



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji

[Yüksek Lisans Tezi]

**PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA OTOFAJİ İLİŞKİLİ VPS34
İNİHİTÖRÜNÜN WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN
İNCELENMESİ**

Vera AVCI
ORCID: 0000-0003-2265-1616

Danışman
PROF.DR. Hasibe VURAL
ORCID: 0000-0003-2564-7807

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 23YL18006 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2024



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteği, güveni ve paha biçilemez rehberliği ile hep yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Hasibe VURAL'a

Bilgi ve birikimleriyle desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hatice Gül DURSUN ve Prof. Dr. Ercan KURAR'a

Akademik sürecim boyunca bana yol gösteren, bilgisi ve uzmanlığıyla desteğini hep hissettiğim Doç. Dr. Ebru GÜÇLÜ'ye

Eğitim ve araştırma süreçlerimde karşılaştığım zorluklarda gösterdiği hem akademik desteği hem de psikolojik desteğiyle yanımda olan Doç. Dr. İlknur ÇINAR AYAN'a

Bu süreçte desteğini ve katkısını esirgemeyen Doç. Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ'e,

Araştırmamı 23YL18006 proje numarası ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Motivasyon kaynağım olan ve hayatımı güzelleştiren arkadaşlarıma ve hep yanımda olduğunu bildiğim, desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

En içten şükranlarımı sunmak isterim.

Vera AVCI

NİSAN 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI.....	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pankreasın yapısı ve özellikleri.....	3
2.2. Pankreas Kanseri	4
2.2.1. PDAK'nın epidemiyolojisi ve risk faktörleri	5
2.2.2. PDAK'nın moleküler patogenezi	9
2.2.3. PDAK'nın Belirtileri, Tanısı ve Evrelendirmesi.....	10
2.2.4. PDAK'nın tedavisi	12
2.3 Otofaji.....	13
2.3.1. VPS34.....	17
2.4. Wnt/ β -katenin.....	17
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Hücre Kültürü.....	21
3.1.1 Hücre hattının dondurulması	21
3.1.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözündürülmesi	21
3.1.3. Hücre hattının pasajlanması	21
3.2. Autophinib stok solüsyonun hazırlanması	22
3.3. Sitotoksisite analizi	22
3.4. Koloni formasyon analizi	22
3.5. Otofaji analizi	23
3.6. Apoptoz analizi	23
3.7. Otofaji, Wnt/ β -katenin ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	24
3.7.1. Hücre hatlarından total RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi.....	24
3.7.2. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi.....	24
3.7.3. cDNA sentezi	25
3.7.4. qRT-PZR	25

3.8. İstatiksel analizler.....	27
4.BULGULAR	29
4.1. Autophinib'in PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi	29
4.2. Autophinib uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkisi	30
4.3. Autophinib uygulamasının apoptotik aktivite üzerindeki etkisi	31
4.4. Autophinib uygulamasının pankreas kanseri hücrelerinde otofaji, Wnt/ β -katenin ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	32
5.TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
7. KAYNAKLAR.....	45
8. EKLER.....	57
8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı	57

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **VERA AVCI**'nin "**Pankreas Kanseri Hücre Hattında Otofaji İlişkili VPS34 İnhibitörünün Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı Üzerinden İncelenmesi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 26.04.2024

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Hasibe VURAL Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
Jüri Üyesi	Prof. Dr. H. Gül DURSUN Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Ebru GÜÇLÜ Yozgat Bozok Üniversitesi Kenevir Araştırmaları Enstitüsü Temel Bilimler ve Sağlık A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 08/05/2024 tarih ve 09/01 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL
Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Pankreas Kanseri Hücre Hattında Otofaji İlişkili VPS34 İnhibitörünün Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı Üzerinden İncelenmesi başlıklı tez çalışmamın toplam **31** sayfalık kısmına ilişkin, 26.04.2024 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **% 4** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

26.04.2024

Vera AVCI

Prof. Dr. Hasibe VURAL

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

26.04.2024

Vera AVCI

KISALTMALAR

AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AKT	: Protein kinaz B
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
APC	: Tümör baskılayıcı gen
ATG101	: Otofaji ile ilişkili 101
ATG12	: Otofaji ile ilişkili 12
ATG13	: Otofaji ile ilişkili protein 13
ATG14	: Otofaji ile ilişkili 14
ATG16	: Otofaji ile ilişkili 16
ATG3	: Otofaji ile ilişkili 3
ATG5	: Otofaji ile ilişkili 5
ATG7	: Otofaji ile ilişkili 7
Bcl-2	: BCL2 apoptoz düzenleyici
BRCA1/2	: Meme kanseri tip 1/2 duyarlılık proteini
BRPC	: Borderline Rezektabl Pankreas Kanseri
CA 19-9	: Karbonhidrat antijeni 19-9
CDKN2A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CMA	: Şaperon aracılı otofaji
CEA	: Karsinoembriyonik antijen
ÇKBT	: Çok kesitli bilgisayarlı tomografi
DM	: Diabetes mellitus
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMT2	: Diabetes mellitus tip 2
DVL1/2	: Dağınık segment polaritesi proteini 1/2
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
ER	: Endoplazmik retikulum
FIP200	: 200 kDa'lık fokal adezyon kinaz ailesi
GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1
IPMN	: İntraduktal papiller müsinoz neoplazm
KRAS	: Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu

LAPC	: Lokal Olarak İlerlemiş Pankreas Kanseri
LC3	: Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zinciri 3
LPS	: Lipopolisakkarit
LRP5/6	: LDL reseptörü ilişkili protein 5/6
MAPK	: Mitojenle etkileşen protein kinaz
MCN	: Müsinöz kistik neoplazm
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
mTORC1	: Rapamisin kinazın mekanik hedef proteini 1
PanIN	: Pankreatik intraepitelyal neoplazm
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDAC	: Pankreatik duktal adenokarsinom
PE	: Fosfatidiletanolaminin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PI3P	: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PIK3C3	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Tip 3
PK	: Pankreas kanseri
PP	: Pankreatik polipeptit
PRSS1	: Serin proteaz 1
qRT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SMA	: Superior mezenterik arter
SPINK1	: Serin peptidaz inhibitörü kazal tip 1
TME	: Tümör mikroçevresi
TP53	: Tümör proteini 53
ULK1	: UNC-51 benzeri kinaz
VPS15	: Fosfoinositid-3-Kinaz Düzenleyici Alt Birim 4
VPS34	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Tip 3

TABLolar LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Pankreas kanserinde yaygın olarak yer alan on iki yolak ve mutasyona uğrayan genler.....	10
Tablo 2.2 TNM tanımlamaları.....	12
Tablo 3.1. Otofaji ile ilişkili genler.....	26
Tablo 3.2. Wnt/ β -katenin ile ilişkili genler.....	26
Tablo 3.3. Apoptoz ve PDAK ile ilişkili genler.....	26



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Pankreasın anatomik yapısı.....	3
Şekil 2.2. Ekzokrin pankreas hücreleri (A) asiner ve kanal hücreleri (B).....	4
Şekil 2.3. Pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) öncü lezyonunda oluşan mutasyonlar ve pankreas hücrelerinin morfolojik olarak değişimi.....	9
Şekil 2.4. Otofajinin moleküler mekanizması.....	15
Şekil 2.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun moleküler mekanizması.....	18
Şekil 4.1. Autophinib uygulamasının MIA PaCa-2 hücre canlılığına etkisi.....	29
Şekil 4.2. Autophinib uygulamasının PANC-1 hücre canlılığına etkisi.....	29
Şekil 4.3. Autophinib uygulamasının A. MIA PaCa-2 ve B. PANC-1 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi (**p<0,001).....	30
Şekil 4.4. Autophinib uygulamasının MIA PaCa-2 hücrelerinde otofajik aktivite üzerine etkisi **p<0,01.....	31
Şekil 4.5. Autophinib uygulamasının PANC-1 hücrelerinde otofajik aktivite üzerine etkisi # p<0,0001.....	31
Şekil 4.6. Autophinib uygulamasının MIA PaCa-2 hücrelerinde apoptoz aktivite üzerindeki etkisi # p<0,0001.....	32
Şekil 4.7. Autophinib uygulamasının PANC-1 hücrelerinde apoptoz aktivite üzerindeki etkisi # p<0,0001.....	32
Şekil 4.8. PANC-1 hücre hattında 5 ve 10 μ M doz uygulamanın otofaji genleri üzerinde kat değişimi etkisi (# p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01).....	33
Şekil 4.9. MIA PaCa-2 hücre hattında 5 ve 10 μ M doz uygulamanın otofaji genleri üzerinde kat değişimi etkisi (# p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01).....	33

Şekil 4.10. PANC-1 hücre hattında 5 ve 10 µM doz uygulamanın Wnt/β-katenin yolağı genleri üzerinde kat değişimi etkisi (# p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).....	34
Şekil 4.11. MIA PaCa-2 hücre hattında 5 ve 10 µM doz uygulamanın Wnt/β-katenin yolağı genleri üzerinde kat değişimi etkisi (# p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).....	34
Şekil 4.12. PANC-1 hücre hattında 5 ve 10 µM doz uygulamanın apoptoz ve pankreas kanseri ilişkili genler üzerindeki kat değişimi etkisi (# p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05)...	35
Şekil 4.13. MIA PaCa-2 hücre hattında 5 ve 10 µM doz uygulamanın apoptoz ve pankreas kanseri ilişkili genler üzerindeki kat değişimi etkisi (# p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).....	35



ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji

[Yüksek Lisans Tezi]

PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA OTOFAJİ İLİŞKİLİ VPS34 İNHİBİTÖRÜNÜN WNT/ β -KATENİN SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN İNCELENMESİ

Vera AVCI

Konya-2024

Pankreas kanseri (PK) insidansı dünya çapında her yıl artmaktadır ve erken teşhisi oldukça zordur. Hastalığın gizli prognoz göstermesi, geç tanı konması ve kemoterapi/radyoterapi gibi tedavilere direnç oluşturması, pankreas kanserinin daha başarılı bir şekilde tedavisi ve erken teşhisi için yeni stratejilere acilen ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Kanserli hücrelerin tedavilere direnç geliştirmesinde, agresif form oluşturmasında ve yayılmasında etkili olduğu bilinen birçok moleküler mekanizma vardır ve bunlardan biri de otofajidir. Otofajinin kanserdeki rolü karmaşıktır ve tümör tipine veya içeriğine bağlı olarak değişebilir. Bunun yanında, pankreas kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde düzensizlik gösteren Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile otofaji arasındaki etkileşim farklı kanser türlerinde çalışılmıştır fakat moleküler mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada, insan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK) hücre hatları olarak PANC-1 ve MIA PaCa-2 kullanılmıştır. Otofaji düzensizliğinin altında yatan mekanizmaları daha net anlamak amacıyla otofajinin ana düzenleyicilerinden biri olan VPS34 hedeflenerek autophinib ile inhibe edilmiş, hücre canlılığına WST-8/CCK8 testi ile bakılmıştır. Otofajik aktivite LC3-II Kantitasyon ELISA kiti ile apoptotik aktivite ise Kaspaz-3 ELISA kiti ile analiz edilmiştir. Wnt/ β -katenin sinyal yolu arasındaki potansiyel etkileşimi araştırmak için qRT-PZR kullanılarak hedef genlerinin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Hücre canlılığı analizi ile sonraki deneylerde kullanılacak autophinib konsantrasyonu 48 saat için 5 ve 10 μ M olarak belirlenmiştir. LC3-II ELISA kiti testi sonucunda 5 ve 10 μ M doz grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında otofajik aktivitede anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Kaspaz-3 ELISA testi sonuçlarında ise doz gruplarında anlamlı bir apoptotik aktivite artışı görülmektedir. qRT-PZR sonuçlarına bakıldığında otofaji ve Wnt/ β -katenin ilişkili genlerde anlamlı bir azalış mevcutken apoptoz genlerinde ise anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, PDAK hücre hatlarında otofajiyi baskılamanın Wnt/ β -katenin sinyal yoluyla ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olduğu ve apoptozu hem kaspaz-3 testi hem de gen düzeyinde analiz ile arttırdığı saptanarak antikanser aktiviteye neden olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Otofaji, pankreas kanseri, VPS34, wnt/ β -katenin sinyal yolağı.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
Medical Biology

[Master Thesis]

INVESTIGATION OF AUTOPHAGY-ASSOCIATED VPS34 INHIBITOR VIA WNT/ β -CATENIN SIGNALING PATHWAY IN PANCREATIC CANCER CELL LINE

Vera AVCI

Konya-2024

The incidence of pancreatic cancer (PC) is increasing annually worldwide and early detection is challenging. The disease's poor prognosis, late diagnosis and resistance to treatments such as chemotherapy/radiotherapy suggest that new strategies are urgently needed for more successful treatment and early detection of pancreatic cancer. There are many molecular mechanisms known to be involved in cancer cells developing resistance to treatments, forming aggressive forms and spreading, one of which is autophagy. The role of autophagy in cancer is complex and may vary depending on tumor type or context. In addition, the interaction between autophagy and the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which is dysregulated in many cancer types, including pancreatic cancer, has been studied in different cancer types, but the molecular mechanisms remain unclear. In this study, PANC-1 and MIA PaCa-2 were used as human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines. In order to better understand the mechanisms underlying autophagy dysregulation, VPS34, one of the main regulators of autophagy, was targeted and inhibited with autophinib, and cell viability was examined by WST-8/CCK8 assay. Autophagic activity was analyzed by LC3-II Quantitation ELISA kit and apoptotic activity by Caspase-3 ELISA kit. To investigate the potential interaction between the Wnt/ β -catenin signaling pathway, the expression levels of target genes were analyzed by qRT-PCR. By cell viability analysis, the autophinib concentration to be used in subsequent experiments was determined as 5 and 10 μ M for 48 hours. As a result of the LC3-II ELISA test, a significant decrease in autophagic activity was observed in the 5 and 10 μ M dose groups compared to the control group. In the caspase-3 ELISA test results, a significant increase in apoptotic activity was observed in the dose groups. qRT-PCR results showed a significant decrease in autophagy and Wnt/ β -catenin related genes and a significant increase in apoptosis genes. Based on these results, it has been shown that suppressing autophagy in PDAC cell lines causes a decrease in the expression level of genes associated with Wnt/ β -catenin signaling pathway and increases apoptosis both by caspase-3 assay and gene level analysis, and may cause anticancer activity.

Keywords: Autophagy, pancreatic cancer, VPS34, wnt/ β -catenin signaling pathway.



1.GİRİŞ VE AMAÇ

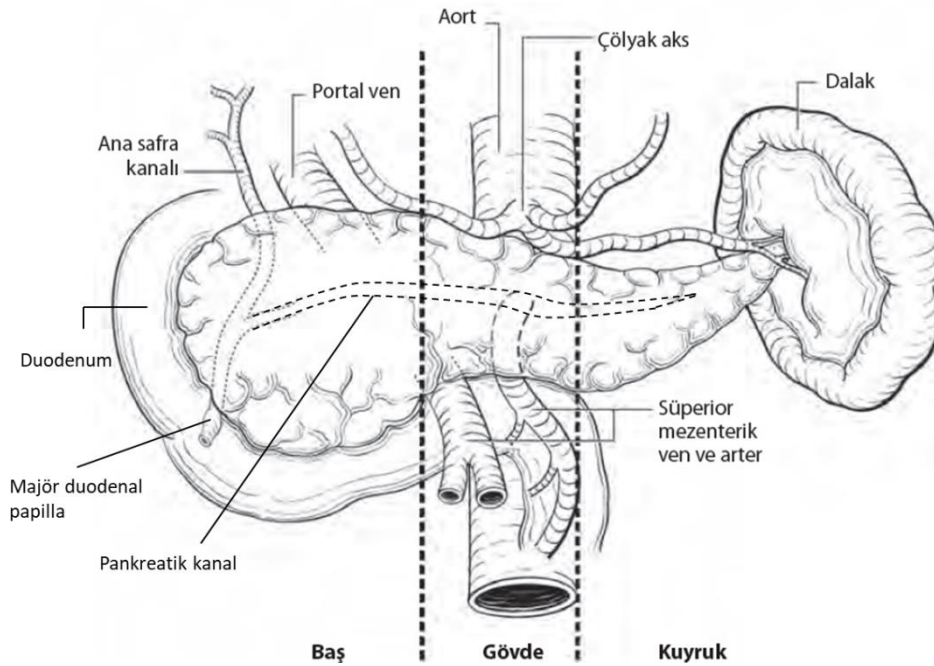
Pankreas kanserinin en sık görülen formu olan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK), tedavisi çok az olan ölümcül bir hastalıktır (Sung vd., 2021). Hastalar tipik olarak geç evre tümörü, ameliyat edilememe, radyasyon/kemoterapi veya immünoterapiye dirençli metastatik tümör ile başvurur (Whatcott, 2012). PDAK'da en sık görülen belirleyici mutasyonlardan biri *KRAS* onkogeni mutasyonudur ve PDAK'nın %90'ından fazlasında görülmektedir (Biankin vd., 2012). *TP53*, *CDKN2A (P16)* ve *SMAD4 (DPC4)* gibi tümör baskılayıcı genlerde de %50-80 oranlarında mutasyonlar görülmektedir (Klein, 2012). PDAK gelişiminde birçok heterojen mutasyon ortaya çıkmakta ya da kalıtsal olarak aktarılmaktadır ve bunlara bağlı olarak hücrel sinyalizasyonda değişiklikler meydana gelmektedir. Değişiklik görülen bu sinyal yollarından spesifik hücrel fonksiyonlarda bulunanlardan bazıları: apoptoz, DNA hasar onarımı, hücre döngüsü, invazyon, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi temel süreçlerde yer almaktadır (Jones vd., 2008). Ayrıca, PDAK tümörleri, hücrel homeostazide görev alan otofajinin kanserli hücrelere enerji sağlayarak onların çoğalmasına yardımcı olduğu ve tedavi direncini arttırdığı gösterilen bir tümör mikroçevresi (TME) geliştirir (Murakami vd., 2019). Artmış otofaji fonksiyonu, tümör hücrelerinin stres koşullarına adaptasyon sağlamasıyla sağ kalımlarını arttırabilmektedir (S. Yang vd., 2011). PDAK gelişiminde mutasyonlara bağlı değişen sinyal yollarından biri olarak tanımlanan Wnt/ β -katenin sinyal yolağı otofaji ile etkileşim içindedir (Lorzadeh vd., 2021). Bazı çalışmalar otofajinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağı proteinlerini degrade ederek sinyalizasyonunu azalttığını gösterse de diğer çalışmalar Wnt ligandına bağlı aktivasyonun otofajiyi arttırdığını göstermiştir (Gao vd., 2010; Ríos vd., 2018). Bu bilgiler dikkate alınarak temelde iki ana amaç çerçevesinde bu tez çalışması yapılmıştır. İlk amaç, PDAK'da otofaji ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağı arasındaki etkileşimin değerlendirilmesi, ikinci amaç ise bu etkileşimin PDAK hücrelerinde antikanser bir yanıt olup olmadığına bakılmasıdır. Bu amaçla otofajinin ilk aşamasında yer alan VPS34 hedeflenmiş ve inhibitörü olan autophinib kullanılarak PDAK hücre hattı olan PANC-1 ve MIA Paca-2 üzerinden hücre canlılığı test edilmiştir. VPS34'ün inhibe edilmesinin otofaji üzerindeki etkisi, LC3-II otofajik aktivite testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücrelerin apoptoz aktivitesi ise Kaspaz-3 testi kullanılarak analiz edilmiştir. Otofajinin Wnt/ β -katenin ile ilişkisine gen düzeyinde qRT-PZR kullanılarak bakılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

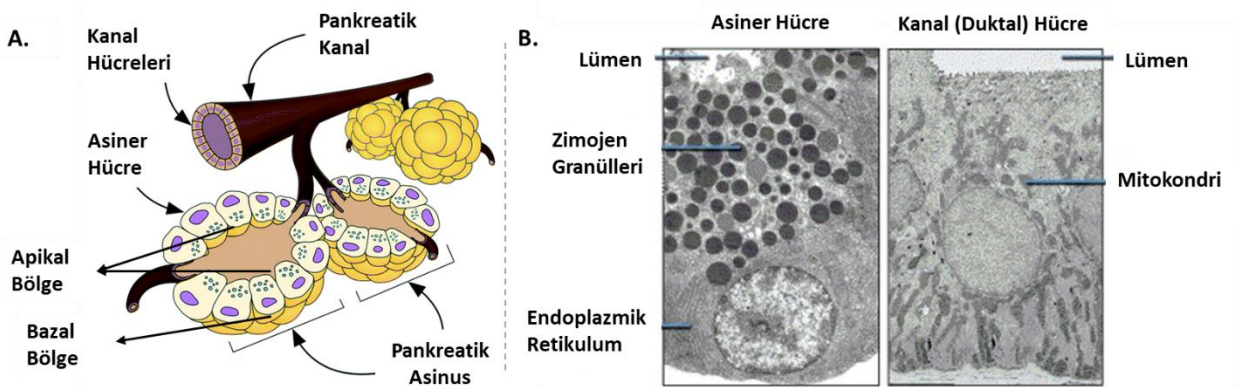
2.1. Pankreasın yapısı ve özellikleri

Pankreas, yetişkin insanlarda yaklaşık 15-18 santimetre uzunluğunda ve 80-100 gram ağırlığında bir salgı bezi organıdır. Temel olarak sindirim ve besin metabolizmasının düzenlenmesinde mevcut endokrin ve ekzokrin özelliği sayesinde rol oynar (Sarles, 1977). Pankreasın yapısını baş, gövde ve kuyruk olarak ayrılan üç ana kısım oluşturur (Şekil 2.1). Karın boşluğunda yer alır, başı duodenumun ilk kısımları tarafından çevrelenirken, kuyruğu dalak ile bitişiktir (Talathi vd., 2023). Pankreasta salgılanan moleküllerin trafiği için boşaltım kanalları önemlidir. Bir kanal ağı aracılığıyla enzim ve hormon salgıları hedef kısımlara iletilir. Bu iletimde ana kanal, pankreas boyunca ilerleyerek hücrelerden salgıları toplayan ve onu duodenuma boşaltan pankreatik kanaldır. Pankreatik kanal, karaciğerden gelen safra kanalı ile birleşir ve majör duodenal papilla yoluyla duodenuma ulaşır (Longnecker, 2021). Pankreasta kan akışı ise üst pankreatikoduodenal arter (çölyak arterin dalı) ve alt pankreatikoduodenal arterlerden (süperior mezenterik arterin dalı) sağlanır. Venöz drenaj ise dalak veni ve superior mezenterik ven yoluyla gerçekleşir ve bunlar portal vene boşaltılır (Sarles, 1977). Ayrıca pankreas hem parasempatik hem de sempatik sinir sistemleri tarafından innerve edilir; parasempatik sistem beyinden, sempatik sistem ise omurilikten kaynaklanır ve her iki sistem de pankreas içindeki farklı yapıları innerve eder (Hampton vd., 2022).



Şekil 2.1. Pankreasın anatomik yapısı (AJCC Kanseri Evreleme Atlası, 2012).

Pankreasın en büyük doku kütleini yaklaşık %85'lik bir oranla ekzokrin kısım oluşturur (Flay & Gorelick, 2004). Ekzokrin aktivitesinde asiner ve kanal (duktal) hücreler yer alır (Şekil 2.2). Ekzokrin kısmın temel alt birimi olan asinus, kanal hücelere bağılı olan asiner hücelerden oluşur. Asinus, sindirim enzimlerinin sentezlenmesi, depolanması ve salgılanmasından sorumlu asiner hüceleri içeren, küme halinde bulunan bir yapıdır. Asiner hüceler apikal bölgede yoğun zimojen granülleri içerirken, bazal bölgede ise çekirdek ve endoplazmik retikulum yer almaktadır. Bu kısım karboksipeptidazlar, amilazlar, lipazlar ve proteazlar gibi sindirim (zimojen) enzimlerinin salgılanması ve depolanmasından sorumludur. Enzimler üretilip pankreatik kanala salınır ve nihayetinde ince bağırsağa ulaşarak besinlerin daha kolay emilebilmeleri için temel bileşenlerine ayrılırlar. Kanal hüceler ise pankreastaki sıvı hacmini ve pankreas suyu pH'sını uygun düzeyde tutabilmek için aktif olarak bikarbonat, iyon ve su salgılar. Pankreasın endokrin kısmı ise temelde glukoz homeostazını sağlamada bunun yanında protein ve yağ metabolizmasını düzenlemede rol alır. Endokrin kısım insülin üreten beta hüceleri; glukagon üreten alfa hüceleri; somatostatin üreten delta hüceleri; pankreatik polipeptit ve adrenomedullin için PP (pankreatik polipeptit) hüceleri, ve ghrelin üreten epsilon hücre tiplerinden oluşur ve tüm bu hüceler adacıklar şeklinde görünen (Langerhans islets) yapılar içinde bulunurlar (Boron & Boulpaep, 2016).



Şekil 2.2. Ekzokrin pankreas hüceleri (A) asiner ve kanal hüceleri (B).

2.2. Pankreas Kanseri

Pankreastaki DNA mutasyonları onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açarak hızlı ve kontrolsüz büyüyen pankreas hücelerini ve sonunda da tümörleri oluşturur (Jones vd., 2008). Pankreas tümörleri büyük bir çoğunlukla birincil tümörlerdir; vücudun başka yerlerinden pankreasa metastaz yapan tümörlerin görülme sıklığı neredeyse hiç yoktur. Pankreas tümörleri histolojik farklılaşmalarına göre epitelyal veya epitelyal olmayan olarak kategorize edilebilir. Ayrıca, biyolojik davranışlarına göre benign (iyi

huyulu), ve malign (kötü huyulu) olarak sınıflandırılırlar (Haeberle & Esposito, 2019). Epitelyal tümörler ekzokrin veya endokrin olarak alt kategoride sınıflandırılabilirler. Pankreas kanseri çoğunlukla ekzokrin (duktal ve asiner hücrelerden) ve endokrin (adacık) hücreler dahil olmak üzere epitelyal hücrelerden kaynaklanır (Backx vd., 2022). Pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAK), en sık görülen pankreas kanseri formudur ve pankreas tümörlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur (Wang vd., 2020). Bu nedenle, pankreas kanseri ve bu çalışmanın odağı olan pankreatik duktal adenokarsinoma terimleri sıklıkla eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Endokrin tümörler, pankreas tümörlerinin %5'inden daha azını oluşturmaktadır. Epitelyal olmayan pankreatik maligniteler ise son derece nadirdir (Pitman, 2007). Pankreas adenokarsinomunun üçte ikisi pankreasın baş kısmında, üçte biri ise pankreasın gövde ve kuyruğunda ortaya çıkar (Maisonneuve & Lowenfels, 2010).

2.2.1. PDAK'nın epidemiyolojisi ve risk faktörleri

Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) verilerine göre 2020 yılında dünya çapında 495.773 pankreas tanısı ve 466.000 ölüm sayısı onu her iki cinsiyette de kanserden kaynaklı ölümlerde, yedinci önde gelen neden haline getirmektedir (Sung vd., 2021). Meme kanserinin azalan oranları göz önüne alındığında, pankreas kanserinin 2025 yılına kadar kanser ölümlerinin üçüncü önde gelen nedeni olarak meme kanserini geçeceği öngörülmüştür (Ferlay vd., 2016). Ayrıca başka bir çalışmaya göre, bu hastalığın 2030 yılında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedeni olması beklenmektedir (Rahib vd., 2014). Özellikle son yıllarda cerrahi rezeksiyonun etkinliği ve adjuvan kemoterapinin eklenmesi konusunda başarılar elde edilmiş olsa da, pankreas kanseri hala tüm kanserler arasında tüm evreler için en kötü sağkalım oranına sahiptir (Sung vd., 2021).

Pankreas kanseri genetik, çevresel ve yaşam tarzı gibi birçok faktörün sebep olduğu bir hastalıktır. Pankreas kanseri ile ilişkili risk faktörlerinin anlaşılması, önleyici stratejilerin geliştirilmesi ve uygulanması için çok önemlidir. Bu risk faktörleri değiştirilebilen ve değiştirilemeyen olarak iki kategoriye ayrılır. Değiştirilemeyen risk faktörlerinde; yaş, cinsiyet, mikrobiyota, diabetes mellitus (DM), genetik yatkınlık ve değiştirilebilen risk faktörlerinde; sigara, alkol kullanımı, diyet faktörleri, pankreatit ve obezite gibi unsurlar yer almaktadır (Luo vd., 2023). Bu faktörlerin pankreas kanserinin oluşumu, ilerlemesi ve yayılması üzerindeki etkileri aşağıda açıklanmıştır.

Yaş

Pankreas kanseri yaşla beraber önemli ölçüde artmaktadır. Yapılan çalışmalar, pankreas kanserinin ağırlıklı olarak yaşlı bir popülasyon hastalığı olduğunu ve hastaların çoğunun 50 yaşın üzerinde olduğunu göstermektedir (Bray vd., 2018). Pankreas kanserine yakalanma riskinin en yüksek olduğu aralık 60 ila 80 yaş olarak belirlenmiştir (Siegel vd., 2022). Nadiren 40 yaşından önce ortaya çıkar ve pankreas kanseri vakalarının yarısından fazlası için ortalama yaş 71'dir (Ilic & Ilic, 2016).

Cinsiyet

Pankreas kanseri erkeklerde kadınlara göre daha yaygındır. Küresel olarak, pankreas kanseri insidansı erkekler için 100.000'de 5,5 ve kadınlar için 100.000'de 4,0'dır (Bray vd., 2018). Pankreas kanseri, muhtemelen çevresel veya mesleki risk faktörlerinin yanı sıra ağır sigara alışkanlığı ve yüksek alkol alımı gibi yaşam tarzları nedeniyle erkeklerde daha fazla görülür.

Mikrobiyota

Birçok epidemiyolojik çalışma ağız bakterileri ile pankreas kanseri arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalardan biri pankreas kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla iki bakteri seviyesinin (*Neisseria elongate* ve *Streptococcus mitis*) daha düşük olduğunu bildirmiş ve iki bakteri kombinasyonunun pankreas kanserli hastaları sağlıklı bireylerden yüksek özgüllükle ayırdığını bulmuştur (Farrell vd., 2012). Bağırsak mikrobiyotası, obezite ve tip II diyabet gibi diğer pankreas kanseri risk faktörleriyle ilişkilidir (Ping Li vd., 2020). Pankreas kanseri hastalarında bağırsak mikrobiyal çeşitliliğinde azalma gözlenmektedir (Ren vd., 2017). Pankreas kanseri, belirli patojenlerde ve lipopolisakkarit (LPS) üreten bakterilerde artış, probiyotiklerde ve bütirat üreten bakterilerde ise azalma ile ilişkilidir (Ren vd., 2017). Çalışmalarda LPS'nin, NF-κB yolunu aktive ederek ve onkojenik Ras varlığında fibrozis ve pankreas kanseri oluşumunu indükleyerek pro-inflamatuar ve pro-tümör rolü oynadığı düşünülmektedir (Darnaud vd., 2013).

Pankreas da çeşitli bakteri taksonları içerir (Del Castillo vd., 2019). Yapılan araştırmalar *Lactobacillus* ve periodontal ilişkili patojenler gibi bazı bakterilerin varlığını ve miktarını, kanserli ve kanserli olmayan bireylerin pankreas dokularına göre farklılık oluşturduğunu göstermiştir (Del Castillo vd., 2019). Ayrıca *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerin pankreasa göç edebildiği ve pankreatik onkogenезin ilerlemesini destekleyebildiği bulunmuştur (Pushalkar vd., 2018).

Diabetes mellitus (DM)

Pankreas kanseri olan kişilerin yaklaşık %80'i aynı zamanda diyabet teşhisi konan hastalardır (Huang vd., 2020). Yakın zamanda diyabet teşhisi konan hastalarda pankreas kanseri gelişme riski yaklaşık 7 kat artarken, yeni başlangıçlı diyabeti olan daha yaşlı hastalarda pankreas kanseri gelişme riski 8 kat daha fazladır ve bu durum diyabet ile pankreas kanseri arasında çift taraflı bir rol olduğunu kanıtlamaktadır (Pannala vd., 2009). Pankreas kanseri ve diabetes mellitus tip 2 (DMT2) arasındaki ilişki, DMT2 ile karakterize olan hiperinsülinemi ve yüksek insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) seviyesine bağlıdır (J. Yang vd., 2016). Kandaki yüksek hormon seviyesi doğrudan asiner ve duktal hücre gruplarına ulaşır ve bu hücrelerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını teşvik etmek için IGF-1 reseptörleri üzerinde etkili olur (Andersen vd., 2017). Yapılan bir çalışmada DMT2'li zayıf bireylerde pankreatik kanal hücre çoğalmasının diyabetik olmayan zayıf kontrollere kıyasla 4 kat arttığı bildirilerek DMT2'de artan pankreatit ve pankreas kanseri riskinin kronik olarak artan pankreatik kanal hücre proliferasyonundan kaynaklandığı öne sürülmüştür (Butler vd., 2010).

Aile öyküsü ve genetik yatkınlık

Kalıtsal (ailesel) pankreas kanseri, vakaların yaklaşık %10'unu oluşturur (Ohmoto vd., 2019). Yapılan çalışmalarda, kalıtsal pankreas kanseri olan bireylerin birinci derece akrabalarında pankreas kanseri riskinin genel popülasyona göre dokuz kat arttığı gösterilmiştir (Klein vd., 2004). Kalıtsal pankreas kanserli hastalar, kalıtsal olmayan pankreas kanserli hastalara göre daha fazla prekanseröz lezyona sahiptir ve pankreas dışı kanserler geliştirme riskleri fazladır (Shi vd., 2009).

Germ hattı mutasyonu olarak bilinen ve germ hücrelerinde meydana gelen genetik varyasyon veya mutasyonlar, pankreas kanseri riskinin artmasında önemli bir rol oynar (Chaffee vd., 2018). Pankreas kanseri riskini artırdığı bilinen genetik mutasyonlar arasında; kalıtsal pankreatitle ilişkili *PRSS1* ve *SPINK1* genlerindeki mutasyonlar (LaRusch & Whitcomb, 2011), DNA onarım geni *ATM* mutasyonu, kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri ile ilişkili *BRCA1/2*'deki mutasyonlar (Moran vd., 2012), ailesel atipik multipl mol melanomu ile ilişkili *CDKN2A* geni mutasyonu, yanlış eşleşme onarım genlerindeki mutasyonlar (De Snoo vd., 2008) (*MLH1/MSH6/MSH2/PMS2*), *KRAS*, *P53* ve *SMAD4* gen mutasyonları yer almaktadır (Slebos vd., 2000).

Sigara

Sigara tüketimi genel olarak kanser oluşumunda önemli bir çevresel risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Kanserde en yaygın gen mutasyonlarından olan *KRAS* ve *TP53* gen mutasyonlarını indüklemesi, kronik inflamasyona sebep olması çeşitli büyüme faktörlerini uyararak hücrel dönüşümü sağlaması nedeniyle PK (Pankreas kanseri) oluşum riskini artırmaktadır (Pandol vd., 2012). Sigara içmek PDAK gelişme riskini sigara içmeyenlere kıyasla yaklaşık 2 kat artırmaktadır (Matsuo vd., 2011). Ayrıca, sigara kullanımı diğer risk faktörlerine sahip bireylerde PDAK gelişme riskini sinerjetik olarak artırmaktadır (Iodice vd., 2008).

Alkol Tüketimi

PDAK oluşma riskinin, ağır alkol tüketenlerde ($\geq 37,5$ g/gün etanol eşdeğeri) 1,22 kat arttığı ve orta derecede alkol tüketenlerde veya orta miktardan daha az içenlerde önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir (Tramacere vd., 2010). Alkol ve metabolitleri, kronik inflamasyon ve hücrel gen instabilitesi yoluyla pro-karsinojenik bir etki oluşturmaktadır (Gupta vd., 2010). Alkol tüketiminin kronik pankreatitin %60-90'undan sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu yüzden PDAK gelişiminde doğrudan ya da pankreatit oluşumuyla dolaylı olarak etki ettiği düşünülmektedir (Setiawan vd., 2017).

Kronik pankreatit

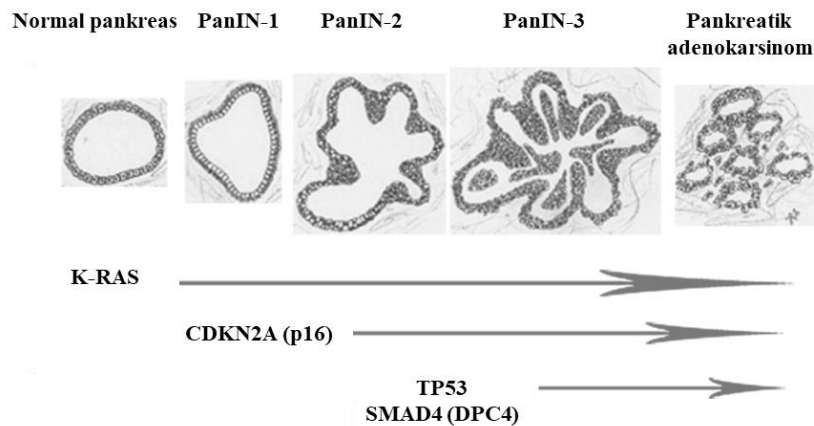
Kronik pankreatitte görülen hastalık paternleri pankreas kanserinde görülenlerle çok benzerdir (Lowenfels vd., 1993). Kronik pankreatit, PDAK gelişimi için önemli bir risk faktörüdür ve yapılan bir meta-analizde 13,3 kat PDAK gelişimi için daha fazla risk gösterdiği bildirilmiştir (Raimondi vd., 2010).

Obezite

Obezite, pankreas kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar, vücut kitle indeksindeki her 5 kg/m^2 'lik artış için 1,12'lik bir risk artışı olduğunu göstermiştir (Larsson vd., 2007). Obezite, iki biyolojik mekanizma nedeniyle artmış pankreas kanseri riski ile ilişkilidir. Bunlar inflamasyondaki ve hormonal seviyedeki dengesizliklerdir (M. Xu vd., 2018). Obezite, pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar moleküller arasında dengesizliğe neden olur; bu da pankreas dokusunda hücre çoğalmasını ve anjiyogenezi teşvik edebilir (Rawla vd., 2019). Ayrıca obezite hormon üretiminde de düzensiz artışa neden olarak tümör oluşumunu teşvik edebilir (Chung vd., 2019).

2.2.2. PDAK'nın moleküler patogenezi

Spontan ve kalıtsal mutasyonlar hücrel yanıtın bozulmasına neden olarak PDAK'yı oluşturur. PDAK'ların çoğunluğu esas olarak pankreasın duktal epitelinden kaynaklanan pankreatik intraepitelyal neoplaziden (PanIN) oluşur (Hruban vd., 2000). Ayrıca intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar (IPMN) ve müsinöz kistik neoplazmlar (MCN) olarak adlandırılan öncül lezyonlardan da kaynaklanmaktadır (Tanaka vd., 2006). Pankreas karsinogenezinde temel olarak dört belirleyici mutasyon yer almaktadır. Bunlar; onkogen olarak bilinen ve tümörlerin %90'ından fazlasında görülen KRAS genindeki aktive edici mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerden olan ve tümörlerin %50-80'inde görülen TP53, CDKN2A (p16) ve SMAD4 (DPC4) inaktive edici mutasyonlarıdır (Biankin vd., 2012; Indini vd., 2021; Klein, 2012). Tümör, öncü lezyonların morfolojik ve moleküler olarak farklılaşmasıyla adım adım invaziv tümör hücrelerine dönüşür. PanIN'lerin oluşumu ve ilerlemesi de bu genetik mutasyonların kademeli olarak ilerlemesiyle gerçekleşir. Bu nedenle PanIN'ler Şekil 3'te gösterildiği gibi hücrel morfolojiye dayalı olarak PanIN-1, PanIN-2 ve PanIN-3 olarak sınıflandırılır (Hruban vd., 2001). Düşük dereceli PanIN-1 gelişimi K-RAS onkogeninin aktivasyonu ile ilişkilidir (Hingorani vd., 2003). P16'nın inaktivasyonu, daha yüksek dereceli displaziye ilerleme ile ilişkilidir ve ileriki evrelerde bu mutasyonlar SMAD4'teki mutasyonun ihtimalini artırır. Tümör baskılayıcı gen TP53, KRAS tarafından başlatılan PanIN'in ilerlemesini engelleyen kritik bariyerlerden biridir ve çoğu pankreatik adenokarsinomda inaktive olur (Heinmöller vd., 2000; Yamano vd., 2000).



Şekil 2.3. Pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) öncü lezyonunda oluşan mutasyonlar ve pankreas hücresinin morfolojik olarak değişimi (Hruban vd., 2001).

Pankreasta meydana gelen mutasyonların, yapılan çalışmalarda son derece karmaşık ve heterojen olduğu ortaya konulsa da belirli hücrel sinyal yollarının bu süreçte rol aldığı

gösterilmiştir (Jones vd., 2008). Analiz edilen tümörlerin çoğunda önemli ölçüde değişmiş olan 12 ana sinyal yolağı ve bu yolaklarla tanımlanmış genler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Pankreas kanserinde yaygın olarak yer alan on iki yolak ve mutasyona uğrayan genler (Jones vd., 2008) .

Düzenleyici yolak	Mutasyona uğrayan genler
Apoptoz	CASP10, VCP, CAD, HIP1
DNA Hasar Kontrolü	TP53
Hücre Döngüsü	CDKN2A, APC2
Hedgehog signaling	GLI1, GLI3, BOC, CREBBP, LRP2
Hücre Adezyonu	CDH1
Integrin sinyali	ITGA4, ITGA9, ITGA11, LAMA1
JNK yolağı	TNF
RAS-MAPK Yolağı	KRAS
İnvazyon yolağı	ADAM11/12/19, DPP6, MEI1A
Küçük GPTaz yolağı	CDC42BPA, AGHGEF7, ARHGEF9
TGF- β yolağı	SMAD4, SMAD3, TGFBR2
Wnt/Notch signaling	MYC, WNT9A, MAP2, TSC2, GATA6, TCF4

2.2.3. PDAK’nın Belirtileri, Tanısı ve Evrelendirmesi

Erken evre pankreas kanseri tipik olarak klinik açıdan sessizdir. Pankreas kanserine bağlı semptomların görüldüğü hastaların çoğunda hastalık ilerlemiştir (Vincent vd., 2011). Tümörler en sık olarak pankreasta bulunan kanalların çıkış noktasında ortaya çıkar. Bu bölgelerde oluşan tümörlerin büyümesi yakın çevrede bulunan diğer kanallara örneğin ortak safra kanalına baskı oluşturur. Bu baskı, tıkanma sarılığı olarak bilinen bir durum olan safranin karaciğerde birikmesine yol açar; bu patolojinin en erken belirtilerinden biridir (De La Cruz vd., 2014). Diğer kısımlarda ortaya çıkan tümörler, bir semptoma neden olmadıkları için ileri evreye kadar tespit edilememektedir. Karın ağrısı, kaşıntı, koyu renkli idrar ve ağırlı dışkı, safranin tıkanıklığının göstergesi olabilecek spesifik olmayan semptomlar arasındadır. Ayrıca anoreksi, erken doyma, bulantı, dispepsi ve kilo kaybı da görülebilir (Porta vd., 2005). Çok çeşitli ve spesifik olmayan semptomlar nedeniyle pankreas kanserinin diğer hastalıklardan ayırt edilmesi oldukça önemlidir. Bu tümörlerin metastazları karaciğere veya çevredeki lenf düğümlerine olabilir (Ayres Pereira & Chio, 2019). Tanı genellikle hastalık ilerledikten sonra konulduğu için, ameliyat edilebilir vakalarda bile prognoz kötüdür. Eksik veya gecikmiş tanı olasılığı nedeniyle, pankreas kanseri otopsi çalışmalarında en sık bulunan tümördür (Poruk vd., 2013).

Pankreas kanserleri genellikle vasküler tutulum ve uzak metastaz yapmasına göre rezektabl veya unrezektabl tümörler olarak kategorize edilir (Soloff vd., 2018). Bölge dışı lenf düğümlerindeki ve dokulardaki metastatik oluşum unrezektabl olarak kabul edilir. Vasküler

tutulunun özellikle superior mezenterik arter (SMA) ve çölyak arterin etrafında 180 dereceden fazla olması da hastaları unrezektabl olarak sınıflandırır (Ducreux vd., 2015). Tedavi edilebilirliğine göre ayrıca 3 kategoriye ayrılabilir. İlk kategori lokalize cerrahi olarak rezekte edilebilir tümörleri içerir. Bunlar, pankreasla sınırlı oldukları ve diğer organlara veya dokulara yayılmadıkları için ameliyatla çıkarılabilen tümörlerdir. İkinci kategori, unrezektabl olan lokal olarak ilerlemiş tümörlerden oluşur. Bu tümörler pankreas haricinde de büyümüş ve yakındaki organları veya kan damarlarını istila ederek cerrahi olarak çıkarılmalarını zorlaştırmıştır. Üçüncü kategori metastatik tümörlerden oluşur. Bu tümörlerin vücuttaki uzak organlara veya dokulara yayılmaları cerrahi olarak çıkarılmalarını imkansız hale getirmiştir. Birinci ve ikinci kategoriler arasında, sınırda (borderline) rezekte edilebilir tümörler (BRPC) vardır. Bu tümörlerin, ameliyat için uygun olabilecekleri veya olamayacakları gri bir alandadır. Bu tümörleri ameliyat etme kararı, çölyak arter, hepatik arter, portal ven, superior mezenterik arter ve ven gibi komşu organların ve kan damarlarının tutulum derecesine bağlıdır (Soloff vd., 2018).

Çok kesitli bilgisayarlı tomografi (ÇKBCT) pankreas adenokarsinomunu teşhis etmek ve değerlendirmek için en iyi görüntüleme yöntemlerinden biridir. Kesinlik oranı rezektabl tümörleri öngörmekte %77 ve unrezektabl tümörleri öngörmekte %93'tür (Granata vd., 2016). Abdominal ultrasonografi şu anda mevcut olan tanı araçlarından biridir. Diğer araçlar arasında manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve sitolojik tanı için endoskopik ultrason kılavuzluğunda ince iğne aspirasyonu bulunmaktadır (Elbanna vd., 2020). Pankreas kanseri ile ilişkili tümör belirteçlerinden olan CEA ve CA 19-9 kan seviyelerinin ölçümü ile de semptomları olan hastalarda tanı doğrulanabilir ve rezeksiyon sonrası prognoz ve nüks öngörülebilmektedir (E Poruk vd., 2013). Ancak, tümöre özgü olmadığından, semptomları olmayan hastalar için tek başına bir tarama aracı olarak kullanılamaz.

Pankreas kanseri için en sık kullanılan evreleme yaklaşımı Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) tarafından TNM evreleme sistemi olarak adlandırılan ve temelde üç faktöre dayanan bir sınıflandırmadır (Amin vd., 2017). Bu evreleme tümörün boyutu ve yayılımı (T), yakındaki lenf düğümlerinin tutulumu (N) ve uzak organlarda veya lenf düğümlerinde metastaz varlığını (M) içerir. TNM evrelemesi Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2 TNM tanımlamaları (Amin vd., 2017)

Primer Tümör (T)			
Tx Primer tümör değerlendirilemiyor			
T0 Primer tümör bulgusu yok			
Tis Karsinoma in situ			
T1 En büyük boyutu 2 cm veya daha küçük ve pankreasla sınırlı tümör			
T2 En büyük boyutu 2 cm'den büyük ve pankreasla sınırlı tümör			
T3 Çölyak aks veya süperior mezenterik artere invaze olmadan pankreas dışına uzanım gösteren tümör			
T4 Çölyak aks veya süperior mezenterik artere invaze tümör (unrezektabl tümör)			
Bölgesel Lenf Nodları (N)			
NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor			
N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok			
N1 Bölgesel lenf nodu metastazı var			
Uzak Metastaz (M)			
M0 Uzak metastaz yok			
M1 Uzak metastaz var			
TNM EVRE GRUPLARI			
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T2	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
Evre IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Evre III	T4	Herhangi N	M0
Evre IV	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2.4. PDAK'nın tedavisi

Pankreas kanseri tedavisindeki gelişmeler, hastalığın evresine bağlı olarak farklı seçeneklerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Tanı konulduğunda, hastaların yaklaşık %10-20'si rezektabl tümör, %30-40'ı Borderline Rezektabl Pankreas Kanseri (BRPC) veya Lokal Olarak İlerlemiş Pankreas Kanseri (LAPC) ve %50-60'ı metastatik veya sistemik tümör geliştirmiş olur (Kleeff vd., 2016). Rezektabl tümörler için cerrahi rezeksiyon (Pankreatektomi) ve ardından kemoterapi potansiyel olarak en küratif seçenektir ve pankreastaki yüksek hacimli kısım tümörleri pankreatektomi için daha iyi sonuçlar göstermektedir (Ducreux vd., 2015). Cerrahi rezeksiyondan önce uygulanan FOLFIRINOX (folinik asit, 5- fluorourasil, irinotekan ve oksaliptatin kombinasyonu) veya gemitabin ile beraber albümine bağlı paklitaksel gibi neoadjuvan tedavi, borderline rezektabl pankreas kanseri (BRPC) veya lokal olarak ilerlemiş pankreas kanseri (LAPC) olan hastalara fayda sağlayabilir (Pappalardo vd., 2021). Neoadjuvan tedavinin başlangıçta rezektabl olmayan tümörleri rezektabl edilebilir hale getirebileceği bildirilmiştir (Katz vd., 2009). Bununla birlikte, cerrahi uygulama öncesi neoadjuvan tedavi yaklaşımı için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Cerrahi ve kemoterapidaki gelişmeler sayesinde pankreas kanseri cerrahisi lokal olarak ilerlemiş hastalığı da kapsayacak şekilde

genişlemiştir. Arteriyel rezeksiyonlar ve neoadjuvan FOLFIRINOX tedavi yaklaşımları seçilmiş hastalarda umut vaat etmektedir (Janssen vd., 2019). LAPC veya metastatik pankreas kanseri için kemoterapi seçenekleri hastanın performans durumuna bağlıdır. Bu ölçeklerden biri olan Doğu Kooperatif Onkoloji Grubu (ECOG) performans durumu iyi olan hastalar için FOLFIRINOX veya gemitabin ile beraber albümine bağlı paklitaksel önerilirken, performans skoru orta ve kötü olan hastalar için gemitabin monoterapisi veya destekleyici bakım daha uygun görülmektedir (Chiorean vd., 2019).

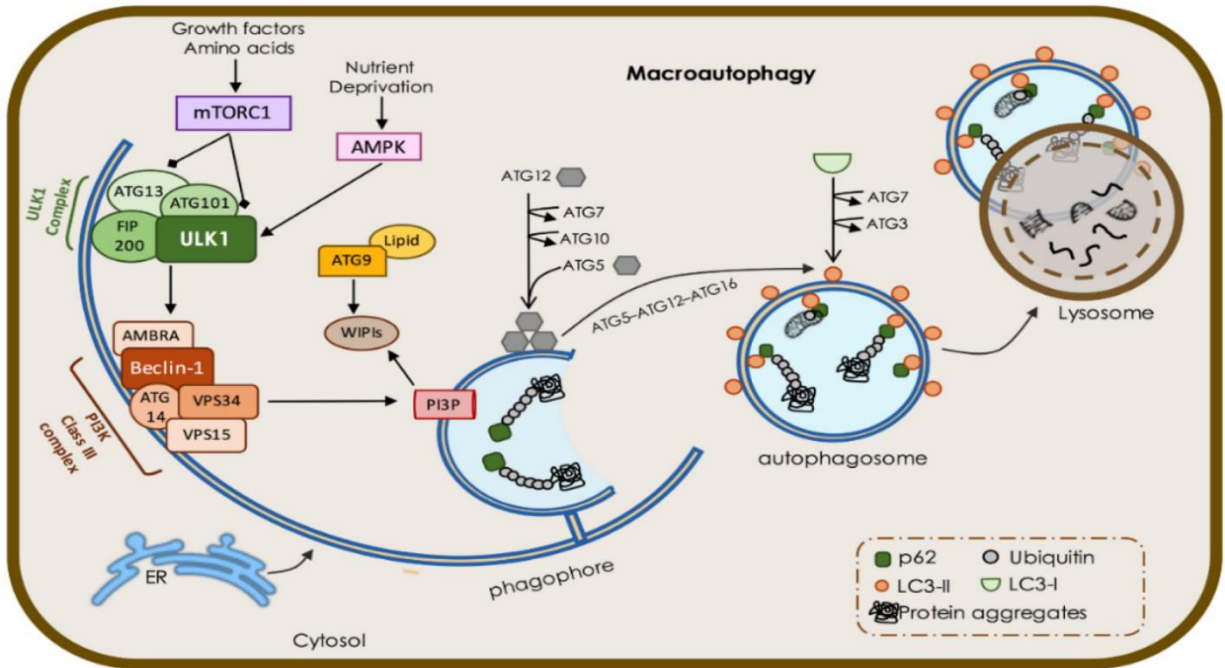
Tüm bu teröpatik uygulamalara rağmen PDAK için 5 yıllık sağkalım oranı %10'dan daha azdır (Yamamoto vd., 2015). Kötü prognoz göstermesi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Kemoterapi başta olmak üzere, PDAK hücrelerinin tedavilere direnç gösterdiği bilinmektedir. PDAK'da kemorezistans oluşumuna katkıda bulunan iki önemli unsur olarak desmoplazi ve TME söylenebilir (Whatcott, 2012). Bu unsurlardan desmoplazi, tümörün içinde ve çevresinde bağ dokusunun anormal büyümesini destekler ve yoğun ve fibröz bir ortam yaratır. Bu yoğun ortam, kemoterapi ilaçlarının tümöre nüfuz etmesini ve kanser hücrelerine ulaşmasını zorlaştırarak etkinliklerini azaltabilir. Bir diğer unsur da tümörü çevreleyen, hücreleri, kan damarlarını ve tümörle etkileşime giren diğer bileşenleri içeren tümör mikroçevresidir (TME). Tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması için destekleyici bir ortam sağlayarak kemorezistansa katkıda bulunur (Murakami vd., 2019).

2.3 Otofaji

Kanserli hücrelerin zayıf prognoz göstermesi ve çeşitli terapilere karşı direnç geliştirmesi, hücrenin homeostazını sağlayan moleküler mekanizmaların değişiminden kaynaklanabilmektedir. Bu mekanizmalardan biri olan otofaji, hasarlı ya da yaşlı organellerin temizlenmesini, makromoleküllerin parçalanarak geri dönüştürülmesini içeren ve böylece hücrel homeostaziyi koruyan bir yoldur. Yunanca "kendi kendini yeme" anlamına gelen otofaji, çevresel ve hücrel stres sinyallerine karşı önemli bir rol oynamaktadır (Galluzzi vd., 2017). Besin eksikliği, mitokondriyal hasar, oksidatif stres, hipoksi, endoplazmik retikulum (ER) stresi, patojenik enfeksiyonlar ve büyüme faktörlerinin azalması gibi çeşitli stres türleri otofajiyi tetikleyebilir (Klionsky vd., 2021). Otofaji şaperon aracılı otofaji (CMA), mikrotofaji ve makrotofaji olmak üzere üç ana mekanizma aracılığıyla gerçekleşmektedir. Şaperon aracılı otofaji (CMA) oldukça spesifik bir süreçtir ve hedef substrat üzerindeki tanımlı bölgeler, sitoplazmik hedefin Hsc70 gibi özel şaperonlar tarafından algılanıp lizozomlara yönlendirilmesine ve sonuç olarak parçalanmasına yol açar. Mikrotofaji, sitoplazmik hedefin lizozomlar tarafından doğrudan yutulup parçalanmasını içeren seçici olmayan bir süreçtir. Bu

çalışmada değerlendirilen ve otofaji olarak adlandırılan makrotofaji ise sitoplazmik hedeflerin çift zarlı ve otofagozom olarak adlandırılan veziküllerin içine alınarak degradasyonu için lizozomlarla kaynaşmasını ve hedef moleküllerin parçalanmasını içeren bir mekanizmadır. Otofajik sürecin temel basamakları; başlatma, uzama, otofagozom oluşumu, füzyon-otolizozom oluşumu ve degradasyondan oluşur. Bu süreç karmaşıktır ve çeşitli sinyal yolları tarafından düzenlenen hücre içindeki birçok protein ve organel tarafından kontrol edilir. Başlatma, sürecin tetiklendiği otofajinin ilk aşamasıdır. Bu aşamada iki önemli başlatma kompleksi yer almaktadır. İlk kompleks UNC-51 benzeri kinaz (ULK1), 200 kDa'lık fokal adezyon kinaz ailesi etkileşimli protein (FIP200), otofaji ile ilişkili protein 13 (ATG13) ve ATG101'den oluşan ULK1 kompleksidir. ULK1 aktive edildiğinde başlatma kompleksini oluşturmak için FIP200, ATG13 ve ATG101'e bağlanabilir (Ganley vd., 2009). ULK1 aktivasyonu sonrasında fagoforun öncülü olarak bilinen izolasyon membranı oluşumu başlatılır (Karanasios vd., 2013). Başlatma aşamasının diğer önemli birimi fosfatidilinositol 3-kinaz katalitik alt birim tip 3 (PI3KC3) kompleksidir. PI3KC3 kompleksinin ana bileşenleri, VPS34 proteini, VPS15 (PIK3R4 (Fosfoinositid-3-Kinaz Düzenleyici Alt Birim 4)) proteini ve BECLIN1 proteininden oluşmaktadır. Aktive olan ULK1, PI3KC3 kompleksini de aktive ederek ATG14L'nin de PI3KC3 kompleksine bağlanması gerçekleşir (Russell vd., 2013). Aktive olan PI3KC3 kompleksi otofagozomun ilk formu olan fagoforu oluşturmak üzere fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PI3P) üretmeye başlar (Whitmarsh-Everiss & Laraia, 2021). Böylece aktive olan ULK1 ve PI3KC3 kompleksi endoplazmik retikulum (ER)/golgi aparatı üzerindeki izolasyon membranına lokalize olarak fonksiyonel hale gelirler (Zhi vd., 2018). Uzama ve otofagozom oluşumu otofajinin ikinci aşamasıdır. Bu aşamada, fagoforun uzaması gerçekleşir ve hedef makromoleküller otofagozom adı verilen çift membranlı veziküller içine alınır. Bu otofagozomlar hücre sel bileşenlerin parçalanması için bir hazne (kap) görevi görür. Otofagozom oluşumu çeşitli ubikitin benzeri sistemlerle karakterize edilir. Başlatma kompleksi, endoplazmik retikulumdaki fosfoinositidleri PI3P'e (fosfatidilinositol-3-fosfat) dönüştürerek ubikitin benzeri sistem proteinlerini ve otofaji için gerekli diğer proteinleri fagofora doğru çeker (Whitmarsh-Everiss & Laraia, 2021). Bu proteinler E1 ligaz olarak ATG7, E2 ligaz olarak ATG3, ATG16L1 kompleksi ile birlikte E3 ligaz olarak görev yapan ATG5-ATG12 konjugatından oluşan yapılardır (Dooley vd., 2014; Fujita vd., 2008). Sitozolde bulunan Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zinciri 3 (LC3), otofaji sırasında ATG4 tarafından kesilerek LC3-I'e dönüştürülür ve bu da ATG7'nin bağlanmasını uyarır. Bu uyarım, LC3-II olarak da bilinen LC3-fosfatidiletanolaminin (PE) konjugatını oluşturmak için PE'nin LC3-I ile ligasyonu ile sonuçlanır. Ardından fagofor, ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi

aracılığıyla PE ile konjuge olmuş LC3'ü (LC3-II) membrana alır ve PE-lipidlenmiş LC3 (ATG8), tam bir otofagozom haline gelmek için ATG3, ATG4, ATG5 ve ATG7 ile etkileşime girer (Fujita vd., 2008). Parçalanması istenen biyomoleküle ve otofagozom membranındaki LC3-PE konjugatına bağlanabilen p62/SQSTM1 gibi adaptör proteinlerle hedef kargo membranının içine yönlendirilir (Lamark vd., 2009). ATG5-ATG12-ATG16 sistemi ve LC3-PE sisteminin aktivitesi ve koordinasyonu, otofagozomun doğru bir şekilde oluşması ve kıvrılması için önemlidir ayrıca LC3-PE'nin lipidasyonunu ve otofagozomal membrana yerleşmesini kolaylaştırır (Kaufmann & Wollert, 2014). Fagoforda çoklu LC3-II ve ATG5-ATG12-ATG16 komplekslerinin varlığı otofagozom oluşumunun başladığını gösterir. Füzyon ve otolizozom oluşumu aşamasında otofagozomlar hücresel atıkların parçalanmasından sorumlu organeller olan lizozomlarla kaynaşır. Bu füzyon otolizozom oluşumuna neden olur. Otolizozomlar, otofagozomların lizozomlarla füzyonu ile oluşur. Bu otolizozomlar, parçalanması hedeflenen molekülleri içerir. Otofajinin son aşaması, makromoleküllerin otolizozomlar içinde parçalanmasıdır. Bu süreç makromolekülleri amino asitler, yağ asitleri ve nükleotitler gibi daha küçük bileşenlere ayırır (White vd., 2015).



Şekil 2.4. Otofajinin moleküler mekanizması (White vd., 2015).

Otofajinin düzenlenmesinde rol alan başlıca yollar arasında PI3K/AKT/mTORC1, MAPK, AMPK yolağı ve Bcl-2 protein ailesi yer almaktadır (Gillson vd., 2022). PI3K/AKT/mTORC1 yolağında mTORC1, otofajiyi negatif olarak düzenleyen bir protein kompleksidir. Bu nedenle, PI3K/AKT/mTORC1 yolağının aktivasyonu otofajinin

inhibisyonuna yol açar (C. H. Jung vd., 2010). Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu otofajideki bir diğer önemli yolaktır. Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) gibi MAPK yolu bileşenlerinin aktivasyonu, içeriğe bağlı olarak otofajiyi teşvik veya inhibe edebilir (Mollinedo & Gajate, 2019). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) hücrel enerji dengesini düzenleyen bir proteindir, besin yoksunluğu veya stres koşullarına yanıt olarak aktive olarak hücrel geri dönüşüm ve enerji üretimi ihtiyacına işaret eder. AMPK'nın aktivasyonu, mTORC1'i inhibe ederek ve otofaji ile ilgili diğer proteinleri aktive ederek otofajiyi uyarır (Dunlop & Tee, 2013). Bcl-2 hücre ölümünü ve hayatta kalmayı düzenleyen bir protein ailesidir. Bcl-2 proteinleri, otofaji ile ilişkili diğer proteinlerle etkileşime girebilir ve otofajiden sorumlu yapılar olan otofagozomların oluşumunu önleyebilir (H.-D. Xu & Qin, 2019).

Otofajik süreçteki regülasyonun bozulması birçok patolojik durumun gelişimine neden olabilir. Kanser oluşumu ve ilerlemesi bağlamında bu durumu incelediğimizde otofajinin kanserde hem tümör baskılayıcı hem de tümör büyümesinin destekleyicisi olarak görev yaptığı ikili bir role sahip olduğu görülmektedir. Kanser oluşumunun ilk basamaklarında otofajinin daha çok tümör oluşumunu baskılayıcı bir etki gösterdiği bilinmektedir (Galluzzi vd., 2015). Bu fonksiyonunu genomik instabiliteyi ve DNA hasarını artırabilecek hasarlı proteinlerin ve organellerin temizlenmesini sağlayarak ve hücre ölümünü uyararak gerçekleştirebilir (Mathew vd., 2007; Takamura vd., 2011). Öte yandan otofaji, kanserin ileri evrelerinde geri dönüştürülmüş besinler, organeller ve proteinler gibi hücrel bileşenlerin parçalanmasından enerji sağlayarak tümör büyümesini destekleyebilir (Kimmelman & White, 2017). Otofajik yolağın PDAK'daki durumuna bakıldığında ilerlemiş PDAK'nın normal pankreas veya düşük dereceli PDAK'ya kıyasla yüksek otofajiye sahip olduğu ve otofajideki bu artışın belirleyici (driver) mutasyonlar ve tümör mikroçevresindeki artan stres tarafından yönlendirildiği açıklanmaktadır (S. Yang & Kimmelman, 2011). Otofaji, stres altındaki kanser hücrelerine makromoleküllerin parçalanması yoluyla ATP üretir ve böylece alternatif bir enerji kaynağı sağlayarak kanser hücrelerinin hipoksik koşullara adaptasyonuna ve alternatif yolları düzenleyerek tümörün sağ kalımına yardımcı olabilir (S. Yang & Kimmelman, 2011). PDAK'daki otofaji artışı birçok mekanizma ile ilişkilendirilmiştir. Otofajinin düzenlenmesinde yer alan yollar, tümör mikroçevresindeki (TME) stres durumu AMPK ve HIF-1/2 gibi stresle ilişkili diğer proteinler arasındaki denge tarafından bu seviye belirlenir (Gillson vd., 2022).

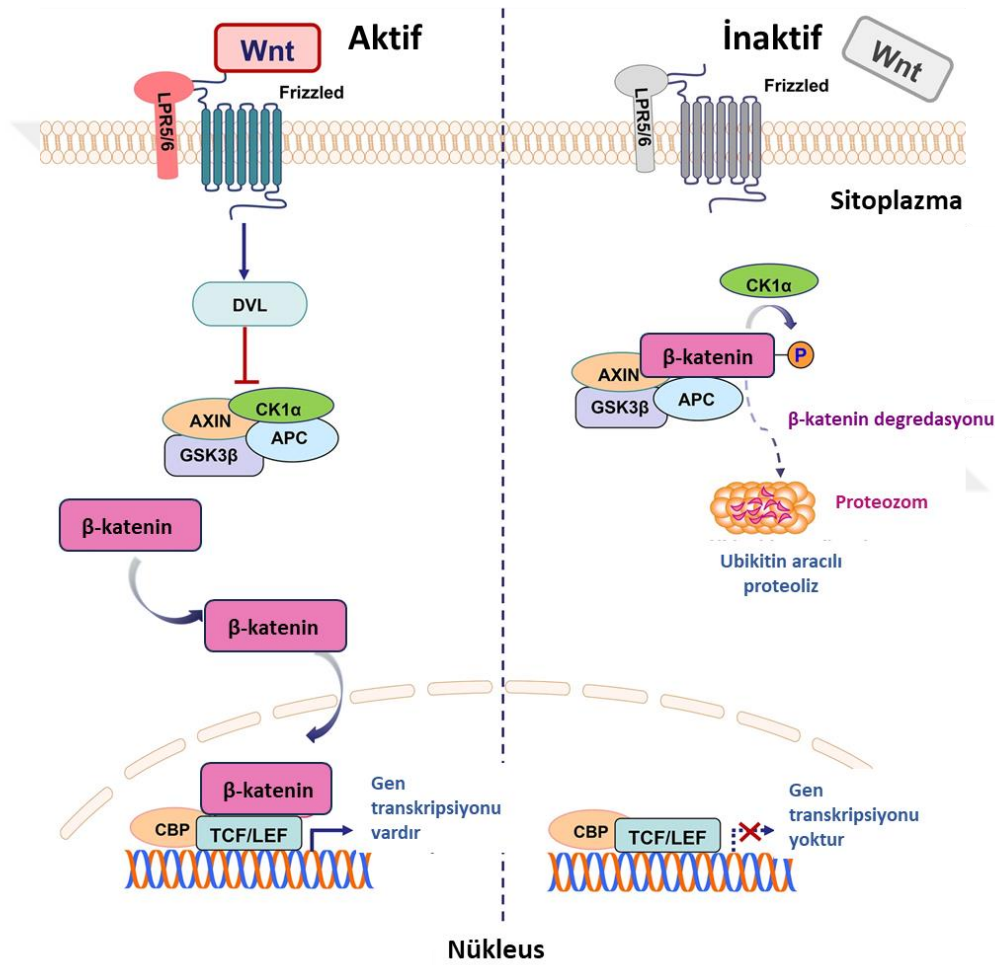
2.3.1. VPS34

Fosfatidilinositol 3-kinaz katalitik alt birim tip 3 (PI3KC3) olarak da bilinen VPS34, otofajide kritik bir rol oynayan sınıf III fosfatidilinositol 3-kinazdır (PI3K). VPS34, otofaji ile ilgili proteinlerin otofagozomal membrana alınması için gerekli olan fosfatidilinositol 3-fosfatı (PI3P) üretir (Kim vd., 2013). VPS34, hücrelerdeki aktivitesini ve lokalizasyonunu düzenlemek için diğer proteinlerle farklı kompleksler oluşturur. VPS34/sınıf III PI3K kompleksi olarak da bilinen standart VPS34 kompleksi, VPS34, VPS15, Beclin-1 ve ATG14L'den oluşur (Zhong vd., 2009). Bu kompleks, otofajinin başlatılması ve düzenlenmesi için kritiktir ve diğer otofaji ile ilişkili proteinleri yapıya kazandırmak için PI3P'in üretildiği fagofor montaj bölgesine yerleşir (Hurley & Young, 2017). Çalışmalar, VPS34'ün çeşitli kanseri hücrelerinde yukarı regüle edildiğini ve aşırı ekspresyonunun kötü prognoz ve kemoterapiye karşı artan direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Piffoux vd., 2021). Ayrıca araştırmalar, VPS34'ün meme kanseri hücrelerinde otofajinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını ve VPS34'ün inhibisyonunun meme kanseri hücrelerini kombinasyonel tedaviye daha duyarlı hale getirebileceğini de göstermiştir (Dyczynski vd., 2018).

2.4. Wnt/ β -katenin

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması için çok önemli bir düzenleyicidir ve düzensizliği, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkta görülmektedir (Y. Zhang & Wang, 2020). Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunu uyaran Wnt ligandları bir çeşit glikoproteindir ve tam fonksiyon gösterebilmesi için lipid modifikasyonu adı verilen bir süreçten geçmesi gerekir (Komiya & Habas, 2008). Wnt/ β -katenin yolu için ana Wnt protein ligandlarından biri Wnt3a'dır (Liu vd., 2022). Wnt ligandı modifiye edildikten sonra, frizzled-ilişkili protein ailesi adı verilen bir reseptör grubuna bağlanır. Wnt ligandı için eş reseptörler olan LRP5/6 adlı diğer proteinleri de içeren bir kompleks oluşmuş olur. Bu kompleksin oluşumu, çeşitli hücresel süreçlerde yer alan Wnt sinyal yolunun aktivasyonu için önemlidir. Ligandlar reseptöre bağlandığında Dishevelled (Dvl) adı verilen bir proteinin aktivasyonunu tetikler. Dvl'nin aktivasyonu APC, Axin ve GSK-3 β proteinlerini içeren β -katenin degradasyon kompleksinin ayrışmasına yol açar. Degradasyon kompleksinin ayrışması, β -katenin'in nükleer membran boyunca yer değiştirmesine ve hücrenin çekirdeğine girmesine izin verir. Çekirdekte β -katenin, TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ailesi olarak adlandırılan bir grup proteine bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Komiya & Habas, 2008). Wnt/ β -katenin sinyal yolu, hücre döngüsü, EMT, anjiyogenez, apoptoz direnci ve kanser kök hücrelerinin korunması gibi çeşitli kanser özelliklerinin ortaya çıkmasından sorumlu

genleri düzenleyerek pankreas karsinogenezinde önemli bir rol oynar (Ram Makena vd., 2019). Yapılan bazı pankreas kanseri çalışmalarında PDAK ve normal pankreas doku örneklerinin mikroarray analizi ile Wnt sinyal yolağının PDAK onkogeninde rol oynadığı belirlenmiştir (Pompella vd., 2020). Ayrıca pankreas kanseri dokularında Wnt ligandlarının ekspresyonunda artış olduğu, Wnt/ β -katenin yolunun inhibe edilmesinin ise PDAK hücrelerinde tümör proliferasyonunu bloke ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Pasca di Magliano vd., 2007). Yine yapılan başka çalışmalarda, hipoksik koşullardaki pankreas tümörlerinde HIF-2 α , β -katenin ile bir kompleks oluşturarak tümör gelişimini desteklerken β -katenin aktivitesini artırıp stabilize ettiği ortaya konmuştur (Tao vd., 2021).



Şekil 2.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun moleküler mekanizması (Tao vd., 2021).

Wnt/ β -katenin yolunun birçok düzenleyicisi bulunmaktadır. Otofaji de bu yolağa etki eden mekanizmalardan biridir. Ortaya çıkan kanıtlar, otofaji ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu arasında ikili bir ilişki olduğunu ve herhangi bir yolun düzensizliğinin diğerini etkileyebileceğini göstermektedir (Lorzadeh vd., 2021). Otofajinin, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunda kilit rol oynayan β -katenin ve Dishevelled gibi proteinlerin degrade olmasına sebep olarak Wnt/ β -katenin yolunun aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir

(Lorzadeh et al., 2021). Bununla birlikte, daha az literatür bilgisi olsa da bazı durumlarda Wnt/ β -katenin otofajinin birbirini pozitif olarak regüle ettiği de gösterilmiştir (Ríos vd., 2018; Ye vd., 2021). Genel olarak bu bulgular, otofajinin hücresel bağlamda Wnt/ β -katenin sinyalini hem yukarı hem de aşağı yönde düzenleyebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, ilgili moleküler mekanizmaları ve hastalıkta bu etkileşimi hedeflemenin potansiyel terapötik etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Son araştırmalar, otofajinin düzensizliğinin kanserin ilerlemesine katkıda bulunabileceğini ve otofajiyi hedeflemenin umut verici bir terapötik yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, pankreas kanserinde otofaji düzensizliğinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. VPS34, otofajinin kilit düzenleyicilerinden biridir ve düzensizliği, çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, otofajinin ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının birbirleri üzerindeki etkisi henüz tam olarak tanımlanamamıştır. Bu çalışmada, VPS34'ün autophinib inhibitörü ile susturulması gerçekleştirilerek; otofajinin pankreas kanseri hücrelerindeki etki mekanizması ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamıza konu olan PANC-1 (ATCC® CRL-1469™) ve MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420) insan PDAK hücre hatları ATCC® (American Type Culture Collection, Rockville)'den elde edilmiştir. PANC-1 ve MIA PaCa-2 duktal adenokarsinom hücre hatları %10 fetal sığır serumu (FBS, Serox, SF101H-500) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Capricorn, PS-B) içeren yüksek glikoz DMEM besiyeri (Capricorn, DMEM-HA) bulunan flasklarda 37°C'de %95 nem ortamında, %5 CO₂'li etüvde çoğaltılmıştır.

3.1.1 Hücre hattının dondurulması

Adherent hücrelerin flask yüzeyinden kalkmaları için Tripsin-EDTA (Capricorn, TRY-3B) uygulanmıştır. Flask 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde yaklaşık 5 dakika (dk) inkübe edildikten sonra hücrelerin kalktığı inverted mikroskop ile bakılarak teyit edilmiştir. Kalkan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenmiş, flasktaki hücreler falkon tüpe toplanmış ve 1500 rpm'de 4 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Uygun miktarda taze besiyerinde çözdürülen pellete %10 oranında Dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek hücreler kriyotüplere aktarılmıştır. Hücreler -20°C'de dondurulduktan sonra -80°C'de kaldırılmıştır.

3.1.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözdürülmesi

Dondurulmuş hücreler 37 °C'de hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra taze besiyeri içeren falkon tüpe alınmıştır. 1500 rpm'de 4 dk santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pellet besiyeri ile çözdürülmüştür. PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücreleri uygun miktarlarda flasklara ekilmiş 37°C'de %95 nem ortamında, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler flask yüzeyinin %80-%85'ini doldurana kadar iki günde bir besiyeri değiştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Flask dolduğunda pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.1.3. Hücre hattının pasajlanması

Flask yüzeyi %80-85 oranında dolduğunda eski besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden kalkması için 1-2 ml Tripsin-EDTA eklendikten sonra hücreler 3-4 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı inverted mikroskopta kontrol edilmiştir. Tripsin- EDTA miktarının iki katı olacak şekilde yeni besiyeri flaska eklenmiş ve hücre-besiyeri içeriği falkon tüpe aktarılmıştır. Santrifüj işlemi 1500 rpm'de 4 dk olacak şekilde yapılmış ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pellet uygun miktarda

besiyeri ile çözdürülerek taze besiyeri bulunan flasklara ekilmiştir. Hücreler 37°C’de %95 nem ortamında, %5 CO₂’li etüvde inkübe edilmiştir.

3.2. Autophinib stok solüsyonun hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız, VPS34 inhibitörü olarak seçilen Autophinib (MedChemExpres, HY-101920) ticari olarak satın alınmıştır. Moleküler ağırlığı 346.73 g/mol olan bu madde protokole uygun olarak DMSO ile çözdürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti alikotlanarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Sitotoksisite analizi

Autophinib uygulamasının PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için Geliştirilmiş Hücre Sayım Kiti 8 (WST-8/CCK8) (Elabscience, E-CK-A362) kullanılmıştır. Hücre çoğalması ve sitotoksisitesinin tespitinde kullanılan kolorimetrik bir test kitidir. WST-8, elektron bağlama reaktifi varlığında dehidrojenazlar tarafından turuncu formazana indirgenebilen MTT'ye benzer bir bileşiktir. Üretilen formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Absorbansın 450 nm’de ölçülmesiyle canlı hücre miktarı dolaylı olarak hesaplanabilmektedir.

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 2×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra çeşitli konsantrasyon aralıklarında autophinib uygulaması yapılmıştır. Hücreler 24, 48 ve 72 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyonun sonunda besiyeri aspire edilerek kuyucuklara 100 µl taze besiyeri ve 10 µl CCK-8 Buffer eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuktaki absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ELISA cihazında (BioTek Epoch) 450 nm ve 630 nm dalga boyunda ölçülerek tüm konsantrasyonlar için % canlılık-ölüm belirlenmiştir. GraphPad Prism 8.01 programıyla IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.4. Koloni formasyon analizi

Koloni formasyon analizi için sitotoksisite testi ile belirlenmiş olan IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri baz alınmıştır. Bu analiz için 6 kuyucuklu plakalara kontrol ve doz grupları 3 tekrarlı olacak şekilde her biri kuyuya 2×10^3 hücre ekimi yapılmıştır. Hücre ekiminden 24 saat sonra dozlar 48 saat süreyle uygulanmıştır. Seçilen dozlarla inkübasyon sonrasında 10 gün boyunca hücreler kültüre edilmiş ve 2 gün arayla besiyerleri değiştirilmiştir. Koloni oluşumları inverted mikroskop altında doğrulandıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. Soğuk metanol uygulaması

ile hücreler fikse edilmiş ve sonra kristal viyole boyası ile boyanmıştır. Yıkama işleminin ardından plakalar kurumaya bırakılmış ve sonrasında koloniler sayılmıştır.

3.5. Otofaji analizi

Otofaji analizi için LC3-II Kantitasyon ELISA kiti (Cell Biolabs, CBA-5116) ilgili firmadan temin edilmiştir. Kit, hücre lizat örneklerinde LC3'ün tespiti ve kantitasyonu için geliştirilmiş bir enzim immunoassaydir. Test, sitozolik pro-LC3 ve LC3-I'i uzaklaştırmak ve otofagozom membranına bağlı LC3-II'yi korumak için seçici bir permeabilizasyon prosedürü kullanır. Lizat örneklerindeki bilinmeyen LC3-II miktarı, absorbansı bilinen bir LC3 standart eğrisiyle karşılaştırılarak belirlenir. Kontrol ve doz grupları için 6 kuyucuklu plakalara %80 yoğunlukta olacak şekilde hücre ekimi yapılmış ve sonrasında hücreler seçilen dozlar ile 48 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 1 mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 2 mL 1X PBS ile yıkanmıştır. PBS tamamen aspire edildikten sonra 1 mL 1X Sitozolik LC3 Uzaklaştırma Reaktifi eklenerek, orbital çalkalayıcıda 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücreler yeniden 1 mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 2 mL 1X PBS ile üç kez yıkanmıştır. Son PBS yıkaması tamamen aspire edildikten sonra hücrelere önceden soğutulmuş 1X RIPA tamponu eklenmiştir. Plaka buza yerleştirilerek 10 dk inkübe edilmiştir. Hücreler yüzeyden kazınarak santrifüj tüplerine toplanmış ve 12000 g 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant toplanarak protein konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından ELISA protokolüne geçilmiştir. Anti-LC3 Antikor Kaplı Plakaya 100 µL hacimde 3 tekrarlı olacak şekilde lizat örnekleri, LC3 standardı ve blank ayrı ayrı kuyulara eklenmiştir. Gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiş ve ardından kuyu başına 250 µL 1X Yıkama Tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Her bir kuyuya 100 µL seyreltilmiş Anti-LC3 antikor eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Yeniden yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş HRP conjugated sekonder antikor eklenerek orbital çalkalayıcıda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yeniden yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her kuyuya 100 µL Substrat Solüsyonu eklenmiş ve orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Her kuyuya 100 µL Durdurma Solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılmış ve mikroparka okuyucu ELISA cihazında 450 nm'de ölçüm yapılmıştır.

3.6. Apoptoz analizi

Apoptoz analizi için Human CASP3 (Caspase 3) ELISA kiti (Elabscience, E-EL-H0017) tedarikçi firmadan satın alınmıştır. Kontrol ve doz gruplarından hücre lizatı protokole göre elde edilmiştir. Kitte sağlanan CASP3'e spesifik antikor ile kaplanan ELISA plakasına,

100 µL hacimde olacak şekilde örnekler ve standartlar 3 tekrarlı eklenmiştir. Daha sonra Human CASP3'e spesifik biyotinlenmiş tespit antikoru ve Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı her bir mikro plaka kuyucuğuna art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Substrat çözeltisi her bir kuyucuğa eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklara durdurma çözeltisi eklenerek 450 nm'de mikrolaka okuyucu ELISA cihazında okuma gerçekleştirilmiştir.

3.7. Otofaji, Wnt/β-katenin ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Kontrol ve doz gruplarında Otofaji, Wnt/β-katenin ve apoptoz ile ilişkili önemli genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, ardından cDNA sentezlenmiştir.

3.7.1. Hücre hatlarından total RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi

Total RNA izolasyonu için 6-kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 250.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca hücreler 37°C'de %95 nem ortamında, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Ardından hücelere doz grupları için 5 µM ve 10 µM olacak şekilde uygulama yapılmıştır. 48 saatin sonunda besiyerleri uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 500 µL RiboEx (GeneAll, 301-001) eklenmiş ve 5-10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler kazınarak ependorf tüplere toplanmıştır. Her bir ependorf tüpe faz oluşturması için 100 µL kloroform eklenmiş ve 15 saniye (sn) boyunca vortekslenmiştir. Ependorf tüpleri 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alınarak üzerine 250 µL izopropanol damla damla eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyonun ardından 14000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 750 µL önceden soğutulmuş %70'lik etanol ilave edilmiştir. 14000 g'de 5 dk santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak oluşan RNA pelletleri kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin sonunda pellet nükleaz içermeyen su ile çözdürülmüştür. Sonrasında RNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.2. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi

İzole ettiğimiz RNA'ların kalite ve miktarının belirlenmesi için RNA örneklerimizden 1 µL alınarak nanodrop cihazında ölçümler yapılmıştır. A260/A230 nm için 2,0-2,4 ve A260/A280 nm için 2±0,1 arasında olan RNA örnekleri analizlerde kullanılmıştır. Olası DNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak amacı ile RNA örneklerine üretici firmanın (Thermo

Scientific, #EN0521) protokolü doğrultusunda DNase-I enzimi eklenerek DNase işlemi uygulanmıştır. Kullanılacak RNA miktarı 2000 ng'a göre ayarlanmıştır. 2 µl 10X buffer ve 2 µl 1U/µl DNase-I enzimi ilave edilmiş ve 20 µl'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. 37°C'de 30 dk inkübasyondan sonra örnekler 2 µl 50 mM EDTA eklenmiş ve 65°C'de 10 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. DNase uygulanmış RNA örneklerinin tekrar ölçümleri yapılmış ve aynı gün cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.7.3. cDNA sentezi

RNA'nın cDNA'ya çevirimi için cDNA sentezi kiti kullanılmış ve üretici firmanın (iScript™ cDNA sentez kiti, Bio-Rad, 170-8891) talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. DNase-I uygulamasından sonra RNA örneklerimiz 1000 ng' göre hesaplanarak kalıp olarak kullanılmıştır. 5X iScript reaksiyon karışımından 4 µL, Reverse Transkriptaz enziminden ise 1 µL ve nükleaz içermeyen su ile de 20 µL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Ardından örnekler 25°C'de 5 dk, 46°C'de 20 dk ve 95°C'de 1 dk şeklinde inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.4. qRT-PZR

qRT-PZR analizinde kullanılan genlere yönelik primerler, IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/site>) programı kullanılarak tasarlanmıştır. qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş genler Tablo 3.1, Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te sunulmuştur. qPZR analizi, çift iplikli DNA'ya bağlanabilen BrightGreen boyasını içeren qPZR mastermiks (BrightGreen 2X qPZR MasterMix – ROX, ABM, MasterMix-R) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için; 2X qPZR MasterMiks'den (ABM, MasterMix-R) 5 µL, ileri ve geri primerin her birinden 5 pMol, cDNA'dan ise 2 µL ilave edilerek, toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 10 µL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon; enzim aktivasyonu (95°C'de 10 dk), denatürasyon (95°C'de 15 sn) ve bağlanma/uzama (60°C'de 60 sn) basamaklarından oluşan PZR protokolü uygulanarak 40 döngü olacak şekilde Gerçek zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad, CFX Connect) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 95°C'de 1 dakika ısıtılıp, 65°C'ye düşürülen ısı, 0,5°C'lik artışlar ile 95°C'ye kademeli olarak yükseltilmiş ve erime eğrisi elde edilmiştir. Reaksiyon sonrası analiz için eşik döngü değerleri (Ct) kaydedilmiştir. Gruplar arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar 2^(-ΔΔCt) metodu ile web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programı ile belirlenmiştir. Normalizasyon için ACTB ve GAPDH referans genleri kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Otofaji ile ilişkili genler

<i>PIK3CA</i>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa izoformu
<i>PRKAA2</i>	Protein kinaz AMP ile aktive olan katalitik alt birim alfa 2
<i>mTORC1</i>	Rapamisin kinazın mekanik hedef proteini 1
<i>ULK1</i>	UNC-51 benzeri kinaz
<i>VPS15</i>	Fosfoinositid-3-Kinaz Düzenleyici Alt Birim 4
<i>ATG14</i>	Otofaji ile ilişkili 14
<i>VPS34</i>	Fosfatidilinositol 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Tip 3
<i>BECN1</i>	Beclin-1
<i>SQSTM1</i>	Sekestozom-1
<i>LAMP1</i>	Lizozomal ilişkili zar proteini 1
<i>ATG5</i>	Otofaji ile ilişkili 5
<i>ATG12</i>	Otofaji ile ilişkili 12
<i>ATG16</i>	Otofaji ile ilişkili 16
<i>ATG7</i>	Otofaji ile ilişkili 7
<i>ATG9</i>	Otofaji ile ilişkili 9
<i>MAPLC3A</i>	Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 alfa
<i>MAPLC3B</i>	Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 beta

Tablo 3.2. Wnt/ β -katenin ile ilişkili genler

<i>CTNN1</i>	Catenin beta 1
<i>GSK3B</i>	Glikojen sentaz kinaz-3 beta
<i>APC</i>	Wnt Sinyal Yolunun APC Regülatörü
<i>DVL1</i>	Dağınık segment polarite proteini 1
<i>DVL2</i>	Dağınık segment polarite proteini 2
<i>LRP5/6</i>	LDL reseptörü ilişkili protein 5/6
<i>HIF1A</i>	Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1 Alfa Alt Birim
<i>CDH1</i>	Kadherin 1
<i>CDH2</i>	Kadherin 2
<i>FN1</i>	Fibronektin 1
<i>LEF1</i>	Lenfoit artırıcı bağlama faktörü 1
<i>TCF7</i>	Transkripsiyon faktörü 7
<i>YWHAZ</i>	Tirozin 3-Monooksijenaz/Triptofan 5-Monooksijenaz Aktivasyon Proteini Zeta
<i>ACTN4</i>	Alfa-aktinin-4
<i>SNAI1</i>	Snail ailesi transkripsiyonel baskılayıcı 1
<i>SNAI2</i>	Snail ailesi transkripsiyonel baskılayıcı 2

Tablo 3.3. Apoptoz ve PDAK ile ilişkili genler

<i>CAS3</i>	Kaspaz-3
<i>CAS7</i>	Kaspaz-7
<i>CAS8</i>	Kaspaz-8
<i>CAS9</i>	Kaspaz-9
<i>BAX</i>	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
<i>BCL2</i>	BCL2 apoptoz düzenleyici
<i>CYCS</i>	Sitokrom C
<i>FADD</i>	Fas Ölüm Alanı Yoluyla İlişkilendirilmiş
<i>TNFA</i>	Tümör nekroz faktörü
<i>JAK2</i>	Janus Kinaz 2
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu
<i>STAT3</i>	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
<i>SMAD4</i>	SMAD Aile Üyesi 4
<i>CCND1</i>	Siklin D1
<i>CMYC</i>	MYC Proto-Onkogen
<i>CDKN1B</i>	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B

3.8. İstatiksel analizler

Gruplar arası karşılaştırma GraphPad Prism yazılımı (Sürüm 8.0.2, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile yapılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

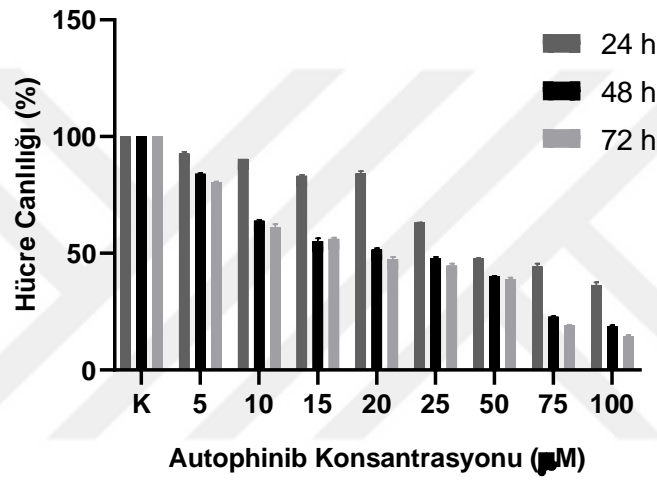




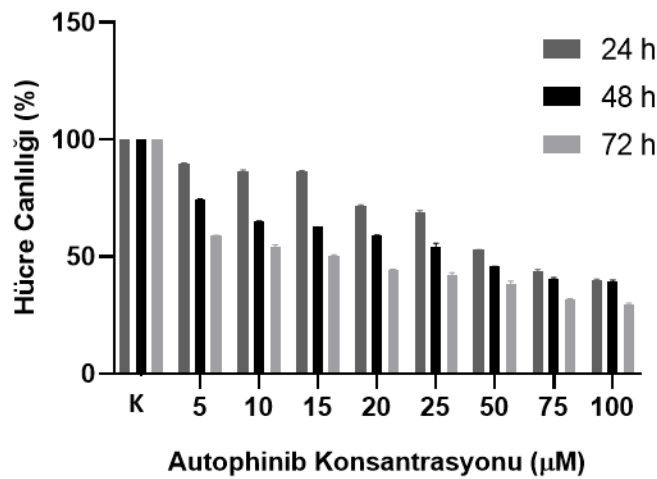
4.BULGULAR

4.1. Autophinib'in PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi

PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde autophinib uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi CCK8 testi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla hücreler 24, 48 ve 72 saat süresince 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyonları kullanılarak autophinib uygulaması yapılmıştır. CCK8 sonuçları değerlendirildiğinde autophinib ile muamele edilen MIA PaCa-2 hücrelerinde (Şekil 4.1) ve PANC-1 hücrelerinde (Şekil 4.2), canlılığın uygulanan konsantrasyona ve zamana bağımlı şekilde azaldığı gözlemlenmiştir.

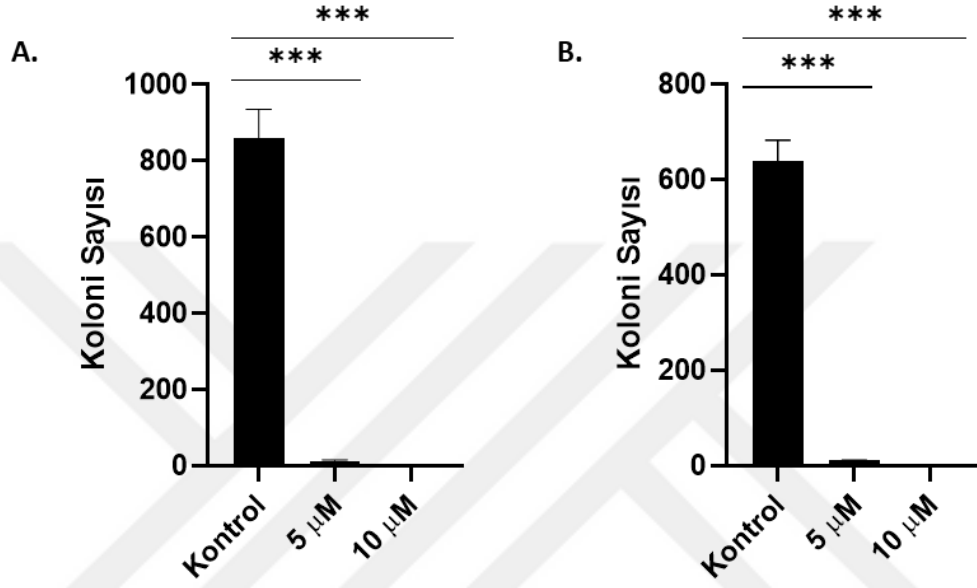


Şekil 4.1. Autophinib uygulamasının MIA PaCa-2 hücre canlılığına etkisi.



Şekil 4.2. Autophinib uygulamasının PANC-1 hücre canlılığına etkisi.

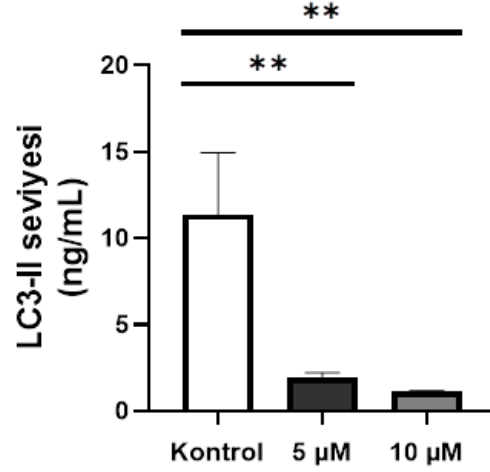
İlerleyen analizler için kullanılacak olan konsantrasyon değerleri 5 μ M ve 10 μ M olarak belirlenmiş ve 48 saat süresince muamele edilmiştir. Ayrıca PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde bu dozların koloni oluşturma kapasitesi koloni formasyon analizi ile değerlendirilmiştir. 5 μ M ve 10 μ M doz uygulamalarının koloni sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalma gözlemlenmiştir. (Şekil 4.3) (***) ($p < 0,001$).



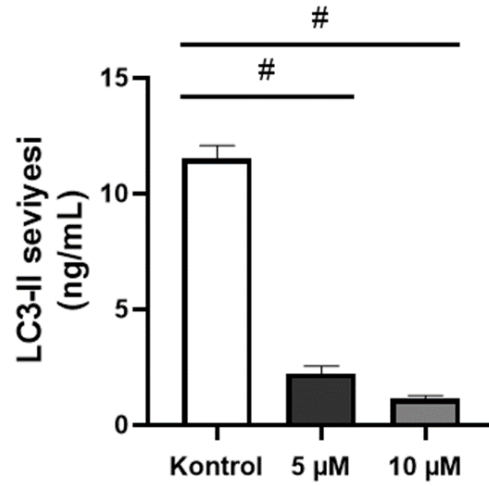
Şekil 4.3. Autophinib uygulamasının A. MIA PaCa-2 ve B. PANC-1 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi.

4.2. Autophinib uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkisi

PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde autophinib uygulamasının otofajik aktivite üzerine etkisi LC-3 II miktarını baz alan kit kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda uygulanan doz grubu hücreleri 48 saat sonunda protokole göre toplanmış ve uygulaması yapılmıştır. Sonuçlara göre 48 saat süresince 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında autophinib uygulamasının kontrol grubu hücrelerine kıyasla MIA PaCa-2 hücrelerinde $p < 0,01$ anlamlılıkta (Şekil 4.4) ve PANC-1 hücrelerinde $p < 0,0001$ anlamlılıkta (Şekil 4.5) otofajik aktivitede azalma meydana getirdiği gözlemlenmiştir.



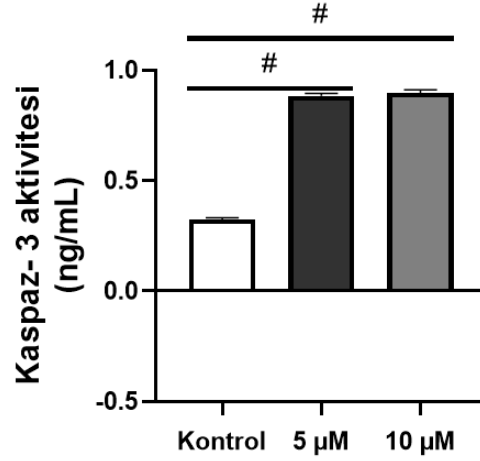
Şekil 4.4. Autophinib uygulamasının MIA PaCa-2 hücrelerinde otofajik aktivite üzerine etkisi.



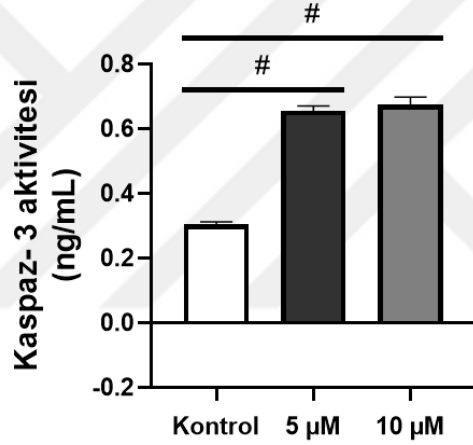
Şekil 4.5. Autophinib uygulamasının PANC-1 hücrelerinde otofajik aktivite üzerine etkisi.

4.3. Autophinib uygulamasının apoptotik aktivite üzerindeki etkisi

Autophinib uygulamasının PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki apoptoz aktivite değişikliği kaspaz-3 kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol, 5 ve 10 µM gruplarına 48 saat autophinib uygulamasının ardından protokole göre devam eden işlemler yapılmıştır. Her iki hücre hattı için de kontrol grubu, 5 ve 10 µM dozlarla kıyaslandığında kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7) (# p<0,0001).



Şekil 4.6. Autophinib uygulamasının MIA PaCa-2 hücrelerinde apoptoz aktivite üzerindeki etkisi.

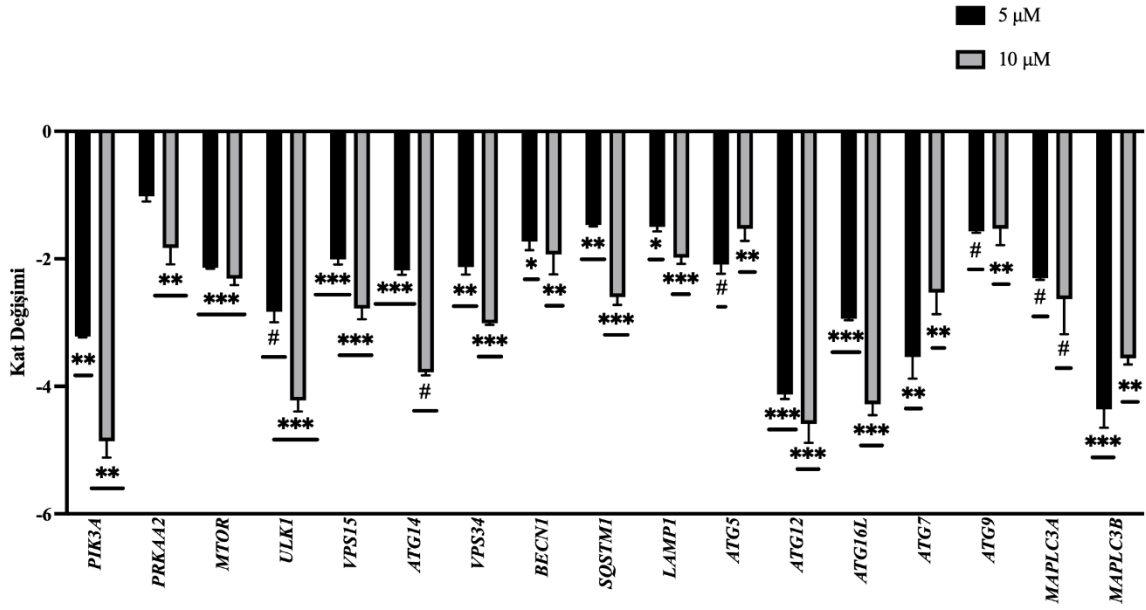


Şekil 4.7. Autophinib uygulamasının PANC-1 hücrelerinde apoptoz aktivite üzerindeki etkisi.

4.4. Autophinib uygulamasının pankreas kanseri hücrelerinde otofaji, Wnt/ β -katenin ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi

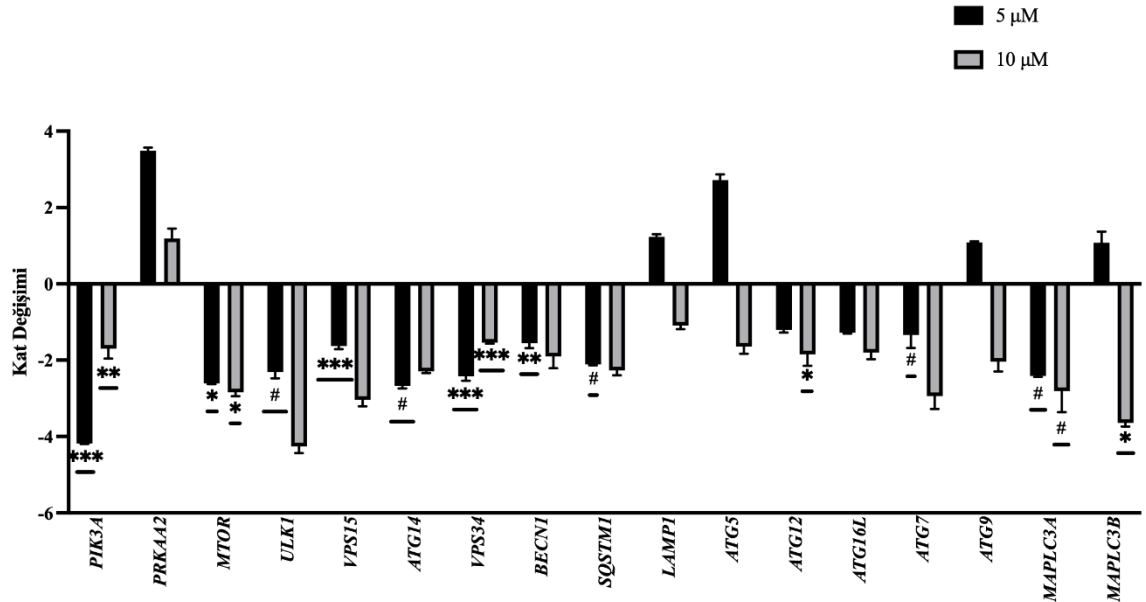
Autophinib uygulamasının PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerindeki gen analizleri; otofaji genleri, Wnt/ β -katenin yolağı genleri ve apoptoz genlerini içermektedir. Bu genlerin mRNA seviyeleri qRT-PZR analizi ile ölçülmüştür.

PANC-1 hücrelerindeki 5 ve 10 μ M doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu hücrelerde otofaji ile ilişkili *PIK3A*, *PRKAA2*, *MTOR*, *ULK1*, *VPS15*, *ATG14*, *VPS34*, *BECN1*, *SQSTM1*, *LAMP1*, *ATG5*, *ATG12*, *ATG16L*, *ATG7*, *ATG9*, *MAPLC3A*, *MAPLC3B* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir. (Şekil 4.8) (**p<0,01)



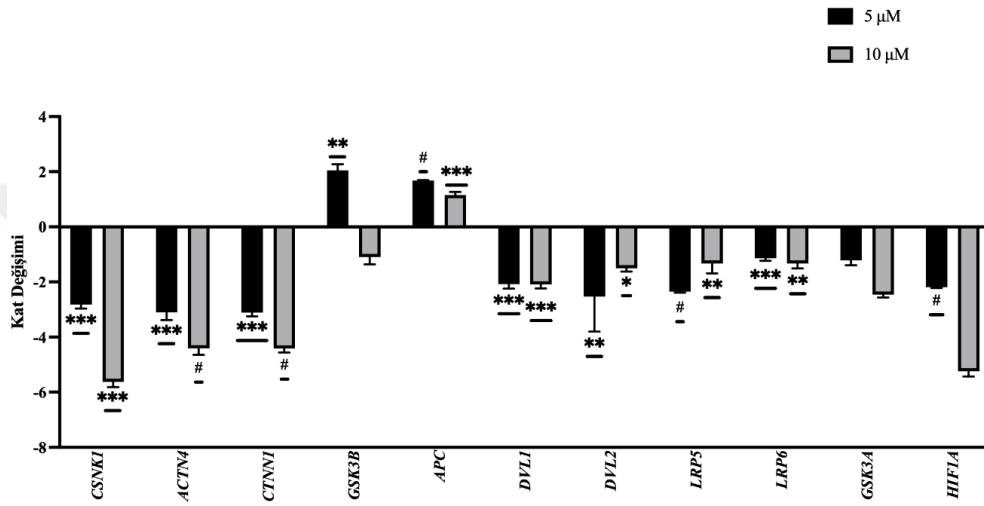
Şekil 4.8. PANC-1 hücre hattında 5 ve 10 μM doz uygulamanın otofaji genleri üzerinde kat değişimi etkisi.

MIA PaCa-2 hücrelerinde 5 μM doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu hücrelerde otofaji ile ilişkili *PIK3A*, *MTOR*, *ULK1*, *VPS15*, *ATG14*, *VPS34*, *BECN1*, *SQSTM1*, *ATG7*, *MAPLC3A*, genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalış gözlemlenmiş, 10 μM doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise *PIK3A*, *VPS34* ve *MAPLC3A* genlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. (Şekil 4.9) (# p<0,0001, *** p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).



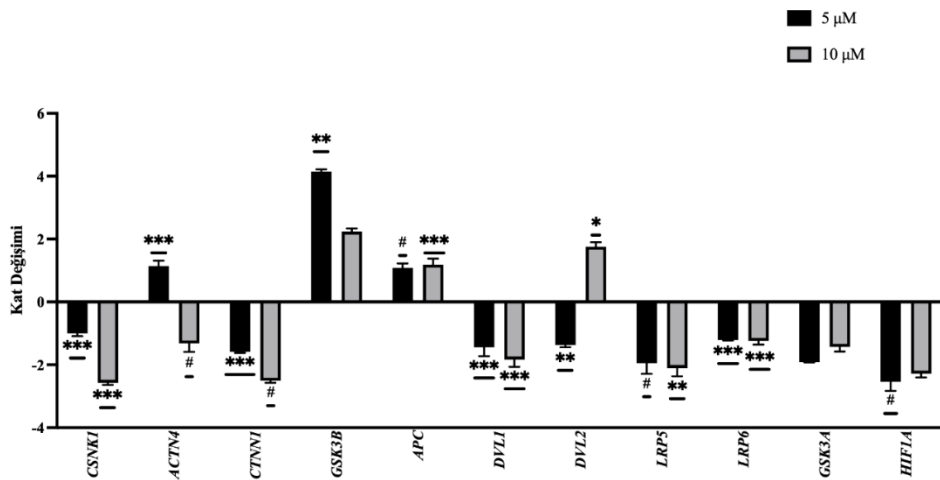
Şekil 4.9. MIA PaCa-2 hücre hattında 5 ve 10 μM doz uygulamanın otofaji genleri üzerinde kat değişimi etkisi.

Wnt/ β -katenin yolağı gen ekspresyon seviyeleri PANC-1 hücrelerinde 5 μ M doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *CTNN1*, *CSNK1*, *DVL1*, *DVL2*, *LRP5*, *LRP6*, *HIF1A*, *CDH2*, *FN1*, *LEF1*, *YWHAZ*, *ACTN4*, *SNAI1*, *SNAI2* genlerinde anlamlı bir azalış gözlemlenirken *GSK3B* ve *APC* genlerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0,01$). 10 μ M doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise *CTNN1*, *CSNK1*, *DVL1*, *DVL2*, *LRP5*, *LRP6*, *HIF1A*, *CDH2*, *FN1*, *LEF1*, *YWHAZ*, *ACTN4*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TCF7* genlerinin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma gözlemlenirken *APC* geninde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. (Şekil 4.10) (# $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).



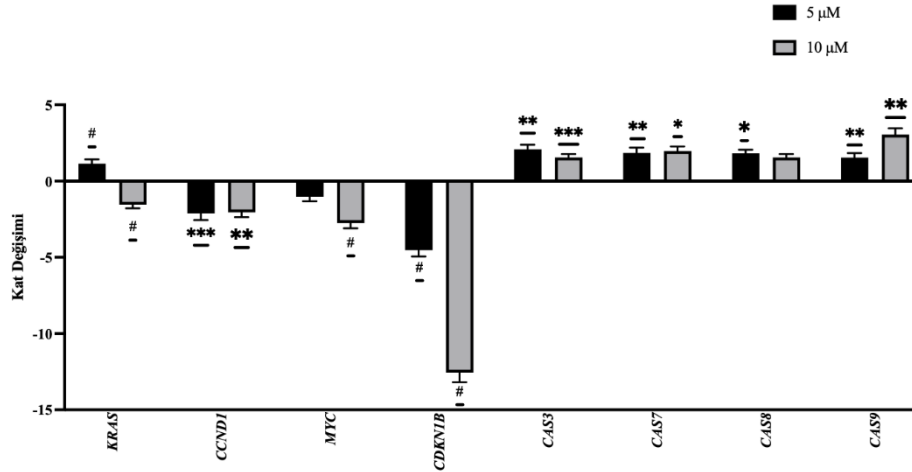
Şekil 4.10. PANC-1 hücre hattında 5 ve 10 μ M doz uygulamanın Wnt/ β -katenin yolağı genleri üzerinde kat değişimi etkisi.

MIA PaCa-2 hücrelerinde 5 ve 10 μ M doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu hücrelerde Wnt/ β -katenin yolağı ile ilişkili *CTNN1*, *CSNK1*, *DVL1*, *LRP5*, *LRP6* ve *HIF1A* genlerinde anlamlı bir azalış gözlemlenirken *GSK3B* ve *APC* genlerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.11) (# $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).



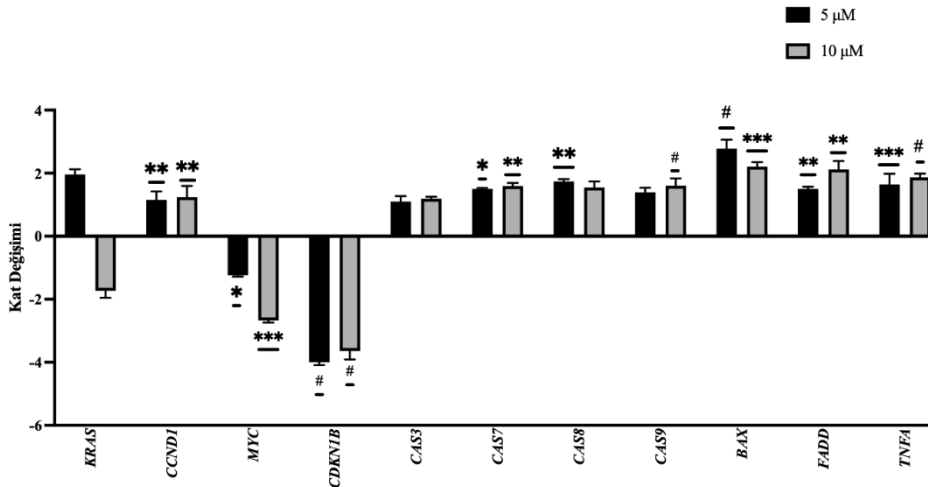
Şekil 4.11. MIA PaCa-2 hücre hattında 5 ve 10 μ M doz uygulamanın Wnt/ β -katenin yolağı genleri üzerinde kat değişimi etkisi.

PANC-1 hücrelerindeki 5 ve 10 µM doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu hücrelerde apoptoz ilişkili genlerden olan *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* genlerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca PDAK ile ilişkili genlerden olan *KRAS*, *CCND1*, *MYC*, *CDKN1B* için PANC-1 hücrelerindeki 10 µM doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu genlerde anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12) (# $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).



Şekil 4.12. PANC-1 hücre hattında 5 ve 10 µM doz uygulamanın apoptoz ve pankreas kanseri ilişkili genler üzerindeki kat değişimi etkisi.

MIA PaCa-2 hücrelerinde 5 ve 10 µM doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptoz ilişkili *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *BCL2*, *CYCS*, *FADD* ve *TNFA* genlerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0,01$). Mia-PaCa-2 hücrelerinde 5 µM doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PDAK ile ilişkili olan *CCND1*, *MYC*, *CDKN1B* genlerin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiş ayrıca 10 µM doz grubu grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da *MYC*, *CDKN1B* genlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.13) (# $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).



Şekil 4.13. MIA PaCa-2 hücre hattında 5 ve 10 µM doz uygulamanın apoptoz ve pankreas kanseri ilişkili genler üzerindeki kat değişimi etkisi.



5.TARTIŞMA

Pankreas kanseri birçok unsurun kompleks etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Pankreastaki DNA mutasyonları, özellikle onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücrelerin hızlı ve kontrolsüz bölünmesine yol açarak tümör gelişimine neden olmaktadır (Jones vd., 2008). Bu tümörlerin çoğunluğu pankreasın epitelyal hücrelerinden kaynaklanmakta olup, özellikle pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAK) en sık görülen formudur. En ölümcül kanser türlerinden biri olan PDAK'nın etkili tedavilerin olmaması nedeniyle, hastalarının beş yıllık genel sağkalımının %10'dan az olduğu bilinmektedir (Siegel vd., 2022). Bu malignite için etkili klinik sonuçların önündeki en büyük engel, hastalığın hızlı ilerlemesi ve gizli prognozuna bağlı olarak gecikmiş tanısı ve mevcut radyoterapi, kemoterapi gibi tedavilere karşı gösterdiği direncidir (Murakami vd., 2019). Bu nedenle, pankreas kanserinin daha başarılı bir şekilde tedavisi ve erken teşhisi için yeni stratejilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanserli hücrelerin zayıf prognoz göstermesi ve çeşitli terapilere karşı direnç geliştirmesi hücrenin homeostozini sağlayan moleküler mekanizmaların değişiminden kaynaklanabilmektedir. Bu mekanizmalardan biri olan otofaji, hasarlı ya da yaşlı organellerin temizlenmesini, makromoleküllerin parçalanarak geri dönüştürülmesini içeren ve böylece hücrel homeostaziye koruyan bir yoldur (Galluzzi vd., 2017). Otofaji, kanser gelişimi ve ilerlemesi bağlamında hem tümör oluşumunu engelleyen hem de destekleyen bir rol oynar. Erken evrelerde, otofaji tümör baskılayıcı bir etki göstererek, hasarlı proteinleri ve organelleri temizler, hücre ölümünü uyararak tümör oluşumunu engelleyebilir. Ancak ilerlemiş pankreas adenokarsinomlarında, otofaji artışı, geri dönüştürülmüş besinlerin ve bunlardan elde edilen enerjinin tümör hücreleri tarafından kullanılmasıyla tümör büyümesini destekleyebilir (Galluzzi vd., 2015). Özellikle, PDAK'ın yüksek otofajik aktivite göstermesi, tümör mikroçevresindeki stres koşulları ve sinyal yolları tarafından yönlendirilebilmektedir. Bu durum, kanser hücrelerine hipoksik koşullara adaptasyon ve alternatif enerji kaynakları sağlama gibi avantajlar kazandırabilir (S. Yang vd., 2011).

Wnt/ β -katenin sinyal yolu hücre çoğalması ve farklılaşması için çok önemli bir düzenleyicidir ve düzensizliği, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalık türünde görülmektedir (Liu vd., 2022). Yapılan bazı pankreas kanseri çalışmalarında, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun, pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı ve Wnt/ β -katenin yolunun inhibisyonunun PDAK hücrelerinde tümör proliferasyonunu bloke ettiği ve apoptozu

indüklediği gösterilmiştir (Pasca di Magliano vd., 2007). Wnt/ β -katenin yolunun birçok düzenleyicisi bulunmaktadır, otofaji de bu yolağa etki eden mekanizmalardan biridir (Lorzadeh vd., 2021). Otofajinin Wnt/ β -katenin sinyal yolunu etkilediği mekanizmaları incelediğimizde, bu iki yol arasında karmaşık bir etkileşim olduğunu gözlemliyoruz. Otofaji, Wnt/ β -katenin sinyal yoluna farklı şekillerde etki edebilir. Otofaji, Wnt/ β -katenin sinyal yolu bileşenlerinin degradasyonunu düzenleyerek etki gösterebildiği gibi bazı durumlarda da Wnt/ β -katenin ligandları otofajinin uyarılma sinyalini de düzenleyebilir (Gao vd., 2010; Ríos vd., 2018). Bu nedenle, pankreas kanseri bağlamında otofaji ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunun etkileşimini anlamak, terapötik müdahaleler için yeni hedeflerin belirlenmesinde önemli bir adım olabilir.

PDAK gelişimine etki eden moleküler mekanizmalar çalışılan bir alan olsa da, otofajinin bu süreçteki çift yönlü rolü ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile olan etkileşiminin daha ayrıntılı incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bu nedenler doğrultusunda, tez çalışmasında, pankreas kanserinde otofaji düzensizliğinin altında yatan mekanizmaları daha net anlamak amacıyla otofajinin ana düzenleyicilerinden biri olan VPS34 hedeflenerek pankreas kanserinde otofajik seviyeye ve bunun Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile etkileşimine bakılmıştır. Bu amaçla, otofajinin moleküler mekanizması autophinib ile inhibe edilmiş, otofaji mekanizması otofaji aktivite testi ile incelenmiş ardından da apoptoz etkinliği kaspaz-3 kiti ile değerlendirilmiştir. İnsan PDAK hücre hatlarından olan PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde bu inhibisyonun etkinliği otofaji, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ve apoptoz ilişkili genler üzerinden qRT-PZR kullanılarak değerlendirilmiştir.

Pankreas tümörlerinin, diğer epitelyal tümörlerle karşılaştırıldığında bazal koşullar altında daha yüksek bir otofajik aktivite gösterdikleri bilinmektedir (S. Yang & Kimmelman, 2011). Otofajinin, pankreas tümörlerinin gelişimiyle eş zamanlı olarak arttığı ve bu artan otofaji aktivesinin PDAK gelişiminde önemli bir yere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. PDAK'nın desmoplastik yapısı, tümör hücrelerinin besin ve oksijen almasını zorlaştırır (Lyssiotis & Kimmelman, 2017). Bu zorlu koşullarda tümörün büyümesi için otofajinin gerekli olduğu gösterilmiştir (S. Yang vd., 2011). Aynı çalışmada PDAK hücrelerinde RNAi ve farmakolojik olarak otofaji inhibisyonu gerçekleştirilmiş ve reaktif oksijen türlerinin artması, DNA hasarının artmasına ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun azalmasına yol açarak pankreas kanseri hücrelerinin büyümesinin baskılandığı hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gözlemlenmiştir (S. Yang vd., 2011). Yapılan başka bir çalışmada PDAK hastalarından alınan dokular incelenmiş ve yüksek otofajik aktivenin kötü prognoz sonucu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Fujii vd., 2008). Otofaji PDAK'nın tümör mikroçevresiyle farklı yollardan

ilişkidedir. PDAK TME'si yüksek hipoksik ortama sahip kanser türleri arasındadır (Hollinshead vd., 2020). Çalışmalar otofajinin hipoksi ile indüklenerek pankreas tümör hücrelerinin bu ortama direnç geliştirmesini sağlayarak hayatta kalmasında rol oynadığını göstermiştir (Tan vd., 2016). Tüm bu bulgular otofajinin PDAK için önemli bir hedef olduğunu göstermektedir.

Klinikte otofaji inhibisyonu için kullanılan CQ ve HCQ tek mevcut ilaçlardır. Bu ilaçlar lizozomun asidik yapısını bozar ve otofagozomların lizozomlarla füzyonunu bloke ederek kargo degradasyonunu engellemiş olur (Y. Yang vd., 2013). Otofajinin farklı basamaklarındaki moleküllerin de hedeflenerek etki mekanizmalarının incelenmesi önem arz etmektedir. Bu sebeple, bu tez çalışmasında otofajinin erken basamaklarında yer alan VPS34 proteini hedeflenerek etkinliği çeşitli yollar üzerinden incelenmiştir. VPS34'ü seçici olarak hedef alan autophinib inhibitörü kullanılarak otofaji inhibe edilmiştir. Autophinib uygulaması farklı kanser hücrelerinde çalışılmıştır. İnsan glioblastoma multiforme (GBM) hücre hatlarında 48 saat boyunca 1 μ M autophinib uygulaması yapılarak hücre canlılığında anlamlı bir azalma ve apoptozda da anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (S. Xu vd., 2022). İnsan meme kanseri hücre hattı MCF7 hücrelerinde autophinib uygulamasının doza bağlı bir şekilde LC3-II miktarını azalttığı belirtilmiştir. Sitotoksikite testi ile IC₅₀ değeri 48 saat uygulamada 19 nM olarak belirlenmiştir (Robke vd., 2017). Bu tez çalışmasında autophinibin pankreas kanseri üzerindeki anti-proliferatif etkilerini incelemek için, PDAK hücrelerinden olan PANC-1 ve MIA PaCa-2'ye WST-8/CCK8 sitotoksikite testi uygulanmıştır. Artan autophinib dozajıyla, hücre canlılığının in vitro olarak PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde hem zamana hem de konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. 48 saatlik autophinib uygulaması baz alınarak IC₅₀ değerleri her iki hücre için de benzer çıkmış ve 10 μ M olarak yuvarlanmıştır. IC₂₀ değerleri de benzerlik göstermiş ve 5 μ M'a yuvarlanarak kullanılmıştır. GBM ve MCF-7 hücre hatlarından daha yüksek konsantrasyonlarda IC₅₀ değeri vermesi pankreas kanserinin agresif ve yoğun fibröz yapısı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. 5 ve 10 μ M doz konsantrasyonları ve 48 saatlik inkübasyon süresi belirlendikten sonra koloni oluşturma kapasiteleri analiz edilmiş, hem PANC-1 hem de MIA PaCa-2 hücrelerinde otofajinin baskılanmasıyla beraber koloni oluşumunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.

Autophinib uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkinliği hem LC3-II ELISA kiti ile hem de gen düzeyinde qRT-PZR analizi ile incelenmiştir. Otofajinin kanserde ikili bir rolü olmasına rağmen, yukarıda ifade edildiği gibi otofaji PDAK gelişiminde tümör ilerlemesini destekleyerek kanser hücreleri için koruyucu bir mekanizma olarak hareket ettiğini

göstermiştir. 5 ve 10 μ M dozlarda 48 saatlik inkübasyon ile autophinib uygulamasının, PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde otofajiyi hem LC3-II ELISA analizinde hem de qRT-PZR analizinde anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. VPS34'ün inhibisyonundan sonra otofaji ile ilgili belirleyici genlerin analizleri gerçekleştirilmiştir. VPS34'ün kanser ile ilişkisi halen çalışılmaktadır fakat araştırmaların çoğu otofajinin indüklenmesi yoluyla VPS34'ün kanser hücrelerinde sağ kalımı ve hücre proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. Bu çalışmalardan birinde, otofaji için seçici substratlardan birisi olan ve otofagozom oluşumunda yer alan p62'nin VPS34 tarafından transkripsiyonel ve fosforilasyon yoluyla aktive edilerek insan meme kanseri hücrelerinin onkojenitesini arttırdığı gösterilmiştir (Jiang vd., 2017). VPS34'ün kolon kanseri, akciğer kanseri ve renal hücreleri ile yapılan çalışmalarda da tümör hücrelerinin sağ kalımını desteklediği gösterilmiştir (Dayde vd., 2016; Kobylarz vd., 2020; Pasquier, 2015). Bu çalışmalarla benzer olarak VPS34'ün hedeflenmesi PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde sitotoksositeye yol açarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır. Ayrıca otofajide kritik rol oynayan *PIK3A*, *PRKAA2*, *MTOR*, *ULK1*, *VPS15*, *ATG14*, *VPS34*, *BECN1*, *SQSTM1*, *LAMP1*, *ATG5*, *ATG12*, *ATG16L*, *ATG7*, *ATG9*, *MAPLC3A*, *MAPLC3B* genlerin mRNA seviyelerinde VPS34 inhibisyonuna bağlı olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Otofaji inhibisyonunun çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Tompkins & Thorburn, 2019).

Otofaji ve apoptoz arasında çok yönlü bir etkileşim vardır (Kang vd., 2011). Yapılan bir çalışmada *Atg5*-null fareler oluşturulmuş ve otofajinin inhibisyonuna bağlı olarak PDAK hücrelerinde bozulmuş proliferasyon, artmış DNA hasarı ve artmış apoptoz tespit edilmiştir (A. Yang vd., 2014). Başka bir çalışmada da otofajinin TNF α ile indüklenen apoptoz yolunu inhibe ederek tümör hücrelerini T hücre aracılı sitotoksiteden koruduğu gösterilmiştir (Young vd., 2020). Burada da PDAK hücrelerinde autophinib uygulamasıyla otofaji inhibisyonunun, apoptozu önemli ölçüde indüklediği hem *CAS3*, *CAS7*, *CAS8*, *CAS9*, *FADD*, *TNFA* genlerinin mRNA seviyeleri değerlendirilerek hem de Kaspaz-3 ELISA kiti kullanılarak gösterilmiştir.

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun anormal aktivasyonunun pankreas kanserinde tümör oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (Y.-S. Jung & Park, 2020). Otofaji ve Wnt/ β -katenin arasındaki ilişkiye bakıldığında ise çalışmaların büyük bir kısmı otofaji Wnt/ β -katenin arasında negatif bir ilişkinin olduğunu göstermektedir (Jia vd., 2014; Pengfei Li vd., 2016; Z. Zhang vd., 2018). Bu çalışmalardan biri besin yokluğu ile indüklenen otofaji mekanizmasının β -kateninin parçalanmasına neden olduğunu ve Wnt/ β -katenin aktivitesinin ise otofajiyi, otofajik adaptör olan p62'nin ekspresyonunu baskılayarak inhibe ettiğini göstermiştir (Petherick

vd., 2013). İnsan kolorektal kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, Wnt/ β -katenin yolağının aracı moleküllerinde biri olan Dishevelled'in otofaji mekanizması tarafından parçalandığı ve Wnt sinyalini olumsuz yönde düzenlediği gösterilmiştir (Gao vd., 2010). İnsan glioblastoma multiforme (GBM) hücre hatlarında yapılan bir çalışmada da benzer şekilde otofajinin Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunu negatif olarak düzenlediği bulunmuş ayrıca β -katenin'in hücre içinde yeniden konumlanarak N-cadherin ile birleştiği, böylece mezenkimal-epitelyal benzeri geçişe katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Colella vd., 2019). Birbirinin negatif regülatörü olduğunu gösteren çoğu çalışmanın aksine, otofaji ve Wnt/ β -katenin'in pozitif olarak etkileşimde olduğu çalışmalar da mevcuttur. Diyabetik farelerle yapılan bir çalışmada otofajinin Wnt sinyalini pozitif yönde düzenleyebileceği gösterilmiş, otofajik inhibisyonda ise diyabetik farelerin retinalarında β -katenin protein ekspresyonu önemli ölçüde azaltarak Wnt sinyalini sinerjetik olarak azalttığı gözlemlenmiştir (Ye vd., 2021). İnsan hepatoselüler karsinom (HCC) hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmanın western blot sonuçları, aç bırakılıp otofajinin indüklendiği hücrelerde β -katenin ekspresyonunun arttığını gösterirken, otofaji inhibitörü uygulanan hücrelerde β -katenin ekspresyonunda azalma olduğunu göstermiştir (Fan vd., 2018). Başka bir çalışmada, Wnt3a ligandıyla uyarılan Wnt sinyalizasyonu GSK-3 β inhibisyonuna yol açarak hipokampal nöronlarda otofaji başlangıcını arttırdığı gösterilmiştir (Ríos vd., 2018). Bu çalışmada, Wnt/ β -katenin otofaji ilişkisi çoğunlukla birbirlerinin negatif regülatörü olduğu çalışmaların aksine birbirleriyle sinerjetik olarak etkileşimde olduğunu göstermiştir. İlgili genlerin mRNA seviyelerine qRT-PZR ile bakıldığında sinyali aktive eden genlerde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Kilit moleküllerden biri olan β -katenin'in mRNA seviyesindeki anlamlı azalışı onun hedef genlerinden olan ve aynı zamanda PDAK'ta da upregüle edilen *MYC* ve *CCND1* gibi genlerin mRNA seviyesinde de anlamlı bir azalma göstermiştir.

Sonuçlar bütün olarak değerlendirildiğinde otofaji inhibisyonunun insan PDAK hücrelerinden olan PANC-1 ve MIA PaCa-2'de canlılığı azalttığı belirlenmiştir. Bu inhibisyona bağlı olarak otofaji ile ilişkili genlerde ve LC3II protein seviyesinde anlamlı bir azalma, apoptoz ilişkili genlerde ve Kaspaz-3 protein seviyesinde anlamlı bir artış ve Wnt/ β -katenin ilişkili genlerin seviyelerinde de anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Otofaji inhibisyonu bağlamında Wnt/ β -katenin sinyalinin de negatif etkilendiği ve bu uygulamanın potansiyel bir antikanser etkisi olduğu gösterilmiştir. İki sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi net olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışmasıyla MIA PaCa-2 ve PANC-1 insan PDAK hücre hatları üzerinden otofajinin kritik bir elemanı olan VPS34 autophinib ile inhibe edilmiş ve otofajinin baskılanmasının kanser hücrelerinde canlılığı azalttığı görülmüştür. 5 ve 10 μ M dozlarında 48 süresince devam eden uygulamalar yapılmış ve otofajik aktivitede kontrol gruplarına kıyasla anlamlı azalma, apoptotik aktivitede kontrol gruplarına kıyasla anlamlı artış ve gen analizi sonuçlarına göre de Wnt/ β -katenin sinyal yolağında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. PDAK'nın gelişiminde yer alan otofaji ile Wnt/ β -katenin sinyal yolunun azalarak kanserli hücreleri ölüme götüren apoptozun artması autophinib uygulamasının antikanser etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir.

Pankreas kanseri gelişiminde otofajinin karmaşıklığı çalışılan bir alan olmakla beraber, otofaji ile Wnt/ β -katenin sinyal yolunun moleküler etkileşimlerinin aydınlatılması PDAK'nın gelişiminde rol alan unsurların ve hastalığın daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Bunun yanında otofaji ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu arasındaki etkileşimlerin daha ayrıntılı incelenerek, yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi sağlanabilir. Pankreas kanseri, halen düşük sağkalım oranına sahip olsa da bu moleküler etkileşimlerin daha iyi anlaşılması ve hedeflenmesiyle gelecekteki tedavi yaklaşımlarında önemli bir ilerleme sağlayabilir.



7. KAYNAKLAR

- Amin, M. B., Edge, S. B., Greene, F. L., Byrd, D. R., Brookland, R. K., Washington, M. K., Gershenwald, J. E., Compton, C. C., Hess, K. R., & Sullivan, D. C. (2017). *AJCC cancer staging manual* (C. 1024). Springer.
- Andersen, D. K., Korc, M., Petersen, G. M., Eibl, G., Li, D., Rickels, M. R., Chari, S. T., & Abbruzzese, J. L. (2017). Diabetes, pancreatogenic diabetes, and pancreatic cancer. *Diabetes*, *66*(5), 1103–1110.
- Ayres Pereira, M., & Chio, I. I. C. (2019). Metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma: Current standing and methodologies. *Genes*, *11*(1), 6.
- Backx, E., Coolens, K., Van den Bossche, J.-L., Houbracken, I., Espinet, E., & Rooman, I. (2022). On the origin of pancreatic cancer: molecular tumor subtypes in perspective of exocrine cell plasticity. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, *13*(4), 1243–1253.
- Biankin, A. V, Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M.-C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., Wilson, P. J., Patch, A.-M., Wu, J., Chang, D. K., Cowley, M. J., Gardiner, B. B., Song, S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., ... University of California, S. F. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, *491*(7424), 399–405. <https://doi.org/10.1038/nature11547>
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2016). *Medical physiology E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Butler, A. E., Galasso, R., Matveyenko, A., Rizza, R. A., Dry, S., & Butler, P. C. (2010). Pancreatic duct replication is increased with obesity and type 2 diabetes in humans. *Diabetologia*, *53*, 21–26.
- Chaffee, K. G., Oberg, A. L., McWilliams, R. R., Majithia, N., Allen, B. A., Kidd, J., Singh, N., Hartman, A.-R., Wenstrup, R. J., & Petersen, G. M. (2018). Prevalence of germ-line mutations in cancer genes among pancreatic cancer patients with a positive family history. *Genetics in Medicine*, *20*(1), 119–127.
- Chiorean, E. G., Cheung, W. Y., Giordano, G., Kim, G., & Al-Batran, S.-E. (2019). Real-world comparative effectiveness of nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX in advanced pancreatic cancer: a systematic review. *Therapeutic advances in medical oncology*, *11*, 1758835919850367.
- Chung, K. M., Singh, J., Lawres, L., Dorans, K. J., Garcia, C., Burkhardt, D. B., Robbins, R., Bhutkar, A., Cardone, R., Zhao, X., Babic, A., Vayrynen, S. A., Costa, A. D., Nowak, J. A., Chang, D. T., Dunne, R. F., Hezel, A. F., Koong, A. C., Wilhelm, J. J., ... Muzumdar, M. D. (2019). Endocrine-exocrine signaling drives obesity-associated pancreatic ductal adenocarcinoma. *bioRxiv*, 663583. <https://doi.org/10.1101/663583>
- Colella, B., Faienza, F., Carinci, M., D'Alessandro, G., Catalano, M., Santoro, A., Cecconi, F., Limatola, C., & Di Bartolomeo, S. (2019). Autophagy induction impairs Wnt/ β -catenin signalling through β -catenin relocalisation in glioblastoma cells. *Cellular Signalling*, *53*, 357–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.10.017>

- Darnaoud, M., Faivre, J., & Moniaux, N. (2013). Targeting gut flora to prevent progression of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, *58*(2), 385–387.
- Dayde, D., Guerard, M., Perron, P., Hatat, A.-S., Barrial, C., Eymin, B., & Gazzeri, S. (2016). Nuclear trafficking of EGFR by Vps34 represses Arf expression to promote lung tumor cell survival. *Oncogene*, *35*(30), 3986–3994.
- De La Cruz, M. S. D., Young, A. P., & RUFFIN IV, M. T. (2014). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *American family physician*, *89*(8), 626–632.
- De Snoo, F. A., Bishop, D. T., Bergman, W., van Leeuwen, I., van der Drift, C., van Nieuwpoort, F. A., Out-Luiting, C. J., Vasen, H. F., ter Huurne, J. A. C., & Frants, R. R. (2008). Increased risk of cancer other than melanoma in CDKN2A founder mutation (p16-Leiden)-positive melanoma families. *Clinical Cancer Research*, *14*(21), 7151–7157.
- Del Castillo, E., Meier, R., Chung, M., Koestler, D. C., Chen, T., Paster, B. J., Charpentier, K. P., Kelsey, K. T., Izard, J., & Michaud, D. S. (2019). The microbiomes of pancreatic and duodenum tissue overlap and are highly subject specific but differ between pancreatic cancer and noncancer subjects. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, *28*(2), 370–383.
- Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E. J., Girardin, S. E., Wilson, M. I., & Tooze, S. A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12–5–16L1. *Molecular cell*, *55*(2), 238–252.
- Ducreux, M., Cuhna, A. S., Caramella, C., Hollebecque, A., Burtin, P., Goéré, D., Seufferlein, T., Haustermans, K., Van Laethem, J. L., & Conroy, T. (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, *26*, v56–v68.
- Dunlop, E. A., & Tee, A. R. (2013). The kinase triad, AMPK, mTORC1 and ULK1, maintains energy and nutrient homeostasis. *Biochemical Society Transactions*, *41*(4), 939–943.
- Dyczynski, M., Yu, Y., Otrocka, M., Parpal, S., Braga, T., Henley, A., Zazzi, H., Lerner, M., Wennerberg, K., Viklund, J., Martinsson, J., Grandér, D., Milito, A., & Pokrovskaja, K. (2018). Targeting autophagy by small molecule inhibitors of vacuolar protein sorting 34 (Vps34) improves the sensitivity of breast cancer cells to Sunitinib. *Cancer Letters*, *435*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.07.028>
- E Poruk, K., Z Gay, D., Brown, K., D Mulvihill, J., M Boucher, K., L Scaife, C., A Firpo, M., & J Mulvihill, S. (2013). The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. *Current molecular medicine*, *13*(3), 340–351.
- Elbanna, K. Y., Jang, H.-J., & Kim, T. K. (2020). Imaging diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma: a comprehensive review. *Insights into imaging*, *11*(1), 1–13.
- Fan, Q., Yang, L., Zhang, X., Ma, Y., Li, Y., Dong, L., Zong, Z., Hua, X., Su, D., Li, H., & Liu, J. (2018). Autophagy promotes metastasis and glycolysis by upregulating MCT1 expression and Wnt/ β -catenin signaling pathway activation in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *37*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0673-y>

- Farrell, J. J., Zhang, L., Zhou, H., Chia, D., Elashoff, D., Akin, D., Paster, B. J., Joshipura, K., & Wong, D. T. W. (2012). Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*, *61*(4), 582 LP – 588. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300784>
- Ferlay, J., Partensky, C., & Bray, F. (2016). More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta oncologica*, *55*(9–10), 1158–1160.
- Flay, N. W., & Gorelick, F. S. (2004). *Exocrine Pancreas* (L. R. B. T.-E. of G. Johnson (ed.); ss. 769–774). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00256-2>
- Fujii, S., Mitsunaga, S., Yamazaki, M., Hasebe, T., Ishii, G., Kojima, M., Kinoshita, T., Ueno, T., Esumi, H., & Ochiai, A. (2008). Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer science*, *99*(9), 1813–1819.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*, *19*(5), 2092–2100.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.-L., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, *36*(13), 1811–1836. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/embj.201796697>
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D. A., Karantza, V., Kimmelman, A., Kumar, S., Levine, B., Maiuri, M. C., Martin, S. J., Penninger, J., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Simon, H.-U., ... Kroemer, G. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*, *34*(7), 856–880. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/embj.201490784>
- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1· ATG13· FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(18), 12297–12305.
- Gao, C., Cao, W., Bao, L., Zuo, W., Xie, G., Cai, T., Fu, W., Zhang, J., Wu, W., & Zhang, X. (2010). Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nature cell biology*, *12*(8), 781–790.
- Gillson, J., Abd El-Aziz, Y. S., Leck, L. Y. W., Jansson, P. J., Pavlakis, N., Samra, J. S., Mittal, A., & Sahni, S. (2022). Autophagy: A key player in pancreatic cancer progression and a potential drug target. *Cancers*, *14*(14), 3528.
- Granata, V., Fusco, R., Catalano, O., Setola, S. V., de Lutio di Castelguidone, E., Piccirillo, M., Palaia, R., Grassi, R., Granata, F., & Izzo, F. (2016). Multidetector computer tomography in the pancreatic adenocarcinoma assessment: an update. *Infectious Agents and Cancer*, *11*(1), 1–7.
- Gupta, S., Wang, F., Holly, E. A., & Bracci, P. M. (2010). Risk of pancreatic cancer by alcohol dose, duration, and pattern of consumption, including binge drinking: a population-based study. *Cancer Causes & Control*, *21*, 1047–1059.

- Haeberle, L., & Esposito, I. (2019). Pathology of pancreatic cancer. *Translational gastroenterology and hepatology*, 4.
- Hampton, R. F., Jimenez-Gonzalez, M., & Stanley, S. A. (2022). Unravelling innervation of pancreatic islets. *Diabetologia*, 65(7), 1069–1084. <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05691-9>
- Heinmöller, E., Dietmaier, W., Zirngibl, H., Heinmöller, P., Scaringe, W., Jauch, K.-W., Hofstädter, F., & Rüschoff, J. (2000). Molecular Analysis of Microdissected Tumors and Preneoplastic Intraductal Lesions in Pancreatic Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 157(1), 83–92. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64520-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64520-8)
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., & Hitt, B. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell*, 4(6), 437–450.
- Hollinshead, K. E. R., Parker, S. J., Eapen, V. V., Encarnacion-Rosado, J., Sohn, A., Oncu, T., Cammer, M., Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2020). Respiratory supercomplexes promote mitochondrial efficiency and growth in severely hypoxic pancreatic cancer. *Cell reports*, 33(1).
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Klöppel, G., & Longnecker, D. S. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology*, 25(5), 579–586.
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research*, 6(8), 2969–2972.
- Huang, B. Z., Pandol, S. J., Jeon, C. Y., Chari, S. T., Sugar, C. A., Chao, C. R., Zhang, Z.-F., Wu, B. U., & Setiawan, V. W. (2020). New-onset diabetes, longitudinal trends in metabolic markers, and risk of pancreatic cancer in a heterogeneous population. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 18(8), 1812–1821.
- Hurley, J. H., & Young, L. N. (2017). Mechanisms of autophagy initiation. *Annual review of biochemistry*, 86, 225–244.
- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(44), 9694.
- Indini, A., Rijavec, E., Ghidini, M., Cortellini, A., & Grossi, F. (2021). Targeting KRAS in Solid Tumors: Current Challenges and Future Opportunities of Novel KRAS Inhibitors. İçinde *Pharmaceutics* (C. 13, Sayı 5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050653>
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's archives of surgery*, 393, 535–545.
- Janssen, Q. P., Buettner, S., Suker, M., Beumer, B. R., Addeo, P., Bachellier, P., Bahary, N., Bekaii-Saab, T., Bali, M. A., & Besselink, M. G. (2019). Neoadjuvant FOLFIRINOX in patients with borderline resectable pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 111(8), 782–794.
- Jia, Z., Wang, J., Wang, W., Tian, Y., XiangWei, W., Chen, P., Ma, K., & Zhou, C. (2014). Autophagy eliminates

- cytoplasmic β -catenin and NICD to promote the cardiac differentiation of P19CL6 cells. *Cellular signalling*, 26(11), 2299–2305.
- Jiang, X., Bao, Y., Liu, H., Kou, X., Zhang, Z., Sun, F., Qian, Z., Lin, Z., Li, X., Liu, X., Jiang, L., & Yang, Y. (2017). VPS34 stimulation of p62 phosphorylation for cancer progression. *Oncogene*, 36(50), 6850–6862. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.295>
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., & Jimeno, A. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *science*, 321(5897), 1801–1806.
- Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1287–1295.
- Jung, Y.-S., & Park, J.-I. (2020). Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond β -catenin and the destruction complex. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 183–191. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0380-6>
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 18(4), 571–580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S. A., & Ktistakis, N. T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *Journal of cell science*, 126(22), 5224–5238.
- Katz, M. H. G., Wang, H., Fleming, J. B., Sun, C. C., Hwang, R. F., Wolff, R. A., Varadhachary, G., Abbruzzese, J. L., Crane, C. H., Krishnan, S., Vauthey, J.-N., Abdalla, E. K., Lee, J. E., Pisters, P. W. T., & Evans, D. B. (2009). Long-Term Survival After Multidisciplinary Management of Resected Pancreatic Adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 16(4), 836–847. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0295-2>
- Kaufmann, A., & Wollert, T. (2014). Scaffolding the expansion of autophagosomes. *Autophagy*, 10(7), 1343–1345.
- Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., & Guan, K.-L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, 152(1–2), 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.016>
- Kimmelman, A. C., & White, E. (2017). Autophagy and tumor metabolism. *Cell metabolism*, 25(5), 1037–1043.
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V, Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Klein, A. P. (2012). Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 51(1), 14–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mc.20855>
- Klein, A. P., Brune, K. A., Petersen, G. M., Goggins, M., Tersmette, A. C., Offerhaus, G. J. A., Griffin, C., Cameron, J. L., Yeo, C. J., & Kern, S. (2004). Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer research*, 64(7), 2634–2638.

- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C.-K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, *17*(1), 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Kobylarz, M. J., Goodwin, J. M., Kang, Z. B., Annand, J. W., Hevi, S., O'Mahony, E., McAllister, G., Reece-Hoyes, J., Wang, Q., & Alford, J. (2020). An iron-dependent metabolic vulnerability underlies VPS34-dependence in RKO cancer cells. *Plos one*, *15*(8), e0235551.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, *4*(2), 68–75.
- Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., & Johansen, T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell cycle*, *8*(13), 1986–1990.
- Larsson, S. C., Orsini, N., & Wolk, A. (2007). Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*, *120*(9), 1993–1998. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.22535>
- LaRusch, J., & Whitcomb, D. C. (2011). Genetics of pancreatitis. *Current opinion in gastroenterology*, *27*(5), 467.
- Li, Pengfei, Guo, Y., Bledsoe, G., Yang, Z., Chao, L., & Chao, J. (2016). Kallistatin induces breast cancer cell apoptosis and autophagy by modulating Wnt signaling and microRNA synthesis. *Experimental cell research*, *340*(2), 305–314.
- Li, Ping, Shu, Y., & Gu, Y. (2020). The potential role of bacteria in pancreatic cancer: a systematic review. *Carcinogenesis*, *41*(4), 397–404. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa013>
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>
- Longnecker, D. S. (2021). Anatomy and Histology of the Pancreas. *Pancreapedia*, *1*, 1–24. <https://doi.org/10.3998/panc.2021.01>
- Lorzadeh, S., Kohan, L., Ghavami, S., & Azarpira, N. (2021). Autophagy and the Wnt signaling pathway: A focus on Wnt/ β -catenin signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1868*(3), 118926. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118926>
- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R. W., Lankisch, P. G., Andersen, J. R., Dimagno, E. P., Andren-Sandberg, A., & Domellof, L. (1993). Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, *328*(20), 1433–1437. <https://doi.org/10.1056/NEJM199305203282001>
- Luo, W., Wang, J., Chen, H., Ye, L., Qiu, J., Liu, Y., Wang, R., Weng, G., Liu, T., & Su, D. (2023). Epidemiology of pancreatic cancer: New version, new vision. *Chinese Journal of Cancer Research*, *35*(5), 438.
- Lyssiotis, C. A., & Kimmelman, A. C. (2017). Metabolic interactions in the tumor microenvironment. *Trends in cell biology*, *27*(11), 863–875.
- Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2010). Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Digestive diseases*,

28(4–5), 645–656.

- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C. M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., & White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & development*, 21(11), 1367–1381.
- Matsuo, K., Ito, H., Wakai, K., Nagata, C., Mizoue, T., Tanaka, K., Tsuji, I., Tamakoshi, A., Sasazuki, S., & Inoue, M. (2011). Cigarette smoking and pancreas cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence in the Japanese population. *Japanese journal of clinical oncology*, 41(11), 1292–1302.
- Mollinedo, F., & Gajate, C. (2019). Novel therapeutic approaches for pancreatic cancer by combined targeting of RAF→MEK→ERK signaling and autophagy survival response. *Annals of translational medicine*, 7(Suppl 3).
- Moran, A., O'hara, C., Khan, S., Shack, L., Woodward, E., Maher, E. R., Laloo, F., & Evans, D. G. R. (2012). Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Familial cancer*, 11, 235–242.
- Murakami, T., Hiroshima, Y., Matsuyama, R., Homma, Y., Hoffman, R. M., & Endo, I. (2019). Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Annals of gastroenterological surgery*, 3(2), 130–137.
- Ohmoto, A., Yachida, S., & Morizane, C. (2019). Genomic features and clinical management of patients with hereditary pancreatic cancer syndromes and familial pancreatic cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 561.
- Pandol, S. J., Apte, M. V., Wilson, J. S., Gukovskaya, A. S., & Edderkaoui, M. (2012). The burning question: why is smoking a risk factor for pancreatic cancer? *Pancreatology*, 12(4), 344–349.
- Pannala, R., Basu, A., Petersen, G. M., & Chari, S. T. (2009). New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *The lancet oncology*, 10(1), 88–95.
- Pappalardo, A., Giunta, E. F., Tirino, G., Pompella, L., Federico, P., Daniele, B., De Vita, F., & Petrillo, A. (2021). Adjuvant Treatment in Pancreatic Cancer: Shaping the Future of the Curative Setting. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.695627>
- Pasca di Magliano, M., Biankin, A. V., Heiser, P. W., Cano, D. A., Gutierrez, P. J. A., Deramaudt, T., Segara, D., Dawson, A. C., Kench, J. G., Henshall, S. M., Sutherland, R. L., Dlugosz, A., Rustgi, A. K., & Hebrok, M. (2007). Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*, 2(11), e1155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001155>
- Pasquier, B. (2015). SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells. *Autophagy*, 11(4), 725–726. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1033601>
- Petherick, K. J., Williams, A. C., Lane, J. D., Ordóñez-Morán, P., Huelsken, J., Collard, T. J., Smartt, H. J. M., Batson, J., Malik, K., & Paraskeva, C. (2013). Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *The EMBO journal*, 32(13), 1903–1916.
- Piffoux, M., Eriau, E., & Cassier, P. A. (2021). Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 124(2), 333–344. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01039-5>

- Pitman, M. B. (2007). *Chapter 9 - Pancreas* (M. K. Sidawy, S. Z. Ali, & J. R. B. T.-F. N. A. C. Goldblum (ed.); ss. 251–298). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06731-0.50013-6>
- Pompella, L., Tirino, G., Pappalardo, A., Caterino, M., Ventriglia, A., Nacca, V., Orditura, M., Ciardiello, F., & De Vita, F. (2020). Pancreatic cancer molecular classifications: From bulk genomics to single cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8), 2814.
- Porta, M., Fabregat, X., Malats, N., Guarner, L., Carrato, A., De Miguel, A., Ruiz, L., Jariod, M., Costafreda, S., & Coll, S. (2005). Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clinical and Translational Oncology*, *7*, 189–197.
- Poruk, K. E., Firpo, M. A., Adler, D. G., & Mulvihill, S. J. (2013). Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? *Annals of surgery*, *257*(1), 17.
- Pushalkar, S., Hundeyin, M., Daley, D., Zambirinis, C. P., Kurz, E., Mishra, A., Mohan, N., Aykut, B., Usyk, M., & Torres, L. E. (2018). The pancreatic cancer microbiome promotes oncogenesis by induction of innate and adaptive immune suppression. *Cancer discovery*, *8*(4), 403–416.
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Research*, *74*(11), 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., & Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *24*(3), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>
- Ram Makena, M., Gatla, H., Verlekar, D., Sukhavasi, S., K. Pandey, M., & C. Pramanik, K. (2019). Wnt/ β -catenin signaling: the culprit in pancreatic carcinogenesis and therapeutic resistance. *International journal of molecular sciences*, *20*(17), 4242.
- Rawla, P., Thandra, K. C., & Sunkara, T. (2019). Pancreatic cancer and obesity: epidemiology, mechanism, and preventive strategies. *Clinical Journal of Gastroenterology*, *12*(4), 285–291. <https://doi.org/10.1007/s12328-019-00953-3>
- Ren, Z., Jiang, J., Xie, H., Li, A., Lu, H., Xu, S., Zhou, L., Zhang, H., Cui, G., Chen, X., Liu, Y., Wu, L., Qin, N., Sun, R., Wang, W., Li, L., Wang, W., & Zheng, S. (2017). Gut microbial profile analysis by MiSeq sequencing of pancreatic carcinoma patients in China. *Oncotarget*; Vol 8, No 56. <https://www.oncotarget.com/article/18820/text/>
- Ríos, J. A., Godoy, J. A., & Inestrosa, N. C. (2018). Wnt3a ligand facilitates autophagy in hippocampal neurons by modulating a novel GSK-3 β -AMPK axis. *Cell Communication and Signaling*, *16*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0227-0>
- Robke, L., Laraia, L., Carnero Corrales, M. A., Konstantinidis, G., Muroi, M., Richters, A., Winzker, M., Engbring, T., Tomassi, S., Watanabe, N., Osada, H., Rauh, D., Waldmann, H., Wu, Y. W., & Engel, J. (2017). Phenotypic Identification of a Novel Autophagy Inhibitor Chemotype Targeting Lipid Kinase VPS34. *Angewandte Chemie - International Edition*, *56*(28), 8153–8157. <https://doi.org/10.1002/anie.201703738>

- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., & Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology*, *15*(7), 741–750.
- Sarles, H. (1977). The exocrine pancreas. İçinde *International review of physiology* (C. 12). <https://doi.org/10.4199/c00026ed1v01y201102isp014>
- Setiawan, V. W., Monroe, K., Lugea, A., Yadav, D., & Pandol, S. (2017). Uniting epidemiology and experimental disease models for alcohol-related pancreatic disease. *Alcohol research: current reviews*, *38*(2), 173.
- Shi, C., Hruban, R. H., & Klein, A. P. (2009). Familial pancreatic cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *133*(3), 365–374.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, *72*(1), 7–33.
- Slebos, R. J. C., Hoppin, J. A., Tolbert, P. E., Holly, E. A., Brock, J. W., Zhang, R. H., Bracci, P. M., Foley, J., Stockton, P., & McGregor, L. M. (2000). K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *9*(11), 1223–1232.
- Soloff, E. V., Zaheer, A., Meier, J., Zins, M., & Tamm, E. P. (2018). Staging of pancreatic cancer: resectable, borderline resectable, and unresectable disease. *Abdominal Radiology*, *43*(2), 301–313. <https://doi.org/10.1007/s00261-017-1410-2>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209–249.
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., & Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development*, *25*(8), 795–800.
- Talathi, S. S., Zimmerman, R., & Young, M. (2023). Anatomy, abdomen and pelvis, pancreas. İçinde *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Tan, Q., Wang, M., Yu, M., Zhang, J., Bristow, R. G., Hill, R. P., & Tannock, I. F. (2016). RETRACTED: Role of Autophagy as a Survival Mechanism for Hypoxic Cells in Tumors. *Neoplasia*, *18*(6), 347–355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.04.003>
- Tanaka, M., Chari, S., Adsay, V., Carlos Castillo, F.-D., Falconi, M., Shimizu, M., Yamaguchi, K., Yamao, K., & Matsuno, S. (2006). International Consensus Guidelines for Management of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas. *Pancreatology*, *6*(1), 17–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000090023>
- Tao, J., Yang, G., Zhou, W., Qiu, J., Chen, G., Luo, W., Zhao, F., You, L., Zheng, L., & Zhang, T. (2021). Targeting hypoxic tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Journal of hematology & oncology*, *14*, 1–25.

- Tompkins, K. D., & Thorburn, A. (2019). Focus: Death: Regulation of apoptosis by autophagy to enhance cancer therapy. *The Yale journal of biology and medicine*, 92(4), 707.
- Tramacere, I., Scotti, L., Jenab, M., Bagnardi, V., Bellocco, R., Rota, M., Corrao, G., Bravi, F., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2010). Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *International journal of cancer*, 126(6), 1474–1486.
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The lancet*, 378(9791), 607–620.
- Wang, L., Gaddam, S., Wang, N., Xie, Y., Deng, Z., Zhou, Z., Fan, Z., Jiang, T., Christodoulou, A. G., & Han, F. (2020). Multiparametric mapping magnetic resonance imaging of pancreatic disease. *Frontiers in Physiology*, 11, 8.
- Whatcott, C. J. (2012). Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. İçinde *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*.
- White, E., Mehnert, J. M., & Chan, C. S. (2015). Autophagy, metabolism, and cancer. *Clinical cancer research*, 21(22), 5037–5046.
- Whitmarsh-Everiss, T., & Laraia, L. (2021). Small molecule probes for targeting autophagy. *Nature Chemical Biology*, 17(6), 653–664.
- Xu, H.-D., & Qin, Z.-H. (2019). Beclin 1, Bcl-2 and autophagy. *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science*, 109–126.
- Xu, M., Jung, X., Hines, O., Eibl, G., & Chen, Y. (2018). Obesity and Pancreatic Cancer: Overview of Epidemiology and Potential Prevention by Weight Loss. *Pancreas*, 47, 158–162. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000974>
- Xu, S., Luo, C., Chen, D., Tang, L., Chen, L., & Liu, Z. (2022). Whole transcriptome and proteome analyses identify potential targets and mechanisms underlying tumor treating fields against glioblastoma. *Cell Death & Disease*, 13(8), 721. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05127-7>
- Yamamoto, T., Yagi, S., Kinoshita, H., Sakamoto, Y., Okada, K., Uryuhara, K., Morimoto, T., Kaihara, S., & Hosotani, R. (2015). Long-term survival after resection of pancreatic cancer: a single-center retrospective analysis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(1), 262.
- Yamano, M., Fujii, H., Takagaki, T., Kadowaki, N., Watanabe, H., & Shirai, T. (2000). Genetic Progression and Divergence in Pancreatic Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 156(6), 2123–2133. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65083-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65083-3)
- Yang, A., Rajeshkumar, N. V., Wang, X., Yabuuchi, S., Alexander, B. M., Chu, G. C., Von Hoff, D. D., Maitra, A., & Kimmelman, A. C. (2014). Autophagy Is Critical for Pancreatic Tumor Growth and Progression in Tumors with p53 Alterations. *Cancer Discovery*, 4(8), 905–913. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0362>
- Yang, J., Waldron, R. T., Su, H.-Y., Moro, A., Chang, H.-H., Eibl, G., Ferreri, K., Kandeel, F. R., Lugea, A., & Li, L. (2016). Insulin promotes proliferation and fibrosing responses in activated pancreatic stellate cells.

American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 311(4), G675–G687.

- Yang, S., & Kimmelman, A. C. (2011). A critical role for autophagy in pancreatic cancer. *Autophagy*, 7(8), 912–913.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell’antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., & Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & Development*, 25(7), 717–729. <https://doi.org/10.1101/gad.2016111>
- Yang, Y., Hu, L., Zheng, H., Mao, C., Hu, W., Xiong, K., Wang, F., & Liu, C. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(5), 625–635.
- Ye, S., Zhang, Y., Wang, X., Liang, X., Wei, M., Zong, R., Liu, Z., & Chen, Q. (2021). Autophagy positively regulates Wnt signaling in mice with diabetic retinopathy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(4), 1–8. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10598>
- Young, T. M., Reyes, C., Pasnikowski, E., Castanaro, C., Wong, C., Decker, C. E., Chiu, J., Song, H., Wei, Y., Bai, Y., Zambrowicz, B., Thurston, G., & Daly, C. (2020). Autophagy protects tumors from T cell–mediated cytotoxicity via inhibition of TNF α -induced apoptosis. *Science Immunology*, 5(54), eabb9561. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb9561>
- Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3>
- Zhang, Z., Liu, T., Yu, M., Li, K., & Li, W. (2018). The plant alkaloid tetrandrine inhibits metastasis via autophagy-dependent Wnt/ β -catenin and metastatic tumor antigen 1 signaling in human liver cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 37, 1–11.
- Zhi, X., Feng, W., Rong, Y., & Liu, R. (2018). Anatomy of autophagy: from the beginning to the end. *Cellular and molecular life sciences*, 75, 815–831.
- Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., & Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *In* *Nature cell biology* (C. 11, Sayı 4, ss. 468–476). <https://doi.org/10.1038/ncb1854>



8. EKLER

8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI	
Toplantı Sayısı:177	Toplantı Tarihi: 02 Haziran 2023

Karar Sayısı:2023/4358:(Başvuru ID: 14369) N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasibe VURAL'ın "Pankreas Kanseri Hücre Hattında Otofaji İlişkili VPS34 İnhibitörünün Wnt/B-Katenin Sinyal Yolu Üzerinden İncelenmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili dilekçesi ve ekleri görüşüldü. Yüksek lisans öğrencisi Vera AVCI'nın tez çalışmasının N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasibe VURAL'ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Hasibe VURAL

Yardımcı Araştırmacılar: Yüksek Lisans Öğrencisi Vera AVCI

ASLI GİBİDİR
02.06.2023

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı