

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ONKOLOJİ VE KANSER BİYOLOJİSİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES FAKTÖRÜ OLAN
IRE1 α 'NIN PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

RAHMİ ÇETİNKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kemal ERGİN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-19002 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji ve Kanser Biyolojisi Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Rahmi ÇETİNKAYA tarafından hazırlanan “Endoplazmik Retikulum Stres Faktörü olan ‘IRE1 α ’nın, Pankreas Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/01/2022

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Kemal ERGİN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Ali Zahit BOLAMAN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. M. Alper ERDOĞAN	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda ve bilim insanı olma yolunda bana yol gösteren, bilgileriyle ışık tutan ve yardımcı olan danışman hocam Sn. Prof. Dr. Kemal ERGİN'e teşekkürü borç bilirim. İlk defa kendisinden öğrenmiş olduğum klinik bilgileri sabırla öğreten Medikal Onkoloji BD. öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Sabri BARUTCA'ya eğitimim boyunca bana hem hoca hem de örnek bir insan olarak yol gösterdiği için çok teşekkür ederim. Güler yüzü ve enerjisiyle bana her zaman güç veren ve destek olan değerli sınıf arkadaşım Sn. Şengül BARUTCA'ya teşekkür ederim.

Kendilerini son yıllarda tanıma şansını bulmuş olduğum, bana her zaman azim ve çalışkanlığın önemini gösteren İç Hastalıkları AD., Hematoloji BD. öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Ali Zahit BOLAMAN'a ve Sn. Prof. Dr. İrfan YAVAŞOĞLU'na, ayrıca Halk Sağlığı AD. Sn. Prof. Dr. Filiz ABACIGİL, Tıbbi Patoloji AD. Sn. Doç. Dr. Nuket ELİYATKIN, Medikal Onkoloji BD. Sn. Doç. Dr. Esin OKTAY ve Biyokimya AD. Sn. Prof. Dr. Özge ÇEVİK hocalarıma teşekkür etmek isterim. Tezimin deney aşamalarında bana yol gösteren İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fizyoloji AD. Sn. Doç. Dr. M. Alper ERDOĞAN hocama yardımları için teşekkürü borç bilirim.

ADÜ'nün bana katmış olduğu en güzel değerlerden biri olan İç Hastalıkları AD. Uzm. Dr. Efser ERBİL'e arkadaşlığı ve dertlerime ortak olduğu için ayrıca teşekkür etmek isterim. Lab. partnerim Büşra AYDINOĞLU'na ve deney aşamalarında yardımcı olan arkadaşlarım Arş. Gör. Burçin İrem ABAS'a, Arş. Gör. Simge Ünay'a ve Arş. Gör. Didem BAKAY'a çok teşekkür ederim. Ayrıca projemize maddi destek sağlayan ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri birimine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Ve tabii her zaman yanımda olan, varlıklarıyla bana güç veren ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ANNEM, BABAM ve AĞABEYİM'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Pankreas	4
2.1.1. Pankreas'ın Yapısı ve Morfolojisi	6
2.1.2. Pankreas Anatomisi.....	8
2.2. Pankreas Kanseri	9
2.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	10
2.2.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri.....	12
2.2.3. Pankreas Kanseri Karsinogenezi ve Patogenezi	13
2.2.4. Pankreas Kanserinin Sınıflandırılması	17
2.2.4.1. Pankreas Kanserinin TNM Sınıflandırması	17
2.2.4.2. Pankreas Tümörlerinin Patolojik Olarak Sınıflandırılması.....	18
2.2.5. Pankreas Kanseri Tanısı	19
2.2.6. Pankreas Kanseri Tedavisi	21
2.2.6.1. Pankreas Kanseri Cerrahisi	22
2.2.6.2. Pankreas Kanserinde Küçük Molekül Temelli Tedaviler	23

2.3. Endoplazmik Retikulum.....	24
2.3.1. Endoplazmik Retikulum Stresi	25
2.3.1.1 UPR (Katlanmamış Protein Cevabı)	26
2.3.2. Kanserde Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı	29
2.3.3 UPR ve Apoptoz	33
2.3.4. UPR ve Metastaz.....	35
2.3.4. UPR ve Anjiyogenez.....	35
2.4. Pankreas Kanserde Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR	37
2.4.1. Pankreas Kanserde İlaç Direnci ve UPR.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Gereç	40
3.1.1. Cihazlar	40
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	40
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1. Hücre Kültürü.....	41
3.2.1.1. Pasajlama.....	41
3.2.1.2. Hücre Dondurma ve Çözdürme Prosedürü	42
3.2.1.3. Tripan Mavisini İle Boyama	43
3.2.2. MTS/ PMS Canlılık ve Sitotoksisite Deneyi	44
3.2.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Deneyi	44
3.2.4. Kombinasyon İlaç Etkinliğinin Sinerjistik Analizi	45
3.2.5. Klonojenik Deney	47
3.2.6. Matrijel İnvazyon Deneyi	47
3.2.7. Apoptoz Deneyi (Anneksin V).....	48
3.2.8. Hücre Döngüsü Deneyi	49
3.2.9. Kaspaz 3/ 7 Deneyi	50

3.2.10. Western Blotlama.....	51
3.2.10.1. Protein İzolasyonu.....	51
3.2.10.2. Protein Miktarının Ölçülmesi.....	52
3.2.10.3 Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) Yürütülmesi ..	53
3.2.10.4. Protein Örneklerinin Jele Yükleme İçin Hazırlanması	53
3.2.10.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi	54
3.2.10.6. Blotlama (Protein Örneklerinin PVDF Membrana Aktarılması).....	54
3.2.10.7. Membran Bloklama İşlemi.....	55
3.2.10.8. Membran Üzerindeki Proteinin İmmünolojik Olarak Gösterilmesi.....	55
3.2.10.9. Membran Görüntüleme İşlemi	56
3.2.10.10 Membranın Tekrar Kullanımı	56
4. BULGULAR	57
4.1. Hücre Kültürü.....	57
4.2. MTS/ PMS Canlılık Deneyi Bulguları	57
4.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Analizi Bulguları	62
4.4. Klonojenik Deney	65
4.5. Sinerjistik Analiz Bulguları.....	68
4.6. Hücre Döngüsüne Ait Bulgular.....	73
4.7. Hücre Ölümüne İlişkin Bulgular	77
4.8. Hücrelerin Kaspaz 3/ 7 Aktivitelerine Ait Bulgular.....	80
4.9. İnvazyon Deneyi	83
4.10. Western Blot ve Protein Ekspresyon Analizleri.....	87
4.10.1. Protein Konsantrasyon Analizi	87
4.10.2. Western Blot Protein Ekspresyonları	89
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	99

KAYNAKLAR	100
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	128
ÖZGEÇMİŞ	129

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
ASR	: Yaşa göre standartlaştırılmış oran
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
BRPC	: Sınırdaki rezektabl pankreas kanseri
BSA	: Sığır serum albümin
CI	: Kombinasyon indeksi
CTRL	: Kontrol
ÇKBT	: Çok kesitli bilgisayarlı tomografi
DAG	: Diaçilgliserol
DM	: Diabetes Mellitus
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DR5	: Ölüm reseptörü 5
DRI	: Doz azaltma indeksi
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
GCB-DLBCL	: Germinal merkez B hücre benzeri diffüz büyük B hücreli lenfoma
GEM	: Gemsitabin
IC	: İnhibitör konsantrasyon
IPMN	: İntraduktal papiller müsinöz neoplazm
IRE1α	: İnositol gerektiren enzim la
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
LAPC	: Lokal olarak ilerlemiş rezeke edilemeyen pankreas kanseri
LOX	: Lizil oksidaz
MAPK	: Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz
MCN	: Müsinöz kistik neoplazm
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NT	: Non-treated

OD	: Optik yoğunluk
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PANIN	: Pankreas intraepitelyal neoplazi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDAK	: Pankreatik duktal adenokarsinom
PDGF	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PERK	: Protein Kinaz RNA-Benzeri ER Kinaz
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PI	: Propidyum iyodür
PIP3	: Fosfatidil inozitol (3,4,5) - trisfosfat
PMS	: Fenazin metosülfat
PP	: Pankreas polipeptit
PS	: Fosfatidilserin
PVDF	: Polivinilidin Florür
RIDD	: Düzenlenmiş Ire1'e bağlı bozunma
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SMA	: Süperior mezenterik arter
SRP	: Sinyal tanıma faktörü
STF	: STF-083010
TBS	: Tris tamponlu salin
THAP	: Thapsigargin
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri
UICC	: Uluslararası Kanser Savaş Örgütü
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XBP1s	: X-box bağlayıcı protein 1 (spliced)
XBP1u	: X-box bağlayıcı protein 1 (unspliced)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pankreas kanseri progresyon modeli. Grant ve diğerlerinden esinlenerek yeniden çizilmiştir (Grant ve diğerleri, 2016).....	6
Şekil 2. 2020'de tahmini yaşa göre standardize insidans ve mortalite oranları (GCO, 2021)..	11
Şekil 3. Pankreas kanserinin başlaması ve progresyonunda rol oynayan protein ve yolaklar. Sarkar ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir (Sarkar ve diğerleri, 2007).	16
Şekil 4. UPR yolağının üç ana kolu (Zhang ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir) (Zhang ve diğerleri, 2020).....	28
Şekil 5. UPR yolağı ve apoptotik mekanizmalar (Hetz ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir) (Hetz ve diğerleri, 2020).	34
Şekil 6. UPR ve anjiyogenez (Hsu ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir) (Hsu ve diğerleri, 2019)	36
Şekil 7. Panc-1 hücrelerinde Gemsitabin için IC50 analiz grafiğı.	60
Şekil 8. Gemsitabin'e ait doz/ cevap eğrisi.	60
Şekil 9. Panc-1 hücrelerinde STF-083010 için IC50 analiz grafiğı.	61
Şekil 10. STF-083010'a ait doz/ cevap eğrisi.	61
Şekil 11. Panc-1 hücrelerinde kemoterapiye cevap (veya direnç) etkilerine bakıldığında hücre proliferasyon yüzdeleri.	62
Şekil 12. NT ve Gemsitabin gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.	63
Şekil 13. STF-083010 ve Gemsitabin + STF-083010 gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.	63
Şekil 14. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.	64
Şekil 15. Gemsitabin + Thapsigargin ve Gemsitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.	64

Şekil 16. PANC-1 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda Gemsitabin uygulanan gruplarda koloni görüntüleri, kolonilere ait yoğunluk analizleri ve NT grubuna göre normalize edilmiş sonuçlara ait grafik.	65
Şekil 17. PANC-1 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda STF-083010 uygulanan gruplarda koloni görüntüleri, kolonilere ait yoğunluk analizleri ve NT grubuna göre normalize edilmiş sonuçlara ait grafik.	66
Şekil 18. PANC-1 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda Thapsigargin uygulanan gruplarda koloni görüntüleri, kolonilere ait yoğunluk analizleri ve NT grubuna göre normalize edilmiş sonuçlara ait grafik.	66
Şekil 19. PANC-1 hücrelerinde kombinasyon tedavisi uygulanan gruplarda koloni görüntüleri ve kolonilere ait yoğunluk analizleri.	67
Şekil 20. Sinerjistik analiz için yapılan değişen konsantrasyonlarda Gemsitabin ve STF-083010 uygulanan gruplara ait %hücre proliferasyon analizi (İlaçların sonundaki 30, 50 ve 70 sayıları o ilacın sırasıyla IC30, IC50 ve IC70 konsantrasyonlarını temsil etmektedir.) Tüm gruplar kontrol grubuna göre anlamlıdır (****: Kontrol'e göre $p < 0,0001$).	69
Şekil 21. Doz-Etki eğrisi. Mavi çizgi ve kareler Gemsitabin'e ait Doz-canlılık eğrisini gösterir. Kırmızı çizgi ve kareler STF-083010'a ait Doz-canlılık eğrisini göstermektedir. Yeşil üçgenler ise Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonlarını temsil etmektedir.	69
Şekil 22. Gemsitabin, STF-083010 ve her ikisinin kombinasyonunun yapıldığı gruplara ait Medyan-Etki grafiği.	70
Şekil 23. Gemsitabin ve STF-083010 için DRI grafiği. Eşiğin üzerindeki kombinasyonlar doz azaltımına izin veren kombinasyonları göstermektedir.	70
Şekil 24. Gemsitabin ile STF-083010 ilaç kombinasyonunun izobologram analizi. Normalleştirilmiş izobologramlar üretmek için CompuSyn yazılımı kullanıldı. Eşik çizgisinin altındaki değerler sinerjistik kombinasyonu göstermektedir (İlaçların sonundaki 30, 50 ve 70 sayıları o ilacın sırasıyla IC30, IC50 ve IC70 konsantrasyonlarını temsil etmektedir).	71
Şekil 25. NT ve Gemsitabin gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.	73
Şekil 26. STF-083010 ve Gemsitabin + STF-083010 gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.	74

Şekil 27. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.	74
Şekil 28. Gemsitabin + Thapsigargin ve Gemsitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.....	75
Şekil 29. Kontrol, Gemsitabin, STF-083010 ve Gemsitabin + STF-083010 gruplarına ait hücre döngüsü analiz sonuçları.	75
Şekil 30. Kontrol, Thapsigargin, STF-083010 + Thapsigargin, Gemsitabin + Thapsigargin ve Gemsitabin + Thapsigargin + STF-083010 gruplarına ait hücre döngüsü analiz sonuçları.	76
Şekil 31. NT ve Gemsitabin gruplarına ait apoptoz oranları.....	78
Şekil 32. STF-083010 ve Gemsitabin + STF-083010 gruplarına ait apoptoz oranları.	79
Şekil 33. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait apoptoz oranları.....	79
Şekil 34. Gemsitabin + Thapsigargin ve Gemsitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait apoptoz oranları.	80
Şekil 35. NT ve Gemsitabin gruplarında kaspaz 3/7 oranları.	81
Şekil 36. STF-083010 ve Gemsitabin + STF-083010 gruplarında kaspaz 3/7 oranları.	82
Şekil 37. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarında kaspaz 3/7 oranları.	82
Şekil 38. Gemsitabin + Thapsigargin ve Gemsitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarında kaspaz 3/7 oranları.....	83
Şekil 39. Matrijel invazyon deneyinde % membranı geçen hücre sayıları (metastatik hücre).84	
Şekil 40. BSA dilüsyonlarına ait standart eğri.	89
Şekil 41. IRE1 α proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.....	90
Şekil 42. VEGFR2 proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.	91
Şekil 43. Bak proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.....	92
Şekil 44. Bcl-xL proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.	92
Şekil 45. Perk proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.....	92
Şekil 46. XBP-1s proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.....	93
Şekil 47. XBP-1u proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.	93

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Panc-1 hücrelerine ait karakteristik görüntü.	57
Resim 2. İlaç uygulanan gruplara ait faz kontrast mikroskobu görüntüleri. İlaç gruplarında kontrol grubuna göre canlı hücre sayısında azalış ve yüzen hücre miktarında artış gözlemlendi.	59
Resim 3. MTS/PMS deneyi sonucunda Gemsitabin uygulanan hücrelerdeki renk değişimine ait görüntü. Soldan sağa konsantrasyon arttıkça canlılık azalmaktadır (NT: Non-treated).	59
Resim 4. MTS/PMS deneyi sonucunda STF-083010 uygulanan hücrelerdeki renk değişimine ait görüntü (NT: Non-treated).....	59
Resim 5. Kontrol grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.	85
Resim 6. Gemsitabin grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.	85
Resim 7. STF-083010 grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.	86
Resim 8. Gemsitabin + STF-083010 grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.	86
Resim 9. Thapsigargin grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri. ...	87
Resim 10. STF-083010 + Thapsigargin grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.	87
Resim 11. Örneklerdeki protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılan konsantrasyon analizi. Üstteki kuyucuklarda 3 tekrar olacak şekilde 4x oranında seyreltilmiş protein örnekleri yer alırken, aşağıdaki kuyucuklarda BSA'nın dilüsyonları yer almaktadır. Her bir kuyucuk DC protein assay kitinin içindeki solüsyonlar ile muamele edilmiştir. Renk koyulaştıkça protein konsantrasyonu artmaktaydı.	88
Resim 12. Deney gruplarında ER stres faktörü olan IRE1 α 'nın protein bantlarına ait blot görüntüsü.	89
Resim 13. Deney gruplarında anjiyogenez belirteci VEGFR2'nin protein bantlarına ait blot görüntüsü.	90

Resim 14. Deney gruplarında Bak, Bcl-xL, Perk, XBP1s ve XBP1u protein bantlarına ait blot görüntüleri.91

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. AJCC'nin TNM evreleme sistemine göre pankreas kanserinin TNM evrelemesi. ...	17
Tablo 2. Pankreas tümörlerinin patolojik olarak sınıflandırılması.	18
Tablo 3. Pankreas kanserinde Faz I, II ve III klinik çalışmalarında test edilen küçük molekülü tedaviler	24
Tablo 4. İlaç kombinasyonunun etkileşim türleri.	46
Tablo 5. Klonojenik deney gruplarına ait sayısal veriler.	67
Tablo 6. Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonlarına ait CI değerleri ve Tablo 1'e göre bu değerlerin etkileri.	71
Tablo 7. Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonuna ait İnhibitör Etki (Fa) ve Doz Azaltma İndeksi (DRI) değerleri.	72
Tablo 8. Deney gruplarında hücre döngüsü analizi sonuçları. ($p < 0,0001$).....	76
Tablo 9. Deney gruplarına ait total apoptoz, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları.	77
Tablo 10. Deney gruplarında kaspaz 3/7 oranları.	81
Tablo 11. Deney gruplarında mebranı geçen ortalama hücre sayıları ve standart sapmaları. ¹ $p < 0,0001$ (Kontrol'e göre), ² $p < 0,0001$ (Gemsitabin'e göre), ³ $p = 0,0154$ (STF-083010'a göre), ⁴ $p = 0,0005$ (STF-083010'a göre), ⁵ $p = 0,0076$ (STF-083010'a göre).	84

ÖZET

ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES FAKTÖRÜ OLAN IRE1 α 'NIN PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Çetinkaya R. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ve Kanser Biyolojisi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: Bu çalışmada endoplazmik retikulum stres faktörü olan IRE1 α 'nın pankreas kanseri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Araştırma, pankreas kanseri hücre hattı Panc-1 ile in vitro olarak yapıldı. Hücre hattı, hücre kültürü yöntemleri ile çoğaltıldı ve deney ilaçları olan gemsitabin, STF-083010 ve thapsigargin ile muamele edildi. IRE1 α inhibitörü olan STF-083010'un pankreas kanseri hücrelerinde sitotoksisite, apoptoz, hücre döngüsü, kaspaz 3/ 7 ve invazyon üzerindeki etkileri test edildi. Ayrıca hücre ölümü ve endoplazmik retikulum stresinin protein düzeyindeki etkilerine western blot deneyi ile bakıldı. Verilerin analizinde One Way Anova testi ve ikili karşılaştırma için ise Bonferroni testi kullanıldı.

Bulgular: STF-083010 için IC50 oranı 160 μ M, Gemsitabin için 4 mg/ ml olarak bulundu. Ayrıca düşük doz kemoterapi ile STF-083010 tedavisinin sinerjistik etki gösterdiğini bulduk. Kontrol grubunda %6,25 total apoptoz ve %5,42 nekroz saptanırken, gemsitabin grubunda %36,67 total apoptoz ve %3,1 nekroz, STF-083010 grubunda %34,97 total apoptoz ve %0,97 nekroz, Gemsitabin + STF-083010'de ise %43,52 total apoptoz ve %3,5 nekroz saptandı. Bu sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlıydı. Kaspaz 3/7 oranı ise kontrol grubunda %9,68 iken Gemsitabin grubunda %27,7, STF-083010 grubunda %26,12, Gemsitabin + STF-083010 %49,84 olarak bulundu. Western blot sonuçlarında ise pro-apoptotik Bak proteininde, kontrol ve gemsitabin grubuna kıyasla STF-083010 grubunda artış gözlemlendi. Ayrıca anjiyogenez belirteci VEGFR2'de kontrol ve gemsitabin grubuna kıyasla STF-083010 grubunda önemli bir azalış gözlemlendi. STF-083010'un anti-proliferatif etkisi aynı zamanda klonojenik deneyde de gözlemlendi. İnvazyon deneyinde, kontrol grubuna kıyasla STF-083010 ve gemsitabin + STF-083010 grubunda metastatik hücre miktarında azalış gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmada pankreas kanseri hücrelerinin ER stresi altında olduğu ve IRE1 inhibitörü STF-083010'un bu stresin hayatta kalma yanlısı yolağını inhibe ederek hücrelerin apoptoza girmesini sağladığı sonucuna ulaşıldı. Ayrıca tümör anjiyogenezinin (VEGFR2 bağlamında) pankreas kanseri hücrelerinde aktif olduğu, STF-083010 kullanımının VEGFR2 ekspresyonunda azalışa yol açarak anjiyogenezi inhibe edebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Pankreas Kanseri, Endoplazmik Retikulum Stresi, Katlanmamış Protein Cevabı, Apoptoz, İnvazyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF IRE1 α , THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS FACTOR, ON CELL DEATH IN PANCREATIC CANCER CELLS

Cetinkaya R. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Basic Oncology and Cancer Biology Program, Master's Thesis, Aydın, 2022.

Objective: In this study, it was aimed to determine the effects of IRE1 α , an endoplasmic reticulum stress factor, on pancreatic cancer.

Materials and Methods: The study was performed in vitro with the pancreatic cancer cell line Panc-1. The cell line was propagated by cell culture methods and treated with the experimental drugs gemcitabine, STF-083010 and thapsigargin. The effects of STF-083010, an IRE1 α inhibitor, on cytotoxicity, apoptosis, cell cycle, caspase 3/7 and invasion in pancreatic cancer cells were tested. In addition, the effects of cell death and endoplasmic reticulum stress at the protein level were examined by western blot test. One Way Anova test was used for data analysis and Bonferroni test was used for pairwise comparison.

Results: The IC₅₀ ratio was 160 μ M for STF-083010 and 4 mg/ml for Gemcitabine. We also found that low-dose chemotherapy and STF-083010 treatment showed a synergistic effect. While %6.25 total apoptosis and %5.42 necrosis were detected in the NT group, %36.67 total apoptosis and %3.1 necrosis in the gemcitabine group, %34.97 total apoptosis and %0.97 necrosis in the STF-083010 group, %43.52 total apoptosis and %3.5 necrosis were detected in Gemcitabine + STF-083010. These results were also statistically significant. Caspase 3/7 ratio was %9.68 in the NT group, %27.7 in the Gemcitabine group, %26.12 in the STF-083010 group, and %49.84 in Gemcitabine + STF-083010. Western blot results showed an increase in pro-apoptotic Bak protein in the STF-083010 group compared to the control and gemcitabine groups. In addition, a significant decrease in the angiogenesis marker VEGFR2 was observed in the STF-083010 group compared to the control and gemcitabine groups. The anti-proliferative effect of STF-083010 was also observed in the clonogenic assay. In the invasion experiment, a decrease in the amount of metastatic cells was observed in the STF-083010 and gemcitabine + STF-083010 groups compared to the control group.

Conclusion: In this study, it was concluded that pancreatic cancer cells are under ER stress and the IRE1 inhibitor STF-083010 inhibits the pro-survival pathway of this stress, causing cells to enter apoptosis. In addition, it was concluded that tumor angiogenesis (in the context of VEGFR2) is active in pancreatic cancer cells, and the use of STF-083010 may inhibit angiogenesis by causing a decrease in VEGFR2 expression.

Keywords: Pancreatic Cancer, Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, Apoptosis, Invasion

1. GİRİŞ

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK) hem erkeklerde hem de kadınlarda kanserden en sık ölüm nedenlerinden biridir (Siegel ve diğerleri, 2020). Hastaların %80'inden fazlası kanserin ileri bir aşamasında teşhis edilir ve ortalama 5 yıllık sağkalım oranı %5'in altındadır (Siegel ve diğerleri, 2020). Pankreas kanserinin önemli bir özelliği, tümör etrafındaki yoğun desmoplastik reaksiyondur ve bu durum terapötik ajanların verilmesini engellemektedir (Erkan ve diğerleri, 2012). Cerrahi rezeksiyon tek küratif seçenek olmasına rağmen, PDAK hastalarının %80'inden fazlasına, ortalama sağkalım 12-18 ay olan, rezeke edilemeyen hastalık tanısı konmaktadır (Thakur ve diğerleri, 2018). Tarihsel olarak, standart kemoterapi gemitabin veya 5-florourasilden oluşmaktaydı, ancak FOLFIRINOX ve nab-paklitaksel (nanotanecik albumin-bağlı paklitaksel) ile gemitabin içeren daha yeni kombinasyonlar hayatta kalmada artan iyileşmelerle ilişkilendirilmiştir (Conroy ve diğerleri, 2011; Von Hoff ve diğerleri, 2013). Başarılı tedavilerin olmaması, yeni terapötik seçeneklerin araştırılmasına ön ayak olmaktadır. Bu nedenle kemoterapötikleri ve endoplazmik retikulum (ER) stresini hedef alan ilaçları birleştirmek, yeni terapötik kombinasyonları keşfetmek için potansiyel bir yol olabilir.

ER, ökaryotik hücrelerde veziküler trafik, hücre içi kalsiyum homeostazı, sentez, katlanma, salgı ve zar proteinlerinin modifikasyonları dahil olmak üzere çok önemli biyosentetik ve sinyal işlevlerini yerine getirir (Berridge, 2002; Ron ve Walter, 2007). Bu işlemler, ER'de yerleşik şaperonlar ve GRP78 (HSPA5 veya BiP olarak da bilinir) gibi kalsiyum bağlayıcı proteinler tarafından desteklenir. Hipoksi, oksidatif stres ve glukoz yoksunluğu dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik koşullar, ER homeostazını bozabilir ve ER protein katlama yükü ve kapasitesi arasında bir dengesizliğe neden olarak, "ER stresi" olarak bilinen bir durum olan ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olabilir. Bu da, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan evrimsel olarak korunmuş, entegre bir sinyal iletim yolunu aktive eder (Walter ve Ron, 2011). UPR yolu, esasen ER'deki protein yükünü hafifleterek ve protein translasyonunu azaltarak ER homeostazını yeniden kurar. Bu, ER stres araçlarının üç farklı kolunun aracılık ettiği karmaşık bir transkripsiyonel program aracılığıyla gerçekleşir: IRE1 α /XBP1, PERK/EIF2 α ve ATF6. GRP78, UPR'nin çok önemli bir düzenleyicisidir ve normal fizyolojik durumda normal olarak IRE1 α 'ya bağlanır. ER stresi altında, IRE1 α 'nın oligomerizasyonuna ve trans-otofosforilasyonuna yol açarak IRE1 α 'yı serbest bırakır. Aktive edilmiş IRE1 α , XBP1 mRNA'yı aktif eklenmiş formuna (XBP1s) ayırır ve bu, otofaji veya

apoptoza yardımcı olan çeşitli UPR genleri için bir transkripsiyon faktörü haline gelir (Ron ve Walter, 2007).

Pankreas hücreleri yüksek hormon ve enzim salgılama işlevlerine sahiptir ve oldukça gelişmiş ER'ye sahiptir. Pankreas kanseri stroma açısından son derece zengindir, hipoksiktir ve metabolitler yetersizdir (Vasseur ve diğerleri, 2010). Tümör hücreleri, UPR gibi adaptif mekanizmaların aktivasyonunu destekleyen kronik metabolik stres koşullarıyla karşı karşıyadır (Moenner ve diğerleri, 2007). ER stresinin pankreas kanseri patobiyolojisinde ve inflamasyondaki rolü, tümörigenez ve kemorezistansta giderek daha önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (Yadav ve diğerleri, 2014). Ayrıca, belirli anti-kanser terapötikleri, ER stresini kronik olarak aktive edebilir ve bu tür bir ilaca bağlı ER stresi, kanser hücrelerinin hayatta kalma yanlısı tepkisine yol açar, bu da sonuç olarak tümörlerin belirli kemoterapötiklere tepkisizlik geliştirmesine izin verir (Avril ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, UPR'nin dinamikleri potansiyel terapötik hedefler sunar.

GRP78 ve diğer UPR sinyallerini hedeflemeye dayalı tedavinin tümörlerin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Chiu ve diğerleri, 2013; Ma ve diğerleri, 2014). ER stresini aktive eden ilaçlar kanserlerin klinik tedavisi için kullanılmıştır. Bir proteozom inhibitörü olan Bortezomib'in, ER stresini indüklediği ve multipl myelomda terapötik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Gambella ve diğerleri, 2014; Ling ve diğerleri, 2012). Bortezomib ayrıca pankreas kanseri hücrelerinde ER stresini indükler ve bu kanser hücrelerinde UPR'yi baskılar (Nawrocki ve diğerleri, 2005). Bortezomib ayrıca sisplatin ile sinerji oluşturarak, CHOP ve BiP / GRP78'in artmış ekspresyonu yoluyla pankreas kanseri hücrelerinde artmış ER stresinin aracılık ettiği apoptoza neden olur.

Pankreas kanseri hücre ölümünü indüklemek için bir başka yaklaşım, UPR'nin onarımını inhibe etmektir. Örneğin, bir IRE1 α inhibitörü STF-083010 (STF) (N-[(2-Hidroksi-1-naftalenil) metilen]-2-tiyofensülfonamid) ve 2-Hidroksi-1-naftaldehit (HNA), XBP-1 splicing'ini bloke ederek, XBP-1 ekspresyonunu düşürür ve kronik lenfositik lösemi (KLL) hücrelerinde apoptoza neden olur (Kriss ve diğerleri, 2012). Dahası, multipl myelomda, toyokamisın tarafından IRE1 α -XBP-1s yolağının inhibisyonu, apoptozu indüklemek için bortezomib ile sinerji oluşturmuştur (Ri ve diğerleri, 2012). Ek olarak, yüksek verimli tarama, salisilaldimin analoglarını IRE1 α endonükleaz aktivitesinin güçlü inhibitörleri olarak tanımladı (Volkman ve diğerleri, 2011). Bir salisilaldimin analogu, 3-Etoksi-5,6-dibromosalisilaldehit (3ETH), hem in vitro hem de in vivo bir murin modelinde myelom hücrelerinde XBP-1 splicing'ini inhibe eder.

Dikkat çekici bir şekilde, pankreas kanserleri için tümör mikro ortamı stroma açısından son derece zengin, hipoksik ve metabolitlerden yoksundur (Vasseur ve diğerleri, 2010). Bu özellikleri sebebiyle pankreas tümörleri ER stresine ve UPR aktivasyonuna yatkın bir haldedir. Hızla büyüyen bu hipoksik tümörlerde UPR'nin dinamikleri potansiyel tedavi seçeneği sunmaktadır. Yapılan diğer çalışmaların ışığında yaptığımız çalışmada pankreas kanserlerinin ER stresi altında olduğunu varsayıyoruz ve bu hücrelerin bu strese karşı koruyucu mekanizmasını IRE1 α inhibitörü ile inhibe ederek pankreas kanseri hücrelerinin apoptoza maruz kalmasını bekliyoruz. Ayrıca thapsigargin ile indüklenen yoğun ER stresi ortamında IRE1 inhibitörünün bu etkileri tersine çevireceğini düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Pankreas

Pankreas, hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyona sahip glandüler bir organdır (Röder ve diğerleri, 2016). Genel amacı, kan glukoz seviyelerini düzenleyen hormonların yanı sıra sindirime yardımcı olan enzimler üreterek metabolik homeostazı korumaktır. Pankreas, endodermal germ tabakasının embriyonik ön bağırsağından elde edilir (Gittes, 2009). Embriyonik gelişim sırasında, ön bağırsaktan dorsal ve ventral pankreası oluşturan iki tomurcuk çıkar. Bu tomurcuklar genişledikçe temas edip birleşerek olgun pankreası oluşturana kadar yavaş yavaş yeniden konumlanırlar. Pankreas progenitör hücreleri, asiner, endokrin veya duktal işlev görür. Endokrin hücreler (α , β ve δ), kan şekeri düzeylerini modüle etmek için insülin, glukagon ve somatostatin gibi hormonları dolaşım sistemine salgılar (Röder ve diğerleri, 2016). Bu homeostatik fonksiyon, çeşitli doku ve organların metabolik taleplerinin karşılanmasını sağlar. Kanallardaki asiner hücreler, pankreas kanalına tripsinojen, kimotripsinojen, lipaz ve amilaz gibi enzimler salgılar (Keller ve Layer, 2005). Bu enzimler daha sonra ince bağırsağa girerek proteinler, karbonhidratlar ve lipidler gibi çeşitli diyet makromoleküllerinin sindirimine yardımcı olurlar.

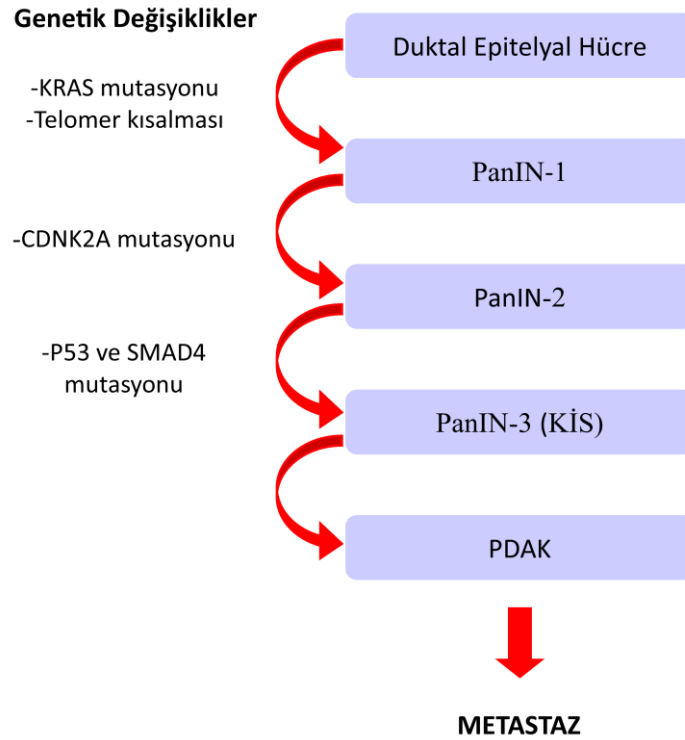
Pankreas disfonksiyonu diabetes mellitus, pankreatit ve kanser gibi bir dizi yaygın hastalığa yol açabilir (Braganza ve diğerleri, 2011; Hezel ve diğerleri, 2006; Polonsky, 2012). Diabetes mellitus (DM) bu hastalıkların en yaygın olanıdır. Bununla birlikte, pankreas kanseri açık ara en ölümcül olanıdır ve etiyolojisi genellikle diyabet de dahil olmak üzere diğer pankreas bozukluklarıyla bağlantılıdır. Pankreas kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir ve özellikle kötü bir prognozla ilişkilidir (Siegel ve diğerleri, 2020). Bu hastalığa yakalanan hastalar, altı aydan daha kısa bir medyan genel sağkalım ve kabaca %8'lik bir beş yıllık sağkalım oranı sergiler. Pankreas kanseri ile ilişkili kötü prognoz, kısmen kötü erken teşhis yöntemlerine bağlanmaktadır (Lennon ve diğerleri, 2014). Hastalar genellikle hastalık tüm vücuda yayılana kadar asemptomatik kalır. Ek olarak, pankreas kanserini tedavi etmek için kullanılan terapötikler, hastanın sağkalımını birkaç aydan fazla uzatmadıkları için nispeten etkisizdir (Garrido-Laguna ve Hidalgo, 2015). 2030 yılına kadar Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni

olması beklendiğinden, bu zorlukların üstesinden gelmek hastalığın gelecekteki tedavisinde kritik olacaktır (Rahib ve diğerleri, 2014).

Pankreas kanserleri, endokrin veya ekzokrin hücrelerden kaynaklanabilir. Böylece endokrin ve ekzokrin tümörler histolojik görünüm ile ayırt edilebilir. Endokrin tümörler nispeten nadirdir ve tüm pankreas kanserlerinin %5'inden azını oluşturur. Çok daha yaygın pankreas adenokarsinomu ile karşılaştırıldığında, 27 aylık bir medyan sağkalım ve 0.28 kat daha düşük ölüm riski ile ilişkilidirler (Fesinmeyer ve diğerleri, 2005). Endokrin tümörleri genellikle pankreas adacık hücrelerinden türetilir ve sıklıkla yapısal olarak yüksek seviyelerde pankreas hormonları üretir. Orijin hücrelerine ve salgıladıkları hormonlara bağlı olarak insülinomalar, glukagonomlar ve gastrinomalar olarak daha fazla kategorize edilebilirler. Pankreas endokrin tümörleri, hipoglisemi veya nekrolitik göçmen eritem (deri döküntüsü) gibi semptomlara yol açan aşırı hormon salgılamaları nedeniyle kolayca teşhis edilebilir (Phan ve diğerleri, 1998). Ekzokrin hücrelerden türetilen pankreas kanserleri, endokrin tümörlerden çok daha yaygındır ve tipik olarak iki histolojik alt tipe sınıflandırılabilir. Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK) alt tipi, ekzokrin tümörlerin çoğunluğunu oluşturur ve tüm pankreas malignitelerinin %90'ından fazlasını oluşturur. PDAK'lar, pankreas kanalını kaplayan ve kökenleri nedeniyle bez benzeri görünen epitel hücrelerinden türetilir (Fesinmeyer ve diğerleri, 2005). Bu kanserler sıklıkla karaciğere veya lenf düğümlerine metastaz yapar (Kern ve diğerleri, 2002). Kanser gelişiminin erken evrelerinde semptomlarının olmaması nedeniyle, PDAK'lar genellikle kanser metastaz yaptıktan sonra ve geç bir aşamada teşhis edilir. Sonuç olarak, kansere karşı terapötikler, ilaç direncini artıran güçlü sitoprotektif mekanizmalar nedeniyle etkisiz kalmaktadır. Bu saldırganlık ve ilaç direnci nedeniyle, PDAK için tahmini medyan sağkalım 4 ay kadar kısa olabilmektedir (Fesinmeyer ve diğerleri, 2005).

PDAK'lardan önce, prekanseröz olan ve kansere dönüşme eğilimi sergileyen pankreas intraepitelyal neoplazileri (PanIN'ler) ve intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar (IPMN'ler) olarak bilinen hiperplastik lezyonların gelişimi gelir (Şekil 1). IPMN'ler, pankreas kanalına uzanan papilla (parmak benzeri yapılar) gibi görünür (Hruban ve diğerleri, 2001). Müsinöz tümörler, pankreas kanserinin ikinci en yaygın histolojik alt tipidir ve vakaların %10'undan azını oluşturur. Bu tümörler genellikle tanı anında adenokarsinomlardan çok daha az invazivdir ve karşılaştırmaya göre 0,88 kat daha düşük mortalite riskine sahiptir (Fesinmeyer ve diğerleri, 2005). Müsinöz tümörler de pankreas duktal epitelinden kaynaklanır, ancak hücrelerin içinde ve çevresinde görülebilen müsin salgılayarak "yüzer" gibi görünmelerine neden olur (Hruban ve diğerleri, 2004). Farklılaşmamış ve karaciğer kanserlerine benzeyen asiner hücrelerden

kaynaklananlar gibi pankreas kanserinin başka birçok alt tipi vardır. Ancak, bu alt tipler nadirdir.



Şekil 1. Pankreas kanseri progresyon modeli. Grant ve diğerlerinden esinlenerek yeniden çizilmiştir (Grant ve diğerleri, 2016).

2.1.1. Pankreas'ın Yapısı ve Morfolojisi

Pankreas, ön bağırsak (dorsal ve ventral tomurcuklar) endodermindeki ortak bir multipotent hücre popülasyonundan gelişir. Ekzokrin ve endokrin pankreas, Pdx1, Ptf1a ve Sox9'u ifade eden ortak bir progenitör hücre popülasyonundan kaynaklanır. Ngn3, NeuroD, Hnf6 ve Pax4 gibi diğer faktörlerin varlığında bu hücreler, endokrin pankreasın proliferasyonuna ve farklılaşmasına katkıda bulunur. Proendokrin faktörlerin ve Ptf1a ve Mist1 gibi transkripsiyon faktörlerinin yokluğu, ekzokrin pankreas gelişimine yol açar (Benitez ve diğerleri, 2012; Reichert ve Rustgi, 2011). Genel olarak, Hedgehog, Notch ve Wnt ile ilişkili yollar, pankreasın gelişimi, farklılaşması ve çoğalmasında kritik roller oynar. Ekzokrin pankreas, doğumda morfolojik olarak olgunlaşır, ancak çoğu hayvanda süttten kesimde fonksiyonel olgunluğa ulaşır (Walthall ve diğerleri, 2005).

Ekzokrin pankreas bileşeni, pankreas kütlelerinin ~ %90'ını oluşturur ve asiner, sentroasiner ve duktal hücrelerden oluşur. Langerhans'ın endokrin bileşen adacıkları pankreasın yaklaşık %1-2'sini oluşturur ve kan damarları, lenfatikler, sinirler ve fibröz bağ dokusu stroması ile interstisyum pankreasın diğer kısımlarını oluşturur. Pankreas, bezin çok sayıda asini içeren lobüllere bölünmesiyle sonuçlanan septa oluşturan ince bir gevşek bağ dokusu tabakası ile kaplıdır. Ekzokrin pankreas asinin organizasyonunu açıklamak için iki model önerilmiştir. Bunlardan biri, Takahashi tarafından desteklenen ve lobüllerin, kanallarla birbirine bağlanmış üzüm benzeri kümeler halinde düzenlendiği asiner modeldir. Diğeri, Bockman tarafından desteklenen, lobüllerin anastomoz yapan tübüllerden oluşan bir ağdan tomurcuklandığı retiküler modeldir (Bockman, 1976; Takahashi, 1984).

İnsan pankreası, ortalama olarak 100-150 g ağırlığında ve 15-25 cm uzunluğunda olan üst karın bölgesinin retroperitoneal bir organıdır. Pankreas ana pankreas kanalının ana safra kanalıyla birleştiği ampulla Vater yoluyla duodenuma günde yaklaşık bir kilogram pankreas suyu salgılar. Anatomik olarak pankreas, dalak, mide, oniki parmak bağırsağı ve kolon dahil olmak üzere diğer karın organları ile bağlantılıdır. Pankreas yapısal olarak baş, gövde ve kuyruk olarak adlandırılan üç bölüme ayrılmıştır (Beger ve diğerleri, 2018). Pankreasın baş bölgesi düzdür ve duodenumun ilk halkası içinde yer alır. Kuyruk bölgesi dalak hilusuna yakındır ve pankreas polipeptit (PP) hücrelerini içeren pankreasın tek parçasıdır (Beger ve diğerleri, 2018). Pankreasın gövde bölgesi ise prizmaya benzeyen bir şekle sahiptir. Pankreasın kanlanması birkaç ana artere, yani alt pankreatikoduodenal arter, üst pankreatikoduodenal arter ve splenik artere bağlıdır. Metabolitlerin pankreastan uzaklaştırılması ve hormon salınımı sırasıyla pankreatikoduodenal ven ve pankreatik ven aracılığıyla gerçekleşir. Pankreas, pankreas pleksus, çölyak ganglionları ve vagus siniri tarafından yüksek oranda innerve edilir (Beger ve diğerleri, 2018).

Pankreasın endokrin ve ekzokrin rolleri, farklı olmakla birlikte, birbiriyle yakından ilişkili fizyolojik işlevlere sahiptir. Pankreas, yapısal olarak farklı dört bileşen olarak düşünülebilir: birincisi asiner hücreler ve kanal hücrelerinden oluşan ekzokrin pankreas; ikincisi adacık hücrelerinin yeri olan endokrin pankreas; üçüncüsü kan damarları; ve dördüncüsü ise ekstraselüler boşluk. Başlıca işlevi sindirim enzimi ve sodyum bikarbonat salgısı üretmek olan ekzokrin kısım, pankreasın hücresel kütlelerinin çoğunu (yani hacimce yaklaşık %80'ini) oluşturur. Ekzokrin pankreas mimarisi, yapısal olarak büyük bir üzüm salkımına benzeyen kör uçlu bir kanal sistemi ile karakterize edilir. Asini, dallanmış bir tübül ağı ile lobüller halinde gruplandırılmıştır. Her bir asinüs, apikal zarları hücreler arası kanalikül olarak bilinen merkezi

bir lümeni kaplayan ve bazolateral zarları asiner periferi oluşturan yüksek oranda yönlendirilmiş, piramidal şekilli asiner hücrelerden oluşur (Leung ve Ip, 2006). Asiner hücre salgıları, esas olarak sodyum bikarbonat formunda bikarbonat salgılayan kanal hücreleri olarak da bilinen duktal epitel hücrelerinden oluşan hücreler arası kanaliküllere akar (Leung ve Ip, 2006). Acini'yi drene eden küçük interkalasyonlu kanallar daha büyük intralobüler kanallarda birleşir ve bunlar daha sonra büyük ekstralobüler kanalda birleşir. Ekstralobüler kanallar nihayet ana toplayıcı kanalda birleşir ve bu kanal pankreas özsuyu duodenuma girmeden önce koledok ile birleşir (Leung ve Ip, 2006).

2.1.2. Pankreas Anatomisi

Pankreas, arka karın duvarındaki L1 ve L2 omurlarının gövdelerini geçen, retroperitoneal olarak bulunan genişletilmiş, yardımcı bir sindirim bezidir. Pankreas, sağda onikiparmak bağırsağı ile solda dalak arasında üst karın bölgesinde enlemesine uzanır. Baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere dörde ayrılır. Baş, inferior vena kava ve renal vena uzanır ve duodenumun C halkası ile çevrilidir. Pankreasın kuyruğu dalak hilusuna kadar uzanır. Pankreas bir ekzokrin sekresyonu (asiner hücrelerden pankreas suyu) üretir ve daha sonra kana giren ana ve yardımcı pankreas kanalları ve endokrin sekresyonları (Langerhans'ın pankreas adacıklarından glukagon ve insülin) yoluyla duodenuma girer (Talathi ve diğerleri, 2021).

Pankreasın başı, onikiparmak bağırsağının C şeklindeki eğrisi ile çevrili bezin genişlemiş kısmıdır. Oniki parmak bağırsağının inen kısmına giderken safra kanalı, başın posterosuperior yüzeyindeki bir olukta uzanır. Pankreasın gövdesi boyundan devam ederek aort ve L2 omurunun üzerinden geçer. Pankreas gövdesinin ön yüzeyi periton ile kaplıdır. Vücudun arka yüzeyinde periton yoktur ve aort, superior mezenterik arter (SMA), sol böbrek üstü bezi, sol böbrek ve böbrek damarları ile temas halindedir (Talathi ve diğerleri, 2021).

Pankreasın boynu nispeten daha kısadır. Pankreasın kuyruğu sol böbreğin önünde yer alır ve burada dalak hilusu ve sol kolik fleksurayla yakından ilişkilidir. Pankreas salgılarını taşıyan ana pankreas kanalı, duodenumun inen kısmına açılan hepatopankreatik ampulla oluşturmak için safra kanalı ile birleşir. Hepatopankreatik ampulla etrafındaki Oddi'nin hepatopankreatik sfinkteri, safra ve pankreas suyunun ampulla içine akışını kontrol eden ve duodenal maddelerin ampulla içine geri akışını engelleyen düz kas sfinkteridir (Talathi ve diğerleri, 2021). Pankreasın çoğunluğu (yaklaşık %80'i) asiner hücreleri içeren ekzokrin pankreastan oluşur.

Bunlar apikal bölgede yoğun zimojen granülleri içerirken, bazal bölge çekirdeği ve endoplazmik retikulumu (sindirim enzimlerinin sentezlenmesine yardımcı olan) içerir. Bu enzimler, Golgi kompleksi adı verilen salgı keseciklerinde depolanır. Asiner hücrelerin bazolateral membranı, sindirim enzimlerinin ekzositozunu düzenleyen sekretin, kolesistokinin, asetilkolin dahil olmak üzere nörotransmitterler için çeşitli reseptörler içerir. Pankreas ayrıca endokrin hücrelerini içeren Langerhans adacığını da içerir. Ekzositoz tarafından salgılanan ekzokrin enzimlerin aksine, endokrin enzimler kan dolaşımına pankreas kan akışı içindeki kompleks bir kılcal ağ yoluyla girer. 4 tip endokrin hücre vardır (A hücreleri glukagon üretir, B hücreleri insülin üretir, D hücreleri somatostatin üretir ve F hücreleri pankreas polipeptidi üretir). Stelat hücreleri, pankreas içinde doğrudan epitel yapılarının oluşumudur. Kronik pankreatit gibi durumlarda, bu hücreler iltihabı ve fibrozu teşvik eder (Talathi ve diğerleri, 2021).

2.2. Pankreas Kanseri

Normal pankreas, sindirim enzimleri salgılayan asiner hücreler, bikarbonat salgılayan duktal hücreler, asiner ve duktal hücreler arasındaki geçiş bölgesi olan sentro-asiner hücreler, hormon salgılayan endokrin adacıklar ve nispeten inaktif stelat hücrelerden oluşur. Pankreasın malign neoplazmalarının çoğunluğu adenokarsinomlardır; Nadir pankreas neoplazmaları arasında nöroendokrin tümörler (insülin veya glukagon gibi hormonlar salgılayabilen) ve asiner karsinomlar (sindirim enzimlerini dolaşıma salabilen) bulunur. Daha az yaygın olan neoplazmalar arasında kolloid karsinomlar, pankreatoblastomlar ve katı-psödopapiller neoplazmalar bulunur. Spesifik olarak, PDAK pankreasın en yaygın malignitesidir. Pankreas kanseri şu anda gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin dördüncü en yüksek nedenidir ve sonuçlar iyileştirilmezse, hastalığın önümüzdeki on yıl içinde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir (Rahib ve diğerleri, 2014). Tütün içimi, tip 2 DM ve kronik pankreatit gibi risk faktörleri, vakaların yaklaşık dörtte biri ila üçte birini oluşturur.

Pankreas kanseri, birkaç nedenden dolayı son derece kötü bir prognozla ilişkilidir (Siegel ve diğerleri, 2020). Genellikle spesifik olmayan semptomlar ve hatta bazı durumlarda semptom olmaması, hassas ve spesifik tümör belirteçlerinin eksikliği ve erken evre tümörlerin görüntülenmesindeki zorluklar nedeniyle ileri evrelerde teşhis edilir. Pankreas kanseri, perinöral ve vasküler lokal büyüme ve çoğu hastada küratif cerrahi rezeksiyona engel olan

erken uzak metastazlarla agresif bir fenotip sergilemektedir. Pankreas kanseri, kemoterapi, radyoterapi ve moleküler hedefli tedavi dahil olmak üzere çoğu geleneksel tedavi seçeneğine dikkate değer bir direnç (veya tolerans) ile karakterize edilir. Son olarak, pankreas kanseri, çoklu genetik ve epigenetik değişiklikleri barındırır ve karmaşık, yoğun tümör mikroçevrelerine sahiptir.

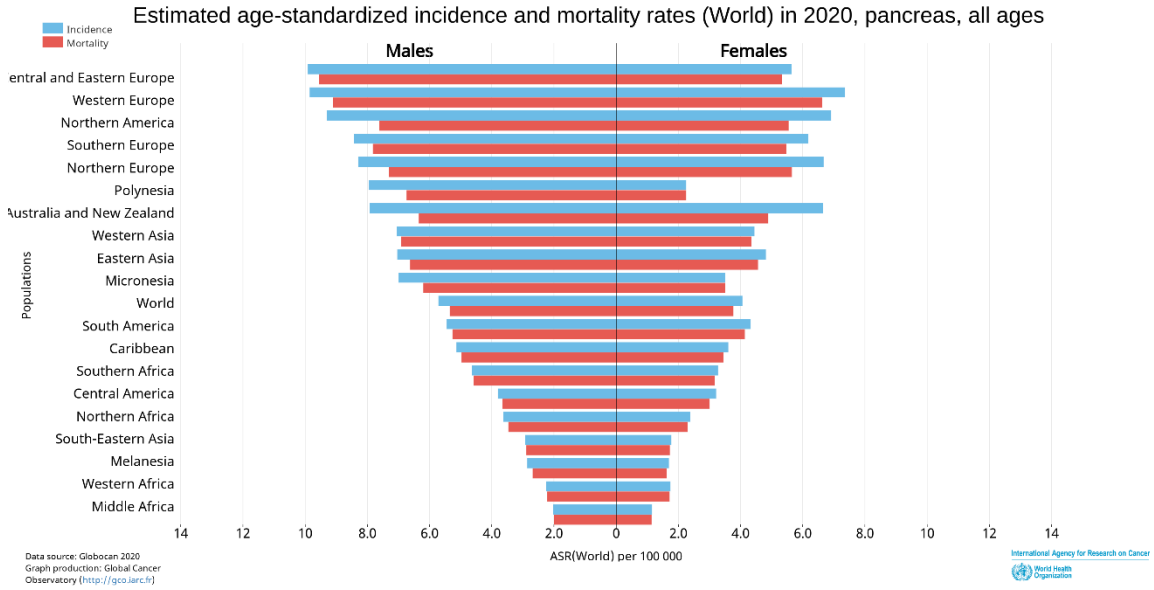
Pankreas kanserinde erken teşhis önemli bir konu olmayı sürdürmektedir. Pankreatik intraepitelyal neoplazi, intraduktal papiller müsinöz neoplazmalar ve müsinöz kistik neoplazmalar gibi malignite öncesi durumları saptamak için taramadan fayda görebilecek yüksek riskli hastaların belirlenmesi gerekmektedir, ancak kabul edilebilir bir tarama testi henüz tanımlanmamıştır (McGuigan ve diğerleri, 2018). Pankreas adenokarsinomunun tedavisi, yeni cerrahi tekniklerin ve laparoskopik teknikler ve neo-adjuvan kemoradyoterapi gibi tıbbi tedavilerin tanıtılmasıyla gelişmektedir, ancak bu, sonuçlarda yalnızca mütevazı gelişmelere yol açmıştır. Yeni biyobelirteçlerin tanımlanması, pankreas kanseri tedavisinin bireysel hastaya göre ayarlanabileceği ve yaşam kalitesi üzerinde olumsuz sonuçları olan gereksiz tedavilerin önlenebileceği hassas bir tıp çağına doğru ilerlemektedir. Araştırma çabaları ayrıca yeni araçların ve dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Genel olarak, pankreas kanseri ile ilişkili yükü azaltmak için önemli ilerleme gereklidir. Büyük konsorsiyumları ve pankreas adenokarsinomu araştırmalarını finanse etmek için yakın zamanda yenilenen çabalar memnuniyetle karşılanmaktadır.

2.2.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri insidansı bölgelere ve popülasyonlara göre değişkenlik göstermektedir (Şekil). 2020'de dünya çapında 495.773 yeni pankreas kanseri vakası kaydedilmiş ve tüm kanserlerin %3,2'sini temsil ettiği saptanmıştır (GCO, 2021; NIH, 2021). Yaşa göre standartlaştırılmış oran (ASR) insidansı en yüksek Avrupa (100.000 kişi başına 7.8) ve Kuzey Amerika'da (100.000 kişi başına 8.0), ardından Okyanusya'da (100.000 kişi başına 6.6) idi. En düşük oran, tahmini 100.000 kişide 2,3 insidansla Afrika'da gözlendi (GCO, 2021). En yüksek orandaki popülasyonlar (Macaristan: 11.2) ve en düşük oranlı popülasyonlar (Malawi: 0.63) arasında insidans oranlarındaki farklılıklar yaklaşık 18 kat idi (GCO, 2021).

Pankreas kanseri, dünyada en yaygın 15. kanser ve kanser ölümlerinin 9. en yüksek nedeni olarak sıralanmaktadır. Globocan tahminleri, 2025'de küresel olarak pankreas

kanserinden 572.329 tanı ve 539.007 ölüm olacağını 2030'da ise 657.584 tanı ve 620.818 ölüm olacağını ortaya koymaktadır (GCO, 2021). Şekil 2' de gösterildiği gibi, insidans oranları ülkeler arasında önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Yaşa göre standartlaştırılmış en yüksek insidans Avrupa ve Kuzey Amerika'da, en düşük ise Afrika ve Güney Orta Asya'da görülmektedir (GCO, 2021). Gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere kıyasla daha yüksek insidans oranlarına genel bir eğilim vardır.



Şekil 2. 2020'de tahmini yaşa göre standardize insidans ve mortalite oranları (GCO, 2021).

Pankreas kanseri için uluslararası ölüm oranları dünyada önemli ölçüde değişmektedir (Şekil 2b). 2018'de en yüksek ölüm oranları Batı Avrupa (100.000 kişi başına 7.8), Orta ve Doğu Avrupa'da (7.1), ardından Kuzey Avrupa (6.6) ve Kuzey Amerika'da (6.5) kaydedildi (GCO, 2021). En düşük oran Güney-Orta Asya (1.1) ve Orta Afrika (1.5) ülkelerinde bildirilmiştir. Ölüm oranlarındaki farklılıklar, en yüksek ve en düşük orana sahip popülasyonlar arasında yaklaşık 16 kat idi (Macaristan: 10,2'ye karşı Malawi: 0,62). 2020'de pankreas kanserine bağlı ölümlerin çoğu (182.074'ü) Batı Pasifik'te meydana gelirken, ikinci en çok ölüm Avrupa'da (145.010'u) kaydedildi. Pankreas kanserinin hem erkek hem de kadınlarda ölüm oranı yaşla birlikte artar ve tüm ölümlerin neredeyse %90'ı 55 yaşından sonra meydana gelmektedir (GCO, 2021).

2.2.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin en önemli belirleyicisi yaştır. Hastaların çoğuna >50 yaşlarında tanı konur ve en yüksek insidans yaşamın yedinci ve sekizinci dekatlarındadır. Önlenebilir risk faktörleri açısından tütün kullanımı en önemli ve en çok çalışılmıştır. Sigara içenlerde içmeyenlere göre pankreas kanseri gelişme riski iki ila üç kat daha fazladır; sigarayı bırakmanın olumlu bir etkisi olduğu gibi bir doz-risk ilişkisi kaydedilmiştir. Tütün içiciliğine atfedilebilen vakaların oranının çeşitli popülasyonlarda %15-30 olduğu tahmin edilmektedir (Bosetti ve diğerleri, 2012; Parkin, 2011; Whiteman ve diğerleri, 2015).

Obezite ve düşük fiziksel aktivitenin de pankreas kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Behrens ve diğerleri, 2015; Genkinger ve diğerleri, 2015). Yüksek (doymuş) yağ alımı, düşük sebze ve meyve alımı, kırmızı ve işlenmiş et tüketimi gibi bazı beslenme ve diyet faktörleri de riskle ilişkilidir (Bosetti ve diğerleri, 2013a; Larsson ve Wolk, 2012). Bununla birlikte, diğer diyet faktörleri tanımlanmamış ve nicelleştirilmemiştir.

Ayrıca, ağır alkol tüketimi ile pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir, ancak orta düzeyde alkol tüketimi ile böyle bir ilişki gösterilememiştir (Lucenteforte ve diğerleri, 2012). Ağır alkol tüketimi, pankreas kanseri riskini on kattan fazla artıran kronik pankreatit ile ilişkili olabilir ve pankreatitin alkollü ve alkolsüz formları arasında atfedilebilir risk açısından çok az fark vardır.

Diabetes mellitus hem hastalık için bir risk faktörüdür hem de erken evre pankreas kanserinin bir sonucudur; uzun süreli diabetes mellitus, pankreas kanseri riskini yaklaşık olarak iki katına çıkarır (Bosetti ve diğerleri, 2014). Diabetes mellitusa pankreas kanseri de (tip 3c diabetes mellitus) neden olabilir ve buna bağlı olarak yeni başlangıçlı diabetes mellitus, yaşlı hastalarda pankreas kanseri tanısı için ilk ipucu olabilir (Bosetti ve diğerleri, 2014). Gastrointestinal ülser ve gastrektomi, pankreas kanseri riskinde ılımlı bir artış ile ilişkilidir, ancak modern çağda genel hastalık yükü üzerinde sınırlı bir etkiye sahiptir (Bosetti ve diğerleri, 2013b).

Pankreas kanseri hastaların %10'unun ailesinde pankreas kanseri öyküsü vardır (Turati ve diğerleri, 2013). Gerçekten de, Peutz-Jeghers sendromu gibi bazı kalıtsal koşullar pankreas kanseri riskini artırmaktadır. BRCA2, BRCA1, CDKN2A, ATM, STK11, PRSS1, MLH1 ve PALB2'deki mutasyonlar, değişken penetranslı pankreas kanseri ile ilişkilidir ve ABO kan grubu lokusu gibi orta düzeyde risk sağlayan yaygın varyantlar da tanımlanmıştır (Rizzato ve diğerleri, 2013).

Cinsiyet de pankreas kanseri risk faktörleri arasında yer almaktadır. Dünya çapında pankreas kanseri insidansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir (Kadınlarda 4.0'a kıyasla erkeklerde yaşa göre standardize edilmiş oran 5.5) (GCO, 2021). Bu eşitsizlik, yüksek gelişmişlik indeksi olan ülkelerde daha fazla görünmektedir (GCO, 2021). Cinsiyet farklılığına rağmen, 15 çalışmanın sistematik bir incelemesi, kadınlarda üreme faktörlerinin pankreas kanseri ile ilişkili olmadığı sonucuna varmıştır (Wahi ve diğerleri, 2009).

Pankreas kanserinde bağırsak mikrobiyotasının rolünü inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan sistematik bir incelemede, düşük *Neisseria elongate* ve *Streptococcus mitis* düzeylerinin ve daha yüksek *Porphyromonas gingivalis* ve *Granulicatella adiacens* düzeylerinin, pankreas kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Memba ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte, bu bulguları doğrulamak ve ayrıca hedefe yönelik tedavinin terapötik bir olasılık olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.2.3. Pankreas Kanseri Karsinogenezi ve Patogenezi

Solid kanserin moleküler mekanizmaları, hastalığın farklı aşamalarında meydana gelen ve dokuyu etkileyen farklı mekanizmalarla çok karmaşıktır. Pankreas kanserinin başlaması, gelişmesi ve ilerlemesinin ayrıntılı moleküler mekanizmaları, hastalığın temel prensiplerinin 1970'lerde ve 1980'lerde ortaya çıkmasından bu yana kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Zavoral ve diğerleri, 2011). Pankreas kanseri gelişiminin klasik modeli, öncü lezyonlardan invaziv karsinomaya morfolojik ve moleküler dönüşümleri tanımlamaktadır (Hruban ve diğerleri, 2000).

Pankreas adenokarsinomu, normal mukozadan spesifik öncü lezyonlara ve sonuçta invaziv maligniteye kadar bir dizi aşamalı mutasyonu takiben gelişir (Mohammed ve diğerleri, 2014). Bu malignitenin en iyi karakterize edilen üç öncüsü, pankreas intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplazmalar (IPMN) ve müsinöz kistik neoplazmalardır (MCN) (Esposito ve diğerleri, 2014). Bunların her biri benzersiz klinik, patolojik ve moleküler özelliklere sahiptir.

Kanal lezyonlarının sınıflandırılması için standart isimlendirme ve tanı kriterleri, temel olarak pankreas içi epitelyal neoplazi (PanIN) derecelerine dayanmaktadır (Hruban ve diğerleri, 2001). Her PanIN aşaması (1A, 1B, 2 ve 3,) belirli genleri ve genetik yolları etkileyen genetik düzensizliklerle karakterize edilen moleküler süreçleri tanımlamaktadır.

PanIN modelinde, genetik değişiklikler, hücre büyümesi, hücre bölünmesi, apoptoz ve göç gibi tüm moleküler sistemlerin kararsızlığını indükleyen hücrel sinyallemenin kilit koruyucularını etkileyen temel bir role sahiptir. Onkogenik mutasyonların baskın bir karakteri vardır; bu nedenle, bir alel eksikliği (yani heterozigot mutasyon) ölümcül bir sonuç için yeterlidir. KRAS, CTNNB1 (β -catenin), PIK3CA veya AKT1 dahil olmak üzere pankreas kanseri oluşumunda rol oynayan birkaç anahtar proto-onkogen vardır (Zavoral ve diğerleri, 2011). Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar ise, çekinik bir karaktere sahiptir; bu nedenle, hücre yalnızca her iki alel de etkilendiğinde işlevini kaybeder. Pankreas kanserinde, sıklıkla etkilenen tümör baskılayıcılar arasında TP53, APC, SMAD4 ve TP16 bulunur (Zavoral ve diğerleri, 2011).

C-MET / HGF (hepatosit büyüme faktörü) sinyal yolu, pankreas kanserinin erken ilerlemesinde anahtar faktördür. Yol, anahtar onkogenlerin aktivasyonu, anjiyogenez ve saçılma (hücre ayrışması ve metastaz) yoluyla invaziv büyümeden sorumludur. c-MET, embriyonik gelişim ve yara iyileşmesinde birincil işlevi olan bir HGF reseptörünü kodlayan bir proto-onkogendir (Chmielowiec ve diğerleri, 2007). C-MET mRNA normal insan ekzokrin pankreasında çok düşük seviyelerde bulunmasına rağmen, pankreas kanserlerinin çoğunda (Ebert ve diğerleri, 1994) ve pankreatitten etkilenen epitel hücrelerinde yukarı regüle edilir (Yu ve diğerleri, 2006). C-MET'in aşırı ekspresyonu, akut pankreatitten etkilenen rejenere dokuda da gözlenir ve pankreas karsinogenezinde erken bir olay olarak görülür (Yu ve diğerleri, 2006).

Ras / Raf / mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu, kanserde en çok çalışılan ve en iyi tarif edilen sinyal yollarından biridir (Molina ve Adjei, 2006). Fosforillenmiş MAPK1/ERK2 çekirdeğe transloke olarak çeşitli transkripsiyon faktörlerini fosforile eder ve pankreas kanserinin malign fenotiplerinde önemli roller oynadığı düşünülen aşağı akış genlerinin ekspresyonunu indükler (Brunet ve diğerleri, 1999; Furukawa ve diğerleri, 2006).

PTEN / PI3K / AKT, temelde hücre membranındaki lokalizasyonu yoluyla AKT onkojeninin düzenlenmiş aktivasyonuna dayanan önemli bir sinyal yolağıdır (Carnero ve diğerleri, 2008). AKT'nin membran lokalizasyonunda yer alan iki önemli protein ailesi PI3K ve PTEN fosfatazlardır. PI3K, fosfoinositidler olarak bilinen bazı zara bağılı lipidleri fosforile edebilir. PI3K aracılı fosforilasyon, fosfatidilinositol 3-fosfat (PIP), fosfatidilinositol (3,4) -bifosfat (PIP2) ve fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfat (PIP3) üreten üç aşamada ilerleyebilir. Fosforile formlar, PIP3 ve daha az ölçüde PIP2, önemli protein kinazları hücre membranına çeker. En belirgin olanı, glikoz metabolizması, hücre proliferasyonu, apoptoz, transkripsiyon ve hücre göçü dahil olmak üzere bir dizi anahtar hücrel süreci tetikleyen bir serin / treonin

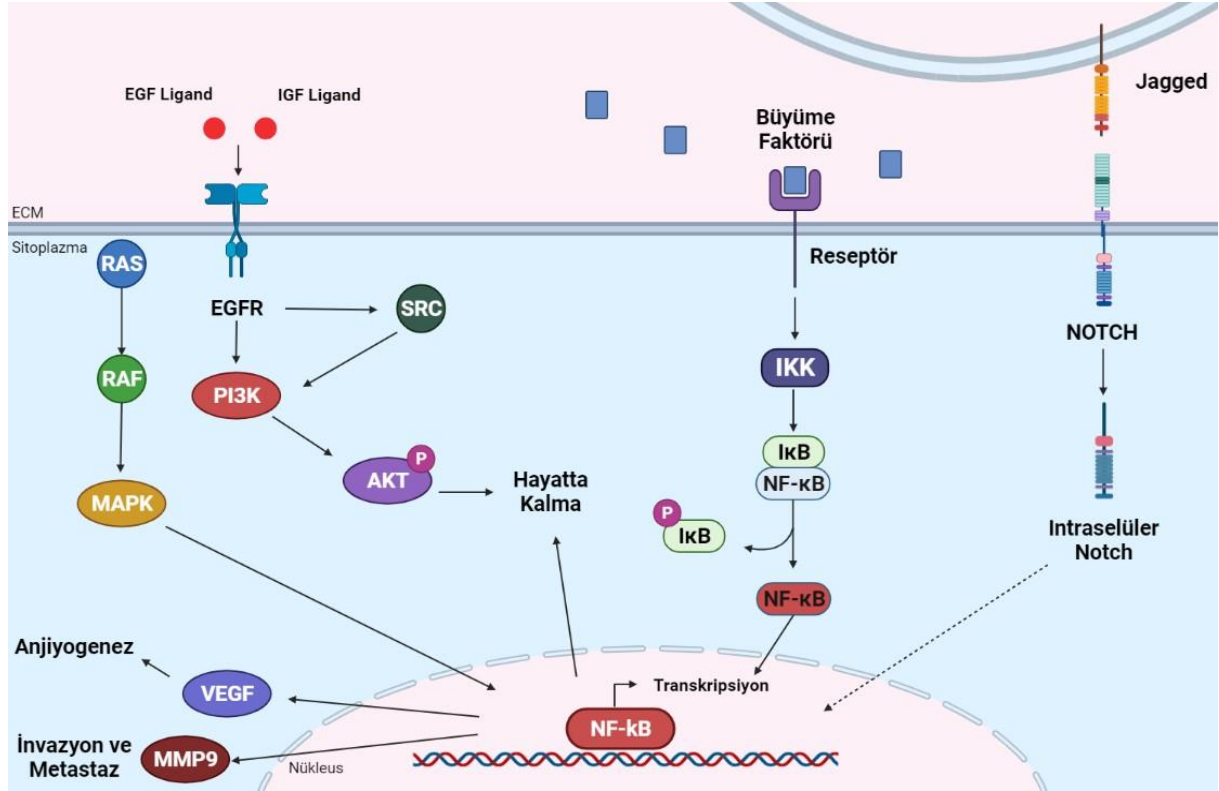
protein kinaz ailesi olan AKT'dir. AKT aktivitesi, hücre zarı üzerindeki uygun lokalizasyonuna büyük ölçüde bağlıdır. AKT'nin membrandaki konumu, PIP3'e güçlü bir şekilde bağlanmasıyla sağlanır. Pankreas karsinogenezinde AKT1, hücre döngüsü tutuklanmasının üstesinden gelerek, apoptozu bloke ederek ve anjiyogenezi teşvik ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir onkogen olarak işlev görür (Zavoral ve diğerleri, 2011). Pankreas karsinogenezindeki anahtar rolü sayesinde, PI3K / AKT / PTEN sinyali, antikanser tedavisi için önemli bir hedeftir.

JAK / STAT sinyal yolu, sitokin reseptörlerinden gelen kimyasal sinyallerin hücre çekirdeğine iletilmesiyle DNA transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Zavoral ve diğerleri, 2011). JAK2/STAT3 yolu, pankreas tümör hücrelerinde CCK2R tarafından aktive edilir ve hücre proliferasyonuna katkıda bulunur (Ferrand ve diğerleri, 2005). Ayrıca JAK2/STAT3 yolunun CCK2R tarafından deregülasyonu, pankreas karsinogenezinde erken bir adımı temsil eder ve hücre proliferasyonuna ve pankreas tümörü gelişimine katkıda bulunur (Ferrand ve diğerleri, 2005). STAT3 ise FG ve PANC-1 hücrelerinin vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonunu ve dolayısıyla insan pankreas kanseri anjiyogenezi, büyümesini ve metastazını doğrudan düzenler (Wei ve diğerleri, 2003).

Wnt sinyali endokrin pankreas oluşumu ve sürdürülmesi için çok önemlidir (Dessimoz ve Grapin-Botton, 2006). Pankreas karsinogenezi sırasında Wnt, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve göçü üzerinde doğrudan etkisi olan bir dizi genin transkripsiyonunu tetikler (Rulifson ve diğerleri, 2007). Çekirdekte yüksek β -katenin ekspresyon seviyelerinin lokalizasyonu, çeşitli yüksek dereceli PanIN lezyonlarının yanı sıra ilerlemiş pankreas kanserinde deneysel olarak doğrulanmıştır (Al-Aynati ve diğerleri, 2004). Kanonik olmayan, β -katenin'den bağımsız bir yolda, β -katenin destekli transkripsiyonu bloke eden diğer sinyal araçları dahil edilir. β -Katenin'in nükleer lokalizasyonu ve kanonik olmayan Wnt yollarında yer alan bir gen olan WNT5a'nın yüksek ekspresyon seviyeleri, pankreas kanseri progresyonunda her iki yolun da dahil olduğunu düşündürmektedir (Rulifson ve diğerleri, 2007).

Son yıllarda moleküler patogenezin yoğun olarak araştırılması, pankreas kanserinin teşhisi, tedavisi ve prognozu için yararlı moleküllerin belirlenmesinde büyük yardımcı olmuştur. Son birkaç yılda, önemli araştırmalar pankreas karsinogenezindeki moleküler olayları ve bunların klinikopatolojik durumla ilişkisini belirlemeye odaklanmıştır. Pankreas kanserinin gelişimi ve ilerlemesi sırasında çok sayıda gen alt kümesinin, aktivasyon veya inaktivasyon olmak üzere genetik değişikliklere uğradığı bulunmuştur (Mimeault ve diğerleri, 2005). Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, pankreas kanserlerinin

başlamısından ve ilerlemesinden kısmen sorumludur (Mimeault ve diğerleri, 2005; Jimeno ve Hidalgo, 2006; Maitra ve diğerleri, 2006). Ayrıca, EGFR, Akt, NF- κ B, vb. gibi çeşitli hücre sinyal yollarındaki moleküllerin deregülasyonu ve bunların moleküler çapraz karışımı (Şekil 3), pankreas kanserinin moleküler patogenezinde önemli roller oynamaktadır (Jimeno ve Hidalgo, 2006; Mimeault ve diğerleri, 2005).



Şekil 3. Pankreas kanserinin başlaması ve progresyonunda rol oynayan protein ve yollar. Sarkar ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir (Sarkar ve diğerleri, 2007).

Pankreas kanserinde onkogenler, nokta mutasyonu ve amplifikasyon dahil olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla aktive edilebilir. Ras onkogeninin aktivasyonu, pankreas kanserlerinin %90'ından fazlasında bulunmuştur (Almoguera ve diğerleri, 1988). Pankreas kanserlerinin yaklaşık %80-90'ının ise K-ras'daki 12, 13 ve 61 kodonlarında nokta mutasyonu barındırdığı bulunmuştur. Bu, herhangi bir insan tümör tipinde bulunan K-ras değişiminin en yüksek fraksiyonudur (Almoguera ve diğerleri, 1988).

2.2.4. Pankreas Kanserinin Sınıflandırılması

2.2.4.1. Pankreas Kanserinin TNM Sınıflandırması

TNM sınıflandırması, pankreas adenokarsinomunun lokal ve sistemik büyümesini karakterize etmek için kullanılır. Tümör boyutu ve yakın doku, lenf nodu metastazı ve uzak metastazların invazyonu, hastalığın prognozu ile korele olduğu gösterilmiştir. Uluslararası Kanser Savaş Örgütü (UICC) ve Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC), ayırt edilebilir bir prognoza sahip tümör evrelerini karakterize etmek amacıyla TNM sınıflamasına dayanan bir evreleme sistemi yayınladı (Edge ve Compton, 2010). Tablo 1’de pankreas kanseri için AJCC evreleme sistemi bulunmaktadır.

Tablo 1. AJCC’nin TNM evreleme sistemine göre pankreas kanserinin TNM evrelemesi.

TNM aşaması	Açıklama
T-stage	
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör 2 cm’den küçük ve pankreasla sınırlı
T2	Tümör 2 cm’den büyük ve pankreasla sınırlı
T3	Tümör pankreasın ötesine uzanıyor ancak çölyak arter veya SMA tutulumu yok
T4	Tümör çölyak arter veya SMA'yı içerir
N-stage	
N0	Tümör bölgesel lenf düğümlerine dahil değil
N1	Tümör bölgesel lenf düğümlerine dahil
M-stage	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

M: metastazlar; N: düğümler; SMA: superior mezenterik arter; T: tümör.

2.2.4.2. Pankreas Tümörlerinin Patolojik Olarak Sınıflandırılması

Pankreas tümörleri geniş bir spektrum içerir ve genellikle histolojik farklılaşmalarına göre epitelyal veya epitelyal olmayan ve biyolojik davranışlarına göre benign, pre-malign veya malign neoplazmlar olarak sınıflandırılır. Epitelyal neoplazmlar, ekzokrin veya endokrin olabilirken, ekzokrin neoplazmlar grubu ayrıca duktal ve asiner neoplazmlarda sınıflandırılır. Pankreas neoplazmlarına genel bir bakış Tablo 2' de verilmiştir.

PDAK, tüm pankreas neoplazmlarının yaklaşık %90'ını oluşturan pankreas malignitesinin açık ara en yaygın türüdür (Fesinmeyer ve diğerleri, 2005). Bu nedenle, “pankreas kanseri” ve “pankreatik duktal adenokarsinom” terimleri sıklıkla eşanlamlı olarak kullanılmaktadır.

Tablo 2. Pankreas tümörlerinin patolojik olarak sınıflandırılması.

Benign Tümörler
Seröz kistadenom
Müsinöz kistadenom
İntraduktal papiller-müsinöz adenom
Olgun Teratom
Malign Tümörler
Şiddetli duktal displazi-karsinoma in situ
Duktal adenokarsinom
Müsinöz kistik olmayan karsinom
Taşlı yüzük hücreli karsinom
Adenoskuamöz karsinom
Farklılaşmamış (anaplastik) karsinom
Karışık duktal-endokrin karsinom
Osteoklast benzeri dev hücreli tümör
Seröz kist-adenokarsinom
Müsinöz kist-adenokarsinom
İntraduktal papiller-müsinöz karsinom
Asiner hücreli karsinom
Pankreatoblastom
Solid-psödopapiller karsinom
Çeşitli (Miscellaneous) karsinom

2.2.5. Pankreas Kanseri Tanısı

Pankreas kanserinin klinik belirtileri spesifik değildir ve sarılık, açıklanamayan kilo kaybı, sırtta yayılan epigastrik ağrı, mide bulantısı, yeni başlayan diyabetes mellitus ve nadiren tromboflebit içerir (Wolfgang ve diğerleri, 2013). Pankreas kanseri teşhisinden şüphelenildiğinde, ilk olarak görüntüleme yapılmaktadır. Çok Kesitli BT (ÇKBT), pankreas ve çevresindeki damar sisteminin mükemmel çözünürlüğünü sağlar ve hastalığın yayılmasında diğer organları değerlendirmek için kullanılabilir (Wolfgang ve diğerleri, 2013). Genellikle çölyak gövdesi, superior mezenterik arter ve diğer arterlerin tutulumunu değerlendirmek için erken arteriyel faz görüntüleri, pankreas lezyonları için pankreas fazı görüntüleri, portal ven ve superior mezenterik ven tutulumunu değerlendirmek için ise portal venöz faz görüntüleri tercih edilir (Lee ve Lee, 2014). Çoğu pankreas kanseri katı hipodens lezyonlar oluşturur. Pankreas başının kanserleri tipik olarak hem pankreas kanallarını hem de safra kanallarını tıkayarak her iki kanalın yukarı doğru genişlemesine neden olurken, korpus ve bezin kuyruğundaki karsinomlar pankreas kanalının sadece uzak kısımlarını tıkamaktadır. ÇKBT pankreastaki lezyonları tanımlayabilir, ancak aynı zamanda herhangi bir lezyonun rezektabilitesini değerlendirmek için mevcut altın standarttır (Kleeff ve diğerleri, 2016). Pankreasa bitişik süperior mezenterik arter ve ven gibi büyük damarların tutulumu, tümörü sınırda rezekte edilebilir veya lokal olarak ilerlemiş ve rezekte edilemez hale getirmektedir (Wolfgang ve diğerleri, 2013). MRI, pankreas kanallarının ve mevcut olabilecek kistlerin mükemmel çözünürlüğünü sağlayabilir. MRI ayrıca karaciğer metastazlarının saptanması ve değerlendirilmesinde ÇKBT'den daha duyarlı olabilir (Motosugi ve diğerleri, 2011; Tsurusaki ve diğerleri, 2016).

Pankreas kanseri tanısı koymak için patolojinin gerekli olduğu göz önüne alındığında, çoğu hastaya ince iğne aspirasyon biyopsisi ile endoskopik ultrasonografi uygulanmaktadır (Kleeff ve diğerleri, 2016). Endoskopik ultrasonografi pankreas ve peripankreatik damarların ve lenf düğümlerinin mükemmel çözünürlüğünü sağlar ve doku elde etmek için kullanılabilir. PET, özellikle genişlemiş lenf düğümleri ve tedaviden sonra kalıcı bir kitle gibi klinik önemi belirsiz daha büyük kitleleri değerlendirirken bu teknolojileri destekleyebilir (Parikh ve diğerleri, 2015).

Pankreas kanseri tanısında patoloji, tanı koymada altın standarttır. Pankreastan nasıl örnek alındığına bağlı olarak, elde edilen materyaller sitolojik veya histolojik değerlendirilebilir

(Hruban ve diğeri, 2007). Diğeri organlarda olduğu gibi, kanser teşhisi genellikle çekirdeklerin şekli, boyutu ve yoğunluğu gibi nükleer özelliklerin değerlendirilmesi ile konur. Kanser tanısını koymaya ek olarak, patoloji tümör derecesini (önemli bir prognostik faktör) ve tümör tipini tanımlamak için kullanılabilir. Ayrıca, SMAD4 gibi belirteçler için immünohistokimyasal etiketleme, malign kanser tanısını desteklemek için kullanılabilir, ancak bu tanıyı belirlemez (Wilentz ve diğeri, 2000). İnvaziv pankreas kanserine yol açan öncü lezyonlar da tanımlanabilir; bunlara PanIN (düşük dereceden yüksek dereceli displaziye derecelendirilmiş), IPMN'ler ve müsinöz kistik neoplazmalar dahildir (Basturk ve diğeri, 2015; Hruban ve diğeri, 2007).

Pankreas kanserlerinin çoğu, 'tübüler' duktal adenokarsinomları infiltre etmektedir. Bu tümörler, yoğun bir şekilde desmoplastik stromaya sızan bez oluşturan neoplastik hücreler ile karakterize edilirler (Hruban ve diğeri, 2007). Bu desmoplastik stromanın tanınması iki nedenden dolayı önemlidir. Birincisi, stroma o kadar yoğun olabilir ki küçük biyopsi örnekleri neoplastik bezleri gözden kaçırabilir. Bunun için pankreas kanseri teşhisi ekarte edilmeden önce kapsamlı örnekleme ihtiyacı vardır. İkincisi, desmoplastik stroma tipik olarak hipovaskülerdir ve derin hidrostatik basınç altındadır. Bu nedenle potansiyel olarak kemoterapötik ajanların neoplastik hücrelere verilmesini engeller (Jacobetz ve diğeri, 2013; Provenzano ve diğeri, 2012).

Pankreasta, klinik öneme sahip olan birkaç farklı neoplazm türü ortaya çıkabilir (Hruban ve diğeri, 2007). Pankreas nöroendokrin tümörleri, adından da anlaşılacağı gibi, nöroendokrin farklılaşması ile karakterize edilir. Bu tümörler yavaş büyüme eğilimindedir ve genellikle cerrahi olarak tedavi edilir. Buna karşılık, adenoskuamöz karsinomlar ve farklılaşmamış karsinomlar genellikle hızlı büyür ve sıklıkla metastatiktir. Ancak bazı adenoskuamöz karsinomlar platin bazlı kemoterapiye yanıt verir (Voong ve diğeri, 2010). Kolloid karsinomlar hemen hemen her zaman ayrı bir kistik öncü lezyon, bir IPMN ile birlikte ortaya çıkar. Kolloid karsinomu olan bir hastanın prognozu, tipik bir duktal adenokarsinomu olan bir hastadan daha iyidir. Son olarak, medüller karsinomlar, zayıf farklılaşma, sinsityal bir büyüme paterni ve sınırları zorlayan farklı bir kanser şeklidir. Medüller karsinomları tanımak önemlidir çünkü kötü farklılaşmalarına rağmen bu kanserler iyi bir prognoz ile ilişkilidir ve sıklıkla mikrosatellit kararsızlığı sergilerler; mikrosatellit kararsızlığına sahip kanserler, bazı immünoterapilere son derece duyarlı görünmektedir (Le ve diğeri, 2015).

2.2.6. Pankreas Kanseri Tedavisi

Pankreas kanserli hastalar için tedaviyi optimize etmek zorlu bir iştir. Hastaların çoğu, vasküler tutulum nedeniyle lokal olarak ilerlemiş ve teknik olarak rezeke edilemeyen hastalık veya genellikle karaciğer ve peritona yaygın metastatik hastalık ile başvurur. Hastaların %20'sinden daha azında rezektabl hastalık vardır. rezeksiyon ve ardından adjuvan tedavi uygulanan hastaların ise ~%80'i nüks edecek ve sonuçta hastalıkları nedeniyle ölecektir. Bu nedenlerle, hastalar için etkili ilaç tedavilerinin keşfedilmesi büyük önem taşımaktadır. Tarihsel olarak, çok az etkili ilaç tanımlanmıştır. Daha önce tanımlandığı gibi pankreas kanseri klinik öncesi sistemlerde ilaç dağıtımını engellediği gösterilen derin desmoplastik stroma ile ilişkilidir (Olive ve diğerleri, 2009). Ek olarak, hemen hemen tüm vakalar, genel olarak kanserde kötü bir prognostik faktör olan ve genellikle tedaviye dirençle ilişkili olan KRAS aktivasyonu tarafından yönlendirilir. Bununla birlikte, terapötik ortamı olumlu yönde etkileyen bazı ilerlemeler kaydedilmiştir.

1997'de, bir nükleozid analogu olan gemitabin, "gemitabin" ile "bolus 5-florourasil"i karşılaştıran randomize bir çalışmaya dayalı olarak FDA tarafından pankreas kanseri tedavisi için onaylandı (Burris ve diğerleri, 1997). 2005 yılında, gemitabin ile kombinasyon halinde EGFR'nin bir tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib, yine tek başına gemitabin üzerinde anlamlı ancak minimal iyileşme gösteren randomize bir denemeye dayanarak FDA tarafından onaylandı (Moore ve diğerleri, 2007). Bununla birlikte, 2011'de folinik asit (leucovorin), 5-florourasil, irinotekan ve oksaliptatin (FOLFIRINOX) kombinasyonu, gemitabin monoterapisine kıyasla güçlü aktivite göstermiştir (Conroy ve diğerleri, 2011). Ancak bu rejimin ishal, bulantı, yorgunluk, miyelosupresyon ve nöropati gibi önemli toksisiteleri vardır ve bu yan etkiler ilaçlarla kontrol edilememektedir. Bu nedenle, FOLFIRINOX genellikle, mükemmel performans durumuna sahip olan 76 yaş altı hastalar için ayrılmıştır. 2012'de gemitabin ve albümine bağlı paklitaksel rejimi tanıtıldı ve yine tek başına gemitabin ile karşılaştırıldığında randomize bir çalışmada daha iyi etkinlik göstererek pankreas kanseri tedavisi için albümine bağlı paklitakselin FDA onayına yol açtı (Von Hoff ve diğerleri, 2013). Bu tedavinin toksisiteleri de dikkate değerdir: alopesi, miyelosupresyon, mide bulantısı, yorgunluk ve nöropati. Ancak bu rejim, biraz daha yaşlı veya performans durumu biraz daha kötü olan hastalara güvenle verilmektedir.

İkinci basamak tedavi seçimi öncelikle başlangıçta hangi rejimin kullanıldığına bağlıdır; FOLFIRINOX başlangıçta kullanılmışsa gemitabin bazlı bir rejim seçilir veya başlangıçta

gemsitabin ve albümine bağlı paklitaksel kullanılmışsa florlu pirimidin bazlı bir rejim seçilir. Ayrıca FDA, gemsitabin ile birinci basamak tedaviyi takiben 5-florourasil ve lökovorin ile kombinasyon halinde kullanılmak üzere lipozomal irinotekan'ı onayladı (Wang-Gillam ve diğerleri, 2016).

Lokal olarak ilerlemiş, rezeke edilemeyen hastalık (genellikle büyük damarların etrafında lokal yayılım, ancak metastatik hastalık olmaksızın) geleneksel olarak kemoradyoterapi ile tedavi edilmiştir. Bununla birlikte, gemsitabin monoterapisi ve ardından kemoradyasyon veya devam eden kemoterapi ile yapılan çok önemli bir sistemik tedavi denemesi, radyasyonun dahil edilmesi için bir sağkalım yararı gösteremedi (Hammel ve diğerleri, 2016).

2.2.6.1. Pankreas Kanseri Cerrahisi

Pankreas kanseri için tek potansiyel tedavi seçeneği cerrahidir. Yaklaşık on yıl önce, pankreas tümörünün cerrahi rezeksiyonu, özellikle düşük hasta hacmine sahip tıp merkezlerinde kabul edilemez derecede yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ilişkilendirildi (Kleeff ve diğerleri, 2016). Ayrıca, genel sağkalım açısından hastalara cerrahinin yararı sorgulanmıştır (Gudjonsson, 1995). Günümüzde ise artan deneyim, hasta bakımının yüksek hacimli merkezlerde daha fazla merkezleştirilmesi ve daha iyi perioperatif yönetim sayesinde, pankreas kanseri cerrahisi, kabul edilebilir ölüm oranları (<%5) olan yüksek hasta hacimli merkezlerde güvenle gerçekleştirilebilmektedir (Kleeff ve diğerleri, 2016). Ayrıca, makroskopik tam tümör rezeksiyon ve adjuvan tedaviler, seçilen alt gruplarda \geq %40 genel sağkalım ile %20 (%15–25) gibi güçlü 5 yıllık sağkalım oranlarıyla sonuçlanmaktadır (Kleeff ve diğerleri, 2016).

Tanı anında hastaların \sim %10-20'si rezektabl tümörler, %30-40'ı sınırdaki rezektabl pankreas kanseri (BRPC) veya lokal olarak ilerlemiş/rezeke edilemeyen pankreas kanseri (LAPC) ve %50-60'ı ise metastatik veya sistemik hastalık ile başvurur. Daha önce BRPC ve LAPC'nin tanımlarının eksik olması, klinik çalışmaların ve güvenilir sonuç analizlerinin karşılaştırılmasını engellemiştir. 2014 yılında, Uluslararası Pankreas Cerrahisi Çalışma Grubu BRPC ve LAPC'nin tanımlarını iyileştirdi ve bu tanımlar daha sonra Ulusal Kapsamlı Kansere Ağı tarafından da kabul edildi (Bockhorn ve diğerleri, 2014; Tempero ve diğerleri, 2014). Hastalarda rezektabilitenin sınıflandırılması, ana arterlerin (çölyak gövdesi, hepatic arter ve

superior mezenterik arter) ve damarların (portal ven ve superior mezenterik ven) tutulumuna bağlıdır (Kleeff ve diğerleri, 2016).

2.2.6.2. Pankreas Kanserinde Küçük Molekül Temelli Tedaviler

Pankreas kanseri biyolojisi ve moleküler özelliklerin genişleyen anlayışıyla, çeşitli spesifik tümör sinyal yollarını hedefleyen ilaçların geliştirilmesi, hastaların tedavi seçeneklerini iyileştirmek için umut verici bir yöntem olarak kabul edilmiştir (Sun ve diğerleri, 2020). Pankreas kanserinde geçtiğimiz on yıl içinde, artan küçük molekül inhibitörlerinin klinik denemeleri yapılmıştır. Şu anda faz I klinik deneylerinde pankreas kanserini hedef alan yaklaşık 10 küçük molekül bulunmaktadır. Bunlar, fokal yapışma kinaz ve piruvat kinaz 2'nin (PF-562271) ikili inhibitörünü, protein fosfataz 2A (LB-100) inhibitörlerini, fokal yapışma kinazı (C4), mitojenle aktive olan protein kinazı (CI-1040), proteazom (marizomib, NPI-0052), RAS sinyal yolu (salirasib), histon deasetilaz (HDAC) (vorinostat), MEK1/2 (pimasertib, AS-703026), Wee1 kinaz (AZD1775) ve Kirpi sinyali (saridegib, IPI-926)'ni içermektedir (Sun ve diğerleri, 2020). Bugüne kadar, bu faz I klinik deneyler, potansiyel pankreas kanseri tedavileri olarak bu ajanlar için daha fazla araştırmayı destekleyen, umut verici güvenlik ve tolere edilebilirliğin yanı sıra teşvik edici antitümör aktivitesi göstermiştir. Dikkat çekici bir şekilde, vorinostat ve kapesitabin kombinasyonu faz I klinik denemesi, 1.1 yıllık gibi önemli bir sağkalım gösterdi (Chan ve diğerleri, 2016).

Bir dizi küçük molekül inhibitörü, oldukça umut verici sonuçlar bildiren raporlarla, faz II klinik deneylerindedir. İlerlemiş, iyi farklılaşmış pankreas nöroendokrin tümörleri olan 32 hasta üzerinde yapılan bir faz II çalışmasında, VEGF tirozin kinaz reseptörleri 1, 2 ve 3'ün bir inhibitörü olan tirozin kinaz reseptör inhibitörü pazopanib, 25 aylık bir hayatta kalma göstermiştir (Phan ve diğerleri, 2015). PDGF ve VEGF reseptörleri için yüksek afiniteye sahip bir politirozin kinaz inhibitörü olan vatalanib'in ikinci basamak bir tedavi olarak faz II denemesi, metastatik pankreas kanserli hastalarda 6 aylık olumlu bir genel sağkalım oranı ile sonuçlanmıştır (Dragovich ve diğerleri, 2014).

Pankreas kanseri tedavisi için küçük molekül inhibitörlerini araştıran klinik çalışmaların sayısı, kanser hücresi ve biyolojisinin daha iyi anlaşılmasının ve özellikle de karmaşık moleküler patolojinin anlaşılması gibi doğal moleküler heterojenliğin bir sonucu olarak hızla

artmaktadır. Faz I, II ve III klinik çalışmalarında test edilen küçük molekül temelli tedaviler Tablo 3’ de listelenmiştir.

Tablo 3. Pankreas kanserinde Faz I, II ve III klinik çalışmalarında test edilen küçük molekül tedaviler

Küçük Molekül	Hedef	Sağkalım
Gemcitabin	Timidilat sentaz ve dihidrofolat redüktaz	5.6 ay
5-FU	Timidilat sentaz	4.4 ay
Nab-paklitaksel	Topoizomeraz I	8.5 ay
PF-562271	Fokal Adhezyon Kinaz ve piruvat kinaz 2	Veri yok
LB-100	Protein fosfataz 2A	Veri yok
CI-1040	MAPK	Veri yok
Selumetinib	MAPK	5.4 ay
Marizomib	Proteazom	Veri yok
Salirasib	RAS Sinyal Yolağı	6.2 ay
Pazopanib	VEGFR tirozin kinaz	14.4 ay
Vatalanib	Politirozin kinaz	6 ay
Hidroksiklorokin	Otofaji	23.3 ay
Vismodegib	Hedgehog Sinyal Yolağı	6.9 ay
Dactolisib	Fosfatidilinositol 3-kinaz ve rapamisinin memeli hedefi	Veri yok
Veliparib	Poli (ADP riboz) polimeraz	3.1 ay
Erlotinib	EGFR tirozin kinaz	Veri yok
Sunitinib	VEGFR ve PDGFR tirozin kinaz	Veri yok

2.3. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik Retikulum (ER), hücredeki en büyük organeldir ve protein sentezi, protein transportu, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum

depolanması gibi işlemlerin ana bölgesidir (Reid ve Nicchitta, 2015; Schwarz ve Blower, 2016). Bu organelin çok işlevli doğası, sayısız protein, benzersiz fiziksel yapılar ve hücre içi ortamdaki değişikliklere koordinasyon ve bunlara yanıt gerektirir. Çeşitli sistemlerden yapılan çalışmalar, ER'nin her biri belirli bir işlev veya işlevlerle ilişkili olan çok sayıda farklı yapısal etki alanından oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak bu fonksiyonel alt alanların nasıl organize edildiği ve farklı fonksiyonel alanların farklı yapılara nasıl dönüştüğü henüz net değil.

ER'nin ana işlevlerinden biri, salgılanan proteinler ve membran proteinleri için protein sentezinin yapıldığı bir bölge olarak hizmet etmektir (Jan ve diğerleri, 2014). Protein sentezi, ribozomların ER'nin sitozolik kısmına lokalizasyonunu gerektirir ve protein sentezini düzenleyen kanonik yol, ER zarı üzerinde mRNA:ribozom kompleksinin birlikte translasyonel olarak yerleştirilmesini içermektedir. Salgılayıcı veya integral membran proteinlerinin translasyonu sitozolde başlar, daha sonra bu mRNA'ları içeren ribozomlar, sinyal tanıma partikülü (SRP) tarafından tanınan ve bağlanan yeni oluşan polipeptidin amino terminalindeki bir sinyal dizisi yoluyla ER zarına alınır (Walter ve Blobel, 1981). mRNA:ribozom: polipeptit:SRP kompleksi, SRP reseptörüne kenetlendiği ER'yi hedef alır (Meyer ve diğerleri, 1982). Translasyon ER'de devam eder ve ortaya çıkan polipeptit, birkaç Sec proteini içeren ve lipid çift tabakasını kapsayan bir kanal olan translocon yoluyla ER'ye girebilir (Rapoport, 2007).

2.3.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), glukoneogenez ve lipid sentezi gibi metabolik süreçlerde yer alan dinamik bir tübüler ağ içinde düzenlenmiştir. Aynı zamanda hücredeki ana hücre içi kalsiyum deposudur ve otofagozomların ve peroksizomların biyogenezine katkıda bulunur (Hetz, 2012). ER'de yer alan protein olgunlaşma adımları, çoğu ökaryotik hücrede toplam proteomun yaklaşık %30'unu oluşturan salgı yolunda sentezlenen proteinlerin uygun şekilde katlanması için çok önemlidir.

Protein katlanmasının verimliliği ve doğruluğu, çoklu çevresel ve hücre sel sinyallerin dinamik entegrasyonu yoluyla sürekli olarak ayarlanır. Çeşitli geri besleme mekanizmaları, salgı yolunun hemen hemen her yönünü işlevsel olarak etkileyerek protein katlama gereksinimlerindeki dalgalanmalara verimli bir şekilde uyum sağlar (Ron ve Walter, 2007). ER'de protein katlanmasındaki bozulmaların üstesinden gelen bir homeostatik yolun varlığına

dair ilk kanıt, memeli hücrelerinde, katlanmanın farmakolojik inhibisyonunun birkaç önemli ER şaperonunun transkripsiyonel yukarı regülasyonuna yol açtığı öncü bir çalışmadan gelmiştir (Kozutsumi ve diğerleri, 1988). Bu bulgu, ER stresi koşulları altında gen ekspresyonunu yeniden programlayan bir sinyal iletimi geri besleme döngüsünün varlığını ortaya çıkardı.

Artık, ER stresi üzerine hücrelerin, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak bilinen protein katlama değişiklikleriyle başa çıkmak için bir dizi tamamlayıcı adaptif mekanizmayı aktive ettiği bilinmektedir. UPR, katlanmamış protein yükündeki dalgalanmaları tamponlamak için ER lümenindeki protein katlanma durumu hakkında bilgiyi çekirdeğe ve sitozole iletir (Schröder ve Kaufman, 2005). Hücreler geri dönüşümsüz ER stresine maruz kaldığında, bu yol, apoptoz yoluyla hasarlı hücreleri ortadan kaldırır, bu da stres uyaranlarının süresi ve yoğunluğu hakkındaki bilgileri entegre eden mekanizmaların varlığını gösterir (Woehlbier ve Hetz, 2011).

2.3.1.1 UPR (Katlanmamış Protein Cevabı)

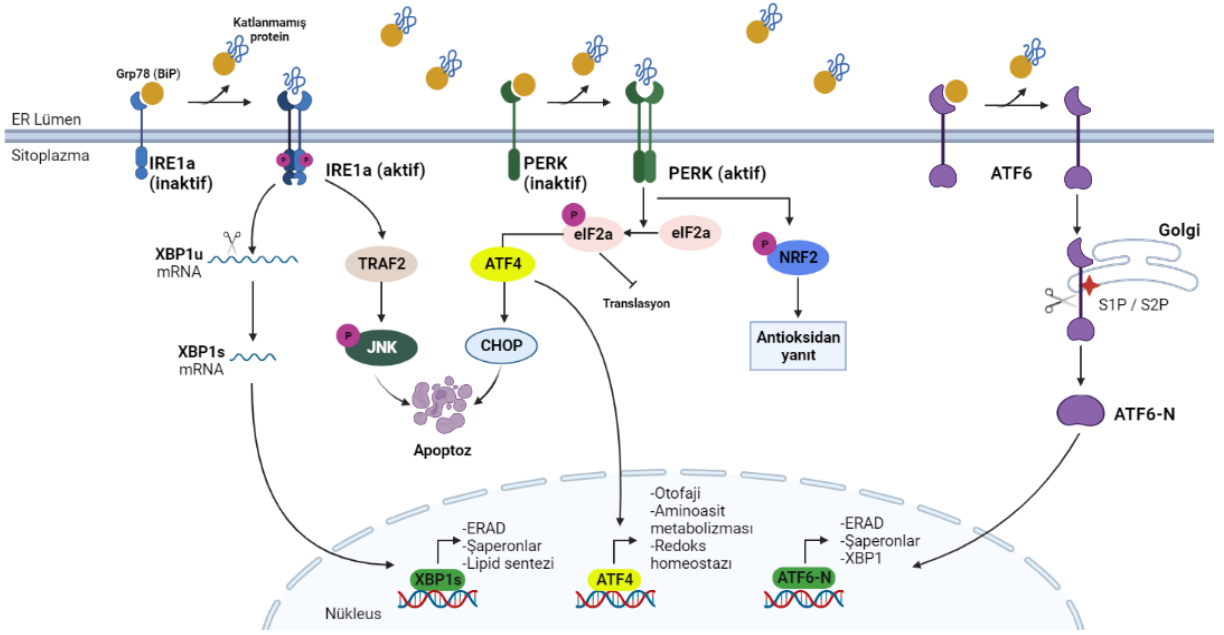
Memeli UPR'si, çok çeşitli bazal metabolik durumlar üzerinden çeşitli girdilere yanıt veren dinamik ve esnek bir sinyal olayları ağına dönüşmüştür. ER stres koşulları altında, UPR'nin aktivasyonu, ER zarının genişlemesi, protein katlama ve kalite kontrol makinelerinin temel bileşenlerinin seçici sentezi ve proteinlerin içeri akışının zayıflaması dahil olmak üzere çeşitli pro-survival mekanizmalar yoluyla katlanmamış protein yükünü azaltır. ER stresi hafifletilmediğinde ve homeostaz sağlanamadığında, UPR apoptozu tetikler (Hetz, 2012).

ER stresine maruz kalan omurgalı hücrelerinde geçici olarak farklı iki hücresel yanıt dalgası gözlemlenir. Ani bir reaksiyon olarak, PERK aktivasyonu, ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2a (eIF2a)'nın fosforilasyonu yoluyla genel protein translasyonunu inhibe eder (Harding ve diğerleri, 2000). Ek olarak, belirli ER yerleşimli proteinleri kodlayan mRNA'nın seçici bozunması, RIDD (düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozunma) yoluyla başlatılır (Han ve diğerleri, 2009). Toplu bir bozunma yolu olan makrotofaji, muhtemelen hasarlı ER'yi (ER-faji olarak adlandırılan bir süreç) ve lizozomal yol boyunca anormal protein agregatlarını ortadan kaldırmak için ER stresi tarafından da aktive edilir. Son olarak, önleyici kalite kontrolü ve ko-translasyonel bozunması, translasyon üzerine bir protein alt kümesinin ER'ye translokasyonunu engeller (Hetz, 2012). Genel olarak, bu mekanizmalar, homeostazı yeniden kuran adaptif ve onarım mekanizmalarına izin vermek için proteinlerin ER'ye akışını azaltır.

İkinci olay dalgası, en az üç farklı UPR transkripsiyon faktörünün düzenlenmesi yoluyla büyük bir gen ekspresyon yanıtını tetikler. Her stres sensörü, belirli bir transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu ve UPR hedef genlerinin bir alt kümesinin yukarı regülasyonunu teşvik etmek için benzersiz bir mekanizma kullanır (Ron ve Walter, 2007). IRE1 α , ER stres koşulları altında dimerize ve ototransfosforile olan bir kinaz ve endoribonükleazdır. IRE1 konformasyonel değişiklik nedeniyle sitozolik RNaz alanının aktivasyonuna yol açar (Walter ve Ron, 2011). Aktif IRE1 α , XBP1 transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'nın 26 nükleotid uzunluğunda bir intronu keserek kodlama okuma çerçevesini değiştirir (Yoshida ve diğerleri, 2001). Böylece XBP1s (spliced-XBP1) olarak adlandırılan, proteinlerin ER'ye girişi ve protein katlanması ile ilgili hedef genlerinin yukarı regülasyonunu indüklemek için çekirdeğe yer değiştiren aktif ve kararlı bir transkripsiyon faktörü ile sonuçlanır (Acosta-Alvear ve diğerleri, 2007) (**Şekil 4**). XBP1s ayrıca ER stresi altında ER membran genişlemesi için gerekli olan fosfolipid sentezini de modüle eder (Hetz ve diğerleri, 2011).

ATF6, ATF6 α , ATF6 β , LUMAN, OASIS, BBF2H7, CREBH ve CREB4 dahil olmak üzere bZIP transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir grup ER stres dönüştürücüyü temsil eder. ER stres koşulları altında, ATF6, site-1 proteazları tarafından işlenmek üzere Golgi'ye taşınır (Asada ve diğerleri, 2011) (**Şekil 4**). Son olarak, eIF2a'nın PERK tarafından fosforilasyonu, redoks dengesi, amino asit metabolizması, protein katlanması ve otofaji ile ilgili hayatta kalma yanlısı genlerin seviyelerini kontrol eden transkripsiyon faktörü ATF4'ü kodlayan mRNA'nın seçici translasyonuna yol açar (Ameri ve Harris, 2008; Schröder ve Kaufman, 2005) (**Şekil 4**). UPR'nin bu dalı ayrıca protein translasyonunun veya protein sentezinin zayıflamasına katkıda bulunabilecek birkaç mikroRNA'nın ekspresyonunu da düzenlemektedir (Behrman ve diğerleri, 2011).

Yüksek oranda protein sentezi ve salgılanması gerektiren fizyolojik süreçler, hücre ölüm yollarını tetiklemeden UPR'nin uyarlanabilir programlarının aktivasyonunu sürdürmelidir. Bununla birlikte, belirli bir eşiğin üzerinde, çözülmemiş ER stresi apoptoza neden olur. Geri dönüşü olmayan ER hasarı koşulları altında apoptozu başlatan mekanizmalar son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır ve bu yolak bir dizi tamamlayıcı yolu içermektedir (Tabas ve Ron, 2011).



Şekil 4. UPR yolağının üç ana kolu (Zhang ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir) (Zhang ve diğerleri, 2020).

ER stresi altında hücre ölümü, BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenen mitokondriyal apoptoz yoluna bağlıdır (Tait ve Green, 2010). Bu yolda proapoptotik çok alanlı proteinler BAX ve/veya BAK'ın konformasyonel aktivasyonu, kaspaz aktivasyonunu tetiklemede önemli bir adımdır. Kronik ER stresi, yukarı akış BCL-2 ailesi üyeleri olan BIM ve PUMA gibi yalnızca BH3 proteinlerinin ve ayrıca hücre ölümü hassaslaştırıcı NOXA'nın transkripsiyonel yukarı regülasyonu yoluyla BAX ve/veya BAK'a bağlı apoptoza yol açar (Hetz, 2012). CHOP olarak adlandırılan anahtar UPR proapoptotik proteininin transkripsiyonu, PERK–ATF4 eksenini tarafından pozitif olarak kontrol edilmektedir (Tabas ve Ron, 2011) (Şekil 4). CHOP, hem BIM'in transkripsiyonunu hem de BCL-2 ekspresyonunun aşağı regülasyonunu destekleyerek apoptozun indüklenmesine katkıda bulunur (Tabas ve Ron, 2011). CHOP'a ek olarak, ATF4 ve p53, ER stresi altında yalnızca BH3 proteinlerinin doğrudan transkripsiyonel yukarı regülasyonunda da rol oynar (Woehlbier ve Hetz, 2011). Diğer yandan aşırı ER stresi altında hücre ölümünü indüklemek için, kaspaz 2 tarafından sadece BH3 proteini BID'in aktivasyonu ve ayrıca apoptozu aktive etmek için mitokondriyi duyarlılaştırabilen ER kalsiyum salınımı dahil olmak üzere birçok başka tamamlayıcı mekanizma önerilmiştir (Tabas ve Ron, 2011).

UPR sinyali, bir dizi çift yönlü karışma noktası aracılığıyla diğer stres tepkilerinin çoklu bileşenleriyle birleşir (Hetz ve Glimcher, 2009). UPR sensörleri tarafından 'alarm stres yollarının' devreye girmesi, ER stres adaptasyonunu, apoptozu veya doğrudan protein katlama

stresiyle ilgili olmayan fizyolojik çıktıları modüle edebilir. Örneğin, IRE1 α 'nın aktivasyonu, adaptör protein TRAF2'yi alarak alarm genlerini devreye sokabilir, bu da ASK1 yolunun ve onun aşağı akış hedefi JNK'in aktivasyonu ile sonuçlanır (Urano ve diğerleri, 2000) (Şekil 4). JNK aktivasyonu, IRE1 α aktivasyonuna yanıt olarak önemli bir pro-apoptotik sinyaldir. IRE1 α -JNK sinyali, temel bir otofaji düzenleyicisi olan beclin 1'i aktive ederek ER stresi ve besin açlığı tarafından indüklenen makrotofajiyi de tetikleyebilir (Kroemer ve diğerleri, 2010). Ek olarak, IRE1 α , farklı adaptör proteinlerinin bağlanması yoluyla p38, ERK ve NF- κ B'yi içeren alarm yollarını devreye sokar (Hetz ve Glimcher, 2009).

2.3.2. Kanserde Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Cevabı

Tümörler tarafından oluşturulan olumsuz çevresel koşulların ötesinde, kanser hücreesindeki genetik değişiklikler ER stresini besleyebilir ve UPR yollarının kalıcı aktivasyonunu teşvik edebilir (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). Örneğin, tümör baskılayıcıların kaybı ve onkogenlerin hiperaktivasyonu, tümörigenez sırasında artan metabolik talebi karşılamak için protein sentezini artırır. Ek olarak, çoğalan kanser hücreleri, bölünme ve yavru hücrelere tahsis için hızlı ER genişlemesi gerektirir (Babour ve diğerleri, 2010). ER stres yanıtlarını düzenlemek, hem hayatta kalma hem de pro-apoptotik çıktılarla sonuçlanabilecek oldukça dinamik bir süreçtir. Gerçekten de, hücre kaderinin belirlenmesi, UPR'nin yoğunluğuna ve süresine bağlı görünmektedir. Son 15 yılda, çok sayıda çalışma, kanserin başlaması ve ilerlemesinde ER stres yanıt yollarıyla ilgili rolleri ortaya çıkarmıştır.

Onkojenik dönüşüm, çeşitli engellerin üstesinden gelmek için UPR'den yararlanan çok adımlı bir süreçtir. Normal epitel hücrelerinde MYC'nin hiperaktivasyonu, büyük proteotoksik strese neden olur ve hücre sağkalımının azalmasına yol açar (Zhao ve diğerleri, 2018). Yine de, MYC kaynaklı strese dayanan hücreler, lenfoma, nöroblastom, prostat kanseri ve meme kanseri dahil olmak üzere birçok insan kanserinde UPR'nin gelişmiş aktivasyonunu sergilemektedir (Hart ve diğerleri, 2012; Xie ve diğerleri, 2018). Düşük MYC seviyeleri ifade eden normal meme epitel hücreleri veya kanser hücreleri, XBP1 ablasyonuna dirençliken, MYC-hiperaktive edilmiş hücreler, IRE1 α -XBP1'in genetik veya farmakolojik inaktivasyonuna karşı oldukça hassastır (Xie ve diğerleri, 2018; Zhao ve diğerleri, 2018). Bu nedenle, sürdürülebilir UPR, MYC tarafından yönlendirilen onkojenik dönüşümün neden olduğu strese uyum için kritik bir role sahiptir.

Mutant RAS, UPR ile etkileşime giren başka bir onkojenik sürücüdür. HRAS-G12V, erken yaşlanmayı teşvik etmek ve melanositlerde neoplastik büyümeyi bastırmak için IRE1 α ve ATF6 aktivasyonunu tetikler (Denoyelle ve diğerleri, 2006). IRE1 α 'nın RIDD aktivitesinin, ID1 mRNA'nın bozulması yoluyla keratinositlerde erken yaşlanmaya aracılık ettiği gösterilmiştir. Buna karşılık, IRE1 α -XBP1 sinyali, keratinositlerin HRAS kaynaklı proliferasyonunu artırır (Blazanin ve diğerleri, 2017).

Onkojenik transformasyondan sonra kanser hücreleri, adaptasyonu ve tümör büyümesini kolaylaştıran IRE1 α ve PERK aktivasyonu tarafından koordine edilen kalıcı, ölümcül olmayan ER stres tepkilerine maruz kalır. IRE1 α 'nın yapıcı aktivasyonu, şaperonlar, kıvrımlar ve ERAD makineleri gibi klasik UPR genlerinin XBP1'e bağlı ekspresyonunu destekler. Bu efektörler, protein katlanmasını ve salgılanmasını artırırken yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasını destekler, böylece UPR'nin sitoprotektif işlevini sürdürür (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). IRE1 α -XBP1 sinyali, kanser metabolizmasının yeniden programlanmasında da rol oynar. XBP1, HIF1 α ile bir heterodimer oluşturarak ve üçlü negatif meme kanserinde (TNBC) GLUT1 ve LDHA dahil olmak üzere anahtar düzenleyicilerin ekspresyonunu kontrol ederek hipoksi tepkilerini ve glikolizi düzenler (Chen ve diğerleri, 2014). Pankreas kanserinin fare modellerinde, SWI/SNF kromatin yeniden biçimlendirici Smarcb1'in tükenmesi, pankreas kanserinin agresif mezenkimal alt tipi için potansiyel bir terapötik hedef sağlayan mutant KRAS'tan bağımsız MYC ve IRE1 α -MKK4 aracılı mezenkimal yeniden programlamayı aktive eder (Genovese ve diğerleri, 2017). Bu mekanizmalar, kanser hücrelerinin progresyon sırasında karşılaştığı çeşitli onkojenik ve metabolik streslere etkin bir şekilde adapte olmasını sağlar.

Son çalışmalar ayrıca kanserde IRE1 α güdümlü RIDD'nin işlevini ortaya çıkarmaya başlamıştır. Glioblastoma hücre dizilerinde *in vitro*, IRE1 α 'nın RNaz aktivitesi iki zıt işlev oynar: XBP1, miyeloid hücreler tarafından infiltrasyonu desteklerken aynı zamanda anjiyogenezi artırır ve migrasyon ve invazyon belirteçlerinin ekspresyonunu artırır (Lhomond ve diğerleri, 2018). Buna karşılık, RIDD anjiyogenezi ve kanser hücresi göçünü azaltmaktadır. Bu nedenle, XBP1 aktivasyonu ile RIDD arasındaki dengenin, glioblastoma hastalarının klinik sonuçları ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Lhomond ve diğerleri, 2018). RIDD ayrıca, ölüm reseptörü 5 (DR5) aracılığıyla PERK ve IRE1 α karışması tarafından talimat verilen hücre kaderinin önemli bir belirleyicisidir. ER stresi, kanonik hücre dışı ligandı TRAIL'den bağımsız olarak PERK-CHOP ile aktive olan hücre içi DR5 yoluyla apoptozu başlatabilir (Lam ve diğerleri, 2020). Yanlış katlanmış proteinler ayrıca hücre içinde DR5'i aktive eden ve apoptozu teşvik eden doğrudan ligandlar olarak işlev görmektedir (Lam ve diğerleri, 2020).

Aşırı ER stresi altında, IRE1 α RNaz hiperaktivasyonunun, seçilmiş mikroRNA'ları (miR-17, miR-34a, miR-96 ve miR-125b) parçalayarak apoptozu teşvik ettiği, proapoptotik kaspaz 2'nin translasyonuna ve mitokondriyal apoptoz yolunun indüklenmesine izin verdiği gösterilmiştir (Upton ve diğerleri, 2012). Bununla birlikte, IRE1 α tarafından düzenlenen mikroRNA fonksiyonunun kanserdeki etkileri de büyük ölçüde keşfedilmemiş durumdadır.

IRE1 α 'nın sitoplazmik alanı, JNK yolunu uyararak ve BCL-2 aktivitesini baskılayarak ve BIM (BCL2L11 olarak da bilinir) fonksiyonunu indükleyerek apoptozu teşvik etmek için TRAF2 ile etkileşime girer (Szegezdi ve diğerleri, 2006; Upton ve diğerleri, 2012). Bu nedenle, uzun süreli kontrolsüz IRE1 α aktivasyonu kanser hücrelerine zararlıdır. IRE1 α 'nın, XBP1'den bağımsız STAT3 fosforilasyonunu ve hepatoselüler karsinomun (HCC) büyümesini desteklediği gösterilmiştir (Y. Wu ve diğerleri, 2018). Ek olarak, IRE1 α 'nın kinaz aktivitesi, TRAF2 yoluyla I κ B kinaz (IKK) ile bir kompleks oluşturarak ER stresi ile indüklenen NF- κ B aktivasyonu için gereklidir (Hu ve diğerleri, 2006). IRE1 α -TRAF2-ASK1-JNK ekseni ayrıca kanser hücrelerinde inflamatuvar yanıtları arttırmak için NF- κ B ve aktivatör protein 1 (AP1) aktivasyonunu da destekler (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021).

IRE1 α -XBP1 sinyalinin yakın zamanda germinal merkez B hücre benzeri yaygın büyük B hücreli lenfomada (GCB-DLBCL) tümör büyümesini baskıladığı bildirildi. IRE1 α ifadesi EZH2 tarafından susturularak GCB-DLBCL'de XBP1 aktivasyonunu bloke eder. Bununla birlikte, bu fenotip, ksenograft fare modellerinde GCB-DLBCL ilerlemesinin baskılanmasına yol açan XBP1s ektopik aşırı ekspresyonu ile kurtarılabilir (Bujisic ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, IRE1 α -XBP1 aşağı regülasyonu, GCB-DLBCL'yi diğer DLBCL alt tiplerinden ayırmaktadır. Ancak bu spesifik kanser alt tipinde IRE1 α -XBP1'in farklı tümör baskılayıcı fonksiyonunu açıklayan temel mekanizma belirsizliğini korumaktadır.

En çok çalışılan ER stres molekülü BiP (GRP78 olarak da bilinir), birçok insan kanserinde aşırı eksprese edilir ve büyüme faktörü olgunlaşmasını ve salgılanmasını arttırmak, apoptozu baskılamak ve anjiyogenezi teşvik etmek gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla tümör büyümesini destekler (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). BiP'nin bir kısmı, diğer yüzey proteinleri ile kompleksler oluşturarak sinyal iletimine aracılık ettiği kanser hücresi yüzeyinde lokalize olur (Shin ve diğerleri, 2003). Örneğin, hücre yüzeyine lokalize BiP, prostat kanseri hücresinin hayatta kalmasını arttırmak için AKT sinyalini artırır ve TGF β sinyalini baskılayarak prostat kanseri büyümesini kolaylaştırmak için hücre yüzeyi proteini olan Cripto ile etkileşime girer (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). Bu nedenle BiP, insan kanserlerinde çekici bir terapötik hedef olarak kabul edilmiştir.

PERK, tümör ilerlemesini düzenlemek için çeşitli mekanizmalar kullanır. Bu sensörün önemli işlevi, antioksidan glutatyon'un biyosentezini artırarak oksidatif stresi kontrol etmektir (Rouschop ve diğerleri, 2013). PERK, NRF2'yi fosforile ederek KEAP1 kompleksinden ayrılmasına neden olur ve koruyucu antioksidan tepkilerin transkripsiyonel bir indükleyicisi olarak işlevini gösterir (Cullinan ve diğerleri, 2003). Oksidatif protein katlama kapasitesinde ortaya çıkan artış, tümör büyümesi için faydalıdır. İkincisi, PERK-eIF2 α eksenini, MYC güdümlü lenfomada sitoprotektif UPR fonksiyonlarını desteklemek için hücrede translasyonu zayıflatır ve otofajiyi geliştirir (Hart ve diğerleri, 2012). Üçüncüsü, hem PERK hem de GCN2, eIF2a'yı fosforile etmek ve ATF4'ü indüklemek için MYC tarafından aktive edilir (Tameire ve diğerleri, 2019). eIF2a, translasyonu geçici olarak yavaşlatsa da, bu, MYC'nin neden olduğu proteotoksik stresi hafifletmek için yeterli değildir. Bu nedenle, ATF4, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4EBP1'i doğrudan yukarı regüle etmek ve mTORC1'e bağlı sinyalleme bastırmak ve MYC aktivasyonu üzerine proteotoksisteyi önlemek için MYC ile bir kompleks oluşturur (Tameire ve diğerleri, 2019). Dördüncüsü, PERK, lipid metabolizmasını ve fosfolipid biyolojisini çoklu mekanizmalar yoluyla düzenler. PERK ayrıca diaçilgliserolü (DAG) fosforile eden ve ana ürün olarak fosfatidik asit üreten lipid kinaz aktivitesine sahiptir (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). PERK'in lipid kinaz aktivitesi, PI3K p85 alt birimi tarafından düzenlenir ve ER stresi sırasında mTOR, AKT ve ERK1 ve ERK2 aktivasyonuna aracılık eder (Bobrovnikova-Marjon ve diğerleri, 2012). Son olarak, kodlanmayan RNA'nın PERK güdümlü düzenlenmesi, kanser hücresi sağkalımını desteklemek için kritik öneme sahiptir. miR-211, ekspresyonunu bastırmak ve hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için CHOP promotöründe H3K27 metilasyonunu indükleyen, fare meme tümörlerinde ve insan B hücre lenfomasında PERK'e bağlı bir hayatta kalma yanlısı mikroRNA'dır (Chitnis ve diğerleri, 2012). PERK-miR-211 ekseninin MYC'ye bağlı aktivasyonu aynı zamanda sirkadiyen düzenleyiciler BMAL1 ve CLOCK'u baskılayarak sirkadiyen salınımı ve protein sentezini azaltır, böylece Burkitt lenfomanın ilerlemesini destekler (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021).

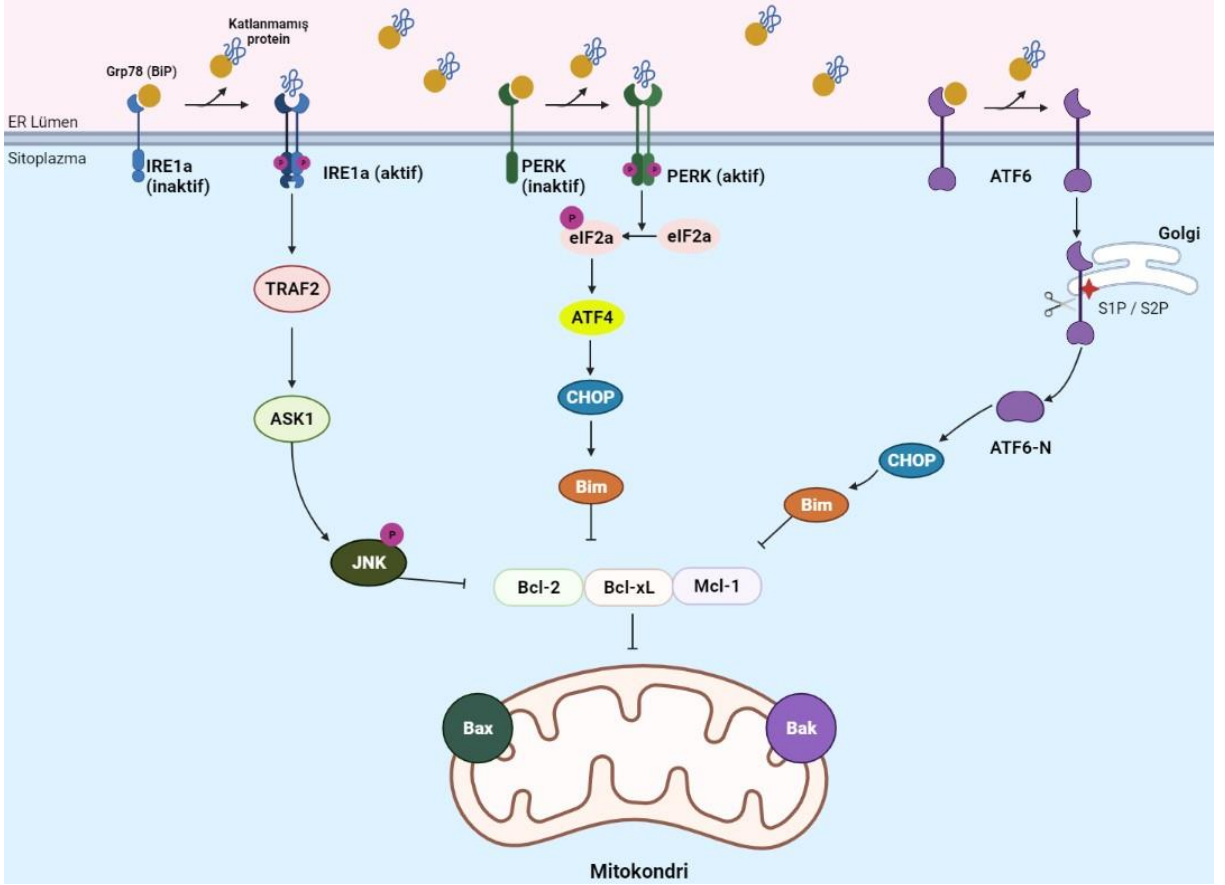
Hem IRE1 α hem de PERK, ER stresini hafifletmek ve kanser hücresinin hayatta kalmasını sağlamak için işlev görse de, birçok çalışma, çoğu durumda işlevsel olarak gereksiz olmadıklarını göstermektedir. Kanser hücrelerinin, proapoptotik aktivitelerini tetiklemeden IRE1 α ve PERK'in pro-tümör fonksiyonlarını nasıl sürdürdüğü iyi anlaşılmamıştır.

2.3.3 UPR ve Apoptoz

ER stresi sırasında hücreler ya adaptasyon mekanizmalarını indükleyerek hayatta kalır ya da apoptoz yoluyla intihar eder. İçsel apoptoz yolu, mitokondriyel faktörlerle yakından ilişkilidir. Proapoptotik proteinlerin membrana eklenmesi mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanır (Gorman ve diğerleri, 2012).

CHOP, ER stresinin neden olduğu apoptozun önemli bir aracısıdır. Özellikle, CHOP indüksiyonu, ER stresi ile ilişkili apoptozun başlangıcı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve CHOP'un susturulması hücreleri apoptozdan korumaktadır (Jing ve diğerleri, 2012). Bununla birlikte, CHOP nakavt farelerden türetilen fare embriyonik fibroblastları (MEF), ER stresine dayalı apoptoza karşı yalnızca kısmi direnç sergiler, bu da CHOP'un bu bağlamda tek ölüm yolu olmadığını göstermektedir (Zinszner ve diğerleri, 1998). CHOP'un ER stresinin neden olduğu apoptoza tam olarak nasıl aracılık ettiği tartışmalıdır çünkü CHOP, hücre göçü, proliferasyon ve hayatta kalma gibi kanserin ayırt edici özellikleriyle ilgili olan çok sayıda geni düzenler (Jauhiainen ve diğerleri, 2012). Anti-apoptotik BCL-2'nin aşağı regülasyonu ve proapoptotik BIM, PUMA ve BAX'ın uyarılmasının, CHOP aracılı apoptoza katkıda bulunduğu inanılmaktadır (Gorman ve diğerleri, 2012). Meme kanserinden türetilen hücrelerden elde edilen in vivo veriler bu bulguları desteklemektedir (Weston ve Puthalakath, 2010). Ayrıca, p38 tarafından fosforilasyona yanıt olarak CHOP aktivitesi artar. p38, ER stresi üzerine IRE1-TRAF2 kompleksine alınan ASK1'in substratıdır. Bu nedenle, uzun süreli stres sırasında, PERK ve IRE1 yolları, CHOP aktivitesini güçlendiren IRE1 aracılı ASK1 aktivasyonu ile CHOP üzerinde birleşebilir (Walter ve Ron, 2011).

Diğer yandan birkaç çalışma, ER stresi ile indüklenen apoptozun aracılığında JNK'nin çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Verma ve Datta, 2012). IRE1 tarafından JNK alımı, hem IRE1 hem de TRAF2 ile etkileşime girdiği bildirilen JNK tarafından düzenlenir. IRE1-TRAF2 kompleksi daha sonra ASK1'i alır ve ASK1 aktivasyonuna neden olur ve hücre ölümüne yol açan JNK yolunu düzenler.



Şekil 5. UPR yolağı ve apoptotik mekanizmalar (Hetz ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir) (Hetz ve diğerleri, 2020).

Yalnızca BH3 içeren (BH3-only proteins) 11 protein alt ailesi üyesinden PUMA, NOXA, BID, HAKAKIRI ve BIM'in ER stresinin neden olduğu apoptoza aracılık ettiği de bildirilmiştir (Pike ve diğerleri, 2012; Puthalakath ve diğerleri, 2007). Ek olarak, BCL-2 ailesi belirli UPR bileşenleriyle fiziksel etkileşimler yoluyla ER stresini de düzenler. Örneğin, BAX ve BAK, ER stresi üzerine IRE1 sitozolik alanı ile doğrudan etkileşime girer; bu etkileşim IRE1 aktivasyonu için gereklidir (Hetz ve diğerleri, 2006). Yalnızca ER-lokalize BAK eksprese eden hücrelerde, BIM ve PUMA, XBP1s yokluğunda IRE1'in TRAF2-JNK kolunu seçici olarak aktive eder (Klee ve diğerleri, 2009).

IRE1'in BAX ve BAK ile ilişkisi, bir ER transmembran proteini olan BAX inhibitörü-1'den (BI-1) etkilenmektedir. BI-1, endoribonükleaz aktivitesini inhibe etmek için doğrudan IRE1 sitozolik alanı ile etkileşime girer. BI-1 eksikliği olan hücrelerin, gelişmiş IRE1 aktivitesi ve sürekli XBP1 splicing sergilediği bulunurken, BI-1 aşırı ekspresyonu, IRE1 ile BAX veya BAK arasındaki etkileşimi bozmuştur (Lisbona ve diğerleri, 2009).

2.3.4. UPR ve Metastaz

UPR'nin primer tümör ilerlemesindeki işlevi kapsamlı bir şekilde çalışılmış olsa da, çok aşamalı metastatik programdaki rolü tam olarak tanımlanmamıştır. Kanser hücreleri, metastatik hücrelerin kolonizasyonunu ve hayatta kalmasını kolaylaştırmak için uzak organ nişlerini yeniden programlayabilir; bu süreç, pre-metastatik niş (PMN) oluşumu olarak adlandırılır (Cox ve diğerleri, 2015; Hoshino ve diğerleri, 2015). Hipoksi, kemikte PMN oluşumunu teşvik etmek için östrojen reseptörü negatif meme tümörlerinde lisil oksidazı (LOX) yukarı regüle eder (Cox ve diğerleri, 2015). İlginç bir şekilde, XBP1, LOX promotörüne bağlanır ve LOX ekspresyonunu düzenler. IRE1 α -XBP1'in bu faktör aracılığıyla PMN'ye katkıda bulunma olasılığını yükseltir (Yang ve diğerleri, 2017).

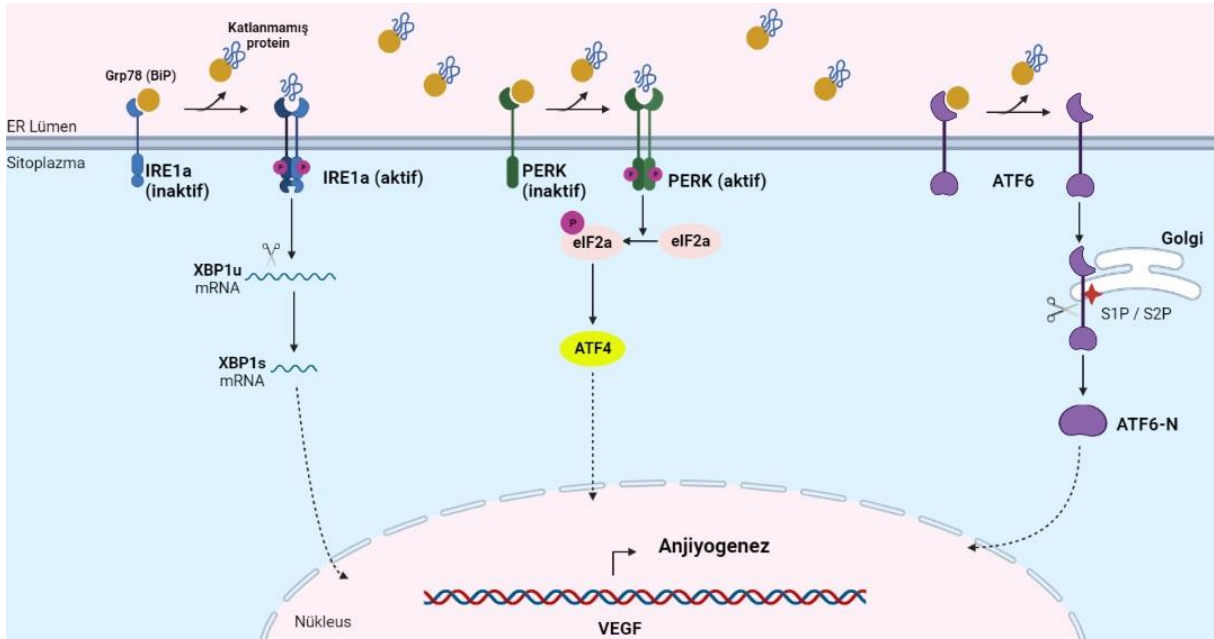
Metastaz sırasında kanser hücreleri, hücre dışı matris (ECM) ve komşu hücrelerle teması kaybettikten sonra programlanmış hücre ölümünün bir şekli olan anoikis'e maruz kalır. Birkaç çalışma, PERK-eIF2 α ekseninin anoikisi baskıladığını ve tümör invazyonu ve metastaz için gerekli olduğunu ileri sürmektedir (Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). PERK ayrıca epitelyal mezenkimal geçişe (EMT) maruz kalan hücrelerde seçici olarak aktive edilir (Feng ve diğerleri, 2014). Metastatik hücreler, dolaşımında ve uzak dokularda birincil tümörlerdeki kanser hücrelerine göre daha yüksek seviyelerde oksidatif stres yaşar. Antioksidanların sentezi gibi metabolik adaptasyonlar, uzak bölgelerde kanser hücrelerinin hayatta kalması ve nihayetinde büyümesi için vazgeçilmezdir. PERK dalı, ATF4 ve NRF2 yoluyla antioksidan tepkileri destekler ve bu nedenle, oksidatif stresi hafifleterek muhtemelen metastatik hücrelere fayda sağlar (Cullinan ve diğerleri, 2003).

2.3.4. UPR ve Anjiyogenez

Yetersiz vasküler beslenme hipoksiye, besin yoksunluğuna ve sonuç olarak düşük ATP üretimine neden olur. Bu faktörler ayrıca yanlış katlanmış proteinlerle de ilişkilidir ve ER stresi ve UPR tetiklenmektedir. İlginç bir şekilde, UPR anjiyogenezi hem inhibe edebilir hem de indükleyebilir.

UPR'nin kollarından gelen transkripsiyon faktörleri (XBP1s ve ATF4) VEGF promotörüne bağlanabilir ve onu aktive edebilir (Ghosh ve diğerleri, 2010). ATF4, çeşitli insan aort endotel hücre dizilerinde IL-8'i (interlökin-8) transkripsiyonel olarak modüle eder. Bir pro-

anjiyojenik sitokin olan IL-8, endotelial hücre proliferasyonunu ve damar oluşumunu indükleyebilir ve endotelial hücre apoptozunu azaltan MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu teşvik edebilir (Li ve diğerleri, 2003; Oskolkova ve diğerleri, 2008). XBP-1'ler VEGF promotörüne bağlanabilir ve Akt/GSK/β-katenin eksen yolu yoluyla endotelial proliferasyonu sürdürebilir (Zeng ve diğerleri, 2013). XBP1s, VEGF ekspresyonunu yukarı regüle etmek için HIF-1α ile bir kombinasyon yoluyla üçlü negatif meme kanseri hücre proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2014).



Şekil 6. UPR ve anjiyogenez (Hsu ve diğerlerinden esinlenerek biorender aracılığı ile yeniden çizilmiştir) (Hsu ve diğerleri, 2019)

Buna karşılık, anti-anjiyogenez ile ilgili olarak birkaç bilinen mekanizma vardır: TRAF2-JNK'nin IRE-1α tarafından aktivasyonu, Bim gibi spesifik Bcl-2 ailesi proteinlerini fosforile ederek sitokrom c aracılı apoptotik yolları indükler (Win ve diğerleri, 2014). Ayrıca, PERK-ATF4 ekseninin aktivasyonu, apoptotik proteinlerin sentezini artıran CHOP ekspresyonunu tetikler. Ayrıca CHOP, anjiyogenez indükleyen önemli bir faktör olan eNOS promotörünü (endotelial nitrik oksit sentaz) inhibe eder (Hsu ve diğerleri, 2019).

2.4. Pankreas Kanserinde Endoplazmik Retikulum Stresi ve UPR

PDAK tümörleri ve onları çevreleyen mikroçevreyi oluşturan hücrelerin, hipoksik, besinden yoksun durumları nedeniyle bazal ER stresi sergiledikleri bildirilmektedir (Kong ve diğerleri, 2015). Bu nedenle, PDAK tümörlerinin bazal olarak aktif bir UPR profiline sahip olması muhtemeldir. Bu adaptif- UPR, tümör oluşumuna ve ilerlemeye katkıda bulunabilir.

Pankreas kanserinde en sık araştırılan UPR bileşeni GRP78 (BiP)'dir. Yüksek GRP78 seviyeleri, ER stresi koşulları altında yaygın olarak gözlenmektedir ve UPR'nin aktivasyonu üzerine GRP78'in ekspresyonu artmaktadır. GRP78'in artan ekspresyonu, kötü hastalık prognozu ve prostat kanseri, yumurtalık kanseri ve B hücreli lenfoma dahil olmak üzere birçok kanser türünün ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Robinson ve diğerleri, 2021). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, PDAK dokusunda artan GRP78 ekspresyonu mevcuttur ve PDAK hastaları için kötü bir prognoz ile korele olduğu bildirilmiştir (Niu ve diğerleri, 2015).

GRP78'in yüksek ekspresyonu, normal pankreatik duktal hücrelere kıyasla PDAK hücrelerinin bir özelliğidir, ancak artan GRP78 seviyelerinin PDAK ilerlemesine nasıl katkıda bulunduğu hala tanımlanmaya devam etmektedir. PDAK hücre dizisi S2-VP10'un, GRP78'in shRNA aracılı yıkımı olsun veya olmasın, transkriptomik analizi, hücre döngüsü, apoptoz ve aktin-hücre iskeleti düzenlemesi dahil olmak üzere anahtar sinyal yollarında belirtilen değişikliklerle etkisinin geniş kapsamlı olabileceğini düşündürmektedir (Dauer ve diğerleri, 2019). shGRP78 içeren PDAK hücre hatları, shSCR muadillerine kıyasla azaltılmış migrasyon, invazyon ve klonojenik özellikler sergilemiştir.

IRE1 ve PERK pankreas hücrelerinde insülin biyosentezi ve glukoz homeostazı ile ilgili iyi belgelenmiş işlevlere sahip olsa da, bunların PDAK'ın ilerlemesi ve yayılmasındaki rollerine ilişkin sınırlı bilgi vardır (Robinson ve diğerleri, 2021).

Diğer kanser türlerine (üçlü negatif meme kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri) benzer şekilde, PDAK hücrelerinin proliferatif kapasitesinin korunmasında IRE1'e bağlı sinyalleşmenin bir rolü olduğu bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2017). UPR'nin IRE1 ve ATF6 kolları tarafından anterior gradyan protein 2 homologunun (AGR2) indüksiyonu, artmış proliferasyona katkıda bulunabilir (Chevet ve diğerleri, 2013). Başka bir çalışmada, STF-083010, PDAK hücrelerinin canlılığını azaltmış ve iyi bilinen bir otofaji inhibitörü olan klorokin ile kombinasyon halinde STF-083010'un, PDAK büyümesi üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Thakur ve diğerleri, 2018). PERK aktivasyonu, artan tümörigenez

ile ilişkilendirilmiştir. Bir PERK inhibitörü kullanan çalışmada, PERK inhibisyonunun PDAK hücrelerinde apoptozu arttırdığını ve PDAK ksenograftlarında in vivo kullanıldığında tümör yükünü azalttığı gösterilmiştir (Atkins ve diğerleri, 2013). Yakın tarihli bir çalışma, PERK aktivitesini, PDAK metastazı hedefi olan karaciğer ile ilişkilendirdi. Karaciğerdeki PDAK hücreleri, IRE1 aktivasyonu olmaksızın UPR'nin PERK kolunun seçici aktivasyonunu sergiledi (Pommier ve diğerleri, 2018). Yazarlar, bunun PDAK hücrelerinin T hücresi öldürmekten kaçınmasını ve karaciğerde "uykuda" kalmasını sağladığını gösterdi. Latent kanser hücrelerinde XBP1s ekspresyonu, T hücresi tükenmesi ile kombinasyon halinde kanser hücrelerinin yeniden çoğalmasını ve metastaz yapmasını sağladı. Birlikte ele alındığında, bu çalışmalar UPR'nin hem IRE1 hem de PERK kollarının PDAK hücrelerinde aktif olduğunu; bununla birlikte, aktivasyonlarının kapsamı ve PDAK ilerlemesini teşvik etmedeki özel rolleri ile ilgili birçok bilinmeyen bulunmaktadır.

Diğer yandan pankreas asiner hücreler, yüksek protein sentezi ve işleme oranları nedeniyle geniş bir ER ağına sahiptir ve bu da onları ER stresine ve UPR aktivasyonuna özellikle duyarlı hale getirir. Asiner hücrelerde UPR bileşenlerinin genetik ablasyonu, UPR'nin hücre sağlığı ve normal işlevinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Hess ve diğerleri, 2011). PERK'in ayrıca fare asiner hücrelerinde hücre sağkalımı için hayati olduğu gösterilmiştir (Lida ve diğerleri, 2007). Bu özellikler hesaba katılarak, asiner hücrelerin PDAK'da hücre sağkalımını desteklemek için XBP1 ve PERK kullanabileceği varsayılmıştır.

2.4.1. Pankreas Kanseri İlaç Direnci ve UPR

Sınırlı etkinlik ve kemoterapiye karşı kazanılmış direnç, PDAK tedavisinde en önemli sorunların başında gelmektedir. Bugüne kadar gemsitabin direnci yaygın olarak bildirilmiş ve kemo direncin üstesinden gelebilecek kombinasyon tedavilerine yönelik araştırmalarda artışa yol açmıştır. Gemisitabin etkili bir kemoterapötik olabilse de, daha agresif bir tümör tipinin nüksetmesine de katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Robinson ve diğerleri, 2021). Gemisitabinin, PDAK'da epitelyal mezankimal geçişi uyardığı, tedaviden sonra hücrelerin hayatta kalmasını, inflamatuvar sitokin sinyalleşmesini ve pro-tümörojenik makrofaj infiltrasyonunu desteklediği bilinmektedir (Robinson ve diğerleri, 2021).

Muhtemel bir kemorezistans mekanizması, kanser hücrelerinin kemoterapinin neden olduğu apoptozdan kaçabilmesi için UPR'nin hayatta kalma yanlısı sinyalini kullanabilir. Panc-

1 hücre dizisinden izole edilen kanser kök hücre benzeri bir popülasyonun gemsitabin ile tedaviden sonra farklı UPR tepkileri gösterdiği, fosfo-PERK ve ATF6N ekspresyonunun arttığı ve fosfo-IRE1'in azaldığı gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). İlginç bir şekilde, androjen tedavisine yanıt olarak prostat kanseri hücrelerinde de benzer bir UPR yanıtı farklılığı bildirilmiştir, bu da kanonik UPR kollarının bu şekilde ayrılmasının nadir bir fenomen olmayabileceğini düşündürmektedir (Sheng ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışma, gemsitabin ile PDAK hücrelerinde köklülükte azalmaya ve ER stresi ile ilişkili apoptoza yol açan yağ asidi sentezi inhibitörleri arasındaki sinerjistik etkileri tanımladı (Tadros ve diğerleri, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Çalışma kapsamında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Laboratuvarında bulunan spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek), +4/ -20 C buzdolabı/ derin dondurucu (Samsung), -80 C dondurucu, distile su cihazı (Nüve), vorteks (Nade), CO₂ inkübatör (ThermoScientific), Hücre analiz cihazı (Muse), Kemilüminesans görüntüleme sistemi (SynGene G:BOX Chemi XX6), Biyogüvenlik kabini, SDS-PAGE yürütme tankı (BioRad), blotlama cihazı (TransBlot Turbo, BioRad), shaker, su banyosu, inverted mikroskop (Olympus), santrifüj (Nüve ve Hettich) ve kuru blok ısıtıcı (BioSan) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Hücre kültürü işlemlerinde DMEM (Sigma), tripsin-EDTA (Sigma), penisilin-streptomisin (Sigma) ve L-glutamin (Gibco) kullanıldı. Hücre canlılık analizi için MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium tuzu) ve bağlantı reaktifi olan PMS (*phenazine methosulfate*) kullanıldı. Protein izolasyonu için 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton, 2.5 mM sodium pirofosfat, 1 mM beta-gliserofosfat, 1 mM sodium orthovanadate, 10 µg/ml leupeptin içeren RIPA Buffer (Cell Signaling Tech. Cat: 9806S) ve Proteaz/ Fosfataz inhibitör karışımı (Thermo Fisher, Cat: 78440) kullanıldı. Protein miktar tayini için DC Protein Assay kiti (BioRad) ve Protein Standard II (Bio-Rad, Cat: 5000007) (Bovine Serum Albumin), protein yükleme aşamasında 2X yükleme tamponu ve Beta merkapto-etanol karışımı (BioRad Cat No: 1610737), protein yürütme işleminde ise 1X yürütme tamponu (Tris, glisin, ve SDS, pH 8.3, BioRad) ve Biotinlenmiş Protein Ladder (Cell Signaling Tech., Cat.No: 7727S) kullanılmıştır. Membran yıkama aşamalarında 1 X TBS-Tween ve membran bloklama işleminde 1 X TBS-Tween ile hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu (Bio-Rad, Blotting-Grade Blocker, Cat.No:170-

6404) kullanıldı. İmmünolojik olarak membran üzerindeki proteinlerin görüntülenebilmesi için HRP konjuge IRE1 α , Perk, XBP-1, apoptoz belirteçleri: bak, bcl-xl; anjiyogenez belirteci VEGFR2 ve ayrıca β -aktin primer antikoru (Cell Signaling Tech.), HRP konjuge anti-rabbit yada anti-mouse IgG sekonder antikoru (Cell Signaling Tech.) ve Kemilüminesans substrat kiti (BioVision, Cat.No: K820-50) kullanıldı. Mebranım tekrar kullanılması için ise Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Cat.No: 46430) kullanıldı.

Hücre sayımı ve canlılık deneyi için Count & Viability kit (Muse, Guava), apoptoz deneyi için Anneksin V kit (Muse, Guava), hücre döngüsü analizi için Cell Cycle kit (Muse, Guava) ve kaspaz 3/ 7 analizi için ise Caspase 3/ 7 kit (Muse, Guava) kullanıldı. Matrijel invazyon deneyinde matrijel matriks (Corning) ve Hema 3 boyama kiti (Fisher Sci.) , klonojenik deneyde ise metanol içerisinde hazırlanmış %0,5'lik kristal viyole çözeltisi kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

İnsan pankreas kanseri hücre hattı PANC-1 (pankreatik duktal epiteloid karsinom), ATCC (Amerikan Hücre Kültürü Bankası)'den temin edildi. Pankreas kanseri hücre hattı 37°C, %5 CO₂ inkübatörde, %10 Fetal Sığır Serum (FBS), Penisilin-streptomisin ve L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri ortamında inkübe edilerek çoğaltıldı ve pasajlandı. Hücreler 75 cm²'lik flasklar içinde konfluent olduğunda (yaklaşık 5-7 gün içinde) tripsin ile muamele edilerek toplandı ve pasajlandı. Hücre sayısı ve canlılık oranını belirlemek amacıyla hücreler Tripan mavisini ile boyandı. Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı ayrıca hücre analiz cihazında (Muse Cell Analyzer) Count&Viability kiti kullanılarak da değerlendirildi (Bölüm 3.2.3.).

3.2.1.1. Pasajlama

Alt kültürleme yada pasajlama, ortamın çıkarılması ve hücrelerin önceki kültürden taze büyüme ortamına aktarılması işlemidir. Pasajlama ile hücre hattının daha fazla çoğaltılması amaçlandı. Pasajlama için şu işlem adımları gerçekleştirildi;

1. Öncelikle kullanılmış hücre kültürü ortamı flasktan serolojik pipet ile çekilerek atıldı.
2. Hücreleri flasktan ayırmak için 37 °C'de ısıtılmış tripsin kullanıldı. T25 flasklar için 1-2 ml, T75 flask için ise 2-3 ml tripsin eklendi ve yaklaşık 5 dk 37 °C, %5 CO₂ inkübatörde bekletildi.
3. Hücrelerin ayrıldığı inverted mikroskopta belirlendikten sonra tripsini inhibe etmek için 2 katı kadar serumlu besiyeri eklendi ve falkon tüp içerisine alınarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatant atılarak pellet uygun miktarda besiyeri ile yeniden süspanse edildi.
5. Süspansiyon eşit bir şekilde 2 ile 4 yeni flaska (hücre yoğunluğuna bağlı olarak) bölündü.
6. Flasklar her gün inverted mikroskopta incelendi. Hücreler flask tabanını kapladığında ya yeniden pasajlandı ya da deneyler için kullanıldı.

3.2.1.2. Hücre Dondurma ve Çözdürme Prosedürü

Panc-1 hücreleri, kontaminasyondan kaynaklanan kayıpları önlemek, genetik değişimi en aza indirmek ve hücre stoğu elde etmek için dondurularak saklandı.

Hücre dondurma işlemi için şu adımlar izlendi;

1. Hücreler öncelikle kontaminasyon açısından kontrol edildi.
2. Hücreleri dondurmak için %10 DMSO (dimetilsülfoksit) içeren complete medya ile dondurma ortamı hazırlandı.
3. Hücreler tripsinize edilerek flask tabanından ayrılması sağlandı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
4. Hücre yoğunluğuna göre, pellet uygun miktarda dondurma ortamı ile yeniden süspanse edildi ve 2 ml'lik kryo tüplere bölüştürüldü.
5. Tüpler önce -20 °C'de 2 saat bekletildikten sonra -80 °C veya sıvı azot tanklarına alınarak muhafaza edildi.

Hücre çözme işlemi için ise şu adımlar izlendi;

1. Sıvı azot yada -80 °C dondurucudan çıkarılan hücreler 37 °C su banyosunda hızlıca çözdürüldü.

2. Hücreler complete medya ile karıştırılarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı ve pellet besiyeri ile yeniden süspanse edilerek T25 flask'a ekildi.

3.2.1.3. Tripan Mavisı İle Boyama

Tripan Mavisı, canlı hücre sayımı için kullanılması önerilen birkaç boyadan biridir. Bu yöntem, canlı hücrelerin bu boyayı almaması, ölü (canlı olmayan) hücrelerin alması ilkesine dayanmaktadır. Bu nedenle ölü hücreler mikroskop altında mavi bir şekilde kolayca ayırt edilebilmektedir. Ayrıca boyama, hücre morfolojisinin görselleştirilmesini kolaylaştırır.

1. Hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet 1 ml besiyeri ile yeniden süspanse edildi.
2. Ependorf tüp içerisinde 1:1 oranında hücre süspansiyonu %0.4 tripan mavisı (Lonza, Cat No: 17-942E) pipetlenerek karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. Daha uzun inkübasyon süreleri hücre ölümüne ve canlı hücre sayımlarının azalmasına yol açacağından dolayı hücreler, tripan mavisı ile karıştırıldıktan sonra 3 ila 5 dakika içinde sayıldı.
3. Karışımdan 10 µl alınarak hemasitometreye konuldu. İverted mikroskopta mavi ile boyanan (cansız) ve boyanmayan (canlı) hücreler sayıldı. Bu işlem 4 kez tekrarlandı ve ortalama sayı elde edildi.
4. Hemasitometrenin her karesi, 0.1 mm³ veya 10⁻⁴ cm³'lük bir toplam hacmi temsil eder. 1 cm³ yaklaşık 1 ml'ye eşdeğer olduğundan, ml başına hücre konsantrasyonu aşağıdaki hesaplama ile belirlendi;

$$\text{Hücre Sayısı} = \text{Her karedeki hücre sayısı ortalaması} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

5. Yüzde canlı hücre sayısı ise şu formül ile elde edildi;

$$\% \text{ Canlı Hücre} = \frac{\text{ml başına toplam canlı hücre sayısı}}{\text{ml başına toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.2.2. MTS/ PMS Canlılık ve Sitotoksisite Deneyi

Hücre sayımı yapıldıktan sonra her grup için üç tekrar olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu (5000 hücre/ kuyucuk) plakalara ekildi. Hücrelerin yapışmasına izin vermek için plaka 24 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi ve diğer gün hücreler deney ilaçları ile 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. IRE1 inhibitörü (STF-083010) 5 µM ile 200 µM arasında, Gemcitabin 500 µg/ ml ile 10 mg/ ml arasında değişen konsantrasyonlarda test edildi. Thapsigargin ise literatürde mevcut konsantrasyon (1 µM) ile test edildi. Diğer aşamaya geçmeden önce MTS ve PMS solüsyonları hazırlandı; 42 mg MTS hassas tartı ile tartılarak 21 ml dPBS içerisinde çözdürüldü. PMS için de 9.2 mg tartılarak 10 ml dPBS içerisinde çözdürüldü. Kullanıma kadar saklanması için -20 °C'de muhafaza edildi. Deney günü ayrı ayrı hazırlanan MTS ve PMS solüsyonları 2000 µl MTS ve 100 µl PMS olacak şekilde falkon tüpte birleştirildi ve orta hızda vortekslendi. İlaçlar ile muamele sonrasında 96-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, hazırlanmış tetrazolium bileşiği olan MTS (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium tuzu*) ve bağlantı reaktifi olan PMS (*phenazine methosulfate*) solüsyon karışımı 20 µl olacak şekilde eklendi. Alüminyum folyaya sarılı olarak inkübatörde yaklaşık 4 saatlik bir inkübasyondan sonra MTS-PMS solüsyonunun hücre içi indirgenmesi sonucu çözünmez koyu renkli formazana dönüşmesi beklendi. Bu arada hücreler düzenli olarak invert mikroskop ile noktalanma ve intrasellüler presipitat açısından kontrol edildi. Ardından 490 nm (nanometre) dalga boyundaki ELISA plak okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek) ile absorbanlar okutulmuş gruplar karşılaştırıldı.

3.2.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Deneyi

Her deney aşamasında hücre ekimi için gerekli olan hücre sayımı ve MTS/PMS deneyi sonuçlarından bağımsız olarak deney ilaçlarının hücrelerin canlılık oranları üzerine etkisini belirleyebilmek için Count & Viability kit'i kullanılmıştır. Canlılık belirleme amacıyla hücreler 6-çukurlu plakalara 5×10^5 hücre/ kuyu olacak şekilde ekildi deney ilaçları ile MTS/PMS deneyinde belirlenen IC50 konsantrasyonları ile 48 saat muamele edildi ve sürenin sonunda hücreler tripsinize edilerek falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırıldı ve her pellet 180 µl besiyeri ile orta hızda vortekslenerek yeniden süspanse edildi. Her gruptan 50 µl alınarak ayrı ayrı 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı ve

üzerlerine 450 ml Count & Viability solüsyonundan eklendi. Örneklerin iyice karıştığından emin olundu ve 5 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Ardından hücre analiz cihazında (Muse Cell Analyzer, Guava, Luminex Corp.) okuma yapıldı.

3.2.4. Kombinasyon İlaç Etkinliğinin Sinerjistik Analizi

Gemsitabin ve STF-083010'un kombinasyonunun arasındaki sinerjistik etki Chou-Talalay yöntemine göre değerlendirildi (Chou, 2006). Hücre sayımı yapıldıktan sonra her grup için dört tekrar olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu (5000 hücre/kuyucuk) plakalara ekildi. Hücrelerin yapışmasına izin vermek için plaka 24 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi ve diğer gün hücreler 48 saat boyunca ilaçların IC30, IC50 ve IC70 konsantrasyonlarının kombinasyonları ile muamele edildi. Hücre canlılığı, daha önce bahsedildiği gibi (Bölüm 3.2.2. MTS/ PMS Canlılık ve Sitotoksosite Deneyi) MTS/ PMS deneyi ile değerlendirildi.

Gemsitabin ve STF-083010'un birleşik etkisi ve izobologram analizi CompuSyn Yazılımı (ComboSyn) kullanılarak medyan doz etkisi yöntemiyle değerlendirildi. İzobologram, iki ilacın farklı dozlarının eşdeğer kombinasyonlarını gösteren bir grafik olmakla birlikte farklı doz seviyelerinde aditif, sinerjistik veya antagonistik etkileri göstermektedir. Bu yöntem, iki ajan arasındaki kombinasyonun etkisine dayalı olarak bir CI (Kombinasyon İndeksi) belirler. Bu çalışmada $CI < 1$ olması sinerjistik, $CI > 1$ olması antagonistik ve $CI = 1$ olduğunda ise aditif etki olarak kabul edildi (Tablo 4) (Nurcahyanti ve Wink, 2016).

İlaç etkileşimleri, medyan etki ilkesine dayalı olarak CI yöntemi ile değerlendirildi (Chou, 2006). Medyan etki denklemi, aşağıdaki denklemde iki ilacın kombinasyonu ile sitotoksosite etkisi arasında ilişki kurar:

$m = 1$ olduğunda

$$\frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} = \frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} + \frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} - \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2}$$

$m \neq 1$ olduğunda

$$\left[\frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} \right]^{1/m} = \left[\frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} \right]^{1/m} + \left[\frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} \right]^{1/m} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2}$$

D, ilacın dozu, D_m, medyan-etki grafiğinin x-kesişiminden belirlenen gücü gösteren medyan-etki dozu: f_a, dozdan etkilenen fraksiyonu; f_u, etkilenmeyen kesiri (f_u = 1 - f_a); ve m, medyan-etki grafiğinin eğimi tarafından belirlenen doz-etki eğrisinin sigmoidliğini (şeklini) belirten bir üsdür. Kombinasyon İndeksi (CI) daha sonra aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

Medyan etki denklemi, hücrelerin yüzde 'x'ini (IC₃₀, 50 ve 70) inhibe eden tek başına ilaç 1 ve 2'nin dozu olan D_x'i hesaplamak için kullanıldı. (D)₁ ve (D)₂, hücrelerin yüzde 'x'ini (IC₃₀, 50 ve 70) inhibe etmek için kombinasyon halinde kullanılan gemsitabin ve STF-083010'un konsantrasyonlarıdır.

İlaç kombinasyonu sinerji etkileşimi sağladığında, tek başına ilacın konsantrasyonu ile kombinasyon halindeki ilacın azaltılmış konsantrasyonu arasındaki kat sayısını veya oranını bilmek için doz azaltma indeksi (DRI) veya sitotoksisite potansiyeli hesaplandı ve bu değer klinik düzeyde önemli bir konu olarak nitelendirilmektedir (Chou, 2006; Eid ve diğerleri, 2012). DRI > 1 sinerjiyi gösterir. DRI, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$DRI = \frac{\text{Gemsitabin } IC_{50}}{\text{STF - 083010 ile kombinasyon halinde Gemsitabin } IC_{50}}$$

Tablo 4. İlaç kombinasyonunun etkileşim türleri.

Kombinasyon İndeksi Aralığı	Açıklama
<0.1	Çok güçlü sinerji
0.1–0.3	Güçlü sinerji
0.3–0.7	Sinerji
0.7–0.85	Orta düzeyde sinerji
0.85–0.90	Hafif sinerji
0.90–1.10	Aditif

1.10–1.20	Hafif antagonizm
1.20–1.45	Orta derecede antagonizm
1.45–3.3	Antagonizm
3.3–10	Güçlü antagonizm
>10	Çok güçlü antagonizm

3.2.5. Klonojenik Deney

Hücre canlılığını ve proliferasyonunu göstermek amacıyla yapılan klonojenik deney için 6 gözlü kuyucuk içeren plakalara 10.000 hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekildi. Her bir grup için 2 kuyucuk kullanıldı. Hücreler ekildikten sonra yapışmalarına izin vermek için 24 saatlik bir inkübasyon sonrasında deney ilaçları ile muamele edildiler ve her 5 günde bir olmak üzere kontrol edildiler. Yaklaşık 2. haftanın sonunda NT (non-treated) gruptaki hücreler kuyucuğu kapladıktan sonra deney sonlandırıldı. Sonrasında hücre kolonileri içeren plakanın kuyucukları PBS ile yıkandı ve metanol ile fikse edildi. %70 metanol içerisinde hazırlanmış %0.5'lik kristal viyole çözeltisi ile 30 dk muamele edildi. Kuyucuklar distile su ile yıkandıktan sonra koloniler belirlendi ve sayım yapıldı. Koloni/ hücre sayıları ve hücre yoğunluk analizi ImageJ (National Institutes of Health) programının 'Colony Area' eklentisi kullanılarak yapıldı.

3.2.6. Matrijel İnvazyon Deneyi

Deney ilaçlarının hücrelerin invazyon ve metastaz yapma yeteneği üzerindeki etkilerini belirlemek için transwell invazyon deneyi dizayn edildi. İnvazyon deneyi 24 kuyucuklu plakalarda 8 µm çapta porlar içeren insertlerde matrijel matriks kullanılarak yapıldı. Bu deneyde matrijel matriks bazal membran olarak işlev görmektedir.

Deneye başlamadan önce hücreler T25 flasklara her grup için 250.000 hücre/ flask olacak şekilde ekildi ve deney ilaçları muamele edildi. Matrijel matriks (ECM, Corning) deneyden 1 gece önce + 4 °C'de buzdolabında eritildi. Deney günü buz üzerinde çalışılarak, 3000 µl FBS'siz (FBS (-) negatif) soğuk medium ve 200 µl matrijel matriks pipetaj yapılarak falkon içerisinde karıştırıldı. İnsertler (üst kuyucuk) kuyucuklara yerleştirilerek üzerleri 100 µl Matrigel ile kaplandı. Güvenlik kabini içerisinde 2 saat boyunca, kapağı hafif açık şekilde bekletilerek jelleşmenin gerçekleşmesi sağlandı. Sürenin sonunda jelleşmeyen sıvı kısım

matrijele zarar vermeden pipetle çekilerek atıldı. Plate, alüminyum folyoya sarılarak + 4 °C'de 1 gece boyunca bekletildi. Böylece membranın porları matrijel tarafından tıkanarak invaziv olmayan hücrelerin geçişinin engellendiği bir ortam oluşturuldu. Ertesi gün insertlerin üzerine pankreas kanseri hücreleri (200 µL FBS negatif medium'da 50.000 hücre) ekildi. Alt kuyucuklara ise 500 µl %10 FBS'li medium eklendi. İnvazyonun gerçekleşmesi için 48 saat beklendi. Sürenin sonunda membranın diğer tarafına geçmeyen hücreler pamuklu çubuk ile nazikçe uzaklaştırıldı. İnsertlerde porun öbür tarafına geçen hücreleri saymak için ise membranlar bistüri yardımı ile kesildi ve HEMA3 boya kiti (Fisher Sci.) içindeki solüsyonlar ile fikse edildi, boyandı ve mikroskopta incelenerek sayıldı. Hücre sayımı istatistiki analizi GraphPad Prism v9.0 programında önce gruplar arası dağılım için One Way ANOVA testi (ortalama ve standart sapmalar verildi) ve ardından gruplar arası fark için Bonferroni ikili karşılaştırma testi yapıldı. $p \leq 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

3.2.7. Apoptoz Deneyi (Annexin V)

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, hücre büyümesi ve çoğalmasının önemli ve aktif bir düzenleyici yoludur. Apoptoza giren hücreler, karakteristik fizyolojik değişikliklerle sonuçlanan hücre içi süreçleri başlatarak spesifik indüksiyon sinyallerine yanıt verir. Bunlar arasında fosfatidilserinin (PS) hücre yüzeyine eksternalizasyonu, spesifik hücre proteinlerinin bölünmesi ve degradasyonu, nükleer kromatinin sıkıştırılması ve fragmantasyonu, ve membran bütünlüğünün kaybı (geç aşamalarda) yer almaktadır (Rudin ve Thompson, 1997). Annexin V, normalde hücre zarının iç yüzünde lokalize olan bir zar bileşeni olan PS için yüksek afiniteye sahip, kalsiyuma-bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir (van Heerde ve diğerleri, 1995). Apoptotik yolağın başlarında, PS molekülleri, Annexin V'in kolayca bağlanabileceği şekilde hücre zarının dış yüzeyine lokalize olur (Vermes ve diğerleri, 1995).

Bu amaçla deney ilaçlarının Panc-1 hücrelerinde apoptoz üzerine etkilerini belirlemek için Annexin V bazlı deney dizayn edildi. Öncelikle hücre canlılığı doğrulandıktan sonra Panc-1 hücreleri 500.000 hücre/ dish olacak şekilde petrilere ekildi. Ekilen hücrelerin yapışmasına izin vermek için 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Sürenin sonunda hücreler deney ilaçları ile 48 saat boyunca muamele edildi. Ardından dishlerin içindeki besiyerleri ayrı ayrı falkon tüpler içine alındı. Dishler için yaklaşık 1 ml tripsin eklendi ve inkübatörde 5-7 dk bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı inverted mikroskopta belirlendikten sonra her bir dish içindeki tripsin miktarının 2 katı kadar taze besiyeri ile içleri

yıkandı ve tüm hücreler toplanarak bu karışım ilk baştaki falkon tüplerin içine alındı. Falkonlar 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında tüplerdeki süpernatantlar uzaklaştırıldı ve pelletler hücre analiz cihazının ölçebileceği hücre konsantrasyonunu (yaklaşık 250.000-500.000 hücre/ml) elde edebilmek için uygun miktarda besiyeri ile yeniden süspanse edildi. Süspanse edilen hücrelerden her grup için ayrı ayrı 100'er µL alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Ardından bunların üzerine 100 µL Annexin V, 7-Amino Aktinomisin D (7-AAD) içeren solüsyondan eklendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında yaklaşık 20 dk inkübe edildi. Cihaz ile ölçüm yapılarak her grup için canlı ve apoptotik hücre miktarları belirlendi. İstatistiki analiz GraphPad Prism v9.0 programı ile önce OneWay Anova testi, daha sonra gruplar arası fark için Bonferroni ikili karşılaştırma testi yapıldı. $p < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

3.2.8. Hücre Döngüsü Deneyi

Hücre siklusu analizi için hücreler propidium iodide (PI) ve RNAase içeren solüsyonlar ile muameleye tabi tutuldu. PI nükleer interkalasyonla DNA'yı boyar ve hücre siklusunun değişik basamağındaki hücreyi ayırt eder ve RNAase varlığında bu etkisi spesifik hale gelir. İnterfaz aşamasında bölünme dışındaki 'dinlenen' hücreler (G0/ G1 fazı), her kromozomun iki kopyasını içerir. Hücreler döngüye girdikçe kromozomal DNA'yı (S fazı) sentezlerler. PI'den gelen floresan yoğunluğu, tüm kromozomal DNA iki katına çıkana kadar (G2/ M fazı) artar. Bu aşamada, G2/ M hücreleri, G0/ G1 popülasyonunun iki katı yoğunlukta floresan verir. G2/ M hücreleri sonunda iki hücreye bölünür. Bu deney, her hücre döngüsü fazındaki (G0/ G1, S ve G2/ M) hücrelerin yüzdesini ayırt etmek ve ölçmek için DNA içeriğinin PI bazlı boyamasını kullanır.

Bu deneyde hücreler önce fiksasyon işlemine tabi tutuldu ve daha sonra fikse edilen hücreler boyandı. Bu amaçla önce fiksasyon aşaması için, hücre canlılığı doğrulandıktan sonra Panc-1 hücreleri 500.000 hücre/ dish olacak şekilde petrilere ekildi. Ekilen hücrelerin yapışmasına izin vermek için 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Sürenin sonunda hücreler deney ilaçları ile 48 saat boyunca muamele edildi. Ardından dishlerin içindeki besiyerleri ayrı ayrı falkon tüpler içine alındı. Dishler için yaklaşık 1 ml tripsin eklendi ve inkübatörde 5-7 dk bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı inverted mikroskopta belirlendikten sonra her bir dish içindeki tripsin miktarının 2 katı kadar taze besiyeri ile içleri yıkandı ve tüm hücreler toplanarak bu karışım ilk baştaki falkon tüplerin içine alındı. Falkonlar 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellete yaklaşık 1 ml PBS eklenerek

pipetaj yapıldı. Pellet PBS ile çözüldükten sonra 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından tüplerin dibinde yaklaşık 50 µL PBS kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan PBS ile pellet çözdürüldü ve orta hızda vorteks yapıldı. Ardından hücrelerin üzerine 1'er ml %70 soğuk etanol eklendi ve orta hızda vortekslendi. Fiksasyon aşamasının tamamlanması için hücreler buzdolabında -20 °C'de yaklaşık 24 saat bekletildi.

Etanol ile fikse edilen hücrelerden 200 µL alınarak yeni falkon tüplere konuldu ve 300g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldı ve her pellete 250 µL PBS eklenerek pipetaj yapıldı. 300 g'de 5 dk daha santrifüj yapıldıktan sonra süpernatantlar uzaklaştırılarak her tüpe 200 µl PI ve RNase karışımı içeren hücre döngüsü reaktifinden eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildikten sonra hücre analiz cihazında okuma yapıldı. İstatistiki analiz GraphPad Prism v9.0 programı ile önce OneWay Anova testi, daha sonra gruplar arası fark için Bonferroni ikili karşılaştırma testi yapıldı.

3.2.9. Kaspaz 3/ 7 Deneyi

Kaspazlar (sistein bağımlı aspartat spesifik proteazlar) proapoptotik sinyallere yanıt olarak, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sürecinin yayılmasında merkezi bir rol oynayan sistein proteazlardır (Riedl ve Shi, 2004). Bazı kaspazlar hücre içi kaskadı başlatmak için hareket ederken, efektör kaspazlar olarak adlandırılan diğer kaspazlar aşağı akışta hareket eder ve yapısal proteinlerin (Kaspaz-3 ve Kaspaz-7) bölünmesi yoluyla hücresel yıkımı yönlendirir. Kaspaz-3/ 7'nin aktivasyonu bu nedenle apoptozun ayırt edici bir özelliğidir (Porter ve Jänicke, 1999).

Bu amaçla Panc-1 hücreleri 500.000 hücre/dish olacak şekilde petrilere ekildi. Ekilen hücrelerin yapışmasına izin vermek için 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Sürenin sonunda hücreler deney ilaçları ile 48 saat boyunca muamele edildi. Ardından dishlerin içindeki besiyerleri ayrı ayrı falkon tüpler içine alındı. Dishler için yaklaşık 1 ml tripsin eklendi ve inkübatörde 5-7 dk bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı inverted mikroskopta belirlendikten sonra her bir dish içindeki tripsin miktarının 2 katı kadar taze besiyeri ile içleri yıkandı ve tüm hücreler toplanarak bu karışım ilk baştaki falkon tüplerin içine alındı. Falkonlar 300g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelletler 50 µl 1x Assay Buffer BA içerisinde yeniden süspanse edildi. Ardından 1:8 oranında PBS ile seyreltilmiş Kaspaz 3/ 7 reaktifinden her tüpe 5'er µl eklendi ve %5 CO₂ 37 °C sıcaklıkta 30

dk inkübe edildi. Ardından her tüpe 1X Assay Buffer BA ile seyreltilen Kaspaz 7-AAD çalışma solüsyonundan 150'şer µl eklendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dk inkübe edildi. Sürenin sonunda hücreler hücre analiz cihazında analiz edildi.

3.2.10. Western Blot

ER stresini, hücre ölümünü ve anjiyogenezi protein düzeyinde göstermek amacıyla western blot deneyi dizayn edildi. Western blot deneyinde hücreler her grup için flask başına 1×10^6 hücre/ flask olacak şekilde ekildi. Ardından hücreler deney ilaçları olan Gemsitabin, IRE1 α inhibitörü STF-083010 ve Thapsigargin ile tek tek ve kombinasyonları ile birlikte muamele edildi. Protein izolasyonu ve blotlama sonrası PVDF membran IRE1 α , Perk, XBP-1; apoptoz belirteçleri: bak, bcl-xl; anjiyogenez belirteci VEGFR2 ve ayrıca β -aktin) antikoları ile inkübe edildi. İmmünreaktivitenin gösterilmesi amacıyla kemilüminesans deteksiyon kitleri kullanıldı ve bantlar Jel görüntüleme cihazı ile görünür hale getirildi. Protein ekspresyonlarına ait kat değişimi (bant yoğunluğu) Image J programı ile hesaplandı.

3.2.10.1. Protein İzolasyonu

Pankreas kanseri hücreleri 6 ml besiyeri içeren T25 flasklara 1×10^6 hücre/flask olacak şekilde ekildi ve yapışmalarına izin vermek için 37°C, %5 CO₂' de yaklaşık olarak 24 saat inkübe edildi. Hücreler yüzeye yapıştıktan sonra deney ilaçları olan Gemsitabin, IRE1 α inhibitörü STF-083010 ve Thapsigargin ile tek tek ve kombinasyonları ile birlikte 48 saat boyunca muamele edildi. 48 saat sonra tüm grupların mediumları serolojik pipet ile çekilerek falkon tüplere alındı. Flasklara 2 ml tripsin eklenerek inkübatörde yaklaşık 5 dk kadar inkübe edildi. Sürenin sonunda hücrelerin yüzeyden ayrıldığı inverted mikroskop ile kontrol edildi. Tripsini inhibe etmek için her flaska 4 ml besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra her grup kendi falkon tüplerinin içerisine alındı. 1200 rpm'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatantlar uzaklaştırıldı. Pelletler ise 1'er ml buz gibi soğuk PBS ile yeniden süspanse edilerek 1,5 ml'lik ependorf tüpler içerisine alındı. Ardından +4°C'de yaklaşık 5000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Lizis işlemi için 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton, 2.5 mM sodium pirofosfat, 1 mM beta-gliserofosfat, 1 mM sodium

orthovanadate ve 10 µg/ ml leupeptin içeren RIPA Buffer (Cell Signaling Tech. Cat: 9806S) kullanıldı. Ayrıca lizis tamponuna kullanımdan hemen önce 10 µl Proteaz ve Fosfataz inhibitör karışımından (Thermo Fisher, Cat: 78440) eklendi ve hafifçe vortekslendi. Hazırlanan RIPA buffer ve Proteaz/ Fosfataz inhibitör karışımından her ependorf'a yaklaşık 100 µl olacak şekilde eklendi ve lizis işlemine tabii tutuldu. Ependorflar pellet parçalanana kadar yaklaşık 40 saniye süreyle vortekslendi ve 10 dk buz üzerinde bekletildi. Bu işlem yaklaşık 3-5 kez tekrarlandı. Lizis işleminin ardından tüpler 13.000 rpm'de +4°C'de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Ardından süpernatantlar dikkatli bir şekilde yeni ependorf tüplere alındı ve deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.10.2. Protein Miktarının Ölçülmesi

Hücrelerden elde edilen total protein miktarının ölçümü DC Protein Assay kiti (Bio-Rad, Cat: 5000112) ve 96 çukurlu plakalar kullanılarak yapıldı. Deneye hazırlık için ilk olarak gerekli olacak her ml reaktif A'ya 20 µl reaktif S eklendi. Protein Standard II (Bio-Rad, Cat: 5000007) (Bovine Serum Albumin) kullanılarak konsantrasyonları 25 µg/µl ile 1250 µg/µl arasında değişen beş adet Bovine Serum Albumin (BSA) dilüsyonları oluşturuldu. Ayrıca hiç BSA bulunmayan standart için distile su kullanıldı. Diğer yandan protein örnekleri -80°C'den çıkartılarak buz üzerinde çözülmesi beklendi. Ardından tüm örnekler vortekslenerek iyice karışması sağlandı ve 2X ve 4X olacak şekilde distile su ile seyreltildi. 2x dilüsyon için 5 µl örnek + 5 µl distile su; 4x dilüsyon için 5 µl örnek + 15 µl distile su konuldu. BSA dilüsyonları ve seyreltilen protein örnekleri 5'er µl ve yan yana 3 tekrar olacak şekilde 96 çukurlu plakaya eklendi.

Deneye başlamadan önce hazırlanan reaktif A ve reaktif S karışımı örnek ve standart bulunan her bir kuyucuğa 25'er µl olacak şekilde baloncuk yapmadan eklendi. Hemen sonra yine kitte bulunan reaktif B'den her kuyucuğa 200 µl dikkatlice eklendi. Bu aşamadan sonra karanlıkta çalışılmaya özen gösterildi ve baloncuk kontrolü yapılarak her kuyucukta bulunan baloncuklar çarpaz kontaminasyona dikkat edilerek pipet ucu ile uzaklaştırıldı. Plaka, shaker'de 5-10 sn yavaşça karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda absorbanslar 750 nm dalga boyuna hazırlanmış spektrofotometre cihazında okutuldu (Epoch Microplate Spectrophotometer). Çıkan sonuçlar

excell programında analiz edildi. Standart ve örneklerin optik yoğunluklarının (OD) ortalaması alınarak önce standart eğri hazırlandı. Standartlar ile oluşturulan eğrinin korelasyon katsayısının (Correlation Coefficient - R2 değeri) bire yakın olması sağlandı. Ardından protein örneklerinin absorbans ortalamaları standart eğri ile karşılaştırıldı ve her bir örnekteki protein miktarı belirlendi. Yapılan her western blot deneyi öncesinde bu deney tekrarlandı.

3.2.10.3 Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS-PAGE) Yürütülmesi

İzole edilen ve miktarları belirlenen proteinlerin SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için %8–16 Mini Protean TGX Tris-HCl (Bio-Rad, Cat. No: 4561104) hazır jeller kullanıldı. Bu jeller 10 adet kuyucuğa ve 50 µl hacime sahiptir. Örnekler jele yükleme için hazırlanmadan önce diğer aşamalarda kullanılacak solüsyonlar hazırlandı.

Proteinlerin jelde yürütülmesi için kullanılacak 25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS ve 8.3 pH oranına sahip 10X yürütme tamponundan (BioRad, Cat No: 1610732) 100 ml alınarak 900 ml distile su ile 1X'e seyreltildi.

Jelde yürütülen proteinlerin PVDF membrana aktarılması sırasında kullanılacak olan 25 mM Tris, 190 mM glisin ve 8.3 pH oranına sahip 10X transfer tamponundan ise (BioRad, Cat No: 1610734) 100 ml alınarak 200 ml methanol ve 700 ml distile su ile 1X'e seyreltildi ve soğuması için +4°C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.10.4. Protein Örneklerinin Jele Yükleme İçin Hazırlanması

Jelde her kuyuya toplam 40 µg protein yüklenmesi için önceden miktarları belirlenen örnekler excell üzerinden 1.3 hata payı ile birlikte hesaplanarak her bir örnekten alınması gerek miktarlar belirlendi. Toplam hacmin 2/3 ü kadar distile su ile seyreltilen örneklere son aşamada toplam hacmin 1/3 ü kadar yükleme tamponu (BioRad Cat No: 1610737) (kullanımdan önce beta merkaptto etanol eklenen) eklendi. Örnekler pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandıktan sonra, kuru blok ısıtıcıda 95-100 °C'de 5 dk kaynatıldı. Böylece proteinlerin denatüre edilmesi sağlanmış oldu. Sürenin sonunda 13.000 rpm'de 2-3 sn spin attırılan örnekler artık 40 µl'de 40 ug protein içeriyordu. Ardından örnekler hızlıca jele yüklenmeye başlandı.

3.2.10.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi

Örnekleri yükleme için hazırlanması sırasında (yaklaşık 1 saat önce) jel +4°C'den alındı ve taraklar çıkarılarak jelin oda sıcaklığına gelmesi için elektroforez tankına yerleştirildi. Ardından daha önce hazırlanan 1X yürütme tamponu elektroforez tankının yarısına gelecek kadar döküldü. Bu sırada jelin kuyucuklarının da yürütme tamponu ile dolduğundan emin olundu. Jelin ilk ve son kuyucuğu 7'şer µl Biotinlenmiş Protein Ladder (Cell Signaling Tech., Cat.No: 7727S) moleküler ağırlık belirteci ile yüklendi. Daha sonra sırası ile kuru blok ısıtıcıda 95-100 °C'de kaynatılan protein örneklerinden 40'ar µl yüklendi ve örnekler yığınlama kısmından çıkana kadar 50 V akım uygulandı, daha sonra 100 V akıma çıkartıldı. Yükleme boyası jelin alt kısmında bulunan siyah şerite gelene kadar yürütüldü (yaklaşık 60 dakika).

3.2.10.6. Blotlama (Protein Örneklerinin PVDF Membrana Aktarılması)

Protein örneklerinin PVDF membrana aktarılması için yarı-ıslak transfer yöntemi tercih edildi. Jel yürütme işlemi bittikten sonra kaset dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı ve jele zarar vermeden kaset açıldı. Jelin örnek yükleme bölümü kesilerek atıldı ve örneklerin bulunduğu kısım nazikçe buzdolabında soğutulmuş 1X transfer tamponu içerisinde yıkandı. Diğer yandan başka bir kapta hidrofobik özelliğe sahip PVDF membranı aktifleştirmek için metanol içerisinde 30-60 sn kadar yıkandı. Ardından membran 2-3 defa distile su ile yıkılarak soğuk 1X transfer tamponu bulunan kap içerisinde bekletildi.

Filtre kağıtları 2 ayrı tomar olacak şekilde 1x transfer tamponu içinde iyice ıslatılarak sırasıyla; filtre kağıdı, PVDF membran, jel ve tekrar filtre kağıdı olacak şekilde Trans Blot Turbo (BioRad) cihazının rafına yerleştirildi (jel katot, membran anot yakınında olacak şekilde). Ardından membran ile jel arasındaki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için 'roller' ile dikkatlice fazla bastırılmadan sandviçin üzerinden geçildi. Biriken transfer tamponu uzaklaştırıldıktan sonra raf cihaza yerleştirildi. Transfer işlemi 2.5 A/ 25V akımda 3 dakika süreyle gerçekleştirildi.

3.2.10.7. Membran Bloklama İşlemi

Bloklama aşamasına geçmeden önce yıkama solüsyonu olarak kullanılacak olan, 137 mM Sodyum Klorür, 20 mM Tris ve 7.6 Ph oranına sahip 10X TBS solüsyonu hazırlandı. 1X TBS-%0,1 Tween-20 solüsyonu hazırlamak için 99 ml 10X TBS solüsyonuna, 1 ml Tween-20 solüsyonu ve 900 ml distile su eklendi.

Blotlama işleminden ardından membranın antikor ile muamelesinden önce non-spesifik bağlanmaların önüne geçmek için membran bloklama işlemine tabii tutuldu. Bunun için blotlama cihazından çıkarılan membran 1X TBS-Tween içerisinde hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu (Sigma, Cat No: M7409) solüsyonu ile oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 1 saat süreyle muamele edildi.

3.2.10.8. Membran Üzerindeki Proteinin İmmünolojik Olarak Gösterilmesi

Bloklama işlemi tamamlandıktan sonra membran 5 kez 5'er dk 1X TBS- %0,1 Tween 20 solüsyonu ile orbital karıştırıcıda yıkandı. Bu sırada membran ile inkübe edilecek primer antikor, 1X TBS-%0,1 Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu içerisinde kullanıcı talimatlarına göre verilen 1:1000 seyreltme oranı ile seyreltilti. Membranın büyüklüğü ve inkübasyonun yapılacağı kabın büyüklüğü dikkate alınarak yeterli miktarda primer antikor çözeltisinin elde edildiğinden emin olundu. Yıkama işleminin ardından membran, hazırlanan primer antikor çözeltisi ile +4°C'de ve orbital karıştırıcıda gece boyu inkübe edildi.

Ertesi gün primer antikor çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra membran 5 kez 5'er dk 1X TBS- %0,1 Tween-20 içerisinde orbital karıştırıcıda yıkandı. Bu sırada primer antikora bağlanacak olan sekonder antikor çözeltisi hazırlandı. Bunun için öncelikle primer antikorun hangi hayvan türünden elde edildiğine dikkat edildi (Tavşan veya fare). Ardından primer antikora bağlanacak HRP (yaban turpu peroksidazı) konjuge anti-tavşan yada anti-fare IgG sekonder antikorlar, 1X TBS-%0,1 Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu içerisinde kullanıcı talimatlarına göre verilen 1:2000 seyreltme oranı ile seyreltilti. Sekonder antikor ile muamele oda sıcaklığında orbital karıştırıcı üzerinde yaklaşık 1 saat süre ile yapıldı. Sürenin sonunda sekonder antikor çözeltisi uzaklaştırılarak membran 1X TBS- %0,1 Tween-20 ile 3 kez 5'er dk orbital karıştırıcıda yıkandı. Ardından membran görüntüleme işlemine geçildi.

3.2.10.9. Membran Görüntüleme İşlemi

Membran görüntüleme işlemi için membran kemilüminesans görüntüleme cihazının içerisine asetat kağıdı ile birlikte yerleştirildi. Ardından Kemilüminesans Substrat Kiti (BioVision, Cat.No: K820-50) içerisindeki reaktif A ve reaktif B kullanıcı talimatına göre 1:1 oranında ependorf tüp içerisinde karıştırıldı. Bu işlemin karanlık ortamda yapılmasına özen gösterildi. Ardından cihaza yerleştirilen membran hazırlanan substrat karışımı ile kaplandı ve membranın üstü de asetat kağıdı ile kapatıldı. Cihazın kapağı kapatılarak reaksiyonun gerçekleşmesi için yaklaşık 1-2 dakika beklendi. Bu sırada cihazın yazılımı üzerinden gerekli işlemler yapıldı ve membran görüntüleme için gerekli optimum süre belirlenerek uygun pozlandırma ayarı ve süre tanımlandı. Membran görüntüsü çekildikten sonra tif formatında kaydedilerek dansitometrik analize geçildi.

Dansitometrik analiz için ImageJ (NCBI, NIH) yazılımı kullanıldı. Yazılım üzerinden membran görüntüsü açıldı ve bantların bulunduğu bölüm seçilerek yoğunluk analizi yapıldı. Sonuçlar kaydedilerek analizi yapılmak üzere bilgisayarda saklandı. Protein ekspresyon sonuçları, excell üzerinden yükleme kontrolü olan beta aktin ile normalize edilerek belirlendi.

3.2.10.10 Membranın Tekrar Kullanımı

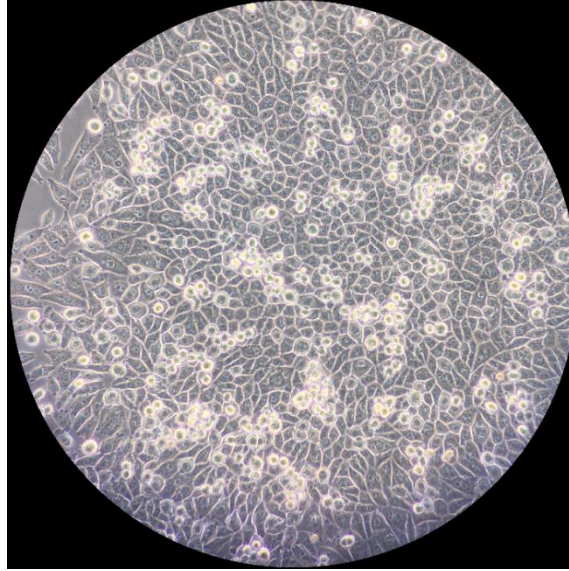
Aynı membran üzerinde başka bir proteinin işaretlenmesi için membran tekrar kullanılabilir. Bunun için öncelikle önceki işaretlemeden kalan antikorlar uzaklaştırılmaktadır.

Bu amaçla membran, Western Blot Stripping Buffer (Nzytech, Cat.No: MB19101) ile yaklaşık 5-10 dk oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda yıkandı. Ardından kalıntıları uzaklaştırmak için 1X TBS-%0,1 Tween 20 çözeltisi ile 5 kez 5'er dk orbital karıştırıcıda yıkandı. Daha sonra Bölüm 3.2.10.7.'den itibaren aynı işlemler uygulandı. İlgilenilen proteinler bakıldıktan sonra en son aşamada yükleme kontrolü olarak beta-aktin proteini ile işaretleme yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü

ATCC'den temin edilen pankreas kanseri hücre hattı PANC-1 (pankreatik duktal epiteloid karsinom) flasklar içinde çoğaltıldı, pasajlandı, donduruldu ve deneylerde kullanılmak üzere -80 °C buzdolabında ve azot tankında saklandı. Pankreas kanser hücre hattı Panc-1'e (pankreatik duktal epiteloid karsinom) ait karakteristik görüntü epitelyal karakterde ve koloni benzeri yapılar oluşturduğu gözlemlendi (Resim 1).



Resim 1. Panc-1 hücrelerine ait karakteristik görüntü.

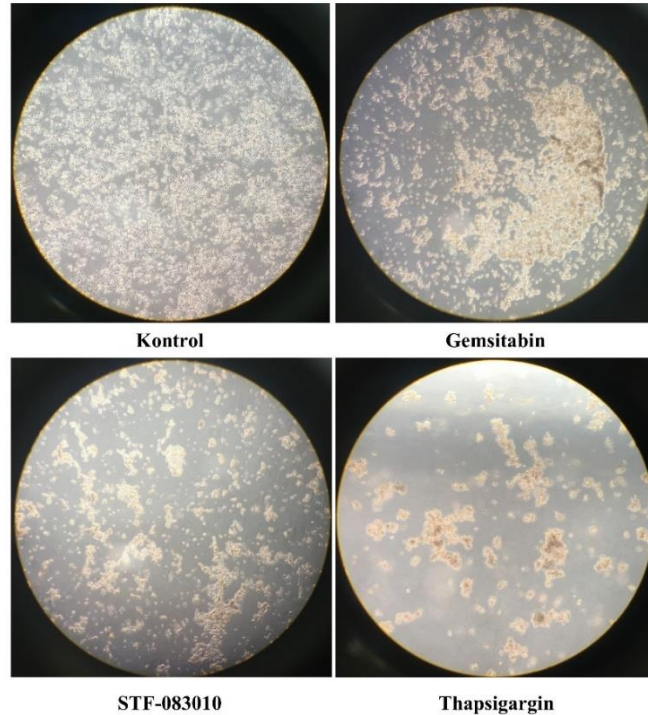
4.2. MTS/ PMS Canlılık Deneyi Bulguları

Gemcitabin ve STF-083010'un PANC-1 hücreleri üzerindeki büyüme engelleyici etkisini saptamak için MTS/PMS deneyi dizayn edildi. Kemoterapötik ajan olan Gemcitabin Panc-1 hücrelerinde 500 µg/ml, 1 mg/ml, 1,50 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml ve 10 mg/ml olmak üzere değişen konsantrasyonlarda denendi. IRE1α inhibitörü STF-083010 (5 mg) ise DMSO içerisinde 5 mM stok çözeltisi elde edilecek şekilde hazırlandıktan sonra 5, 10, 25, 50, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 ve 300 µM olacak şekilde değişen konsantrasyonlarda Panc-1 hücreleri üzerinde denendi.

Deneysel olarak kullanılacak dozlar, Gemcitabin için hücre proliferasyonunu %50 düzeyinde azaltan, etkin olan en düşük doz (IC50 değeri) 4 mg/ml olarak belirlendi (Şekil 7, Şekil 8). IRE1 α inhibitörü STF-083010 için ise yarı maksimum inhibitör konsantrasyon 160 μ M olarak belirlendi (Şekil 9). Thapsigargin için de literatürde belirtilen doz olan 1 μ M kullanıldı.

Gemcitabin ve STF-083010'da hücre canlılığı zamana ve doza bağımlı olarak bulundu. Sonuçlar, PANC-1 hücrelerinde IC50'ye ulaşmak için gerekli sitotoksik olmayan STF-083010 konsantrasyonunun 48 saat boyunca 160 μ M olduğunu gösterdi. STF-083010 için test edilen en düşük doz olan 5 μ M'da, kontrol grubuna kıyasla 48 saat sonra istatistiksel olarak anlamlı (p=0.0139) büyüme inhibisyonu gözlemlendi (yaklaşık %5'lik). Maksimum büyüme inhibisyonu ise yaklaşık %86,28 olan 300 μ M'da gözlemlendi. Gemcitabin için ise, IC50'ye ulaşmak için gerekli sitotoksik olmayan konsantrasyonunun 48 saat boyunca 4 mg/ml olduğu bulundu. Gemcitabin için test edilen en düşük doz olan 500 μ g/ml'de kontrol grubuna kıyasla 48 saatlik tedavide yaklaşık %10'luk büyüme inhibisyonu gözlemlendi.

Diğer yandan faz kontrast mikroskopu ile morfolojik değişiklikler gözlemlendi. Hücreler, 48 ve 72 saat boyunca DMSO ve farklı konsantrasyonlarda Gemcitabin ve STF-083010 ile muamele edildi. Her iki ilaç için de tedavi edilen hücre gruplarında toplam hücre sayısında bir azalma ve kültür ortamında doza bağlı bir şekilde yüzen hücrelerde bir artış dahil olmak üzere morfolojik değişiklikler gözlemlendi (Resim 2).

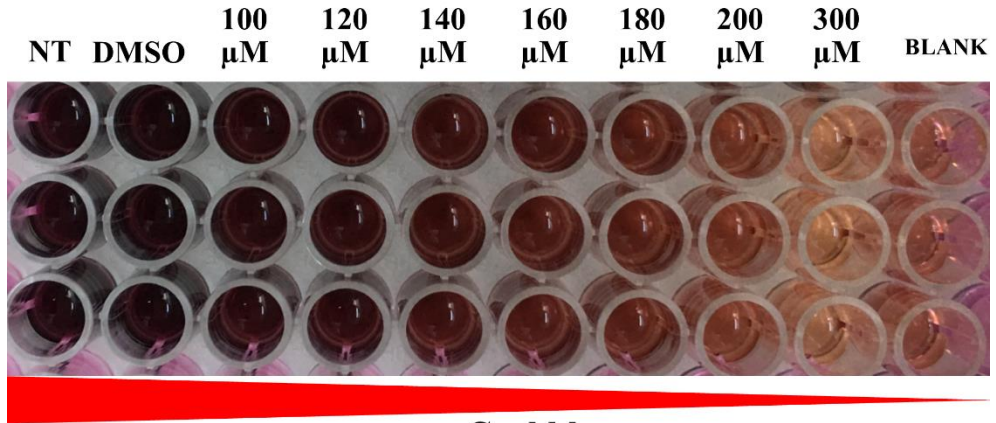


Resim 2. İlaç uygulanan gruplara ait faz kontrast mikroskobu görüntüleri. İlaç gruplarında kontrol grubuna göre canlı hücre sayısında azalış ve yüzen hücre miktarında artış gözlemlendi.



Canlılık

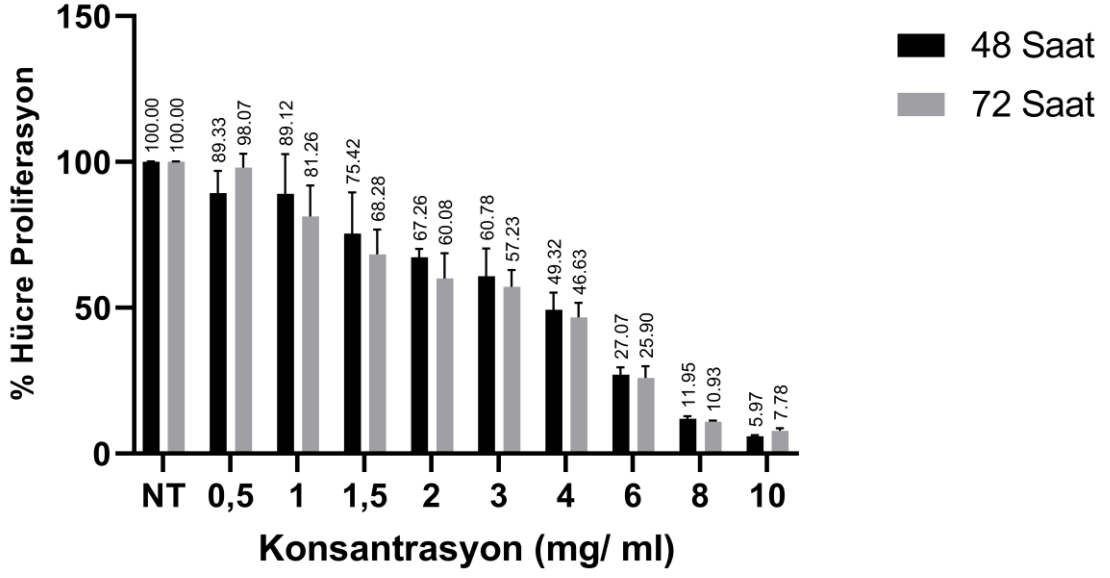
Resim 3. MTS/PMS deneyi sonucunda Gemsitabin uygulanan hücrelerdeki renk değişimine ait görüntü. Soldan sağa konsantrasyon arttıkça canlılık azalmaktadır (NT: Non-treated).



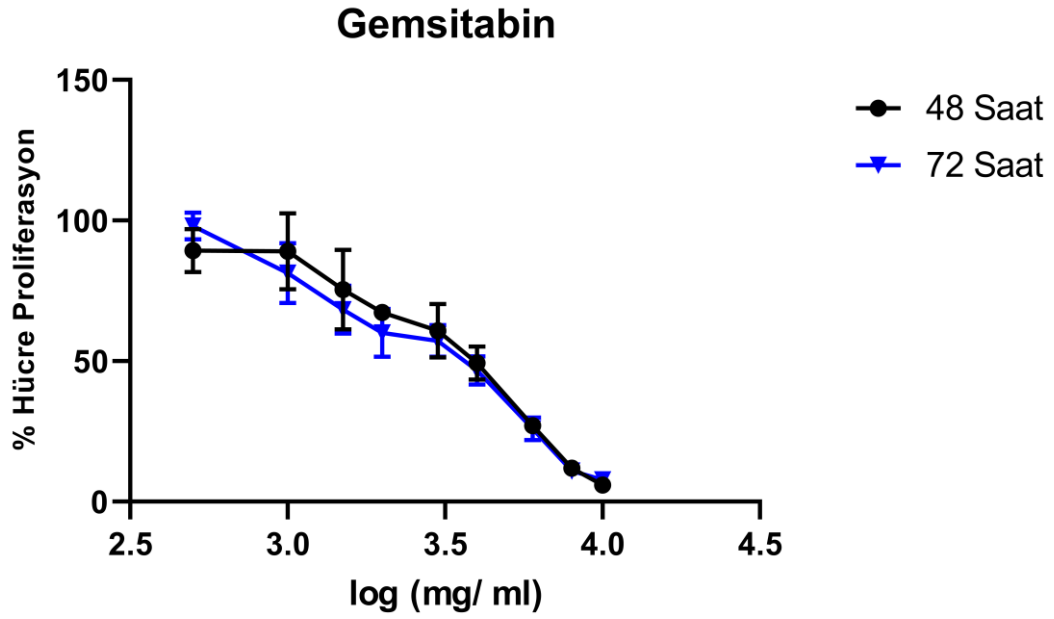
Canlılık

Resim 4. MTS/PMS deneyi sonucunda STF-083010 uygulanan hücrelerdeki renk değişimine ait görüntü (NT: Non-treated).

Gemcitabin

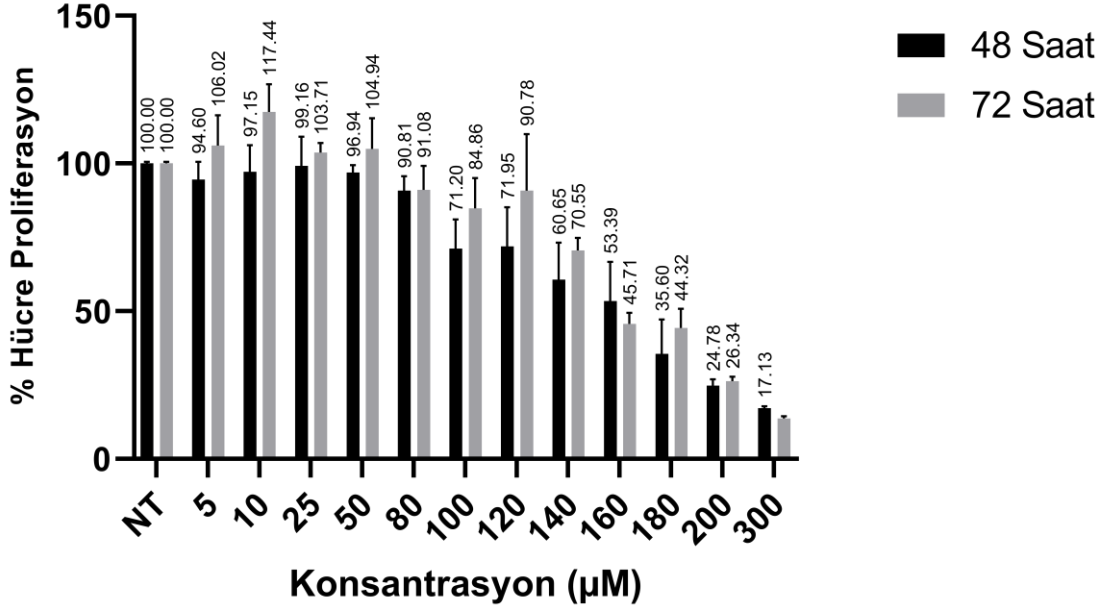


Şekil 7. Panc-1 hücrelerinde Gemcitabin için IC50 analiz grafiği.



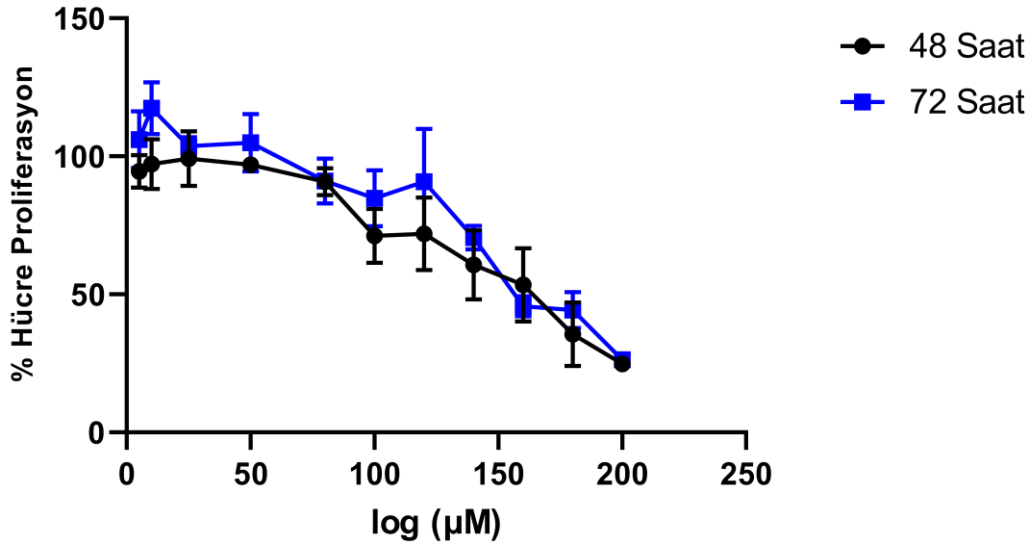
Şekil 8. Gemcitabin'e ait doz/ cevap eğrisi.

STF- 083010

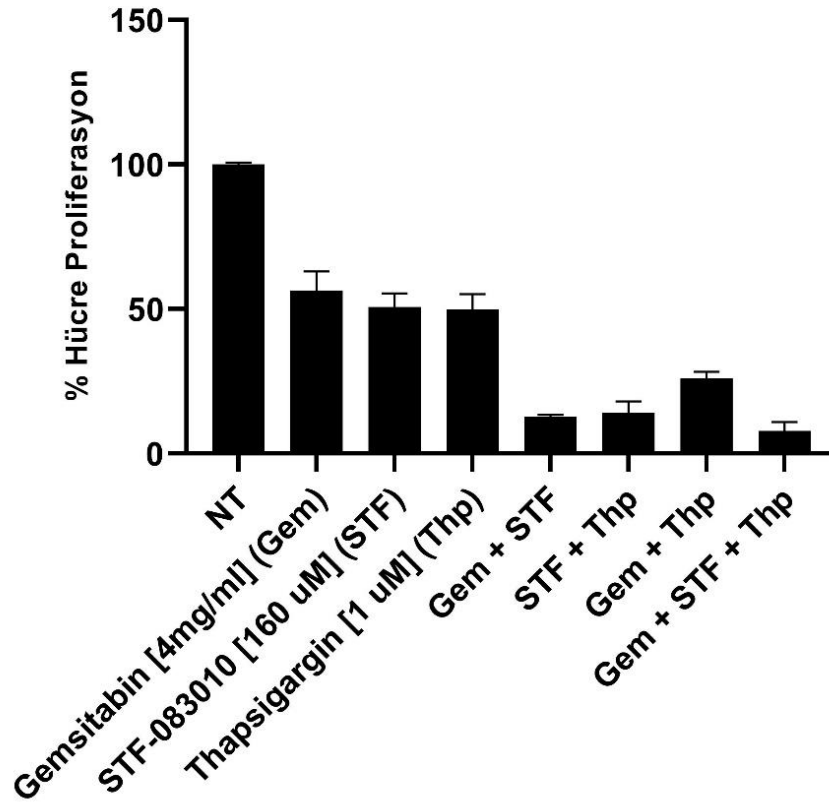


Şekil 9. Panc-1 hücrelerinde STF-083010 için IC50 analiz grafiği.

STF-083010



Şekil 10. STF-083010'a ait doz/ cevap eğrisi.

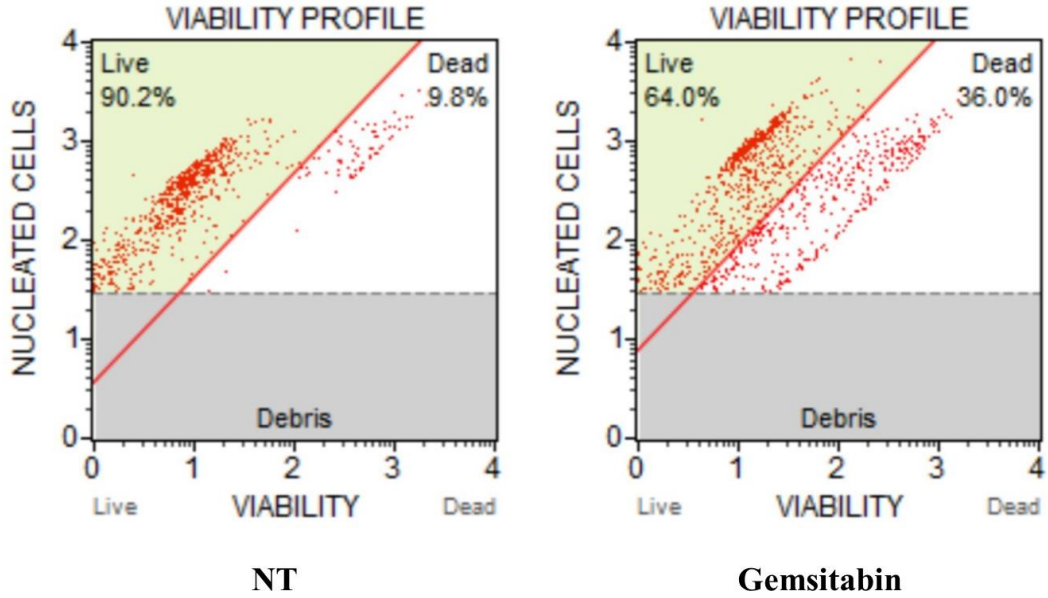


Şekil 11. Panc-1 hücrelerinde kemoterapiye cevap (veya direnç) etkilerine bakıldığında hücre proliferasyon yüzdeleri.

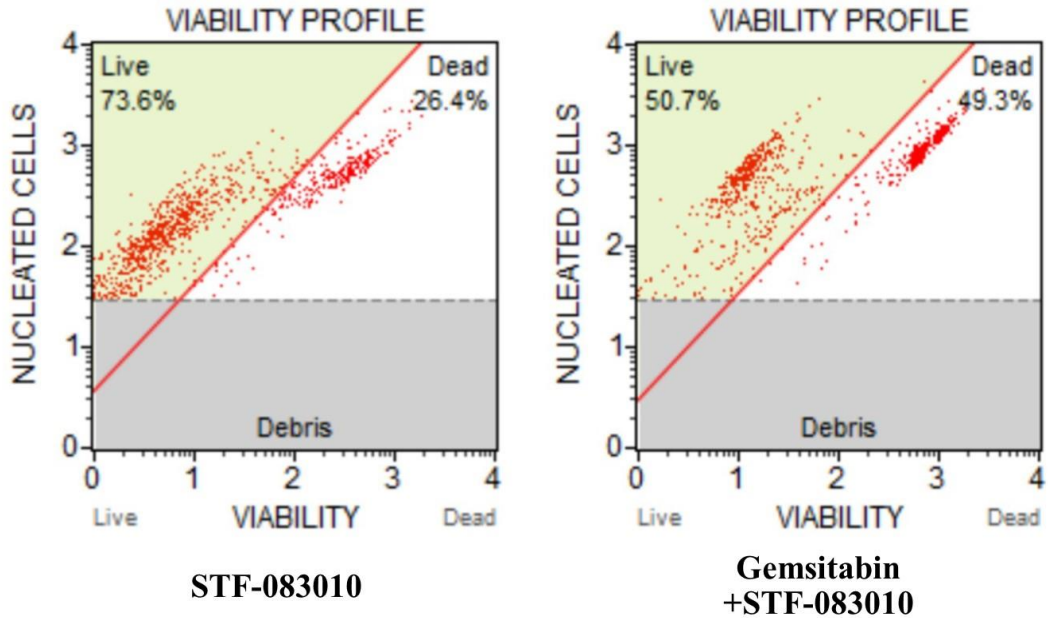
4.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Analizi Bulguları

MTS/ PMS deneyi ile ilaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi çeşitli zaman noktalarında belirlendi. Ancak MTS/ PMS deneyi sadece hücrelerin metabolik aktivitesi ile sınırlıdır. Deney ilaçlarının, hücrelerin membran bütünlüğünü bozma yeteneğini değerlendirebilmek için ise Count&Viability deneyi yapıldı. MTS/ PMS deneyi ile elde edilen sitotoksik olmayan konsantrasyonlar (IC50) kullanılarak hücreler deney ilaçları ile 48 saat muamele edildi. Kontrol grubunda hücrelerin %90,2 si canlı iken gemcitabin ile tedavi edilen hücrelerin %39'u, STF-083010 uygulanan hücrelerin %26,4'ü , thapsigargin uygulanan hücrelerin %39,1'i, gemcitabin+ STF-083010 uygulanan hücrelerin %49,3'ü , STF-083010+thapsigargin uygulanan hücrelerin %43,5'i, gemcitabin+thapsigargin uygulanan hücrelerin %41,6'sı ve gemcitabin+STF083010+thapsigargin uygulanan hücrelerin ise %36,8'inin ölü olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda hücre proliferasyonunda önemli bir düşüş gözlemlendi. Gemcitabin ve STF-083010'un kombine olarak

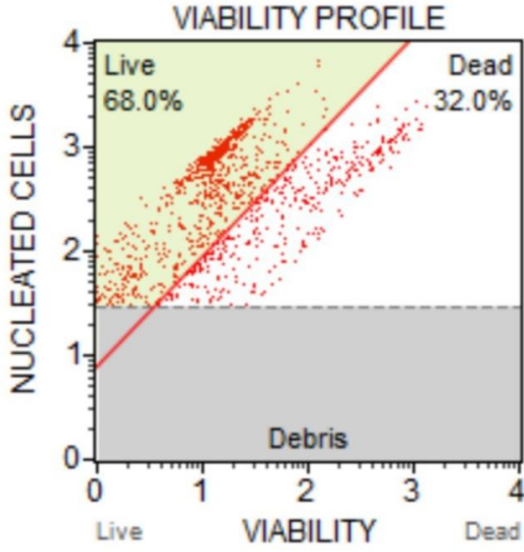
tedavisi tek başlarını yapılan tedaviye kıyasla proliferasyonu daha çok düşürdüğü tespit edildi. Aynı durum STF-083010+Thapsigargin kombinasyonunda da gözlemlendi.



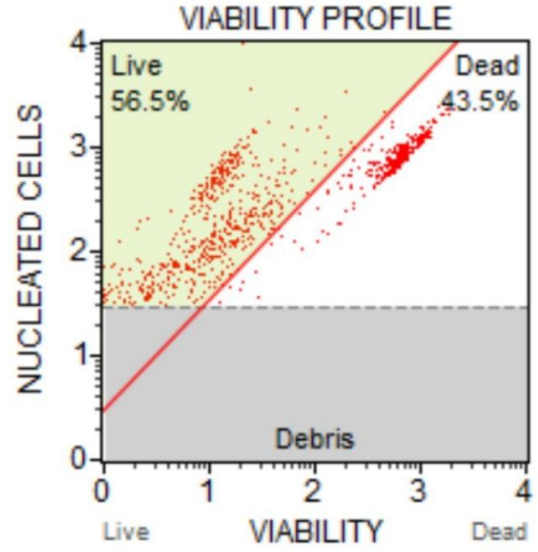
Şekil 12. NT ve Gemcitabin gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.



Şekil 13. STF-083010 ve Gemcitabin + STF-083010 gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.

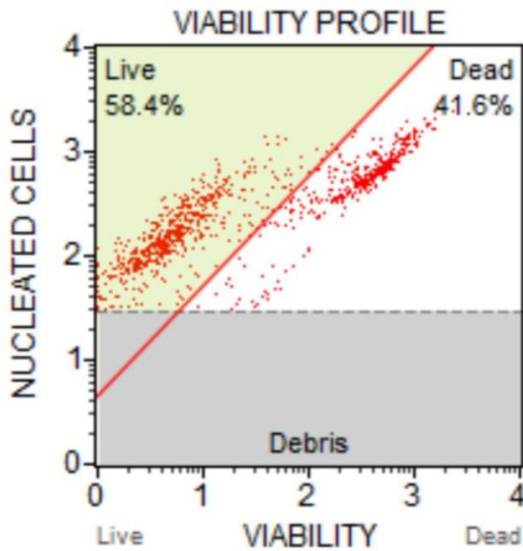


Thapsigargin

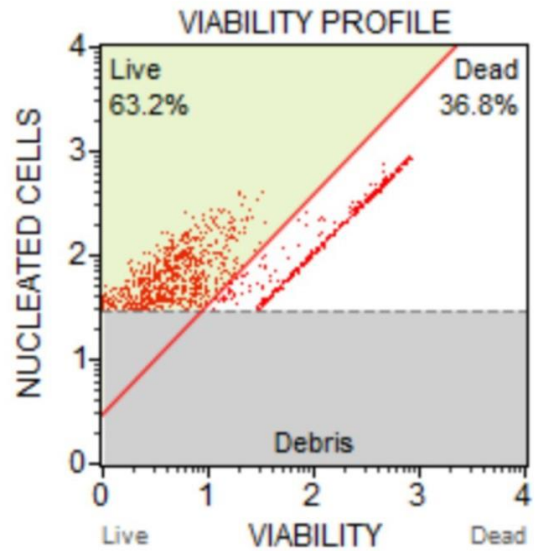


**STF-083010
+Thapsigargin**

Şekil 14. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.



**Gemcitabin
+Thapsigargin**



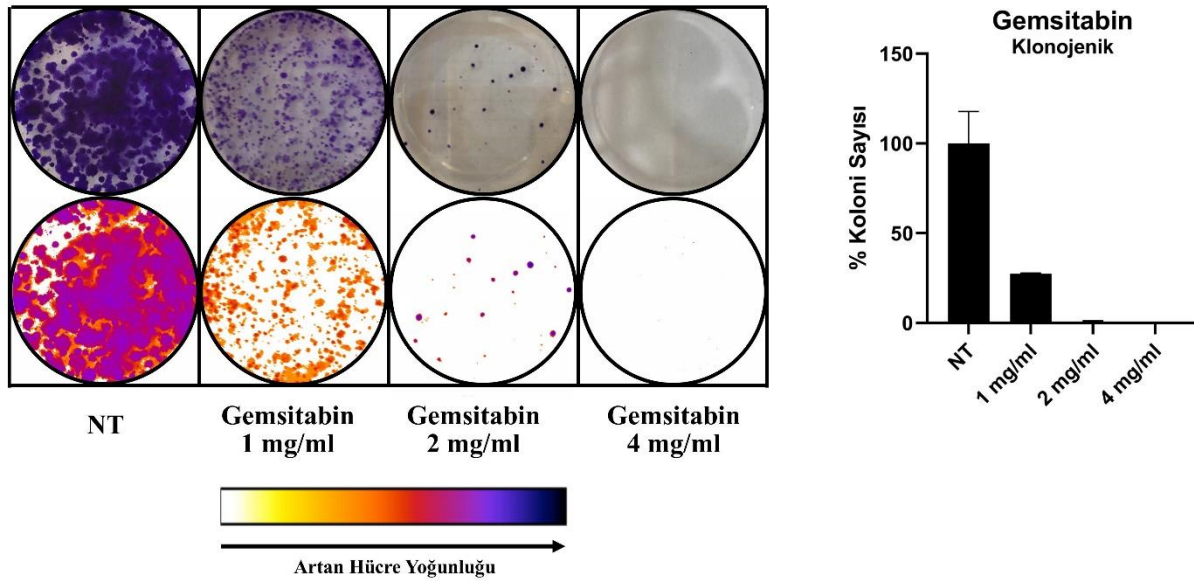
**Gemcitabin
+STF-083010
+Thapsigargin**

Şekil 15. Gemcitabin + Thapsigargin ve Gemcitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait hücre sayım ve canlılık analizine ait grafikler.

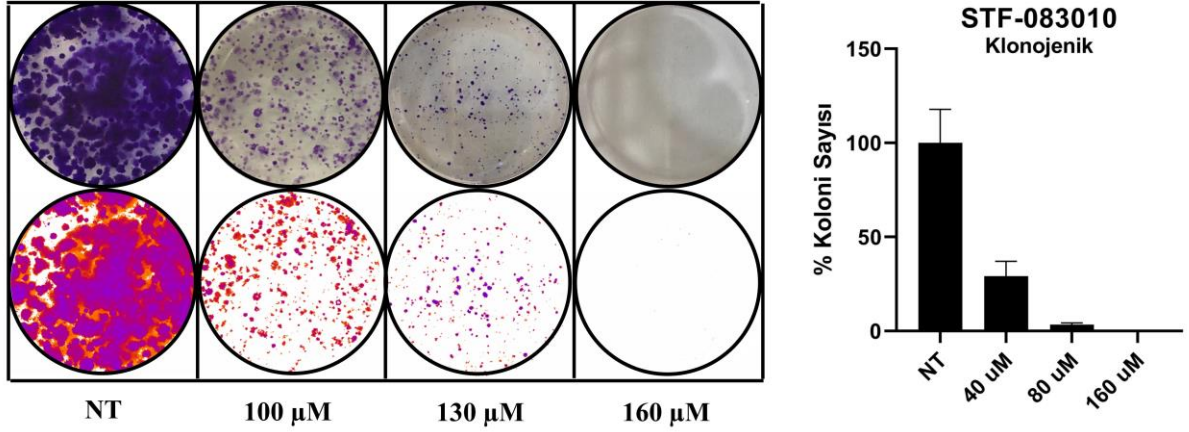
4.4. Klonojenik Deney

Klonojenik deney ile hücrelerin koloni oluşturma yeteneği değerlendirildi. Kontrol grubunda toplam 1.872.149 piksel sayılırken, gempitabin 1 mg/ ml'de 513.642, 2 mg/ ml'de 15.574, 4 mg/ ml'de 31 piksel sayıldı (Şekil 16). STF-083010 100 uM'da 546.065, 130 uM'da 63.489 ve 160 uM'da 99 piksel sayıldı (Şekil 17). Thapsigargin 250 nM'da 148.037, 750 nM'da 59.763 ve 1 uM'da ise 56 piksel sayıldı (Şekil 18). Gempitabin + STF-083010 grubunda 103 piksel, STF-083010 + Thapsigargin grubunda 57 piksel, Gempitabin + Thapsigargin grubunda 52 piksel ve Gempitabin + STF-083010 + Thapsigargin grubunda ise 37 piksel sayıldı (Şekil 19).

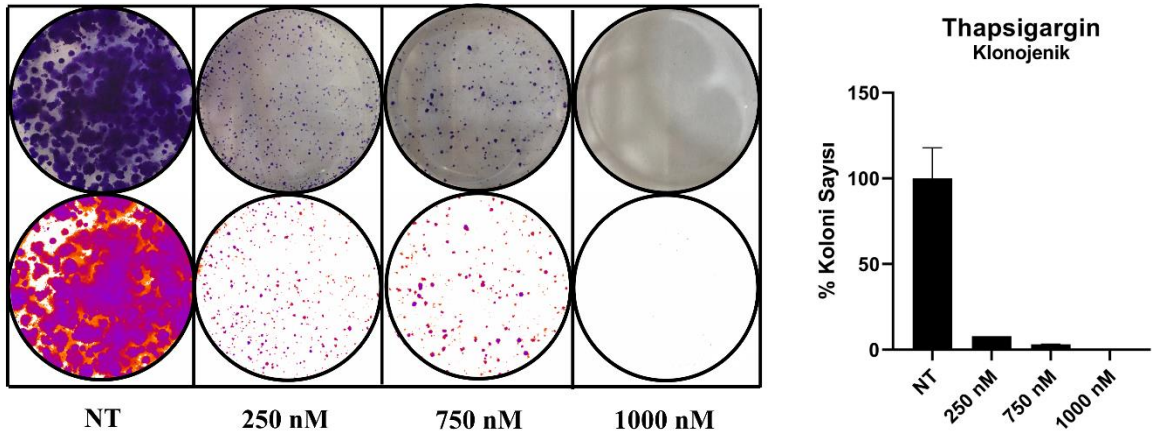
Gempitabin, STF-083010 ve Thapsigargin gruplarının hepsinde artan ilaç konsantrasyonu ile koloni oluşumunda ciddi azalış gözlemlendi. Benzer durum kombinasyon tedavi uygulanan gruplarda da gözlemlendi. Klonojenik deneye ait sayısal veriler Tablo 5'de verilmiştir.



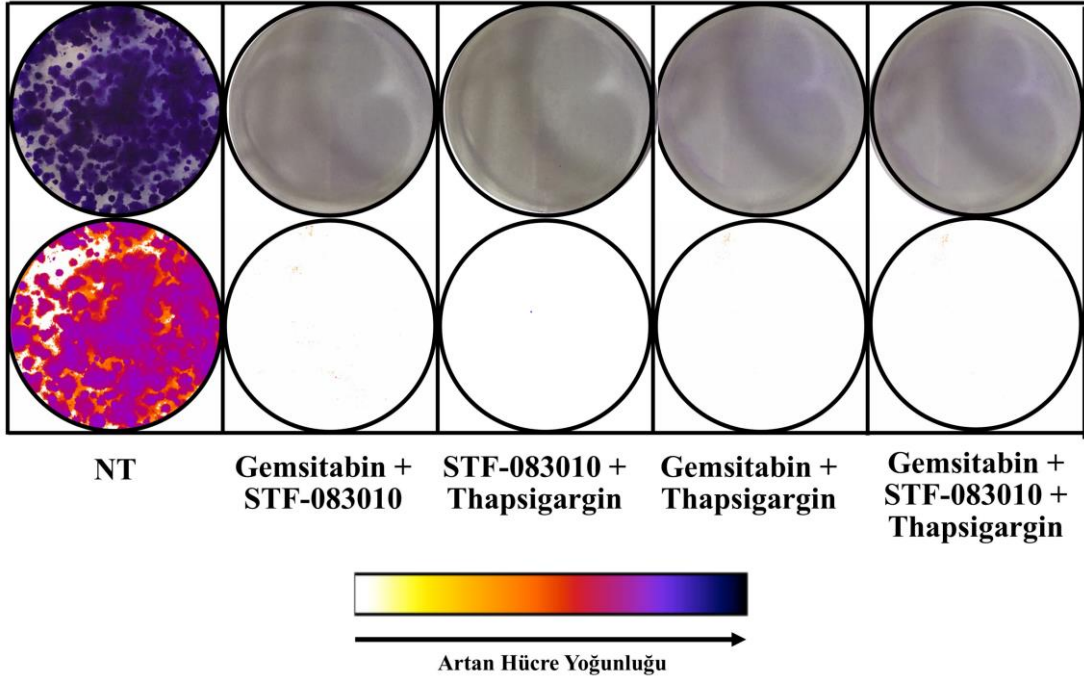
Şekil 16. PANC-1 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda Gempitabin uygulanan gruplarda koloni görüntüleri, kolonilere ait yoğunluk analizleri ve NT grubuna göre normalize edilmiş sonuçlara ait grafik.



Şekil 17. PANC-1 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda STF-083010 uygulanan gruplarda koloni görüntüleri, kolonilere ait yoğunluk analizleri ve NT grubuna göre normalize edilmiş sonuçlara ait grafik.



Şekil 18. PANC-1 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda Thapsigargin uygulanan gruplarda koloni görüntüleri, kolonilere ait yoğunluk analizleri ve NT grubuna göre normalize edilmiş sonuçlara ait grafik.



Şekil 19. PANC-1 hücrelerinde kombinasyon tedavisi uygulanan gruplarda koloni görüntüleri ve kolonilere ait yoğunluk analizleri.

Tablo 5. Klonojenik deney gruplarına ait sayısal veriler.

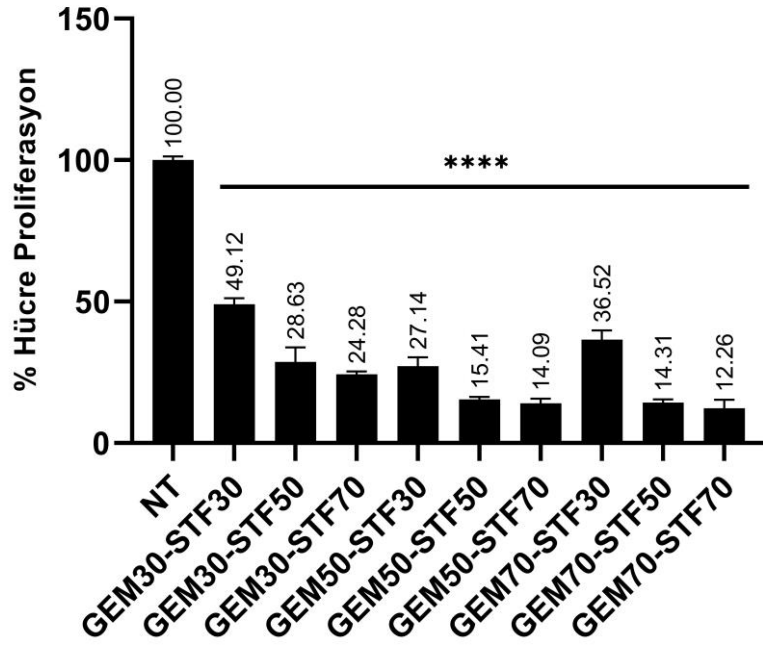
Gruplar	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	1.872.149,5 ± 334.115,5
Gempitabin 1 mg/ ml	513.642,5 ± 7.357,5
Gempitabin 2 mg/ ml	15.574,5 ± 7.467,5
Gempitabin 4 mg/ ml	31 ± 18
STF-083010 100 uM	546.065 ± 148.925
STF-083010 130 uM	63.489 ± 16.867
STF-083010 160 uM	99 ± 86
Thapsigargin 250 nM	148.037 ± 16
Thapsigargin 750 nM	59.763 ± 2.023
Thapsigargin 1000 nM	56,5 ± 12
Gempitabin 4 mg/ml	103,5 ± 9,5

+ STF-083010 160 uM	
STF-083010 160 uM + Thapsigargin 1000 nM	57,5 ± 7,5
Gemsitabin 4 mg/ml + Thapsigargin 1000 nM	52,5 ± 2,5
Gemsitabin 4 mg/ml + STF-083010 160 uM + Thapsigargin 1000 nM	37,5 ± 18,5

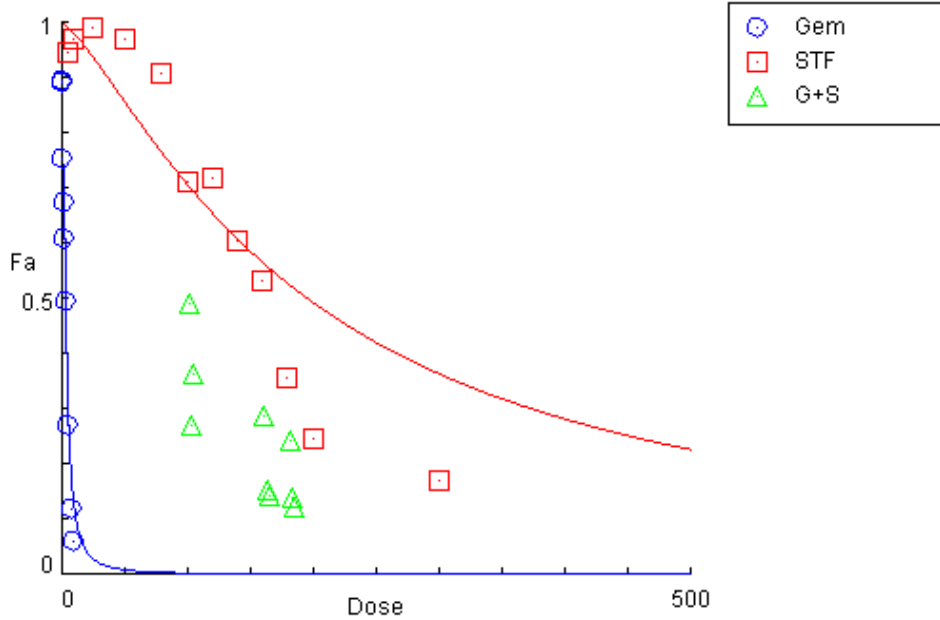
4.5. Sinerjistik Analiz Bulguları

Deney ilaçlarının sinerjistik inhibitör etkisi, MTS/PMS deneyi ile tespit edildi. Bu deneyin amacı, düşük doz kemoterapötik ilaçlar (Gemsitabin) ve STF-083010 kombinasyonu ile toksisiteyi azaltma ve verimliliği artırma etkisi daha yüksek olan sinerjistik konsantrasyonların belirlenmesi idi.

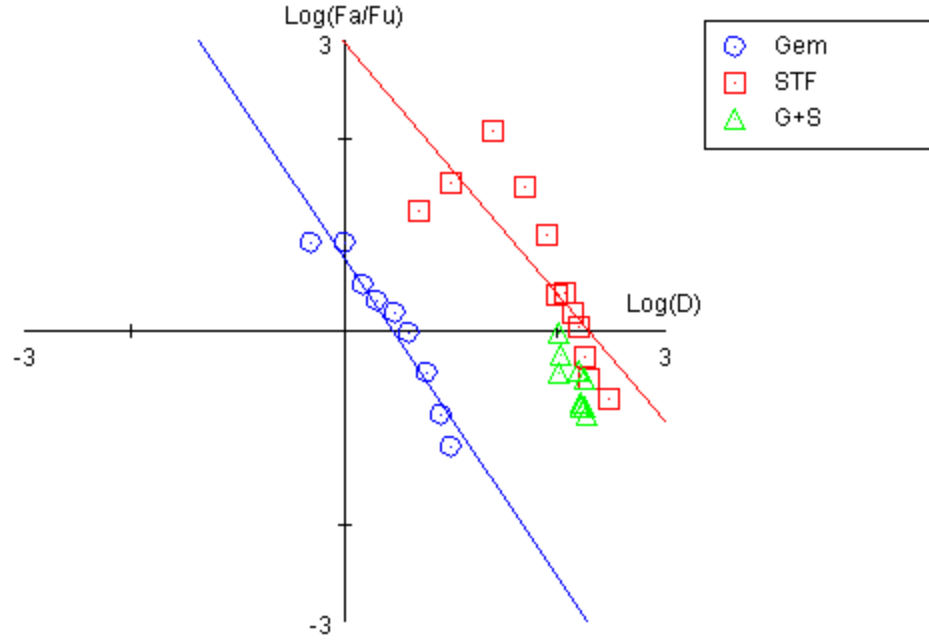
Sinerjik etki gösteren kombinasyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için Panc-1 hücre hattı, farklı Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonu ile (önceden belirlenen IC₃₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonları ile) 48 saat boyunca tedavi edildi. Ardından daha önce belirtilen şekilde MTS/PMS deneyi ile sitotoksite analizi yapıldı (Şekil 20). Tüm veriler CalcuSyn yazılımı ile analiz edildi. Normalleştirilmiş izobologram analizi sonucu, Gemsitabin IC₃₀ (2 mg/ml) + STF IC₅₀ (160 uM) (CI= 0.81), Gemsitabin IC₃₀ (2 mg/ml) + STF IC₇₀ (180 uM) (CI= 0.73), Gemsitabin IC₅₀ (4 mg/ml) + STF IC₅₀ (160 uM) (CI= 0.72), Gemsitabin IC₅₀ (4 mg/ml) + STF IC₇₀ (180 uM) (CI= 0.69), Gemsitabin IC₇₀ (6 mg/ml) + STF IC₅₀ (160 uM) (CI= 0.82) ve Gemsitabin IC₇₀ (6 mg/ml) ve STF IC₇₀ (180 uM) (CI= 0,82) kombinasyonlarında sinerjistik bir inhibitör etki gösteren kombinasyon indeksi (CI) değeri <1 idi. Gemsitabin IC₅₀ (4 mg/ml) + STF IC₃₀ (100 uM) (CI= 1.00) kombinasyonunda ise CI=1 aditif etki gözlemlendi. Gemsitabin IC₃₀ (2 mg/ml) + STF IC₃₀ (100 uM) (CI= 1.18) ve Gemsitabin IC₇₀ (6 mg/ml) + STF IC₃₀ (100 uM) (CI= 1.82) kombinasyonunda antagonistik etki gösteren CI değeri >1 idi (Tablo 6). Tüm verilere ait grafikler Şekil 21, 22, 23 ve 24'de verilmiştir. Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonuna ait İnhibitör Etki (Fa) ve Doz Azaltma İndeksi (DRI) değerleri ise Tablo 7'de verilmiştir.



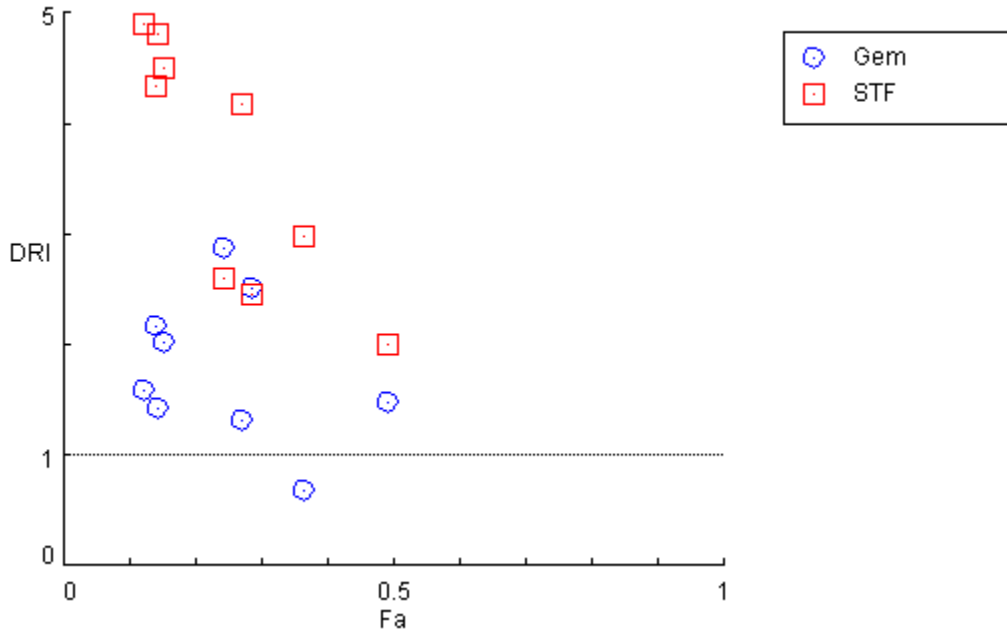
Şekil 20. Sinerjistik analiz için yapılan değişen konsantrasyonlarda Gemsitabin ve STF-083010 uygulanan gruplara ait % hücre proliferasyon analizi (İlaçların sonundaki 30, 50 ve 70 sayıları o ilacın sırasıyla IC30, IC50 ve IC70 konsantrasyonlarını temsil etmektedir.) Tüm gruplar kontrol grubuna göre anlamlıdır (****: Kontrol'e göre $p < 0,0001$).



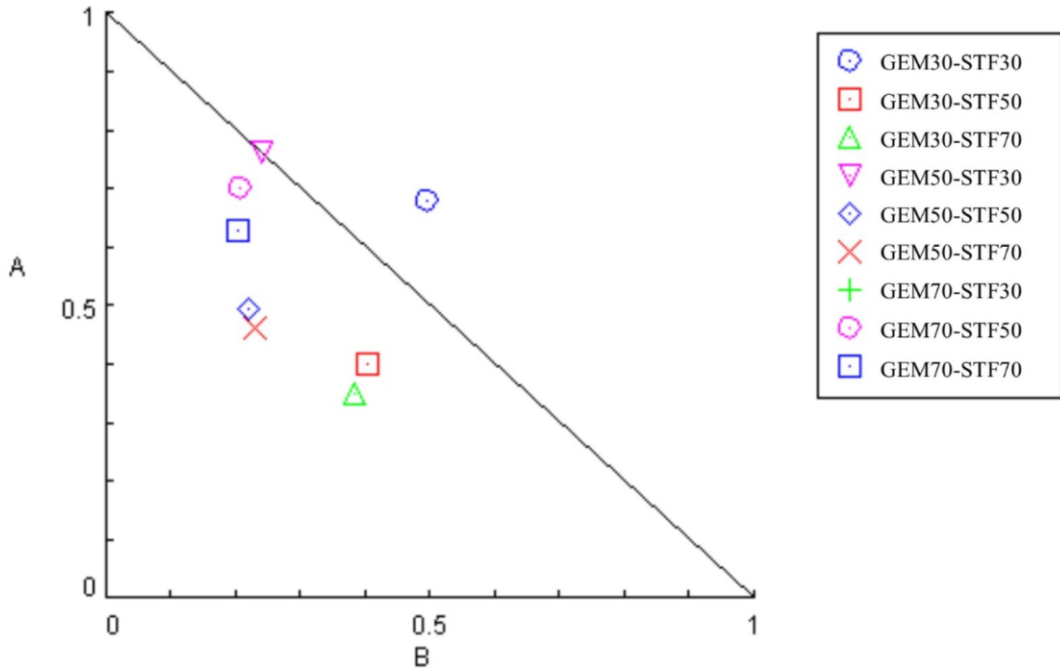
Şekil 21. Doz-Etki eğrisi. Mavi çizgi ve kareler Gemsitabin'e ait Doz-canlılık eğrisini gösterir. Kırmızı çizgi ve kareler STF-083010'a ait Doz-canlılık eğrisini göstermektedir. Yeşil üçgenler ise Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonlarını temsil etmektedir.



Şekil 22. Gemsitabin, STF-083010 ve her ikisinin kombinasyonunun yapıldığı gruplara ait Medyan-Etki grafiği.



Şekil 23. Gemsitabin ve STF-083010 için DRI grafiği. Eşiğin üzerindeki kombinasyonlar doz azaltımına izin veren kombinasyonları göstermektedir.



Şekil 24. Gemsitabin ile STF-083010 ilaç kombinasyonunun izobologram analizi. Normalleştirilmiş izobologramlar üretmek için CompuSyn yazılımı kullanıldı. Eşik çizgisinin altındaki değerler sinerjistik kombinasyonu göstermektedir (İlaçların sonundaki 30, 50 ve 70 sayıları o ilacın sırasıyla IC30, IC50 ve IC70 konsantrasyonlarını temsil etmektedir).

Tablo 6. Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonlarına ait CI değerleri ve Tablo 1'e göre bu değerlerin etkileri.

Kombinasyon	Kombinasyon İndeksi	Etki
Gemsitabin IC30 (2 mg/ml) + STF IC30 (100 µM)	1,18	Hafif Antagonizm
Gemsitabin IC30 (2 mg/ml) + STF IC50 (160 µM)	0,81	Orta Sinerjizm
Gemsitabin IC30 (2 mg/ml) + STF IC70 (180 µM)	0,73	Orta Sinerjizm
Gemsitabin IC50 (4 mg/ml) + STF IC30 (100 µM)	1,00	Aditif
Gemsitabin IC50 (4 mg/ml) + STF IC50 (160 µM)	0,72	Orta Sinerjizm

Gemsitabin IC50 (4 mg/ml) + STF IC70 (180 µM)	0,69	Sinerjizm
Gemsitabin IC70 (6 mg/ml) + STF IC30 (100 µM)	1,82	Antagonizm
Gemsitabin IC70 (6 mg/ml) + STF IC50 (160 µM)	0,82	Orta Sinerjizm
Gemsitabin IC70 (6 mg/ml) ve STF IC70 (180 µM)	0,83	Orta Sinerjizm

9 farklı kombinasyonda hesaplanan Fa değerleri sırası ile 0.49, 0.29, 0.24, 0.27, 0.15, 0.14, 0.37, 0.14 ve 0.12 idi. Gemsitabin 4.03 mg/ ml hariç tüm gemsitabin ve STF-083010 dozlarının DRI değeri 1 in üzerindedi ve bu da gemsitabin veya STF-083010'un uygun doz azaltımına izin verdiğini göstermektedir (Tablo 7).

Tablo 7. Gemsitabin ve STF-083010 kombinasyonuna ait İnhibitör Etki (Fa) ve Doz Azaltma İndeksi (DRI) değerleri.

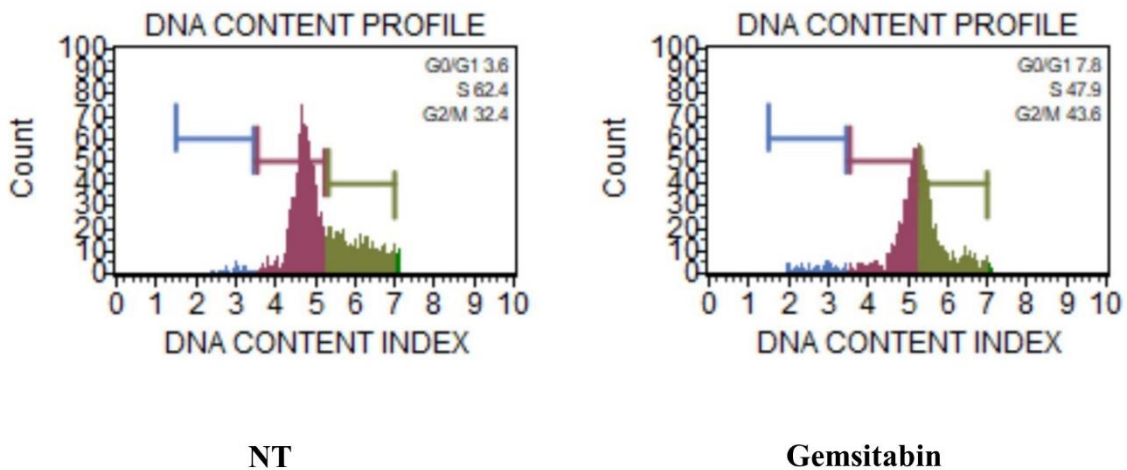
İnhibitör Etki (Fa)	Gemsitabin Doz (mg/ml)	STF-083010 Doz (µM)	Doz Azaltma İndeksi (Gemsitabin)	Doz Azaltma İndeksi (STF-083010)
0.49	2.94	201.03	1.47	2.01
0.29	5.01	393.78	2.51	2.46
0.24	5.75	467.54	2.87	2.60
0.27	5.25	416.85	1.31	4.17
0.15	8.10	720.82	2.03	4.51
0.14	8.64	781.01	2.16	4.34
0.37	4.03	298.76	0.67	2.99
0.14	8.54	770.33	1.42	4.81
0.12	9.52	883.06	1.59	4.91

4.6. Hücre Döngüsüne Ait Bulgular

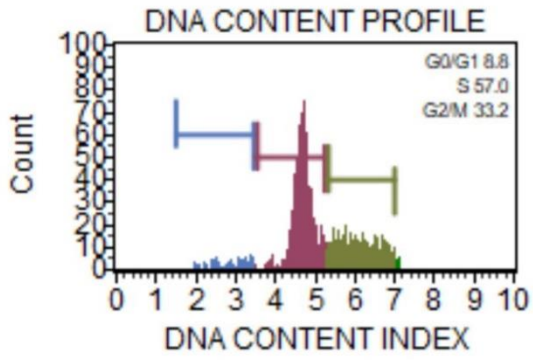
Deney ilaçlarının hücre döngüsü üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için hücre döngüsü analizi yapıldı. Kontrol grubunda hücre popülasyonunun %4,03'ü G0/ G1 fazında, %63,03'ü S fazında ve %31,5'i G2/ M fazında iken Gemsitabin grubunda %8,33 G0/ G1 fazında, %48,1'i S fazında ve %42,53 G2/ M fazında, STF-083010 grubunda %8,13 G0/ G1 fazında, %58,27 S fazında ve %32,3 G2/ M fazında, Thapsigargin grubunda %32,37 G0/ G1 fazında, %41,13 S fazında ve %25,4 G2/ M fazında olduğu gözlemlendi.

Kombinasyon gruplarında ise Gemsitabin + STF-083010'de %17,53 G0/ G1 fazında, %52,67 S fazında ve %28,57 G2/ M fazında, STF-083010 + Thapsigargin'de %11,87 G0/ G1 fazında, %53,7 S fazında ve %32,83 G2/ M fazında, Gemsitabin + Thapsigargin'de %6,07 G0/ G1 fazında, %39,73 S fazında ve %53,1 G2/M fazında, Gemsitabin + STF-083010 + Thapsigargin kombinasyonunda %4,93 G0/ G1 fazında, %68,27 S fazında ve %25,73 G2/ M fazında olduğu bulundu.

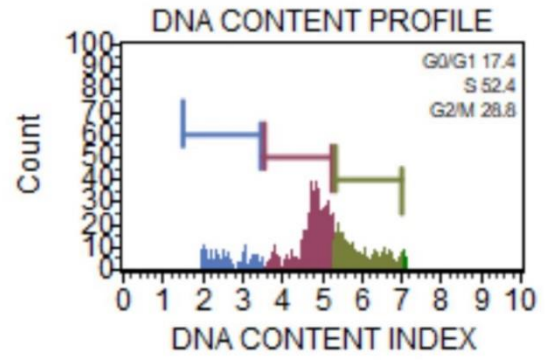
Tüm gruplarda NT grubuna kıyasla G0/ G1 fazındaki hücrelerde artış gözlenirken Gemsitabin + STF-083010 + Thapsigargin kombinasyonu dışındaki tüm gruplarda ise S fazındaki hücrelerde azalış gözlemlendi. Hücre döngüsü analizlerine ait grafikler Şekil 25, 26, 27, 28, 29 ve 30'da, analize ait sayısal veriler ise Tablo 8'de verilmiştir.



Şekil 25. NT ve Gemsitabin gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.

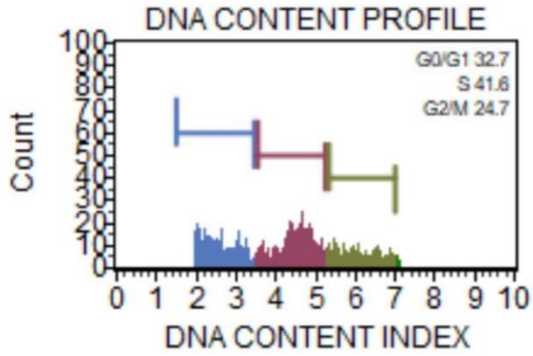


STF-083010

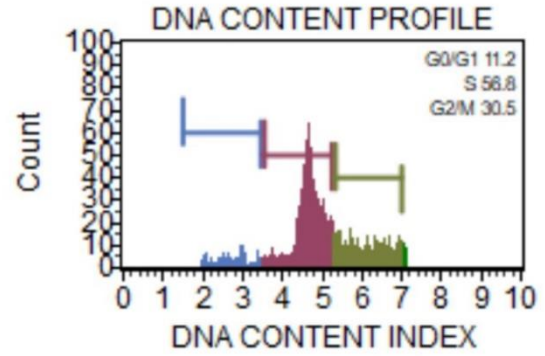


**Gemsitabin
+ STF-083010**

Şekil 26. STF-083010 ve Gemsitabin + STF-083010 gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.

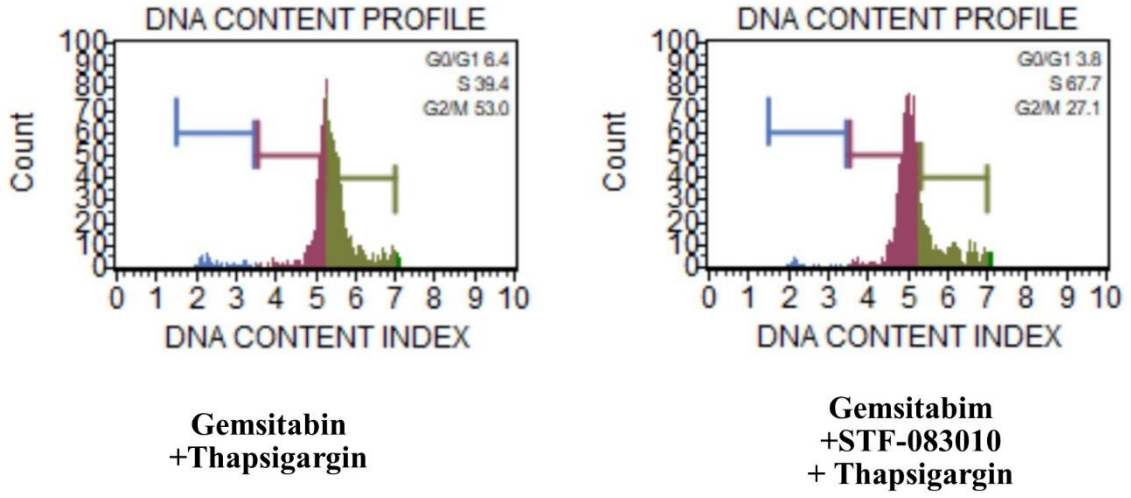


Thapsigargin

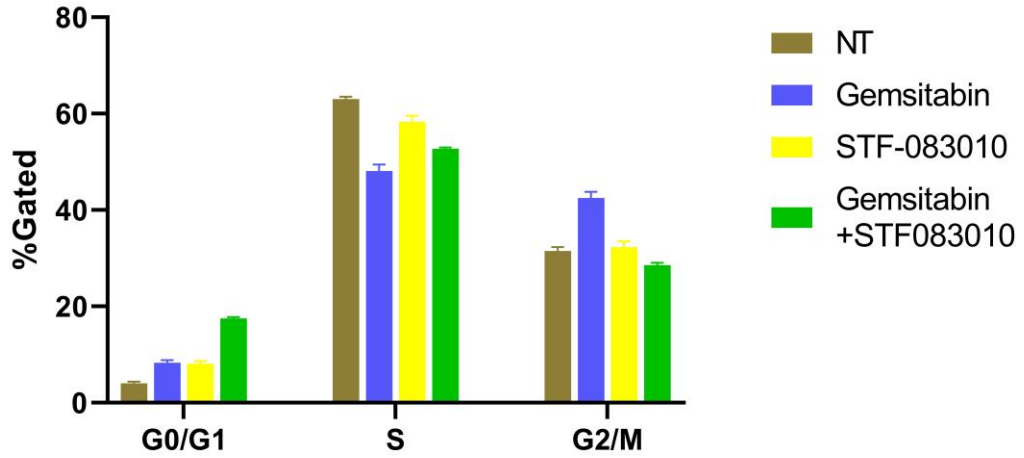


**STF-083010
+ Thapsigargin**

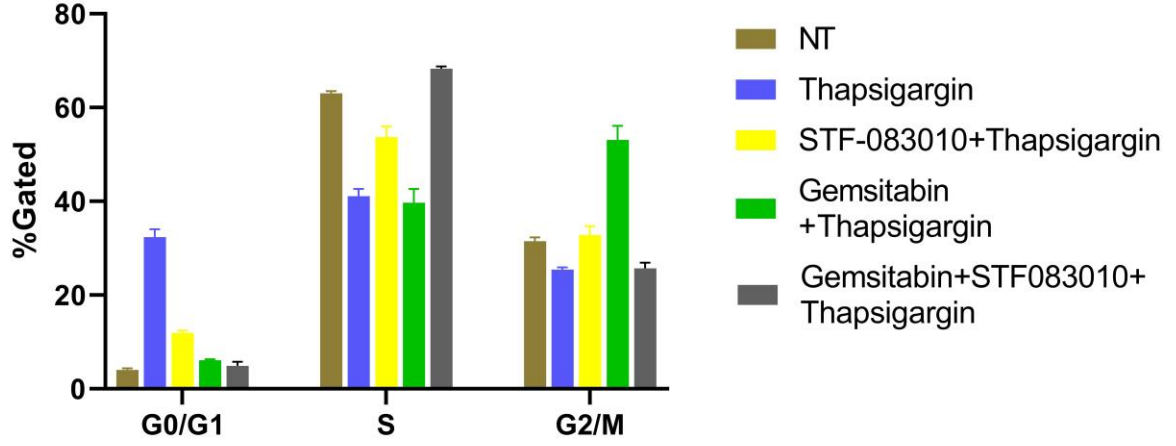
Şekil 27. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.



Şekil 28. Gemcitabin + Thapsigargin ve Gemcitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarında hücre döngüsü analizine ait grafikler.



Şekil 29. Kontrol, Gemcitabin, STF-083010 ve Gemcitabin + STF-083010 gruplarına ait hücre döngüsü analiz sonuçları.



Şekil 30. Kontrol, Thapsigargin, STF-083010 + Thapsigargin, Gemcitabin + Thapsigargin ve Gemcitabin + Thapsigargin + STF-083010 gruplarına ait hücre döngüsü analiz sonuçları.

Tablo 8. Deney gruplarında hücre döngüsü analizi sonuçları. (p<0,0001)

Panc1	G0/ G1 (%Ortalama ± Standart sapma)	S (%Ortalama ± Standart sapma)	G2/ M (%Ortalama ± Standart sapma)
NT	4,03 ± 0,31	63,03 ± 0,46	31,5 ± 0,83
Gemcitabin	8,33 ± 0,50	48,1 ± 1,31	42,53 ± 1,24
STF-083010	8,13 ± 0,48	58,27 ± 1,33	32,3 ± 1,20
Thapsigargin	32,37 ± 1,65	41,13 ± 1,51	25,4 ± 0,51
Gemcitabin+STF-083010	17,53 ± 0,26	52,67 ± 0,31	28,57 ± 0,48
STF-083010+Thapsigargin	11,87 ± 0,57	53,7 ± 2,24	32,83 ± 1,88
Gemcitabin+Thapsigargin	6,07 ± 0,25	39,73 ± 2,87	53,1 ± 2,98
Gemcitabin+STF-083010+Thapsigargin	4,93 ± 0,87	68,27 ± 0,49	25,73 ± 1,14

4.7. Hücre Ölümüne İlişkin Bulgular

Deney ilaçlarının ve kombinasyonlarının pankreas kanserinde apoptoz üzerine etkilerini belirleyebilmek için Anneksin V temelli deney dizayn edildi. Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda apoptozda bir artış söz konusuydu.

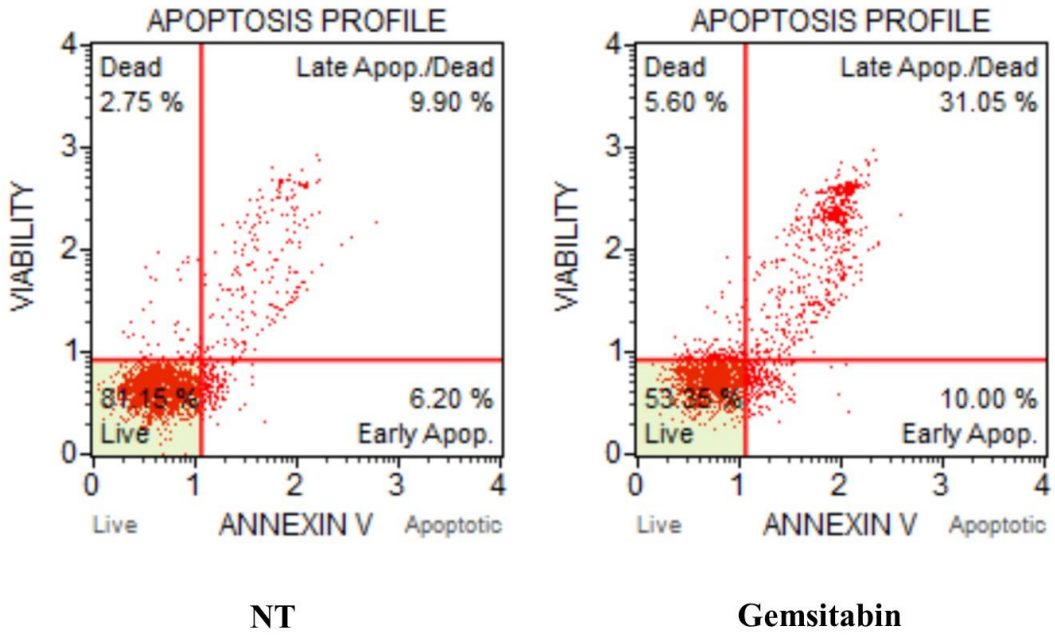
NT (Kontrol) grubunda %6,25 total apoptoz ve %5,42 nekroz saptanırken, gemsitabin grubunda %36,67 total apoptoz (%9,05 erken, %27,62 geç apoptoz) ve %3,1 nekroz, STF-083010 grubunda %34,97 total apoptoz (%20,22 erken, %14,75 geç apoptoz) ve %0,97 nekroz, Thapsigargin grubunda %24,23 total apoptoz (%10,45 erken, %13,78 geç apoptoz) ve %5,1 nekroz saptanmıştır. Kombinasyon gruplarında ise Gemisitabin + STF-083010'de %43,52 total apoptoz (%7,92 erken, %35,6 geç apoptoz) ve %3,5 nekroz, STF-083010 + Thapsigargin kombinasyonunda %27,13 total apoptoz (%4,33 erken, %22,8 geç apoptoz) ve %2,78 nekroz, Gemisitabin + Thapsigargin kombinasyonunda %23,97 total apoptoz (%9,55 erken, %14,42 geç apoptoz) ve %2,37 nekroz ve Gemisitabin + STF-083010 + Thapsigargin kombinasyonunda ise %17,53 total apoptoz (%6,83 erken, %10,7 geç apoptoz) ve %2,67 nekroz saptandı.

Tüm gruplar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). Veriler ayrıntılı olarak Tablo 9'de belirtilmiştir. Sonuçlara ait grafikler ise Şekil 31, 32, 33 ve 34'de verilmiştir.

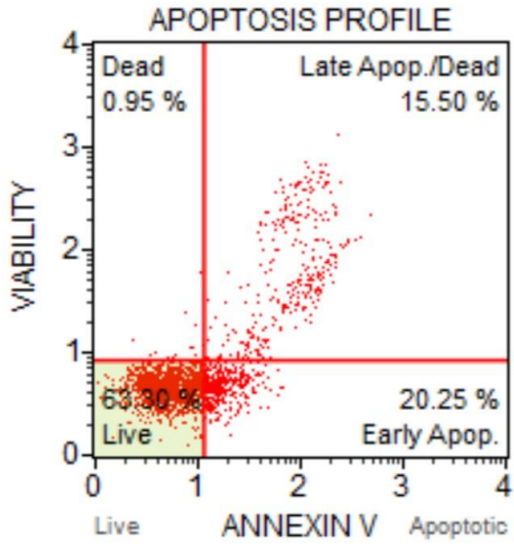
Tablo 9. Deney gruplarına ait total apoptoz, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları.

Gruplar	%Total Apoptoz Oranı (Ortalama \pm Standart sapma)	%Erken Apoptotik (Ortalama \pm Standart sapma)	%Geç Apoptotik (Ortalama \pm Standart sapma)	%Nekroz (Ortalama \pm Standart sapma)	P değeri (NT'ye göre)
Kontrol	6,25 \pm 0,21	1,97 \pm 0,06	4,28 \pm 0,17	5,42 \pm 0,37	-
Gemsitabin	36,67 \pm 3,20	9,05 \pm 1,01	27,62 \pm 2,43	3,1 \pm 1,77	<0,0001
STF-083010	34,97 \pm 0,78	20,22 \pm 0,08	14,75 \pm 0,71	0,97 \pm 0,27	<0,0001
Thapsigargin	24,23 \pm 4,43	10,45 \pm 2,28	13,78 \pm 2,18	5,1 \pm 4,28	<0,0001

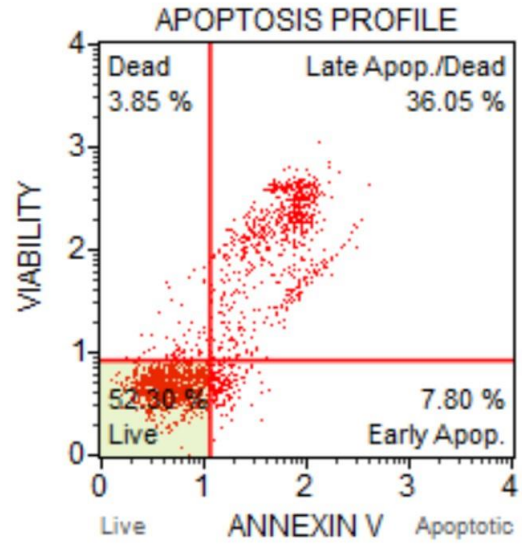
Gemcitabin+STF-083010	43,52 ± 0,51	7,92 ± 0,4	35,6 ± 0,32	3,5 ± 0,27	<0,0001
STF-083010+Thapsigargin	27,13 ± 1,79	4,33 ± 0,49	22,8 ± 1,35	2,78 ± 0,28	<0,0001
Gemcitabin +Thapsigargin	23,97 ± 0,53	9,55 ± 1,15	14,42 ± 0,7	2,37 ± 0,43	<0,0001
Gemcitabin + STF-083010 + Thapsigargin	17,53 ± 1,05	6,83 ± 0,53	10,7 ± 0,8	2,67 ± 0,43	<0,0001



Şekil 31. NT ve Gemcitabin gruplarına ait apoptoz oranları.

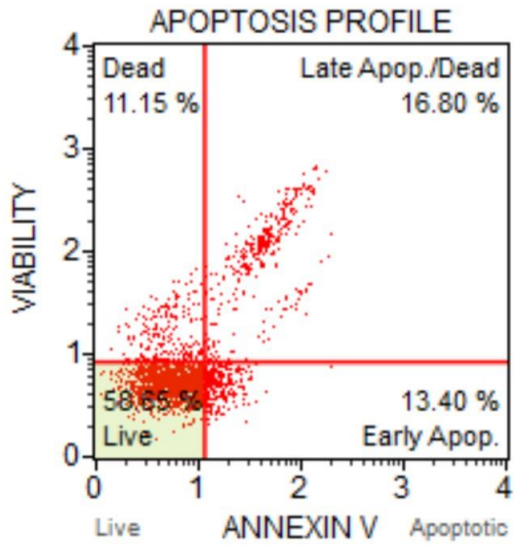


STF-083010

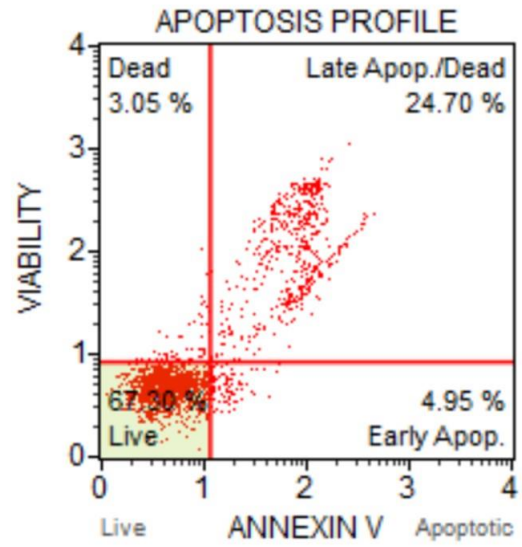


**Gemsitabin
+ STF-083010**

Şekil 32. STF-083010 ve Gemsitabin + STF-083010 gruplarına ait apoptoz oranları.

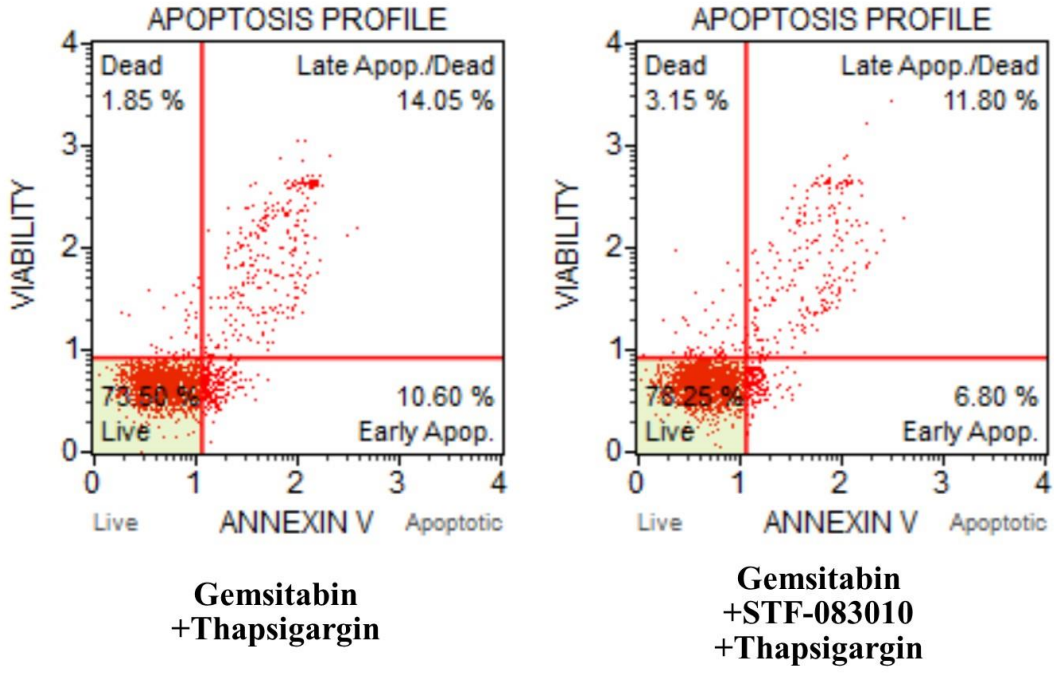


Thapsigargin



**STF-083010
+Thapsigargin**

Şekil 33. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait apoptoz oranları.



Şekil 34. Gemcitabin + Thapsigargin ve Gemcitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarına ait apoptoz oranları.

4.8. Hücrelerin Kaspaz 3/ 7 Aktivitelerine Ait Bulgular

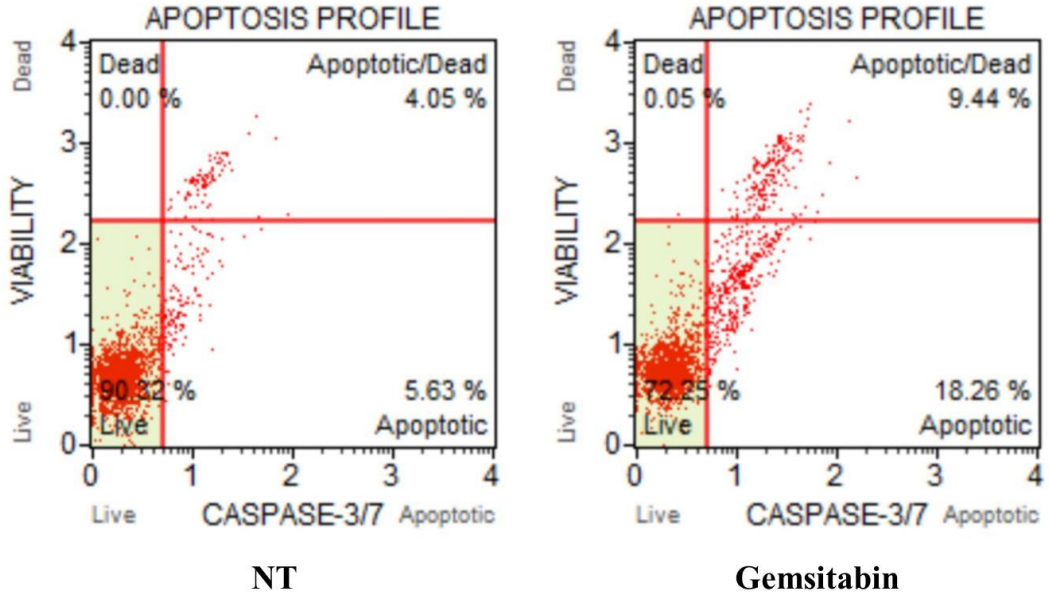
Deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla kaspaz 3/ 7 aracılığıyla olan apoptozda önemli bir artış gözlemlendi. NT grubunda total kaspaz 3/ 7 ile apoptoza giren hücrelerin oranı %9,68 iken Gemcitabin grubunda %27,7, STF-083010 grubunda %26,12, Thapsigargin grubunda %35,86 olarak bulundu. Gemcitabin + STF-083010 kombinasyonunda kaspaz 3/7 ile apoptoz oranı %49,84 iken STF-083010 + Thapsigargin kombinasyonunda %43,94, Gemcitabin + Thapsigargin kombinasyonunda %64,31 ve Gemcitabin + STF-083010 + Thapsigargin kombinasyonlarında %71,52 olarak bulundu. Tüm deney ilaçlarında tek başlarına kullanıma kıyasla kombine olarak kullanımda kaspaz 3/ 7 ile apoptoza giren hücre sayısı artmıştır.

Deney gruplarında % kaspaz 3/ 7 oranları Tablo 10'da verilmiştir. Kaspaz 3/ 7'ye ait grafikler ise Şekil 33, 34, 35 ve 36'da gösterilmiştir. Grafiklerde sol alt kadranda canlı hücreler ve saptanabilir apoptoza girmeyen popülasyonu (Kaspaz-3/ 7(-) ve Ölü hücre belirteci (-)), sağ alt kadranda apoptozun erken evrelerindeki hücreleri (Kaspaz-3/ 7(+) ve Ölü hücre belirteci (-)), sağ üst kadranda apoptozun geç aşamalarındaki hücreler veya apoptotik mekanizmalarla ölmüş hücreleri (Kaspaz-3/ 7(+) ve Ölü hücre belirteci (+)), sol üst kadranda ise nekroz yoluyla ölen hücreleri (Kaspaz-3/ 7(-) ve Ölü hücre belirteci (+)) olarak gösterilmiştir.

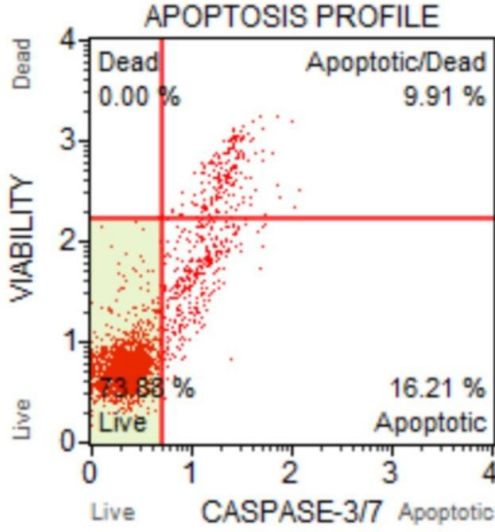
ancak apoptotik yoldan ölmeyen hücreleri (Kaspaz-3/ 7(-) ve Ölü hücre belirteci (+)) göstermektedir. Sağ alt kadran ve sağ üst kadran toplamı total kaspaz 3/7 miktarını belirtir.

Tablo 10. Deney gruplarında kaspaz 3/7 oranları.

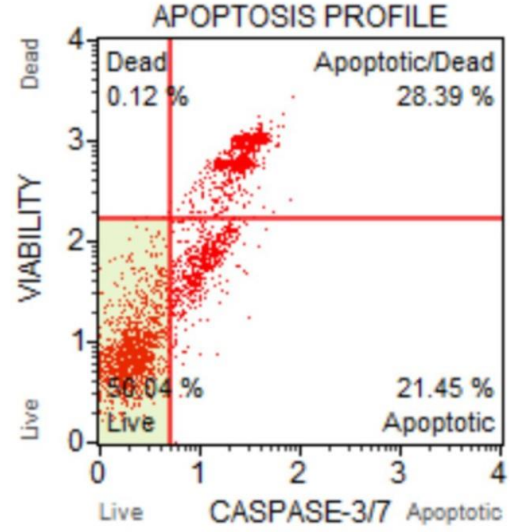
Gruplar	%Kaspaz 3/ 7 Oranı
NT	%9,68
Gemsitabin	%27,7
STF-083010	%26,12
Thapsigargin	%35,86
Gemsitabin+STF-083010	%49,84
STF-083010+Thapsigargin	%43,94
Gemsitabin+Thapsigargin	%64,31
Gemsitabin+STF-083010+Thapsigargin	%71,52



Şekil 35. NT ve Gemcitabin gruplarında kaspaz 3/7 oranları.

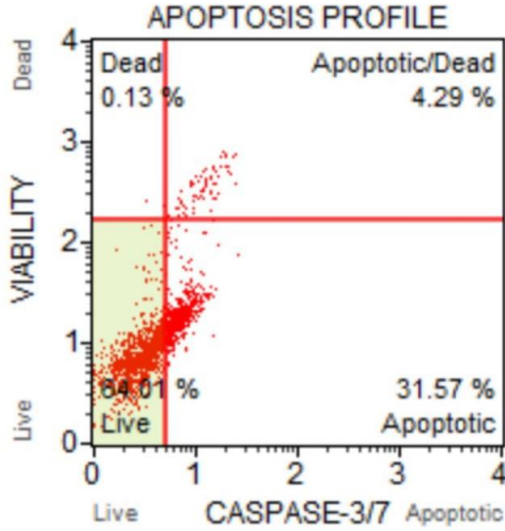


STF-083010

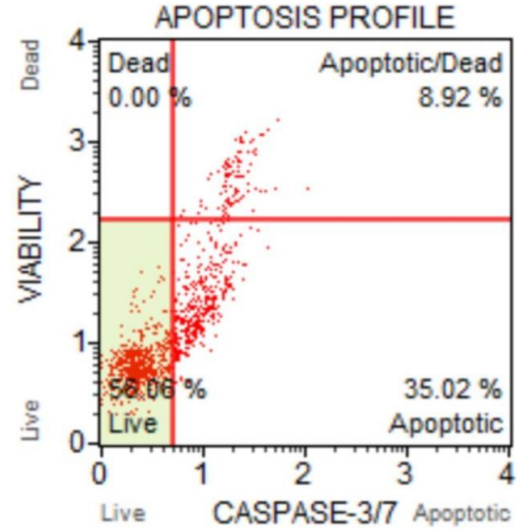


**Gemcitabin
+STF-083010**

Şekil 36. STF-083010 ve Gemcitabin + STF-083010 gruplarında kaspaz 3/7 oranları.

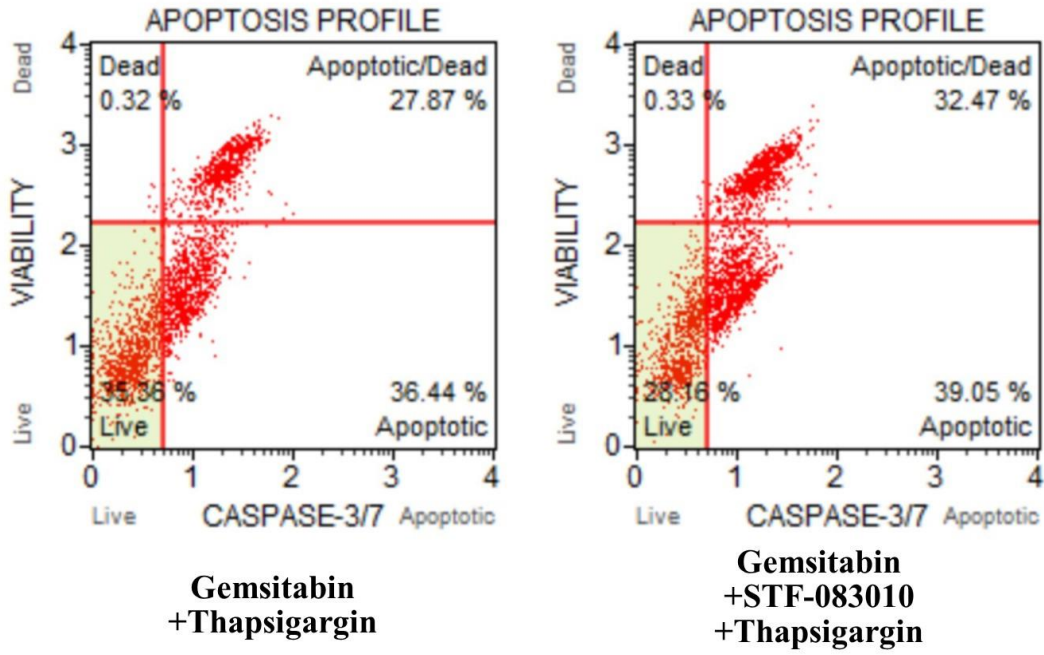


Thapsigargin



**STF-083010
+Thapsigargin**

Şekil 37. Thapsigargin ve STF-083010 + Thapsigargin gruplarında kaspaz 3/7 oranları.

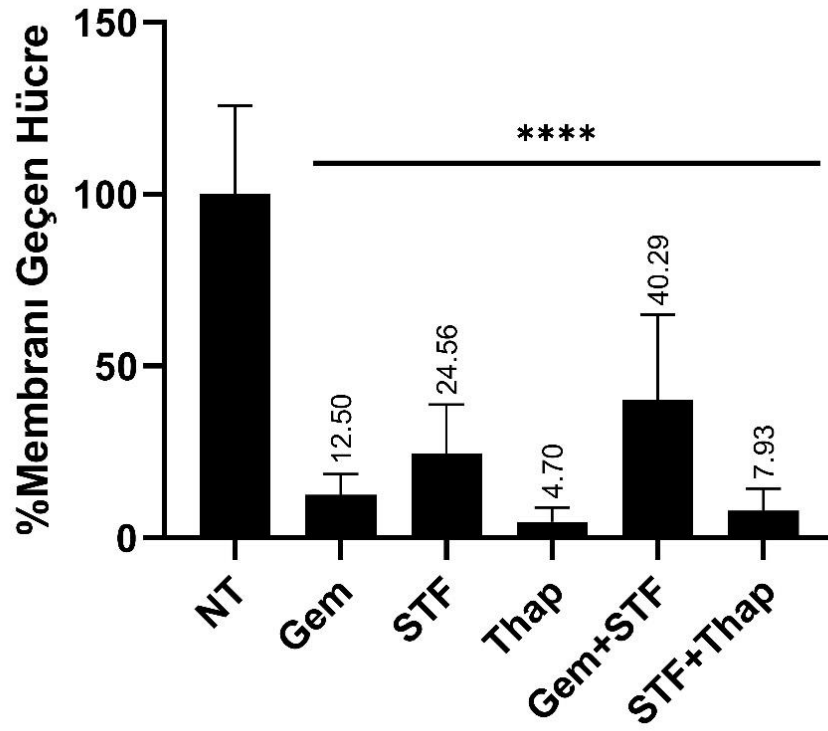


Şekil 38. Gemcitabin + Thapsigargin ve Gemcitabin + STF-083010 + Thapsigargin gruplarında kaspaz 3/7 oranları.

4.9. İnvazyon Deneyi

STF-083010 ve gemcitabin ile kombinasyonunun hücrelerin invazyon üzerine etkilerini belirlemek için matrijel invazyon deneyi yapıldı. Tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla membranı geçen hücre sayısında ciddi bir düşüş söz konusuydu. NT grubunda membranı geçen ortalama hücre sayısı 788 iken, Gemcitabin grubunda 98,5, STF-083010 grubunda 193,5, Thapsigargin grubunda 37, gemcitabin ve STF-083010 kombinasyonunda 317,5 ve STF-083010-Thapsigargin kombinasyonunda 62,5 hücre idi (Tablo 11. Deney gruplarında mebranı geçen ortalama hücre sayıları ve standart sapmaları. ¹ p <0,0001 (Kontrol'e göre), ² p <0,0001 (Gemcitabin'e göre), ³ p =0,0154 (STF-083010'a göre), ⁴ p =0,0005 (STF-083010'a göre), ⁵ p =0,0076 (STF-083010'a göre).).

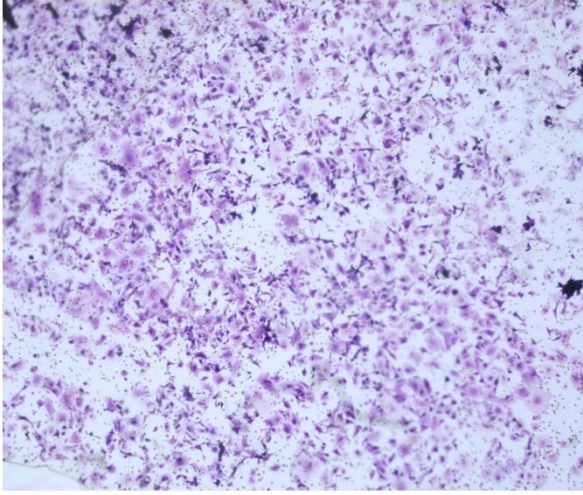
İnvazyon deneyinin sonuçlarına ait grafik Şekil 39'da, membranlara ait görüntüler ise Resim 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'da bulunmaktadır.



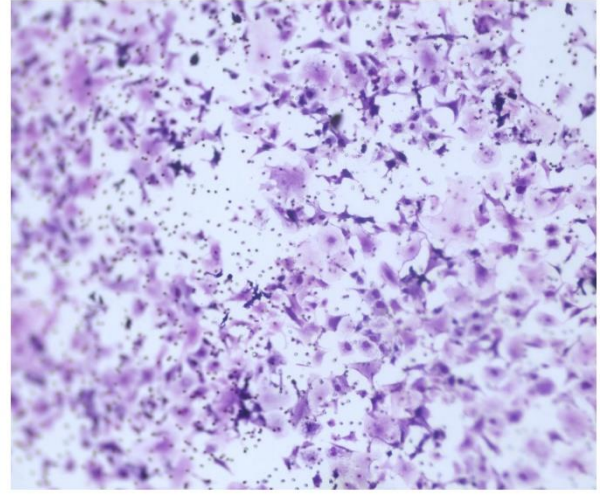
Şekil 39. Matrijel invazyon deneyinde % membranı geçen hücre sayıları (metastatik hücre).

Tablo 11. Deney gruplarında mebranı geçen ortalama hücre sayıları ve standart sapmaları. ¹ p <0,0001 (Kontrol'e göre), ² p <0,0001 (Gemsitabin'e göre), ³ p =0,0154 (STF-083010'a göre), ⁴ p =0,0005 (STF-083010'a göre), ⁵ p =0,0076 (STF-083010'a göre).

Gruplar	Ortalama ± Standart sapma
Kontrol	788 ± 25,81
Gemsitabin	98,5 ± 6,09 ¹
STF-083010	193,5 ± 14,25 ¹
Thapsigargin	37 ± 4,11 ^{1,4}
Gemsitabin + STF-083010	317,5 ± 24,63 ^{1,2,3}
STF-083010 + Thapsigargin	62,5 ± 6,40 ^{1,5}

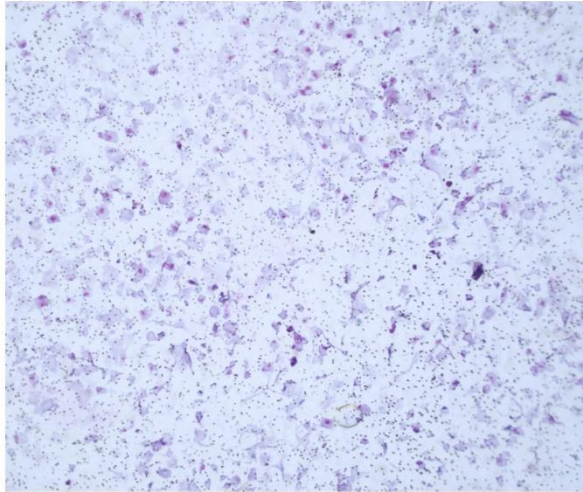


Kontrol (5x)

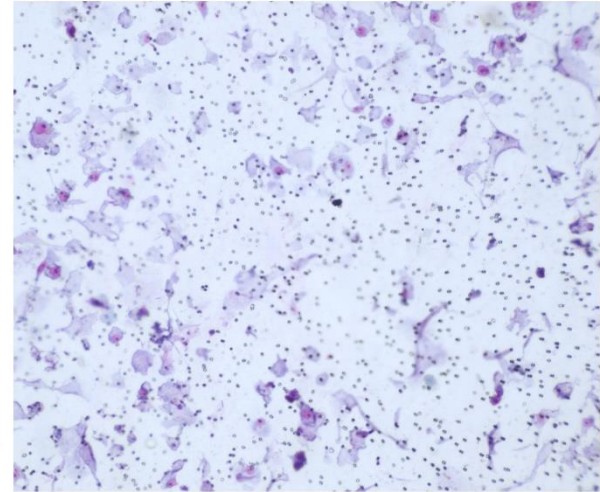


Kontrol (10x)

Resim 5. Kontrol grubuna ait 5x ve 10x büyütmelerde transwell membran görüntüleri.

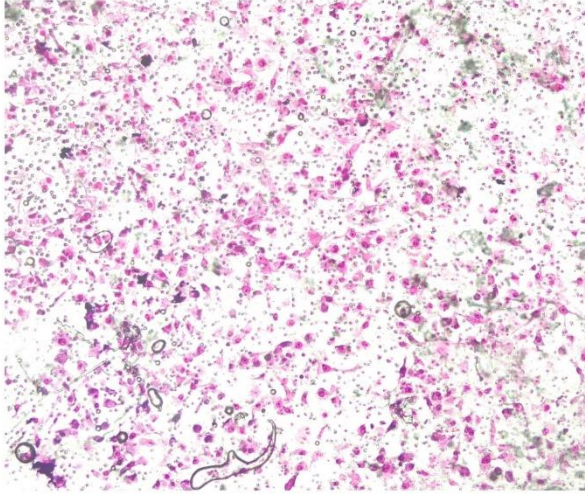


Gemcitabin (5x)

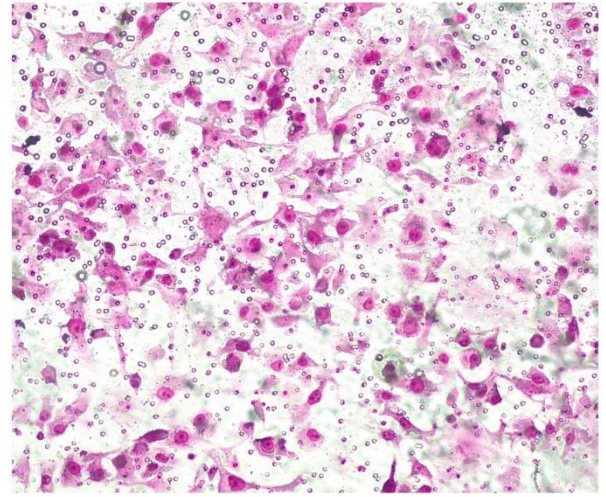


Gemcitabin (10x)

Resim 6. Gemcitabin grubuna ait 5x ve 10x büyütmelerde transwell membran görüntüleri.

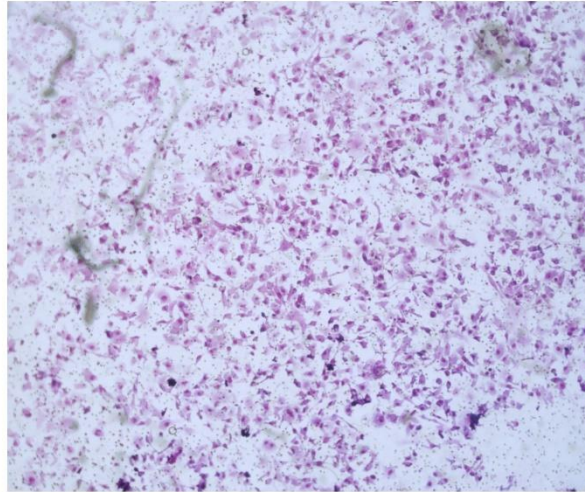


STF-083010 (5x)

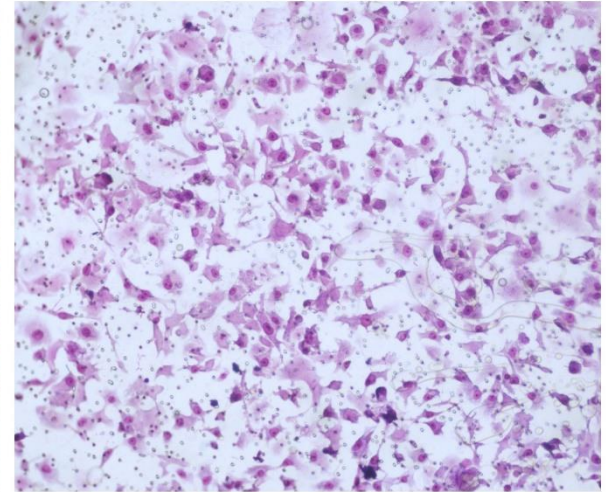


STF-083010 (10x)

Resim 7. STF-083010 grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.

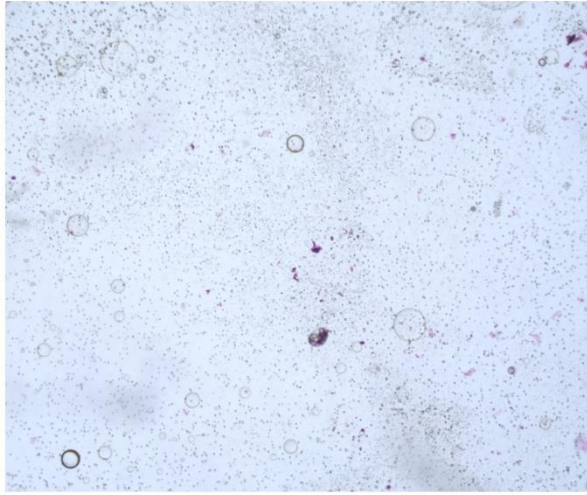


Gemitabin+ STF-083010 (5x)

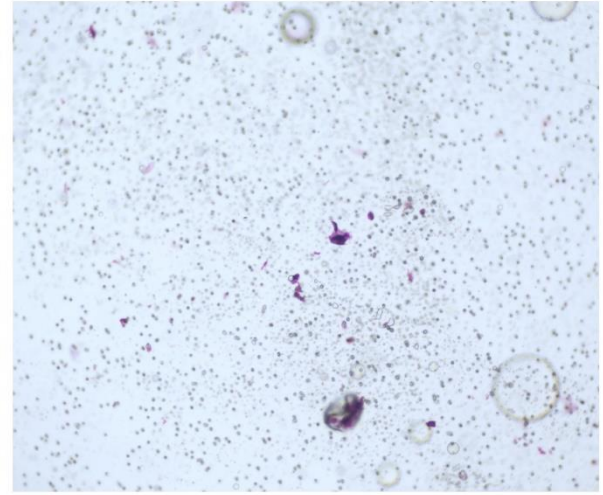


Gemitabin+ STF-083010 (10x)

Resim 8. Gemitabin + STF-083010 grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.

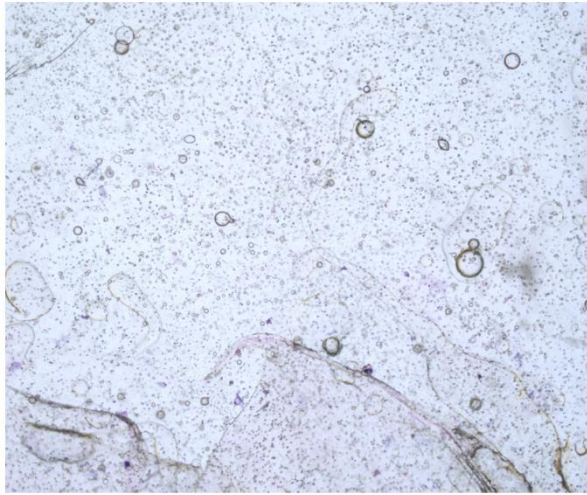


Thapsigargin (5x)

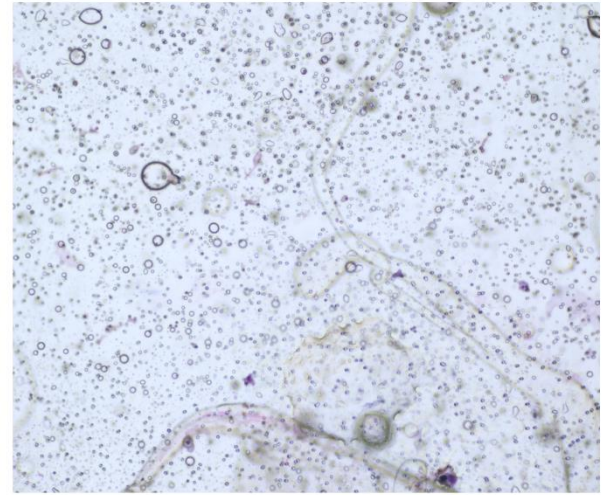


Thapsigargin (10x)

Resim 9. Thapsigargin grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.



STF-083010+ Thapsigargin (5x)



STF-083010+ Thapsigargin (10x)

Resim 10. STF-083010 + Thapsigargin grubuna ait 5x ve 10x büyütmede transwell membran görüntüleri.

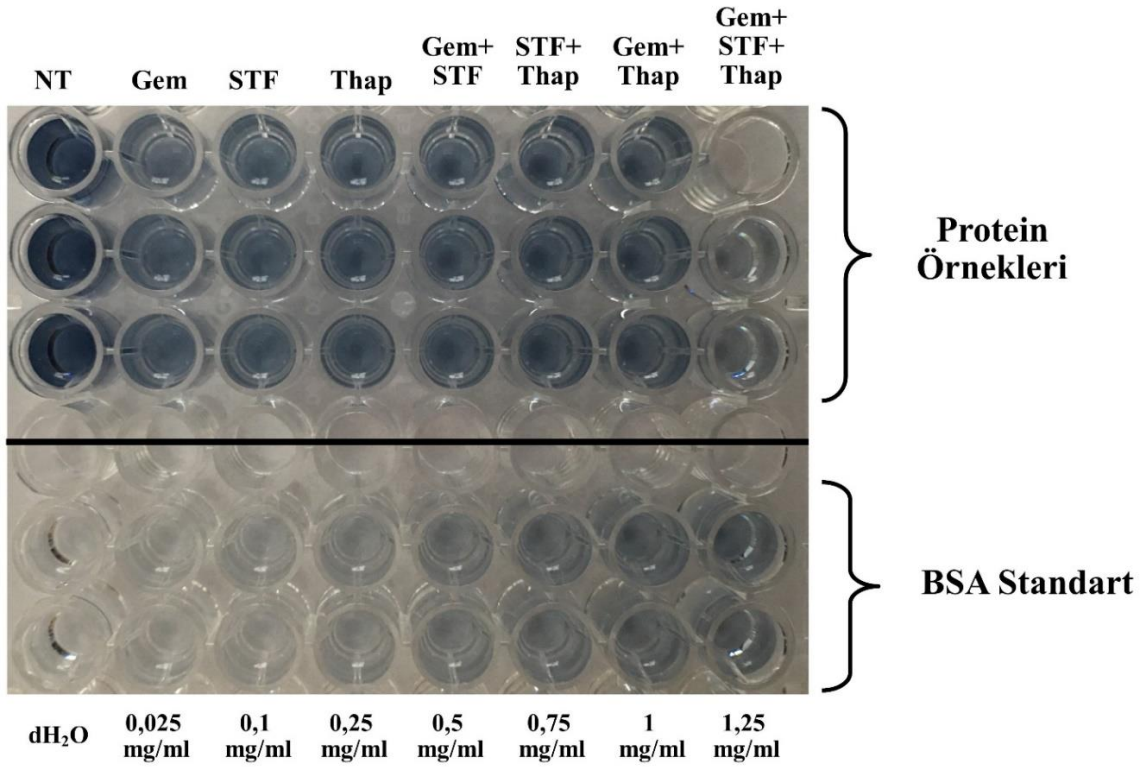
4.10. Western Blot ve Protein Ekspresyon Analizleri

4.10.1. Protein Konsantrasyon Analizi

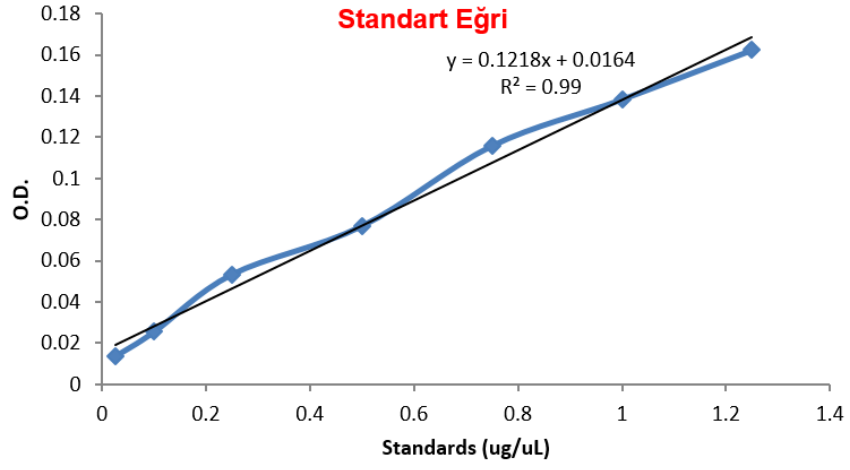
SDS-PAGE jelde her kuyuya eşit miktarda proteinin yüklenmesi için hücrelerden elde edilen total protein miktarı ölçüldü. Sırasıyla kontrol, gemsitabin, STF-083010, thapsigargin,

gemsitabin + STF-083010, STF-083010 + thapsigargin, gemsitabin + thapsigargin ve gemsitabin + STF083010 + thapsigargin gruplarında ölçülen protein miktarları şu şekilde idi; 8.44, 4.10, 3.92, 4.15, 3.44, 4.05, 3.30, 1.45 µg/ µl.

Ayrıca örneklerin absorbands değerlerinden, protein miktarının belirlenebilmesi için sırayla 0.025, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 ve 1.25 mg/ ml olacak şekilde BSA dilüsyonları oluşturuldu. BSA standartlarının absorbands değerleri ile standart eğri hazırlandı. Örneklerin absorbands değerleri, oluşturulan standart grafik denklemi kullanılarak protein miktarları belirlendi. Konsantrasyon analizine ait renk değişimi Resim 11’de ve BSA dilüsyonlarına ait standart eğri Şekil 40’da bulunmaktadır.

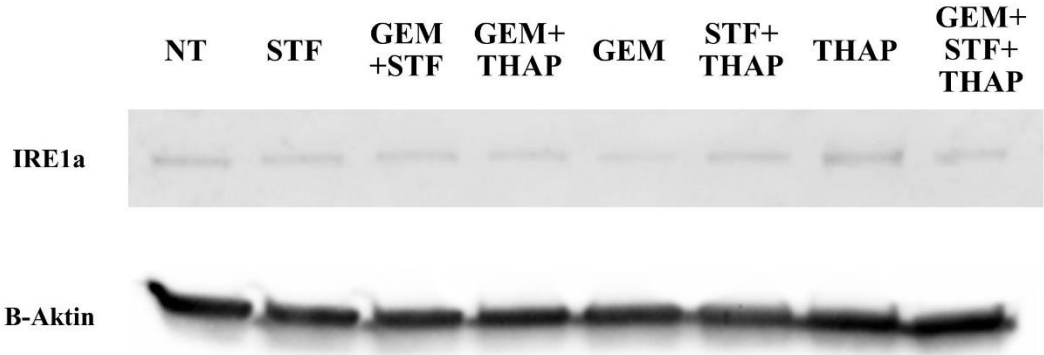


Resim 11. Örneklerdeki protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılan konsantrasyon analizi. Üstteki kuyucuklarda 3 tekrar olacak şekilde 4x oranında seyreltilmiş protein örnekleri yer alırken, aşağıdaki kuyucuklarda BSA'nın dilüsyonları yer almaktadır. Her bir kuyucuk DC protein assay kitinin içindeki solüsyonlar ile muamele edilmiştir. Renk koyulaştıkça protein konsantrasyonu artmaktadır.

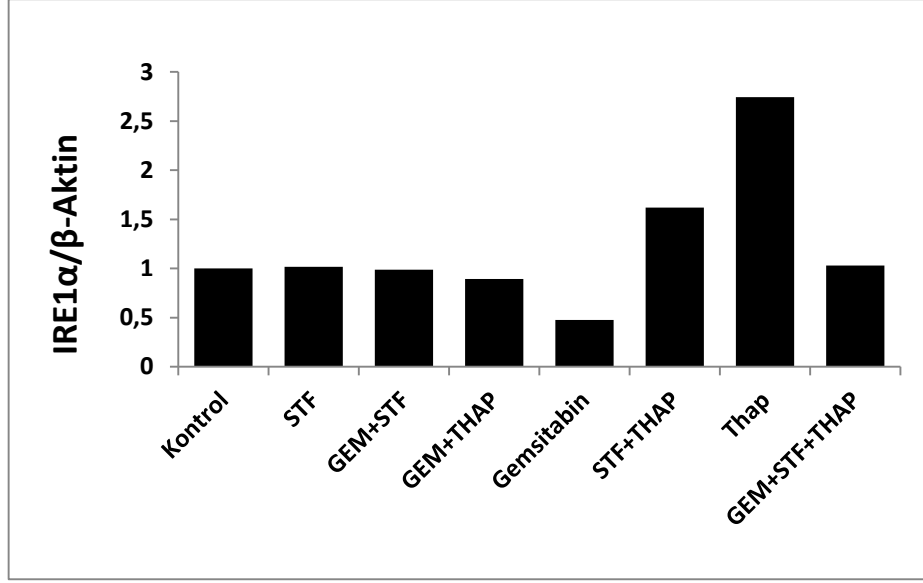


Şekil 40. BSA dilüsyonlarına ait standart eğri.

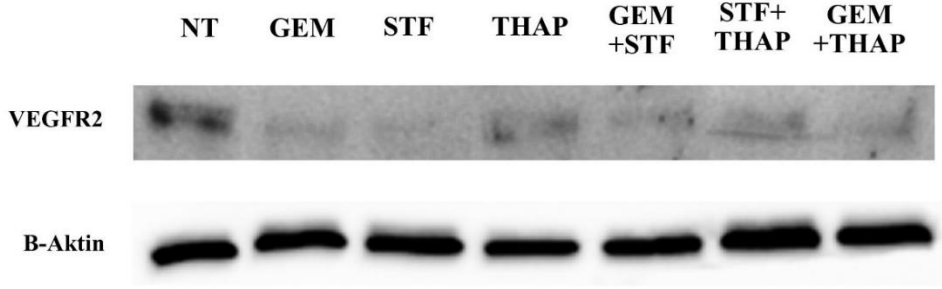
4.10.2. Western Blot Protein Ekspresyonları



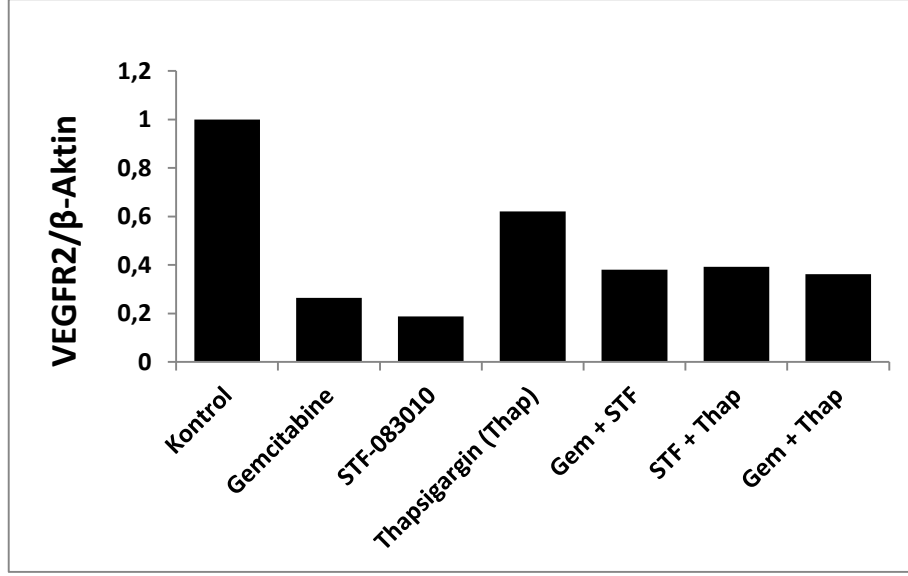
Resim 12. Deney gruplarında ER stres faktörü olan IRE1 α 'nın protein bantlarına ait blot görüntüsü.



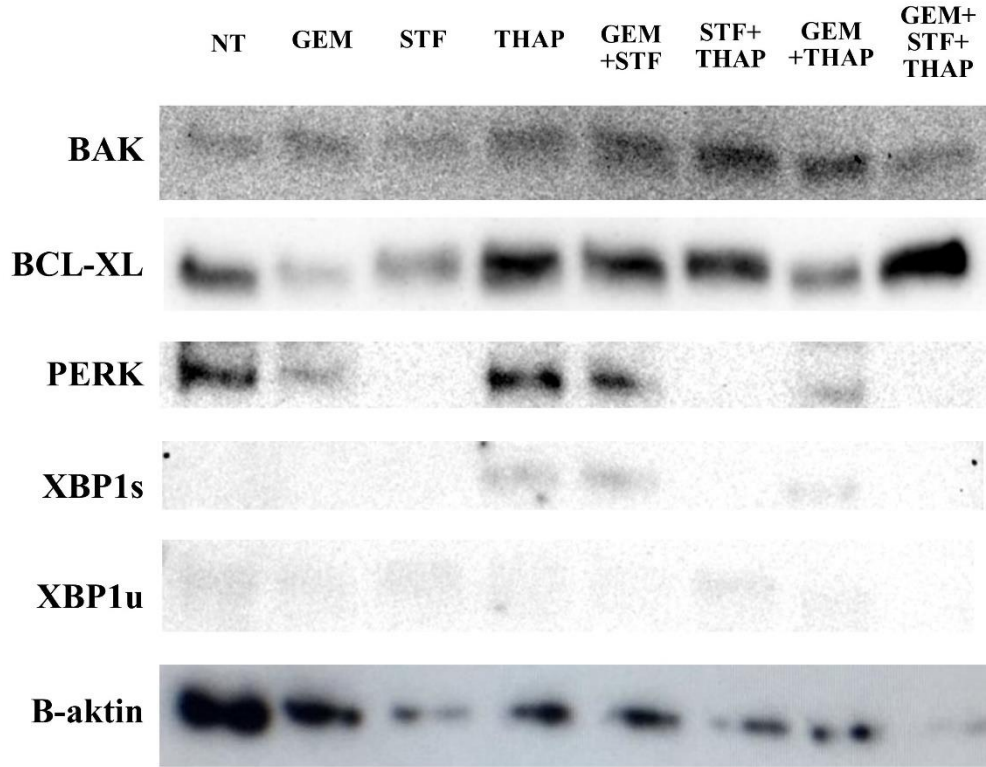
Şekil 41. IRE1 α proteininin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.



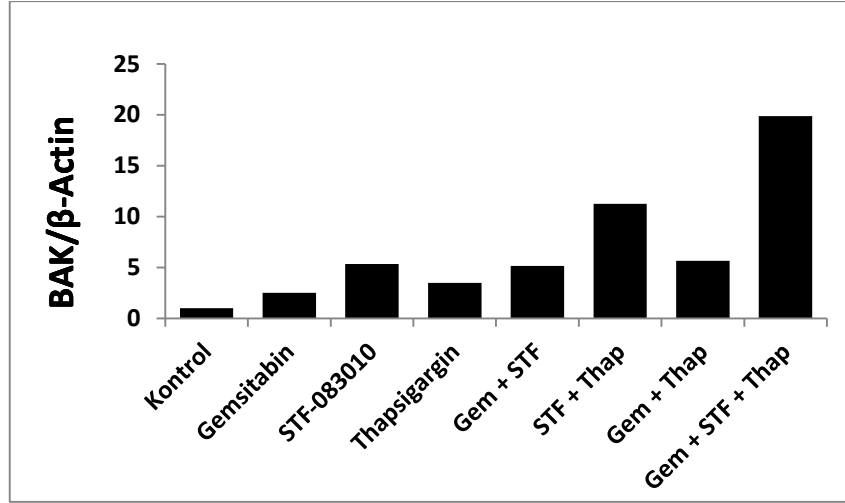
Resim 13. Deney gruplarında anjiyogenez belirteci VEGFR2'nin protein bantlarına ait blot görüntüsü.



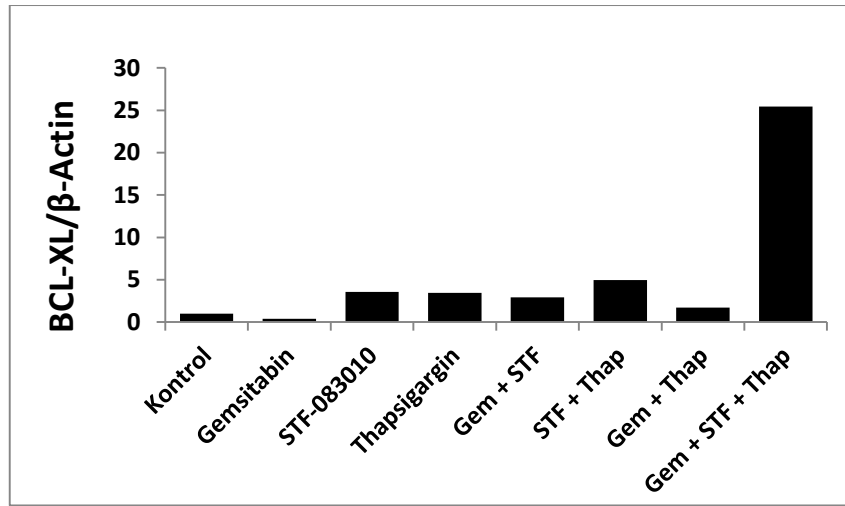
Şekil 42. VEGFR2 proteinin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.



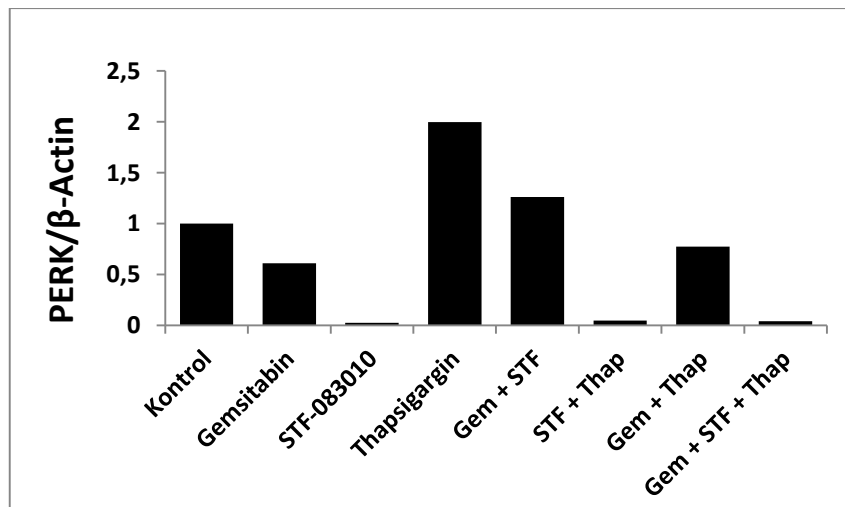
Resim 14. Deney gruplarında Bak, Bcl-xL, Perk, XBP1s ve XBP1u protein bantlarına ait blot görüntüleri.



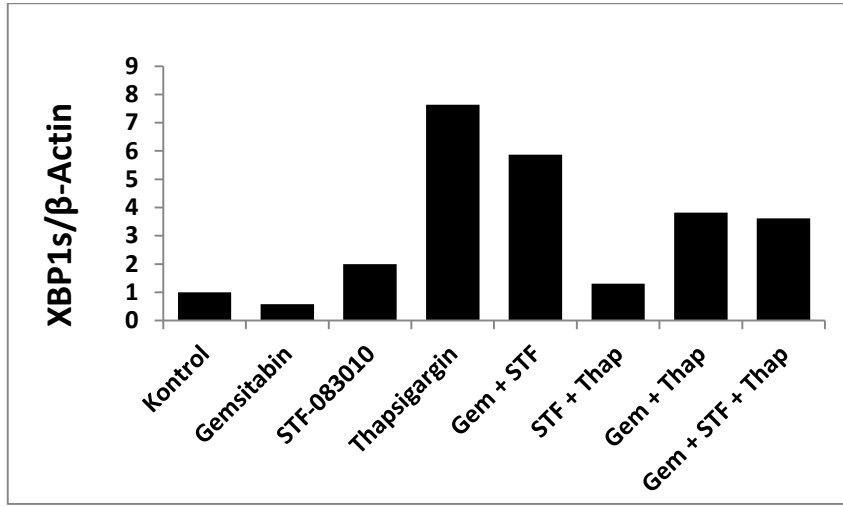
Şekil 43. Bak proteinin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.



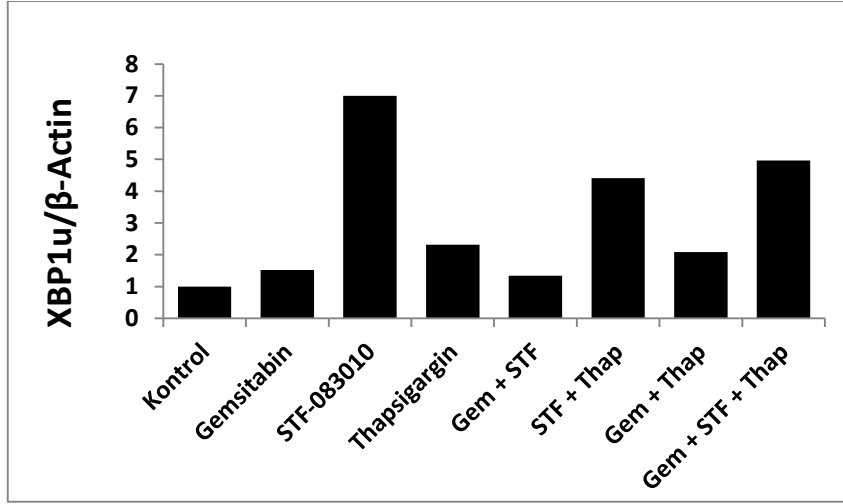
Şekil 44. Bcl-xL proteinin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.



Şekil 45. Perk proteinin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.



Şekil 46. XBP-1s proteinin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.



Şekil 47. XBP-1u proteinin beta aktin ile normalize edilmiş sonuçları.

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri dünyada kanserden ölümlerin en yüksek nedenidir ve sonuçlar iyileştirilmezse, hastalığın önümüzdeki on yıl içinde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir. Pankreas kanserinde genel 5 yıllık sağkalım oranı %7'nin altındadır ve tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Günümüzde Gemsitabin, 5-FU ve FOLFIRINOX gibi kemoterapötik tedaviler ile klinik olarak minimum iyileşme sağlamasına rağmen cerrahi olarak rezeke edilemeyen hastalığa sahip olan hastalar başta olmak üzere pankreas kanseri için yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç bulunmaktadır.

Endoplazmik retikulum protein sentezi, protein transportu, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması gibi işlemlerin ana bölgesidir. Artmış salgı yükü gibi fizyolojik stresler veya ER'de düzgün şekilde katlanamayan mutasyona uğramış proteinlerin mevcudiyeti gibi patolojik stresler, protein katlama talebi ile ER'nin protein katlama kapasitesi arasında bir dengesizliğe yol açabilir. ER stresine neden olur. ER stresini algılamak ve buna yanıt vermek için ökaryotik hücreler, topluca katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir grup sinyal iletim yolu geliştirmiştir. UPR'nin ER düzenleyicileri, bir dizi transmembran ER'de yerleşik proteinden oluşur, IRE1, PERK ve ATF-6. ER stresinin tümörler üzerinde ikili bir etkisi vardır. İlk olarak, tümör büyümesini artıran uyarlanabilir bir anlamı vardır. İkincisi, apoptozu indükleyen sitotoksik etkileri de vardır. Kanser hücreleri, UPR'nin aktivasyonu ile çevredeki mikro çevreye uyum sağlar ve makrofajlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve anjiyojenik faktörler salgılayarak kanser hücresi gelişimi ve istilası için daha uygun mikro ortamlar oluşturur.

XBP1s'in çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edilmesi, onun bir proto-onkogen gibi davrandığını düşündürür. XBP1s kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonu, kronik lenfositik lösemi gibi tümör oluşumunu doğrudan destekleyebilir ve aktive edilmiş IRE1 α 'yı ve ardından XBP1 eklemesini hedeflemek, multipl miyelomda klinik öncesi modellerde umut verici sonuçlar vermiştir. Ayrıca, XBP1s, üçlü negatif meme kanserinde HIF1 α ile etkileşime girer ve bir hipoksi imza gen ekspresyon programını indükleyerek tümörün ilerlemesini sağlar. XBP1s ve ATF6 α hedefi, P58IPK, ayrıca ER stresiyile karşı karşıya kalan malign hücrelerin hayatta kalmasıyla da bağlantılıdır ve kronik UPR sinyallesine adaptif bir yanıtı aracılık eder.

Bu çalışmada ER stres faktörü IRE1 α proteininin endonükleaz inhibitörü olan STF-083010'un pankreas kanserindeki etkilerini inceledik. Western blot deneyinde pankreas kanseri hücrelerinin ER stresi altında olduğunu gösteren PERK ve IRE1 α proteinlerinin ekspresyonunda artış gözlemledik. ER stresine bağlı PERK ve IRE1 α ekspresyonları thapsigargin uygulanan gruplarda daha fazlaydı. Bir dizi MTS/PMS sitotoksisite deneyi ile STF-083010'un yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonunu belirlerken ayrıca gempitabin ve thapsigargin ile kombinasyonunu da inceledik. STF'de 160 μ M olarak bulduğumuz IC50 değeri diğer deney aşamalarında da kullandık. STF-083010'un XBP1s ekspresyonunda düşüş ve XBP1u ekspresyonunda artışa neden oldu. Bu da STF-083010'un IRE1 α endonükleaz aktivitesini başarıyla inhibe ettiğini göstermektedir. Thapsigargin grubunda XBP1s ekspresyonunda artış gözlenirken, XBP1u'da düşüş söz konusuydu. Thapsigargin'e STF-083010 ilavesi bu proteinin ekspresyonunda düşüşe neden oldu ve Thapsigargin ile indüklenen ER stresinin STF-083010 kombinasyonu ile tersine çevrildiği gözlemlendi. İlginç bir şekilde diğer ER stres faktörü olan PERK proteininin ekspresyonu IRE1 α inhibitörü olan STF-083010 grubunda çok azdı. Dahası STF-083010'un bu etkisi, PERK ekspresyonunda artış gözlenen Thapsigargin grubuna ilave ile tersine çevrildi. STF-083010, IRE1'in endonükleaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu için IRE1 protein ekspresyonunda beklediğimiz gibi bir değişikliğe neden olmadı. PERK ekspresyonundaki düşüşün bize STF-083010'un IRE1'in endonükleaz inhibisyonunda spesifik olmayabileceğini düşündürmektedir.

Sinerjistik analiz için, pankreas kanseri tedavisinde FDA onaylı kemoterapötik ajan olan gempitabin ile STF-083010'u farklı konsantrasyonlarda analiz ettik. Sonuçlarımız düşük doz gempitabin ile STF'nin farklı konsantrasyonlarının sinerjistik bir etki gösterdiği yönündeydi. Yapılan bir çalışmada düşük doz gempitabin kullanımının, rezeke edilemeyen pankreas kanserli yaşlı hastaların prognozunu iyileştirebileceği ve ayrıca, önceki raporlara kıyasla düşük doz gempitabin ile tedavi edilen hastalarda şiddetli toksisitenin etkileri daha düşük olarak bulunmuştur (Matsumoto ve diğerleri, 2011). Bu nedenle düşük doz gempitabin'in STF-083010 ile kombinasyonu toksisiteyi azaltarak etkinliği artırabilir.

Pankreas kanseri hücrelerinin STF-083010 ile tedavisinde tek başına gempitabin kullanımına kıyasla kaspaz 3/7 yoluyla apoptoza giden hücre sayısında önemli bir artış söz konusuydu. Ayrıca western blot deneyinde STF-083010 gruplarında pro-apoptotik Bak protein ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlemlendi.

Klonojenik deney ile STF-083010'un ve gempitabin ile kombinasyonunun anti-proliferatif etkilerini kanıtladık.

Ayrıca invazyon deneyinde STF-083010'un IRE1a-XBP1s inhibisyonu yoluyla pankreas kanseri hücrelerinde invazyonu azalttığını gözlemledik. Gerçektende yapılan birkaç çalışmada kolorektal karsinom, meme kanseri ve oral skuamöz hücreli karsinomlu hastalardan alınan metastatik tümör örneklerinde IRE1a veya XBP1'in primer tümörlere kıyasla aşırı ekspresyonunu tanımlamıştır (Jin ve diğerleri, 2016; Li ve diğerleri, 2015; Mhaidat ve diğerleri, 2015; Sun ve diğerleri, 2018). Ek olarak, primer tümörlerde yüksek XBP1 seviyelerinin, özofagus karsinomu, hepatoselüler karsinom ve oral skuamöz hücreli karsinomu olan hastalarda uzak metastaz varlığı ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (Hsu ve diğerleri, 2018; S. Wu ve diğerleri, 2018; Xia ve diğerleri, 2016). Primer tümörde XBP1s'in aşırı ekspresyonu, hepatoselüler karsinomda intrahepatik invazyon ve uzak metastaz ile korele idi (S. Wu ve diğerleri, 2018). Pankreas kanserlerinde, latent karaciğer metastazları, anti-tümör immün tepkisinden kaçan sessiz yayılmış kanser hücrelerinden (DCC'ler) gelişmektedir (Pommier ve diğerleri, 2018). Şaşırtıcı bir şekilde, DCC'lerin IRE1'in inhibisyonu yoluyla, MHC sınıf I molekül ekspresyonunu aşağı regüle ederek CD8 T hücresi sitotoksitesinden kaçtığı bulunmuştur. DCC'lerde IRE1 sinyal dalının aktivasyonu XBP1s aşırı ekspresyonu yoluyla, karaciğer makro-metastatik lezyonlarının aşırı büyümesine yol açmıştır (Pommier ve diğerleri, 2018). Logue ve ark. üçlü negatif meme kanserinde (TNBC) IRE1 aktivitesinin akciğer metastazını artırdığını, IRE1 α 'nın terapötik bir hedef olarak kullanılabileceğini ve TNBC tedavisinde küçük molekül IRE1 inhibitörlerinin terapötik potansiyelini göstermişlerdir Zhao ve ark. tarafından yayınlanan bulgularda ise, IRE1-XBP1 yolunun farmakolojik inhibisyonunun MYC kaynaklı meme kanserlerini baskıladığını bildirilmiştir (Logue ve diğerleri, 2018; Zhao ve diğerleri, 2018). Xie ve diğerlerinin in vitro olarak kolon kanseri hücre hattı ile yaptıkları çalışmada, IRE1'in siRNA'lar ile susturulmasının Src ve FAK'ın fosforilasyonunun inhibisyonuna ve RhoA, Rac1 ve CDC42 dahil olmak üzere akış aşağı efektör GTPaz'ların etkisizleştirilmesine yol açtığını ve IRE1'in knock-down edilmesinin FN1-Src/FAK-GTPaz sinyalleşmesini inhibe ederek kolon kanseri hücrelerinin metastatik potansiyelini azalttığını bulmuşlardır (Xie ve diğerleri, 2019). Tüm bu bulgular, bizim bulduğumuz sonuçlar ile uyumlu idi. Ancak STF-083010'un neden olduğu invazyon inhibisyonunun, EMT belirteçleri üzerindeki etkisi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Lhomond ve arkadaşları glioblastom hastalarında yüksek IRE1 aktivitesinin daha kısa hasta sağkalımı ve bağışıklık hücreleri tarafından artan tümör infiltrasyonu, artan tümör anjiyogenezi ve gelişmiş istila/göç özellikleri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Lhomond ve diğerleri, 2018). Bizim çalışmamızda ise tümör vaskülarizasyonunda önemli role sahip olan

VEGFR2 proteininin Panc-1 hücrelerinde aşırı eksprese olduğu, STF-083010 ile tedavinin ise VEGFR2 ekspresyonunda önemli bir düşüş sağladığı saptandı. Bu nedenle Lhomond ve diğerlerinin çalışmasındaki bulgular ile uyumlu olarak çalışmamızda IRE1 α -XBP1 ekseninin pankreas kanserinin anjiyogenezinde de rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda düşük doz gemsitabin ile STF-083010'un kullanımının sinerjik etki gösterdiği gözlemlendi. Bu sonuç ile uyumlu olarak Sheng ve diğerleri, MKC8866 ile IRE1 α 'nın spesifik inhibisyonunun, fare modellerinde prostat kanserini inhibe etmede dikkate değer bir etkinliğe sahip olduğunu ve ayrıca klinikte prostat kanserine karşı kullanılan hem hedeflenen hem de kemoterapötik ilaçlarla sinerji oluşturduğunu göstermişlerdir (Sheng ve diğerleri, 2019). Bir diğer çalışmada toyokamisinin, MM hücre dizilerinde XBP1 ekspresyonunun yapısal aktivasyonunu bastırdığı, MM ksenograft in vivo modelinde tümör büyümesini inhibe ettiğini ve bortezomib'e dirençli olanlar dahil olmak üzere MM hücrelerinde bortezomibin kemoterapötik etkisini sinerjistik olarak arttırdığı bulunmuştur (Ri ve diğerleri, 2012). Sun ve diğerleri ise AML'de XBP1 ve XBP1s'in sıklıkla arttığını, IRE1 α RNase aktivitesinin küçük moleküller tarafından inhibisyonunun AML hücre büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlar ve IRE1 α 'nın aktivasyonunu inhibe eden bileşiklerin, hücre ölümü için yeni bir yolu temsil edebileceğini ve kemoterapiye faydalı bir tamamlayıcı olabileceğini tanımlamışlardır (Sun ve diğerleri, 2016). Yine çalışmamızın bulgularına benzer olarak Harnoss ve diğerleri farmakolojik olarak IRE1 α kinaz inhibisyonunun, farelerde hücre hattı bazlı ve hastadan türetilmiş TNBC ksenograftlarının büyümesini güçlü bir şekilde zayıflattığını ve ayrıca tümör gerilemesine neden olmak için anti-VEGF-A tedavisi ile sinerjize edilebileceğini göstermişlerdir (Harnoss ve diğerleri, 2020).

Diğer yandan Mimura ve arkadaşları, IRE1 α endoribonükleaz alanının inhibisyonu yoluyla XBP1 splicing'inin bloke edilmesinin, multiple myelom hücre hatlarında büyüme inhibisyonuna neden olduğunu ve IRE1 α 'nın multiple myelomda potansiyel bir terapötik seçenek olduğunu göstermişlerdir (Mimura ve diğerleri, 2012). Ming ve diğerleri ise kemo-dirençli meme kanser hücre hattında XBP1'in hem mRNA hem de protein ekspresyonlarının arttığını ve STF-083010'un, dirençli MCF-7 hücrelerine karşı tamoksifen duyarlılığını yeniden kurarak, ksenograft meme tümörü modelinde meme kanseri ilerlemesini önemli ölçüde geciktirebileceğini göstermişlerdir (Ming ve diğerleri, 2015). Glioblastomda yakın zamanda, MKC8866'nın adjuvan kullanımının, temozolomid tedavisi ile birlikte ışınlamanın etkinliğini artırdığı bulundu (Le Reste ve diğerleri, 2019).

Yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak IRE1 α inhibitörü STF-083010'un pankreas kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etkilere sahip olduğunu, gemsitabin ile kombinasyonunun sitotoksisiteyi ve kaspaz 3 ve 7 aracılığıyla apoptozu artırdığını bulduk.

Tüm bu bulgular IRE1 α 'nın kanserde önemli bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir. Özellikle pankreas kanserinde dikkat çekici bir şekilde tümör mikro ortamı stroma açısından son derece zengindir ve hipoksiktir ve metabolitlerden yoksundur. Bu nedenle pankreas tümörleri ER stresine ve UPR aktivasyonuna yatkın bir hale gelmektedir. Hızla büyüyen bu hipoksik tümörlerde UPR'nin dinamikleri potansiyel tedavi seçeneği sunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışma IRE1 α endonükleaz inhibitörü STF-083010'un pankreas kanserinde in vitro olarak sitotoksiste gösterdiği, proliferasyonu inhibe ettiğini ve apoptozu artırdığını göstermektedir. Bu apoptoz büyük oranda kaspaz 3/7 aracılığıyla meydana gelmekteydi. Bu etki FDA onaylı kemoterapötik ajan Gempitabin kombinasyonu ile daha da artmaktaydı. STF-083010 ayrıca kanser gelişiminde ve progresyonunda kritik role sahip olan metastazın oranında düşme sağladı.

Ekspresyonu, artmış tümör sağ kalımı ve anjiyogenezi tetikleyen XBP1s'in, STF-083010 aracılığıyla inhibisyonu VEGFR2 ekspresyonunda önemli bir düşüş sağladı. Bu sonuç pankreas kanserinde STF-083010 kullanımının tümör anjiyogenezini inhibe edebileceğini düşündürmektedir. STF-083010'un hem tek başına tedavisi hem de gempitabin ile kombinasyonu ise pro-apoptotik protein BAK ekspresyonunda artışa neden olarak hücrelerin apoptozunu tetiklediğini gösterdik. STF-083010'un ayrıca çapraz yollar aracılığıyla bir diğer ER stres faktörü PERK ekspresyonunu da etki ettiğini düşünüyoruz.

Ayrıca STF-083010 ve gempitabin kombinasyonu pankreas kanseri hücrelerinde G0/G1 fazında hücre döngüsü tutuklanmasına neden olduğunu ve böylece hücrelerin sessiz faza girdiğini gösterdik.

Bizim çalışmamız IRE1 α endonükleaz inhibitörü STF-083010'un pankreas kanserinde in vitro olarak anti-proliferatif, anti-neoplastik, anti-metastatik ve pro-apoptotik etkilerine kanıt sunmaktadır. Çalışmamız farklı özelliklere sahip diğer pankreas kanseri hücre hatları ile kanıtlanabilirse pre-klinik in vivo çalışmalar için de ön ayak oluşturabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., & Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*, 27(1), 53-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011>
- Al-Aynati, M. M., Radulovich, N., Riddell, R. H., & Tsao, M. S. (2004). Epithelial-cadherin and beta-catenin expression changes in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res*, 10(4), 1235-1240. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0087>
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53(4), 549-554. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90571-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90571-5)
- Ameri, K., & Harris, A. L. (2008). Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.020>
- Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A., & Imaizumi, K. (2011). The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *J Biochem*, 149(5), 507-518. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr041>
- Atkins, C., Liu, Q., Minthorn, E., Zhang, S. Y., Figueroa, D. J., Moss, K., Stanley, T. B., Sanders, B., Goetz, A., Gaul, N., Choudhry, A. E., Alsaïd, H., Jucker, B. M., Axten, J. M., & Kumar, R. (2013). Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res*, 73(6), 1993-2002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-3109>
- Avril, T., Vauléon, E., & Chevet, E. (2017). Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis*, 6(8), e373. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.72>
- Babour, A., Bicknell, A. A., Tourtellotte, J., & Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell*, 142(2), 256-269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.006>

- Basturk, O., Hong, S. M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D. S., Matthaei, H., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., Takaori, K., . . . Furukawa, T. (2015). A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol*, 39(12), 1730-1741. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000000533>
- Beger, H. G., Warshaw, A. L., Hruban, R. H., Buchler, M. W., Lerch, M. M., Neoptolemos, J. P., Shimosegawa, T., & Whitcomb, D. C. (2018). *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery, 3rd Edition*. Wiley-Blackwell.
- Behrens, G., Jochem, C., Schmid, D., Keimling, M., Ricci, C., & Leitzmann, M. F. (2015). Physical activity and risk of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*, 30(4), 279-298. <https://doi.org/10.1007/s10654-015-0014-9>
- Behrman, S., Acosta-Alvear, D., & Walter, P. (2011). A CHOP-regulated microRNA controls rhodopsin expression. *J Cell Biol*, 192(6), 919-927. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010055>
- Benitez, C. M., Goodyer, W. R., & Kim, S. K. (2012). Deconstructing pancreas developmental biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012401>
- Berridge, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32(5-6), 235-249. <https://doi.org/10.1016/s0143416002001823>
- Blazanin, N., Son, J., Craig-Lucas, A. B., John, C. L., Breech, K. J., Podolsky, M. A., & Glick, A. B. (2017). ER stress and distinct outputs of the IRE1 α RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(37), 9900-9905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701757114>
- Bobrovnikova-Marjon, E., Pytel, D., Riese, M. J., Vaites, L. P., Singh, N., Koretzky, G. A., Witze, E. S., & Diehl, J. A. (2012). PERK utilizes intrinsic lipid kinase activity to generate phosphatidic acid, mediate Akt activation, and promote adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 32(12), 2268-2278. <https://doi.org/10.1128/mcb.00063-12>

- Bockhorn, M., Uzunoglu, F. G., Adham, M., Imrie, C., Milicevic, M., Sandberg, A. A., Asbun, H. J., Bassi, C., Büchler, M., Charnley, R. M., Conlon, K., Cruz, L. F., Dervenis, C., Fingerhutt, A., Friess, H., Gouma, D. J., Hartwig, W., Lillemoe, K. D., Montorsi, M., . . . Izbicki, J. R. (2014). Borderline resectable pancreatic cancer: a consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery, 155*(6), 977-988. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.02.001>
- Bockman, D. E. (1976). Anastomosing tubular arrangement of the exocrine pancreas. *Am J Anat, 147*(1), 113-118. <https://doi.org/10.1002/aja.1001470111>
- Bosetti, C., Bravi, F., Turati, F., Edefonti, V., Polesel, J., Decarli, A., Negri, E., Talamini, R., Franceschi, S., La Vecchia, C., & Zeegers, M. P. (2013a). Nutrient-based dietary patterns and pancreatic cancer risk. *Ann Epidemiol, 23*(3), 124-128. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2012.12.005>
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Bracci, P. M., Negri, E., Neale, R. E., Risch, H. A., Olson, S. H., Gallinger, S., Miller, A. B., Bueno-de-Mesquita, H. B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P. A., Zatonski, W., Fontham, E., Holly, E. A., Gao, Y. T., Yu, H., . . . La Vecchia, C. (2013b). Ulcer, gastric surgery and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol, 24*(11), 2903-2910. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt336>
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D. T., Petersen, G., Bracci, P. M., Ji, B. T., Negri, E., Li, D., Risch, H. A., Olson, S. H., Gallinger, S., Miller, A. B., Bueno-de-Mesquita, H. B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P. A., Zatonski, W., Fontham, E., . . . La Vecchia, C. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol, 23*(7), 1880-1888. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr541>
- Bosetti, C., Rosato, V., Li, D., Silverman, D., Petersen, G. M., Bracci, P. M., Neale, R. E., Muscat, J., Anderson, K., Gallinger, S., Olson, S. H., Miller, A. B., Bas Bueno-de-Mesquita, H., Scelo, G., Janout, V., Holcatova, I., Lagiou, P., Serraino, D., Lucenteforte, E., . . . Ghadirian, P. (2014). Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol, 25*(10), 2065-2072. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu276>

- Braganza, J. M., Lee, S. H., McCloy, R. F., & McMahon, M. J. (2011). Chronic pancreatitis. *Lancet*, *377*(9772), 1184-1197. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61852-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61852-1)
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., & Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *Embo j*, *18*(3), 664-674. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.664>
- Bujisic, B., De Gassart, A., Tallant, R., Demaria, O., Zaffalon, L., Chelbi, S., Gilliet, M., Bertoni, F., & Martinon, F. (2017). Impairment of both IRE1 expression and XBP1 activation is a hallmark of GCB DLBCL and contributes to tumor growth. *Blood*, *129*(17), 2420-2428. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-741348>
- Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., & Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, *15*(6), 2403-2413. <https://doi.org/10.1200/jco.1997.15.6.2403>
- Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., & Leal, J. F. (2008). The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*, *8*(3), 187-198. <https://doi.org/10.2174/156800908784293659>
- Chan, E., Arlinghaus, L. R., Cardin, D. B., Goff, L., Berlin, J. D., Parikh, A., Abramson, R. G., Yankeelov, T. E., Hiebert, S., Merchant, N., Bhaskara, S., & Chakravarthy, A. B. (2016). Phase I trial of vorinostat added to chemoradiation with capecitabine in pancreatic cancer. *Radiother Oncol*, *119*(2), 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.04.013>
- Chen, X., & Cubillos-Ruiz, J. R. (2021). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer*, *21*(2), 71-88. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M. B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W. L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D. Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M. D., Ferrari, M., . . . Glimcher, L. H. (2014). XBP1 promotes triple-

negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature*, 508(7494), 103-107.
<https://doi.org/10.1038/nature13119>

Chevet, E., Fessart, D., Delom, F., Mulot, A., Vojtesek, B., Hrstka, R., Murray, E., Gray, T., & Hupp, T. (2013). Emerging roles for the pro-oncogenic anterior gradient-2 in cancer development. *Oncogene*, 32(20), 2499-2509. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.346>

Chitnis, N. S., Pytel, D., Bobrovnikova-Marjon, E., Pant, D., Zheng, H., Maas, N. L., Frederick, B., Kushner, J. A., Chodosh, L. A., Koumenis, C., Fuchs, S. Y., & Diehl, J. A. (2012). miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner. *Mol Cell*, 48(3), 353-364. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.025>

Chiu, C. C., Lee, L. Y., Li, Y. C., Chen, Y. J., Lu, Y. C., Li, Y. L., Wang, H. M., Chang, J. T., & Cheng, A. J. (2013). Grp78 as a therapeutic target for refractory head-neck cancer with CD24(-)CD44(+) stemness phenotype. *Cancer Gene Ther*, 20(11), 606-615. <https://doi.org/10.1038/cgt.2013.64>

Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., Wehland, J., Birchmeier, C., & Birchmeier, W. (2007). c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol*, 177(1), 151-162. <https://doi.org/10.1083/jcb.200701086>

Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58(3), 621-681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., & Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 364(19), 1817-1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>

Cox, T. R., Rumney, R. M. H., Schoof, E. M., Perryman, L., Høye, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N. A., Forrest, H., Evans, H. R., Huggins, I. D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., & Erler, J. T. (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, 522(7554), 106-110. <https://doi.org/10.1038/nature14492>

- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*, 23(20), 7198-7209. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003>
- Dauer, P., Sharma, N. S., Gupta, V. K., Durden, B., Hadad, R., Banerjee, S., Dudeja, V., Saluja, A., & Banerjee, S. (2019). ER stress sensor, glucose regulatory protein 78 (GRP78) regulates redox status in pancreatic cancer thereby maintaining "stemness". *Cell Death Dis*, 10(2), 132. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1408-5>
- Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T. M., Fullen, D. R., Pointer, J. N., Gruber, S. B., Su, L. D., Nikiforov, M. A., Kaufman, R. J., Bastian, B. C., & Soengas, M. S. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol*, 8(10), 1053-1063. <https://doi.org/10.1038/ncb1471>
- Dessimoz, J., & Grapin-Botton, A. (2006). Pancreas development and cancer: Wnt/beta-catenin at issue. *Cell Cycle*, 5(1), 7-10. <https://doi.org/10.4161/cc.5.1.2293>
- Dragovich, T., Laheru, D., Dayyani, F., Bolejack, V., Smith, L., Seng, J., Burris, H., Rosen, P., Hidalgo, M., Ritch, P., Baker, A. F., Raghunand, N., Crowley, J., & Von Hoff, D. D. (2014). Phase II trial of vatalanib in patients with advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma after first-line gemcitabine therapy (PCRT O4-001). *Cancer Chemother Pharmacol*, 74(2), 379-387. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2499-4>
- Ebert, M., Yokoyama, M., Friess, H., Büchler, M. W., & Korc, M. (1994). Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res*, 54(22), 5775-5778.
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*, 17(6), 1471-1474. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>
- Eid, S. Y., El-Readi, M. Z., & Wink, M. (2012). Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 19(14), 1288-1297. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.08.010>

- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Kong, B., Esposito, I., Friess, H., & Kleeff, J. (2012). The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med*, *12*(3), 288-303. <https://doi.org/10.2174/156652412799218921>
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., & Klöppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol*, *20*(38), 13833-13841. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13833>
- Feng, Y. X., Sokol, E. S., Del Vecchio, C. A., Sanduja, S., Claessen, J. H., Proia, T. A., Jin, D. X., Reinhardt, F., Ploegh, H. L., Wang, Q., & Gupta, P. B. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Discov*, *4*(6), 702-715. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-13-0945>
- Ferrand, A., Kowalski-Chauvel, A., Bertrand, C., Escricut, C., Mathieu, A., Portolan, G., Pradayrol, L., Fourmy, D., Dufresne, M., & Seva, C. (2005). A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models. *J Biol Chem*, *280*(11), 10710-10715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413309200>
- Fesinmeyer, M. D., Austin, M. A., Li, C. I., De Roos, A. J., & Bowen, D. J. (2005). Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *14*(7), 1766-1773. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.Epi-05-0120>
- Furukawa, T., Kanai, N., Shiwaku, H. O., Soga, N., Uehara, A., & Horii, A. (2006). AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer. *Oncogene*, *25*(35), 4831-4839. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209494>
- Gambella, M., Rocci, A., Passera, R., Gay, F., Omedè, P., Crippa, C., Corradini, P., Romano, A., Rossi, D., Ladetto, M., Boccadoro, M., & Palumbo, A. (2014). High XBP1 expression is a marker of better outcome in multiple myeloma patients treated with bortezomib. *Haematologica*, *99*(2), e14-16. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.090142>
- Garrido-Laguna, I., & Hidalgo, M. (2015). Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, *12*(6), 319-334. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.53>

- GCO. (2021). *The Global Cancer Observatory (GCO) is an interactive web-based platform presenting global cancer statistics to inform cancer control and research.* <https://gco.iarc.fr/>
- Genkinger, J. M., Kitahara, C. M., Bernstein, L., Berrington de Gonzalez, A., Brotzman, M., Elena, J. W., Giles, G. G., Hartge, P., Singh, P. N., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Weiderpass, E., Adami, H. O., Anderson, K. E., Beane-Freeman, L. E., Buring, J. E., Fraser, G. E., Fuchs, C. S., Gapstur, S. M., Gaziano, J. M., . . . Jacobs, E. J. (2015). Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. *Ann Oncol*, 26(11), 2257-2266. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv355>
- Genovese, G., Carugo, A., Tepper, J., Robinson, F. S., Li, L., Svelto, M., Nezi, L., Corti, D., Minelli, R., Pettazoni, P., Gutschner, T., Wu, C. C., Seth, S., Akdemir, K. C., Leo, E., Amin, S., Molin, M. D., Ying, H., Kwong, L. N., . . . Chin, L. (2017). Synthetic vulnerabilities of mesenchymal subpopulations in pancreatic cancer. *Nature*, 542(7641), 362-366. <https://doi.org/10.1038/nature21064>
- Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., & Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*, 5(3), e9575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009575>
- Gittes, G. K. (2009). Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol*, 326(1), 4-35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- Gorman, A. M., Healy, S. J., Jäger, R., & Samali, A. (2012). Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther*, 134(3), 306-316. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.02.003>
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 144, 241-275. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.008>
- Gudjonsson, B. (1995). Carcinoma of the pancreas: critical analysis of costs, results of resections, and the need for standardized reporting. *J Am Coll Surg*, 181(6), 483-503.
- Hammel, P., Huguet, F., van Laethem, J. L., Goldstein, D., Glimelius, B., Artru, P., Borbath, I., Bouché, O., Shannon, J., André, T., Mineur, L., Chibaudel, B., Bonnetain, F., &

- Louvet, C. (2016). Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *Jama*, *315*(17), 1844-1853. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4324>
- Han, D., Lerner, A. G., Vande Walle, L., Upton, J. P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B. J., Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2009). IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*, *138*(3), 562-575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.017>
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, *6*(5), 1099-1108. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00108-8)
- Harnoss, J. M., Le Thomas, A., Reichelt, M., Guttman, O., Wu, T. D., Marsters, S. A., Shemorry, A., Lawrence, D. A., Kan, D., Segal, E., Merchant, M., Totpal, K., Crocker, L. M., Mesh, K., Dohse, M., Solon, M., Modrusan, Z., Rudolph, J., Koeppen, H., . . . Ashkenazi, A. (2020). IRE1 α Disruption in Triple-Negative Breast Cancer Cooperates with Antiangiogenic Therapy by Reversing ER Stress Adaptation and Remodeling the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*, *80*(11), 2368-2379. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-19-3108>
- Hart, L. S., Cunningham, J. T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S. L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., Li, Y., Gao, Y., Liu, H., Li, C., Maity, A., Thomas-Tikhonenko, A., Perl, A. E., Koong, A., Fuchs, S. Y., . . . Koumenis, C. (2012). ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest*, *122*(12), 4621-4634. <https://doi.org/10.1172/jci62973>
- Hess, D. A., Humphrey, S. E., Ishibashi, J., Damsz, B., Lee, A. H., Glimcher, L. H., & Konieczny, S. F. (2011). Extensive pancreas regeneration following acinar-specific disruption of Xbp1 in mice. *Gastroenterology*, *141*(4), 1463-1472. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.045>
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(2), 89-102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>

- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M. C., Antonsson, B., Brandt, G. S., Iwakoshi, N. N., Schinzel, A., & Glimcher, L. H. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α . *Science*, *312*(5773), 572-576.
- Hetz, C., & Glimcher, L. H. (2009). Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1 α interactome. *Mol Cell*, *35*(5), 551-561. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.021>
- Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., & Glimcher, L. H. (2011). The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiol Rev*, *91*(4), 1219-1243. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2011>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(8), 421-438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, *20*(10), 1218-1249. <https://doi.org/10.1101/gad.1415606>
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., . . . Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, *527*(7578), 329-335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Longnecker, D. S., Lüttges, J., & Offerhaus, G. J. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*, *25*(5), 579-586. <https://doi.org/10.1097/00000478-200105000-00003>
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *6*(8), 2969-2972.

- Hruban, R. H., Pitman, M. B., & Klimstra, D. S. (2007). *Tumors of the Pancreas* (6th edition ed.). Amer Registry of Pathology.
- Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Biankin, S. A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Klöppel, G., Longnecker, D. S., Lüttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., & Yonezawa, S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 28(8), 977-987. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000126675.59108.80>
- Hsu, H. T., Hsing, M. T., Yeh, C. M., Chen, C. J., Yang, J. S., & Yeh, K. T. (2018). Decreased cytoplasmic X-box binding protein-1 expression is associated with poor prognosis and overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*, 479, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.001>
- Hsu, S. K., Chiu, C. C., Dahms, H. U., Chou, C. K., Cheng, C. M., Chang, W. T., Cheng, K. C., Wang, H. D., & Lin, I. L. (2019). Unfolded Protein Response (UPR) in Survival, Dormancy, Immunosuppression, Metastasis, and Treatments of Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102518>
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J., & Exton, J. H. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol*, 26(8), 3071-3084. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.8.3071-3084.2006>
- Iida, K., Li, Y., McGrath, B. C., Frank, A., & Cavener, D. R. (2007). PERK eIF2 alpha kinase is required to regulate the viability of the exocrine pancreas in mice. *BMC Cell Biol*, 8, 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-38>
- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M. E., Zecchini, H. I., Lolkema, M. P., Jiang, P., Kultti, A., Thompson, C. B., Maneval, D. C., Jodrell, D. I., Frost, G. I., Shepard, H. M., Skepper, J. N., & Tuveson, D. A. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 62(1), 112-120. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302529>

- Jan, C. H., Williams, C. C., & Weissman, J. S. (2014). Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*, *346*(6210), 1257521. <https://doi.org/10.1126/science.1257521>
- Jauhainen, A., Thomsen, C., Strömbom, L., Grundevik, P., Andersson, C., Danielsson, A., Andersson, M. K., Nerman, O., Rökvist, L., Ståhlberg, A., & Åman, P. (2012). Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. *PLoS One*, *7*(4), e33208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033208>
- Jin, C., Jin, Z., Chen, N. Z., Lu, M., Liu, C. B., Hu, W. L., & Zheng, C. G. (2016). Activation of IRE1 α -XBP1 pathway induces cell proliferation and invasion in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, *470*(1), 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.119>
- Jing, G., Wang, J. J., & Zhang, S. X. (2012). ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Exp Diabetes Res*, *2012*, 589589. <https://doi.org/10.1155/2012/589589>
- Keller, J., & Layer, P. (2005). Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*, *54 Suppl 6*(Suppl 6), vi1-28. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.065946>
- Kern, S. E., Hruban, R. H., Hidalgo, M., & Yeo, C. J. (2002). An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. *Cancer Biol Ther*, *1*(6), 607-613. <https://doi.org/10.4161/cbt.307>
- Klee, M., Pallauf, K., Alcalá, S., Fleischer, A., & Pimentel-Muñoz, F. X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *The EMBO journal*, *28*(12), 1757-1768.
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*(1), 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Kong, B., Cheng, T., Wu, W., Regel, I., Raulefs, S., Friess, H., Erkan, M., Esposito, I., Kleeff, J., & Michalski, C. W. (2015). Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress

characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 6(31), 32154-32160.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5168>

Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332(6163), 462-464.
<https://doi.org/10.1038/332462a0>

Kriss, C. L., Pinilla-Ibarz, J. A., Mailloux, A. W., Powers, J. J., Tang, C. H., Kang, C. W., Zanesi, N., Epling-Burnette, P. K., Sotomayor, E. M., Croce, C. M., Del Valle, J. R., & Hu, C. C. (2012). Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: a novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood*, 120(5), 1027-1038.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-394346>

Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2), 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>

Lam, M., Marsters, S. A., Ashkenazi, A., & Walter, P. (2020). Misfolded proteins bind and activate death receptor 5 to trigger apoptosis during unresolved endoplasmic reticulum stress. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.52291>

Larsson, S. C., & Wolk, A. (2012). Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *Br J Cancer*, 106(3), 603-607.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.585>

Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., . . . Diaz, L. A., Jr. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 372(26), 2509-2520.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>

Le Reste, P.-J., Pineau, R., Samal, J., Jegou, G., Lhomond, S., Gorman, A., Samali, A., Patterson, J., Zeng, Q., Pandit, A., Aubry, M., Soriano, N., Etcheverry, A., Mosser, J., Avril, T., & Chevet, E. (2019). *Development of a novel preclinical glioblastoma mouse model and therapeutic impact of IRE1 inhibition*. <https://doi.org/10.1101/841296>

- Lee, E. S., & Lee, J. M. (2014). Imaging diagnosis of pancreatic cancer: a state-of-the-art review. *World J Gastroenterol*, *20*(24), 7864-7877. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7864>
- Lennon, A. M., Wolfgang, C. L., Canto, M. I., Klein, A. P., Herman, J. M., Goggins, M., Fishman, E. K., Kamel, I., Weiss, M. J., Diaz, L. A., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Hruban, R. H. (2014). The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? *Cancer Res*, *74*(13), 3381-3389. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-14-0734>
- Leung, P. S., & Ip, S. P. (2006). Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol*, *38*(7), 1024-1030. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.001>
- Lhomond, S., Avril, T., Dejeans, N., Voutetakis, K., Doultinos, D., McMahon, M., Pineau, R., Obacz, J., Papadodima, O., Jouan, F., Bourien, H., Logotheti, M., Jégou, G., Pallares-Lupon, N., Schmit, K., Le Reste, P. J., Etcheverry, A., Mosser, J., Barroso, K., . . . Chevet, E. (2018). Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol Med*, *10*(3). <https://doi.org/10.15252/emmm.201707929>
- Li, A., Dubey, S., Varney, M. L., Dave, B. J., & Singh, R. K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*, *170*(6), 3369-3376. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369>
- Li, H., Chen, X., Gao, Y., Wu, J., Zeng, F., & Song, F. (2015). XBP1 induces snail expression to promote epithelial- to-mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells. *Cell Signal*, *27*(1), 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.09.018>
- Li, X. X., Zhang, H. S., Xu, Y. M., Zhang, R. J., Chen, Y., Fan, L., Qin, Y. Q., Liu, Y., Li, M., & Fang, J. (2017). Knockdown of IRE1 α inhibits colonic tumorigenesis through decreasing β -catenin and IRE1 α targeting suppresses colon cancer cells. *Oncogene*, *36*(48), 6738-6746. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.284>
- Ling, S. C., Lau, E. K., Al-Shabeeb, A., Nikolic, A., Catalano, A., Iland, H., Horvath, N., Ho, P. J., Harrison, S., Fleming, S., Joshua, D. E., & Allen, J. D. (2012). Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response

regulator XBP-1. *Haematologica*, 97(1), 64-72.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2011.043331>

Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J. H., Walter, P., Reed, J. C., Glimcher, L. H., & Hetz, C. (2009). BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol Cell*, 33(6), 679-691. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.017>

Logue, S. E., McGrath, E. P., Cleary, P., Greene, S., Mnich, K., Almanza, A., Chevet, E., Dwyer, R. M., Oommen, A., Legembre, P., Godey, F., Madden, E. C., Leuzzi, B., Obacz, J., Zeng, Q., Patterson, J. B., Jäger, R., Gorman, A. M., & Samali, A. (2018). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nature Communications*, 9(1), 3267. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05763-8>

Lucenteforte, E., La Vecchia, C., Silverman, D., Petersen, G. M., Bracci, P. M., Ji, B. T., Bosetti, C., Li, D., Gallinger, S., Miller, A. B., Bueno-de-Mesquita, H. B., Talamini, R., Polesel, J., Ghadirian, P., Baghurst, P. A., Zatonski, W., Fontham, E., Bamlet, W. R., Holly, E. A., . . . Duell, E. J. (2012). Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol*, 23(2), 374-382. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr120>

Ma, X. H., Piao, S. F., Dey, S., McAfee, Q., Karakousis, G., Villanueva, J., Hart, L. S., Levi, S., Hu, J., Zhang, G., Lazova, R., Klump, V., Pawelek, J. M., Xu, X., Xu, W., Schuchter, L. M., Davies, M. A., Herlyn, M., Winkler, J., . . . Amaravadi, R. K. (2014). Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest*, 124(3), 1406-1417. <https://doi.org/10.1172/jci70454>

Matsumoto, K., Miyake, Y., Kato, H., Kawamoto, H., Imagawa, A., Toyokawa, T., Nakatsu, M., Ando, M., Hirohata, M., & Yamamoto, K. (2011). Effect of low-dose gemcitabine on unresectable pancreatic cancer in elderly patients. *Digestion*, 84(3), 230-235. <https://doi.org/10.1159/000330384>

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 J Gastroenterol*, 24(43), 4846-4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>

- Memba, R., Duggan, S. N., Ni Chonchubhair, H. M., Griffin, O. M., Bashir, Y., O'Connor, D. B., Murphy, A., McMahon, J., Volcov, Y., Ryan, B. M., & 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>
- Meyer, D. I., Krause, E., & Dobberstein, B. (1982). Secretory protein translocation across membranes-the role of the 'docking protein'. *Nature*, *297*(5868), 647-650. <https://doi.org/10.1038/297647a0>
- Mhaidat, N. M., Alzoubi, K. H., & Abushbak, A. (2015). X-box binding protein 1 (XBP-1) enhances colorectal cancer cell invasion. *J Chemother*, *27*(3), 167-173. <https://doi.org/10.1179/1973947815y.0000000006>
- Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y. T., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Fabre, C., Minami, J., Ohguchi, H., Kiziltepe, T., Ikeda, H., Kawano, Y., French, M., Blumenthal, M., Tam, V., Kertesz, N. L., Malyankar, U. M., Hokenson, M., . . . Anderson, K. C. (2012). Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*, *119*(24), 5772-5781. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366633>
- Ming, J., Ruan, S., Wang, M., Ye, D., Fan, N., Meng, Q., Tian, B., & Huang, T. (2015). A novel chemical, STF-083010, reverses tamoxifen-related drug resistance in breast cancer by inhibiting IRE1/XBP1. *Oncotarget*, *6*(38), 40692-40703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5827>
- Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M., & Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res*, *67*(22), 10631-10634. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-1705>
- Mohammed, S., Van Buren, G., 2nd, & Fisher, W. E. (2014). Pancreatic cancer: advances in treatment. *World J Gastroenterol*, *20*(28), 9354-9360. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i28.9354>
- Molina, J. R., & Adjei, A. A. (2006). The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*, *1*(1), 7-9.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-

Nomikos, T., Ptasynski, M., & Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, 25(15), 1960-1966. <https://doi.org/10.1200/jco.2006.07.9525>

Motosugi, U., Ichikawa, T., Morisaka, H., Sou, H., Muhi, A., Kimura, K., Sano, K., & Araki, T. (2011). Detection of pancreatic carcinoma and liver metastases with gadoxetic acid-enhanced MR imaging: comparison with contrast-enhanced multi-detector row CT. *Radiology*, 260(2), 446-453. <https://doi.org/10.1148/radiol.11103548>

Nawrocki, S. T., Carew, J. S., Pino, M. S., Highshaw, R. A., Dunner, K., Jr., Huang, P., Abbruzzese, J. L., & McConkey, D. J. (2005). Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res*, 65(24), 11658-11666. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-05-2370>

NIH. (2021). *NIH (National Institutes of Health) Surveillance Epidemiology and End Results Program Cancer Stat Facts: Pancreatic Cancer*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>

Niu, Z., Wang, M., Zhou, L., Yao, L., Liao, Q., & Zhao, Y. (2015). Elevated GRP78 expression is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Sci Rep*, 5, 16067. <https://doi.org/10.1038/srep16067>

Nurcahyanti, A. D., & Wink, M. (2016). L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *PeerJ*, 4, e1542. <https://doi.org/10.7717/peerj.1542>

Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M. A., Caldwell, M. E., Allard, D., Frese, K. K., Denicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S. P., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W. J., Chang, A., . . . Tuveson, D. A. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324(5933), 1457-1461. <https://doi.org/10.1126/science.1171362>

Oskolkova, O. V., Afonyushkin, T., Leitner, A., von Schlieffen, E., Gargalovic, P. S., Lusic, A. J., Binder, B. R., & Bochkov, V. N. (2008). ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized

sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood*, *112*(2), 330-339.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-112870>

Parikh, U., Marcus, C., Sarangi, R., Taghipour, M., & Subramaniam, R. M. (2015). FDG PET/CT in Pancreatic and Hepatobiliary Carcinomas: Value to Patient Management and Patient Outcomes. *PET Clin*, *10*(3), 327-343. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2015.03.001>

Parkin, D. M. (2011). 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *Br J Cancer*, *105 Suppl 2*(Suppl 2), S6-s13. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.475>

Phan, A. T., Halperin, D. M., Chan, J. A., Fogelman, D. R., Hess, K. R., Malinowski, P., Regan, E., Ng, C. S., Yao, J. C., & Kulke, M. H. (2015). Pazopanib and depot octreotide in advanced, well-differentiated neuroendocrine tumours: a multicentre, single-group, phase 2 study. *Lancet Oncol*, *16*(6), 695-703. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)70136-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(15)70136-1)

Phan, G. Q., Yeo, C. J., Hruban, R. H., Lillemoe, K. D., Pitt, H. A., & Cameron, J. L. (1998). Surgical experience with pancreatic and peripancreatic neuroendocrine tumors: review of 125 patients. *J Gastrointest Surg*, *2*(5), 472-482.

Pike, L. R., Phadwal, K., Simon, A. K., & Harris, A. L. (2012). ATF4 orchestrates a program of BH3-only protein expression in severe hypoxia. *Mol Biol Rep*, *39*(12), 10811-10822. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1975-3>

Polonsky, K. S. (2012). The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med*, *367*(14), 1332-1340. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110560>

Pommier, A., Anaparthi, N., Memos, N., Kelley, Z. L., Gouronnet, A., Yan, R., Auffray, C., Albregues, J., Egeblad, M., Iacobuzio-Donahue, C. A., Lyons, S. K., & Fearon, D. T. (2018). Unresolved endoplasmic reticulum stress engenders immune-resistant, latent pancreatic cancer metastases. *Science*, *360*(6394). <https://doi.org/10.1126/science.aao4908>

Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, *6*(2), 99-104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>

Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of

pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3), 418-429.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>

Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., & Strasser, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129(7), 1337-1349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>

Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 74(11), 2913-2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-14-0155>

Rapoport, T. A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450(7170), 663-669. <https://doi.org/10.1038/nature06384>

Reichert, M., & Rustgi, A. K. (2011). Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest*, 121(12), 4572-4578. <https://doi.org/10.1172/jci57131>

Reid, D. W., & Nicchitta, C. V. (2015). Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(4), 221-231. <https://doi.org/10.1038/nrm3958>

Ri, M., Tashiro, E., Oikawa, D., Shinjo, S., Tokuda, M., Yokouchi, Y., Narita, T., Masaki, A., Ito, A., Ding, J., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., Shiotsu, Y., Ueda, R., Iwawaki, T., Imoto, M., & Iida, S. (2012). Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood Cancer J*, 2(7), e79. <https://doi.org/10.1038/bcj.2012.26>

Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(11), 897-907. <https://doi.org/10.1038/nrm1496>

Rizzato, C., Campa, D., Pezzilli, R., Soucek, P., Greenhalf, W., Capurso, G., Talar-Wojnarowska, R., Heller, A., Jamroziak, K., Khaw, K. T., Key, T. J., Bambi, F., Landi, S., Mohelnikova-Duchonova, B., Vodickova, L., Büchler, M. W., Bugert, P., Vodicka, P., Neoptolemos, J. P., . . . Canzian, F. (2013). ABO blood groups and pancreatic cancer

risk and survival: results from the PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium. *Oncol Rep*, 29(4), 1637-1644. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2285>

Robinson, C. M., Talty, A., Logue, S. E., Mnich, K., Gorman, A. M., & Samali, A. (2021). An Emerging Role for the Unfolded Protein Response in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/cancers13020261>

Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519-529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>

Rouschop, K. M., Dubois, L. J., Keulers, T. G., van den Beucken, T., Lambin, P., Bussink, J., van der Kogel, A. J., Koritzinsky, M., & Wouters, B. G. (2013). PERK/eIF2 α signaling protects therapy resistant hypoxic cells through induction of glutathione synthesis and protection against ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(12), 4622-4627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210633110>

Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*, 48(3), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>

Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (1997). Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med*, 48, 267-281. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.48.1.267>

Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M. M., Nusse, R., Hebrok, M., & Kim, S. K. (2007). Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(15), 6247-6252. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701509104>

Sarkar, F. H., Banerjee, S., & Li, Y. (2007). Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224(3), 326-336. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.007>

Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>

- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 73(1), 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Sheng, X., Arnoldussen, Y. J., Storm, M., Tesikova, M., Nenseth, H. Z., Zhao, S., Fazli, L., Rennie, P., Risberg, B., Wæhre, H., Danielsen, H., Mills, I. G., Jin, Y., Hotamisligil, G., & Saatcioglu, F. (2015). Divergent androgen regulation of unfolded protein response pathways drives prostate cancer. *EMBO Mol Med*, 7(6), 788-801. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404509>
- Sheng, X., Nenseth, H. Z., Qu, S., Kuzu, O. F., Frahnow, T., Simon, L., Greene, S., Zeng, Q., Fazli, L., Rennie, P. S., Mills, I. G., Danielsen, H., Theis, F., Patterson, J. B., Jin, Y., & Saatcioglu, F. (2019). IRE1 α -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nature Communications*, 10(1), 323. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08152-3>
- Shin, B. K., Wang, H., Yim, A. M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J. H., Zhao, R., Puravs, E., Tra, J., Michael, C. W., Misek, D. E., & Hanash, S. M. (2003). Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem*, 278(9), 7607-7616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210455200>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Sun, H., Lin, D. C., Guo, X., Kharabi Masouleh, B., Gery, S., Cao, Q., Alkan, S., Ikezoe, T., Akiba, C., Paquette, R., Chien, W., Müller-Tidow, C., Jing, Y., Agelopoulos, K., Müschen, M., & Koeffler, H. P. (2016). Inhibition of IRE1 α -driven pro-survival pathways is a promising therapeutic application in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 7(14), 18736-18749. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7702>
- Sun, J., Russell, C. C., Scarlett, C. J., & McCluskey, A. (2020). Small molecule inhibitors in pancreatic cancer. *RSC Med Chem*, 11(2), 164-183. <https://doi.org/10.1039/c9md00447e>
- Sun, Y., Jiang, F., Pan, Y., Chen, X., Chen, J., Wang, Y., Zheng, X., & Zhang, J. (2018). XBP1 promotes tumor invasion and is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 40(2), 988-998. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6498>

- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, 7(9), 880-885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- Tabas, I., & Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 13(3), 184-190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
- Tadros, S., Shukla, S. K., King, R. J., Gunda, V., Vernucci, E., Abrego, J., Chaika, N. V., Yu, F., Lazenby, A. J., Berim, L., Grem, J., Sasson, A. R., & Singh, P. K. (2017). De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*, 77(20), 5503-5517. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-16-3062>
- Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9), 621-632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- Takahashi, H. (1984). Scanning electron microscopy of the rat exocrine pancreas. *Arch Histol Jpn*, 47(4), 387-404. <https://doi.org/10.1679/aohc.47.387>
- Talathi, S. S., Zimmerman, R., & Young, M. (2021, 2021 Jul 26). *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532912/>
- Tameire, F., Verginadis, II, Leli, N. M., Polte, C., Conn, C. S., Ojha, R., Salas Salinas, C., Chinga, F., Monroy, A. M., Fu, W., Wang, P., Kossenkov, A., Ye, J., Amaravadi, R. K., Ignatova, Z., Fuchs, S. Y., Diehl, J. A., Ruggero, D., & Koumenis, C. (2019). ATF4 couples MYC-dependent translational activity to bioenergetic demands during tumour progression. *Nat Cell Biol*, 21(7), 889-899. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0347-9>
- Tempero, M. A., Malafa, M. P., Behrman, S. W., Benson, A. B., 3rd, Casper, E. S., Chiorean, E. G., Chung, V., Cohen, S. J., Czito, B., Engebretson, A., Feng, M., Hawkins, W. G., Herman, J., Hoffman, J. P., Ko, A., Komanduri, S., Koong, A., Lowy, A. M., Ma, W. W., . . . Freedman-Cass, D. A. (2014). Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*, 12(8), 1083-1093. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0106>

- Thakur, P. C., Miller-Ocuin, J. L., Nguyen, K., Matsuda, R., Singhi, A. D., Zeh, H. J., & Bahary, N. (2018). Inhibition of endoplasmic-reticulum-stress-mediated autophagy enhances the effectiveness of chemotherapeutics on pancreatic cancer. *J Transl Med*, *16*(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1562-z>
- Tsurusaki, M., Sofue, K., & Murakami, T. (2016). Current evidence for the diagnostic value of gadoxetic acid-enhanced magnetic resonance imaging for liver metastasis. *Hepatol Res*, *46*(9), 853-861. <https://doi.org/10.1111/hepr.12646>
- Turati, F., Edefonti, V., Bosetti, C., Ferraroni, M., Malvezzi, M., Franceschi, S., Talamini, R., Montella, M., Levi, F., Dal Maso, L., Serraino, D., Polesel, J., Negri, E., Decarli, A., & La Vecchia, C. (2013). Family history of cancer and the risk of cancer: a network of case-control studies. *Ann Oncol*, *24*(10), 2651-2656. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt280>
- Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*, *338*(6108), 818-822. <https://doi.org/10.1126/science.1226191>
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, *287*(5453), 664-666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>
- van Heerde, W. L., de Groot, P. G., & Reutelingsperger, C. P. (1995). The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost*, *73*(2), 172-179.
- Vasseur, S., Tomasini, R., Tournaire, R., & Iovanna, J. L. (2010). Hypoxia induced tumor metabolic switch contributes to pancreatic cancer aggressiveness. *Cancers (Basel)*, *2*(4), 2138-2152. <https://doi.org/10.3390/cancers2042138>
- Verma, G., & Datta, M. (2012). The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death. *J Cell Physiol*, *227*(5), 1791-1795. <https://doi.org/10.1002/jcp.22903>
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic

cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184(1), 39-51.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i)

Volkman, K., Lucas, J. L., Vuga, D., Wang, X., Brumm, D., Stiles, C., Kriebel, D., Der-Sarkissian, A., Krishnan, K., Schweitzer, C., Liu, Z., Malyankar, U. M., Chiovitti, D., Canny, M., Durocher, D., Sicheri, F., & Patterson, J. B. (2011). Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease. *J Biol Chem*, 286(14), 12743-12755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199737>

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., . . . Renschler, M. F. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691-1703.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoal304369>

Voong, K. R., Davison, J., Pawlik, T. M., Uy, M. O., Hsu, C. C., Winter, J., Hruban, R. H., Laheru, D., Rudra, S., Swartz, M. J., Nathan, H., Edil, B. H., Schulick, R., Cameron, J. L., Wolfgang, C. L., & Herman, J. M. (2010). Resected pancreatic adenosquamous carcinoma: clinicopathologic review and evaluation of adjuvant chemotherapy and radiation in 38 patients. *Hum Pathol*, 41(1), 113-122.
<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.012>

Wahi, M. M., Shah, N., Schrock, C. E., Rosemurgy, A. S., 2nd, & Goldin, S. B. (2009). Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature. *Ann Epidemiol*, 19(2), 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2008.11.003>

Walter, P., & Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, 91(2 Pt 1), 551-556. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.2.551>

Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.
<https://doi.org/10.1126/science.1209038>

- Walthall, K., Cappon, G. D., Hurtt, M. E., & Zoetis, T. (2005). Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 74(2), 132-156. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20040>
- Wang-Gillam, A., Li, C. P., Bodoky, G., Dean, A., Shan, Y. S., Jameson, G., Macarulla, T., Lee, K. H., Cunningham, D., Blanc, J. F., Hubner, R. A., Chiu, C. F., Schwartzmann, G., Siveke, J. T., Braithe, F., Moyo, V., Belanger, B., Dhindsa, N., Bayever, E., . . . Chen, L. T. (2016). Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 387(10018), 545-557. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00986-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00986-1)
- Wang, L., Zhang, Y., Wang, W., Zhu, Y., Chen, Y., & Tian, B. (2017). Gemcitabine treatment induces endoplasmic reticular (ER) stress and subsequently upregulates urokinase plasminogen activator (uPA) to block mitochondrial-dependent apoptosis in Panc-1 cancer stem-like cells (CSCs). *PLoS One*, 12(8), e0184110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184110>
- Wei, D., Le, X., Zheng, L., Wang, L., Frey, J. A., Gao, A. C., Peng, Z., Huang, S., Xiong, H. Q., Abbruzzese, J. L., & Xie, K. (2003). Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene*, 22(3), 319-329. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206122>
- Weston, R. T., & Puthalakath, H. (2010). Endoplasmic reticulum stress and BCL-2 family members. *Adv Exp Med Biol*, 687, 65-77. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6706-0_4
- Whiteman, D. C., Webb, P. M., Green, A. C., Neale, R. E., Fritschi, L., Bain, C. J., Parkin, D. M., Wilson, L. F., Olsen, C. M., Nagle, C. M., Pandeya, N., Jordan, S. J., Antonsson, A., Kendall, B. J., Hughes, M. C., Ibiebele, T. I., Miura, K., Peters, S., & Carey, R. N. (2015). Cancers in Australia in 2010 attributable to modifiable factors: summary and conclusions. *Aust N Z J Public Health*, 39(5), 477-484. <https://doi.org/10.1111/1753-6405.12471>
- Wilentz, R. E., Su, G. H., Dai, J. L., Sparks, A. B., Argani, P., Sohn, T. A., Yeo, C. J., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2000). Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol*, 156(1), 37-43. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64703-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64703-7)

- Win, S., Than, T. A., Fernandez-Checa, J. C., & Kaplowitz, N. (2014). JNK interaction with Sab mediates ER stress induced inhibition of mitochondrial respiration and cell death. *Cell Death Dis*, 5(1), e989. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.522>
- Woehlbier, U., & Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPProsome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci*, 36(6), 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.001>
- Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*, 63(5), 318-348. <https://doi.org/10.3322/caac.21190>
- Wu, S., Du, R., Gao, C., Kang, J., Wen, J., & Sun, T. (2018). The role of XBP1s in the metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 500(3), 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.033>
- Wu, Y., Shan, B., Dai, J., Xia, Z., Cai, J., Chen, T., Lv, S., Feng, Y., Zheng, L., Wang, Y., Liu, J., Fang, J., Xie, D., Rui, L., Liu, J., & Liu, Y. (2018). Dual role for inositol-requiring enzyme 1 α in promoting the development of hepatocellular carcinoma during diet-induced obesity in mice. *Hepatology*, 68(2), 533-546. <https://doi.org/10.1002/hep.29871>
- Xia, T., Tong, S., Fan, K., Zhai, W., Fang, B., Wang, S. H., & Wang, J. J. (2016). XBP1 induces MMP-9 expression to promote proliferation and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res*, 6(9), 2031-2040.
- Xie, H., Tang, C. H., Song, J. H., Mancuso, A., Del Valle, J. R., Cao, J., Xiang, Y., Dang, C. V., Lan, R., Sanchez, D. J., Keith, B., Hu, C. C., & Simon, M. C. (2018). IRE1 α RNase-dependent lipid homeostasis promotes survival in Myc-transformed cancers. *J Clin Invest*, 128(4), 1300-1316. <https://doi.org/10.1172/jci95864>
- Xie, Y., Liu, C., Qin, Y., Chen, J., & Fang, J. (2019). Knockdown of IRE1 α suppresses metastatic potential of colon cancer cells through inhibiting FN1-*Src*/FAK-GTPases signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 114, 105572. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105572>
- Yadav, R. K., Chae, S. W., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress and cancer. *J Cancer Prev*, 19(2), 75-88. <https://doi.org/10.15430/jcp.2014.19.2.75>

- Yang, Y., Cheng, B. J., Jian, H., Chen, Z. W., Zhao, Y., Yu, Y. F., Li, Z. M., Liao, M. L., & Lu, S. (2017). XBP1-LOX Axis is critical in ER stress-induced growth of lung adenocarcinoma in 3D culture. *Am J Transl Res*, *9*(2), 700-707.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, *107*(7), 881-891. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00611-0)
- Yu, J., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ishikawa, N., Ogura, Y., Yamada, D., Egami, T., Fujita, H., Ohashi, S., Nagai, E., & Tanaka, M. (2006). Overexpression of c-met in the early stage of pancreatic carcinogenesis; altered expression is not sufficient for progression from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, *12*(24), 3878-3882. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i24.3878>
- Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., & Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, *17*(24), 2897-2908. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i24.2897>
- Zeng, L., Xiao, Q., Chen, M., Margariti, A., Martin, D., Ivetic, A., Xu, H., Mason, J., Wang, W., Cockerill, G., Mori, K., Li, J. Y., Chien, S., Hu, Y., & Xu, Q. (2013). Vascular endothelial cell growth-activated XBP1 splicing in endothelial cells is crucial for angiogenesis. *Circulation*, *127*(16), 1712-1722. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.001337>
- Zhang, T., Li, N., Sun, C., Jin, Y., & Sheng, X. (2020). MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? *EMBO Molecular Medicine*, *12*(5), e11845. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emmm.201911845>
- Zhao, N., Cao, J., Xu, L., Tang, Q., Dobrolecki, L. E., Lv, X., Talukdar, M., Lu, Y., Wang, X., Hu, D. Z., Shi, Q., Xiang, Y., Wang, Y., Liu, X., Bu, W., Jiang, Y., Li, M., Gong, Y., Sun, Z., . . . Chen, X. (2018). Pharmacological targeting of MYC-regulated IRE1/XBP1 pathway suppresses MYC-driven breast cancer. *J Clin Invest*, *128*(4), 1283-1299. <https://doi.org/10.1172/jci95873>

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., & Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 12(7), 982-995.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Endoplazmik Retikulum Stres Faktörü olan ‘IRE1 α ’nın, Pankreas Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans/Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Rahmi ÇETİNKAYA

04 / 01 / 2022

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÇETİNKAYA, Rahmi
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Aydın / 19.08.1995
E-mail : rahmictnky@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi / Temel Onkoloji AD.	01/2022
Lisans	Kastamonu Üniversitesi / Genetik ve Biyomühendislik	06/2017

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
Kasım 2019-halen	Monitor Medikal Araştırma ve Danışmanlık Ltd. Şti. / Novartis	Klinik Araştırma Koordinatörü
Ocak-Şubat 2017	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Lab. ve Proteomik Lab.	Stajyer
Temmuz-Ağustos 2016	TÜBİTAK UME (Ulusal Metroloji Enstitüsü), Biyoanaliz Lab.	Ar-Ge Stajyeri
Haziran-Ağustos 2015	Kastamonu Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Araştırma Laboratuvarı	Araştırmacı (Proje)

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Ergin K., **Çetinkaya R.** (2022) Regulation of MicroRNAs. In: Allmer J., Yousef M. (eds) miRNomics. Methods in Molecular Biology, vol 2257. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_1

Akgül B., Stadler, P. F., Hawkins, L. J., Hadj-Moussa, H., Storey, K. B., Ergin, K., **Çetinkaya, R.**, Paschoal, A. R., Nachtigall, P. G., Tutar, Y., Yousef, M., & Allmer, J. (2022) 44 Current Challenges in miRNomics. In: Allmer J., Yousef M. (eds) miRNomics. Methods in Molecular Biology, vol 2257. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1170-8_19

Çakır, E., **Çetinkaya, R.**, Ergin, K., Yavaşoğlu, I., & Bolaman, A. Z. (2021). Mm-033: Does metformin increase the effectiveness of lenalidomide in myeloma treatment? Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia, 21, S417-S418. [https://doi.org/10.1016/S2152-2650\(21\)01937-6](https://doi.org/10.1016/S2152-2650(21)01937-6)

Altunoglu, Y. C., Unel, N. M., Baloglu, M. C., Ulu, F., Can, T. H., & **Çetinkaya, R.** (2018). Comparative identification and evolutionary relationship of fatty acid desaturase genes in some oil crops: The sunflower model for evaluation of gene expression pattern under drought stress. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 32(4), 846-857. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1480421>

2. PROJELER

TÜBİTAK, University Students Domestic Research Projects Support Program: 2209/A Investigation of Stearoil-Acp Desaturase Gene Activity in Sunflower Plant (*Helianthus Annuus*) Under Drought Stress (2014-2016)

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Çakır, E., **Çetinkaya, R.**, Ergin, K., Yavaşoğlu, I., & Bolaman, A. Z. (2021). Does metformin increase the effectiveness of lenalidomide in myeloma treatment? Presented at The 7th World Congress on. Controversies in Multiple Myeloma (COMy), Paris.

Ünel, N. M., **Çetinkaya, R.**, Midilli, A., Çelik Altunoğlu, Y., & Baloğlu, M. C. (2017). Bioinformatics Analysis of Hsp60 Genes in Cucumber Genome. Presented at the International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), Cappadocia.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Erbil E., **Çetinkaya R.**, Ergin K., Yavaşoğlu, I., & Bolaman, A. Z. (2021). Myelom tedavisinde statinler kullanılmalı mı ? Presented at the 23. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Kıbrıs.