



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BİYOLOJİ (MOLEKÜLER BİYOLOJİ) DOKTORA PROGRAMI

**PANKREAS KANSERİNDE İMMÜN CHECKPOINTLER İLE
HEDEF SİNYAL YOLAKLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Kübra Sena BAŞ TOPCU

Danışman: Prof. Dr. Ercan ÇAÇAN

TOKAT- 2025



Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, 1002-A, Proje No: 122Z760 ve 124Z413) ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB, A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı, Proje No: 38293) tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, Kübra Sena BAŞ TOPCU, TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ercan ÇAÇAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Pankreas Kanseriinde İmmün Checkpointler ile Hedef Sinyal Yolakları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi” adlı doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

.../.../...

Kübra Sena BAŞ TOPCU

JÜRİ KABUL VE ONAY

Kübra Sena BAŞ TOPCU tarafından hazırlanan “**Pankreas Kansерinde İmmün Checkpointler ile Hedef Sinyal Yolakları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 09.10.2025 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Danışman): Prof. Dr. Ercan ÇAÇAN

.....

Üye (Başkan): Doç. Dr. Bilal ŞAHİN

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ACUNGİL

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Filiz DEMİR

.....

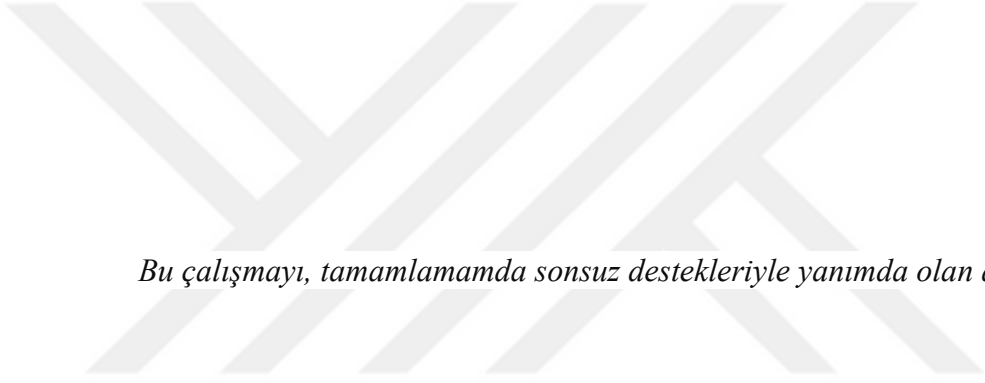
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Fatih YULAK

.....

ONAY

...../...../.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü



Bu çalışmayı, tamamlamamda sonsuz destekleriyle yanımda olan aileme ithaf ediyorum...

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde büyük katkıları olan, bilgi birikimi ve yol göstericiliğiyle her aşamada bana rehberlik eden danışmanım Prof. Dr. Ercan ÇAÇAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez izleme komitesi üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ACUNGİL ve Dr. Öğr. Üyesi Filiz DEMİR'e, başta doktora sürecinin uzun ve meşakkatli yolunda desteklerini hep hissettiğim Aysun KESKİN olmak üzere ÇAÇAN LAB'ın tüm üyelerine teşekkür ederim. Tez çalışmamda bana her zaman destek olan hocalarım Prof. Dr. Dursun KISA, Doç. Dr. Yavuz ERDEN ve Arş. Gör. Kübra TEMİZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca her türlü sıkıntıda elimi tutan, benimle tez sürecimde şehirler arası binlerce yol kateden ve tez çalışmamdaki sponsorlarımdan biri olan canım anneme, daima yanımda olup bana güç veren, bilgisiyle ilgisiyle yolumu aydınlatan sevgili babama ve destekleriyle beni motive eden değerli kardeşime teşekkür ederim. İlaveten bu yorucu süreçte sabrı, anlayışı ve sevgisi ile bana her zaman destek olan, geç saatlere kadar benimle laboratuvarında kalan, yoluma ışık tutan değerli meslektaşım ve sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Yunus Emre TOPCU'ya teşekkür ederim.

“1002-A Hızlı Destek Modülü” 122Z760 ve 124Z413 nolu projeler kapsamında tez çalışmamı destekleyen ve “2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı” kapsamında maddi olarak destek sağlayan TÜBİTAK'a ve tez çalışmamı “A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı” 38293 nolu proje kapsamında destekleyen TÜSEB'e teşekkür ederim.

ÖZET

PANKREAS KANSERİNDE İMMÜN CHECKPOINTLER İLE HEDEF SİNYAL YOLAKLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Baş Topcu, Kübra Sena

Doktora, Biyoloji Anabilim Dalı (Moleküler Biyoloji Bilim Dalı)

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ercan ÇAÇAN

Ekim 2025, xviii + 130 sayfa

Pankreas kanseri agresif klinik seyri, geç evrede tanı alması ve mevcut tedavi yaklaşımlarına sınırlı yanıt vermesi nedeniyle en ölümcül kanser türlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Tümör mikroçevresinin immün baskılayıcı yapısı ve genetik heterojenliği, bu kanser türünde immünoterapötik yaklaşımların etkinliğini ciddi şekilde kısıtlamaktadır. Bu bağlamda, immün kaçış mekanizmalarında rol oynayan immün checkpoint molekülünün moleküler düzeyde daha iyi anlaşılması ve bu hedeflerin düzenleyici sinyal yolları ile ilişkilerinin aydınlatılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu doktora tez çalışmasında, pankreas kanserinde bağışıklık sistemini baskılayan VISTA, PD-L1, CD155, HVEM ve IDO1 gibi immün checkpoint molekülünün gen ve protein düzeyinde düzenlenmesine odaklanılmış; bu molekülün ekspresyon düzeylerini etkileyen potansiyel sinyal yolları çeşitli küçük molekül inhibitörleri aracılığıyla deneysel olarak araştırılmıştır. Vorinostat, PF-562271, navoximod, importazole ve sepantronyum bromür gibi özgün kimyasal ajanların tekli ve kombinasyon halinde pankreas kanseri hücre hatlarında (Mia PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1, PANC-1, CAPAN-1) uygulanması sonucunda; bu bileşiklerin antiproliferatif etkileri, hücre migrasyonu ve koloni oluşumu üzerindeki rolleri, apoptoz mekanizmaları ve immün checkpoint ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkileri kapsamlı olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda özellikle VISTA, PD-L1 ve CD155 molekülünün ekspresyon düzeylerinin bazı bileşik kombinasyonlarıyla anlamlı biçimde baskılandığı; bunun yanında TRIM15, Twist1, AGR2, LEF1 ve BIRC5 gibi tümör progresyonunda rol oynayan genlerin de modüle edildiği gösterilmiştir. Ayrıca BIRC5 inhibitörü sepantronyum bromürün tek başına ve navoximod ile kombinasyon halinde uygulanmasının sağlıklı hücre proliferasyonu ve migrasyonunu etkilemeden yalnızca tümör hücrelerinde immün checkpoint baskılaması sağladığı da tespit edilmiştir. Bu bulgular, tedaviye dirençli tümör mikroçevresinin yeniden programlanmasına katkı sunabilecek immünoterapötik stratejiler açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır. Bu tez, pankreas kanseri biyolojisini immün regülasyon, epigenetik kontrol, hücre döngüsü ve tümör mikroçevresi dahil olmak üzere çok yönlü olarak değerlendirmiştir. Elde edilen veriler, immün checkpoint molekülünün farklı sinyal yollarıyla nasıl etkileşim kurduğunu ortaya koymakta; bu molekülün eş zamanlı hedeflenmesinin, immün kaçış mekanizmalarının aşılması ve immünoterapiye duyarlılığın artırılması açısından güçlü bir strateji sunabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, bu tez çalışması; pankreas kanserinde immün kaçış mekanizmalarını hedefleyen küçük moleküller aracılığıyla, immün checkpoint molekülünün regülasyonuna dair önemli bulgular ortaya koymuş; böylece immünoterapiye dirençli tümör mikroçevresinin yeniden programlanmasına yönelik yenilikçi ve hedefe yönelik kombinasyon tedavileri için yeni nesil tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutmuştur.

Anahtar Kelimeler: Pankreas Kanseri, İmmünoterapi, Hedefe Yönelik Tedavi, İmmün Checkpoint



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN IMMUNE CHECKPOINTS AND TARGET SIGNALING PATHWAYS IN PANCREATIC CANCER

Baş Topcu, Kübra Sena

PhD Dissertation, Department of Biology (Division of Molecular Biology)

Thesis Advisor: Prof. Dr. Ercan Çağan

October 2025, xviii + 130 pages

Pancreatic cancer is considered one of the most lethal cancers due to its aggressive clinical course, late-stage diagnosis, and limited response to current treatment approaches. The immunosuppressive nature of the tumor microenvironment and genetic heterogeneity severely limit the effectiveness of immunotherapeutic approaches in this cancer type. In this context, a better understanding of immune checkpoint molecules involved in immune escape mechanisms at the molecular level and the elucidation of the relationship between these targets and regulatory signaling pathways are critical for developing new treatment strategies. This doctoral dissertation focused on the gene and protein regulation of immune checkpoint molecules such as VISTA, PD-L1, CD155, HVEM, and IDO1, which suppress the immune system in pancreatic cancer. The potential signaling pathways affecting the expression levels of these molecules were experimentally investigated using various small molecule inhibitors. The use of unique chemical agents such as vorinostat, PF-562271, navoximod, importazole, and sepantronium bromide, both individually and in combination, in pancreatic cancer cell lines (Mia PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1, PANC-1, and CAPAN-1) has led to comprehensive investigations of their antiproliferative effects, roles in cell migration and colony formation, apoptosis mechanisms, and regulatory effects on immune checkpoint expression. The study demonstrated that the expression levels of VISTA, PD-L1, and CD155 molecules were significantly suppressed by certain compound combinations, while genes involved in tumor progression, such as TRIM15, Twist1, AGR2, LEF1, and BIRC5, were also modulated. Furthermore, it was determined that the administration of the BIRC5 inhibitor sepantronium bromide, both alone and in combination with navoximod, suppressed immune checkpoints only in tumor cells without affecting healthy cell proliferation and migration. These findings hold significant potential for immunotherapeutic strategies that could contribute to the reprogramming of the treatment-resistant tumor microenvironment. This thesis evaluated pancreatic cancer biology from multiple perspectives, including immune regulation, epigenetic control, the cell cycle, and the tumor microenvironment. The data revealed how immune checkpoint molecules interact with diverse signaling pathways, demonstrating that simultaneous targeting of these molecules could offer a powerful strategy for overcoming immune escape mechanisms and enhancing sensitivity to immunotherapy. In conclusion, this thesis study has revealed important findings regarding the regulation of immune checkpoint molecules through small molecules targeting immune escape mechanisms in pancreatic cancer, thus paving the way for the development of next-generation therapeutic strategies for innovative and targeted combination therapies aimed at reprogramming the immunotherapy-resistant tumor microenvironment.

Keywords: Pancreatic Cancer, Immunotherapy, Targeted Therapy, Immune Checkpoint

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME.....	i
JÜRİ KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	4
2.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri.....	4
2.2. Pankreas Kanserinin Risk Faktörleri.....	6
2.3. Pankreas Kanseri Tanı ve Tedavisi	8
2.4. İmmün Checkpointler ve Kanser Tedavisindeki Yeri.....	11
2.4.1. VISTA	12
2.4.2. PD-1 / PD-L1	15
2.4.3. IDO1	17
2.4.4. TIGIT / CD155	20
2.4.5. BTLA / HVEM.....	22
2.5. Epitel Mezenkimal Transisyon (EMT) ve Kansер İlerlemesi ile Bağlantıları	25
2.6. Kansер İlerlemesinde Önemli Sinyal Peptitleri ve Yolakları.....	28
2.7. Epigenetik ve Kansер	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Biyoinformatik Analizler	34

3.1.1. Normal ve tümörlü pankreas dokularındaki hedef gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması	34
3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.2.1. Hücre hatları ve çoğaltılması.....	36
3.2.2. siRNA'ların hücre hatlarına transfeksiyonu.....	37
3.2.3. Kimyasal bileşiklerin hücre hatlarına uygulanması	38
3.2.4. Hücre canlılık analizi (MTT analizi).....	39
3.2.5. Hücre migrasyon analizi (Wound healing analizi).....	42
3.2.6. Koloni oluşum analizi	43
3.2.7. Hücrelerden total RNA izolasyonu	43
3.2.8. Real time PCR'da kullanılan primer dizileri ve reaksiyonun hazırlanması ..	45
3.2.9. Hücrelerden protein izolasyonu.....	49
3.2.10. Örneklerdeki protein konsantrasyonlarının belirlenmesi	51
3.2.11. Proteinlerin elektroforezde yürütülmesi, proteinlerin membrana transferi, membranın bloklanması, proteinlerin membran üzerinde antikorlar ile gösterimi ve protein bantlarının görüntülenmesi.....	51
3.3. İstatistiksel Analiz.....	53
4. SONUÇLAR.....	54
4.1. Pankreas Kanseri ve Sağlıklı Dokularda İmmün Checkpoint Moleküllerin ve Çeşitli Sinyal Yolaklarından Sorumlu Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyesi	54
4.2. Vorinostat Bileşiği ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Pankreas Kanseri Hücre Canlılığına Etkisi	56
4.3. Vorinostat Bileşiği ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Pankreas Kanseri Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkisi.....	58
4.4. Vorinostat Bileşiği ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun EMT ile İlişkili Genler ve İmmün Checkpoint VISTA Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	60
4.5. Vorinostat Bileşiği ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun İmmün Checkpoint VISTA Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi.....	62

4.6. Sepantronyum Bromür ve Navoximod Bileşiklerinin Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Pankreas Kanseri ve Sağlıklı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	64
4.7. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının pankreas kanseri ve sağlıklı hücre migrasyonu üzerindeki etkisi	65
4.8. Sepantronyum Bromür ve Navoximod Bileşiklerinin Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Hedef Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi	69
4.9. Sepantronyum Bromür ve Navoximod Bileşiklerinin Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının İmmün Checkpoint CD155, VISTA ve PD-L1 Protein Seviyesi Üzerindeki Etkisi	74
4.10. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanseri Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi....	75
4.11. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Koloni Oluşumu Üzerindeki Etkisi.....	76
4.12. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkisi.....	77
4.13. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında PF-562271 Bileşiğinin Hedef Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi.....	81
4.14. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanseri Üzerindeki HVEM Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi.....	84
4.15. İmpozazole'nin Pankreas Kanseri Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	85
4.16. İmpozazole'nin Hedef Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi	85
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ.....	101
7. NOT	103
8. KAYNAKÇA	104
9. ÖZGEÇMİŞ	130

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3. 1. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan qRT-PCR’da kullanılan primerlerin dizileri	45
Tablo 3. 2. qRT-PCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı	48
Tablo 3. 3. qRT-PCR protokolü	48
Tablo 3. 4. Ayırma jeli (%12) ve yükleme jeli (%5) için hazırlık bileşenleri ve hacimleri	52



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Pankreas anatomisi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir.)	4
Şekil 2. 2.2022 yılında tüm yaş ve her iki cinsiyet dahil olmak üzere pankreas kanserinin her 100 000 kişi başına düşen dünya genelindeki ortalama ölüm oranı (https://gco.iarc.fr/ Erişim tarihi: 03.05.2024).....	5
Şekil 2. 3. Pankreas kanserinin risk faktörleri (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Luo ve ark., 2023a)	8
Şekil 2. 4. VISTA ve PSGL-1 etkileşimi. Bu ligand-reseptör bağlantısı T hücre aktivitesini baskılayarak kanser hücrelerinin bağışıklıktan kaçışını kolaylaştırmaktadır (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Martin ve ark., 2023).....	14
Şekil 2. 5. PD1 ve PD-L1'in bağlanması T hücre yanıtını baskılamaktadır (Zhang ve ark., 2020).....	17
Şekil 2. 6. PD-L1/PD-1 ve CTLA-4/B7-1/B7-2 bağlantısı, T hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir ve Treg hücre proliferasyonunu teşvik ederken PD-L1, PD-L2 ve IDO1 ekspresyon seviyesini de arttırmaktadır. IDO sinyalizasyonu, T efektör hücrelerinin enerjisi ile immün baskılayıcı bir fonksiyon göstermektedir (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; https://www.amsbio.com/ido-immune-pathway/ Erişim tarihi: 11.07.2024; Ludovini ve ark., 2021)	20
Şekil 2. 7. T ve NK hücrelerinde eksprese olan TIGIT, kanser hücresi veya APC'lerde eksprese edilen CD155 ligandı ile yüksek afinitede bağlanarak inhibitör sinyal sağlamaktadır (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Jin ve ark., 2022).....	22
Şekil 2. 8. HVEM/BTLA sinyalizasyonu. HVEM ile BTLA'nın etkileşimi T hücrelerinde SHP-1 ve SHP-2 alımına neden olarak TCR sinyalini down regüle eden inhibitör sinyalleri iletmektedir. APC ve kanser hücrelerinde ise HVEM aracılı NF-κB aktivasyonu indüklenerek proinflamatuvar ve prosurvival sinyaller gerçekleşir (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Ning ve ark., 2021).....	24
Şekil 2. 9. EMT'de kanonik ve kanonik olmayan TGF-B sinyal yolağı (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir).....	27
Şekil 3. 1. Vorinostat, Twist-siRNA ve Non target-siRNA (NT-siRNA) bileşiklerinin pankreas kanseri hücre hatlarına ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanması ile yürütülen çalışmaların şematik gösterimi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir). Yürütülen çalışmalar TÜBİTAK 1002-A kapsamında desteklenmiştir	35

Şekil 3. 2. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin pankreas kanseri ve sağlıklı epitel hücre hatlarına ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanması ile yürütülen çalışmaların şematik gösterimi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir). Yürütülen çalışmalar TÜSEB A4 kapsamında desteklenmiştir	35
Şekil 3. 3. PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücre hatlarına uygulanması ile yürütülen çalışmaların şematik gösterimi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir). Yürütülen çalışmalar TÜBİTAK 1002-A kapsamında desteklenmiştir	36
Şekil 4. 1. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri normal pankreas dokularına (gri, 171 numune) kıyasla pankreas kanseri dokularında (kırmızı, 179 numune) artmıştır. $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$	55
Şekil 4. 2. CAPAN-1, Mia PaCa-2, AsPC-1 pankreas kanseri hücre hatlarına vorinostat ve Twist-siRNA'nın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi	57
Şekil 4. 3. Vorinostat ve Twist-siRNA'nın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının pankreas kanseri hücre migrasyonu üzerindeki etkisi. Vorinostat bileşiğinin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki IC50 değeri hesaplandıktan sonra, Twist-siRNA ile kombinasyon tedavisi sırasıyla Mia PaCa-2 (A,D), AsPC-1 (B,E) ve CAPAN-1 (C,F) hücrelerine uygulandı ve hücre migrasyon analizine tabi tutuldu. Hücre göçü analizindeki hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)	59
Şekil 4. 4. Pankreas kanseri hücre hatlarına ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanan vorinostat ve Twist-siRNA'nın hedef genlerin mRNA seviyelerindeki gen ekspresyon kat değişimine etkisi	61
Şekil 4. 5. Twist-siRNA ve vorinostat bileşiğinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulamasından sonra AsPC-1, CAPAN-1, Mia PaCa-2 hücrelerindeki western blot görüntüleri ve VISTA protein ekspresyon seviyeleri	63
Şekil 4. 6. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin 48 saat boyunca uygulanmasının BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi ..	64
Şekil 4. 7. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin kombinasyon halinde 48 saat boyunca uygulanmasının BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi	65

Şekil 4. 8. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde BEAS-2B akciğer epitel sağlıklı hücre hattına uygulanarak gerçekleştirilen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme).....	66
Şekil 4. 9. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde Mia PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattına uygulanarak gerçekleştirilen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme).....	67
Şekil 4. 10. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattına uygulanarak gerçekleştirilen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme).....	68
Şekil 4. 11. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde muamelesinin BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarındaki hücre göçü üzerindeki etkisi. Hücre göç oranları kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde (%) yara iyileşmesi üzerinden değerlendirilmiştir.....	68
Şekil 4. 12. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde Mia PaCa-2, AsPC-1 ve BEAS-2B hücre hattına uygulanmasından sonra hedef genlerin rölatif ekspresyon seviyesi.....	73
Şekil 4. 13. Pankreas kanseri ve sağlıklı hücre hatlarına sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının immün checkpoint CD155, VISTA ve PD-L1 protein seviyesi üzerindeki etkisi	75
Şekil 4. 14. PF-562271 bileşiğinin 24 saat (A-C) ve 48 saat (D-F) boyunca muamelesinin BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	76
Şekil 4. 15. BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hattında yapılan koloni oluşum analizinin sonuçları. Kristal violet ile boyanmış kolonilerin görüntülenmesi (A) ve koloni oluşturma yetenekleri yüzdeleri (B)	77
Şekil 4. 16. PANC-1 hücre hattına PF-562271'in 1 ve 5 µM uygulanması ile yürütülen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme).....	78
Şekil 4. 17. BxPC-3 hücre hattına PF-562271'in 1 ve 5 µM uygulanması ile yürütülen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme).....	79
Şekil 4. 18. AsPC-1 hücre hattına PF-562271'in 1 ve 5 µM uygulanması ile yürütülen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme).....	80
Şekil 4. 19. PF-562271 bileşiğinin 1 ve 5 µM muamelesinin PANC-1, BxPC-3 ve AsPC-1 hücre hatlarındaki hücre göçü üzerindeki etkisi	80

Şekil 4. 20. PANC-1 hücre hattına 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda 48 saat boyunca uygulanan PF-562271 bileşiğinin p21, siklin D1, survivin, HIF 1A, LEF1, AGR2 ve HVEM genlerine ait gen ekspresyon analizi	82
Şekil 4. 21. AsPC-1 hücre hattına 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda 48 saat boyunca uygulanan PF-562271 bileşiğinin p21, siklin D1, survivin, HIF 1A, LEF1, AGR2 ve HVEM genlerine ait gen ekspresyon analizi	83
Şekil 4. 22. BxPC-3 hücre hattına 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda 48 saat boyunca uygulanan PF-562271 bileşiğinin p21, siklin D1, survivin, HIF 1A, LEF1, AGR2 ve HVEM genlerine ait gen ekspresyon analizi	84
Şekil 4. 23. PF-562271 bileşiğinin 1 ve 5 µM dozlarında pankreas kanseri hücre hatları BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1'e uygulanması sonrasında HVEM protein ekspresyon seviyesi	85
Şekil 4. 24. A. İmpozazole uygulamasının pankreas kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Pankreas kanseri hücrelerine 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda impozazole uygulanmasının B. TRIM15, VISTA, BCL-2, PD-L1 ve BAX genlerine ait gen ekspresyon analizi	86

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Kısaltma	Açıklama
AGR2	Ön Gradyan 2
APC	Antijen Sunan Hücre
APS	Amonyum Persülfat
AML	Akut Miyeloid Lösemi
BRCA1	Meme Kanseri 1
BRCA2	Meme Kanseri 2
BSA	Bovin Serum Albümin
CAR-T	Kimerik Antijen Reseptörü T hücresi
CCL	Kemokin (C-C) Motif Ligandı
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
DAMP	Hasarla İlişkili Moleküler Pattern
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EMT	Epitel Mezenkimal Transisyon
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FBS	Fetal Bovin Serum
GEPIA2	Gen Ekspresyon Profilleme Etkileşimli Analizi 2
GLUT1	Glukoz Taşıyıcı 1
GTE _x	Genotip-Doku Ekspresyonu
HAT	Histon Asetil Transferaz
HbA1c	Hemoglobin A1c
HCl	Hidroklorik Asit
HDAC	Histon Deasetilaz
HK2	Hekzokinaz
HSP	Isı Şok Proteini
HVEM	Herpesvirüs Giriş Aracısı
IDO1	İndolamin 2,3-Dioksijenaz 1
IDO2	İndolamin 2,3-Dioksijenaz 2
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ITAM	İmmünoresptör Tirozin Bazlı Aktivasyon Motifi

ITIM	İmmünreseptör Tirozin Bazlı İnhibitör Motifi
JAK	Janus Kinaz
KRAS	Kirsten Rat Sarkoma Virüs
LAG3	Lenfosit Aktivasyon Geni 3
LDHA	Laktat Dehidrogenaz A
LEF1	Lenfoid Arttırıcı Bağlayıcı Faktör 1
LEF1	Lenfosit Güçlendirici Bağlama Faktörü-1
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MDSC	Miyoloid Türevli Kök Hücreler
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NK	Doğal Öldürücü
NLRP3	Nod Benzeri Reseptör Proteini 3
NSCLC	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
PAAD	Pankreas Adenokarsinomu
PALB2	BRCA2'nin Ortağı ve Lokalizatörü
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PD-1	Programlanmış Hücre Ölüm Proteini 1
PD-L1	Programlanmış Ölüm Ligandı 1
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
PK	Pirüvat Kinaz
PKD2	Protein Kinaz D İzofom 2
PSGL-1	P-Selektin Glikoprotein Ligand-1
qRT-PCR	Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAHA	Suberoil-Anilid Hidroksamik Asit
SMAD	SMA ve MAD İlişkili 4
STAT	Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü
TCGA	Kanser Genom Atlası
TCR	T Hücre Reseptörü
TDO	Triptofan 2,3-Dioksijenaz
TEMED	Tetrametil Etilendiamin
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TIGIT	İmmünoglobulin ve ITIM Domainli T Hücre İmmün Reseptörü

TIM3	T hücresi İmmünoglobulin ve Müsin Domain İçeren Molekül 3
TNFRSF	Tümör Nekroz Faktörü Reseptör Süper Ailesi
TP53	Tümör Proteini 53
TRAF	TNF Reseptörü ile İlişkili Faktör
TRIM	Üç Parçalı Motif Protein Ailesi
VISTA	T Hücresi Aktivasyonunun V-domain İmmünoglobulin Baskılayıcısı
VSIG-3	V-set ve immünoglobulin domaini içeren 3



1. GİRİŞ

Kanser, hücrel kontrollerden kaçan ve kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olan bir hastalıktır ve dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedeni olarak bilinmektedir (Brown ve ark., 2023; Sareen ve ark., 2025; Elmadani ve ark., 2025). GLOBOCAN 2022 verilerine göre pankreas kanseri 467.409 ölüm ile dünya genelinde en ölümcül altıncı kanser türü olarak rapor edilmiştir (<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/>, Erişim tarihi: 06.05.2025). Agresif biyolojik davranışı ve erken teşhis güçlüğü nedeniyle pankreas kanseri, en ölümcül malignitelerden biri olup tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır (Buchholz ve ark., 2024). Pankreas kanseri erken evrelerde herhangi bir semptom göstermediğinden dolayı, hastalık tespit edildiğinde hastaların %80-85'i rezekte edilemez hale gelmektedir (De Dosso ve ark., 2021). Kemoterapi, metastatik pankreas kanseri için standart bir tedavi olmasına rağmen genetik heterojenliğe sahip bir tümör türü olarak bilindiğinden dolayı pankreas kanseri hastaları için tek bir tedavi yönteminin yeterli düzeyde fayda sağlamayacağı düşünülmektedir (Robatel ve Schenk, 2022).

Hedefli tedavi onkogenlerin anormal aktivasyonunu engellemek, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu önlemek ve çeşitli sinyal yollarının bloke edilmesine dayanan bir tedavi stratejisidir. İmmünoterapi ise pankreas kanseri tedavisi için umut vaadedici gibi görünse de pankreas kanserinin immün baskılayıcı tümör mikroçevresinden dolayı immünoterapi için yeni yaklaşımlar geliştirilmelidir (Wang ve ark., 2024a). Kombine ilaç tedavisi, kanser tedavisinde meydana gelen birden fazla direnç mekanizmalarını baskılayarak kanser hücrelerini hedef aldığından dolayı kanser tedavisinde daha etkili ve uzun süreli yanıtlar elde edilmesine olanak sağlayabilmektedir (Sareen ve ark., 2025). Fizyolojik koşullarda T hücrelerinin aktivasyonunu baskılayarak bağışıklık homeostazını ve doku hasarını korumak, otoimmün reaksiyonu baskılamak için immün checkpoint adı verilen inhibitör moleküllerin ekspresyon seviyeleri artmaktadır. Ancak kanser hücreleri bu immün checkpoint yollarını aktif hale getirerek bağışıklıktan kaçmaktadırlar. Bağışıklık aracılığıyla kanserin tanınmasını ve ortadan kaldırılmasını hedefleyen immün checkpoint inhibitör terapisi, kanser tedavisinde kalıcı bir antitümör yanıt oluşturma potansiyeli olarak umut vadetmektedir (Mucciolo ve ark.,

2020). Fakat immünoterapiye en dirençli kanser türlerinden biri olarak bilinen pankreas kanseri tedavisinde tek başına immün checkpoint blokasyonu tedavisi etkili olmadığından dolayı immünoterapiye direnç mekanizmalarını hedefleyen çoklu tedavilerin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Zhou ve ark., 2022). Bundan dolayı tümör progresyonundan sorumlu sinyal yollarının ve tümör mikroçevreyi hedefleyen farklı tedavi stratejilerinin kombinasyon halinde uygulanması pankreas kanserinde tedavi etkinliğini arttırmak açısından önemli bir yaklaşım olabilir.

Yeni bir immün checkpoint olan T hücre aktivasyonunun V-domain Ig baskılayıcısı (VISTA), prostat kanseri, kolorektal kanser ve küçük olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde T hücresi aktivitesini baskılayarak tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçmasına aracılık etmektedir. VISTA'nın farklı tümörlerdeki ekspresyon düzeyi ve bağışıklık sistemi üzerindeki düzenleyici rolü karmaşık olup halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Huang ve ark., 2020; Gao ve ark., 2024). Benzer şekilde, immün checkpoint molekülü olan CD155, doğal öldürücü hücreler (NK) ve T hücreleriyle etkileşerek immün yanıtı baskılamakta; aynı zamanda tümör hücresinin proliferasyonunu ve migrasyon yeteneğini destekleyen, tümör progresyonu sırasında ekspresyonu artan bir adezyon molekülü olarak görev yapmaktadır (Molfetta ve ark., 2020; Briukhovetska ve ark., 2023). Herpes virüsü giriş aracı (HVEM) molekülü birçok tümörde yüksek seviyede eksprese edilmekte olup tümör gelişimi, lenf nodu metastazı, immünsüpresif mikroçevrenin oluşumu ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Sordo-Bahamonde ve ark., 2023). Programlanmış hücre ölümü 1 ligandı (PD-L1) PD-1 ile etkileşim kurarak T hücresi sinyalini inhibe eden bir immün checkpoint molekülüdür ve bağışıklık homeostazını sağlamaktan sorumlu inhibitör sinyaller sağlamaktadır. İlaveten akciğer kanseri, melanom, gliom ve meme kanseri gibi çeşitli kanser hücreleri tarafından eksprese edilerek kanser hücrelerinin bağışıklıktan kaçmasına yardımcı olmaktadır (Lin ve ark., 2024). İndoleamin 2,3-dioksijenaz 1 (IDO1) enzimi ise triptofan metabolizmasını değiştirerek T hücre yanıtını baskılayan immünsüpresif bir tümör mikroçevresi oluşturan bir immün checkpoint molekülü olarak bilinmektedir. Ayrıca, IDO1'in diğer immün checkpoint moleküllerine yönelik uygulanan inhibitörlere karşı direnç gelişimini teşvik ettiği de gösterilmiştir (Cheong ve Sun, 2018). Pankreas kanserinde VISTA, CD155, HVEM, PD-L1 ve IDO1'in ekspresyon düzeyleri ve bu moleküllerin hangi sinyal yolları aracılığıyla düzenlendiği hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, söz

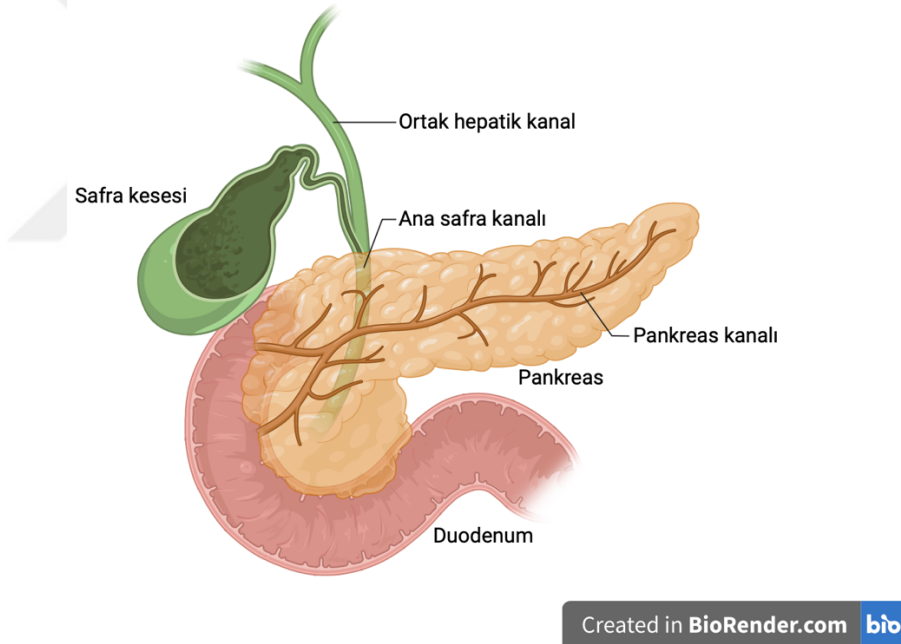
konusu moleküllerin biyolojik rollerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılması, bu hedeflere yönelik geliştirilecek tedavi stratejilerinin etkinliğinin artırılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, immün checkpoint moleküllerinin pankreas kanserindeki ekspresyon profillerinin ve aralarındaki potansiyel etkileşimlerin ortaya konması, hedeflenebilir yeni immünoterapötik adayların belirlenmesine olanak tanıyarak pankreas kanserine yönelik geliştirilecek tedavi stratejilerine katkı sağlayacaktır.

Bu doktora tez çalışmasında, pankreas kanseri hücre hatlarında (Mia PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1, CAPAN-1, PANC-1) farklı immün checkpoint moleküllerin (VISTA, IDO1, PD-L1, CD155 ve HVEM) çeşitli kimyasal bileşikler ile hedeflenmesinin, pankreas kanseri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki, apoptozun indüklenmesi üzerindeki rolü ve hücre davranışlarındaki değişimler (proliferasyon, migrasyon, koloni oluşumu) kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca VISTA, IDO1, PD-L1, CD155 ve HVEM gibi immün checkpoint moleküllerin tümör progresyonunda kritik rol oynayan sinyal yolları arasındaki potansiyel etkileşimlerin ortaya konması ve bu etkileşimlerin terapötik hedefleme açısından taşıdığı önemin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu tez kapsamında elde edilen verilerin, bağışıklık sisteminden kaçışı kolaylaştıran moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına ve bu doğrultuda pankreas kanserine özgü yeni immünoterapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Pankreas ve Pankreas Kanseri

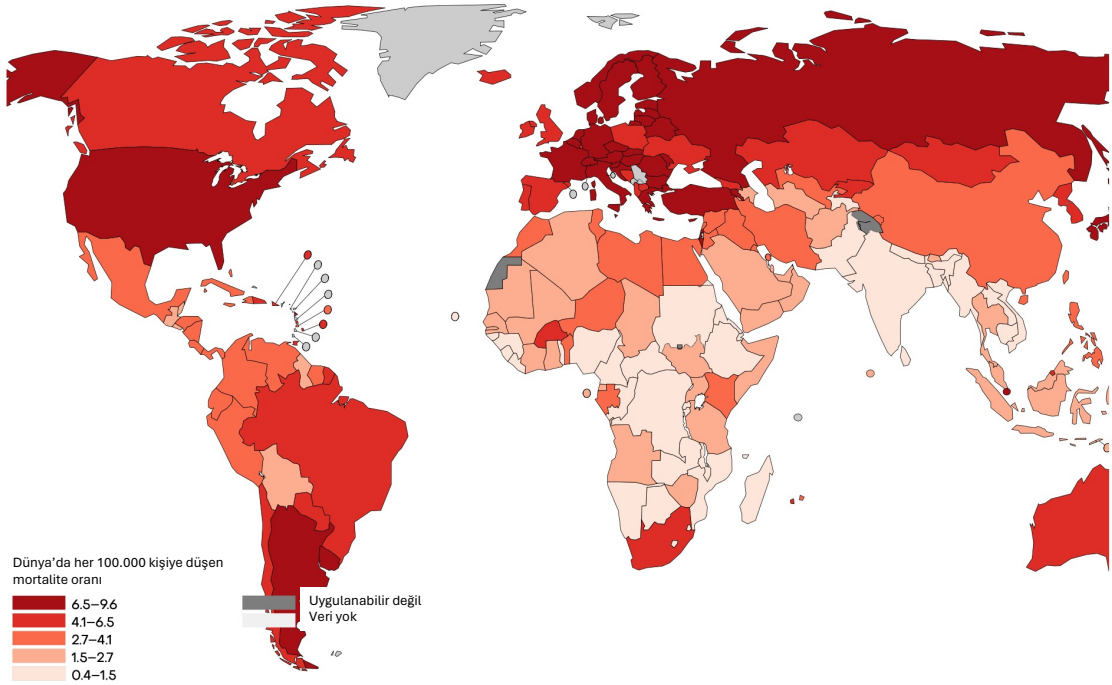
Pankreas, üst karın bölgesinde hem ekzokrin hem de endokrin bileşeni olan uzun bir retroperitoneal bezdir (A-Kader ve Ghishan, 2012). Ekzokrin ve endokrin kısımlardan oluşan pankreasın ekzokrin kısmı çoğunlukla asinar hücrelerden oluşmaktadır ve yağları, proteinleri, karbonhidratları sindirmeye yardımcı olan proteaz, lipaz ve amilaz gibi sindirim enzimleri içeren pankreas suyu üretmektedir. Pankreasın endokrin kısmı ise vücudun enerji için glikoz kullanmasına yardımcı olan ve kandaki glikoz seviyelerini düzenleyen glukagon ve insülin üretmektedir (Şekil 2.1) (Yuan ve ark., 2021).



Şekil 2. 1. Pankreas anatomisi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir.)

Pankreas kanseri dünya çapında kanser kaynaklı ölümlerin başlıca nedenlerinden olarak bilinmektedir ve kanser tedavisindeki gelişmelere rağmen 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %11'dir (Jian ve ark., 2023; Yu ve ark., 2024). GLOBOCAN 2022 verilerine göre tüm kanser türleri arasında pankreas kanseri dünya çapında 467 409 vaka ile en ölümcül 6. kanser türü olarak belirlenmiştir (<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi: 03.05.2024) (Şekil 2.2).

Pankreas kanserinin tümör mikroçevresinde yer alan çok sayıda fibroblast popülasyonu, yoğun hücre dışı matriks ve baskılayıcı bağışıklık hücre popülasyonları pankreas kanserinin agresif seyrine, tedaviye direnç ve hastalığın heterojenliğine neden olmaktadır (Halbrook ve ark., 2023). Erken teşhis ve onkolojik tedavilerdeki ilerlemelerin sağkalımı uzatmada başarılı olduğu diğer birçok kanserin aksine pankreas kanserinde erken evrelerde hastalık herhangi bir semptom göstermemektedir. Hastalık ilerlediğinde kilo kaybı, karın ağrısı ve yorgunluk gibi spesifik olmayan semptomlar görülebilmektedir. Ancak bu durumda hastalık ilerlemiş ve hastaların %80-85'i rezekte edilemez halde gelmiştir (De Dosso ve ark., 2021; Luo ve ark., 2023a; Mok ve ark., 2024).



Şekil 2. 2022 yılında tüm yaş ve her iki cinsiyet dahil olmak üzere pankreas kanserinin her 100 000 kişi başına düşen dünya genelindeki ortalama ölüm oranı (<https://gco.iarc.fr/> Erişim tarihi: 03.05.2024)

Onkogenlerde ve tümör süpressör genlerde meydana gelen somatik mutasyonların birikimi kansere neden olmaktadır. Pankreas duktal adenokarsinomunda en sık mutasyona uğramış onkogen Kirsten rat sarkoma virüs (KRAS) olarak bilinmektedir (Kamisawa ve ark., 2016; Strickler ve ark., 2023). İlaveten pankreas kanserinde siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A), tümör proteini 53 (TP53) ve SMA, MAD ilişkili 4 (SMAD4) ve ANXA2 genleri de yüksek seviyede eksprese olmaktadır (Duan ve ark.,

2023; Menadi ve ark., 2024). KRAS mutasyonları ile pankreas kanserinin tümör mikroçevresi arasında mekanik bir bağlantı vardır. Bu sayede mutasyona bağlı olarak miyoloid türevli kök hücreler (MDSC) toplanmaktadır ve antitümör T hücre aktivitesini sınırlandırmaktadır (Ho ve ark., 2020). Kapsamlı çalışmalara rağmen uzun yıllardır pankreas kanseri tanısı alan hastaların prognozunda bir iyileşme olmamasının temel nedenleri erken tanı için güvenilir tahmin göstergelerinin olmaması ve terapötik seçeneklerin sınırlı olmasıdır (Ku ve ark., 2024).

2.2. Pankreas Kanserinin Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin altında yatan nedenler büyük ölçüde bilinmemesine ile birlikte yaklaşık %10'unun genetik faktörlere bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Ancak çoğu ailesel pankreas kanseri hastalarının genetik temeli bilinmemektedir (Kamisawa ve ark., 2016; Védie ve ark., 2024). Pankreas kanserinde özellikle sigara kullanımı, alkol kullanımı, diyabet, obezite ve kronik pankreatit önemli risk faktörleri olarak bilinmektedir (Sakaue ve ark., 2024) (Şekil 2.3).

Sigara içmek, pankreas kanseri için en iyi belirlenmiş risk faktörüdür ve sigarayı bıraktıktan sonra en az 10 yıl devam eden %75 oranında bir riske neden olmaktadır (Kamisawa ve ark., 2016; Klein, 2021). Yapılan çalışmalarda sigara içmeyenlerde sigara içenlere kıyasla daha uzun sağkalım gözlemlenmiştir. Bundan dolayı pankreas kanseri teşhisi konulduktan sonra sigara prognostik bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır (Neumann ve ark., 2023).

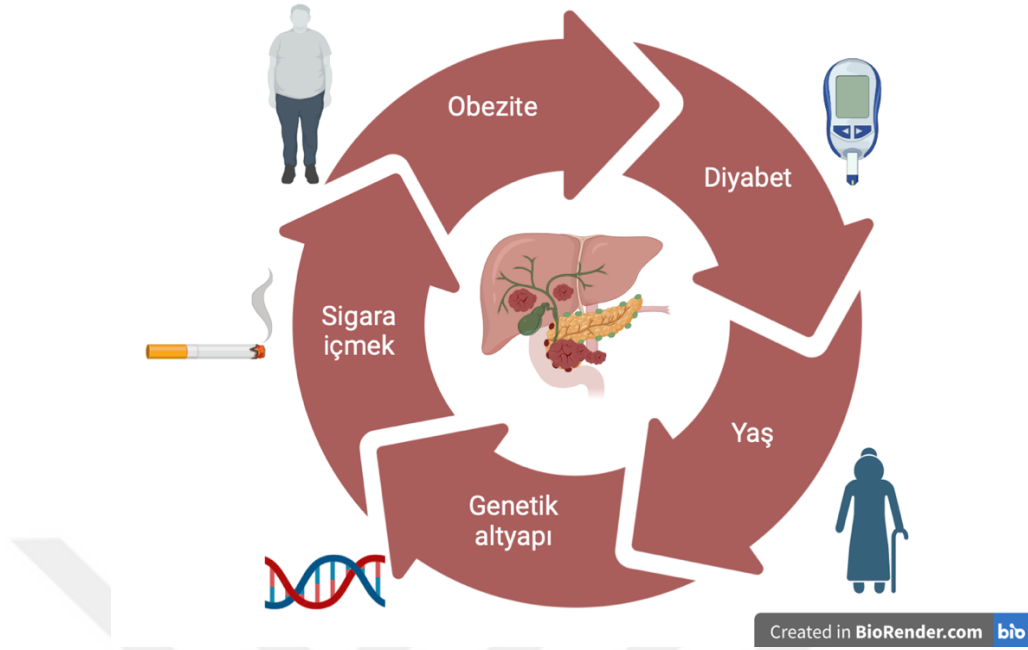
Diyabet vücut tarafından yetersiz insülin üretimi veya ürettiği insülinin etkili bir şekilde kullanılamaması ile karakterize edilmiştir. Pankreas kanseri hastalarının yaklaşık %50'sinde erken evrelerde tip 2 diyabet veya pankreas kanseri hücrelerinin insülin direnci yoluyla glikoz metabolizmasının bozulduğunu gözlemlenmektedir (Amri ve ark., 2023; Jacobs ve Stoffel, 2024). Diyabet, hem pankreas kanseri için bir risk faktörü hem de kanserin bir sonucudur ve yeni teşhis edilen pankreas kanseri olan birçok hastada diyabet başlangıcı olduğunu veya diyabetliler arasında hastalığın kötüleştiği gözlemlenmektedir (Klein, 2021). Yapılan çalışmalarda pankreas kanseri ve diyabetli

hastalarda miR-21, miR-221 gibi bazı mikro RNA'ların yüksek seviyede eksprese olduğu ve bunların düşük sağkalım ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Kozłowska ve Śliwińska, 2023). 10 yıldan fazla süredir tip 1 diyabet olan hastaların pankreas kanserine yakalanma riski 5-10 kat artmaktadır. İlaveten pankreas kanseri hastalarının kan şekeri ve HbA1c seviyelerinin diyabet tanısından 1 ay önce önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2020).

Obezite ve pankreas kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların birçoğunda pozitif bir korelasyon mevcuttur (Preziosi ve ark., 2014). Pankreas kanserinde kritik öneme sahip KRAS genindeki yüksek ekspresyon obezite hastalarında da artmıştır ve bu yol ile pankreas kanseri gelişimini tetikleyebileceği düşünülmektedir (Eibl ve Rozengurt, 2021). Yapılan çalışmalarda pankreas kanserinde obez koşullar altında Nod benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3), IL-1 β 'yı serbest bırakarak pankreas kanseri hücrelerinin göçünü ve invazyonunu desteklemektedir (Yang ve ark., 2023a).

Pankreas kanserinin dünya çapındaki insidansı ve mortalitesi artan yaş ile korelasyon halindedir ve özellikle 55 yaş üzerindeki hastalarda tespit edilmektedir (Rawla ve ark., 2019; Zhao ve Liu, 2020). Pankreas kanserinin yaşa bağlı telomerlerde gerçekleşen kısalmalara bağlı gelişebileceği de düşünülmektedir (Cai ve ark., 2021).

Pankreas kanseri hastalarının yaklaşık %5-10'unda ailesel pankreas kanseri öyküsü görülmektedir (Jacobs ve Stoffel, 2024). Yapılan çalışmalar pankreas kanseri birey ile kan bağı olmasının pankreas kanseri riskini 1,5 ile 13 kat arasında artmasına neden olduğunu göstermektedir (Klein, 2021). İlaveten ailesel pankreas kanseri öyküsü olan bireylerin pankreas kanseri tanısı konulduğundaki ortalama yaşı, aile öyküsü olmayan bireye kıyasla daha erkendir (Goggins ve ark., 2020). Kalıtsal pankreas kanseri gelişiminde meme kanseri 1 (BRCA1), meme kanseri 2 (BRCA2), ataksi-telenjektazi mutanlığı (ATM), TP53, BRCA2'nin ortağı ve lokalizatörü (PALB2), adenomatöz polipozis koli, CDKN2A, SMAD4 genleri önemli rol oynamaktadır (Abe ve ark., 2021).



Şekil 2. 3. Pankreas kanserinin risk faktörleri (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Luo ve ark., 2023a)

2.3. Pankreas Kanseri Tanı ve Tedavisi

Pankreas kanserinde gelişmiş cerrahi teknikler, adjuvan kemoterapi, ileri evre metastatik kanser hastalarına uygulanan hedefli tedavilerin kullanımı ile sağkalım sonuçlarında ilerleme kat edilmesine rağmen, 5 yıllık sağkalım oranı hala oldukça düşüktür (Springfeld ve ark., 2023). İleri pankreas kanseri hastalarındaki tedavinin başarısızlık nedeni başlıca hastaların %50-70'inde teşhis edilen ileri ve uzak metastaz durumu olduğundan dolayı pankreas kanseri hala kötü prognoza sahiptir (Ettrich ve Seufferlein, 2021; Falco ve ark., 2023).

Hastalarının yalnızca %10'unda erken başlangıçlı pankreas kanseri teşhisi konmaktadır ve hastaların yaklaşık %60'ında metastatik tümörleşme mevcuttur (Zhao ve Liu, 2020). Pankreas kanserinin agresif seyrinden dolayı hastaların %90'ından fazlasında ameliyat sonrası hayatını kaybetmektedir ve cerrahi işlemler tek başına yeterli olmamaktadır (Neoptolemos ve ark., 2018). Bundan dolayı adjuvan kemoterapi ile uygulanan cerrahi tedaviler daha çok tercih edilmektedir (Springfeld ve ark., 2019).

Radyoterapi, Nobel Ödülü sahibi Marie Curie'nin radyoaktiviteyi keşfetmesinden bu yana kanser hücrelerini öldürmek veya kontrol altına almak için önemli ve etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Radyoterapi temel olarak X ışınları ve gama (γ) ışınları gibi yüksek enerjili foton radyasyonu kullanarak kanser hücrelerine uygulanan bir tedavi yöntemi olarak bilinmektedir (Gong ve ark., 2021). Radyoterapi tümör hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Sun ve ark., 2023). Yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyon yolu ile DNA kırılması indüklenerek kanser hücreleri etkisiz hale gelmektedir. Ancak radyoterapi dozu arttırıldığında ışınlama bölgesindeki sağlıklı dokuda radyasyon hasarı meydana gelebilir (Tang ve ark., 2024). Bunun yanı sıra radyasyon ile tümör hücrelerinin öldürülmesi, hasarla ilişkili moleküler patternlerin (DAMP'ların) salınmasına neden olarak immünomodülatör sitokinlerin ekspresyonunu uyarır ve proinflamatuvar bir ortam üretmektedir (Ng ve Dawson, 2022). Ancak pankreas kanseri hastalarının birçoğu radyasyon tedavisine direnç göstermektedir (Shi ve ark., 2011). Kemoterapi ile radyoterapi birlikte pankreas kanserli hastalara uygulandığında ise uzun sağkalım bildirilmiştir. İlaveten sınırda rezeke edilebilir pankreas kanseri olan hastalarda neoadjuvan kemoradyoterapi kullanımı rezeksiyonu mümkün kılarak sağkalımı önemli ölçüde iyileştirebilir (Wang ve Kumar, 2011).

Kemoterapi birçok katı malignitelerin tedavisi için ana yöntemlerden biri olarak bilinmektedir (Liu ve ark., 2017). Pankreas kanseri olan hastaların rezeksiyondan sonra bile yüksek nüks gösterdiği bilinmektedir. Rezeksiyon sonrası nüks gelişimini önlemek veya geciktirmek için rezeksiyon öncesi ve sonrasında kemoterapi uygulanmaktadır (Okusaka ve Furuse, 2020). Yapılan birkaç çalışmada adjuvan kemoterapinin pankreas kanserinin rezeksiyonundan sonra hastalarda sağkalımı iyileştirdiğini doğrulamıştır (Van Roessel ve ark., 2020). Pankreas kanseri birçok kanser türüne göre kemoterapi tedavilerine karşı oldukça dirençlidir ve tek başına uygulandığında yanıt oranı kombinasyon tedavilere kıyasla nispeten daha düşüktür (Springfeld ve ark., 2023).

Hedefe yönelik tedavi stratejisi, hastaların sıklıkla yaşadığı yan etkileri en aza indirmeyi ve tedavi sürecinde gözlemlenebilecek ilaç direncinin üstesinden gelmeyi amaçlamaktadır. Spesifik proteinlerin seçici olarak hedeflenmesini sağlayan bir tedavi yöntemi olarak bilinmektedir (Victoir ve ark., 2024). Moleküler hedefli tedavilerin

kullanımı tümör büyümesini, ilerlemesini, invazyonunu, metastazını ve kemorezistansı düzenleyen belirli moleküllerin veya sinyal yollarının bloke edilmesi prensibine dayanmaktadır. Pankreas kanserinde apoptoz, DNA hasar kontrolü, G1/S hücre döngüsü geçişi ve invazyonun düzenlenmesi gibi hücresel süreçleri içeren tümör başına ortalama 63 genetik değişikliği kapsayan sinyal yolağı tanımlanmıştır (Ansari ve ark., 2016). Hedefli moleküler tedavi için özellikle pankreas kanserinde yüksek seviyede eksprese edilen veya sık mutasyona uğrayan EGFR, VEGF, KRAS, TP53 ve SMAD4 gibi genler potansiyel tedavi hedefi olarak öne çıkmaktadır (Duan ve ark., 2023). Son yıllarda biyoinformatik araçlar ile pankreas kanserinde mutasyonlar ve anormal sinyal yolları da keşfedilmeye başlanmıştır. Bu yenilikçi tedavi seçenekleri pankreas kanseri hastalarının sağkalımının artırılması için önem arz etmektedir (Kolbeinson ve ark., 2023). Ancak kanserin karmaşık yapısını hedeflemek için tek başına tedavi seçenekleri yeterli olmayabilir. Bundan dolayı kombine ve hedefe yönelik tedaviler hakkında daha fazla çalışma yapılmalıdır (Tran ve Tran, 2022).

Geleneksel tedavilerdeki kısıtlamalarının üstesinden gelmek için kullanılan immünoterapi, tümör hücrelerini spesifik olarak hedeflemek, ortadan kaldırmak ve tümör hücresinin büyümesini engellemeyi amaçlamaktadır (Ma ve ark., 2024). Kanser hücrelerinin kendisinden ziyade konakçı bağışıklık sistemini hedef alan immünoterapi, onkolojide önemli bir dönüm noktası haline gelmiştir (Smyth ve Teng, 2018). İmmünoterapi immün checkpoint blokajı, aşılar ve kimerik antijen reseptörü T hücresi (CAR-T) gibi tedavileri içermektedir. 2011 yılındaki immün checkpoint inhibitörü monoklonal antikor ipilimumab, kullanımından bu yana melanom, NSCLC ve renal hücreli karsinom gibi tümörlerde önemli ilerlemeler kat edilmiştir (Zhu ve ark., 2023). Hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi ile hastaların hayatta kalma oranı önemli ölçüde artmasına rağmen, hastaların tedaviye yanıt vermesini engelleyen ilaç direnci oluşması tedavinin başarısını sınırlamaktadır (Peng ve ark., 2024). Yapılan çalışmalar pankreas kanserinde immünoterapiye karşı direnç gelişmesinin ardındaki mekanizmaların T hücreleri ile ilgili olduğunu göstermiştir. T hücrelerinin işlev bozukluğu veya aktivasyonunun engellenmesi ve düşük düzeyde mutasyon oluşumundan dolayı dolayı pankreas kanserinde immünoterapi ile iyi bir sonuç alınmamıştır. Bu nedenle T hücrelerinin performansının artırılmasına yönelik stratejiler immünoterapinin

hedeflerindendir (Lai ve ark., 2019; Luo ve ark., 2023b). Pankreas duktal adenokarsinomada düşük düzeyde PD-1 + T hücresi infiltrasyonu olduğundan dolayı immün checkpoint blokajına verilen yanıt zayıf kalmaktadır. Bundan dolayı pankreas duktal adenokarsinomada yüksek seviyede eksprese edilen TIM3, TIGIT ve VISTA gibi immünoşüpresif yolların hedeflenmesi tedavi etkinliğini arttırmak için potansiyel bir strateji sunabilir (Morrison ve ark., 2018). Bunun yanı sıra pankreas kanserinin tümör mikroçevresi de geleneksel immünoterapilere karşı bir bariyer oluşturmaktadır. Tümör mikroçevresini yeniden programlayan ve immünoterapinin potansiyel faydalarını ortaya koyan kombinasyon tedavileri yaklaşımıyla umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Torphy ve ark., 2018). Bu nedenle ilaç direnci mekanizmalarının anlaşılmasını sağlayacak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve kombinasyon stratejileri ile çoklu sinyal yollarının hedeflenmesi kanser tedavisi için kritik öneme sahiptir.

2.4. İmmün Checkpointler ve Kanser Tedavisindeki Yeri

İmmün checkpoint molekülleri, bağışıklık tepkileri üzerinde inhibitör veya uyarıcı etkiler uygulayan ligand-reseptör çiftleri olarak tanımlanmaktadır (Zhang ve Zheng, 2020). Fizyolojik koşullar altında bağışıklık homeostazını ve doku hasarını koruyan, otoimmün reaksiyonları sınırlandıran inhibitör uyarıcıları indükleyen sinyal ve moleküllere immün checkpoint adı verilmektedir. Bu moleküller patolojik durumlarda kanser hücrelerinde eksprese edilerek bağışıklık hücrelerinin tanımasından kaçmaktadır. Bu sayede bağışıklık düzeninin bozulmasına ve tümör büyümesine neden olmaktadır (Mucciolo ve ark., 2020; Wagner ve ark., 2021; Peng ve Bao, 2022).

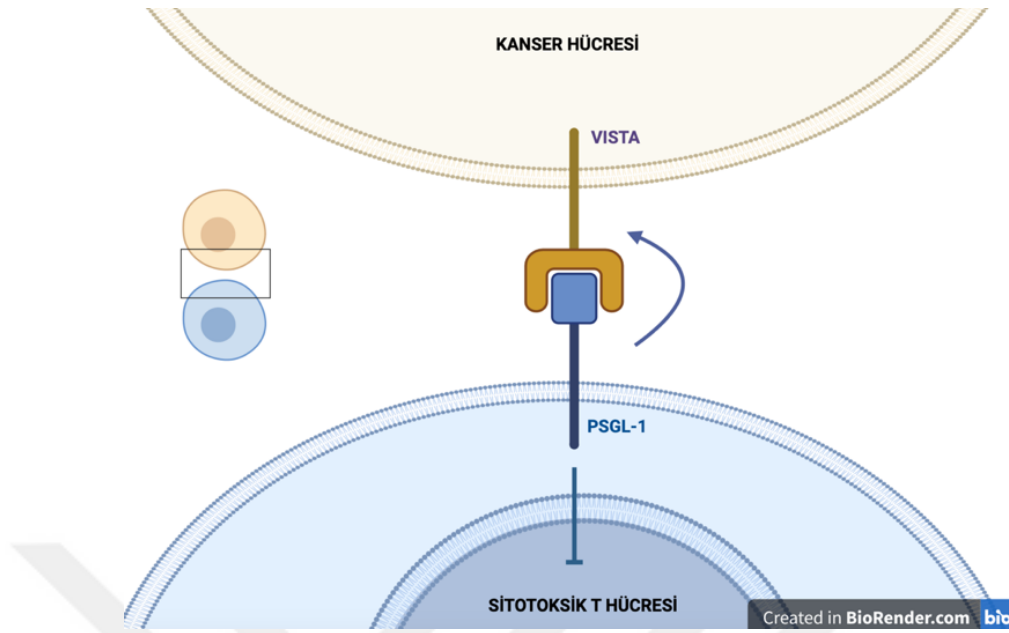
2018 Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü Prof. James Allison ve Prof. Tasuku Honjo'ya kanser tedavisinde bağışıklık sistemini aktive etmek için immün checkpoint blokasyonu üzerine yaptıkları çığır açıcı keşifler nedeni ile verilmiştir (Rotte ve ark., 2018). Yaptıkları çalışmalar ile Prof. Honjo PD-1/PD-L1, Prof. Allison ise CTLA-4 molekülünün immünoşüpresif fonksiyonunu doğrulamışlardır (Liu ve Wu, 2018). Çalışmalar PD-1 ve CTLA-4'ün kanser hastalarının tedavisinde bir hedef olarak kullanılmasının önünü açmıştır (Ljunggren ve ark., 2018). İmmün checkpoint reseptörleri CTLA-4 (B7.1 ve B7.2) ve PD-1 (ligandı PD-L1 ve PD-L2)'in tanımlanmasından sonra Lenfosit aktivasyon

geni-3 (LAG3), TIM3, T-hücre immünoglobulin ve ITIM domaini (TIGIT) (ligandı CD155 ve CD112), indoleamin 2,3-dioksijenaz 1 (IDO1) ve T hücre aktivasyonunun V-domain Ig baskılayıcısı (VISTA) blokasyonları antitümör bağışıklığın geri kazanılması ve tümör büyümesinin yavaşlaması için umut verici hedefler arasında gösterilmektedir (Xu ve ark., 2018; Chen ve ark., 2024). İmmün checkpoint inhibitörleri, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanıyarak savaşmasını sağlayan yeni bir yaklaşımdır (Liu ve Wu, 2018). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) melanom tedavisinde immün checkpointlere karşı hedef alan monoklonal antikörleri 2011 yılında onaylamıştır ve sonrasında immün checkpointlerin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar artmıştır (Pawłowska ve ark., 2022). İmmün checkpoint inhibitör ilaçlarını kullanan hastaların tedaviyi bıraktıktan sonra devam eden kalıcı yanıtlarından dolayı çalışmalar oldukça heyecan verici olmuştur (Mukherji ve ark., 2022). Ancak bununla birlikte tek başına immün checkpoint blokasyon tedavisi zayıf hasta yanıtı, ilaç direnci ve bağışıklıkla ilgili zorluklar (otoimmünite) immün checkpoint inhibitörlerinin kullanılmasına sınırlılık getirmektedir. Bundan dolayı immün checkpoint inhibitörleri ile uygulanacak olan kombinasyon tedaviler umut verici yaklaşımlar olarak gösterilmektedir (Peng ve Bao, 2022; Zhang ve ark., 2024a).

2.4.1. VISTA

VISTA (Vsr, c10orf54, PD-1H, DD1 α , Gi24, Dies1, SISP1) B7 negatif checkpoint ailesinin bir üyesidir düzenleyicisidir ve immünoterapi için yeni bir hedefi temsil etmektedir. Vsr geni tarafından kodlanan ve insan kromozomunda 10q22.1'da bulunan VISTA bir Ig-V domaini, bir transmembran domain ve iyi korunmuş bir sitoplazmik kuyruktan oluşan 279 amino asit uzunluğunda 55-65 kDa ağırlığında tip I transmembran proteini olarak bilinmektedir. VISTA molekülünün filogenetik analizi sonucunda PD-1, CD28 ve CTLA-4 ile benzerlikler göstermiştir ancak en yüksek benzerliğin PD-1 ile olduğu tespit edilmiştir. VISTA'nın sitoplazmik kuyruğu klasik immünreseptör tirozin bazlı inhibitör motif (ITIM)/ immünoreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM) motiflerine sahip değildir ve bu nedenle diğer B7 ailesi üyelerinden farklıdır (Wang ve ark., 2019; Kong, 2020; Ziogas ve ark., 2023; Shekari ve ark., 2023). VISTA'nın IgV domaini 3 ek sistein amino asidi içerdiğinden dolayı immünoglobulin süper ailesinin diğer üyelerinden farklıdır ve bu nedenle benzerlik eksikliği göz önüne alındığında

VISTA'ya PD-L adı verilmemiştir (Ceeraz ve ark., 2013). VISTA'nın en temel görevi T hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek veya T hücreleri tarafından sitokinlerin üretimini azaltarak bağışıklık sistemi tepkilerinin düzenlenmesi ve homeostazın korunmasıdır (Gao ve ark., 2024). VISTA'nın ilk olarak 2014 yılında hematopoetik dokularda (dalak, lenf düğümleri, periferik kan) ve lökosit infiltrasyonu olan dokularda yüksek seviyede ekspresyon profili olduğu tespit edilmiştir. Özellikle VISTA'nın T hücrelerinin proliferasyonunu baskılarken, B hücrelerini etkilemediği ve T hücresinin sitokin üretimini ve aktivasyonunu baskılayabileceğini yapılan çalışmada gösterilmiştir (Lines ve ark., 2014). Makrofajlar, nötrofiller ve bazofillerde yüksek seviyede eksprese olan VISTA, CD4⁺ T hücresi, CD8⁺ T hücresi, plazma hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde düşük seviyede eksprese olmaktadır (Shekari ve ark., 2023). T hücreleri, antijen sunan hücreler (APC'ler) ve tümör hücreleri üzerindeki VISTA ekspresyonu bağışıklık düzenleyici işlevlerini yerine getirmek için hem reseptör hem de ligand görevi görmektedir (Gao ve ark., 2024). VISTA normal pH'de ligandı olan V-set ve immünoglobulin domaini içeren 3 (VSIG-3; IGSF11) ile etkileşime girerek bir reseptör olarak işlevi görmesine karşın asidik pH'de tümör hücrelerinde ifade edilen bir ligand olarak işlev görerek bilinen reseptöre bağlanmaktadır (Rezouki ve ark., 2023) (Şekil 2.4). Akut miyeloid lösemi (AML) üzerinde yapılan bir çalışmada VISTA'nın AML hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edildiği ve bu hücreler tarafından salınan Galektin-9'u ligand olarak tanıdığı tespit edilmiştir. VISTA'nın Galektin-9'un immünosüpresif aktivitesini arttırdığı ve bu reseptör-ligand bağlantısının AML hücrelerine granzim B salınmasını engellediğini göstermiştir. Bu etkileşim Granzim B'nin T hücreleri içerisinde kalmasına ve burada aktif hale gelerek T hücrelerinin ölümüne neden olduğunu, bu sayede AML hücrelerinin immüniteden kaçmasına yardımcı olduğu gösterilmektedir (Yasinska ve ark., 2020).



Şekil 2. 4. VISTA ve PSGL-1 etkileşimi. Bu ligand-reseptör bağlantısı T hücre aktivitesini baskılayarak kanser hücrelerinin bağışıklıktan kaçışını kolaylaştırmaktadır (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Martin ve ark., 2023)

VISTA ilk olarak Wang ve meslektaşları tarafından fibrosarkom fare modelinde negatif checkpoint düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Sonraki çalışmalarda hem hayvan tümör modellerinde hem de insan primer kanserlerindeki tümör mikroçevresinde VISTA ekspresyonunun yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir (Mortezaee ve ark., 2022). Tümör hücrelerinde VISTA'nın yüksek seviyedeki ekspresyonunun, *in vitro* çalışmalarda T-hücresi proliferasyonunu ve sitokin üretimini baskıladığı ve *in vivo* çalışmalarda ise CD8+ T hücrelerinin tümör infiltrasyonunu azalttığı belirlenmiştir (Guo ve ark., 2023). Yapılan çalışmalarda 223 tane pankreas tümör dokusunda VISTA proteini tümör hücrelerinin %25,6'sında, bağışıklık hücrelerinin %38,1'inde ve endotel hücrelerin %26'sından yüksek oranda eksprese edilmiştir. İlaveten VISTA blokasyonu ile karaciğer metastazı olan pankreas kanserli fare modellerinde karaciğerdeki metastatik nodül sayısı önemli ölçüde azalmıştır (Hou ve ark., 2020). Bir başka çalışma ise endometrial ve yumurtalık kanserlerinin yüksek VISTA seviyelerini eksprese ettiğini ve tümör hücrelerinde VISTA ekspresyonunun artmasının T hücre proliferasyonunu baskıladığını ve bu sayede tümör hücrelerinin bağışıklıktan kaçmasını kolaylaştırdığını göstermektedir (Mulati ve ark., 2019). VISTA blokajı ise T hücresi aktivasyonunu

arttırmaktadır ve IFN- γ , IL-2, IL-17, CCL-3, CCL-5 ve CXCL-11 gibi birçok inflamatuvar sitokin üretimini upregüle etmektedir. İlâveten VISTA, miyeloid türevli immün baskılayıcı hücrelerin işlevlerini güçlendirme, T regülatör hücrelerin hayatta kalmasını sürdürme ve antijen sunan hücrelerin antijen sunum yeteneğini kısıtlama potansiyeline de sahiptir (Meng ve ark., 2024).

Pankreas kanseri dokusunda yapılan çalışmalar VISTA'nın yüksek yoğunluklu infiltrasyon yapan bağışıklık hücrelerinde eksprese olduğunu ve bundan dolayı VISTA'nın pankreas kanseri immünoterapisi için kritik bir hedef olabileceğini göstermiştir. İlâveten pankreas tümör hücrelerinde yüksek VISTA ekspresyonu düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda pankreas kanserinde VISTA sinyal kaybının bağışıklıktan kaçmaya katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle pankreas adenokarsinomunda VISTA'nın immüno-regülatör mekanizması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Huang ve ark., 2020; Digomann ve ark., 2023).

2.4.2. PD-1 / PD-L1

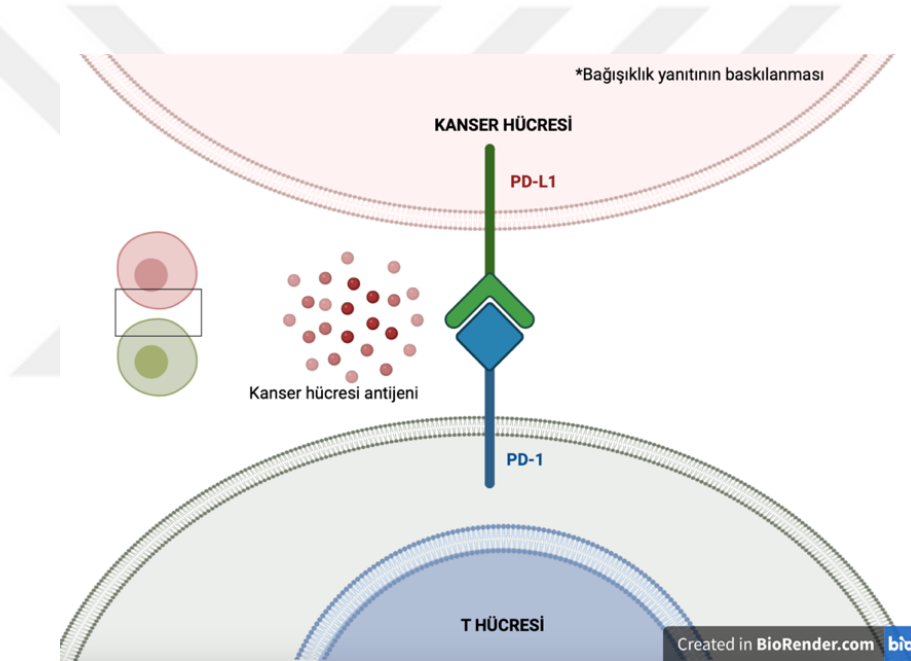
PD-1, CD28 ailesinden immünsüpresif bir checkpointtır ve antijene maruz kalma durumunda makrofajlarda, B lenfositlerinde, monositlerde, NK hücrelerinde ve dentritik hücrelerde eksprese edilmektedir (Liu ve ark., 2021a; Tang ve ark., 2022a). İnsanlarda kromozom 2q37 üzerindeki PDCD1 geni tarafından kodlanan bir transmembran reseptörü olarak bilinmektedir (Xu ve Li, 2024). İlk keşfedildiği yıllarda PD-1'in apoptotik süreçte rol oynayabileceğini düşündürülmüş, özellikle programlanmış hücre ölümü geçiren hücrelerde PD-1 ekspresyonunun artması bu hipotezi desteklemiştir (Ishida ve ark., 1991). PD-1 reseptörünün B7 ailesine ait 2 ligandı bulunmaktadır: PD-L1 (CD274 veya B7-H1) ve PD-L2 (CD273 veya B7-DC). PD-L1 proteinleri genellikle fibroblastlar, perisitler, epitel, endotelyal ve düz kas hücreleri gibi birçok stromal hücrede olduğu gibi birkaç antijen sunan ve immüno-süpresif hücrede de eksprese edilmektedir (Salminen, 2024; Cacan, 2017). 2001'deki keşfinden bu yana birçok laboratuvar ve klinik çalışmanın odak noktası haline gelen PD-L1, kromozom 15q24.1'de bulunan gen tarafından kodlanmaktadır ve mRNA'sı normal dokuların çoğunda yaygın ifade edilirken, protein ekspresyonu fizyolojik koşullarda düşük seviyededir. Bu durum transkripsiyon sonrası düzenleyici mekanizmaların etkisini göstermektedir (Perovic ve ark., 2024).

PD-1/PD-L1 yolu özellikle otoimmün hastalıklarda, virüs enfeksiyonunda, transplantasyon immünolojisinde ve tümör bağışıklığında önemli bir rol oynamaktadır (Jiang ve ark., 2019). Normal koşullarda PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşim immün homeostazın korunması ve otoimmünitenin önlenmesi için önem arz etmektedir. Bununla birlikte PD-L1'in tümör hücrelerinde yüksek seviyedeki ekspresyonu, T lenfosit aktivasyonunu baskılayarak bağışıklık kaçışını kolaylaştırabilir (Şekil 2.5) (Xu ve Li, 2024; Bullock ve Richmond, 2024; Zhang ve ark., 2024b). PD-1/PD-L1 sinyal yolağının blokajı, CD8+ T hücrelerinin sitokin üretimi, proliferasyon, enfekte hücreleri öldürme ve viral yükü azaltma gibi işlevlerinin yeniden kazanılmasını sağlamıştır (Barber ve ark., 2006).

PD-L1 ekspresyonu, Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K)-Akt kinazın upregülasyonu veya IFN- γ salgılanması ile artmaktadır (Alsaab ve ark., 2017). IFN- γ , PD-L1'in düzenlenmesi için önemli olan protein kinaz D izoform 2'yi (PKD2) indüklemektedir. PKD2 aktivitesinin inhibisyonu ise, PD-L1 ekspresyonunu inhibe ederek güçlü bir antitümör bağışıklık tepkisini desteklemektedir. NK hücreleri, Janus kinaz (JAK)1, JAK2 ve sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü 1 (STAT 1) yolakları aracılığıyla IFN- γ salgılayarak tümör hücrelerinin yüzeyindeki PD-L1 ekspresyonunu arttırmaktadır (Han ve ark., 2020). İlaveten PD-L1+ T hücreleri STAT6'ya bağımlı M2 tipi makrofajların farklılaşmasını teşvik ederek PD-L1/PD-1 bağlantısı aracılığıyla efektör T hücrelerinin işlevini inhibe etmektedir. Bu nedenle immün checkpoint PD-1/PD-L1'in bloke edilmesi, T hücresi apoptozunu azaltarak anti-tümör bağışıklığı teşvik edebilir (Lin ve ark., 2024).

PD-L1 tümör mikroçevresinin önemli bir göstergesidir ve epitel-mezenkimal transisyon ve ilaç direncine neden olarak tümör ilerlemesine katkı sağlamaktadır (Jia ve ark., 2024). Akciğer kanserinde PD-L1'in TGF- β ile EMT'yi indüklediğini, bu sayede tümör ilerlemesini ve metastazı desteklediği gösterilmiştir (Jeong ve ark., 2024). Bir başka çalışmada ise akciğer kanserinde PD-L1'in knockdown edilmesi ile EMT sürecinde yer alan genlerin ekspresyon seviyesinde bir azalma meydana gelmiştir. İlaveten yüksek PD-L1 ekspresyonu ile tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile anlamlı bir korelasyon da tespit edilmiştir (Liv d., 2024). Yapılan çalışmalarda PD-1/PD-L1

inhibitörü çeşitli solid tümörlerde iyi klinik sonuçlar elde etmiştir ve umut verici bir tümör tedavisi stratejisi olarak kabul edilmektedir (Guo ve ark., 2024). Ancak pankreas kanseri tedavisinde tek başına immün checkpoint inhibitörlerinin kullanılması tümör mikroçevresinde yer alan immünsüpresif hücreler ve sitokinlerden dolayı kanserli hastaların anti PD-1/PD-L1 immünoterapisine verdiği yanıt yetersiz kalmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada anti-PD-L1 ve sisplatin tedavi kombinasyonunun çok iyi sinerjistik etki sağlayarak klinik öncesi ve klinik çalışmalarında antitümör etkiyi arttırdığı bildirilmiştir (Jia ve ark., 2024; Nan ve ark., 2024). Bu immünsüpresif faktörlerin immün checkpoint moleküller ile birlikte hedef alınması immünoterapi için önem arz etmektedir.



Şekil 2. 5. PD1 ve PD-L1'in bağlanması T hücre yanıtını baskılamaktadır (Zhang ve ark., 2020)

2.4.3. IDO1

Esansiyel amino asit olan L-Triptofan triptamine dekarboksilasyon, protein sentezi, serotonerjik yol ve kinürenin (Kyn) yolu olmak üzere dört farklı mekanizma ile metabolize edilmektedir. Kyn yolu memelilerde diyet ile alınan triptofanın yaklaşık %95'ini metabolize eden bir yol olarak bilinmektedir (Zhai ve ark., 2018). L-triptofanın

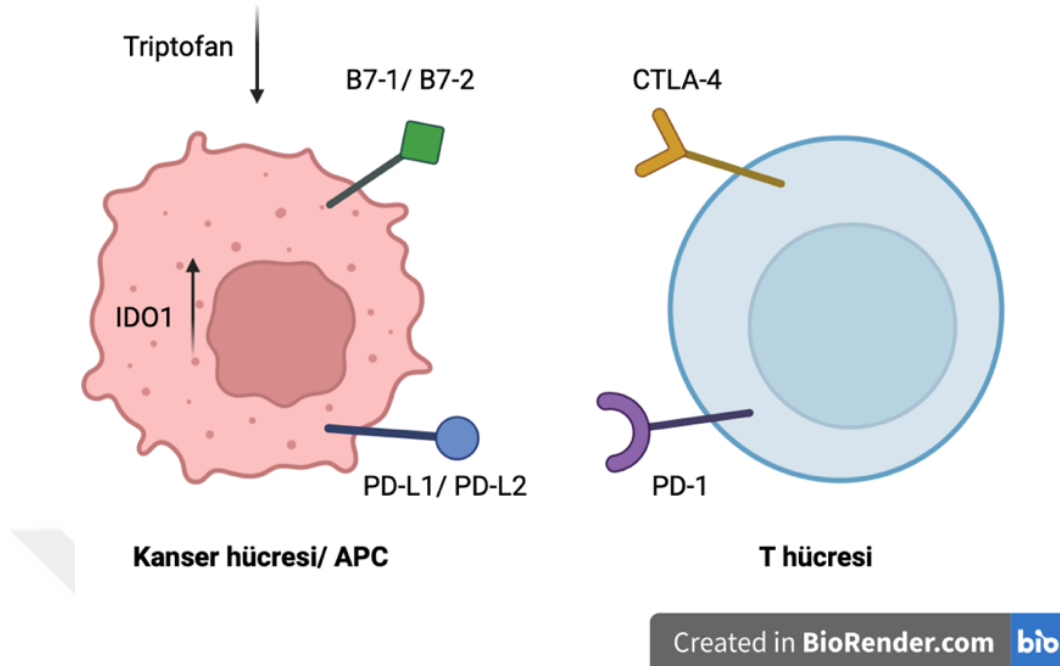
kyn ve metabolitlerine dönüştüren enzim başlıca IDO1 enzimi olarak bilinmektedir. Buna ilaveten kyn yolunda daha düşük katalitik aktiviteye sahip IDO2 ve triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO) olmak üzere iki dioksijenaz daha bulunmaktadır (Salminen, 2022).

IDO1 insanda kromozom 8p12 tarafından kodlanan 45 kDa hemoglobin oksidazdır ve L-triptofan-kinürenin yolunun metabolizmasında önemli bir enzimi olarak görev almaktadır (Zhai ve ark., 2018; Liu ve ark., 2022a). İnterferon (IFN) ile indüklenebilen bir gen olarak bilinen IDO1, doğuştan gelen ve edinsel bağışıklık modülasyonunda yer almaktadır (Meireson ve ark., 2020). IDO1 epitel hücrelerde, tümör hücrelerinde ve ayrıca antijen sunan hücrelerde güçlü bir şekilde eksprese edilmektedir ve T hücresi proliferasyonunu inhibe ederek, Treg hücrelerinin de farklılaşmasını indükleyerek immünsüpresif bir tümör mikroçevresine neden olmaktadır (Anzai ve ark., 2022; Liu ve ark., 2022a). Rahim ağzı kanserinde yapılan bir çalışmada IFN- γ 'nın IDO1 ekspresyonunu destekleyerek kanseri hücrelerinde otofaji ve makrofaj fagositozunu indüklediği tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2021). Yapılan diğer çalışmalarda ise tümör mikroçevresinde azalan triptofan seviyesi, azalmış CD8+ TIL ve kötü prognoz ile korelasyon göstermiştir. Buna ilaveten IDO1 enziminin inhibisyonu, yan etkileri arttırmadan sitotoksik kemoterapi, radyoterapi ve immün checkpoint inhibisyonu tedavilerinin etkisini güçlendirmiştir. Yumurtalık kanserinde ise platin dirençli hastalarda IDO1 ekspresyon seviyesinin, duyarlı hastalardan daha yüksek seviyede eksprese edildiği ve IDO1'i susturmanın p53-bağımlı apoptozu arttırdığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı IDO1 hedeflenmesinin ilaç direncinin üstesinden gelmek için önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Prendergast ve ark., 2017; Amobi-McCloud ve ark., 2021; Wang ve ark., 2022a).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda endometrial kanserde IDO1 ekspresyonu ile prognoz arasında negatif bir korelasyon tespit edilirken, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri, hepatoselüler karsinom, yumurtalık kanseri, pankreas kanseri ve meme kanserinde IDO1 ekspresyonu ile prognoz arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Korac ve ark., 2022; Hoffmann ve ark., 2023). 2024 yılında Liang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pankreas kanserinde IDO1 ile glikolitik enzimlerden olan hekzokinaz 2 (HK2), piruvat kinaz (PK), laktat dehidrojenaz A (LDHA) ve glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) genleri arasında pozitif bir korelasyon

belirlenmiştir. Bu durum pankreas kanseri hücrelerinde IDO1'in yüksek seviyedeki ekspresyonunun ve triptofan eksikliğinin glikolizi teşvik ederek apoptozu baskılamıştır (Liang ve ark., 2024).

JAK1/STAT1 yolağı, kanser hücrelerinde yapısal olarak aktif olan sitokin kaynaklı sinyaldir. Bu yolak ayrıca IFN-gama'nın reseptörüne bağlanması ile meydana gelen sinyal kaskadlarını düzenleyerek IDO1'in transkripsiyonel aktivasyonuna da neden olmaktadır (Korac ve ark., 2022). Bunun yanı sıra PD-L1'in de JAK-STAT yolağı ile ekspresyonunun upregüle olduğu bilinmektedir. Bu durum ile triptofan tüketimi ve kynurenin üretimi gerçekleşerek efektör T hücrelerinin işlevini bozmaktadır ve Treg'lerin çoğalmasını ve fonksiyonunu arttırır. Akciğer kanserinde yapılan bir çalışmada ise yüksek PD-L1 veya PD-L2 seviyeleri ile IDO-1 veya IDO-2 arasında pozitif bir ilişki de gözlenmiştir (Ludovini ve ark., 2021; Chen ve ark., 2022). Bir başka çalışmada da akciğer kanseri hastalarında IDO1 ekspresyonu PD-L1 ekspresyonu ile korelasyon göstermiştir (Şekil 2.6). Bu çalışmalar IDO1 ve PD-L1 inhibitörlerinin kombinasyon halinde kullanımının etkili bir kanser tedavisi olabileceğini göstermektedir (Takada ve ark., 2019).



Şekil 2. 6. PD-L1/PD-1 ve CTLA-4/B7-1/B7-2 bağlantısı, T hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir ve Treg hücre proliferasyonunu teşvik ederken PD-L1, PD-L2 ve IDO1 ekspresyon seviyesini de arttırmaktadır. IDO sinyalizasyonu, T efektör hücrelerinin anerjisi ile immün baskılayıcı bir fonksiyon göstermektedir (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; <https://www.amsbio.com/ido-immune-pathway/> Erişim tarihi: 11.07.2024; Ludovini ve ark., 2021)

2.4.4. TIGIT / CD155

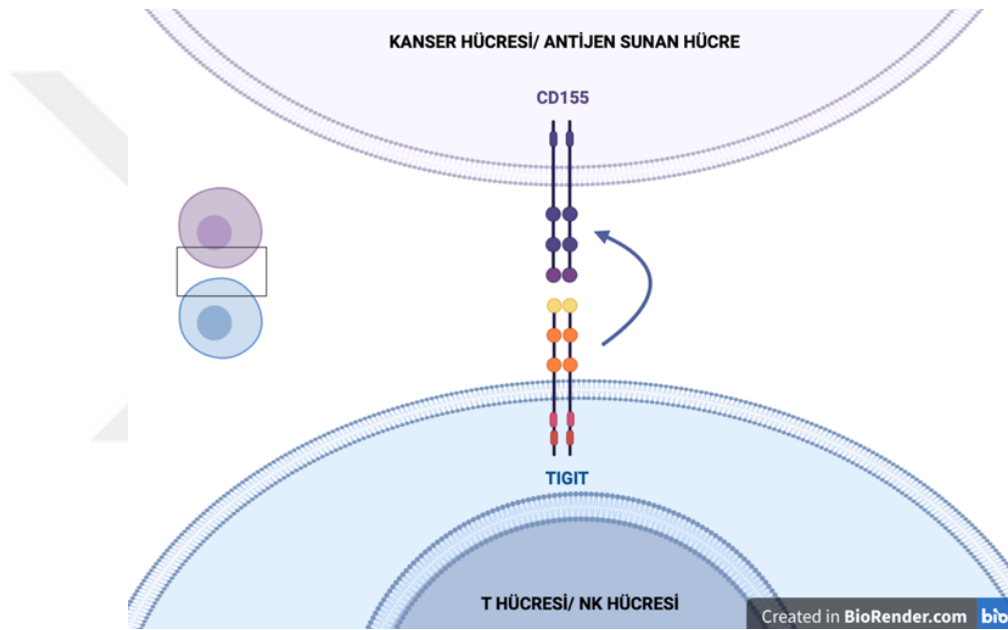
İmmün checkpoint Ig ve immünoresptör tirozin bazlı bir inhibitör motif (ITIM) etki alanlı T hücresi immünoresptörü (TIGIT; V-set ve immünooglobulin domain içeren protein 9/VSIG9; V-set ve transmembran domain içeren protein 3/VSTM3), immünitinin aşırı aktivasyonlarını önlemek için efektör immün hücreleri tarafından ifade edilen ko-inhibitör moleküldür (Assal ve ark., 2024; Erişim tarihi: 11.07.2024). TIGIT NK hücreleri, CD8⁺ T hücreleri, CD4⁺ T hücreleri ve Treg hücreleri üzerinde eksprese edilmektedir ve esas olarak dentritik hücreler, makrofajlar ve lenfositler üzerinde ifade edilen ligandı olan CD155 (Nect-5) adezyon molekülüne bağlanması ile T hücre aktivasyonunu inhibe etmektedir (Liu ve ark., 2022b; Jin ve ark., 2022; Huang ve ark., 2024).

TIGIT, immüoglobulin süper ailesinin bir üyesidir ve ekstraselüler Ig değişken bölgesi, tip I transmembran domaini, ITIM ve immüoglobulin kuyruk tirozin (ITT) benzeri motiften oluşmaktadır (Wang ve ark., 2022b). CD155 ise çocuk felci virüsü reseptörü (PVR) olarak da bilinmektedir ve nectin ailesine de ait olan immüoglobulin benzeri bir yapışma molekülüdür. CD155'te sırasıyla dört ek izoformu α , β , δ ve γ vardır ve özellikle, α izoformu, CD155 sinyalleme ve işlevinde önemli bir rol oynayan uzun bir C terminaline ve ITIM'a sahiptir (Wu ve ark., 2024).

CD155 molekülü melanom, pankreas kanseri, akciğer adenokarsinoma, özofagus karsinoma, mide kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, endometrial kanser ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyede eksprese edilmektedir. Tümörlerde CD155'in artan ekspresyonu tümör hücrelerinin DNA'sına zarar vererek DNA polimeraz ekspresyonunu inhibe etmektedir. Böylece yüksek oranda çoğalan malign hücrelerin replikasyon kapasitesini etkilemektedir (Liu ve ark., 2021c; Xin ve ark., 2022). Üçlü negatif meme kanserinde CD155'in mezenkimal fenotiple ilişkili olduğu ve CD155'in knockdown edilmesinin hücre göçü, invazyon ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2020). Rahim ağzı kanserinde ise CD155'in AKT ile etkileşime girerek kanser hücrelerinin çoğalmasını teşvik ettiği ve AKT/mTOR ve NF- κ B yolları ile otofajiyi inhibe edebileceği tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2021b). 2024 yılında yapılan bir çalışmada CD155/TIGIT sinyalleme ile CD8⁺ T hücresi glikoz metabolizmasının modülasyonu arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. CD155 ile CD8⁺ T hücresi üzerindeki TIGIT arasındaki etkileşim hücrenin glikoz kullanım dengesini bozmuştur. Bu dengenin bozulması ile tümör mikroçevresinde yer alan CD8⁺ T hücresi aktivasyonunun ve efektör fonksiyonlarının bozulmasına da katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Huang ve ark., 2024). İlaveten tümörlerdeki yüksek oksidatif stres ve nitrik oksit seviyeleri, DNA hasar tepkisi aracılı CD155'i upregüle ederken radikal oksidatif stres (ROS) temizleyicisi olan N-asetil-L sistein (NAC) varlığında down regüle olmaktadır (Zhou ve ark., 2023).

Pankreas kanserinde yapılan çalışmalarda yüksek CD155 ekspresyonu ile VEGF ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiş olup bu durumun

CD155'in tümör ilişkili anjiogenez süreçleri ile rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Nishiwada ve ark., 2015). Pankreas kanseri olan hastaların yaklaşık %80'inde CD155'in yüksek ekspresyonu bulunmaktadır ve CD155/TIGIT yoluyla immün baskılanma gerçekleşmektedir. Son çalışmalar TIGIT blokajının özellikle immün checkpoint PD-1/PD-L1 blokajı ile birleştirildiğinde, klinik öncesi modellerde T ve NK hücresi fonksiyonunu geri kazandırdığını göstermiştir (Şekil 2.7) (Peng ve ark., 2022). Yapılan çalışmalar TIGIT/CD155 sinyal yollarının hedeflenmesinin pankreas kanserinde yeni bir tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2. 7. T ve NK hücrelerinde eksprese olan TIGIT, kanser hücresi veya APC'lerde eksprese edilen CD155 ligandı ile yüksek afinitede bağlanarak inhibitör sinyal sağlamaktadır (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Jin ve ark., 2022)

2.4.5. BTLA / HVEM

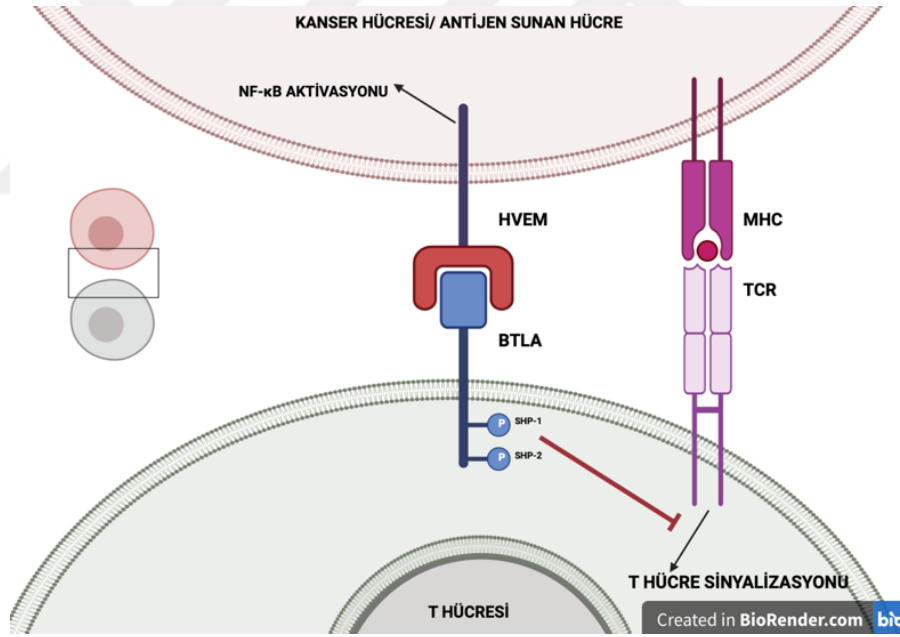
İnsan kromozomunda 3q13.2 yer alan BTLA geni, CD28 gen ailesinin bir üyesidir ve protein ürünü yapısal olarak PD-1 ve CTLA-4'e benzemektedir. BTLA hücre dışı domain, transmembran domain ve sitoplazmik domain olmak üzere üç domainden meydana gelmektedir (Wojciechowicz ve ark., 2024; Hu, 2024; www.ncbi.nlm.nih.gov, Erişim tarihi: 24.07.2024). BTLA molekülü esas olarak T ve B lenfositlerinde, makrofajlarda,

dentritik hücrelerde ve düşük seviyede NK hücrelerinde eksprese edilmektedir. BTLA molekülü Watanabe ve arkadaşları tarafından 2003 yılında T yardımcı tip 1 (Th1) hücrelerinde keşfedilmiştir. İnhibitör fonksiyonu olduğuna ilişkin ilk kanıtlar ise BTLA'dan yoksun farelerde otoimmün hastalıkların gelişmesi ile tespit edilmiştir (Watanabe ve ark., 2003; Sordo-Bahamonde ve ark., 2023). 2005 yılında yapılan çalışmalar ile BTLA molekülünün, HVEM ligandına bağlanarak T hücre proliferasyonunu baskılayan inhibitör sinyal sağlayan bir immün checkpoint olduğu tespit edilmiştir (Sedy ve ark., 2005).

HVEM (TNFRSF14), tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesine (TNFRSF) ait bir tip I transmembran proteinidir ve BTLA için tanımlanan ilk ligandır. İlk olarak 1996 yılında herpes simpleks virüsün (HSV) hücrelere girişini kolaylaştırmadaki rolü nedeniyle keşfedilmiştir (Mohamed ve ark., 2023; Wojciechowiec ve ark., 2024). HVEM molekülü BTLA ile bağlanması sonucunda T hücrelerine negatif bir sinyal iletilerek immün süpresyon görevi görmektedir (Şekil 2.8) (Aubert ve ark., 2019). HVEM molekülü bir sinyal peptidi, hücre dışı domain, bir transmembran domaini ve sitoplazmik domaininden meydana gelmektedir (Kunciewicz ve ark., 2023). BTLA'nın sitoplazmik domaini ise immünoresseptör tirozin bazlı anahtar motifi (ITSM) ve ITIM olmak üzere iki inhibitör motiften meydana gelmektedir. HVEM'in BTLA'ya bağlanması, ITIM ve ITSM motiflerinde bulunan tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu aktive ederek immünoşüpresif etkilere aracılık eden Src homoloji alanı 2 (SH2) içeren protein tirozin fosfataz, SHP-1 ve SHP-2' nin alınmasına yol açmaktadır (Ning ve ark., 2021; Wojciechowiec ve ark., 2024).

HVEM ve BTLA aynı anda reseptör ve ligand olarak görev alabildiğinden, HVEM-BTLA sinyal yolağı hem ko-stimülatör hem de ko-inhibitör yolları aktive edebilen karmaşık bir çift yönlü sinyal sistemi oluşturmaktadır. Lenfosit homeostazını korumak ve otoimmüniteyi önlemeyen HVEM/BTLA yolağı hem doğuştan hem de adaptif immün yanıtlarda kritik bir rol üstlenmektedir (Cheung ve ark., 2023). HVEM, özellikle T hücrelerinde eksprese edilmektedir ve çeşitli kanser türlerinde mutasyona uğradığı, akciğer kanseri, kolorektal kanser, karaciğer, meme, özofagus gibi farklı kanser türlerindeki yüksek ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir

(Ren ve ark., 2018; Han ve ark., 2019). Anormal BTLA ekspresyonu ise çeşitli kanser türlerinde özellikle tümör mikroçevresinde yer alan tümör infiltrate lenfositlerde (TIL) gözlenmiştir. Artan BTLA ekspresyonunun antikanser ilaçların inhibisyonu gerçekleştirdiği bilinmektedir (Andrzejczak ve ark., 2024). Oral skuamöz hücreli karsinom örneklerinde yapılmış bir çalışmada sağlıklı oral mukozaya kıyasla tümörlü dokularda önemli ölçüde artmış BTLA ekspresyonu gösterilmiştir (Ries ve ark., 2024). 136 mide kanseri biyopsisi üzerinde yürütülen bir çalışma, HVEM'in yüksek seviyedeki ekspresyonu hastalığın ilerlemesi ve genel sağ kalım oranının azalması ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Hu ve ark., 2024). PD-1 ve CTLA-4 immün checkpointler için birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen BTLA–HVEM bağlantısının T hücresi tabanlı kanser tedavilerine karşı dirençteki rolü yeterince anlaşılmamıştır (Guruprasad ve ark., 2024).



Şekil 2. 8. HVEM/BTLA sinyalizasyonu. HVEM ile BTLA'nın etkileşimi T hücrelerinde SHP-1 ve SHP-2 alımına neden olarak TCR sinyalini down regüle eden inhibitör sinyalleri iletmektedir. APC ve kanser hücrelerinde ise HVEM aracılı NF-κB aktivasyonu indüklenerek proinflamatuvar ve prosurvival sinyaller gerçekleşir (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir; Ning ve ark., 2021)

2.5. Epitel Mezenkimal Transisyon (EMT) ve Kanser İlerlemesi ile Bağlantıları

Epitel mezenkimal transisyon (EMT), epitel hücrelerinin hücre-hücre adezyon ve apikal-bazal polarizasyon gibi özelliklerin bir kısmını kaybettiği, hücre hareketini sağlamak için mezenkimal özellikler kazandığı hücresel bir süreçtir (Jolly ve ark., 2017; Fontana ve ark., 2024). EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri mezenkimal farklılaşmada yer alan genleri aktive ederken, epitel bileşenlerin ekspresyonunu inhibe etmektedir. Özellikle E-kadherin gibi epitel belirteçlerinin ekspresyonunun azalması ve N-kadherin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2, Twist1 ve Vimentin gibi mezenkimal belirteç görevi gören transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Liang ve ark., 2023).

Embriyogenez özelliği olarak epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşümü ilk olarak 1980'lerde Greenburg ve Hay tarafından gözlemlenmiştir. Sonrasında yara iyileşmesi, doku yenilenmesi, kök hücre farklılaşması, organ fibrozu ve kanser ilerlemesi gibi süreçlerde etkili olduğu belirlenmiştir (Lamouille ve ark., 2014; Ang ve ark., 2023). İlaveten EMT, apoptozu baskılayarak antikanser ilaçlara karşı direnç geliştirmektedir. EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörü ZEB1, çeşitli tümör tiplerinde proapoptotik BCL-2 aile üyesi BIM'i baskılayarak apoptozu down regüle etmektedir (Yoshimori ve ark., 2024). Yapılan çalışmalar EMT'yi indükleyen sitokinlerin, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks arasındaki yapışmaların bozulmasına yol açarak kanser hücrelerine metastatik yetenek kazandırdığını göstermiştir (Xu ve ark., 2024).

Prostat, akciğer, karaciğer, pankreas ve meme kanseri dahil birçok kanserin tümörojenezinde EMT'nin etkili olduğu gösterilmiştir (Ribatti ve ark., 2020). Pankreas kanserinde yapılan çalışmalar, hücrelerin EMT sürecine girdiğini ve mikroçevreyi yeniden şekillendirmek için tümör invazyonunu teşvik ettiğini göstermektedir (Yang ve ark., 2023b). EMT'nin pankreas kanseri hücrelerine kemorezistans sağlama yeteneği olmasına rağmen, hücrelerin tümör oluşumu ve ilerlemesine dair sınırlı bir katkısı olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark., 2017). İlaveten pankreas kanserinde EMT'nin gempitabin direnci ile ilişkili olduğu da bilinmektedir (Funamizu ve ark., 2023).

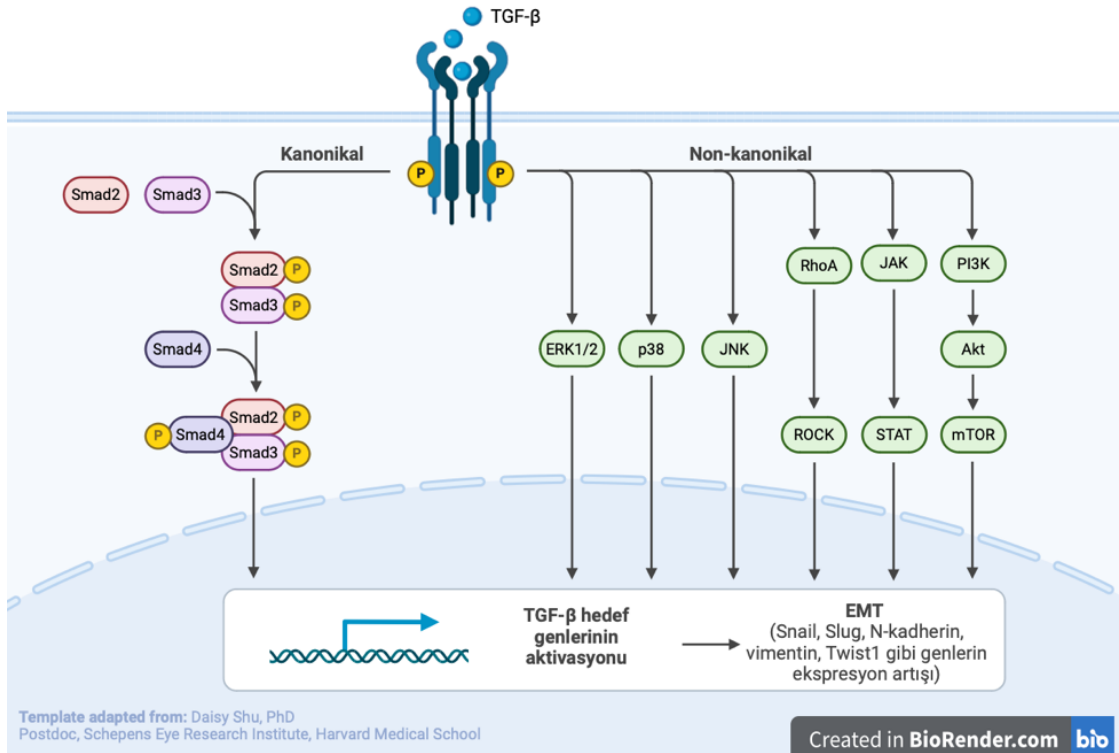
EMT sürecinin Wnt, Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Notch ve PI3K gibi çoklu yollar tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. TGF- β proteininin aracılık ettiği TGF- β sinyali, SMAD2/3/4 kompleksi aracılığıyla Snail, Twist ve ZEB'i kodlayan genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Wnt sinyal yolu ise GSK-3 β 'yi inhibe ederek β -katenin/LEF/TCF'nin transkripsiyonel kompleksinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu durum hücre proliferasyonu, migrasyon ve farklılaşma ile ilişkilendirilmiştir. Notch sinyallemede ise NF- κ B up regüle edilerek EMT transkripsiyon faktörlerin gen ekspresyonunu teşvik etmektedir (Ribatti ve ark., 2020; Yooder ve Thongboonkerd, 2023; Hu ve ark., 2023). İlave yapılan çalışmalar PI3K/Akt sinyal yolağının TGF- β sinyali aracılığıyla Twist1 fosforilasyonu sağlayarak tümör metastazını teşvik ettiğini göstermiştir (Hao ve ark., 2019). Bir başka çalışmada ise üçlü negatif meme kanseri hastalarında TGF- β 'nin inhibisyonunun immün checkpoint bloke edici antikorların etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2023).

İlk olarak EMT ve TGF- β sinyal yolağı bağlantısı, TGF- β tedavisi yapılan hücrelerin epitel hücre yapısının küboidalden uzun bir iğ şekline dönüşü sonucu epitel belirteçlerin ekspresyon seviyesindeki azalma ve mezenkimal belirteçlerden fibronektin ve vimentin ekspresyonundaki artış ile tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2009). Tümör progresyonu, metastazı modüle etmede kritik bir öneme sahip olan TGF- β , karsinomda tanımlanan ilk EMT indükleyicilerden biri olarak da bilinmektedir (Wang ve ark., 2023). TGF- β 'nin kanser metastazı, immünsüpresif etkisi ve bağışıklıktan kaçıştaki rolünün daha fazla araştırılması kanser tedavisinde hedeflenmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için önem arz etmektedir.

Kanonik TGF- β /SMAD yolağı aracılığı ile SMAD molekülü Snail, Twist1 ve Zeb1'in ekspresyon seviyesini arttırmaktadır (Hua ve ark., 2020). ERK, p38 MAPK, PI3K/Akt, Rho benzeri GTPazlar (Rho) ve TNF reseptörü ile ilişkili faktör 4/6 (TRAF 4/6) gibi çeşitli proteinler non-kanonik sinyalizasyonlar aracılığı ile TGF- β tarafından aktive edilmektedir. Aktifleşen sinyal yolları EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek metataz, anjiogenez ve hücre büyüme neden olmaktadır (Costanza ve ark., 2017; Zhang, 2017) (Şekil 2.9). Pankreas kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada müsin kısa varyantı S1 (MUC1)'in aşırı ekspresyonunun TGF- β sinyaline bir

yanıt olarak JNK sinyal yolağını doğrudan aktive ettiği ve c-Myc ekspresyonunu upregüle ederek bu sayede hücre canlılığını arttırdığı tespit edilmiştir (Bose ve ark., 2022).

Yapılan çalışmalarda immün checkpoint seviyeleri ile EMT belirteçleri arasında pozitif korelasyon ve buna bağlı olarak kötü prognostik sonuçlar gözlemlenmiştir. Akciğer kanseri hastaların dolaşımında bulunan tümör hücrelerinin PD-L1 ile N-kadherin ve vimentin gibi EMT belirteçlerinin birlikte eksprese olduğu tespit edilmiştir. İlaveten Zeb1'in akciğer adenokarsinom hücrelerinde PD-L1'i indüklediği belirlenmiştir (Cordani ve ark., 2024). Meme kanserinde yapılan bir çalışmada immün checkpoint VISTA'nın Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2 gibi mezenkimal belirteçlerle pozitif olarak korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar VISTA ekspresyonunun meme kanserinde EMT sürecine bağlı olarak metastatik potansiyel ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Rezouki ve ark., 2023). Hepatoselüler karsinomada yapılan bir çalışmada ise TGF- β 1 ile indüklenen EMT sürecinde PD-L1 ekspresyonu upregüle olmuştur. Tüm bu sonuçlar EMT ile immün checkpoint moleküllerin düzenlenmesi arasında yakın bir ilişki olabileceğini göstermektedir (Shrestha ve ark., 2021).



Şekil 2. 9. EMT’de kanonik ve kanonik olmayan TGF-B sinyal yolağı (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir)

2.6. Kanser İlerlemesinde Önemli Sinyal Peptitleri ve Yolakları

Wnt sinyal yolağı, Wnt ailesinin salgılanan lipit modifiye proteinleri tarafından aktive edilen hücreler arası bir sinyal kaskadıdır. Wnt ligandının alıcı hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanması ile sinyal başlamaktadır (Rim ve ark., 2022). Wnt sinyalizasyonu evrimsel açıdan oldukça korunmuştur ve embriyogenez, homeostaz, doku yenilenmesi, hücre farklılaşması ve hücrelerin hareketlerinin belirlenmesine önemli katkı sağlamaktadır. Anormal seviyedeki Wnt sinyalizasyonu dejeneratif hastalıklar, diyabet, çeşitli kanser türleri ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli bozuklukların gelişmesi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Hayat ve ark., 2022). En çok çalışılan ve kritik Wnt yolağı, temel gelişimsel gen ekspresyonunu kontrol eden ko-aktivatör β -katenin miktarını düzenleyerek işlev gören kanonik Wnt sinyalizasyonudur. Wnt yokluğunda iskele proteini Axin, tümör baskılayıcı adenomatoz polipoziskoli gen ürünü, kazein kinaz 1 (CK1) ve glikojen sentaz kinaz 3'ten (GSK3) oluşan yıkıcı kompleksin etkisiyle sitoplazmik β -kateninin ubiquitinasyona uğrayarak proteazomal bozunmaya uğramaktadır (MacDonald ve ark., 2009). Wnt varlığında ise Wnt molekülü, 7 transmembran proteini Frizzled'in (Fz) sistein bakımından zengin domainine bağlanmaktadır ve ayrıca sinyalizasyonun başlaması için LRP ailesinden (LRP5/6 koreseptörleri) bir molekül de gerekmektedir. Wnt sinyalizasyonu Disheveled (Dsh)'nin fosforilasyonuna yol açmaktadır. Wnt, LRP'nin fosforilasyonunu indükleyerek Axin molekülüne bağlanmasına izin vermektedir ve yıkım kompleksin dağılması ile β -katenin fosforile olarak parçalanması önlenmektedir (Walczyńska ve ark., 2023). β -katenin birikimi çekirdeğe taşınmasına neden olur ve burada TCF/lenfosit güçlendirici bağlama faktörü-1 (LEF1) protein ailesine bağlanarak ve bu proteinlerin aktivitesini düzenleyerek transkripsiyonel bir yardımcı aktivatör görevi görmektedir (Steinhart ve ark., 2018). Transkripsiyon aktivatörü LEF1, Lenfoid arttırıcı bağlayıcı faktör 1 proteinini kodlamaktadır ve esas olarak T hücresi, B hücresi ve NK hücre gelişimi sürecinde rol oynamaktadır ancak hücre döngüsünü, EMT ve tümör gelişimi ve ilerlemesini düzenlemekle de ilişkilidir. Artan LEF1 ekspresyonu melanom, pankreas, kolorektal, meme ve mide kanseri olmak üzere farklı kanser türlerinde karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir (Blazquez ve ark., 2020; Brot ve ark., 2024; Wang ve ark., 2024b). Kolon kanserinde yapılan çalışmada LEF1'in upregülasyonunun kötü prognostik sonuç

ile ilişkili olduğu ve c-myc ve survivin genleri ile korelasyonu halinde olduğu gösterilmiştir (Gu ve ark., 2023). Pankreas kanserli hastalarda LEF1 ekspresyonunun up regülasyonunun lokal lenf nodu metastazı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Li ve ark., 2021a). β -Katenin'nin nükleer birikiminin kanser ilerlemesi, invazyonu, metastazı ve nüks gibi olumsuz klinik sonuçlarla pozitif ilişkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda β -katenin/TCF/LEF kompleksinin CD274 geninin promotör bölgesine bağlanarak PD-L1 ekspresyonunu indükleyebileceğini göstermiştir (Liu ve ark., 2024). Ancak pankreas kanserinde LEF'in tümör progresyonu, metastaz ve immün kaçış mekanizmalarındaki potansiyel rolü henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. LEF1 ekspresyonunun ve ilişkili biyolojik süreçler üzerindeki etkilerinin incelenmesi, pankreas kanserinde prognostik ve terapötik öneminin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Survivin olarak da adlandırılan BIRC5, tümör hücrelerinin hayatta kalması ve çoğalması için gerekli olan hücre döngüsü düzenlemesi, apoptoz inhibisyonu ve sitokinez dahil olmak üzere birçok temel biyolojik süreçte çok önemli bir rol oynayan X'e bağlı apoptoz inhibitörüdür (Li ve ark., 2024; Carlos ve ark., 2024). BIRC5, meme, kolon, rahim ağzı ve prostat kanserleri dahil olmak üzere birçok kanserde aşırı eksprese edilir ve kötü bir prognozla ilişkilidir (Al-Yahya ve ark., 2024). İlaveten yapılan çalışmalarda yüksek BIRC5 ekspresyon seviyesinin yumurtalık kanserinde kemorezistansını teşvik ettiği belirlenmiştir (Fan ve ark., 2024). BIRC5 ekspresyonunun p38, PI3K/AKT ve JAK/STAT gibi çeşitli sinyal yolları ile düzenlendiği bilinmektedir (Siragusa ve ark., 2024). Rapamisinin memeli hedefi (mTOR), BIRC5 ekspresyonunu düzenleyerek hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını, anjiyogenezini ve invazyonunu teşvik etmektedir (Singh vd.i 2015). Ek olarak akciğer kanserinde yapılan bir çalışmada BIRC5 ekspresyonunun mTOR aktivasyonu yoluyla PD-L1 ekspresyonunun pozitif korelasyon gösterdiği, tümör immün kaçışını indükleyerek kısmen akciğer kanseri ilerlemesini teşvik ettiği belirlenmiştir (Ma ve ark., 2022). Ancak, BIRC5'in apoptozu inhibe etme yeteneği iyi bilinse de, bu sürecin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için ve tümör immün yanıtını nasıl şekillendirdiği daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

YM155 (sepantronium bromide), BIRC5 geninin promotörüne bağlanarak gen ekspresyonunu doğrudan baskılayan inhibitör molekül olarak bilinmektedir ve akciğer,

meme ve prostat kanserinde otofajiye bağı DNA hasarı ile apoptozu indüklemektedir. Ek olarak, hücre döngüsünde mitozun ve G2M fazından G1'e geçişin ve G1'den S fazına geçişin önemli bir düzenleyicisi olarak rol oynamaktadır (Hong ve ark., 2023; Shojaei Moghadam ve ark., 2020). Çalışmalar YM155'in küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve özofagus skuamöz hücreli karsinomu da dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde radyoduyarlılaştırıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesini düşürerek EMT'yi tersine çevirdiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018). Anti-kanser aktivitesi iyi çalışılmış olsa da, YM155'in kesin etki mekanizması belirsizliğini korumaktadır (West ve ark., 2023).

Ön gradyan 2 (AGR2), endoplazmik retikulumda oksidatif protein katlanmasında rol oynayan bir endoplazmik retikulum proteinidir. Protein disülfid izomeraz (PDI) aktivitesine de sahip olan AGR2 embriyonik gelişim, mukus olgunlaşması, doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde rol oynamaktadır (Schraps ve ark., 2024). AGR2'nin tümör oluşumu ve tümör hücrelerinin yayılması ile ilişkili sinyal yollarında yer aldığı bilinmektedir (Salu ve ark., 2025). AGR2 prostat, akciğer, mide, yumurtalık, pankreas, özofagus ve baş ve boyun kanserleri dahil olmak üzere birçok kanser türünde yüksek seviyede eksprese edilmektedir ve hücre içi AGR2 ekspresyonunun apoptoz direncine ve proliferasyona katkı sağladığı bilinmektedir (Martisova ve ark., 2024). Özellikle AGR2'nin değişen ekspresyonu TGF- β yolağının düzenleyicileri ile yakından bağlantılıdır ve bu da AGR2'nin EMT ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Robinson ve ark., 2024). Pankreas kanserinde ise AGR2'nin yüksek seviyedeki ekspresyonunun tümör gelişimi, ilerlemesi ve metastazında kritik bir rol oynadığı ve zayıf hasta sağkalımı ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir (Salu ve ark., 2025). Teratom hücre hatlarında AGR2'nin glikolizi teşvik ederek hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu arttırdığı gösterilmiştir (Zhang ve Zhang 2024). Ancak, pankreas kanserinde AGR2'nin tam mekanizması ve hangi sinyal yolları aracılığıyla düzenlendiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. AGR2'nin tümör hücrelerinde hangi spesifik faktörler tarafından modüle edildiği, sinyal yolları ile olan etkileşimleri ve tümör mikroçevresine olan etkileri daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

Üç parçalı motif protein ailesi (TRIM) ubiquitin-proteazom kompleksi için substrat özgüllüğünü belirleyebilen ve proteazomdan bağımsız işleve sahip olan yüksek oranda korunmuş bir E3 ubiquitin ligaz proteini grubu olarak bilinmektedir (Cai ve ark., 2024). TRIM ailesinden olan TRIM15, hücrelerdeki substratların poliubiquitinasyonuna aracılık etmek için bir E3 ligaz görevi görmektedir ve karaciğer kanserinde, pankreas kanserinde tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Yang ve ark., 2023c). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde TRIM15'in kanser hücrelerinin proliferasyona ve metastaza neden olduğu belirlenmiştir (Liang ve ark., 2022). Pankreas kanserinde artan TRIM15 ekspresyonunun lipid anabolizmasını tetikleyerek, pankreas kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu geliştirilmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Sun ve ark., 2021). Özofagus skuamöz hücreli karsinomda da TRIM15'in upregüle olduğu, nakavt edilmesinin ise hücre çoğalması, migrasyonu ve invazyonunu engellediği gözlemlenmiştir. İlaveten TRIM15'in nakavt edilmesinin EMT ile ilişkili genler olan N-kadherin ve vimentin proteinlerinin ekspresyonunda da azalma meydana geldiği bilinmektedir (Zhang ve ark., 2021a). Artan TRIM15 ekspresyonunun mide kanseri hastalarında ise daha düşük sağkalıma neden olduğu 2018 yılında yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Chen ve ark., 2018). Bununla birlikte, kanser hücrelerinde ilaç direncine neden olan immün checkpointler ile TRIM15 arasındaki potansiyel etkileşimler henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. TRIM15'in, tümör immün kaçış mekanizmaları ve terapötik direnç süreçlerinde nasıl bir rol oynadığı daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır. Özellikle pankreas kanserinde TRIM15'in potansiyel bir biyomarker olabileceği ve hastalığın ilerleyişi ile tedaviye yanıt üzerindeki etkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, TRIM15'in ilgili sinyal yolları ile etkileşimlerinin derinlemesine incelenmesi, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

2.7. Epigenetik ve Kanser

Kanser hem genetik hem de epigenetik modifikasyonların neden olduğu kontrolsüz hücre bölünmesi olarak bilinmektedir. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin baskılanması, apoptotik sinyal yollarının inaktivasyonu ile hücre çoğalması gerçekleşmektedir (Cacan ve ark., 2014; Cacan ve ark., 2015). Düzensiz epigenetik mekanizmalar ile tümör mikroçevresinin etkilenmesi sonucunda kanser hücreleri

başıklık sisteminin baskılanmasına da neden olmaktadır (Garcia-Martinez ve ark., 2021; Wawruszak ve ark., 2021; Kumari ve ark., 2013). Epigenetik değişiklikler özellikle histon lizin asetilasyonunu sağlayan histon asetiltransferazlar (HAT'lar) ve HAT'ların zıt aktivitesine sahip histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından düzenlenmektedir. Histon kuyruklarında bulunan lizin kalıntılarındaki asetilasyon seviyesini değiştiren bu enzimler, kanser tedavisinde terapötik bir hedef haline gelmiştir (Ali ve ark., 2013). Genetik mutasyonların aksine epigenetik değişiklikler, potansiyel olarak geri dönüşümlüdür ve yeniden programlama ile geri dönüştürülebildiğinden ümit verici bir tedavi stratejisi olarak gösterilmektedir (Miranda Furtado ve ark., 2019). Epigenetik değişiklikler metastaz oluşumunda önemli bir role sahip olduğundan epigenetik düzenleyicilerin hedeflenmesi agresif seyirde olan ve geç evre hastalarının tedavisi için önemli bir rol oynamaktadır ve bu biyomarkerların kombinasyon tedavi ile birleştirilerek hedeflenmesi yeni bir tedavi stratejisi olabilir (Wang ve ark., 2021). Pankreas kanseri oluşumu, ilerlemesi ve tedaviye direnç gelişimi yönünden ele alındığında hem genetik hem de epigenetik yönleri olan bir hastalıktır (Hayashi ve ark., 2021). Bu nedenle epigenetik biyomarkerların hedeflenmesi, pankreas kanserinin ilerlemesini ve tedaviye direnç gelişimini engelleyebilir, özellikle ileri evre pankreas kanseri hastaları için yeni tedavi stratejileri sunabilir.

HDAC'ler histon asetilasyonunu tersine çevirerek gen ifadesinin azalmasına veya artmasına neden olan proteinlerdir. Kromatin yapısı gevşemiş olmasına rağmen HDAC inhibisyonu gen ifadesini her zaman arttırmamaktadır (San José-Enériz ve ark., 2019). HDAC'lerin yüksek seviyede ekspresyonu mide, kolon, prostat, over ve meme kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde gözlemlenmektedir (Cacan, 2016) Zayıf klinik sonuçlar ile ilişkili olan HDAC'lerin inhibitörünün kullanımı sonucunda ısı şok proteini 90 (HSP90) inhibisyonu, apoptoz oluşumu ve hücre döngüsü baskılanması meydana gelmiştir (Rana ve ark., 2020). Vorinostat veya suberoil-anilid hidroksamik asit (SAHA) kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) tedavisi için 2006 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (El Omari ve ark., 2024). Birçok malignite için klinik öncesi ve klinik çalışmalarda anti-tümör aktivitesi gösteren en umut verici HDAC inhibitörlerinden biri olup, kök hücre benzeri kanser hücre popülasyonunda farklılaşmayı indükleyerek tümörojeniteyi ve invazivliği azaltabilir. Ayrıca, insan akciğer kanseri hücrelerinde

radoterapinin inhibitör etkisini arttırabilir (Wu ve ark., 2017). Yapılan çalışmalar SAHA'nın meme kanseri hücre hatlarında EMT'yi güçlü bir şekilde etkilediğini göstermiştir. E-kadherin ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırırken N-kadherin, vimentin ve fibronektin belirteçlerini anlamlı şekilde baskılamıştır (Wawruszak ve ark., 2021). Meme ve akciğer kanserine ek olarak yumurtalık ve baş boyun tümörlerinde de SAHA'nın uygulandığı bilinmektedir (Huang ve ark., 2022). İlavenen glioma kök hücrelerinde SAHA kullanımı c-myc yolağını hedefleyerek T regülatör hücreleri baskılamaktadır. Bu da immün checkpoint PD-L1 blokaj tedavisini iyileştirmiştir (Sun ve ark., 2024). Tüm bunlar göz önüne alındığında pankreas kanserinde etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için SAHA'nın tümör mikroçevresine ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesine yönelik etkileri daha fazla araştırılmalıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

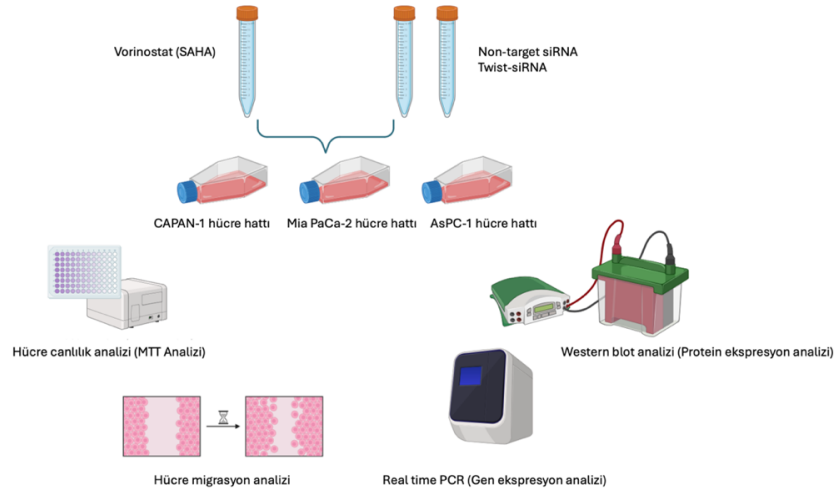
3.1. Biyoinformatik Analizler

3.1.1. Normal ve tümörlü pankreas dokularındaki hedef gen ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması

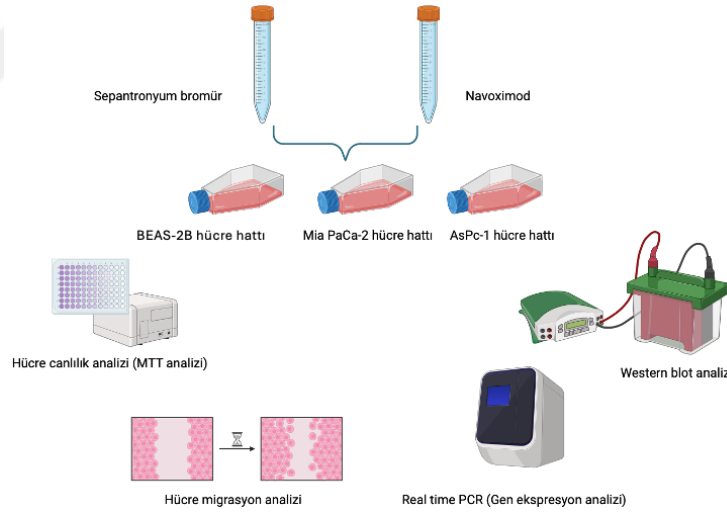
Pankreas adenokarsinomu (PAAD) olarak adlandırılan pankreas kanserli hastalar ve sağlıklı pankreas dokularında gen ekspresyon analizleri açık erişimli Gen Ekspresyon Profilleme Etkileşimli Analizi 2 (GEPIA2) veritabanı kullanılarak TCGA ve Genotip-Doku Ekspresyonu (GTEx) verileri görselleştirilmiştir. Veri setlerinde yer alan istatistiksel analizler veritabanlarına entegre olarak gerçekleştirilmiştir. Diferansiyel gen ekspresyonu analizinde one-way ANOVA kullanılmıştır. $\log_2FC$ cutoff 1, p değeri 0,05 olarak kabul edilmiştir. $\log_2(TPM + 1)$ ölçeği kullanılarak hedef genlerin RNA-Seq verileri TCGA ve GTEx verileri ile kıyaslanmıştır. Veritabanı ile Twist1, TGF- β , E-kadherin, N-kadherin, Snail, Slug, Vimentin, IDO1, IDO2, TDO, BIRC5, mTOR, PD-L1, CD155, AGR2, LEF1, HVEM, siklin D1, p21, HIF-1 α ve VISTA genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Gen ekspresyon analizi grafiğinde pankreas kanseri dokuları (179 numune) kırmızı, sağlıklı pankreas dokuları (171 numune) ise gri renk ile gösterilmektedir (Tang ve ark., 2019).

3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

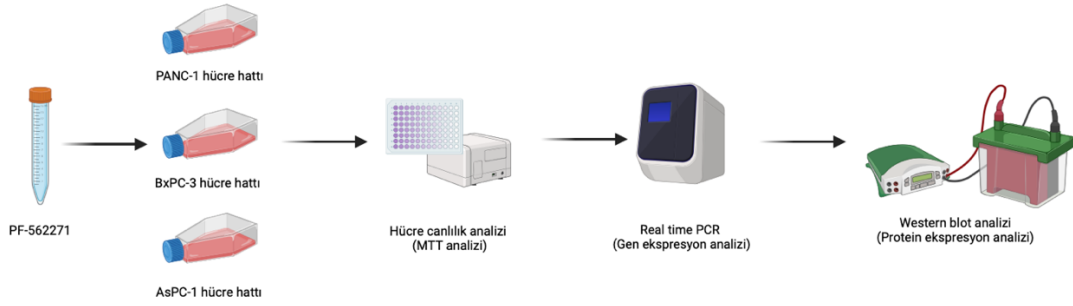
Bu tez çalışması 3 farklı kurum dışı fonlanan proje tarafından desteklendiğinden dolayı çalışmalar pankreas kanserinde farklı sinyal yollarının farklı kimyasallar/bileşikler ile baskılanarak ve/veya indüklenerek analizler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda 5 farklı pankreas kanseri hücre hattı ve 1 tane sağlıklı epitel hücre hattı kullanarak gerçekleştirilen deneylerde, ilgili sinyal yollarının hücresel süreçler ve immün checkpointler üzerindeki düzenleyici etkileri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir (Şekil 3.1-3.3).



Şekil 3. 1. Vorinostat, Twist-siRNA ve Non target-siRNA (NT-siRNA) bileşiklerinin pankreas kanseri hücre hatlarına ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanması ile yürütülen çalışmaların şematik gösterimi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir). Yürütülen çalışmalar TÜBİTAK 1002-A kapsamında desteklenmiştir



Şekil 3. 2. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin pankreas kanseri ve sağlıklı epitel hücre hatlarına ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanması ile yürütülen çalışmaların şematik gösterimi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir). Yürütülen çalışmalar TÜSEB A4 kapsamında desteklenmiştir



Şekil 3. 3. PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücre hatlarına uygulanması ile yürütülen çalışmaların şematik gösterimi (Biorender.com aracılığıyla çizilmiştir). Yürütülen çalışmalar TÜBİTAK 1002-A kapsamında desteklenmiştir

3.2.1. Hücre hatları ve çoğaltılması

Bu tez kapsamında 5 farklı insan pankreas kanseri hücre hattı PANC-1, BxPC-3, Mia PaCa-2, AsPC-1, CAPAN-1 ve sağlıklı akciğer epitel hücresi BEAS-2B kullanılmıştır. Hücre hatlarındaki farklı genomik ve metabolik farklılıklardan ötürü ilaç uygulamasının hücrelerdeki yanıtı farklı olabilmektedir.

AsPC-1 hücre hattı (ATCC, CRL-1682) pankreas kanseri olan 62 yaşındaki beyaz bir kadın hastanın pankreasından alınan hücrelerle başlatılan çıplak fare ksenograftlarından türetilen hücre hattıdır. Mia PaCa-2 hücre hattı (ATCC, CRL-1420) 1975'te 65 yaşındaki beyaz bir erkeğin pankreas tümör dokusundan elde edilen insan pankreas karsinom hücre hattıdır. Doğal tip SMAD4 genine, mutant KRAS'a (12 Cys), mutant TP53'e (248 Trp) ve CDKN2A/p16'nın homozigot delesyonuna sahip olan Mia PaCa-2 hücre hattı son derece metastatik özelliğe sahiptir. CAPAN-1 hücre hattı (ATCC, HTB-79) pankreas adenokarsinomlu 40 yaşındaki beyaz bir erkeğin pankreasından izole edilen epitel morfolojisine sahip bir hücre hattıdır (Sevgin, 2020; <https://www.atcc.org/products> Erişim tarihi: 15.02.2024). BEAS-2B hücre hattı (ATCC, CRL-3588) kanserli olmayan bireylerden türetilen normal insan bronşiyal epitelinden izole edilen epitel hücre hattıdır. PANC-1 hücre hattı (ATCC, CRL-1469) 56 yaşında epitelioid karsinomaya sahip bir erkeğin pankreas kanalından izole edilmiş epitel morfolojiye sahip hücre hattıdır. BxPC-3 hücre hattı (ATCC, CRL-1687) adenokarsinomlu 61 yaşında kadın bir hastanın pankreas dokusundan izole edilen epitel morfolojiye sahip hücre hattıdır (<https://www.atcc.org/products> Erişim tarihi: 20.02.2025).

Mia PaCa-2, PANC-1 ve CAPAN-1 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco, ABD) ve %1 penisilin-streptomisin (Biowest, Fransa) ilave edilen DMEM (Gibco, ABD) besiyerinde, AsPC-1, BEAS-2B ve BxPC-3 hücreleri ise RPMI-1640 (Biowest, Fransa) besiyeri hazırlanarak 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde yeterli doluluk oranına ulaşınca kadar inkübasyona bırakılarak kültüre edilmiştir. Hücre hatları, ışık mikroskobu altında morfolojileri kontrol edildikten sonra, stok almak için her bir hücre hattı kendi besiyerinde %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanarak dondurulmuştur.

Hücre sayımı için T75 flaskta bulunan hücreler %0,25 tripsin-EDTA (1X) çözeltisi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılmıştır. 3500 rpm’de 3 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pellet 1 mL hücre besiyerinde çözdürülmüştür. Çözeltiden 10 µL alınmıştır ve tripan blue boyası ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra neubauer lamında sayılmıştır.

$$\text{mL'deki canlı hücre sayısı} = \frac{4 \text{ farklı kare içersindeki canlı hücre sayısı}}{4} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

3.2.2. siRNA’ların hücre hatlarına transfeksiyonu

Thermo Fisher Scientific protokolüne göre Twist-siRNA ve NT-siRNA’lar 5000 pmol toz siRNA olarak satın alınmıştır ve üzerine 1,5 mL nükleas free su eklenerek çözdürülmüştür. Protokole göre 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi için şu adımlar uygulanmıştır:

- ◆ Mia PaCa-2, AsPC-1, CAPAN-1 hücre hatları 96 kuyucuklu platelere her kuyucukta 5000 hücre olarak şekilde ekilmiştir.
- ◆ 96 kuyucuklu plate için her bir kuyucuk başına olacak şekilde 5 µL serumsuz besiyeri + 0,3 µL lipofectamine 3000 (Invitrogen, ABD) 1. tüp için hazırlanmıştır.
- ◆ Her bir kuyucuk başına olacak şekilde 5 µL serumsuz besiyeri + 3pmol siRNA (0,9 µL) 2. tüp için hazırlanmıştır.
- ◆ Tüp 1 ve tüp 2’den 1:1 oranında karışım elde edilerek oda koşullarında 10 dakika bekletilmiştir.

- ◆ Her kuyucuğa 200 µL taze serumsuz besiyeri eklenmiştir. Üzerine kuyucuk başına 10 µL tüp 1 + tüp 2 karışımından eklenmiştir.
- ◆ 48 saat inkübasyondan sonra hücre proliferasyon analizi (MTT analizi) yapılmıştır.

Üretici firma protokole göre gen ekspresyon analizi (qRT-PCR) öncesinde şu adımlar uygulanmıştır:

- ◆ 6 kuyucuklu plate için her kuyucuk başına 1.tüp 125 µL serumsuz besiyeri + 7,5 µL lipofectamine 3000 olacak şekilde hazırlanmıştır.
- ◆ 2.tüp ise her kuyucuk başına 125 µL serumsuz besiyeri + 75 pmol siRNA (22,5 µL) olacak şekilde hazırlanmıştır.
- ◆ Tüp 1 ve tüp 2'den 1:1 oranında karışım elde edilerek oda koşullarında 10 dakika bekletilmiştir.
- ◆ Her kuyucuğa 1000 µL serumsuz besiyeri eklendikten sonra kuyucuk başına 125 µL 1 ve tüp 2 karışımından eklenmiştir.
- ◆ 48 saat inkübasyondan sonra RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
(Protein izolasyonu için siRNA transfeksiyon süresi 72 saat olarak uygulanmıştır.)

3.2.3. Kimyasal bileşiklerin hücre hatlarına uygulanması

Twist-siRNA ve Vorinostat Uygulaması Çalışmaları

Mia PaCa-2, AsPC-1, CAPAN-1 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (0,1-200 µM) HDAC inhibitörü vorinostat bileşiği uygulanmıştır.

- ◆ Vorinostat (Ambeed, ABD) %2,5 DMSO ile çözündürülerek 100.000 µM stok çözelti hazırlanmıştır. DMSO'nun nihai konsantrasyonu hücreler üzerine toksik olmayacak düzeyde (%0,1) tutulmuştur.
- ◆ 100.000 µM stok çözelti vorinostat bileşiğinden 0,1-200 µM konsantrasyonlarda hazırlanarak 3 tekrarlı olacak şekilde Mia PaCa-2, AsPC-1, CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerine 48 saat boyunca uygulanmıştır (Susanto ve ark., 2015).

Sepantronyum Bromür ve Navoximod Uygulaması Çalışmaları

IDO1 inhibitörü Navoximod (Ambeed, ABD) 0,1-200 μ M konsantrasyonlarda ve BIRC5 inhibitörü sepantronyum bromür (Ambeed, ABD) ise 0,1-200 nM konsantrasyonlarında hazırlanmıştır (Chen ve ark., 2023; Zhang ve ark., 2015). Her iki bileşik ana stoklarının hazırlanması için DMSO ile çözdürülmüştür . Nihai DMSO konsantrasyonu hücelere toksik olmayacak düzeyde (%0,1) tutulmuştur. 3 tekrarlı olacak şekilde Mia PaCa-2, AsPC-1, BEAS-2B hücre hatlarına 48 saat boyunca uygulanmıştır.

PF-562271 Uygulaması

Fokal adezyon kinaz (FAK) inhibitörü PF-562271 bileşiğı (Ambeed, ABD) DMSO ile çözdürülerek ana stok $\text{çözelti haline getirilmiştir}$. Bileşik hücelere uygulanacağında DMSO'nun nihai konsantrasyonu hücreler üzerinde toksik olmayacak düzeyde (%0,1) tutulmuştur. 0,1-100 μ M konsantrasyonlarda hazırlanan PF-562271 bileşiğı PANC-1, BxPC-3, AsPC-1 hücre hatlarına 3 tekrarlı olacak şekilde 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır (Hu ve ark., 2017).

İmportazole Uygulaması

İmportazole bileşiğı (MedChemExpress, ABD) ana stok hazırlamak için DMSO ile çözdürülmüş , ardından bileşiğın 1-250 μ M konsantrasyonları nihai DMSO konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde AsPC-1 hücre hattına 48 saat boyunca uygulanmıştır (Yoshino ve ark., 2021).

3.2.4. Hücre canlılık analizi (MTT analizi)

Twist-siRNA ve Vorinostat Uygulaması Çalışmaları

Vorinostat bileşiğı ve Twist-siRNA'nın Mia PaCa-2, CAPAN-1 ve AsPC-1 hücreleri üzerine sitotoksik etki yapıp yapmadığını ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini anlamak için ayrı ayrı ve kombinasyon halinde hücre hatlarına uygulandıktan sonra MTT analizi yapılmıştır. Analiz için 96 kuyucuklu platelere her birinde ortalama 5000 hücre olacak şekilde hücelere uygun besiyeri içinde ekim yapılmıştır ve hücrelerin plate yüzeyine tutunması için hücreler gece boyunca %5 CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir.

- ◆ Sürenin sonunda eski besiyeri çekilerek farklı konsantrasyonlarda (0,1-200 μ M) hazırlanmış olan vorinostat, 3 tekrarlı olacak şekilde pankreas kanseri hücrelerine 48 saat boyunca uygulanarak inkübe edilmiştir.
- ◆ Pankreas kanseri hücre hatlarında Twist1 geninin susturulmasının hücre sitotoksitesisi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla Twist-siRNA ve NT-siRNA 3 pmol konsantrasyonda hazırlanmıştır. Hücre hatlarına uygulandıktan sonra 48 saatlik transfeksiyon süresi boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
- ◆ Kombinasyon tedavi etkinliğinin gözlemlenebilmesi için vorinostat bileşiğinin her hücre için hesaplanan IC₅₀ dozu ve 3 pmol Twist-siRNA pankreas kanseri hücre hatlarına uygulanmış ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süreçleri sonunda MTT analizi gerçekleştirilmiştir. 0,5 mg/mL MTT (Serva, Almanya) bileşiği PBS ile çözdürülerek hazırlanmıştır. Yapılan tüm tedaviler için bileşiklerin uygulama süresi sonunda kuyucuklardan uygulanan bileşikler ve eski besiyeri çekilip, 20 μ L MTT solüsyonu eklenmiştir. Hücreler 3 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda MTT solüsyonu dökülüp, 100 μ L DMSO eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Absorbans değeri mikropate okuyucuda 570 nm'de okunmuştur. İlaç uygulanmış gruptaki absorbans değeri / kontrol grubunun hücre canlılık oranı) x 100 işlemi yapılarak hücre ölümüne etki eden ilaç uygulama süresi hesaplanmıştır (Şentürk ve ark., 2025).

Vorinostat uygulanması sonrasında IC₅₀ değeri belirlenmesi için doz-hücre canlılığı (%) eğrisi çizilmiştir.

- ◆ Vorinostat ile Twist1-siRNA'nın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi için vorinostat bileşiğinin IC₅₀ dozu ve üretici firmanın önerdiği doz olan 3 pmol siRNA kombinasyonu hücre proliferasyon analizi (MTT analizi), hücre migrasyon analizi, gen ekspresyon seviyesi ve protein seviyesi tespiti için kullanılmıştır.

Sepantronyum Bromür ve Navoximod Uygulaması Çalışmaları

Sepantronyum bromür ile navoximodun ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücreleri üzerine sitotoksik etki yapıp yapmadığını anlamak için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için 96 kuyucuklu platelere her birinde ortalama 5000 hücre olacak şekilde hücrelere uygun besiyeri içinde ekim yapılmıştır ve gece boyunca hücreler %5 CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda eski besiyeri çekilerek farklı konsantrasyonlara sahip sepantronyum bromür ile navoximod BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücrelerine ayrı ayrı uygulandıktan MTT analizi ile optimum dozlar tespit edilmiştir. Kombinasyon uygulaması için 1 ve 5 nM sepantronyum bromür, 10 ve 25 µM navoximod konsantrasyonları seçilmiş olup tekrar 48 saat boyunca uygulanmıştır. Süre sonunda 3.2.4.1.de yer alan MTT protokolü uygulanmıştır.

PF-562271 Uygulaması

PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla MTT analizi yapılmıştır. 96 kuyucuklu platelere her birinde ortalama 5000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye tutunması için gece boyunca inkübasyona bırakılan hücrelerden süre sonunda eski besiyeri çekilmiştir ve PF-562271 bileşiği 0,1-100 µM konsantrasyon aralığında taze besiyeri içerisinde uygulanmıştır. Bileşiğin 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 3.2.4.1.de yer alan MTT protokolü uygulanmıştır.

İmportazole Uygulaması

İmportazole bileşiğinin AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla MTT analizi yapılmıştır. Analiz için 96 kuyucuklu platelere her birinde ortalama 5000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve gece boyunca hücreler %5 CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir. İmportazole bileşiği, hücrelere 48 saat boyunca 1-250 µM konsantrasyon aralığında uygulanmış ve uygulama süresinin sonunda 3.2.4.1 numaralı başlıkta belirtilen MTT protokolü doğrultusunda hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Hücre migrasyon analizi (Wound healing analizi)

Twist1-siRNA ve Vorinostat Uygulaması Çalışmaları

Vorinostat ile Twist1-siRNA'nın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde hücre hatlarına uygulanmasının hücrelerinin migrasyon yeteneğini hangi seviyede etkilediğini gözlemlemek için hücre migrasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Mia PaCa-2, AsPC-1 ve CAPAN-1 hücreleri 6 kuyucuklu platelere her kuyucukta yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve %80-90 doluluk oranına ulaşan hücre hatları üzerinde eski besiyeri uzaklaştırılmadan 200 μ L'lik pipet ucu yardımıyla kuyucuğun orta hizasında manuel olarak yara alanı oluşturulmuştur (Li ve ark., 2023b). Daha sonra eski besiyeri uzaklaştırılıp hücreler 2 defa PBS ile yıkanarak yüzeyde kalan hücre parçaları uzaklaştırılmıştır. MTT analizi sonucuna göre her hücre hattı için hesaplanan vorinostat bileşiğinin IC₅₀ dozu ile 3 pmol Twist-siRNA'nın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulandığındaki uygun dozları seçilecek olup 6 kuyucuklu platelere eklenmiştir. Ardından 0, 24 ve 48. saatlerde 5x boyutta hücre migrasyon alanlarının fotoğrafları çekilmiştir (Menevşe Çınar, 2022). Görüntüler Image j programı ile işlenmiştir. Hücre migrasyon analizi 3 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

Sepantronyum Bromür ve Navoximod Uygulaması Çalışmaları

1 ve 5 nM sepantronyum bromür ile 10 ve 25 μ M navoximodun ayrı ayrı ve kombinasyon halinde hücre hatlarına uygulanmasının hücrelerinin migrasyon yeteneğini hangi seviyede etkilediğini gözlemlemek için hücre migrasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için 3.2.5.1 numaralı başlıkta belirtilen protokol uygulanmıştır.

PF-562271 Bileşiği Uygulaması Çalışmaları

PF-562271 bileşiğinin 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarda pankreas kanseri hücre hatlarına uygulanmasının hücre migrasyon yeteneği üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla hücre migrasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için 3.2.5.1 numaralı başlıkta belirtilen protokol uygulanmıştır.

3.2.6. Koloni oluşum analizi

PF-562271 kimyasalının pankreas kanseri hücrelerinin koloni oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi için koloni oluşum analizi gerçekleştirilmiştir. PANC-1, AsPC-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücre hatları 6 kuyucuklu platelere her kuyuda yaklaşık 1500 hücre olacak şekilde eklenmiştir ve bir gece 37°C’de %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra eski besiyeri çekilerek taze besiyeri içerisinde 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda PF-562271 bileşiği hücrelere 48 saat boyunca uygulanmıştır. Süre sonunda eski besiyeri atılarak taze besiyeri eklenmiş ve koloni oluşumu gerçekleşene kadar 14 gün boyunca hücreler beslenmiştir. 14 günün sonunda hücreler 2 kere PBS ile yıkanmıştır. %4 metanol ile oda koşullarında 15 dakika fıkse edilmiştir. Daha sonra metanol atılıp 2 kere PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Koloniler üzerine kristal violet eklendikten sonra 15 dakika beklenmiştir. Süre sonunda hücreler tekrar PBS ile yıkanmıştır ve koloniler İmage J program ile sayılmış, % koloni oluşumu hesaplanmıştır (Valdez ve ark., 2024).

3.2.7. Hücrelerden total RNA izolasyonu

Twist-siRNA ve Vorinostat Uygulaması alışmaları

Pankreas kanseri hücreleri 6 kuyucuklu platelere her kuyucukta 10⁶ hücre olacak şekilde ekilmiştir ve bir gece 37°C’de %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra eski besiyeri çekilerek uygulama yapılmamış kontrol grubu, vorinostat bileşiğinin IC₅₀ dozu uygulanmış olan grubu, 3pmol Twist-siRNA, 3pmol NT-siRNA ve vorinostat IC₅₀ dozu + 3pmol Twist-siRNA olmak üzere 5 farklı grup oluşturularak 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Hibrizol (HibriGen, Türkiye) reaktifi kullanılarak firmanın önerdiği protokol doğrultusunda aşağıdaki adımlar sırasıyla uygulanmıştır:

- ◆ Eski besiyeri dökülmeden tüm hücreler hücre kazıyıcı ile kazınarak bir ependorfa alınmıştır ve 3000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- ◆ Süpernatant atılarak pellet üzerine 500 µL Hibrizol reaktifi ilave edilmiştir. Pellet çözünene kadar pipetaj yapılarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 100 µL kloroform eklenerek 7-8 defa karıştırılmıştır ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- ◆ 12.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz dikkatli bir şekilde üst sulu faz ayrılarak yeni bir tüpe aktarılmıştır.
 - ◆ 250 µL soğuk izopropil alkol eklenerek tüp birkaç kez çevrilmiştir ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
 - ◆ İnkübasyondan sonra 12.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
 - ◆ Süpernatant dökülerek pellet üzerine 1 mL %75'lik etanol eklenmiştir. Yavaş bir şekilde tüp alt üst edildikten sonra 12.000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
 - ◆ Santrifüj sonunda süpernatant atılarak pellet steril kabin içerisinde 30 dakika kurumaya bırakılmıştır.
 - ◆ Pellet 30 µL nükleas free su ile çözündürülerek saklamak için -80°C'de tutulmuştur.
- RNA izolasyonu sonrasında RNA'ların konsantrasyonlarının ölçülmesi için MaestroNano Micro-Volume Spektrofotometre kullanılmıştır.

Sepantronyum Bromür ve Navoximod Uygulaması Çalışmaları

Mia PaCa-2 ve AsPC-1 pankreas kanseri hücre hatları ve BEAS-2B sağlıklı epitel hücre hattı 6 kuyucuklu plakelere her kuyucukta yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde ekildikten sonra tam doluluk sağlanana kadar inkübe edilmiştir. Sepantronyum bromür ve navoximodun MTT analizi sonucunda tespit edilen optimum dozları (sepantronyum bromür için 1 nM ve navoximod için 25 µM) ayrı ayrı ve kombinasyon halinde BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarına 48 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası 3.2.7.1'de yer alan RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

PF-562271 Uygulaması

Mia PaCa-2, PANC-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücre hatları 6 kuyucuklu plakelere her kuyuda yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde ekildikten sonra tam doluluk sağlanana kadar inkübe edilmiştir. MTT analizi sonunda 3 hücre hattı için PF-562271 kimyasalının optimum dozları 48 saat için 1 ve 5 µM olarak olacak şekilde hesaplanmıştır. Hücreler tam doluluk sağladıktan sonra eski besiyeri atılmış ve 1 ve 5 µM PF-562271 dozları yeni besiyeri içerisinde hücrelere uygulanmış ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 3.2.7.1'de yer alan RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

İmportazole Uygulaması

AsPC-1 hücreleri 6 well platelere her kuyucukta yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde ekildikten sonra tam doluluk sağlanana kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda eski besiyeri çekilmiştir ve importazole bileşiği taze besiyeri ile AsPC-1 hücre hattına uygulanmıştır. Uygulanan konsantrasyon MTT analizi sonucunda elde edilen optimum konsantrasyonlar olan 5 ve 10 μM seçilmiştir ve hücrelere 48 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası 3.2.7.1’de yer alan RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

3.2.8. Real time PCR’da kullanılan primer dizileri ve reaksiyonun hazırlanması

Twist1, TGF- β , E-kadherin, N-kadherin, Snail, Slug, Vimentin, IDO1, IDO2, TDO, BIRC5, mTOR, PD-L1, CD155, VISTA, AGR2, LEF1, HVEM, siklin D1, p21, HIF-1 α ve GAPDH genlerine spesifik primerler “Macrogen” firmasından sipariş verildi. Liyofilize halde gelen primerler spin yapıldıktan sonra satın alınan firmanın protokolüne göre 100pmol/ μL olacak şekilde 250 μL nükleaz free suda çözündürüldü. Oda koşullarında 10 dakika bekledikten sonra -20 °C’de saklandı. Primerler qRT-PCR’da kullanmak için 10pmol/ μL konsantrasyon olacak şekilde nükleaz free su ile seyreltilti. Kullanılan primer sekansları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3. 1. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan qRT-PCR’da kullanılan primerlerin dizileri

Gen	Primer Dizisi
Twist1	F: 5’ TCC GCA GTC TTA CGA GGA GCT ‘3 R: 5’ TCT GAA TCT TGC TCA GCT TGT CCG ‘3
E-kadherin	F: 5’ ATT TTT CCC TCG ACA CCC GAT ‘3 R: 5’ TCC CAG GCG TAG ACC AAG A ‘3
N-kadherin	F: 5’ CCT CCA GAG TTT ACT GCC ATG AC ‘3 R: 5’ GTA GGA TCT CCG CCA CTG ATT C ‘3
Vimentin	F: 5’ ACG TCT TGA CCT TGA ACG CA ‘3 R: 5’ TCT TGG CAG CCA CAC TTT CA ‘3

Tablo 3. 2. (Devam) Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan qRT-PCR’da kullanılan primerlerin dizileri

Gen	Primer Dizisi
Snail	F: 5’ TGC CCT CAA GAT GCA CAT CCG A ‘3 R: 5’ GGG ACA GGA AGA AGG GCT TCT C ‘3
Slug	F: 5’ ATC TGC GGC AAG GCG TTT TCC A ‘3 R: 5’ GAG CCC TCA GAT TTG ACC TGT C ‘3
TGF-Beta	F: 5’ GCC AGA GTG GTT ATC TTT TGA TG ‘3 R: 5’ AGT GTG TTA TCC CTG CTG TCA C ‘3
Mir21	F: 5’ GCG GCG TAG CTT ATC AGA CTG A ‘3 R: 5’ GTG CAG GGT CCG AGG T ‘3
VISTA	F: 5’ GAT AGC GGC CTC TAC TGC TG ‘3 R: 5’ TGG ATG GTG CAT CTT TGC CT ‘3
TRIM15	F: 5’ TCCCTGAAGGTGGTCCATGAG ‘3 R: 5’ CAGGATCTTGCCCGAGGATT ‘3
BAX	F: 5’ GAC ATT GGA CTT CCT CCG GGA ‘3 R: 5’ ACA AAG ATG GTC ACG GTC TGC ‘3
BCL-2	F: 5’ TGG ACA ACA TCG CCC TGT GGA ‘3 R: 5’ TCA CTT GTG GCC CAG ATA GGC A ‘3
BIRC5	F: 5’ ACC GCA TCT CTA CAT TCA AG ‘3 R: 5’ CAA GTC TGG CTC GTT CTG ‘3
IDO1	F: 5’ GGC TTC TTC CTC GTC TCTCTATTG ‘3 R: 5’ TGACGCTCTACTGCACTGGATAC ‘3
IDO2	F: 5’ GTG GGG CTG GTC TAT GAA GGT G ‘3 R: 5’ TGG TGG CAG CGG AGA TAA TGT A ‘3
TDO	F: 5’ CGG TGG TTC CTC AGG CTA TC ‘3 R: 5’ CTT CGG TAT CCA GTG TCG GG ‘3
PD-L1	F: 5’ AGG GCA TTC CAG AAA GAT GAG ‘3 R: 5’ TTG GGA ACC GTG ACA GTA AT ‘3
mTOR	F: 5’ AGT GGA CCA GTG GAA AGA GG ‘3 R: 5’ TTC AGG GAT GTC TTG TGA GG ‘3

Tablo 3. 3. (Devam) Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan qRT-PCR’da kullanılan primerlerin dizileri

Gen	Primer Dizisi
CD155	F: 5’GCG TAG AGG ATG AAG GCA ACT ‘3 R: 5’CAA GCA CTC GGA GCC AGA TAT ‘3
AGR2	F: 5’CTT GTG GCC CTC TCC TAC AC ‘3 R: 5’GTC CAG ATG AGT TGGTCACCC ‘3
LEF1	F: 5’GAC GAG ATG ATC CCC TTC AA ‘3 R: 5’CGG GAT GAT TTC AGA CTC GT ‘3
HVEM	F: 5’GTG CAG TCC AGG TTA TCG TGT ‘3 R: 5’CAC TTG CTT AGG CCA TTG AGG ‘3
Siklin D1	F: 5’GCT GCG AAG TGG AAA CCA TC ‘3 R: 5’CCT CCT TCT GCA CACA TTT GAA ‘3
p21	F: 5’CTC CTT CCC ATC GCT GTC AC ‘3 R: 5’TCA CCC TGC CCA ACC TTA GA ‘3
HIF-1α	F: 5’CGC AAG TCC TCA AAG CAC AGT TAC ‘3 R: 5’GCA GTG GTA GTG GTG GCA TTA GC ‘3
GAPDH	F: 5’ AAG GTG AAG GTC GGA GTC AA ‘3 R: 5’ AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG ‘3

Kantitatif Real Time PCR

Twist-siRNA ve Vorinostat Uygulaması Çalışmaları

Twist-siRNA ve vorinostat bileşiğinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının pankreas kanseri hücre hatları CAPAN-1, Mia PaCa-2 ve AsPC-1’deki hedef gen ekspresyon profilleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi için qRT-PCR (BioRad) yapılmıştır.

qRT-PCR deneyleri için tek adımlı PCR imkanı tanıyan kit “Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit” ile gen ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir. Kite ait önerilen protokol ve bileşenlerin konsantrasyonları her bir reaksiyon için Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3. 4. qRT-PCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı

İçerikler	Hacim
Luna Universal One-Step Reaksiyon Mix (2x)	5 µL
Luna WarmStart RT Enzim Mix (20x)	0,5 µL
Forward primer (10 µM)	0,5 µL
Reverse primer (10 µM)	0,5 µL
Template RNA	<1 µg (total RNA)
Nuclease-free su	10 µL’ye tamamlanır

qRT-PCR “BioRad CFX Connect Real-Time PCR System” cihazı ile analiz gerçekleştirilmiştir ve uygulanan protokol Tablo 3.3’deki gibidir.

Tablo 3. 5. qRT-PCR protokolü

Aşamalar	Döngü sayısı	Sıcaklık ve Süre
Reverse Transkriptaz	1	55 °C 15 dakika
Başlangıç Denatürasyonu	1	95°C 3 dakika
Amplifikasyon	40	95°C 10 saniye
		Tm-5 °C 30 saniye
		72°C 30 saniye
Soğuma	1	37°C, 30 saniye

qRT-PCR ile yapılan amplifikasyon sonuçları için bir housekeeping gen olan GAPDH genine ait transkriptler kontrol ve deney grupları arasındaki normalizasyon için kullanılmıştır.

Vorinostat uygulanan deney grupları kontrol grubu ile, Twist-siRNA uygulanan deney grupları ise NT-siRNA uygulanan grubu ile normalize edilmiştir. Rölatif gen ekspresyonu hesabı için $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) yöntemi kullanılmıştır (Livak ve ark., 2001; Kucuk ve ark., 2021).

Sepantronyum Bromür ve Navoximod Uygulaması Çalışmaları

BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarına 1 nM sepantronyum bromür ve 25 µM navoximod bileşikleri ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmıştır. Hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişim oranının tespit edilmesi için “BioRad” qRT-PCR cihazı ile yapılmıştır. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiği uygulanan deney grupları uygulama yapılmayan kontrol grubu ile normalize edildi. Rölatif gen ekspresyonu hesabı için $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) yöntemi kullanılmıştır (Livak ve ark., 2001; Kucuk ve ark., 2021).

İmportazole uygulaması çalışmaları

İmportazole bileşiği AsPC-1 hücre hattına 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişim oranının tespit edilmesi için “BioRad” qRT-PCR cihazı ile analiz yapılmıştır. İmportazole bileşiği uygulanan deney grupları uygulama yapılmayan kontrol grubu ile normalize edildi. Rölatif gen ekspresyonu hesabı için $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) yöntemi kullanılmıştır (Livak ve ark., 2001; Kucuk ve ark., 2021).

PF-562271 Uygulaması Çalışmaları

BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatlarına PF-562271 bileşiğinin 1 ve 5 µM dozları 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişim oranının tespit edilmesi için “BioRad” qRT-PCR cihazı ile analiz yapılmıştır. PF-562271 bileşiği uygulanan deney grupları uygulama yapılmayan kontrol grubu ile normalize edildi. Rölatif gen ekspresyonu hesabı için $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) yöntemi kullanılmıştır (Livak ve ark., 2001; Kucuk ve ark., 2021).

3.2.9. Hücrelerden protein izolasyonu

Hücre hatları protein izolasyonu için 6 kuyucuklu platelere her kuyucukta yaklaşık 10^6 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve %80-90 oranında konfluent olana kadar 37°C’de %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Twist-siRNA ve Vorinostat Uygulaması Çalışmaları

İnkübasyon süresi bittikten sonra eski besiyeri çekilerek vorinostat IC₅₀ dozu ve 3pmol Twist-siRNA ayrı ayrı ve kombinasyon halinde 72 saat boyunca uygulanmıştır. Kontrol grubu, 3 pmol NT-siRNA, vorinostat IC₅₀ dozu, 3pmol Twist-siRNA ve kombinasyon uygulaması olmak üzere 5 farklı grup oluşturulmuştur. Süre sonunda protein izolasyonu protokolü uygulanmıştır.

Sepantronyum Bromür ve Navoximod Uygulaması Çalışmaları

İnkübasyon süresinin ardından eski besiyeri çekilmiştir ve yeni besiyeri içerisinde sepantronyum bromür ve navoximodun MTT analizi sonucunda tespit edilen optimum dozları (sepantronyum bromür için 1 nM ve navoximod için 25 µM) ayrı ayrı ve kombinasyon halinde hazırlanarak BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarına 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda protein izolasyonu protokolü uygulanmıştır.

PF-562271 Uygulaması Çalışmaları

İnkübasyon süresinin ardından eski besiyeri çekilmiştir ve yeni besiyeri içerisinde PF-562271 bileşiğinin 1 ve 5 µM dozları 48 saat boyunca pankreas kanseri hücre hatları PANC-1, BxPC-3, AsPC-1'e uygulanmıştır. Süre sonunda protein izolasyonu protokolü uygulanmıştır.

Tüm protein izolasyonu protokolleri radyoimmünopresipitasyon assay (RIPA) tamponu ile yapılmıştır. RIPA tamponu 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton-X, %0,1 SDS, %0,5 sodyum deoksilat pH 7,6 olacak şekilde 250 mL'ye distile su ile hazırlanmıştır. İçerisine 250 mM sodyum florür, 50 mM sodyum ortovanadat, 50 mM fenilmetil sülfonil florür olmak üzere 3 tane proteaz ve fosfataz inhibitörü eklenmiştir.

Tüm çalışmalar için inkübasyon süresi sonrası aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

- ◆ Eski besiyeri dökülmeden tüm hücreler hücre kazıyıcı ile kazınarak bir ependorfa alınmıştır ve 3500 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- ◆ Süpernatant döküldükten sonra her bir ependorfa 1000 µL PBS eklenmiştir ve tekrar 3500 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- ◆ Pelletin üzerine her bir kuyucuk için 200 µL RIPA tamponu eklenmiştir. Buzun üzerinde 30 dakika boyunca her 5 dakika da bir vortexlenmiştir.
- ◆ 12.000 rpm’de 20 dakika +4 °C’de santrifüj edilmiştir.
- ◆ Süpernatant alınıp yeni bir tüpe aktararak -80°C’de saklanmıştır.

3.2.10. Örneklerdeki protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

Örneklerdeki protein konsantrasyonları “Pierce BCA Protein Assay Kit” (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. BCA yöntemine göre çeşitli konsantrasyonlarda (25-2000 µg/mL) bovine serum albümin (BSA) standartları oluşturulup, BCA çalışma solüsyonları ile inkübe edilmiştir.

Protokole göre şu adımlar gerçekleştirilmiştir:

- ◆ BSA veya konsantrasyonu bilinmeyen protein örneklerinden mikropate kuyucuklarından her birine 3 tekrarlı olacak şekilde 25 µL eklenmiştir.
- ◆ Her kuyucuk başına 200 µL çalışma solüsyonu eklenerek 30 saniye boyunca plaka çalkalayıcısında karıştırılmıştır.
- ◆ Plate kapatıldıktan sonra 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir ve daha sonra oda sıcaklığına kadar plate soğutulmuştur.
- ◆ Mikropate okuyucu ile 562 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür.

3.2.11. Proteinlerin elektroforezde yürütülmesi, proteinlerin membrana transferi, membranın bloklanması, proteinlerin membran üzerinde antikorlar ile gösterimi ve protein bantlarının görüntülenmesi

BCA kiti ile yapılan analiz sonrasında konsantrasyonları hesaplanan proteinler 2x Laemmli buffer (BioRad, ABD) (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, %25 gliserol, %2 SDS, %0,01 bromfenol mavi) ve β-merkaptoetanol ile karıştırılmıştır. 95 °C 6 dakika boyunca inkübe edilmiştir ve proteinlerin denatürasyon olmaları sağlanmıştır. Elde edilen lizatlar deneyde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır. Tablo 3.4’te yer alan

konsantrasyonlarda sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jeli hazırlanarak proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır.

Tablo 3. 6. Ayırma jeli (%12) ve yükleme jeli (%5) için hazırlık bileşenleri ve hacimleri

	%12 Ayırma Jeli	%5 Yükleme Jeli
Distile su	3,8 mL	5,86 mL
%30 Akrilamid	3,4 mL	1,34 mL
1,5 M Tris HCl pH 8.8	2,6 mL	-
0,5 M Tris HCl pH 6.8	-	2,6 mL
%10 APS	100 mL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL
%10 SDS	100 µL	100 µL

Çalışma tamponu (10x) pH 8.3 250 mM Tris-base, 1,92 M glisin, %1 SDS kullanılarak hazırlanmıştır. Tanklarda kullanılmak üzere çalışma tamponu 1x'e seyreltilmiştir. 80 volt 10 dakika ilk yürütme yapıldıktan sonra 175 volt 75 dakika olmak üzere yürütme işlemi devam etmiştir.

- ◆ Elektroforez sonrasında jelin membrana transfer aşaması için jel, filtre kağıtları ve nitroselüloz membran (0,45 µm, Bio-Rad) soğuk transfer tamponu ile ıslatılarak 5 dakika bekletilmiştir.

Transfer tamponu (1x) 25 mM Tris-base, 190 mM glisin, 0,4 gram SDS ve %20 metanol kullanılarak hazırlanmıştır.

- ◆ Proteinin jelden membrana transfer işlemi için filtre kağıdı-membran-jel-filtre kağıdı olacak şekilde düzenek yerleştirilmiştir ve 1,3 amper 25 volt 12 dakika boyunca transfer gerçekleştirilmiştir.
- ◆ 1x %0,1 Tween 20 içeren 1x tris tamponlu salin (TBS) ile hazırlanan %4'lük yağsız süt tozu çözeltisi hazırlanmıştır ve 1 saat boyunca 37 °C'de shaker üzerinde bloklama yapılmıştır.

TBS (10x) çözeltisi 20 mM Tris-Base ve 150 mM NaCl pH 7.6 olacak şekilde hazırlanmıştır. 1x TBS-T ise TBS 10x'ten 100 mL, 1 mL Tween 20 ve final hacim 1 litreye distile su ile tamamlanmıştır.

- ◆ İnkübasyon süresi sonrasında 5 dakika 1x TBS-T ile bekletilerek yıkanmıştır.
- ◆ İmmün checkpoint VISTA (Rabbit, Cell signaling; 1:1000 dilüsyon oranında), immün checkpoint HVEM, CD155 ve PD-L1 (Mouse, Santa Cruz; 1:500 dilüsyon oranında) ve β -Aktin (Mouse, Genscript, HRP konjuge; 1:5000 dilüsyon oranında) antikoru %4'lük yağsız süt tozu solüsyonunda hazırlanmıştır.
- ◆ Membranın yüzeyi kaplanacak şekilde eklenerek 1 gece +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
- ◆ İnkübasyon süresi sonunda 3 kez 5 dakika boyunca 1x TBS-T ile bekletilerek çalkalayıcı üzerinde yıkama yapılmıştır.
- ◆ HRP (Horseradish peroksidaz) bağlı sekonder antikor 10 mL %4'lük yağsız süt tozu solüsyonunda 1:5000 dilüsyon oranında hazırlanmıştır ve 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
- ◆ İnkübasyondan sonra 3 kez 5 dakika boyunca 1x TBS/T ile bekletilerek çalkalayıcı üzerinde yıkama yapılmıştır.
- ◆ Görüntüleme için membran üzerine 2 mL kemilüminesans reaktifi (Bio-Rad, Clarity Western ECL Substrate, ABD) eklenerek karanlıkta 1 dakika bekletildikten sonra görüntüleme cihazı yardımıyla (Fusion FX-7, Vilber, Almanya) görüntüleme yapılmıştır (Erden, 2021).

Görüntüler Image J programında analiz edilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism® V.9.5.0 (GraphPad software) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler normal dağıldığında grup ortalamalarını karşılaştırmak için student's t testi (two-tailed distribution) kullanarak analiz edilmiştir. qRT-PCR verileri ortalama +SEM olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farkı karşılaştırmak için two-way ANOVA kullanılmıştır. Anlamlılık p değeri hesaplanarak incelenmiştir ve $p < 0,05$ istatistiksel fark olarak kabul edilmiştir. $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$

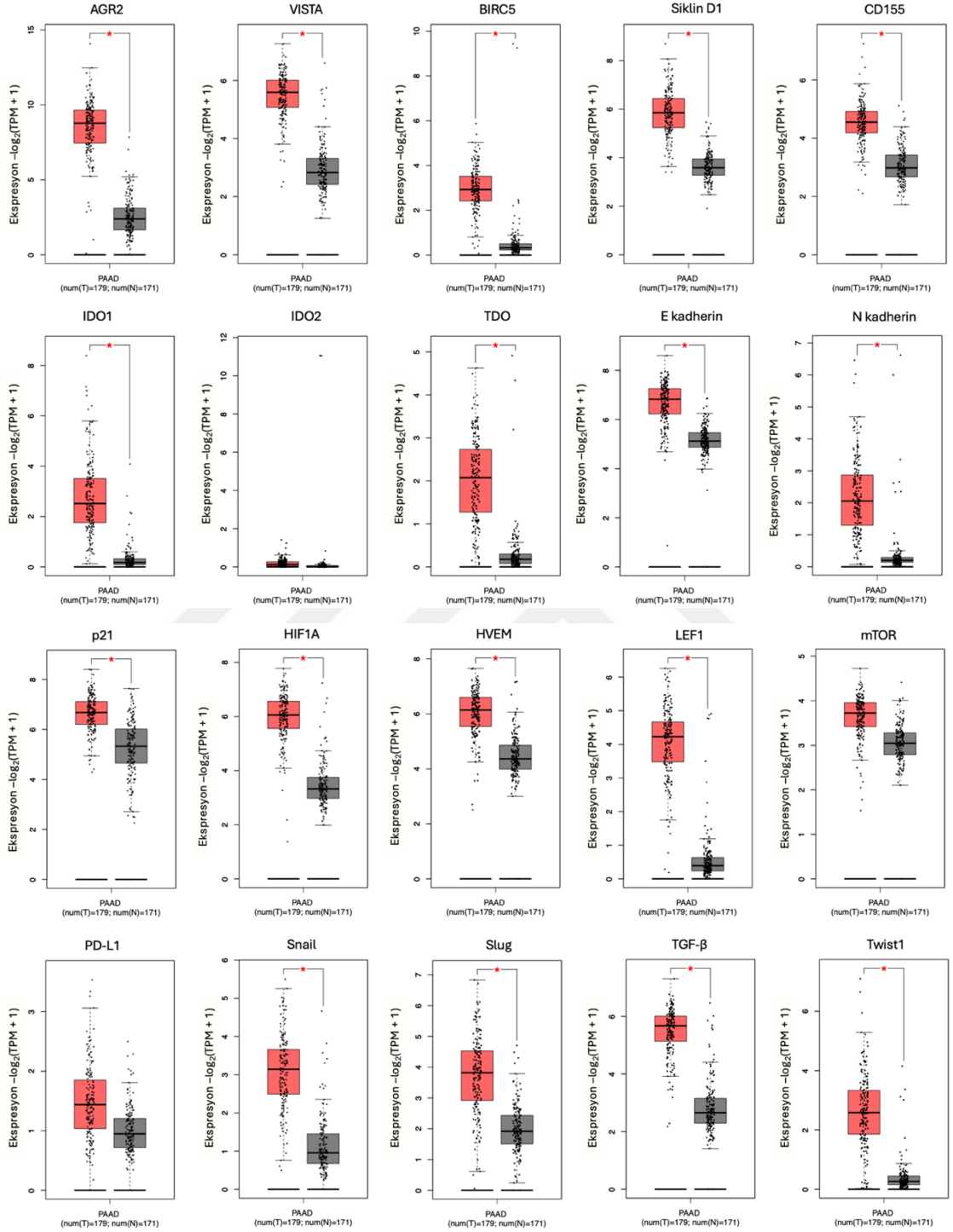
4. SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen verilerin bir kısmı aşağıda yer alan dergide yayınlanmıştır.

Topcu, K. S. B., & Cacan, E. (2025). Twist1 Regulates the Immune Checkpoint VISTA and Promotes the Proliferation, Migration and Progression of Pancreatic Cancer Cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 29(9), e70586.

4.1. Pankreas Kanseri ve Sağlıklı Dokularda İmmün Checkpoint Moleküllerin ve Çeşitli Sinyal Yolaklarından Sorumlu Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyesi

171 normal/sağlıklı pankreas dokuları ve 179 pankreas kanseri dokularında Twist1, TGF- β , E kadherin, N kadherin, Snail, Slug, Vimentin, IDO1, IDO2, TDO, BIRC5, mTOR, PD-L1, CD155, AGR2, LEF1, HVEM, siklin D1, p21, HIF-1 α ve VISTA mRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Twist1, TGF- β , E kadherin, N kadherin, Snail, Slug, Vimentin, IDO1, TDO, BIRC5, CD155, AGR2, LEF1, HVEM, siklin D1, p21, HIF-1 α ve VISTA mRNA seviyeleri sağlıklı dokulara kıyasla pankreas kanseri dokularında daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

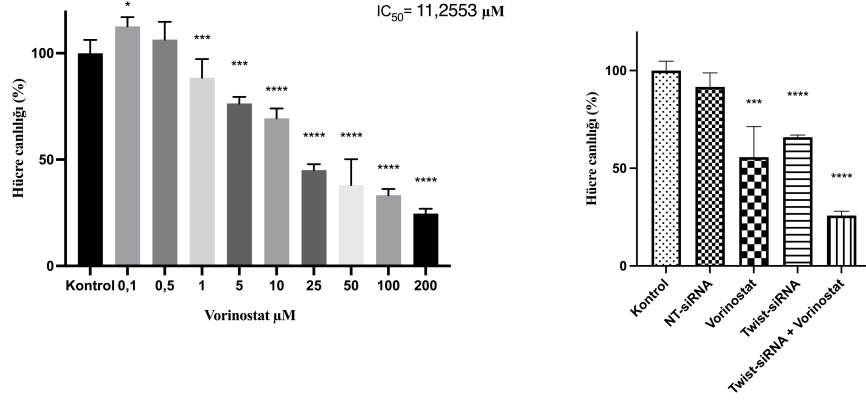


Şekil 4. 1.Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri normal pankreas dokularına (gri, 171 numune) kıyasla pankreas kanseri dokularında (kırmızı, 179 numune) artmıştır. $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$;****: $p \leq 0,0001$

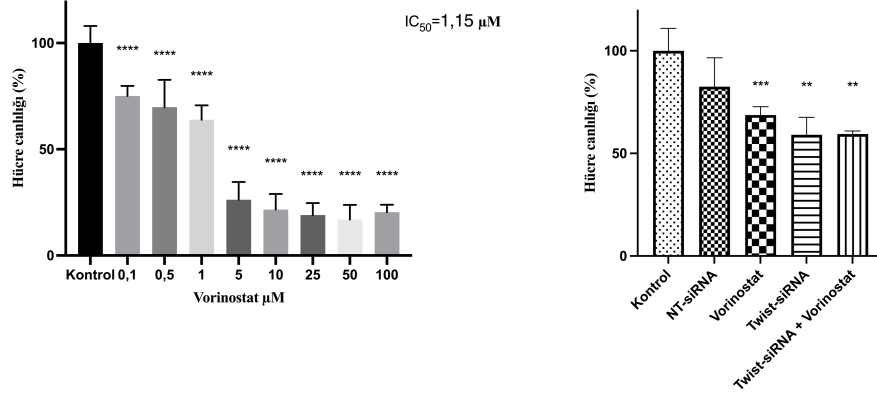
4.2. Vorinostat Bileşigi ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Pankreas Kanseri Hücre Canlılığına Etkisi

Twist1 geninin vorinostat bileşigi ile pankreas kanseri hücre hatları üzerinde sinerjik bir etki oluşturarak hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi için hücre canlılık analizi (MTT analizi) yapıldı. Hücrelere 48 saatlik 0,1-200 μ M dozlarda vorinostat uygulaması 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Vorinostat uygulanmış hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile kontrol grubu hücrelerinin ortalama absorbans değerleri oranlanarak hücre canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. 48 saat boyunca vorinostat uygulanmış CAPAN-1, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarında IC₅₀ değeri sırasıyla 11,2553, 1,15 ve 1,182 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). IC₅₀ dozları “AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>)” tarafından sağlanan çevrimiçi hesaplayıcı kullanılarak hesaplanmıştır. Pankreas kanseri hücre hatlarındaki kombinasyon tedavi için 3 pmol Twist-siRNA ve her hücre için ayrı ayrı belirlenen IC₅₀ dozlarındaki vorinostat bileşigi ile 48 saat muamele edilmiştir. Sonuçlar hücrelere 3pmol NT-siRNA kullanımına kıyasla 3 pmol Twist-siRNA transfeksiyonunun hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığını göstermektedir. Ayrıca her 3 hücre hattında da NT-siRNA uygulanan gruba kıyasla Twist-siRNA ve vorinostatın kombinasyon halinde kullanımı sinerjistik bir şekilde hücre canlılığını azaltmıştır (Şekil 4.2). Özellikle CAPAN-1 hücrelerinde, tekli tedavilere göre kombinasyon tedavisi hücre canlılığını daha etkili bir şekilde azaltmıştır.

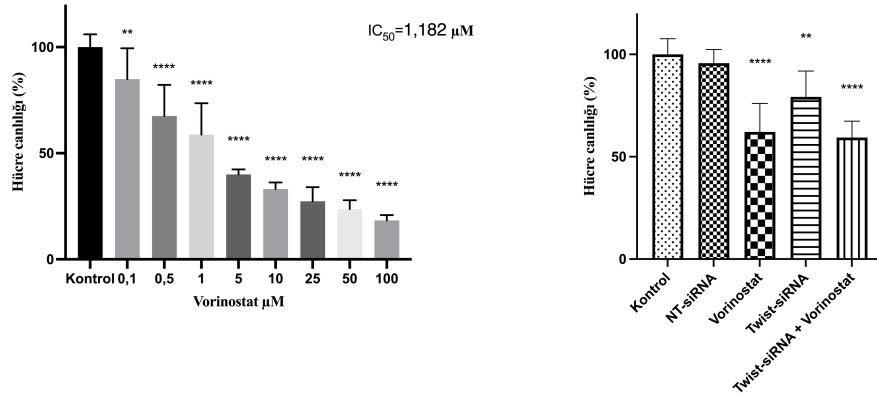
CAPAN-1 Hücre Hattı



Mia PaCa-2 Hücre Hattı



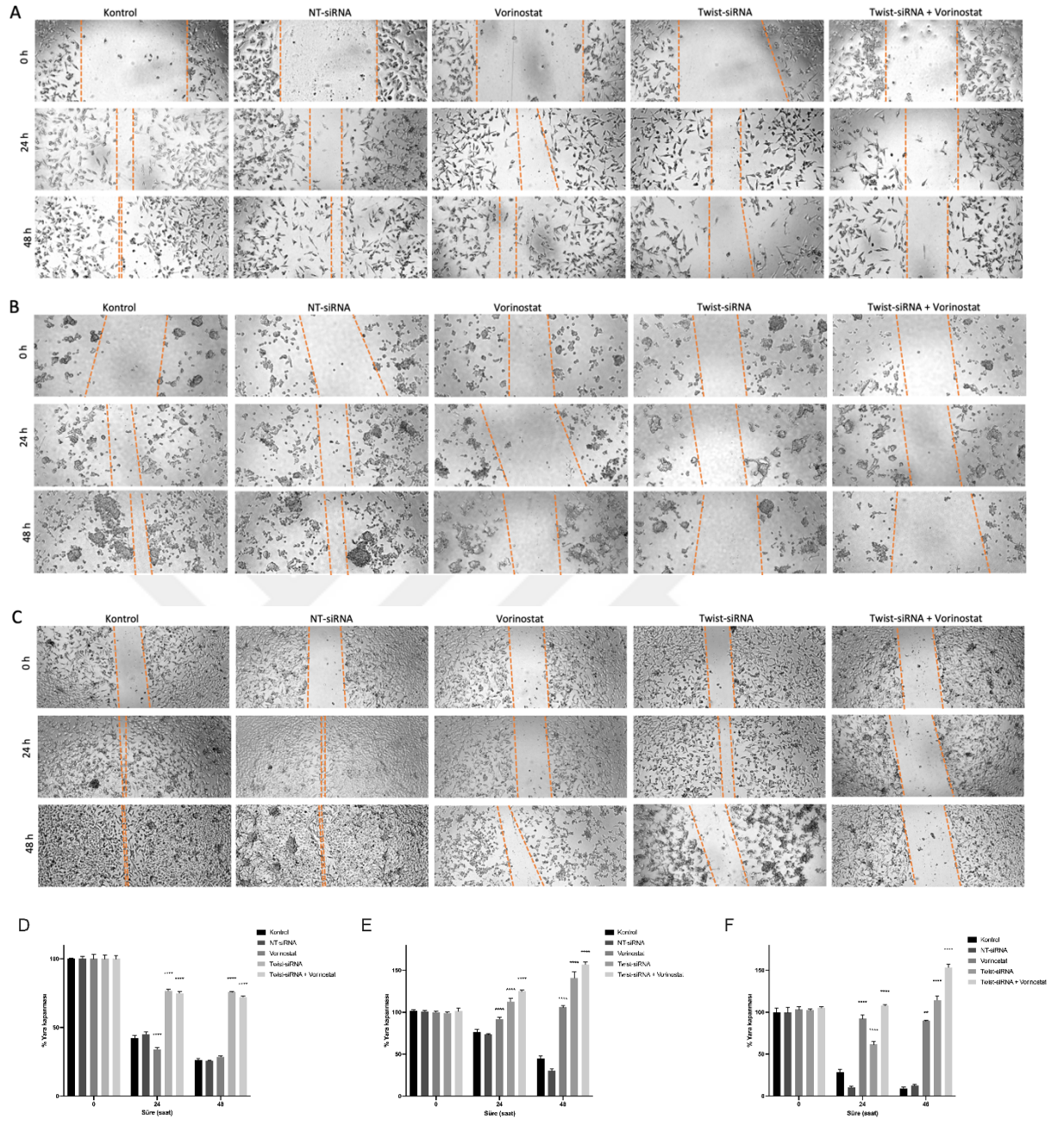
AsPC-1 Hücre Hattı



Şekil 4. 2. CAPAN-1, Mia PaCa-2, AsPC-1 pankreas kanseri hücre hatlarına vorinostat ve Twist-siRNA'nın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi

4.3. Vorinostat Bileşigi ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Pankreas Kanseri Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkisi

Hücre migrasyon analizi, Twist-siRNA transfeksiyonu ve vorinostat tedavisinin hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini anlamak için gerçekleştirildi. Vorinostat ve Twist-siRNA'nın CAPAN-1 ve AsPC-1 hücre hatlarında birlikte kullanımının, ayrı uygulamalarına kıyasla hücre göçünü daha etkili bir şekilde engellediği gösterilmiştir (Şekil 4.3). Bu bulgular, Twist-siRNA ve vorinostat bileşiğinin kombinasyon halinde kullanımının tek başına kullanılmasına kıyasla pankreas kanserinde hücre göçünü baskılamada daha güçlü bir etkiye sahip olduğunu açıkça göstermektedir.

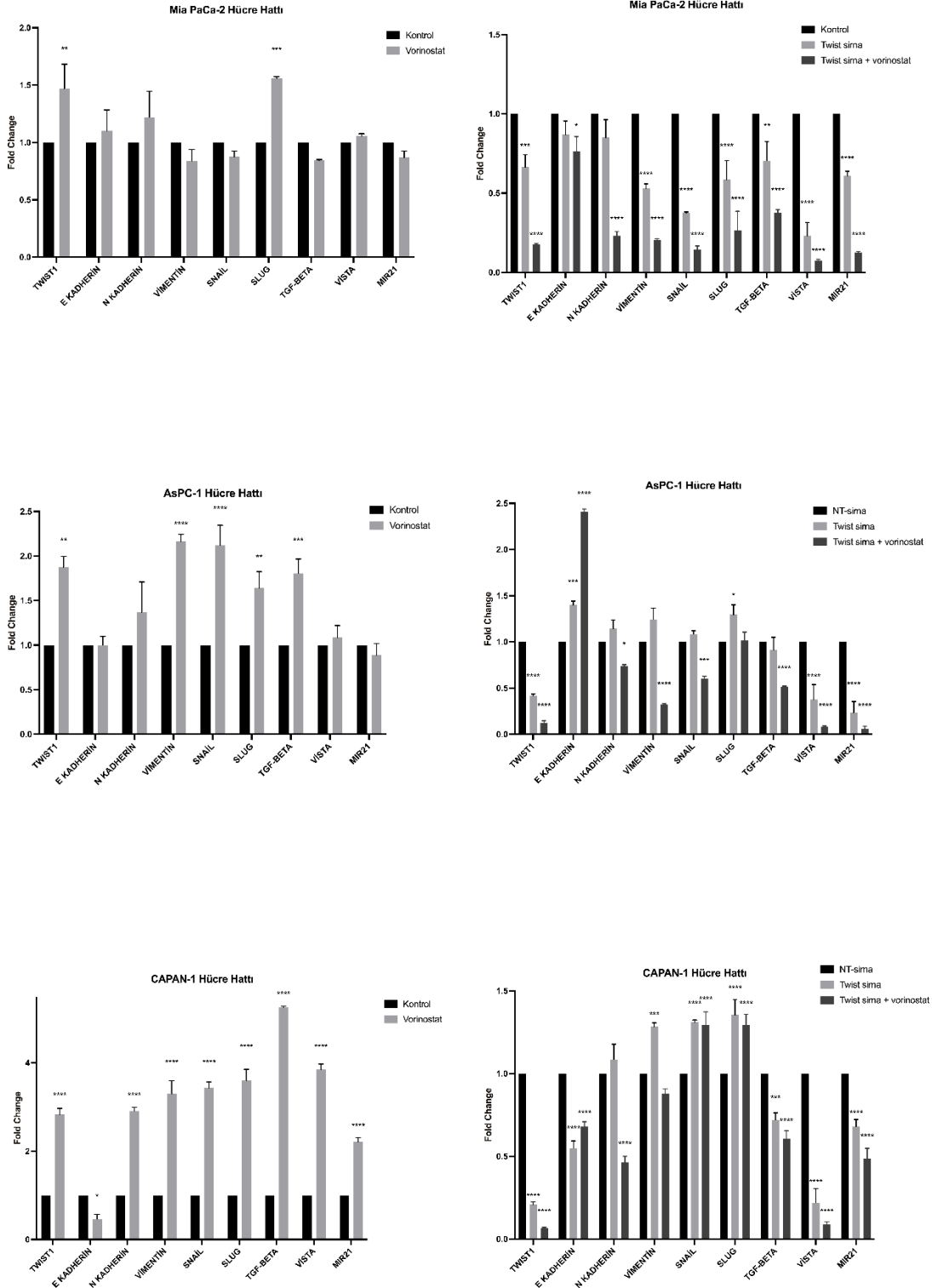


Şekil 4. 3. Vorinostat ve Twist-siRNA'nın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının pankreas kanseri hücre migrasyonu üzerindeki etkisi. Vorinostat bileşiğinin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki IC50 değeri hesaplandıktan sonra, Twist-siRNA ile kombinasyon tedavisi sırasıyla Mia PaCa-2 (A,D), AsPC-1 (B,E) ve CAPAN-1 (C,F) hücrelerine uygulandı ve hücre migrasyon analizine tabi tutuldu. Hücre göçü analizindeki hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)

4.4. Vorinostat Bileşigi ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun EMT ile İlişkili Genler ve İmmün Checkpoint VISTA Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Pankreas kanserine vorinostat uygulaması, EMT ile ilişkili genlerin ve VISTA'nın mRNA seviyesini arttırmaktadır. Sonuçlar, CAPAN-1 (11,25 μ M vorinostat) ve AsPC-1 (1,182 μ M vorinostat) hücre hatlarında EMT ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinde önemli bir artış olduğunu ortaya koydu. Özellikle, vorinostat tedavisi üç pankreas kanseri hücre hattında (Mia PaCa-2, AsPC-1, CAPAN-1), Twist1 mRNA seviyesinde önemli ölçüde up regülasyona neden olmuştur. Ayrıca, CAPAN-1 hücre hattında vorinostat tedavisi, kontrol grubuna kıyasla VISTA'nın mRNA seviyesinde 3.5 kat artışa yol açmıştır (Şekil 4.4). Bu bulgular, vorinostatın düşük dozlarda bile EMT ile ilişkili genleri etkileyebileceğini ve VISTA ifadesini artırabileceğini, potansiyel olarak pankreas kanseri ilerlemesi ve bağışıklık modülasyonundaki rolünü göstermektedir.

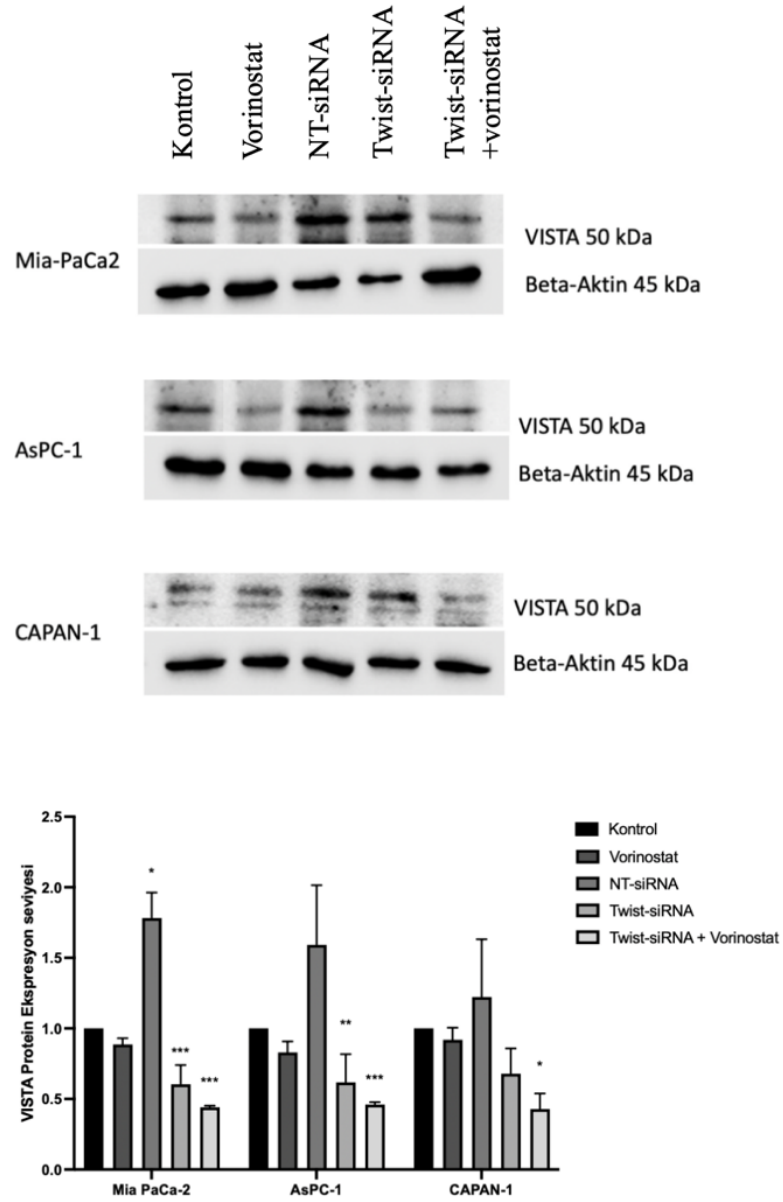
Twist1'in pankreas kanserinde immün checkpoint VISTA'yı modüle etmedeki rolünü daha da açıklamak için, Twist-siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Twist-siRNA transfeksiyonunu takiben, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinde belirgin bir azalma gözlemlendi. Ayrıca bu knockdown üç pankreas kanseri hücre hattında (Mia PaCa-2, AsPC-1, CAPAN-1) VISTA'nın mRNA seviyesini önemli ölçüde baskılamıştır. Vorinostat ve Twist-siRNA'nın kombinasyon halinde uygulanması yalnızca Twist-siRNA transfeksiyonu ile karşılaştırıldığında, vorinostat ile kombinasyonun EMT ile ilişkili genlerin ve immün checkpoint VISTA'nın mRNA seviyesini daha etkili bir şekilde bastırdığını göstermektedir (Şekil 4.4). Bu sonuçlar, Twist1 susturulması ve vorinostatın kombinasyon halinde uygulanmasının hem EMT ile ilişkili genlerin hem de immün checkpoint VISTA'nın pankreas kanserinde modüle edilmesinde olası bir sinerjik etki oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 4. Pankreas kanseri hücre hatlarına ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanan vorinostat ve Twist-siRNA'nın hedef genlerin mRNA seviyelerindeki gen ekspresyon kat değişimine etkisi

4.5. Vorinostat Bileşigi ve Twist-siRNA Transfeksiyonunun İmmün Checkpoint VISTA Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

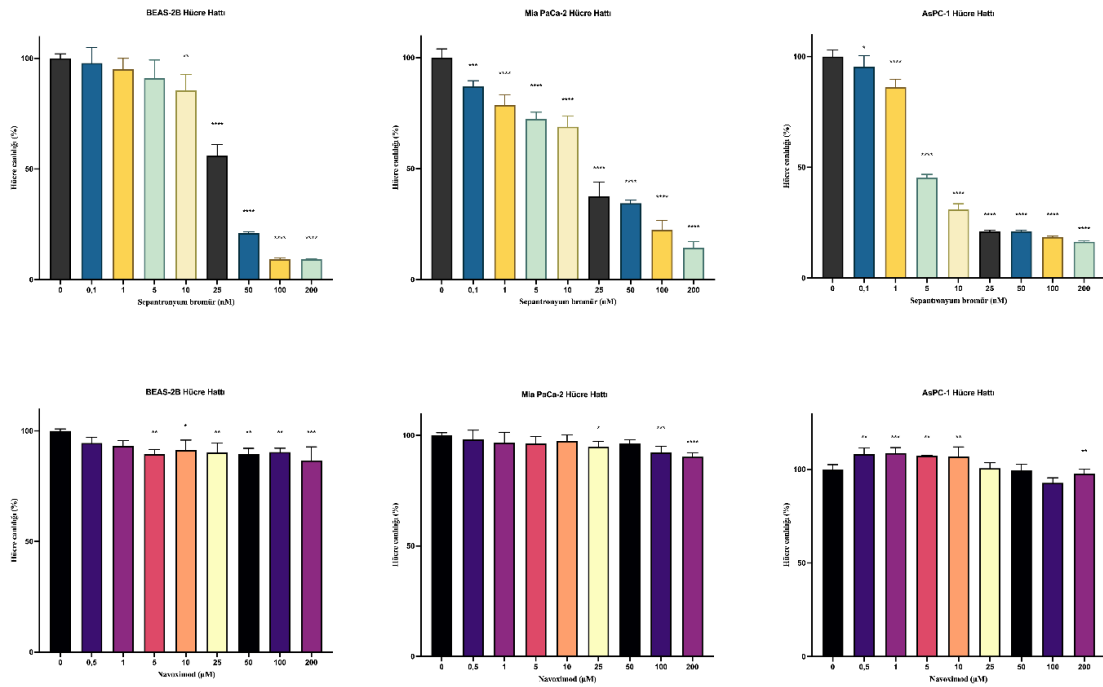
HDAC inhibitörü vorinostat, Twist-siRNA transfeksiyonu ve kombinasyon tedavisinin pankreas kanseri hücrelerinde immün checkpoint VISTA'nın protein seviyesi üzerindeki etkisini belirlemek için western blot analizi yapıldı. Sonuçlar pankreas kanseri hücrelerinde vorinostat uygulamasını takiben VISTA protein düzeyinde önemli bir değişiklik olmadığını gösterdi. Twist-siRNA transfeksiyonu ile karşılaştırıldığında, Twist-siRNA transfeksiyonu ve vorinostat tedavisinin kombinasyonu VISTA protein düzeyini önemli ölçüde azaltmıştır. Bulgular, Twist1'in pankreas kanseri hücrelerinde VISTA ekspresyonunu düzenleyebileceğini göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. Twist-siRNA ve vorinostat bileşiğinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulamasından sonra AsPC-1, CAPAN-1, Mia PaCa-2 hücrelerindeki western blot görüntüleri ve VISTA protein ekspresyon seviyeleri

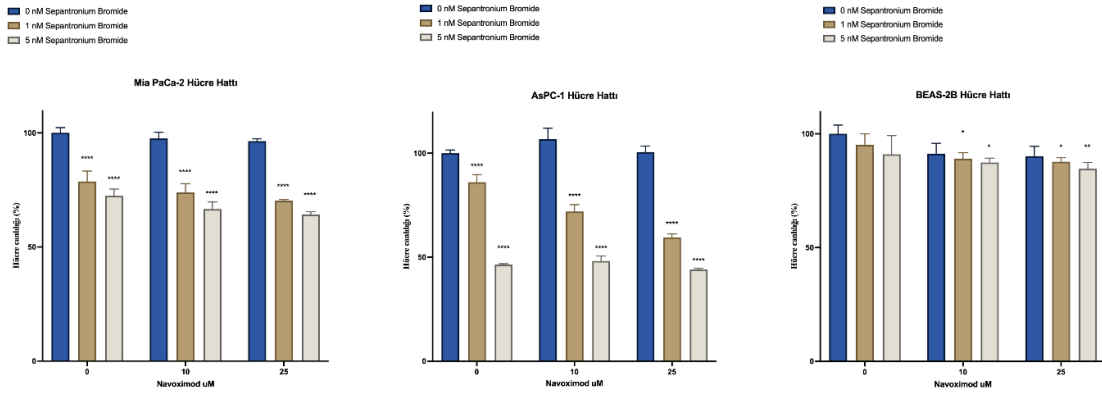
4.6. Sepantronyum Bromür ve Navoximod Bileşiklerinin Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Pankreas Kanseri ve Sağlıklı Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

Pankreas kanseri hücre hatları Mia PaCa-2 ve AsPC-1, sağlıklı hücre hattı BEAS-2B'ye sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin sitotoksik etki yapıp yapmadığını gözlemlemek için MTT analizi yapıldı. 48 saat boyunca sepantronyum bromür bileşiğinin pankreas kanseri hücrelerine uygulanması hücre canlılığını anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.6). Buna rağmen navoximod bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda pankreas kanseri ve sağlıklı hücre hatlarına 48 saat boyunca uygulanması hücre canlılığı üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Sepantronyum bromür bileşiğinin 48 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ dozu BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarında sırasıyla 27,25 nM, 22,93 nM ve 4,66 nM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 6. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin 48 saat boyunca uygulanmasının BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi

MTT analizi sonrasında kombinasyon çalışmalarında kullanılmak üzere sepantronyum bromür (1 ve 5 nM) ve navoximod (10 ve 25 μ M) bileşiklerinin 2 farklı konsantrasyonu seçilerek pankreas kanseri ve sağlıklı hücelere 48 saat boyunca uygulanmıştır (Şekil 4.7). Yapılan kombinasyon analizi sonucunda hücre migrasyon, mRNA ve protein ekspresyon analizleri için sepantronyum bromür için 1 nM ve navoximod bileşiği içinse 25 μ M konsantrasyonları seçilmiştir.

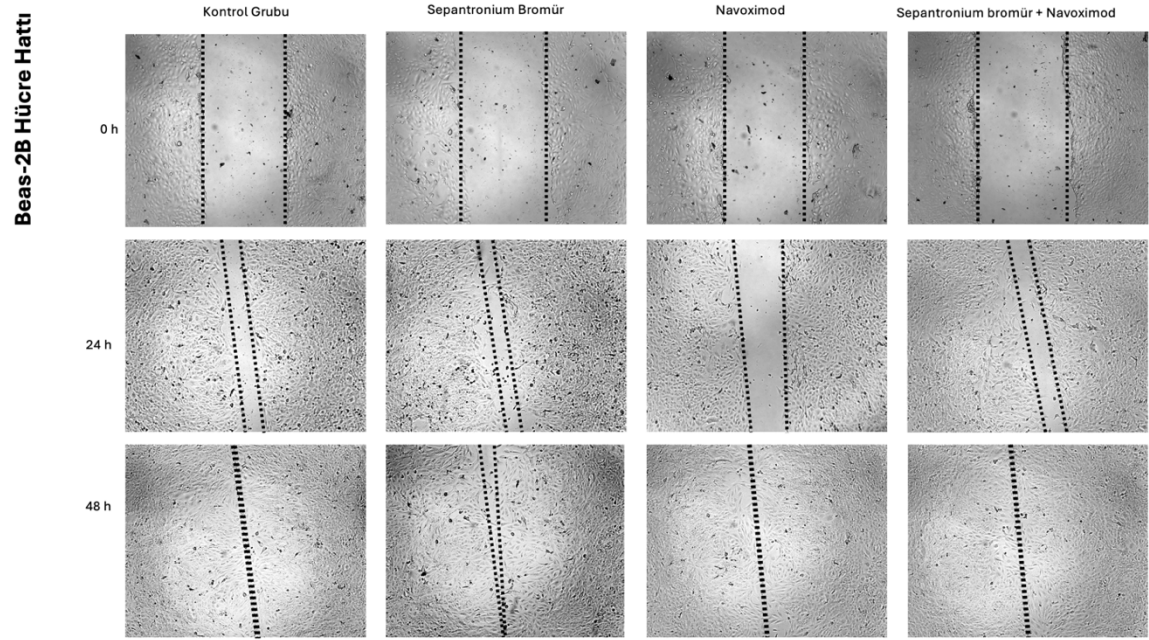


Şekil 4. 7. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin kombinasyon halinde 48 saat boyunca uygulanmasının BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi

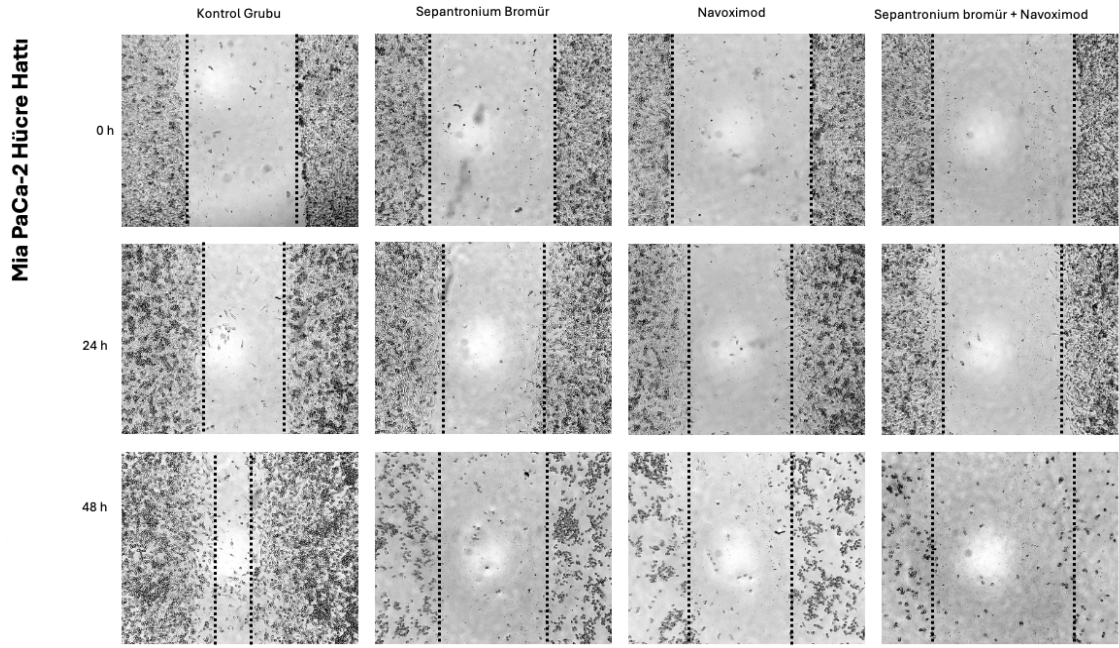
4.7. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının pankreas kanseri ve sağlıklı hücre migrasyonu üzerindeki etkisi

Hücre migrasyon analizi için BEAS 2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarına 1 nM sepantronyum bromür ve 25 μ M navoximod ayrı ayrı ve kombinasyon halinde 48 saat boyunca uygulanmıştır. BEAS 2B hücrelerine kimyasalların ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanması kontrol grubuna kıyasla hücre migrasyonunu etkilememiştir (Şekil 4.8). Ancak Mia PaCa-2 sepantronyum bromür ve navoximod kimyasallarının tek uygulanmasına kıyasla kombinasyon halinde uygulandığındaki hücre migrasyonu anlamlı şekilde baskılanmıştır (Şekil 4.9). AsPC-1 hücre hattına 48 saat boyunca ayrı ayrı sepantronyum bromür ve navoximod uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre göçünü

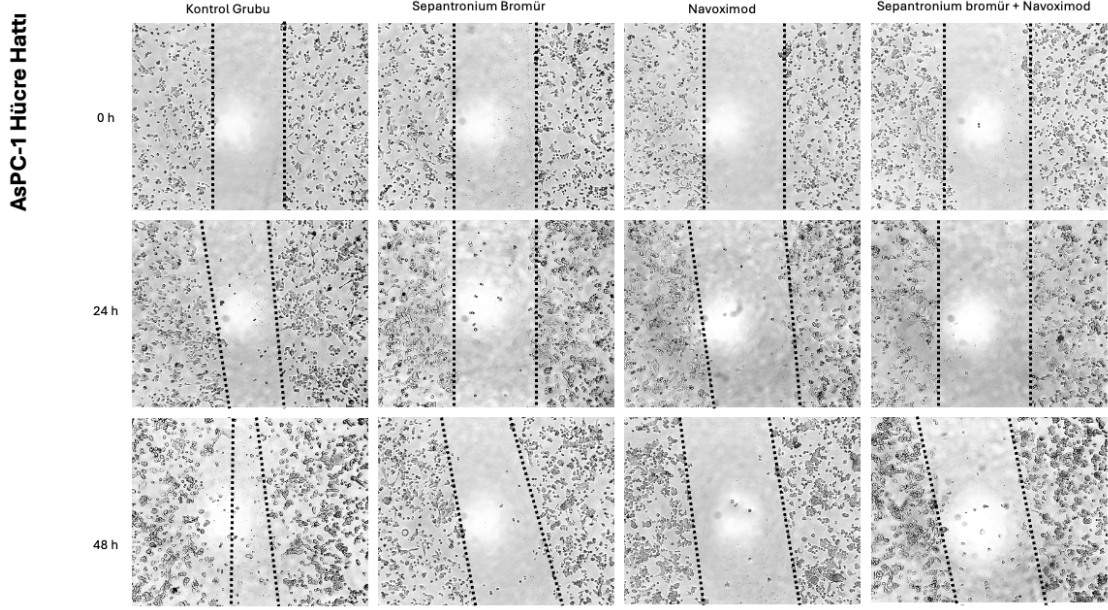
azaltmıştır. Kombinasyon uygulaması ise navoximodun tek başına kullanılmasına kıyasla hücre göçünü baskılamamıştır (Şekil 4.10).



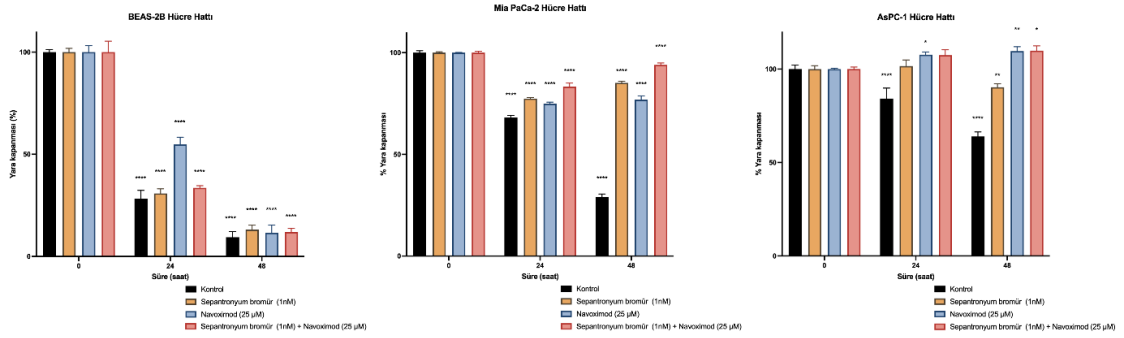
Şekil 4. 8. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde BEAS-2B akciğer epitel sağlıklı hücre hattına uygulanarak gerçekleştirilen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)



Şekil 4. 9. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde Mia PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattına uygulanarak gerçekleştirilen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)



Şekil 4. 10. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattına uygulanarak gerçekleştirilen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)



Şekil 4. 11. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde muamelesinin BEAS-2B, Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarındaki hücre göçü üzerindeki etkisi. Hücre göç oranları kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde (%) yara iyileşmesi üzerinden değerlendirilmiştir.

4.8. Sepantronyum Bromür ve Navoximod Bileşiklerinin Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının Hedef Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi

Gen ekspresyon analizi için 1 nM sepantronyum bromür ve 25 µM navoximod bileşikleri ayrı ayrı ve kombinasyon halinde 48 saat boyunca hücre hatlarına uygulanmıştır. Uygulama sonucunda IDO1, IDO2, TDO, BIRC5, mTOR, E-kadherin, N-kadherin, vimentin, VISTA, CD155 ve PD-L1 kodlayan genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir (Şekil 4.12). Analizde housekeeping gen olarak GAPDH seçilmiştir.

-IDO1 gen ekspresyonu 1 nM sepantronyum bromür ve 25 µM navoximodun ayrı ayrı uygulaması sonucunda tüm hücre hatlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmış olduğu belirlendi. 1 nM sepantronyum bromür ve 25 µM navoximodun kombinasyon halinde kullanımı tek başına kullanımına kıyasla anlamlı şekilde Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hattında IDO1 ekspresyonunu baskılamıştır. Ancak Beas 2B sağlıklı hücre hattında kombinasyon uygulaması IDO1 ekspresyonunu arttırmıştır.

-Kontrol grubuna kıyasla IDO2 gen ekspresyonunda sepantronyum bromür uygulanması yalnız Mia PaCa-2 hücre hattında ekspresyonu arttırırken, navoximod uygulaması Mia PaCa-2 hücre hattında IDO2 ekspresyonunu anlamlı şekilde baskılamıştır. Kombinasyon halinde uygulanması 3 hücre hattında da IDO2 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

-TDO gen ekspresyonu Sepantronyum bromür uygulaması sonucunda Mia PaCa-2 hücre hattında 1.87 kat baskılanırken AsPC-1 hücre hattında 1.38 kat ve Beas 2B hücre hattında 3.24 kat artışa neden olmuştur. Navoximod uygulaması TDO gen ekspresyonunu Mia PaCa-2 hücre hattında 1.45 kat baskılarken kombinasyon halinde uygulanması 2.09 kat baskılanmıştır. AsPC-1 hücre hattında navoximod uygulaması 1.49 kat ve kombinasyon uygulaması 1.23 kat TDO gen ekspresyonunu arttırmıştır. BEAS 2B sağlıklı hücre hattında ise navoximod uygulaması TDO gen ekspresyonunu 5.42 kat arttırırken kombinasyon halinde uygulanması 3.06 kat arttırmıştır.

-CD155 gen ekspresyonu sepantronyum bromürün tek başına kullanımında Mia PaCa-2 ve BEAS 2B hücre hattında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, navoximod uygulaması Mia PaCa-2 hücre hattında gen ekspresyonunu 2.58 kat ve kombinasyon uygulaması ise 2.71 kat baskılamıştır. AsPC-1 hücre hattında ise sepantronyum bromürün tek başına uygulanması gen ekspresyonunu 1.54 kat arttırırken, navoximod uygulaması 1.72 kat ve kombinasyon uygulaması 1.3 kat artışa neden olmuştur. BEAS 2B hücre hattında navoximodun tek başına uygulanması gen ekspresyonunu 1.3 kat arttırırken kombinasyon uygulaması gen ekspresyonunu 1,44 kat baskılamıştır.

-VISTA gen ekspresyonu sepantronyum bromür tek başına kullanımı sonrasında AsPC-1 ve Beas 2B hücre hattında anlamlı bir değişikliğe neden olmazken Mia PaCa-2 hücre hattında 1.52 kat artışa neden olmuştur. Navoximodun tek başına ve sepantronyum bromür ile kombinasyon halinde uygulanması AsPC-1 hücre hatlarında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak navoximodun tek başına uygulanması Mia PaCa-2 hücre hattında VISTA gen ekspresyonunu 3.23 kat ve kombinasyon halinde uygulanması 3.9 kat baskılamıştır. BEAS 2B hücre hattına navoximod uygulaması VISTA gen ekspresyonunu 2.14 kat arttırırken, kombinasyon halinde uygulanması gen ekspresyonunu 1.43 kat arttırmıştır.

-PD-L1 gen ekspresyonu Mia PaCa-2 hücre hattında sepantronyum bromür uygulaması sonucunda 1.31 kat artarken, navoximod uygulaması ile 1.36 kat ve kombinasyon uygulaması ile 2.39 kat baskılanmıştır. AsPC-1 hücre hattında ise PD-L1 gen ekspresyonu sepantronyum bromür uygulaması sonrasında 1.69 kat baskılanmıştır ancak navoximod uygulaması ile anlamlı bir değişiklik olmamıştır. sepantronyum bromür ve navoximod uygulaması sonrasında ise PD-L1 gen ekspresyonu 1.76 kat baskılanmıştır. BEAS 2B hücre hattında PD-L1 gen ekspresyonu sepantronyum bromür uygulaması sonrasında anlamlı bir değişiklik olmazken, navoximod uygulaması ile 1.37 kat artmıştır ancak kombinasyon uygulaması sonrasında gen ekspresyonu 1.36 kat baskılanmıştır.

-BIRC5 gen ekspresyonu sepantronyum bromür uygulanmasından sonra Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hattında sırasıyla 1.36 kat ve 1.59 kat baskılanırken BEAS 2B hücre hattında 2.12 kat artmıştır. Navoximod uygulaması ise Mia PaCa-2 hücre hattında gen

ekspresyonunu 1.55 kat baskılanırken AsPC-1 hücre hattında gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. BEAS 2B hücre hattında ise BIRC5 gen ekspresyonunda 3.18 kat artış olmuştur. sepantronyum bromür ve navoximodun kombinasyon halinde uygulanması BIRC5 gen ekspresyonunun Mia PaCa-2, AsPC-1 ve BEAS 2B hücre hatlarında sırasıyla 2.49, 1.53 ve 1.43 kat baskılanmasına neden olmuştur.

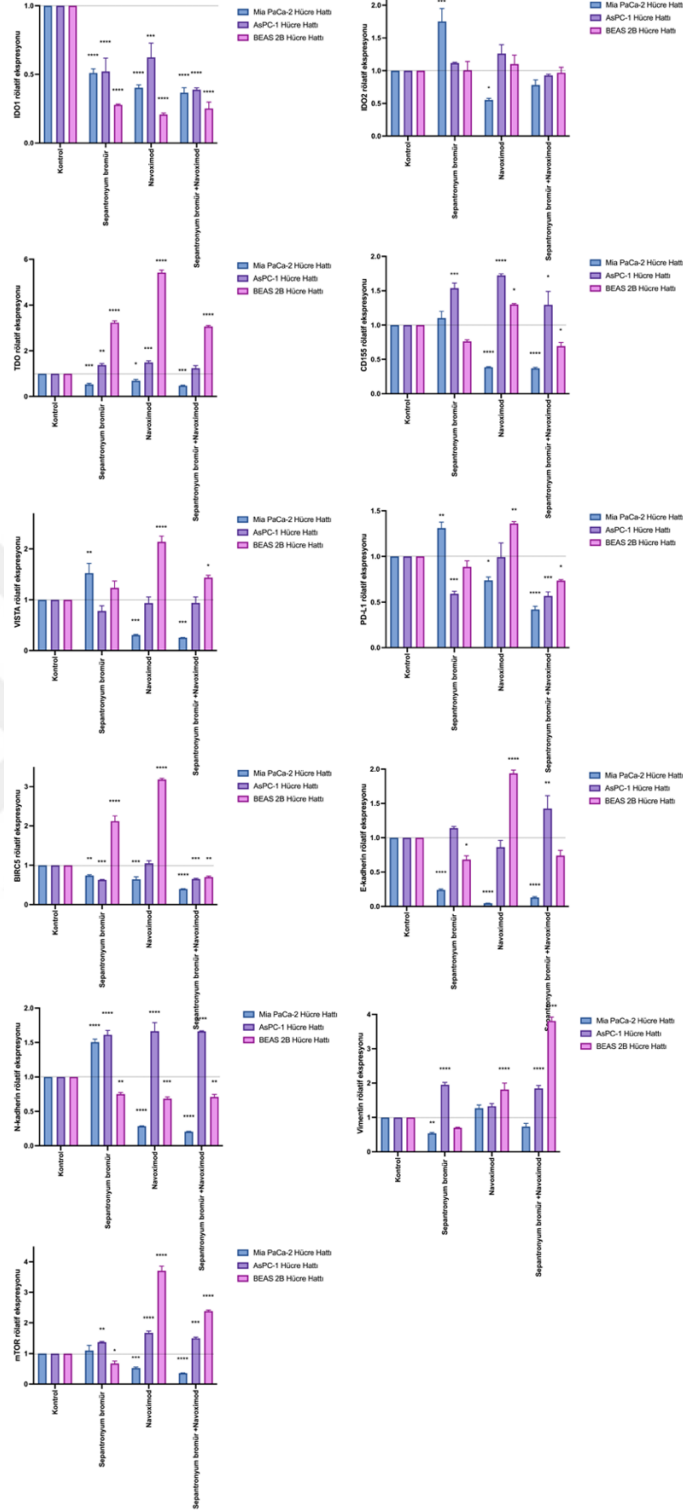
-Mia PaCa-2 hücre hattında sepantronyum bromür uygulamasından sonra **E-kadherin gen ekspresyonu** 4.1 kat baskılanırken navoximod uygulaması sonrasında 21.85 kat baskılanmıştır. Kombinasyon uygulamasından sonra ise E-kadherin gen ekspresyonu 7.74 kat baskılanmıştır. AsPC-1 hücre hattına sepantronyum bromür ve navoximod uygulamasından sonra E-kadherin gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Ancak sepantronyum bromür ve navoximod kombinasyon uygulaması sonrasında 1.43 kat artışa neden olmuştur. BEAS 2B hücre hattında ise sepantronyum bromür uygulaması sonrasında E-kadherin gen ekspresyonu 1.47 kat baskılanırken, navoximod uygulaması sonrasında gen ekspresyonu 1.94 kat artmıştır ancak kombinasyon uygulaması sonrasında anlamlı bir değişiklik olmamıştır.

-Mia PaCa-2 hücre hattında sepantronyum bromür uygulamasından sonra **N-kadherin gen ekspresyonu** 1.5 kat artarken, navoximod uygulaması gen ekspresyonunu 3.5 kat baskılamıştır. Kombinasyon uygulaması ise Mia PaCa-2 hücre hattında gen ekspresyonunu 4.84 kat baskılamıştır. AsPC-1 hücre hattında sepantronyum bromür uygulamasından sonra gen ekspresyonu 1.61 kat, navoximod uygulamasından sonra 1.67 kat ve kombinasyon uygulamasından sonra ise 1.66 kat artış gerçekleşmiştir. BEAS 2B hücre hattında ise sepantronyum bromür uygulamasından sonra gen ekspresyonu 1.33 kat, navoximod uygulamasından sonra 1.46 kat ve kombinasyon uygulamasından sonra ise 1.41 kat baskılanmıştır.

-**Vimentin gen ekspresyonu** sepantronyum bromür uygulamasından sonra Mia PaCa-2 hücre hattında 1.85 kat baskılanırken navoximod ve kombinasyon uygulamasından sonra anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. AsPC-1 hücre hattına uygulanan sepantronyum bromür sonrasında 1.95 kat artış olmuştur. Ancak navoximod uygulaması

sonrasında ise anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Kombinasyon uygulaması sonrasında ise gen ekspresyonu 1.85 kat artmıştır. BEAS 2B hücre hattında ise sepantronyum bromür uygulaması sonrasında anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken navoximod uygulaması sonrasında vimentin gen ekspresyonu 1.81 kat ve kombinasyon uygulaması sonrasında 3.81 kat artış meydana gelmiştir.

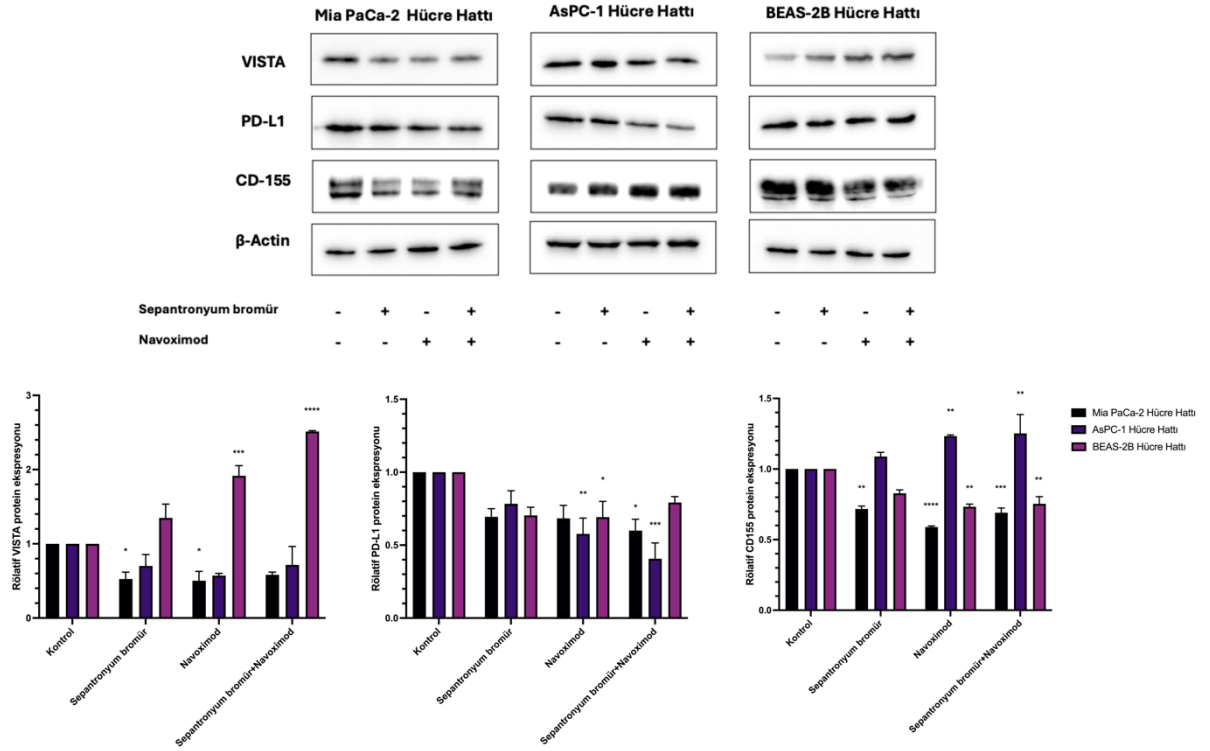
-mTOR gen ekspresyonu sepantronyum bromür uygulamasından sonra Mia PaCa-2 hücre hattında anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken, navoximod uygulaması sonrasında 1.92 kat ve kombinasyon uygulaması sonrasında 2.81 kat baskılanmıştır. AsPC-1 hücre hattına uygulanan sepantronyum bromür sonrasında mTOR gen ekspresyonu 1.37 kat, navoximod uygulaması sonrasında 1.68 kat ve kombinasyon uygulaması sonrasında 1.5 kat artmıştır. BEAS 2B hücre hattına sepantronyum bromür uygulaması ile mTOR gen ekspresyonu 1.48 kat baskılanırken, navoximod uygulaması sonrasında 3.7 kat ve kombinasyon uygulaması sonrasında 2.39 kat artmıştır.



Şekil 4. 12. Sepantronyum bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde Mia PaCa-2, AsPC-1 ve BEAS-2B hücre hattına uygulanmasından sonra hedef genlerin rölatif ekspresyon seviyesi

4.9. Sepantronyum Bromür ve Navoximod Bileşiklerinin Ayrı Ayrı ve Kombinasyon Halinde Uygulanmasının İmmün Checkpoint CD155, VISTA ve PD-L1 Protein Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Sepantronyum bromür ve navoximod uygulaması yapılmış Mia PaCa-2, AsPC-1 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki PD-L1, VISTA ve CD155 protein seviyelerinin tespit edilebilmesi için western blot analizi yapılmıştır. Kontrol olarak β -Aktin kullanılmıştır. 48 saat boyunca hücre hatlarına 1 nM sepantronyum bromür ve 25 μ M navoximod uygulaması yapılmış, total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tek başına YM155 uygulaması VISTA protein seviyesini Mia PaCa-2 hücre hattında baskılarken, BEAS 2B ve AsPC-1 hücre hatlarında VISTA proteininde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Tek başına navoximod uygulaması ise Mia PaCa-2 hücre hattında VISTA protein seviyesini baskılarken, BEAS 2B hücre hattında protein seviyesini arttırmıştır. Kombinasyon halinde ilaçların uygulanması ise yalnız BEAS 2B hücre hattında VISTA protein seviyesinde anlamlı şekilde arttırmıştır. Tek başına sepantronyum bromür uygulaması PD-L1 protein seviyesinde her 3 hücre hattında da anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, navoximod uygulaması AsPC-1 hücre hattında PD-L1 proteininin baskılanmasına neden olmuştur. Kombinasyon halinde ilaçların uygulanması ise Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hattında PD-L1 protein seviyesini anlamlı şekilde azaltmıştır. CD155 proteini içinse sepantronyum bromürün tek başına uygulanması Mia PaCa-2 hücre hattında hedef protein seviyesinin azalmasına neden olmuştur. Navoximod uygulamasından sonra Mia PaCa-2 ve BEAS 2B hücre hatlarında CD155 protein seviyesi azalırken, AsPC-1 hücre hattında CD155 protein seviyesi artmıştır. Kombinasyon halinde uygulamadan sonra ise Mia PaCa-2 ve BEAS 2B hücre hatlarında CD155 protein seviyesi azalırken, AsPC-1 hücre hattında artmıştır (Şekil 4.13).

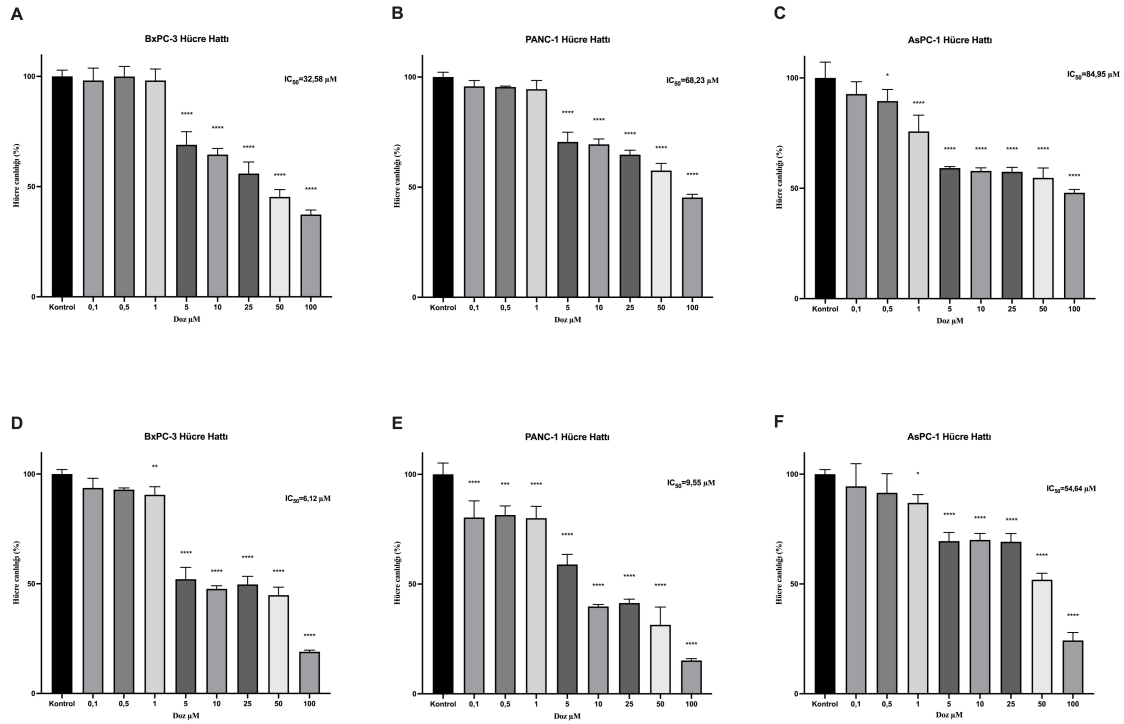


Şekil 4. 13. Pankreas kanseri ve sağlıklı hücre hatlarına sepantronium bromür ve navoximod bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının immün checkpoint CD155, VISTA ve PD-L1 protein seviyesi üzerindeki etkisi

4.10. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanseri Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkisinin olup olmadığını gözlemlemek için 24 ve 48 saat boyunca artan konsantrasyonlarında (0,1-100 μ M) PF-562271 uygulaması yapılmıştır ve ardından MTT analizi gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik uygulamadan sonra BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri sırasıyla 32,58 μ M, 68,23 μ M ve 84,95 μ M olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, PF-562271'in kısa süreli maruziyette BxPC-3 hücrelerinde daha belirgin sitotoksik etki gösterdiğini, ancak PANC-1 ve AsPC-1 hücrelerinde daha yüksek dozlarda etki ettiğini göstermektedir. 48 saatlik PF-562271 muamelesinden sonra ise BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri sırasıyla 6,12 μ M, 9,55 μ M ve 54,64 μ M olarak hesaplanmıştır. Veriler, PF-562271'in maruziyet süresi uzadıkça pankreas kanseri hücre

hatlarında sitotoksik etkisinin belirgin şekilde arttığını göstermektedir. Özellikle BxPC-3 hücre hattında IC₅₀ değerinin 24 saate kıyasla yaklaşık beş kat azaldığı, bu durumun ise PF-562271'in hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkisinin zamanla güçlendiğine işaret ettiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücre hatlarında doza bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksisite oluşturmuştur (Şekil 4.14).

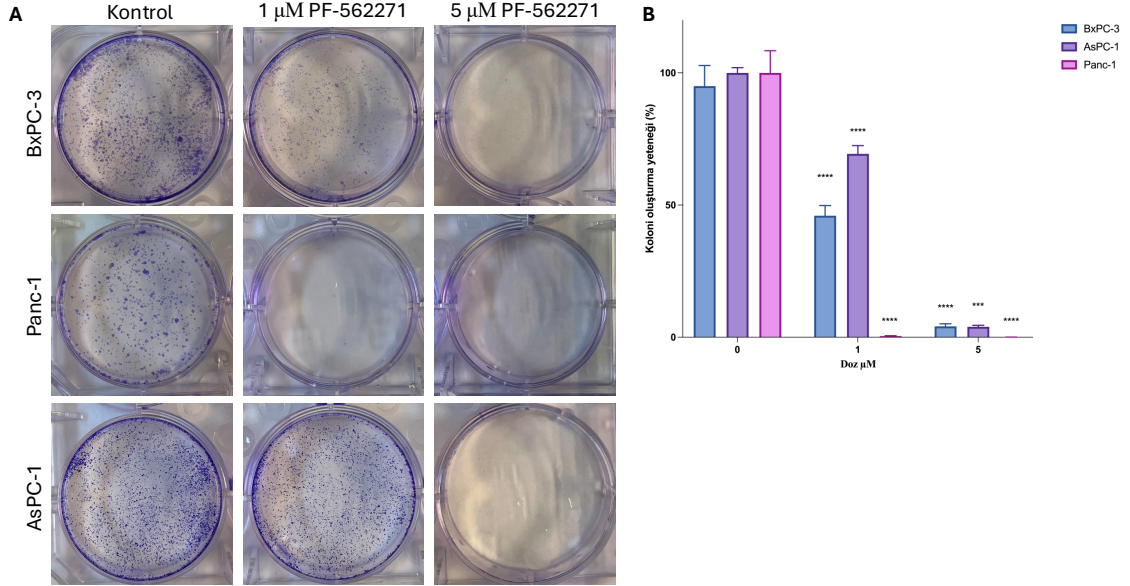


Şekil 4. 14. PF-562271 bileşiğinin 24 saat (A-C) ve 48 saat (D-F) boyunca muamelesinin BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi

4.11. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanserli Hücre Hatlarında Hücre Koloni Oluşumu Üzerindeki Etkisi

PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücrelerinin koloni oluşumu üzerindeki etkilerinin gözlemlenebilmesi için 48 saat boyunca 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda uygulanmış daha sonrasında hücreler 14 gün boyunca büyütülmüştür. Tüm hücreler kristal violet ile boyanmıştır ve koloniler görüntülenmiştir. 1 ve 5 µM PF-562271

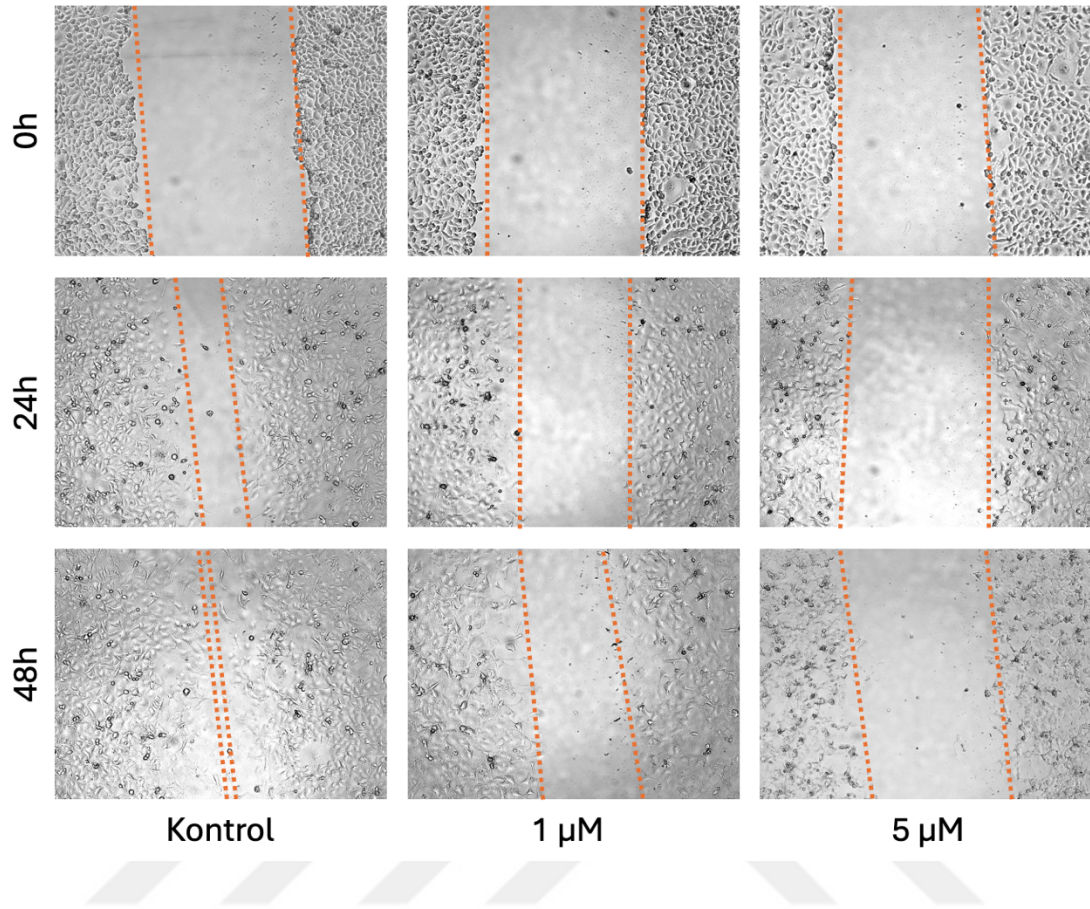
uygulaması sonucunda koloni oluşturma yeteneği BxPC-3 ve AsPC-1 hücre hattına kıyasla PANC-1 hücre hattında önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.15).



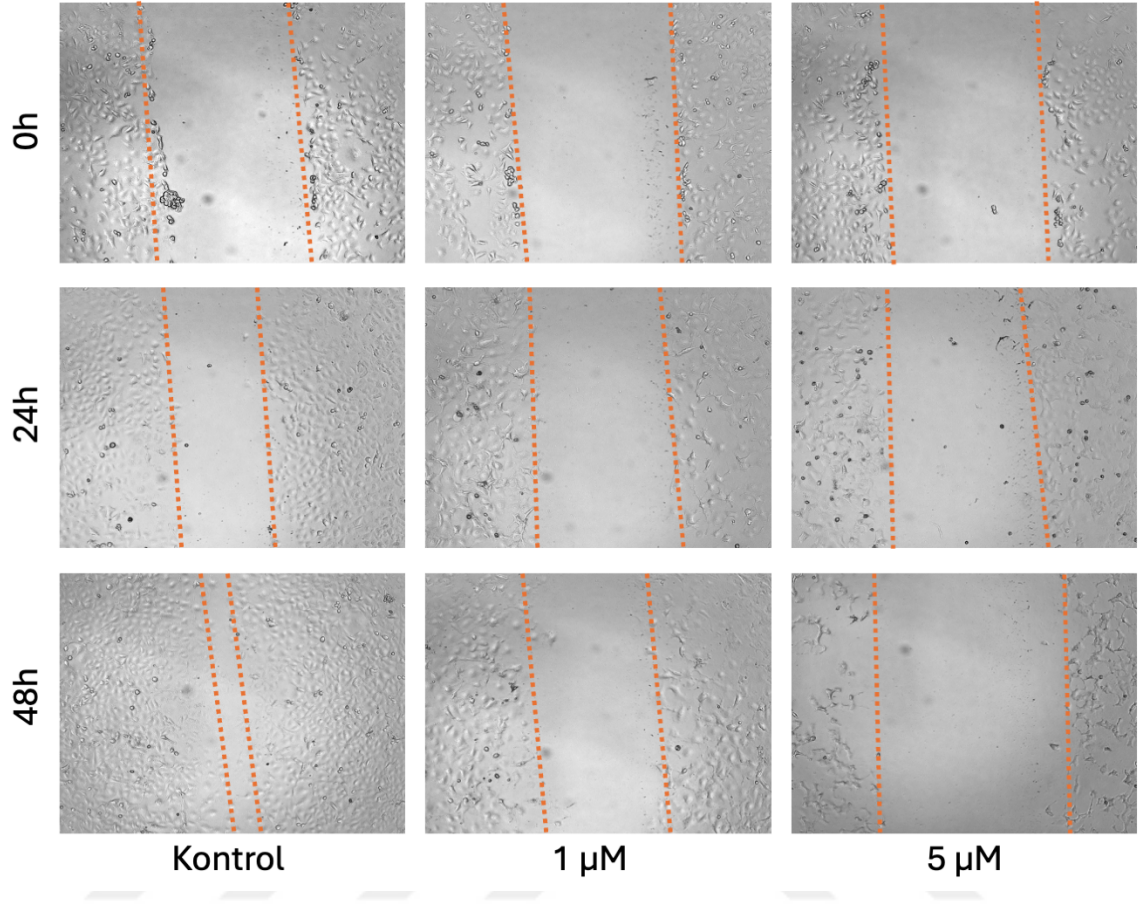
Şekil 4. 15. BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hattında yapılan koloni oluşum analizinin sonuçları. Kristal violet ile boyanmış kolonilerin görüntülenmesi (A) ve koloni oluşturma yetenekleri yüzdeleri (B)

4.12. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkisi

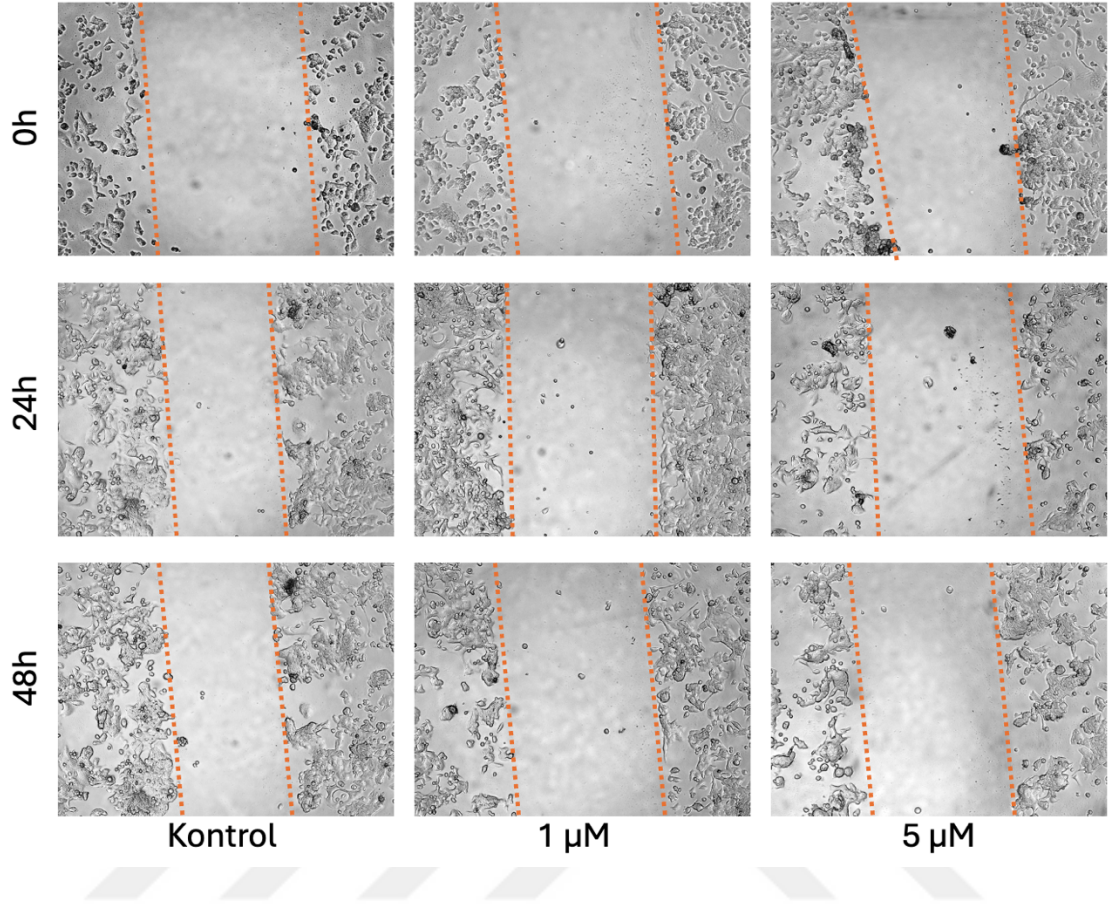
PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücrelerinin migrasyon yetenekleri üzerindeki etkilerinin gözlemlenebilmesi için 24 ve 48 saat boyunca 1 ve 5 µM PF-562271 konsantrasyonlarında muamele gerçekleştirilmiştir. 0, 24 ve 48 saatlik hücrelerin görüntüsü mikroskop altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. PANC-1, AsPC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarına 1 ve 5 µM uygulanan PF-562271 24 ve 48 saat sonra kontrol grubuna kıyasla migrasyonu anlamlı şekilde baskılamıştır (Şekil 4.16-4.19).



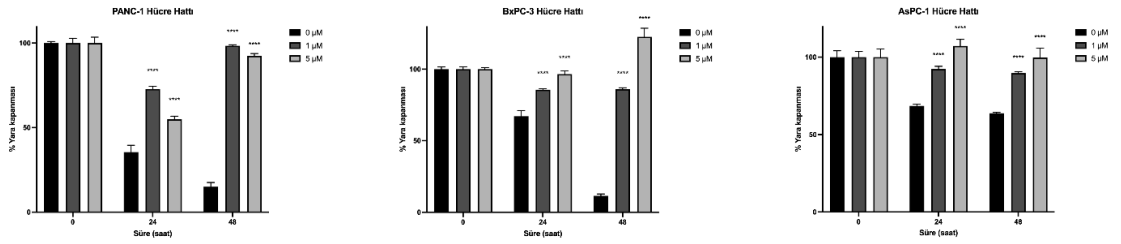
Şekil 4. 16. PANC-1 hücre hattına PF-562271'in 1 ve 5 µM uygulanması ile yürütülen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)



Şekil 4. 17. BxPC-3 hücre hattına PF-562271'in 1 ve 5 µM uygulanması ile yürütülen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)



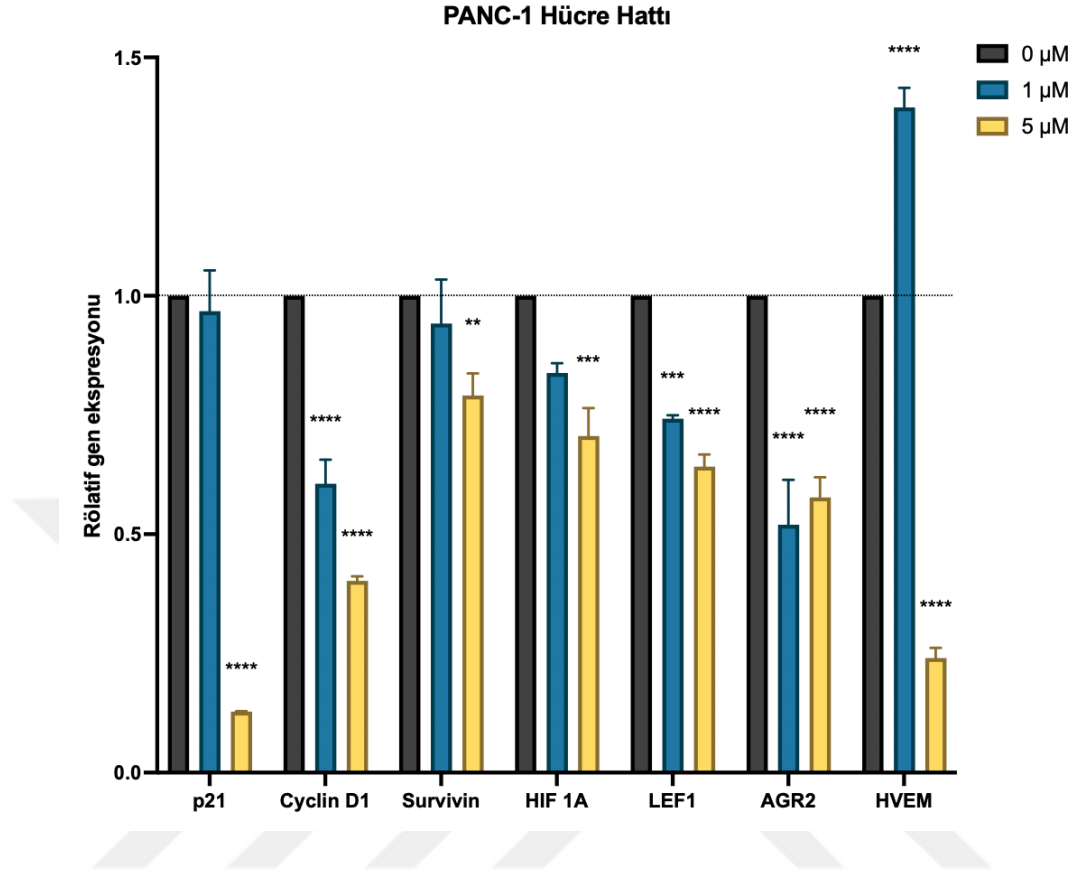
Şekil 4. 18. AsPC-1 hücre hattına PF-562271'in 1 ve 5 μ M uygulanması ile yürütülen hücre migrasyon analizindeki hücrelerin mikroskopik görüntüsü (5x büyütme)



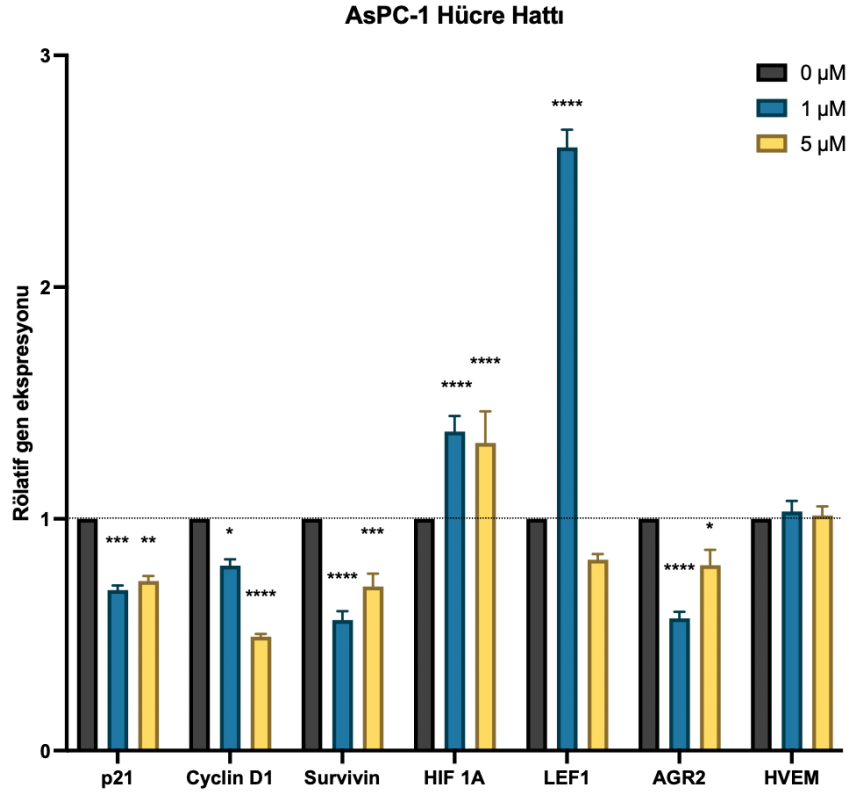
Şekil 4. 19. PF-562271 bileşiğinin 1 ve 5 μ M muamelesinin PANC-1, BxPC-3 ve AsPC-1 hücre hatlarındaki hücre göçü üzerindeki etkisi

4.13. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında PF-562271 Bileşiminin Hedef Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi

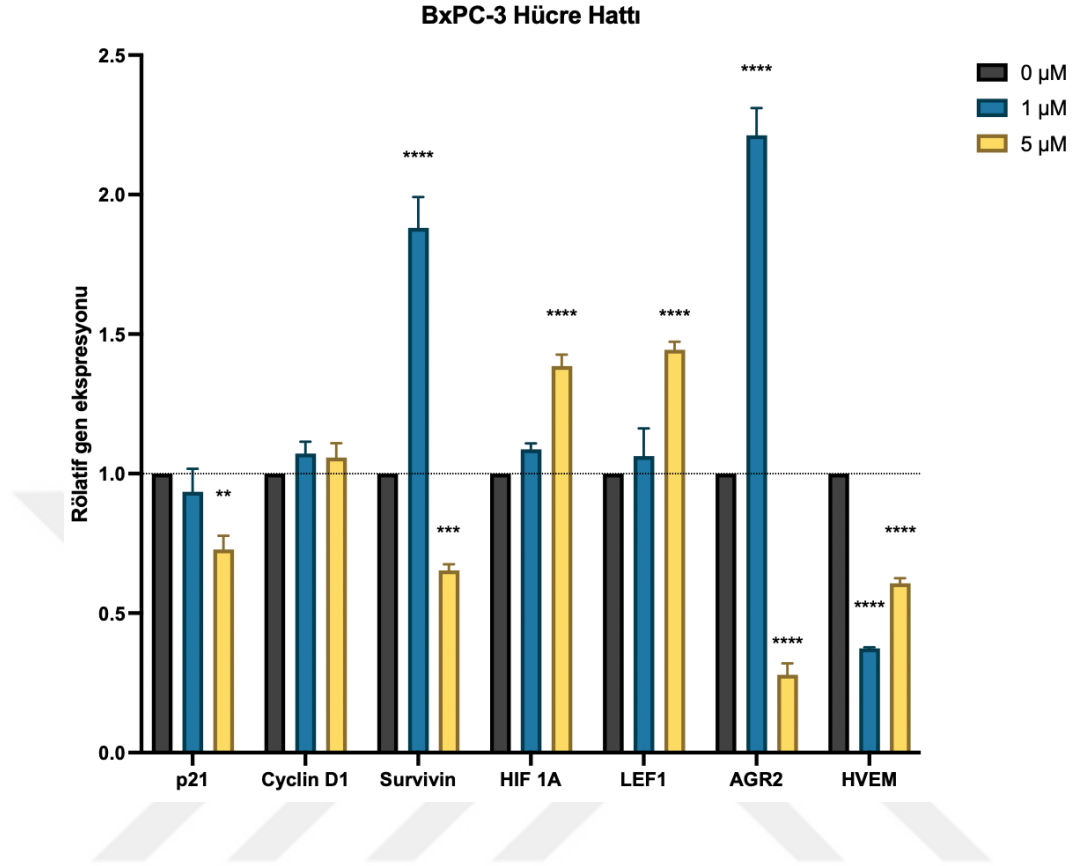
PF-562271 bileşiminin pankreas kanseri hücrelerinde hedef gen ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatları 48 saat boyunca 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarında PF-562271 ile muamele edilmiştir. Apoptotik bir gen olan p21 geni her 3 hücre hattında da azalma göstermiştir. PANC-1 hücre hattında 5 μ M PF-562271 uygulaması kontrol grubuna kıyasla 8.14 kat, BxPC-3 hücre hattında 1.37 kat ve AsPC-1 hücre hattında ise 1.36 kat gen ekspresyonu baskılanmıştır. PF-562271 uygulaması PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatlarında siklin D1 geninin azalmasına neden olmuştur. PANC-1 hücre hattında 1 ve 5 μ M PF-562271 uygulanması siklin D1 geninin sırasıyla 1.65 ve 2.49 kat azalmasına neden olmuştur. AsPC-1 hücre hattında ise 1 ve 5 μ M PF-562271 uygulanması siklin D1 geninin sırasıyla 1.44 ve 1.37 kat azalmasına neden olmuştur. Buna rağmen BxPC-3 hücre hattında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Survivin ekspresyonu 5 μ M PF-562271 uygulanması sonucunda tüm hücre hatlarında baskılanmıştır. PANC-1, AsPC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarında sırasıyla 1.26, 1.41 ve 1.53 kat survivin gen ekspresyonu baskılanmıştır. HIF 1A gen ekspresyonu 5 μ M PF-562271 uygulaması sonrasında PANC-1 hücre hattında azalırken (1.42 kat), BxPC-3 (1.39 kat) ve AsPC-1 (1.33 kat) hücre hatlarında artışa neden olmuştur. Yapılan gen ekspresyonu analizi sonucunda LEF1, 5 μ M PF-562271 uygulanması PANC-1 hücre hattında 1,56 kat azalırken, BxPC-3 hücre hatlarında 1.44 kat artış meydana gelmiştir. AGR2 geni ise 5 μ M doz uygulaması sonrasında PANC-1, AsPC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarında sırasıyla 1.73 kat, 1.25 kat ve 3.59 kat anlamlı şekilde baskılanmıştır. HVEM gen ekspresyonu 5 μ M PF-562271 uygulaması sonrasında PANC-1 ve BxPC-3 hücre hattında sırasıyla 4.16 kat ve 1.65 kat baskılanırken, AsPC-1 hücre hattında anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 4.20-4.22).



Şekil 4. 20. PANC-1 hücre hattına 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda 48 saat boyunca uygulanan PF-562271 bileşiğinin p21, siklin D1, survivin, HIF 1A, LEF1, AGR2 ve HVEM genlerine ait gen ekspresyon analizi



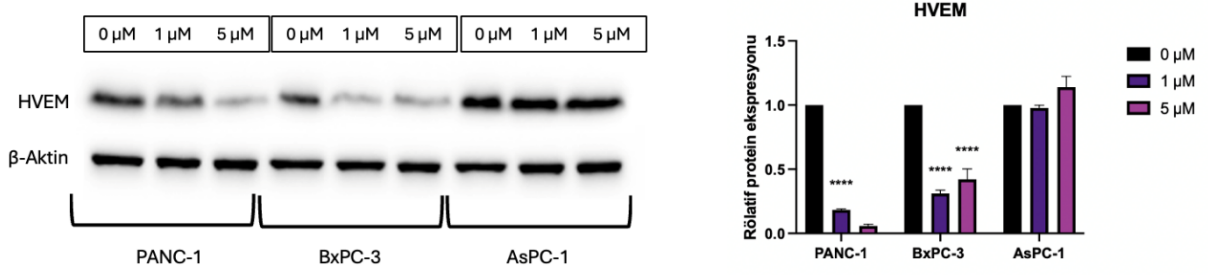
Şekil 4. 21. AsPC-1 hücre hattına 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda 48 saat boyunca uygulanan PF-562271 bileşiğinin p21, siklin D1, survivin, HIF 1A, LEF1, AGR2 ve HVEM genlerine ait gen ekspresyon analizi



Şekil 4. 22. BxPC-3 hücre hattına 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarda 48 saat boyunca uygulanan PF-562271 bileşiğinin p21, siklin D1, survivin, HIF 1A, LEF1, AGR2 ve HVEM genlerine ait gen ekspresyon analizi

4.14. PF-562271 Bileşiğinin Pankreas Kanseriindeki HVEM Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücrelerinde hedef protein HVEM ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatları 48 saat boyunca 1 ve 5 μ M konsantrasyonlarında PF-562271 ile muamele edilmiştir. Kontrol olarak β -Aktin kullanılmıştır. Elde edilen bulgular PF-562271 bileşiğinin BxPC-3 ve PANC-1 hücre hatlarında HVEM protein ekspresyonunu doza bağlı olarak önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Şekil 4.23).



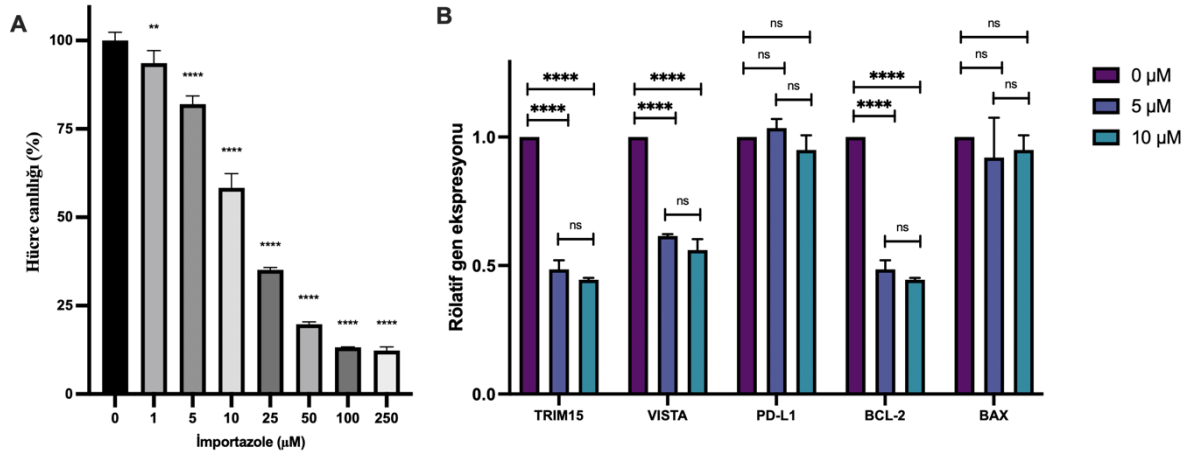
Şekil 4. 23. PF-562271 bileşiğinin 1 ve 5 µM dozlarında pankreas kanseri hücre hatları BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1'e uygulanması sonrasında HVEM protein ekspresyon seviyesi

4.15. İmportazole'nin Pankreas Kanseri Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

İmportazol bileşiğinin hücre sitotoksitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için pankreas kanseri hücre hattı AsPC-1'e farklı dozlarda 48 saat boyunca uygulandı. MTT analizi sonucunda, importazol pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak baskıladı (Şekil 4.24). İmportazole bileşiğinin AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerindeki IC50 değeri 14,9 µM olarak hesaplandı.

4.16. İmportazole'nin Hedef Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi

İmportazole bileşiğinin pankreas kanserinde TRIM15, apoptoz mekanizması ile ilişkili genler ve immün checkpoint genlerinin (PD-L1, VISTA) ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerini anlamak amacıyla mRNA seviyeleri incelendi. Pankreas kanseri hücrelerine 5 ve 10 µM importazole bileşiğinin uygulanması, uygulama yapılmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında TRIM15 ifadesini 5 µM importazolede yaklaşık 2,1 ve 10 µM importazolede yaklaşık 2,3 kat baskıladı. Ayrıca, immün checkpoint VISTA ve anti-apoptotik BCL-2 gen ifadesi sırasıyla yaklaşık 1,6 ve 1,8 kat (5 µM), 2,1 ve 2,3 kat (10 µM) azalırken, importazole tedavisinin immün checkpoint PD-L1 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (Şekil 4.24). İlaveten BAX apoptotik gen ekspresyon seviyesinde importazole uygulaması sonucunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 4. 24. A. İmportazole uygulamasının pankreas kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Pankreas kanseri hücrelerine 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda importazole uygulanmasının B. TRIM15, VISTA, BCL-2, PD-L1 ve BAX genlerine ait gen ekspresyon analizi

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri en kötü prognoza sahip olan malignitelerden biri olup, agresif seyrinden ve geç evrede tanı almasından dolayı 5 yıllık sağkalımı oldukça düşüktür. Cerrahi rezeksiyon ve kemoterapi pankreas kanseri için tedavi stratejilerinin başında gelmesine rağmen hastaların ajanlara verdiği yanıt kısıtlıdır ve hastaların büyük bir kısmı tanı aldığı anda cerrahi müdahaleye uygun değildir (Stoop ve ark., 2025). Bağışıklık sistemini aktive ederek kansere karşı tedavi imkanı sunan immünoterapi, pankreas kanserinde zayıf antijen sunumu, tanınması ve işlenmesi gibi nedenlerle sınırlı başarı göstermektedir (Li ve ark., 2022). Hedefe yönelik tedaviler ise hastalarda sıkça rastlanan ilaç direncini aşmayı ve yan etkileri azaltmayı amaçlayan spesifik proteinleri seçici bir şekilde hedef alan tedavi yaklaşımıdır (Victoir ve ark., 2024). Bu nedenle hedefe yönelik tedavi stratejilerin geliştirilmesi, immünoterapi ile kombinasyon tedavi stratejilerinin uygulanması ve bu alanda kapsamlı klinik araştırmaların sürdürülmesi pankreas kanseri tedavisinde kritik bir öneme sahiptir.

Pankreas kanserinde immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler kapsamında son yıllarda odaklanılan immün checkpoint moleküllerinin birbiri ile olan etkileşimi ve bu moleküllerin hangi sinyal yolları aracılığıyla düzenlendiği, henüz yeterince aydınlatılamamış olup, bu alandaki moleküler düzeydeki çalışmalar sınırlı kalmıştır. Bu nedenle tez çalışmada, pankreas kanserinde immün checkpoint moleküller VISTA, HVEM, CD155, PD-L1 ve IDO1'in ekspresyon profilleri incelenmiş ve bu moleküllerin çeşitli hücrelerel sinyal yolları ile olası ilişkileri analiz edilmiştir. Çalışmada HDAC inhibitörü vorinostat, survivin inhibitörü sepantronyum bromür, IDO1 inhibitörü navoximod, EMT'den sorumlu transkripsiyon faktörü Twist1'in susturulması amacıyla kullanılan Twist1-siRNA, nükleer transport inhibitörü importazole ve FAK inhibitörü PF-562271 bileşiklerinin apoptoz, hücre döngüsü, proliferasyon, hipoksi ve EMT gibi süreçlerde rol oynayan farklı sinyal yollarını hedefleyerek pankreas kanserinde immün checkpointlar üzerindeki düzenleyici etkileri ve ilişkili oldukları sinyal yolları araştırılmıştır. Bileşiklerin hücre canlılığı, migrasyonu, koloni oluşumu üzerindeki etkileri, apoptotik süreç üzerindeki düzenleyici etkileri, tümör mikroçevreyi nasıl şekillendirdiği, özellikle pankreas kanserinde VISTA, HVEM, CD155, PD-L1 ve IDO1

gibi immün checkpoint moleküllerinin ekspresyon düzeylerine etkileri değerlendirilmiştir. Böylece bu çalışma, pankreas kanserinde hem hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarına hem de immün regülasyona dair potansiyel yeni bağlantıların ortaya konulmasına katkı sağlamayı amaçlamıştır.

Esas olarak antijen sunan hücrelerde ve özellikle Treg hücreleri üzerinde eksprese edilen VISTA, T hücre aktivasyonunu inhibe ederek immün süpresör tümör mikroçevresi oluşturan immün checkpoint molekül olarak bilinmektedir. Ligandı olan VSIG ile VISTA'nın bağlanması sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini inhibe ederek T hücre proliferasyonunu baskılamaktadır (Mei ve ark., 2020). Tümörde ve otoimmün hastalıklarda aşırı eksprese olan VISTA, bağışıklık sistemi üzerinde düzenleyici rolünden dolayı terapötik bir ilaç hedefi potansiyeli göstermektedir. VISTA, kanser tedavisi için umut verici bir hedef olmasının yanı sıra hem doğuştan gelen hem de edinsel bağışıklık tepkilerini modüle etmedeki çok yönlü rolü nedeniyle çeşitli otoimmün enflamatuvar hastalık türlerinin önemli bir düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Li ve ark., 2021b; Zhang ve Kim, 2024). Pankreas, melanoma, akciğer, meme ve kolorektal kanser başta olmak üzere birçok kanser türünde yüksek VISTA ekspresyonu tanımlanmıştır (Zong ve ark., 2020; Xie ve ark., 2020; Borgeaud ve ark., 2023; Issam Salah ve ark., 2023). Li ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı bir çalışmada, kemoterapi tedavisinin melanoma hücrelerinde VISTA ekspresyonunu teşvik ettiği ve VISTA'nın aşırı ekspresyonunun bağışıklıktan kaçmaya neden olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2023a). Bir başka çalışmada ise pankreas kanserinde yüksek seviyede ekspresyon olan ve kemoterapi direncini teşvik eden TLR4 sinyal yolağının immün checkpoint molekülü olan VISTA ile etkileşim içerisinde olduğu ve bu etkileşimin tümör progresyonu ile immün kaçış mekanizmalarını destekleyebileceği gösterilmiştir (Topcu ve ark., 2022). Ancak bununla birlikte VISTA'nın pankreas kanserindeki ekspresyonu ve klinik önemi hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle VISTA'nın tümör mikroçevresindeki rolünün daha fazla araştırılması, pankreas kanserinde VISTA'nın hedeflenmesi ve ilişkili olduğu sinyal yollarının belirlenmesi kanser tedavisi için önem arz etmektedir.

Tez çalışmasında öncelikle pankreas kanserinde immün checkpoint VISTA'nın EMT ile ilişkili genler ile bağlantılarının anlaşılabilmesi için EMT ile ilişkili transkripsiyon

faktörü Twist1 geni Twist-siRNA ile susturuldu. VISTA'nın epigenetik düzeydeki düzenlenme potansiyelini değerlendirmek amacıyla, HDAC inhibitörlerinden biri olan vorinostat ile hücrelere tedavi uygulandı. Hücre migrasyon analizi, gen ve protein ekspresyon analizlerinde kullanabilmek için vorinostat bileşiğinin IC₅₀ dozunun tespit edilmesi için hücre canlılık analizi (MTT analizi) yapıldı. 3 pmol Twist-siRNA ve farklı konsantrasyonlardaki vorinostat bileşiğinin ayrı ayrı uygulaması sonrasında pankreas kanseri hücre canlılığında azalma olduğu gösterildi. Vorinostat için IC₅₀ değeri CAPAN-1 hücre hattında 11,2553 µM, Mia PaCa-2 hücre hattında 1,15 µM ve AsPC-1 hücre hattında 1,182 µM olarak saptanmıştır. Kombinasyon tedavi uygulamasının pankreas kanseri hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi için gerçekleştirilen analizde özellikle CAPAN-1 hücre hattında kombinasyon tedavinin tek başına bileşiklerin uygulanmasına kıyasla daha etkili bir şekilde hücre canlılığını baskıladığı tespit edildi. Mevcut literatürdeki bulgular, çalışmamızı destekler nitelikte olup; HDAC inhibitörü vorinostatın pankreas kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Kumagai ve ark., 2007; Chao ve ark., 2019). Sonrasında Twist-siRNA ve vorinostat bileşiğinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının pankreas kanseri hücre hatlarında hücre göçü üzerindeki etkileri değerlendirmek için hücre migrasyon analizi yapıldı ve düşük dozlarda kombinasyon tedavisinin hücre migrasyonunu kontrol grubuna kıyasla engellediği tespit edildi. Literatür ile kıyaslandığında Twist1-siRNA'nın kolon kanseri hücrelerinde invazyon ve göç yeteneğini azalttığı gösterilmiştir. Dahası Twist1 susturulması E-kadherin ekspresyon seviyesini arttırırken, vimentin ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Shen ve ark., 2019). Bir başka çalışmada da Twist1'in EMT'ye neden olarak hepatoselüler karsinomada hücre göçünü arttırdığı gösterilmiştir (Matsuo ve ark., 2009). Oral dil skuamöz hücreli karsinomada yapılan bir çalışmada ise Twist1 susturulması sonrasında hücre çoğalması, migrasyonu ve invazyonunda baskılanma gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra EMT belirteci vimentin ekspresyonunda azalma ve E-kadherin ekspresyonunda ise artış meydana gelmiştir (de Morais ve ark., 2022). Qin ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, multipl miyeloma hücrelerinde normal kemik iliği hücrelerine kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek Twist1 ekspresyonu tespit edilmiştir. Ayrıca, Twist1'in susturulmasının insan multipl miyeloma hücrelerinde apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Qin ve ark., 2021). Çalışmamızda Twist1

susturulmasının vorinostat ile kombinasyon halinde uygulanmasının EMT'den sorumlu genlerin yanı sıra immün checkpoint VISTA'nın ekspresyon düzeyini düzenlediğini de gösterdik. Vorinostatın tek başına uygulanması her 3 hücre hattında da Twist1 gen ekspresyonunu artırırken, CAPAN-1 hücre hattında VISTA gen ekspresyonunu arttırmıştır. Akciğer ve kolon kanserinde yeni HDAC inhibitörleri E-Kadherin'i artırırken Vimentin ve Slug'u azaltarak EMT'yi baskılamış; benzer şekilde Vorinostat da N-Kadherin ve Vimentin ekspresyonunu düşürüp E-Kadherin'i yükselterek EMT fenotipini modüle etmiştir (Özel ve ark., 2021; Lee ve ark., 2024). Kombinasyon halinde bileşiklerin uygulanması Mia PaCa-2 hücre hattında EMT'den sorumlu biyobelirteçlerin ekspresyonlarını baskılamıştır. İlaveten Twist-siRNA ve vorinostatın kombinasyon halinde uygulanması VISTA gen ve protein ekspresyonunu oldukça baskılamıştır. Bu durum, her iki ajan arasında sinerjistik bir etkileşimin mevcut olduğunu ve birlikte uygulandıklarında immün kaçış mekanizmalarının hedeflenmesinde daha etkili olabileceklerini göstermektedir. Literatürde meme kanserinde Twist1'in immün checkpoint molekül PD-L1 promotörüne bağlandığı ve CD8+ T hücrelerinin tükenmesini hızlandırarak meme kanseri hücrelerinin bağışıklıktan kaçmasını sağlayan PD-L1 ekspresyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Yu ve Xu, 2024). Bu durum Twist1'in hedeflenmesinin immün süpresör etkiyi azaltacağı ve anti-tümör bağışıklığı güçlendirerek immünoterapötik stratejileri geliştirebileceğini göstermektedir. Bu tez çalışması ile mevcut literatürü destekler nitelikte olan sonuçlar bulunmuştur ve pankreas kanseri hücrelerinde Twist1 ekspresyonunun immün checkpoint VISTA ile pozitif korelasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, HDAC inhibitörü vorinostatın Twist1 inhibisyonu ile sinerjistik etki oluşturarak VISTA ekspresyonunu baskılayabileceği ortaya konulmuştur. Mevcut çalışmamız Twist1'in EMT biyobelirteçlerini modüle etmesinin yanı sıra pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu baskıladığını da göstermiştir.

Fetal gelişim sırasında eksprese edilen, ancak normal yetişkin dokularında ekspresyonu bulunmayan BIRC5 geninin; literatürde çeşitli kanser türlerinin progresyonu ve kötü prognozla ilişkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Zou ve ark., 2019; Fäldt Beding ve ark., 2022). Artan BIRC5 ekspresyonunun, çeşitli tümörlerde bağışıklık hücresi infiltrasyon seviyesi ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir (Xu ve ark., 2021).

Apoptoz inhibitörü BIRC5'in immünoterapide de belirteç olarak kullanılabileceği ve immün checkpoint blokajı tedavisinin etkinliğini arttırabileceği düşünülmüştür. Survivin inhibitörü sepantronyum bromürün, yumurtalık kanseri hücrelerinde sağkalımı down regüle ederek hücre büyümesini baskıladığı, hücre döngüsünde duraksamaya yol açtığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Hou ve ark., 2018). Bir başka çalışmada sepantronyum bromür prostat kanseri tedavilerde sıklıkça kullanılan cabazitaxel ile kombinasyon halinde uygulandığında cabazitaxelin etkinliğini arttırmıştır (Miyao ve ark., 2020). Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada ise sepantronyum bromür, survivin ekspresyonunu baskılayarak pankreas kanseri hücrelerinde gempitabine duyarlılığı arttırmıştır (Yoon ve ark., 2012). Zhao ve arkadaşlarının 2016'da yaptıkları bir çalışmada ise pankreas kanserinde sepantronyum bromür tek başına apoptozu indüklemekte yetersiz kalmışken, gempitabin ile kombinasyon halinde uygulanması apoptozu desteklemiştir (Zhao ve ark., 2016). Ancak BIRC5 inhibitörü sepantronyum bromürün pankreas kanserinde antitümör etkisini hangi sinyal yolları ile etkileşime girerek sağladığı ve immün checkpoint mediatörler üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. İlaveten söz konusu inhibitörün, immün checkpoint molekül olan IDO1 inhibitörü navoximod ile kombinasyon halinde uygulanmasının kanser hücreleri üzerindeki etkisine dair spesifik bir çalışma yer almamaktadır. Bundan dolayı bu tez çalışmasında BIRC5 inhibitörü sepantronyum bromür ve IDO1 inhibitörü navoximodun ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının hücre canlılığı, hücre migrasyonu ve immün kaçıştaki olası rolleri *in vitro* çalışmalar ile değerlendirilmiştir.

PD-L1, özellikle kanser hücreleri ve makrofajlar olmak üzere çeşitli hücrelerde ifade edilmektedir ve tümör hücrelerinin bağışıklıktan kaçışını teşvik etmektedir (Zhang ve ark., 2021b). PD-L1 inhibitörleri melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanser ve meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünün tedavisi için kullanılmasına rağmen belirsiz mekanizmasından dolayı hasta yanıtları %40'tan azdır (Gou ve ark., 2020). PD-1/PD-L1 blokasyonu etkili antitümör immün yanıtı teşvik etmek için yetersiz olduğundan dolayı kemoterapi, radyoterapi, angiogenez inhibitörleri ve diğer immün checkpoint inhibitörleri ile birlikte hedeflenmesi kanser tedavisinde daha yüksek yanıt oranına sahiptir (Yiv ve ark., 2022). Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada PD-L1 ve IL-6'nın kombinasyon halinde blokasyonu tümör büyümesini inhibe etmiş ve T

hücre infiltrasyonunu arttırmıştır (Mace ve ark., 2018). Wang ve arkadaşları PD-L1'in pankreas kanserinde yüksek seviyede eksprese edilen FOXP3 tarafından upregüle edilerek CD8+ T hücrelerinin aktivitesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir (Wang ve ark., 2020). Meme kanserinde yapılan bir çalışmada ise PD-L1'in susturulması, meme kanseri hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu, invazyonunu ve *in vivo* tümör büyümesini azaltmıştır (Alkaabi ve ark., 2023). 2018 yılında Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise PD-L1 ekspresyonunun rahim ağzı kanseri hastalarında lenf nodu metastaz kapasitesini arttırdığı ve kötü prognoz ile önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra PD-L1, rahim ağzı kanseri hücrelerinde bir E-kadherin/SIRT3 sinyal yolu aracılığıyla glikoz metabolizmasını da düzenlediği belirlenmiştir (Wang ve ark., 2018).

Fizyolojik olarak çoğu sağlıklı dokuda eksprese olmayan immün checkpoint CD155'in kolon kanseri, özofagus kanseri, lösemi ve nöroblastom gibi çeşitli kanserlerde ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Özofagus kanserinde yapılan çalışmada CD155 ekspresyonunun PD-L1 ile pozitif korelasyon gösterdiği, ayrıca CD155'in baskılanmasının hücre döngüsünde bozulmalara yol açarak apoptozu indüklediği ve böylelikle tümör hücrelerinin proliferasyonunu engellediği raporlanmıştır. Benzer şekilde hepatoselüler karsinomada da PD-L1 ve CD155'in yüksek oranda eksprese edildiği ve bağışıklıktan kaçışta etkili oldukları belirtilmiştir (Assal ve ark., 2024; Tang ve ark., 2022b). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomada yapılan bir çalışmada ise hastalardan elde edilen miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerde yüksek CD155 ve PD-L1 ekspresyonu gözlemlenmiştir (Mao ve ark., 2021). Meme kanserinde ise yüksek CD155 ekspresyonunun hücre yapışması ve sağkalımla ilişkili sinyal yolları ile bağlantılı olabileceği ve mezenkimal fenotip ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Özellikle CD155, EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri olan Vimentin, Zeb1 ve Slug protein ekspresyonu ile pozitif bir korelasyon göstermiştir (Zheng ve ark., 2020). PD-L1 ve CD155'in çeşitli kanser türlerinde artmış ekspresyonlarının bağışıklıktan kaçış ve tümör progresyonunda önemli roller oynadığı göz önüne alındığında, bu immün checkpoint moleküllerinin hedeflenmesine yönelik çalışmaların derinleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, PD-L1 ve CD155'in düzenlenmesinden sorumlu olabilecek moleküler sinyal yollarının detaylı biçimde aydınlatılması, hem hedefe yönelik yeni

tedavi stratejilerinin geliştirilmesine hem de kombinasyon tedavilerinin daha etkin planlanmasına olanak sağlayacaktır. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışmasında pankreas kanserinde BIRC5 ve IDO1 moleküllerinin immün checkpoint mediatörler olarak işlev gören ve immün hücrelerin baskılanmasına neden olan VISTA, PD-L1 ve CD155'in üzerindeki rolünü ve tedaviye yönelik potansiyeli kapsamlı şekilde araştırılmıştır. Çalışmada immün checkpoint mediatörler VISTA, CD155 ve PD-L1'in inhibisyonunu hedefleyen IDO1 inhibitörü navoximod ile BIRC5 inhibitörü sepantronyum bromürün ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının öncelikle pankreas kanser hücrelerindeki canlılığı ve migrasyonu üzerindeki etkileri ele alınmıştır. Sepantronyum bromürün 48 saat boyunca tek başına uygulanması sonucunda Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarında IC50 değeri sırasıyla 22,93 ve 4,66 nM olarak hesaplanmış olup çok düşük dozlarda hücre canlılığını baskılamıştır. Navoximod uygulaması ise pankreas kanseri hücre canlılığını etkilemezken, kombinasyon halinde kullanımı sepantronyum bromürün antiproliferatif etkinliğini arttırmıştır. Ayrıca yine sepantronyum bromürün navoximod ile kombinasyon halinde kullanımı hem sepantronyum bromür hem de navoximodun ayrı ayrı kullanımına kıyasla pankreas kanseri hücre göçünü daha fazla baskılamıştır. Buna rağmen bileşiklerin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanması sağlıklı hücre hattı olan BEAS-2B'nin göçünü etkilememiştir. Literatür ile kıyaslandığında sepantronyum bromürün pankreas kanseri hücreleri üzerinde düşük dozlarda antiproliferatif etkilere sahip olduğu ve 48 saatlik uygulama sonrasında pankreas kanseri Mia PaCa-2 hücre hattında IC50 değeri 29,36 nM olarak hesaplandığı görülmüştür (Na ve ark., 2012). Bir başka çalışmada ise sepantronyum bromürün pankreas kanseri hücre göçünü engellediği ve tümör progresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Brown ve ark., 2020). Ma ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada BIRC5'in aşırı ekspresyonu akciğer kanseri hücrelerinde mTOR sinyal yolu aracılığı ile PD-L1 ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır. İlaveten BIRC5'in yüksek seviyedeki ekspresyonu PD-L1'i upregule ederek kanser hücrelerinin immün yanıtı kaçışını desteklemiştir (Ma ve ark., 2022). Metastatik kanser hastalarında IDO1 inhibitörü navoximod bileşiğinin atezolizumab gibi PD-L1 inhibitörleriyle kombinasyon halinde uygulanmasının antitümör aktivitesi açısından umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Jung ve ark.,2019; Naour ve ark., 2020). İlaveten navoximod, plazma ve dokuda kinurenin konsantrasyonlarını yaklaşık %50 oranında azaltmış, IDO1 tarafından

indüklenen T hücresi baskısını engellemiş ve T hücresi fonksiyonunu yeniden sağlamıştır (Ebata ve ark., 2020). Ancak, navoximodun immün süpresör moleküller ve immün checkpoint PD-L1 ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Buna karşın immün checkpoint VISTA ve CD155 ile olan ilişkisine dair henüz bir çalışma mevcut değildir. Bu doktora tez çalışmasında, immünoterapötik hedefler arasında yer alan BIRC5 ve IDO1'in kombinasyon halinde baskılanması ile, immün checkpoint molekülleri VISTA, PD-L1 ve CD155'in ekspresyon düzeyleri üzerindeki sinerjistik etkileri ilk kez kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, immün kaçış mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılmasına katkı sağlarken, kombinasyon tedavilerine yönelik potansiyel yeni stratejilerin geliştirilmesine de zemin hazırlamaktadır. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, bileşiklerin tek başına kullanılmasına kıyasla kombinasyon halinde uygulanması Mia PaCa-2 ve AsPC-1 hücre hatlarında CD155 ve PD-L1 gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olmuştur. İlaveten bileşiklerin kombinasyon halinde uygulanması sadece Mia PaCa-2 hücre hattında VISTA gen ekspresyonunun daha belirgin şekilde baskılanmasına neden olmuştur. Buna ek olarak, kombinasyon tedavisinin EMT süreçleri üzerindeki etkileri incelenmiştir ve Mia PaCa-2 hücre hattında EMT sorumlu N-kadherin gen ekspresyonunun down regüle olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulguların ardından, immün checkpoint moleküllerinin protein düzeylerini değerlendirmek amacıyla Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, navoximod ve sepantronyum bromür bileşiklerinin kombinasyon halinde uygulanmasının, ayrı ayrı uygulamaya kıyasla, pankreas kanseri hücre hatlarında VISTA ve PD-L1 protein ekspresyon düzeylerini daha belirgin şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Bulgularımız AsPC-1 pankreas kanseri hücre hattında PD-L1 ve VISTA ekspresyon düzeylerinin, CD155 ile negatif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, farklı immün kaçış yollarının birlikte değerlendirilmesinin, hedefe yönelik immünoterapilerde daha etkili stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Yaptığımız analizler sonrasında navoximod ve sepantronyum bromür bileşiklerinin kombinasyon halinde uygulanmasının, bazı pankreas kanseri hücre hatlarında immün kaçış mekanizmalarını hedef alarak CD155, PD-L1 ve VISTA gibi immün checkpoint moleküllerinin gen ve protein düzeylerinde anlamlı düzeyde baskılama sağladığını ortaya koymuştur. Özellikle VISTA gen ve protein ekspresyonundaki belirgin azalma, bu molekülün hedeflenmesinin pankreas tümör

mikroçevresinde immün yanıtın yeniden programlanmasında kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, kombinasyon tedavisinin EMT sürecine dair önemli bir gösterge olan N-kadherin gen ekspresyonunu da inhibe etmesi, bu yaklaşımın sadece immün modülasyonla sınırlı kalmayıp tümör progresyonunu doğrudan etkileyebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Tüm bu veriler doğrultusunda, navoximod ve sepantronyum bromür kombinasyonunun, pankreas kanserinde immünoterapötik stratejiler açısından umut vadeden bir yaklaşım sunduğu değerlendirilmektedir.

AGR2 meme, pankreas, prostat ve özofagus gibi birçok kanser türünde yüksek seviyede eksprese olmaktadır ve tümör gelişimi, invazyonu ve metastazı gibi süreçlerde pozitif korelasyon göstermektedir (Zhang ve ark., 2023). p53 molekülünün inhibitörü olarak bilinen AGR2, pankreatik duktal adenokarsinomanın erken evrelerinde tespit edilmektedir (Zhang ve ark., 2021c). Kolon kanserinde yapılan bir çalışmada AGR2'nin PD-L1 ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu gösterilmiş olup, bu durum AGR2'nin kolon kanseri hücrelerinin bağışıklıktan kaçma ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Martisova ve ark., 2024). Yapılan bir çalışmada ise pankreas kanserinden salgılanan AGR2'nin, Wnt/ β -katenin yolağı aracılığıyla kanserle ilişkili fibroblastlardan (CAF'lardan) insülin benzeri büyüme faktörü 1'in (IGF1) üretimini sağladığı gösterilmiştir. IGF1 reseptörü ise AKT yolu aracılığıyla tümör hücresi proliferasyonunu ve hayatta kalmasını teşvik ettiği bilinmektedir (Li ve ark., 2025). Wnt/ β -katenin sinyal yolağında görevli transkripsiyon faktörü LEF1'in pankreas kanserli hastalarda artan ekspresyonunun lokal lenf nodu metastazı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Li ve ark., 2021a). Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, LEF1'in CD4⁺, CD8⁺ ve Treg hücreleri dahil olmak üzere olgun T hücrelerinde PD-1 gen ekspresyonunu pozitif yönde düzenlediği gösterilmiştir. Bu bulgu, LEF1'in immün checkpoint inhibitörlerine yanıtı artırma potansiyeli taşıdığına ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlayabileceğine işaret etmektedir (Zhao ve ark., 2023). AGR2 ve LEF1 proteinlerinin immün düzenleyici rolleri dikkate alındığında, bu proteinlerin immün checkpoint molekülleri üzerindeki potansiyel düzenleyici etkileri bu tez çalışmasında incelenmiştir.

İmmün checkpoint HVEM, bağlandığı liganda bağlı olarak farklı bağışıklık yanıtları başlatabilen çift yönlü bir immün düzenleyici molekül olarak bilinmektedir. BTLA ile etkileşimi sonucunda efektör T hücrelerinde inhibitör sinyalleşme başlatarak immün yanıtı baskımlarken, LIGHT ile etkileşimi sonrasında T hücresi aktivasyonunu destekleyen uyarıcı sinyaller iletmektedir (Yao ve ark., 2025). Önceki çalışmalarda HVEM'in mide, prostat ve kolon kanseri hastalarında kötü prognoz belirtici olabileceği gösterilmiştir. (Inoue ve ark., 2015; Lan ve ark., 2017; Aubert ve ark.,2021). Mide kanserine yönelik yapılan bir başka çalışmada ise HVEM protein düzeyinin yalnızca kanserli hasta grubunda artış gösterdiği ve bu artışın özellikle ileri evre vakalarda daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Azarafza ve ark., 2022). Yumurtalık kanserinde ise HVEM ekspresyon seviyesi HIF-1 α 'nın ekspresyonu ile pozitif korelasyon göstermiştir. Artan HVEM ekspresyonunun hipoksik koşullar altında hücre çoğalmasını teşvik ederek hücre apoptozunu baskıladığı tespit edilmiştir (Duan ve ark., 2020). Akciğer kanserinde ise HVEM'in ileri metastazlı hastalarda daha yüksek seviyede eksprese olduğu ve immün checkpoint molekül PD-L1 ekspresyonu ile negatif bir korelasyona sahip olduğu tespit edilmiştir (Ren ve ark., 2028). Bununla birlikte HVEM'in pankreas kanserindeki ekspresyon düzeyi ve fonksiyonel rolüne ilişkin literatürdeki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda çalışmamızda; çeşitli kanser türlerinde yüksek düzeyde eksprese olduğu, tümör immün kaçışına katkı sağladığı ve zayıf sağkalımla ilişkili olduğu bildirilen immün checkpoint molekülü HVEM'in, FAK inhibitörü PF-562271 bileşiğı ile olan etkileşiminin pankreas kanseri modelinde araştırılması amaçlanmıştır.

Tüm bu literatürden yola çıkarak TÜBİTAK 1002-A grubu desteğı ile yürütölen “Pankreas Kanserinde İmmün Checkpoint HVEM'in Düzenleyici Rolünün Sistem Biyolojisi Yaklaşımıyla Araştırılması” başlıklı projemiz kapsamında yapılan *in siliko* ön analizlerde, PF-562271'in muhtemel AGR2 ve LEF1 inhibitörü olabileceğı ortaya konmuştur (Bu çalışma halen yayın aşamasındadır.). Bu kapsamda FAK inhibitörü PF-562271'in, AGR2 ve LEF1 molekülleri aracılığıyla immün checkpoint HVEM üzerinde düzenleyici bir etki oluşturabileceğı düşünülmektedir. FAK, hücre proliferasyonu ve göçünün düzenlenmesinde kritik rol üstlenen tirozin kinaz yapısında bir proteindir. Melanom ve mide kanseri modellerinde yüksek FAK ekspresyonunun tümör hücrelerinin çoğalması ve migrasyonunu artırdığı gösterilmiştir. PF-562271, FAK'a karşı geliştirilmiş

küçük molekül inhibitörlerden biridir (He ve ark., 2024). Yapılan çalışmalar, kolorektal ve over kanseri hücrelerinde düşük dozlarda uygulanan PF-562271'in hücre göçünü baskıladığını ve kök hücre belirteçleri (Nanog, OCT4, CD133, CD44, c-Myc) ekspresyonunu azalttığını ortaya koymuştur (Xu ve ark., 2023; Pan ve ark., 2023). Tez çalışmasında öncelikle PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkileri incelenmiştir. 48 saat boyunca PF-562271 bileşiğine maruz kalan BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 6,12, 9,55 ve 54,64 µM olarak tespit edilmiştir. Hücre canlılık analizini takiben hücre koloni oluşum analizi ve hücre migrasyon analizi de yapılmıştır ve PF-562271 bileşiğinin 48 saat boyunca pankreas kanseri hücre hatları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Koloni oluşum analizinde ve hücre migrasyon analizinde PF-562271 bileşiğinin uygulama yapılması için 1 ve 5 µM dozları seçilmiştir. Bulgularımız özellikle BxPC-3 ve PANC-1 hücre hatlarında PF-562271'in düşük dozlarda hücre migrasyon ve koloni oluşumunu baskıladığını göstermektedir. Pan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yumurtalık kanserinde PF-562271'in hücre döngüsünü durdurduğu, hücre göçünü ve proliferasyon sürecini inhibe ettiği gösterilmiştir (Pan ve ark., 2023). Prostat kanseri hücrelerinde de benzer şekilde PF-562271 bileşiğinin hücre sağkalımını azalttığı, *in vivo* çalışmalarda ise tümör büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Lee ve ark., 2015). Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada ise PF-562271 bileşiğinin kanserle ilişkili fibroblastların ve makrofajların göçünü engellediği gösterilmiştir. Ek olarak, tedaviden sonra pankreas kanseri invazyon ve metastazında önemli bir azalma gözlemlenmiştir (Stokes ve ark., 2011). Bulgularımız PF-562271 bileşiğinin önceki çalışmalarda rapor edilen antiproliferatif etkilerini desteklemektedir. PF-562271 bileşiğinin antiproliferatif etkisi, hücre migrasyonunu ve koloni oluşumunu baskılama üzerindeki etkileri göz önüne alındığında pankreas kanseri tedavisi için PF-562271'in daha fazla araştırılması gerekmektedir. Ancak şu ana kadar pankreas kanserinde PF-562271 bileşiğinin literatürde etkilerini inceleyen yalnız bir çalışma mevcuttur. Bundan dolayı PF-562271 bileşiğinin etki mekanizmalarının aydınlatılması pankreas kanserine karşı tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir. PF-562271 bileşiğinin immün düzenleyici potansiyelinin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda bu bileşiğin T hücresi aktivasyonu ve proliferasyonu üzerinde inhibitör etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular PF-562271'in yalnızca tümör hücrelerine yönelik

antiproliferatif etkileriyle değil, aynı zamanda immün sistemi modüle edici özellikleriyle de öne çıktığını ortaya koymaktadır (Wiemer ve ark., 2013). Bir başka çalışma ise PF-562271'in MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında PF-562271 bileşiğinin immün checkpoint PD-L1 düzeylerini azaltabileceğini ve böylece tümör hücrelerinin immün sistemden kaçış mekanizmalarını zayıflatabileceğini göstermiştir (Wu ve ark., 2023). Bu tez çalışmasında PF-562271 bileşiğinin yalnız HVEM ekspresyonu üzerindeki etkileri değil, aynı zamanda tümör hücresi sağkalımına katkıda bulunan survivin, hipoksiye yanıt oluşturan HIF-1A, apoptoz mekanizmasında görev alan p21, hücre döngüsünü düzenleyen siklin D1, WNT/ β -katenin yolaklarında yer alan transkripsiyon faktörü LEF1 ile metastatik potansiyelde önemli rolü olduğu bilinen AGR2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi de değerlendirilmiştir. Hücre döngüsü ile ilişkili gen ekspresyonlarının PF-562271 bileşiği tarafından düzenlendiği ve survivin, siklin D1 ve p21 gen ekspresyonlarında bir azalma tespit edilmiştir. Buna ilaveten HIF-1A gen ekspresyonu da yalnız PANC-1 hücre hattında azalmıştır. Literatürde yumurtalık kanserinde ve rhabdomyosarkomada PF-562271 bileşiğinin G1 fazı hücre döngüsünü durdurmayı indükleyerek hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Al-Ghabkari ve ark., 2019; Pan ve ark., 2023). Yaptığımız qRT-PCR sonuçlarına göre PF-562271 bileşiğinin özellikle PANC-1 hücre hattında LEF1 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskıladığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, AGR2 gen ekspresyonunun BxPC-3, PANC-1 ve AsPC-1 hücre hatlarında PF-562271 uygulamasıyla azaldığı gösterilmiştir. HVEM gen ekspresyonu ise özellikle PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarında belirgin şekilde baskılanmıştır. Bu bulgular, PF-562271'in AGR2, LEF1 genleri üzerindeki düzenleyici etkilerini hücre hattı özgüllüğünde ortaya koymaktadır. PF-562271 bileşiğinin HVEM protein seviyesindeki etkilerinin tespit edilmesi için yapılan Western blot analizi de qRT-PCR verilerimizi doğrulamıştır. Özellikle PANC-1 ve BxPC-3 hücre hattında HVEM proteini güçlü şekilde baskılanmıştır. Sonuçlarımız PF-562271'in yalnızca tümör hücre proliferasyonu ve göçü üzerinde değil, aynı zamanda tümör mikroçevresindeki immün baskılayıcı sinyallerin modülasyonu açısından da önemli bir ajan olabileceğini ortaya koymaktadır.

İmportin- β , nükleer transport reseptörü olarak bilinmektedir ve meme, prostat ve akciğer kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünde yüksek seviyede eksprese edilmektedir

(Kuusisto ve Jans., 2015; Lim ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018; Verrico ve ark., 2020). Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada İmportin- β 'nin susturulması, prostat kanseri hücre döngüsünü durdurarak hücre büyümesini engellemiştir (Yang ve ark., 2019). İmportazole bileşiği İmportin- β 'nin küçük moleküllu inhibitörü olarak keşfedilmiştir ve importin- β /RanGTP aracılı nükleer importu bozmaktadır (Soderholm ve ark., 2011). Akut miyeloid lösemi hücrelerine importazole uygulanması ise hücrelerin apoptoza gitmesine neden olmuştur (Xie ve ark., 2025). Literatürden yola çıkarak importazolenin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferative etkisi, apoptoz sürecindeki rolü ve immün modülatör etkisi incelenmiştir. Bu çalışma, importazole bileşiğinin pankreas kanseri üzerinde yapılan ilk çalışmasıdır. Çalışma kapsamında importazolenin yalnız hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri değil, aynı zamanda apoptoz mekanizmaları, immün kaçışta rol oynayan immün checkpoint molekülleri (PD-L1, VISTA) ve tümör progresyonuyla ilişkilendirilen TRIM15 geni üzerindeki düzenleyici etkileri de değerlendirilmiştir. Pankreas kanseri hücre hattı AsPC-1'e 48 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda importazole uygulanmış ve MTT analizi sonucunda bileşiğin düşük dozlarda hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda importazolenin AsPC-1 hücrelerinde IC₅₀ değerinin 14,9 μ M olduğu belirlenmiş, bu da bileşiğin düşük dozlarda sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Buna ek olarak importazolenin apoptoz sürecindeki etkisinin incelenmesi için Bcl-2 ve BAX genlerine bakılmış olup, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda uygulanan importazole, anti apoptotik gen olan Bcl-2 ekspresyonunu yaklaşık 2 kat baskılamıştır. Literatürde miyelom hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise importazolenin klasik NF- κ B sinyal yolağını baskılayarak hücrelerin apoptoza gitmesine neden olmuştur (Yan ve ark., 2015). Bu bulgular, çalışmamızda elde edilen sonuçları desteklemektedir.

E3 ubiquitin ligaz ailesinin bir üyesi olan TRIM15, çeşitli kanser türlerinde tümör progresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Cai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, TRIM15'in aşırı ekspresyonu pankreas kanseri hücrelerinin metastazını ve ilerlemesini indüklediği gösterilmiştir (Cai ve ark., 2024). Bir başka çalışmada ise akciğer kanserinde TRIM15'in artan ekspresyonunun zayıf sağkalım ile ilişkili olduğu ve tümör proliferasyonunu ve metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir (Liang ve ark., 2022). Ayrıca TRIM15'in normal dokulara kıyasla mide kanseri dokularında daha yüksek seviyede

eksprese olduğu, bu durumun ise invazyonu arttırarak zayıf sağkalıma neden olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018). Yüksek dereceli seröz yumurtalık kanserinde yapılan bir çalışmada ise TRIM15'in artan ekspresyonunun, malign seyrin ilerlemesini desteklediğini gösterilmiştir. İlaveten TRIM15'in aşırı ekspresyonu yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri dokularında hipoksik mikroçevre ile ilişkilendirilmiştir (Wei ve ark., 2025). Bu tez çalışması kapsamında pankreas kanserinde TRIM15'in importazole bileşiği tarafından düzenlenip düzenlenmediğinin anlaşılması için 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda importazole pankreas kanseri hücrelerine uygulanmış ve TRIM15 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskıladığı tespit edilmiştir. Akciğer kanserinde yapılan bir çalışmada importazole bileşiğinin radyasyonun neden olduğu immün checkpoint PD-L1 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Yoshino ve ark., 2021). Bu bilgi doğrultusunda, importazolenin pankreas kanserinde olası immün modülatör etkilerini değerlendirmek amacıyla, immün checkpoint molekülleri VISTA ve PD-L1 gen ekspresyonları üzerindeki düzenleyici etkileri araştırılmıştır. İportazolenin 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda AsPC-1 hücre hattına uygulanması VISTA gen ekspresyonunu yaklaşık 2 kat baskılarken, PD-L1 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Sonuçlarımız importazolenin yalnız İportin- β inhibitörü değil, aynı zamanda immün checkpoint VISTA'nın da muhtemel inhibitörü olabileceğini *in vitro* analizler ile göstermektedir.

Tüm bu sonuçlar, immün checkpointlerin farklı sinyal yolları ile düzenlenebileceğini ve bu düzenlemenin hedeflenmesinin pankreas kanseri gibi tedaviye dirençli malignitelerde terapötik avantaj sağlayabileceğini ortaya koymaktadır. Çalışmada kullanılan PF-562271, importazole, navoximod ve sepantronyum bromür gibi bileşiklerin uygulanmasıyla immün süpresör moleküllerin ekspresyonu azalabilmektedir. Bu bağlamda elde edilen bulgular immünoterapi çalışmalarında duyarlılığı arttıracak potansiyel kombinasyon stratejilerinin gelişmesine katkı sağlayabilir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışması, üç farklı kurum dışı proje kapsamında desteklenmiş olup; her bir proje, özgün kimyasal bileşikler ve hedeflenen farklı hücresel sinyal yolları aracılığıyla, pankreas kanseri hücre hatlarında immünomodülatör yanıtların çok boyutlu olarak değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Projelerin her biri, spesifik inhibitörler aracılığıyla epigenetik modifikasyonlar, apoptotik yanıtlar, metabolik düzenlemeler ve tümör mikroçevresiyle ilişkili moleküler mekanizmalar gibi farklı biyolojik süreçleri hedef alarak; immünomodülatör etkilerin çok yönlü olarak değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

Tez çalışmasının ilk bölümünde HDAC inhibitörü vorinostat ve Twist1'in pankreas kanseri hücre hatlarında sinerjistik etkileri hücre canlılığı, hücre migrasyonu, EMT biyobelirteçleri ve immün checkpoint VISTA üzerinde incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında yürütülen deney sonuçlarına göre pankreas kanseri hücre hatlarında vorinostat ve Twist1-siRNA düşük konsantrasyonlarda antiproliferatif ve anti-migrasyon etki göstermiştir. Vorinostat ve Twist1-siRNA kombinasyon halinde kullanımı pankreas kanseri hücre hatlarında EMT biyobelirteçlerinin ekspresyonunu ve VISTA gen ekspresyonunu güçlü bir şekilde baskılamıştır.

Tez çalışmasının diğer kısmında, BIRC5 inhibitörü sepantronyum bromür ve immün checkpoint IDO1 inhibitörü navoximodun ayrı ayrı ve kombinasyon halindeki uygulanması pankreas kanseri hücreleri ve sağlıklı hücrelerdeki antiproliferatif etkisine, hücre migrasyonu diğer immün checkpoint moleküller olan PD-L1, CD155 ve VISTA üzerindeki immünomodülatör etkilerine bakılmıştır. Navoximod bileşiği sağlıklı ve kanser hücrelerinde sitotoksositeye neden olmazken, sepantronyum bromür yalnız kanser hücrelerinin canlılığını düşük dozlarda inhibe etmiştir. Bileşiklerin kombinasyon ve tek başına uygulanması sağlıklı hücrelerin migrasyonunu etkilemezken, kanser hücrelerinin migrasyon yeteneklerini tek başına kullanıma kıyasla baskılamıştır. İlaveten, her iki bileşiğin immün checkpoint molekülleri üzerindeki düzenleyici etkileri değerlendirilmiş ve bu moleküllerin VISTA, PD-L1 ve CD155 ekspresyon düzeylerinde çeşitli düzeylerde baskılama sağladığı gözlemlenmiştir.

Tez çalışmasının üçüncü bölümünde FAK inhibitörü olarak bilinen küçük inhibitör molekül PF-562271 bileşiğinin immün checkpoint HVEM üzerindeki düzenleyici etkileri belirlenmiştir. PF-562271 bileşiğinin pankreas kanseri hücre hatlarında hücre sitotoksitesi, hücre koloni oluşumu ve hücre migrasyonu üzerindeki etkileri değerlendirildi. Ayrıca bu bileşik HVEM, LEF1 ve AGR2 genlerinin ekspresyon seviyelerini azaltmış olup, bununla birlikte HVEM protein düzeyinde de baskılamaya yol açmaktadır. Elde edilen veriler, PF-562271'in pankreas kanseri biyolojisinde önemli rol oynayan bu gen ve proteinler üzerinden tümör progresyonunu baskılayabileceğini ve immün checkpointler üzerinde düzenleyici etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışmasının son bölümünde ise İmportin β 1 inhibitörü olan importazole bileşiğinin pankreas kanseri hücre hattı AsPC-1'de immün checkpoint molekülleri PD-L1 ve VISTA ile birlikte, TRIM15 ve apoptoz genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki düzenleyici etkileri incelenmiştir. İmportazole, pankreas kanseri hücre canlılığını düşük dozlarda azaltırken, TRIM15 ve VISTA gen ekspresyonunu baskılamıştır. Buna rağmen PD-L1 gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Ek olarak importazole bileşiği anti apoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunu da baskılamıştır. Bu bulgular, importazolenin immün yanıt düzenleyicileri ve hücre ölüm yolları üzerinde çok yönlü etkiler oluşturabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında pankreas kanserine karşı potansiyel etkileri olan farklı küçük molekül inhibitörleri incelenmiştir. Yapılan deneysel analizler sonucunda bileşiklerin yalnızca antiproliferatif etkiler göstermediği, aynı zamanda bağışıklık yanıtını da etkileyerek immün düzenleyici özellikler sergileyebileceği ortaya konulmuştur. Hücre canlılığının azaltılması, bazı immün checkpoint ve apoptoz genlerinin ekspresyonunun baskılanması gibi çok yönlü etkiler, bu bileşiklerin pankreas kanseri immünoterapisinde potansiyel ilaç adayları olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

7. NOT

Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin bir kısmı aşığıda verilen dergide (Topcu ve Cacan, 2025) yayınlanmıştır. Elde edilen diğer veriler yakında başka makalelerde yayınlanacaktır.

Topcu, K. S. B., & Cacan, E. (2025). Twist1 Regulates the Immune Checkpoint VISTA and Promotes the Proliferation, Migration and Progression of Pancreatic Cancer Cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 29(9), e70586.



8. KAYNAKÇA

- A-Kader, H. H., & Ghishan, F. K. (2012). The Pancreas. Textbook of Clinical Pediatrics, 1925–1936. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02202-9_198
- Abe, K., Kitago, M., Kitagawa, Y., & Hirasawa, A. (2021). Hereditary pancreatic cancer. International Journal of Clinical Oncology, 26(10), 1784–1792. <https://doi.org/10.1007/s10147-021-02015-6>
- Ali, M. W., Cacan, E., Liu, Y., Pierce, J. Y., Creasman, W. T., Murph, M. M., Govindarajan, R., Eblen, S. T., Greer, S. F., & Hooks, S. B. (2013). Transcriptional suppression, DNA methylation, and histone deacetylation of the regulator of G-protein signaling 10 (RGS10) gene in ovarian cancer cells. PloS one, 8(3), e60185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060185>
- Al-Ghabkari, A., Qasrawi, D. O., Alshehri, M., & Narendran, A. (2019). Focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation is a key regulator of embryonal rhabdomyosarcoma (ERMS) cell viability and migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 145, 1461–1469. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02913-3>
- Al-Yahya, S., Al-Saif, M., Al-Ghamdi, M., Moghrabi, W., Khabar, K. S. A., & Al-Souhibani, N. (2024). Post-transcriptional regulation of BIRC5/survivin expression and induction of apoptosis in breast cancer cells by tristetraprolin. RNA biology, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2286101>
- Alkaabi, D., Arafat, K., Sulaiman, S., Al-Azawi, A. M., & Attoub, S. (2023). PD-1 independent role of PD-L1 in triple-negative breast cancer progression. International journal of molecular sciences, 24(7), 6420. <https://doi.org/10.3390/ijms24076420>
- Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. Frontiers in pharmacology, 8, 561. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00561>
- Amobi-McCloud, A., Muthuswamy, R., Battaglia, S., Yu, H., Liu, T., Wang, J., Putluri, V., Singh, P. K., Qian, F., Huang, R. Y., Putluri, N., Tsuji, T., Lugade, A. A., Liu, S., & Odunsi, K. (2021). IDO1 Expression in Ovarian Cancer Induces PD-1 in T Cells via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. Frontiers in immunology, 12, 678999. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.678999>
- Amri, F., Belkhatat, C., Yeznasni, A., Koulali, H., Jabi, R., Zazour, A., Abda, N., Bouziane, M., Ismaili, Z., & Kharrasse, G. (2023). Association between pancreatic cancer and diabetes: insights from a retrospective cohort study. BMC cancer, 23(1), 856. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11344-w>
- Andrzejczak, A., & Karabon, L. (2024). BTLA biology in cancer: from bench discoveries to clinical potentials. Biomarker research, 12(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00556-2>
- Ang, H. L., Mohan, C. D., Shanmugam, M. K., Leong, H. C., Makvandi, P., Rangappa, K. S., Bishayee, A., Kumar, A. P., & Sethi, G. (2023). Mechanism of epithelial-mesenchymal transition in cancer and its regulation by natural compounds. Medicinal research reviews, 43(4), 1141–1200. <https://doi.org/10.1002/med.21948>

- Ansari, D., Tingstedt, B., Andersson, B., Holmquist, F., Stureson, C., Williamsson, C., Sasor, A., Borg, D., Bauden, M., & Andersson, R. (2016). Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. *Future oncology* (London, England), 12(16), 1929–1946. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0010>
- Anzai, H., Yoshimoto, S., Okamura, K., Hiraki, A., & Hashimoto, S. (2022). IDO1-mediated Trp-kynurenine-AhR signal activation induces stemness and tumor dormancy in oral squamous cell carcinomas. *Oral Science International*, 19(1), 31–43.
- Assal, R. A., Elemam, N. M., Mekky, R. Y., Attia, A. A., Soliman, A. H., Gomaa, A. I., Efthimiadou, E. K., Braoudaki, M., Fahmy, S. A., & Youness, R. A. (2024). A Novel Epigenetic Strategy to Concurrently Block Immune Checkpoints PD-1/PD-L1 and CD155/TIGIT in Hepatocellular Carcinoma. *Translational oncology*, 45, 101961. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.101961>
- Aubert, N., Brunel, S., Olive, D., & Marodon, G. (2019). TNFRSF14 (HVEM) is a novel immune checkpoint for cancer immunotherapy in humanized mice.
- Aubert, N., Brunel, S., Olive, D., & Marodon, G. (2021). Blockade of HVEM for Prostate Cancer Immunotherapy in Humanized Mice. *Cancers*, 13(12), 3009. <https://doi.org/10.3390/cancers13123009>
- Azarafza, M., Tehrani, M., Valadan, R., Maleki, I., Mohammad Mehdi Ghaffari-Hamedani, S., Ghanadan, A., Alizadeh-Navaei, R., & Ajami, A. (2022). Role of BTLA/HVEM network in development of gastric cancer. *Human immunology*, 83(8-9), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.07.003>
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., & Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439(7077), 682–687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- Blazquez, R., Rietkötter, E., Wenske, B., Wlochowicz, D., Sparrer, D., Vollmer, E., Müller, G., Seegerer, J., Sun, X., Dettmer, K., Barrantes-Freer, A., Stange, L., Utpatel, K., Bleckmann, A., Treiber, H., Bohnenberger, H., Lenz, C., Schulz, M., Reimelt, C., Hackl, C., ... Pukrop, T. (2020). LEF1 supports metastatic brain colonization by regulating glutathione metabolism and increasing ROS resistance in breast cancer. *International journal of cancer*, 146(11), 3170–3183. <https://doi.org/10.1002/ijc.32742>
- Borgeaud, M., Sandoval, J., Obeid, M., Banna, G., Michielin, O., Addeo, A., & Friedlaender, A. (2023). Novel targets for immune-checkpoint inhibition in cancer. *Cancer treatment reviews*, 120, 102614. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102614>
- Bose, M., Grover, P., Sanders, A. J., Zhou, R., Ahmad, M., Shwartz, S., Lala, P., Nath, S., Yazdanifar, M., Brouwer, C., & Mukherjee, P. (2022). Overexpression of MUC1 Induces Non-Canonical TGF- β Signaling in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 821875. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.821875>
- Briukhovetska, D., Suarez-Gosalvez, J., Voigt, C., Markota, A., Giannou, A. D., Schübel, M., Jobst, J., Zhang, T., Dörr, J., Märkl, F., Majed, L., Müller, P. J., May, P., Gottschlich, A., Tokarew, N., Lücke, J., Oner, A., Schwerdtfeger, M., Andreu-Sanz, D., Grünmeier, R., ... Kobold, S. (2023). T cell-derived interleukin-22 drives the expression of CD155 by cancer cells to suppress NK cell function and

- promote metastasis. *Immunity*, 56(1), 143–161.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.12.010>
- Brot, S., Cobb, J., Alibhai, A. A., Jackson-Oxley, J., Haque, M., Patke, R., Harris, A. E., Woodcock, C. L., Lothion-Roy, J., Varun, D., Thompson, R., Gomes, C., Kubale, V., Dunning, M. D., Jeyapalan, J. N., Mongan, N. P., & Rutland, C. S. (2024). Immunohistochemical Investigation into Protein Expression Patterns of FOXO4, IRF8 and LEF1 in Canine Osteosarcoma. *Cancers*, 16(10), 1945. <https://doi.org/10.3390/cancers16101945>
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular cancer research : MCR*, 21(11), 1142–1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>
- Brown, M., Zhang, W., Yan, D., Kenath, R., Le, L., Wang, H., Delitto, D., Ostrov, D., Robertson, K., Liu, C., & Pham, K. (2020). The role of survivin in the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and a novel survivin-targeted therapeutic for PDAC. *PloS one*, 15(1), e0226917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226917>
- Buchholz, K., Dursiewicz, J., Klimaszewska-Wisniewska, A., Wisniewska, M., Slupski, M., & Grzanka, D. (2024). SKA3 Expression as a Prognostic Factor for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *International journal of molecular sciences*, 25(10), 5134. <https://doi.org/10.3390/ijms25105134>
- Bullock, K. K., & Richmond, A. (2024). Beyond Anti-PD-1/PD-L1: Improving Immune Checkpoint Inhibitor Responses in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, 16(12), 2189. <https://doi.org/10.3390/cancers16122189>
- Cacan E. (2017). Epigenetic-mediated immune suppression of positive co-stimulatory molecules in chemoresistant ovarian cancer cells. *Cell Biol Int*. 2017 Mar;41(3):328-339. doi: 10.1002/cbin.10729
- Cacan, E., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2015). Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases. *International journal of oncology*, 47(6), 2264–2275. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3192>
- Cacan, E., Ali, M. W., Boyd, N. H., Hooks, S. B., & Greer, S. F. (2014). Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance. *PloS one*, 9(1), e87455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087455>
- Cacan E. (2016). Histone Deacetylase-1-mediated Suppression of FAS in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Anticancer research*, 36(6), 2819–2826.
- Cai, H., Zhao, J., Zhang, Q., Wu, H., Sun, Y., Guo, F., Zhou, Y., Qin, G., Xia, W., Zhao, Y., Liang, X., Yin, S., Qin, Y., Li, D., Wu, H., & Ren, D. (2024). Ubiquitin ligase TRIM15 promotes the progression of pancreatic cancer via the upregulation of the IGF2BP2-TLR4 axis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1870(5), 167183. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2024.167183>
- Cai, J., Chen, H., Lu, M., Zhang, Y., Lu, B., You, L., Zhang, T., Dai, M., & Zhao, Y. (2021). Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer letters*, 520, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.027>
- Carlos, J. A. E. G., Lima, K., Rego, E. M., Costa-Lotufo, L. V., & Machado-Neto, J. A. (2024). The survivin/XIAP suppressant YM155 impairs clonal growth and induces apoptosis in JAK2^{V617F} cells. *Hematology, transfusion and cell*

- therapy, 46 Suppl 6(Suppl 6), S217–S227.
<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.05.012>
- Ceeraz, S., Nowak, E. C., & Noelle, R. J. (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in immunology*, 34(11), 556–563.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.003>
- Chao, M. W., Chang, L. H., Tu, H. J., Chang, C. D., Lai, M. J., Chen, Y. Y., Liou, J. P., Teng, C. M., & Pan, S. L. (2019). Combination treatment strategy for pancreatic cancer involving the novel HDAC inhibitor MPT0E028 with a MEK inhibitor beyond K-Ras status. *Clinical epigenetics*, 11(1), 85.
<https://doi.org/10.1186/s13148-019-0681-6>
- Chen, F., Zhao, D., Huang, Y., Wen, X., & Feng, S. (2023). Synergetic impact of combined navoximod with cisplatin mitigates chemo-immune resistance via blocking IDO1+ CAFs-secreted Kyn/AhR/IL-6 and pol ζ-prevented CIN in human oral squamous cell carcinoma. *Life sciences*, 335, 122239.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122239>
- Chen, H., Molberg, K., Carrick, K., Niu, S., Rivera Colon, G., Gwin, K., Lewis, C., Lea, J., Panwar, V., Zheng, W., Castrillon, D. H., & Lucas, E. (2024). Expression and Prognostic Significance of LAG-3, TIGIT, VISTA, and IDO1 in Endometrial Serous Carcinoma. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 37(8), 100532.
<https://doi.org/10.1016/j.modpat.2024.100532>
- Chen, W., Lu, C., & Hong, J. (2018). TRIM15 Exerts Anti-Tumor Effects Through Suppressing Cancer Cell Invasion in Gastric Adenocarcinoma. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 8033–8041. <https://doi.org/10.12659/MSM.911142>
- Chen, Y. C., He, X. L., Qi, L., Shi, W., Yuan, L. W., Huang, M. Y., Xu, Y. L., Chen, X., Gu, L., Zhang, L. L., & Lu, J. J. (2022). Myricetin inhibits interferon-γ-induced PD-L1 and IDO1 expression in lung cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 197, 114940. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.114940>
- Cheong, J. E., & Sun, L. (2018). Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities. *Trends in pharmacological sciences*, 39(3), 307–325.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.007>
- Cheung, T. C., Atwell, S., Bafetti, L., Cuenca, P. D., Froning, K., Hendle, J., Hickey, M., Ho, C., Huang, J., Lieu, R., Lim, S., Lippner, D., Obungu, V., Ward-Kavanagh, L., Weichert, K., Ware, C. F., & Vendel, A. C. (2023). Epitope topography of agonist antibodies to the checkpoint inhibitory receptor BTLA. *Structure (London, England : 1993)*, 31(8), 958–967.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2023.05.011>
- Cordani, M., Strippoli, R., Trionfetti, F., Barzegar Behrooz, A., Rumio, C., Velasco, G., Ghavami, S., & Marcucci, F. (2024). Immune checkpoints between epithelial-mesenchymal transition and autophagy: A conflicting triangle. *Cancer letters*, 585, 216661. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216661>
- Costanza, B., Umelo, I. A., Bellier, J., Castronovo, V., & Turtoi, A. (2017). Stromal modulators of TGF-β in cancer. *Journal of clinical medicine*, 6(1), 7.
<https://doi.org/10.3390/jcm6010007>

- De Dosso, S., Siebenhüner, A. R., Winder, T., Meisel, A., Fritsch, R., Astaras, C., Szturz, P., & Borner, M. (2021). Treatment landscape of metastatic pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews*, 96, 102180. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102180>
- de Moraes, E. F., de Farias Moraes, H. G., de Moura Santos, E., Barboza, C. A. G., Téó, F. H., Salo, T., Coletta, R. D., & de Almeida Freitas, R. (2023). TWIST1 regulates proliferation, migration, and invasion and is a prognostic marker for oral tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 52(2), 127–135. <https://doi.org/10.1111/jop.13377>
- Digomann, D., Strack, J., Heiduk, M., Plesca, I., Rupp, L., Reiche, C., Nicolaus, S., Beer, C., Sommer, U., Schmitz, M., Distler, M., Weitz, J., Seifert, A. M., & Seifert, L. (2023). VISTA Ligation Reduces Antitumor T-Cell Activity in Pancreatic Cancer. *Cancers*, 15(8), 2326. <https://doi.org/10.3390/cancers15082326>
- Duan, H., Li, L., & He, S. (2023). Advances and Prospects in the Treatment of Pancreatic Cancer. *International journal of nanomedicine*, 18, 3973–3988. <https://doi.org/10.2147/IJN.S413496>
- Duan, L., Tao, J., Yang, X., Ye, L., Wu, Y., He, Q., Duan, Y., Chen, L., & Zhu, J. (2020). HVEM/HIF-1 α promoted proliferation and inhibited apoptosis of ovarian cancer cells under hypoxic microenvironment conditions. *Journal of ovarian research*, 13(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00646-3>
- Ebata, T., Shimizu, T., Fujiwara, Y., Tamura, K., Kondo, S., Iwasa, S., Yonemori, K., Shimomura, A., Kitano, S., Koyama, T., Sato, N., Nakai, K., Inatani, M., & Yamamoto, N. (2020). Phase I study of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitor navoximod (GDC-0919) as monotherapy and in combination with the PD-L1 inhibitor atezolizumab in Japanese patients with advanced solid tumours. *Investigational new drugs*, 38(2), 468–477. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00787-3>
- Eibl, G., & Rozengurt, E. (2021). Obesity and pancreatic cancer: insight into mechanisms. *Cancers*, 13(20), 5067.
- El Omari, N., Khalid, A., Makeen, H. A., Alhazmi, H. A., Albratty, M., Mohan, S., Tan, C. S., Ming, L. C., Chook, J. B., & Bouyahya, A. (2024). Stochasticity of anticancer mechanisms underlying clinical effectiveness of vorinostat. *Heliyon*, 10(12), e33052. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33052>
- Elmadani, M., Mokaya, P. O., Omer, A. A. A., Kiptulon, E. K., Klara, S., & Orsolya, M. (2025). Cancer burden in Europe: a systematic analysis of the GLOBOCAN database (2022). *BMC cancer*, 25(1), 447. <https://doi.org/10.1186/s12885-025-13862-1>
- Erden, Y. (2021). Sour black mulberry (*Morus nigra* L.) causes cell death by decreasing mutant p53 expression in HT-29 human colon cancer cells. *Food Bioscience*, 42, 101113.
- Ettrich, T. J., & Seufferlein, T. (2021). Systemic Therapy for Metastatic Pancreatic Cancer. *Current treatment options in oncology*, 22(11), 106. <https://doi.org/10.1007/s11864-021-00895-4>
- Falco, M., Masojć, B., & Sulikowski, T. (2023). Radiotherapy in Pancreatic Cancer: To Whom, When, and How?. *Cancers*, 15(13), 3382. <https://doi.org/10.3390/cancers15133382>

- Fäldt Beding, A., Larsson, P., Helou, K., Einbeigi, Z., & Parris, T. Z. (2022). Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. *BMC cancer*, 22(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09371-0>
- Fan, Y., Pan, Y., Jia, L., Gu, S., Liu, B., Mei, Z., Lv, C., Huang, H., Zhu, G., & Deng, Q. (2024). BIRC5 facilitates cisplatin-chemoresistance in a m6A-dependent manner in ovarian cancer. *Cancer medicine*, 13(1), e6811. <https://doi.org/10.1002/cam4.6811>
- Fontana, R., Mestre-Farrera, A., & Yang, J. (2024). Update on Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression. *Annual review of pathology*, 19, 133–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051222-122423>
- Funamizu, N., Honjo, M., Tamura, K., Sakamoto, K., Ogawa, K., & Takada, Y. (2023). microRNAs Associated with Gemcitabine Resistance via EMT, TME, and Drug Metabolism in Pancreatic Cancer. *Cancers*, 15(4), 1230. <https://doi.org/10.3390/cancers15041230>
- Gao, Y., He, Y., Tang, Y., Chen, Z. S., & Qu, M. (2024). VISTA: A Novel Checkpoint for Cancer Immunotherapy. *Drug discovery today*, 29(7), 104045. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.104045>
- Garcia-Martinez, L., Zhang, Y., Nakata, Y., Chan, H. L., & Morey, L. (2021). Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. *Nature communications*, 12(1), 1786. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22024-3>
- Goggins, M., Overbeek, K. A., Brand, R., Syngal, S., Del Chiaro, M., Bartsch, D. K., Bassi, C., Carrato, A., Farrell, J., Fishman, E. K., Fockens, P., Gress, T. M., van Hooft, J. E., Hruban, R. H., Kastrinos, F., Klein, A., Lennon, A. M., Lucas, A., Park, W., Rustgi, A., ... International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) consortium (2020). Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut*, 69(1), 7–17. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319352>
- Gong, L., Zhang, Y., Liu, C., Zhang, M., & Han, S. (2021). Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *International journal of nanomedicine*, 16, 1083–1102. <https://doi.org/10.2147/IJN.S290438>
- Gou, Q., Dong, C., Xu, H., Khan, B., Jin, J., Liu, Q., Shi, J., & Hou, Y. (2020). PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer. *Cell death & disease*, 11(11), 955. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03140-2>
- Gu, S., Liu, F., Xie, X., Ding, M., Wang, Z., Xing, X., Xiao, T., & Sun, X. (2023). β -Sitosterol blocks the LEF-1-mediated Wnt/ β -catenin pathway to inhibit proliferation of human colon cancer cells. *Cellular signalling*, 104, 110585. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110585>
- Guo, F., Kong, W., Li, D., Zhao, G., Anwar, M., Xia, F., Zhang, Y., Ma, C., & Ma, X. (2024). M2-type tumor-associated macrophages upregulated PD-L1 expression in cervical cancer via the PI3K/AKT pathway. *European journal of medical research*, 29(1), 357. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01897-2>
- Guo, Z., Zhang, R., Yang, A. G., & Zheng, G. (2023). Diversity of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 14, 1121285. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1121285>
- Guruprasad, P., Carturan, A., Zhang, Y., Cho, J. H., Kumashie, K. G., Patel, R. P., Kim, K. H., Lee, J. S., Lee, Y., Kim, J. H., Chung, J., Joshi, A., Cohen, I., Shestov, M., Ghilardi, G., Harris, J., Pajarillo, R., Angelos, M., Lee, Y. G., Liu, S., ... Ruella,

- M. (2024). The BTLA-HVEM axis restricts CAR T cell efficacy in cancer. *Nature immunology*, 25(6), 1020–1032. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-01847-4>
- Halbrook, C. J., Lyssiotis, C. A., Pasca di Magliano, M., & Maitra, A. (2023). Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell*, 186(8), 1729–1754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014>
- Han, M. Z., Wang, S., Zhao, W. B., Ni, S. L., Yang, N., Kong, Y., Huang, B., Chen, A. J., Li, X. G., Wang, J., & Wang, D. H. (2019). Immune checkpoint molecule herpes virus entry mediator is overexpressed and associated with poor prognosis in human glioblastoma. *EBioMedicine*, 43, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.002>
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10(3), 727.
- Hao, Y., Baker, D., & Ten Dijke, P. (2019). TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2767. <https://doi.org/10.3390/ijms20112767>
- Hayashi, A., Hong, J., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2021). The pancreatic cancer genome revisited. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(7), 469–481. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00463-z>
- Hayat, R., Manzoor, M., & Hussain, A. (2022). Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell biology international*, 46(6), 863–877. <https://doi.org/10.1002/cbin.11797>
- He, Y., Gang, B., Zhang, M., Bai, Y., Wan, Z., Pan, J., Liu, J., Liu, G., & Gu, W. (2024). ACE2 improves endothelial cell function and reduces acute lung injury by downregulating FAK expression. *International immunopharmacology*, 128, 111535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111535>
- Ho, W. J., Jaffee, E. M., & Zheng, L. (2020). The tumour microenvironment in pancreatic cancer - clinical challenges and opportunities. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(9), 527–540. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0363-5>
- Hoffmann, I., Dragomir, M. P., Monjé, N., Keunecke, C., Kunze, C. A., Schallenberg, S., Marchenko, S., Schmitt, W. D., Kulbe, H., Sehouli, J., Braicu, I. E., Jank, P., Denkert, C., Darb-Esfahani, S., Horst, D., Sinn, B. V., Sers, C., Bischoff, P., & Taube, E. T. (2023). Increased expression of IDO1 is associated with improved survival and increased number of TILs in patients with high-grade serous ovarian cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 44, 100934. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2023.100934>
- Hong, S. H., Lee, Y. J., Jang, E. B., Hwang, H. J., Kim, E. S., Son, D. H., Park, S. Y., Moon, H. S., & Yoon, Y. E. (2023). Therapeutic Efficacy of YM155 to Regulate an Epigenetic Enzyme in Major Subtypes of RCC. *International journal of molecular sciences*, 25(1), 216. <https://doi.org/10.3390/ijms25010216>
- Hou, L. J., Huang, X. X., Xu, L. N., Zhang, Y. Y., Zhao, N., Ou, R. Y., Li, W. F., Zhang, W. J., Jiang, Q. W., Yang, Y., Wei, M. N., Huang, J. R., Wang, K., Yuan, M. L., Xing, Z. H., Shi, Z., & Yan, X. J. (2018). YM155 enhances docetaxel efficacy in ovarian cancer. *American journal of translational research*, 10(3), 696–708.
- Hou, Z., Pan, Y., Fei, Q., Lin, Y., Zhou, Y., Liu, Y., Guan, H., Yu, X., Lin, X., Lu, F., & Huang, H. (2021). Prognostic significance and therapeutic potential of the immune checkpoint VISTA in pancreatic cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 147(2), 517–531. <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03463-9>

- Hu X. (2024). The role of the BTLA-HVEM complex in the pathogenesis of breast cancer. *Breast cancer* (Tokyo, Japan), 31(3), 358–370. <https://doi.org/10.1007/s12282-024-01557-7>
- Hu, C., Chen, X., Wen, J., Gong, L., Liu, Z., Wang, J., Liang, J., Hu, F., Zhou, Q., Wei, L., Shen, Y., & Zhang, W. (2017). Antitumor effect of focal adhesion kinase inhibitor PF562271 against human osteosarcoma *in vitro* and *in vivo*. *Cancer science*, 108(7), 1347–1356. <https://doi.org/10.1111/cas.13256>
- Hu, C., Ye, M., Bai, J., Liu, P., Lu, F., Chen, J., Yu, P., Chen, T., Shi, X., & Tang, Q. (2023). Methylmalonic acid promotes colorectal cancer progression via activation of Wnt/ β -catenin pathway mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cancer cell international*, 23(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02973-z>
- Hua, W., Ten Dijke, P., Kostidis, S., Giera, M., & Hornsveld, M. (2020). TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(11), 2103–2123. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03398-6>
- Huang, H., Fu, Y., Duan, Y., Zhang, Y., Lu, M., Chen, Z., Li, M., & Chen, Y. (2022). Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Treatment Reveals Crosstalk Among Proteome, Phosphoproteome, and Acetylome in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Frontiers in genetics*, 13, 873840. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.873840>
- Huang, M., Yu, X., Wang, Q., Jiang, Z., Li, X., Chen, W., & Song, C. (2024). The immune checkpoint TIGIT/CD155 promotes the exhaustion of CD8 + T cells in TNBC through glucose metabolic reprogramming mediated by PI3K/AKT/mTOR signaling. *Cell communication and signaling : CCS*, 22(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01455-z>
- Huang, X., Zhang, X., Li, E., Zhang, G., Wang, X., Tang, T., Bai, X., & Liang, T. (2020). VISTA: an immune regulatory protein checking tumor and immune cells in cancer immunotherapy. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00917-y>
- Inoue, T., Sho, M., Yasuda, S., Nishiwada, S., Nakamura, S., Ueda, T., Nishigori, N., Kawasaki, K., Obara, S., Nakamoto, T., Koyama, F., Fujii, H., & Nakajima, Y. (2015). HVEM expression contributes to tumor progression and prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer research*, 35(3), 1361–1367.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*, 11(11), 3887–3895.
- Issam Salah, N. E. I., Marnissi, F., Lakhdar, A., Karkouri, M., ElBelhadji, M., & Badou, A. (2023). The immune checkpoint VISTA is associated with prognosis in patients with malignant uveal melanoma. *Frontiers in immunology*, 14, 1225140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1225140>
- Jacobs, M. F., & Stoffel, E. M. (2024). Genetic and other risk factors for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Familial cancer*, 23(3), 221–232. <https://doi.org/10.1007/s10689-024-00372-5>
- Jeong, H., Koh, J., Kim, S., Song, S. G., Lee, S. H., Jeon, Y., Lee, C. H., Keam, B., Lee, S. H., Chung, D. H., & Jeon, Y. K. (2024). Epithelial-mesenchymal transition induced by tumor cell-intrinsic PD-L1 signaling predicts a poor response to immune checkpoint inhibitors in PD-L1-high lung cancer. *British journal of cancer*, 131(1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41416-024-02698-4>

- Jia, M., Yuan, Z., Yu, H., Feng, S., Tan, X., Long, Z., Duan, Y., Zhu, W., & Yan, P. (2024). Rapamycin circumvents anti PD-1 therapy resistance in colorectal cancer by reducing PD-L1 expression and optimizing the tumor microenvironment. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 176, 116883. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116883>
- Jia, Z. Y., Yan, X., Zhou, H., Wang, W., Li, C., & Zhang, B. L. (2024). Anti-PD-L1 checkpoint inhibitor combined with nanocarrier-mediated cisplatin codelivery system for effective treatment of pancreatic cancer. *Molecular immunology*, 174, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2024.08.006>
- Jian, S., Kong, D., & Tian, J. (2023). Expression of miR-425-5p in Pancreatic Carcinoma and Its Correlation with Tumor Immune Microenvironment. *Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research*, 36(1), 2216756. <https://doi.org/10.1080/08941939.2023.2216756>
- Jin, S., Zhang, Y., Zhou, F., Chen, X., Sheng, J., & Zhang, J. (2022). TIGIT: A promising target to overcome the barrier of immunotherapy in hematological malignancies. *Frontiers in oncology*, 12, 1091782. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1091782>
- Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A., & Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis?. *Molecular oncology*, 11(7), 755–769. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12083>
- Jung, H. S., Gu, J., Kim, J. E., Nam, Y., Song, J. W., & Kim, H. K. (2019). Cancer cell-induced neutrophil extracellular traps promote both hypercoagulability and cancer progression. *PloS one*, 14(4), e0216055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216055>
- Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., & Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*, 388(10039), 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00141-0)
- Klein A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(7), 493–502. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00457-x>
- Kolbeinson, H. M., Chandana, S., Wright, G. P., & Chung, M. (2023). Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 36(1), 2129884. <https://doi.org/10.1080/08941939.2022.2129884>
- Kong X. (2020). Discovery of New Immune Checkpoints: Family Grows Up. *Advances in experimental medicine and biology*, 1248, 61–82. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_4
- Korac, K., Rajasekaran, D., Sniegowski, T., Schniers, B. K., Ibrahim, A. F., & Bhutia, Y. D. (2022). Carbidopa, an activator of aryl hydrocarbon receptor, suppresses IDO1 expression in pancreatic cancer and decreases tumor growth. *The Biochemical journal*, 479(17), 1807–1824. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210851>
- Kozłowska, M., & Śliwińska, A. (2023). The Link between Diabetes, Pancreatic Tumors, and miRNAs-New Players for Diagnosis and Therapy?. *International journal of molecular sciences*, 24(12), 10252. <https://doi.org/10.3390/ijms241210252>
- Ku, B., Eisenbarth, D., Baek, S., Jeong, T. K., Kang, J. G., Hwang, D., Noh, M. G., Choi, C., Choi, S., Seol, T., Kim, H., Kim, Y. H., Woo, S. M., Kong, S. Y., & Lim, D. S. (2024). PRMT1 promotes pancreatic cancer development and resistance to chemotherapy. *Cell reports. Medicine*, 5(3), 101461. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101461>

- Kucuk, B., Kibar, B., & Cacan, E. (2021). A broad analysis in clinical and *in vitro* models on regulator of G-protein signalling 10 regulation that is associated with ovarian cancer progression and chemoresistance. *Cell biochemistry and function*, 39(3), 413–422. <https://doi.org/10.1002/cbf.3607>
- Kumagai, T., Wakimoto, N., Yin, D., Gery, S., Kawamata, N., Takai, N., Komatsu, N., Chumakov, A., Imai, Y., & Koeffler, H. P. (2007). Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells. *International journal of cancer*, 121(3), 656–665. <https://doi.org/10.1002/ijc.22558>
- Kunciewicz, K., Bojko, M., Battin, C., Karczyńska, A., Sieradzan, A., Sikorska, E., Węgrzyn, K., Wojciechowicz, K., Wardowska, A., Steinberger, P., Rodziewicz-Motowidło, S., & Spodzieja, M. (2023). BTLA-derived peptides as inhibitors of BTLA/HVEM complex formation - design, synthesis and biological evaluation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 165, 115161. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115161>
- Kuusisto, H. V., & Jans, D. A. (2015). Hyper-dependence of breast cancer cell types on the nuclear transporter Importin β 1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853, 1870–1878. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.002>
- Lai, E., Puzzone, M., Ziranu, P., Pretta, A., Impera, V., Mariani, S., Liscia, N., Soro, P., Musio, F., Persano, M., Donisi, C., Tolu, S., Balconi, F., Pireddu, A., Demurtas, L., Pusceddu, V., Camera, S., Sclafani, F., & Scartozzi, M. (2019). New therapeutic targets in pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews*, 81, 101926. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101926>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lee, Y. C., Lin, S. C., Yu, G., Cheng, C. J., Liu, B., Liu, H. C., Hawke, D. H., Parikh, N. U., Varkaris, A., Corn, P., Logothetis, C., Satcher, R. L., Yu-Lee, L. Y., Gallick, G. E., & Lin, S. H. (2015). Identification of Bone-Derived Factors Conferring De Novo Therapeutic Resistance in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer research*, 75(22), 4949–4959. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1215>
- Lee, H. Y., Hsu, M. J., Chang, H. H., Chang, W. C., Huang, W. C., & Cho, E. C. (2024). Enhancing anti-cancer capacity: Novel class I/II HDAC inhibitors modulate EMT, cell cycle, and apoptosis pathways. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 109, 117792. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117792>
- Li, X., Gulati, M., Larson, A. C., Solheim, J. C., Jain, M., Kumar, S., & Batra, S. K. (2022). Immune checkpoint blockade in pancreatic cancer: Trudging through the immune desert. *Seminars in cancer biology*, 86(Pt 2), 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.08.009>
- Li, G., Wang, Y., Wang, W., Lv, G., Li, X., Wang, J., Liu, X., Yuan, D., Deng, S., & You, D. (2024). BIRC5 as a prognostic and diagnostic biomarker in pan-cancer: an integrated analysis of expression, immune subtypes, and functional networks. *Frontiers in genetics*, 15, 1509342. <https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1509342>
- Li, H., Zhang, Z., Shi, Z., Zhou, S., Nie, S., Yu, Y., Zhang, L., Sun, Y., Fang, C., Hu, J., Niu, Y., Schuck, K., Wang, L., Jiang, K., Lu, Z., Kahlert, C., Roth, S., Loos, M., Herr, I., Sunami, Y., ... Kong, B. (2025). Disrupting AGR2/IGF1 paracrine and

- reciprocal signaling for pancreatic cancer therapy. *Cell reports. Medicine*, 6(2), 101927. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101927>
- Li, J. Y., Tian, T., Han, B., Yang, T., Guo, Y. X., Wu, J. Y., Chen, Y. S., Yang, Q., & Xie, R. J. (2023b). Suberoylanilide hydroxamic acid upregulates reticulophagy receptor expression and promotes cell death in hepatocellular carcinoma cells. *World journal of gastroenterology*, 29(34), 5038–5053. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i34.5038>
- Li, K., Kong, P., Yi, C., Wang, X., & Yan, D. (2021a). Expression of lymphoid enhancer factor-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its effect on prognosis. *Journal of International Oncology*, 608-613.
- Li, N., Yang, S., Ren, Y., Tai, R., Liu, H., Wang, Y., Li, J., Wang, F., Xing, J., Zhang, Y., Zhu, X., Xu, S., Hou, X., & Wang, G. (2023a). Chemotherapy induces immune checkpoint VISTA expression in tumor cells via HIF-2alpha. *Biochemical pharmacology*, 210, 115492. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115492>
- Li, T. T., Jiang, J. W., Qie, C. X., Xuan, C. X., Hu, X. L., Liu, W. M., Chen, W. T., & Liu, J. (2021b). Identification of active small-molecule modulators targeting the novel immune checkpoint VISTA. *BMC immunology*, 22(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12865-021-00446-4>
- Liang, H., Zhan, J., Chen, Y., Xing, Z., He, Z. N. T., Liu, Y., Li, X., Chen, Y., Li, Z., Kuang, C., Yang, D., & Yang, Q. (2024). Tryptophan deficiency induced by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 results in glucose transporter 1-dependent promotion of aerobic glycolysis in pancreatic cancer. *MedComm*, 5(5), e555. <https://doi.org/10.1002/mco2.555>
- Liang, L., & Kaufmann, A. M. (2023). The significance of cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition in metastasis and anti-cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2555. <https://doi.org/10.3390/ijms24032555>
- Liang, M., Wang, L., Sun, Z., Chen, X., Wang, H., Qin, L., Zhao, W., & Geng, B. (2022). E3 ligase TRIM15 facilitates non-small cell lung cancer progression through mediating Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Cell communication and signaling : CCS*, 20(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00875-7>
- Lim, K. S., & Wong, R. W. (2018). Targeting nucleoporin POM121-importin β axis in prostate cancer. *Cell chemical biology*, 25(9), 1056-1058. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.09.003>
- Lin, X., Kang, K., Chen, P., Zeng, Z., Li, G., Xiong, W., Yi, M., & Xiang, B. (2024). Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers. *Molecular cancer*, 23(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02023-w>
- Lines, J. L., Pantazi, E., Mak, J., Sempere, L. F., Wang, L., O'Connell, S., Ceeraz, S., Suriawinata, A. A., Yan, S., Ernstoff, M. S., & Noelle, R. (2014). VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer research*, 74(7), 1924–1932. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1504>
- Liu, C., Yang, M., Zhang, D., Chen, M., & Zhu, D. (2022a). Clinical cancer immunotherapy: Current progress and prospects. *Frontiers in immunology*, 13, 961805. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.961805>
- Liu, J., Chen, Z., Li, Y., Zhao, W., Wu, J., & Zhang, Z. (2021a). PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in tumor immunotherapy. *Frontiers in pharmacology*, 12, 731798. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.731798>

- Liu, L., Wang, A., Liu, X., Han, S., Sun, Y., Zhang, J., Guo, L., & Zhang, Y. (2022b). Blocking TIGIT/CD155 signalling reverses CD8⁺ T cell exhaustion and enhances the antitumor activity in cervical cancer. *Journal of translational medicine*, 20(1), 280. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03480-x>
- Liu, L., Wang, Y., Geng, C., Wang, A., Han, S., You, X., Sun, Y., Zhang, J., Lu, W., & Zhang, Y. (2021b). CD155 Promotes the Progression of Cervical Cancer Cells Through AKT/mTOR and NF- κ B Pathways. *Frontiers in oncology*, 11, 655302. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.655302>
- Liu, L., You, X., Han, S., Sun, Y., Zhang, J., & Zhang, Y. (2021c). CD155/TIGIT, a novel immune checkpoint in human cancers (Review). *Oncology reports*, 45(3), 835–845. <https://doi.org/10.3892/or.2021.7943>
- Liu, Q., Liao, Q., & Zhao, Y. (2017). Chemotherapy and tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Cancer cell international*, 17, 1-17.
- Liu, S. Y., & Wu, Y. L. (2018). An immunological storm for cancer therapy: 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science bulletin*, 63(24), 1608–1610. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2018.11.023>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Ljunggren, H. G., Jonsson, R., & Höglund, P. (2018). Seminal immunologic discoveries with direct clinical implications: The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine honours discoveries in cancer immunotherapy. *Scandinavian journal of immunology*, 88(6), e12731. <https://doi.org/10.1111/sji.12731>
- Ludovini, V., Bianconi, F., Siggillino, A., Vannucci, J., Baglivo, S., Berti, V., Tofanetti, F. R., Reda, M. S., Bellezza, G., Mandarano, M., Belladonna, M. L., Metro, G., Chiari, R., Sidoni, A., Puma, F., Minotti, V., & Roila, F. (2021). High PD-L1/IDO-2 and PD-L2/IDO-1 Co-Expression Levels Are Associated with Worse Overall Survival in Resected Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Genes*, 12(2), 273. <https://doi.org/10.3390/genes12020273>
- Luo, W., Wang, J., Chen, H., Qiu, J., Wang, R., Liu, Y., Su, D., Tao, J., Weng, G., Ma, H., & Zhang, T. (2023b). Novel strategies optimize immunotherapy by improving the cytotoxic function of T cells for pancreatic cancer treatment. *Cancer letters*, 576, 216423. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216423>
- Luo, W., Wang, J., Chen, H., Ye, L., Qiu, J., Liu, Y., Wang, R., Weng, G., Liu, T., Su, D., Tao, J., Ding, C., You, L., & Zhang, T. (2023a). Epidemiology of pancreatic cancer: New version, new vision. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, 35(5), 438–450. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2023.05.03>
- Ma, T., Gu, J., Wen, H., Xu, F., & Ge, D. (2022). BIRC5 Modulates PD-L1 Expression and Immune Infiltration in Lung Adenocarcinoma. *Journal of Cancer*, 13(10), 3140–3150. <https://doi.org/10.7150/jca.69236>
- Ma, Y., Chen, S., & Dai, G. (2024). Exploring prognostic factors for survival in patients with advanced pancreatic cancer undergoing PD-1 inhibitor immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 20(1), 2376429. <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2376429>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17(1), 9-26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>

- Mace, T. A., Shakya, R., Pitarresi, J. R., Swanson, B., McQuinn, C. W., Loftus, S., Nordquist, E., Cruz-Monserrate, Z., Yu, L., Young, G., Zhong, X., Zimmers, T. A., Ostrowski, M. C., Ludwig, T., Bloomston, M., Bekaii-Saab, T., & Lesinski, G. B. (2018). IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut*, 67(2), 320–332. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311585>
- Mao, L., Xiao, Y., Yang, Q. C., Yang, S. C., Yang, L. L., & Sun, Z. J. (2021). TIGIT/CD155 blockade enhances anti-PD-L1 therapy in head and neck squamous cell carcinoma by targeting myeloid-derived suppressor cells. *Oral oncology*, 121, 105472. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105472>
- Martin, A. S., Molloy, M., Ugolkov, A., von Roemeling, R. W., Noelle, R. J., Lewis, L. D., Johnson, M., Radvanyi, L., & Martell, R. E. (2023). VISTA expression and patient selection for immune-based anticancer therapy. *Frontiers in immunology*, 14, 1086102. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1086102>
- Martisoava A, Faktor J, Sosolikova T, Klemesova I, Kolarova T, Holcakova J, Hrstka R. Characterization of the AGR2-NPM3 axis uncovers the AGR2 involvement in PD-L1 regulation in colorectal cancer. *Sci Rep*. 2024 Sep 20;14(1):21926. doi: 10.1038/s41598-024-72990-z.
- Matsuo N, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Tanaka S, Nishina S, Nakanishi Y, Uemura M, Takaki A, Nakamura S, Kobayashi Y, Nouse K, Yagi T, Yamamoto K. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2009 Jul 18;9:240. doi: 10.1186/1471-2407-9-240.
- Mei Z, Huang J, Qiao B, Lam AK. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*. 2020 May 28;12(1):16. doi: 10.1038/s41368-020-0084-8
- Meireson, A., Devos, M., & Brochez, L. (2020). IDO expression in cancer: different compartment, different functionality?. *Frontiers in immunology*, 11, 531491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.531491>
- Menadi, S., Kucuk, B., & Cacan, E. (2024). Promoter Hypomethylation Upregulates ANXA2 Expression in Pancreatic Cancer and is Associated with Poor Prognosis. *Biochemical genetics*, 10.1007/s10528-023-10577-5. <https://doi.org/10.1007/s10528-023-10577-5>
- Menevşe Çınar, Şeyma. İyonik sıvıların kolon kanseri ve akciğer kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve antimetastatik etkilerin in vitro koşullarda incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, 2022.
- Meng, L., Wu, H., Wu, J., Ding, P., He, J., Sang, M., & Liu, L. (2024). Mechanisms of immune checkpoint inhibitors: insights into the regulation of circular RNAs involved in cancer hallmarks. *Cell death & disease*, 15(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06389-5>
- Miranda Furtado, C. L., Dos Santos Luciano, M. C., Silva Santos, R. D., Furtado, G. P., Moraes, M. O., & Pessoa, C. (2019). Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164–1176. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>
- Miyao, T., Koike, H., Sekine, Y., Ohtsu, A., Oka, D., & Suzuki, K. (2020). YM155 Reverses Cabazitaxel Resistance in Castration-resistant Prostate Cancer by Reducing Survivin Expression. *Anticancer research*, 40(9), 5091–5095. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14512>

- Mohamed, A. H., Obeid, R. A., Fadhil, A. A., Amir, A. A., Adhab, Z. H., Jabouri, E. A., Ahmad, I., & Alshahrani, M. Y. (2023). BTLA and HVEM: Emerging players in the tumor microenvironment and cancer progression. *Cytokine*, 172, 156412. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156412>
- Mok, E. T. Y., Chitty, J. L., & Cox, T. R. (2024). miRNAs in pancreatic cancer progression and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, 41(3), 163–186. <https://doi.org/10.1007/s10585-023-10256-0>
- Molfetta, R., Zitti, B., Lecce, M., Milito, N. D., Stabile, H., Fionda, C., Cippitelli, M., Gismondi, A., Santoni, A., & Paolini, R. (2020). CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 922. <https://doi.org/10.3390/ijms21030922>
- Morrison, A. H., Byrne, K. T., & Vonderheide, R. H. (2018). Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends in cancer*, 4(6), 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.04.001>
- Mortezaee, K., Majidpoor, J., & Najafi, S. (2022). VISTA immune regulatory effects in bypassing cancer immunotherapy: Updated. *Life sciences*, 310, 121083. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121083>
- Mucciolo, G., Roux, C., Scagliotti, A., Brugiapaglia, S., Novelli, F., & Cappello, P. (2020). The dark side of immunotherapy: pancreatic cancer. *Cancer drug resistance* (Alhambra, Calif.), 3(3), 491–520. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.13>
- Mukherji, R., Debnath, D., Hartley, M. L., & Noel, M. S. (2022). The Role of Immunotherapy in Pancreatic Cancer. *Current oncology* (Toronto, Ont.), 29(10), 6864–6892. <https://doi.org/10.3390/curroncol29100541>
- Mulati, K., Hamanishi, J., Matsumura, N., Chamoto, K., Mise, N., Abiko, K., Baba, T., Yamaguchi, K., Horikawa, N., Murakami, R., Taki, M., Budiman, K., Zeng, X., Hosoe, Y., Azuma, M., Konishi, I., & Mandai, M. (2019). VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. *British journal of cancer*, 120(1), 115–127. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0313-5>
- Na, Y. S., Yang, S. J., Kim, S. M., Jung, K. A., Moon, J. H., Shin, J. S., Yoon, D. H., Hong, Y. S., Ryu, M. H., Lee, J. L., Lee, J. S., & Kim, T. W. (2012). YM155 induces EGFR suppression in pancreatic cancer cells. *PloS one*, 7(6), e38625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038625>
- Nan, Y., Bai, Y., Hu, X., Zhou, K., Wu, T., Zhu, A., Li, M., Dou, Z., Cao, Z., Zhang, X., Xu, S., Zhang, Y., Lin, J., Zeng, X., Fan, J., Zhang, X., Wang, X., & Ju, D. (2024). Targeting IL-33 reprograms the tumor microenvironment and potentiates antitumor response to anti-PD-L1 immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 12(9), e009236. <https://doi.org/10.1136/jitc-2024-009236>
- Naour, J. L., Galluzzi, L., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Vacchelli, E. (2020). Trial watch: ido inhibitors in cancer therapy. *OncoImmunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/2162402x.2020.1777625>
- Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., & Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(6), 333–348. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0005-x>
- Neumann, C. C. M., Schneider, F., Hilfenhaus, G., Vecchione, L., Benzing, C., Ihlow, J., Fehrenbach, U., Malinka, T., Keilholz, U., Stintzing, S., & Pelzer, U. (2023). Impact of Smoking, Body Weight, Diabetes, Hypertension and Kidney

- Dysfunction on Survival in Pancreatic Cancer Patients-A Single Center Analysis of 2323 Patients within the Last Decade. *Journal of clinical medicine*, 12(11), 3656. <https://doi.org/10.3390/jcm12113656>
- Ng, S. S. W., & Dawson, L. A. (2022). Inflammatory Cytokines and Radiotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomedicines*, 10(12), 3215. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123215>
- Ning, Z., Liu, K., & Xiong, H. (2021). Roles of BTLA in immunity and immune disorders. *Frontiers in Immunology*, 12, 654960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.654960>
- Nishiwada, S., Sho, M., Yasuda, S., Shimada, K., Yamato, I., Akahori, T., Kinoshita, S., Nagai, M., Konishi, N., & Nakajima, Y. (2015). Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer research*, 35(4), 2287–2297.
- Okusaka, T., & Furuse, J. (2020). Recent advances in chemotherapy for pancreatic cancer: evidence from Japan and recommendations in guidelines. *Journal of gastroenterology*, 55(4), 369–382. <https://doi.org/10.1007/s00535-020-01666-y>
- Olaoba, O. T., Yang, M., Adelusi, T. I., Maidens, T., Kimchi, E. T., Staveley-O'Carroll, K. F., & Li, G. (2024). Targeted Therapy for Highly Desmoplastic and Immunosuppressive Tumor Microenvironment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, 16(8), 1470. <https://doi.org/10.3390/cancers16081470>
- Özel, M., Baskol, M., Akalın, H., & Baskol, G. (2021). Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Reduces Fibrosis Markers and Deactivates Human Stellate Cells via the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). *Cell biochemistry and biophysics*, 79(2), 349–357. <https://doi.org/10.1007/s12013-021-00974-1>
- Pan Q, Wang Q, Zhao T, Zhao X, Liang Y, Shi M, Chen C, Lin F. FAK inhibitor PF-562271 inhibits the migration and proliferation of high-grade serous ovarian cancer cells through FAK and FAK mediated cell cycle arrest. *Med Oncol*. 2023 Jun 29;40(8):215. doi: 10.1007/s12032-023-02092-9.
- Pawłowska, A., Skiba, W., Suszczyk, D., Kuryło, W., Jakubowicz-Gil, J., Paduch, R., & Wertel, I. (2022). The Dual Blockade of the TIGIT and PD-1/PD-L1 Pathway as a New Hope for Ovarian Cancer Patients. *Cancers*, 14(23), 5757. <https://doi.org/10.3390/cancers14235757>
- Peng, C., Li, X., Yao, Y., Nie, Y., Fan, L., & Zhu, C. (2024). MiR-135b-5p promotes cetuximab resistance in colorectal cancer by regulating FOXN3. *Cancer biology & therapy*, 25(1), 2373497. <https://doi.org/10.1080/15384047.2024.2373497>
- Peng, H., Li, L., Zuo, C., Chen, M. Y., Zhang, X., Myers, N. B., Hogg, G. D., DeNardo, D. G., Goedegebuure, S. P., Hawkins, W. G., & Gillanders, W. E. (2022). Combination TIGIT/PD-1 blockade enhances the efficacy of neoantigen vaccines in a model of pancreatic cancer. *Frontiers in immunology*, 13, 1039226. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1039226>
- Peng, S., & Bao, Y. (2022). A narrative review of immune checkpoint mechanisms and current immune checkpoint therapy. *Annals of Blood*, 7.
- Perovic, D., Dusanovic Pjevic, M., Perovic, V., Grk, M., Rasic, M., Milickovic, M., Mijovic, T., & Rasic, P. (2024). B7 homolog 3 in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 30(31), 3654–3667. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i31.3654>
- Prendergast, G. C., Malachowski, W. P., DuHadaway, J. B., & Muller, A. J. (2017). Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer research*, 77(24), 6795–6811. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2285>

- Preziosi, G., Oben, J. A., & Fusai, G. (2014). Obesity and pancreatic cancer. *Surgical oncology*, 23(2), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2014.02.003>
- Qin, W., Liu, Q., Xu, X., Liu, A., Zhang, H., Gu, J., & Zhang, T. (2021). A novel Twist1/hsa-miR138-5p/caspase-3 pathway regulates cell proliferation and apoptosis of human multiple myeloma. *Annals of hematology*, 100(7), 1815–1824. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04059-6>
- Rana, Z., Diermeier, S., Hanif, M., & Rosengren, R. J. (2020). Understanding Failure and Improving Treatment Using HDAC Inhibitors for Prostate Cancer. *Biomedicines*, 8(2), 22. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8020022>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World journal of oncology*, 10(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Ren, S., Tian, Q., Amar, N., Yu, H., Rivard, C. J., Caldwell, C., Ng, T. L., Tu, M., Liu, Y., Gao, D., Ellison, K., Suda, K., Rozeboom, L., Rivalland, G., Mitchell, P., Zhou, C., & Hirsch, F. R. (2018). The immune checkpoint, HVEM may contribute to immune escape in non-small cell lung cancer lacking PD-L1 expression. *Lung cancer* (Amsterdam, Netherlands), 125, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.09.004>
- Rezouki, I., Zohair, B., Ssi, S. A., Karkouri, M., Razzouki, I., Elkarroumi, M., & Badou, A. (2023). High VISTA expression is linked to a potent epithelial-mesenchymal transition and is positively correlated with PD1 in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 13, 1154631. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1154631>
- Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational oncology*, 13(6), 100773. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>
- Ries, J., Trumet, L., Hahn, A., Kunater, L., Lutz, R., Geppert, C., Kesting, M., & Weber, M. (2024). The Immune Checkpoint BTLA in Oral Cancer: Expression Analysis and Its Correlation to Other Immune Modulators. *International journal of molecular sciences*, 25(12), 6601. <https://doi.org/10.3390/ijms25126601>
- Rim, E. Y., Clevers, H., & Nusse, R. (2022). The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. *Annual review of biochemistry*, 91, 571–598. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-040320-103615>
- Robatel, S., & Schenk, M. (2022). Current Limitations and Novel Perspectives in Pancreatic Cancer Treatment. *Cancers*, 14(4), 985. <https://doi.org/10.3390/cancers14040985>
- Robinson RM, Reyes L, Christopher BN, Duncan RM, Burge RA, Siegel J, Nasarre P, Wang P, O'Bryan JP, Hobbs GA, Klauber-DeMore N, Dolloff NG. A High-Affinity Monoclonal Antibody Against the Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Target, Anterior Gradient-2 (AGR2/PDIA17). *Antibodies* (Basel). 2024 Dec 5;13(4):101. doi: 10.3390/antib13040101
- Rotte, A., D'Orazi, G., & Bhandaru, M. (2018). Nobel committee honors tumor immunologists. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 37(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0937-6>
- Sakaue, T., Terabe, H., Takedatsu, H., & Kawaguchi, T. (2024). Association between nonalcoholic fatty liver disease and pancreatic cancer: Epidemiology, mechanisms, and antidiabetic medication. *Hepatology Research*, 54(8), 729-735. <https://doi.org/10.1111/hepr.14081>

- Salminen A. (2024). Inhibitory immune checkpoints suppress the surveillance of senescent cells promoting their accumulation with aging and in age-related diseases. *Biogerontology*, 25(5), 749–773. <https://doi.org/10.1007/s10522-024-10114-w>
- Salminen, A. (2022). Role of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1) and kynurenine pathway in the regulation of the aging process. *Ageing Research Reviews*, 75, 101573. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101573>
- Salu, P., Tuvin, D., & Reindl, K. M. (2025). AGR2 knockdown induces ER stress and mitochondria fission to facilitate pancreatic cancer cell death. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1872(1), 119854. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2024.119854>
- San José-Enériz E, Gimenez-Camino N, Agirre X, Prosper F. HDAC Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 14;11(11):1794. doi: 10.3390/cancers11111794
- Sareen, G., Mohan, M., Mannan, A., Dua, K., & Singh, T. G. (2025). A new era of cancer immunotherapy: vaccines and miRNAs. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII, 74(5), 163. <https://doi.org/10.1007/s00262-025-04011-5>
- Schraps, N., Port, J. C., Menz, A., Viehweger, F., Büyücek, S., Dum, D., Schlichter, R., Hinsch, A., Fraune, C., Bernreuther, C., Kluth, M., Hube-Magg, C., Möller, K., Reisch, V., Luebke, A. M., Lebok, P., Weidemann, S., Sauter, G., Lennartz, M., Jacobsen, F., ... Lutz, F. (2024). Prevalence and Significance of AGR2 Expression in Human Cancer. *Cancer medicine*, 13(21), e70407. <https://doi.org/10.1002/cam4.70407>
- Sedy, J. R., Gavrieli, M., Potter, K. G., Hurchla, M. A., Lindsley, R. C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C. F., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature immunology*, 6(1), 90–98. <https://doi.org/10.1038/ni1144>
- Şentürk, S., Kaplan, Ö., Bal, K., Topcu, K. S. B., & Gök, M. K. (2025). Thiolated layered double hydroxide-based nanoparticles: A study on mucoadhesiveness and cytotoxicity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 704, 135461.
- Sevgin, Börteçine. Abemaciclib ve Palbociclib'in MIA PACA-2 ve CAPAN-2 pankreas kanseri hücrelerinde AMPK'nın etkileşimde olduğu üst ve alt sinyal yolları ile etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Kültür Üniversitesi, 2020.
- Shekari, N., Shانهbandi, D., Kazemi, T., Zarredar, H., Baradaran, B., & Jalali, S. A. (2023). VISTA and its ligands: the next generation of promising therapeutic targets in immunotherapy. *Cancer cell international*, 23(1), 265. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-03116-0>
- Shen, X., Jiang, H., Chen, Z., Lu, B., Zhu, Y., Mao, J., Chai, K., & Chen, W. (2019). MicroRNA-145 Inhibits Cell Migration and Invasion in Colorectal Cancer by Targeting TWIST. *OncoTargets and therapy*, 12, 10799–10809. <https://doi.org/10.2147/OTT.S216147>
- Shi, S., Yao, W., Xu, J., Long, J., Liu, C., & Yu, X. (2012). Combinational therapy: new hope for pancreatic cancer?. *Cancer letters*, 317(2), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.029>
- Shojaei Moghadam, K., Farshdousti Hagh, M., Alivand, M. R., Fardi, M., Movassaghpour, A. A., Mohammadi, A., Moghadasi, M., & Solali, S. (2020).

- Emerging Effects of Sepantronium Bromide (YM155) on MOLT-4 Cell Line Apoptosis Induction and Expression of Critical Genes Involved in Apoptotic Pathways. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 10(1), 81–87. <https://doi.org/10.15171/apb.2020.010>
- Shrestha, R., Bridle, K. R., Crawford, D. H. G., & Jayachandran, A. (2021). Immune checkpoint molecules are regulated by transforming growth factor (TGF)- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *International journal of medical sciences*, 18(12), 2466–2479. <https://doi.org/10.7150/ijms.54239>
- Singh, N., Krishnakumar, S., Kanwar, R. K., Cheung, C. H., & Kanwar, J. R. (2015). Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers. *Drug discovery today*, 20(5), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.013>
- Siragusa, G., Tomasello, L., Giordano, C., & Pizzolanti, G. (2024). Survivin (BIRC5): Implications in cancer therapy. *Life sciences*, 350, 122788. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122788>
- Smyth, M. J., & Teng, M. W. (2018). 2018 Nobel Prize in physiology or medicine. *Clinical & translational immunology*, 7(10), e1041. <https://doi.org/10.1002/cti2.1041>
- Soderholm, J. F., Bird, S. L., Kalab, P., Sampathkumar, Y., Hasegawa, K., Uehara-Bingen, M., Weis, K., & Heald, R. (2011). Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β . *ACS chemical biology*, 6(7), 700–708. <https://doi.org/10.1021/cb2000296>
- Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., Granda-Díaz, R., Martínez-Pérez, A., Aguilar-García, C., Rodrigo, J. P., García-Pedrero, J. M., & Gonzalez, S. (2023). Beyond the anti-PD-1/PD-L1 era: promising role of the BTLA/HVEM axis as a future target for cancer immunotherapy. *Molecular cancer*, 22(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01845-4>
- Springfeld, C., Ferrone, C. R., Katz, M. H. G., Philip, P. A., Hong, T. S., Hackert, T., Büchler, M. W., & Neoptolemos, J. (2023). Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 20(5), 318–337. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00746-1>
- Springfeld, C., Jäger, D., Büchler, M. W., Strobel, O., Hackert, T., Palmer, D. H., & Neoptolemos, J. P. (2019). Chemotherapy for pancreatic cancer. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*, 48(3 Pt 2), e159–e174. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.02.025>
- Steinhart, Z., & Angers, S. (2018). Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development (Cambridge, England)*, 145(11), dev146589. <https://doi.org/10.1242/dev.146589>
- Stokes, J. B., Adair, S. J., Slack-Davis, J. K., Walters, D. M., Tilghman, R. W., Hershey, E. D., Lowrey, B., Thomas, K. S., Bouton, A. H., Hwang, R. F., Stelow, E. B., Parsons, J. T., & Bauer, T. W. (2011). Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. *Molecular cancer therapeutics*, 10(11), 2135–2145. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0261>
- Stoop, T. F., Javed, A. A., Oba, A., Koerkamp, B. G., Seufferlein, T., Wilmink, J. W., & Besselink, M. G. (2025). Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*, 405(10485), 1182–1202. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(25\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00261-2)

- Strickler, J. H., Satake, H., George, T. J., Yaeger, R., Hollebecque, A., Garrido-Laguna, I., Schuler, M., Burns, T. F., Coveler, A. L., Falchook, G. S., Vincent, M., Sunakawa, Y., Dahan, L., Bajor, D., Rha, S. Y., Lemech, C., Juric, D., Rehn, M., Ngarmchamnanrith, G., Jafarinasabian, P., ... Hong, D. S. (2023). Sotorasib in KRAS p.G12C-Mutated Advanced Pancreatic Cancer. *The New England journal of medicine*, 388(1), 33–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2208470>
- Sun, Q., Hong, Z., Zhang, C., Wang, L., Han, Z., & Ma, D. (2023). Immune checkpoint therapy for solid tumours: clinical dilemmas and future trends. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 320. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01522-4>
- Sun, T., Liu, B., Cai, L., Zhou, Y., Yang, W., & Li, Y. (2024). Suberanilohydroxamic acid (SAHA), a HDAC inhibitor, suppresses the effect of Treg cells by targeting the c-Myc/CCL1 pathway in glioma stem cells and improves PD-L1 blockade therapy. *Journal of neuro-oncology*, 168(3), 457–471. <https://doi.org/10.1007/s11060-024-04689-0>
- Sun, Y., Ren, D., Yang, C., Yang, W., Zhao, J., Zhou, Y., Jin, X., & Wu, H. (2021). TRIM15 promotes the invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by mediating APOA1 ubiquitination and degradation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(11), 166213. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166213>
- Susanto, J. M., Colvin, E. K., Pinese, M., Chang, D. K., Pajic, M., Mawson, A., Caldon, C. E., Musgrove, E. A., Henshall, S. M., Sutherland, R. L., Biankin, A. V., & Scarlett, C. J. (2015). The epigenetic agents suberoylanilide hydroxamic acid and 5-AZA-2' deoxycytidine decrease cell proliferation, induce cell death and delay the growth of MiaPaCa2 pancreatic cancer cells *in vivo*. *International journal of oncology*, 46(5), 2223–2230. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2894>
- Takada, K., Kohashi, K., Shimokawa, M., Haro, A., Osoegawa, A., Tagawa, T., Seto, T., Oda, Y., & Maehara, Y. (2019). Co-expression of IDO1 and PD-L1 in lung squamous cell carcinoma: Potential targets of novel combination therapy. *Lung cancer* (Amsterdam, Netherlands), 128, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.12.008>
- Tang, Q., Chen, Y., Li, X., Long, S., Shi, Y., Yu, Y., Wu, W., Han, L., & Wang, S. (2022a). The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Frontiers in immunology*, 13, 964442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.964442>
- Tang, R., Yin, J., Liu, Y., & Xue, J. (2024). FLASH radiotherapy: A new milestone in the field of cancer radiotherapy. *Cancer letters*, 587, 216651. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216651>
- Tang, X., Yang, J., Shi, A., Xiong, Y., Wen, M., Luo, Z., Tian, H., Zheng, K., Liu, Y., Shu, C., Ma, N., Wang, R., & Zhao, J. (2022b). CD155 Cooperates with PD-1/PD-L1 to Promote Proliferation of Esophageal Squamous Cancer Cells via PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *Cancers*, 14(22), 5610. <https://doi.org/10.3390/cancers14225610>
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic acids research*, 47(W1), W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>
- Topcu, K. S. B., Korucu, E. N., Menevse, E., Kocak, N., & Duran, T. (2022). Investigation of the effects of the toll-like receptor 4 pathway on immune

- checkpoint vista in pancreatic cancer. *Investigational New Drugs*, 40(3), 519-528. <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01209-z>
- Torphy, R. J., Zhu, Y., & Schulick, R. D. (2018). Immunotherapy for pancreatic cancer: Barriers and breakthroughs. *Annals of gastroenterological surgery*, 2(4), 274-281. <https://doi.org/10.1002/ags3.12176>
- Tran, T. H., & Phuong Tran, T. T. (2022). Targeting the PD-1/PD-L1 axis for cancer treatment: a review on nanotechnology. *Royal Society Open Science*, 9(4), 211991. <https://doi.org/10.1098/rsos.211991>
- Valdez BC, Tsimberidou AM, Yuan B, Baysal MA, Chakraborty A, Andersen CR, Andersson BS. Synergistic Cytotoxicity of Histone Deacetylase and Poly-ADP Ribose Polymerase Inhibitors and Decitabine in Breast and Ovarian Cancer Cells: Implications for Novel Therapeutic Combinations. *Int J Mol Sci*. 2024 Aug 26;25(17):9241. doi: 10.3390/ijms25179241.
- Van Roessel, S., van Veldhuisen, E., Klompmaker, S., Janssen, Q. P., Abu Hilal, M., Alseidi, A., Balduzzi, A., Balzano, G., Bassi, C., Berrevoet, F., Bonds, M., Busch, O. R., Butturini, G., Del Chiaro, M., Conlon, K. C., Falconi, M., Frigerio, I., Fusai, G. K., Gagnière, J., Griffin, O., ... European-African Hepato-Pancreato-Biliary Association (2020). Evaluation of Adjuvant Chemotherapy in Patients With Resected Pancreatic Cancer After Neoadjuvant FOLFIRINOX Treatment. *JAMA oncology*, 6(11), 1733–1740. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.3537>
- Vedie, A. L., Laouali, N., Gelot, A., Severi, G., Boutron-Ruault, M. C., & Rebours, V. (2024). Childhood and adulthood passive and active smoking, and the ABO group as risk factors for pancreatic cancer in women. *United European Gastroenterology Journal*, 12(4), 440-450. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12487>
- Verrico, A., Rovella, P., Di Francesco, L., Damizia, M., Staid, D. S., Le Pera, L., Schininà, M. E., & Lavia, P. (2020). Importin- β /karyopherin- β 1 modulates mitotic microtubule function and taxane sensitivity in cancer cells via its nucleoporin-binding region. *Oncogene*, 39(2), 454–468. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0989-x>
- Victoir, B., Croix, C., Gouilleux, F., & Prié, G. (2024). Targeted Therapeutic Strategies for the Treatment of Cancer. *Cancers*, 16(2), 461. <https://doi.org/10.3390/cancers16020461>
- Wagner, M., Jasek, M., & Karabon, L. (2021). Immune Checkpoint Molecules-Inherited Variations as Markers for Cancer Risk. *Frontiers in immunology*, 11, 606721. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.606721>
- Walczyńska, K. S., Zhu, L., & Liang, Y. (2023). Insights into the role of the Wnt signaling pathway in the regeneration of animal model systems. *The International journal of developmental biology*, 67(3), 65–78. <https://doi.org/10.1387/ijdb.220144yl>
- Wang, D., Gu, Y., Yan, X., Huo, C., Wang, G., Zhao, Y., Teng, M., & Li, Y. (2022b). Role of CD155/TIGIT in Digestive Cancers: Promising Cancer Target for Immunotherapy. *Frontiers in oncology*, 12, 844260. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.844260>
- Wang, F., & Kumar, P. (2011). The role of radiotherapy in management of pancreatic cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*, 2(3), 157–167. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2011.032>
- Wang, H., Luo, Y., Ran, R., Li, X., Ling, H., Wen, F., & Yu, T. (2022a). IDO1 Modulates the Sensitivity of Epithelial Ovarian Cancer Cells to Cisplatin through ROS/p53-

- Dependent Apoptosis. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 12002. <https://doi.org/10.3390/ijms231912002>
- Wang, H., Sahu, A., Chuong, M. D., & Li, R. (2024b). TCF4 as a potential prognostic biomarker and an anticancer target in gastric cancer. *Translational cancer research*, 13(9), 5073–5086. <https://doi.org/10.21037/tcr-24-1290>
- Wang, H., Wang, D., Li, C., Zhang, X., Zhou, X., & Huang, J. (2018). High Kpn β 1 expression promotes non-small cell lung cancer proliferation and chemoresistance via the PI3-kinase/AKT pathway. *Tissue & cell*, 51, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.02.003>
- Wang, J., Wu, G., Manick, B., Hernandez, V., Renelt, M., Erickson, C., Guan, J., Singh, R., Rollins, S., Solorz, A., Bi, M., Li, J., Grabowski, D., Dirkx, J., Tracy, C., Stuart, T., Ellinghuysen, C., Desmond, D., Foster, C., & Kalabokis, V. (2019). VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunology*, 156(1), 74–85. <https://doi.org/10.1111/imm.13001>
- Wang, J., Yang, J., Narang, A., He, J., Wolfgang, C., Li, K., & Zheng, L. (2024a). Consensus, debate, and prospective on pancreatic cancer treatments. *Journal of hematology & oncology*, 17(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01613-x>
- Wang, S. S., Xu, J., Ji, K. Y., & Hwang, C. I. (2021). Epigenetic Alterations in Pancreatic Cancer Metastasis. *Biomolecules*, 11(8), 1082. <https://doi.org/10.3390/biom11081082>
- Wang, S., Huang, S., & Sun, Y. L. (2017). Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review. *BioMed research international*, 2017, 2646148. <https://doi.org/10.1155/2017/2646148>
- Wang, S., Li, J., Xie, J., Liu, F., Duan, Y., Wu, Y., Huang, S., He, X., Wang, Z., & Wu, X. (2018). Programmed death ligand 1 promotes lymph node metastasis and glucose metabolism in cervical cancer by activating integrin β 4/SNAI1/SIRT3 signaling pathway. *Oncogene*, 37(30), 4164–4180. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0252-x>
- Wang, X., Eichhorn, P. J. A., & Thiery, J. P. (2023). TGF- β , EMT, and resistance to anti-cancer treatment. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 97, pp. 1-11). Academic Press.
- Wang, X., Li, X., Wei, X., Jiang, H., Lan, C., Yang, S., Wang, H., Yang, Y., Tian, C., Xu, Z., Zhang, J., Hao, J., & Ren, H. (2020). PD-L1 is a direct target of cancer-FOXP3 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and combined immunotherapy with antibodies against PD-L1 and CCL5 is effective in the treatment of PDAC. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 38. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0144-8>
- Wawruszak, A., Borkiewicz, L., Okon, E., Kukula-Koch, W., Afshan, S., & Halasa, M. (2021). Vorinostat (SAHA) and Breast Cancer: An Overview. *Cancers*, 13(18), 4700. <https://doi.org/10.3390/cancers13184700>
- Wei, W., Zhang, Y., Li, Y., Huang, J., Kang, F., Tan, S., Lin, L., Lu, X., Wei, H., & Wang, N. (2025). Hypoxia-mediated high expression of TRIM15 promotes malignant progression of high-grade serous ovarian cancer through activation of AKT signaling pathway by K63 ubiquitination. *International journal of cancer*, 156(12), 2401–2415. <https://doi.org/10.1002/ijc.35387>
- West, T. J., Bi, J., Martínez-Peña, F., Curtis, E. J., Gazaniga, N. R., Mischel, P. S., & Lairson, L. L. (2023). A Cell Type Selective YM155 Prodrug Targets Receptor-Interacting Protein Kinase 2 to Induce Brain Cancer Cell Death. *Journal of the*

- American Chemical Society, 10.1021/jacs.2c11715. Advance online publication. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c11715>
- Wiemer, A. J., Wernimont, S. A., Cung, T. D., Bennin, D. A., Beggs, H. E., & Huttenlocher, A. (2013). The focal adhesion kinase inhibitor PF-562,271 impairs primary CD4⁺ T cell activation. *Biochemical pharmacology*, 86(6), 770–781. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.024>
- Wojciechowicz, K., Kuncewicz, K., Rutkowski, J., Jassem, J., Rodziewicz-Motowidło, S., Wardowska, A., & Spodzieja, M. (2024). Targeting BTLA with the peptide inhibitor HVEM(14-39) - A new way to restore the activity of T cells in melanoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 175, 116675. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116675>
- Wojciechowicz, K., Spodzieja, M., & Wardowska, A. (2024). The BTLA-HVEM complex - The future of cancer immunotherapy. *European journal of medicinal chemistry*, 268, 116231. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116231>
- Wu, C. C., Pan, M. R., Shih, S. L., Shiao, J. P., Wu, C. C., Chang, S. J., Kao, C. N., Chen, F. M., Hou, M. F., & Luo, C. W. (2023). Combination of FAK inhibitor and cytokine-induced killer cell therapy: An alternative therapeutic strategy for patients with triple-negative breast cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 163, 114732. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114732>
- Wu, J. W., Liu, Y., Dai, X. J., Liu, H. M., Zheng, Y. C., & Liu, H. M. (2024). CD155 as an emerging target in tumor immunotherapy. *International immunopharmacology*, 131, 111896. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111896>
- Wu, Z., Jing, S., Li, Y., Gao, Y., Yu, S., Li, Z., Zhao, Y., Piao, J., Ma, S., & Chen, X. (2017). The effects of SAHA on radiosensitivity in pancreatic cancer cells by inducing apoptosis and targeting RAD51. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 89, 705–710. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.067>
- Xie, X., Zhang, J., Shi, Z., Liu, W., Hu, X., Qie, C., Chen, W., Wang, Y., Wang, L., Jiang, J., & Liu, J. (2020). The Expression Pattern and Clinical Significance of the Immune Checkpoint Regulator VISTA in Human Breast Cancer. *Frontiers in immunology*, 11, 563044. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.563044>
- Xie, Y., Zhao, R., Zheng, Y., Li, Y., Wu, F., Lei, Y., Li, L., Zeng, H., Chen, Z., & Hou, Y. (2025). Targeting KPNB1 suppresses AML cells by inhibiting HMGB2 nuclear import. *Oncogene*, 44(21), 1646–1661. <https://doi.org/10.1038/s41388-025-03340-0>
- Xin, H., Liu, Y., Chen, P., Yin, T., Wang, M., Liu, T., Wen, Z., & Cheng, Y. (2022). CD155 promotes radioresistance and malignancy of esophageal cancer by regulating Hippo-YAP pathway. *Discover oncology*, 13(1), 53. <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00515-z>
- Xu, C., Zhang, W., & Liu, C. (2023). FAK downregulation suppresses stem-like properties and migration of human colorectal cancer cells. *PloS one*, 18(4), e0284871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284871>
- Xu, H., Wang, J., Al-Nusaif, M., Ma, H., & Le, W. (2024). CCL2 promotes metastasis and epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer via PI3K/Akt/mTOR and autophagy pathways. *Cell proliferation*, 57(3), e13560. <https://doi.org/10.1111/cpr.13560>

- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, 19(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, L., Yu, W., Xiao, H., & Lin, K. (2021). BIRC5 is a prognostic biomarker associated with tumor immune cell infiltration. *Scientific reports*, 11(1), 390. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79736-7>
- Xu, M., & Li, S. (2024). The opportunities and challenges of using PD-1/PD-L1 inhibitors for leukemia treatment. *Cancer letters*, 593, 216969. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216969>
- Xu, W., Hi  u, T., Malarkannan, S., & Wang, L. (2018). The structure, expression, and multifaceted role of immune-checkpoint protein VISTA as a critical regulator of anti-tumor immunity, autoimmunity, and inflammation. *Cellular & molecular immunology*, 15(5), 438–446. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.148>
- Yan, W., Li, R., He, J., Du, J., & Hou, J. (2015). Importin β 1 mediates nuclear factor- κ B signal transduction into the nuclei of myeloma cells and affects their proliferation and apoptosis. *Cellular signalling*, 27(4), 851–859. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.01.013>
- Yang, C., Jin, X., Liu, X., Wu, G., Yang, W., Pang, B., Jiang, J., Liao, D., & Zhang, Y. (2023c). TRIM15 forms a regulatory loop with the AKT/FOXO1 axis and LASP1 to modulate the sensitivity of HCC cells to TKIs. *Cell death & disease*, 14(1), 47. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05577-7>
- Yang, J., Liu, S., Li, Y., Fan, Z., Meng, Y., Zhou, B., Zhang, G., & Zhan, H. (2023a). FABP4 in macrophages facilitates obesity-associated pancreatic cancer progression via the NLRP3/IL-1 β axis. *Cancer letters*, 575, 216403. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216403>
- Yang, J., Liu, Y., & Liu, S. (2023b). The role of epithelial-mesenchymal transition and autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma invasion. *Cell Death & Disease*, 14(8), 506. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06032-3>
- Yang, S. L., Tan, H. X., Niu, T. T., Liu, Y. K., Gu, C. J., Li, D. J., Li, M. Q., & Wang, H. Y. (2021). The IFN- γ -IDO1-kynureine pathway-induced autophagy in cervical cancer cell promotes phagocytosis of macrophage. *International journal of biological sciences*, 17(1), 339–352. <https://doi.org/10.7150/ijbs.51241>
- Yasinska, I. M., Meyer, N. H., Schlichtner, S., Hussain, R., Siligardi, G., Casely-Hayford, M., Fiedler, W., Wellbrock, J., Desmet, C., Calzolari, L., Varani, L., Berger, S. M., Raap, U., Gibbs, B. F., Fasler-Kan, E., & Sumbayev, V. V. (2020). Ligand-Receptor Interactions of Galectin-9 and VISTA Suppress Human T Lymphocyte Cytotoxic Activity. *Frontiers in immunology*, 11, 580557. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.580557>
- Yi, M., Zheng, X., Niu, M., Zhu, S., Ge, H., & Wu, K. (2022). Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. *Molecular cancer*, 21(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01489-2>
- Yoodee, S., & Thongboonkerd, V. (2023). Epigenetic regulation of epithelial–mesenchymal transition during cancer development. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 380, pp. 1-61). Academic Press.
- Yoon, D. H., Shin, J. S., Jin, D. H., Hong, S. W., Jung, K. A., Kim, S. M., Hong, Y. S., Kim, K. P., Lee, J. L., Suh, C., Lee, J. S., & Kim, T. W. (2012). The survivin suppressant YM155 potentiates chemosensitivity to gemcitabine in the human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2. *Anticancer research*, 32(5), 1681–1688.

- Yoshimori, T., Kawami, M., Kumagai, Y., Futatsugi, S., Yumoto, R., Uchida, Y., & Takano, M. (2024). Abemaciclib-induced epithelial-mesenchymal transition mediated by cyclin-dependent kinase 4/6 independent of cell cycle arrest pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 172, 106601. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2024.106601>
- Yoshino, H., Sato, Y., & Nakano, M. (2021). KPNB1 Inhibitor Importazole Reduces Ionizing Radiation-Increased Cell Surface PD-L1 Expression by Modulating Expression and Nuclear Import of IRF1. *Current issues in molecular biology*, 43(1), 153–162. <https://doi.org/10.3390/cimb43010013>
- Yu, J., An, N., Zhu, J., Zhu, B., Zhang, G., Chen, K., Zhou, Y., Ye, T., & Li, G. (2024). AVL-armed oncolytic vaccinia virus promotes viral replication and boosts antitumor immunity via increasing ROS levels in pancreatic cancer. *Molecular therapy. Oncology*, 32(4), 200878. <https://doi.org/10.1016/j.omton.2024.200878>
- Yu, X., & Xu, J. (2024). TWIST1 Drives Cytotoxic CD8⁺ T-Cell Exhaustion through Transcriptional Activation of CD274 (PD-L1) Expression in Breast Cancer Cells. *Cancers*, 16(11), 1973. <https://doi.org/10.3390/cancers16111973>
- Yuan, Q., Pan, A., Fu, Y., & Dai, Y. (2021). Anatomy and physiology of the pancreas. In *Integrative pancreatic intervention therapy* (pp. 3-21). Elsevier.
- Zhai, L., Ladomersky, E., Lenzen, A., Nguyen, B., Patel, R., Lauing, K. L., Wu, M., & Wainwright, D. A. (2018). IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. *Cellular & molecular immunology*, 15(5), 447–457. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.143>
- Zhang, H., Zhang, Y., Feng, Z., Shuai, M., Ma, X., Wang, S., Yu, S., Deng, R., Luo, D., Shi, J., Pu, C., & Li, R. (2024b). Discovery of Novel Proteolysis-Targeting Chimera Molecules as Degradors of Programmed Cell Death-Ligand 1 for Breast Cancer Therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 67(13), 10589–10600. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c02259>
- Zhang, J. Y., Yan, Y. Y., Li, J. J., Adhikari, R., & Fu, L. W. (2020). PD-1/PD-L1 based combinational cancer therapy: icing on the cake. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 722. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00722>
- Zhang, K., Li, Y., Kong, X., Lei, C., Yang, H., Wang, N., Wang, Z., Chang, H., & Xuan, L. (2023). AGR2: a secreted protein worthy of attention in diagnosis and treatment of breast cancer. *Frontiers in oncology*, 13, 1195885. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1195885>
- Zhang, L., Qin, B., Zou, B., Wang, S., Quan, X., Wang, J., & Zhao, H. (2021a). Knockdown of TRIM15 inhibits the proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells through inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 53(2), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s10863-021-09872-w>
- Zhang, L., Zhang, W., Wang, Y. F., Liu, B., Zhang, W. F., Zhao, Y. F., Kulkarni, A. B., & Sun, Z. J. (2015). Dual induction of apoptotic and autophagic cell death by targeting survivin in head neck squamous cell carcinoma. *Cell death & disease*, 6(5), e1771. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.139>
- Zhang, Q., Yang, C., Gao, X., Dong, J., & Zhong, C. (2024a). Phytochemicals in regulating PD-1/PD-L1 and immune checkpoint blockade therapy. *Phytotherapy Research*, 38(2), 776-796. <https://doi.org/10.1002/ptr.8082>

- Zhang, R. J., & Kim, T. K. (2024). VISTA-mediated immune evasion in cancer. *Experimental & molecular medicine*, 56(11), 2348–2356. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01336-6>
- Zhang, X., Huang, X., Xu, J., Li, E., Lao, M., Tang, T., Zhang, G., Guo, C., Zhang, X., Chen, W., Yadav, D. K., Bai, X., & Liang, T. (2021b). NEK2 inhibition triggers anti-pancreatic cancer immunity by targeting PD-L1. *Nature communications*, 12(1), 4536. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24769-3>
- Zhang, X., Wang, X., Xu, R., Ji, J., Xu, Y., Han, M., Wei, Y., Huang, B., Chen, A., Zhang, Q., Li, W., Wang, J., Li, X., & Qiu, C. (2018). YM155 decreases radiation-induced invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition by targeting STAT3 in glioblastoma. *Journal of translational medicine*, 16(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1451-5>
- Zhang, Y., & Zhang, J. (2024). AGR2 facilitates teratoma progression by regulating glycolysis via the AnXA2/EGFR axis. *Experimental cell research*, 442(1), 114228. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2024.114228>
- Zhang, Y., & Zheng, J. (2020). Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Advances in experimental medicine and biology*, 1248, 201–226. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_9
- Zhang, Z., Li, H., Deng, Y., Schuck, K., Raulefs, S., Maeritz, N., Yu, Y., Hechler, T., Pahl, A., Fernández-Sáiz, V., Wan, Y., Wang, G., Engleitner, T., Öllinger, R., Rad, R., Reichert, M., Diakopoulos, K. N., Weber, V., Li, J., Shen, S., ... Kong, B. (2021c). AGR2-Dependent Nuclear Import of RNA Polymerase II Constitutes a Specific Target of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in the Context of Wild-Type p53. *Gastroenterology*, 161(5), 1601–1614.e23. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.07.030>
- Zhao, X., Puszyk, W. M., Lu, Z., Ostrov, D. A., George, T. J., Robertson, K. D., & Liu, C. (2015). Small molecule inhibitor YM155-mediated activation of death receptor 5 is crucial for chemotherapy-induced apoptosis in pancreatic carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*, 14(1), 80–89. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0229>
- Zhao, P., Sun, L., Zhao, C., & Malik, S. (2023). PD1 is transcriptionally regulated by LEF1 in mature T cells. *Immunobiology*, 228(5), 152708. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152708>
- Zhao, Z., & Liu, W. (2020). Pancreatic cancer: a review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Technology in cancer research & treatment*, 19, 1533033820962117. <https://doi.org/10.1177/1533033820962117>
- Zheng, Q., Gao, J., Yin, P., Wang, W., Wang, B., Li, Y., & Zhao, C. (2020). CD155 contributes to the mesenchymal phenotype of triple-negative breast cancer. *Cancer science*, 111(2), 383–394. <https://doi.org/10.1111/cas.14276>
- Zhou, R., Chen, S., Wu, Q., Liu, L., Wang, Y., Mo, Y., Zeng, Z., Zu, X., Xiong, W., & Wang, F. (2023). CD155 and its receptors in cancer immune escape and immunotherapy. *Cancer letters*, 573, 216381. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216381>
- Zhou, Y., Jin, X., Yu, H., Qin, G., Pan, P., Zhao, J., Chen, T., Liang, X., Sun, Y., Wang, B., Ren, D., Zhu, S., & Wu, H. (2022). HDAC5 modulates PD-L1 expression and cancer immunity via p65 deacetylation in pancreatic cancer. *Theranostics*, 12(5), 2080–2094. <https://doi.org/10.7150/thno.69444>

- Zhu, Y. H., Zheng, J. H., Jia, Q. Y., Duan, Z. H., Yao, H. F., Yang, J., Sun, Y. W., Jiang, S. H., Liu, D. J., & Huo, Y. M. (2023). Immunosuppression, immune escape, and immunotherapy in pancreatic cancer: focused on the tumor microenvironment. *Cellular oncology* (Dordrecht, Netherlands), 46(1), 17–48. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00741-1>
- Ziogas, D. C., Theocharopoulos, C., Lialios, P. P., Foteinou, D., Koumprentziotis, I. A., Xynos, G., & Gogas, H. (2023). Beyond CTLA-4 and PD-1 inhibition: novel immune checkpoint molecules for melanoma treatment. *Cancers*, 15(10), 2718. <https://doi.org/10.3390/cancers15102718>
- Zong, L., Mo, S., Yu, S., Zhou, Y., Zhang, M., Chen, J., & Xiang, Y. (2020). Expression of the immune checkpoint VISTA in breast cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 69(8), 1437–1446. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02554-3>
- Zou, J., Liao, X., Zhang, J., & Wang, L. (2019). Dysregulation of miR-195-5p/-218-5p/BIRC5 axis predicts a poor prognosis in patients with gastric cancer. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 33(5), 1377–1385. <https://doi.org/10.23812/19-146-A>

9. ÖZGEÇMİŞ

