



**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN**  
**ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PANKREAS KANSERİNDE TOLL-LİKE  
RESEPTÖR 4 (TLR4) YOLAĞININ İMMÜN  
CHECK-POİNT VİSTA ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Kübra Sena BAŞ TOPCU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Haziran-2021**  
**KONYA**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# PANKREAS KANSERİNDE TOLL-LİKE RESEPTÖR 4 (TLR4) YOLAĞININ İMMÜN CHECK-POINT VISTA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Kübra Sena BAŞ TOPCU**

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU**

**2021, 109 Sayfa**

**Jüri**

**Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU**

**Doç. Dr. Nadir KOÇAK**

**Doç. Dr. Ali Tevfik UNCU**

Pankreas duktal adenokarsinom (PDAC), pankreasın malign tümörlerinden olup en yaygın görülen tipidir ve Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin yedincisi olarak bilinmektedir. Pankreas kanseri erken evrelerde herhangi bir semptom göstermediğinden dolayı hızlıca yayılım göstermektedir ve bundan dolayı teşhisi oldukça zordur. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere pankreas kanseri için tedavi yöntemlerinin başarı oranı düşük ve nüksü kaçınılmazdır. İmmunoterapötik yaklaşımlar ilerlemiş malignitelerin tedavisi için ortaya çıkmıştır. İmmün check-point inhibitörleri, kanser tedavisinde tümörün büyümesini engellerken aynı zamanda kemoterapinin etkinliğini arttırdığı için oldukça umut vericidir. İmmunoterapide son zamanlarda hedef haline gelmiş T hücre aktivasyonunun V-domain immunoglobulin baskılayıcısı (VISTA) esas olarak hematopoietik hücrelerde ve kanser hücrelerinde yüksek seviyede eksprese olan transmembran proteinidir. Prostat kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ve kolorektal karsinom gibi birçok insan kanserinde bağışıklıktan kaçınma ve hayatta kalmak için T hücresi ile ilişkili yanıtı baskılayan negatif immün check-point olarak bilinmektedir. Kanserle ilişkili VISTA'nın, pankreas kanserinde M2 makrofajlarından olan CD68+ makrofajlarında yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. Ancak pankreas kanserinde VISTA'nın bağlantılı olduğu sinyal yolları ve klinik önemi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Toll-like reseptörler (TLR'ler) mikrobik hücre duvarının spesifik bileşenlerini tanıyan hem doğuştan gelen hem de adaptif immün hücreleri aktive eden, evrimsel olarak korunmuş patern tanıma reseptörü (PRR) olarak bilinmektedir. Kanserde immunosupresif faktörlerin salgılanmasına ek olarak apoptoz direncini de arttırmaktadır. Pankreas kanser hücrelerinde TLR4 yüksek seviyede eksprese olmaktadır ve kötü prognozla ilişkilidir. İmmün check-point VISTA ile TLR4 ekspresyonu arasında potansiyel bağlantılar henüz keşfedilmemiştir. Pankreas kanserinde VISTA ve TLR4'ün downstream sinyal yollarındaki bağlantıların hedeflenmesi, immün check-point inhibitörleri ve onkogenik yolak inhibitörleri üzerine yapılacak klinik çalışmalar için fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmada pankreas kanserinin gelişimi ve proliferasyonunda TLR4 ve down stream yolağında yer alan IRAK4 moleküllerinin VISTA ile arasındaki bağlantılarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla pankreas kanseri hücre hattı olan PANC-1 hücrelerine TLR4 antagonisti olan Naloxone ve VISTA-siRNA uygulaması yapılmıştır. Öncelikle TLR4 geninin PANC-1 hücreleri üzerinde proliferasyona olan etkisinin incelenmesi ve Naloxone ilacının IC50 dozunu bulmak için MTT analizi yapılmıştır. IC50 dozu tespit edildikten sonra TLR4, IRAK4 ve VISTA'nın gen ekspresyonu seviyesinde baskılanmasına qRT-PCR ile bakılmıştır. Sonraki aşamada VISTA blokasyonunun TLR4 gen ekspresyonundaki etkisine bakmak için VISTA-siRNA uygulanmıştır. MTT analizi ile hücre

proliferasyonundaki azalma, qRT-PCR ile hedef genlerin ekspresyonlarındaki azalma anlamlı bir şekilde tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak Naloxone ve VISTA-siRNA'nın PANC-1 hücrelerine beraber transfekte edildiğindeki sinerjik etkilerini görebilmek için Naloxone'un etken dozu ile VISTA-siRNA kombinasyon halinde hücrelere uygulanmıştır. qRT-PCR ile kontrol grubuna göre uygulama yapılan grup kıyaslandığında VISTA ile TLR4 ve onun downstream yolağında yer alan IRAK4 molekülünün ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak PANC-1 hücre hattında TLR4 sinyal yolağı ile VISTA gen ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki ve pankreas kanseri proliferasyonunda ve ilerlemesinde bu hedef genlerin tehlikeli bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen bulgular, ileri analizler ile geliştirilmelidir. Verilerimize göre pankreas kanseri ilerlemesinde TLR4 sinyal yolağının immun check-point VISTA'ya aracılık ettiği düşünüldüğünden ilerki çalışmalarda gerekli inhibitörler kullanılarak diğer sinyal yolları ile potansiyel bağlantıların tespit edilmesi gerekmektedir. VISTA ve TLR4 sinyal yolağı arasında bulunan ilişkinin ve bağlantılı olduğu sinyal yollarının tespit edilmesi durumunda kanser tedavisinde immun check-point inhibitörlerinin cevap belirlemede önemli bir belirteç olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Pankreas duktal adenokarsinom; siRNA; TLR4; VISTA; İmmünoterapi; İmmun-check point

## **ABSTRACT**

## **MS THESIS**

# **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) PATHWAY ON IMMUNE CHECK-POINT VISTA IN PANCREATIC CANCER**

**Kübra Sena BAŞ TOPCU**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE**

**Advisor: Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU**

**2021, 109 Pages**

**Jury**

**Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU**

**Assoc.Prof.Dr. Nadir KOÇAK**

**Assoc.Prof.Dr. Ali Tevfik UNCU**

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most common malignant tumors of the pancreas, and is known worldwide as the seventh in cancer-related deaths. Since pancreatic cancer does not show any symptoms in the early stages, it spreads rapidly and is therefore difficult to diagnose. Treatment methods for pancreatic cancer, including surgery, chemotherapy, and radiotherapy, have a low success rate and inevitable recurrence. Immunotherapeutic approaches have emerged for the treatment of advanced malignancies. Immune check-point inhibitors are very promising as they prevent the growth of the tumor in cancer treatment and at the same time increase the effectiveness of chemotherapy. The V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation (VISTA), which has recently become a target in immunotherapy, is a highly expressed transmembrane protein primarily in hematopoietic cells and cancer cells. Prostate cancer is known as a negative immune check-point that suppresses T cell-related response for immune avoidance and survival in many human cancers such as non-small cell lung cancer (NSCLC) and colorectal carcinoma. Cancer-associated VISTA has also been found to be highly expressed in CD68 + macrophages, which are M2 macrophages in pancreatic cancer. However, there is less information about the signal pathways associated with VISTA in pancreatic cancer and its clinical significance. Toll-like receptors (TLRs) are known as evolutionarily conserved pattern recognition receptors (PRRs), which activate both innate and adaptive immune cells that recognize specific components of the microbial cell wall. In addition to the secretion of immunosuppressive factors in cancer, it also increases apoptosis resistance. TLR4 is highly expressed in pancreatic cancer cells and is associated with a poor prognosis. Potential links between VISTA and TLR4 expression have not yet been discovered. Targeting the linkages in the downstream signaling pathways of VISTA and TLR4 in pancreatic cancer would be useful for clinical studies on immune check-point inhibitors and oncogenic pathway inhibitors.

In this study, it was aimed to investigate the connections between TLR4 and IRAK4 molecules in the down stream pathway with VISTA in the development and proliferation of pancreatic cancer. For this purpose, TLR4 antagonist Naloxone and VISTA-siRNA were transfected into PANC-1 cells, a pancreatic cancer cell line. First of all, MTT analysis was performed to examine the effect of TLR4 gene on proliferation on PANC-1 cells and to find the IC50 dose of the Naloxone drug. After the IC50 dose was determined, suppression of the level of TLR4, IRAK4 and VISTA gene expression was shown in qRT-PCR. In the next step, VISTA-siRNA was applied to determine the effect of VISTA blocking on TLR4 gene expression. The decrease in cell proliferation was detected by MTT analysis, and the decrease in target genes expressions was determined significantly by qRT-PCR. Based on these results, in order to

see the synergistic effect of Naloxone and VISTA-siRNA when transfected into PANC-1 cells together, the active dose of Naloxone and VISTA-siRNA were applied to the cells in combination. When the treated group was compared with the control group by qRT-PCR, a significant decrease was observed in the expression level of VISTA and TLR4 molecule in its downstream pathway with IRAK4.

As a result, a significant relationship between TLR4 signaling pathway and VISTA gene expression in PANC-1 cell line and these target genes have a dangerous potential in the proliferation and progression of pancreatic cancer. Findings obtained from our study should be developed with further analysis. According to our data, since it is thought that the TLR4 signaling pathway mediates the immune check-point VISTA in the progression of pancreatic cancer, potential connections with other signaling pathways should be determined by using the necessary inhibitors in future studies. If the findings of the study are supported by further analysis, it is thought that the relationship between VISTA and TLR4 signaling pathways and their associated signal pathways may be an important marker in determining the response of immune check-point inhibitors in cancer treatment.

**Keywords:** Pancreatic ductal adenocarcinoma; siRNA; TLR4; VISTA; Immunotherapy; Immune-check point

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimleri ile bana her zaman yol gösterici olan, desteğini hiç esirgemeyen, sonraki çalışmalarında bilgisine, destek ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım, bana her zaman sabır gösteren ve ailemden bir parça olarak hissettiğim değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU'ya,

tez çalışmalarım esnasında desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a ve Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı Korucu'ya,

desteklerini her zaman hissettiğim ve tecrübelerinden yararlandığım değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ayşe Hale ALKAN ve Arş. Gör. Kevser Betül CEYLAN'a,

hayatımın her anında bana destek sağlayan ve bana sonsuz güvenen, içindeki bilim aşkı ile tezimi yazmamda yol gösterici olan ve bu hayattaki en büyük şansım sevgili eşim Yunus Emre TOPCU'ya,

beni bu günlere sevgi kelimesinin anlamını bilecek şekilde yetiştirerek getiren, bana her konuda inanan ve güvenen, benden hiçbir zaman maddi manevi desteğini esirgemeyen, her zaman benim için çabalayan ve koşulsuz her şartta yanımda olan sevgili annem Nazile BAŞ'a ve kendi hayallerini gerçekleştirmeme fırsat veren, bilime olan ilgisi ve donanımı ile beni destekleyen ve yol göstericiliğinden dolayı canım babam Şerafettin BAŞ'a,

sonsuz teşekkür ederim.

Kübra Sena BAŞ TOPCU  
KONYA-2021

*Bu tezi aileme ithaf ediyorum...*

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xx</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>4</b>
2.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri.....	4
2.1.1. Pankreas Kanseri Epidemolojisi .....	7
2.1.2. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri .....	8
2.1.3. Pankreas Kanseri Evreleme .....	9
2.1.4. Pankreas Kanserinde Tedavi Yaklaşımları .....	11
2.1.5. Pankreas Kanserinde Genetik Değişimler ve Yolaklar.....	12
2.2. Tümör Mikroçevresi (TMC) .....	15
2.3. Toll-like Reseptör (TLR) Ailesi.....	18
2.3.1. TLR'lerin Yapısal Özellikleri ve Sınıflandırılması .....	19
2.3.2. Kanser İlerlemesinde TLR'lerin Moleküler Mekanizması .....	23
2.3.3. Toll-like Reseptör 4 (TLR4) .....	24
2.3.4. TLR4'ün Endojen Ligandları.....	28
2.3.5. TLR4 İnhibitörleri.....	32
2.4. İmmun Check-pointler .....	33
2.4.1. CTLA4 .....	33
2.4.2. PD-1/PD-L1 .....	34
2.4.3. LAG-3 .....	35
2.4.4. VISTA.....	35
2.5. RNA İnterferans .....	40
2.5.1. RNA İnterferans Mekanizması .....	42
2.5.2. siRNA Mekanizmasında Görevli Bileşenler.....	45
2.5.3. Memeli Hücrelerinde Çeşitli siRNA Stratejileri.....	47

2.5.5. RNA İnterferans Kullanım Alanları.....	48
2.6. Araştırmanın Amacı.....	48
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
3.1. Hücre Kültürü .....	50
3.1.2. Hücre Sayımı.....	51
3.2. Naloxone Uygulaması.....	51
3.2.1. Canlılık Analizi .....	51
3.2.2. RNA İzolasyonu ve İzole Edilen RNA'nın Ölçümü.....	52
3.2.3. cDNA Sentezi .....	53
3.2.4. qRT-PCR.....	55
3.4. siRNA Çalışması.....	57
3.4.1 siRNA'ların Hazırlanması ve Saklanması .....	58
3.4.2. siRNA Transfeksiyonu.....	58
3.4.3. siRNA Verilen Hücrelerden RNA İzolasyonu.....	60
3.4.4. İzole Edilen RNA Miktarının Ölçülmesi .....	60
3.4.5. cDNA Sentezi .....	61
3.4.6. GAPDH, TLR4, VISTA ve IRAK4 Genlerinin Primerlerinin Hazırlanması ve Dizi Bilgileri .....	63
3.4.7. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) .....	63
3.4.8. siRNA Susturma Yüzdelerinin Hesaplanması .....	64
3.4.9. Canlılık Analizi .....	64
3.5. Naloxone ve VISTA-siRNA'nın PANC-1 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin Analizi .....	65
3.5.1. Gen Ekspresyonu Düzeyinde Analiz .....	65
3.5.2. Canlılık Analizi .....	66
3.6. İstatistik Analizleri.....	66
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....</b>	<b>67</b>
4.1. PANC-1 Hücre Hattına Naloxone Uygulamasının Sonuçları.....	67
4.1.1. PANC-1 Hücre Canlılığı Üzerinde Naloxone Uygulamasının Etkisi.....	67
4.1.2. Naloxone Uygulaması Sonrası PANC-1 Hücrelerinin Morfolojilerinin İncelenmesi .....	68

4.1.3. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone Uygulamasının TLR4, IRAK4 ve VISTA Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi .....	68
4.2. siRNA Uygulaması Sonrası RNA İzolasyon Bulguları .....	69
4.3. siRNA Etkinliğini Gösteren qRT-PCR Sonuçları.....	70
4.3.1. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan VISTA-siRNA Transfeksiyonunun VISTA Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları .....	70
4.3.2. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan 25nM GAPDH-siRNA Transfeksiyonunun GAPDH Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları .....	72
4.3.3. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan VISTA-siRNA Transfeksiyonunun IRAK4 Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları .....	73
4.3.4. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan VISTA-siRNA Transfeksiyonunun TLR4 Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları.....	75
4.4. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan siRNA Transfeksiyonunun Hücre Canlılığına Etkisi .....	76
4.5. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve siRNA'nın Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Hedef Genler Üzerindeki Sinerjik Etkisi.....	77
4.5.1. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve siRNA Uygulamasının VISTA Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi .....	78
4.5.2. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve VISTA-siRNA Uygulamasının TLR4 Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi .....	78
4.5.3. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve VISTA-siRNA Uygulamasının IRAK4 Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi .....	79
4.6. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve siRNA'nın Kombinasyon Halinde Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi .....	80
4.7. Naloxone ve siRNA Uygulaması Yapılan PANC-1 Hücrelerinin Morfolojilerinin İncelenmesi .....	81
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>82</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>88</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>89</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>109</b>

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa No</b>
2.1. Pankreas Kanseri TNM Evrelemesi	10
2.2. Toll-like reseptörlerin mikrobiyal ligandları	21
2.3. Toll-like reseptörlerin endojen ligandları	22
2.4. TLR4 Ligandları	34
3.1. Çalışmada kullanılan PANC-1 pankreas kanseri hücre hattının özellikleri	50
3.2. T-75 flasklarına ekilen hücreler	52
3.3. cDNA Sentezinde Kullanılan RNA, Primer ve Su Bileşenlerinin Miktarları	54
3.4. cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları	54
3.5. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-qPCR' de kullanılan primer listesi.	55
3.6. qRT-PCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı	56
3.7. qRT-PCR protokolü	57
3.8. VISTA siRNA-pool İçerisindeki siRNA Dizi Bilgileri	57
3.9. GAPDH Kontrol siRNA-pool İçerisindeki siRNA Dizi Bilgileri	58
3.10. Non-Target siRNA-pool İçerisindeki siRNA Dizi Bilgileri	58
3.11. Transfeksiyon karışımının hazırlanması	59
3.12. cDNA Sentezinde Kullanılan RNA, Primer ve Su Bileşenlerinin Miktarları	62
3.13. cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları.	62
3.14. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-qPCR' de kullanılan primer listesi	63
3.15. qRT-PCR'da kullanılacak reaktifler ve miktarları	64
3.16. qRT-PCR Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri	64
3.17. Naloxone ve VISTA-siRNA'nın PANC-1 hücre hattındaki sinerjik etkilerinin araştırılması için hazırlanan test grupları	65
4.1. 271 µM Naloxone uygulaması sonrasında HUVEC ve PANC-1 hücre hatlarında VISTA, TLR4 ve IRAK4 gen ekspresyonlarındaki 2-ΔΔCT ve	69

P- değerinin karşılaştırılması

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
	<b>No</b>
2.1. Pankreasın Anatomisi	4
2.2. İnvaziv pankreas karsinomuna üç farklı morfolojik yolak modeli	6
2.3. Tüm yaş ve her iki cinsiyet dahil olmak üzere tahmini olarak dünya genelinde 2020 yılındaki pankreas kanseri insidansı	7
2.4. Tüm yaş ve her iki cinsiyet dahil olmak üzere tahmini olarak dünya genelinde 2020 yılındaki pankreas kanseri mortalitesi	8
2.5. PDAC onkogenezinin ilerleme modeli	13
2.6. Toll-like reseptörlerin genel yapısı	20
2.7. Bazı TLR'lerin bazı ligandları ve aktivasyon ürünleri	21
2.8. a. Mikroorganizma veya bakterilerden üretilen PAMP'ların ve hasar sonucu salınan DAMP'ların hücre zarında bulunan TLR'ler ile etkileşimi. TIR domainine sahip reseptörlerin TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 heterodimerizasyon veya TLR4 ve TLR5'in homodimerizasyon ile aktivasyonu. b. TIR domainine bağlanan IRAK1 ve IRAK4'ün Myd88 tarafından fosforlanması sonucu aktivasyonu c. Aktif IRAK adaptör moleküllerinin TRAF6 molekülünü fosforlayarak aktif hale geçmesi d. TRAF6 molekülünün TAB1 ve TAB2 moleküllerini fosforlayarak aktivasyonundan sonra TAK1 molekülünü de aktif hale getirmesi, TRAF6'nın ubiquitinasyonlanması ve IKK molekülünün TAK1 tarafından fosforlanması e. Fosforlanan IKK kompleksinin TAK1'den ayrılması, NFκB'yi baskılayan IKB molekülünün fosforlanarak ayrılması f. Fosforlanan IKB molekülünün ubiquitinasyonlanması g. Aktif NF-κB molekülünün çekirdek içine girerek DNA'ya bağlanıp proinflamatuvar sitokin genlerinin ekspresyonunu sağlaması	22
2.9. TLR sinyalizasyonunda yer alan Myd88, IRAK-4 ve IRAK-1 moleküllerinin domainleri ve bağlantı noktaları	24
2.10. Myd88 adaptör molekülünün TIR domaini ile TLR'ye, DD domaini ile IRAK adaptör molekülüne bağlanması	25
2.11. LPS'nin ve endojen ligandların TLR4 reseptörü ile MD-2	26

aracılı bağlantısı sonucu MYD88 bağımlı ve MYD88 bağımsız yolların uyarılmasıyla proinflamatuvar sitokin ve tip1 interferon genlerinin NF-κB aracılığıyla aktivasyonu	
2.12. Myd88 bağımlı TLR sinyal yolağı	27
2.13: Aktif T hücrelerinde bulunan CTLA-4 reseptörünün antijen sunan hücrelerde (APC) eksprese olan CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) molekülleri ile etkileşimi	33
2.14. Tümör hücresinin yüzeyinde eksprese olan PD-L1 molekülünün T hücresindeki PD-1 reseptörü ile etkileşimi sonucu T hücresinin baskılanarak tümör hücresine karşı yanıtızsız kalması	34
2.15. VISTA'nın yapısı ve sitoplazmik kuyruğunda yer alan korunmuş SH2, SH3 ve PKC (protein kinaz C) bağlayıcı motifler	35
2.16. VISTA molekülünün hücreler üzerindeki ekspresyonu	36
2.17. VISTA/VSIG-3 etkileşiminin T hücreleri üzerinde ko-inhibitör görev görerek sitokin ve kemokin ekspresyonunu ve salınımını baskılaması	37
2.18. T hücrelerinde eksprese olan PSGL-1 ligandının antijen sunan hücrelerde eksprese olan VISTA molekülü ile etkileşimi sonucu T hücre yanıtının baskılanması	37
2.19. Kanserli hücrelere Anti-VISTA Mab verildiğinde özellikle APC'lerde eksprese olan VISTA'nın T hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkisi kalkar ve bunun sonucunda da tümör hücrelerine karşı sitokin üretimi ve salınımı gerçekleşir	38
2.20. Antisens etki gösteren CHS geninin petunya bitkisinde göstermiş olduğu fenotip	39
2.21. RNA interferansın <i>C.elegans</i> 'taki Mex-3 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri a.RNA enjekte edilmemiş embriyo b.Antisens RNA enjekte edilmiş embriyo c.dsRNA enjekte edilmiş embriyo	40
2.22. miRNA biyogenezi	42
2.23. siRNA'nın şematik görüntüsü	42
2.24. siRNA ve miRNA'nın işlenmesi sonucu gen susturmaları	43
2.25. DICER enziminin dsRNA'dan siRNA yapmasını sağlayacak domainleri ve RISC kompleksinin siRNA oluşumu için gerekli olan	44

alt birimi TRBP	
2.26. RISC kompleksinin bileşenleri	45
2.27. Uzun dsRNA DICER1 ve ona bağlanan transaktivasyon cevap elemanı RNA bağlayıcı protein (TRBP) aracılığıyla kesilerek 3' ucunda 2-3 nükleotit fazlalığına sahip siRNA olmaktadır. AGO-2 enziminin de gelmesiyle oluşan RISC kompleksi, rehber ve yolcu zincirlerin birbirinden ayrılmasını, rehber zincir ile de hedef mRNA'ya %100 komplementer şeklinde bağlanmayı sağlamaktadır. AGO-2 hedef mRNA'yı keser, post-transkripsiyonel susturma gerçekleşmektedir	46
2.28. Memeli hücrelerine verilen farklı siRNA stratejileri	47
3.1. İlaç etkinliğinin belirlenebilmesi için yapılan MTT uygulamasının 96 well plate üzerindeki deney düzeneği	51
3.2. qRT-PCR için hazırlanan elisa plate deney düzeneği	55
3.3. siRNA susturma yüzdesi hesaplamasında kullanılan şablon	64
4.1. PANC-1 hücre hattının Naloxone ile 72 saat inkübasyonundan sonraki konsantrasyona bağlı % canlılık oranı	67
4.2. (A) Naloxone uygulanmamış ve (B) 72 saatlik 217,789 µM Naloxone uygulaması yapılmış PANC-1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X büyütme)	68
4.3. PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarına 72 saat Naloxone uygulaması sonucunda TLR4, IRAK4 ve VISTA gen ekspresyonlarındaki değişim	69
4.4. %1'lik Agaroz jelde RNA görüntüleme Sağdan sola doğru Marker, 25nM NT (48h), 25nM VISTA (48h), 25nM GAPDH (48h), 25nM NT (24h), 25nM VISTA (24h), 25nM GAPDH (24h)	70
4.5. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulamasının qRT-PCR ile gösterimi	71
4.6. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulamasının qRT-PCR ile gösterimi	71
4.7. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulamasının qRT-PCR ile gösterimi	72

4.8. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM GAPDH-siRNA uygulaması sonrasında GAPDH gen ekspresyonundaki qRT-PCR sonucu	72
4.9. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	73
4.10. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	74
4.11. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	74
4.12. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	75
4.13. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	76
4.14. PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	76
4.15. PANC-1 hücrelerine farklı dozlarda uygulanan VISTA-siRNA ve NT-siRNA'ların kontrole göre hücre canlılığına etkisi	77
4.16. PANC-1 hücre hattına Naloxone + 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında VISTA gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	78
4.17. PANC-1 hücre hattına Naloxone + 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	79
4.18. PANC-1 hücre hattına Naloxone + 25nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu	79
4.19. PANC-1 hücre hattına Naloxone ile 25 nM VISTA-siRNA'nın kombinasyon halinde ve 25 nM NT-siRNA, 25 nM GAPDH-siRNA ve 25 nM VISTA-siRNA uygulamasının hücre canlılığına olan etkisinin MTT analizi grafiği	80
4.20. (A) Naloxone + VISTA-siRNA ve (B) uygulama yapılmamış	81

kontrol grubu PANC-1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X  
büyütme)

5.1. Naloxone'un etki mekanizması

85

## SİMGELER VE KISALTMALAR

DAMP	Hasarla ilişkili moleküller patternler
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	Çift zincirli RNA
EBV	<i>Epstein-Barr</i> virüsü
GLOBOCAN	Küresel Kanser Gözlemevi
HBV	Hepatit B virüsü
HIV-1	HIV tip 1
HUVEC	İnsan göbek damarı endotelial hücreleri
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IPMN	İntraduktal papiller neoplazi
KRAS	Kristen virüsü ras
MCN	Müsinöz kistik neoplaziler
miRNA	Mikro RNA
MMP	Matriks Metallo Proteaz
mRNA	Mesajcı RNA
NT	Non Target
PAMP	Patojenle ilişkili moleküller patternler
PanIN	Pankreatik intraepitelial neoplaziler
PDAK	Pankreas Duktal Adenokarsinoma
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	RNA indükleyici kompleksi
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA interferans
siRNA	Küçük interferans RNA
TLR	Toll-like reseptör
VISTA	T hücre aktivasyonunun V-domain immunoglobulin baskılayıcısı

## 1. GİRİŞ

Kanser, normal hücrelerin zaman içerisinde mutasyonların etkisiyle malign dönüşüme uğrayarak genetik materyalin hasar görmesi üzerine devamlı hücre çoğalması sonucunda oluşmaktadır (Demirelli, 2003). GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser kaynaklı ölüm tespit edilmiştir. Verilere göre Dünya çapında 2040 yılında 28,4 milyon yeni kanser vakasının meydana geleceği tahmin edilmektedir (Sung ve ark., 2021).

Kanserden ölümlerinin yaklaşık %70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Tütün kullanımı, alkol kullanımı, sağlıksız beslenme ve fiziksel hareketsizliğin kanser gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Özellikle ileri yaşlarda daha fazla kanser gelişmesinin nedeni, yaş ilerledikçe hücrel tamir mekanizmalarının daha az etkili olma eğilimi ile ilişkilendirilmiştir (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Erişim tarihi:17.03.2020).

2012'deki 14 milyon kanser vakasının 2,2 milyonu (%15,4) karsinojen enfeksiyonlarına bağlıdır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından karsinojen ajanları; *Helicobacter pylori*, hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), HIV tip 1 (HIV-1), insan papilloma virüsü, *Epstein-Barr* virüsü (EBV) ve insan herpesvirüsü tip 8 (HHV-8) olarak belirlenmiştir (Plummer ve ark., 2016).

Pankreas duktal adenokarsinom (PDAK), pankreasın malign tümörlerinden olup en yaygın görülen tipidir ve Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin yedincisidir (Rawla, 2019 ; <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/13-Pancreas-fact-sheet.pdf>, Erişim tarihi: 14.05.2021). Pankreas kanseri non-invaziv lezyonlardan olan pankreatik intraepitelial neoplazi (PAIN), intraduktal papiller neoplazi (IPMN) ve müsinöz kistik neoplaziden (MCN) köken almaktadır (Göral, 2014). Oldukça yaygın bu kanser tipinin henüz nedeni bilinmiyor olup yaş, sigara kullanımı, obezite, diyabet, kimyasal karsinojenler (benzin, böcek ilacı), cinsiyet, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, kronik pankreatit ve aile anamnezine göre risk faktörleri belirlenmiştir. GLOBOCAN 2020 tahminlerine göre pankreas kanseri dünya genelinde 466.003 kişinin ölümüne, 495.773 yeni vakaya neden olan en yaygın 12. kanserdir (Sung ve ark., 2021).

Pankreas kanseri erken evrelerde herhangi bir semptom göstermediğinden dolayı hızlıca yayılma göstermektedir ve bundan dolayı teşhisi oldukça zordur. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere pankreas kanseri için tedavi yöntemlerinin başarı oranı düşük ve nüksü kaçınılmazdır. Pankreas kanserinin oldukça heterojen ve

karmaşık yapısından dolayı hedefli ve kombine tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin sağ kalım oranını arttırabileceği düşünülmektedir (Banerjee ve ark., 2018).

Antikanser immun cevabı arttırmak için immun check-pointler gibi T hücrelerini düzenleyici yolakların hedeflenmesi ile yapılan tedavilerin birçok kanser türünde başarı ile sonuçlandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Cheng, Zhao, & Zhao, 2018).

Kanser hücreleri otoimmunitenin baskılanması için immunitayı düzenleyen immun check-pointleri hücre zarında eksprese ederek veya uyararak immun sistem hücrelerinden kendilerini korumayı başarmaktadırlar. T hücre aktivasyonunun V-domain immunoglobulin baskılayıcısı (VISTA), negatif immun check-point molekülü olarak işlev yapan Tip 1 transmembran proteindir. Miyeloid hücrelerde, kanser hücrelerinde, Foxp3+ ve CD4+ regülatör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. T hücre aktivasyonunu ve sitokin üretimini CD4+ ve CD8+ T yardımcı hücrelerde bulunan bir inhibitör reseptörü ile kuvvetli bir şekilde baskılamaktadır (Lines ve ark. 2014). Bu immun check-pointleri bloke eden ajanların kullanılmasıyla, kanser hücrelerinin sağ kalımında, proliferasyonunda ve migrasyonunda azalma gerçekleşmiş ve böylece immüno terapiye olan ilgi artmıştır (Brahmer ve ark. , 2012 ; Gelao, Criscitiello, Esposito, Goldhirsch, & Curigliano, 2014).

Toll, ilk olarak *Drosophilla melanogaster* türünde transmembran proteinini kodlayan gen olarak tespit edilmiştir (Hashimoto, Hudson, & Anderson, 1988). Daha sonra yapılan çalışmalarla birlikte toll geninin kodladığı proteinin homoloğu memelilerde tespit edilmiş ve toll-like reseptör (TLR) olarak adlandırılmıştır (Güven & Can, 2012). TLR'nin memelilerde keşfedilmesinden sonra ise doğal bağışıklık sisteminde özellikle de immun cevapta, inflamasyonda ve patojenin tanınmasında rol oynadığı tespit edilmiştir. Ekzojen enfeksiyon ligandları (PAMP, patojenle ilişkili moleküller patternler) ve doku yaralanması/ölümü sırasında salınan endojen moleküller (DAMP, hasarla ilişkili moleküller patternler) ile uyarıldıktan sonra yanıt oluşturan TLR'ler, doğal immün sistem hücreleri olan makrofaj ve dentrik hücrelerinin yanı sıra epitel ve fibroblast hücrelerinde de eksprese olmaktadır (Turul & Ersoy, 2004 ; Goulopoulou, McCarthy, & Webb, 2016 ; Özbek, Hitit, Ergün, Beyaz, & Ergün, 2017).

TLR ailesinden olan TLR4 hem LPS hem de DAMP'lar ile aktive olarak proinflamatuvar sitokin sentezine sebep olan hücre zarı reseptörü olarak bilinmektedir. Doğuştan gelen immun hücrelerde ve birçok tümör hücresinde eksprese edilmektedir. Özellikle tümör oluşumunu tetiklemede, tümör büyümesinde, apoptozu indüklemeye ve kemoterapiye dirençte görev almaktadır (Chen, Kao, & Liu, 2018). Normal pankreas

epitel hücrelerine göre kanser hücrelerinde daha yüksek seviyede gen ekspresyonu olan TLR4, pankreas duktal adenokarsinom (PDAC) hastalardaki kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Lanki ve ark., 2018).

RNA interferans (RNAi) gen ekspresyonunu baskılamak veya susturmak için kullanılan oldukça spesifik bir yaklaşım olarak bilinmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanser gibi çeşitli patolojik durumların tedavisi için önemli bir potansiyeldir. Bu yöntemde kodlanmayan RNA molekülleri hedef gen ekspresyonunu veya translasyonunu sekansa özgü bir şekilde inhibe etmektedir (Chen ve ark., 2018).

RNAi mekanizmasının bir parçası olan siRNA (küçük interferans RNA), dsRNA'nın 21-23 nükleotit uzunluğunda işlenmesi sonucu oluşmaktadır ve memeliler için sentetik veya viral kaynaklıdır. Birçok hastalıkta post-transkripsiyonel seviyede genlerin aşırı ekspresyonunu baskılamak ve moleküler yolları anlamak için siRNA kullanarak sekansa özgü gen susturması yapılmaktadır (Singh ve ark., 2016 ; Fakhr, Zare, & Toolabi, 2016)

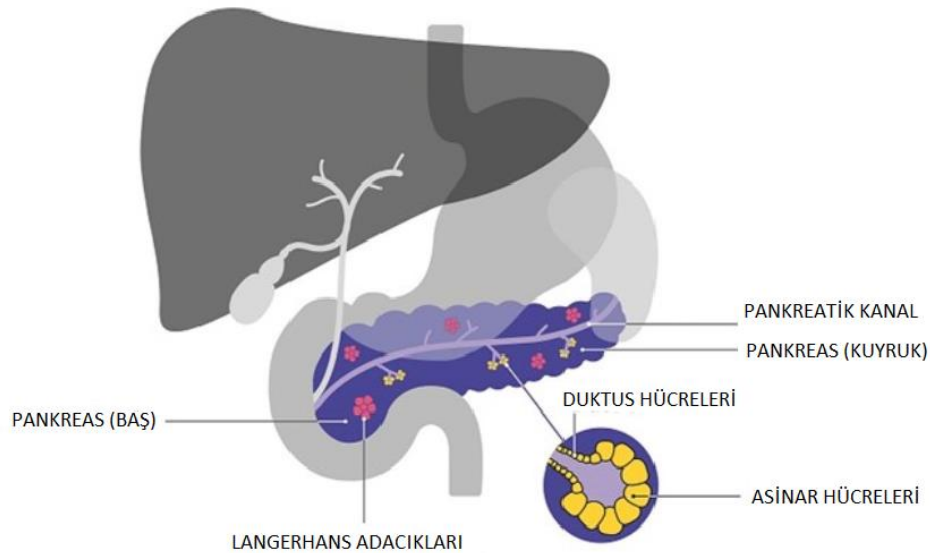
Bu çalışmada, PANC-1 insan pankreas kanserinin progresyonu için önemli olan toll-like reseptör 4 (TLR4) gen ekspresyonu, TLR4 inhibitörü olan Naloxone ile susturulmaya çalışırken aynı zamanda bir negatif immun check-point olan VISTA (T hücre aktivasyonunun V-domain Ig baskılayıcısı) gen ekspresyonunu da spesifik olarak siRNA ile susturulması ve bunun akabinde TLR4 sinyal yolağının VISTA ile olan ilişkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Literatürde TLR4 sinyal yolağı ile VISTA arasında ilişkiyi gösteren ve sinyal yolağı analizi yapmak üzere herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışma sonucunda elde edilen veriler pankreas kanseri gelişimi ve proliferasyonunda TLR4 ve onun down stream yolağında yer alan IRAK4 molekülünün kötü prognozla ilişkili olduğunu ve kanser gelişiminde TLR4 sinyal yolağının negatif immun check-point VISTA ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın pankreas kanserini tedavi etmeye yönelik yapılan çalışmalara yeni yaklaşımların geliştirilmesine ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri

Pankreas, 14-18 cm uzunluğunda ve 2-3 cm kalınlığında 50-100 g ağırlığında 3 ana kısımdan oluşan (baş, gövde, kuyruk) periton zarı ile karın duvarının arasında bir organdır (Dolenšek, Rupnik, & Stožer, 2015). Toplam pankreas hacminin %96-99 kadarı enzim salgılayan ekzokrin pankreas, geri kalanı da hormon salgılayan endokrin pankreasın Langerhans adacıklarından oluşmaktadır. İnsülin hormonu langerhans adacıklarının  $\beta$  hücrelerinden sentezlenerek salgılanmaktadır (Rahier, Wallon, & Henquin, 1981). Ekzokrin pankreasta duktal ve asiner hücreler bulunmaktadır. Pankreatik kanallar (duktuslar), asiner hücrelerde üretilen sindirim enzimlerinin ve bikarbonat iyonlarının ince bağırsağa ulaşmasında görev yapmaktadırlar (Stark & Eibl, 2015) (Şekil 2.1).



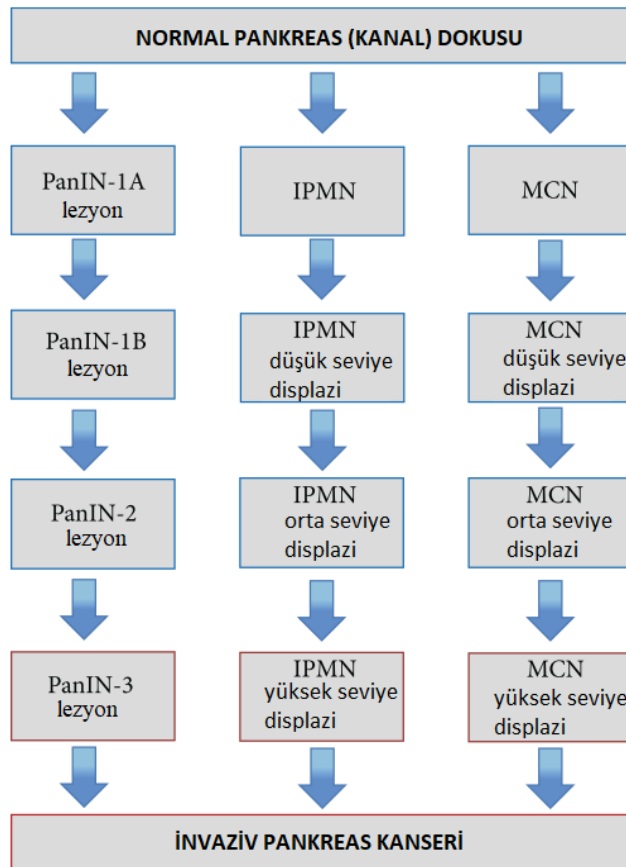
**Şekil 2.1.** Pankreasın Anatomisi

(<https://www.pancreaticcancer.org.uk/information-and-support/facts-about-pancreatic-cancer/types-of-pancreatic-cancer/> Erişim tarihi: 29.03.2020)

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK), pankreasın maling tümörlerinden en yaygın görülen tipidir ve Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin yedinci sırasında yer almaktadır (Rawla ve ark., 2019). Pankreas adenokarsinomlarının yaklaşık % 60-70'i pankreasın baş kısmında, geri kalanı gövdede (% 15) ve kuyrukta (% 15) bulunmaktadır (McGuigan ve ark., 2018). Pankreas kanserlerinin %95'i ekzokrin pankreas kökenli, %5'i endokrin pankreas kökenlidir. Ekzokrin kökenli pankreas kanserinin en yaygın tipi ise pankreatik duktal epitelyumunu örten hücrelerden kaynaklanan pankreas duktal adenokarsinomdur (PDAC) (DiMaio, 2014).

Pankreas kanseri gelişiminde pankreas intraepitelyal neoplazmı (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplazmı (IPMN) ve müsinöz kistik neoplazmı (MNC) olmak üzere 3 öncü lezyon bulunmaktadır (Şekil 2.2). Sağlıklı pankreas hücreleri genetik değişiklik geçirerek bazal membranı geçemeyen ve invaziv olmayan lezyonlara dönüşmektedirler. Mutasyonların birikimiyle düşük displazilerin yüksek displaziye ve bununla birlikte invaziv pankreas kanserinin geliştiği düşünülmektedir. Ancak genellikle non-invaziv prekürsör lezyonlar, malign hale dönüşmeden tedavi edilebilmektedir. Bu nedenle, pankreastaki preinvaziv prekürsör lezyonların saptanması ve tedavisi için daha fazla çabanın sarf edilmesi gerekmektedir (Hruban ve ark., 2001 ; Hruban ve ark., 2004 ; Distler, Aust, Weitz, Pilarsky, & Grützmann, 2014).

PanIN (pankreas intraepitelyal neoplazmlar) kanserleşmede PanIN-1 (zayıf seviye), PanIN-2 (orta seviye) ve PanIN-3 (yüksek seviye) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır. Pankreatik duktal sistemin tüm lezyonlarının neredeyse hepsini kapsayan PanIN, pankreas kanserine dönüşen en yaygın epitelyal neoplazmadır (Hruban ve ark., 2001 ; Takaori, 2007). IPMN (intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar) genelde pankreasın baş kısmında oluşan, bol miktarda müsin üreten ve gözle görülebilen 1cm'den büyük neoplazmlarken, PanIN'ler 5mm'den küçük mikroskopik lezyonlardır (Takaori, 2007). MCN (müsinöz kistik neoplazmlar) ise müsin üreten epitel tabakalarda yumurtalık benzeri stromada görülmektedir. Nadir görülen malign neoplazmlardan olup genellikle kadınlarda geliştiği bilinmektedir. Pankreatik duktal sistemle hiçbir bağlantı göstermeyen MCN, pankreasın gövdesinden ziyade kuyruk kısmında oluşmaktadır (Yonezawa, Higashi, Yamada, & Goto, 2008).



**Şekil 2.2.** İnvaziv pankreas karsinomuna üç farklı morfolojik yolak modeli (Distler ve ark., 2014)

Hanahan ve arkadaşları kanserin neoplazmdan metastaza ilerlemesini büyüme faktörlerinin otonom olarak üretimi, anti büyüme sinyallerinde yanıt eksikliği, apoptozdan kaçma, sınırsız replikasyon yeteneği, devamlı anjiogenez ve doku invazyonu/metastazı olarak 6 adımda tanımlamışlardır. Bu olayların meydana gelmesinde bir düzen yoktur, kanserin türüne bağlı olarak tek tek veya kombinasyon halinde oluşabilmektedir (Moniri, Dai, & Warnock, 2014).

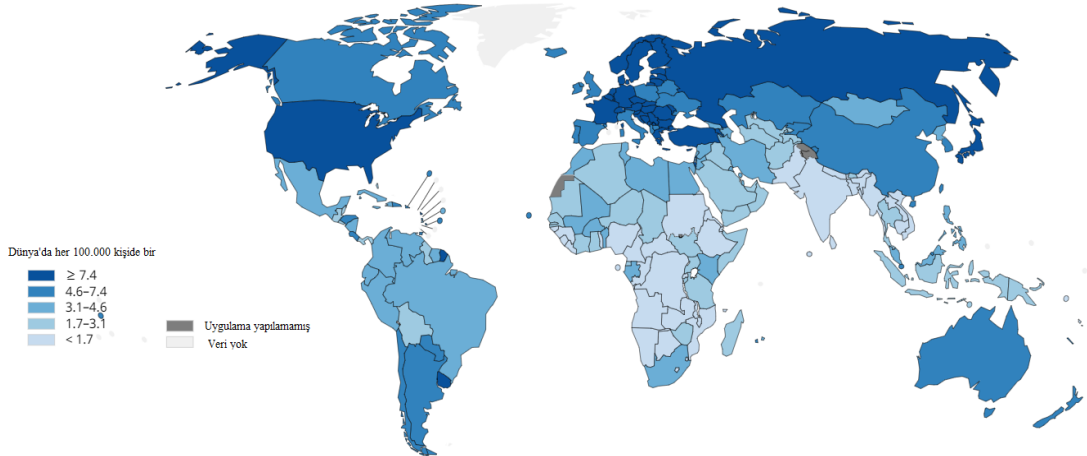
Pankreas kanseri, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkmaktadır. Özellikle hücre döngüsündeki kontrol noktalarında bulunan kinazlarda, tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde meydana gelen mutasyonlardan dolayı kanserleşme gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda hücrelerde apoptoza karşı direnç gelişir, tümör baskılayıcı faktörleri inhibe ederek büyüme faktörlerine ihtiyaçları olmadan büyümeye ve çoğalmaya başlarlar. Ayrıca telomerdeki kısalmalar, anöploidi ve kromozomal bozukluklar, kronik yangının artışı, otofajinin gerçekleşmemesi, hücre içi yolaklardaki bozukluklar, hücreler arası bağlantıların zayıflaması, anormal DNA metilasyonu, DNA hasarı ve tamir mekanizmasındaki bozuklukların hepsi kanser oluşumunda rol oynayan temel moleküler faktörler olarak bilinmektedir (Baran, 2018).

### 2.1.1. Pankreas Kanseri Epidemolojisi

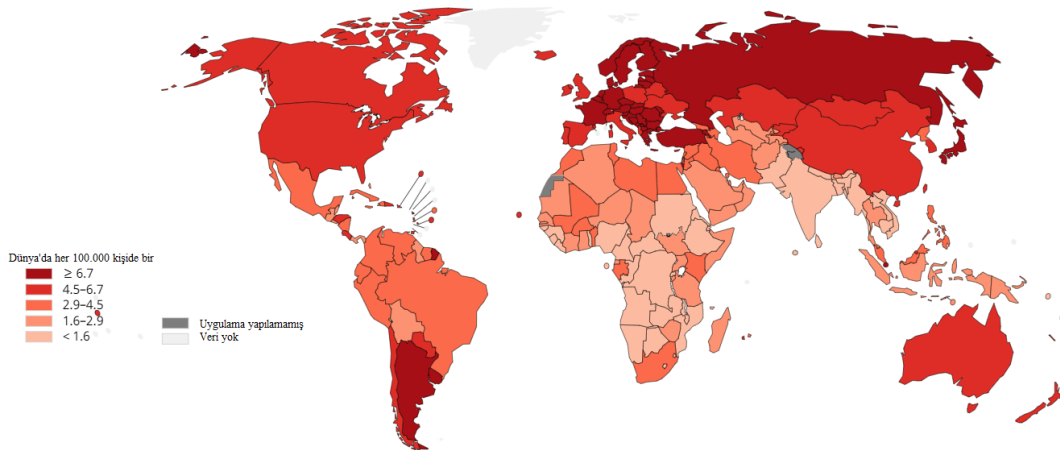
Pankreas kanseri insidansı popülasyonlara, cinsiyete ve yaşa göre farklılık göstermektedir. 2020 yılında pankreas kanseri tüm kanserlerin %2,6'sını oluşturmuştur ve dünya genelinde 495,773 yeni pankreas kanseri vakası kaydedilmiştir (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). 28 Avrupa ülkesinde yapılan bir çalışmada, pankreas kanserinin 2025 yılına kadar üçüncü önde gelen kanser ölüm nedeni olarak meme kanserini geçeceği tahmin edilmektedir (Sung ve ark., 2021).

GLOBOCAN 2020 verilerine göre Türkiye’de her iki yaş için pankreas kanseri tüm kanserler arasında en ölümcül 4.kanserdir. Verilere göre pankreas kanseri 100.000 kişide 8392 vaka ve 8214 ölüm olarak tespit edilmiştir (<https://gco.iarc.fr/today/explore> Erişim Tarihi: 12.04.2021).

Pankreas kanseri Kuzey Amerika ve Avrupa’da kolon kanserinden sonra en sık görülen gastrointestinal kanser olarak bilinmektedir. Erken evrede fark edilememesi ve etkili tedavilerin kısıtlı olmasından dolayı pankreas kanserine yeni ve etkili tedavi stratejileri geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir (Rahib ve ark., 2014 ; Korc, Jeon, Edderkaoui, Pandol, & Petrov, 2017).



**Şekil 2.3.** Tüm yaş ve her iki cinsiyet dahil olmak üzere tahmini olarak dünya genelinde 2020 yılındaki pankreas kanseri insidansı (<https://gco.iarc.fr/today/explore> Erişim Tarihi: 14.05.2021)



**Şekil 2.4.** Tüm yaş ve her iki cinsiyet dahil olmak üzere tahmini olarak dünya genelinde 2020 yılındaki pankreas kanseri mortalitesi (<https://gco.iarc.fr/today/explore> Erişim Tarihi: 14.05.2021)

### 2.1.2. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri

Yaşam tarzının pankreas kanserini etkilediği bilinmektedir. Sağlıklı beslenme, düzenli fiziksel aktivite, sigara ve alkol kullanmamak pankreas kanserini dörtte bir oranında önleyebilmektedir (Korc ve ark., 2017).

En büyük çevresel faktör ise sigara içmektir. Sigara içme süresi boyunca pankreas kanserine yakalanma riski her bir sigara yılı için % 1, her 10 yıllık sigara kullanımı için % 16 oranında artmaktadır (Barone, Corrado, Gemignani, & Landi, 2016). Ailesel yatkınlık veya kalıtsal pankreatit olan sigara içenlerde, sigara içmeyenlere göre 10-20 yıl önce ortaya çıkan PC riskini de arttırmaktadır (Lowenfels ve ark. 2000; Rulyak ve ark. 2003). Sigara dumanında bulunan yüksek miktardaki kanserojenler DNA'nın yapısına katılarak mutasyonlara sebebiyet verebilmektedir. Bunun yanı sıra sigara dumanındaki bileşenlerin kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı ve AKT yolağını bozarak normal duktal hücrelerin apoptoza gitmesini engellediği tespit edilmiştir (Barone ve ark., 2016).

Pankreas kanseri 50 yaşından önce hastaların yalnız %10'unda görülmektedir ve ortalama tanı yaşı 65'tir (Zavoral, Minarikova, Zavada, Salek, & Minarik, 2011).

Düşük seviyede *Neisseria elongata* ve *Streptococcus mitis*'in ve daha yüksek seviyede *Porphyromonas gingivalis* ve *Granulicatella adiacen*'in pankreas kanseri riski ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bağırsak mikrobiyotasının dengesizliği immun efektör hücrelerin düzenlenmesinde ve sitokin salınmasında sorun yaratarak inflamatuvar aracılı hastalıklara sebep olabilmektedir (Memba ve ark., 2017).

Diyabetli bireylere göre diyabet olmayanların pankreas kanserine yakalanma oranının yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Ayrıca diyabetli pankreas kanseri hastalarında diyabet tanısı, hastaların %74-88'inde pankreas kanserinin

tanısından 24 aydan daha kısa bir sürede ortaya çıkmıştır. Tip 2 diyabette pankreas insülin üretir ancak özellikle insülin reseptörü yokluğundan veya yapısının bozulmasından kaynaklı olarak ligand-reseptör kompleksi oluşmaz ve bunun sonucunda glikoz hücre içine alınmaz. Pankreas kanseri için özellikle tip2 diyabet (T2DM) önemli bir risk faktörü olup T2DM obezite ile ilişkilendirilmiştir. Bunun sonucunda obezitenin de pankreas kanserinin ilerlemesine katkı sağladığı belirtilmiştir (Andersen ve ark., 2017).

Son 10 yılda toplanan veriler sonucunda kronik pankreatitin pankreas kanseri için önemli bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir. Ancak buna rağmen kronik pankreatitli hastaların yalnız %5'ine pankreas kanseri teşhisi konulmuştur. Pankreas kanseri teşhisinden 1-2 yıl önce ortaya çıkan pankreatit aslında tümörden kaynaklanan duktal tıkanmalar sonucunda gerçekleşmektedir (Raimondi, Lowenfels, Morselli-Labate, Maisonneuve, & Pezzilli, 2010).

Dünyanın en yaygın enfeksiyonlarından olan *Helicobacter pylori* duodenum ve midenin çeşitli alanlarına yerleşen, buralarda iltihaplanma ve kronik enflamasyona neden olan gram (-) bakterilerdir. Yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda *Helicobacter pylori*'nin pankreas kanseri ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Guo, Liu, & Wu, 2016).

Pankreatik adenokarsinomun yaklaşık %5-10'unun güçlü bir kalıtsal temele sahip olduğu bilinmektedir (Zhen ve ark., 2015). Ailedeki etkilenen kişilerin sayısına göre risk 4 ila 32 kat artarken eğer aile öyküsünde birinci derece akrabalarından 3 veya daha fazla kişide pankreas kanseri teşhisi konulmuşsa pankreas kanserine yakalanma riski 32 kat artmaktadır (Zavoral ve ark., 2011; McGuigan ve ark., 2018).

### 2.1.3. Pankreas Kanseri Evreleme

Ameliyat öncesi cerrahi evreleme, şüpheli bir PDAC'nin cerrahi için uygun olup olmadığına, kanserin büyüklüğünü, invazyon ve metastazının belirlenmesini ifade etmektedir. Günümüzde evrelemede en çok kullanılan AJCC (American Joint Comitee for Cancer) tarafından belirlenmiş "TNM" sistemidir (Stark & Eibl, 2015).

TNM sisteminde T primer tümörün boyutunu ve kapsamını, N tümörün yakın olduğu lenf nodlarının sayısını, M ise kanserin metastaz yapıp yapmadığını ifade etmektedir. T1, T2, T3, T4 primer tümörün boyutunu veya kapsamını ifade eder. T'den sonraki sayı ne kadar büyük olursa, tümör o kadar gelişmiş olarak ifade edilir. T'ler ayrıca T3a ve T3b gibi daha fazla ayrımı sağlamak için özelleştirilebilmektedir. N1, N2,

N3 kanser içeren lenf düğümlerinin sayısını ve yerini gösterir (Tablo 2.1). N'den sonraki sayı ne kadar yüksek olursa, kanser içeren lenf nodu o kadar fazladır (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>, Erişim tarihi: 04.06.2020)

**Tablo 2.1.** Pankreas Kanseri TNM Evrelemesi (Vahit, 2005 ; <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>, Erişim tarihi: 04.06.2020)

<b>Pri(T)</b>	
Tx	Primer tümör ölçülemez
T0	Primer tümör bulunamıyor
Tis	İn situ karsinom
T1	Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2 cm' den küçük
T2	Tümör pankreasta sınırlı ve en büyük çapı 2 cm' den büyük
T3	Tümör direkt olarak doudenum, safra kanalı veya peripankreatik dokulara yayılmış
T4	Tümör direkt olarak mide, dalak, kolon veya komşu kan damarlarına yayılmış

<b>Bölgesel lenf nodları (N)</b>	
Nx	Bölgesel lenf nodlarında tümör ölçülemez
N0	Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı
pN1a	Tek bir bölgesel lenf noduna metastaz
pN1b	Multipl bölgesel lenf noduna metastaz

<b>Uzak metastaz (M)</b>	
Mx	Metastaz ölçülemiyor
M0	Metastaz yok

M1	Metastaz ile kanser vücudun diğer bölgelerine yayıldı
----	---

#### 2.1.4. Pankreas Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

Pankreas kanseri için mevcut tedavi seçenekleri cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapidir. Tedavi seçenekleri, kanserin türü ve evresi, yan etkiler, hastanın tercihleri ve genel sağlık durumu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Erken bir aşamada tespit edildiğinde, pankreas kanserinin başarılı bir şekilde tedavi edilme ihtimali yüksektir. Bununla birlikte pankreas kanserinin ileri evrelerinde hastaların daha uzun yaşaması için tümörün kontrol altına alındığı tedaviler de mevcuttur (<https://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/types-treatment>, Erişim tarihi: 26.05.2020).

Pankreas kanseri 4 yıllık sağ kalım oranı %4'ten daha az olan en agresif tümörlerden biridir. Pankreas kanserinde klinik çalışmalarda kullanılan birçok yeni hedefe yönelik ajanın başarısız olması, pankreas kanserlerinde bulunan onkogenlerin up regülasyonu ve tümör supresör genlerinin down regülasyonu ile gen fonksiyonunun kaybı veya kazanımından, apoptotik ve sağ kalım yollarının düzensizliğinden kaynaklanmaktadır. Cerrahi rezeksiyon kanserin tam olarak iyileşmesi için en önemli tedavilerden biridir ancak genelde tümör metastaza uğradığı için PDAC hastalarının yalnız %15-20'sinde uygulanabilmektedir (Mahalingam ve ark., 2009 ; Zakharova, 2012).

Kemoterapi tek başına kullanılabilirken radyoterapinin tek başına kullanıldığı görülmemiştir. Kemoterapi, radyoterapiyle kombine olarak kemoradyoterapi olarak da uygulanabilmektedir. Kemoterapi tedavileri adjuvan (cerrahi işlem sonrası), neoadjuvan (cerrahi işlem öncesi) ve hafifletici olarak kategorize edilebilir. Pankreas kanserini hücre döngüsünü bozarak tedavi etmeyi hedefleyen en yaygın kemoterapi ilaçları gemsitabin, 5-florourasil (5FU), sisplatin ve oksaliplatin (Eloxatin)'dir. Kemoterapi ilaçları normal ve kanserli hücreleri ayırt etmede yetersiz olduğundan dolayı bu ilaçların yan etkileri vücudun normal hızda bölünen hücrelerine de zarar vermektedir. İlâveten ilaç direnci ve yüksek toksisitesinden dolayı kemoterapi son seçim olarak kullanılmaktadır (Moniri ve ark., 2014).

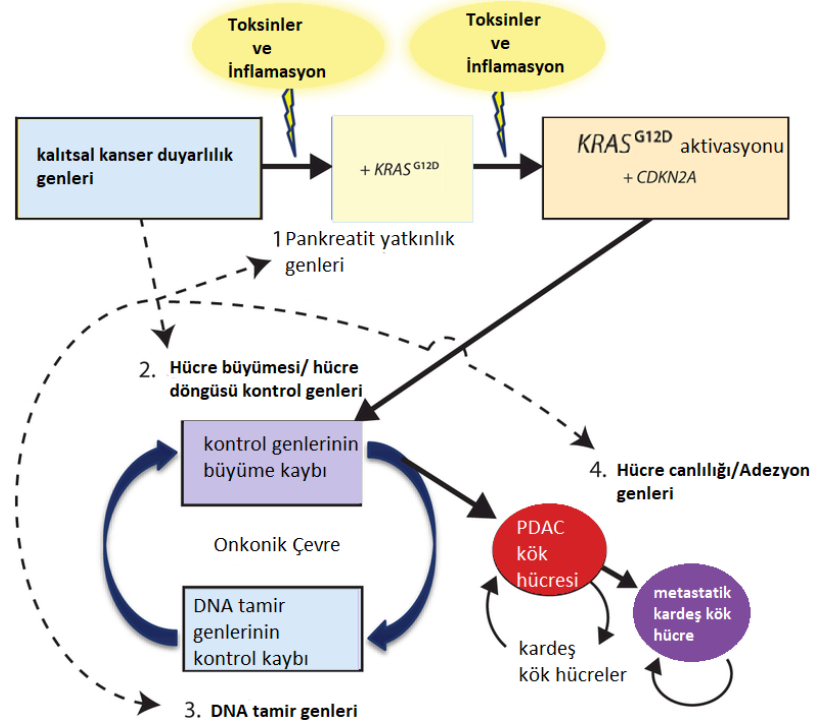
Çeşitli insan kanserleri için terapötik ajanlar kullanarak, birçok tirozin kinaz aktivitesine sahip ve kinaz aktivitesi olmayan reseptörlerin inhibisyonu ile malignitenin önlenmesi hedeflenmektedir (Santoni ve ark., 2015 ; Wu ve ark., 2020). Pankreas

inflamasyonu, diyabet ve tümör gelişmesinde TLR aracılığıyla proinflamatuvar sitokin, kemokin ve immunosüpresif sitokin üretimi gerçekleştiğinden dolayı TLR antagonistlerinin ideal terapötik strateji olabileceği düşünülmektedir. TLR antagonist ve agonistlerinin kullanımı pankreas kanseri için fayda sağlasa da radyasyon, monoklonal antikör ve sitotoksik ilaçlarla kullanımının daha yararlı olabileceği düşünülmektedir (Santoni ve ark., 2015).

### **2.1.5. Pankreas Kanserinde Genetik Değişimler ve Yolaklar**

Yapılan çalışmalar sonucunda özellikle belirli genlerdeki germline mutasyonları, pankreas kanseri ile yüksek seviyede ilişkilidir. Bunlar kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri ile ilişkili BRCA1 ve BRCA2 genleri, kalıtsal pankreatit geni olan PRSS1, ATM geni, Peutz-Jeghers sendromu (PJS) geni STK11 ve ailesel melanomun ana nedenlerinden biri olarak kabul edilen bir tümör baskılayıcı geni olan CDKN2A'dır. Hedeflenebilir moleküler yolakların aydınlatılması, kişiselleştirilmiş tedavi ve pankreas kanseri erken teşhisi ile ilgili yapılan çalışmaların ilerletilmesi PDAC tedavisi için kritik bir öneme sahiptir (Chen, Roberts, & Klein, 2017, Zhan, Shelton, Greer, Brand, & Whitcomb, 2018) **Şekil 2.5**'te pankreas kanserinin gelişme ve ilerlemesinden sorumlu çevresel ve kalıtsal etkenler gösterilmektedir.

Pankreas kanserinde tümör progresyonunun erken evresinde telomer kısalması, KRAS aktivasyonu, siklin bağlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A)/p16 inaktivasyonu yer alırken, TP53/p53 ve SMAD4/DPC4'ün inaktivasyonu ile geç evrede karşılaşılmaktadır (Hruban ve ark., 2004).



Şekil 2.5. PDAC onkogenezinin ilerleme modeli (Zhan ve ark., 2018)

Tirozin kinaz reseptörü (TKR) hücre-hücre iletişimde, hücre büyümesinde, mortalite ve farklılaşma gibi birçok biyolojik fonksiyonların kontrolünde görevli olan tirozin kinazların alt sınıfındandır ve transmembran reseptörüdür. İnsanda 58 tane tirozin kinaz reseptörü olduğu bilinmektedir (Manning, Whyte, Martinez, Hunter, & Sudarsanam, 2002). Ligand ile aktive olmuş TKR, RAS/MAPK, PI-3K/AKT ve JAK2/STAT da dahil birçok sinyal yolağını düzenlemektedir. Sinyalizasyonda oluşabilecek bozukluk başta kanser olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır. İnsan kanser tedavisinde kullanılan TKR inhibitörleri hücre içi TKR'nin ATP bağlanma bölgesini hedef alır (Du & Lovly, 2018).

RAS geni GTPase ailesinin önemli bir üyesidir ve 3 tane H-RAS, N-RAS ve K-RAS adı verilen insan proteinini kodlarlar. Bu RAS proteinleri hücre polaritesi, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerde, hücre içi sinyal yollarını kontrol ederler (Santarpia, Lippman, & El-Naggar, 2012).

KRAS (kristen virüsü ras) onkogenindeki mutasyon PDAC hastalarında %90 oranında görülmektedir. Bu bir kanserde bilinen en yüksek KRAS nokta mutasyonudur. Tümör gelişimi ve ilerlemesi için önemli bir yere sahip olduğundan dolayı KRAS marker olarak kullanılmaktadır (Moniri ve ark., 2014 ; Watanabe ve ark., 2019). KRAS'ın G13C, G61R, G61K, G61L ve G12V gibi spesifik nokta mutasyonları mevcuttur ancak içlerinden en agresif hali G12V'dir. Bu mutasyonlar spesifik aminoasit

değişimine neden olduğundan dolayı GTPase aktivitesi bozulur. Bunun sonucunda da RAS proteini GTP'ye bağlı olarak kalır ve devamlı bir hücre proliferasyonuna sebep olur (Di Magliano & Logsdon, 2013).

Wnt /  $\beta$ -katenin sinyal yolağı embriyogenez ve beyin gelişiminde önemli bir yol oynamaktadır. Glikoprotein yapısındaki Wnt'nin, Frizzled (Fz) adı verilen reseptörle ilişkiye girmesiyle yolak aktive hale geçer ve yıkıcı kompleksin baskılanmasıyla fosforlanamayan  $\beta$ -katenin nükleusa girerek burada bulunan transkripsiyon faktörleriyle (TCF/LEF-1) gen ekspresyonunu arttırmak için kompleks yapar. Sinyal yolağındaki düzensizlikler ise pankreas kanseri kemorezistansına neden olur.(Freese, Pino, & Pleasure, 2010 ; Cui, Jiang, Wang, Wang, & Xie, 2012)

Hücre döngüsünün negatif regülatörü olarak adlandırılan CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) 9p21 kromozomunda yer alır ve tümör süpresör protein olan p16'yı kodlar. CDK4'e bağlanarak inhibisyonunu sağlayan p16 molekülü, hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişi etkileyerek hücre bölünmesini yavaşlatmaktadır. CDKN2A'da fonksiyon kaybı olması ailesel atipik multiple mole melanom (FAMMM) gelişimine neden olur. Yapılan çalışmalar sonucunda FAMMM hastalarında pankreas kanseri için artan risk gözlemlenmiştir (Zhen ve ark., 2015 ; Turaçlı, 2017).

PDAC içinde aşırı eksprese edilen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) familyasından biri olan HER-2/neu 17q21.1 kromozomunda yer alır. HER-2/neu normal pankreas kanal epitelyumunda eksprese edilmezken, PanIN'de yüksek seviyede ekspresyonu tespit edilmiştir (PanIN-1A: 82%, PanIN-1B: 86%, PanIN-2 ve daha yüksek seviyede: 92%) (Yonezawa ve ark., 2008).

Tümör baskılayıcı bir protein olan p53, DNA hasarı ve proliferasyon gelişimi dahil olmak üzere çeşitli streslere yanıt veren hücre içinde önemli bir sensör olarak görev almaktadır. DNA'ya zarar veren ajanlar ve  $\gamma$  ışınması moleküllerin fosforilasyonuna, ardından p53'ün birikmesine ve aktivasyonuna neden olur. Bir stres anında p53, E3 benzeri ubiquitin ligaz olan MDM2 ile DNA'nın replikasyonunu durdurarak DNA onarımına izin verir veya hücreyi apoptoza götürerek genomu korur. Ayrıca p53 ile beraber E2F1'in DNA hasarına yanıt olarak apoptoza katkıda bulunduğu da tespit edilmiştir (Rogoff, Pickering, Debatis, Jones, & Kowalik, 2002).

Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) yolağındaki sinyalleşmelerde rol oynayan SMAD4 proteinini kodlayan ve tümör baskılayıcı gen olan DPC4, 18.kromozomun q kolunda bulunur (Massagué, Blain, & Lo, 2000). TGF  $\beta$ / SMAD4

yolağı hücre zarından çekirdeğe sinyal iletimini kontrol etmektedir ve apoptoz, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon gibi bir çok hücrel süreçten sorumludur (Shi & Massagué, 2003). SMAD4 geninde meydana gelen homozigot veya heterozigot delesyonların özellikle yüksek dereceli lezyonlara (PanIN-3) neden olduğu tespit edilmiştir (Wilentz et al., 2000).

Toll-like reseptörler (TLR'ler) patojenle ilişkili moleküler paternleri (PAMP'ler) ve hasarla ilişkili moleküler paternleri (DAMP'ler) tanıyarak patojenleri tespit etmektedir. TLR ailesinin bir üyesi olan TLR4; lenfositler, nötrofiller ve makrofajlar başta olmak üzere immün hücrelerin yüzeyinde yüksek seviyede eksprese edilmektedir. TLR4 özellikle obezite ile ilişkili metabolik bozukluklarda, apoptozda ve inflamatuvar hastalıklara karşı önemli bir rol oynamaktadır (WANG et al., 2020). PDAC'da aşırı eksprese edilen ve doğal immün sistemde yer alarak LPS ile aktif hale gelen Toll-like Reseptör 4 (TLR4); PI3K-AKT yolu ile VEGF'i düzenleyerek anjiogenez oluşumuna, karsinogenezin hızlanmasına, EMT oluşumuna, genomik instabiliteye, tümör gelişmesi, invazyonun artması ve metastaza neden olmaktadır. Lenf noduna metastaz yapan pankreas tümörünün, metastaz yapmayanlara göre daha yüksek seviyede TLR4 ekspresyonu gözlemlenmiştir (Vaz & Andersson, 2014 ; Sun ve ark., 2016).

İmmün check-pointlerden olan tip 1 transmembran proteini VISTA (T hücre aktivasyonunun V-domain Ig baskılayıcısı), bağışıklık yanıtını düzenlemede hem ligand hem de reseptör olarak görev almaktadır. VISTA, T hücrelerinin aktivasyonunu, proliferasyonunu ve sitokin üretimini baskılayan inhibitör immün check-point olarak bilinmektedir. Pankreas kanseri dokusu üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, tümör mikroçevresine infiltre olan immün hücrelerde özellikle CD68+ makrofajlarda yüksek seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. Ancak VISTA'nın pankreas kanserindeki biyolojik işleyişi tam olarak bilinmemektedir (Huang ve ark., 2020 ; Hou ve ark., 2021).

## **2.2. Tümör Mikroçevresi (TMÇ)**

Tümör mikroçevresi (TMÇ), malignliğe geçişte normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüştürüldüğü ve tümör hücrelerine de destek sağlayan karmaşık heterojen bir yapıdır (Pollard & W., 2015). Kanser hücresi, kanser kök hücresi, sağlıklı hücre, invazyon ve metastaz için gerekli hücrel ve moleküler olaylara katılan geniş bir stromal ve vasküler hücre ağından meydana gelir. Bu heterojen hücre popülasyonunda fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, kemik iliği kaynaklı kök hücreler ve progenitör hücreleri, perisitler ve adipositler de mevcuttur. TMÇ hücreleri sitokin, kemokin ve

büyüme faktörlerinin salınımı ile anjiogenez ve hipoksi oluşumu, ekstraselüler matriks ve bazal membran yıkımını sağlayarak invazyon ve metastaza neden olurlar. Ayrıca T lenfositlerini ve NK hücrelerini baskılayıp T regülatör hücreleri arttırarak immunosüpresif etki de yaratmaktadırlar (Wels, Kaplan, Raffi, & Lyden, 2008 ; Zhang, Garcia-Santos, Peinado, & Lyden, 2013)

### **T Lenfositleri**

TMÇ'de bulunan CD8+ T hücreleri, IL-2 ve IFN- $\gamma$  salgılayan Th1 hücreleri tarafından desteklenerek iyi bir prognoz gösterirken, IL-4, IL-5 ve IL-13 salgılayan Th2 hücreleri veya IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 salgılayan Th17 hücreleri B hücre yanıtını destekleyerek tümör gelişimine katkıda bulunur. İmmünsüpresör özellikteki T regülatör hücreleri ise (Treg) IL-10 ve TGF- $\beta$  salgılayıp, immun sistem hücrelerinin tümör hücrelerini algılayarak yok etmesini önler. Yüksek sayıda Treg, birçok kanser türünde daha kötü prognoz ile ilişkilidir ancak bazı kanser modellerinde tümör hücre büyümesini doğrudan baskılayarak iyi prognoz gösterdiği de bilinmektedir (Balkwill, Capasso, & Hagemann, 2012).

### **B Lenfositleri**

B10 hücreleri olarak bilinen B regülatör hücreleri güçlü bir sitokin olan IL-10 salgılayarak T hücrelerine bağlı inflamasyonu ve otoimmün hastalıkları baskılayan bir immünsüpresördür (Horikawa, Minard-Colin, Matsushita, & Tedder, 2011). Ek olarak tümörle indüklenmiş Breg hücreleri (tBreg) yüksek seviyede TGF- $\beta$  eksprese ederek de-novo şekilde Treg oluşumunu indükler ve metastazın gelişmesine büyük oranda katkı sağlar (Obradovic, 2005)

### **Tümör İlişkili Makrofajlar (TAM)**

TMÇ'de en çok bulunan hücrelerden makrofajlar, hem primer tümörün gelişiminde hem de metastaz sırasında önemli rol oynamaktadır. Primer tümörde anjiogenezi uyarır, invazyonu ve intravazasyonu destekler. T hücrelerini ve NK hücrelerini baskılayarak metastazik bölgelerde sağkalım, kalıcı büyüme ve ekstrasvazasyonu desteklediği bilinmektedir. Makrofajlar ayrıca kendiliğinden kanserle ilişkili mutasyon kazanmış endotel hücrelerinin gelişimini arttıran sitokin ve anjiogenez için oldukça önemli olan VEGF başta olmak üzere bir çok büyüme faktörü salgılayarak kanserin ilerlemesine neden olurlar (Pollard & W., 2015). M2 makrofajlar özellikle IL-

4, IL-5, IL-10 ve IL-1 $\alpha$  gibi anti-inflamatuar sitokinleri üretirler ve anjiogeneze destek sağlayarak tümör gelişimine neden olurlar. M1 makrofajları ise IFN- $\gamma$  gibi tümör hücrelerini ve mikroorganizmaları öldüren proinflamatuar sitokin üretmektedir (Mantovani, Sozzani, Locati, Allavena, & Sica, 2002).

### **Dentritik Hücreler**

Normal şartlarda vücuda giren antijeni işleyen ve sunumunu yapan dentritik hücreler, TME'nin hipoksik ve enflamatuarlı yapısı ile fonksiyonu değişir ve tümör bölgesindeki T hücresi yanıtlarını baskılayarak tümörü destekleyici özellik kazandığı bilinmektedir (Gabrilovich ve ark., 2008 ; Balkwill ve ark., 2012).

### **Kanser İlişkili Fibroblastlar (CAF)**

Doku yaralanmasında stromada yer alan fibroblastlar, parakrin sinyaller aracılığıyla miyofibroblastlara dönüşür ve TMC'inde fazla miktarda bulunan bu hücelere kanser ilişkili fibroblastlar (CAF) denir. Tümör bölgesinde azalan oksijen varlığıyla HIF-1 $\alpha$ /HIF-2 $\alpha$  moleküllerinin ekspresyonu oldukça artar ve bunun sonucunda VEGF gen ekspresyonu tetiklenerek anjiogenez oluşur. Yapılan çalışmalarda CAF aktivasyonu ile salgılanan galektin-1, VEGF ekspresyonunu artırarak tümör anjiogenezini tetiklemekte ve T hücre aracılı sitotoksik immun cevabı baskılamaktadır (Balkwill ve ark., 2012 ; Dong Tang ve ark., 2016 ; Baran, 2018). Kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan TGF- $\beta$ , EMT oluşumuna katkı sağlarken HGF, FGF, EGF gibi büyüme faktörleri de kanser hücrelerinin proliferasyonu için oldukça önemlidir. (Bhowmick et al., 2004). CAF'lardan salınan bir kemokin olan CXCL12 ise malign hücrelerin proliferasyonunu ve büyümesini sağlamaktadır (Orimo et al., 2005).

### **MDSC**

İnsan vücudunda hematopoietik hücreler bakımından en çok bulunan miyeloid hücreler makrofaj, granülosit ve dentritik hücelere farklılaşır. Normal şartlar altında organizmayı patojenlerden korur, dokuların yeniden düzenlenmesini sağlar ve ölmekte olan hücreleri ortadan kaldırır. Ancak tümör mikroçevresinde miyeloid hücreler immunosüpresif hücelere dönüşmektedir. TME'de yüksek seviyede bulunan bu hücelere miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC) denir. MDSC'ler ROS üretiminin yanı sıra iNOS ekspresyonunu sağlayarak L-argininin metabolizasyonu ile NO oluşumunu indükler. Bu sayede T hücrelerinin TCR'deki zeta zincirini bozarak T

hücre yanıtını baskıladığı bilinmektedir (Rodriguez ve ark., 2004 ; Gabrilovich ve ark., 2008). MDSC'ler tarafından membranda eksprese edilen bir metalloproteaz olan ADAM17, naif CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin yüzeyindeki L-selektin molekülünü azaltır. Böylece T hücrelerinin ikincil lenfoid düğümlerine gidip antijenle karşılaşarak aktif hale geçmesi engellenir. Ayrıca IL-10 ve TGF- $\beta$  ekspresyonu ile naif CD4+ T hücrelerinin Treg hücrelerine dönüşümünü indüklediği ve NK hücrelerini inhibe ettiği bilinmektedir (Gabrilovich ve ark., 2008).

### 2.3. Toll-like Reseptör (TLR) Ailesi

Tüm çok hücreli canlılar mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlardan korunmak için savunma sistemine ihtiyaç duyarlar. Bu savunma sistemi enfeksiyonlara karşı ilk koruyucu engeli oluşturan doğal bağışıklık sistemidir. Epitel bariyer, fagositler (makrofajlar, nötrofiller), komplemanlar ve natural killer (NK) hücreler sahip oldukları özel reseptörler aracılığıyla hem enfeksiyonu engellerler hem de konak dokuya girmiş olan mikroorganizmaların etkisizleştirilmesini sağlamaktadırlar (Abbas ve Lichtman, 2007).

Toll-like reseptörü (TLR) ilk olarak *Drosophila Melanogaster*'da embriyonal dorsoventral polaritesinin gelişiminde esansiyel bir gen olarak keşfedilmiştir. 1995 yılında Edward B. Lewis ve Eric Wieschaus erken embriyonik gelişimin genetik kontrolünde Toll geninin rolü ile ilgili yapmış oldukları çalışmalarından dolayı 1995 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'nü almışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarda TLR knockdown olan *Drosophila Melanogaster*, mantar enfeksiyonundan ölmüş ve bunun sonucunda TLR'nin antifungal etkisi de tespit edilmiştir (Lemaitre ve ark., 1996 ; Eckerle & Eltzschig, 2011).

2011 yılında Bruce A. Beutler, Jules A. Hoffmann ve Ralph M. Steinman'a meyve sineği ve memelilerde doğuştan gelen bağışıklığın TLR aktivasyonu ile ilişkisine dair çığır açan keşiflerinden dolayı 2011 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görülmüşlerdir (Volchenkov, Sprater, Vogelsang, & Appel, 2012).

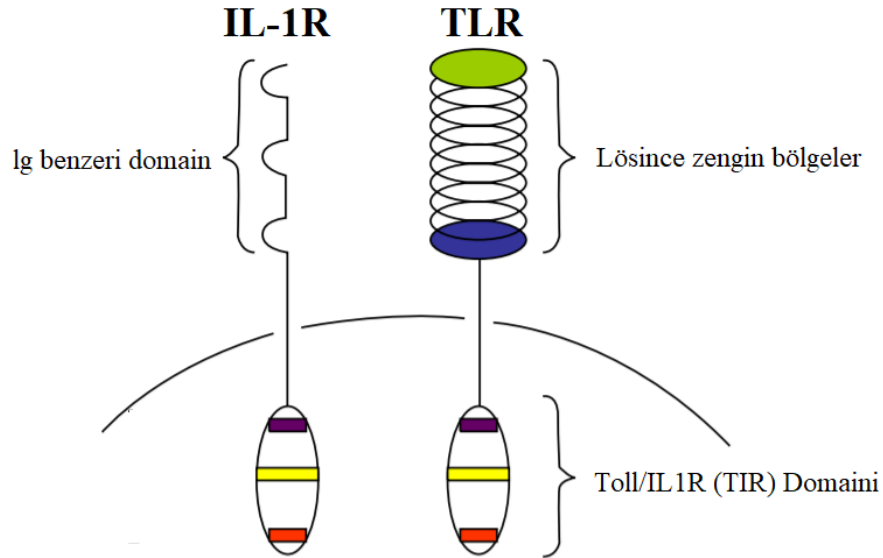
TLR'ler APC'lerde (makrofajlar, dentritik hücreler, B hücreleri), antijene spesifik T hücreleri gibi immun hücrelerde ve fibroblast, epitel hücreler gibi immun olmayan hücrelerde eksprese edilir. APC'lerde eksprese edilen TLR'ler aracılığıyla antijenler yakalanır ve yolakların aktivasyonu sonucu salınan sitokinler ve yüzey proteinleri sayesinde APC'lerin aktivasyonu sağlanır. Bunun sonucunda salınan kemokinler aracılığıyla enfeksiyon bölgesine lökositlerin yönlendirilmesi ve T hücre

aktivasyonu ile antijenin nötralizasyonu sağlanır (Lodish ve ark., 2020). İmmun hücrelerin yanı sıra birçok tümör hücresinde de eksprese olan TLR'ler, tümör hücresinin büyümesini, gelişmesini ve immuniteden kaçmasına destek olmaktadır. Mikropların hayatta kalması için gerekli moleküler yapılara ise patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) denir. Doğal bağışıklık hücrelerindeki pattern tanıyan reseptörler (PRR) sayesinde PAMP'lar tanınmaktadır. Bu PRR'lerden biri olan TLR'ler aracılığıyla bakteriler, virüsler, parazitler ve mantarlar gibi çok çeşitli canlıdan türetilen lipid, lipoprotein, protein ve nükleik asit gibi PAMP'lar tanınmaktadır (Yamamoto ve ark., 2003 ; Akira ve ark., 2006 ; Kawai & Akira, 2010 ; Oblak & Jerala, 2011).

Doku yaralanmalarında hasarlı veya nekrotik hücrelerden hücre içine salınan endojen proinflamatuvar moleküllere hasara bağlı moleküler kalıplar (DAMP) denir. DAMP'lar TLR2 ve TLR4 reseptörleri tarafından tanınma özelliğine sahiptir ve bu reseptörlerle ilişkiye girerek inflamasyona neden olurlar. Bunun sonucunda doğal bağışıklık hücrelerini bir araya toplamaktadırlar. Hiyolurunan, heparan sülfat, HMGB-1 proteini, S100 proteinleri, ısı şoku protein (HSP) , tenascin C, DNA ve hücre içi komponentler DAMP'lara örnek olarak verilebilir (Rubartelli & Lotze, 2007 ; Korver, Gibson, Bowen, & Coller, 2019).

### **2.3.1. TLR'lerin Yapısal Özellikleri ve Sınıflandırılması**

Tip 1 transmembran glikoproteini olan Toll reseptör, ligand tanımaya yardımcı lösin açısından zengin tekrar (LRR) motifleri içeren ekstraselüler domain, transmembran domain ve karboksi terminal uçta hücre içi sinyal iletimini sağlayan toll-like/interlökin-1 reseptör (TIR) domaini içermektedir (Nomura ve ark., 1994 ; Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Toll-like reseptörlerin intraselüler domaini ile IL-1 reseptörlerinin intraselüler domaini karşılaştırıldığında benzer yapıya sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.6). Bundan dolayı TLR'nin intraselüler domainine toll-like/interlökin-1 reseptör (TIR) denilmiştir (Rock, Hardiman, Timans, Kastelein, & Bazan, 1998).



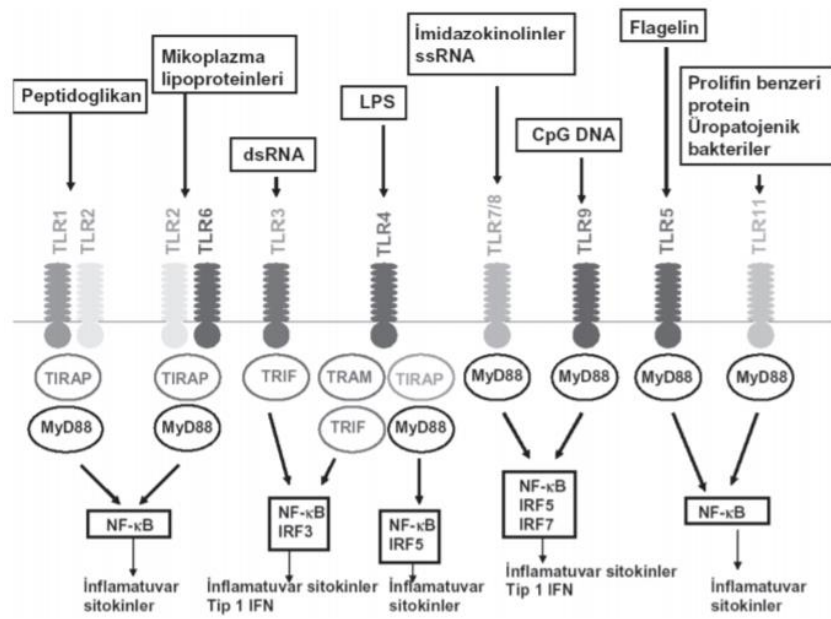
Şekil 2.6. Toll-like reseptörlerin genel yapısı (Thao et al., 2018)

TLR ailesinin memelilerde tanımlanmış 12, farelerde tanımlanmış 10 üyesi mevcuttur. Bunlardan TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11 hücre yüzeyinde eksprese olur ve lipit, lipoprotein ve protein gibi mikrobiyal membran bileşenlerini tanımaktadırlar (Şekil 2.7). TLR 3, 7, 8, 9 ise intraselüler organeller olan endoplazmik retikulum, endozomlarda, lizozomlarda, endolizozomlarda eksprese olurlar (Şekil 2.8) ve mikrobiyal nükleik asitleri tanımaktadırlar (Yamamoto ve ark., 2003 ; Akira ve ark., 2006 ; Kawai & Akira, 2010).

TLR2, TLR1 veya TLR6 ile heterodimer yapı oluşturarak lipopeptit ve gram-pozitif bakterilerin diğer bileşenleriyle aktive olurken, TLR4 lipopolisakkarit (LPS) ile, TLR5 flagellin adı verilen bakteri flagellerinin bir bölgesiyle, TLR3 çift iplikli RNA (dsRNA) ile, TLR9 bakterilere özgü metillenmemiş CpG nükleotitleriyle, TLR7 ve TLR8 tek sarmallı RNA (ssRNA) ile aktive olmaktadır (Tablo 2.2). TLR8 ve TLR10 yalnız insanlarda eksprese olurken, TLR11 ve TLR13 yalnız farelerde tespit edilmiştir. Ligandlar vasıtasıyla aktive olan TLR yolakları nihai olarak TNF  $\alpha$  - $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretilmesini sağlamaktadır ve üretilen sitokinler spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak bağışıklık hücreleri üzerinde etki etmektedirler (Abbas ve Lichtman, 2007 ; Moresco, LaVine, & Beutler, 2011).

**Tablo 2.2.** Toll-like reseptörlerin mikrobiyal ligandları (Yu, Wang, & Chen, 2012)

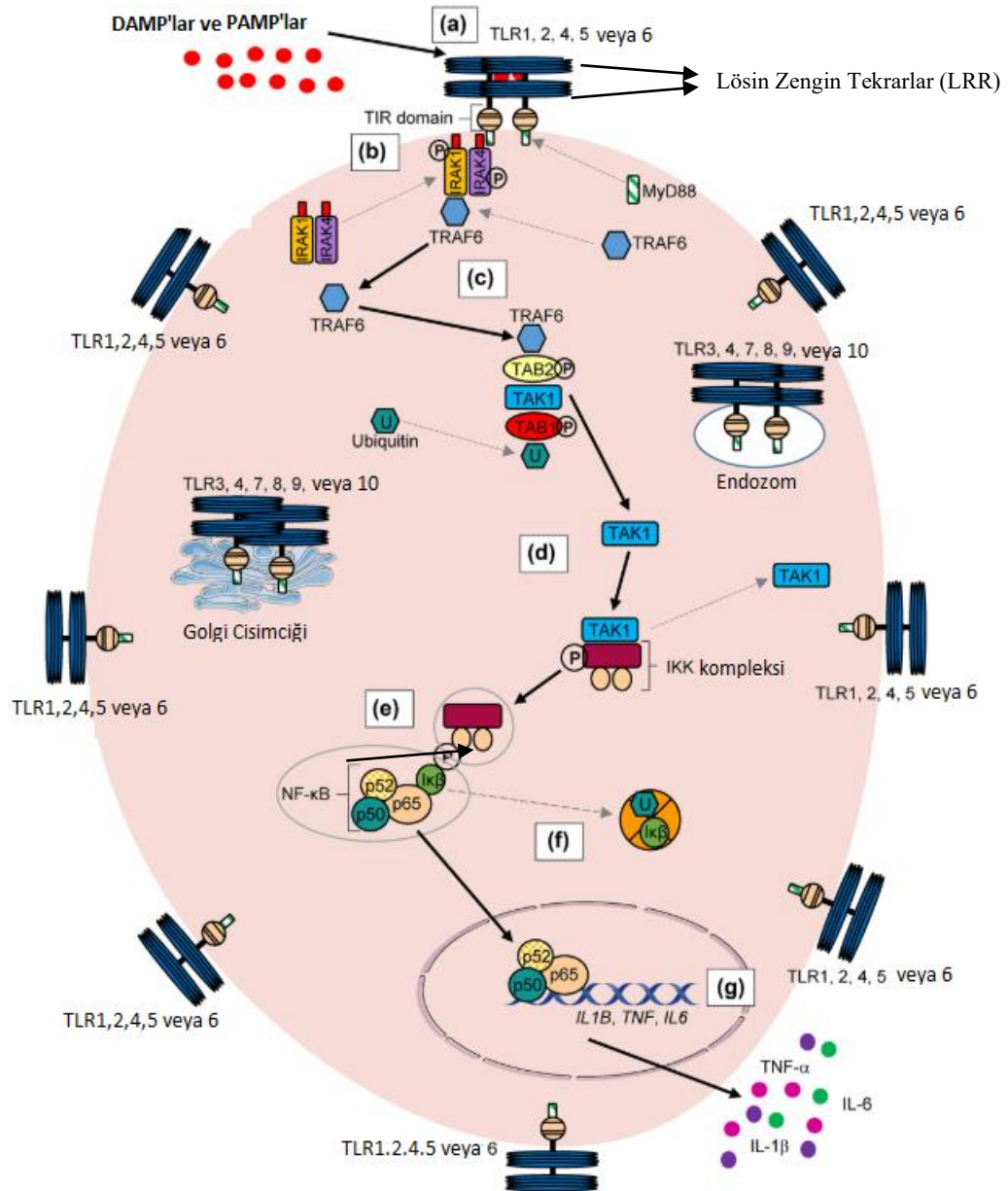
TLR1	Triasil lipopeptitler (Bakteriler ve mikobakteriler)
TLR2	Peptidoglikan, lipoteikoik asit (Gram-pozitif bakteriler), LPS (Leptospira)
TLR3	dsRNA (virüs)
TLR4	LPS (Gram-negatif bakteriler), Zarf proteinleri (RSV, MMTV)
TLR5	Flagelin (Bakteriler)
TLR6	Peptidoglikan (Gram-pozitif bakteriler)
TLR7	ssRNA
TLR8	ssRNA
TLR9	Metillenmemiş CpG DNA

**Şekil 2.7.** Bazı TLR'lerin bazı ligandları ve aktivasyon ürünleri (Camcıoğlu, 2013)

Toll-like reseptörler ayrıca genellikle doku hasarı ve hücre lizis bölgelerinden salınan endojen ligandlar olan hasara bağlı moleküler kalıplara (DAMP) da yanıt vermektedirler (Sung ve ark., 2021). TLR reseptör sınıflarına göre endojen ligandlar Tablo 2.3.'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.3.** Toll-like reseptörlerin endojen ligandları (Yu, Wang, & Chen, 2010 ; Duffy & O'Reilly, 2016)

TLR1	–
TLR2	Serum amiloid A, HMGB-1, endoplazmin, hiyalüronik asit
TLR3	mRNA
TLR4	Fibrinojen, HSP 20, HSP 60, HSP 70, HSP 96, heparan sülfat, HMGB-1, S100 proteinleri, hiyalüronik asit
TLR5	–
TLR6	HSP 60, HSP 70, HSP 96, çözünür tüberküloz faktörü (STF)
TLR7	ssRNA
TLR8	ssRNA
TLR9	DNA, HMGB1



**Şekil 2.8. a.** Mikroorganizma veya bakterilerden üretilen PAMP'ların ve hasar sonucu salınan DAMP'ların hücre zarında bulunan TLR'ler ile etkileşimi. TIR domainine sahip reseptörlerin TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 heterodimerizasyon veya TLR4 ve TLR5'in homodimerizasyon ile aktivasyonu. **b.** TIR domainine bağlanan IRAK1 ve IRAK4'ün MyD88 tarafından fosforlanması sonucu aktivasyonu. **c.** Aktif IRAK adaptör moleküllerinin TRAF6 molekülünü fosforlayarak aktif hale geçmesi. **d.** TRAF6 molekülünün TAB1 ve TAB2 moleküllerini fosforlayarak aktivasyonundan sonra TAK1 molekülünü de aktif hale getirmesi, TRAF6'nın ubiquitinasyonlanması ve IKK molekülünün TAK1 tarafından fosforlanması. **e.** Fosforlanan IKK kompleksinin TAK1'den ayrılması, NF-κB'yi baskılayan IκB molekülünün fosforlanarak ayrılması. **f.** Fosforlanan IκB molekülünün ubiquitinasyonlanması. **g.** Aktif NF-κB molekülünün çekirdek içine girerek DNA'ya bağlanıp proinflamatuar sitokin genlerinin ekspresyonunu sağlaması (Korver ve ark., 2019)

### 2.3.2. Kanser İlerlemesinde TLR'lerin Moleküler Mekanizması

TLR'lerin aktivasyonu hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, metastaz ve anjiyogenezi destekleyebileceği gibi hücre büyümesini inhibe de edebilmektedir. Ancak asıl altta yatan moleküler mekanizma belirsizliğini hala korumaktadır. TLR

sinyalizasyonu çeşitli otoimmün, kronik enflamasyon ve enflamatuvar hastalıklarda da rol oynamaktadır. Bu durum, çeşitli kanser türlerinin gelişmesine yol açan büyüme ve hayatta kalma faktörleri açısından zengin bir mikroçevre ortamı sağlamaktadır. Oluşturulan TME'de inflamasyonu arttırmak için daha fazla immün hücre toplanmaktadır. Bu şekilde hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon ve hayatta kalma düzenlenmektedir. Tümör hücreleri ayrıca, sitotoksik lenfosit saldırısına karşı dirençlerini artıran ve böylelikle bağışıklıktan kaçmaya yol açan proanjiyojenik faktörleri ve büyüme faktörlerini serbest bırakmaktadır. Bu bilgilerin ışığında yapılan çalışmalar sonucunda yüksek TLR ekspresyonu bir çok kanser hücre hattında kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Prasad & Kumar, 2020)

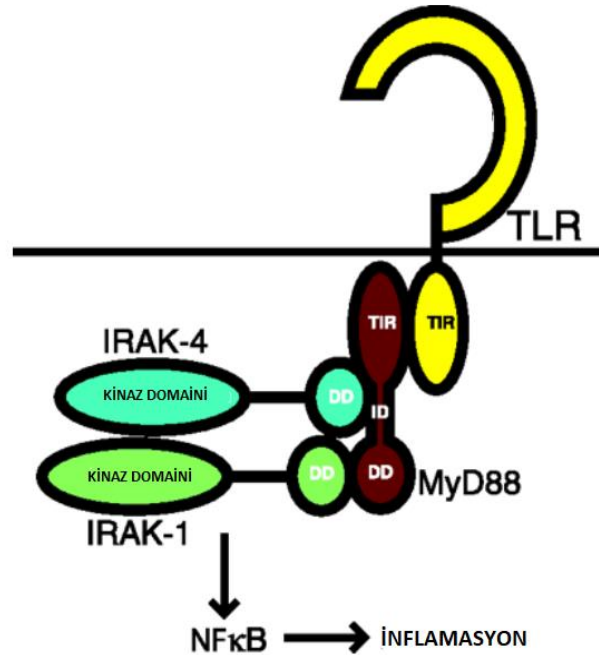
NF- $\kappa$ B, kronik inflamasyon ile tümör oluşumu arasındaki ilişkiyi sağlayan ana faktörlerden biridir ve insan tümörlerinin %90'ından fazlasında yapısal olarak aktive edilmektedir. Bununla birlikte NF- $\kappa$ B'yi aktive edebilen ajanlar, tümör gelişimi ve ilerlemesine doğrudan etki edebilmektedir. Patojenlerin hücre yüzeyindeki TLR'ler ile etkileşiminin, NF-B'nin aktivasyonu ve NF- $\kappa$ B'ye bağımlı genlerin ekspresyonu ile sonuçlandığı ve böylece TLR'lerin karsinogenezin uyarılmasına katkı sağladığı bilinmektedir (Shcheblyakov, Logunov, Tukhvatulin, Shmarov, & Naroditsky, 2010).

### **2.3.3. Toll-like Reseptör 4 (TLR4)**

TLR4; mikrobik hücre duvarının spesifik bileşenlerini tanıyan, hem doğuştan gelen hem de adaptif immün hücreleri aktive eden, evrimsel olarak korunmuş Patern tanıma reseptörü (PRR) olarak bilinmektedir ve PAMP ve DAMP adı verilen bileşikleri tanıma özelliğine sahiptir (Lang, Silvis, Deshpande, Nystrom, & Frost, 2003 ; Vogl ve ark., 2007 ; Firmal ve ark., 2020). Özellikle tüm gram negatif bakterilerin dış zarının yapısal bileşeni olan lipopolisakkaritteki (LPS) korunmuş lipit A'yı tanımaktadır (Medzhitov & Janeway, 1997 ; Kawai & Akira, 2010). TLR4'ün LPS ile indüklenerek ve adaptör moleküller aracılığıyla doğal immün yanıt sinyal yollarını tetiklediği tespit edilmiştir (Yamamoto ve ark., 2003).

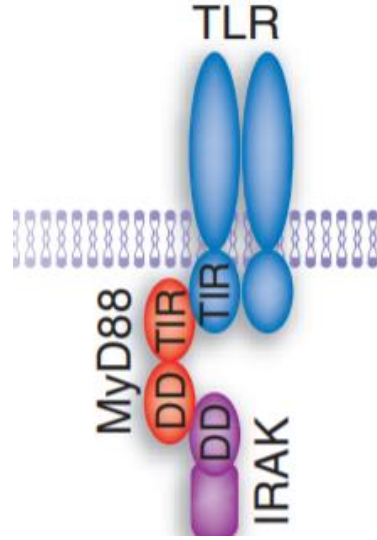
Yüzey reseptörü olan ve LPS ile indüklenen TLR4, lipopolisakkarit bağlayan protein (LBP) ile LPS'yi reseptöre getirirken, CD14 adı verilen ko-reseptör yardımıyla da MD-2 tarafından LPS tanınmaktadır. TLR4'ün ekstraselüler kısmının aktivasyonu, TIR dimerizasyonuna neden olmaktadır ve bu şekilde hücre içi sinyalleşmeler başlamış olur (Lu, Yeh, & Ohashi, 2008). DAMP veya PAMP'ların TLR'ye bağlanmasıyla Myd88/TLR4/MD-2 kompleksi oluşmaktadır. TIR (Toll-IL1 reseptör) domaini içeren Myd88-TIRAP veya TRIF-TRAM adaptör molekülleri aracılığıyla doğal immün yanıt

sinyal yolları tetiklenmektedir. Myd88 adaptör molekülü proinflamatuvar sitokin üretimi için önemliyken, TRIF molekülünün Myd88 bağımsız yoldan sorumlu olduğu bilinmektedir (Yamamoto ve ark., 2003 ; Oblak & Jerala, 2011).



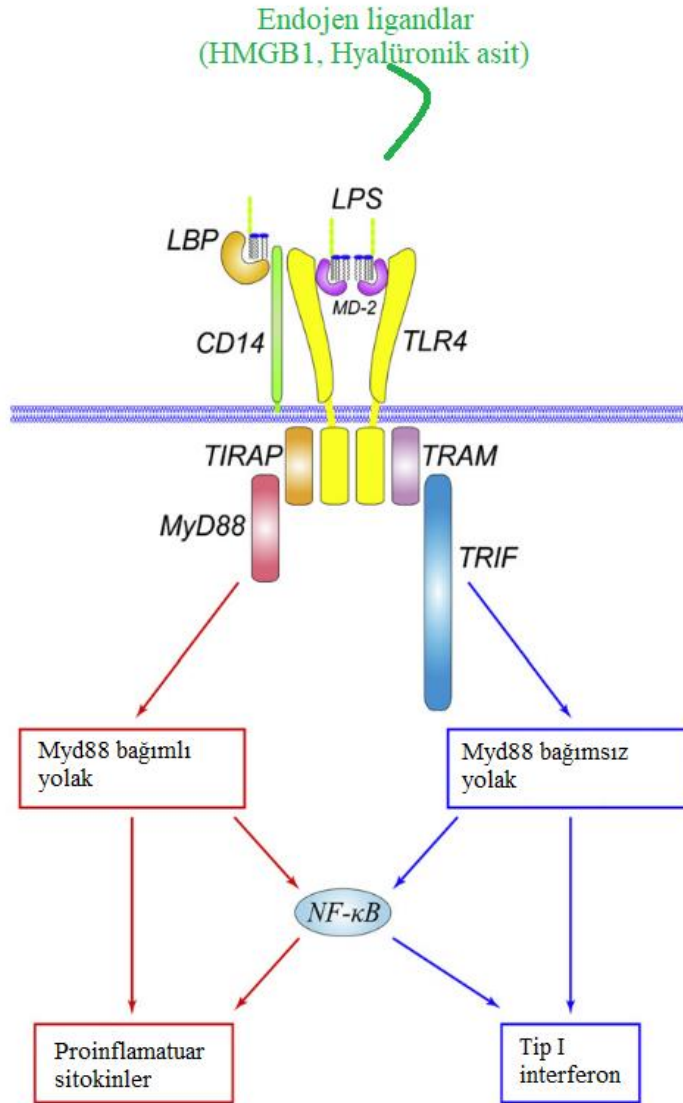
Şekil 2.9. TLR sinyalizasyonunda yer alan Myd88, IRAK-4 ve IRAK-1 moleküllerinin domainleri ve bağlantı noktaları (Lasker & Nair, 2006)

Toll-like reseptörler tarafından tanınan patojenler, TIR domaini içeren Myd88, TIRAP, TRIF adaptör moleküller aracılığıyla doğal immün yanıt sinyallerini tetiklemektedirler. TLR'lerin neredeyse hepsi Myd88'i adaptör molekül olarak kullanmaktadır ve bu proinflamatuvar sitokin üretimi için oldukça önemlidir. Myd88 bağımsız yoldan sorumlu olan TRIF molekülü NF-κB ve IRF3 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır. Myd88'de Toll-IL1 Reseptör Domaini (TIR), IRAK4 ile etkileşime geçen intermediyet domain (ID) ve Death Domain (DD) mevcuttur (Şekil 2.9). TIR domaini diğer TIR domaini içeren adaptör moleküllerle bağlantı sağlarken, DD ise IRAK-1 ve IRAK-4 gibi moleküllerin Death Domain'leri ile bağlantı kurmaktadır (Şekil 2.10) (Yamamoto ve ark., 2003 ; X. Wang ve ark., 2016).



**Şekil 2.10.** Myd88 adaptör molekülünün TIR domaini ile TLR'ye, DD domaini ile IRAK adaptör molekülüne bağlanması (Han, 2006)

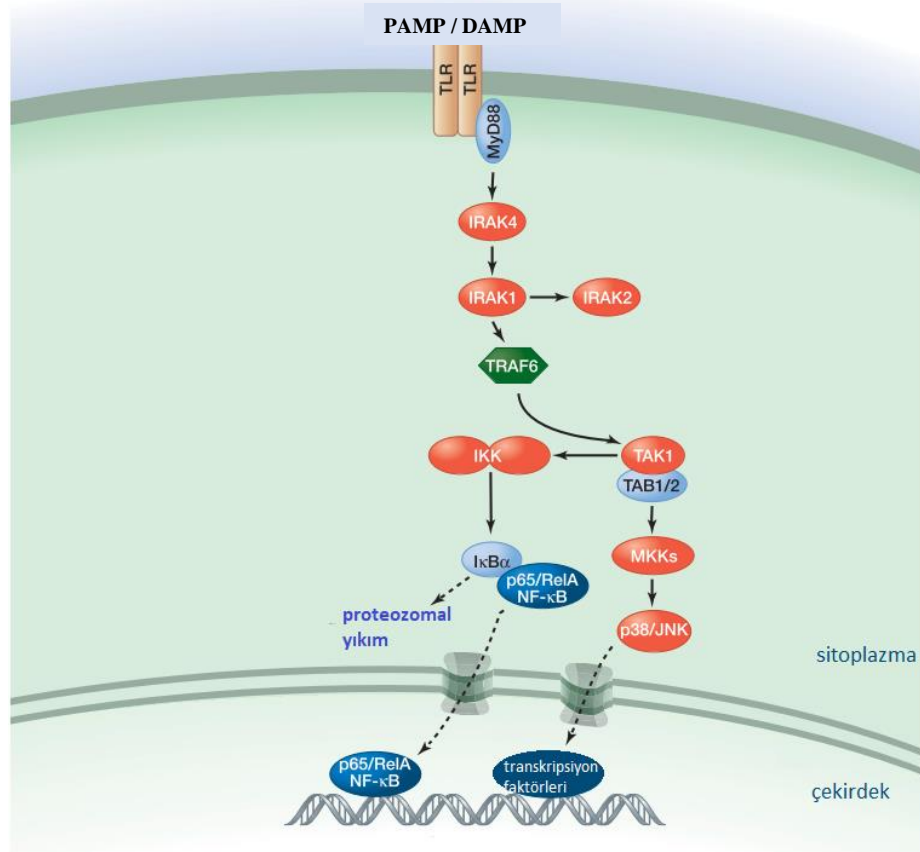
Myd88 bağımsız yolda görev alan TRAM molekülü, TRIF ve TLR4 arası bağlantı kurmak için seçici olarak TLR4'e bağlanmaktadır. TRIF molekülü de Tip1 IFN ve inflamatuvar sitokin genlerinin indüksiyonu için NF- $\kappa$ B ve MAPK aktivasyonu sağlamaktadır. Myd88 bağımlı yolda ise TIRAP adaptör molekülüne Myd88 molekülü bağlanır ve Myd88 aracılığıyla IRAK moleküllerinin fosforlanması sağlanır. Fosforlanarak aktive olan IRAK moleküllerine bağlanan TRAF6 molekülü de IRAK molekülleri tarafından fosforlanır. TRAF6 hem JNK ve p38 gibi MAPK ailesi üyelerinin aktivasyonunu hem de TAK1 ve onun devamında IKK proteininin aktivasyonu ile I $\kappa$ B molekülünün fosforlanarak ayrılmasını, NF- $\kappa$ B'nin serbest kalarak sitoplazmadan çekirdeğe geçmesine aracılık etmektedir. Çekirdeğe geçen NF- $\kappa$ B (RelA/p65), p38/MAPK ve proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1B, IL-12 gibi) transkripsiyonunu sağlamaktadırlar. Myd88 bağımlı ve bağımsız her iki yolda da NF- $\kappa$ B aktivasyonu sonucu proinflamatuvar sitokin ve Tip 1 IFN salınımı gerçekleşir (Şekil 2.11) (Lu ve ark., 2008 ; Kawasaki & Kawai, 2014).



**Şekil 2.11.** LPS'nin ve endojen ligandların TLR4 reseptörü ile MD-2 aracılı bağlantısı sonucu MYD88 bağımlı ve MYD88 bağımsız yolların uyarılmasıyla proinflamatuar sitokin ve tip1 interferon genlerinin NF-κB aracılığıyla aktivasyonu (Lu ve ark., 2008 ; Pradere, Dapito, & Schwabe, 2014)

NF-κB bağışıklık ve inflammatuar yanıtlar için önemli bir ökaryotik transkripsiyon faktörüdür. Kanser, kronik inflammatuar, astım, nörodejeneratif hastalıklarda aktiftir. Sinyal yolağında ligand-reseptör bağlantısı olmaması durumunda IκB molekülü (inhibitör protein) NF-κB'nin yapısındaki DNA bağlanma bölgesine bağlanarak DNA ile etkileşim kurmasını ve bunun sonucunda da proinflamatuar sitokinlerin salınmasını engeller. Reseptörlerin TNF-α, IL-1β veya LPS gibi ligandlar ile uyarılması sonucunda IκB proteinleri, inhibitör kappa B kinaz (IKK) enzimi aracılığıyla fosforillenir. NF-κB ile IκB molekülünün birbirinden ayrılması IκB'nin ubiquitinlenerek proteozomlar aracılığıyla degregasyonuna neden olur ve serbest NF-κB molekülü çekirdeğe girerek DNA'ya bağlanır (Şen ve ark., 2017). TLR ligandlarının,

MAPK ve NF- $\kappa$ B yolağıyla doğuştan gelen bağışıklık tepkisini aktive ettiği bilinmektedir (Şekil 2.12) (Iliev, Hansen, Jørgensen, Krasnov & Jørgensen, 2013). Yapılan çalışmalarda Myd88 ve TIRAP knockdown farelerde LPS ile indüklenen sitokin üretimi tamamen durmuştur ve NF- $\kappa$ B ve MAPK kaskadlarının aktivasyonunun geç evrede başladığı görülmüştür (Yamamoto ve ark., 2002).



Şekil 2.12. Myd88 bağımlı TLR sinyal yolağı (Lim & Staudt, 2013)

#### 2.3.4. TLR4'ün Endojen Ligandları

Doku yaralanmalarında hasarlı veya nekrotik hücrelerden salınan DAMP'lar TLR4 reseptörünün endojen ligandlarıdır (Tablo 2.4). DAMP moleküler ailesinin ilk tanınmış üyelerinden olan yüksek mobilite grup-1 proteini (HMGB-1), insanda HMGB-1 geni tarafından kodlanır ve 13.kromozomun q kolunda yer alır. (Ferrari, Finelli, Rocchi, & Bianchi, 1996 ; Yang, Wang, Chavan, & Andersson, 2015). Hücrede normal şartlar altında inflamasyon özelliği olmayan HMGB-1 replikasyon, genom stabilitesinin korunması, rekombinasyon, DNA onarımı ve transkripsiyonel aktivasyonu sağlayan bir proteindir (Tang ve ark., 2011). Hasar durumunda ise HMGB-1 nekrotik ve hasarlı hücrelerden kolayca salınır, inflamasyon için TLR2, TLR4 ve RAGE (ileri glikozillenmiş son ürün reseptörü) gibi reseptörlerle birleşerek sinyal görevi görür. Sepsis durumunda inflamasyonun geç mediatörüken, lokal organ hasarında erken

mediatör olarak görev yapmaktadır. Kendisinin proinflamatuvar yeteneği olmamasına rağmen, HMGB-1'in knockdown yapılması sonucunda nekrotik hücrelerin inflamasyon yeteneği oldukça azalmıştır. Çünkü HMGB-1 molekülünün nekrotik hücrelerden salınımı, komşu hücrelere ölüm sinyalini göstermekteydi ve gerekli proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve salınımını tetikliyordu. Anti-HMGB1 antikorunu verilerek yapılan deney sonucunda da MAP kinaz fosforilasyonunda ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonunda azalma olmuştur (Scaffidi, Misteli, & Bianchi, 2002 ; Tsung ve ark., 2005 ; Q. Chen, Guan, Zuo, Wang, & Yin, 2016).

S100 proteini aktif fagositler tarafından salınan, TLR4'ün endojen bir ligandı olan DAMP'lardandır. Yapılan çalışmalar sonucu S100 proteinini kodlayan genlerin bloke olması LPS'ye yanıtı zayıflatmış ve daha sonra hücre dışından eklenen S100 ile de zayıf LPS yanıtı telafi edilmiştir (Vogl ve ark., 2007). S100 proteinin üyelerinden olan S100A9'un knockdown yapılması sonucunda NF- $\kappa$ B faktörlerinden olan p50-p65'in TNF- $\alpha$  promotörüne daha az bağlandığı ve bunun sonucunda da S100 proteininin transkripsiyonel regülasyonda oldukça önemli olduğu görülmüştür. Daha ileri çalışmalar ile de LPS ile S100A8'in MyD88'in sitozolden TLR4 reseptör kompleksine translokasyonu ve IRAK komplekslerinin yanı sıra ERK, p38 MAPK ve PKC'nin aktivasyonu dahil olmak üzere özdeş sinyal iletim yollarını indüklediğini ortaya koydu. S100A8'in bir TLR4-MD2 kompleksine doğrudan bağlanması embriyonik böbrek hücrelerinde NF-KB-bağımlı gen ekspresyonunu uyarmıştır (Tsan & Gao, 2007). Yapılan çalışmalarda S100A ailesinden olan S100A4 proteininin meme kanseri hücrelerinin metastazını uyardığı ve yüksek ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Cabezón ve ark., 2007).

TLR4'ün endojen ligandlarından olan ısı şoku proteinleri (HSP60-HSP70) şaperon olarak görev görür ve proteinlerin katlanmasına, yanlış katlanmış proteinlerin düzenlenmesine yardımcı olur. Aynı zamanda ısı stresine karşı proteinleri korumakla da görevlidir (Reading ve ark., 1989). Bunun yanında stresli ve hasarlı hücrelerin tehlike sinyali olarak da tanımlanmıştır. Endotel hücreler, düz kas hücreleri ve makrofajlarda güçlü proinflamatuvar yanıt oluşturabilmektedir. İnsan HSP60 TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi sitokinlere ek olarak IL-12 ve IL-15 gen ekspresyonunu indükleyerek TH1 farklılaşmasına bağlı doku inflamasyonunun başlatılması ve sürdürülmesinde rol aldığı tespit edilmiştir. HSP60, hasarlı hücrelerin ve hücreye giren mikrobiyal patojenlerin doğal bağışıklık hücrelerini TLR4 reseptörüne bağlanıp proinflamatuvar sitokin üretimini tetikleyerek yaptığı bilinmektedir. İnsan HSP60'ın ayrıca makrofajlarda doğrudan NO

üretimini tetiklediği yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir (W. Chen, Syldath, Bellmann, Burkart, & Kolb, 1999 ; Ohashi, Burkart, Flohé, & Kolb, 2000).

Vücudumuzdaki birçok ekstraselüler matrikste bulunan ve glikoprotein ailesinden olan Tenascin C, insanda 9.kromozomun q kolundaki TN-C geni tarafından kodlanır. Hücre şeklini, göçünü ve büyümesini etkilediği bilinmektedir. Embriyogenezde özellikle nöral gelişimde yüksek seviyede, organogenezdeyse daha az eksprese olur. Gelişmiş organlarda eksprese olmazlar ancak inflamasyon veya tümör oluşumu gibi patolojik koşullar altında tekrar ortaya çıkar (Gulcher ve ark., 1991 ; Jones & Jones, 2000 ; Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003). Romatoid artritli bireylerde yapılan çalışmaya göre eklemlerde yüksek seviyede Tenascin C ekspresyonu gözlemlenmiştir. Sinoviyal fibroblastlardaki TLR4 reseptörüne bağlanan Tenascin C, Myd88 bağımlı yolak aracılığıyla IL-6 ekspresyonu, insan makrofajlarında da TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-8 ekspresyonunu uyarmaktadır. Bununla birlikte LPS’de olduğu gibi TLR4 reseptörüne bağlanmak için MD-2 ve CD-14 gibi ara molekülere ihtiyacı yoktur (Midwood ve ark., 2009).

TLR4 reseptörünün bir başka endojen ligandı hyalüronik asit (HA), ekstraselüler matriksin (ECM) bir bileşenidir ve glikozaminoglikan ailesinin (GAG) bir üyesidir. Yara iyileşmesi, inflamasyon, hücre sel göç, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi olaylarda düzenleyici olarak görev almaktadır. Enflamasyon durumunda HA hyalüronidaz ve reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığıyla fragmentler halinde hücre zarından dışarı salınır (Eldridge, Moldobaeva, & Wagner, 2011). İnflamatuvar yanıtı başlatmak için Myd88 bağımlı TLR4 sinyal yolağına ve TLR2’ye ihtiyaçları vardır. Reseptör-ligand ilişkisi vasıtasıyla NF- $\kappa$ B sinyal yolağını da aktiveştiren HA, makrofajlardan kemokin üretimini uyarmaktadırlar (Jiang ve ark., 2005). Bir diğer ECM bileşeni olan Heparan sülfat (HS) çoğu hayvan dokusunun hücre yüzeyinde de bulunur ve hücre gelişiminde, hücre homeostazının sağlanmasında ve birçok hastalık sürecinde rol oynar (Lindahl & Li, 2009). Heparanaz-1 enzimi heparan sülfatın fragmentlere ayrılmasına neden olur ve plazmada heparanaz-1 (HPSE1)’in aşırı ekspresyonu kanserle ilişkilendirilmiştir (Melo ve ark., 2015). Ayrıca HPSE1’in aktivasyonu TLR4’e bağlı endotelial LPS yanıtını artırırken, anti-inflamatuvar özellikteki Heparanaz-2 TLR4 reseptör kompleksine LPS bağlanmasını inhibe eder (Kıyan ve ark., 2019). HPSE’nin artmasıyla proinflamatuvar sitokinler olan IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$ ’da artış olur (Goodall, Poon, Phipps, & Hulett, 2014).

**Tablo 2.4.** TLR4 Ligandları (Guven & Can, 2012)

ENDOJEN LİGANDLAR	HSP60
	HSP70
	Hyalüronik Asit
	Tenascin C
	Heparan Sülfat
	$\beta$ -defensin 2
	Fibrinojen
	S100 (S100A8/S100A9)
	Okside LDL
	HMGB-1
Akciğer Sürfaktan Protein A	
EKZOJEN LİGANDLAR	Lipopolisakkaritler (LPS) / Lipit A
	Viral Zarf Glikoproteinleri

Tümör hücreleri immün yıkımından kaçmak için birçok mekanizma ile immün yanıt özelliklerini kendi lehine çevirecek şekilde işlev görür. İmmünsüpresif sitokin salgılanması, antiapoptotik molekül ekspresyonu, tümör antijeni ve MHCI ekspresyonunu down regüle etmek gibi özellikleri mevcuttur. Yapılan çalışmalarda birçok kanser türünde TLR4'ün yüksek seviyede eksprese olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerindeki TLR4 sinyal yolağı bozulmamıştır ancak immün ataklara karşı yanıt oluşturabilecek NFKB, ERK, JNK, immün süpresör olarak iNOS, IL-6 ve antitümör etki yapan IL-12 ekspresyonlarına neden olmaktadır. Tümör hücrelerinde TLR4 sinyali immunosüpresif faktörlerin salgılanmasına ek olarak apoptoz direncini de arttırmaktadır (Oblak & Jerala, 2011). İnsan pankreas kanseri dokusunda ise TLR2, TLR4, TLR7 ve TLR9 yüksek seviyede eksprese olurken, normal pankreas dokusunda ekspresyon gözlenmemiştir (Rosenberg ve ark., 2011).

İnsan MMP-9 geni 20q13.12 kromozomunda bulunur ve ekstraselüler matriksi yeniden biçimlendirmek için proteolitik kesim yapar, spesifik olarak plazma membranında bulunan yüzey proteinlerini de ekstraselüler domaininden kestiği bilinmektedir (Fiore, Fusco, Romero, & Stamenkovic, 2002). MMP9'un aşırı

ekspresyonu farklı malign tümörlerde gözlenmiştir. Tümör invazyonu ve metastazında görev yapan MMP9, NK aracılı sitotoksositeye karşı da direnç sağlamaktadır (Fiore ve ark., 2002). PDAC'ta LPS ile indüklenen TLR4 yolağında NF- $\kappa$ B'nin aktive olması sonucunda artan MMP ekspresyonunun TAM'larla ilgili olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni M2 makrofajlarından eksprese edilen IL-10'un EMT'ye aracılık etmesidir (Vaz & Andersson, 2014). IL-1 $\beta$  NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu ile yüksek seviyede eksprese olur ve MMP9 ekspresyonunu tetikleyerek kanser hücrelerinin invazivliğini artırır. RNA interferans yöntemiyle MMP9 hedeflenerek LPS kaynaklı invaziv yetenekte azalma gözlenmiştir (Ikebe ve ark., 2009). 2016 yılında Sindhu ve arkadaşlarının monosit hücrelerde anti-TLR4 antikoru kullanarak yaptıkları çalışmada, antikorun MMP9 genini önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. Aynı şekilde Myd88'in eksikliği de MMP9'un üretimini azaltmıştır (Sindhu, Al-Roub, Koshy, Thomas, & Ahmad, 2016).

### 2.3.5. TLR4 İnhibitörleri

TLR4'ün inhibisyonu tümör oluşumu ve gelişimini engellemektedir. Yapılan çalışmalarda TLR4  $-/-$  farelerde tümörün büyümesi daha yavaş olmuştur (Vaz & Andersson, 2014). Örneğin pankreas kanserinde TLR4 yolağının aktivasyonu ile NFKB'nin IL-1 $\beta$  ekspresyonunu tetiklemesi, MMP9'un salınmasını bunun sonucunda da invaziv özelliğin artmasına sebep olmuştur. Özellikle LPS ile aktive olan TLR4'ün artan invazivliği, siRNA aracılığıyla TLR4 veya Myd88 gen ürünleri hedeflenerek azalmıştır (Ikebe ve ark., 2009).

TAK-242 (Resatorvid) molekülü TLR4'ün hücre içi domainine bağlanarak TLR4 ile adaptör proteinler arasındaki protein-protein etkileşimlerine müdahale eder (Matsunaga, Tsuchimori, Matsumoto, & Ii, 2011). TAK-242 tedavisinden sonra hem p38 MAP kinazın hem de NF- $\kappa$ B'nin p65 alt biriminde fosforilasyon olayları önemli ölçüde inhibe edilmiştir (Daniel E Shumer, Natalie J Nokoff, 2017).

Paclitaxel antineoplastik bir ajandır ve mikrotübül stabilizasyonunu indükleyerek hücre döngüsünü durdurur. Tümör hücrelerinin hücre döngüsünü durdururken zamanda antitümör immunitiyi de arttırmaktadır. Paclitaxel verilen hücrelerde M1 belirteçlerinde (TNF- $\alpha$ , IL12, nitrat) artış görülmüş, yapılan çalışmalar sonucunda da TLR4 yoluyla makrofajları M1 profiline yönlendirdiği ve NF- $\kappa$ B'nin de aktivasyonunu bloke ettiği tespit edilmiştir (Wanderley ve ark., 2018).

TLR4 sinyalleşmesinde LPS, CD14 tarafından MD2 molekülüne aktarılır ve bu şekilde hem MD2-TLR4 heterodimerizasyonu hem de TLR4 çiftleri arasında homodimerizasyon gerçekleşmektedir. Bir opinooid olan naloxone ise LPS ile TLR4'ün birleşmesini engellemek için MD2 molekülüne bağlanmaktadır. Bu şekilde TLR4'ü düzenleyerek LPS ile aktivasyonu sonucu oluşan NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve IL-1, IL-6, TNF-alfa gibi proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu da baskılamaktadır (Chin ve ark., 2016 ; Chin ve ark., 2019).

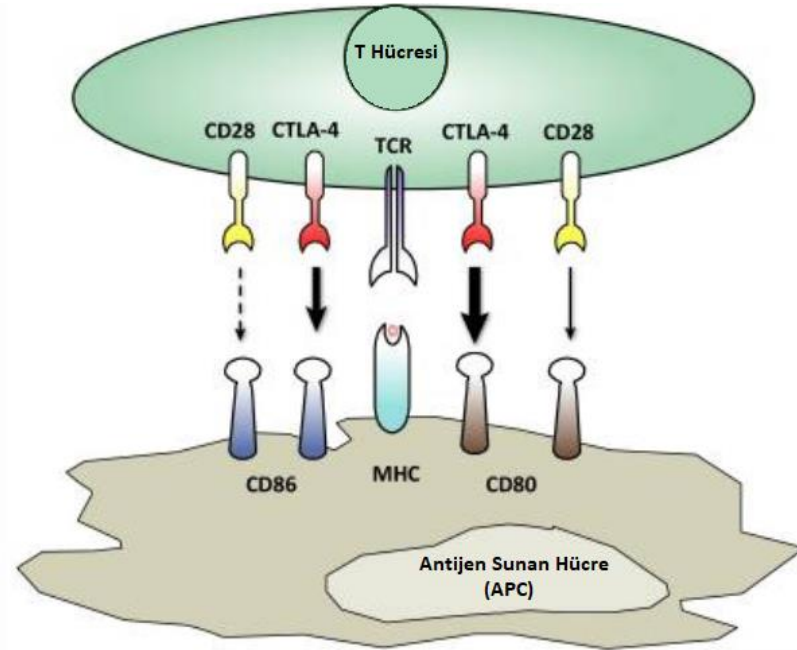
## 2.4. İmmun Check-pointler

T lenfositlerine MHC'ler aracılığıyla antijeni sunan APC'ler (antijen sunan hücreler) vücuda giren antijeni yakalayıp parçalara ayırırlar. T hücre reseptörlerinin (TCR) MHC ile birleşmesiyle antijenlerin T hücreleri tarafından tanınmalarını sağlamaktadırlar. Ancak T hücre yanıtının başlaması için aynı zamanda eş uyaran denilen B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) proteinlerinin APC'lerde ekspresyonunun olması şarttır. MHC-TCR birleşmesine ek olarak tüm T hücrelerinde eksprese olan CD28 reseptörü ile B7 ligandı da bağlandığı zaman T hücre yanıtı başlamış olur (Abbas ve Lichtman, 2007). Bununla birlikte uyarıcı sinyallerin yanında uygunsuz T hücre aktivasyonunu önlemek için PD-1, CTLA-4, LAG-3 ve VISTA gibi T hücre bağışıklığının negatif düzenleyicilerine ihtiyaç vardır. Bu proteinler sayesinde immün sistem, normal hücrelere karşı atak göstermez ve normal hücreler neoplastik büyüme geçirmeye başladığında T hücreleri bunları algılayarak karşı atak yaparlar. Ancak tümör hücreleri de bu immün check-point moleküllerini membranlarında eksprese ederek immün sistem hücrelerinin saldırısından korunmayı başarırlar. Pankreas kanserinin ileri evrelerinde CTLA-4, LAG-3, PD-1, VISTA gibi immün check-point genlerinin yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği ve bunun da sağkalım ile ters orantılı olduğu bilinmektedir. Negatif düzenleyici inhibitörlerin blokese veya aktivatörlerin artırılması ile tümöre karşı yanıt güçlendirilebilir (Brunet ve ark., 1988 ; Gelao, Criscitiello, Esposito, Goldhirsch, & Curigliano, 2014 ; Baran, 2018 ; Blando ve ark., 2019).

### 2.4.1. CTLA4

İmmunoglobulin süper ailesine ait olan CTLA-4 (sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4) 223 amino asitlik protein kodlayan bir dizidir. Esas olarak efektör T lenfositlerinde, naif T hücrelerinde ve Treg yüzeyinde az miktarda eksprese edilir (Brunet ve ark., 1988 ; Gelao, Criscitiello, Esposito, Goldhirsch, & Curigliano, 2014 ;

Goodall ve ark., 2014 ; Baran, 2018 ). Normal şartlar altında B7 molekülü ile CD28 reseptörü bağlanırken, CTLA-4 B7'ye bağlanmak için CD28 ile rekabet haline girer ve 20 kat fazla afiniteyle B7'ye bağlanır (Şekil 2.13). Bunun sonucunda ikinci sinyalleşme olan B7/CD28 gerçekleşmediği için T hücrelerinde anerjiye sebep olunur. B7 eş uyarılar ile bağlantı sonrasında TCR sinyallerinin doğrudan inhibisyonu meydana gelir ve azalan IL-2 ekspresyonu ile T hücreleri için immunsuppressive etki yaratır (Linsley & Ledbetter, 1993 ; Gelao, Criscitiello, Esposito, Goldhirsch, & Curigliano, 2014).

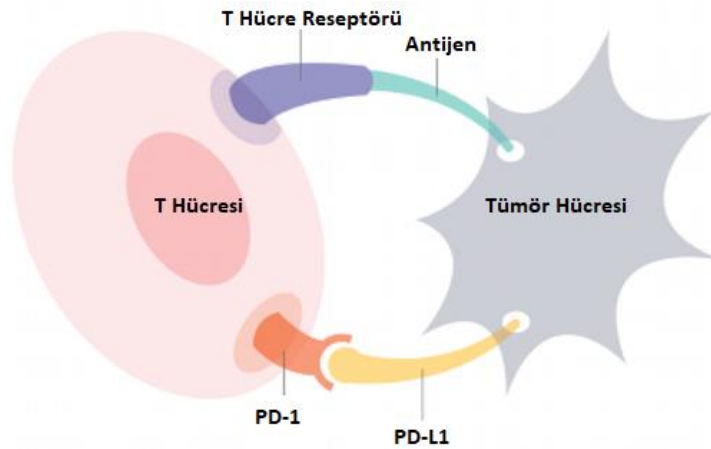


**Şekil 2.13:** Aktif T hücrelerinde bulunan CTLA-4 reseptörünün antijen sunan hücrelerde (APC) eksprese olan CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) molekülleri ile etkileşimi (Walker & Sansom, 2015)

#### 2.4.2. PD-1/PD-L1

Efektör T hücresi, B hücresi ve miyeloid hücrelerinde eksprese edilen programlanmış ölüm reseptörü-1 (PD-1), neredeyse tüm insan hücrelerinin yüzey membranında bulunan B7 gen ailesinin bir üyesi olan PD-L1 (programlanmış ölüm ligandı-1) ile etkileşim gösterir. T hücrelerinin aktivasyonu ve inhibisyonu için oldukça önemli olan PD-1/PD-L1 yolu periferik T-lenfosit toleransının korunmasında ve inflamasyonun düzenlenmesinde görev alır (Şekil 2.14). PD-1/PD-L1 etkileşimi sonucunda TCR aracılı T hücre proliferasyonu zayıflar, IL-2 ekspresyonu azalır, T hücrelerinde sitokin salınımı inhibe olur. Bu sinyal yolağı PD-1 hücre ölümünü doğrudan indüklemez, ancak hücre büyüme faktörlerini ve sağkalım sinyallerini azaltır. Yapılan çalışmalarda PD-1 eksik farelerde graft-versus-host hastalığı (GvHD) adı verilen otoimmün reaksiyonlar gerçekleşmiştir (Freeman ve ark., 2000 ; Latchman ve ark., 2001 ; Schütz ve ark., 2017). Kanser hücreleri ise hücre yüzeylerinde PD-L1

ekspresyonunu arttırarak (şekil10) bağışıklık sistemini baskılamayı başarır. İn-vivo olarak PD-L1 tümör oluşumunu ve invazivliği arttırarak tümör hücrelerini spesifik CD8 + T hücrelerine daha az duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Schütz ve ark., 2017).



**Şekil 2.14.** Tümör hücresinin yüzeyinde eksprese olan PD-L1 molekülünün T hücreindeki PD-1 reseptörü ile etkileşimi sonucu T hücresinin baskılanarak tümör hücrelerine karşı yanıtı kalması (<https://www.smartpatients.com/targets/pd-1> ; Erişim tarihi: 06.05.2020)

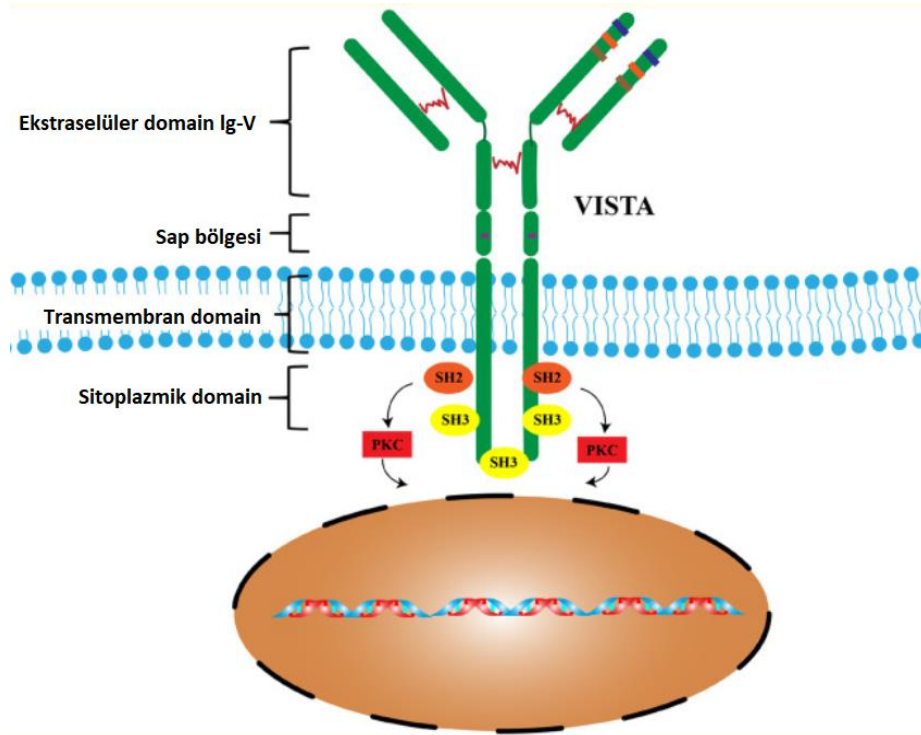
### 2.4.3. LAG-3

Ig süper ailesinden olan 489 aminoasitten oluşan lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3) molekülü, insanda 12.kromozomda CD4 genine yapışık şekilde yer alır ve CD4 molekülü ile homoloji gösteren bir immun check-pointtir (Abramo ve ark., 2012). Efektör T hücresi, NK hücresi ve malign B hücrelerinin bir kısmında eksprese olan LAG-3 yüksek afiniteyle MHC II'ye bağlanarak immun cevabın düzenlenmesinde rol oynar. LAG-3 ekspresyonu T hücresi ve NK hücresinin yanı sıra sekonder lenfoid organlar tarafından da sıkı bir şekilde düzenlenir (Bruniquel, Borie, Hannier, & Triebel, 1998). Tümör mikroçevresinde bulunan T hücrelerinde özellikle CD8+ T hücrelerinde yüksek seviyede LAG-3 ekspresyonuyla immunosüpresif etki gözlenmektedir. PD-L1'i yüksek seviyede eksprese eden tümörlü dokularda LAG-3'ün ekspresyonu ile beraber tümörün daha agresif olduğu tespit edilmiştir (Keane ve ark., 2020)

### 2.4.4. VISTA

İnsanda kromozom 10'da (10q22.12) bulunan gen tarafından kodlanan ve 7 ekzona sahip olan T hücre aktivasyonunun V-domain Ig baskılayıcısı (VISTA / VSIR / B7H5) toplamda 311 aminoasite sahiptir. Bu tip 1 transmembran proteininin 136 amino asitlik kısmı tek bir ekstraselüler Ig-V domainine, 97 amino asitlik kısmıysa sitoplazmik kuyruğa aittir (Şekil 2.15). B7 ailesi üyesi olan VISTA (B7H5), B7 proteininin ektodomainlerinde ikinci bir Ig domainine sahip olmasından dolayı ayrı

değerlendirilmiştir. Ig süper ailesiyle olan homolojisinden dolayı VISTA'nın ekstraselüler domaini PD-L1 ile homoloji gösterir. Ancak VISTA'daki IgV domaini ilave 3 sistein daha içerir ve bundan dolayı diğer Ig süper ailesi üyelerinden farklıdır. Başlangıçta VISTA'nın PD-L1 molekülüne benzerliğinden dolayı reseptörünün de PD-1 olabileceği düşünülmüştür. Ancak daha sonradan yapılan çalışmalarla birlikte VISTA'nın reseptörünün kendine özgü olduğu görülmüştür (Wang ve ark., 2011; Ceeraz, Nowak, & Noelle, 2013).

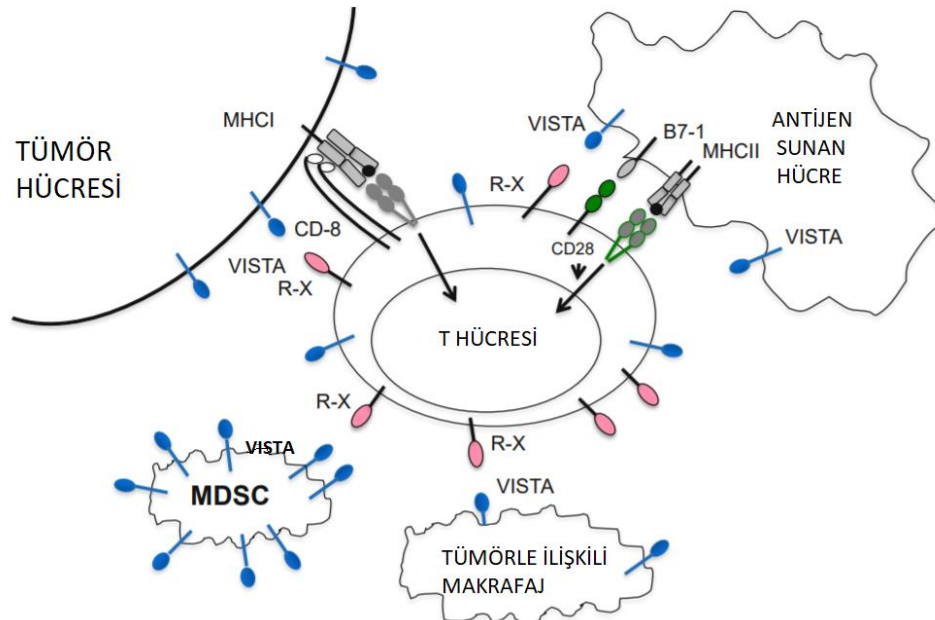


**Şekil 2.15.** VISTA'nın yapısı ve sitoplazmik kuyruğunda yer alan korunmuş SH2, SH3 ve PKC (protein kinaz C) bağlayıcı motifler (Huang ve ark., 2020)

Normal fizyolojide VISTA, efektör immun hücrelerini negatif olarak düzenleyerek örneğin T hücrelerini baskılayarak bir immun yanıt esnasında kendi antijenlerine karşı zararlı bir immün saldırısını önlemektedir (Nowak ve ark., 2017).

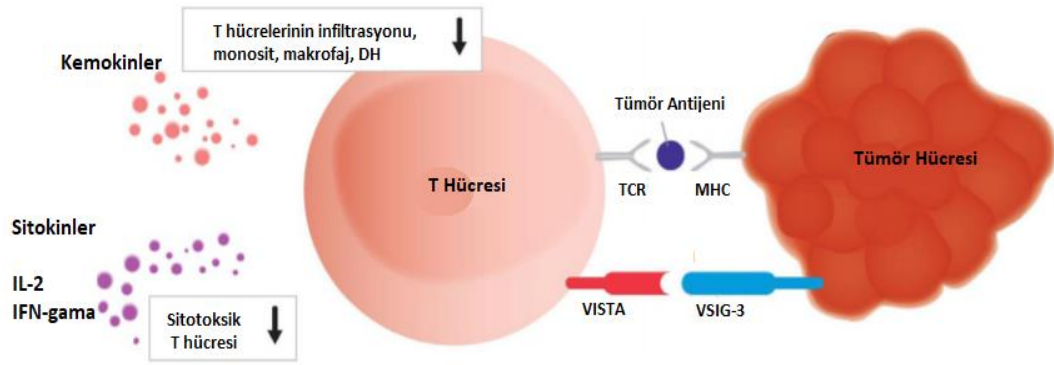
Çoğu insan kanserinde ve murin modelinde TME'deki bağışıklık hücrelerinde eksprese edilen VISTA, özellikle CT26 kolon kanserinde, B16 melanomada, kolorektal kanserde ve pankreas duktal adenokarsinomada (PDAC) kötü prognoz ile ilişkilidir (Yuan, Tatineni, Mahoney, & Freeman, 2021). Yüksek seviyede antijen sunan hücrelerde (APC), özellikle kanser ve enfeksiyon durumunda artan ve immunsupresör olan MDSC'de (miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler), CD4<sup>+</sup> T hücrelerinde ve Treg hücrelerinde eksprese olmaktadır (Şekil 2.16). B hücrelerinde VISTA ekspresyonuna rastlanmazken, CD8<sup>+</sup> T hücresi ve NK hücrelerinde daha az seviyede eksprese

edilmektedir. Farelerde tümör infiltrate eden lökositler üzerinde yüksek oranda eksprese edilen ve hem ligand hem reseptör olan VISTA, tümör modellerinde anti-tümör etkiyi baskılamaktadır. Erken TCR aktivasyonunu baskılayarak CD4<sup>+</sup> T hücresi yanıtını negatif düzenlerken, apoptoza karşı etkisi minimum seviyededir. APC'lerde eksprese olan VISTA, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini doğrudan baskılayarak immunsupresör görevi görmektedir. T hücrelerinin hayatta kalması, büyümesi için son derece önemli olan IL-2 sitokininin ekspresyonunu azalttığı da tespit edilmiştir. VISTA ekspresyonunu korumak veya düzenlemek için lenfoid dokularda mikroçevrenin rolü büyüktür. Yapılan bir çalışmayla birlikte VISTA'nın tümör hücreleri üzerindeki ekspresyonunun MMP yolunu tetikleyerek tümör büyümesine katkı sağladığı görülmüştür (Price, 2008 ; Wang ve ark., 2011 ; Ceeraz, Nowak, & Noelle, 2013 ; Nowak ve ark., 2017 ; Gabrilovich, 2018).



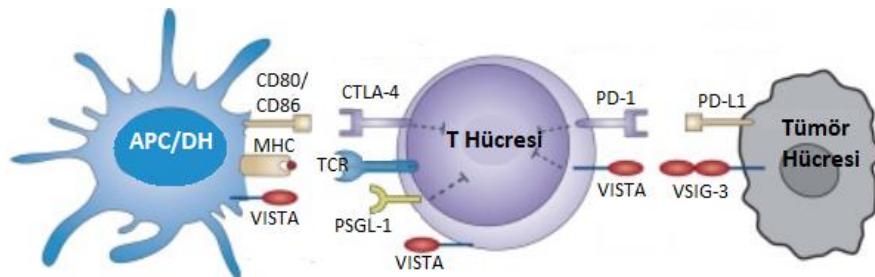
Şekil 2.16. VISTA molekülünün hücreler üzerindeki ekspresyonu (Mahoney, 2019)

Son zamanlarda VISTA'nın ligandı olduğu düşünülen B7 ailesinden VSIG-3 molekülü kolorektal kanser, hepatoselüler karsinom ve mide kanserinde yüksek seviyede eksprese olmaktadır. VISTA/VSIG-3 etkileşimi aktive olmuş T hücrelerinde ko-inhibitör fonksiyon gösterir. VSIG-3 T hücrelerinde ve periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) sitokin ve kemokin salınımını baskılayarak, proliferasyonu engeller (Şekil 2.17). VISTA/VSIG-3 blokasyonu ile yeni bir kanser immunoterapi stratejisi geliştirilmiştir. Ancak yine de VSIG-3'ün tam olarak biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir (J. Wang ve ark., 2019).



**Şekil 2.17.** VISTA/VSIG-3 etkileşiminin T hücreleri üzerinde ko-inhibitör görev görerek sitokin ve kemokin ekspresyonunu ve salınımını baskılaması (Wang ve ark., 2019).

P-selektin glikoprotein ligandı-1 (PSGL-1) T hücreleri ve daha birçok hematopoietik hücreler tarafından eksprese olan adezyon molekülüdür. Naif T hücreleri, bellek T hücreleri ve efektör T hücrelerinin inflamasyonlu dokuya göçünde, endotelial hücreler ve trombositlere tutunmasında P-selektin gibi moleküller oldukça önemlidir (Tinoco, Otero, Takahashi, & Bradley, 2017 ; Johnston ve ark., 2019). Antijen stimülasyonu sırasında PSGL-1 ekspresyonu sonucu hücrelere bağlanmasıyla, T hücreleri reseptör sinyallerini azaltarak hücre sağlığı ve fonksiyonunu bozmaktadır. Ayrıca hücre yüzeyinde VISTA gibi inhibitör reseptör ekspresyonunu da arttırmaktadır. Güncel çalışmalarla beraber PSGL-1 eksikliğinde aktif T hücrelerinde efektör sitokin üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Viral enfeksiyon ve melanoma tümör modellerinde de PSGL-1 molekülünün T hücrelerinin tükenmesini desteklediği gözlemlenmiştir (Tinoco ve ark., 2017) (Şekil 2.18). VISTA asidik tümürlü ve iltihaplı bölgelerde immunsupresor olabilmek için pH seçiciliğini kullanarak PSGL-1 ile etkileşim kurmaktadır ve T hücrelerinin sitokin salınımını engelleyerek T hücre aktivasyonunu baskılamaktadır. Yapılan çalışmalarda PSGL-1 geninin silinmesi T hücrelerine VISTA bağlanmasını önemli ölçüde azaltmıştır (Johnston ve ark., 2019)



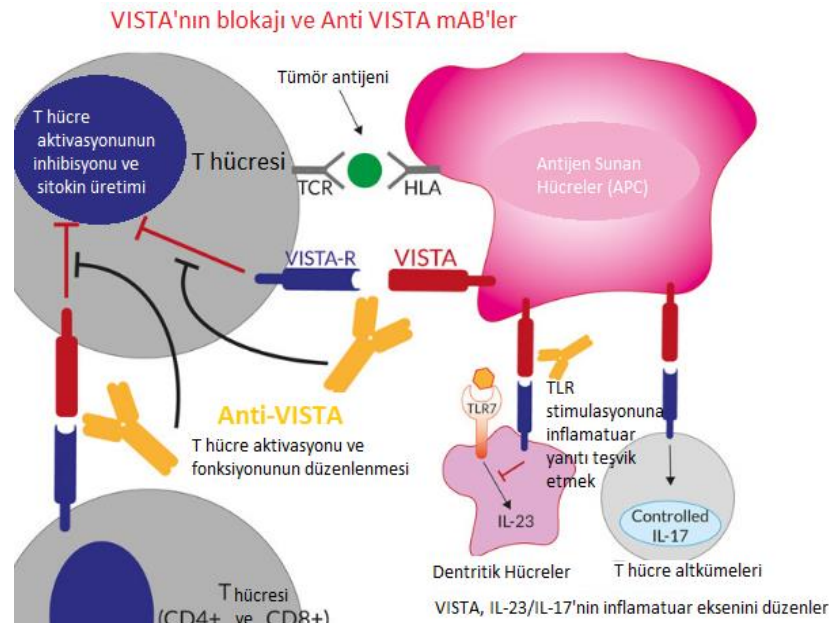
**Şekil 2.18.** T hücrelerinde eksprese olan PSGL-1 ligandının antijen sunan hücrelerde eksprese olan VISTA molekülü ile etkileşimi sonucu T hücre yanıtının baskılanması (Wang ve ark., 2020)

İnsan pankreas kanserindeki tümör mikroçevresinin stromal bölgesine M2 makrofajlar, MDSC'ler, Treg hücreler de dahil olmak üzere birçok immün hücre

infiltrate olmaktadır. Kanserle ilişkili VISTA'nın, pankreas kanserinde M2 makrofajlarından olan CD68+ makrofajlarında da yüksek seviyede ekspresyona olduğu tespit edilmiştir. TME'de stromal bölgede bulunan CD68+ makrofajları anjiogenez, tümör büyümesi ve metastazı tetikleyerek sağkalımı azaltıcı bir etki yapmaktadır (Blando ve ark., 2019 ; Mohamed ve ark., 2020).

VISTA molekülünün immunosupresör etkisini ortadan kaldırarak, kanserin gelişimini ve invazyonu engellemek amacıyla anti-VISTA antikor terapisi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır (Şekil 2.19). 2014 yılında LeMercier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre VISTA monoklonal antikorlar kullanılarak tümör mikroçevresi değiştirilmiştir. Bunun sonucunda tümör içine sızan CD8+ T hücrelerinin efektör fonksiyonu ve proliferasyonu artmıştır. IFN- $\gamma$  ve granzim B gibi efektör molekül üretimi de artarak tümör gelişimi engellenmiş ve sağkalım da artmıştır. Ayrıca 2019 yılında Mulati ve arkadaşlarının yumurtalık ve endometriyal kanser türlerinde yaptığı çalışmalar ile de VISTA'nın shRNA ile hedeflenmesi sonucunda IFN- $\gamma$ 'nın up regüle olduğu ve T hücre yanıtının arttığı tespit edilmiştir (Le Mercier ve ark., 2014 ; Mulati ve ark., 2019).

PD-L1 yerine VISTA'nın bloke edilmesi, tümör infiltran lenfositlerin sitokin üretimini inhibe etmektedir. Bu nedenle, PD-L1 ve VISTA, pankreas kanserinde antitümör T hücre yanıtlarını baskılayabilen inhibitör yollarını tetiklemektedir (Huang ve ark., 2020)

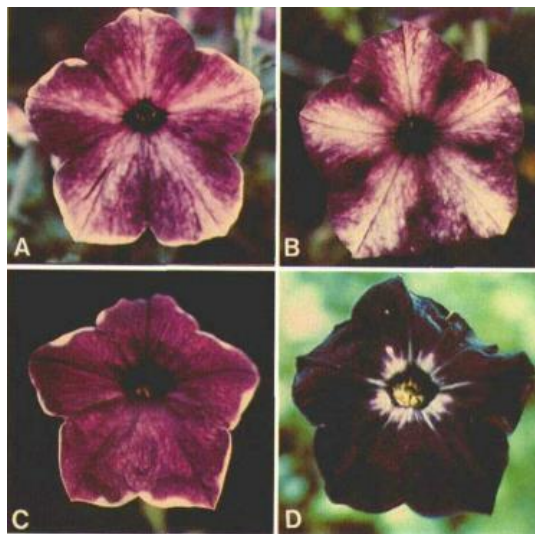


**Şekil 2.19.** Kanserli hücelere Anti-VISTA Mab verildiğinde özellikle APC'lerde ekspresyona olan VISTA'nın T hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkisi kalkar ve bunun sonucunda da tümör hücrelerine karşı sitokin üretimi ve salınımı gerçekleşir ( <https://www.invivogen.com/anti-hvista> ; Erişim tarihi: 12.02.2020)

## 2.5. RNA İnterferans

RNA interferans ökaryotlarda korunmuş, gen ekspresyonunu baskılamak veya susturmak için kullanılan basit ve hızlı post transkripsiyonel bir yöntemdir. RNA'nın komplementer mRNA'ya bağlanarak degege olmasını sağlayan 21-24 nükleotit uzunluğundaki kısa dsRNA'lara denir (Giraud ve ark., 2003). Mantarlar, bitkiler ve hayvanlar dahil olmak üzere bir çok ökaryotik organizmada transpozon, transgen ve virüslere karşı oluşmuş korunmuş bir mekanizmadır (Vargason, Szitty, Burgyán, & Tanaka Hall, 2003). Böceklerde ve bitkilerde viral enfeksiyonu tahrip etmek için uzun dsRNA'lar siRNA'ya dönüşürken, memelilerde viral enfeksiyona karşı savaşmak için RNAi'nin böyle bir mekanizmasının olup olmadığı bilinmemektedir (Pawlowski, Grelon, & Armstrong, 2013).

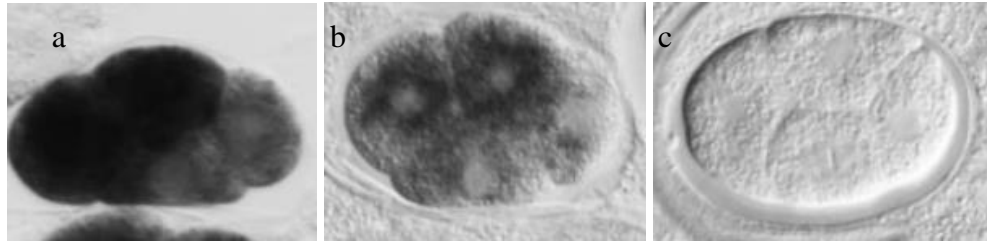
Antosiyaninler, özellikle çiçekli bitkilerde taç yaprağın renklenmesinden büyük ölçüde sorumlu fenilpropanoid yolağından türetilen flavonoid bileşikleridir. Kalkon sentaz (CHS) ise flavonoid biyosentezinde yer alan çok önemli bir enzimdir. Napoli ve arkadaşları daha yoğun mor renkli petunyalar elde etmek için güçlü bir promotörle flavonoid biyosentezinde yer alan kalkon sentaz (CHS) enzimini aşırı eksprese ettirerek antosiyaninin biyosentezinde sınırlayıcı olup olmadığını tespit etmek için petunya bitkisine *Agrobacterium Tumefaciens* vektörü ile CHS geni eklemişlerdir. Deneyin sonucunda eklenen CHS trans geninin, CHS gen ekspresyonunu inhibe ederek antosiyanin biyosentezini engellediği görülmüştür. Hem vektör aralığıyla verilen transgenin hem de endojen genin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir düşüş tespit edilmiş ve bu olaya “eşbaskınlık (kosupresyon)” ismi verilmiştir (Napoli, Lemieux, & Jorgensen, 1990) (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Antisens etki gösteren CHS geninin petunya bitkisinde göstermiş olduğu fenotip (Napoli ve ark., 1990)

1995 yılında Guo ve Kempheus, *Caenorhabditis Elegans*'ta PAR-1 geninin ekspresyonunun antisens RNA tarafından düşürülmesi hedeflenmiş ancak sense RNA kontrolünde de benzer gen ekspresyonlarında düşüş gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda hem sense hem de antisense RNA'nın gen ifadesini baskılamada etkili olduğu tespit edilmiştir. Napoli ve arkadaşları 1996 yılında petunya bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda hem transkript seviyesinde promotörde gerçekleşecek metilasyonlar ile hem de transgenlerle post-transkripsiyon seviyesinde gen susturmasının olabileceğini öngörmüşlerdir (Jorgensen, Cluster, English, Que, & Napoli, 1996 ; Singh ve ark., 2016).

Fire ve Mello 1998 yılında *C.Elegans* erken embriyosunda bol miktarda bulunan kas gelişiminden sorumlu Mex-3 geni için dsRNA ekleyerek gen ekspresyonunu tespit etmek istemişlerdir. Sense ve antisense RNA'yı bir karışım halinde dsRNA olarak *C.Elegans*'a verilmiş ve kontrol olarak kullandıkları tek sarmallı RNA'nın etkisine kıyasla dsRNA verildiğinde daha etkili ve spesifik bir şekilde hedef geni post transkripsiyonel seviyede susturmayı (PTGS) başarmışlardır (Şekil 2.21). Bunu RNA interferans veya RNAi olarak adlandırmışlardır (Fire, Mello ve ark., 1998).



**Şekil 2.21.** RNA interferansın *C.elegans*'taki Mex-3 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri a.RNA enjekte edilmemiş embriyo b.Antisens RNA enjekte edilmiş embriyo c.dsRNA enjekte edilmiş embriyo

2001 yılında Elbashir ve arkadaşları farklı memeli hücrelerinde dsRNA'ların bir RNase III yardımıyla kesilerek 21-23 nükleotit uzunluğunda siRNA ile gen susturması yapabileceğini tespit etmişlerdir. RNAi'nin doğal fonksiyonu ve eş baskılaması genomu virüs ve transpozon gibi genetik elementlerin invazyonundan korumaktır. Ayrıca 30nt'lik kısa dsRNA'lar etkin bir şekilde işlenerek 21-23nt'lik RNA (siRNA) elde edilir. Sentetik siRNA'ların 3'OH ucunda 2-3 nükleotitlik fazlalıkla, sekansa özgü mRNA bozunması için kılavuz olarak da hareket ettikleri gözlenmiştir. Ayrıca 21-23 nt uzunluğundaki siRNA'lar hücrede istenmeyen aktivasyonu da önlemektedir (Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, 2001). siRNA'nın ideal boyutu için çeşitli çalışmalar yapılmış ve 19 nükleotitle de 21-29 nükleotitle de başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak kısa siRNA'lar spesifik olmayan bir bağlanmaya neden olabilirken, uzun siRNA'lar

memelilerde immun yanıtı tetiklediği için daha kısa siRNA tercih edilmektedir (Fakhr ve ark., 2016). Kılavuz zincir “antisense zincir” ile, yolcu zincir ise “sense zincir” ile eş anlamıdır (Pawlowski ve ark., 2013).

### 2.5.1. RNA İnterferans Mekanizması

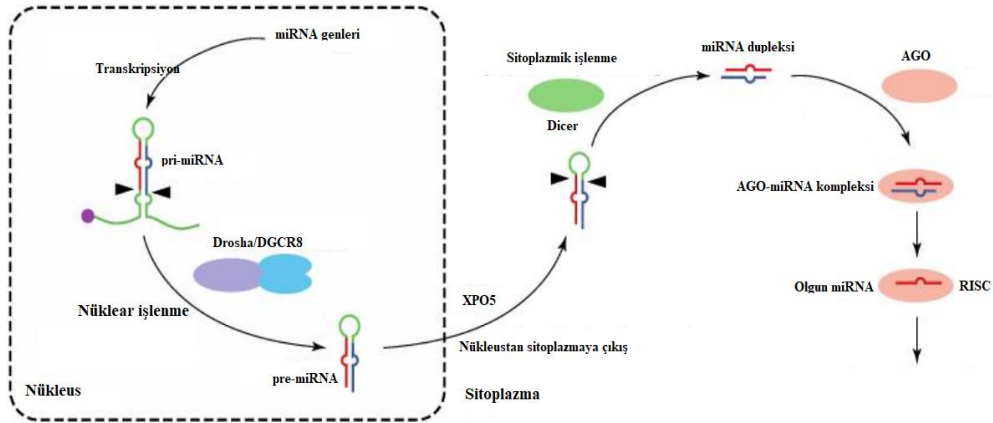
Gen susturma mekanizması transkripsiyonel gen susturması (TGS) veya post transkripsiyonel gen susturması (PTGS) olarak gerçekleşebilir. TGS genelde promotor veya enhansır bölgelerinin etkinliğini DNA seviyesinde genlerin metilasyon durumunu değiştirerek veya TALEN’leri (transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz) değiştirerek genlerin DNA seviyesinde hedeflenmesini sağlamaktadır (H. Kim & Kim, 2014).

PTGS mekanizması olarak bilinen RNAi, hem 21-23 nükleotit uzunluğunda dsRNA’dan meydana gelen siRNA’yı hem de 22 nükleotid uzunluğa sahip miRNA (micro RNA)’yı içermektedir (Zhao & Srivastava, 2007).

#### miRNA ve Biyogenezi

Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan ve yüksek oranda korunmuş miRNA’lar, *Caenorhabditis elegans*’ta keşfedilmiştir. İnsanlar dahil çoğu ökaryotta bulunmaktadırlar. Şimdiye kadar, sırasıyla insanlarda ve farelerde 1800 ve 1100’den fazla miRNA geni tespit edilmiştir. Sekans tamamlayıcılığı yoluyla çok sayıda hedef mRNA’ya bağlanarak hedef RNA’ları baskılamaktadırlar ve bu şekilde çeşitli türlerde gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesine aracılık etmektedirler (MacFarlane & R. Murphy, 2010 ; Matsuyama & Suzuki, 2020).

miRNA biyogenezinde birden çok adım vardır: miRNA genlerinin transkripsiyonu, DROSHA ile nüklear işleme, nükleo-sitoplazmik geçiş, DİCER tarafından sitoplazmik işleme ve AGO proteinleri ile RISC kompleksi oluşumu (Şekil 2.22).

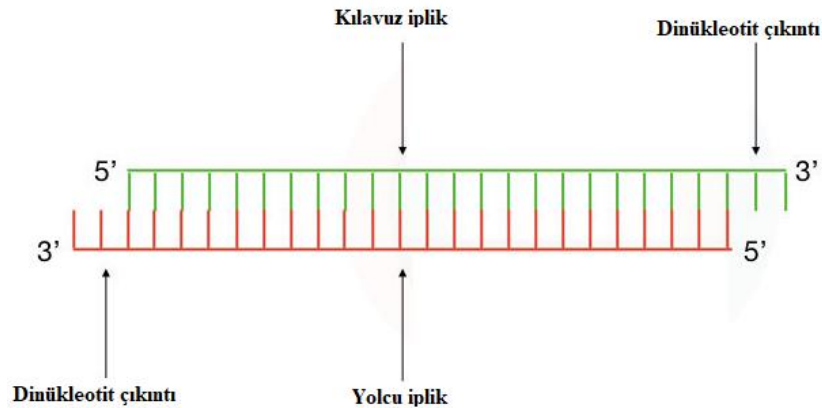


Şekil 2.22. miRNA biyogenezi (Matsuyama & Suzuki, 2020)

Kanonikal miRNA biyogenezi, RNA II polimerazın pri-miRNA oluşturması ile başlamaktadır. Pri-miRNA'lar çekirdekteki RNase III içeren Drosha kompleksi tarafından pre-miRNA'lara işlenmektedir. Exportin-5 (XPO5) ile sitoplazmaya aktarılan pre-miRNA'lar sitoplazmada RNase III içeren DİCER tarafından işlenerek 21–24 nt miRNA dupleksini oluşturmaktadır. miRNA dupleksi RISC kompleksini oluşturmak için HSP70/HSP90 şaperon mekanizması ile AGO proteinine yüklenir. miRNA dupleksinden yolcu iplik ayrılırken RISC kompleksi kılavuz iplik ile oluşturulur. AGO-miRNA kompleksi genellikle hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesine sekansa spesifik bir şekilde bağlanarak translasyonu baskılamaktadır (Matsuyama & Suzuki, 2020) (Şekil 2.24).

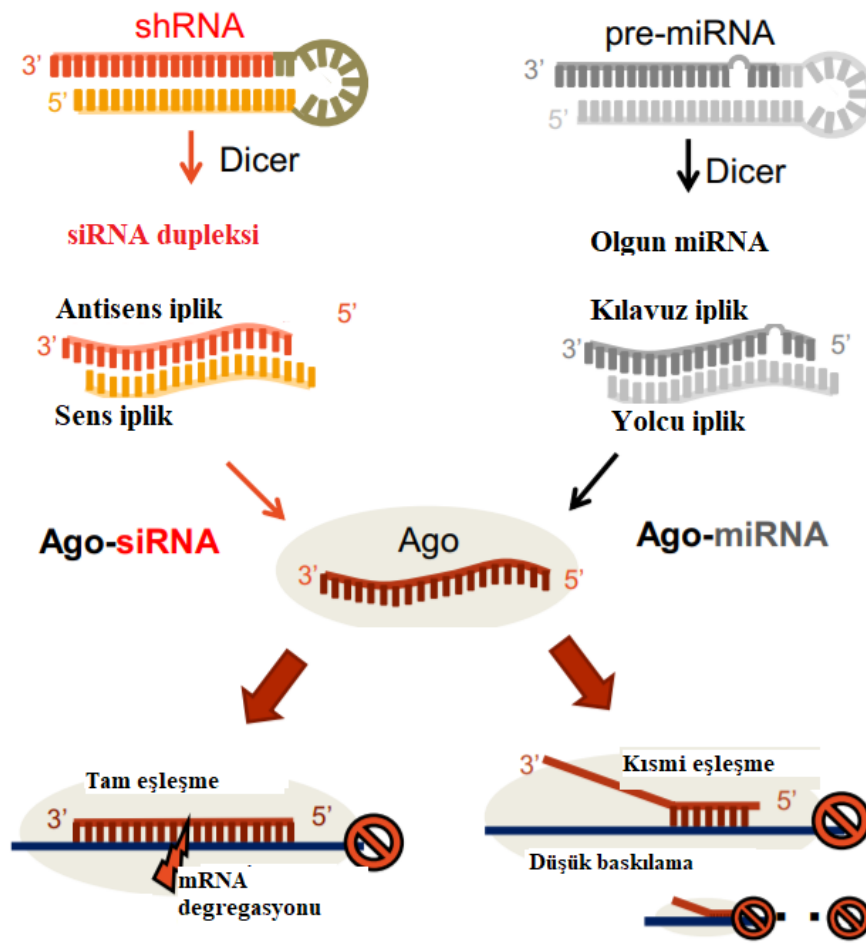
### siRNA

PTGS mekanizması mayalarda ve bitkilerde heterokromotin oluşumunu düzenleyerek genom stabilitesini korurken mantar, bitki ve hayvanlarda dsRNA'nın siRNA olarak işlenmesini sağlamaktadır (Vargason ve ark., 2003).



Şekil 2.23. siRNA'nın şematik görüntüsü (Erişim tarihi: 26.04.2021 <https://geneticeducation.co.in/sirna-small-interfering-rna-structure-and-function/>)

Memeli hücrelerinde siRNA'lar, ekzojen kaynaklı çift sarmallı RNA'nın RNase III enzim ailesinden olan DICER tarafından endonükleolitik işleme yoluyla üretilmektedir. 21-23 nükleotitlik siRNA fragmentlerine kesilmektedirler (Şekil 2.23). DICER enzimi ile 3'OH ucunda dinükleotitlik bir çıkıntı oluşturulan siRNA'lar, bu çıkıntılar sayesinde RISC ile entegrasyon ve hedef RNA'daki kesim alanlarını tanımlayabilmektedirler. RISC'in bir bileşeni olan argonat-2 (AGO-2) proteini siRNA dubleksini çözerek kılavuz iplik ile hedef mRNA ile birleşmeye hazır hale getirir. mRNA'nın kodlanmayan 3'UTR bölgesine RISC kompleksi bağlandığında AGO yardımıyla translasyon baskılanması gerçekleşirken, RISC kompleksinde yer alan siRNA hedef mRNA'nın kodlanan sekansı (CDS) %100 komplementer olarak birleştiğinde AGO-2 endonükleaz aktivitesi ile hedef mRNA'nın degege olmasına neden olarak PTGS sağlanır (Elbashir ve ark., 2001 ; Divan ve Royds ,2013 ; Singh ve ark., 2016 ; Fakhr, Zare, & Teimoori-Toolabi, 2016) (Şekil 2.24).

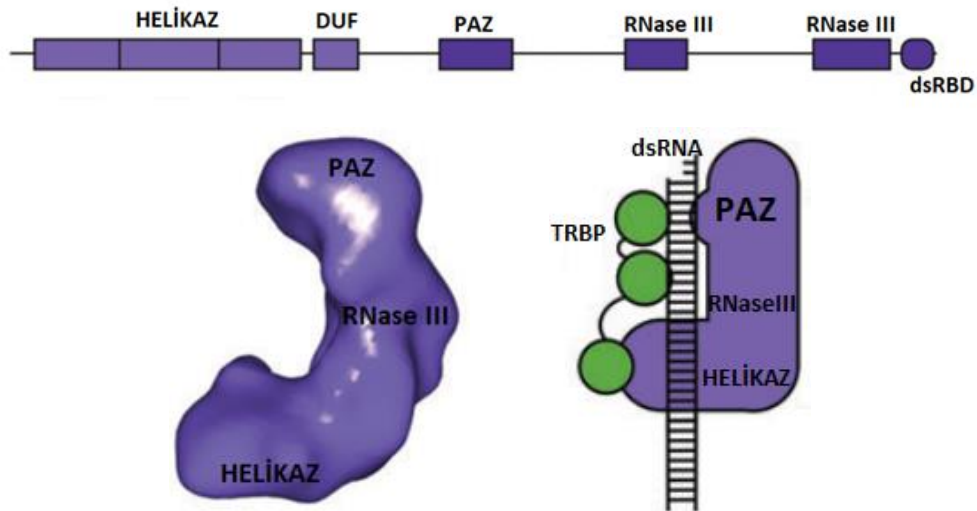


Şekil 2.24. siRNA ve miRNA'nın işlenmesi sonucu gen susturmaları (Seok, Lee, Jang, & Chi, 2018)

## 2.5.2. siRNA Mekanizmasında Görevli Bileşenler

### DICER

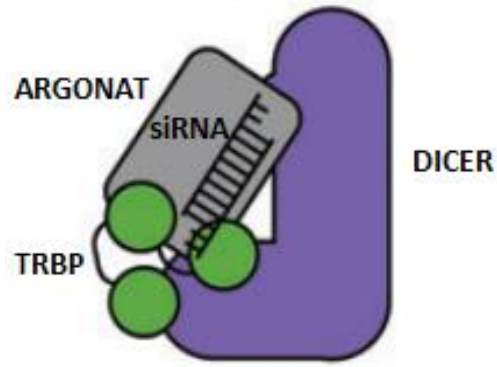
DICER *Drosophila*'da keşfedilmiş, ATP bağımlı RNase III sınıfına ait bir enzimdir ve uzun dsRNA'nın 21-23 nükleotit uzunluğunda 3' ucunda dinükleotitlik çıkıntı kalacak şekilde kesilmesini sağlamaktadır. Bu nükleaz evrimsel olarak solucanlarda, mantarlarda, sineklerde, bitkilerde ve memelilerde korunmuştur. Enzim helikaz, PAZ, RNaseIII ve dsRBD domainlerine sahiptir. Helikaz domaini siRNA'nın zincirinin açılmasını ve tek zincirin RISC kompleksine aktarımını, PAZ domainiyse dsRNA'nın DICER enzime bağlanmasını sağlamaktadır. Uzun dsRNA'nın kesilmesi de RNase III domainiyle gerçekleşir (Watson et al., 2001).



**Şekil 2.25.** DICER enziminin dsRNA'dan siRNA yapmasını sağlayacak domainleri ve RISC kompleksinin siRNA oluşumu için gerekli olan alt birimi TRBP (Heyam, Lagos, & Plevin, 2015)

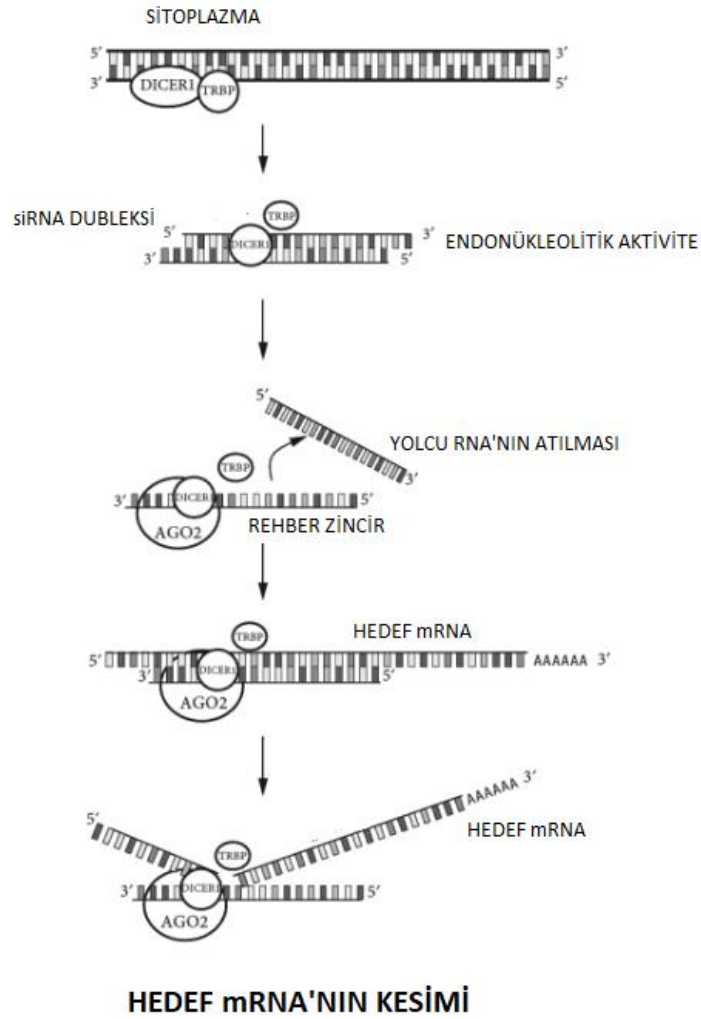
### RISC (RNA ile indüklenen susturma kompleksi)

Bir ribonükleoprotein kompleksi olan RISC, hedef mRNA'ya %100 komplementer bağlanarak nükleaz aktivitesiyle ATP'den bağımsız bir şekilde parçalama işlemi yapar. RISC kompleksine girebilmesi için siRNA'nın 5'ucunun endojen kinazlar tarafından fosforlanması gerekmektedir. Kompleksteki moleküllerle etkileşim kuran siRNA, kompleksi hedef mRNA'ya yönlendirerek bir şablon gibi davrandığından dolayı RISC'in en önemli parçası olarak kabul edilmiştir. Tanımlanan ilk RISC kompleksi bileşenlerinden Argonat molekülü (AGO), *C.elegans*'ki RDE-1'in memelilerdeki homoloğu olan AGO-2'dir (Giraud, Le Quéré, & da Cunha, 2003 ; Pawlowski ve ark., 2013 ; Singh ve ark., 2016).



Şekil 2.26. RISC kompleksinin bileşenleri (Heyam et al., 2015)

AGO2 PAZ, MID ve PIWI olmak üzere 3 fonksiyonel domainden oluşmaktadır. PIWI; RNase H aktivitesi ile yolcu ipliğin ayrılmasını ve hedef mRNA'yı kesme işlevine sahiptir. PAZ domaini ise siRNA'nın 3'dinükleotit bölgesini spesifik olarak tanınmaktadır ve siRNA'nın 5 'fosfat grubu MID ile PIWI domainleri arasında girmektedir. Aktif hale gelen siRNA-RISC kompleksi komplementer mRNA ile birleşerek degege etmektedir. Etkin bir şekilde kapatılan gen sayesinde protein translasyon seviyesi de önemli ölçüde azalmaktadır. mRNA degregasyonundan sonra RISC geri dönüştürülür (Gavrilov & Saltzman, 2012 ; Matsuyama & Suzuki, 2020).

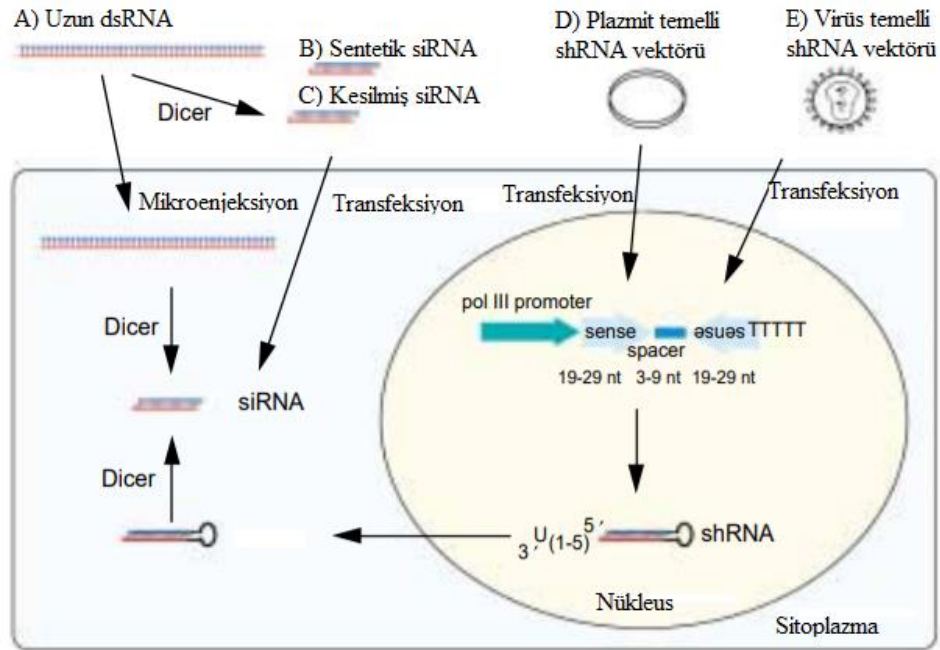


**Şekil 2.27.** Uzun dsRNA DICER1 ve ona bağlanan transaktivasyon cevap elemanı RNA bağlayıcı protein (TRBP) aracılığıyla kesilerek 3' ucunda 2-3 nükleotit fazlalığına sahip siRNA olmaktadır. AGO-2 enziminin de gelmesiyle oluşan RISC kompleksi, rehber ve yolcu zincirlerin birbirinden ayrılmasını, rehber zincir ile de hedef mRNA'ya %100 komplementer şekilde bağlanmayı sağlamaktadır. AGO-2 hedef mRNA'yı keser, post-transkripsiyonel susturma gerçekleşmektedir (Divan ve Royds, 2013).

### 2.5.3. Memeli Hücrelerinde Çeşitli siRNA Stratejileri

siRNA'lar hedef gen ekspresyonunu susturmak için hücredeki doğal olarak oluşan RNAi yollarını kullanmaktadırlar. dsRNA'ların RNase III/DICER kesimi ile hazırlanması (Şekil. A), siRNA'ların dsRNA'lardan kimyasal olarak sentezlenmesi (Şekil. B), rekombinant DICER enzimi kullanılarak dsRNA'lardan in vitro şekilde siRNA sentezlenmesi (Şekil. C), ekspresyon plazmitleri kullanarak çekirdekte shRNA elde etmeye dayalı yöntem (Şekil. D) ve adenovirüs, retroviral virüs, lentiviral virüs gibi virüs temelli vektör kullanarak siRNA elde edilebilmektedir. Kimyasal olarak sentezlenmiş olan siRNA'lar lipofilik reaktifler kullanılarak hücreye verimli bir şekilde aktarılabilir. Rekombinant DICER enzimi kullanarak ise kırılmış siRNA,

boyutlarına göre ayrılıp, saflaştırılıp ve hücelere transfekte edildiği bilinmektedir (Kim, 2003).



Şekil 2.28. Memeli hücelerine verilen farklı siRNA stratejileri (Kim, 2003)

### 2.5.5. RNA İnterferans Kullanım Alanları

RNAi post transkripsiyonel seviyede çok sayıda hastalığın ve doğal sürecin altında yatan çeşitli moleküler yolları araştırmak için umut verici bir araçtır. Birçok türde gen susturulması için uygulanabilmektedir. Gen ekspresyon seviyesini düşürmede mantar, bakteri ve virüs gibi patojenlerin virülansını azaltmak ve kanser gibi birçok hastalıkta farklı mRNA izoformlarını susturarak mevcut proteinlerin canlıdaki rolünü öğrenmek için oldukça önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır. *C.elegans*'ta ise DICER enziminin işlevini anlamak için mutasyona uğratılmış ve çok hücreli organizmalarda gelişim sürecinde RNAi'nin önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2016 ; Fakhr ve ark., 2016)

Kanser başlangıcı, ilerlemesi ve metastazı mutasyona uğramış veya anormal seviyede eksprese olan genlerle ilişkilidir. Gen susturma, tümör büyümesi inhibisyonu ve onkogenlerin yüksek seviyede ekspresyonu siRNA ile hedeflenebilmektedir (Wen & Meng, 2014).

### 2.6. Araştırmanın Amacı

Tümör kaynaklı immun baskılanma, kanser immunoterapileri için büyük bir engeldir. Son zamanlarda immun check-point VISTA gibi B7 ailesi düzenleyici

moleküllerin hedeflenmesi otoimmünite ve kanser gibi hastalıkların tedavileri için ümit verici bir yaklaşım olmuştur.

Pankreas kanserinde yüksek seviyede eksprese olan TLR4, normal pankreas hücrelerinde çok az veya hiç eksprese olmamaktadır. Yapılan birçok çalışma kemoterapiye direncin ve tümör progresyonunun inhibisyonu için TLR4'ün potansiyel bir hedef olduğunu göstermektedir (Vaz & Andersson, 2014 ; C. Chen ve ark., 2018).

VSIR geni tarafından kodlanan VISTA ve Toll-like reseptör 4 (TLR4) sinyal yollarına bakıldığında her iki proteinin de NF- $\kappa$ B sinyal yolağı ile bağlantılı olduğu görülmüştür (<https://www.genecards.org>, Erişim tarihi: 08.05.2021) Ancak pankreas kanserinde VISTA ile TLR4 ekspresyonu arasındaki potansiyel bağlantılar henüz keşfedilmemiştir.

Literatür bilgilerinden edinilen verilere dayanarak, insan pankreas kanseri hastalarında kötü prognoz, TLR4 ve negatif immün check-point VISTA'nın yüksek seviyedeki gen ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda PANC-1 hücre hattına TLR4 antagonisti olan Naloxone ilacının uygulanmasının ve RNA interferans yöntemi ile VISTA'nın susturulmasının hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve TLR4 sinyal yolağı ile VISTA arasındaki potansiyel bağlantıların tespit edilmesi hedeflenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü

Pankreas adenoduktal karsinoma kökenli PANC-1 hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)' den temin edildi. PANC-1 hücre hattında TLR-4 ve VISTA moleküllerinin yüksek seviyede ekspresyon olmalarının, tümörün agresif olmasına katkı sağladığı düşünüldüğünden dolayı bu hücre hattı seçilmiştir.

PANC-1 hücre hattının temel özellikleri **Tablo 3.1**'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan PANC-1 pankreas kanseri hücre hattının özellikleri

#### PANC-1 Hücre Hattı (ATCC ®CRL-1469)

Organizma	Homo Sapiens
Doku	Pankreas Kanalı
Hastalık	Pankreas Adenoduktal Karsinoma
Morfoloji	Epitelyal
Cinsiyet	Erkek
Yaş	56
Büyüme Özelliği	Adherent

Dondurulmuş stok hücreler öncelikle 37 °C' lik su banyosunda hızlı bir şekilde eritildi. 15 ml' lik falkon tüpe 10 ml medyum ilave edildikten sonra üzerine hücre solüsyonundan damla damla eklenerek 200 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve çöktürüldü. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 1x Phosphate Buffered Saline (PBS; Gibco®-Invitrogen, ABD) ile bir kez yıkandı. Tekrar 200 g'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Pellet kısmındaki PANC-1 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS; Hyclone, US) ve %1 antibiyotikli (Penicillin-Streptomycin 1:1; Gibco®-Invitrogen, ABD) 5 ml'lik DMEM High Glucose (Biowest, France) medyumunda, T25 kültür flaskında 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li etüvde yeterli doluluk oranına ulaşmaya kadar inkübasyona bırakılarak kültüre edildi ve doluluk oranına ulaşan hücreler yeni flaslara pasajlandı. Hücreler flaskın %60-80'ini kapladıktan sonra cell scraper ile kaldırıldı. Kaldırılan hücrelere 200 g 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pellet ve ark.ındı, süpernatant kısmı atıldı. Hücre pelleti 1 ml medyum içinde çözdürüldü ve hücre sayım lamında (Thermo, ABD) hücre yoğunluğu hesaplandı. Daha sonra çalışılması için hücrelerin bir kısmı, 1 ml dondurma medyumuna (%10 Dimetil Sulfoksit (DMSO;

Applich em, Almanya), %70 DMEM, %20 FBS) içeren kriyo tüplere alınarak -80 °C dondurucuda stoklandı.

### 3.1.2. Hücre Sayımı

1 ml homojen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 1,5 ml' lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 10 µl %0,04 trypan blue boya solüsyonu eklenerek (dilüsyon faktörü:2) pipetaj yapıldı. Boyanmış hücre süspansiyonu 5 dakika oda ısısında bekletildi ve hücre sayım lamına 20 µl hücre süspansiyonundan yüklendi. Ölü hücreler mavi boyayı içine almışken, mavi ile boyanmayan canlı hücreler invert mikroskop (Nikon, Japan) altında 100× büyütme ile 4 farklı bölgede sayılarak ortalaması alındı. Canlı, ölü ve toplam hücre sayısı aşağıdaki formülde verildiği gibi hesaplandı.

$$1 \text{ ml' deki hücre sayısı} = \text{Sayılan bölgelerdeki ortalama hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

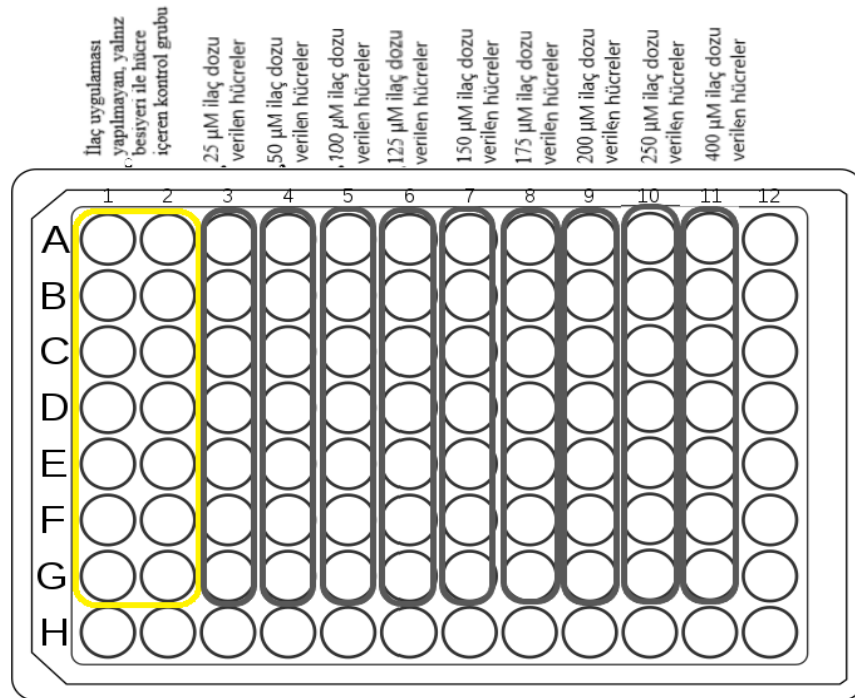
## 3.2. Naloxone Uygulaması

Çalışmamızda TLR4 antagonisti olarak bilinen Naloxone Hameln Pharma Plus (GmbH, Almanya) firmasından satın alındı.

### 3.2.1. Canlılık Analizi

Naloxone ilacının PANC-1 hücreleri üzerine sitotoksik etki yapıp yapmadığını anlamak için MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) testi yapıldı. Bunun için 24., 48. ve 72. Saatler için 3 tane 96 well platelere her kuyucukta  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve yaklaşık 24 saat 37°C, %5 CO2 etüvde inkübe edildi. Sürenin sonunda eski medyumlar uzaklaştırıldı. 7 tekrar ve 2 kontrol grubu olmak üzere 25 µM, 50 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM, 175 µM, 200 µM, 250 µM ve 400 µM dozda 200 µl Naloxone ile karıştırılmış medyum verildi (Şekil 3.1). İlacın verilmesinden sonra 24., 48. ve 72. saatlerde kuyucuklardan ilaçlı medyumlar uzaklaştırıldı ve her kuyucuk için 20 µl 5 mg/ml Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT; AppliChem, Almanya, #5P011404) solüsyonu eklendi. 3 saat 37°C, %5 CO2 etüvde inkübe edildi. MTT döküldü ve 200 µl DMSO eklenerek 15 dakika karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında mikroplate spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) 575 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Farklı

konsantrasyonlarda verilmiş olan Naloxone'nun 24., 48. ve 72. saatlerindeki gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak analiz edildi.



Şekil 3.1. İlaç etkinliğinin belirlenebilmesi için yapılan MTT uygulamasının 96 well plate üzerindeki deney düzeniği

### 3.2.2. RNA İzolasyonu ve İzole Edilen RNA'nın Ölçümü

PANC-1 insan pankreas kanseri hücreleri ve sağlıklı hücre hattı olan HUVEC, T-75 flasklarına her flaskta  $7 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekildi.

Tablo 3.2. T-75 flasklarına ekilen hücreler

1 numaralı flask	HUVEC-Doz
2 numaralı flask	HUVEC-Kontrol
3 numaralı flask	PANC-1-Doz
4 numaralı flask	PANC-1-Kontrol

- 24 saat sonra belirlenen dozda 1 ve 3 numaralı flasklara 10 ml Naloxone verildi (**Tablo 3.2.**).
- 72 saat inkübasyondan sonra hücreler cell scraper ile kazındı.
- 15'lik falkona alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Besiyeri dikkatli bir şekilde ayrıldı ve pelletin üzerine 500 µl Trizol (Sigma-Aldrich®, Almanya, #BCBX6548) eklendi ve şeffaf bir görüntü elde edene kadar pipetaj yapılarak pellet çözdürüldü. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından tekrar pipetaj yapıldı.

5. 250 µl kloroform eklendikten sonra 2 ml'lik ependorfa alındı ve 12.000 g'de 25 dakika +4 °C'de santrifüj edildi.
6. Dikkatli bir şekilde üst faz ayrıldı ve yeni ependorfa alındı.
7. Üzerine 250 µl izopropanol eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 12.000 g'de 25 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı.
9. Süpernatant kısmı atıldı, pellet üzerine 1000 µl %75'lik alkol eklendi ve 7500 g 10 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı.
10. Süpernatant atıldı ve pellet 1 saat çeker ocakta kurumaya bırakıldı.
11. 70 µl nükleaz free su ile pellet çözdürüldü.

RNA izolasyonundan sonra Thermo Scientific Multiskan Sky cihazı (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) Scanlt Software 4.0 programı kullanılarak izole edilen RNA'ların miktar ve saflık ölçümü yapıldı. İlk olarak RNA ölçümü için hazır protokol girildi. Nanodrop Plate'ine (Thermo Scientific™ µDrop™ Plate, #N12391, ABD) blank için 2 tekrar olacak şekilde 2µl RNA' nın çözdürüldüğü Nuclease Free Water konuldu. Daha sonra RNA'lardan her tüpten yine 2 µl 2 tekrar olacak şekilde µdrop Plate'ine konuldu. RNA'ların konsantrasyonu (ng/µl) ve saflığı (OD260/OD280) ölçüldü.

### 3.2.3. cDNA Sentezi

RNA'ları cDNA'ya çevirmek için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Thermo, ABD, #K1622) kullanıldı. cDNA sentezine başlamadan önce RNA'ların ölçülen konsantrasyonları kitin protokolüne göre Nuclease Free Water ile 1µg'a eşitlendi.

Kit içerisinde çıkan bileşenlerin tümü buz üzerinde çözdürüldü. **Tablo 3.3**'deki bileşenlerden tüpler hazırlandı.

**Tablo 3.3.** cDNA Sentezinde Kullanılan RNA, Primer ve Su Bileşenlerinin Miktarları

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
RNA	1 µg
Oligo (dT)18 primer	1 µl
Random Hekzamer primer	1 µl
Nuclease Free Water	Toplam volüm 12 µl' ye tamamlayacak miktarda değişken
<b>Toplam volüm</b>	<b>12 µl</b>

1. Oligo dT primer ve random hekzamer primerden birer µl alınarak tüpe eklendi ve mini spin yapıldı.
2. Tüm RNA örnekleri için ayrı ayrı olacak şekilde her tüpe 2µl primer mix eklendi ve mini spin yapıldı.
3. Tüpler Thermal Cyclers'da (ProFlex PCR, Thermo, ABD, #4484076) 65°C'de 5 dk 1 döngü olacak şekilde inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında tüpler tekrar buz üzerine alındı ve ayrı bir ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

**Tablo 3.4.** cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl
<b>Toplam volüm</b>	<b>8 µl</b>

**Tablo 3.4'**de verilen bileşenlerden hazırlanan karışım pipetaj yapılarak karıştırıldı. Hazırlanmış olan 12 µl'lik RNA-primer karışımına 3.1'deki tablo ile hazırlanan mixten 8 µl dağıtılır. Bu işlem sonunda her bir tüpte 20 µl RNA-enzim karışımı oluşmuştur. Tüpler thermal cyclers'a (ProFlex PCR, Thermo, ABD, #4484076) konuldu ve sırasıyla 42°C 60dk, 25°C 5dk, 42°C 60dk ve 70°C 5dk inkübe edildi. İşlem sonunda örnekler cihazdan alındı ve -20°C derecede muhafaza edildi.

GAPDH, TLR4, VISTA ve IRAK4 genlerine spesifik primerler Primer-Blast programı ile dizayn edildi ve ‘‘Sentebiolab’’ firmasından sipariş verildi. Tüm primerlerin stokları 100µM olarak geldi.

Kullanılan primer sekansları ve PCR rnlerinin uzunlukları **Tablo 3.5**'de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-qPCR' de kullanılan primer listesi.

Gen	Primer Dizisi
IRAK4	F: 5' CGCTTCCTAGTTCGGCTGGTT 3' R: 5' GTTTTGGGAACAGCATCTGCC 3'
VISTA	F: 5' GATAGCGGCCTCTACTGCTG 3' R: 5' TGGATGGTGCATCTTTGCCT 3'
TLR4	F: 5' AGACCTGTCCCTGAACCCTAT 3' R: 5' CGATGGACTTCTAAACCAGCCA 3'
GAPDH	F: 5' GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT 3' R: 5' GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG 3'

#### 3.2.4. qRT-PCR

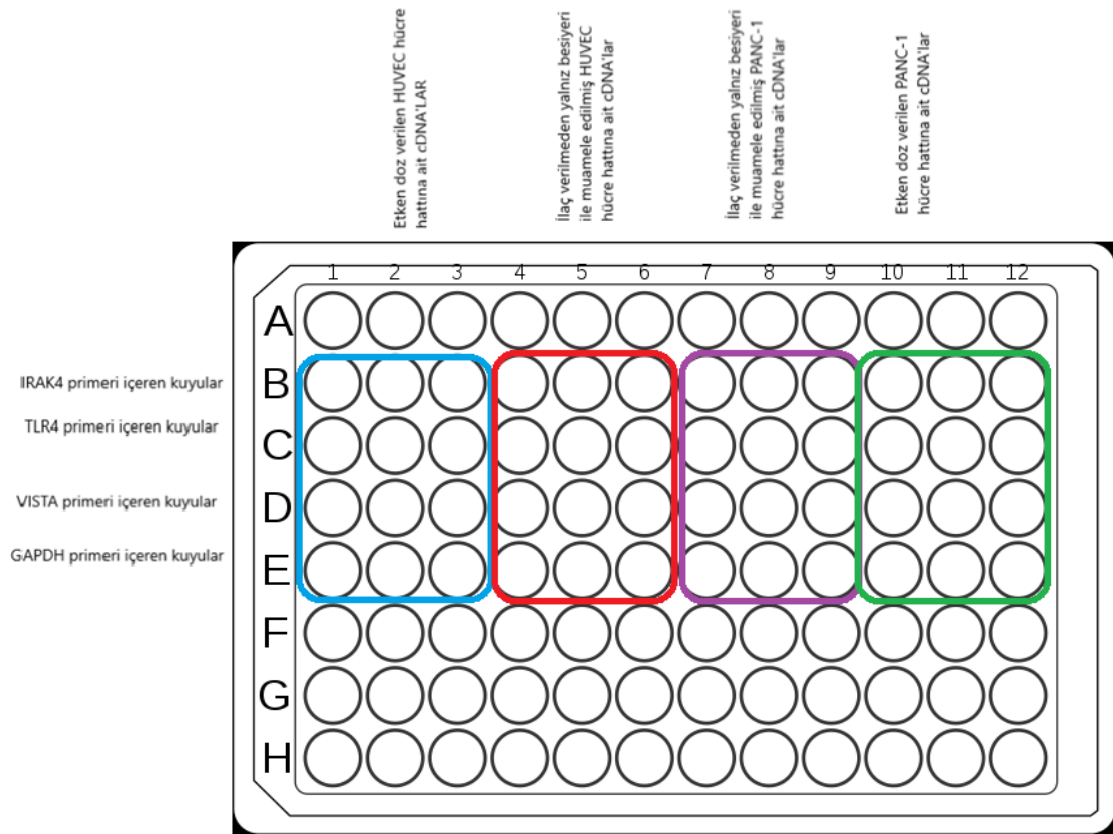
İnsan pankreas kanseri (PANC-1) hücre hattında Naloxone uygulamasından sonra hedef genlerin mRNA düzeyinde etkinliğinin saptanması ve baskılanma oranının tespit edilmesi için Quant Studio3 cihazı (Thermo, ABD) ile qRT-PCR yapıldı.

qRT-PCR alışması için DNA Green Master (Roche, Version 07, #06402712001) kullanıldı. Tüm genlerin ekspresyonu için 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı (şekil 3.2).

Naloxone'un gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi için yapılan qRT-PCR analizindeki reaksiyon karışımı **Tablo 3.6**'da verilmiştir.

**Tablo 3.6.** qRT-PCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşeni	Hacim
SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	5 µl
F+R primer Mix (50 pM)	0,2 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz-Free su	2,8 µl
<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

**Şekil 3.2.** qRT-PCR için hazırlanan elisa plate deney düzeniği

Hedef genlerin ekspresyon seviyelerini incelemek için yapılan qRT-PCR analizinin protokolü **Tablo 3.7'**de verilmiştir.

**Tablo 3.7.** qRT-PCR protokolü

Denatürasyon	50 °C’de 2 dk
	95 °C’de 10 dk
Amplifikasyon (40x)	95 °C’de 15 sn
	53 °C’de 30 sn
	72 °C’de 1 dk
Melt Curve	95 °C’de 15 sn
	60 °C’de 1 dk
	95 °C’de 15 sn

### 3.4. siRNA Çalışması

Çalışmada kullanılan VISTA, GAPDH ve negatif kontrol siRNA’ların dizi bilgileri ve katalog numaraları **Tablo 3.8, 3.9** ve **3.10**’daki gibidir.

VISTA; ON-TARGETplus Human EGFR (1956) siRNA – SMARTpool, 5 nmol (Dharmacon, GE Healthcare, L-032651-02-005)

**Tablo 3.8.** VISTA siRNA-pool İçerisindeki siRNA Dizi Bilgileri.

<b>Dizi</b>	<b>Dizi Bilgileri</b>
1. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-032651-21, VISTA <b>GUGAGACAGUGCCGAGUA</b> Mol. Wt: 13,445.1 (g/mol) Ext. Coeff: 367,303 (L/mol.cm)
2. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-032651-22, VISTA <b>CCACAAUGCUUGAUGCCAG</b> Mol. Wt: 13,445.1 (g/mol) Ext. Coeff: 361,073 (L/mol.cm)
3. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-032651-23, VISTA <b>GGACAAAGGGCACGAUGUG</b> Mol. Wt: 13,460.1 (g/mol) Ext. Coeff: 359,738 (L/mol.cm)
4. siRNA dizisi	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-032651-24, VISTA <b>CGGUGGAACUACUACGACUAAA</b> Mol. Wt: 13,430.1 (g/mol) Ext. Coeff: 373,622 (L/mol.cm)

GAPDH; ON-TARGETplus Human GAPDH Control Pool, 5 nmol (Dharmacon, GE Healthcare, D-001830-10-05)

**Tablo 3.9.** GAPDH Kontrol siRNA-pool İçerisindeki siRNA Dizi Bilgileri.

<b>Dizi</b>	<b>Dizi Bilgileri</b>
1. siRNA dizisi	GUCAACGGAUUUGGUCGUA
2. siRNA dizisi	CAACGGAUUUGGUCGUAUU
3. siRNA dizisi	GACCUCAACUACAUGGUUU
4. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUCCAAUA

Negatif Kontrol; ON-TARGETplus Human Non-targeting Pool, 5 nmol (Dharmacon, GE Healthcare, D-001810-10-05)

**Tablo 3.10.** Non-Target siRNA-pool İçerisindeki siRNA Dizi Bilgileri.

<b>Dizi</b>	<b>Dizi Bilgileri</b>
1. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUCGACUAA
2. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUUGUGUGA
3. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUUUCUGA
4. siRNA dizisi	UGGUUUACAUGUUUCCUA

### 3.4.1 siRNA'ların Hazırlanması ve Saklanması

siRNA'lar firmadan 5nM konsantrasyonda toz halinde temin edildi. siRNA'ları çözdürmek için aynı firmadan alınan 5X siRNA Buffer (B-002000-UB-100, Dharmacon, GE Healthcare, ABD) Nuclease Free su ile 1X'e seyreltildi. Toz haldeki siRNA'lar firma protokolüne göre uygun miktarda 1X siRNA Buffer ile sulandırılarak 20uM konsantrasyonunda stok hazırlandı. siRNA'lar 20 µM konsantrasyonda -20 °C derecede muhafaza edildi. Deneylerde 20 µM siRNA'lar öncelikle 1X siRNA Buffer ile 5 µM konsantrasyona indirildi ve 5 µM üzerinden hesaplamalar yapıldı. siRNA'lar ile birlikte aynı firmadan alınan transfeksiyon ajanı DharmaFECT ise +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.4.2. siRNA Transfeksiyonu

- PANC-1 insan pankreas kanseri  $7 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılan T-25 flaskta hücreler %80-90 konfluent olduğunda cell scraper ile kaldırıldı.

- Kaldırılan hücrelere 200 g 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pellve ark.ındı ve %10 FBS'li antibiyotiksiz komplet mediumda çözdürüldü.
- 24 ve 48 saatlik siRNA çalışması için 6 well plate'lere 25.000 hücre ekildi ve hücrelerde %60-80 doluluk olması beklendi.
- 5 µM konsantrasyonda olan stok VISTA siRNA'ları optimum susturma yüzdesinin belirlenmesi için 5nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM olmak üzere farklı konsantrasyonlarda ayarlanarak hücrelere transfekte edildi.
- siRNA deneyinde 6 well plate için 5 µM VISTA ve Non-Targeting siRNA stoklarından;
  - 5nM için 2 µl siRNA,
  - 10nM için 4 µl siRNA,
  - 25nM için 10 µl siRNA,
  - 50nM için 20 µl siRNA alınarak üzeri Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco®-Invitrogen, ABD) ile 200 µl' ye tamamlanarak birinci tüpler hazırlandı.
- İkinci tüplere ise 1 well için 5 µl DharmaFECT ile 195 µl Opti-MEM karıştırıldı ve yavaşça pipetaj yapıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (Tablo 3.11).
- İnkübasyon sonrası siRNA bulunan tüp içeriği, DharmaFECT bulunan tüpe aktarıldı ve birleştirilen karışım yine pipetaj yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 25 dk inkübe edildi.
- Hücreler üzerinde bulunan mediumlar tamamen çekildikten sonra her bir well için tüp 1 ve tüp 2 karışımından 400 µl ve üstüne 1600 µl %10 FBS bulunan, antibiyotik içermeyen komplet medium eklendi.
- Karışımın homojen dağılması için plate' ler ileri geri hareket ettirildi ve 37°C %5 CO2 içeren inkübatöre kaldırıldı. Transfeksiyon sonrası 24. ve 48. saatlerde gen ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

**Tablo 3.11.** Transfeksiyon karışımının hazırlanması

Karışım	GAPDH	VISTA	Non-Targeting
5 µM siRNA	40 µl	2, 4, 10, 20 µl	2, 4, 10, 20 µl
DharmaFECT	5 µl	5 µl	5 µl
Opti-MEM	195 µl	195 µl	195 µl

### 3.4.3. siRNA Verilen Hücrelerden RNA İzolasyonu

Kültüre edilmiş hücreler 24 ve 48 saat siRNA ile inkübe edildikten sonra hücrelerden ilk olarak RNA izolasyonu yapıldı. Bu aşamada şu basamaklar takip edildi;

1. 6 well plate'de bulunan hücreler cell scraper ile kazındı ve 15ml'lik falkona alınarak 1500 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı.
2. Besiyeri dikkatlice ayrıldı ve üzerine 200 µl PBS ekleyip 1500 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı.
3. Süpernatant kısmı atılarak pelletin üstüne 500 µl Trizol (Sigma-Aldrich®, Almanya, #BCBX6548) eklendi ve pellet pipetaj yapılarak çözdürüldü. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Beklemenin ardından üzerine 200 µl kloroform eklendi. 2 dk oda sıcaklığında inkübe ettikten sonra 2 ml'lik ependorfa alındı ve 120.000 g'de 30 dk santrifüj yapıldı.
5. Üst faz dikkatli bir şekilde ayrılıp yeni ependorfa alındı.
6. Üzerine 200 µl izopropanol eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra +4°C' ye soğutulmuş santrifüjde 12.000 g 30 dk santrifüj yapıldı.
7. Süpernatant kısmı atıldı, pellet kısmına 1000 µl alkol eklendi ve +4°C' ye soğutulmuş santrifüjde 7500 g 10 dk santrifüj yapıldı.
8. Sürenin sonunda süpernatant tamamen alındı ve RNA pelleti kurumaya bırakıldı.
9. 20 µl nükleaz free su ekleyip RNA çözdürüldü.

### 3.4.4. İzole Edilen RNA Miktarının Ölçülmesi

RNA izolasyonundan sonra 24 ve 48 saat için her bir örnek mikrolate spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) ile RNA saflığı ve miktarı ölçüldü. Ölçüme kadar RNA'lar buz içerisinde bekletildi. Ölçüm için ScanIt Software 4.0 programı kullanıldı ve RNA ölçümü için hazır protokol girildi. µdrop plate'ine (Thermo Scientific™ µDrop™ Plate, #N12391, ABD) blank için 2µl RNA'nın çözdürüldüğü Nuclease Free Water konuldu. Daha sonra RNA'lardan her tüpten 2 µl 2 tekrar olacak şekilde RNA konsantrasyonu için 260 nm dalga boyu, RNA'nın saflığı ve kalitesi içinse 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki ölçümlerin oranı (OD260/OD280) esas alınarak okuma yapıldı.

Konsantrasyon ve saflık tayini yapılan RNA'ların kalitelerine bakmak için ethidium bromide (EtBr) ile hazırlanan %1' lik agaroz jelde 24. Ve 48. Saatler için 25nM Non-Targeting (NT), 25nM VISTA ve 25nM GAPDH yürütüldü. Yürütmeden

sonra jel U.V. görüntüleme cihazında (VILBER Fusion FX, France) görüntülendi. İzole edilen RNA'nın bir kısmı bekletilmeden cDNA sentezinde kullanıldı, bir kısmı ise kullanılana kadar kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

#### **Agaroz Jel Hazırlanması**

Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan agaroz jel ve jelin yürütüleceği tanka 10X TAE (Tris Asetat EDTA)'den distile su ile hazırlanmış 1X TAE tampon çözeltisi hazırlandı. %1'lik agaroz jel için 1 gr agaroz tartılıp, 100 ml 1X TAE içine eklendi. Elde edilen karışım mikrodalga fırında 600 W' da agaroz tamamen eriyene kadar 2-3 dk ısıtıldı. Çeker ocağın içinde karışıma 3 µl Etidium Bromide eklendi ve homojen bir şekilde dağılması için 8-10 saniye karıştırıldı. Karışım jel kasetine döküldükten sonra taraklar takılarak 30 dakika jelin donması beklendi.

#### **Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi**

Jel donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve jel kasetlerle birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. İlk kuyucuğa 5 µl 100 bp marker yüklendi. Sonraki kuyucuklara 2 µl jel yükleme solüsyonu ile karıştırılmış olan 5 µl RNA örnekleri yüklendi. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 150 V 20 dakika yürütme yapıldı. Yürütme tamamlandıktan sonra jel tanktan alındı ve UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

#### **3.4.5. cDNA Sentezi**

RNA'ları cDNA'ya çevirmek için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Thermo, ABD, #K1622) kullanıldı. cDNA sentezine başlamadan önce RNA'ların ölçülen konsantrasyonları kitin protokolüne göre Nuclease Free Water ile 1µg'a eşitlendi.

Kit içerisinden çıkan bileşenlerin tümü buz üzerinde çözdürüldü. **Tablo 3.12.**'deki bileşenlerden tüpler hazırlandı.

**Tablo 3.12.** cDNA Sentezinde Kullanılan RNA, Primer ve Su Bileşenlerinin Miktarları

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
RNA	1 µg
Oligo (dT)18 primer	1 µl
Random Hekzamer primer	1 µl
Nuclease Free Water	Toplam volüm 12 µl' ye tamamlayacak miktarda değişken
<b>Toplam volüm</b>	<b>12 µl</b>

1. Oligo dT primer ve random hekzamer primerden birer µl alınarak tüpe eklendi ve mini spin yapıldı.
2. Tüm RNA örnekleri için ayrı ayrı olacak şekilde her tüpe 2µl primer mix eklendi ve mini spin yapıldı.
3. Tüpler thermal cycler'da (ProFlex PCR, Thermo, ABD, #4484076) 65°C'de 5 dk 1 döngü olacak şekilde inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında tüpler tekrar buz üzerine alındı ve ayrı bir ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

**Tablo 3.13.** cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları.

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl
<b>Toplam volüm</b>	<b>8 µl</b>

**Tablo 3.13'**de verilen bileşenlerden hazırlanan karışım pipetaj yapılarak karıştırıldı. Hazırlanmış olan 12 µl'lik RNA-primer karışımına Tablo 3.3'deki gibi hazırlanan mixten 8 µl dağıtılır. Bu işlem sonunda her bir tüpte 20 µl RNA-enzim karışımı oluşmuştur. Tüpler thermal cycler'a (ProFlex PCR, Thermo, ABD, #4484076) konuldu ve sırasıyla 42°C 60dk, 25°C 5dk, 42°C 60dk ve 70°C 5dk inkübe edildi. İşlem sonunda örnekler cihazdan alındı ve -20°C derecede muhafaza edildi.

### 3.4.6. GAPDH, TLR4, VISTA ve IRAK4 Genlerinin Primerlerinin Hazırlanması ve Dizi Bilgileri

GAPDH, TLR4, VISTA ve IRAK4 genlerine spesifik primerler Primer-Blast programı ile tasarlandı ve “Sentebiolab” firmasından sipariş verildi. Tüm primerlerin stokları 100 µM olarak geldi.

Kullanılan primer sekansları ve PCR ürünlerinin uzunlukları **Tablo 3.14**'de verilmiştir.

**Tablo 3.14.** Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-qPCR' de kullanılan primer listesi.

Gen	Primer Dizisi
IRAK4	F: 5' CGCTTCCTAGTTCGGCTGGTT 3' R: 5' GTTTTGGGAACAGCATCTGCC 3'
VISTA	F: 5' GATAGCGGCCTCTACTGCTG 3' R: 5' TGGATGGTGCATCTTTGCCT 3'
TLR4	F: 5' AGACCTGTCCCTGAACCCTAT 3' R: 5' CGATGGACTTCTAAACCAGCCA 3'
GAPDH	F: 5' GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT 3' R: 5' GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG 3'

### 3.4.7. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)

İnsan pankreas kanseri (PANC-1) hücre hattında siRNA uygulamasından sonra hedef genlerin mRNA düzeyinde etkinliğinin saptanması ve baskılanma oranının tespit edilmesi için Quant Studio3 cihazı (Thermo, ABD) ile kantitatif real time PCR yapıldı.

qRT-PCR çalışması için DNA Green Master (Roche, Version 07, #06402712001) kullanıldı. Tüm genlerin ekspresyonu için 2 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

Hedef genler için hazırlanan mixten 2 tekrarlı olacak şekilde tüm kuyucuklara 8 µl ve üzerine 2 µl cDNA eklenerek dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı (Tablo 3.15).

**Tablo 3.15.** qRT-PCR'da kullanılacak reaktifler ve miktarları

<b>Reaktifler</b>	<b>Miktar</b>
Syber Green	5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Revers Primer	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	2 µl
cDNA	2 µl

**Tablo 3.16'** da verilen süre ve sıcaklıklar ayarlanarak qRT-PCR yapılmıştır.**Tablo 3.16.** qRT-PCR Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri

<b>Reaksiyon</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü</b>
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	
Primer bağlanması	53 °C	30 saniye	40 döngü
Uzama	72 °C	60 saniye	

### 3.4.8. siRNA Susturma Yüzdelerinin Hesaplanması

siRNA uygulamasından sonra hedef genlerin mRNA seviyesinde elde edilen susturma oranlarının hesaplanması için siRNA satın alınan üretici firmanın referans bilgileri ve şablonu baz alınarak qRT-PCR sonuçları hesaplandı (Şekil 3.3). NT-siRNA, GAPDH-siRNA ve VISTA-siRNA uygulaması sonucunda grup içi farklılıklar istatistiksel olarak hesaplandı.

Step 1. Normalize to (REF):	$\Delta C_q = C_q(TAR) - C_q(REF)$	Given Values	Step 1	Step 2	Step 4	Step 5	
Step 2. Exponential expression transform:	$\Delta C_q \text{ Expression} = 2^{-\Delta C_q}$	$C_q(REF)$	$C_q(TAR)$	$C_q(TAR)-(REF)$	$\Delta C_q$ Expression	$\Delta \Delta C_q$	% KD
Step 3. Average replicates and calculate standard deviation		21.9	23.1	1.2	0.43	1.00	-
Step 4. Normalize to treatment control							
Step 5. % KD = $(1 - \Delta \Delta C_q) \times 100$							
	Non-targeting Control	21.9	23.1	1.2	0.43	1.00	-
	TAR <sub>ALDOA</sub>	27.5	34.3	6.7	0.01	0.02	98

**Şekil 3.3.** siRNA susturma yüzdesi hesaplamasında kullanılan şablon

### 3.4.9. Canlılık Analizi

PANC-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda verilen VISTA-siRNA, NT-siRNA ve 25 nM GAPDH-siRNA'larının hücre hattına sitotoksik etki yapmadığını anlamak için MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) testi yapıldı. Bunun için 96 well plate'e her kuyucuk için yaklaşık  $5 \times 10^4$  hücre 100 µl komplet medyum ile ekildi ve 24 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi. Sürenin sonunda eski medyum uzaklaştırıldı. siRNA susturma yüzdesinin bulunabilmesi için 5 tekrar olacak şekilde 5 µM stok VISTA-siRNA ve NT-siRNA'dan 5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM konsantrasyona sahip siRNA ve 25 nM GAPDH-siRNA hücrelere verildi.

Transfeksiyonun 24. saatinde her kuyucuğa 20 µl Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT; AppliChem, Almanya, #5P011404) solüsyonu eklendi ve 3 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi. MTT döküldü ve 200 µl DMSO eklenerek 15 dakika karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında mikrotplate spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) 570 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Farklı konsantrasyonlarda verilmiş olan siRNA'ların doz grupları arası farklılıklar istatistiksel olarak analiz edildi.

### 3.5. Naloxone ve VISTA-siRNA'nın PANC-1 Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin Analizi

#### 3.5.1. Gen Ekspresyonu Düzeyinde Analiz

Naloxone ve VISTA-siRNA'nın pankreas kanseri üzerindeki sinerjik etkisinin araştırılması için T-25 flasklarına 3 test grubu olacak şekilde hücre ekimi yapıldı (Tablo 3.17). Hücreler 24 saat sonra %60-80 konfluent olduğunda daha önceden belirlemiş olduğumuz Naloxone'un IC<sub>50</sub> dozu test grubundaki hücrelere verildi. Naloxone verdikten 48 saat sonra tüm besiyerleri çekildi. Naloxone ve 25 nM siRNA'ların kombinasyon halinde uygulanacağı gruplara seyrelme oranı düşünülerek komplet medyum ile hazırlanmış 1,25x Naloxone verildi.

**Tablo 3.17.** Naloxone ve VISTA-siRNA'nın PANC-1 hücre hattındaki sinerjik etkilerinin araştırılması için hazırlanan test grupları

1. T-25 flaskı	Naloxone + 25 nM VISTA-siRNA
2. T-25 flaskı	25 nM NT-siRNA
3. T-25 flaskı	25 nM GAPDH-siRNA

PANC-1 hücre hattına 25 nM siRNA verildikten 24 saat sonra 3.4.3 ve 3.4.4 başlıklarında yer alan protokole göre RNA izolasyonu, RNA konsantrasyon ve saflık tayini yapıldı.

siRNA ve Naloxone'un kombinasyon halinde uygulamasından sonra VISTA, TLR4, IRAK4 ve GAPDH hedef genlerdeki mRNA seviyesinde etkinliğin tespit edilebilmesi için 3.4.7 başlığında yer alan protokole göre Quant Studio3 cihazı ile tüm genler için 3 tekrar olacak şekilde qRT-PCR yapıldı. siRNA ve Naloxone'un kombinasyon halinde hücrelere verildiğindeki susturma yüzdeleri üretici firmanın referans bilgileri ve şablonu referans alınarak hesaplanmıştır.

### 3.5.2. Canlılık Analizi

siRNA ve Naloxone'un kombinasyon halinde PANC-1 hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkilerine bakmak için MTT analizi yapıldı. 5 mg/ml olan MTT, 1/10 oranında FBS içermeyen besiyeri ile dilue edildi. 96 well plate'e her kuyucukta 3000 hücre olacak şekilde 100 µl hücre ekimi yapıldı ve 24 saat 37°C, %5 CO2 etüvde inkübe edildi.

24 saatin sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve 3 tekrar olacak şekilde hücrelere transfeksiyon reagent, Naloxone + 25 nM VISTA-siRNA, 25 nM NT-siRNA, 25 nM GAPDH-siRNA transfekte edildi. Kontrol olarak transfeksiyon yapılmamış hücreler kullanıldı. siRNA transfeksiyonunun 24. saatinde besiyeri atılarak her kuyucuğa 100 µl MTT ilave edildi. 3,5 saat 37°C, %5 CO2 etüvde inkübe edildi. Sürenin sonunda MTT uzaklaştırıldı ve 100 µl DMSO eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında mikropate spektrofotometre cihazı ile (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) 570 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Naloxone ile VISTA-siRNA ve NT-siRNA uygulaması sonucu 24. saatte gruplar arası farklılık istatistiksel olarak analiz edildi.

### 3.6. İstatistik Analizleri

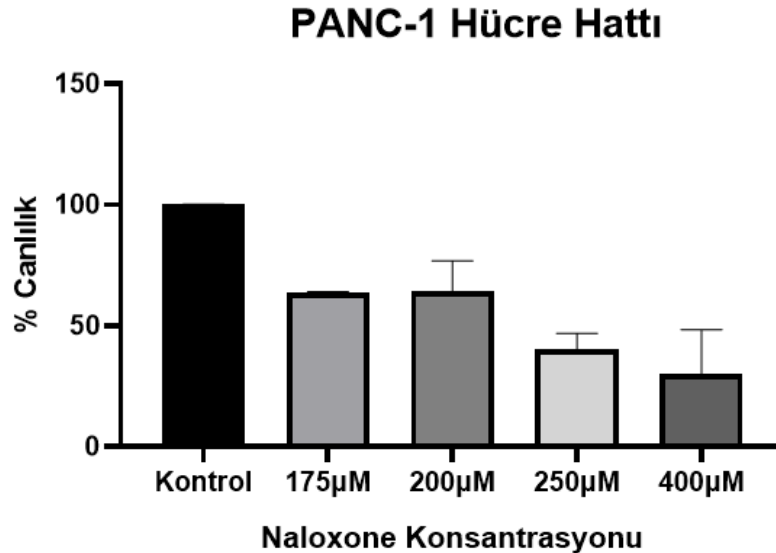
Sonuçlar, gruplar içi farklılık student's t testi (two-tailed distribution) ve gruplar arası farklılık varyans analizi (ANOVA) uygulanarak araştırıldı. Anlamlılık p değeri hesaplanarak incelendi. İstatistik işlemleri GraphPad Prism® V.8.0.1 (GraphPad software) programı ve SPSS kullanılarak gerçekleştirildi.  $p < 0,05$  istatistiksel fark olarak kabul edildi.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

### 4.1. PANC-1 Hücre Hattına Naloxone Uygulamasının Sonuçları

#### 4.1.1. PANC-1 Hücre Canlılığı Üzerinde Naloxone Uygulamasının Etkisi

PANC-1 hücre hattında TLR4 geninin hücre proliferasyonuna etkisini görmek için canlılık analizi olarak MTT testi yapıldı. PANC-1 hücre hattına 72 saatlik 175, 200, 250 ve 400  $\mu\text{M}$  dozlarda Naloxone her grup için 7 tekrar olacak şekilde uygulandı. 7 kuyucuğun 575 nm dalga boyunda ölçülen absorbanslarının ortalamaları alındı. Naloxone uygulanmış hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile Naloxone uygulanmamış kontrol grubu hücrelerinin ortalama absorbans değerleri oranlanarak canlılık yüzdeleri hesaplandı. 72 saat sonunda Naloxone uygulanmamış kontrol hücre grubuna göre, farklı konsantrasyonlarda Naloxone verilmiş hücrelerde canlılığın anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi. ( $p < 0,01$ )



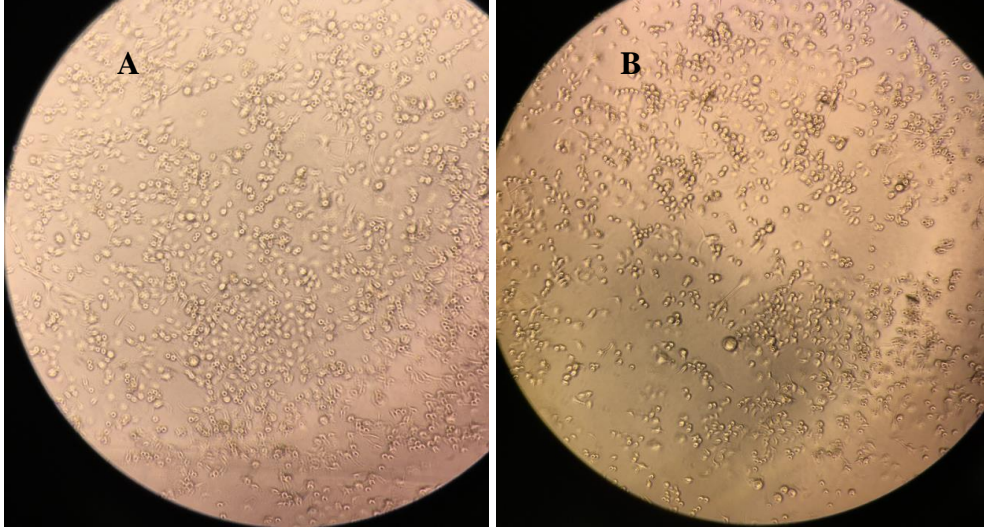
**Şekil 4.1.** PANC-1 hücre hattının Naloxone ile 72 saat inkübasyonundan sonraki konsantrasyona bağlı % canlılık oranı

Naloxone uygulamasından sonra kontrol grubuna göre 72. saat sonunda hücre canlılık yüzdesi 175  $\mu\text{M}$  %64, 200  $\mu\text{M}$  %57, 250  $\mu\text{M}$  %36 ve 400  $\mu\text{M}$  %19'a düşmüştür (Şekil 4.1).

PANC-1 hücre hattında Naloxone'ın 72 saat inkübasyonundan sonra IC50 dozu GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak 217,789  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı.

#### 4.1.2. Naloxone Uygulamasından Sonra PANC-1 Hücrelerinin Morfolojilerinin İncelenmesi

PANC-1 hücre hattına IC50 dozu olarak belirlenen 217,789  $\mu\text{M}$  Naloxone uygulaması yapıldıktan 72 saat sonra hücreler inverted mikroskop altında 10X optik büyütmede görüntülenmiştir. İncelemeler sonucunda uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre Naloxone uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).

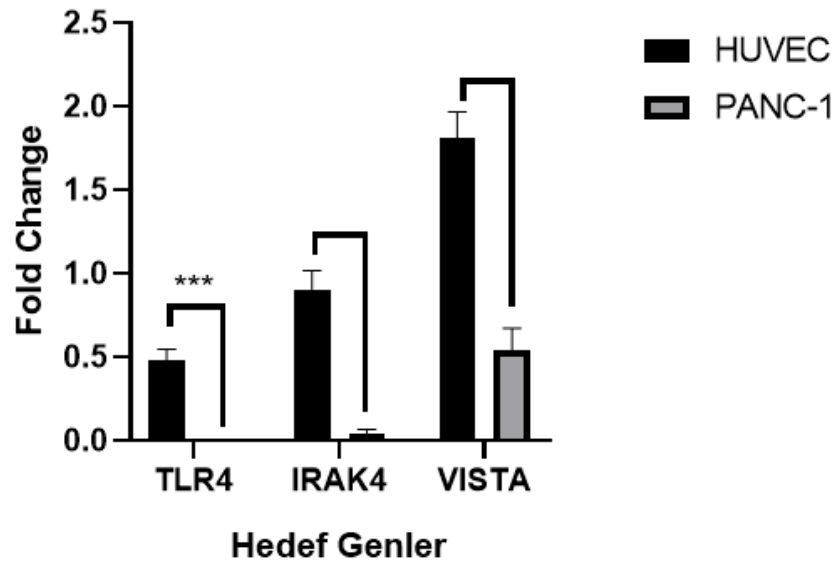


Şekil 4.2. (A) Naloxone uygulanmamış ve (B) 72 saatlik 217,789  $\mu\text{M}$  Naloxone uygulaması yapılmış PANC-1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X büyütme)

#### 4.1.3. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone Uygulamasının TLR4, IRAK4 ve VISTA Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

TLR4 antagonisti Naloxone'un TLR4 ve onun downstream yolağında yer alan IRAK4 ve immun check-point VISTA üzerindeki etkilerine gen ekspresyonları seviyesindeki kıyaslamaya  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  ile bakıldı.

IC50 dozunu 217,789  $\mu\text{M}$  olarak bulduğumuz Naloxone hem pankreas kanseri hücre hattı olan PANC-1'e hem de sağlıklı hücre hattı olan HUVEC'e 72 saat boyunca uygulandı. Çalışmaya göre HUVEC hücre hattına kıyasla PANC-1 hücre hattında TLR4 gen ekspresyonu anlamlı bir şekilde downregülasyon gözlemlenirken, IRAK4 ve VISTA gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarına 72 saat Naloxone uygulaması sonucunda TLR4, IRAK4 ve VISTA gen ekspresyonlarındaki değişim

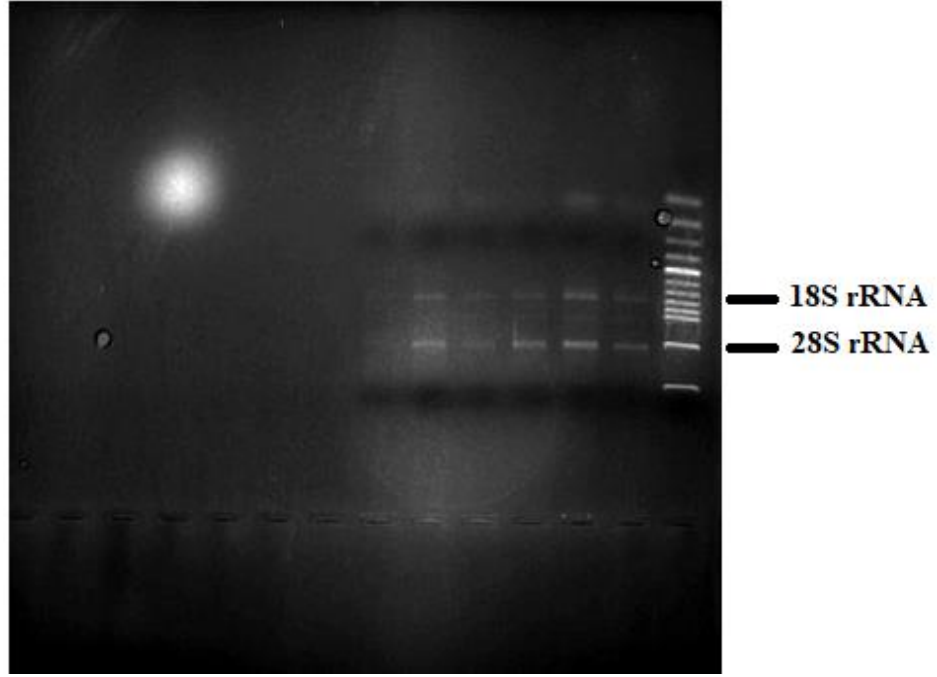
qRT-PCR gen ekspresyonu verileri ve her hücrenin P-değeri **Tablo 4.1**'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.1.** 271  $\mu$ M Naloxone uygulaması sonrasında HUVEC ve PANC-1 hücre hatlarında VISTA, TLR4 ve IRAK4 gen ekspresyonlarındaki  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ve P- değerinin karşılaştırılması

	VISTA		TLR4		IRAK4	
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	P	$2^{-\Delta\Delta CT}$	P	$2^{-\Delta\Delta CT}$	P
HUVEC	1,82	0,65	0,485	0,001	0,91	0,49
PANC-1	0,56	0,02	0,00585	0,001	0,045	0,001

#### 4.2. siRNA Uygulaması Sonrası RNA İzolasyon Bulguları

PANC-1 hücre kültüründen izole edilen RNA'lar her bir örnek için iki tekrar olacak şekilde ThermoScientific Multiskan Sky cihazı (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) ScanIt Software 4.0 programında RNA saflığı ve kalitesi ölçüldü. Miktar ölçümü yapılan RNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek bant profiline bakıldı (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** %1'lik Agaroz jelde RNA görüntüleme  
Sağdan sola doğru Marker, 25nM NT (48h), 25nM VISTA (48h), 25nM GAPDH (48h), 25nM  
NT (24h), 25nM VISTA (24h), 25nM GAPDH (24h)

### 4.3. siRNA Etkinliğini Gösteren qRT-PCR Sonuçları

PANC-1 hücre hattına siRNA uygulamasının gen ekspresyonu seviyesinde etkinliğini saptamak amacıyla Quant Studio3 cihazı (Thermo, ABD) kullanılarak qRT-PCR yapıldı. siRNA transfeksiyonundan sonra VISTA, GAPDH, TLR4 ve IRAK4 genlerinin ekspresyonlarına bakılarak baskılama oranları hesaplandı.

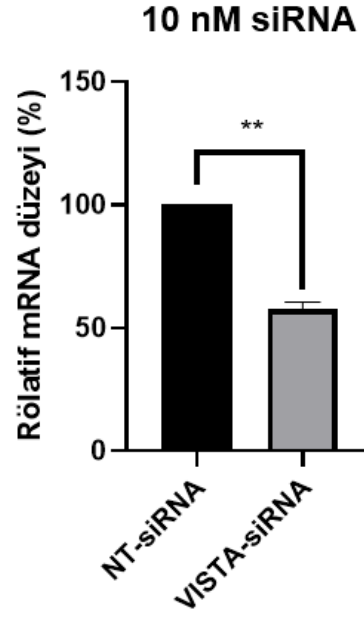
Tüm genlerin ekspresyonu 3 tekrar ve pozitif kontrol olarak GAPDH-siRNA, hedef genler içinse VISTA-siRNA kullanarak gen ekspresyonlarındaki baskılanmalar hesaplandı.

#### 4.3.1. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan VISTA-siRNA Transfeksiyonunun VISTA Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları

PANC-1 hücre hattına 5, 10, 25, 50 nM konsantrasyonlarında verilen VISTA-siRNA ve NT-siRNA'lar için VISTA gen ekspresyon sonuçları GAPDH genine göre normalize edildi. Bu şekilde VISTA gen ekspresyonundaki baskılanma oranları hesaplandı. Maksimum baskılama sağlayan siRNA dozu tespit edilerek ileri çalışmalar için kullanılmıştır.

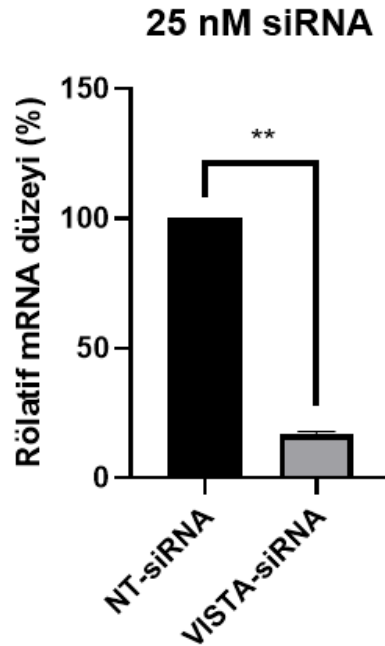
PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 5 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda VISTA gen ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlenmedi.

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda VISTA gen ekspresyonunda kontrole göre %44 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.5). ( $p<0,01$ )



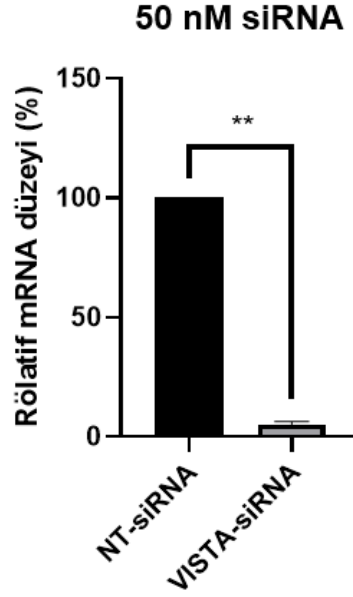
**Şekil 4.5.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulamasının qRT-PCR ile gösterimi

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda VISTA gen ekspresyonunda kontrole göre %83 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.6). ( $p<0,01$ )



**Şekil 4.6.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulamasının qRT-PCR ile gösterimi

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda VISTA gen ekspresyonunda kontrole göre %95 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.7). ( $p<0,01$ )

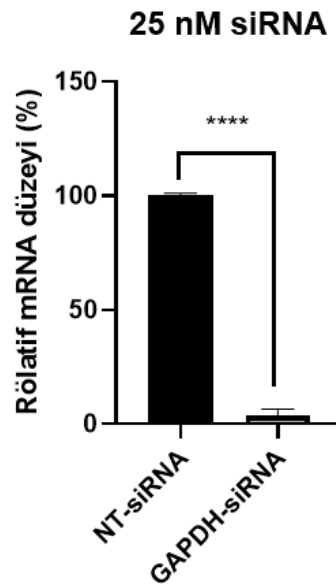


**Şekil 4.7.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulamasının qRT-PCR ile gösterimi

#### 4.3.2. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan 25nM GAPDH-siRNA

##### Transfeksiyonunun GAPDH Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM GAPDH-siRNA uygulanması sonucunda GAPDH gen ekspresyonunda kontrole göre %96 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.8). ( $p<0,0001$ )

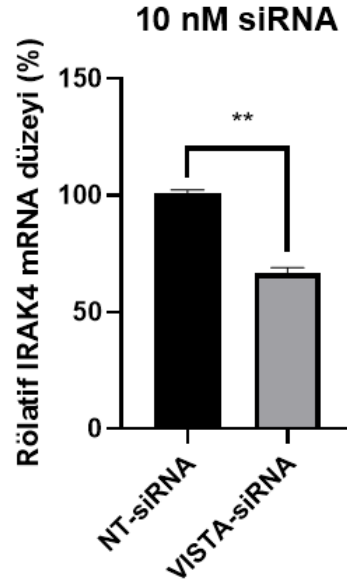


**Şekil 4.8.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM GAPDH-siRNA uygulaması sonrasında GAPDH gen ekspresyonundaki baskılanmanın qRT-PCR ile gösterimi

### 4.3.3. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan VISTA-siRNA Transfeksiyonunun IRAK4 Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları

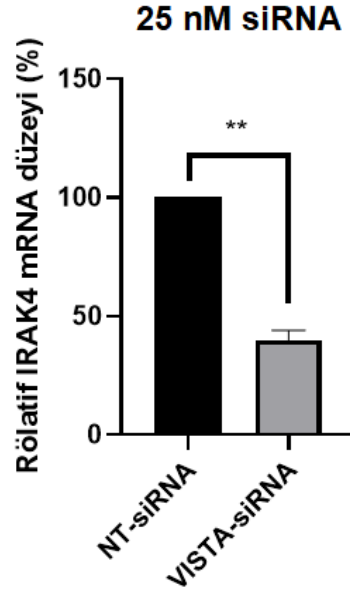
PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 5 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda IRAK4 gen ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlemlenmemiştir.

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda IRAK4 gen ekspresyonunda kontrole göre %33 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.9). ( $p<0,01$ )



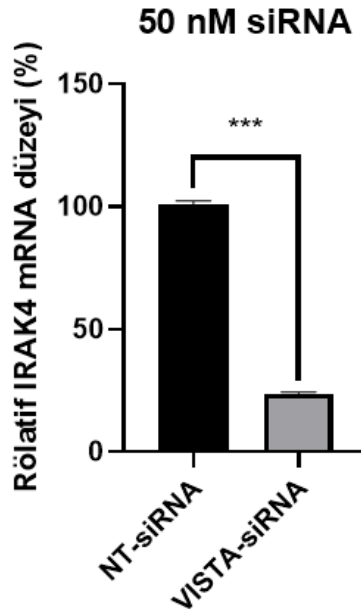
**Şekil 4.9.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda IRAK4 gen ekspresyonunda kontrole göre %60 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.10). ( $p<0,01$ )



**Şekil 4.10.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda IRAK4 gen ekspresyonunda kontrole göre %76 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.11). ( $p < 0,001$ )

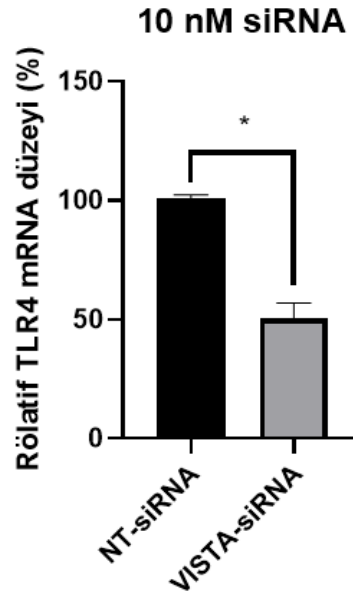


**Şekil 4.11.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

#### 4.3.4. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan VISTA-siRNA Transfeksiyonunun TLR4 Gen Ekspresyonunda Baskılanma Oranları

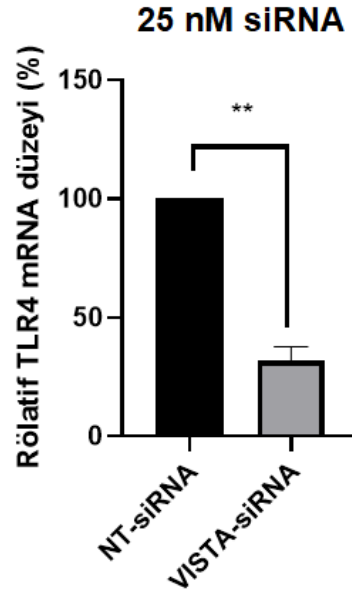
PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 5 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda TLR4 gen ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir baskılanma gözlemlenmemiştir.

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda TLR4 gen ekspresyonunda kontrole göre %50 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.12). ( $p < 0,05$ )



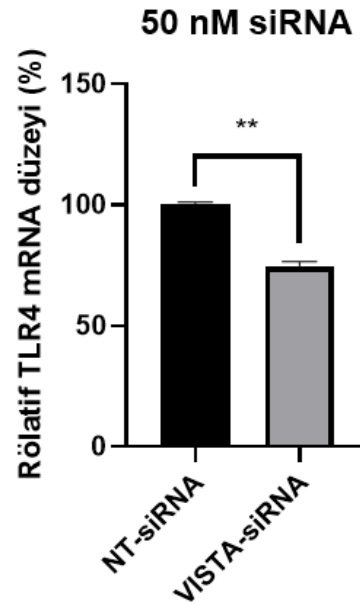
**Şekil 4.12.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 10 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda TLR4 gen ekspresyonunda kontrole göre %70 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.13). ( $p < 0,01$ )



**Şekil 4.13.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulanması sonucunda TLR4 gen ekspresyonunda kontrole göre %75 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.14). ( $p < 0,01$ )



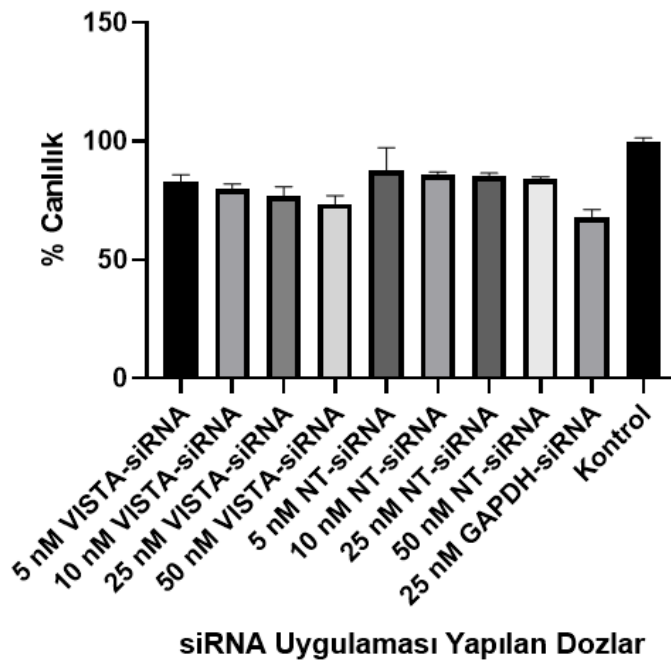
**Şekil 4.14.** PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 50 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

#### 4.4. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan siRNA Transfeksiyonunun Hücre Canlılığına Etkisi

VISTA geninin pankreas kanseri hücre hattı üzerine proliferasyona olan etkisinin gözlemlenmesi ve hücreler üzerindeki etken dozun tespit edilebilmesi için canlılık analizi testi olarak MTT metodu kullanıldı. Analizlerde VISTA-siRNA'ların

farklı dozları her grup için 5 tekrarlı olarak çalışıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra spektrofotometre ile 570 nm’de absorbans değerleri ölçüldü ve ortalama değerleri alındı. siRNA transfeksiyonu yapılmış hücrelerin ortalama absorbans değerleri, transfeksiyon yapılmamış kontrol hücre grubunun ortalama absorbans değerine oranlanarak hücrelerin siRNA dozlarına göre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak farklı konsantrasyonlarda VISTA-siRNA transfeksiyonu yapılmış hücrelerin NT-siRNA transfeksiyonu yapılmış ve transfeksiyon yapılmamış kontrol grubuna göre canlılığında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. ( $p<0,0001$ )

5 nM VISTA-siRNA uygulanan hücrelerde canlılık %85’e, 10 nM VISTA-siRNA uygulanan hücrelerde canlılık %81’e, 25 nM VISTA-siRNA uygulanan hücrelerde canlılık %79’a ve 50 nM VISTA-siRNA uygulanan hücrelerde canlılık %76’ya düşmüştür. 25 GAPDH-siRNA uygulanan hücrelerde canlılık ise %70’e düşmüştür (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. PANC-1 hücrelerine farklı dozlarda uygulanan VISTA-siRNA ve NT-siRNA’ların kontrole göre hücre canlılığına etkisi

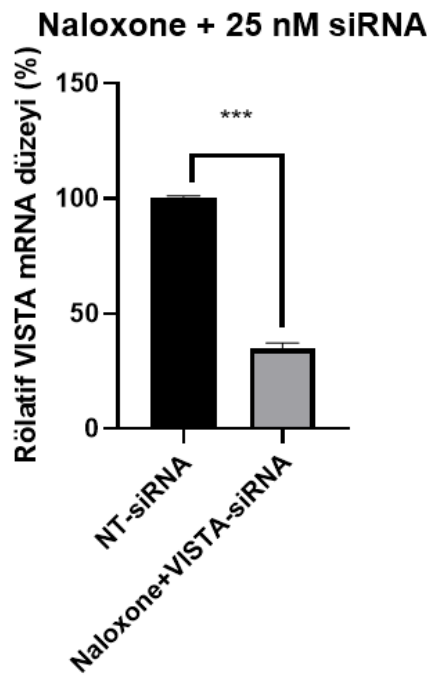
#### 4.5. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve siRNA’nın Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Hedef Genler Üzerindeki Sinerjik Etkisi

Hücre hattına 72 saatlik Naloxone ile birlikte 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA, 25 nM GAPDH-siRNA ve 25 nM NT-siRNA uygulaması yapılmıştır. TLR4 antagonisti olan Naloxone’un siRNA’lar ile kombinasyon halinde uygulanmasının VISTA, TLR4

ve IRAK4 gen ekspresyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmuştur.

#### 4.5.1. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve siRNA Uygulamasının VISTA Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

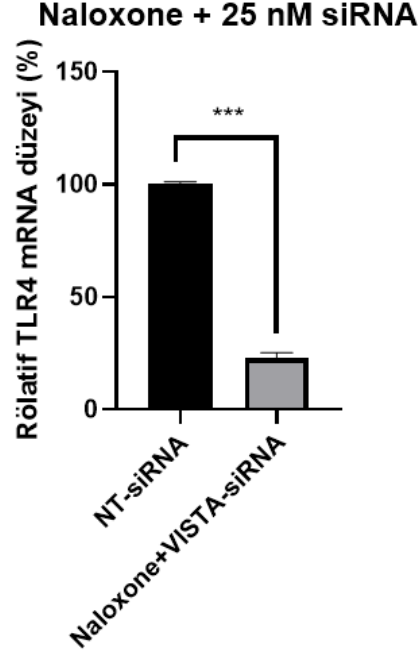
PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA ve 72 saatlik Naloxone'un kombinasyon halinde uygulanması sonucunda VISTA gen ekspresyonunda kontrole göre %67 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.16). ( $p < 0,001$ )



Şekil 4.16. PANC-1 hücre hattına Naloxone + 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında VISTA gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

#### 4.5.2. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve VISTA-siRNA Uygulamasının TLR4 Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

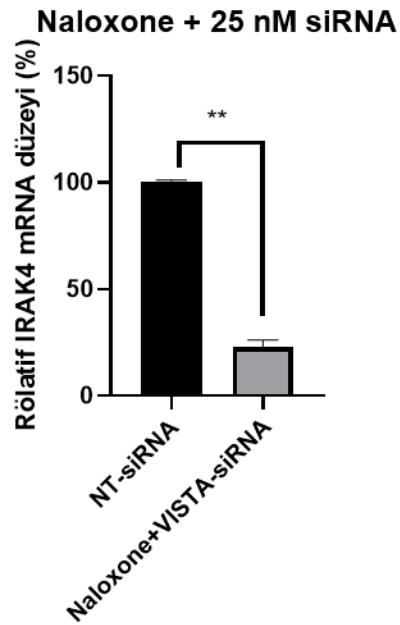
PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA ve 72 saatlik Naloxone'un kombinasyon halinde uygulanması sonucunda TLR4 gen ekspresyonunda kontrole göre %75 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.17). ( $p < 0,001$ )



Şekil 4.17. PANC-1 hücre hattına Naloxone + 25 nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında TLR4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

#### 4.5.3. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve VISTA-siRNA Uygulamasının IRAK4 Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

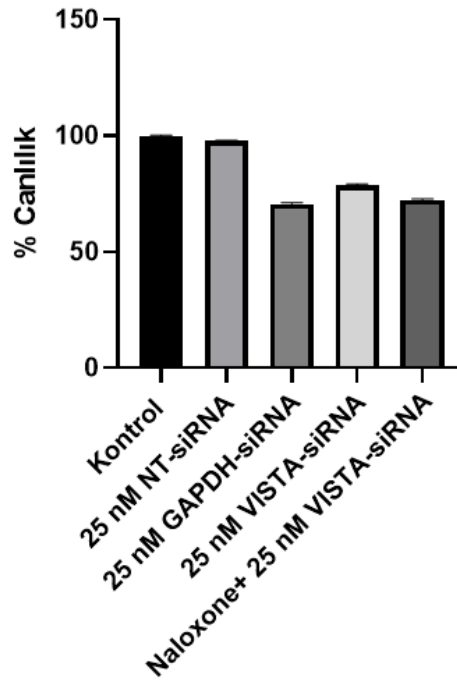
PANC-1 hücre hattına 24 saatlik 25 nM VISTA-siRNA ve 72 saatlik Naloxone'un beraber uygulanması sonucunda IRAK4 gen ekspresyonunda kontrole göre %79 oranında anlamlı bir baskılanma (knockdown) gözlemlendi (Şekil 4.18). ( $p < 0,01$ )



Şekil 4.18. PANC-1 hücre hattına Naloxone + 25nM VISTA-siRNA uygulaması sonrasında IRAK4 gen ekspresyonunun qRT-PCR sonucu

#### 4.6. PANC-1 Hücre Hattında Naloxone ve siRNA'nın Kombinasyon Halinde Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

VISTA geninin TLR4 geni ile PANC-1 hücre hattı üzerinde sinerjik etki oluşturarak hücre proliferasyonundaki etkisinin gözlemlenmesi için canlılık analizi için MTT metodu kullanıldı. Analizlerde her grup 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 3 kuyucuğun 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerinin ortalamaları alındı. siRNA ve Naloxone'un PANC-1 hücrelerine beraber verildiğindeki canlılığına bakılmıştır. Naloxone ve siRNA muamelesi yapılan hücrelerin ortalama absorbans değerleri, transfeksiyon yapılmamış kontrol hücrelerine oranlanarak canlılık yüzdeleri hesaplandı. Sonuç olarak, VISTA-siRNA uygulanan hücrelerde, kontrol hücreleri ve NT-siRNA uygulanan hücrelerin canlılığının 24 saat sonunda anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.19). ( $p < 0,001$ )

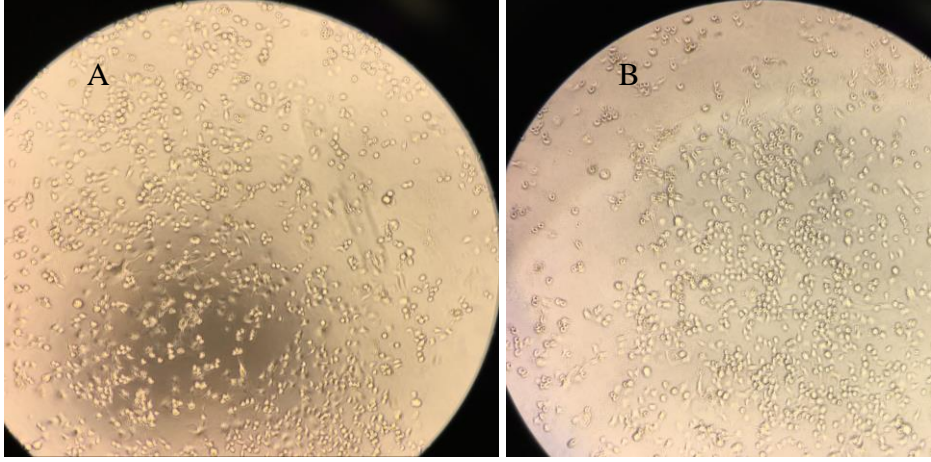


**Şekil 4.19.** PANC-1 hücre hattına Naloxone ile 25 nM VISTA-siRNA'nın kombinasyon halinde ve 25 nM NT-siRNA, 25 nM GAPDH-siRNA ve 25 nM VISTA-siRNA uygulamasının hücre canlılığına olan etkisinin MTT analizi grafiği

72 saatlik Naloxone ve 24 saatlik VISTA-siRNA muamelesi uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre hücre canlılık yüzdesi %77'ye, 24 saatlik VISTA-siRNA muamelesi uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre hücre canlılık yüzdesi %79'a, 24 saatlik NT-siRNA muamelesi uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre hücre canlılık yüzdesi %98'e, 24 saatlik GAPDH-siRNA muamelesi uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre hücre canlılık yüzdesi %71'ye düşmüştür.

#### 4.7. Naloxone ve siRNA Uygulaması Yapılan PANC-1 Hücrelerinin Morfolojilerinin İncelenmesi

PANC-1 hücre hattına IC50 dozu olarak belirlenen 217,789  $\mu$ M Naloxone uygulaması yapıldıktan 48 saat sonra VISTA-siRNA Naloxone ile kombinasyon halinde hücrelere uygulanmıştır. Hücreler inverted mikroskop altında 10X optik büyütmede görüntülenmiştir. Uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre Naloxone ve siRNA kombinasyonu uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir. (Şekil 4.20)



Şekil 4.20. (A) Naloxone + VISTA-siRNA ve (B) uygulama yapılmamış kontrol grubu PANC-1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (10X büyütme)

## 5. TARTIŞMA

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK), en ölümcül solid malignitelerden biridir ve Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin yedinci sırasında yer almaktadır. Cerrahi tekniklerde ve ameliyat sonrası sonuçlarda önemli iyileşmeye rağmen genel nüks oranı yaklaşık % 85 ve 5 yıllık sağkalımın % 30'dan az olduğu bilinmektedir (Rawla ve ark., 2019 ; Casolino ve ark., 2021). Pankreas kanseri karmaşık tümör mikroçevresi, genetik ve epigenetik değişikliklerden dolayı kemoterapi, radyoterapi ve hedefli terapilere karşı direnç geliştirmektedir (Sunami & Kleeff, 2019). Bu nedenlerden dolayı daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç vardır.

İmmunoterapik yaklaşımlar ilerlemiş malignitelerin tedavisi için ortaya çıkmıştır. İmmun check-point inhibitörleri, kanser tedavisinde tümörün büyümesini engellerken aynı zamanda kemoterapinin etkinliğini arttırdığı için oldukça umut vericidir (Sunami & Kleeff, 2019). Son zamanlarda pankreas kanseri tümör hücreleri üzerinde yer alan spesifik reseptörleri hedefleyen ilaçların geliştirilmesi ve bunların kemoterapötik ajanlarla kombine halde kullanılması veya siRNA molekülleri tarafından aşırı eksprese edilen genlerin inhibisyonlarına odaklanılmıştır (Aslan, Shahbazi, Ulubayram, & Ozpolat, 2018).

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir bileşeni olan TLR4, bağışıklık hücrelerinde ve epitel hücrelerde yüksek seviyede eksprese olmaktadır. İnsanda TLR'ler pankreas kanseri dokusunda ve birçok kanser hücre hattında eksprese olmasına rağmen normal pankreas hücrelerinde çok az veya hiç eksprese olmamaktadır (Vaz & Andersson, 2014 ; Lanki ve ark., 2018). TLR4 tümör hücreleri, immün hücreler ve tümör mikro çevresi ile iletişim kurarak tümör ilerlemesine neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada kemoterapiye direncin ve tümör oluşumunun inhibisyonu için TLR4 önemli bir rol oynamaktadır (C. Chen ve ark., 2018).

Prostat hücrelerinde upregüle olan TLR4'ün, genetik olarak yatkın bireylerde karsinogenezi teşvik edebilen ve enflamatuar sürece katkı sağlayan doğal immün hücreler ile sinerji oluşturabileceği düşünülmektedir (Gatti ve ark., 2009).

*Helicobacter Pylori* birçok kanser için risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu enfeksiyonun pankreas kanserinin gelişme riskini önemli ölçüde arttırabileceğini destekleyen çalışmalar mevcuttur (Guo, Liu, & Wu, 2016).

TLR'ler mikrobiyal bileşenlerin tanınmasıyla ilk konak savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda mide mukozasında en çok rastlanan enfeksiyonlardan olan *Helicobacter Pylori*'nin mide karsinomunda TLR ile etkileşime

girdiği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu görülmüştür (Schmaußer, Andrulis, Endrich, Müller-Hermelink, & Eck, 2005).

Ikebe ve arkadaşları 2009 yılında siRNA ile TLR4 ve Myd88'i hedefleyerek LPS'nin pankreas kanseri hücresindeki invaziv yeteneği üzerindeki etkisine bakmışlardır. Çalışma sonucunda LPS'nin pankreas kanseri hücrelerinin invaziv yeteneğini arttırdığı ve NF-κB yolağının blokajının LPS'ye bağlı artan invazif yeteneğini azalttığı gösterilmiştir (Ikebe ve ark., 2009).

Hsiao ve arkadaşlarının hepatoselüler karsinom (HepG2) hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada IL-6'nın LPS ile indüklenen TLR4'ü upregüle ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca TLR4 aktivasyonunun HepG2 hücrelerinde proliferasyonu, nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonunu ve NO üretimini arttırdığı da tespit edilmiştir. Bunun yanısıra TLR4 ekspresyonunun çok yüksek olduğu HepG2 hücrelerine uygulanmış olan antitümör ilaçlarına karşı yüksek kemo direnç geliştirildiği görülmüştür (Hsiao ve ark., 2015).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) bir immun check-point olan PD-L1 ile TLR4 arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan çalışmada akciğer kanseri dokularında TLR4 ile PD-L1 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon gözlemlenmiştir. Bu iki proteinin artan ekspresyonunun ERK ve PI3K/AKT sinyal yollarını da aktive ederek kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Buradan yola çıkarak ERK ve PI3K inhibitörü kullanarak yapılan çalışmanın sonunda LPS ile indüklenen PD-L1'in up regülasyonunun TLR4/ERK yolağına bağlı olduğunu ancak TLR4 / PI3K / AKT sinyal yolağına bağlı olmadığını tespit etmişlerdir (Kang ve ark., 2020).

TLR4 ile ilişkili yolakların bloke edilmesiyle ümit verici sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen terapötik ajan olarak kabul edilebilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Çünkü hem stromal hücrelerde hem de tümör hücrelerinde TLR4 eksprese edilmektedir. Bundan dolayı tümör mikro çevresinde bulunan TLR4 ligandları farklı hücre popülasyonları arasında karmaşık etkileşime neden olabilmektedir.

İmmun check-pointlerden olan ve hem ligand hem reseptör olarak görev alabilen VISTA'nın T hücre proliferasyonunu ve sitokin salınımını baskıladığı bilinmektedir. Prostat kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ve kolorektal karsinom gibi birçok insan kanserinde bağışıklıktan kaçınma ve hayatta kalma için T hücresi ile ilişkili yanıtı baskılayan VISTA, pankreas kanserinde de CD68+

makrofajlarında yüksek seviyede eksprese olmaktadır (Blando ve ark., 2019 ; Huang ve ark., 2020).

Preklinik çalışmalar VISTA blokajının T hücre efektör fonksiyonlarını serbest bıraktığını ve kolon kanseri modellerinde anti-PD-L1 gibi diğer immün kontrol noktası inhibitörleri ile sinerji oluşturarak tümör büyümesini baskıladığını göstermiştir (Zong ve ark., 2020).

Yumurtalık ve endometriyal kanseri olan hastalara PD-1 blokajı gibi immün check-point inhibitörleri ile tedavi yapılmıştır ancak sonuçlar tatmin edici olmamıştır (başarı oranı yaklaşık %13) (Mulati ve ark., 2019). Bundan dolayı anti-PD-1 tedavisine dirençli hastaları başarılı bir şekilde tedavi etmek için kombine terapiler gibi yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ön görülmektedir.

Bu çalışmaların devamında insan yumurtalık ve endometrial kanser hücrelerinde de yüksek seviyede eksprese olan VISTA molekülüne karşılık anti-VISTA antikor tedavisi yapılmıştır. Tedavinin yüksek seviyede VISTA ekspresyonu taşıyan farelerin hayatta kalmasını önemli ölçüde uzattığı görülmüştür (Mulati ve ark., 2019)

Deng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre VISTA'nın kolon kanserindeki yüksek seviyede ekspresyonu, kötü prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca VISTA, HIF-1 $\alpha$  sinyal yolağı aracılığıyla hipoksik bölgelerde upregüle olmaktadır. VISTA'nın hedeflenmesinin hipoksinin antitümör bağışıklık üzerindeki zararlı etkilerini azaltabileceği düşünülmektedir (Deng ve ark., 2020).

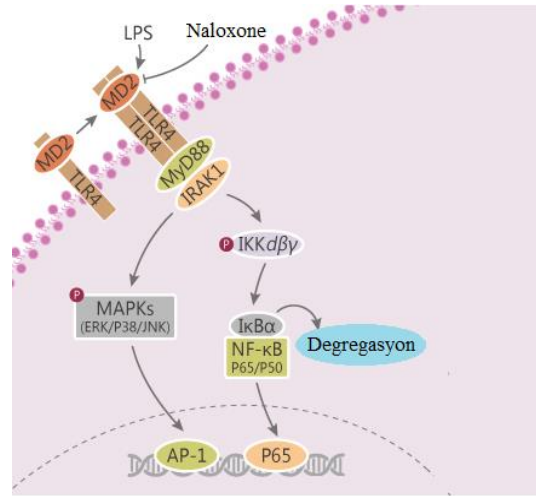
İmmün check-point VISTA ile ilgili yapılmış bu çalışmalara dayanarak siRNA-VISTA'nın bloke edilmesinin pankreas kanseri gelişimini ve invazyonunu baskılayacağını düşünmekteyiz.

Genecards.org sitesinden VISTA ve TLR4 sinyal yollarının ilişkili olabilecekleri potansiyel sinyal yollarına bakılmıştır. Bunun sonucunda her iki proteinin de NF- $\kappa$ B sinyal yolağı ile bağlantılı olduğu görülmüştür.

Ancak pankreas kanserinde VISTA'nın ekspresyonu ve klinik önemi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır ve VISTA ile TLR4 ekspresyonu arasında potansiyel bağlantılar henüz keşfedilmemiştir. Pankreas kanserinde VISTA ve TLR4'ün downstream sinyal yollarındaki bağlantıların hedeflenmesi, immün check-point inhibitörleri ve onkogenik yolak inhibitörleri üzerine yapılacak klinik çalışmalar için fayda sağlayacaktır.

TLR4'ün keşfedilmesinden çok önce Naloxone'un gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan LPS'nin biyolojik aktivitelerini bloke ettiği

bulunmuştur. Son zamanlarda ise Naloxone'un MD2 proteinin LPS bağlanma bölgesine bağlanarak TLR4 antagonistliği yaptığı bilinmektedir (Wang ve ark., 2016) (Şekil 5.1).



**Şekil 5.1.** Naloxone'nun etki mekanizması (<https://www.immune-system-research.com/sepsis/148h37-a-specific-myeloid-differentiation-protein-2-md2-inhibitor/2020-08-11/>  
Erişim tarihi: 08.05.2021)

1987 yılında yumurtalık kanserinde yapılan bir çalışmada, tümörün gelişimini engellemek için Naloxone kimyasal farklı dozlarda hücrelere verilmiştir ve bunun sonucunda tümör hacminde bir azalma gözlemlenmiştir (Kikuchi ve ark., 1987).

Wang ve arkadaşları BV-2 fare mikroglial hücre hattında yaptığı bir çalışmada Naloxone ilacının LPS ile indüklenen TLR downstream sinyallemesini inhibe ettiğini, NO ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerinin de güçlü bir inhibitörü olduğunu göstermişlerdir. TLR4 sinyal yolağında TRIF ile aktive olan IRF3 transkripsiyon faktörü IFN- $\beta$  transkripsiyonu indüklemektedir. Bu çalışmada ayrıca Naloxone konsantrasyona bağlı olarak LPS kaynaklı IRF3 fosforilasyonu ve IFN- $\beta$  üretimi inhibe edilmiştir (X. Wang ve ark., 2016).

MCF-7 hücrelerindeki proliferasyonun baskılanması ve büyümenin inhibisyonu için yapılan bir çalışmada ise Naloxone ve morfin beraber verilmiştir. İlaç verilen hücrelerdeki apoptotik oran kontrol grubuna göre daha yüksek ve özellikle G1'den S fazına geçişte hücre döngüsünün ilerlemesini önleyerek, proliferasyonu da engellediği tespit edilmiştir (Y. Chen ve ark., 2017).

Literatürlerden yola çıkarak çalışmamız için ilk aşamada pankreas kanserinin gelişmesinde ve invazyonunda büyük öneme sahip olan TLR4 sinyal yolağını, TLR4 antagonisti olarak bilinen Naloxone ile susturularak bunun immun check-pointlerden olan ve pankreas kanserinde yüksek seviyede eksprese olan VISTA'nın down regülasyonuna sebep olabileceği düşünülmüştür.

İlk olarak farklı konsantrasyonlarda Naloxone verilen PANC-1 hücre hattında MTT analizi ile hücre canlılığına bakılmıştır. 24, 48 ve 72 saat boyunca 175, 200, 250 ve 400  $\mu\text{M}$  dozlarda Naloxone ile hücreler inkübe edilmiştir ve ilacın 72. saatte etki ettiğine karar verilmiştir. Naloxone'un hücreler üzerindeki canlılığına etkisi için IC50 dozu kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 217,789  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. Bulunan IC50 dozu TLR4, IRAK4 ve VISTA gen ekspresyonlarındaki baskılanmanın tespiti için qRT-PCR ile yapılacak analizde kullanılmıştır.

TLR4 antagonisti olarak bilinen Naloxone ilacı, sağlıklı hücre hattı olan HUVEC ve insan pankreas kanseri hücre hattı PANC-1'e 271,789  $\mu\text{M}$  olarak uygulandıktan sonra qRT-PCR yapıldı. İki hücre hattındaki TLR4, IRAK4 ve VISTA gen ekspresyonlarındaki kıyaslamaya  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak) metodu ile bakıldı. Bunun sonucunda TLR4 gen ekspresyonunda anlamlı bir downregülasyon gözlemlenirken, IRAK4 ve VISTA gen ekspresyonlarında anlamlı sonuç alınamamıştır.

İkinci aşamada ise PANC-1 hücre hattında yüksek seviyede eksprese olan VISTA'yı RNA interferans yöntemi olan siRNA ile susturmanın TLR4 ve onun down stream yolağındaki moleküllerden biri olan IRAK4'ün gen ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmeye çalışılmıştır.

Gen ekspresyonunu maksimum seviyede susturabilmek için siRNA transfeksiyon etkinliğinin optimum koşullarda gerçekleşmesi gerekmektedir. Kullanılan transfeksiyon ajanı ve maruz kalma süresi, kullanılan hücrelerin pasaj durumu ve hücrelerin sağlığı, deney esnasında bulunan şartlar, siRNA'ların uygun bir ortamda saklanması, en düşük ve en etkili siRNA konsantrasyonu bu koşullar arasında yer almaktadır.

VISTA genine spesifik olarak tasarlanmış VISTA-siRNA ve NT-siRNA 4 farklı konsantrasyonda hücrelere lipofeksiyon yöntemi ile transfekte edilmiştir. siRNA'nın VISTA üzerindeki etkisine qRT-PCR ile bakılmıştır. NT-siRNA ile kıyaslandığında ideal susturma oranı 24 saatlik siRNA maruziyeti için 10 nM siRNA'da %44, 25 nM siRNA'da %83, 50 nM'da ise %95 olarak bulunmuştur.

Yapılan optimizasyonlar ve sonraki çalışmalarda kombinasyon uygulaması yapılacağından dolayı qRT-PCR sonuçlarına göre PANC-1 insan pankreas kanseri hücrelerinde 24 saatlik 24 nM VISTA-siRNA uygulamasının en ideal baskılamayı sağladığı görülmüştür. Hücre hattındaki susturma yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve sonuç olarak siRNA'lar başarılı bir şekilde transfekte olarak susturma gerçekleşmiştir.

VISTA-siRNA uygulanan hücrelerdeki TLR4 ve IRAK4 gen ekspresyonlarındaki baskılanmayı görebilmek için qRT-PCR yapılmıştır. 25 nM dozda 24 saatlik siRNA uygulamasından sonra IRAK4 gen ekspresyon seviyesi kontrol ile kıyaslanarak %57 oranında baskılanmıştır. 24 saatlik 25 nM dozda VISTA-siRNA uygulamasından sonra TLR4 gen ekspresyonu ise %72 oranında baskılanmıştır.

Hücreler ile fonksiyonel analizler yapmak için siRNA aracılığıyla mRNA seviyesinde gereken baskılama oranı >%30 kabul edilmektedir (Çavdartepe, 2018). Çalışmamızda çok düşük konsantrasyon ile etkili gen ekspresyonu susturulması gözlemlenmiştir.

VISTA regülasyonunda TLR4'ün sinerjik etki yapabileceği düşünüldüğünden VISTA-siRNA ve Naloxone PANC-1 hücrelerine beraber verilmiştir. Hücrelere ilk 48 saat IC50 dozunu bulduğumuz Naloxone'dan 217,789 µM uygulandı. 48 saatin sonunda tüm besiyerleri çekildi. İkinci aşamada Naloxone ile 25 nM VISTA-siRNA aynı dozda verilmiş olan NT-siRNA uygulanan hücrelere göre qRT-PCR ile VISTA, IRAK4 ve TLR4 gen ekspresyonları karşılaştırılmıştır.

Yapılan çalışmanın sonucunda kontrol grubuna göre kıyaslandığında VISTA, TLR4 ve IRAK4 gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla %67, %75 ve %79 oranlarında anlamlı bir baskılanma (knockdown) tespit edilmiştir. Bu bulgular üzerine VISTA gen ekspresyonunda Naloxone ve VISTA-siRNA kombine halinde verilmesine kıyasla yalnız 25 nM VISTA-siRNA uygulandığında daha fazla bir baskılanma gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin VISTA gen ekspresyonu üzerinde Naloxone ile VISTA-siRNA'nın birbirini negatif olarak etkileyerek etkinliklerini düşürmüş olabileceğini varsaymaktayız. Ancak TLR4 inhibisyonunda kullanılan ajanlar ile VISTA-siRNA'nın PANC-1 hücrelerine kombinasyon halinde uygulanmasının yalnızca VISTA-siRNA uygulamasına kıyasla TLR4 ve onun downstream yolağında yer alan IRAK4 gen ekspresyonlarını anlamlı şekilde downregüle ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında pankreas kanseri ilerlemesinden sorumlu VISTA, TLR4 ve onun downstream yolağında bulunan IRAK4 molekülü arasındaki ilişki gen ekspresyonu düzeyinde tespit edilmiştir.

Çalışma sonuçlarına göre immün check-point VISTA ve TLR4 arasındaki ilişkinin varlığı, VISTA tarafından düzenlenen sinyal yollarının ve ligandlarının daha iyi anlaşılması için bu moleküllerin terapötik bir hedef olarak kabul edilip anti tümör çalışmalarının gelişmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda pankreas kanseri hücrelerinde kültür, ilaç uygulaması ve etken dozun tespit edilmesi, siRNA transfeksiyonları, RNA izolasyonu ve qRT-PCR analizleri başarılı bir şekilde yapılmıştır.

TLR4 antagonisti olarak bilinen Naloxone ilacı, PANC-1 hücrelerinde TLR4 gen ekspresyonunu anlamlı bir şekilde downregüle etmiştir. Ancak TLR4 downstream yolağında yer alan IRAK4 ve negatif immun check point üzerinde anlamlı bir sonuç gözlemlenmemiştir. PANC-1 hücrelerine ilaç muamelesi sonrasında TLR4 gen ekspresyonundaki downregülasyonun, pankreas kanseri hücrelerindeki proliferasyonu da baskıladığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında RNA interferans yöntemi ile VISTA gen ekspresyonundaki baskılanmanın TLR4 sinyal yolağı ile bağlantısına bakılmıştır. Bunun için VISTA-siRNA ile VISTA gen ekspresyonunun susturulması hedeflenmiştir. Çalışmanın sonucunda VISTA gen ekspresyonunun baskılanmasını TLR4 ve IRAK4 gen ekspresyonlarının da anlamlı şekilde baskılanmasına ve hedef genlerin baskılanmasının hücre proliferasyonundaki düşüşe sebep olduğu gözlemlenmiştir.

Son aşamada ise PANC-1 hücrelerine Naloxone ve VISTA-siRNA kombinasyon halinde verilmiştir. Bunun sonucunda tek uygulamaya göre birlikte uygulandıklarında sinerjik bir etki ile TLR4 ve IRAK4 hedef gen ekspresyonlarında daha yüksek bir baskılanma tespit edilmiştir. Sonuç olarak PANC-1 hücre hattında TLR4 sinyal yolağı ile VISTA gen ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, ileri analizler ile geliştirilmelidir. Verilerimize göre pankreas kanseri ilerlemesinde TLR4 sinyal yolağının VISTA immun ckeck-pointine aracılık ettiği düşünüldüğünden ilerki çalışmalarda gerekli inhibitörler kullanılarak diğer sinyal yolları ile potansiyel bağlantıların tespit edilmesi gerekmektedir.

VISTA ve TLR4 sinyal yolağı arasında bulunan ilişkinin ve bağlantılı olduğu sinyal yollarının tespit edilmesi durumunda kanser tedavisinde immun check-point inhibitörlerinin cevap belirlemede önemli bir belirteç olabileceğini düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

- Abramo, J. M., Reynolds, A., Crisp, G. T., Weurlander, M., Söderberg, M., Scheja, M., ... Rugg, G. (2012). Individuality in music performance. *Assessment & Evaluation in Higher Education*, 37(October), 435. <https://doi.org/10.1007/82>
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Andersen, D. K., Korc, M., Petersen, G. M., Eibl, G., Li, D., Rickels, M. R., ... Abbruzzese, J. L. (2017). Diabetes, pancreatogenic diabetes, and pancreatic cancer. *Diabetes*, 66(5), 1103–1110. <https://doi.org/10.2337/db16-1477>
- Aslan, M., Shahbazi, R., Ulubayram, K., & Ozpolat, B. (2018). Targeted Therapies for Pancreatic Cancer and Hurdles Ahead. *Anticancer Research*, 38(12), 6591–6606. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13026>
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(23), 5591–5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>
- Banerjee, K., Kumar, S., Ross, K. A., Gautam, S., Poelaert, B., Nasser, M. W., ... Jain, M. (2018). Emerging trends in the immunotherapy of pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 417, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.012>
- Barone, E., Corrado, A., Gemignani, F., & Landi, S. (2016). Environmental risk factors for pancreatic cancer: an update. *Archives of Toxicology*, 90(11), 2617–2642. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1821-9>
- Bhowmick, N. A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A. E., Dumont, N., Shappell, S., ... Moses, H. L. (2004). TGF- $\beta$  Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science*, 303(5659), 848–851. <https://doi.org/10.1126/science.1090922>
- Blando, J., Sharma, A., Higa, M. G., Zhao, H., Vence, L., Yadav, S. S., ... Sharma, P. (2019). Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(5), 1692–1697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811067116>
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q. M., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., ... Wigginton, J. M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455–2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>

- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., & Golstein, P. (1988). A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature*, 328(6127), 267–270. <https://doi.org/10.1038/328267a0>
- Bruniquel, D., Borie, N., Hannier, S., & Triebel, F. (1998). Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics*, 48(2), 116–124. <https://doi.org/10.1007/s002510050411>
- Camcıoğlu, Y. (2013). *Bağışıklık Sistemi ve Yetersizlikleri*. 17–63.
- Casolino, R., Braconi, C., Malleo, G., Paiella, S., Bassi, C., Milella, M., ... Golan, T. (2021). Reshaping preoperative treatment of pancreatic cancer in the era of precision medicine. *Annals of Oncology*, 32(2), 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.013>
- Ceeraz, S., Nowak, E. C., & Noelle, R. J. (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunology*, 34(11), 556–563. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.003>
- Chen, C.-Y., Kao, C.-L., & Liu, C.-M. (2018). The Cancer Prevention, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation of Bioactive Phytochemicals Targeting the TLR4 Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2729. <https://doi.org/10.3390/ijms19092729>
- Chen, F., Roberts, N. J., & Klein, A. P. (2017). Inherited pancreatic cancer. *Chinese Clinical Oncology*, 6(6). <https://doi.org/10.21037/cco.2017.12.04>
- Chen, Q., Guan, X., Zuo, X., Wang, J., & Yin, W. (2016). The role of high mobility group box 1 (HMGB1) in the pathogenesis of kidney diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(3), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.004>
- Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V., & Kolb, H. (1999). Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(6), 3212–3219. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092772>
- Chen, X., Mangala, L. S., Rodriguez-Aguayo, C., Kong, X., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2018). RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer and Metastasis Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9717-6>
- Cheng, X., Zhao, G., & Zhao, Y. (2018). Combination Immunotherapy Approaches for Pancreatic Cancer Treatment. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6240467>

- Chin, P. Y., Dorian, C. L., Hutchinson, M. R., Olson, D. M., Rice, K. C., Moldenhauer, L. M., & Robertson, S. A. (2016). Novel Toll-like receptor-4 antagonist (+)-naloxone protects mice from inflammation-induced preterm birth. *Scientific Reports*, *6*(1), 36112. <https://doi.org/10.1038/srep36112>
- Chiquet-Ehrismann, R., & Chiquet, M. (2003). Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress. *Journal of Pathology*, *200*(4), 488–499. <https://doi.org/10.1002/path.1415>
- Cui, J., Jiang, W., Wang, S., Wang, L., & Xie, K. (2012). Role of Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Drug Resistance of Pancreatic Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(17), 2464–2471. <https://doi.org/10.2174/13816128112092464>
- Daniel E Shumer, Natalie J Nokoff, N. P. S. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Demirelli, F. H. (2003). Kanserin Moleküler Genetik Temelleri. *Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi*, (37), 9–15. Retrieved from <http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/37/3701.pdf>
- Deng, J., Li, J., Sarde, A., Lines, J. L., Lee, Y., Qian, D. C., ... Mabaera, R. (2020). HHS Public Access. *7*(7), 1079–1090. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0507>.Hypoxia-induced
- Di Magliano, M. P., & Logsdon, C. D. (2013). Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*, *144*(6), 1220–1229. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.071>
- DiMaio, C. J. (2014). Pancreatic Cysts and Tumors. *Mount Sinai Expert Guides*, 304–322. <https://doi.org/10.1002/9781118932759.ch30>
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., & Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International*, *2014*(Figure 2). <https://doi.org/10.1155/2014/474905>
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, *7*(1). <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, *17*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>
- Duffy, L., & O'Reilly, S. C. (2016). Toll-like receptors in the pathogenesis of

- autoimmune diseases: Recent and emerging translational developments. *ImmunoTargets and Therapy*, 5, 69–80. <https://doi.org/10.2147/ITT.S89795>
- Eckle, T., & Eltzschig, H. K. (2011). Toll-like Receptor Signaling during Myocardial Ischemia. *Anesthesiology*, 114(3), 490–492. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31820a4d78>
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15(2), 188–200. <https://doi.org/10.1101/gad.862301>
- Eldridge, L., Moldobaeva, A., & Wagner, E. M. (2011). Increased hyaluronan fragmentation during pulmonary ischemia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(5), 0–6. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00079.2011>
- Fakhr, E., Zare, F., & Teimoori-Toolabi, L. (2016). Precise and efficient siRNA design: A key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Therapy*, 23(4), 73–82. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.4>
- Ferrari, S., Finelli, P., Rocchi, M., & Bianchi, M. E. (1996). The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. *Genomics*, 35(2), 367–371. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0369>
- Fessler, Michael B.; Rudel, Lawrence L.; Brown, M. (2008). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Fiore, E., Fusco, C., Romero, P., & Stamenkovic, I. (2002). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene*, 21(34), 5213–5223. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205684>
- Freeman, B. G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., ... Honjo, T. (2000). PD-1 Freeman JEM 2000. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1028–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Freese, J. L., Pino, D., & Pleasure, S. J. (2010). Wnt signaling in development and disease. *Neurobiology of Disease*, 38(2), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.09.003>
- Gabrilovich, D. I. (2018). MDSCs. *Cancer Immunol Res*, 5(1), 3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297> Myeloid-derived
- Gatti, G., Quintar, A. A., Andreani, V., Nicola, J. P., Maldonado, C. A., Masini-Repiso,

- A. M., ... Maccioni, M. (2009). Expression of toll-like receptor 4 in the prostate gland and its association with the severity of prostate cancer. *Prostate*, 69(13), 1387–1397. <https://doi.org/10.1002/pros.20984>
- Gavrilov, K., & Saltzman, W. M. (2012). Therapeutic siRNA: Principles, challenges, and strategies. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(2), 187–200.
- Gelao, L., Criscitiello, C., Esposito, A., Goldhirsch, A., & Curigliano, G. (2014). Immune checkpoint blockade in cancer treatment: A double-edged sword cross-targeting the host as an “innocent bystander.” *Toxins*, 6(3), 914–933. <https://doi.org/10.3390/toxins6030914>
- Giraud, X., Le Quéré, C., & da Cunha, L. C. (2003a). Importance of coastal supply of P, Si and Fe for global ocean biogeochemistry. *Submitted to Global Biogeochemical Cycles 2006GB002717*, 67(4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657>
- Giraud, X., Le Quéré, C., & da Cunha, L. C. (2003b). Importance of coastal supply of P, Si and Fe for global ocean biogeochemistry. *Submitted to Global Biogeochemical Cycles 2006GB002717*, 67(4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657>
- Goodall, K. J., Poon, I. K. H., Phipps, S., & Hulett, M. D. (2014). Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109596>
- Göral, V. (n.d.). Pankreas Kanseri : Patogenez ve Tanı. *I. Göral V. Pankreas Kanseri : Patogenez ve Tanı. (Tablo 2):407-414.*, (Tablo 2), 407–414.
- Gulcher, J. R., Nies, D. E., Alexakos, M. J., Ravikant, N. A., Sturgill, M. E., Marton, L. S., & Stefansson, K. (1991). Structure of the human hexabrachion (tenascin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9438–9442. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9438>
- Guo, Y., Liu, W., & Wu, J. (2016). Helicobacter pylori infection and pancreatic cancer risk: A meta-Analysis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(8), C229–C232. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.200744>
- Guyen, B., & Can, M. (2012). Role Of Toll Like Receptors In Various Diseases. *Sakarya Medical Journal*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.5505/sakaryamj.2012.47550>
- Han, J. (2006). Myd88 beyond toll. *Nature Immunology*, 7(4), 370–371. <https://doi.org/10.1038/ni0406-370>
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of drosophila,

- required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90516-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90516-8)
- Heyam, A., Lagos, D., & Plevin, M. (2015). Dissecting the roles of TRBP and PACT in double-stranded RNA recognition and processing of noncoding RNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 6(3), 271–289. <https://doi.org/10.1002/wrna.1272>
- Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T., & Tedder, T. F. (2011). Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4268–4280. <https://doi.org/10.1172/JCI59266>
- Hou, Z., Pan, Y., Fei, Q., Lin, Y., Zhou, Y., Liu, Y., ... Huang, H. (2021). Prognostic significance and therapeutic potential of the immune checkpoint VISTA in pancreatic cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(2), 517–531. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03463-9>
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., ... Offerhaus, G. J. A. (2001). Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(5), 579–586. <https://doi.org/10.1097/00000478-200105000-00003>
- Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., ... Yonezawa, S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology*, 28(8), 977–987. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000126675.59108.80>
- Hsiao, C. C., Chen, P. H., Cheng, C. I., Tsai, M. S., Chang, C. Y., Lu, S. C., ... Kao, Y. H. (2015). Toll-like receptor-4 is a target for suppression of proliferation and chemoresistance in HepG2 hepatoblastoma cells. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.08.004>
- Huang, X., Zhang, X., Li, E., Zhang, G., Wang, X., Tang, T., ... Liang, T. (2020). VISTA: an immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00917-y>
- Ikebe, M., Kitaura, Y., Nakamura, M., Tanaka, H., Yamasaki, A., Nagai, S., ... Katano, M. (2009a). Lipopolysaccharide (LPS) increases the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling pathway. *Journal of Surgical Oncology*, 100(8), 725–731. <https://doi.org/10.1002/jso.21392>

- Iliev, D. B., Hansen, T., Jørgensen, S. M., Krasnov, A., & Jørgensen, J. B. (2013). CpG- and LPS-activated MAPK signaling in invitro cultured salmon (*Salmo salar*) mononuclear phagocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, *35*(4), 1079–1085. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.014>
- Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., ... Noble, P. W. (2005). Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature Medicine*, *11*(11), 1173–1179. <https://doi.org/10.1038/nm1315>
- Johnston, R. J., Su, L. J., Pinckney, J., Critton, D., Boyer, E., Krishnakumar, A., ... Korman, A. J. (2019). VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature*, *574*(7779), 565–570. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1674-5>
- Jones, F. S., & Jones, P. L. (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental Dynamics*, *218*(2), 235–259. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200006\)218:2<235::AID-DVDY2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<235::AID-DVDY2>3.0.CO;2-G)
- Jorgensen, R. A., Cluster, P. D., English, J., Que, Q., & Napoli, C. A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Molecular Biology*, *31*(5), 957–973. <https://doi.org/10.1007/BF00040715>
- Kang, X., Li, P., Zhang, C., Zhao, Y., Hu, H., & Wen, G. (2020). The TLR4/ERK/PD-L1 axis may contribute to NSCLC initiation. *International Journal of Oncology*, *57*(2), 456–465. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5068>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*, *11*(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Keane, C., Law, S. C., Gould, C., Birch, S., Sabdia, M. B., de Long, L. M., ... Gandhi, M. K. (2020). LAG3: A novel immune checkpoint expressed by multiple lymphocyte subsets in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Advances*, *4*(7), 1367–1377. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001390>
- Kikuchi Y, Kita T, Miyauchi M, Kizawa I, Oomori K, Kato K. Effects of naloxone on human ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Jpn J Cancer Res*. 1987 May;78(5):519-25. PMID: 3112065.
- Kim, V. N. (2003). RNA Interference in Functional Genomics and Medicine. *Journal of Korean Medical Science*, *18*(3), 309–318.

- <https://doi.org/10.3346/jkms.2003.18.3.309>
- Kiyan, Y., Tkachuk, S., Kurselis, K., Shushakova, N., Stahl, K., Dawodu, D., ... Haller, H. (2019). Heparanase-2 protects from LPS-mediated endothelial injury by inhibiting TLR4 signalling. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50068-5>
- Korc, M., Jeon, C. Y., Edderkaoui, M., Pandol, S. J., & Petrov, M. S. (2017). Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 31(5), 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.09.001>
- Korver, S. K., Gibson, R. J., Bowen, J. M., & Coller, J. K. (2019). Toll-like receptor/interleukin-1 domain innate immune signalling pathway genetic variants are candidate predictors for severe gastrointestinal toxicity risk following 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 83(2), 217–236. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3729-y>
- Lang, C. H., Silvis, C., Deshpande, N., Nystrom, G., & Frost, R. A. (2003). Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock (Augusta, Ga.)*, 19(6), 538–546. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000055237.25446.80>
- Lanki, M. A., Seppänen, H. E., Mustonen, H. K., Böckelman, C., Juuti, A. T., Hagström, J. K., & Haglund, C. H. (2018). Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 predict favorable prognosis in local pancreatic cancer. *Tumor Biology*, 40(9), 1–9. <https://doi.org/10.1177/1010428318801188>
- Lasker, M. V., & Nair, S. K. (2006). Intracellular TLR Signaling: A Structural Perspective on Human Disease. *The Journal of Immunology*, 177(1), 11–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.11>
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, 2(3), 261–268. <https://doi.org/10.1038/85330>
- Le Mercier, I., Chen, W., Lines, J. L., Day, M., Li, J., Sergent, P., ... Wang, L. (2014). VISTA regulates the development of protective antitumor immunity. *Cancer Research*, 74(7), 1933–1944. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1506>
- Lim, K. H., & Staudt, L. M. (2013). Toll-Like receptor signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011247>

- Lindahl, U., & Li, J. ping. (2009). Chapter 3 Interactions Between Heparan Sulfate and Proteins-Design and Functional Implications. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 276). [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(09\)76003-4](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(09)76003-4)
- Linsley, P. S., & Ledbetter, J. A. (1993). The Role of the CD28 Receptor During T Cell Responses to Antigen. *Annual Review of Immunology*, *11*(1), 191–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.001203>
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- MacFarlane, L.-A., & R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, *11*(7), 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
- Mahalingam, D., Kelly, K. R., Swords, R. T., Carew, J., Nawrocki, S. T., & Giles, F. J. (2009). Emerging drugs in the treatment of pancreatic cancer. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, *14*(2), 311–328. <https://doi.org/10.1517/14728210902972502>
- Mahoney, K., & Ph, D. (2019). *IS VISTA AN ACTIONABLE IMMUNE CHECKPOINT TARGET IN KIDNEY CANCER ?*
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, *298*(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, *23*(11), 549–555. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02302-5)
- Massagué, J., Blain, S. W., & Lo, R. S. (2000). TGF $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, *103*(2), 295–309. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00121-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00121-5)
- Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., & Ii, M. (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Molecular Pharmacology*, *79*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068064>
- Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2020). Systems and synthetic microRNA biology: From biogenesis to disease pathogenesis. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, 21(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21010132>
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295–298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80412-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80412-2)
- Melo, C. M., Origassa, C. S. T., Theodoro, T. R., Matos, L. L., Miranda, T. A., Accardo, C. M., ... Pinhal, M. A. S. (2015). Análises das isoformas de heparanase e da catepsina B em plasma de pacientes com carcinomas gastrointestinais: Estudo transversal analítico. *Sao Paulo Medical Journal*, 133(1), 28–35. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2013.7080003>
- Memba, R., Duggan, S. N., Ni Chonchubhair, H. M., Griffin, O. M., Bashir, Y., O'Connor, D. B., ... Conlon, K. C. (2017). The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology*, 17(6), 867–874. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.09.002>
- Midwood, K., Sacre, S., Piccinini, A. M., Inglis, J., Trebault, A., Chan, E., ... Foxwell, B. (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature Medicine*, 15(7), 774–780. <https://doi.org/10.1038/nm.1987>
- Mohamed, O., El Bastawisy, A., Allahlobi, N., Abdellateif, M. S., Zekri, A. R. N., Shaarawy, S., ... Bahnassy, A. A. (2020). The role of CD68+ macrophage in classical Hodgkin lymphoma patients from Egypt. *Diagnostic Pathology*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0912-3>
- Moniri, M. R., Dai, L. J., & Warnock, G. L. (2014). The challenge of pancreatic cancer therapy and novel treatment strategy using engineered mesenchymal stem cells. *Cancer Gene Therapy*, 21(1), 12–23. <https://doi.org/10.1038/cgt.2013.83>
- Moresco, E. M. Y., LaVine, D., & Beutler, B. (2011). Toll-like receptors. *Current Biology*, 21(13), R488–R493. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.039>
- Mulati, K., Hamanishi, J., Matsumura, N., Chamoto, K., Mise, N., Abiko, K., ... Mandai, M. (2019). VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. *British Journal of Cancer*, 120(1), 115–127. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0313-5>

- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1976). Ozone oxidation products of organic materials. *Marine Pollution Bulletin*, 7(3), 56. [https://doi.org/10.1016/0025-326x\(76\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0025-326x(76)90099-0)
- Nomura, N., Nagase, T., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Sato, S., ... Tabata, S. (1994). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. II. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0041-KIAA0080) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Research*, 1(5), 223–229. <https://doi.org/10.1093/dnares/1.5.223>
- Nowak, E. C., Lines, J. L., Varn, F. S., Deng, J., Sarde, A., Mabaera, R., ... Noelle, R. J. (2017). Immunoregulatory functions of VISTA. *Immunological Reviews*, 276(1), 66–79. <https://doi.org/10.1111/imr.12525>
- Oblak, A., & Jerala, R. (2011). Toll-like receptor 4 activation in cancer progression and therapy. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/609579>
- Obradovic, J. (2005). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., & Kolb, H. (2000). Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. *The Journal of Immunology*, 164(2), 558–561. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.2.558>
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., ... Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>
- ÖZBEK, M., HİTİT, M., ERGÜN, E., BEYAZ, F., & ERGÜN, L. (2017). Toll benzeri reseptörler. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2), 179–191. <https://doi.org/10.24998/maeusabed.335529>
- Pawlowski, W. P., Grelon, M., & Armstrong, S. (2013). *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™ Series Editor*.
- Pollard, R., & W., J. (2015). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 41(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>. Tumor-associated
- Pradere, J. P., Dapito, D. H., & Schwabe, R. F. (2014). The Yin and Yang of Toll-like

- receptors in cancer. *Oncogene*, 33(27), 3485–3495.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2013.302>
- Prasad, S. B., & Kumar, R. (n.d.). *Role of Toll-Like Receptor (TLR) -Signaling in Cancer Progression and Treatment*. 1–12.
- Price, S. J. and T. (2008). 基因的改变NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Rahier, J., Wallon, J., & Henquin, J. C. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia*, 20(5), 540–546.  
<https://doi.org/10.1007/BF00252762>
- 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 and Research: Clinical Gastroenterology*, 24(3), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 588–593.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A. H., Piazuelo, M. B., ... Ochoa, A. C. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Research*, 64(16), 5839–5849. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0465>
- Rogoff, H. A., Pickering, M. T., Debatis, M. E., Jones, S., & Kowalik, T. F. (2002). E2F1 Induces Phosphorylation of p53 That Is Coincident with p53 Accumulation and Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), 5308–5318.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.22.15.5308-5318.2002>
- Rubartelli, A., & Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology*, 28(10), 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.08.004>
- Santarpia, L. L., Lippman, S., & El-Naggar, A. (2012). Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert*

- Opin Ther Targets*, 16(1), 103–119.  
<https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805.Targeting>
- Santoni, M., Andrikou, K., Sotte, V., Bittoni, A., Lanese, A., Pellei, C., ... Cascinu, S. (2015). Toll like receptors and pancreatic diseases: From a pathogenetic mechanism to a therapeutic target. *Cancer Treatment Reviews*, 41(7), 569–576.  
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.04.004>
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), 191–195.  
<https://doi.org/10.1038/nature00858>
- Schmaußer, B., Andrulis, M., Endrich, S., Müller-Hermelink, H. K., & Eck, M. (2005). Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: An implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(3), 179–185.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.02.009>
- Schütz, F., Stefanovic, S., Mayer, L., Von Au, A., Domschke, C., & Sohn, C. (2017). PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 40(5), 294–297. <https://doi.org/10.1159/000464353>
- Şen, M., Ay, U., Akbayır, E., Şenyar, S., Tüzün, E., & Küçükali, C. İ. (2017). NF-κB, SUMO ve Ubikitinasyon İlişkisi NF-κB SUMO AND UBIQUITINATION RELATIONSHIP. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(13), 35–46.
- Seok, H., Lee, H., Jang, E. S., & Chi, S. W. (2018). Evaluation and control of miRNA-like off-target repression for RNA interference. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(5), 797–814. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2656-0>
- Shcheblyakov, D. V., Logunov, D. Y., Tukhvatulin, A. I., Shmarov, M. M., & Naroditsky, B. S. (2010). *Toll-Like Receptors (TLRs): The Role in Tumor Progression*. 2(6), 21–29.
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X)
- Sindhu, S., Al-Roub, A., Koshy, M., Thomas, R., & Ahmad, R. (2016). Palmitate-Induced MMP-9 Expression in the Human Monocytic Cells is Mediated through the TLR4-MyD88 Dependent Mechanism. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(3), 889–900. <https://doi.org/10.1159/000447798>

- Singh, D., Chaudhary, S., Kumar, R., Sirohi, P., Mehla, K., Sirohi, A., ... Singh, P. K. (2016). RNA Interference Technology — Applications and Limitations. *RNA Interference*. <https://doi.org/10.5772/61760>
- Stark, A., & Eibl, G. (2015). Stark A, Eibl G. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl. Base 2015* doi:10.3998/PANC.2015.14. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. <https://doi.org/10.3998/panc.2015.14>
- Sun, Y., Wu, C., Ma, J., Yang, Y., Man, X., Wu, H., & Li, S. (2016). Toll-like receptor 4 promotes angiogenesis in pancreatic cancer via PI3K/AKT signaling. *Experimental Cell Research*, 347(2), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.07.009>
- Sunami, Y., & Kleeff, J. (2019). Immunotherapy of pancreatic cancer. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.03.006>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021a). 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021b). 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Takaori, K. (2007). Current understanding of precursors to pancreatic cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 14(3), 217–223. <https://doi.org/10.1007/s00534-006-1165-6>
- Tang, Daolin, Kang, R., Livesey, K. M., Kroemer, G., Billiar, T. R., Van Houten, B., ... Lotze, M. T. (2011). High-mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control. *Cell Metabolism*, 13(6), 701–711. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.008>
- Tang, Dong, Gao, J., Wang, S., Ye, N., Chong, Y., Huang, Y., ... Wang, D. (2016). Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. *Tumor Biology*, 37(2), 1889–1899. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3942-9>
- Thao, N. P., Lee, Y. S., Luyen, B. T. T., Oanh, H. Van, Ali, I., Arooj, M., ... Kim, Y. H.

- (2018). Chemicals from *Cimicifuga dahurica* and Their Inhibitory Effects on Pro-inflammatory Cytokine Production by LPS-stimulated Bone Marrow-derived Dendritic Cells. *Natural Product Sciences*, 24(3), 194. <https://doi.org/10.20307/nps.2018.24.3.194>
- Tinoco, R., Otero, D. C., Takahashi, A. A., & Bradley, L. M. (2017). PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape. *Trends in Immunology*, 38(5), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.02.002>
- Tsan, M. F., & Gao, B. (2007). Review: Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*, 13(1), 6–14. <https://doi.org/10.1177/0968051907078604>
- Tsung, A., Sahai, R., Tanaka, H., Nakao, A., Fink, M. P., Lotze, M. T., ... Billiar, T. R. (2005). The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *Journal of Experimental Medicine*, 201(7), 1135–1143. <https://doi.org/10.1084/jem.20042614>
- Turaçlı, İ. D. (2017). Malign melanom oluşum ve ilerleme sürecinde gözlenen bazı moleküler değişimler. *Türk Dermatoloji Dergisi*, 11(4), 184–188. <https://doi.org/10.4274/tdd.3000>
- Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyán, J., & Tanaka Hall, T. M. (2003). Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor. *Cell*, 115(7), 799–811. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00984-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00984-X)
- Vaz, J., & Andersson, R. (2014). Intervention on toll-like receptors in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5808–5817. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i19.5808>
- Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., Van Zoelen, M. A. D., ... Roth, J. (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature Medicine*, 13(9), 1042–1049. <https://doi.org/10.1038/nm1638>
- Volchenkov, R., Sprater, F., Vogelsang, P., & Appel, S. (2012). The 2011 Nobel Prize in physiology or medicine. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02663.x>
- Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2015). Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends in Immunology*, 36(2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.001>
- Wanderley, C. W., Colón, D. F., Luiz, J. P. M., Oliveira, F. F., Viacava, P. R., Leite, C.


- A., ... Cunha, F. Q. (2018). Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to an M1 profile in a TLR4-dependent manner. *Cancer Research*, 78(20), 5891–5900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3480>
- Wang, G., Tai, R., Wu, Y., Yang, S., Wang, J., Yu, X., ... Li, N. (2020). The expression and immunoregulation of immune checkpoint molecule VISTA in autoimmune diseases and cancers. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 52, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.02.002>
- Wang, J., Wu, G., Manick, B., Hernandez, V., Renelt, M., Erickson, C., ... Kalabokis, V. (2019). VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunology*, 156(1), 74–85. <https://doi.org/10.1111/imm.13001>
- Wang, L., Rubinstein, R., Lines, J. L., Wasiuk, A., Ahonen, C., Guo, Y., ... Noelle, R. J. (2011). VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 577–592. <https://doi.org/10.1084/jem.20100619>
- Wang, X., Zhang, Y., Peng, Y., Hutchinson, M. R., Rice, K. C., & Yin, H. (2016). *Pharmacological characterization of the opioid and ( + ) -naloxone as antagonists of toll-like receptor 4 Tables of Links*. <https://doi.org/10.1111/bph.13394>
- WANG, Y., GONG, D., YAO, C., ZHENG, F., ZHOU, T., CAO, Q., ... ZHU, J. (2020). Human monoclonal anti-TLR4 antibody negatively regulates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse macrophages. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11500>
- Watanabe, F., Suzuki, K., Tamaki, S., Ishikawa, H., Kakizawa, N., Noda, H., & Rikiyama, T. (2019). Sequential assessments of KRAS- mutated circulating tumor DNA in longitudinal monitoring enable the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15\_suppl), e15712–e15712. [https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15\\_suppl.e15712](https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e15712)
- Watson, J., Khaled, A. R., Wyllie, A. H., Zha, J., Vanderheiden, M. G., Liu, A., ... Zapp, M. (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science*, 293(August), 834–838.
- Wels, J., Kaplan, R. N., Rafii, S., & Lyden, D. (2008). Migratory neighbors and distant invaders: Tumor-associated niche cells. *Genes and Development*, 22(5), 559–574. <https://doi.org/10.1101/gad.1636908>

- Wen, Y., & Meng, W. S. (2014). Recent in vivo evidences of particle-based delivery of small-interfering RNA (siRNA) into solid tumors. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 9(2), 158–173. <https://doi.org/10.1007/s12247-014-9183-4>
- Wilentz, R. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., McCarthy, D. M., Parsons, J. L., Yeo, C. J., ... Hruban, R. H. (2000). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Research*, 60(7), 2002–2006.
- Wu, Q., Wu, W., Jacevic, V., Franca, T. C. C., Wang, X., & Kuca, K. (2020). Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 574–583. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1720013>
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., ... Akira, S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 420(6913), 324–329. <https://doi.org/10.1038/nature01182>
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., ... Akira, S. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*, 4(11), 1144–1150. <https://doi.org/10.1038/ni986>
- Yang, H., Wang, H., Chavan, S. S., & Andersson, U. (2015). High mobility group box protein 1 (HMGB1): The prototypical endogenous danger molecule. *Molecular Medicine*, 21, S6–S12. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00087>
- Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., & Goto, M. (2008). Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Gut and Liver*, 2(3), 137–154. <https://doi.org/10.5009/gnl.2008.2.3.137>
- Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2012). Exogenous or endogenous Toll-like receptor ligands: which is the MVP in tumorigenesis? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 69(6), 935–949. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0864-6>
- Yuan, L., Tatineni, J., Mahoney, K. M., & Freeman, G. J. (2021). Trends in Immunology VISTA : A Mediator of Quiescence and a Promising Target in Cancer Immunotherapy. *Trends in Immunology*, 42(3), 209–227. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.12.008>
- Zakharova, O. P. (2012). Pancreatic adenocarcinoma: Outstanding problems. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 4(5), 104.


- <https://doi.org/10.4240/wjgs.v4.i5.104>
- Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., & Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *17*(24), 2897–2908. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i24.2897>
- Zhan, W., Shelton, C. A., Greer, P. J., Brand, R. E., & Whitcomb, D. C. (2018). Germline Variants and Risk for Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Emerging Concepts. *Pancreas*, *47*(8), 924–936. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001136>
- Zhang, H., Garcia-Santos, G., Peinado, H., & Lyden, D. C. (2013). Microenvironmental regulation of metastasis by exosomes. *Emerging Concepts of Tumor Exosome-Mediated Cell-Cell Communication*, *9*(4), 181–201. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3697-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3697-3_9)
- Zhao, Y., & Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(4), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.02.006>
- Zhen, D. B., Rabe, K. G., Gallinger, S., Syngal, S., Schwartz, A. G., Goggins, M. G., ... Author, G. M. (2015). BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A Mutations in Familial Pancreatic Cancer (FPC): A PACGENE Study HHS Public Access Author manuscript. *Genet Med*, *17*(7), 569–577. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.153>
- Zong, L., Mo, S., Yu, S., Zhou, Y., Zhang, M., Chen, J., & Xiang, Y. (2020). Expression of the immune checkpoint VISTA in breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *69*(8), 1437–1446. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02554-3>

## EKLER

## EK-1 Etik kurul kararı



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
Meram Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı : 14567952-050/1422  
Konu :


Tarih : 25 Eylül 2019

Sayın  
Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU  
N.E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Bölümü Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İlgi:16.09.2019 tarihli dilekçeniz;  
"Pankreas kanserinde Toll-like reseptör 4 (TLR4) yolağının immün check-point VISTA üzerindeki etkilerinin araştırılması" başlıklı, Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' nu sorumluluğunda, Doç. Dr. Nadir KOÇAK, Doç. Dr. Esmâ MENEVŞE ve Moleküler Biyolog Kübra Sena BAŞ' ın yardımcı araştırmacısı olduğu yüksek lisans tez çalışması hakkında Fakültemiz İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulunun 20 Eylül 2019 tarihinde aldığı 2019/2070 sayılı karar ilişikte gönderilmiştir.  
Bilgilerinizi rica ederim.

Ek: Etik Kurul Kararı

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



## EK-2 Etik kurul kararı

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

**Toplantı Sayısı:94**

**Toplantı Tarihi: 20 Eylül 2019**

**Karar Sayısı:2019/2070:**N.E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' nun "Pankreas kanserinde Toll-like reseptör 4 (TLR4) yolağının immün check-point VISTA üzerindeki etkilerinin araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 16.09.2019 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Moleküler Biyolog Kübra Sena BAŞ' ın yüksek lisans tez çalışmasının N.E.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU' nun sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

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

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Yardımcı Araştırmacılar: Doç. Dr. Nadir KOÇAK, Doç. Dr. Esmâ MENEVŞE, Moleküler Biyolog Kübra Sena BAŞ

ASLI GİBİDİR  
20.09.2019

Ömer KONDU

İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Sekreteri

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Arş. Gör. Kübra Sena BAŞ TOPCU  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : KARABÜK - 1995  
**Telefon** : 05536290491  
**Faks** : -  
**e-mail** : kubrasenabas@gmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Fatih Anadolu Lisesi, Safranbolu, Karabük	2013
Üniversite	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	2018
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	2021
Doktora	:	

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2020-Halen	Bartın Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### UZMANLIK ALANI

### YABANCI DİLLER

İngilizce, Yökdil (Şubat 2021):80.00

### BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

### YAYINLAR