. Zhai, B. Zhang, and G. Tian, “AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation,” *Biol. Pharm. Bull.*, 2018.
- [96] H. Okada and T. W. Mak, “Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells,” *Nature Reviews Cancer*. 2004.
- [97] R. Hamacher, R. M. Schmid, D. Saur, and G. Schneider, “Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Molecular Cancer*. 2008.
- [98] D. C. Spierings *et al.*, “Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors,” *J. Histochem. Cytochem.*, 2004.
- [99] G. Coşkun and H. Özgür, “Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması,” *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, 2014.
- [100] S. Von Karstedt, A. Montinaro, and H. Walczak, “Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy,” *Nature Reviews Cancer*. 2017.
- [101] B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, and J. H. Kim, “Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey,” *Blood*. 2012.
- [102] M. A. O’Brien and R. Kirby, “Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease,” *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2008.
- [103] L. Galluzzi *et al.*, “Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018,” *Cell Death and Differentiation*. 2018.
- [104] A. Kondratskyi, K. Kondratska, R. Skryma, and N. Prevarskaya, “Ion channels in the regulation of apoptosis,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2015.
- [105] P. Codogno and A. J. Meijer, “Autophagy and signaling: Their role in cell survival and cell death,” *Cell Death and Differentiation*. 2005.
- [106] D. Öz Arslan, D. Oz Arslan, G. Korkmaz, G. Korkmaz, D. Gözüaçık, and D. Gozuacik, “Autophagy: a cellular stres and a cell death mechanism (Otofaji: bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması),” *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.*, 2011.
- [107] G. Juhász *et al.*, “The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*,” *J. Cell Biol.*, 2008.
- [108] D. Papinski and C. Kraft, “Atg1 kinase organizes autophagosome formation by phosphorylating Atg9,” *Autophagy*, 2014.

- [109] G. Xiao, “Autophagy and NF- κ B: Fight for fate,” *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2007.
- [110] A. L. Anding and E. H. Bachrecke, “Autophagy in cell life and cell death,” in *Current Topics in Developmental Biology*, 2015.
- [111] Y. X. Du, Z. W. Liu, L. You, W. M. Wu, and Y. P. Zhao, “Advances in understanding the molecular mechanism of pancreatic cancer metastasis,” *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*. 2016.
- [112] J. D. Maust, C. L. Frankowski-McGregor, A. Bankhead, D. M. Simeone, and J. S. Sebolt-Leopold, “Cyclooxygenase-2 influences response to cotargeting of MEK and CDK4/6 in a subpopulation of pancreatic cancers,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 17, no. 12, pp. 2495–2506, 2018.
- [113] B. García-Reyes *et al.*, “The emerging role of cyclin-dependent kinases (CDKs) in pancreatic ductal adenocarcinoma,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 10, pp. 9–11, 2018.
- [114] A. Chou *et al.*, “Tailored first-line and second-line CDK4-targeting treatment combinations in mouse models of pancreatic cancer,” *Gut*, vol. 67, no. 12, pp. 2142–2155, 2018.
- [115] C. Y. Liu *et al.*, “Combination of palbociclib with enzalutamide shows in vitro activity in RB proficient and androgen receptor positive triple negative breast cancer cells,” *PLoS One*, 2017.
- [116] 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.
- [117] T. Dhir *et al.*, “Abemaciclib is effective against pancreatic cancer cells and synergizes with HuR and YAP1 inhibition,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 17, no. 10, pp. 2029–2041, 2019.
- [118] P. Li, X. Zhang, L. Gu, J. Zhou, and D. Deng, “P16 methylation increases the sensitivity of cancer cells to the CDK4/6 inhibitor palbociclib,” *PLoS One*, vol. 14, no. 10, pp. 1–14, 2019.
- [119] D. E. Modrak, E. Leon, D. M. Goldenberg, and D. V. Gold, “Ceramide regulates gemcitabine-induced senescence and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines,” *Mol. Cancer Res.*, 2009.
- [120] S. Naz *et al.*, “Abemaciclib, a selective CDK4/6 inhibitor, enhances the radiosensitivity of non-small cell lung cancer in vitro and in vivo,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 16, pp. 3994–4005, 2018.
- [121] E. S. Kim *et al.*, “Abemaciclib in combination with single-agent options in patients with stage IV non-small cell lung cancer: A phase Ib study,” *Clin. Cancer Res.*, 2018.

- [122] N. Hay, “Interplay between FOXO, TOR, and Akt,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2011.
- [123] K. Petrossian *et al.*, “ER α -mediated cell cycle progression is an important requisite for CDK4/6 inhibitor response in HR+ breast cancer,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 45. pp. 27736–27751, 2018.
- [124] 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.
- [125] D. Cretella *et al.*, “The anti-tumor efficacy of CDK4/6 inhibition is enhanced by the combination with PI3K/AKT/mTOR inhibitors through impairment of glucose metabolism in TNBC cells,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–12, 2018.
- [126] 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.
- [127] S. Korur *et al.*, “GSK3 β Regulates Differentiation and Growth Arrest in Glioblastoma,” *PLoS One*, 2009.
- [128] H. R. Gwak, Y. Kim, H. An, D. N. Dhanasekaran, and Y. S. Song, “Metformin induces degradation of cyclin D1 via AMPK/GSK3 β axis in ovarian cancer,” *Mol. Carcinog.*, vol. 56, no. 2, pp. 349–358, 2017.
- [129] D. Jin, N. Tran, N. Thomas, and D. D. Tran, “Combining CDK4/6 inhibitors ribociclib and palbociclib with cytotoxic agents does not enhance cytotoxicity,” *PLoS One*, vol. 14, no. 10, pp. 1–17, 2019.
- [130] 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.
- [131] 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.
- [132] T. Ozaki and A. Nakagawara, “Role of p53 in cell death and human cancers,” *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 994–1013, 2011.
- [133] N. Herranz and J. Gil, “Mechanisms and functions of cellular senescence,” *Journal of Clinical Investigation*. 2018.
- [134] P. Rajendran *et al.*, “Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases,” *Journal of Cellular Physiology*. 2019.
- [135] C. Shao *et al.*, “Inflammatory and Senescent Phenotype of Pancreatic Stellate Cells Induced by Sqstm1 Downregulation Facilitates Pancreatic Cancer Progression,” *Int. J. Biol. Sci.*, 2019.
- [136] K. Chen *et al.*, “Loss of AMPK activation promotes the invasion and metastasis of pancreatic cancer through an HSF1-dependent pathway,” *Mol. Oncol.*, 2017.

- [137] D. G. Hardie, F. A. Ross, and S. A. Hawley, “AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012.
- [138] M. P. Sajan *et al.*, “AICAR and metformin, but not exercise, increase muscle glucose transport through AMPK-, ERK-, and PDK1-dependent activation of atypical PKC,” *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, 2010.
- [139] 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.
- [140] D. B. Shackelford and R. J. Shaw, “The LKB1-AMPK pathway: Metabolism and growth control in tumour suppression,” *Nature Reviews Cancer*. 2009.
- [141] W. W. Feng and M. Kurokawa, “Lipid metabolic reprogramming as an emerging mechanism of resistance to kinase inhibitors in breast cancer,” *Cancer Drug Resist.*, 2019.
- [142] K. Tachibana, D. Yamasaki, K. Ishimoto, and T. Doi, “The role of PPARs in cancer,” *PPAR Research*. 2008.
- [143] L. Fajas and I. C. Lopez-Mejia, “CDK4, a new metabolic sensor that antagonizes AMPK,” *Molecular and Cellular Oncology*. 2018.
- [144] A. Bort, B. G. Sánchez, I. de Miguel, P. A. Mateos-Gómez, and I. Diaz-Laviada, “Dysregulated lipid metabolism in hepatocellular carcinoma cancer stem cells,” *Mol. Biol. Rep.*, 2020.

6. EKLER

6.1. EK A: Cihazlar

Tablo 6.1. Kullanılan cihazlar listesi.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Santrüfj	5417R	Eppendorf
Santrifj (Bjyjk)	5810R	Eppendorf
Spin minispin plus	SN0708	LabNet
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5 µl-10 µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20 µl-200 µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200 µl-1000 µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Njve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu (-80 °C)	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Njve
Nanodrop		BO-GA
Gjç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkjbator	Heracell 150	Thermo
Fluoresan Mikroskopu	Model: 1X71	Olympus
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV

Elektroforez Aletleri		BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
Santrifüj	NF 200	Nüve
DRY BATH İNKÜBATÖR	010410-1109-0157	Bio San
Kuru Blok Isıtıcı		BO-GA
Dondurucu (-20 °C)		Arçelik

6.2. EK B: Hücre Kültürü Donanımları

Tablo 6.2 Hücre doku kültüründe kullanılan malzemeler

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
25 santimetrekarelik hücre büyütme kapları	90026	TPP
75 santimetrekarelik hücre büyütme kapları	90076	TPP
Steril pipetler (5 ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10 ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0,22µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
RPMI 1640	PO4-18947	PAN BIOTECH
DMEM		PAN-BIOTECH
Hemositometre		Neubauer

6.3. EK C: Kimyasal Malzemeler

Tablo 6.3. Kullanılan kimyasal maddelerin listesi.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Palbociclib (PD-0332991)		SelleckChem
Abemaciclib (LY-2835219)		SelleckChem
PVDF Membran (0,45 µm)	10600023	Amersham
PVDF Membran (0,20 µm)	10600021	Amersham
TEMED	A1148,0100	Appllichem
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
Amonyum persülfat	A2941	Appllichem
Coomassie Blue	A3480	Appllichem
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptoetanol	S4805940 517	MERCK
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
DiOC6	2129966	Fluka
DAPI	D9542-5MG	SIGMA-ALDRICH
PI	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Acridine Orange		
DCFH-DA	C6827	Invitrogen
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
SDS	UN1 888	Appllichem

PBS	BE17-51-5F	LONZA
Tris-HCL	648317	CALBIOCHEM
BSA	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
Akrilamid/Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
Glisin	3570	CALBIOCHEM
Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
Ponceau Red	A1405	Applichem
HCL	K438047117 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Çamaşır suyu		ACE
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Bakır sülfat	02791	MERCK
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Super Block T20	37536	Thermo
Tripan mavisi		

6.4. EK D: Kullanılan Antikor ve Kitler

Tablo 6.4. İmmunoblotlama yönteminde kullanılan antikorlar ve kitlerin listesi.

ÜRÜN ADI	KATALOG NUMARASI	FİRMA ADI
PathScan® Phospho Rb (Ser807/811) Sandwich ELISA Kit	7959	Cell Signaling Technology
CDK4	12790	Cell Signaling Technology

CDK6	13331	Cell Signaling Technology
P21 Waf1/Cip1	2947	Cell Signaling Technology
p-Rb (Ser807/811)	8516	Cell Signaling Technology
c-Myc	5605	Cell Signaling Technology
PI3K		Cell Signaling Technology
p-PTEN	9549	Cell Signaling Technology
p-PDK1		Cell Signaling Technology
AKT	9272	Cell Signaling Technology
p-AKT (ser453)	9271	Cell Signaling Technology
p-GSK3 β (Ser9)	9315	Cell Signaling Technology
AMPK	5831	Cell Signaling Technology
p-AMPK (Thr172)	2535	Cell Signaling Technology
p-AMPK β 1	4178	Cell Signaling Technology
mTOR	2983	Cell Signaling Technology
p-mTOR (ser2448)	5536	Cell Signaling Technology
p-p70S6K (Thhr389)	9208	Cell Signaling Technology
Raptor	2280	Cell Signaling Technology
ACLY	4332	Cell Signaling Technology
p-ACLY (Ser455)	4331	Cell Signaling Technology
ACC	3676	Cell Signaling Technology
p-ACC (Ser79)	11818	Cell Signaling Technology

FASN	3180	Cell Signaling Technology
PPAR γ		Cell Signaling Technology
Lipin-1	5195	Cell Signaling Technology
Fumarase		Cell Signaling Technology
ULK1	6439	Cell Signaling Technology
Beclin-1	3495	Cell Signaling Technology
p-Beclin1		Cell Signaling Technology
P62 (SQSTM1)	39749	Cell Signaling Technology
Bax	2772	Cell Signaling Technology
Kaspaz 3	9661	Cell Signaling Technology
Kaspaz 9	9502	Cell Signaling Technology
Kesilmiş PARP	9541	Cell Signaling Technology
β -aktin	2772	Cell Signaling Technology
β -tubulin	2146	Cell Signaling Technology

6.5. EK E: Çözeltiler

10 X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), (pH 7,4) 1L için:

Sodyum Klorür (NaCl)	80,0 gr
Potasyum klorür KCl	2,0 gr
Disodyum hidrojen fostat (Na_2HPO_4)	14,4 gr
Mono potasyum fosfat (KH_2PO_4)	2,4gr
Distile su (dH_2O)	1000ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek Ph 7,4'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi distile su kullanılarak 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1 X olarak kullanılır.

Hücre Dondurma Medyası:

10 mL için;

9 mL Fetal sığır serumu (FBS) ve 1 mL Dimetil sülfoksit (DMSO) hazırlanır. Hazırlanan bu medya 0,22 ml'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20 °C'de muhafaza edilir.

Hücre Lizis Tamponu (CLB):

10 mL için;

M-PER™ Memeli protein ekstraksiyon solüsyonuna 1 tablet Roche PhosTOP fosfataz inhibitör kokteyli eklenir.

p-CLB:

10 mL için;

M-PER™ Memeli protein ekstraksiyon solüsyonuna 1 tablet Roche PhosTOP fosfataz inhibitör kokteyli ve Roche Proteaz inhibitör (PI) kokteyli eklenir. Eppendorflara 1 er mL olacak şekilde alıkuatlama yapılır.

Hazırlanan CLB +4 °C’de muhafaza edilir.

% 70 Etanol: 100 ml

70 ml saf etanol ile 30 ml distile su karıştırılarak hazırlanır.

Yağsız süt tozu (% 5): 50 ml

2,5 g süt tozunun üzerine 50 ml olacak şekilde TBS-T ile tamamlanır.

0,5 M Tris-HCl (pH 6.8): 100 ml

60 ml distile suda 6 g’lık Tris bazını çözüldükten sonra pH’sı 6.8’e ayarlanır. Daha sonra distile su ile 100 ml’ye tamamlandıktan sonra otoklavlanır ve steril olarak saklanır.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 150 ml

80 ml distile su içerisinde 27,23 g Tris bazı çözüldükten sonra pH’sı 8,8’e ayarlanır, üzerine 150 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır. Daha sonra otoklava atılır steril olarak saklanır.

10X TBS Hazırlanışı

86,6 g NaCl, 12,11 g Tris-Baz konulur pH: 8 e ayarlandıktan sonra üzerine 1000 ml olacak şekilde distile suyla tamamlanır.

ÖZGEÇMİŞ



1.Adı Soyadı: Merve Nur ÇOBAN

İletişim Bilgileri:

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

Telefon: 0535 084 44 74

E-posta: mervenurcobann@gmail.com

2. Doğum Tarihi: 01.01.1995

3. Ünvanı: Yüksek Lisans Öğrencisi

4. Öğrenim Durumu:

DERECE	ALAN	ÜNİVERSİTE	YIL
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014-2018
Lisans/Yandal	Matematik-Bilgisayar	İstanbul Kültür Üniversitesi	2015-2017
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2018-2020

5. Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Yayımlanan Bildiriler

1. **M. Çoban**, B. Sevgin, K. Senturk, E. D. Arisan, O. Rencuzogullari, P. Ozfiliz, P. Obakan-Yerlikaya, A. Coker-Gurkan, N. Palavan-Unsal ‘Celastrol’ün Prostat Kanseri Hücrelerinde PI3K/AKT Sinyal Yolağı İle İlişkili Olarak Epitelyal-Mezenkimal Hücre Tranzisyonu Üzerine Etkisi.’ 6. Kök Hücre Sempozyumu, 5 – 6 Mayıs 2017, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye (Poster Sunumu: **M. Çoban**, B. Sevgin, K. Senturk).
2. Elif Damla ARISAN, **Mervener Çoban**, Börteçine Sevgin, Esra Nebiler, Sahra Aras, Özge Rencüzoğulları, Pelin Özfiliz Kılbaş, Pınar Obakan Yerlikaya, Ajda Çoker Gürkan, Narçin Palavan-Ünsal ‘Kanser hücrelerinde FASN hedefli terapötik stratejilerin hücre sağ kalım ve ölüm sinyal yolları açısından incelenmesi’. 2.Moleküler Kanser Zirvesi, 23-24 Mart 2019, İstinye Üniversitesi, İstanbul, Türkiye (Sözlü Bildiri: Elif Damla Arisan)
3. **Merve Nur Coban***, BortecineSevgin, PinarObakanYerlikaya, Ajda CokerGurkan, NarcinPalavanÜnsal, Elif Damla Arisan ‘CDK4/6 Inhibitors Modulate PI3K/AKT/mTOR and AMPK Signalling to Alter Lipid Metabolism in PANC-1 Pancreatic Cancer Cell Line’. Cell Death-Degeneration and Regeneration Symposium 3-5 October 2019, Basibuyuk Campus at Marmara University, Istanbul, Turkey (Poster Sunumu: **Merve Nur Çoban**)
4. Bortecine Sevgin*, **Merve Nur Coban**, Pinar Obakan Yerlikaya, Ajda Coker Gurkan, Narcin Palavan Ünsal, Elif Damla Arisan ‘Increased senescence and G1 cell cycle arrest determines AMPK mediated therapeutic responses in MIAPaCa-2 pancreatic cells against CDK4/6 inhibitors’ Cell Death-Degeneration and Regeneration Symposium 3-5 October 2019, Basibuyuk Campus at Marmara University, Istanbul, Turkey (Poster Sunumu: Börteçine Sevgin)
5. Ebrar Karakaya*, Nida Ceren Usanmaz*, Bortecine Sevgin, **Merve Nur Coban**, Pinar Obakan Yerlikaya, Ajda Coker Gurkan, 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 Symposium 3-5 October 2019, Basibuyuk Campus at Marmara University, Istanbul, Turkey (Poster Sunumu: Ebrar Karakaya, Nida Ceren Usanmaz)

6. Ulusal & Uluslararası Projeler

Celastrol'un LNCaP, DU145 ve PC3 Prostat Kanseri hücre hatlarında PI3K/AKT/mTOR Sinyol yolu üzerinde terapötik etkisinin incelenmesi (*İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı, Bitirme Tezi Çalışması 2016-2018, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN*)

Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında CDK4/6 İnhibitörleri palbociclib ve abemaciclib'in AMPK'nın etkileşimde olduğu üst ve alt sinyal yolları ilişkili global protein ve lipid profilleri üzerine etkisinin araştırılması (*TÜBİTAK 1001; Proje No:118 Z 100 2018-2021, Bursiyer*)

PANC-1 ve Panc10.05 Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Palbociclib ve Abemaciclib Uygulamasıyla PI3K/AKT/mTOR ve AMPK Sinyal Ekseninin İncelenmesi (*Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı, 2018-2010, Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA*)

7. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

1.Elif Damla Arisan^{a,b*}, Ozge Rencuzogullari^b, **Mervener Coban**^{b,1}, Bortecine Sevgin^{b,1}, Pinar Obakan Yerlikaya^b, Ajda Coker-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. Ödüller ve Burslar

1. **M. Coban***, B. Sevgin, P. Obakan-Yerlikaya, A. Coker- Gurkan, N. Palavan Unsal, E.D Arisan CDK4/6 Inhibitors Modulate PI3K/AKT/mTOR and AMPK Signaling to Alter Lipid Metabolism in PANC-1 Pancreatic Cell Line: First Best Poster Presentation in Cell Death: Degeneration and Regeneration Symposium, October 2019, Marmara University, GEMHAM, Istanbul, Turkey (**Poster Sunumu: M. Çoban**).

2. Sharjah (BAE) AUS New Venture Challenge, Semi Finalist-Team worker (DAPGenomics), American University of Sharjah, February 2019
3. TUBİTAK, 1001 Araştırma Projesi, Bursiyer (2018-2021)

9. Çalışma ve Araştırma Deneyimleri

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

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

İstanbul Üniversitesi, Çapa Tıp Fakültesi, Aziz Sancar Deneysel Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim dalı, Yaz Stajı- **03.07.2017-28.07.2017**

10. Sertifikalar

En iyi poster sunumu birincilik sertifikası- Marmara Üniversitesi

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

11. Etkinlikler

E. D. Arisan, A. Coker-Gürkan ve Pinar 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)

12. Katıldığı Bilimsel Ulusal ve Uluslararası Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

2014	2nd Meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, 19-20 Aralık 2014, İstanbul-Türkiye
2015	International ITU Molecular Biology and Genetics Student Congress (2-4 Ekim 2015), İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
2015	I.Adli Bilimler Sempozyumu, 7 Mart 2015, Haliç Üniversitesi, İstanbul Türkiye
2015	I.Kök Hücre Sempozyumu, 18 Nisan, 2015, Haliç Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
2015	Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar”, 18 Aralık 2015, İstanbul Kültür Üniversitesi, İstanbul-Türkiye
2016	Mesleğim ve Kariyerim Semineri”, IEEE Öğrenci Kulübü
2016	XIIIth IUGEN International Molecular Biology and Genetics Students Winter School”, İstanbul Üniversitesi
2016	Bilimsel Düşünce ve Etik/Molerite İlişkisi, İstanbul Kültür Üniversitesi
2016	Tüp Bebek (IVF) Kariyer Günü”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 2 Mayıs 2016
2016	II. Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar”, İstanbul Kültür Üniversitesi, 9 Aralık 2016
2017	VI. Kök Hücre Sempozyumu”, Marmara Üniversitesi –5-6 Mayıs 2017
2019	’Career Lab’19”, Koç Üniversitesi (AICHe), 16-17 Mart 2019
2019	’Cell Death: Degeneration and Regeneration Symposium”, Marmara University,3-4 October 2019