

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**RAS ONKOGENİNİ HEDEFLEYEN İLAÇ ÖNCÜLLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Şükriye Ceren ÖÇAL DİRİCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2024**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

RAS ONKOGENİNİ HEDEFLEYEN İLAÇ ÖNCÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Şükriye Ceren ÖÇAL DİRİCAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS

Eş Danışman: Prof. Dr. Gülay BULUT

Bu çalışmada faj sunumu ile tanımlanan ilaç öncülü adaylarının yüzey plazmon rezonans yöntemi kullanılarak Kras doğal tip ve G12D mutant proteinine bağlanma afiniteleri analiz edilmiştir. Kras'a yüksek afinite ile bağlandığı gösterilen peptit yapılarının onkogenik Ras'ın fonksiyonel aktiviteleri üzerindeki olası inhibe edici etkileri incelenmiştir. Bu aşamadaki çalışmalarda BxPC-3 ve AsPC1 pankreas kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Hücresel çalışmalar kapsamında belirlenen peptitlerin hücre proliferasyonu-sitotoksisite ve motilite analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında faj sunumu ile doğal tip ve mutant KrasG12D mutantına bağlandığı belirlenen 12 amino asit uzunluğunda 7 peptit dizisi belirlenmiş olup bu yapıların 3 tanesinin ilgili hedef proteinlerine yüksek afinite ile bağlandığı yüzey plazmon rezonans analizi ile saptanmıştır. Pankreas kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen yara iyileşme deneyinde peptit 3'ün yara iyileşmesini anlamlı düzeyde inhibe ettiği gözlenmiştir.

Elde edilen verilerin pankreas kanseri başta olmak üzere KrasG12D mutasyonu taşıyan kanser türleri tedavisinde etkili olabilecek yeni ilaç öncülleri geliştirilmesi, kişiye özgü tedaviye olanak tanınmasına katkı sağlaması, ilişkili yeni bir hücresel sinyal yolağının tanımlanması için katkı sağlayabileceği ön görülmektedir.

Şubat 2024, 167 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, Kras, İlaç geliştirme, Faj sunumu

ABSTRACT

PhD Thesis

DEVELOPMENT OF DRUG DERIVATES TARGETING ONCOGENIC RAS PROTEIN

Şükriye Ceren ÖÇAL DİRİCAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Co-supervisor: Prof. Dr. Gülay BULUT

In this study, the binding affinities of drug precursor candidates identified by phage display to the Kras wild type and G12D mutant protein were analyzed using the surface plasmon resonance method. The possible inhibitory effects of peptide structures shown to bind to Kras with high affinity on the functional activities of oncogenic Ras were examined. BxPC-3 and AsPC1 pancreatic cancer cell lines were used in studies at this stage. Cell proliferation-cytotoxicity and motility analysis of the identified peptides within the scope of cellular studies was performed.

Within the scope of this study, 7 peptide sequences with a length of 12 amino acids that were found to bind to wild type and mutant KrasG12D mutant by phage display. And 3 of these structures were determined to bind to their respective target proteins with high affinity by surface plasmon resonance analysis. In the wound healing experiment performed on pancreatic cancer cell lines, it was observed that peptide 3 significantly inhibited wound healing.

It is anticipated that the data obtained may contribute to the development of new drug precursors that may be effective in the treatment of cancer types with KrasG12D mutation, especially pancreatic cancer, to contribute to the possibility of personalized treatment, and to the identification of a new related cellular signaling pathway.

February 2024, 167 pages

Key Words: Cancer, Kras, Drug development, Phage display

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince, değerli bilgi, öneri ve deneyimlerini aktaran,engin fikirleriyle her daim katkıda bulunan, akademik tecrübesini esirgemeyen, danışmanım Prof. Dr. Emine Sümer ARAS ve eş danışmanım Prof. Dr. Gülay BULUT’a,

Tezime katkıları olan Prof. Dr. Aykut ÜREN, Doç. Dr. Kamil TURAN, Araş. Gör. Seda AKDEMİR, Aylin DOMİNİKU, İrem POLAT’a,

TÜBİTAK tarafından 1003 programı çerçevesinde desteklenen 216S522 numaralı “Faj Sunum Yöntemi ile Onkogenik Kras Proteinini Hedefleyen İlaç Öncüllerinin Geliştirilmesi” başlıklı proje rojeye vermiş olduğu desteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’a,

Desteklerini her zaman hissettiğim, her türlü sıkıntıda yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Ş. Ceren ÖÇAL DİRİCAN
Ankara, Şubat 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Kanser	4
2.1.1 DNA'nın yapısı ve işlevi.....	4
2.1.2 Kanser genleri.....	5
2.1.3 Büyüme faktörü bağımsızlığı	6
2.1.4 Anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık	6
2.1.5 Hücre ölümünden kaçınma	7
2.1.6 Sürekli anjiyogenez	8
2.1.7 Hücreölölümsüzleştirme.....	8
2.1.8 İnvazyon ve metastaz	9
2.1.9 Yeniden programlanmış enerji metabolizması	10
2.1.10 İmmün yıkımından kaçınma	10
2.1.11 Kanserin kolaylaştırıcı özellikleri.....	11
2.2 Pankreas Kanseri	12
2.2.1 Geçmişten günümüze pankreas kanseri	13
2.2.2 Risk faktörleri	14
2.2.3 Pankreas kanseri histopatofizyolojisi.....	17
2.2.4 Pankreas kanseri biyolojisi	21
2.3 Kanserin Genetik Temeli.....	22
2.4 Onkogenler	23
2.4.1 Onkogenlerin kökeni ve aktivasyonu	25
2.4.2 Onkogen protein ürünlerinin fonksiyonu	26
2.4.3 Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve insan kanseri	27

2.5 Ras	29
2.5.1 Ras'ın yapısı/yeri/işlevi	29
2.5.2 Ras yolu	34
2.5.3 Ras aktivasyonu/inaktivasyonu	35
2.5.4 Ras ve mutasyonları.....	36
2.6 Kras	39
2.6.1 Kanserde kras mutasyonları	41
2.6.2 Pankreas tümöründe kras	44
2.7 Pankreas Kanseri Tedavi ve İlaç	47
2.7.1 Kras hedefli ilaç	50
2.8 Faj Görüntüleme Yöntemi / Faj Sunum Tekniği	51
3. MATERYAL VE METOD	58
3.1 Faj Görüntüleme Yöntemi / Faj Sunum Tekniği	58
3.2 Biyoinformatik Analizler	70
3.3 Yüzey Plazmonan Rezonans Uygulaması	70
3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları	72
3.4.1 Hücrelerin pasajlanması.....	73
3.4.2 Hücrelerin dondurulması	73
3.4.3 Dondurulmuş hücrelerin canlandırılması	74
3.4.4 İnhibitör peptidlerin pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri ve sitotoksite (IC50) analizi.....	74
3.4.5 Yara iyileşme deneyleri	75
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	77
4.1 Faj Sunumu İle Doğal Tip Kras Proteinine Bağlanan Peptidlerin Eldesi.....	77
4.2 Faj Sunumu İle G12D Mutant Kras Proteine Bağlanan Peptidlerin Eldesi	82
4.3 GDP - Doğal Tip Kras Hedef Proteinine Bağlanan Faj Partikülleri DNA İzolasyon Verileri	88
4.4 GDP - Doğal Tip Kras Faj Sunumu Biyoinformatik Analizleri	89
4.5 GDP - Mutant Kras Hedef Proteinine Bağlanan Faj Partikülleri Dna İzolasyon Verileri	92
4.6 GDP - Mutant Kras Faj Sunumu Biyoinformatik Analizleri	94
4.7 GTP - Doğal Tip Ve G12d Mutant Kras Proteinini Faj Sunum Sonuçları.....	96
4.7.1 GTP - doğal tip kras proteini faj sunumu.....	96
4.7.2 GTP – doğal tip kras hedef proteinine bağlanan faj partikülleri dna izolasyon verileri (3. biyopanning)	103

4.7.3 GTP – doğal tip kras faj sunumu biyoinformatik analizler (3. biyopanning)	104
4.7.4 GTP – doğal tip kras hedef proteinine bağlanan faj partikülleri dna izolasyon verileri (4. biyopanning)	107
4.7.5 GTP – doğal tip kras faj sunumu biyoinformatik analizler (4. biyopanning)	109
4.7.6 GTP - Mutant kras proteini faj sunumu	112
4.7.7 GTP – mutant kras hedef proteinine bağlanan faj partikülleri dna izolasyon verileri	118
4.7.8 GTP – mutant kras faj sunumu biyoinformatik analizler	119
4.7.8 Yüzey plazmonan rezonans uygulaması	122
4.7.9 Hücre düzeyinde deneyler	126
4.7.9.1 Faj sunumu sonrası seçilen peptidlerin pankreas kanseri hücrelerinin (AsPC1 ve BxPC3) proliferasyonu üzerindeki etkileri ve sitotoksite (IC50) analizleri	126
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	147
KAYNAKLAR	152
ÖZGEÇMİŞ	166

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
dH ₂ O	Distile Su
HCl	Hidroklorik Asit
Kb	Kilo Baz Çifti
kDa	Kilodalton
KCl	Potasyum Klorür
Log	Logaritma
Mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
M	Molarite
Mg	Miligram
ML	Mililitre
MM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
Ng	Nanogram
NaOH	Sodyum hidroksit
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
Nm	Nanometre
nM	Nanomol

Kısaltmalar

ATP	Adenozin Trifosfat
BSA	Bovin serum albumin
BT	Bilgisayarlı tomografi
CDK	Siklin- Bağımlı Kinaz
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DDR	Deoksiribonükleik Asit Hasar Yanıtı
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FTI	Fatnesiltransferaz inhibitörleri
FTase	Farnesiltransferaz
G	Gram

G12	Glisin 12
G13	Glisin 13
GAP	GTPaz aktive edici proteinler
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanin nükleotid değişim faktörleri
GGTase1	Geranilgeraniltransferaz I
GIN	Genomik istikrarsızlık
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
ICMT	İzoprenilsistein karboksilmetiltransferaz
IPMN	Pankreatik İntraduktal Papiller Mukozal Neoplazm
ITH	Tümör içi heterojenite
H-Ras	Harvey-Ras
HPV	Human Papilloma Virüs
LB	Luria bertani broth
Kras	Kirsten-Ras
Mm	Milimolar
M	Molarite
MAPK	Mitojenaktif Protein Kinaz
MCN	Müsinöz kistik neoplazi
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NGF	Sinir büyüme faktörü
N-Ras	Nöroblastom Ras
NFkB	Nükleer faktör kappa B
Ng	Nanogram
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
OD	Optik Dansite
PanIN	Pankreatik intraepitelyal neoplazi
PDAK	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PDGF	Trambosit kaynaklı (Platelet) büyüme faktörü
PEG	Polietilen glikol
pH	Hidrojenin Gücü
PI3K	Fosfoinositid-3-kinaz
PK	Pankreas Kanseri
PKC	Protein kinaz C
RALA	Ras benzeri protein A
RAS	Rat sarkomu
RasGEF	RAS Guanidin Değişim Faktörü
RasGRF1	Ras guanin nükleotid salınım faktörü 1
RCE1	RAS dönüştürücü enzim 1
RNA	Ribonükleik Asit
RR	Replikasyon stresi
RSV	Rous Sarkoma Virus
RTK	Reseptör tirozin kinaz
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
Sn	Saniye
TBS	Tris buffer salin

TGF- β
TKGFR
TSG
Q61

Dönüştürücü Büyüme Faktör-Beta
Tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörü
Tümör baskılayıcı gen
Glutamin 61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Pankreas çizimi. a)Pankreasın insan vücudundaki yeri b)Normal pankreas, pankreatit ve pankreas kanserinin karşılaştırılması	18
Şekil 2.2 Ras Aktivasyonu	29
Şekil 2.3 Pankreas kanserindeki Kras Onkogeni	45
Şekil 2.4 M13 Bakteriyofajı.....	53
Şekil 2.5 Faj gösterim tekniğinin uygulama basamakları	54
Şekil 4.1 Doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları.....	78
Şekil 4.2 Doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları.....	78
Şekil 4.3 Doğal tip Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları	79
Şekil 4.4 Doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları.....	80
Şekil 4.5 Doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları.....	80
Şekil 4.7 Doğal tip Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları.....	82
Şekil 4.8 G12D mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları.....	83
Şekil 4.9 G12D mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları.....	84
Şekil 4.10 G12D mutant Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları	84
Şekil 4.11 G12D mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları	85
Şekil 4.12 G12D mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları	86
Şekil 4.13 G12D mutant Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları	86
Şekil 4.14 G12D mutant Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğraflar	87
Şekil 4.15 GDP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüleri	88
Şekil 4.16 GDP - doğal tip Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları.....	92
Şekil 4.17 GDP - mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüsü.....	93
Şekil 4.18 GDP - mutant Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları.....	95

Şekil 4.19 GTP – doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları	97
Şekil 4.20 GTP – doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları	98
Şekil 4.21 GTP – doğal tip Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları	98
Şekil 4.22 GTP – doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları	99
Şekil 4.23 GTP – doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları	100
Şekil 4.24 GTP – doğal tip Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları	100
Şekil 4.26 GTP – doğal tip Kras, 4. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları	102
Şekil. 4.27 GTP – doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüleri (3. biyopanning)	103
Şekil 4.28 GTP – doğal tip Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları (3. biyopanning)	106
Şekil 4.29 GTP – doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüleri (4. biyopanning)	107
Şekil 4.30 GTP – doğal tip Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları.....	112
Şekil 4.31 GTP – mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları	113
Şekil 4.32 GTP – mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları	114
Şekil 4.33 GTP – mutant Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları	114
Şekil 4.34 GTP – mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları	115
Şekil 4.35 GTP – mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları	116
Şekil 4.36 GTP – mutant Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları	116
Şekil 4.37 GTP – mutant Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları	117
Şekil 4.38 GTP – mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüler	118
Şekil 4.39 GTP – mutant Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları.....	121

Şekil 4.40 Peptid 1'in CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri	123
Şekil 4.41 Peptid 2'nin CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri	123
Şekil 4.42 Peptid 3'ün CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri	124
Şekil 4.43 Peptid 4'ün CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri	124
Şekil 4.44 Peptid 5'in CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri	125
Şekil 4.46 Peptid 7'nin CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri	125
Şekil 4.47 Peptid 3 Muamele Edilen AsPC1 hücrelerinin WST analizi	127
Şekil 4.48 Peptid 4 Muamele Edilen AsPC1 hücrelerinin WST analizi	127
Şekil 4.49 Peptid 5 Muamele Edilen AsPC1 hücrelerinin WST analizi	128
Şekil 4.50 Peptid 3 Muamele Edilen BxPC3 hücrelerinin WST analizi	128
Şekil 4.51 Peptid 4 Muamele Edilen BxPC3 hücrelerinin WST analizi	129
Şekil 4.52 Peptid 5 Muamele Edilen BxPC3 hücrelerinin WST analizi	129
Şekil 4.53 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi	130
Şekil 4.54 Peptid 3 (10uM) ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde 0-168 saat aralığında gerçekleşen yara iyileşme deneyi.....	131
Şekil 4.55 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)	131
Şekil 4.56 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)	132
Şekil 4.57 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)	132
Şekil 4.58 Peptid3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)	133
Şekil 4.59 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (96 saat)	133
Şekil 4.60 Peptid 4 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi	134
Şekil 4.61 Peptid 4 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)	134

Şekil 4.62 Peptid 4 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)	135
Şekil 4.63 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi	135
Şekil 4.64 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)	136
Şekil 4.65 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)	136
Şekil 4.66 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)	137
Şekil 4.67 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyi.....	138
Şekil 4.68 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)	139
Şekil 4.69 Peptid3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)	139
Şekil 4.70 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)	140
Şekil 4.71 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)	140
Şekil 4.72 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyi.....	141
Şekil 4.73 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)	142
Şekil 4.74 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)	142
Şekil 4.75 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)	143
Şekil 4.76 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)	143
Şekil 4.77 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyi.....	144
Şekil 4.78 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)	145
Şekil 4.79 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)	145
Şekil 4.80 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)	146
Şekil 4.81 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)	146

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Yüzey plazmon rezonans analizinde kullanılan ligand ve analitler.....	71
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler	72
Çizelge 4.1 Doğal tip Kras proteini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri.....	77
Çizelge 4.2 Doğal tip Kras proteini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri.....	79
Şekil 4.6 Doğal tip Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları.....	81
Çizelge 4.3 Doğal tip Kras proteini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri.....	81
Çizelge 4.4 G12D mutant Kras proteini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	83
Çizelge 4.5 G12D mutant Kras proteini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	85
Çizelge 4.6 G12D mutant Kras proteini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	87
Çizelge 4.7 GDP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri.....	89
Çizelge 4.8 GDP - doğal tip Kras faj sunumu nükleotid dizileri	90
Çizelge 4.9 GDP - doğal tip Kras faj sunumu peptid dizileri	91
Çizelge 4.10 GDP - mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri	93
Çizelge 4.11 GDP - mutant Kras faj sunumu nükleotid dizileri	94
Çizelge 4.12 GDP - mutant Kras faj sunumu peptid dizileri	95
Çizelge 4.13 GTP – doğal tip Kras proteini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	97
Çizelge 4.14 GTP – doğal tip Kras proteini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	99
Çizelge 4.15 GTP – doğal tip Kras proteini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	101
Şekil 4.25 GTP – doğal tip Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları	101
Çizelge 4.16 GTP – doğal tip Kras proteini 4. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	102

Çizelge 4.17 GTP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri (3. biyopanning).....	104
Çizelge 4.18 GTP – doğal tip Kras faj sunumu nükleotid dizileri (3. biyopanning)	105
Çizelge 4.19 GTP – doğal tip Kras faj sunumu peptid dizileri (3. biyopanning)	106
Çizelge 4.20 GTP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri (4. biyopanning).....	108
Çizelge 4.21 GTP – doğal tip Kras faj sunumu nükleotid dizileri (4. biyopanning)	110
Çizelge 4.22 GTP – doğal tip Kras faj sunumu peptid dizileri	111
Çizelge 4.23 GTP – mutant Kras proteini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	113
Çizelge 4.24 GTP – mutant Kras proteini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	115
Çizelge 4.25 GTP – mutant Kras proteini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri	117
Çizelge 4.26 GTP - mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri	119
Çizelge 4.27 GTP – mutant Kras faj sunumu nükleotid dizileri	120
Çizelge 4.28 GTP – mutant Kras faj sunumu peptid dizileri	121
Çizelge 4.29 Biacore analizlerinden elde edilen bulgular.....	122

1. GİRİŞ

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi, normal sınırlarının ötesine geçerek vücudun diğer kısımlarını istila etmesi ve/veya diğer organlara yayılmasıyla vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda başlayabilen geniş bir hastalık grubudur. “Asla iyileşmeyen bir yara” olarak değerlendirilen kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve bağışıklık sisteminin anormal tanınmasıyla karakterizedir (Yin vd, 2021) Kanser genetik bir hastalıktır. En yaygın kanserler somatik hücrelerdeki edinilmiş mutasyonlardan kaynaklanır. Bunun aksine, spesifik herediter mutasyonları nadir görülen kalıtsal kanser sendromlarından sorumludur. Genel olarak kanserle ilişkili genler iki gruba ayrılabilir: onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (TSG'ler). Onkogenler aktivasyona uğrar ve fenotipik olarak baskındır, TSG'ler ise inaktivasyona uğrar ve fenotipik olarak resesiftir. Onkogenik aktivasyon şu yollarla meydana gelebilir: gen dizisi içindeki belirli nokta mutasyonları; genin kopya sayısının çoğaltılması; veya deoksiribonükleik asitin (DNA), transkripsiyonun daha aktif olduğu veya gelişmiş biyolojik aktiviteye sahip bir proteini kodlayan yeni bir füzyon geninin oluşturulduğu bölgelere translokasyonudur. TSG'ler, gen tarafından kodlanan proteinin işlevini bozan mutasyonlar veya genin promotörünün susturulması yoluyla etkisiz hale getirilir. Bu süreçlerin mekanik temellerinin daha iyi anlaşılması, kanser tıbbında teşhis, tedavi ve prognozda devrim yaratmıştır (Nenclares ve Harrington 2023).

Pankreas, midenin arkasında yer alan ve yaprak şeklinde olan bir iç organdır. Yetişkinlerde yaklaşık 15 cm uzunluğunda ve 5 cm genişliğindedir. Pankreas dört farklı bölgeye ayrılır: baş, boyun, gövde ve kuyruk. Pankreasın başı, mide ve on iki parmak bağırsağının birleştiği yere bitişik olan ve safra kanalının ya yüzeyindeki bir oluk içinde yer aldığı ya da içinden geçtiği daha geniş kısımdır. Boyun ve gövde bölgeleri büyük kan damarlarıyla çevrilidir. Pankreasın kuyruğu ise sol böbrek ve dalağın önünde yer alır (Walker 2018).

Pankreas, farklı işlevleri yerine getiren hem endokrin hem de ekzokrin hücrelerden oluşur. Pankreas hücrelerinin çoğunluğu ekzokrin bezleri ve kanalları oluşturan ekzokrin hücreleridir. Bu hücreler karbonhidrat sindirimi için amilaz, amino asit sindirimi için

tripsin, kimotripsin, elastaz ve karboksipeptidazlar gibi proteazlar ve yağ asitlerinin parçalanması için lipaz dahil olmak üzere bir dizi enzimin salgılanmasından sorumludur. Buna karşılık, endokrin hücreler organın nispeten küçük bir bölümünü oluşturur, ancak doğrudan kan dolaşımına salınarak kan glikoz seviyelerini düzenleyen insülin ve glukagon gibi hormonların salgılanmasında çok önemli bir rol oynar. (Ungkulpasvich vd. 2023). Normal sağlıklı bir pankreas, sindirim enzimi salgılayan asiner hücreler, bikarbonat salgılayan duktal hücreler, asiner ve duktal hücreler arasındaki geçiş bölgesi olan sentroasiner hücreler, hormon salgılayan endokrin adacıklar ve nispeten inaktif stellat hücrelerden oluşur (Pandol 2011).

Pankreas kanseri (PK), onkolojik mortaliteye sıkça katkıda bulunan bir hastalıktır ve yüksek derecede değişkenlik, tümöral kitle içinde yoğun nüfuslu bir stromal mikro çevre, yaygın metastaz eğilimi ve hücrel metabolizmanın önemli ölçüde yeniden yapılandırılması ile ayırt edilir. PK alanında, maligniteler ekzokrin veya endokrin hücrelerden kaynaklanabilir (Ungkulpasvich vd. 2023). Pankreas kanseri, pankreastaki anormal DNA mutasyonlarının pankreas hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve bölünmesine neden olarak tümörleri oluşturmasıyla ortaya çıkar. Pankreas kanseri ölümcül bir hastalık ve en agresif ve ölümcül malignitelerden biri olarak nitelendirilmektedir (Hu vd. 2021). Tanı konulduğunda, pankreas kanseri genellikle ileri bir aşamada ortaya çıkar ve genellikle vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır.

Klinik olarak pankreas kanseri, adenokarsinom olarak adlandırılan pankreatik duktal hücrelerdeki glandüler yapıların epitel hücrelerinde oluşan malign tümör için kullanılan genel terimdir (Aier vd 2019). Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK) pankreas kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturur (Jin ve Bai 2020). Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK), sindirim sisteminin en malign tümörlerinden biridir. Derin anatomik yerleşimi ve kolay saptanamayan klinik bulguları nedeniyle, erken tanı için etkili bir yöntem yoktur ve bu da yüksek ölüm oranıyla sonuçlanır (Eguchi vd. 2020). Pankreas kanserinin tanı ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen, 5 yıllık sağkalım oranı %9 olan PDAK'nin 2030 yılına kadar dünya çapında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir (Moore ve Donahue 2019). PDAK, hem tanıda geç evre olması hem de kemoterapiye dirençli olması nedeniyle klinik açıdan zorlu bir

kanserdir (Shibata vd. 2018).

Kras, Ras ailesine (N-, H- ve Kras) ait bir G proteindir. Kras mutasyonlarının PDAK'ı başlattığı düşünülmektedir ve PDAK'ta Kras mutasyonlarının sıklığı %90-95 arasında değişmektedir (Shibata vd. 2018). Kras mutasyonlarının baskınlığı, Ras sinyal ağına karşı hedefe yönelik tedavinin PDAK için etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini düşündürmektedir. Bugüne kadar, PDAK için birkaç hedefe yönelik tedavi onaylanmıştır (Luo 2021). İlk onaylanan EGFR inhibitörü erlotinib, gemsitabin ile kombinasyon halinde tek başına gemsitabine kıyasla sağkalım avantajı sağlamıştır, ancak Kras mutant kolorektal kanser için EGFR hedefli tedavi hakkında olumsuz veriler ortaya çıktıktan sonra tıp camiası hızlı bir şekilde farklı arayışlara yönelmiştir (Moore vd. 2007). Ardından, TRK kinaz inhibitörleri larotrectinib ve entrectinib, NTRK füzyon geni içeren solid tümörler için onaylanmıştır. Ancak, NTRK füzyon geni PDAK'ın sadece %0,5'inde görülür ve NTRK füzyon geni içermeyen PDAK'ın çoğunluğu sistematik olarak değerlendirilmemiştir (Drilon vd. 2018). Son olarak, PARP inhibitörü olaparib, BRCA1 veya BRCA2'de germline mutasyonları olan (~%7,5) son dönem PDAK hastalarında progresyonsuz sağkalımı uzatabilir ancak genel sağkalımı uzatamaz (Huang vd. 2021). Sonuç olarak, klinik aktiviteleri şimdiye kadar hayal kırıklığı yaratmıştır. Bu nedenle, pankreas kanseri için yeni ilaç modellemeleri tanımlanmasına acil ihtiyaç vardır. Ras'taki mutasyonların büyük çoğunluğunun G12, G13 ve Q61 olmak üzere üç sıcak nokta kalıntısındaki yanlış anlamlı mutasyonlar olduğu iyi bilinmektedir. G12'de gözlenen sıklık sırası G12D, G12V, G12C, G12A, G12S ve G12R şeklindedir ve G12C mutasyonu akciğer kanserinde yaygındır ve G12D, PDAK'de en yaygın olanıdır. Aslında, KrasG12D en önemli tümör terapötik hedeflerinden biridir (Xianhua 2023).

Bu tez çalışmasında özellikle Ras ailesi üyelerinden Kras onkogeninin mutasyon görülme oranının %90 civarında bildirildiği pankreas kanseri modeli üzerinde ve yine bu kanser tipinde en sık gözlenen mutasyon çeşidini taşıyan KrasG12D mutant proteinini (Luo, 2021) hedefleyen ilaç öncüllerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser

Kanser, hücresel DNA'daki bilgi bozulduğunda ortaya çıkan ve anormal gen ekspresyon modellerine yol açan genetik bir hastalıktır. Sonuç olarak da büyüme, hayatta kalma ve invazyon/motilite gibi normal hücresel işlevleri kontrol eden normal genlerin etkileri vurgulanırken, bu etkileri baskılayan genlerin etkileri de bastırılmaktadır. DNA metilasyonu gibi süreçlerin neden olduğu mutasyonel olmayan (epigenetik) değişikliklerin görüldüğü fikri son dönemde daha fazla kabul görmesine rağmen, değişimin ana nedeni mutasyonların birikmesidir. Anormal gen ekspresyonu, kanser hücrelerinde biyolojik süreçlerde köklü değişikliklere neden olmaktadır. Bu da kanserin ayırt edici özellikleri olarak adlandırılmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000).

2.1.1 DNA'nın yapısı ve işlevi

Genetik kod, hücresel çekirdekte kromozomlar halinde paketlenmiş DNA formunda bulunmaktadır. DNA molekülleri, bir şeker fosfat omurgasından oluşur; her şeker, dört nükleotit bazından birini içermektedir: adenin (A) ve guanin (G) pürinleri ve timin (T) ve sitozin (C) pirimidinleri. İki DNA ipliği, helezon çizerek bir çift sarmal oluşturmaktadırlar; bazlar, karşı iplikteki belirli partnerlerle hidrojen bağları oluşturmaktadır: A genellikle yalnızca T ile (iki hidrojen bağı) ve C yalnızca G ile (üç hidrojen bağı) eşleşmektedir. Heliks, histon proteinlerinden oluşan nükleozomların etrafına sarılır ve ayrıca yoğunlaşarak kromatin oluşturmaktadır. Kromatin, aktif gen transkripsiyon bölgelerinde gevşek bir şekilde paketlenir (ökromatin) ve transkripsiyonel olarak sessiz genom alanlarında ve sıkıca paketlenmektedir (heterokromatin). Genetik kodun tamamı yaklaşık 3.2×10^9 bazdan oluşur ve yaklaşık 20.000-25.000 gen içermekte, bu genomun yalnızca % 1'ini oluşturmaktadır. Bir gen içindeki DNA dizisi hem eksonları hem de intronları içermektedir. Eksonlar, ribozomda çevrilen protein kodlayan bölgeleri temsil eder; intronlar kodlamaz ve düzenlenir (Nenclares ve Harrington 2020).

Genlerin görevi protein üretmektir; bu da iki aşamalı bir süreçtir. İlk olarak, DNA kodu, transkripsiyon yoluyla haberci ribonükleik aside (mRNA) kopyalanmaktadır. RNA, DNA'dan iki yönden farklıdır: (1) şeker omurgası riboz içerir (deoksiriboz değil); ve (2) timin, urasil (U) ile değiştirilir. Bir genin mRNA'ya kopyalanması ve ardından bir hücresel proteine çevrilmesi süreci karmaşıktır ve birden fazla kontrol düzeyine tabi olmaktadır. Transkripsiyonun düzenlenmesi süreci başlatan adımdır ve DNA'daki destekleyici elemanlar ile bunlara bağlanan spesifik proteinler (> 100 ayrı alt birim) arasındaki etkileşimler ile gerçekleşmektedir. Transkripsiyon başlangıç yerinde, DNA-bağımlı RNA polimeraz II alınır ve DNA'nın kodlama zincirine tamamlayıcı olan mRNA sentezlemeye başlar ve ATGC DNA dizisi mRNA'da UACG olana kadar devam etmektedir. Transkripsiyon sonrası mRNA modifikasyonları, intronların uçbirleştirmeyi ve mRNA'yı çekirdekten dışa aktarmaya uygun hale getirir. İnsan genlerinin yaklaşık %70'inin transkriptlerinin alternatif olarak uçbirleştirilmesi, aynı genden farklı proteinlerin üretilmesine izin vermektedir. Her gen ortalamada, alternatif olarak birleştirilmiş yaklaşık dört mRNA üretir; bu da insan genomunun yaklaşık 100.000 farklı protein kodladığı anlamına gelmektedir. mRNA, translasyon gerçekleşmeden önce mikroRNA'lar (miRNA'lar) adı verilen küçük, protein kodlamayan RNA molekülleri tarafından parçalanabilir; bu da hücre içindeki protein seviyelerini değiştirebilmektedir. Bu küçük miRNA'ların deregülasyonu kansere yol açabilmektedir. En çok deregüle edilmiş miRNA'lardan üçü, birçok farklı kanserde sıklıkla mutasyona uğrayan miRNA let-7, miRNA-200 ve miRNA-125 ailelerine aittir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Eğer mRNA, ribozoma ulaşır ise, onun üçlü (triplet) baz kodu, spesifik protein moleküllerine çevrilmektedir. Kanser olarak bildiğimiz fenotipik değişikliklere aracılık eden bu protein ürünleridir (Hanahan ve Winberg 2000).

2.1.2 Kanser genleri

Kanser, her biri normal hücrelerde temel bir işlev sağlayan iki gen sınıfı tarafından yönlendirilmektedir; onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenler, hücre proliferasyonunu, hayatta kalımı ve invazyon/motiliteyi kontrol eden normal hücresel genlerin (proto-onkogenler) mutasyona uğramış versiyonlarından türemektedir. Normal hücrelerde, proto-onkogenlerin ekspresyonu, kontrolsüz hücre büyümesini önlemek için

çok dikkatli bir şekilde düzenlenmektedir. Kanserde, proto-onkogenlerin aktive edici mutasyonları kontrolsüz hücre bölünmesine, hayatta kalmanın artmasına (anti-kanser tedavisinden sonra bile) ve yayılmaya neden olmaktadır. Onkogenler "fenotipik olarak baskın" olarak tanımlanmaktadır. Bir proto-onkogenin tek bir mutasyona uğramış kopyası kanseri teşvik etmek için yeterlidir. Genellikle katıtsal kanser sendromları ile ilişkili değildir (Nenclares ve Harrington 2020).

2.1.3 Büyüme faktörü bağımsızlığı

Hücrelerde hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu için ligand aracılı uyarım gerekmektedir. Ligandın hücrenin yüzeyinde bulunan ve hücre dışı bölgesine sahip reseptörler ile iletişime girmesi gerekmektedir (Baran, 2018). Hücre yüzeyindeki ligand bağlanması, hücrenin gen ekspresyon modelini değiştirmektedir. Büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu da, reseptörleri uyaran ligandların sentezi ve salınımı da detaylı bir şekilde düzenlenmektedir. Kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyal yollarını deregüle edip, onları kullanarak kontrolsüz hücre bölünmesini desteklemektedir (Rogers vd. 2005).

Kanser hücreleri, üç ana mekanizma ile büyüme faktörlerinde kendi kendine yeterliliğe ulaşır: (1) kendi (otokrin sinyalleme) ve komşu (parakrin sinyalleme) reseptörleri uyarmak için büyüme faktörleri oluşturma ve serbest bırakma; (2) yüzeylerindeki büyüme faktörü reseptörlerinin sayısını, yapısını veya işlevini değiştirerek çekirdeğe bir büyüme sinyali iletme olasılıklarını artırma (aynı kökenli ligand bağlanmasa bile); ve (3) büyümeyi kalıcı olarak açmak için reseptörün downstream sinyal yollarını deregüle etmedir (Talmadge ve Fidler 2010).

2.1.4 Anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık

Bir dizi anti-büyüme sinyali, yukarıda belirtilen pozitif yönde hareket eden büyüme sinyallerine karşı koymakta ve genellikle hücresel büyümenin engellenmemesi için çalışmaktadır. Kısaca anti-büyüme sinyalleri, hücreleri durgunluğa zorlayarak (hücre döngüsünün G0 aşaması) veya terminal farklılaşma indükleyerek hücre döngüsüne

yeniden giremez hale getirmektedir. Anti-büyüme sinyalleri, hücresele reseptörlerini (örneğin, TGF- β reseptörlerini) etkileyen ve ikincil haberciler aracılığıyla çekirdeğe sinyaller gönderen ligandlar (örneğin, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β)) tarafından gönderilir, bu da değiştirilmiş gen ekspresyon modellerine yol açmaktadır. Bu yol esas olarak hücre döngüsünün ilerlemesinin kontrol edilmesinde rol oynar ve retinoblastoma proteini, siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve CDK inhibitörleri gibi proteinler aracılığıyla çalışmaktadır. Anti-büyüme sinyal yollarındaki anormallikler, kanserlerde son derece yaygındır ve hücre döngüsü boyunca kanser hücrelerinin ilerlemesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle, retinoblastoma proteini ve CDK inhibitör ailesinin üyelerinin kaybı ve siklinlerle CDK'lerin aşırı ekspresyonu birçok tümör tipinde görülmektedir (Nenclares ve Harrington 2020).

2.1.5 Hücre ölümünden kaçınma

Normal hücreler, aldıkları hayatta kalma yanlısı ve karşıtı sinyallerin dengesini denetleyerek sürekli olarak canlılıklarını değerlendirmektedir. Normal hücrelerde, endojen (replikasyon sırasında) veya eksojen (genotoksik olaylardan) DNA hasarı, DNA onarımı potansiyeli değerlendirilirken proliferasyonun durdurulmasına (hücre döngüsü durması) yol açmaktadır. Oluşan hasarın kapsamı, onarım kapasitesini aşarsa, hayatta kalma yanlısı ve karşıtı sinyallerin dengesinde bozulmalar meydana gelir. Böylece hücrenin kendisi bir tür regüle hücre ölümüne (örneğin apoptoz, nekroptoz, otofaji) uğramaktadır. Bu durum DNA hasarının giderilmesini önler ve mutasyonların hücre bölünme silsilesine geçme riskini ortadan kaldırmaktadır. Bu mekanizma kanserin gelişmesine karşı güçlü bir engel teşkil etmektedir. Normal hücre ölümünü sağlayan sinyal yollarının kaybı, kanserde neredeyse evrensel bir olaydır. Gerçekte, kanserle ilişkili en iyi bilinen genlerden ikisi (p53 (TP53 olarak da bilinir) (TSG) ve BCL2 (onkogen)) apoptozla yakından ilgilidir. Apoptotik sinyalleme iki ana mekanizması intrinsik ve ekstrinsik yollardır. Kanser hücreleri, ekstrinsik yoldan gönderilen sinyalleri görmezden gelme veya hücre içi pro- ve anti-hayatta kalma moleküllerinin dengesini apoptozun inhibisyonuna yönelik değiştirerek apoptozdan kaçmaktadır. Kanser hücreleri apoptozu atlatarak, hücre ölümüne neden olmadan DNA hasarını sürdürebilmektedir (hasarlı genin hücre hayatta kalımı için elzem olmadığı sürece). Bu

nedenle, normal apoptotik sinyallemeği baypas eden kanser hücrelerinin sitotoksik anti-kanser tedavilerine intrinsik olarak dirençli olma olasılığı daha yüksek görülmektedir. Öte yandan, TSG'lerdeki DNA hasarı onarım yollarını kontrol eden mutasyonlar, kanser hücrelerini sentetik öldürücü denilen olgu yoluyla belirli ilaç tedavilerine (örneğin BRCA-mutasyona uğramış tümörler durumunda poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri) karşı savunmasız hale getirebilmektedir. Ek olarak, değiştirilmiş DNA onarım genlerine sahip kanserler, genellikle yüksek bir tümör mutasyon yükü ve bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerine yanıtı iyileştiren yüksek düzeyde bağışıklık geni ekspresyon imzaları taşımaktadır (Nenclares ve Harrington 2020, Sharma vd. 2019).

2.1.6 Sürekli anjiyogenez

Sağlıklı dokularda, yeni kan damarlarının büyümesine anjiyogenez denmektedir. Anjiyogenez, pozitif (pro-anjiyojenik) ve negatif (anti-anjiyojenik) sinyaller arasındaki dengeyle çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Kanser gelişme yeteneği, kan kaynağını güvence altına alma becerisiyle doğrudan ilişkilidir. Kanser hücresi kümeleri, doğrudan difüzyon yoluyla oksijen ve besin elde ederek 60 - 100 mikrometreye kadar büyüebilir, ancak bu boyuttan fazla büyümesi için bir tümörün özel bir kan kaynağına ihtiyaç vardır. Kanserler bu durumu pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki dengeyi bozarak yapmaktadır. Temelde, kanserler, vasküler endotelial büyüme faktörü gibi pro-anjiyojenik proteinlerin üretimini artırarak ve/veya anjiyostatin gibi anti-anjiyojenik proteinlerin üretimini azaltarak "anjiyojenik fenotipe" geçmektedir (Nenclares ve Harrington 2020, Nishida vd. 2006).

2.1.7 Hücresel ölümsüzleştirme

Normal somatik hücreler, replikatif yaşlanma olarak bilinen kalıcı bir büyüme durması durumuna girmeden önce sınırlı sayıda hücre bölünmesine (Hayflick limiti) uğrayabilmektedir. Bunun nedeni, hücrelerin her bölünmede kromozomlarının (telomerlerin) uçlarını tam olarak kopyalayamamasıdır. Bu nedenle telomerleri zamanla kısalır; bunlar hücrelerin ömrünü geri sayan moleküler saatler gibi olmaktadır. Aksine,

kök hücreler ve kötüçül hücreler telomerlerinin uzunluğunu koruyabilir ve etkili bir şekilde ölümsüzdürler. Çoğu tümörde bu, telomeraz enziminin yukarı regülasyonu yoluyla meydana gelir, ancak vakaların %10-15'inde "telomerlerin alternatif uzaması" denen bir mekanizma sorumludur. Telomeraz enzimatik aktivite çok sayıda protein içermektedir; iki ana bileşen bir RNA şablonu (hTR) ve bir ters transkriptaz enzimidir (hTERT). Ters transkriptaz, telomerik DNA dizisinin (TTAGGG) yeniden sentezini yönlendirmek için hTR RNA şablonunu kullanılmaktadır. Bu nedenle, telomeraz ekspresyonu yeniden aktive edilmiş tümörler, telomerlerinin her bir hücre bölünmesinde kaybettikleri kısımlarını yeniden inşa edebilir ve böylece replikatif yaşlanmaya mahkum edilmekten kaçınabilmektedirler. Telomeraz ekspresyonu, replikatif kinetiği artırır, olumsuz koşullar altında hücre büyümesini destekler ve bir anti-apoptotik ajan olarak hareket edebilmektedir. Yüksek telomeraz proteini seviyeleri aynı zamanda birkaç antineoplastik ilaca direnç sağlamaktadır (De Bardet vd. 2023, Nenclares ve Harrington 2020).

2.1.8 İnvazyon ve metastaz

Uzak organ metastazları kanser ölümlerinin %90'ının sebebinin oluşturmaktadır. İnvazyon ve metastaz olması için karmaşık biyolojik süreçler art arda gerçekleşmelidir: (1) tümör hücresinin yakın komşularından ve yerel bölgede stromadan ayrılması; (2) hücre dışı matriksin enzimatik degradasyonu, ardından spesifik yönlü motilite (tek hücreler, gruplar); (3) kan veya lenfatik damarların penetrasyonu (intravazasyonu) ve tümör embolizasyonu; (4) uygun büyüme faktörlerinin uygun bir şekilde bulunduğu metastatik bir bölgeye varana kadar dolaşımda hayatta kalma; (5) varış noktasında kan damarı endoteline bağlanma ve damardan ekstrasvazasyon; ve (6) proliferasyon, yeni yerin invazyonu ve yeni kan tedarikinin sağlanmasıdır. Epitel tümörlerinin invazyonu ve metastazının altında yatan kilit süreçlerden biri epitelden mezenkime geçişidir. Bu çok yönlü süreç, kanser hücrelerini istila ederek geçici veya kalıcı olarak devreye alınabilmektedir. Ek olarak, tümör metastatik bir birikinti oluşturacağı hedef organa ulaştığında, genellikle mezenkimalden epiteliye geçiş meydana gelmektedir. Farklı kanserlerin belirli organlara (örneğin göğüs kanserinden karaciğer, kemik ve beyine; akciğer kanserinden beyine ve adrenal bezine) metastaz modelleri rastgele meydana

gelmemektedir. Koloni kurmak için uygun bir ortam aramalarına izin veren tümör hücrelerin tarafından, kemokin reseptörlerinin ekspresyonu tarafından yönlendirildikleri görülmektedir (Talmadge ve Fidler 2010).

2.1.9 Yeniden programlanmış enerji metabolizması

Sağlıklı hücreler ilk önce glikozu glikoliz yoluyla pirüvata dönüştürür; ardından oksijen varlığında mitokondriyal oksidatif fosforilasyon gerçekleşerek karbondioksit ve su oluşturmaktadır. Bu dönüşüm ve oluşum çok etkilidir. Glikoz molekülü başına yaklaşık otuz sekiz adenosin trifosfat (ATP) molekülü üretmektedir. Bu durumun aksine, oksijenli koşullar altında bile, kanser hücreleri laktat oluşumuyla birlikte metabolizmalarını değiştirerek glikolizi kullanma eğiliminde olmaktadır (Warburg etkisi). Bu, enerji üretimi açısından israf edicibir durum olarak görünse de, hücre büyümesi ve bölünmesi için önemli substratlar sağlayarak kanser hücreleri için avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, metabolik yeniden programlama, tümör ve stromal hücrelerin plastisitesine yol açan hipoksi-kaynaklı fenotipik anahtar ile paralel gelişebilir ve bu da intratümöral heterojeniteyi tetikleyebilmektedir (ITH). Tümör hücrelerinin bir alt kümesinde hipoksik bir mikro-ortam, nöroendokrin farklılaşmasını, epitelden mezenkime geçişi veya kanser kök hücrelerinin indüksiyonunu uyarabilir; bu süreçler tümör hücresi metastazı için artan bir eğilim ile ilişkilendirilebilir. Bu sürecin anlaşılması ile, enerji ve substrat ihtiyaçları için glikolize bağımlı olan tümör hücrelerini hedefleyen spesifik tedavi türlerini tasarlamak mümkün olabilmektedir (Waller 2016).

2.1.10 İmmün yıkımından kaçınma

Bağışıklık sistemi, premalign ve malign hücrelerin ortaya çıkmasına karşı sürekli bir nöbet tutmaktadır. Bu durum immün sürveyans teorisi olarak açıklanmaktadır. Bunun için en sık alıntılanan kanıt, kronik immünosupresyonun (örneğin, organ transplantasyonundan sonra), özellikle viral kaynaklı spesifik kanser türlerinde belirgin bir artışla ilişkili olduğu gözlemlenmektedir. Bağışıklık sisteminin aynı zamanda bağışık düzeyi yeterli hastalarda viral olmayan kanserlere karşı önemli bir engel olduğu ile ilişkili kanıtlar mevcuttur. Bu nedenle tümörlerin oluşumu; bağışıklık sisteminin,

değiştirilmiş öz-antijenleri olan tümör hücrelerini tanıma, reddetme ve yok etme başarısızlığı olarak algılanabilmektedir. Bu sürecin bir parçası olarak, daha az immünojenik kanser hücrelerinin (immüno düzenleme yoluyla) seçilmesinin ve immün sistemin immünosüpresif bileşenlerinin (örneğin düzenleyici T hücreleri ve miyeloid türevi baskılayıcı hücrelerin) bazı kanserlere aktif olarak dahil edilmesinin sonuçta tümörlerin bağışıklık denetiminden kaçmasına, bağışıklık temizliği için hedef haline gelmeden büyüüp yayılmasına izin verdiği düşünülmektedir (Mahoney vd. 2015).

Son yıllarda, normal bağışıklık tepkisinin ayrılmaz bileşenleri olan bir dizi spesifik bağışıklık kontrol noktası tanımlanmıştır. Bunlar, T hücrelerini inhibe etme ve bunların kronik olarak aktive olmalarını veya normal dokulara karşı anormal hedeflenmelerini önleme işlevi görür. Pek çok kanserin, bağışıklık tespiti veya bağışıklık ile ilgili saldırılardan kaçınmak için bu engelleyici yolları kullandığı görülmektedir. Özellikle, sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4 (CTLA4) ve programlanmış ölüm 1 (PD-1) gibi T hücreleri üzerindeki proteinlerin, birçok kanserin anti-tümör bağışıklığından kaçmasına neden olan mekanizmaların merkezinde olduğu görülmüştür. Bu proteinleri hedefleyen monoklonal antikorlarla, melanom, akciğer, göğüs, deri, mesane, böbrek ve baş ve boyun kanserli hastalarda ani anti-tümör tepkileri alınmıştır (Mahoney vd. 2015).

2.1.11 Kanserın kolaylaştırıcı özellikleri

Kanser gelişiminin temelini oluşturan iki temel kolaylaştırıcı özellik tanımlanmıştır: genomik instabilite ve enflamasyon (Yao ve Dai 2014).

Genomik instabilite, kanser hücrelerinin genetik materyallerinin bütünlüğünün kontrolünü kaybetmesi ve biyolojik davranışlarının aşamalı olarak değişerek, kanserin ayırt edici özelliklerini destekleyen mutasyonel değişiklik repertuarının artmasıyla ilgilidir. Bu sözde "mutatör fenotip", ITH'nin arkasındaki itici güç olup tümörlerin seçici baskıların etkisi altında farklı ve yakınsak evrim gösteren bir dizi farklı klonal popülasyon oluşturabileceği durumu tanımlamaktadır. Klonların seçimi, tümör mikro-ortamı içindeki intrinsik koşulları ve radyoterapi, kemoterapi, hedeflenen maddeler ve immünoterapiler dahil olmak üzere ekstrinsik anti-kanser tedavilerinin etkileri

tarafından yönlendirilmektedir. ITH, tümörlerin tedavilere karşı direnci geliştirebileceği bir mekanizma sağladığından mevcut kanser tedavilerinin en büyük zorluklarından biri olmaktadır (Yao ve Dai 2014).

Enflamasyon, premalign ve malign lezyonların, tümör büyümesini ve yayılmasını destekleyen bağışıklık sisteminin bileşenlerini toplayıp aktive ederek enflamatuvar bir durumu ortaya çıkardığı yaygın durumu tanımlamaktadır. Protein nükleer faktör kB (NFkB), enflamasyon ve kanseri birbirine bağlayan modüler merkez olarak kabul edilmiştir. NFkB tarafından düzenlenen birçok sitokin, hem enflamatuvar hem de tümör hücrelerinde çok yönlü rol oynar; bunların bazıları hücre proliferasyonunun, anjiyogenезin ve metastazın teşvik edilmesi, epitelden mezenkime geçişin güçlendirilmesi ve kansere enflamatuvar yanıtların düzenlenmesidir. Sonucunda, NFkB, tümör-ilişkili makrofajlarda ve tümör ilerlemesini sürdüren ve destekleyen senesent hücrelerde kilit rol oynamaktadır (Nenclares ve Harrington 2020, Yao ve Dai 2014).

2.2 Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri, 21. yüzyılda kansere karşı verilen mücadelede karşılaşılan en büyük engellerden biri olmaya devam etmektedir (Güngör vd. 2014). Pankreas kanserinin erken teşhisinin zorluğu, kötü prognozun ana nedenlerinden biridir. Pankreas kanseri erken evrede genellikle az sayıda semptomla geliştiği ve sigara kullanımı ile aile öyküsü dışında çok fazla bilinen ve spesifik risk faktörü bulunmadığı için, uygun taramalar gerçekleştirmek ve hastalığa erken tanı koymak oldukça zordur (Poruk vd. 2013). Bundan dolayı, tanı konan hastaların yalnızca %10 ile %20'lik bir bölümü başarılı rezeksiyon ve olası tedavi şansına sahiptir ve hastalığı rezektabl seyreden hastalarda dahi sağkalım oranı yalnızca %23'tür (Siegel vd. 2013).

Pankreas kanseri, gelişmiş ülkelerde kanser mortalitesinin önde gelen sebeplerinden bir tanesini oluşturmaktadır. Aynı zamanda dünyadaki en ölümcül neoplazmalardan biridir (Lee vd. 2014).

Pankreas kanseri en ölümcül maligniteler arasında yer almaktadır. Diğer başlıca kanser türlerinin sağkalım oranlarında kaydedilen önemli ilerlemelere rağmen, pankreas kanserinin sağkalım oranı 1960’lardan beri nispeten sabit kalmıştır. Pankreas kanseri genellikle ileri evrelerde tespit edilir ve tedavi türlerinin çoğu etkisiz kalır, bu durum da genel prognozu daha da kötüleştirir (Ansari vd. 2016).

Pankreas kanseri en yaygın görülen kanserler sıralamasında on ikinci sıradadır. Kanser mortalitesi sıralamasında ise altıncı sıradadır. Globocan 2022 verilerinde dünya çapında pankreas kanserinde 510570 tanı ve 466983 ölüm belirtilmiştir (Anonymous 2024).

2.2.1 Geçmişten günümüze pankreas kanseri

Pankreas kanserinin bilinen ilk tanımının 1761 yılında Giovanni Battista Morgagni tarafından ‘de Sedibus Et Causis Morborum Per Anatomen Indagatis Libri Quinque’ adlı kitapta yapıldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, mikroskopik inceleme olmadığı için duktal adenokarsinomun teşhisinin doğruluğu belirsizdir. Pankreas kanseri ile ilgili bir sonraki önemli gelişme ise 1858 yılında gerçekleşmiştir. Jacob Mendez Da Costa, Morgagni’nin çalışmalarını yeniden değerlendirip adenokarsinomun ilk mikroskopik teşhisini gerçekleştirerek pankreas kanserinin varlığını ortaya koymuştur. Pankreas cerrahisi oldukça yeni bir uygulamadır ve ortaya çıkmasında cerrahinin cesur öncüleri, cerrahi anestezinin gelişimi ve modern aseptik teknikler rol oynamıştır. Pankreas cerrahisinin tarihindeki bazı dönüm noktalarına da değinmek gerekir. Bilinen ilk pankreatikoduodenektomi denemesi, 1898 yılında İtalyan cerrah Alessandro Codivilla tarafından pankreas başındaki bir tümörü tedavi etmek üzere gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bu denemenin gerçekleştirildiği hasta cerrahi müdahale sonrası hayatını kaybetmiştir. Aynı yıl içerisinde, Johns Hopkins Tıp Okulu cerrahlarından William Stewart Halsted, onikiparmak bağırsağı ve pankreasın bazı bölümlerini eksize ederek ampulla kanserin ilk başarılı rezeksiyonunu gerçekleştirmiştir. İlk başarılı pankreatikoduodenektomi prosedürünün Alman cerrah Walther Carl Eduard Kausch tarafından iki aşamalı bir prosedür kapsamında gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Tek aşamada gerçekleştirilen ilk başarılı pankreatikoduodenektomi prosedürü 1914 yılında Georg Hirschel tarafından yapılmış olup, ampulla karsinomu için pankreas başının ve

onikiparmak bağırsağının rezeksiyonunu içeren iki aşamalı bir prosedürün sonuçları Amerikan Cerrahi Birliği'nin 1935 yılında düzenlenen yıllık toplantısında Allen Oldfather Whipple tarafından sunulmuştur, bu olay pankreas cerrahisine olan ilgiyi arttırmıştır. Prosedürün tek aşamalı hale gelmesiyle birlikte Whipple, kariyeri boyunca otuz yedi pankreatikoduodenektomi prosedürü gerçekleştirmiştir ve günümüzde hala adını taşıyan bu işlemin yaygınlaşmasını sağladığı düşünülmektedir. Pankreas adenokarsinomu için ilk başarılı pankreatikoduodenektomi prosedürü 1937 yılında Alexander Brunschwig tarafından gerçekleştirilmiştir (Ansari vd. 2016). Günümüzde yüksek kapasiteli hastanelerde yoğunlaşan tecrübeyle birlikte, pankreas cerrahisi %3'ün altında operatif mortalite oranına sahip, güvenli bir prosedür haline gelmiştir (Ansari vd. 2014, Balzano vd. 2008, Yoshioka vd. 2014).

Dünyanın geri kalanında olduğu gibi, pankreas kanserinin beş yıllık sağkalım oranları 1960'lardan beri durgun olarak seyretmektedir (Ansari vd. 2016).

2.2.2 Risk faktörleri

Pankreas kanseri etiyolojisi literatürde uzun süredir kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Literatürün konu dahilindeki araştırma süresince birkaç risk faktörü tanımlanmıştır. Bu risk faktörlerini değiştirebilir ve değiştiremez risk faktörleri olarak iki kategoride gruplandırmak mümkündür (Ungkulpasvich vd. 2023).

Değiştirilebilir risk faktörleri

Değiştirilebilir risk faktörleri, sigara, alkol, obezite, beslenme faktörleri, ve zehirli maddelere maruz kalmadan oluşmaktadır (Mcguigan vd. 2018).

Sigara: Dünya çapında bir milyardan fazla insan tütün kullanmaktadır ve bu sebeple sigara kullanımı dünyadaki pankreas kanserlerinin en önemli çevresel etkenlerimden biridir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Kuruluşu, sigara kullanımının pankreas kanseri ile neden-sonuç ölçeğinde bir ilişkisi olduğunu onaylamıştır. Pankreas kanseri riski, sigarayı kullanma süresi ve günlük tüketilen sigara miktarı ile artmaktadır. Sigara kullananlar için bu risk, kullanmayanlara oranla iki kat daha fazladır; buna ek olarak

yakın zamanda gerçekleştirilen seksen iki adet çalışma verilerinin ortak çözümlenmesi; şu an sigara kullanan kişiler için bağıl risk faktörünün 1.74 olduğu, sigara kullanıp bırakmış kişilerde ise risk faktörünün 1.2 olduğu ve de sigara kullanımı bırakıldıktan en az 10 yıl sonra da bu risk faktörünün korunduğu sonucuna varmaktadır (Iodice vd. 2008, Mcguigan vd. 2018).

Alkol: Literatürdeki bir çok çalışma baz alındığında, yüksek alkol tüketimi ile (günde üç kadehten fazla) pankreas kanseri riskinin arttığı şüphesizdir. Bunun yanı sıra, çalışmalarda, düşük miktarda alkol alımına dair bir herhangi bir ilişkinin varlığı yer almamaktadır (Mcguigan vd. 2018).

Obezite: Obezite, pankreas kanseri de dahil olmak üzere birkaç kanser çeşidi üzerinde riski arttırıcı faktör konumundadır. Bazı çalışmalarda; obezitenin pankreas kanseri insidansını ve mortalitesini arttırdığı da kanıtlanmıştır (Liv d. 2018, Xu vd. 2018).

Beslenme faktörleri: Beslenme faktörleri, pankreas kanseri de dahil olmak üzere farklı kanser türleri ve çeşitli sindirim hastalıklarını etkilemektedir. Mevcut etkinin pankreas kanseri üzerindeki yüzdesi %30-50 düzleminde olduğu görülmektedir. Hatta diğerleri koruyucu olsa bile, belirli spesifik gıdaların tüketimi ile risk artışı ile doğrudan ilişkili olduğu çalışmalarda kanıtlanmaktadır (Ungkulpasvich vd. 2023, Mcguigan vd. 2018).

Değiştirilemez risk faktörleri

Değiştirilemez risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, diabetes mellitus, ailedeki pankreas kanseri öyküsü, genetik faktörler, kronik enfeksiyonlar, 0 olmayan kan grubu ve kronik pankreatit bulunmaktadır (Mcguigan vd. 2018).

Cinsiyet: Pankreas kanseri erkeklerde kadınlara kıyas ile daha yaygındır. Küresel olarak pankreas kanseri insidansı erkekler için 100.000'de 5.5 ve kadınlar için 100.000'de 4.0'dır. Bu değişimdeki farkın gelişme ekseninde üst sıralarda olan ülkelerde daha fazla olduğu görülmektedir (Mcguigan vd. 2018).

Genetik Faktörler: Genetik varyasyon veya mutasyon (Germ hattı mutasyonu), pankreas kanseri riskinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır. Pankreas kanseri olan hastaların yaklaşık % 10'unda gen varyasyonları veya hastalığın gelişimindeki değişiklikler gibi bazı genetik yatkınlıkların varlığı söz konusudur. Pankreas kanseri riskinde artışta özel bir rolü olan kalıtsal genetik mutasyonlardaki dört ana gen, Kras, p53 ve SMAD4'ü içermektedir (Ungkulpasvich vd. 2023).

Enfeksiyon: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ile gastrik kolonizasyon, aynı zamanda,% 4-25'lik tahmini bir popülasyona bağlı fraksiyon ile daha büyük pankreas kanseri riski ile ilişkilidir (Mcguigan vd. 2018, El-Serag vd. 2009) .

Yaş: Pankreas kanseri çoğunlukla yaşlılarda görülmektedir. Hastalığa otuz yaşından genç bireylerde nadiren rastlanırken, yeni tanı koyulan hastaların %90'ı elli beş yaş ve üstüdür ve bu bireylerin çoğu yetmişlerinde veya seksenlerindedir. Hastalığın görülme oranının zirve yaptığı yaş ülkeden ülkeye değişmektedir. Örneğin, Hindistan'da bu oran atmışlı yaşlarda zirve yaparken ABD'de ise yetmişli yaşlarda zirve yapmaktadır (Midha vd. 2016, Wood vd. 2006) .

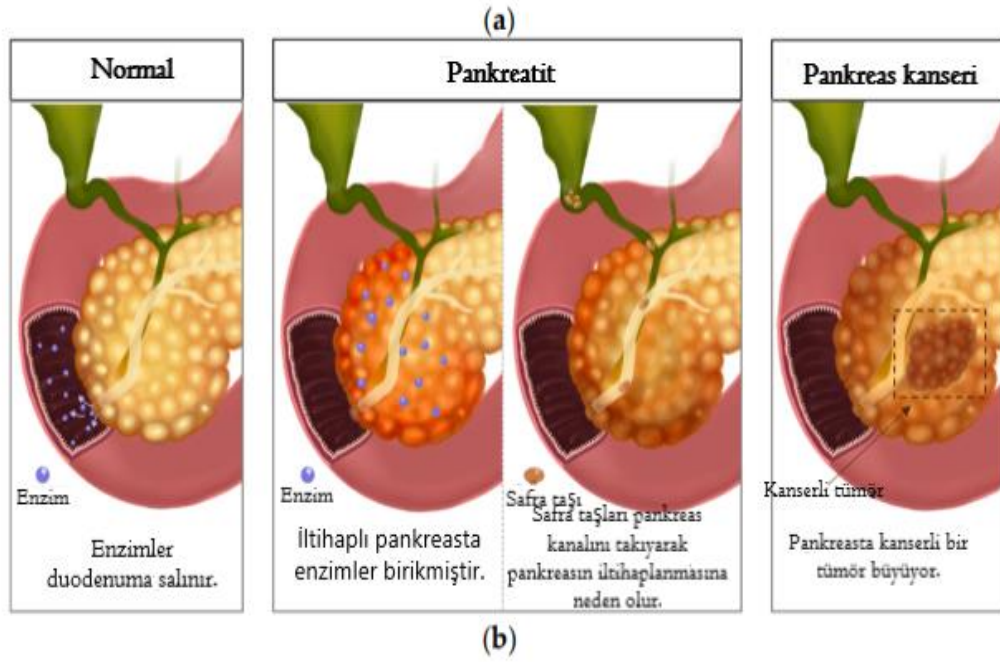
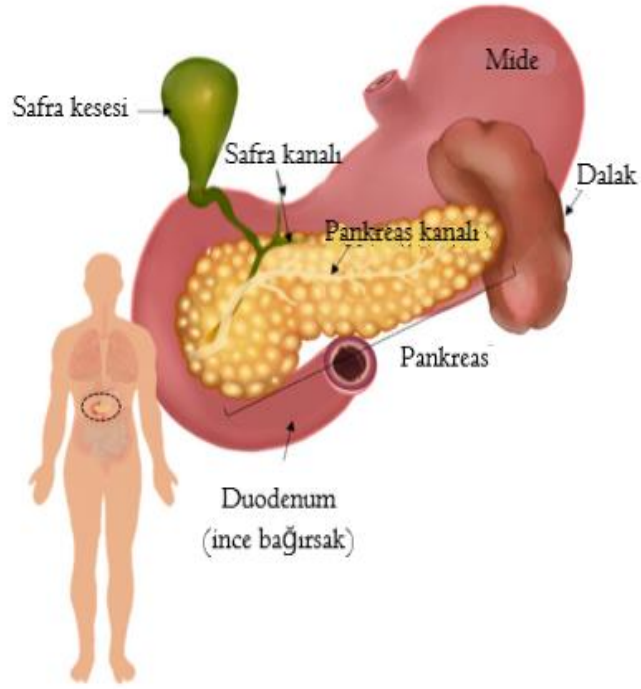
Aile Öyküsü: Pankreas kanseri, eğer iki veya daha fazla sayıda birinci derece akrabada tespit edilmişse kalıtsal olarak değerlendirilir ve bu durum yeni vakaların %5-10'luk oranını oluşturmaktadır (Hruban vd. 2010). Kalıtsal risk faktörlerine sahip olan hastaların pankreas kanserine yakalanma riski aile öyküsü olmayan hastalara oranla dokuz kat daha fazla olup, eğer üç veya daha fazla sayıda birinci derece akrabaya tanı koyulmuşsa bu risk otuz iki kat daha artmaktadır (Becker vd. 2014). Dokuz çalışmadan oluşan bir metaanalizde, ailesinde yalnızca tek bir birinci derece akrabada pankreas kanseri öyküsü bulunan bireylerin dahi pankreatik adenokarsinoma yakalanma riskinin aile öyküsü bulunmayan bireylere oranla %80 arttığı rapor edilmiştir. Bu durum, tanı koyulan hastalardan oluşan alt grubun kuvvetli bir genetik yatkınlığa sahip olduğuna işaret etmektedir (Permuth-Wey ve Egan 2009, Mcguigan vd. 2018).

Diyabet: Diyabet, pankreas kanserinin bilinen bir risk faktörüdür. Stevens vd. tarafından gerçekleştirilen metaanalizde, tip 1 diyabet hastalarının pankreas kanserine yakalanma

riskinin diyabeti olmayan bireylere kıyasla iki kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Steven vd. 2007).

2.2.3 Pankreas kanseri histopatofizyolojisi

Klinik, anatomik ve moleküler patoloji, araştırma ve tıp arasında bir köprü görevi görmektedir. Pankreastaki tümörler çoğunlukla ekzokrindir ve bunlardan bazıları adenoskuamöz karsinom, kolloid karsinom, asinar hücreli karsinom, taşlı yüzük hücreli karsinomu, pankreatoblastom, kistadenokarsinom ve hepatoid karsinomdur. Pankreasta yaygın olarak görülen malign tümör duktal adenokarsinomdur; glandüler bir yapı ile karakterizedir ve pankreas kanseri olarak da adlandırılır. Klinik olarak, karsinom pankreasın başında, nadiren de organın gövde ve kuyruk kısmında ortaya çıkmaktadır. Spesifik olmayan semptomları var olup bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir. Pankreasın baş kısmında (% 75) meydana gelen pankreas kanseri, pankreatit ve tıkanma sarılığı olan hastalarda yaygın olarak görülmektedir. Bu kanser, koledok kanalında tıkanıklığa neden olarak bulantı, kusma, kaşıntı, koyu idrar ve açık renkli dışkı gibi semptomlarla birlikte sarılık ile sonuçlanır. Pankreasın gövde (% 15) ve kuyruk kısmındaki (% 10) karsinom daha geç teşhis edilir. Sırtın yanlarına doğru uzanan karın ağrısı gibi semptomlarla daha kötü bir prognoza sahiptir (Ghaneh vd. 2007, Dariya vd. 2019). Ağrı yoğunluğunun, bağışıklık ve enflamatuar hücreler ile ilişkili olduğu ve perinökleer invazyona yol açtığı bildirilmektedir. Pankreas kanserinin ilerlemesi, hücre döngüsünün deregülasyonu ile sırasıyla onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu ve deaktivasyonunu içeren aşamalı bir süreçtir. Genetiğin ve moleküler biyolojinin bilim camiasında daha iyi anlaşılması, kanserin prekürsör lezyonları ve bunların sınıflandırılmaları belirlenerek elde edilebilmektedir. Bu, erken teşhisi destekleyecek ileri araştırma çalışmalarının önünü açabilmektedir. 2003 yılında geliştirilen ilk transgenik fare modeli, metastatik kanserde düşük dereceli prekürsör lezyonları tanımlanmış ve ilaç testi alanında gerekli olan hücresel etkileşimler ve pankreas kanserinin başlatılmasında ve geliştirilmesinde yer alan moleküler mekanizmalar hakkında daha fazla bilgi elde edilmesini sağlamıştır (Hingorani vd. 2003, Dariya vd. 2019).



Şekil 2.1 Pankreas çizimi. a)Pankreasın insan vücudundaki yeri b)Normal pankreas, pankreatit ve pankreas kanserinin karşılaştırılması (Ungkulpasvich vd. 2023)

Biyoloji, morfoloji ve klinik davranış olarak; pankreas neoplazisi, farklı öncü lezyonlara sahip üç neoplaziye ayrılmaktadır.

İntradüktal papiller müsinöz neoplazm: Bunlar, kökenlerine ve histolojik alt tiplerine

göre malignite geliştirme potansiyellerinde farklılık gösteren kistik neoplazmlardır. Pankreasın baş kısmında ortaya çıkmakta olup ana pankreatik kanallarına doğru ilerlemektedirler. Ana dalları müsin (MUC) üreten neoplastik hücrelerdir. Doku kesitlerinde dalların genişlediği ve müsinin koledok içine doğru düzensiz dolduğu gözlenmektedir. Mikroskopik sonuçlarından, büyüklüklerinin papiller oluşum uzunluğunda birkaç santimetre olduğu gözlenmektedir. IPMN lezyonunda gözlenen mutasyonlar, erken evrelerde tespit edilen Kras (kodon 12 veya 13'te mutasyon) ve guanin nükleotit bağlayıcı proteinden (GNAS1), Kras mutasyonları, düşük dereceli gastrik tip IPMN ve GNAS1 olarak, bir kolloid tipinde invaziv karsinoma dönüşen bağırsak tipi yüksek dereceli lezyonlar olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, TP53'teki mutasyonlar, IPMN'nin sonraki aşamalarında da tespit edilmekte olup CDMN2A ve SMAD4'e ek olarak invaziv kansere yol açmaktadır (Ideno vd. 2013, Dariya vd. 2019).

Müsinöz kistik neoplazm: Bu tür kistler, kalın MUC ve hemorajik materyalden oluşan, natif pankreatik duktal sistemle hiçbir iletişimi olmayan ayrı bir neoplazm olarak bulunmaktadır. Milimetreden birkaç santimetreye kadar değişen boyutlara sahip, ünilocüler veya multilocüler epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Yumurtalık tipi stroma ile ilişkilidir ve sırasıyla düşük (sitolojik atipi, mitozsuz), orta (papiller projeksiyon) ve yüksek dereceli (karışık dallanma ve polarite kaybı) displazisi olan iyi huylu, sınırdan ve malign olarak ayrılabilirler. Kodon 12'deki Kras genindeki nokta mutasyonları dahil olmak üzere, genetik değişiklikler erken tespit edilmekte ve SMAD4 dahil tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar daha sonraki aşamalarında da gözlenmektedir. Ayrıca, TP53 ve CDKN2'deki mutasyonlar invaziv hastalık ile ilişkili olduğu gözlenmektedir. IPMN ve MCN lezyonlarının yüksek moleküler ağırlıklı glikoprotein MUC2 ifade ettiği öne sürülmüştür (Maitra ve Leach 2012, Dariya vd. 2019).

Pankreatik intraepitelyal neoplazi: Longnecker ve Klimstra, pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) lezyonlarının, noninvaziv lezyonlar olarak tanımlanan pankreas kanserinin iyi karakterize premalign öncüleri olduğunu ileri sürmüştür. Boyutları 5 mm'den daha ufaktır ve küçük çaplı pankreatik kanallardan başlarlar; histolojik olarak PanIN-1 (PanIN-1A / PanIN-1B), PanIN-2 ve PanIN-3 lezyonlarından yapısal ve sitoplazmik atipi olarak farklılık göstermektedirler. Bu lezyonların erken evrede

ekspresyonları ile pankreas kanserini geliştirdikleri bildirilmektedir. Bu lezyonlar için ekzokrin progenitör hücreler, insülin üreten hücreler ve yetişkin akiner hücreleri de hedeflenebilir (Maitra ve Leach 2012, Dariya vd. 2019). PanIN-1 (PanIN-1A / PanIN-1B), epitelyumdan kaynaklanan lezyonlardır ve MUC üreten tek tip çekirdeklere sahip yassı, uzun, kolumnar papiller hücreler olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlar düşük dereceli lezyonlardır ve Kras mutasyonu buradan başlayarak aktive olmaktadır. Ek olarak, Kras nükleer atipi, nükleusta polarite kaybı, psödostratifikasyon ve nükleusta hiperkromasi de dahil olmak üzere, çekirdeğinde anormallikleri olan çok sayıda papiller hücreye sahip PanIN-2 lezyonlarında bile tespit edilmektedir. Lezyon, genellikle G1 fazında hücre döngüsünün durdurulmasında rol oynayan, CDK4 / 6 ve p16 proteinlerini kodlayan CDKN2A / p16INK4A dahil tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu göstermektedir. Ayrıca, bu proteinlerin inaktivasyonu nedeniyle, pankreas kanserinde apoptoz inhibe edilmektedir (Zamboni vd. 2013, Dariya vd. 2019). Epitelyal hücreleri olan "yerinde karsinom" olarak adlandırılan PanIN-3 lezyonları, yüksek oranda mitoz ve nükleer polimorfizme sahip kümeler olarak görünürler. Böylece sonunda invaziv olmayan lümeneye ayrılmakta ve girmektedirler. SMAD4, TP53, BRCA2 ve DPC4'teki çeşitli mutasyonlar, PanIN-3'ten adenokarsinoma ilerlemeyi teşvik etmektedir. PanIN, IPMN ve MCN'nin, sentro-asiner-asiner kompartmanından karsinomaya geçişe aracılık ettiği, oradan da metaplaziedisplazi sekansı boyunca taşınmasına neden olduğu hipotezine ek olarak, alternatif bir model, tümörün atipik yassı lezyon/asinar duktal karsinogenez boyunca ilerlemesini içermektedir. Bu model, pankreas kanseri için öncül lezyonlar olarak da kabul edilen PanIN içermemektedir (Aichler vd. 2012, Esposito vd. 2012). Morfolojik olarak, genişlemiş bir çekirdeği ve yüksek mitotik oranı ile belirgin nükleoller olan yassı veya küboidal epitel hücrelerine benzerler. Hipermetilasyon veya gen kaybı nedeniyle p16 / CDKN2A'da değiştirilmiş ekspresyona sahiptirler. Bununla birlikte, moleküler görünümleri ve genetik noktaları belirlemek için daha fazla karakterizasyon gereklidir, çünkü bu, pankreas kanseri'ni erken aşamada tespit edilebilmesi için yeni bir biyobelirteç olabilir. Amerikan Kanser Tümörü-Düğüm-Metastaz Sınıflandırması Ortak Komitesi tarafından hazırlanan pankreas kanserinin doku tanısı ve patolojik evrelendirilmesi, gelişen tümörün rezektabilitesini çok dedektörlü bilgisayarlı tomografi (BT) ile değerlendirilmektedir. Ek olarak, biyopsi muayenesi için histopatolojik ve sitolojik örneklerine dayanılarak rezektabl olmayan

pankreas kanseri için sınıflandırılan birkaç vaka daha gereklidir. Ayrıca, pankreatik, biliyer ve retroperitoneal marjlar dahil mikroskopik marjinal rezeksiyon faktörleri pankreas kanserindeki kötü prognozun üstesinden gelebilmesi için faydalıdır. Pankreas kanseri prognozunu belirlemek için kullanılan gelişmiş teknikler arasında noninvaziv evreleme için kontrastlı çok kesitli BT taraması, doku tanısı için endoskopik ultrasonografi kılavuzluğunda ince iğne aspirasyonu, endoskopik stentleme sırasında yapılan fırça sitolojisi için endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi ve metastatik ve vasküler tutulumu belirlemek için laparoskopi yapılmaktadır (Dariya vd. 2019).

2.2.4 Pankreas kanseri biyolojisi

Pankreas kanserinin biyolojisi, genetik ve epigenetik değişiklikler ve moleküler aşırı ekspresyonu içeren çalışmalardan kolayca anlaşılabilir. Pankreas kanseri, çoğunlukla pankreatik ekzokrin kanseri veya pankreatik adenokarsinom olarak da bilinen pankreatik kanalları kaplayan epitel hücrelerinden gelişen genetik bir hastalıktır. Bu hücreler sindirim enzimleri üretmektedir. Nadiren, pankreas kanseri, vücuttaki kan şekeri seviyelerini kontrol etmede rol oynayan, insülin ve kan akışına salınan glukagon gibi hormonlar üreten Langerhans adacıkları adı verilen pankreasın endokrin hücrelerinden de gelişebilmektedir. Bu tip kansere pankreas endokrin kanseri denir. Alvin ve ark. (Makohon- Moore ve Iacobuzio-Donahue 2016) çalışmalarında pankreas kanserini evrimsel terimlerle tarif etmiş ve üç aşamada sınıflandırmıştır; (1) çevresel maruziyet ve klonal genişlemeden kaynaklanan gen mutasyonunun neden olduğu normal hücrelerin uyarılması ve mutasyona uğramış hücrelerin bölünmeye devam etmesi; (2) klonal bir nüfusun oluşturulması; (3) tümör hücrelerinin taban zarını kırarak çevreleyen stromaya geçtiği yabancı bir mikro-çevreye sokulması. Çok basamaklı pankreas kanseri, gen mutasyonu kaynaklı pankreatik intraepitelyal neoplaziden (PanIN-IA, IB, II ve III) başlamakta ve nihayetinde invaziv neoplastik lezyonlara dönüşmektedir. PanIN'ler pankreas kanserinin histolojik öncüleridir ve çekirdeğin belirginleşmesi, çekirdekte kutuplaşma kaybı, hiperkromatin ve psödostratifikasyon ile karakterizedir (Hruban vd. 2008). İlerleme, PanIN-IA ve B dahil displastik epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır. PanIN-II ve -III dahil displazi hücrelerine dönüşmektedir. Son olarak da Kras gibi onkogenlerdeki mutasyonlar, CDKN2A, TP53

ve SMAD4 gibi tümör baskılayıcı genler ile karakterize invaziv karsinom olarak gelişmektedir. Bir şekilde, pankreas kanseri epigenetik modülasyonlardan, çocuklukta başlayan ve nihayetinde yetişkinlerde kronik hale gelen sindirim enzimlerinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Pankreas kanserinin istatistiksel analizi, hastalığın başlamasının hücre bölünmesi ve zamanı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bunu, DNA replikasyonu (ailesel mutasyon) ile ilişkili içsel faktörlerle karşılaştırıldığında, radyasyon ve kanserojenler dahil dışsal faktörlerin kanserden büyük ölçüde sorumlu olduğunu doğrulayan bilimsel bir tartışma göstermiştir (Tomasetti ve Vogelstein 2015, Dariya vd. 2019). Wu ve ark. (Wu vd. 2016) mutasyonun pankreas kanserine neden olduğu ve bunların % 50'si iç faktörlerden kaynaklandığını kabul etmiştir. Ailesinde Pankreas kanseri hikayesi olan 593 hastanın genom dizilimi, ailesel pankreas kanserinin polijenik olduğunu ve riskin, bir veya daha fazla varyant germ hattı olan bir akraba ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Genellikle artan pankreas kanseri riski ile ilişkili germ hattı varyantları, DNA onarım mekanizmalarında yer alan BRCA1, BRCA2 ve mutasyonlu ataksi telanjiektazidir (Makohon-Moore vd. 2016, Dariya vd. 2019). DNA onarım genleri, tümör bastırma genleri ve bekçi genleri dahil olmak üzere, bakıcı genlerdeki mutasyonlar hücre bölünmesini artırıyor ve gen mutasyonunu hızlandırarak somatik ve genetik değişikliklere yol açabilmektedir. Bu genlerdeki genetik değişiklikler, hücre büyümesi, hücre bölünmesi, apoptoz ve migrasyon dahil moleküler mekanizmaların kararsızlığına yol açmaktadır (Dariya vd. 2019).

2.3 Kanser Genetik Temeli

Kanser hücreleri, kontrolsüz proliferasyon, antiproliferatif sinyallere karşı duyarsızlık, ölümsüzlük, artmış anjiyogenez, hücre ölümü direnci, anöploidi, metastatik potansiyel ve artmış aerobik glikoliz gibi metabolik anormallikler gibi farklı biyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile normal hücrelerden farklı olmaktadır. "Kanserli büyümenin başlaması, sürdürülmesi ve ilerlemesinin neoplastik hücrede genetik değişikliklere dayanır" kavramı, tümörjenezde baskın onkogenik belirleyiciler olarak hareket etme potansiyeline sahip genlerin (onkogenler) ve bir hücreyi habis büyümeden koruyan genlerin (tümör baskılayıcı genler) keşfiyle ikna edici bir destek almıştır. Tümör baskılayıcı genlerin mutant alelleri genellikle resesiftir ve tümörjenezin başlaması,

ikinci alelin de fonksiyonel etkisizleştirilmesiyle meydana gelen heterozigotluk kaybını gerektirmektedir. Onkogenler ilk keşfedildiğinde, hayvanlarda hızlı tümör oluşumunu ve doku kültüründe hayvan hücrelerinin morfolojik dönüşümünü indükleyen yüksek oranda onkogenik retrovirüslerin RNA genomlarında onkogenik belirleyiciler olarak bilinmekteydi. Retroviral onkogenler, yüksek oranda metazoan evrim içinde korunan, hücre büyümesi ve gelişiminde temel fizyolojik fonksiyonları yerine getiren normal hücresel genlerin (c-onc; protoonkogen) transdüksiyonlu mutant allellerini (v-onc) temsil etmektedir. Retrovirüslerin hücre kaynaklı onkogenlerinin aksine, DNA tümör virüslerinin onkogenleri gerçek viral genlerdir (Hartl ve Bister 2001).

2.4 Onkogenler

Normal hücreler, onkogenik dönüşüm olarak bilinen karmaşık bir süreç ile kanserli hale gelmektedir. Bu dönüşüm, normal fizyolojik fonksiyonları bozulan onkogenlerin, tümör baskılayıcıların veya mikroRNA'ların değiştirilmiş ekspresyonu tarafından başlatılmaktadır (Macheret ve Halazonetis 2015, Kotsantis vd. 2018). Bir proto-onkogen, bozulmamış koşullar altında genellikle hücre büyümesi, farklılaşması veya apoptozla ilgili bir proteini kodlayan bir genidir. Nokta mutasyonu, kromozomal translokasyon veya kopya sayısı amplifikasyonu yoluyla proto-onkogen ekspresyonu yanlış olarak düzenlenir ve bu da onkogeni aktive etmektedir. Onkogenler, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, sinyal dönüştürücüler, kromatin remodelleyicileri ve apoptoz düzenleyicileri olarak sınıflandırılan onkoproteinlere dönüşmektedir. Bu nedenle, onkogen aktivasyonu, sonuçta GIN'i harekete geçiren hücre döngüsünü, metabolizmayı, replikasyon zamanlamasını veya transkripsiyonu düzensizleştirerek genomda büyük değişikliklere neden olabilmektedir (Kotsantis vd. 2018).

Kanserde GIN'in indüklendiği ana mekanizmalar arasında DNA onarım kusurları, artan replikasyon stresi ve telomerik disfonksiyon bulunmaktadır. Kalıtsal kanserlerde, GIN genellikle DNA hasar onarımında rol oynayan genlerdeki germ hattı mutasyonlarına atfedilmektedir. Bu mutasyonlar, GIN'e yol açan onarılmamış veya yanlış onarılmış DNA'ya yol açmaktadır (Negrini vd. 2010). Bazı onkogenler de benzer bir DNA onarım

kusuruna neden olabilmektedir. Özellikle, onkogenik Ras ve BRAF'ın aşırı ekspresyonu, BRCA1'in kromatinden ayrılmasına neden olur, bu da DSB onarımını tehlikeye atarak DNA hasarına ve senesansa yol açmaktadır. Dahası, yabani tip Hras ve Nras, onkogenik Kras'ın tümörjenik aktivitesini desteklemek için DDR'yi modüle etmektedir (Grabocka vd. 2014, Kotsantis vd. 2018).

Onkogenler ayrıca DNA replikasyon kusurlarına ve yetersiz replike DNA'ya neden olabilir, bu da mutasyon ve GIN birikmesine yol açmaktadır. RS, çeşitli biçimlerde kendini gösterir; en bariz olanı, genomun tam kopyalanmasını önleyebilecek, “bozulmuş çatal uzatma oranları ve/veya yüksek çatal durmasıdır”. Bu tür bölgeler 53BP1 ile işaretlenmiştir ve genellikle MUS81-EME1 veya XPF-ERCC1 tarafından kırılmaya daha duyarlı olan CFS'lere karşılık gelir (Lukas vd. 2011, Kotsantis vd. 2018). CFS'ler yoluyla replikasyon, kısmen bu bölgelerdeki dormant orjinlerin yokluğu veya anormal aktivasyonu nedeniyle hafif RS ile şiddetlenir (Ozeri- Galai Vd. 2011, Kotsantis vd. 2018). Mitozda kromozomal ayrışma sırasında, yetersiz çoğaltılmış bölgeler genellikle ekstremiteleriyle ilişkili FANCD2 ile PICH, BLM ve RPA tarafından bağlanan ultra ince anafaz DNA köprüleri (UFB'ler) olarak bulunur. Çözümlememiş UFB'ler, kromozom kırılmasına ve/veya yanlış ayrışmaya yol açarak yavru hücrelerde mikronüklei oluşumuna neden olabilmektedir (Chan vd. 2009, Kotsantis vd. 2018).

Son olarak, telomerik disfonksiyon da GIN'e yol açabilir. Telomerler, kromozom uçlarını deleteriyöz proseslerden ve/veya planlanmamış DNA onarımını sürdüren ve koruyan repetitif sekanslardan oluşur. Her hücre döngüsünde telomer tekrarları, "son-replikasyon problemi", oksidatif hasar ve onkogenik aktivasyonla ilişkili RS nedeniyle aşamalı olarak kısalmaktadır. Telomerik disfonksiyon, kromotripsis ve kataegis olarak bilinen ve kanserde GIN'i başlatan yavaş kromozomal parçalanma ve düzenleştirme ile bağlantılıdır (Maciejowski vd. 2015, Kotsantis vd. 2018). Telomerik erozyon, kromozom uçlarında da novo telomerik tekrarları sentezleyen telomeraz ekspresyonu ile dengelenmektedir. HPV 16E6/E7 ile indüklenen anafaz köprülerinin (Plug- DeMaggio vd. 2004, Kotsantis vd. 2018) ve onkogen kaynaklı senesansın (Patel vd. 2016, Kotsantis vd. 2018) telomeraz aktivitesi aktivasyonu ile iyileştirildiği raporları, telomerik bütünlük ve GIN arasındaki bağlantıyı vurgulamaktadır. Ek olarak, Hras, telomerik

çatallanmanın durmasına, telomerik kırılabilirliğe ve telomer tekrarlarının durmasına neden olur (Suram vd. 2012). Bu nedenle, telomerik erozyon, onkogen kaynaklı telomerik replikasyon stresine bağlanabilir, ancak aynı zamanda onkogen kaynaklı telomerase deregülasyonuna da atfedilebilir (Kotsantis vd. 2018).

Apoptoz ve senesans, RS ve/veya GIN ile birlikte ortaya çıkan hücreleri ortadan kaldıran veya durduran koruyucu mekanizmalar olarak işlev görmektedir. Bu kanser koruma bariyeri, tek başına onkogenlerin ekspresyonunun, genetik olaylarla, ve en önemlisi de diğer onkogenlerin ek ekspresyonu veya tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu ile birleştirilmedikçe onkogenik dönüşüme yol açmadığı gerçeğiyle doğrulandığı üzere oldukça güçlüdür (Gonzalez vd. 2006, Kotsantis vd. 2018). Onkogen kaynaklı senesans, tümör baskılayıcı p53'ün ve onun pozitif regülatörü p14 p19'un (ARF) etkilerine atfedilir. ARF, normalde p53 degradasyonundan sorumlu olan ubiquitin ligaz MDM2'yi inhibe eder ve böylece p53 seviyelerini stabilize etmektedir. Diğer onkogenler arasında p53; RAS, c-MYC, E1A ve STAT5A'nın aşırı ekspresyonuna doğrudan ARF veya RS ile indüklenen ATM aktivasyonuna yanıt olarak aktive edilir. Ek olarak, RAS, MYC, E2F1, β -CATENIN ve adenovirüs E1A onkogenlerinin ARF'yi yukarı doğru regüle ettiği gösterilmiştir; c-MYC ise bunun ubiquitilasyonunu ve ardından ULF ubiquitin ligaz tarafından bozunmasını inhibe ederek ARF stabilizasyonuna neden olmaktadır (Konsantis vd. 2018).

2.4.1 Onkogenlerin kökeni ve aktivasyonu

İlk onkogen, yüksek oranda onkogenik olan bir tavuk retrovirüsü olan Rous sarkoma virüsünün (RSV) RNA genomunun biyokimyasal ve genetik analizlerine öncülük ederek 1970 yılında tanımlanmıştır. RSV genomunun dönüştürülmeyen (dönüşüm-defektif) türevleriyle karşılaştırılması, RSV'nin retroviral replikasyon için gerekli olan genler ve kontrol elemanlarından başka genetik bilgi içerdiğini ortaya çıkarmıştır. SRC (sarkoma için) olarak adlandırılan bu ek gen, tartışmasız bir şekilde RSV'nin dönüştürme prensibi olarak tanımlanmıştır. Src'nin kökeninin araştırılması çığır açan bir keşfe yol açmıştır; viral onkogen (v-src) normal bir hücresel genden, yani c-src proto-onkogenden, retroviral yaşam döngüsü sırasında retroviral transdüksiyonla, yani virüs ve konak hücre

arasındaki rekombinasyonuyla türetilmektedir. RSV'nin dönüştürme prensibi üzerine ufuk açıcı bir çalışma ışığında, src ile ilgisi olmayan hücre kaynaklı onkogenler, kuşların ve memelilerin diğer yüksek oranda onkogenik retrovirüslerinin genomlarında tanımlanmıştır (Hartl ve Bister 2013, Bister 2015, Simatou vd. 2020).

Her şekilde, hücrel onkogenlerin retroviral transdüksiyonu, c-onc genlerinin sadece kısmi tamamlayıcılarının retroviral genom içine dahil edilmesine yol açmaktadır. Özellikle, terminal transkripsiyonel kontrol bölgeleri her zaman çıkarılır ve yerine retroviral kontrol elemanları getirilir. Hücrel onkogenler, tümör hücresi DNA'sındaki genetik değişiklikler üzerinde yapılan doğrudan deneysel araştırmalar yoluyla retroviral transdüksiyondan bağımsız olarak ayrıca keşfedilmiştir. Bu genetik değişiklikler arasında kodlama bölgesi içinde fonksiyonel olarak ilişkili mutasyonlar, insersiyonel mutageneziyle transkripsiyonel aktivasyon, kromozomal translokasyon ve gen amplifikasyonu bulunmaktadır (Hartl ve Bister 2013, Bister 2015, Simatou vd. 2020).

Tümör hücresi DNA'sındaki somatik mutasyonlardan veya yeniden düzenlemelerden etkilendiği keşfedilen birkaç genin, bağımsız olarak izole edilmiş retroviral onkogenlerin c-onc allelleri olduğu kanıtlanmıştır. Retroviral transdüksiyonla veya hücrel mutasyon durumlarıyla tanımlanan onkogen grupları arasındaki örtüşmeler, onkogenik potansiyele sahip hücrel genlerin sayısının sınırlı olduğu fikrini desteklemektedir. Normal hücrel protoonkogenleri aktif onkogenlere dönüştüren tüm mutasyon durumları, bu moleküler etkilerden birine veya daha fazlasına yol açar: (1) artmış mRNA sentezi veya gen amplifikasyonu nedeniyle protein ekspresyonunda bir artış, (2) artmış mutasyonlar (enzimatik) aktivite ve/veya negatif regülasyon kaybı ve (3) artmış protein ekspresyonuna ve/veya onkogenik özelliklere sahip bir füzyon proteininin oluşumuna neden olan kromozomal translokasyondur (Hartl ve Bister 2013, Bister 2015, Simatou vd. 2020).

2.4.2 Onkogen protein ürünlerinin fonksiyonu

Onkogenlerin protein ürünleri; büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, GTPazlar, protein kinazlar veya transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere sinyal iletim

yollarının bileşenlerini temsil etmektedir. Onkoproteinlerin düzensiz ekspresyonu veya yapısal modifikasyonları ile gerçekleşen onkogenik aktivasyon, mitojenik sinyallemenin, hücre transformasyonunun ve tümörijenizin konstitütif aktivasyonuna yol açabilmektedir. Prototip onkogenlerin bazıları, neredeyse tüm ana hücresel süreçler üzerinde çok geniş pleiotropik etkilere sahiptir. Örneğin, c-myc proto-onkogeninin protein ürünü (Myc), transkripsiyonel aktivasyon ya da represyon yoluyla, tüm insan genlerinin muhtemelen %15'inin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyonel düzenleyici ağı merkezini oluşturmaktadır. Myc, büyüme kontrolü, metabolizma, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Myc proteininin artan seviyelerine yol açan c-myc deregülasyonu, tüm insan kanserlerinin yaklaşık %30'unda meydana gelen, insan tümörigenezinde sık görülen bir mutasyondur. Son dönemlerde, artan aerobik glikoliz (Warburg etkisi) dahil olmak üzere, genomik dengesizlik veya enerji metabolizmasının yeniden programlanması gibi kanser hücrelerinin karmaşık özellikleri de onkogenik Myc fonksiyonuna atfedilmiştir (Heart ve Bister, 2013, Ahmadi vd. 2021).

2.4.3 Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve insan kanseri

Yirminci yüzyılın ilk yarısında, kanserin başlıca nedenleri olarak tanımlanan genlerin mutasyonlarına kanıt sağlamak için iki paralel araştırma yaklaşımı ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri, tavuklarda ve kemirgenlerde hızlı kanser oluşumuna neden olan hayvan virüslerinin (retrovirüsler) tanımlanmasıdır, diğeri ise kanser oluşumunu teşvik edecek olan inselüler genlerin mutasyonlarına neden olan kimyasal bileşiklerin (kanserojenler) keşfidir. 1970'lerde, tümör oluşturan retrovirüslerin normal hücresel genlerden (proto-onkogenler) türetilen mutasyona uğramış genler (onkogenler) taşıdığı (Bishop 1983, 1985) ve insan kanserlerinin bilinen herhangi bir viral etiyolojinin yokluğunda ortaya çıkan mutasyona uğramış proto-onkogenler (Barbacid 1987) içerdiği keşfedildiğinde bu iki araştırma alanı birleştirilmiştir. Bu bulgular, kanserlerin çoklu mekanizmalardan ve bir veya daha fazla hücresel genin mutasyonundan türeyebileceği kavramlarını ortaya çıkarmıştır. Kanser hücresi biyologları normal hücrelerin ve kanser hücrelerinin özelliklerini kataloglamaya ve karşılaştırmaya başladıkça, kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı (değiştirilmiş morfoloji, kısıtlanmamış hücre büyümesi, değişmiş

metabolizma ve çoklu ve çeşitli kromozomal anormallikler gibi) "dönüştürülmüş" fenotip olarak bilinen bir dizi hücrel ve fiziksel özellik sergilediği ortaya çıkmıştır. İlginçtir ki, normal bir hücre, kanser hücresi ile 'kaynaştırılırsa', ortaya çıkan hibrit hücrenin tam bir konakçı ve donör kromozom tamamlayıcısı içeren bir 'normal' hücrel fenotip sergilediği gözlemlenmiştir. 'Dönüştürülmüş' fenotipin elde edilmesi, normal konakçıdan belirli hücre kromozomlarının kaybını gerektirmekte, bu da bazı normal hücrel genlerin kanser hücrelerinin tümörjenik özelliklerini 'bastırabileceği' fikrine yol açmıştır (Parsons vd. 2016).

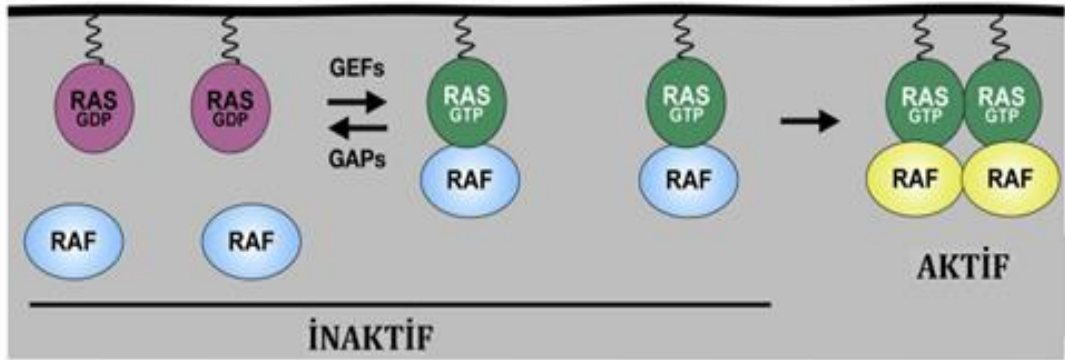
Değişen metabolizma, kanserin ayırt edici bir özelliğidir. Hemen hemen tüm katı ve hematolojik malignitelerde, enerji üretimi ya da karbonhidratların, lipidlerin, amino asitlerin veya nükleotitlerin biyosentezinde rol oynayan metabolik yollar, tümörün spesifik beslenme ve büyüme gereksinimlerini karşılamak için gasp edilmektedir. Bu değişiklikler genellikle hızla bölünen kanser hücrelerinin büyümesini destekler ve tümörün indüklenmesini önleyen veya tümör ilerlemesini ve metastatik yayılmasını zayıflatan metabolik sinyali inhibe etmektedir. Kanser, bu nedenle metabolik bir hastalık olarak düşünülebilir. Kanserde meydana gelen metabolik değişikliklerinin itici güçleri belirsizliğini korumakta olup, farklı modeller ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Örneğin Darwinci seleksiyon teorisinden yola çıkarak, değişiklikler stokastik olaylara atfedilebilir. Bu modele göre, metabolik değişiklikler kanser hücrelerinde rastgele meydana gelir ve gösterdikleri büyüme avantajına göre seçilir. Alternatif bir model ise, metabolik değişikliklerin kanser hücrelerindeki genetik ve epigenetik değişikliklerin bir sonucu olduğunu ve onkogenlerin aktivasyonunun en önemli örnek olduğunu ileri sürer. Bununla birlikte, her iki model birlikte çalışabilir ve birçok metabolik yol, hem stokastik hem de onkogen kaynaklı metabolik değişikliklere maruz kalabilir. Örneğin, hemen hemen tüm kanser hücreleri, onkogenik mutasyon ister olsun ister olmasın, hızlı bir şekilde ATP oluşturmak için aerobik glikolizde glikoz kullanır. Aerobik glikoliz hayatta kalma ve büyüme avantajı sağlar, bu da doku veya genetik geçmişten bağımsız olarak, ihtiyaca dayalı metabolik değişikliklerin seçimine yönelik bir eğilimi gösterir. Bu inceleme, kanser metabolizmasının yeniden düzenlenmesinde onkogenlerin rolüne odaklanmaktadır (Nagarajan vd. 2016).

2.5 Ras

2.5.1 Ras'ın yapısı/yeri/işlevi

Ras, GTP'yi GDP'ye hidrolize eden bir enzim olan küçük membran-bağlı bir GTPazdır. Ras, moleküler anahtar işlevi görür ve GDP-bağlı ve GTP-bağlı olmak üzere iki farklı konformasyonda bulunmaktadır. GDP-bağlı durum, aktif olmayan formuyken, GTP'ye bağlanması proteini aktive ederek, aşağı yönde efektörlerin Ras'a bağlanmasına ve Ras tarafından aktive edilmesine izin veren konformasyonel bir değişikliğe neden olmaktadır. Bu, Ras sinyallemeyle ilişkili kaskadları tetikler. Ras'ın intristik GTP hidroliz aktivitesi, $\sim 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ gibi nispeten yavaş doğal kinetiklerle çok verimsizdir (Stout ve Campbell 2018, Hall vd. 2002).

Bu yavaş hidroliz, Ras'ın hücre içindeki önemli sinyalleme rolü için elverişli değildir, bu nedenle iki ana Ras-ilişkili protein ailesi, GAP'lar ve GEF'ler, Ras fonksiyonunu modüle etmektedir. GTPaz aktive edici proteinler (GAP'ler), Ras'a, GTP'yi GDP'ye hidrolizinde yardımcı olur ve oranı beş kat artırır (Stout ve Campbell 2018, Gideon vd. 1992). Guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler), GDP'nin Ras'tan çıkarılmasına yardımcı olarak yeni bir GTP molekülünün bağlanmasına izin verir. Bu nedenle, Ras'ın aktif ve inaktif durumlar arasındaki döngüsü, esas olarak net GAP ve GEF aktivitesi tarafından kontrol edilmektedir (Stout ve Campbell 2018).



Şekil 2.2 Ras Aktivasyonu (O'Bryana 2019)

Ras proteinleri yalnızca 188-189 amino asit uzunluğundadır, ancak nükleotid bağlanma bölgesi, anahtar I, anahtar II, GEF bağlanma bölgesi, GAP bağlanma bölgesi ve efektör bağlanma bölgesi dahil olmak üzere birkaç önemli motif içerir. Nükleotid bağlanma bölgesi, GTP'nin Ras proteinine bağlandığı ve GTP hidrolizinden sonra GDP'nin çıkarıldığı yerdir. Anahtar I (SI) ve anahtar II (SII) motifleri, Ras proteininin GTP bağlanması ve GTP hidrolizi akabinde konformasyon değiştirmesine izin veren önemli bölgelerdir. Bu konformasyonel değişiklikler GAP'ler ve GEF'lerin bağlanması ve aktif Ras'a efektör bağlanmasının düzgün gerçekleşmesi için önemlidir. Kanser hücrelerinde en sık meydana gelen Ras mutasyonları 12, 13 ve 61 kodonlarında meydana gelir (Stout ve Campbell 2018).

Ras, membran-bağılı bir proteindir ve bu nedenle, bir sinyal molekülü olarak hayati işlevini yerine getirmek için plazma membranı üzerinde bulunması gerekir; GAP'lar, GEF'ler, iskele proteinleri ve downstream efektörleri ile verimli bir şekilde etkileşime girmek için buna ihtiyaç duyar. Bununla birlikte, yeni yapılan araştırmalar, Ras'ın endomembranlar üzerinde de çalışabildiğini, etkileşimlerini ve dolayısıyla sinyalleme kademelerini değiştirebileceğini göstermektedir. Endoplazmik retikulumda Ras'ın post-translasyonel modifikasyonunda, GTPaz'ın uygun membranı hedeflemesi için kritik olan belirli enzimler kullanılır. Ras, bir lipidasyon bölgesi olarak işlev gören C-terminalinde bir CAAX (C = sistein, A = alifatik amino asit, X = değişken bir amino asit) motifine sahiptir. Lipid gruplarının Ras'a bağlanması, farnesiltransferazın (FTase) CAAX motifinin sisteinine on beş karbonlu bir farnezil poliizopren lipid eklenmesi ile başlayan aşamalı bir süreçtir (Cox vd 2015). Daha sonra, Ras dönüştürücü enzim 1 (RCE1), farnesil sisteinin karboksil grubu daha sonra izoprenilsistein karboksilmetiltransferaz (ICMT) ile metil esterlenmeden önce AAX amino asitlerini ayırır. CAAX motifinin aynı zamanda terminal sisteine yirmi karbonlu bir prenil lipid ekleyen farklı bir enzim olan geranilgeraniltransferaz I (GGTase 1) için bir substrat olduğuna dikkat etmek önemlidir. Bu alternatif prenilasyon, doğru membran lokalizasyonunu kolaylaştırmak için bazı Ras izoformlarının enzimatik fazlalığını ve uygun protein işlemenin önemini vurgular (Stout ve Campbell 2018).

Normal fizyolojik koşullar altında, Ras, çeşitli reseptör tiplerinden çoklu hücre dışı

sinyalleri taşıyan bir sinyalleşme düğümü olarak işlev görür. Bunlar arasında EGFR, FGFR, insülin reseptörü vb. reseptör tirozin kinazları (RTK'lar), çeşitli kemokin ve hormon reseptör ailelerini içeren G-protein bağlı reseptörler (GPCR'ler), ve PI3K-AKTmTOR, RAF-MEK-ERK ve RALGDS / RAS benzeri protein A (RALA) veya RALB dahil olmak üzere sadece küçük bir kanonik kaskad alt kümesi olan çok sayıda akışaşağısı efektör yolunda integrinler bulunur. Büyüme faktörleri, EGF, FGF, insülin, CXCL'ler, CX3CL1 vb sitokin ve kemokinler dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere birçok farklı hücre dışı sinyal, Ras'ı aktive ederek hücre içi sinyallere entegre edilir. Ras'ın çeşitli downstream efektörleri, normal biyoloji için gerekli olan proliferasyon, sağ kalım, metabolizma, motilite ve gen transkripsiyonu dahil olmak üzere normal hücresel fonksiyonun birçok yönünü kontrol eder ve daha sonra bozularak tümörijenезi ve tümör progresyonununa yol açar (Stout ve Campbell 2018).

Ras, bu küçük GTPaz süper ailesinin sadece bir üyesi olsa da, ana sinyalleme düğümü olarak hareket etmesi ve böylelikle farklı hücre dışı girdileri çeşitli hücre içi tepkilere dönüştürmesi açısından seminaldir. Sonuç olarak, Ras fonksiyonunun kontrolü arzu edilen bir terapötik hedeftir. GTPaz süper ailesinin diğer üyelerinden ziyade (örneğin Rac, Rho (Ras homolojisi) veya RAL proteinleri) Ras'ın kendisini hedeflemenin avantajı, Ras'ın diğer tüm sinyalleme kaskadlarının upstream'inde olmasıdır. Dolayısıyla, tümör başlangıcını ve ilerlemesini tetiklemek üzere anormal bir şekilde düzenlenen bu GTPazların kontrol ettiği süreçler (yani hareketlilik, proliferasyon, sağ kalım, vb.), kısmen Ras fonksiyonu tarafından düzenlenir (Stout ve Campbell 2018).

Ras, normal hücreleri kanser hücrelerine dönüştürebilen bir onkogen olarak bilinmektedir (Shih vd. 1980). Neoplastik dönüşüm esnasında morfolojisi ve hücre karakteristiklerinde, çoğalabilme ve hareketlilik gibi bazı değişiklikler gözlenmiştir. Bu da, fonksiyonel proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunun yeniden modellenmesinin hem hücre morfolojisi hem de hücre karakteristiğinde dramatik değişikliklere yol açtığını düşündürmektedir (Fujii vd. 2012).

Rat sarkomu (Ras) protein süperailisi, doğal guanozin trifosfat (GTPaz) aktivitesine sahip küçük guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinleri içerir, bu da GTP'yi guanozin

difosfata (GDP) hidrolize eder. Ras ailesi üyeleri arasında Harvey-Ras (H-Ras); nöroblastom-Ras (N-Ras); ve Kirsten-Ras (Kras), Kras-4A ve Kras-4B'nin ekleme varyantları bulunmaktadır. Bu izoformlar, N-terminal G bölgesini kapsayan yüksek oranda korunmuş (G kutuları olarak da bilinen) GDP/GTP-bağlı motif elemanları paylaşmaktadır (Quah vd. 2016, Wennerberg vd. 2005). Ras'ın C-terminal hiperdeğişken bölgesi (HVR), Ras'ın lipit aracılı membran lokalizasyonunu kolaylaştırmak için posttranslasyonel değişikliklere tabi tutulmaktadır (Quah vd. 2016, Konstantinopoulos vd. 2007). G bölgesi iki switch'e (anahtar) sahiptir: switch I (kalıntı 25-40) ve switch II (kalıntı 59-75) (Quah vd. 2016, Kapoor ve Travesset, 2015). Bu switchler, düzenleyici proteinler ve efektörler tarafından Ras'ın iki nükleotide bağlı durumunun tanınması için gereklidir, böylece Ras ve bu Ras-bağlı proteinler arasındaki protein-protein etkileşimleri belirlemektedir (Quah vd. 2016).

Ras proteinleri, sırasıyla GTP ve GDP'nin bağlanması yoluyla switch I ve II'nin yapısal değişikliklerini gerçekleştirerek "açılabilir" ve "kapatılabilir" moleküler switchlerdir. Ras, GDP-GTP değişimi ve GTP hidrolizinin yavaş içsel aktivitelerini gösterdiğinden, aktif ve inaktif konformasyonları arasındaki karşılıklı dönüşüm iki düzenleyici protein tarafından katalize edilmelidir: Guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) ve GTPaz aktive edici protein (GAP). GEF'ler arasında Son of Sevenless (SOS) ve Ras guanin nükleotid salınım faktörü 1 (RasGRF1) bulunur. GEF, GDP-GTP değişimini kolaylaştırarak aktif bir GTP-bağlı RAS durumunu teşvik ederken, GAP, Ras'ın intrinsik GTPaz aktivitesini hızlandırarak Ras'ı inaktif GDP-bağlı durumda tutmaktadır (Quah vd. 2016, Schmidt ve Hall 2002, Bernards ve Settleman, 2004).

Ras, sinyalleri hücre zarından çekirdeğe ileten kompleks bir sinyalizasyon ağında moleküler bir switch görevi gören 21 kDa membrana bağlı bir GTPazdır. Ras sinyalizasyonu, Aktif Ras-GTP ve inaktif Ras-GDP bağlı konformasyonel durumlar arasındaki döngüden sorumludur. Ras'ın GTP'ye bağlı konformasyonel durumu, çoklu downstream efektörleriyle etkileşime girmesine izin vermektedir. Bu moleküler switch iki karşıt bileşen tarafından sıkı bir şekilde denetlenir. Guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler), GDP'nin çözünmesini ve daha fazla GTP'nin sitosolden alınmasını stimüle ederek aktif konformere yol açmaktadır. Buna karşılık, GTPaz aktive edici

proteinler (GAP'lar), Ras'ın yavaş, intristik GTP-hidroliz fonksiyonunu beş katı kadar uyarak inaktif GDP-bağlı konformasyonuna yol açmaktadır (Greiss vd. 2010).

Ras, hücre dışı uyaranlara yanıt olarak çeşitli hücre yüzeyi reseptörleri tarafından aktive edilir, bu da protein sentezine, çoğalmasına, diferansiyasyona ve hücre sağ kalımının düzenlenmesine yol açan downstream (akış aşağı) efektörleri ile etkileşimi teşvik etmektedir. Aktif Ras–GTP öncelikle Raf/MEK (mitojenle aktifleştirilen protein kinaz kinaz)/ERK (hücre dışı sinyal regüle kinaz) efektör yoluyla sinyal gönderir. Ras; Raf, GAP ve GEF'lere ek olarak fosfatidilinositol-3-kinaz dahil olmak üzere diğer efektör proteinler ile de etkileşime girmektedir (Greiss vd. 2010, Campbell ve Der 2004, Hancock 2003, Shields vd. 2000).

Ras'ın üç ana alt türünde (H-, K- veya N-) görülen mutasyonlar, insanda görülen tüm kanser türlerinin yaklaşık %30'u ile ilgilidir (Bar-Sai 2001). Bazı durumlarda, örneğin kolon ve pankreas kanseri vakalarında, Ras mutasyonlar tümörlerin %50 ile 90'ında görülmektedir. Ras mutasyonları, enzimi GTP'yi hidrolize edemez hale getirir ve sinyalizasyon aktivitesinin deregülasyonuna neden olarak kontrolsüz proliferasyon, apoptoza direnç, artan mobilite, metastaz ve sonuçta kansere yol açabilmektedir (Omerovic vd. 2008, Greiss vd. 2010).

Mutasyonu hücre proliferasyonu anormallikleri, hayatta kalma, yerdeğiştirme ve diferansiyasyonda rol oynan Ras, sonuçta kanser başlangıcına ve ilerlemesine yol açan bir proto-onkogen türüdür (Quah vd. 2016, Wennerberg vd. 2005). Epidermal büyüme faktörü (EGF), sinir büyüme faktörü (NGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi hücre dışı sinyaller reseptör tirozin kinazları (RTK'lar) aktive ettiğinde Ras, iki kanonik kanser-yapıcı mitojenaktif protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) yollarını da aktive etmektedir (Vivanco ve Sawyers 2002, Sever ve Brugge 2015, Quah vd. 2016). Ras mutasyonları, insan kanserlerinin %25 ile %30 arasında, pankreatik duktal adenokarsinomların (PDAK'ler) ise %90'ında bulunmaktadır (Prior vd. 2012). Ras izoformlarından Kras mutasyonları, Ras kaynaklı kanserlerin %86'sını oluşturur, ardından N-Ras (% 11) ve H-Ras'ı (% 3) gelmektedir (Forbes vd. 2011). Ras mutasyonları en yaygın olarak kodon glisin-12

(G12), glisin-13 (G13) ve glutamin-61'de (Q61) görülmektedir (Prior ve Hancock 2012). G12 mutasyonları, Ras-GAP etkileşimini önleyen sterik engelle neden olurken, Q61 mutasyonları ise, Ras'ın GAP-aktif edici GTPaz aktivitesini zayıflatır, böylece Ras sinyalizasyonunun uzun süreli aktivasyonuna, bu durumda kanser başlangıcına ve ilerlemesine yol açar (Quah vd. 2016).

Onkogenik Ras'ı inhibe edebilen ilaçlarla ilgili uzun yıllardır süren araştırmalar başarısız olmuştur. Bu nedenle Ras “ilacı yapılamayacak” olarak tanımlanır. Ras'ın ilacı yapılamayacak olarak tanımlanması, bu proteinin yapısında bir ilacı barındıracak iyi tanımlanmış bir bağlanma cebinin bulunmamasına bağlanmaktadır (Ledford 2015). Ras'ın GTP yüklemesi Ras aktivasyonunun ayırt edici özelliği olduğundan, mutant Ras'a bağlanma için hücresel GTP ile rekabet ederek onkogenik Ras aktivasyonunu bloke etmek için bir GTP-rekabetçi inhibitör kullanılması düşünülebilmektedir. Adenosin trifosfat (ATP)-rekabetçi kinaz inhibitörlerinin başarısından yola çıkarak, Ras aktivasyonunu inhibe etmek için GTP'nin şeker ve baz kısımlarındaki modifikasyonları aracılığıyla GTP analoglarının kullanılması düşünülebilir. Bununla birlikte, GTP-rekabetçi inhibitörlerinin iki nedenden dolayı güçten yoksun olduğu bulunmuştur: GTP Ras'a son derece yüksek bir afinite ile bağlanır ve GTP hücre içinde bol miktarda bulunmaktadır (Berndt vd. 2011, Quah vd. 2016).

2.5.2 Ras yolu

Ras yolu, yetişkin organizmaların ve aynı şekilde gelişmekte olan embriyoların normal ve kanserli hücrelerinde bulunan en önemli bir hücre içi sinyal yoludur (Parson vd. 2016). Küçük G proteini Ras üzerinde bulunan guanin nükleotid trifosfat (GTP) için guanin nükleotid difosfat (GDP) değişimine aracılık eden guanin nükleotid değişim proteinleri (GEF'ler) tarafından RTK'lerin downstream'inde aktive edilmektedir (Bos vd. 2007). Ras, GTP tarafından aktive edildiğinde, serin/treonin protein kinaz RAF'ın katalitik aktivitesini uyarmaktadır (Dhillon vd. 2007). GAP'ler (GTPaz aktif edici proteinler), Ras'ın inaktif GDP-bağlı duruma dönüşünü destekler. Aktive edilmiş RAF, daha sonra serin/treonin kinaz ERK'yı fosforile eden ve aktive eden çoklu-özgüllüklü bir kinaz olan MEK'in uyarılmasına yol açmaktadır. Aktive edilmiş ERK, transkripsiyon

faktörleri, transkripsiyonel düzenleyici proteinler, ayrıca DNA replikasyonunda ve hücre bölünmesinde rol oynayan diğer substratlar dahil olmak üzere sayısız nükleer substratın fosforilasyonunu katalize ettiği çekirdeği ile yer değiştirir. Ras proteinleri, tanımlanan ilk onkogenler arasındadır ve mutasyona uğramış Ras, insan kanserinin yaklaşık %15'inde bulunmaktadır (Davies vd. 2002, Parson vd. 2016). RAF mutasyonu, kötücül melanomların %60 ile 70 arasında ve diğer insan kanserlerinde pek çok çeşidinde daha düşük bir sıklıkta görülmektedir. İlginç bir şekilde, insan kanserlerinde az da olsa MEK veya ERK mutasyonu tespit edilmiştir (Parson vd. 2016).

2.5.3 Ras aktivasyonu / inaktivasyonu

Ras kinaz ailesi, neredeyse tüm temel hücresel proseslerin versatil ve anahtar regülatörleri olan küçük GTPazların yaklaşık 150 üyesinden oluşmaktadır. Bu Ras genleri, mikrozomal veya hücre plazma membranında lokalize edilmiş homolog 21 kDa proteinlerini encode etmektedir. GTP ile bağlandıktan sonra etkinleşen ve GTP'nin GDP'ye hidrolizi nedeniyle etkisiz hale gelen ikili anahtarlar olarak hareket etmektedirler (Asati vd. 2017, Donovan vd. 2002).

Kras geni P21 Ras proteinini kodlamaktadır. RASA1 olarak da bilinen bu protein 120 kDa sitozolik bir insan proteindir ve küçük bir guanozin trifosfataz (GTPaz) olarak görev yapmaktadır. Bu protein, çeşitli hücresel süreçleri kontrol etmek için hücre zarı büyüme faktörü reseptörlerini hücre içi sinyal yollarına ve transkripsiyon faktörlerine bağlayarak moleküler bir anahtar görevi görür. P21 Ras, hücre zarının iç yüzeyinin bir bileşenidir ve çeşitli efektör proteinler ile etkileşime girmektedir. Biyolojik etkiler üretmek için Ras proteininin, bir farnesil izoprenoid tarafından lipidlerin değiştirilmesinden sorumlu olan hücre zarı ile birleşmesi gerekmektedir. Kras'ın nokta mutasyonu, Ras'ın içsel GTPaz aktivitesini bozar ve GTPaz aktive edici proteinlerin Guanozin trifosfatın (GTP) (aktif) Guanozin difosfata (GDP) (inaktif) dönüşümünü teşvik etmesini önler. GTP'ye bağlı form açık durumundan sorumludur ve GDP'ye bağlı form kapalı durumu olarak bilinir (Asati vd. 2017). Bu durumlar arasındaki geçiş, herhangi bir sinyal yokluğunda çok yavaş gerçekleşmektedir. GDP Ras'tan ayrıldığında, yerine tipik olarak GDP'den çok daha yüksek bir konsantrasyonda bulunan GTP ile hızlı

bağlanma gerçekleşir. Bu nedenle P21 Ras kalıcı olarak GTP'ye bağlanır ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT/rapamisin'inin memeli hedefi (mTOR) veya RAF/mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MEK)/hücre dışı sinyaller ile düzenlenen kinazlar gibi downstream sinyal yollarını etkinleştirir (upstream büyüme faktörü reseptör aktivasyonundan bağımsızdır) (Di Magliano ve Logsdon 2013). Bu aktivasyonu takiben, hücre proliferasyonu, transformasyon, adezyon ve sağ kalımın uyarılması ile nükleer transkripsiyon faktörleri de (ELK/JUN/MYC gibi) aktive edilir (Cox vd. 2015, Di Magliano ve Logsdon 2013). GTP hidrolizinin aracılık ettiği Ras inaktivasyon prosesi için de benzer ilkeler geçerlidir. Nörofibromin, birçok hücre tipi içinde Ras'ın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan diğer bir GAP formudur. Sinyalleme sırasında bu kompleksin düzenlendiği mekanizma henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte, tüm Ras GAP'lerinden nörofibromin, insan kanserinde en sık mutasyona uğrayandır; örneğin akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık % 8'ini ve glioblastomların % 25'ini oluşturur (Asati vd. 2017).

2.5.4 Ras ve mutasyonları

Ras proteinleri, insan kanserlerinin çeşitli formlarında sıklıkla mutasyona uğramış proto-onkogenlerdir. Ras proteinleri GTPazlar olarak işlev gördüğünden, hücre proliferasyonundan ve sağ kalımından sorumlu olduğundan, aberan Ras proteinleri hiper-proliferatif bozuklukların ve kanserin gelişmesiyle ilişkilidir (Asati vd. 2017). Farklı izoform bölgelerindeki mutasyon, GTP bağlanmasını destekler ve Ras'ın yapısal aktivasyonunu tetikler. Ras izoformları, GDP/GTP bağlanmasının, GTPaz aktivitesinin ve efektör etkileşimlerinin meydana geldiği bölgede sekans kimliği benzerliği gösterdi. Kanıtlar, Ras proteinlerinin, Ras/membran etkileşiminin modülasyonundan sorumlu olan özgün C-terminal hiperdeğişken bölge (HVR) ile izoform spesifik işlevler sergilediğini göstermektedir (Asati vd. 2017, Henis vd. 2009).

Ras süper ailesi, 150'den fazla guanozin tri-fosfat hidrolaz (GTPaz) içeren küçük G protein sınıfına aittir (Wennerberg vd. 2005). Büyük ölçüde korunmuş bu protein ailesi, hücre içindeki membran reseptörlerinden sinyal iletilmesinde önemli rol oynar (Saad vd. 2014, Joncheere vd. 2017). Aile, beş alt aileye ayrılmıştır: Ras, Rho, Rab, ARF ve Ran

(Saad vd. 2014). Bunlardan Ras proteinleri, esas olarak proliferasyon, diferansiyasyon, metabolizma ve hayatta kalma genlerinin regülasyonunda rol oynamaktadır. Bu ailenin en karakterize üyeleri H-ras, N-ras, ve Kras geni ekson dördün alternatif birleşmesinden kaynaklanan Kras4A ve Kras4B izoformlarıdır. Çoğunlukla, Kras ifadesi her yerde bulunan Kras4B'yi belirtirken, Kras4A ifadesi farklı dokularda daha değişkendir. (Tsai vd. 2015). RAS-ailesi proteinleri, çok benzer üç boyutlu bir yapıya sahip olan küçük 188-189 aa – 21 kDa GTPazlardır. Bu proteinler iki alan ve bir merkezi bölge barındırır. N-terminal G alanı (aa 1-165) yüksek oranda korunur ve fosfatı bağlayan bir P-döngüsü, bir efektör bağlanma alanı (aa 32-40) ve konformasyon değişikliklerinden sorumlu iki switch bölge (aa 32-38 ve aa 59-76) içermektedir. RAS GTPaz süper ailesinde merkezi bölge (aa85-165) %85-90 homologdur. C-terminal hiperdeğişken bölge (HVR) (aa 165-185) membran fiksasyonunu kontrol eder ve bir oto-inhibitör alan olarak işlev görmektedir. CAAX son sekansı sistein kalıntısı üzerinde farnesillenerek membrana tutunmasına izin verir. Ek olarak, Kras4B HVR alanı da proteini zarda stabilize eden, lizin açısından zengin bir sekans içerir. İnaktifken, Kras proteini hücre membranının iç yüzeyinde bulunur ve bir guanosin-di-fosfata (GDP) bağlanır. Membran reseptörünün aktivasyonu, adaptörlerin Ras Guanidin Değişim Faktörü (RASGEF) SOS1 aracılığıyla SH2 ve SH3 alanlarının güçlenmesine yol açar. Bu, RAS'ın SOS1 ile etkileşimini sağlar ve GDP ayrışmasını indükler. Serbest Ras proteini daha sonra hızlıca guanosin-tri-fosfat (GTP) molekülüne bağlanır, bu da hücrede Kras hedef genlerini aktive eden sinyali yayar (Jonckheere vd. 2017). Bununla birlikte, Ras aktivasyonu geçicidir çünkü GTPaz aktivitesi GTP'yi GDP'ye hidrolize eder ve inaktive duruma geri döner. GTP hidrolizi, normal Kras aktivasyon/inaktivasyon döngüsüne izin veren bir GTPaz aktive edici protein (GAP) tarafından desteklenmektedir (Wennerberg vd. 2005, Jonckheere vd. 2017). GDP-bağlı durumdayken, Kras4B'nin katalitik alanı HVR ile etkileşime girerek, aktivasyon ile geri döndürülecek oto-inhibitör durumunu korumaktadır (Chavan vd. 2015). Ras ayrıca hücresel dağılım ve özellikle nanokümeler adı verilen lipid yapılarında kümelenmesi ile regüle edilir (Prior vd. 2003). Lokal fosfo-lipit içeriğinin bu modülasyonu daha sonra RAS/RAF/MAPK sinyalizasyonunu değiştirmektedir. Aktivasyon durumuna göre, Ras nanokümeleri oluşturur ve efektörlerin etkili bir şekilde güçlenmesini sağlar. Nanoküme sayısı, aktivasyon sinyal yoğunluğu ile orantılıdır. GDP/GTP döngüsü sırasında Ras konformasyonu değişir: GDP-bağlı Kras, HVR alanı

yoluyla membranla birleşirken, GTP-bağlı kısmen ayrılır. Ayrıca, GTP veya GDP bağlayıcı Ras farklı tür fosfo-lipitlerle birleşir ve bu nedenle nanokümelerin lipit içeriğini değiştirir (Jonckheere vd. 2017). İlginç bir şekilde, H- ve N-Ras izoformları ayrı ayrı, çakışmayan nanokümeler oluşturur. Bu dağılım, homolojisinin yüksek olmasına rağmen sinyalizasyon yollarının diferansiyel aktivasyonunu açıklayabilir (Zhou ve Hancock 2015). Kras, daha çok plazma zarında lokalize olurken, PKC tarafından serine181 (S181) üzerinde de fosforile edilebilir. Bu da mitokondriyal membran üzerinde delokalizasyonuna, Bcl-XL ile etkileşime girmesine ve apoptoz indüklemesine yol açar. Bu S181 fosforilasyonu kalmodulin tarafından inhibe edilir (Jonckheere vd. 2017).

Onkogenik mutasyonlar, GTP hidrolizini bozarak Ras ailesi proteinlerinin fonksiyonel aktivasyonuna neden olur. Yaygın bir onkogenik mutant olan Kras'a (G12C) geri çevrilemez şekilde bağlanan küçük molekül inhibitörlerinin gelişiminin anti-kanser aktivitesi için önemli olduğu gösterilmiştir. Bu inhibitörlerin Kras'a (G12C) bağlanması, hem anahtar-I hem de anahtar-II'yi bozarak, natif nükleotidin GTP yerine GDP'yi tercih etmesine neden olur ve Raf'a bağlanmasını engeller. Kras'ı (G12C) hedeflemek için, sistein tiyollerin nükleofilikliği, seçicilik açısından yabani tip Kras'a göre bir avantaj gösterir. Mutant Cys 12 siteleri, hem nükleotid cebinin hem de anahtar bölgelerinin katılımıyla efektör etkileşimlerine katılır (Ostrem vd. 2013, Jonckheere vd. 2017).

Hras, Nras, Kras olarak adlandırılan mutasyona uğramış 3 Ras proteininin işlevleri, hücre çoğalmasının, sağ kalımın, farklılaşmasının, aksiyon organizasyonunun, veziküler trafiğinin ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi için önemli olan çeşitli sinyal zincirlerini kontrol eden GDP/GTP moleküler anahtarları tarafından düzenlenmektedir. Ras mutasyonu, RaseGTP proteinlerinin aktivitesindeki kusurların ekspresyonuna yol açar (Asati vd. 2017). Ras genlerinin mutasyonel aktivasyonunun insan kanserlerinin % 33'ü ile ilişkili olduğu ve onu en sık görülen onkogenik mutasyonlardan biri olduğu tespit edilmiştir (Karnoub ve Weinberg 2008). Ras mutasyonlarının farklı formlarında, Kras tüm insan kanserlerinin en yüksek yüzde değeri ile (%21,6) ilişkilidir, ikincisi N-Ras'tır (%8,0) ve sonuncusu da en az mutasyona uğramış onkogen olarak bilinen H-Ras'tır (%3,3). Kras mutasyonları, tüm Ras mutasyonlarının %86'sını oluşturur ve

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki en fazla ölüm oranına sahip olan akciğer, kolon ve pankreas kanserinde baskın olarak bulunur (Jemal vd. 2010, Asati vd. 2017).

Mutasyona uğramış Ras genlerinin sıklığı, türü değişiklik gösterir ve büyük ölçüde tümör türüne bağlıdır. Kras mutasyonu en yüksek insidansla pankreas (%90) ve sporadik kolorektal karsinomlarda (%50) bulunur. Birçok tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörünün (TKGFR'ler) aşırı ekspresyonu, Ras-bağlı sinyallemede artışa neden olur. Moleküler düzeydeki bilğimiz, onkogenik Ras'ın insan kanserindeki rolünün önemli olduğuna işaret etmekte. Aktive edilmiş Ras, insan kolon karsinomu veya fibrosarkomu etkileyen, dönüştürülmüş fenotipin bozulmasına neden olur ve bu da aktive edilmiş Ras'ın hücre dönüşümüne katkıda bulunduğunu gösterir. Bu nedenle Ras'ı hedefleyebilen bileşikler, anti-tümör ajanı adayları olabilir. Kanser çok adımlı bir süreç olduğundan ve Kras mutasyonu tipik olarak kanserin ilerlemesinde erken dönem bir olgu olduğundan, tek başına anormal Ras fonksiyonu veya ilerlemiş kanser için terapötik anlamda yararlı bir yaklaşım olabilecek aşağı düzenleyici proteinler arasında kafa karışıklığı yaratır (Asati vd. 2017).

12, 13 veya 61 kodonlarındaki tek amino asit yanlış anlam mutasyonlarının, GTP-bağlı ve aktif formdayken efektör sinyallemenin aktivasyonuna yol açan Ras proteinlerindeki mutasyondan sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Çalışmalar, ATP-rekabetçi protein kinaz inhibitörlerinin, düşük mikromolar aralıklarda protein kinazlara bağlanan ATP'ye kıyasla protein kinazlara nanomolar afinitelerle bağlandığını göstermiştir (Asati vd. 2017, Smyth ve Collins 2009). GTP için Ras'a yüksek bir bağlanma afinitesine sahip olan GTP antagonistleri, bu yönde bir başarı eksikliği gösterdi. Ras sinyallemesini inhibe etmeyi hedefleyen ardından gelen stratejiler, RasGAP'ı taklit edebilen ve mutant Ras proteinlerinin GTPaz aktivitesini geri kazanabilen küçük moleküllerin geliştirilmesi ile ilgilidir (Asati vd. 2017, Baines vd. 2011).

2.6 Kras

H-, N- ve Kras proteinleri, hücre büyümesi ve bölünmesiyle ilgili birçok sinyal yolunu düzenleyen membran-ilişkili moleküler anahtarlardır. Tipik olarak 12, 13 ve 61

kodonlarında gerçekleşen aktive edici Ras mutasyonları, tüm insan kanserlerinin %15 ila 25'i ile ilişkilidir (Prakash vd. 2016). Kras mutasyonları, tüm onkojenik Ras mutasyonlarının %85'ini oluşturmaktadır (Prior vd. 2012).

Bilinen 3 Ras geni vardır ve bunlar 4 Ras proteini üretir: HRas, N-Ras, Kras4A ve Kras4B. Kras4A ve Kras4B splice varyantlarıdır. Ras proteinleri yüksek homolojiye sahiptir ve esas olarak sadece hiper değişken bölge olarak adlandırılan C-terminal 25 amino asitlerinde farklılık göstermektedir. Ras proteinleri, korunmuş anahtar I bölgesi (32-38 amino asitleri) ve anahtar II bölgesi (59-67 amino asitleri) aracılığıyla efektörleriyle etkileşmektedir. S35, G37 ve C40 gibi anahtar I bölgesi çevresinde mutasyonlara sahip Ras proteinleri, Ras efektörlerinin yalnızca bir alt kümesine bağlanmaktadır (Rangarajan vd. 2004, Camonis ve White 2005, Matsunaga vd. 2014). V12 gibi onkojenik mutasyonlar esas olarak Kras geninde gözlemlenmektedir. Özellikle pankreas kanserlerinin %60–90'ı Kras mutasyonlarını barındırmaktadır. Bu özellik, her bir Ras proteininin doku tipine bağlı olarak farklı bir role sahip olduğunu göstermektedir (Matsunaga vd. 2014).

Küçük G-proteinleri Kras, H-Ras ve N-Ras, hücre büyümesini ve farklılaşmasını yöneten birçok sinyal iletim yolunda GDP-GTP tarafından düzenlenen ikili anahtarlar olarak işlev görmektedir. GDP-bağlı 'kapalı' durum ile GTP-bağlı 'açık' durumu arasındaki değişim, GTP için GDP değişimini katalize eden guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) SOS1 ve SOS2 ve GTP'nin GDP'ye hidrolizini katalize ederek 'açık' durumunu sonlandıran GTPaz aktive edici proteinler (GAP'lar) tarafından kontrol edilmektedir. Aktif durumda Ras, Raf, PI3K ve Ral-GDS gibi fonksiyonel olarak çeşitli downstream efektör proteinlerine sinyal göndermektedir. Ras'ın katalitik alanı, 3 Ras izoformu Kras, H-Ras ve N-Ras arasında oldukça homologdur, fakat bu proteinlerin C-terminal hiperdeğişken bölgesinde (HVR) büyük farklılıklar bulunmaktadır. Bu proteinlerin ikinci kısmı, downstream sinyalleme için kritik bir gereksinim olan membran birleşmesine katılmaktadır. Ras proteinlerinde işlev kazanımı mutasyonları sıklıkla insan kanserlerinde bulunur ve hastalar için kötü prognoz belirteçlerini temsil etmektedir. Bu mutasyonlar çoğunlukla 12, 13 ve 61 kodonlarında meydana gelir ve bu formları GAP katalizli hidrolize dirençli ve kronik olarak aktif hale getirmektedir (Wang

vd. 2012, Baines vd. 2011).

İnsan kanserlerinde Ras mutasyonlarının yaygın prevalansı uzun yıllardır kabul edilmektedir; Kras'daki mutasyonlar başlı başına global çapta yılda yaklaşık bir milyon ölümden sorumludur, bu da neredeyse sıtma ve tüberküloz ile eşdeğerdir. CBioPortal veritabanında bulunan mevcut verilerin analizi, Ras izoformları arasında, yanlış anlam mutasyonlarının en yaygın olarak Kras'ta (%85) ve çok daha azının Nras (%12) ve Hras'ta (%3) bulunduğunu ortaya koymaktadır. Ras mutasyonlarının çoğu 12, 13 veya 61 kodonlarında meydana gelmektedir. Kodon 12 veya 13'te glisinin prolin dışındaki herhangi bir amino asit tarafından değiştirmesinin, GAP'ın arginin parmağının GTPaz bölgesine girmesini ve hidrolizi teşvik etmesini önleyen sterik bir blok oluşturduğu düşünülmektedir. Glutamin-61, GTP hidroliz mekanizmasının bir parçasıdır, bu nedenle bu kalıntıdaki mutasyonlar hem içsel hem de GAP aracılı GTP hidrolizini yok etmektedir. A146 mutasyonları (kolorektal kanserde %4) gibi nükleotid için afinitiyi azaltan mutasyonlar da meydana gelmektedir (Edkins vd. 2006, Simanshu vd. 2017). A146 mutantları ve diğerleri (örneğin, T158A, R164Q ve K176Q), GDP'nin hızla ayrışmasına izin vererek, upstream sinyalleri ve GEF'lerin yardımı olmaksızın Ras'ın GTP-formunda anormal birikimiyle sonuçlanır. Tüm bu aktive edici mutasyonların net sonucu, upstream girdisi olmadan artan GTP yüklemesidir. Onkojenik Ras proteinleri ile ilişkili GTP seviyeleri, hücreleri ekilibriyumya 32-P ile işaretleyerek, ve ardından immünopresipitasyon ve bağlı nükleotidin TLC ile analizi ile deneysel olarak ölçülebilir veya RAF'ın Ras bağlama alanını kullanarak pull-down deneyleri yapılabilir. GTP durumundaki Ras oranı, GDP-kapalı oranı ve GTPaz oranından da hesaplanabilir. GTP'nin hücrel düzeylerinin GDP'yi aştığını varsayıldığında, $\text{Ras.GTP} / \text{Ras.GDP} = k_{\text{off}} / k_{\text{cat}}$. Tüm G12, G13 ve Q61 mutantları için k_{cat} , k_{off} 'tan çok daha yavaştır, dolayısıyla RAS proteininin çoğu GTP durumundadır. Onkojenik bir mutant için nispeten yüksek bir intristik GTPaz oranına sahip olan G12C bile kararlı durumda ~75% GTP'ye bağlıdır (Patricelli vd. 2016, Simanshu vd. 2017).

2.6.1 Kanserde kras mutasyonları

Ras protein ailesinin üç kurucu üyesi vardır; Kras, Nras ve Hras. Ras genlerindeki

mutasyonlar, insanlarda görülen tüm kanser çeşitlerinin yaklaşık dörtte birinde bulunur ve global çapta yılda bir milyona kadar ölüme neden olur. Bu yanlış mutasyonların çoğu Kras'ta (%85) ve daha az sıklıkla Nras (%12) ve Hras'da (% 3) ortaya çıkar (Simanshu vd. 2017). Çoğu Ras mutasyonu, 12, 13 ve 61 amino asit kodonlarında meydana gelir. Bu üç kalıntıdaki mutasyon sıklığı ve mutasyona uğramış Ras izoformu, farklı kanser türleri arasında değişiklik gösterir [9]. Çoğu Kras mutasyonu, normalde glisin kalıntısı tarafından işgal edilen kalıntı 12'de meydana gelir. Kalıntı 12'deki glisinin, prolin dışındaki bir şeye mutasyonu, GAP proteinlerinin Kras'a bağlanmasını önleyen, GTP hidrolizini azaltan ve böylece GTP-bağlı aktif formun seviyelerini artıran sterik engelle neden olur. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) en yaygın mutasyon KrasG12C'dir (glisinden sisteine) (Simanshu vd. 2017, Christensen vd. 2020).

Bu mutasyon, tüm Kras mutasyonlarının neredeyse yarısını oluşturur; ardından G12V (glisinden valine) ve G12D'yi (glisinden aspartik aside) gelir (Matikas vd. 2017). Daha önce belirtildiği gibi, KrasG12C mutantındaki reaktif sistein, bu varyantı küçük moleküllü ilaçlarla geri döndürülemez şekilde hedeflemek için bir fırsat sağlar. Akciğer kanseri ile ilgili genomik çalışmalar, G12C dahil Kras mutasyonlarının EGFR, ALK, ROS1, RET ve BRAF dahil olmak üzere diğer NSCLC onkojenik sürücü (driver) mutasyonları ile ayrışık olduğunu göstermiştir, bu da Kras mutasyonlarının, hedefe yönelik tedavi seçenekleri olmayan kendine özgü bir akciğer kanseri setini oluşturduğunu göstermektedir (Campbell vd. 2016, Zehir vd. 2017). Endojen fare modellerinde yapılan Akciğer kanseri çalışmaları, onkojenik Kras'ın diğer onkojenik driver mutasyonlarıyla birlikte ekspresyonunun onkojen kaynaklı senesansa yol açtığını ortaya koymaktadır, bu da muhtemelen aynı tümörde neden nadiren tespit edilebildiğini açıklamaktadır (Cisowski vd. 2015, 2017). Bununla birlikte, NSCLC'deki Kras mutasyonları sıklıkla, hücreleri oldukça kötücül ve agresif tümör hücrelerine dönüştürmek için mutant RAS ile iş birliği yapan STK11, KEAP1 ve TP53'teki mutasyonlarla birlikte ortaya çıkar. Yüzlerce kanser hücre hattında binlerce gen ürününün ekspresyonunu baskılamak için shRNA teknolojisi ile gerçekleştirilen fonksiyonel genomik çalışmalar, Kras mutant kanser hücrelerinin büyüme ve sağ kalım için Kras fonksiyonuna bağlı olduğunu ortaya koymuştur (McDonald vd. 2017, Tsherniak vd. 2017, Christensen vd. 2020).

Kras, hücrel sinyâl iletiminde rol oynayan H-Ras ve N-Ras içeren Ras onkogen ailelerinin en sık mutasyona uğramış izoformlarından biridir ve bu nedenle bunların aktivasyonu, pankreas kanseri (PK) dahil birçok kanser türünde artmış hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilişkilidir. Kras mutasyonu sıklıkla kolorektal, akciğer, multipl miyelom ve kronik pankreatit hastalarında meydana gelir. Daha sonra pankreas kanseri gelişimine yol açar. Bu nedenle, Kras, kötüçül fenotipin gelişimi ve sürdürülmesinde kilit rol oynar. En yaygın mutasyonun, Ras GTPaz aktivitesinin aktivasyonu ile ilgili olan kodon 12'de (KrasG12D) olduğu görülmüştür (Ali vd. 2012).

Kras onkogeni, Ras gen ailesinin üç üyesinden biridir ve Kras geninde doğal olarak meydana gelen mutasyonlar, kodon 12 ve 13'te lokalize edilmiştir. Bu mutasyon genellikle kodon 12 ile sınırlıdır, bu nedenle pankreas kanserinin 'işareti' olarak görülür ve muhtemelen irsi pankreas adenokarsinomu ile ilişkilidir (Lin vd. 2013).

Kras, aktif olmayan GDP'ye bağılı "kapalı" durum ile aktif GTP'ye bağılı "açık" durum arasında geçiş yapan bir guanin nükleotit bağlayıcı proteindir; ikincisi, onkogenezi, metastaz ve tümör ilerlemesini yöneten yollara aracılık eden çeşitli alt efektör proteinlerini bağlar ve etkinleştirir. Kras'ın mutasyonel aktivasyonu (kodon G12, G13 ve Q61'deki nokta mutasyonları), insan pankreas kanserlerinin %90'ından fazlasında meydana gelir, bu da aktif GTP-bağılı durumda Kras birikimi ve downstream sinyalleme yollarının kalıcı aktivasyonu ile sonuçlanır. Onkojenik Kras kaynaklı pankreas tümörjenezinin fare modellerinden elde edilen veriler, mutasyonla aktive edilen Kras'ın sadece pankreas karsinojenezinin başlamasına neden olmadığını (Chuang vd. 2017), aynı zamanda tümör hücresi sağ kalımı için de gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Collins vd. 2012). Terapötik açıdan bakıldığında, onkojenik Kras, pankreas kanserinde klinik açıdan ilişkili bir hedefi temsil etmektedir (Chuang vd.2017).

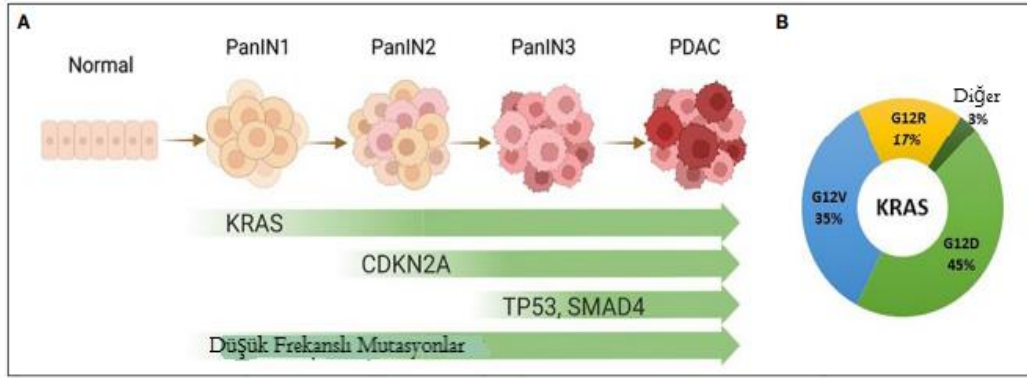
Kras, insan adenokarsinomlarının patogeneğinde rol oynayan ana onkojendir. Hatta Kras genindeki mutasyonlar, insan kanserlerinde en sık görülen onkojen değışikliğidir. Kras mutasyonları, çeşitli lokasyonlardaki tümörlerin gelişiminde erken dönemde görülen bir olgudur. Ayrıca nokta mutasyonuyla aktivasyonun en iyi örneğidirler (Porta vd. 2009).

Onkojenik ras aktivasyonu, hücresel ve moleküler bağlama bağlı olarak, senesans programının aktivasyonundan artmış hücre proliferasyonuna ve apoptozun inhibisyonuna kadar çok çeşitli biyolojik yanıtlarla sonuçlanabilir (Malumbres ve Barbacid 2003, Schubert vd. 2007). Laboratuvar deneyleri, ras genlerinin, bütün dumanının bileşenleri de dahil olmak üzere pek çok kimyasal kanserojen için kritik DNA hedefleri olduğunu göstermiştir ve Ras değişiklikleri, laboratuvar çalışmalarında kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, Ras genleri üzerine yapılan ilk çalışmalardan otuz yıl sonra bile, potansiyel yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin insanlarda Kras mutasyonlarının oluşumu ve kalıcılığı üzerindeki etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir. Tümörlerde bütün kullanımı ile Kras mutasyonları arasındaki ilişki de buna dahildir (Porta vd. 2009,2003, Slattery vd. 2009). Pankreas adenokarsinomlarında Kras mutasyonlarının teşhisinde prevalans yaklaşık %70-90, kolorektal adenokarsinomlarda %30 ve akciğer adenokarsinomlarında %15–40'dır. Bu mutasyonların sıklığı, aynı lokasyonlardaki diğer histolojik tiplerde çok daha düşüktür; örneğin, akciğerin skuamöz hücreli karsinomunda Kras mutasyonlarının prevalansı sadece %5 civarındadır ve akciğerin küçük hücreli karsinomasında %1'den azdır. Pankreas intraduktal adenokarsinomlarda bulunanlar dışındaki Kras mutasyonları diğer pankreas (ekzokrin veya endokrin) neoplazmalarında ve adenokarsinom dışı kolon ve rektum malign tümörlerinde oldukça nadirdir. Ras mutasyonları, insanda görülen safra yolu, idrar kesesi, serviks, yumurtalık, endometriyum, karaciğer, yemek borusu ve tiroid tümörlerinde ve ayrıca akut miyeloid lösemi ve melanomda da ortalama %10'un üzerindeki sıklıklarda tespit edilir (Porta vd. 2009).

2.6.2 Pankreas tümöründe kras

Kolorektal ve akciğer karsinomu yanı sıra, Ras yolunun düzensizliği ile ilişkili vakaların yaklaşık %85'i pankreatik duktal adenokarsinomdur (Hruban vd. 2000). Pankreas kanseri öngörüsünün zayıf prognozu nedeniyle, Kras mutasyonlarının tespiti, tedavisi için yararlı bir prognostik faktör olabilir (Tao vd. 2016). Pankreatik duktal adenokarsinom prekürsörünü arama amacıyla Pankreatik intraepitelyal neoplaziyi (PanIN) tarif eden çalışmalar, ilerlemede önemli bir rolü olduğunu ve sinyal yollarının değişmesinden sorumlu olduğunu göstermiştir. PanIN'den PDAK'ye ilerlemedeki

biyolojik davranışı ve moleküler değişiklikleri anlamak, erken teşhis ve teşhis için noninvazif biyobelirteçlerin tanımlanması ve pankreas kanseri ilerlemesinin kontrolüne yönelik önleyici ve terapötik stratejilerin geliştirilmesi için çok önemlidir (Guo vd. 2016).



Şekil 2.3 Pankreas kanserindeki Kras Onkogeni (A) Kras mutasyonlu pankreas kanseri'nin çok aşamalı geliştirme modeli. (B) Pankreas kanserindeki en yaygın Kras mutasyonları (Sahar, Husain ve Asfar 2022)

Yapılan bir deneyde, Kras mutasyonel aktivasyonu, TP53, SMAD4 ve CDKN2A (p16 INK4A ve p19 ARF'yi kodlar) tümör baskılayıcı genlerinin mutasyonel kaybının bir sonucu olarak pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK) tespit edilmiştir (Eser vd. 2014, Asati vd. 2017). Yakın tarihli bir çalışma, Kras'ın sık mutasyona bağlı olarak pankreas kanseri tedavisi için en önemli terapötik hedef olmaya devam ettiğini göstermiştir. PDAK'nin ekson sekanslamasından önce, bu kanserin ilerlemesi ile ilişkili olduğu bilinen en sık mutasyona uğramış genler, TP53, CDKN2A ve SMAD4 tümör baskılayıcıları olan Kras'dır. Bunların tümü, dizi analizi çalışmasında en sık mutasyona uğramış genler olarak bulundu; en yüksek kanıt ise Kras mutasyonları ile bulundu. Yirmi dört pankreas kanseri türünde 20.661 genin dizi analizlerinin sonucu, en sık mutasyona uğramış dört genin yüz ondört PDAK tümöründen yüz ondördünde bulunan Kras mutasyonları olduğunu göstermiştir (Asati vd. 2017). Onkojenik Kras barındıran farelerde pankreatik duktal adenokarsinomların (PDAK'ler) üretilmesinden farklı belirteçlerin sorumlu olduğu ve ayrıca Kras'ı doğrudan veya dolaylı olarak aktive ettiği gösterilmiştir. Bunun dışında, fare modellerinde PDAK geliştirme süresini artıran bazı belirteçler, doğrudan veya dolaylı olarak Ras aktivitesini azaltır. Onkojenik Kras

ekspresyonu arasındaki ilişkili onkojenik stres, apoptoz veya senesans ile sonuçlanabilir. Hücrelerin senesans engelini aşmasına izin veren faktörler (örneğin P16 veya p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin enflamasyonu veya kaybı) dönüşüm sürecine izin verir. Senesans başlangıcını inhibe etmek ve p16 ekspresyonunu bastırmak için Onkojenik Kras'ın yeterli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, enflamasyon varlığı veya tümör baskılayıcı genlerin kaybı, onkojenik Kras yokluğunda pankreas kanserini başlatmak için yeterli değildir (Carriere vd. 2009, Ardito vd. 2012, Navas vd. 2012, Appleman vd. 2012). Pankreas karsinomlarının %80'inden fazlasında, Kras genine ait kodon 12'de mutasyonlar bulunur. Bu mutasyonlar için duodenal sıvının taranması, bu kanserlerin erken teşhisini sağlayabilir ve pankreas karsinomu tanısının konulmasına yardımcı olabilir. Duodenal sıvıda kansere neden olan genlerdeki genetik değişikliklerin tanımlanması, pankreas karsinomunun saptanmasına yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesi için temel oluşturabilir (Asati vd. 2017).

Bununla birlikte, yabani tip Kras'ın pankreas kanserinin ilerlemesindeki rolü bilinmemektedir. Duan ve ark., Ras GTPaz aktive edici proteinin (DAB2IP) pankreas kanserinde ekspresyonunu ve klinik önemini gösterdi. DAB2IP ekspresyonu pankreas kanseri olan hastalarda, kanserli olmayanlara kıyasla azaldı. DAB2IP ekspresyonu Kras geni, perinöral invazyon ve hastalığın klinik evresi ile ilişkilendirildi. Bu veriler, DAB2IP ekspresyonunun, potansiyel bir prognostik gösterge olarak ve pankreas kanseri olan hastalarda terapötik müdahale için umut verici bir moleküler hedef olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Duan vd. 2013). Alberts, Ras'ta (özellikle de Kras'ta) erken aşamada görülen mutasyonların pankreas kanserinin gelişiminden sorumlu olduğunu göstermiştir. FTI'ler veya antisens oligonükleotitler dahil olmak üzere Ras üzerindeki hedefle ilgili terapötik yaklaşımlar, hastalarda önemli bir gelişime yol açmamıştır. Bununla birlikte, diğer moleküler değişikliklerin, Ras'ın aşırı ekspresyonunu bloke etmek için gerçekleştirilen seçici girişimlerden etkilenmemesi muhtemeldir. Son zamanlarda, anti-kanser ajanlarının geliştirilmesi için diğer hedefe yönelik tedavilerle kombinasyon halinde gerçekleştirilen Ras-hedefli yaklaşımlar çok az ilerleme kaydedilmiştir (Asati vd. 2017). Çeşitli çalışmalar, Kras hedef alınarak pankreas adenokarsinomunun tedavisinin Ras yolunun farklı aşamalarında gerçekleştirildiğini göstermiştir. Örneğin; antisens veya enterferans RNA'nın

transkripsiyon seviyesinde etki göstermesi; farnesil transferaz inhibitörlerinin ve anti-Ras aşılama peptidlerinin, posttranslasyonel düzeyde etki göstermesi; mitojen ile aktive olan protein kinaz inhibitörlerinin, fosfoinositid 3-kinazın, AKT'nin, rapamisinin memeli hedefinin ve RAF'ın çoklu sinyal yollarına etki göstermesi (Bournet vd. 2016). Mevcutta, Wong ve ark., Kras'a giden downstream efektör yolunun PDA tümörleri için hedeflenmiş bir yaklaşım olabileceğini tarif etmektedir. Bu doğrultuda CI-1040A ve AZD6244 gibi metil etil keton (MEK) sinyal inhibitörleri geliştirilmiş fakat hastalıkları ilerlemiş hastaların tedavisi için yapılan klinik denemede başarısız olmuştur. Bu bulgular, PDA'da tek bir yolu hedeflemenin zorluklarını ortaya çıkarmıştır (Wong vd. 2016).

2.7 Pankreas Kanseri Tedavi ve İlaç

Kemoterapi ve cerrahi, PDAK için birincil tedavi seçenekleridir. Ancak hastaların yalnızca %15-20'si tanı anında cerrahi için uygundur. Çoğu PDAK hastası tanı anında uzak metastaz ile başvurur ve primer lezyonun büyük bir cerrahi prosedürle çıkarılmasının sonucu etkilemesi olası değildir. İkinci olarak, pankreas kritik vaskülatüre yakındır. Pankreas dışı yayılımın klinik kanıtı olmayan hastalarda bile, bu damarların primer tümör tarafından önemli ölçüde tutulması veya tıkanması ameliyat için uygunluğu engelleyebilir. Son olarak, genellikle duodenumun bir kısmıyla birlikte pankreasın kısmen çıkarılması ve novo anastomozların oluşturulması, sindirim ve sistemik metabolizma üzerinde kalıcı etkileri olan büyük bir ameliyattır. Buna göre, hastaların operasyona dayanacak ve prosedürden fayda sağlayacak şekilde iyileşecek kadar sağlıklı olmaları gerekir. Cerrahi uygunluğa bakılmaksızın çoğu hasta için klinik bakım, sistemik kemoterapiyi içerir (Zhang vd. 2023).

Geçtiğimiz on yılda, ilerlemiş PDAK hastalarında ilk basamak tedavi olarak iki yeni kombinasyon rejimi ortaya çıkmıştır. Bunlardan ilki kısaltması folfirinox olan 5-florourasil (5-FU), lökovorin, irinotekan ve oksaliptatin kombinasyonudur. İkincisi ise gemsitabin ve paklitakselin albumin nanopartikül konjugatı (nab-paklitaksel) kombinasyonudur. Birinci basamak rejimlerde ilerleme gösteren hastalara, daha önce bu ajanlardan herhangi birini almamış olmaları koşuluyla, diğer rejime veya 5-FU ile

kombinasyon halinde irinotekanın lipo somal formülasyonunu içeren ikinci basamak bir rejime geçme imkanı sunulabilir. Genel olarak, PDAK'ta ikinci basamak rejimler ve ötesi için evrensel standartlar yoktur. Tedavinin seyri genellikle hastanın performans durumuna, "uygulanabilir" hedeflerin varlığına ve uygun klinik çalışmaların mevcudiyetine göre belirlenir (Zhang vd. 2023, Gurreri vd. 2023).

Lokal olarak ilerlemiş veya metastatik PDAK hastaları genellikle küratif olmayan hastalar olarak kabul edilir ve palyatif amaç ile yönetilir. Birkaç çalışma, sistemik kemoterapinin bu durumda genel sağ kalımı iyileştirdiğini göstermiştir. Folfirinox, prodige 4-accord11 çalışmasında değerlendirilmiş ve ileri evre PDAK hastalarında standart doz gemitabin ile folfirinox (5-florourasil, folinik asit, irinotekan ve oksaliptatin) kullanımı karşılaştırılmıştır. Bu çok merkezli faz 3 çalışmasında 342 hasta randomize edilmiş ve folfirinox lehine 6,8 aya karşılık 11,1 aylık bir medyan genel sağkalım (mOS) faydası görülmüştür. Başka bir faz 3 çalışmada (MPACT), 861 hasta nab-paklitaksel ve gemitabin (Gem-nabP) veya tek başına gemitabine randomize edilmiştir. mOS, Gem-nabP grubunda (8,5 aya karşı 6,7 ay) ve progresyonsuz sağkalımda (5,5'e karşı 3,7 ay) daha üstün bulunmuştur. Folfirinox ve Gem-nabP'nin bire bir randomize karşılaştırması yoktur, her ikisi de rezeke edilemeyen PDAK için makul birinci basamak tedaviler olarak kabul edilmektedir. Klinik uygulamada, folfirinox genellikle uygun hastalar için ayrılırken, Gem-nabP vasat performans, komorbiditeler veya ileri yaştaki hastalar için korunmaktadır. Retrospektif verilerden folfirinox 'un OS'yi iyileştirebileceğine, ancak hassas popülasyonda daha fazla toksisiteye neden olduğuna dair kanıtlar vardır. Bu nedenle, performans durumu daha kötü olan (ECOG ≥ 2) PDAK hastaları için gemitabin monoterapisi veya folfox makul tedaviler olarak kabul edilmektedir. Birinci basamak gemitabin bazlı tedavide progresyondan sonra, tek başına 5FU'ya kıyasla 5FU ile kombinasyon halinde nanolipozomal irinotekan, Napoli-1 çalışmasında PDAK hastalarında 6,1 aya karşı 4,2 aylık bir mOS sağkalım avantajına sahip olduğu gösterilmiştir. Şimdi bu kombinasyon standart ikinci basamak tedavidir. PDAK hastalarının yaklaşık %5'i germline BRCA mutasyonları taşımaktadır. DNA hasar yanıtı (DDR) yolağı aberasyonları olan hastalarda sentetik letalite ve PARP inhibisyonunun rolü göz önüne alındığında, germline BRCA mutasyonları olan PDAK hastalarında anahtar idame tedavisi olarak

Olaparib'in (bir PARP İnhibitörü) etkinliğini araştırmak için POLO çalışması yapılmıştı. Önemli mPFS avantajı ve QOL sonuçlarına dayanarak (7,4 aya karşı 3,8 ay, HR 0,53), Olaparib idame tedavisi BRCA mutasyonlu PDAK hastaları için onaylanmıştır. Randomize faz 2 çalışmasında, 153 metastatik PDAK hastasında standart gem-nabP (Gün 1,8 15) ve ardından mfolfox (6 haftalık döngülerin 29. gününde) karşılaştırılmıştır. Sonuçlar mOS 13,7 aya karşı 9,4 ay ile dikkate değerd, ancak derece 3 sitopeniler deneysel kolda daha yüksekti. Nab-P/Gem-mfolfox alan hastalarda 12 aylık (%55,3'e karşı %35,4) ve 24 aylık (%22,4'e karşı %7,6) sağkalım anlamlı olarak daha yüksektir. Bu, metastatik PDAK tedavisinde potansiyel bir ilk basamak seçeneği olabilir (Gurreri vd. 2023).

PDAK rezeksiyonundan sonra önerilen adjuvan kemoterapi, fonksiyonel durumu yüksek olan bireyler için modifiye folfirinox (florourasil, oksaliplatin, irinotekan, lökovorin) veya fonksiyonel durumu daha kötü olan bireyler için gemsitabin ve kapesitabin veya tek başına gemsitabindir. Adjuvan tedavi için öneriler son yirmi yılda yapılan birkaç önemli çalışmaya dayanmaktadır. Başlıca kemoterapi ajanları, DNA sentezini ve onarımını doğrudan etkileyen DNA'ya zarar veren ajanlar (oksaliplatin, irinotekan) ve gemsitabin ve florourasil gibi antimetabolitlerdir. Rezeke edilen PDAK'ta adjuvan kemoterapinin etkinliği, PDAK'ın cerrahi rezeksiyonu yapılan 368 hastanın 6 aylık adjuvan gemsitabin almak veya gözlem altında kalmak üzere randomize edildiği conko-001 çalışmasında tanımlanmıştır. Gemsitabin ile tedavi edilen hastalarda gözlem uygulananlara kıyasla daha üstün medyan genel sağkalım gözlenmiştir (22,8 vs 20,2 ay; hazardratio [HR], 0,76 [%95 CI, 0,61-0,95]), bu da sağkalımda mütevazı bir uzamayı temsil etmektedir. Sonraki çalışmalarda gemsitabin ile tek ajan fluorourasil ve 2 ve 3 ilaçlı kombinasyon rejimleri karşılaştırılmıştır. ESPAC-4 faz 3 çalışması, çift ajan tedavisinin tek başına gemsitabine göre ek bir sağkalım faydası olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, 730 hasta 6 aylık adjuvan gemsitabin artı oral bir antimetabolit olan kapesitabin veya tek başına gemsitabin almak üzere randomize edilmiştir. Kombinasyon tedavisi, tek başına gemsitabine kıyas ile medyan genel sağkalımı iyileştirmiştir (28,0 vs 25,5 ay; HR, 0,82 [%95 CI, 0,68-0,98]). Son olarak, 2018 çok merkezli PRODIGE-24 çalışmasında, düşük serum karbonhidrat antiijeni 19-9 (< 180 U/mL) ve mükemmel performans durumu (Doğu Kooperatif Onkoloji Grubu skoru, 0-1) ile birlikte rezeke

edilmiş PDAK'lı 493 hasta, 6 aylık adjuvan modifiye folfirinox veya tek başına gemsitabin almak üzere randomize edilmiştir. Bu çalışmada, adjuvan ortamda gemsitabin ile yapılan önceki çalışmalara kıyasla her iki grupta da olumlu sağkalım meydana gelmiştir ve muhtemelen daha yüksek oranda seçilmiş hastaların dahil edilmesini yansıtmaktadır: modifiye folfirinox ile tedavi edilen hastalarda genel sağkalım 54,4 ay iken, gemsitabin ile tedavi edilen hastalarda 35 ay olmuştur (HR, 0,64 [%95 CI, 0,48-0,86]). Bu nedenle, modifiye folfirinox, PDAK'ın cerrahi rezeksiyonundan sonra mükemmel fonksiyonel duruma sahip bireylerde standart adjuvan tedavi olarak önerilmektedir. Genel olarak, modifiye folfirinox ile tedavinin uygun olmadığı hastalarda gemsitabin/kapesitabin veya tek başına gemsitabin düşünülebilir. Rezeke edilmiş PDAK için adjuvan tedavi olarak radyoterapinin rolü tartışmalıdır. Eski çalışmalar PDAK için, adjuvan radyasyonu desteklememiştir çünkü genel sağkalım avantajı gösterilmemiştir (Zhang, 2023).

PDAK'ta küratif amaçlı cerrahi sonrası adjuvan kemoterapi geliştirmekte olan bir uygulamadır. 5FU (espac-1) veya Gemsitabin (espac-3, conko 001) ile tek ajan adjuvan tedavisinin sağkalım faydasına rağmen, mevcut uygulamayı belirleyen en yeni iki çalışma espac-4 ve prodige 24'tür. Espac-4, 732 hastayı kapsayan çalışmalarında gemsitabin/kapesitabin kombinasyonunun gemsitabin monoterapisine kıyasla daha iyi Genel Sağkalım (28 vs 25,5 ay) sağladığını bulmuştur. Prodige 24, adjuvan ortamda modifiye folfirinox rejimini (azaltılmış irinotekan ve bolus 5-FU olmadan) gemsitabin ile karşılaştıran çok uluslu büyük bir faz 3 çalışmaydı. Sonuçlar m folfirinox lehine daha iyi medyan Genel Sağkalım (54,4 aya karşı 35 ay) göstermiştir. Beklendiği gibi, m folfirinox daha fazla toksisite ile ilişkilendirilmiştir. Modifiye folfirinox 24 hafta boyunca cerrahi rezeksiyon sonrası iyi performanslı hastalar için standart tedavi olmaya devam etmektedir. Kapesitabinli veya kapesitabinsiz gemsitabin, m folfirinox 'u tolere edemeyenler için bir seçenektir (Nussinov vd. 2021).

2.7.1 Kras hedefli ilaç

Ras'ta onkogenik mutasyonun en fazla mutasyon bölgesi P-döngüsündeki kodon 12 ve 13 ve anahtar II'deki kodon 61'dir. En sık mutasyona uğrayan Kras, Ras mutasyonunun

%86'sını içermektedir. Kras mutasyonları pankreas, kolorektal ve akciğer kanserlerinde ortaya çıkar. Sıcak nokta pozisyonlarının büyük çoğunluğu kodon 12'dedir. Nras mutasyonları melanom ve miyeloid lösemide meydana gelir; en yaygın mutasyon bölgesi kodon 61'dir. Hras mutasyonları mesane kanserinde en yüksek frekansta meydana gelir ve hotspot kodonlar olarak bilinen ekzon 12 ve 61'dir. Ars-583, Kras G12C'nin GDP'ye bağlı durumu ile reaksiyona girer. ARS-583, hücre dizileri grubu boyunca aşağı yönde MAPK/PI3K sinyalini inhibe eder ve akciğer kanserlerinin %20'sini oluşturan Kras G12C mutasyonuna sahip hastaların tedavisini doğrudan inhibe eder. Ars-1620 seçici olarak ve yüksek potansiyele sahip olarak Kras G12C'deki anahtar II cebini hedefler. Ars-1620, Kras G12C mutasyonu taşıyan deri altı ksenograft modellerinde anti-tümör aktiviteye ulaşır. Ryan ve ark. Kras G12C güdümlü akciğer, pankreas ve kolon kanseri hücrelerinde ars-1620 ile tedaviden sonra MAPK sinyalleşmesinin hızlı adaptif Ras yolu geri besleme reaktivasyonunu gözlemlemiştir; bu durum, yukarı regüle edilmiş RTK sinyalleşmesi yoluyla ikincil direnci düşündürmektedir. Amg 510 ile tedavi, Kras G12C fare xenograftlarında geriler ve proinflatuar tümör mikro ortamını indükler. Kovalent bir Kras G12C inhibitörü olan mrtx849, GDP'ye bağlı durumda mutant sistein 12'yi seçici olarak değiştirir. Mrtx849, Kras G12C pozitif hücre hatlarında ve çoklu tümör tiplerinden hastadan türetilmiş ksenograft modellerinde tümör regresyonuna sahiptir. Küçük molekülü SOS1 inhibitörü BI-3406, SOS'un katalitik alanıyla etkileşime girerek Kras ile etkileşime müdahale eder ve böylece G12 ve G13 dahil olmak üzere Kras mutant kanserinde tümör hücresi proliferasyonunu kısıtlar. Bir BI-3406 analogu olan BI 1701963, şu anda Kras mutant katı tümörleri olan hastalarda BI 1701963'ün tek başına ve trametinib ile kombinasyon halinde ön etkinliğini test eden bir faz I denemesindedir. Ponatinib ve amg-47a bileşikleri, Kras G12V proteinlerinin seviyelerini seçici olarak azaltır (Kim vd. 2021, Hoffman vd. 2022).

2.8 Faj Görüntüleme Yöntemi / Faj Sunum Tekniği

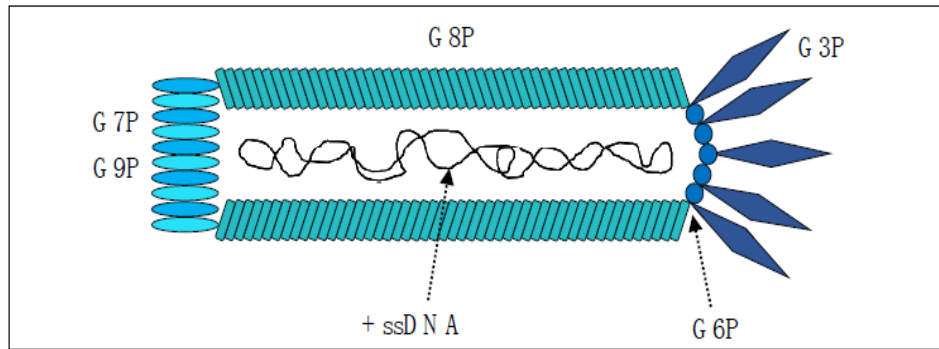
İlk 1985 yılında George P. Smith tarafından tanımlanan faj sunum teknolojisi, yabancı (poli)peptitlerin bakteriyofaj yüzeyindeki kapsid proteinlerine birleşik olarak tanımlamasına dayanmaktadır (Smith 1985). Yüzey görüntülenmesi, kapsid yapısındaki

proteinlerin gen yapısında peptit kodlayan bir gen yerleştirilerek yapılır. Faj partiküllerinin üzerinde biriken milyonlarca peptit, bir faj gösterim peptit kütüphanesi oluşturur. Normal sentetiklerin oluşturduğu molekül kütüphanelerinden farklı olarak gerektiğinde aynı anda 1010 farklı peptit görüntülenebilir (Smith ve Petrenko, 1997, Bratkoviç 2010). Ayrıca faj kütüphanelerinden seçilen peptitler genellikle hedef proteinlerin yüzeyindeki ilgili alanları hedefler (örn. Aktif enzimler veya allosterik alanlar) ve bu sebeple sıklıkla hedef proteinin aktivitesini etkiler (Grøn ve Hyde-DeRuyscher, 2000, Ja vd. 2005). Faj görüntüleme son yirmi yıldır (i) ilaç geliştirme/tasarım (reseptör agonistlerin ve antagonistlerin görüntülenmesi, ilaç hedefinin doğrulanması, aşı geliştirilmesi, yeni antikörlerin, antikor parçacıklarının ve antikor taşıyıcılarının çeşitli iskele proteinleri üzerindeki radomize parçacıkların in vitro seçilmesi, odaklı ilaç ve gen terapisine yönelik ajanların geliştirilmesi), (ii) proteomiks (protein-protein etkileşiminin analizi, epitop haritalandırma, (özgün) enzim substratları ve inhibitörlerinin belirlenmesi, muteinlerin çoğalma hızının ve proteolitiğinin gelişmesi) ve (iii) enzimoloji (katalitik antikörlerin (abzimler) ve özgün karakteristiğe sahip enzimlerin tasarlanması) dahil pek çok bilimsel alanı etkilemiştir (Molek vd. 2011).

Faj gösterimi peptit kütüphaneleri litik veya filamentöz faj, yahut fajmid vektörler kullanılarak tasarlanır. En sık tercih edilen görüntüleme sistemler filamentöz faj temellidir. Bu sistemde peptitler ya majör (pVIII) ya da minör (pIII) protein kılıflarına bağlanır. Kütüphane peptitleri taşıyan protein kılıfının çeşidi görüntülemenin valansını belirler, bu da birden az veya viryon başına binlerce olabilir. Yüksek sayılı görüntülenme avidite ile ilintilidir ve genellikle düşük avidite peptitlerin seçilmesinden kaynaklanır, ama bazı durumlarda bu tercih edilebilir (Gram vd. 1992, Nanduri vd. 2007).

Faj gösterim tekniğinin merkezinde antikörleri göstermek için kullanılan bakteriyofajlar yer almaktadır. Faj gösterim yöntemi için T4, lambda ya da filamentli M13 bakteriyofajının da içinde bulunduğu farklı bakteriyofaj sistemleri kullanılmaktadır. Faj sunum yönteminin teknolojisi için M13 gibi filamentöz bakteriyofajların enfekte edici doğası ve döngüsü kullanılmaktadır. M13 bakteriyofajı, faj gösterim yönteminde en fazla kullanılan filamentöz fajdır. Protein p VIII'den oluşan silindirik bir kapsüle sahip

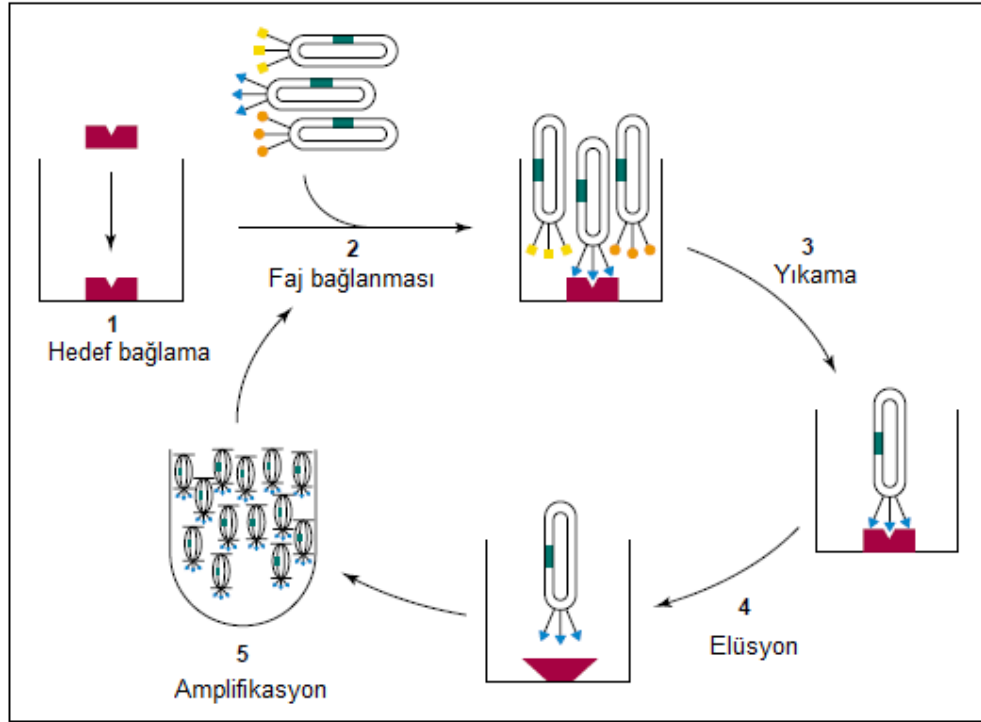
olması ile tanınan bir bakteriyofajdır. Kapsid bir ucunda beş tane pIII ve pVI proteini kopyası ve diğer ucunda pVII ve pIX proteinlerinin üç ile beş kopyası gibi, farklı proteinlerin kopyalarını içermektedir. Viral enfeksiyon döngüsü, pIII proteininin bakteriye bağlanması ve daha sonra tek sarmallı DNA bakteriyofaj genomunun bakteriye enjeksiyonu ile başlamaktadır. Bakterinin içine girdikten sonra, tek iplikçikli DNA, konakçı organizmanın replikasyon mekanizması tarafından çift iplikli DNA'ya (DNA'nın replikatif formu) dönüştürmektedir. Daha sonra, DNA, replikasyonu ile çoğaltılır ve elde edilen ürün, DNA paketleme için gerekli proteinleri bakteriyofaj kapsidine kodlayan tek zincirli bir DNA molekülüdür. Son olarak, olgun bakteriyofajlar hücreyi kaybetmeden bakteriden çıkmaktadır. Bu da filamentli fajların karakteristik bir özelliğidir. Faj gösterimi, viral kaplama proteinlerine kaynaştırılmış arzu edilen peptitlerin, M13 faj gibi bir bakteriyofajın yüzeyinde gösterildiği, etkili bir moleküler tekniktir. Faj gösterim yöntemi sürecinde, yabancı peptitler genellikle pIII ve pVIII proteinlerinin N-terminal ucuna birleştirilir. Yabancı peptit fragmanları 6 ila 43 amino asit arasında değişir, çünkü çok büyük peptitler virüsün enfeksiyöz aktivitesine veya kapsid düzenine potansiyel olarak müdahale edebilir (Ledsgaard vd. 2018).



Şekil 2.4 M13 Bakteriyofajı (Ledsgaard vd. 2018)

Bu teknoloji, bakteriyofaj protein kılıfına birleşik çeşitli polipeptitlerden bir kütüphane oluşturulmasına dayanır; polipeptitin DNA kodu faj parçacığının içinde bulunur. Bu durum fenotip ve genotip arasında fiziki bir bağ oluşturur. Bu bağ faj parçacıklarından oluşan bileşik kütüphaneden afinite seçiminin yapılmasını ve istenen hedefe bağlanabilecek peptitlerin gösterilmesini sağlarken aynı zamanda genetik kimliğin korunmasını sağlamaktadır (Christensen vd. 2001). Afinite seçiminin bir döngüsünde

izole halde bulunan faj, *E. coli* konak hücrelerin enjekte edilmesiyle çoğaltılabilir ve birden fazla afinite seçimi için kullanılabilir. Afinite seçimi için kullanılan tipik protokol tabakaların yüzeyinde veya mikrotitre plakaların girintilerinde bulunan hedeflerin immobilize hale getirilmesiyle başlar (1. Adım). Daha sonra kütüphaneden alınan fajlar immobilize hedeflerle inkübe edilir (2. Adım) ve hedef protein için afinite gösteren peptit ortaya çıkaran faj patiküllerinin bağlanmasına izin verilir. Plaka yıkanarak bağlı olmayan fajlardan arındırılır (3. Adım) ve bağlı fazlar hedef proteinin denatüre edilmesiyle tabakadan ayrıştırılır (4. Adım). Ayrıştırılan fajlar *E. coli* hücrelerle inkübe edilerek hedef protein için afinite gösteren peptit ortaya çıkaran fajların alt popülasyonu enfekte edilir ve çoğaltılır (5. Adım). Çoğaltılan fajlar, belirli sıkı bağlı peptitler kalıncaya kadar sonraki seçim döngülerinde kullanılır (Ehrlich vd. 2000).



Şekil 2.5 Faj gösterim tekniğinin uygulama basamakları (Hamzeh- Mivehroud vd. 2013)

Bu noktada münferit fajlar izole edilir, görüntülenen peptiti kodlayan DNS sekansı belirlenir ve peptit sekansı ortaya çıkar. Afinite seçimi süreci pek çok hedef sınıfı üzerinde gerçekleştirilmiş ve ayrıca hedefin immobilize edilmesi için pek çok metot kullanılmıştır (Sidhu vd. 2000). Faj görüntüleme aslen pIII adlı faj protein kılıfına ait

N-terminusa bağılı peptitlerle geliştirilmiştir. Faj görüntüleme sistemleri peptit ligandların tanımlanması için faydalıdır. Faj görüntüleme, ilaç geliştirmede kullanılan geleneksel rastlantısal taramaya nazaran kolaylık, maliyet etkinliği ve hız bakımından avantajlıdır. Faj görüntüleme teknolojileri ilaç geliştirme, özellikle de özgün fonksiyonları olan ligandların belirlenmesi için son derece güçlü bir araçtır (Hamzeh-Mivehroud vd. 2013).

İçinde büyük kütüphanelerle birlikte yüksek hacimli taramalar bulunduran peptit faj görüntüleme, kliniksel olarak kullanılabilir peptit ve peptidomimetiklerin gelişiminde önemli rol oynamıştır. Yukarıda belirtildiği gibi peptit ligandlar seçilip faj kütüphanesinde belirlendikten sonra genellikle klinik olarak kullanılabilmesi için modifiye edilmeleri gerekir. Bunun nedeni kısmen, bozulmamış proteinlerden avantajlı olmalarına rağmen zayıf farmakokinetik özellikler taşımalarıdır. Bunlar genellikle (özellikle ağızdan alındığında) yarılanma süresinin kısa olması, hızlı enzimatik degradasyon, bağırsak zarı emiliminin zayıf olması ve hızla vücuttan atılmasıdır. Bu özelliklerin hepsi biyoyararlanımın düşük olmasına neden olur. Buna rağmen peptitler hormonlar, nörotransmitterler, sitokinler, antijenler ve peptit protein non-kovalent etkileşimle ilgili büyüme faktörleri dahil biyolojik olarak aktif önemli bir molekül sınıfını oluşturur ve böylelikle pek çok biyolojik sürecin ve biyokimyasal yolun kontrol edilmesine yardımcı olur. Sonuç olarak peptit temelli tedaviler ilaç keşfi ve gelişimi alanında büyük ilgi görmüştür. Peptitler günümüzde tanı ve tedavi amaçlı ilaçlar olarak endokrinoloji, onkoloji, üroloji ve obstetrik alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Hamzeh-Mivehroud vd. 2013).

Faj görüntüleme yönteminin avantajı

Faj sunum teknolojisinin, ligandları izole etmek için ilaç keşfi, afinite kromatografisi, protein-protein etkileşimleri, antikorların epitop haritalaması, antikor fragmanlarını izole etmesi, görüntülenen proteinlerin bağlanma afinitesinin mühendisliği, organlara veya dokulara “ev” yapan peptitlerin tanımlanması için güçlü bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Teknolojinin temeli, bir bakteriyofaj kapsid proteinine kaynaşmış polipeptit varyantlarının bir kütüphanesinin inşasıdır; polipeptidi kodlayan DNA faj partikülü içinde bulunur. Bu, ilgilenilen bir hedefe bağlanan peptitleri sergileyen faj

partiküllerinin kombinatorial kütüphanesinden afinite seçimine izin veren fenotip ve genotip arasında, genetik kimliği de koruyarak, fiziksel bir bağlantı oluşturur. Bir afinite seçimi döngüsünde izole edilen faj, *E. coli* konakçı hücrelerinin enfeksiyonu ile çoğaltılabilir ve ek afinite seçimi döngüleri için kullanılabilir (Christensen vd. 2001).

Tarihsel olarak, hastalıkların tedavisine yönelik yeni ilaçlar tesadüfen veya doğal ilaçlardaki aktif bileşenlerin izolasyonu yoluyla tanımlanmaktadır. Sentetik kimyanın ilerlemesi ve yapısal biyolojiye ilişkin anlayışın artmasıyla birlikte, daha akılcı ilaç tasarımı yaklaşımları kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler biyolojideki modern devrim, ilaç keşfi ve geliştirilmesi için başka bir araç daha eklemiştir. Özellikle faj gösterimi gibi in vitro rekombinant teknolojiler, ilaç geliştirmeye uygun adayların keşfi için güçlü platformlar olarak ortaya çıkmıştır. Faj gösterimi, büyük ölçüde günümüzün önemli ilaç keşif platformlarından biri haline gelmiştir. Başarılı ilaçların pek çok özelliğini (örneğin, etki gücü, özgüllük, çapraz reaktivite ve kararlılık) tasarlama yeteneği ile birlikte peptitler, antikorlar ve diğer proteinler de dahil olmak üzere biyolojik maddelerin tanımlanmasına olanak tanımaktadır (Newmann vd. 2018).

Faj görüntüleme teknolojisi, fajlar üzerinde çeşitli peptitlerin ve proteinlerin görüntülediği kütüphanelerin oluşturulmasına ve daha sonra in vitro kaydırma yoluyla kütüphaneden en uygun klonun seçilmesine olanak tanır. Bu nedenle, ilgilenilen hedefe afinitesi olan veya hedef dokuya göç etme kabiliyetine sahip olan klonlar kütüphaneden zenginleştirilir. Bu nedenle, faj görüntüleme teknolojisinin gelişimi, geleneksel alanın tarama ve diğer yöntemlerin aksine, hedef peptitler veya proteinler için en uygun dizileri sağlar ve bunların moleküler evriminin anlaşılmasına yardımcı olur. Ribozom görüntüleme ve maya görüntüleme teknolojileri gibi çeşitli moleküler görüntüleme teknolojileri önerilmiş olmasına rağmen, görüntülenebilen moleküllerin yüksek çeşitliliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle faj görüntüleme teknolojisi sıklıkla kullanılmaktadır (Nagano vd. 2021).

Özellikle faj görüntüleme teknolojisi, in vitro antikor üretmenin kolay olması nedeniyle yaşam bilimlerinde ilaç keşfi için güçlü bir platform haline geldi. Kış ve ark. 1990 yılında esnek bir peptit bağlayıcıyla bir araya getirilen değişken ağır zincir (VH) ve

değişken hafif zincirden (VL) oluşan tek zincirli değişken fragman (scFv) antikorunu gösterdi. Daha sonra scFv, fragman antijen bağlama (Fab) ve Camelidae'nin ağır zincir antikorlarından türetilen değişken fragman (VHH) gibi çeşitli antikor formatlarının fajlarda görüntülendiği rapor edilmiştir. Bu nedenle faj görüntüleme teknolojisi, saf, immünize edilmiş ve sentetik faj antikorları gibi çeşitli faj antikor kütüphanelerinin oluşturulmasına olanak tanır ve antikor ilaçlarının mevcut gelişimine katkıda bulunmuştur (Nagano vd. 2021).

Bir keşif aracı olarak faj gösteriminin gücü, sistemin iki temel özelliğinden kaynaklanmaktadır: (1) genotip ve fenotip bağlantısı ve (2) boyutları 106 ila 1011, farklı ilaç adayları arasında değişen görüntüleme kütüphaneleri oluşturma ve hedefe bağlananları seçme. Görüntülenen protein ile onu kodlayan gen arasındaki fiziksel bağlantı, istenen bağlanma özelliğine sahip fajın seçilmesinin ardından görüntülenen proteinin karakterizasyonunu kolaylaştırır. Bir ana proteinin gösterimi kanıtlandıktan sonra, arzu edilen bağlanma özelliğine sahip varyantların seçilebileceği 106-1011 varyanttan oluşan görüntüleme kütüphaneleri oluşturmak mümkündür. Tersine, kimyasal kütüphane veya hücre bazlı tarama gibi diğer tarama yöntemleri, yüzlerce veya binlerce sentetik bileşiğin veya on binlerce kaplanmış koloninin test edilmesine olanak tanır (Alfaleh vd. 2020).

Faj görüntüleme kullanılarak geliştirilen birkaç peptid ilaç klinik kullanım veya klinik deneylerde kullanılmak üzere onay almıştır. Örneğin insan plazma kallikrein'in etkili bir inhibitörü olan ecallantide ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından akut herediter anjioödem (HAE) tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (Williams ve Baird 2003). Kistik fibroz (CF) ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) tedavisi için kullanılmak üzere başvurusu yapılacak olan İnsan neutrophil elastase (HNE) inhibitörü DX-890 da, faj görüntüleme temelli klinik çalışmalara dayanan tedavilere bir örnektir (Krumpe vd. 2006, Rothe vd. 2006).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1 Faj Görüntüleme Yöntemi / Faj Sunum Tekniği

Faj görüntüleme yöntemi kullanılarak doğal tip ve G12D mutant Kras proteinlerine özgül olarak bağlanan M13 faj partiküllerinin seçilimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, M13 bakteriyofajı kapsid proteinleri üzerinde 12 peptidlik dizileri sergileyen “Ph.D.TM-12 Faj Sunumu Peptid Kütüphanesi (New England Biolab, A.B.D.) kullanılmıştır. Hedef olarak seçilen doğal tip (TP301958, Origene, A.B.D.) ve G12D mutant (TP700052, Origene, A.B.D.) Kras proteinlerinin referans geni NM_004985 olup her iki protein de HEK293 ökaryotik ekspresyon konakçısında üretilmiştir.

Kras proteinlerinin GDP ile Muamelesi:

Doğal tip Kras proteini (1.5µg) 1 mM GDP ile reaksiyon solüsyonu (% 0.5 BSA, 10 mM MgCl₂) içerisinde bir gece boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. Aynı işlem G12D mutant Kras proteini ile de eşit miktar ve konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir.

Birinci Biyopanning Aşaması

Hedef protein (doğal tip ya da G12D mutant Kras) ile yüzeyin kaplanması:

1. Hedef protein 0.1 M NaHCO₃, pH 8.6 içinde 10–100 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır.
2. 96 kuyulu ELIZA petrisinin bir kuyusuna hedef protein solüsyonu örneğinden 150 µl eklenmiş ve petri yüzeyine eşit şekilde dağılması sağlanmıştır.
3. Kuyuların hedef protein ile kaplanması amacıyla petri bir gece boyunca 4°C’de saklanmıştır.

Bloklama:

1. Kaplama solüsyonu petriden uzaklaştırılmıştır.

2. Hedef protein kaplı kuyuya 300 µl bloklama solüsyonu (0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6), 5 mg/ml BSA) eklenmiştir.

3. Bloklama işlemi 4°C’de en az 1 saat gerçekleştirilmiştir.

Yıkama:

1. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılmıştır.

2. Her bir kuyu 6 defa TBST (TBS + % 0.1 [v/v] Tween-20) ile yıkanmıştır.

Faj kütüphanesinin eklenmesi:

1. Hedef protein ile kaplı kuyuya faj kütüphanesinden (New England Biolab, A.B.D.) 1011 pfu olacak şekilde eklenmiştir.

2. Petri, çalkalayıcı yüzeyinde 10-60 dk. aralığında oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Yıkama:

1. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılmıştır.

2. Her bir kuyu 10 defa TBST (TBS + % 0.1 [v/v] Tween-20) ile yıkanmıştır.

Elüsyon:

1. Hedef proteine bağlı fajlar 100 µl of elüsyon solüsyonu (0.2 M Glisin-HCl (pH 2.2), 1 mg/ml BSA) içinde toplanmıştır.

2. Petri, 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

3. Elüat, eppendorf tüpüne aktarıldı ve 15 µl of 1 M Tris-HCl, pH 9.1 solüsyonu ile nötralize edilmiştir. Bu aşamada elde edilen örnek, “amplifiye olmamış faj elüat popülasyonu (A serisi)” olarak tanımlanmıştır.

Faj Amplifikasyonu:

1. Elüatın geri kalan kısmı amplifiye edilmek üzere 20 ml ER2738 kültürüne eklenmiştir.

2. Örnekler, 4.5 saat boyunca 37°C’de çalkalanmıştır.

Faj örneklerinin PEG/NaCl ile Presipitasyonu:

1. Bakteri kültürü santrifüj tüpüne aktarıldı ve 12,000 g, 10 dk ve 4°C’de santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır.
3. Santrifüj işlemi tekrar edilmiş ve pelet uzaklaştırılmıştır. 4. Süpernatantın yaklaşık %80’i yeni bir tüpe aktarılmıştır.
5. Örnek üzerine 1/6 hacimde %20 PEG/2.5 M NaCl solüsyonu eklenmiştir.
6. Fajların bu solüsyon içinde en az 2 saat boyunca çökmesi sağlanmıştır.
7. PEG çökeltisi 12,000 g, 15 dk ve 4°C’de santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Bu aşamada elde edilen örnek, “PEG/NaCl presipitasyonu sonrası süpernatantı (C serisi)” olarak tanımlanmıştır.

9. Örnek yeniden santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
10. Pelet 1 ml of TBS içinde süspanse edilmiştir.
11. Süspansiyon, eppendorf tüpüne aktarılmış ve 14,000 rpm, 5 dk ve 4°C’de santrifüj edilmiştir.
12. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.
13. Üzerine yeniden 1/6 hacimde %20 PEG/2.5 M NaCl solüsyonu eklenmiştir.
14. Tüp 15–60 dakika buz içinde bekletilmiş ve sonrasında 14,000 rpm, 10 dk ve 4°C’de santrifüj edilmiştir.
15. Süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır.
16. Pelet 200 µl TBS içinde çözölmüştür.

Bu aşamada elde edilen örnek, “amplifiye olmuş faj elüat popölasyonu (B serisi)” olarak tanımlanmıştır.

Bakteri kültürü:

1. 10 ml of LB+Tetrasiklin kültür ortamı içerisine petri yüzeyinden bir adet ER2738 kolonisi aktarılmıştır ve kültür orta-log fazına (OD600 0.5) gelene kadar 37°C’de inkübe edilmiştir. Bu örnek faj elüatının titrasyonu amacıyla kullanılmıştır.
2. 20 ml of LB+Tet kültür ortamı içerisine petri yüzeyinden bir adet daha ER2738 kolonisi aktarılmıştır ve kültür erken-log fazına (OD600 0.01–0.05) gelene kadar 37°C’de inkübe edilmiştir. Bu örnek de ileriki aşamada faj elüatının amplifikasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Faj Titrasyonu: Elde edilen faj popülasyonunun yoğunluğunun belirlenmesi için aşağıdaki örnek gruplarının titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir:

- a. amplifiye olmamış faj elüat popülasyonu (A serisi)
- b. amplifiye olmuş faj elüat popülasyonu (B serisi)
- c. PEG/NaCl presipitasyonu sonrası süpernatant örnekleri (C serisi, presipitasyon sonrası kaybedilen faj sayısını belirlemek amacıyla)

Bu amaçla aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Önceden tek koloni oluşturmak üzere ekilen bakteri petrisinden izole bir koloni alınarak 5–10 ml LB kültür ortamına aktarılmıştır.
2. 4-8 saat boyunca orta-log fazına (OD600 ~ 0.5) gelene kadar inkübatörde çalkalanmıştır.
3. Mikrodalgada çözünmüş olan üst agar solüsyonu 3'er ml olacak şekilde tüplere aktarılmıştır.
4. Bu tüpler kullanılacağı zamana kadar 45°C’de saklanmıştır.
5. Amplifiye olmamış biyopanning elüat örnekleri (A serisi) için 10^{-1} – 10^{-4} , amplifiye olan faj popülasyonu (B serisi) için 10^{-8} – 10^{-11} , ve PEG/NaCl presipitasyonu sonrası elde edilen süpernatant örneği (C serisi) için 10^{-2} – 10^{-6} aralıklarında dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir.

6. Bakteri kültürü orta-log fazına ulaştığında her bir faj dilüsyonu için 200 µl bakteri örneği ependorf tüplerine aktarılmıştır.
7. Bakteri hücrelerinin enfeksiyonunu gerçekleştirmek üzere her bir tüpe ilgili faj dilüsyonundan 10 µl aktarılmıştır.
8. Örnekler oda sıcaklığında enfeksiyon işleminin gerçekleşmesi için 1-5 dk inkübe edilmiştir.
9. Enfekte bakteri hücreleri üst agar içeren kültür tüplerine aktarılmış ve hemen akabinde LB/IPTG/Xgal petrilere dökülmüştür.
10. Petriler soğuduktan sonra 37°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir.
11. Ertesi gün petriler üzerinde oluşan “mavi kolonilerin” sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Sayım aşamasında özellikle üzerinde 100 ya da daha az sayıda plak bulunduran petriler kullanılmıştır.
12. Elde edilen plak sayısı dilüsyon oranı ile çarpılmış ve 10 µl’deki faj titrasyon değeri pfu cinsinden saptanmıştır.

İkinci Biyopanning Aşaması:

İkinci kuyu hedef protein ile kaplanmış. Titrasyon basamağına kadar bütün aşamalar tekrar edilmiştir.

1. Titrasyon petrilindeki mavi koloniler sayılarak faj yoğunluğu belirlenmiştir. (1013–1014 pfu/ml olması beklenmektedir).
2. Buradan elde edilen titrasyon değerine göre ikinci biyopanning aşamasında eklenecek olan faj oranları belirlenmiştir. Birinci biyopanning taramasında elde edilen faj popülasyonu, ikinci biyopanning aşamasında “input” faj olarak kullanılmıştır.
3. Bloklama, yıkama ve elüsyon basamakları aynı şekilde uygulanmıştır. Sadece TBST yıkama solüsyonundaki Tween 20 konsantrasyonu özgül olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla %0.1’den %0.5 (v/v)’e yükseltilmiştir.

4. Elüat, PEG/NaCl süpernatanı ve amplifiye edilen fajların titrasyonu gerçekleştirilmiştir.

Üçüncü Biyopanning Aşaması:

3. kuyu hedef protein ile kaplanmış ve elüatın titrasyon basamağına kadar bütün aşamaları tekrar edilmiştir.

1. İkinci biyopanning aşamasında elde edilen amplifiye elüat, üçüncü biyopanning aşamasında “input” faj olarak kullanılmıştır.

2. Yıkama basamaklarında yine %0.5 Tween20 içeren TBST solüsyonu kullanılmıştır.

3. Bu aşamada sadece amplifiye olmamış elüatın (A serisi) titrasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sekans Analizi için Örneklerin Hazırlanması:

Üçüncü biyopanning aşamasında elde edilen elüatın titrasyon plakları, DNA sekans analizi yapılacak olan Kras proteinlerine bağlanan pozitif klonların hazırlığında kullanılmıştır.

Bu amaçla:

1. İzole tek bir ER2738 kolonisi 10 ml LB kültürüne aktarılmış ve bir gece boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir.

2. Ertesi gün kültür, 1/100 oranında dilüe edilmiş ve bakteri kültür tüplerine 1’er ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

3. Titrasyon petrilinde bulunan mavi faj plakları öze ile alınıp her bir plak bir tüpe olacak şekilde aktarılmıştır.

4. Örnekler çalkalanarak 4.5-5 saat 37°C’de inkübe edilmiştir.

5. İnkübasyon bitiminde tüpler 14,000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek bakterilerin çökmesi sağlanmıştır.

6. Süpernatant yeni tüplere aktarılmıştır.

7. Santrifüj basamağı tekrar edilmiştir.

8. Süpernatanın %80'i yeni tüplere aktarılmıştır.

Elde edilen örnekler amplifiye faj stoğu olup sekans analizinde kullanılmak üzere 4°C'de saklanmıştır.

ER2738 Bakteri Suşunun İdamesi

1. Gliserol stoğunda bulunan ER2738 bakteri örneğinden LB+Tet petrisine ekim yapılmıştır.

2. Petri ters çevrilip 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.

3. Sonrasında petri parafilm ile sarılarak karanlıkta ve 4°C'de maksimum bir ay saklanmıştır.

ER2738 Bakteri Gliserol Stoklarının Hazırlanması

1. LB-Tet tabaklarından sınırları iyi tanımlanmış tek bir koloni steril öze yardımı ile alınarak 10 ml LB-Tet sıvı besiyerine ekilmiştir.

2. Kültür 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3. İnkübasyonun sonucunda 50 µl LB-Gliserol (%30 Gliserol, %70 LB) karışımı ile 750 µl bakteri kültürü karıştırılmış ve dondurma tüplerine aktarılmıştır.

5. Örnekler uzun süreli saklama amacıyla -80°C'ye kaldırılmıştır.

Faj sunumunda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

LB Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Sıvı bakteri kültürünün oluşturulması amacıyla, LB sıvı besiyeri hazırlanmıştır.

1. 500 ml LB sıvı besiyerinin hazırlanması için 5 g Tripton, 2.5 g maya ekstraktı ve 2.5 g sodyum klorür tartılıp 500 ml dH₂O içerisinde çözülmüştür.

2. 1 litrelik otoklavlı şişe içerisine hazırlanan 500 ml LB besiyeri eklenmiştir.

3. LB sıvı besiyeri 20 dakikalık sıvı programda otoklavlanmıştır.
4. Otoklavdan çıkan LB sıvı besiyeri oda sıcaklığında saklanmıştır.

IPTG/Xgal Stoklarının Hazırlanması

IPTG/Xgal tabaklarının oluşturulması için IPTG/Xgal stokları hazırlanmıştır.

1. 0.5 g IPTG ve 0.4 g Xgal tartılıp 10 ml DMF içerisinde çözümüştür.
2. Vorteks yardımıyla solüsyon iyice karıştıktan sonra 1 ml alikatlar halinde steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
3. IPTG/Xgal alikatlarının ışıktan zarar görmesini engellemek amacıyla tüpler alüminyum folyoya sarılı halde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

LB/IPTG/Xgal Tabaklarının Hazırlanması

“Panning” deneylerinin ardından titrasyon işlemleri sırasında elüatın tabaklara ekilip plakların görüntülenmesi amacıyla LB/IPTG/Xgal tabakları hazırlanmıştır.

1. 500 ml LB/IPTG/Xgal agar solüsyonunun hazırlanması için 5 g Tripton, 2.5 g maya ekstraktı ve 2.5 g sodyum klorür tartılıp 500 ml dH₂O içerisinde çözümüştür.
2. 1 litrelik otoklavlı şişe içerisine 7.5 g agar tartılıp eklendikten sonra, hazırlanan 500 ml LB besiyeri de şişenin içerisine eklenmiştir.
3. LB agar solüsyonu 20 dakikalık sıvı programda otoklavlanmıştır.
4. Otoklavdan çıkan LB agar besiyeri manyetik karıştırıcıda karıştırılıp sıcaklığı 70°C’nin altına düştüğünde, IPTG/Xgal stok alikatlarından dilüsyonu 1/1000 olacak şekilde 500 µl besiyerine eklenmiştir.
5. LB/IPTG/Xgal agar solüsyonu bakteri tabaklarına ekilmiş ve katılaştıktan sonra bir sonraki kullanıma kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Top Agar Hazırlanması

E.coli K12 ER2738 suşunun elde edilen fajlarla enfeksiyonu sonrasında LB/IPTG/Xgal tabaklarına dökülmesinde kullanılmak üzere Top Agar hazırlanmıştır.

1. 100 ml Top Agar için gerekli olan 1 g Tripton, 0.5 g maya ekstraktı, 0.5 g sodyum klorür tartılıp 50 ml dH₂O içerisinde çözülmüştür.
2. 500 ml'lik otoklavlı şişe içerisine 0.7 g agar tartılıp eklendikten sonra, hazırlanan 100 ml Top Agar solüsyonu şişenin içerisine eklenmiştir.
3. Top Agar solüsyonu 20 dakikalık sıvı programda otoklavlanmıştır.
4. Otoklavdan çıkan Top Agar oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneyler sırasında mikrodalga fırında ısıtılan Top Agar, donmaması için 45°C etüvde muhafaza edilmiştir.

Tetrasiklin Stoklarının Hazırlanması

LB+Tet tabaklarının ve LB+Tet sıvı besi yerlerinin hazırlanması amacıyla 13 mg/ml Tetrasiklin stokları hazırlanmıştır.

1. 130 mg Tetrasiklin tartılıp, 10 ml %95 etanol içinde vorteks cihazı kullanılarak çözülmüştür.
2. Tetrasiklin solüsyonun içinde tamamen çözüldükten sonra 1 ml alikatlarda halinde mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
3. Stokların ışıktan zarar görmesini engellemek amacıyla alikatlarda alüminyum folyoya sarılı halde -20°C'de muhafaza edilmiştir. Her bir kullanımda çökelti oluşturan alikatlarda kullanmadan önce vortekslenmiştir.

LB+Tet (Tetrasiklin) Tabaklarının Hazırlanması

E.coli K12 ER2738 suşunun tabaklara ekilip tekli koloni seçiliminin yapılması amacıyla LB+Tet tabakları hazırlanmıştır.

1. 500 ml LB+Tet agar solüsyonunun hazırlanması için 5 g Tripton, 2.5 g maya ekstraktı ve 2.5 g sodyum klorür tartılıp 500 ml dH₂O içerisinde çözülmüştür.

2. 1 litrelik otoklavlı şişe içerisine 7.5 g agar tartılıp eklendikten sonra, hazırlanan 500 ml LB besiyeri de şişenin içerisine eklenmiştir.
3. LB agar solüsyonu 20 dakikalık sıvı programda otoklavlanmıştır.
4. Otoklavdan çıkan LB agar besiyeri manyetik karıştırıcıda karıştırılıp sıcaklığı 70°C'nin altına düştüğünde, Tetrasiklin antibiyotiği son konsantrasyonu 20 µg/ml olacak şekilde besiyerine eklenmiştir.
5. LB+Tet agar solüsyonu bakteri tabaklarına ekilmiş ve katılaştıktan sonra bir sonraki kullanıma kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Kaplama Çözeltisinin (0.1 M NaHCO₃, pH 8.6) Hazırlanması

Rekombinant proteinin sulandırılması ve 96 kuyulu tabağa eklenmesi işleminde kullanılacak olan kaplama çözeltisi için 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) solüsyonu hazırlanmıştır.

1. 0.1 M NaHCO₃ hazırlamak için 0.84 g NaHCO₃ tartılmıştır.
2. Tartılan kimyasal 80 ml dH₂O içerisinde çözölmüştür.
3. NaHCO₃'ün tamamen çözünmesini takiben, pH değeri NaOH ile 8.6'ya getirilmiştir.
4. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.
5. Hazırlanan çözelti şırınga filtresi yardımıyla filtrelenip sterilize edilmiştir.
6. Kaplama çözeltisi 4°C'de saklanmıştır.

Blok Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Rekombinant proteinin kaplanmasından sonra bloklama işlemi için kullanılmak üzere 100 ml blok tampon çözeltisi hazırlanmıştır.

1. 0.1 M NaHCO₃ hazırlamak için 0.84 g NaHCO₃ tartılmıştır.
2. Tartılan kimyasal 80 ml dH₂O içerisinde çözölmüştür.
3. NaHCO₃'ün tamamen çözünmesini takiben, pH değeri NaOH ile 8.6'ya getirilmiştir.

4. 5 mg/ml BSA konsantrasyonu gereğince, 0.5 g BSA tartıldıktan sonra çözeltiye eklenmiştir.
5. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.
6. Hazırlanan çözelti şırınga filtresi yardımıyla filtrelenip sterilize edilmiştir.
7. Blok tampon çözeltisi 4°C' de saklanmıştır.

TBS Solüsyonunun Hazırlanması

96 kuyulu tabakların yıkanması ve faj peletinin süspansiyonu amacıyla kullanılmak üzere TBS solüsyonu hazırlanmıştır.

1. 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarına sahip 500 ml TBS çözeltisini hazırlamak için, 1 M Tris-HCl (pH 7.5) stok çözeltisinden 25 ml ve 5 M NaCl stok çözeltisinden 15 ml alınarak karıştırılmıştır.
2. Yeni çözelti dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakikalık sıvı programda otoklavlanmıştır.
3. Otoklavdan çıkan TBS solüsyonu oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

TBST Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması

Yıkama adımları için kullanılacak olan TBST çözeltisinin hazırlanma aşamaları aşağıdaki gibidir;

1. 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarına sahip 500 ml TBS çözeltisini hazırlamak için, 1 M Tris-HCl (pH 7.5) stok çözeltisinden 25 ml ve 5 M NaCl stok çözeltisinden 15 ml alınarak karıştırılmıştır.
2. Yeni çözelti dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakikalık sıvı programda otoklavlanmıştır.
3. Otoklavdan çıkan TBS solüsyonu oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

4. %0.1 TBST (TBS + %0.1 [v/v] Tween-20) yıkama solüsyonunun hazırlanması için 1 L TBS solüsyona 1 ml Tween-20 eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

5. %0.5 TBST (TBS + %0.5 [v/v] Tween-20) yıkama solüsyonunun hazırlanması için 1 L TBS solüsyona 5 ml Tween-20 eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Elüsyon Çözeltilisinin Hazırlanması

Hedefe bağlanmış fajların elüsyonu için kullanılmak üzere 100 ml “0.2 M Glisin-HCl (pH 2.2), 1 mg/ml BSA” elüsyon çözeltisi kullanılmıştır.

1. 0.2 M Glisin-HCl hazırlamak üzere 1.5 g Glisin tartılıp 60 ml dH₂O içerisinde çözülmüştür.

2. pH değeri HCl yardımıyla 2.2’ye getirildikten sonra 0.1 g BSA eklenmiştir.

3. Hacim dH₂O ile 100 ml’ye tamamlandıktan sonra şırınga filtresi yardımıyla filtrelenip sterilize edilmiştir.

4. Elüsyon çözeltisi 4°C’ de saklanmıştır.

Nötralizasyon Tampon Çözeltilisinin (1 M Tris-HCl, pH9.1) Hazırlanması

1. 1 M konsantrasyonda Tris-HCl hazırlamak için 12.11 g Trizma bazı tartıldıktan sonra 100 ml dH₂O içerisinde çözülmüştür.

2. pH 9.1 ayarlanması için HCl çözeltisi kullanıldıktan sonra solüsyon 121°C’de 20 dakikalık sıvı programda otoklavlanmıştır.

3. Otoklavdan çıkan nötralizasyon tampon çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

PEG/NaCl Solüsyonunun Hazırlanması

PEG/NaCl çöktürmesi için kullanılacak olan çözeltinin hazırlanışı aşağıdaki gibidir;

1. 20 g polietilen glikol-8000 (PEG), 60 ml dH₂O içeren beher içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür.

2. PEG kimyasalının çözünmesini kolaylaştırmak için manyetik ısıtıcının sıcaklığı 65°C'ye getirilmiştir.
3. PEG kimyasalının çözünmesi tamamlandıktan sonra 15 g sodyum klorür (NaCl), çözeltiye eklenmiştir.
4. Hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.
5. Homojen bir çözelti elde edinceye kadar manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır.
6. Hazırlanan çözelti temiz bir şişeye aktarıldıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır.
7. Otoklavdan çıkan PEG/NaCl solüsyonu oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2 Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analiz aşamalarında kısaca şu işlemler gerçekleştirilmiştir.

1. DNA analizine gönderilen peptit sekanslarının kromatogram sonuçları **FinchTV programı** kullanılarak analiz edilmiştir.
2. Elde edilen FASTA sekansları taranarak "insert" sekansın öncesi ve sonrasındaki sabit diziler tespit edilmiştir. Elde edilen 36 nükleotit uzunluğundaki diziler, "**ExPasy translate tool**" yardımıyla amino asit dizilerine dönüştürülmüştür.
3. Farklı sekanslardan elde edilen amino asit dizileri "**ESPrpt 3.0** programı ile kendi aralarında karşılaştırılmıştır.
4. Global skor değeri olarak 0.3, 0.5 ve 0.7 parametreleri kullanılarak farklı oranda konsensus dizileri elde edilmiştir.

3.3 Yüzey Plazmonan Rezonans Uygulaması

KrasG12D proteinine bağlanma afinitesi en yüksek olan inhibitor peptidler yüzey plazmonan rezonans yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Faj sunumu neticesinde

tanımlanan peptitlerin doğal ve mutant tip Kras’a bağlanma potansiyelleri yüzey plazmon rezonans tekniği ile analiz edilmiştir. Bu aşamada, analizler Georgetown Üniversitesi, Lombardi Kanser Merkezi bünyesindeki “Biocore Molecular Interaction” Biriminde Prof. Dr. Aykut Üren’in desteği ile Biacore T200 cihazı (GE Healthcare, A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde ligand olarak doğal tip Kras, mutant Kras-G12D ve Avi-Kras-G12D rekombinant proteinleri kullanılmıştır. Bu ligandlar, standart amin birleştirme kimyası kullanılarak CM5 çipi üzerine immobilize edilmiştir (sabitlenmiştir). Biacore analizinde kullanılan Peptit 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 dizileri Genscript firması tarafından 12 amino asit uzunluğunda, minimum %85 saflıkta ve 10-14 mg ağırlıkta olacak şekilde ve herhangi bir ek dizi dahil edilmeden sentezlenmiştir. Peptitler deneylerde analit olarak kullanıldı ve son konsantrasyonları 20 mM olacak şekilde DMSO (Sigma, A.B.D.) içinde çözülmüştür. Yüzey plazmon rezonans analizinde kullanılan ligand ve analitlerin listesi çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Yüzey plazmon rezonans analizinde kullanılan ligand ve analitler

Ligand / Analit	Moleküler Ağırlık	Stok Konsantrasyon
Doğal tip Kras	21,2kDa	0,05 mg/ml
Mutant Kras-G12D	21,2kDa	0,24 mg/ml
Avi-Kras-G12D	26 kDa	16 mg/ml
Peptit 1	1340 Da	20 mM
Peptit 2	1570 Da	20 mM
Peptit 3	1600 Da	20 mM
Peptit 4	1470 Da	20 mM
Peptit 5	1610 Da	20 mM
Peptit 6	1500 Da	20 mM
Peptit 7	1580 Da	20 mM

Bütün analitler için gece kinetiği, tampon solüsyon 1 ve %1 DMSO varlığında gerçekleştirildi. Analit solüsyonlarının akış hızı 50 µL/dk olarak belirlendi. Bağlanma ve disosiyasyon aralıkları sırasıyla 60 sn ve 600 sn olacak şekilde kullanıldı. Enjekte edilen peptit konsantrasyonları 1:2 dilüsyon oranları ile 1.25-160 µM aralığında ve her bir konsantrasyon değeri duplike olacak şekilde uygulandı. Analizlerde, doğal tip Kras 10 mM sodium asetat tampon (pH 4.0) içinde 1:10 dilüsyonda ve son konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde, mutant Kras G12D aynı tampon solüsyonu içerisinde 1:20

dilüsyonda ve son konsantrasyonu 12 µg/mL olacak şekilde ve son olarak Avi-Kras-G12D de aynı tampon solüsyonu içerisinde 1:100 dilüsyonda ve son konsantrasyonu 160 µg/mL olacak şekilde dilüe edildi. Bunların yanında tampon solüsyon 1 (20 mM fosfat tamponu, pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, %0.05 surfaktan P20, 5 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 5 µM GppNHp) immobilizasyon yürütme tamponu olarak uygulandı. Elde edilen verilere göre R_{max} değerleri hesaplandı ve ligandlar ile etkileşimde olan peptitler belirlendi.

3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışma için American Tissue and Cell Collection (ATCC, A.B.D.)’dan BxPC-3 ve AsPC-1 pankreas adenokarsinoma hücreleri temin edilmiştir. Bu deneylerde, doğal tip Kras geni taşıyan BxPC-3 hücre hattı negatif kontrol ve pankreaskanserinde en sık gözlenen Kras mutasyonu olan G12D mutasyonunu taşıyan AsPC-1 hücre hattı (pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu hücreler inhibitör peptidler (ANT’li formda) ile muamele edilecek ve peptidlerin hücreler üzerindeki olası etkileri gözlenmiştir. Bu hücrelere ait genel bilgiler ve Kras mutasyon özellikleri tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler

Hücre Hattı	BxPC-3	AsPC-1
Firma	ATCC	ATCC
Katalog No	CRL-1687	CRL-1682
Organizma	İnsan	İnsan
Doku	Pankreas	Pankreas, metastatik
Hastalık	Adenokarsinoma	Adenokarsinoma
Morfoloji	Epitelyal	Epitelyal
Kültür Özelliği	Adheren	Adheren
Kültür Ortamı	RPMI-1640 ¹	RPMI-1640 ¹
Kras Durumu	Doğal Tip	G12D Mutantı

¹ Katalog no: 302001 (ATCC, ABD)

Hücreler, %10 fetal bovin serum (FBS, Multicell, Brezilya) içeren RPMI-1640 hücre kültürü ortamında, 37°C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan hücre kültürü inkübatörü içerisinde idame ettirilmiştir. Faz kontrast mikroskobu ile her gün incelenen hücrelerin kültür ortamları ATCC tarafından önerilen protokole uygun zaman aralıklarında değiştirilmiştir. Flask yüzeyinde yapışmış haldeki hücreler yine ATCC protokolünde tanımlanan yoğunluk seviyesine geldiklerinde aşağıdaki protokole göre pasajlanmıştır.

3.4.1 Hücrelerin pasajlanması

1. Hücrelerin bulunduğu hücre kültürü ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin serumdan tamamen arındırılması amacıyla fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline, PBS, Multicell, Brezilya) ile yıkanmıştır.
2. Hücreler, tripsin solüsyonu (%0.5 EDTA'lı, Multicell, Brezilya) varlığında 37°C'de ve %5 CO₂ varlığında 5 dk inkübe edilmiştir.
3. Hücrelerin yüzer hale geldiği mikroskop altında kontrol edildikten sonra tripsin aktivitesi hücreler üzerine tam hücre kültürü ortamı eklenerek durdurulmuştur.
4. Hücreler pipet yardımıyla tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş ve önerilen oranlarda (1/3-1/6) flasklara ekilmiştir.

3.4.2 Hücrelerin dondurulması

Uzun süreli depolama amacıyla hücrelerinin aşağıdaki protokole göre -80°C stokları hazırlanmıştır.

Hücrelerinin Dondurulması:

1. Hücreler tripsin ile muamele edilerek tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir.
2. Oda sıcaklığında, 1000 rpm hızda 5 dakika santrifüj (Eppendorf, A.B.D.) edilmiştir.
3. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır.

5. Hücre peleti kaldırılmış ve üzerine her 1×10^6 hücre için 1 ml olacak şekilde dondurma ortamı (%10 serum içeren DMSO) eklenmiştir.

6. Hücreler, uzun süreli saklanmak üzere -80°C 'ye kaldırılmıştır.

3.4.3 Dondurulmuş hücrelerin canlandırılması

1. -80°C 'den alınan hücreler 37°C 'deki su banyosunda hızlı şekilde çözünmüştür.

2. Hücreler 9ml kültür ortamı içeren 15 ml'lik Falcon tüpüne yavaşça aktarılmıştır.

3. Oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

4. Hücrelerin üzerine tam hücre kültürü ortamı eklenmiş ve flaska aktarılmıştır.

3.4.4 İnhibitör peptidlerin pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri ve sitotoksite (IC50) analizi

Pankreas kanseri hücreleri AsPC1 ve BxPC3'ün her bir peptide ait (Peptid 1, 2 ve 3) sitotoksiste analizi WST-1 (Sigma, A.B.D.) yöntemi ile gerçekleştirildi. WST-1 analizlerine ait protokol aşağıda verilmiştir:

1. Hücreler 96 kuyulu plaka üzerine yaklaşık 5,000 -20,000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi.

2. Bir gece boyunca plaka tabanına yapışması için beklendi.

3. Ekim işleminden yaklaşık 20 saat sonra hücreler son konsantrasyonu 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM ve 30 μM (yarım log konsantrasyon) olacak şekilde Peptid 3, 4 ve 5 ile ayrı ayrı muamele edildi. Bu aşamada farklı peptid konsantrasyonları seri dilüsyonlar şeklinde hazırlandı.

4. Negatif kontrol olarak DMSO % 0.1'lik konsantrasyonda eklendi. Ayrıca bütün peptid muamelelerinde her kuyuda standart % 0.1 DMSO kullanıldı.

5. Hücreler 37°C 'de ve % 5 CO_2 varlığında 48 - 96 saat boyunca inkübe edildi. Bu süre zarfında hücre canlılığı mikroskop altında düzenli aralıklar ile takip edildi.

6. İnkübasyon süresinin sonucunda her kuyuya 10 µl WST-1 eklendi.

7. Örneklerin okuma işlemi optimize süreler (30 dk - 4 saat aralığı) ve dalga boylarında (420-480 nm) MultiScan GO Mikroplaka Spektrofotometresi ile (Thermo Scientific, A.B.D.) gerçekleştirildi.

8. Peptidlerin IC50 değerlerinin analizi için GraphPad Prism programı kullanıldı.

Bu deney başlığı altında her hücre hattı ve peptid muamelesi için deney sistemi, üçlü tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.4.5 Yara iyileşme deneyleri

Pankreas kanseri hücreleri AsPC1 ve BxPC3'ün motilitesi üzerinde Peptid 3, 4 ve 5'in etkisinin analizi amacıyla yara iyileşmesi deneyleri gerçekleştirildi.

Bu aşamada her deney grubuna negatif kontrol (peptid ile muamele edilmeyen) örneği dahil edildi ve her koşul üçlü biyolojik tekrar şeklinde gerçekleştirildi. Ayrıca bütün koşullardaki DMSO oranı maksimum % 0.1 olacak şekilde sabitlendi.

Yara iyileşmesi deneyleri için aşağıdaki protokol uygulandı:

1. Hücreler bir sonraki gün % 100 yoğunlukta olacak şekilde 12 kuyulu petrilere ekildi.
2. Ertesi gün petri yüzeyine yara oluşturmak üzere 200 µl'lik steril pipet ucu ile düz çizgi çizildi.
3. Ölü hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla kuyular fosfat tampon (Phosphate Buffered Saline, PBS, Multicell, Brezilya) solüsyonu ile yıkandı.
4. Her bir kuyuya her bir peptidden ilgili konsantrasyonda (1 µM, 3 µM ve 10 µM) içeren serumlu hücre kültürü ortamı eklendi.
5. Bütün koşullara ait yara bölgesi her gün Olympus CRKX41 "inverted" mikroskobu ile 4X ve 10X'lik büyütme altında görüntülendi.
6. Aynı zamanda yara genişliği her 24 saatte piksel cinsinden ölçüldü ve yara alanı fotoğraflandı.

7. Bu çalışmada, oluşturulan yara iyileşmesi modelinin görselleştirilmesi ve yorumlanması için Python (Sürüm 3.9.5) programlama dili ile geliştirilmiş bir kod parçası kullanılmıştır. Python, üst düzey nesne yönelimli bir programlama dili olması, kolay okunabilir olması, sözdiziminin kolay hatırlanması ve bilimsel kullanım için oldukça kapsamlı kütüphane yapıları içermesi nedeniyle tercih edilmiştir. Veri görselleştirmesi için Python ile tümleşik olarak çalışan bir veri görselleştirme kütüphanesi olan Matplotlib (Sürüm 3.5.2) kullanılmıştır. İstatistiki analizler için SciPy kütüphanesi kullanılmıştır. SciPy kütüphanesi, Python programlama dili ve Matplotlib kütüphanesi ile tümleşik olarak çalışması ve kolay kullanıma sahip olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Yara iyileşmesi modelleri mikroskop ile görüntülenmiş ve görüntüler TIFF formatında kaydedilmiştir. Kaydedilen görüntülerde yara dudakları ImageJ (Sürüm 1.8.0) programı kullanılarak ölçülmüştür. ImageJ programı ile ölçülmek istenen görüntü açılmıştır. Açılan görüntü üzerinde ölçüm, yara dudaklarının her iki ucunu birleştiren doğru parçasının uzunluğunun mikrometre cinsinden ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm vertikal düzlemde görüntünün başından sonuna doğru yaklaşık olarak eşit aralıklı olacak şekilde seçilen noktalardan tekrarlanmıştır. Çekilen her resimden minimum 20 ölçüm yapılmıştır. 20 ölçüm yapılamayan görüntülerden (yara alanının küçük olması nedeniyle) mümkün olan en fazla sayıda ölçümün yapılması amaçlanmıştır. Yapılan ölçümlerin mikrometreye çevrilmesi, ölçüm yapılan görüntünün özelliklerinden alınan ölçek oranı ($\mu\text{m}/\text{pixel}$) üzerinden gerçekleştirilmiştir.

İstatistiki analiz için SciPy kütüphanesinin stats modülü kullanılmıştır. Yara iyileşmesi modelinde ölçülen ve bahsedildiği şekilde mikrometreye çevrilen değerler tek bir peptit için, belirli bir zaman diliminde konsantrasyonlar baz alınarak (NT, 1 μM , 3 μM , 10 μM) gruplara ayrılmıştır. Bu grupların arasında istatistiki olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını test etmek için öğrenci t-test kullanılmıştır. Öğrenci t-test sonucu elde edilen p değerlerinin 0.05'ten küçük olduğu gruplar için aralarında anlamlı fark olduğu, p değerlerinin 0.05'ten büyük olduğu gruplar için aralarında anlamlı farkın olmadığı yönünde yorum yapılmış ve p değerleri çizilen her bir grafiğin altına programatik olarak yazılmıştır. Hazırlanan grafik, Taşınabilir Ağ Grafiği (Portable Network Graphics) olarak kaydedilerek kod sonlandırılmıştır.

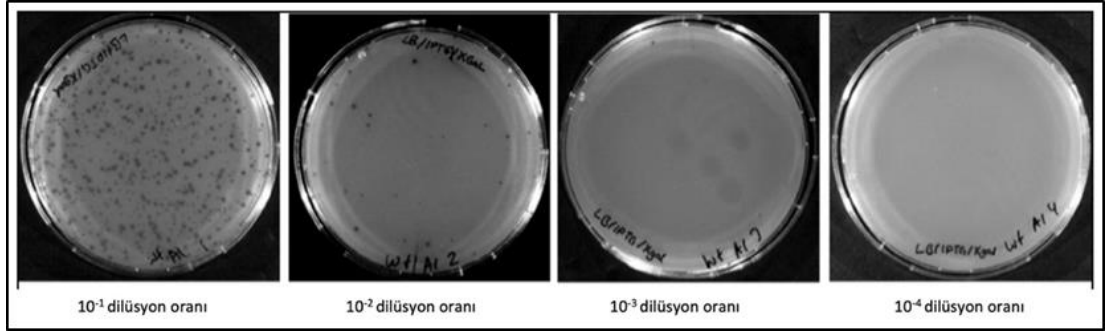
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Faj Sunumu İle Doğal Tip Kras Proteinine Bağlanan Peptidlerin Eldesi

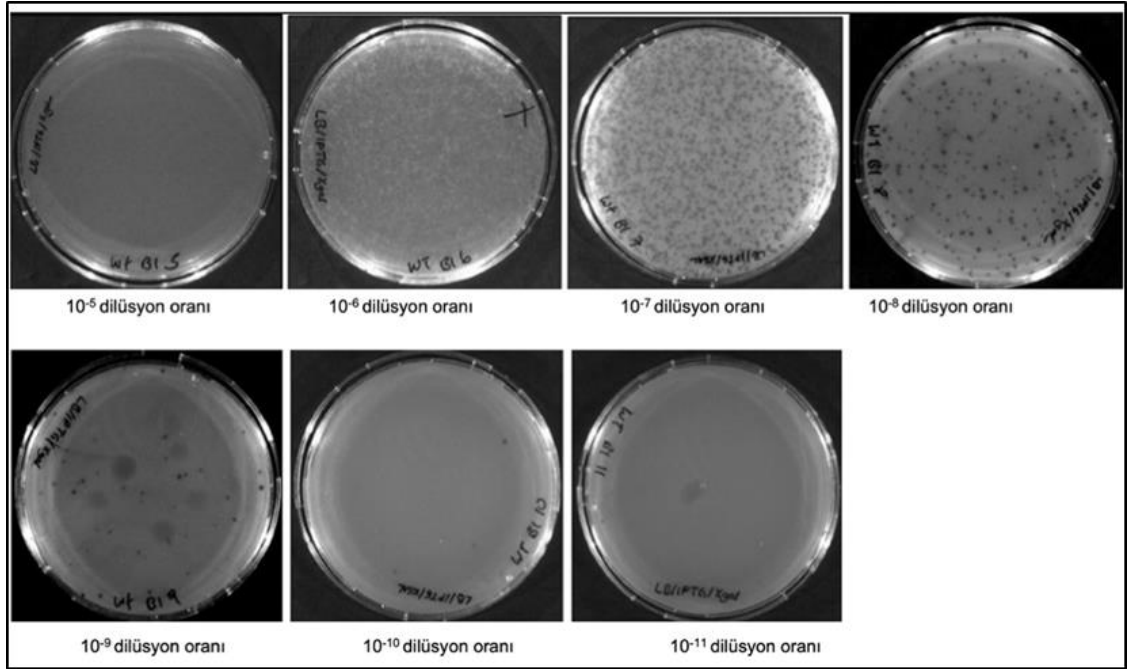
Doğal tip Kras proteinin hedef olarak kullanıldığı faj sunumu prosedüründe üç ardışık “biyopanning” uygulaması gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bu üç biyopanning uygulamasında elde edilen titrasyon deneylerinin sayısal verileri ve ilgili petrilerin fotoğrafları bulunmaktadır.

Çizelge 4.1 Doğal tip Kras proteini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

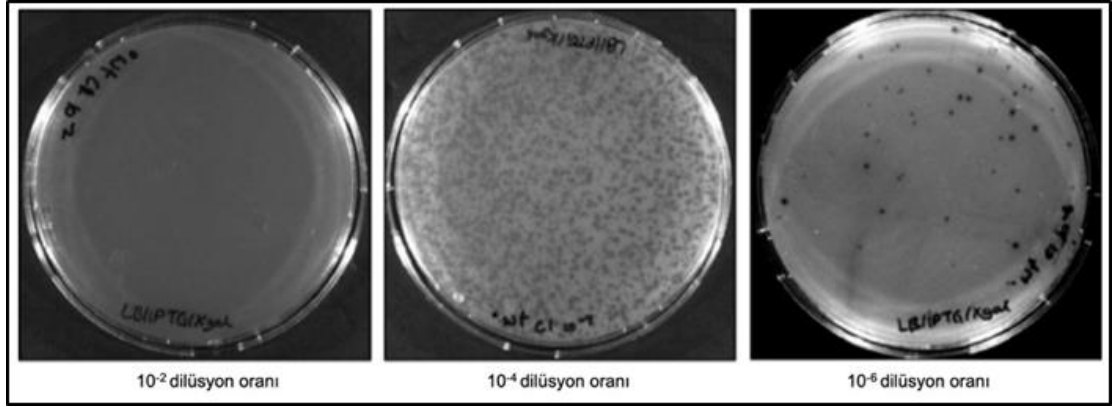
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (1.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
Doğal Tip Kras	Elüat (A1-serisi)	10^{-1}	çok sayıda	—	—
		10^{-2}	36	$3,6 \times 10^5$	$4,14 \times 10^4$
		10^{-3}	4	4×10^5	$4,6 \times 10^4$
		10^{-4}	0	0	0
	Amplifiye elüat (B1-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	333	$3,33 \times 10^{12}$	$6,66 \times 10^{11}$
		10^{-9}	43	$4,3 \times 10^{12}$	$8,6 \times 10^{11}$
		10^{-10}	3	3×10^{12}	6×10^{11}
		10^{-11}	1	1×10^{13}	2×10^{12}
	PEG süpernatantı (C1-serisi)	10^{-2}	çok sayıda	—	—
		10^{-4}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	50	5×10^9	$9,25 \times 10^{10}$



Şekil 4.1 Doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları



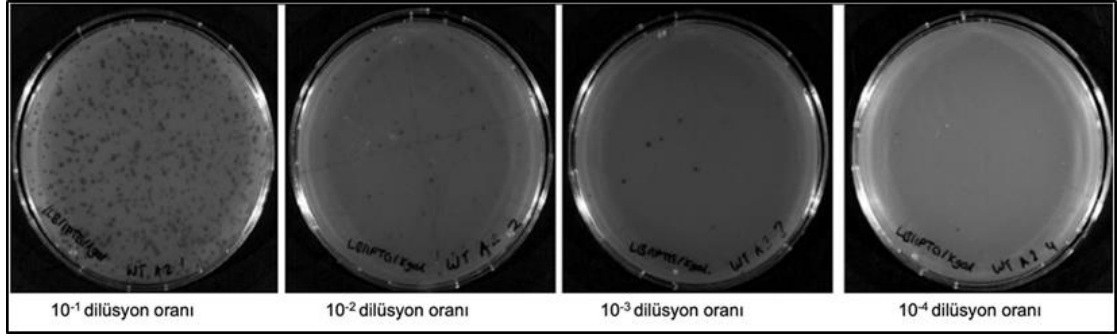
Şekil 4.2 Doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları



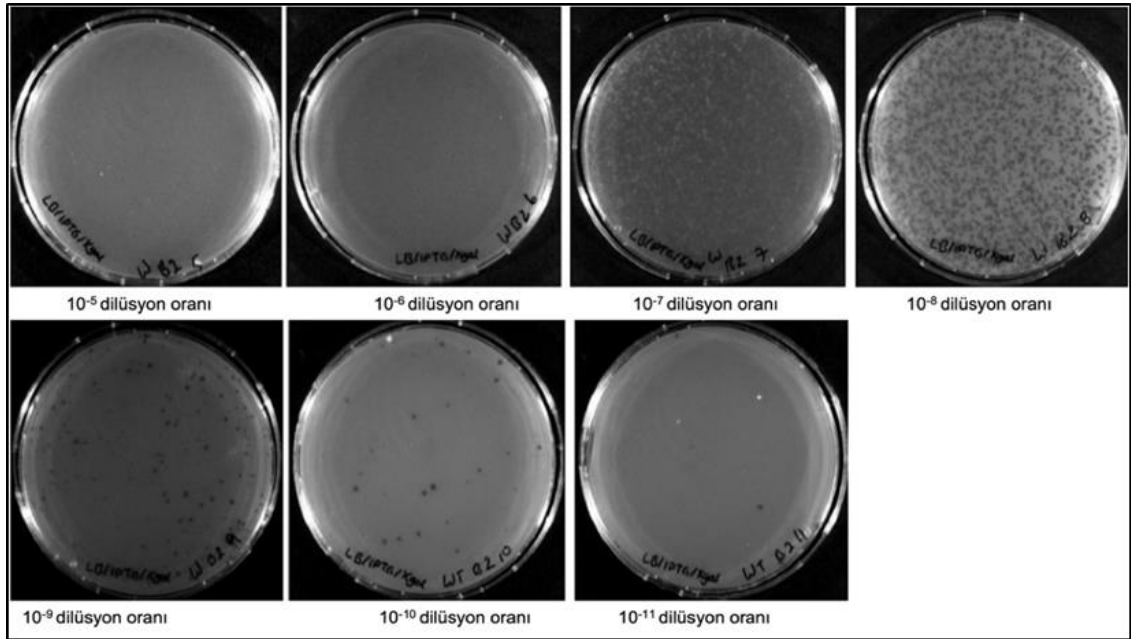
Şekil 4.3 Doğal tip Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.2 Doğal tip Kras proteinini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

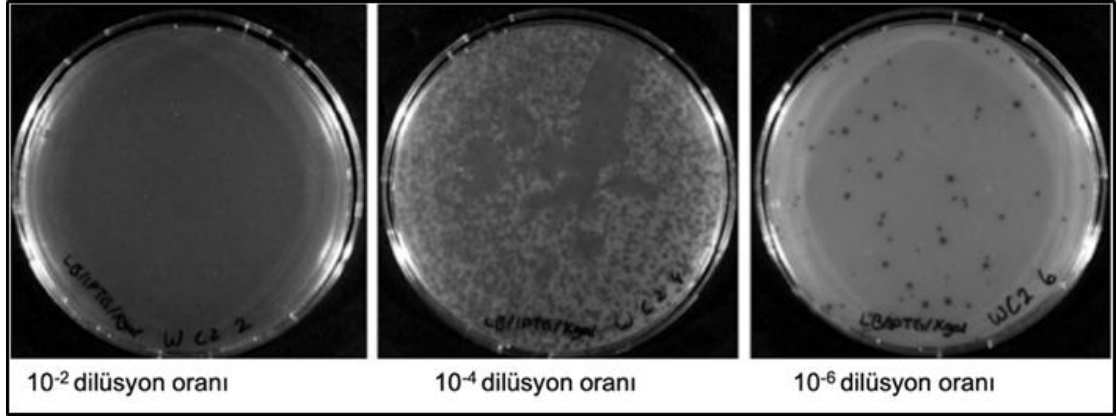
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (2.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
Doğal Tip Kras	Elüat (A2-serisi)	10^{-1}	456	$4,56 \times 10^5$	$5,24 \times 10^4$
		10^{-2}	68	$6,8 \times 10^5$	$4,14 \times 10^4$
		10^{-3}	15	$1,5 \times 10^6$	$1,73 \times 10^5$
		10^{-4}	1	1×10^6	$1,15 \times 10^5$
	Amplifiye elüat (B2-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	çok sayıda	—	—
		10^{-9}	194	$1,94 \times 10^{13}$	$3,88 \times 10^{12}$
		10^{-10}	33	$3,3 \times 10^{13}$	$6,6 \times 10^{12}$
		10^{-11}	5	5×10^{13}	1×10^{13}
	PEG süpernatanı (C2-serisi)	10^{-2}	çok sayıda	—	—
		10^{-4}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	69	$6,9 \times 10^9$	$1,38 \times 10^{11}$



Şekil 4.4 Doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları



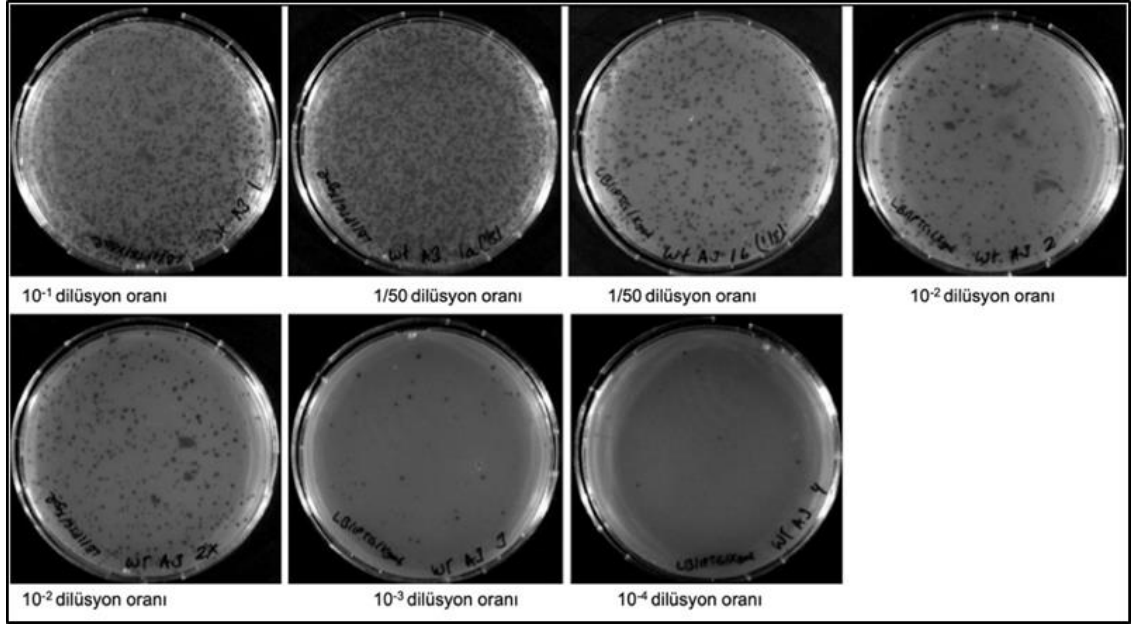
Şekil 4.5 Doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları



Şekil 4.6 Doğal tip Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.3 Doğal tip Kras proteini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

Hedef Protein	Örnek Çeşidi (3.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
Doğal Tip Kras	Elüat(A3-serisi)	10 ⁻¹	çok sayıda	—	—
		1a*	çok sayıda	—	—
		1b*	740	3,7 x 10 ⁶	4,25x10 ⁵
		10 ⁻²	379	3,79 x 10 ⁶	4,35 x 10 ⁵
		10 ⁻²	384	3,84 x 10 ⁶	4,41 x 10 ⁵
		10 ⁻³	58	5,8 x 10 ⁶	6,67 x 10 ⁵
		10 ⁻⁴	8	8 x 10 ⁶	9,2 x 10 ⁵
*; 1a ve 1b kodlu dilüsyonlarda tabak başına 100 koloniden daha az bir yoğunluk elde etmek için1:50 dilüsyon uygulanmıştır.					



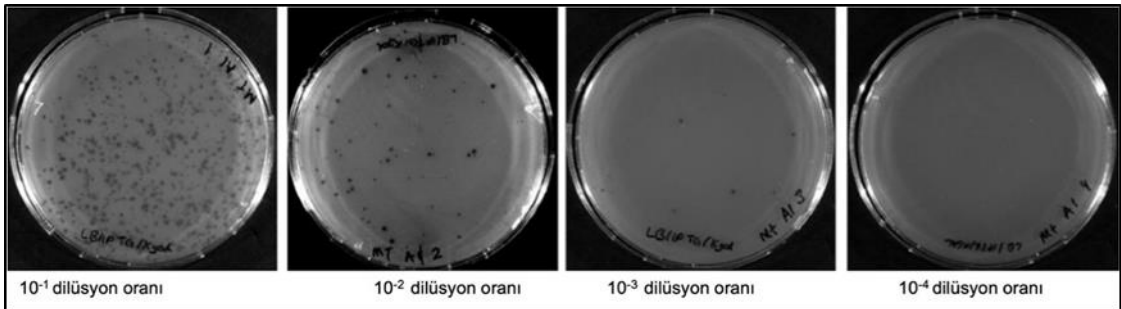
Şekil 4.7 Doğal tip Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları

4.2 Faj Sunumu İle G12D Mutant Kras Proteine Bağlanan Peptidlerin Eldesi

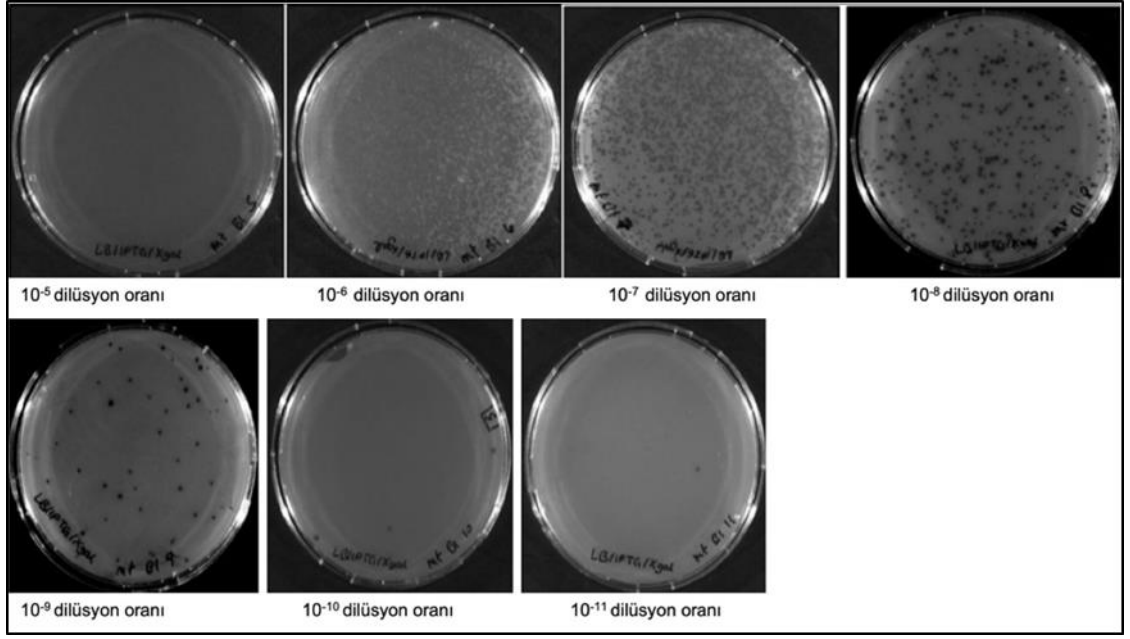
G12D mutant Kras proteinin hedef olarak kullanıldığı faj sunumu prosedüründe üç ardışık “biyopanning” uygulaması gerçekleştirildi. Aşağıda üç biyopanning uygulamasında elde edilen titrasyon deneylerinin sayısal verileri ve ilgili petrilerin fotoğrafları bulunmaktadır. Burada elde edilen titrasyon değerleri faj sunumu prosedürünün başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Çizelge 4.4 G12D mutant Kras proteinini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

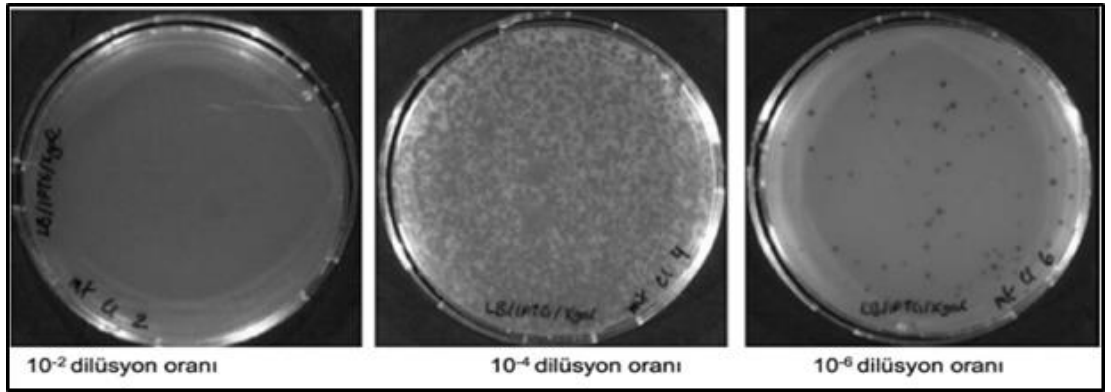
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (1.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
G12D Kras	Elüat (A1-serisi)	10^{-1}	çok sayıda	—	—
		10^{-2}	73	$7,3 \times 10^5$	$8,395 \times 10^4$
		10^{-3}	9	9×10^5	$1,035 \times 10^5$
		10^{-4}	0	0	0
	Amplifiye elüat (B1-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	422	$4,22 \times 10^{12}$	$8,44 \times 10^{11}$
		10^{-9}	54	$5,4 \times 10^{12}$	$1,08 \times 10^{12}$
		10^{-10}	5	5×10^{12}	1×10^{12}
		10^{-11}	1	1×10^{13}	2×10^{12}
	PEG süpernatanı (C1-serisi)	10^{-2}	çok sayıda	—	—
		10^{-4}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	71	$7,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{11}$



Şekil 4.8 G12D mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları



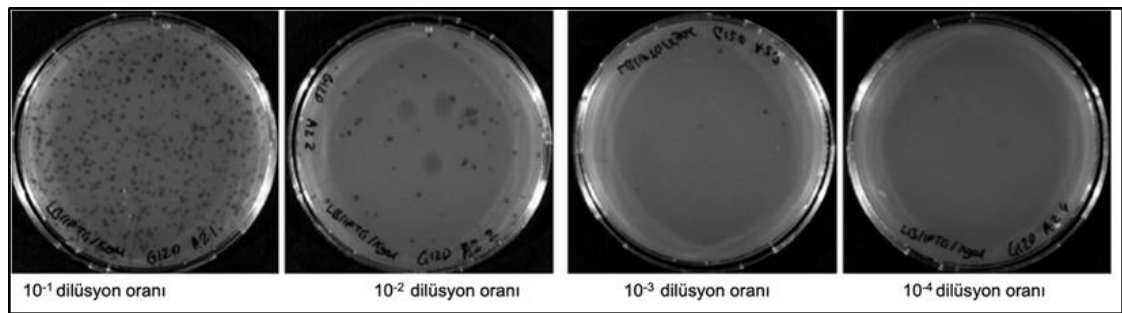
Şekil 4.9 G12D mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları



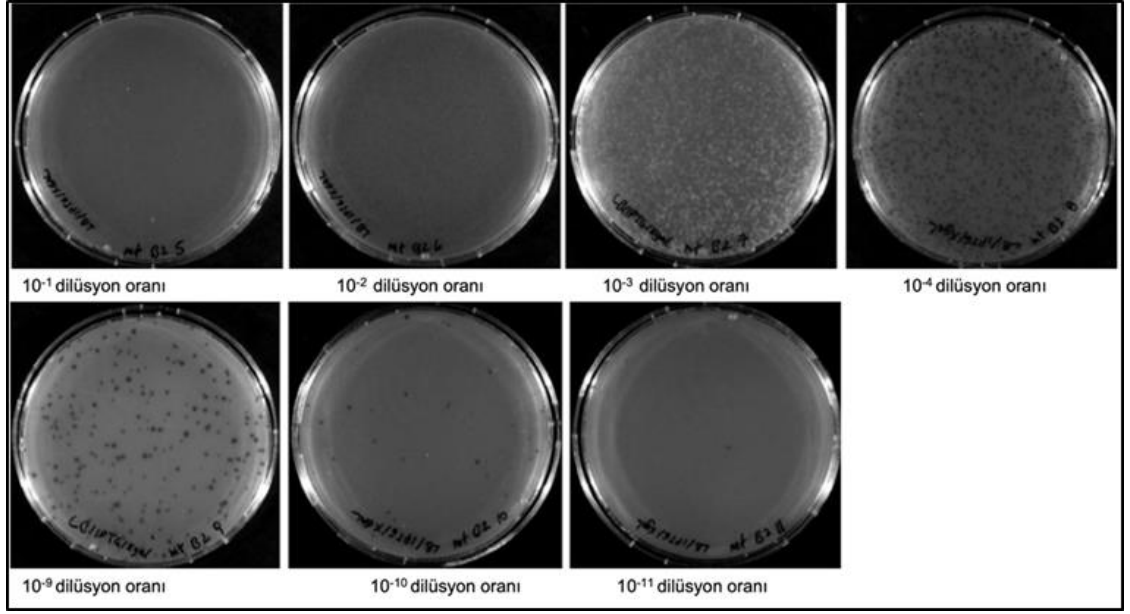
Şekil 4.10 G12D mutant Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.5 G12D mutant Kras proteinini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

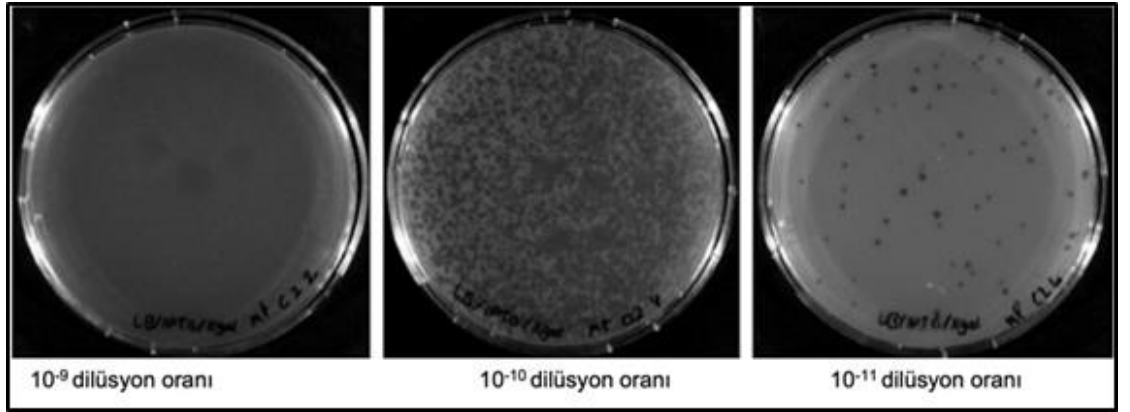
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (2.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
G12D Kras	Elüat (A2-serisi)	10^{-1}	410	$4,1 \times 10^5$	$4,72 \times 10^4$
		10^{-2}	69	$6,9 \times 10^5$	$7,94 \times 10^4$
		10^{-3}	5	5×10^5	$5,75 \times 10^4$
		10^{-4}	1	1×10^6	$1,15 \times 10^4$
	Amplifiye elüat (B2-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	çok sayıda	—	—
		10^{-9}	233	$2,33 \times 10^{13}$	$4,66 \times 10^{12}$
		10^{-10}	30	3×10^{13}	6×10^{12}
		10^{-11}	1	1×10^{13}	2×10^{12}
	PEG süpernatanı (C2-serisi)	10^{-2}	çok sayıda	—	—
		10^{-4}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	79	$7,9 \times 10^9$	$1,58 \times 10^{11}$



Şekil 4.11 G12D mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları



Şekil 4.12 G12D mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları

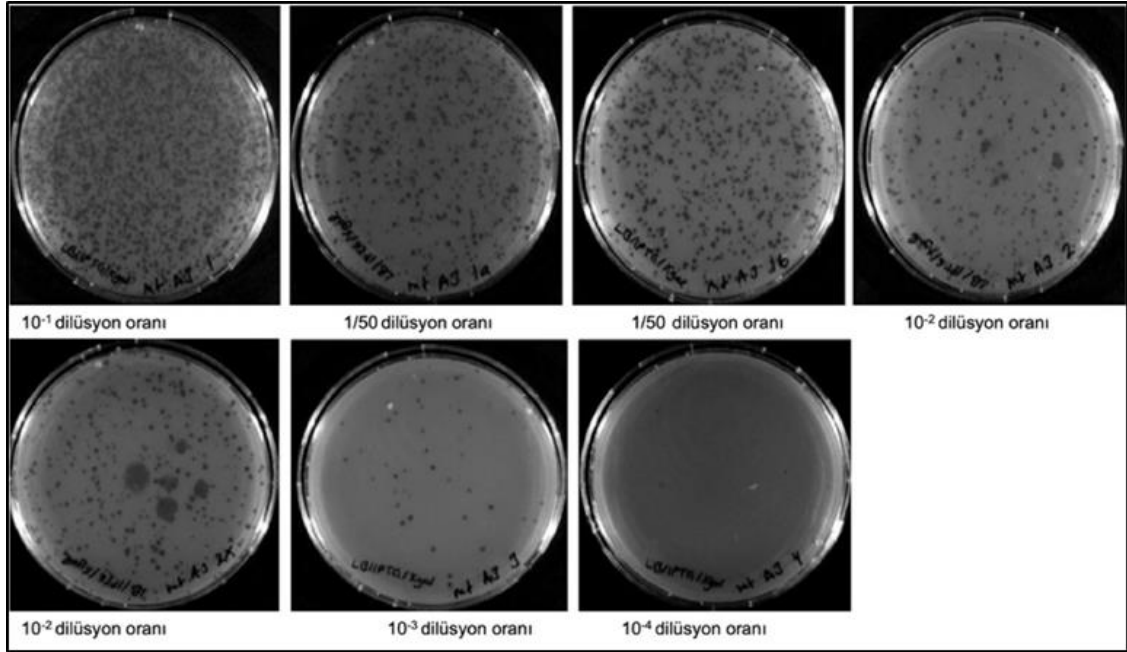


Şekil 4.13 G12D mutant Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.6 G12D mutant Kras proteinini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

Hedef Protein	Örnek Çeşidi (3.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
G12D Kras	Eliyat(A3-serisi)	10^{-1}	çok sayıda	—	—
		1a*	688	$3,44 \times 10^6$	$3,95 \times 10^5$
		1b*	524	$2,62 \times 10^6$	$3,01 \times 10^5$
		10^{-2}	288	$2,88 \times 10^6$	$3,31 \times 10^5$
		10^{-2}	300	3×10^6	$3,45 \times 10^5$
		10^{-3}	62	$6,2 \times 10^6$	$7,13 \times 10^5$
		10^{-4}	5	5×10^6	$5,75 \times 10^5$

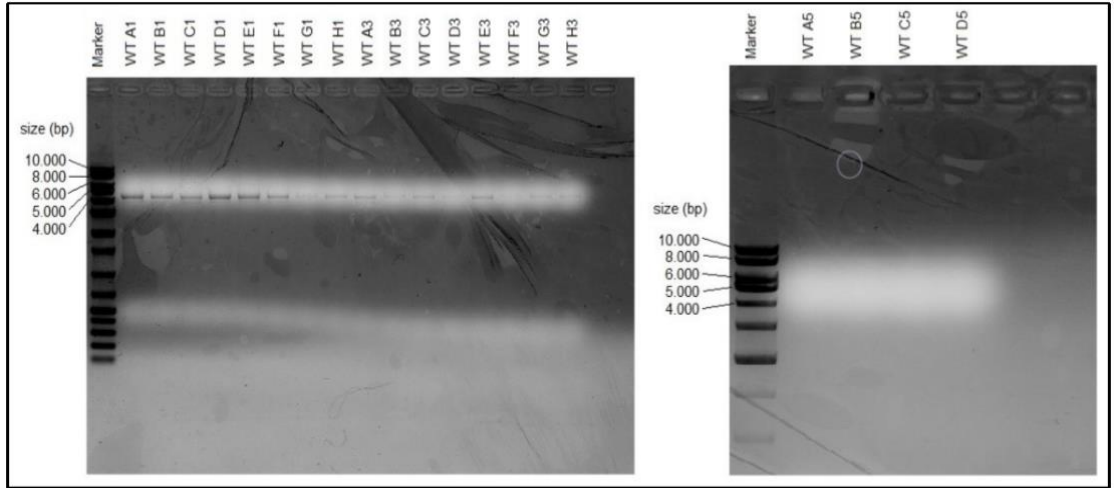
*; 1a ve 1b kodlu dilüsyonlarda tabak başına 100 koloniden daha az bir yoğunluk elde etmek için 1:50 dilüsyon uygulanmıştır.



Şekil 4.14 G12D mutant Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğraflar

4.3 GDP - Doğal Tip Kras Hedef Proteinine Bağlanan Faj Partikülleri DNA İzolasyon Verileri

M13 faj DNA'sı çembersel ve tek iplikli olup yaklaşık 7000 bp uzunluğundadır. Faj sunumu sonucunda elde edilen faj DNA'larının agaroz jel elektroforezi sonuçlarında da bu büyüklükte “intakt” bantlar gözlenmiştir. Bu grup içerisinde, 20 örnekten 16'sının DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Bazı örneklerin saflık değeri olması gereken değer aralığının çok üstünde saptanmıştır. DNA saflıkları beklenen değerlerin çok üzerinde olan örneklerden de kaliteli DNA dizileme sonuçları elde edilmiştir. Örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüleri şekil 4.15’de ve DNA konsantrasyon ve saflık değerleri çizelge 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.15 GDP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüleri

Çizelge 4.7 GDP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	Saflık (A260/A280)
WT A1	64,90	4,603
WT B1	40,80	5,299
WT C1	53,30	9,034
WT D1	54,20	3,566
WT E1	62,50	5,734
WT F1	39,40	6,567
WT G1	28,30	11,32
WT H1	29,80	2,113
WT A3	38,80	4,619
WT B3	41,10	8,220
WT C3	52,40	8,881
WT D3	35,70	39,67
WT E3	56,80	3,138
WT F3	43,60	2,675
WT G3	43,90	7,839
WT H3	38,60	9,190
WT A5	76,40	17,36
WT B5	38,60	35,09
WT C5	44,30	20,14
WT D5	48,50	35,69

4.4 GDP - Doğal Tip Kras Faj Sunumu Biyoinformatik Analizleri

DNA izolasyonu sonucunda seçilen örneklerin Macrogen firması tarafından Sanger dideoksi sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi sonuçları “Finch TV programı” kullanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bütün FASTA sekanslarında 36 nükleotid uzunluğunda insert dizileri tespit edilmiştir. Bu 36 nükleotidlik sekanslar, M13 faj kapsid

proteini gIII üzerinde bulunan ve hedef Kras proteine bağlanmayı sağlayan 12 aminoasitlik peptid sekanslarını kodlayan gen bölgesidir. DNA dizi analizi sonucu belirlenen insert dizileri çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 GDP - doğal tip Kras faj sunumu nükleotid dizileri

Örnek	Nükleotid Dizileri
G8_WTD1	GCTACTATTAATGTTTCTTCGCATACGGGTATGGAT
A9_WTF1	AATCATGCTCATTATCTGGGTGCTTTGTTGTCGACG
A10_WTE1	CAGGGGGTGCCGGATCATATTAGGATTATGTGGAAT
F7_WTA1	AATGCTGCGTATTTTCTTATGATACGACGGGTGAG
G7_WTB1	GGTAATAATGAGTGGGTGCATGAGTCGCAGAGTCTT
A8_WTB3	AATGCTGCGTATTTTCTTATGATACGACGGGTGAG
B8_WTB5	CATGTTACGTTTAAGTTTCAGTGGGATCGTGAGAGT
B9_WTF3	GCGCATTGGCATTATATGTTGTTCGATGATGTATCCG
C9_WTG1	GCGCATTGGCATTATATGTTGTTCGATGATGTATCCG
D8_WTC3	GAGTCTTGGATTCTTCATTTGAATATGACTAGGAAT
D9_WTG3	AGTAGTGAGACGATGTGGCATTGTTGGTTATTATCCG
E8_WTC5	TTTGGGCAGACTAGTGTGGCGTATCATAGGCTGTGG
E9_WTH1	GCGCATTGGCATTATATGTTGTTCGATGATGTATCCG
F8_WD3	CATTTTGAGTGGTATGATCTGGAGCATCTTTTTTAT
F9_WTH3	GCGCATTGGCATTATATGTTGTTCGATGATGTATCCG
G8_WTD5	AATTTGTGGCGTTGGACGTATGAGTATGAGTATCCT
H7_WTA5	AGTCATGCTCCGCATTCCGGTACTAATGATGTGTCT

İnsert dizilerinin tanımlanmasından sonraki aşamada “ExPASy alignment” aracı ile insert DNA dizileri translasyon mekanizması üzerinden aminoasit dizilerine dönüştürülmüştür. Bu diziler, M13 faj partikülü pIII kapsid proteini ile ilişkili olarak faj yüzeyinde sergilenen ve hedef GDP – doğal tip Kras proteini ile fiziksel etkileşime girme potansiyeli olan 12 amino asitlik peptid dizilerdir. İleriki deneylerde bu diziler arasında Kras ile yüksek afinite ile etkileşenler belirlenecek ve hücrel fonksiyon analizlerinde test

edileceklerdir. ExPASy alignment aracı üzerinden tanımlanan peptid dizileri çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9 GDP - doğal tip Kras faj sunumu peptid dizileri

Örnek	Peptid dizileri
G8_WTD1	ATINVSSHTGMD
A9_WTF1	NHAHYLGALLST
A10_WTE1	QGVDPHIRIMWN
F7_WTA1	NAAYFSYDTTGE
G7_WTB1	GNNEWVHESQSL
A8_WTB3	NAAYFSYDTTGE
B8_WTB5	HVTFKFQWDRES
B9_WTF3	AHWHYMLSMMYP
C9_WTG1	AHWHYMLSMMYP
D8_WTC3	ESWILHLNMTRN
D9_WTG3	SSETMWHLGYYP
E8_WTC5	FGQTSVAYHRLW
E9_WTH1	AHWHYMLSMMYP
F8_WD3	HFEWYDLEHLFY
F9_WTH3	AHWHYMLSMMYP
G8_WTD5	NLWRWTYEYEYP
H7_WTA5	SHAPHSVTNDVS

GDP - doğal tip Kras proteinine bağlanan peptidler arasında olası bir konsensus (tekrarlayan) dizi varlığı “ESPrpt sekans analiz programı” ile analiz edilmiştir. Bu analizlere ait sonuçlar şekil 4.16’da verilmiştir. Gerçekleştirilen biyoinformatik çalışmalarında “global skor” olarak öncelikle programın varsayılan değeri olarak sağladığı “0.7” kullanılmıştır. Etkileşen protein sayısı fazla olduğu için sonrasında sekans sıralamaları için daha düşük global skorlar olan 0.5 ve 0.3 değerleri de alınarak tablolar

oluşturulmuştur. Konsensus değeri 70 olan sekansların global skorları 0.7, 50 olan sekansların 0.5 ve 30 olan sekansların global skorları 0.3'tür.

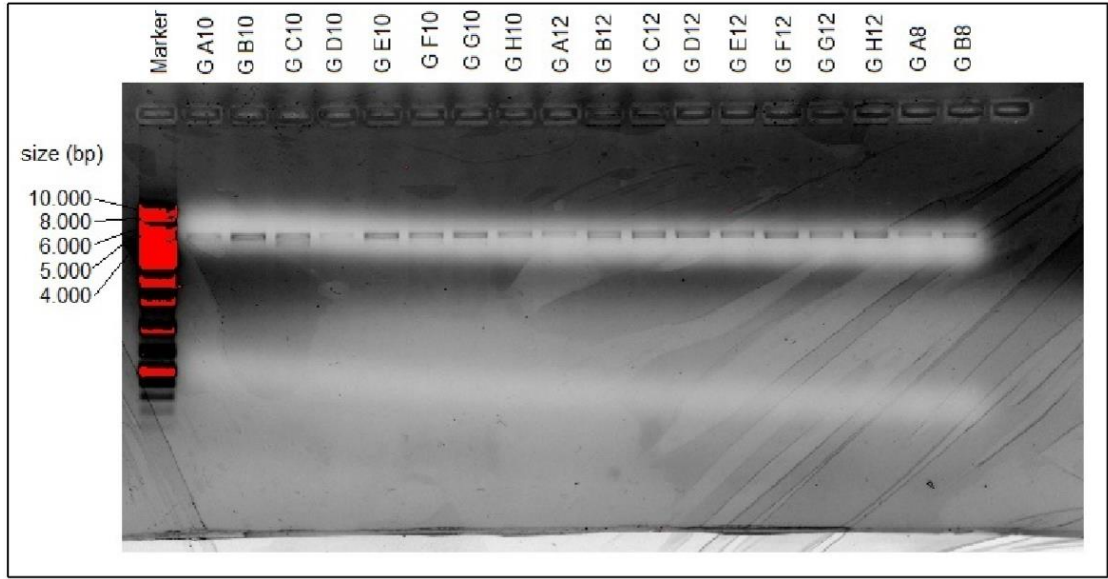
	1	10		1	10		1	10
G8_WTD1	A	T	G8_WTD1	A	T	G8_WTD1	A	T
A10_WTE1	Q	G	A10_WTE1	Q	G	A10_WTE1	Q	G
F7_WTA1	N	A	F7_WTA1	N	A	F7_WTA1	N	A
G7_WTB1	G	N	G7_WTB1	G	N	G7_WTB1	G	N
A8_WTB3	N	A	A8_WTB3	N	A	A8_WTB3	N	A
B8_WTB5	H	V	B8_WTB5	H	V	B8_WTB5	H	V
B9_WTF3	A	H	B9_WTF3	A	H	B9_WTF3	A	H
C9_WTG1	A	H	C9_WTG1	A	H	C9_WTG1	A	H
D8_WTC3	E	S	D8_WTC3	E	S	D8_WTC3	E	S
D9_WTG3	S	S	D9_WTG3	S	S	D9_WTG3	S	S
E8_WTC5	F	G	E8_WTC5	F	G	E8_WTC5	F	G
E9_WTH1	A	H	E9_WTH1	A	H	E9_WTH1	A	H
F8_WTD3	H	F	F8_WTD3	H	F	F8_WTD3	H	F
F9_WTH3	A	H	F9_WTH3	A	H	F9_WTH3	A	H
G8_WTD5	N	L	G8_WTD5	N	L	G8_WTD5	N	L
H7_WTA5	S	H	H7_WTA5	S	H	H7_WTA5	S	H
consensus>30	n	h	consensus>50	.	.	consensus>70	.	.
	y	.		.	.		.	.
	l	e		.	.		.	.
	m	m		.	.		.	.
	y	n		.	.		.	.

Şekil 4.16 GDP - doğal tip Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları

GDP – doğal tip Kras faj sunumu verilerinin biyoinformatik analizleri sonucunda, GDP - doğal tip Kras’a bağlanan “nhw.y.lemmyn” konsensus dizisi tanımlanmıştır. Ayrıca, B9_WTF3, C9_WTG1, E9_WTH1 ve F9_WTH3 örneklerinden ortak AHWHYMLSMYP peptid dizilimi elde edilmiştir.

4.5 GDP - Mutant Kras Hedef Proteinine Bağlanan Faj Partikülleri Dna İzolasyon Verileri

GDP - mutant Kras faj sunumundan elde edilen faj partiküllerine ait DNA izolasyon değerleri GDP - doğal tip Kras verilerine benzer bulunmuştur. Örneklerin DNA jel görüntüleri şekil 4.17’de ve DNA konsantrasyon ve saflık değerleri çizelge 4.10’da verilmiştir. Bu grup için 18 DNA örneğinin tamamında DNA dizi analizi yapılması kararlaştırılmıştır.



Şekil 4.17 GDP - mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüsü

Çizelge 4.10 GDP - mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek	Konsantrasyon (ng/µl)	Saflık (A260/A280)
G A12	34,00	10,18
G B12	81,90	4,029
G C12	77,70	3,049
G D12	42,20	3,385
G E12	55,70	2,665
G F12	51,20	4,096
G G12	64,80	2,966
G H12	34,40	2,567
G A10	25,40	1,608
G B10	51,40	2,653
G C10	57,90	6,226
G D10	30,80	-61,60
G E10	34,90	3,262
G F10	29,60	4,290
G G10	33,00	33,00
G H10	57,90	7,720
G A8	35,30	6,058
G B8	27,60	2,464

4.6 GDP - Mutant Kras Faj Sunumu Biyoinformatik Analizleri

GDP - mutant Kras faj sunumu sonucunda elde edilen 18 faj DNA örneğinin Sanger dideoksi sekans analizi yapılmıştır. İlk aşamada Finch TV programı ile FASTA dizileri üzerinden 36 nükleotidlik insert dizileri belirlenmiştir (çizelge 4.11). Sonrasında bu nükleotid dizileri ExPASy alignment aracı ile peptid dizisine dönüştürülmüştür (çizelge 4.12). Peptid dizileri arasında konsensus sekans varlığının analizi için ESPript sekans analiz programı kullanılmıştır. Bu analizlere ait sonuçlar şekil 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.11 GDP - mutant Kras faj sunumu nükleotid dizileri

Örnek	Nükleotid Dizileri
H8_G10	GGGGGTCAGGAGCGTCATTTTGAGAATAATCATACG
H7_GB10	TGGTGTCTGATTGTAAGACTGCTACGAATATGTAT
B9_GH12	TTTGATTTTTCTAGTATTATTCAGCATAAGACTCGG
B10_GD12	TCGCATTATCAGGGGAATCATGTTGATAATAAGTTG
E8_GC10	CATTGGTATAGGTTGTGGCCTAATGGTCATTTTTCG
F8_GE10	ACTCTTATGACGGCGGATGCTGCGATGAGGATGCGG
A7_GC12	AGTCTTGAGCTTAAGAGGAGTGATGTGCAGCATGCG
H7_GB10	AATCATGCTCATTATCTGGGTGCTTTGTTGTGACG
B7_GD10	GCGCATTGGCATTATATGTTGTGCGATGATGTATCCG
C7_GE12	CATGCGTGATTGGCGGTTGTCTCCTCCTCCTAAG
D6_GA8	CATTGGTATAGGTTGTGGCCTAATGGTCATTTTTCG
D7_GF10	TTTAGTAAGTGTTGTAATACTCTGGAGGTTTCGTAT
E6_GA10	TATGGGATGCATATTAGTGTCGGTCCGGTTATGCG
F6_GA12	GCGCATTGGCATTATATGTTGTGCGATGATGTATCCG
F7_GG12	GGGTGGAATACTTCTTTGGCTTATGGGAGTCTTATG
G6_GB8	TCGCCTGATAGGGATGTTAATATTGAGATGAATTTG
G7_GH10	ACGGAGTGGATGGTTAGGGCTAGTTCGATTGGGGAG
H6_GB12	ACTGCTTATCCGGATTGGTTTACGATGATTGGGCAG

Çizelge 4.12 GDP - mutant Kras faj sunumu peptid dizileri

Örnek	Peptid dizileri
H8_G10	GGQERHFENNHT
H7_GB10	WCPDCKTATNMY
B9_GH12	FDFSSIIQHKTR
B10_GD12	SHYQGNHVDNKL
E8_GC10	HWYRLWPNGHFS
F8_GE10	TLMTADAAMRMR
A7_GC12	SLELKRSVDVQHA
H7_GB10	NHAHYLGALLST
B7_GD10	AHWHYMLSMMP
C7_GE12	HAWYWRLSPPPK
D6_GA8	HWYRLWPNGHFS
D7_GF10	FSKCCNTLEVSY
E6_GA10	YGMHISVRSGYA
F6_GA12	AHWHYMLSMMP
F7_GG12	GSNTSLAYGSLM
G6_GB8	SPDRDVNIEMNL
G7_GH10	TEWMVRASSIGE
H6_GB12	TAYPDWFTMIGQ

H8_G10	1 10	GGQERHFENNHT	H8_G10	1 10	GGQERHFENNHT	H8_G10	1 10	GGQERHFENNHT
H7_GB10		WCPDCKTATNMY	H7_GB10		WCPDCKTATNMY	H7_GB10		WCPDCKTATNMY
B9_GH12		FDFSSIIQHKTR	B9_GH12		FDFSSIIQHKTR	B9_GH12		FDFSSIIQHKTR
B10_GD12		SHYQGNHVDNKL	B10_GD12		SHYQGNHVDNKL	B10_GD12		SHYQGNHVDNKL
E8_GC10		HWYRLWPNGHFS	E8_GC10		HWYRLWPNGHFS	E8_GC10		HWYRLWPNGHFS
F8_GE10		TLMTADAAMRMR	F8_GE10		TLMTADAAMRMR	F8_GE10		TLMTADAAMRMR
A7_GC12		SLELKRSVDVQHA	A7_GC12		SLELKRSVDVQHA	A7_GC12		SLELKRSVDVQHA
H7_GB10		NHAHYLGALLST	H7_GB10		NHAHYLGALLST	H7_GB10		NHAHYLGALLST
B7_GD10		AHWHYMLSMMP	B7_GD10		AHWHYMLSMMP	B7_GD10		AHWHYMLSMMP
C7_GE12		HAWYWRLSPPPK	C7_GE12		HAWYWRLSPPPK	C7_GE12		HAWYWRLSPPPK
D6_GA8		HWYRLWPNGHFS	D6_GA8		HWYRLWPNGHFS	D6_GA8		HWYRLWPNGHFS
D7_GF10		FSKCCNTLEVSY	D7_GF10		FSKCCNTLEVSY	D7_GF10		FSKCCNTLEVSY
E6_GA10		YGMHISVRSGYA	E6_GA10		YGMHISVRSGYA	E6_GA10		YGMHISVRSGYA
F6_GA12		AHWHYMLSMMP	F6_GA12		AHWHYMLSMMP	F6_GA12		AHWHYMLSMMP
F7_GG12		GSNTSLAYGSLM	F7_GG12		GSNTSLAYGSLM	F7_GG12		GSNTSLAYGSLM
G6_GB8		SPDRDVNIEMNL	G6_GB8		SPDRDVNIEMNL	G6_GB8		SPDRDVNIEMNL
G7_GH10		TEWMVRASSIGE	G7_GH10		TEWMVRASSIGE	G7_GH10		TEWMVRASSIGE
H6_GB12		TAYPDWFTMIGQ	H6_GB12		TAYPDWFTMIGQ	H6_GB12		TAYPDWFTMIGQ
consensus>30			consensus>50			consensus>70		

Şekil 4.18 GDP - mutant Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları

Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler kapsamında, GDP - mutant tip Kras’a bağlanan bir konsensus dizi saptanmamıştır. Ancak “HWYRLWPNGHFS” peptid dizisinin E8_GC10 ve D6_GA8 örneklerinde, “AHWHYMLSMYP” peptid dizisinin B7_GD10 ve F6_GA12 örneklerinde temsil edildiği gözlenmiştir.

4.7 GTP - Doğal Tip Ve G12d Mutant Kras Proteini Faj Sunum Sonuçları

GTP - doğal tip ve G12D mutant Kras proteinlerinin faj sunumu deneyleri (biyopanning ve titrasyon basamakları) faj sunumu protokolüne paralel gerçekleştirilmiştir. GTP - doğal tip Kras proteini faj sunumu kapsamında dört biyopanning, GTP- mutant Kras proteini faj sunumunda üç biyopanning döngüsü gerçekleştirilmiştir. Her biyopanning uygulamasında üç farklı aşamada elde edilen örneklerin titrasyonu yapılmıştır:

- a. amplifiye olmamış faj elüat popülasyonu (A serisi)
- b. amplifiye olmuş faj elüat popülasyonu (B serisi)
- c. PEG/NaCl presipitasyonu sonrası süpernatant örnekleri (C serisi, presipitasyon sonrası kaybedilen faj sayısını belirlemek amacıyla)

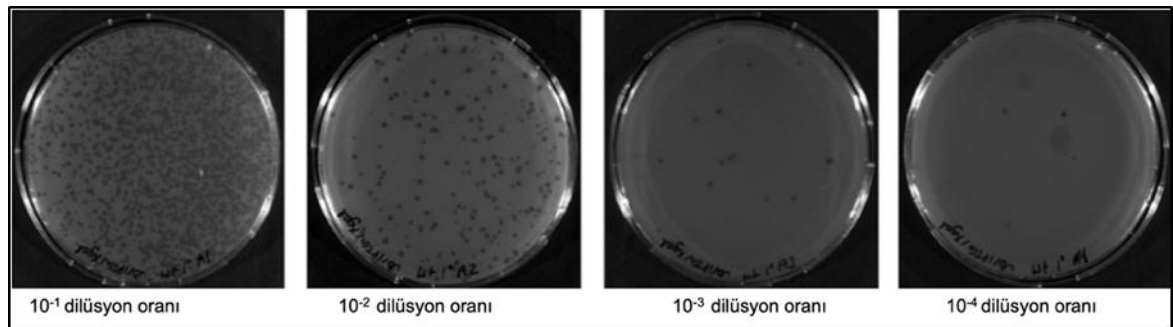
GTP - doğal tip Kras proteini faj sunumu sırasında hem 3. hem de 4. biyopanning örneklerinden DNA elde edilip biyoinformatik analiz gerçekleştirilmiştir. GTP - mutant Kras proteini faj sunumu sırasında 3. biyopanning örneklerinden DNA eldesi ve Sanger dizi analizi sonrasında biyoinformatik analiz gerçekleştirilmiştir.

4.7.1 GTP - doğal tip kras proteini faj sunumu

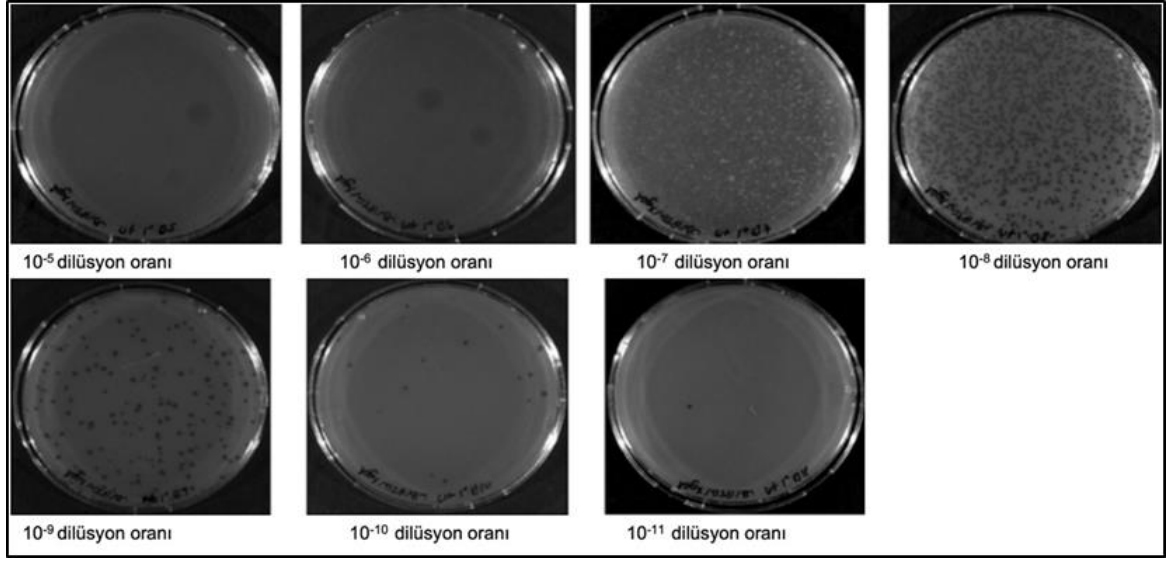
GTP - doğal tip Kras proteinin hedef olarak kullanıldığı faj sunumu prosedüründe 4 ardışık “biyopanning” uygulaması gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bu dört biyopanning uygulamasında elde edilen titrasyon deneylerinin sayısal verileri ve ilgili petrilerin fotoğrafları bulunmaktadır. Burada elde edilen titrasyon değerleri faj sunumu prosedürünün başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Çizelge 4.13 GTP – doğal tip Kras proteini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

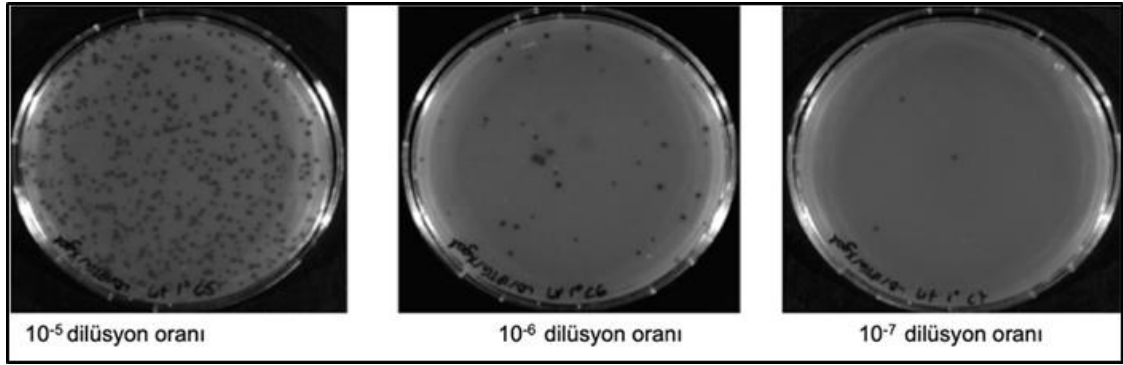
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (1.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
GTP- Doğal Tip Kras	Elüat (A-serisi)	10^{-1}	çok sayıda	—	—
		10^{-2}	180	18×10^5	2×10^5
		10^{-3}	31	31×10^5	$3,56 \times 10^5$
		10^{-4}	4	4×10^5	46×10^4
	Amplifiye Elüat (B-serisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	Amplifiye elüat (B-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	çok sayıda	—	—
		10^{-9}	193	193×10^{11}	$3,8 \times 10^{11}$
		10^{-10}	17	17×10^{12}	$3,4 \times 10^{12}$
		10^{-11}	1	1×10^{13}	2×10^{12}
	PEG Süpernatanı (Cserisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	PEG süpernatanı (C-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	35	35×10^8	70×10^9
		10^{-7}	3	3×10^9	6×10^{10}



Şekil 4.19 GTP – doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları



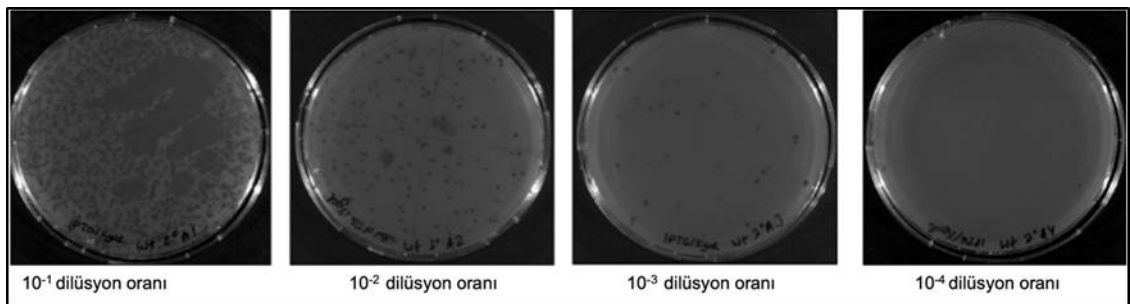
Şekil 4.20 GTP – doğal tip Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları



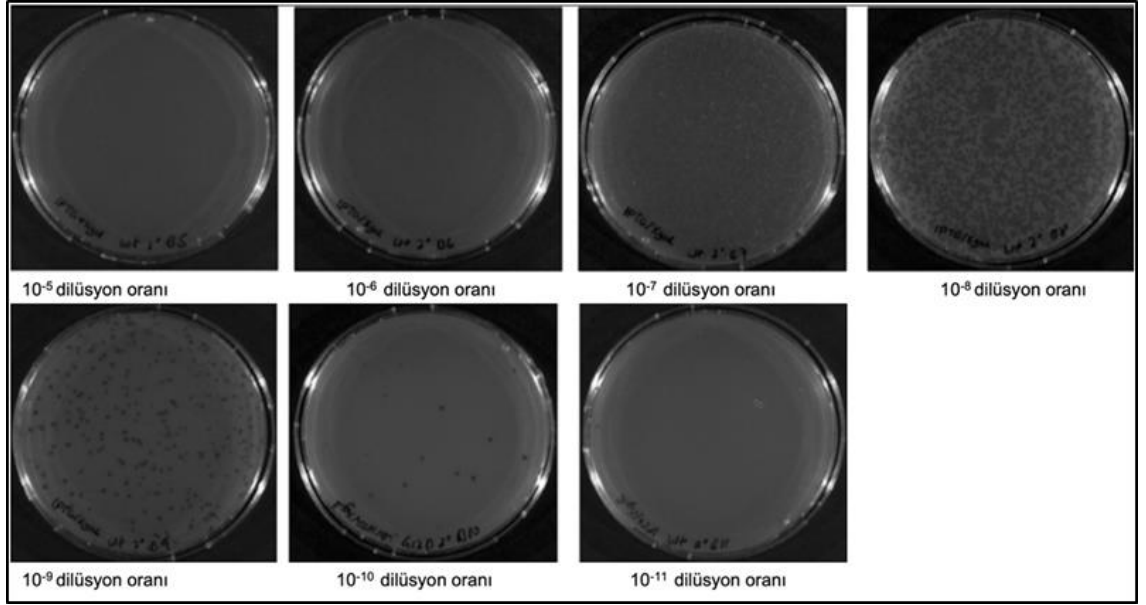
Şekil 4.21 GTP – doğal tip Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.14 GTP – doğal tip Kras proteini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

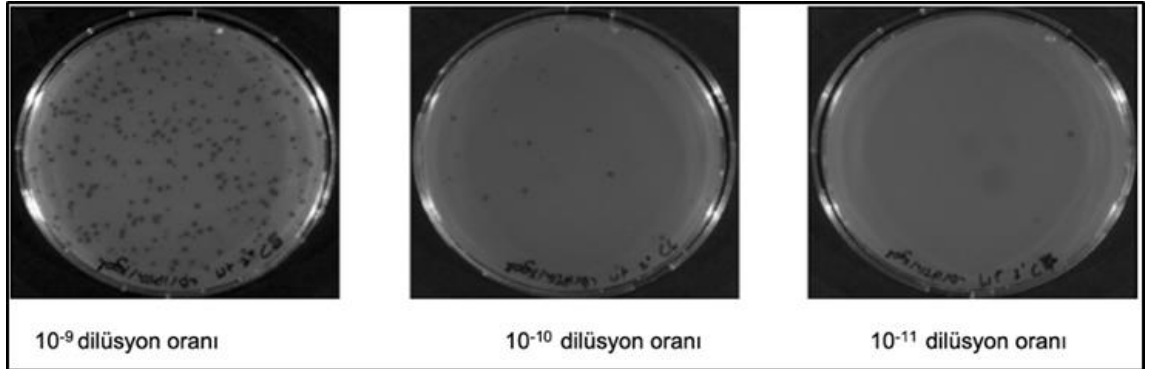
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (1.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
GTP-Doğal Tip Kras	Elüat (A2-serisi)	10^{-1}	456	$4,56 \times 10^5$	$5,24 \times 10^4$
		10^{-2}	68	$6,8 \times 10^5$	$7,82 \times 10^4$
		10^{-3}	15	$1,5 \times 10^6$	$1,73 \times 10^5$
		10^{-4}	1	1×10^6	$1,15 \times 10^5$
	Amplifiye elüat (B2-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	çok sayıda	—	—
		10^{-9}	194	$1,94 \times 10^{13}$	$3,88 \times 10^{12}$
		10^{-10}	33	$3,3 \times 10^{13}$	$6,6 \times 10^{12}$
		10^{-11}	5	5×10^{13}	1×10^{13}
	PEG süpernatanı (C2-serisi)	10^{-2}	çok sayıda	—	—
		10^{-4}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	69	$6,9 \times 10^9$	$1,38 \times 10^{11}$



Şekil 4.22 GTP – doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları



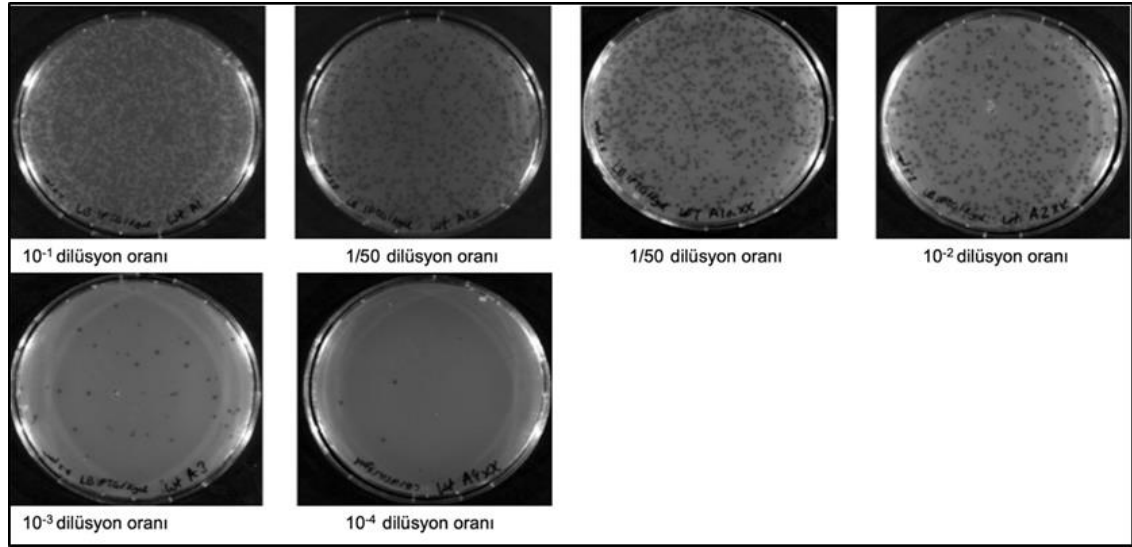
Şekil 4.23 GTP – doğal tip Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları



Şekil 4.24 GTP – doğal tip Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.15 GTP – doğal tip Kras proteini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

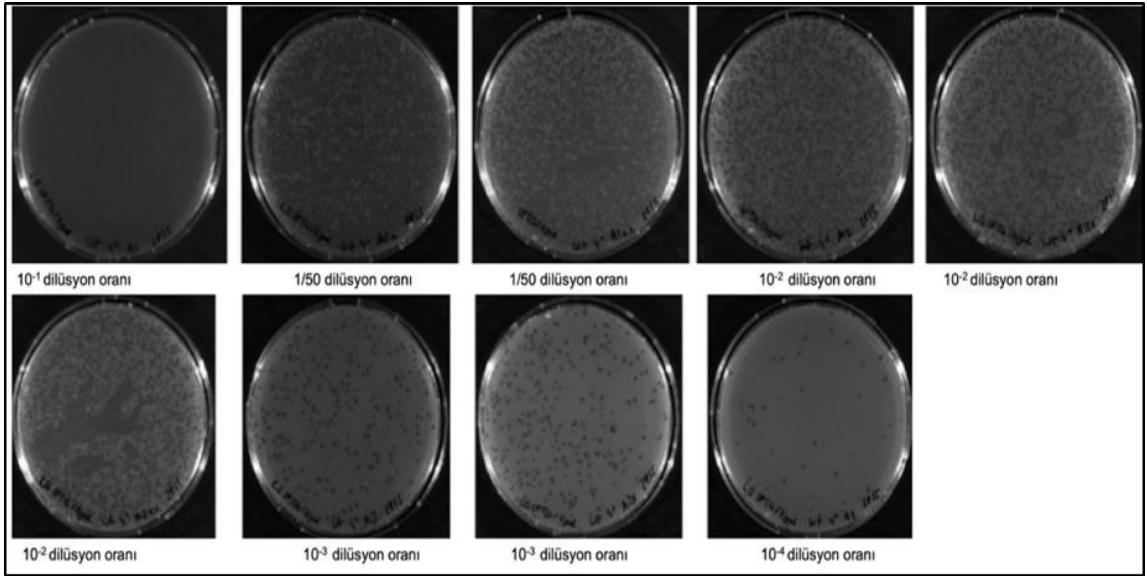
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (3.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
G12D Kras	Elüat (A3-serisi)	10 ⁻¹	çok sayıda	—	—
		1a*	çok sayıda	—	—
		1b*	740	3,7 x 10 ⁶	4,25 x 10 ⁵
		10 ⁻²	379	3,79 x 10 ⁶	4,35 x 10 ⁵
		10 ⁻²	384	3,84 x 10 ⁶	4,41 x 10 ⁵
		10 ⁻³	58	5,8 x 10 ⁶	6,67 x 10 ⁵
		10 ⁻⁴	8	8 x 10 ⁶	9,2 x 10 ⁵
*; 1a ve 1b kodlu dilüsyonlarda tabak başına 100 koloniden daha az bir yoğunluk elde etmek için1:50 dilüsyon uygulanmıştır.					



Şekil 4.25 GTP – doğal tip Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.16 GTP – doğal tip Kras proteini 4. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

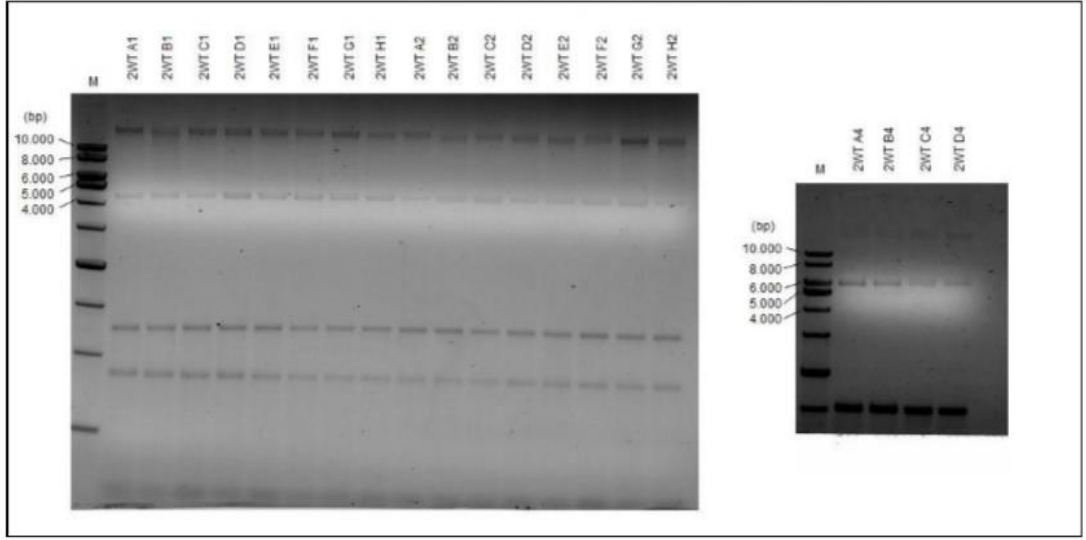
Hedef Protein	Örnek Çeşidi (4.Biyopanning)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
GTP-Doğal Tip Kras	Elüat (A-serisi)	10 ⁻¹	çok sayıda	—	—
		1a*	çok sayıda	—	—
		1b*	çok sayıda	—	—
		10 ⁻²	çok sayıda	—	—
		10 ⁻²	çok sayıda	—	—
		10 ⁻³	322	32,2 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶
		10 ⁻⁴	47	4,7 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁶
*; 1a ve 1b kodlu dilüsyonlarda tabak başına 100 koloniden daha az bir yoğunluk elde etmek için1:50 dilüsyon uygulanmıştır.					



Şekil 4.26 GTP – doğal tip Kras, 4. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları

4.7.2 GTP – doğal tip kras hedef proteinine bağlanan faj partikülleri dna izolasyon verileri (3. biyopanning)

GTP – doğal tip Kras faj sunumundan (3. biyopanning sonrası) elde edilen faj partiküllerine ait DNA izolasyon değerleri önceki çalışmalardan elde edilenler ile benzer bulunmuştur. Örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüleri şekil 4.27’de ve DNA konsantrasyon ve saflık değerleri çizelge 4.17’de verilmiştir. Çembersel, tek iplikli faj DNA örnekleri, elektroforez koşulları nedeniyle birden fazla bant görüntüsü vermiştir. Bu grup için 20 DNA örneğinde DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil. 4.27 GTP – doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüleri (3. biyopanning)

Çizelge 4.17 GTP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri (3. biyopanning)

Örnek	Konsantrasyon (ng / uL)	Saflık (A260/A280)
2WT_A1	92,90	2,518
2WT_B1	94,10	2,407
2WT_C1	105,6	2,743
2WT_D1	129,9	2,547
2WT_E1	124,3	2,496
2WT_F1	129,1	2,888
2WT_G1	103,9	2,411
2WT_H1	100,8	2,389
2WT_A2	89,70	2,318
2WT_B2	95,50	2,567
2WT_C2	131,9	3,575
2WT_D2	88,50	2,690
2WT_E2	132,4	2,248
2WT_F2	193,5	3,707
2WT_G2	141,5	2,419
2WT_H2	90,2	2,784
2WT_A4	114,8	2,490
2WT_B4	146,4	3,832
2WT_C4	109,4	2,532
2WT_D4	89,90	2,716

4.7.3 GTP – doğal tip kras faj sunumu biyoinformatik analizler (3. biyopanning)

GTP – doğal tip Kras faj sunumu, 3. biyopanning sonucunda elde edilen 20 faj DNA örneğinin Sanger dideoksi sekans analizi yapılmıştır. Bu verilerin biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada Finch TV programı ile FASTA dizileri üzerinden 36 nükleotidlik insert dizileri belirlenmiştir (çizelge 4.18). Sonrasında bu nükleotid dizileri ExPASy alignment aracı ile peptid dizisine dönüştürülmüştür (çizelge

4.19). Peptid dizileri arasında konsensus sekans varlığının analizi için ESPript sekans analiz programı kullanılmıştır. Bu analizlere ait sonuçlar şekil 4.28’de verilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında GTP – doğal tip Kras’a bağlanan “f...w..y..mn” konsensus (30) dizisi tanımlanmıştır.

Çizelge 4.18 GTP – doğal tip Kras faj sunumu nükleotid dizileri (3. biyopanning)

Örnek	Nükleotid Dizileri
A9_2WTE2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
H7_2WTD1	TCTGTTACTACTAGTACTCAGACGATTAATGTGGA
B8_2WTF1	TTTACGAATTTGCCGGGTATTAGTCTGAATAAGCGT
B9_2WTF2	ATGTCTTATAAGCTTAATAGTCAGCGTATGCCTACG
C8_2WTG1	TATCTGCGTCATCCGAGTGCTGAGTATAGGTTTTTG
C9_2WTG2	TATTCGTTGCATGTGGATTTGAGTAATGCTAATCTT
D8_2WTH1	AAGTGGGTTTCAGCTGCGGGATTCGTATAGTACTAAT
D9_2WTH2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
E8_2WTA2	CAGCAGATGCATGAGTGGTATTTTCAGAGTTTGCC
E9_2WTA4	GTGCCGGTTCCTAAGAAGATGTGCGCTGGATCCTAC
H8_2WTD2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
F7_2WTB1	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
F8_2WTB2	TATACTCCTAATTGGCATTTTAGGTGGATGCCTGCT
F9_2WTB4	TTTGATTTTTCTAGTATTATTCAGCATAAGACTCGG
H9_2WTD4	ATGAAGTTGAATACTGTTCTTTATGATTATATGACT
G7_2WTC1	CAGCAGATGCATGAGTGGTATTTTCAGAGTTTGCCG
G8_2WTC2	TATACTCCTAATTGGCATTTTAGGTGGATGCCTGCT
G9_2WTC4	TCTACTGCTTTGAAGCAGCTTCCTTCGGTTAGTACT

Çizelge 4.19 GTP – doğal tip Kras faj sunumu peptid dizileri (3. biyopanning)

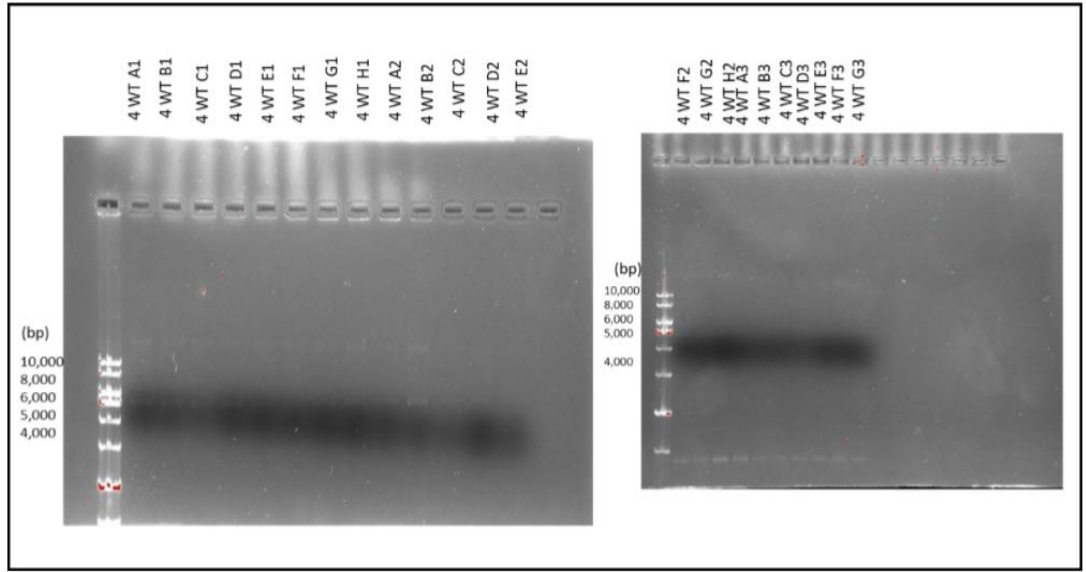
Örnek	Peptid Dizileri
H8_2WTD2	FHSTWPTYSVMN
A9_2WTE2	FHSTWPTYSVMN
H7_2WTD1	SVTTSTQTINVD
B8_2WTF1	FTNLPGISLNKR
B9_2WTF2	MSYKLNSQRMPT
C8_2WTG1	YLRHPSAEYRFL
C9_2WTG2	YSLHVDLSNANL
D8_2WTH1	KWVQLRDSYSTN
D9_2WTH2	FHSTWPTYSVMN
F7_2WTB1	FHSTWPTYSVMN
F8_2WTB2	YTPNWHFRWMPA
F9_2WTB4	FDFSSIIQHKTR
H9_2WTD4	MKLNTVLYDYMT
G7_2WTC1	QQMHEWYFQSLP
G8_2WTC2	YTPNWHFRWMPA
G9_2WTC4	STALKQLPSVST

H8_2WTD2	1 10	FHSTWPTYSVMN	H8_2WTD2	1 10	FHSTWPTYSVMN	H8_2WTD2	1 10	FHSTWPTYSVMN
A9_2WTE2		FHSTWPTYSVMN	A9_2WTE2		FHSTWPTYSVMN	A9_2WTE2		FHSTWPTYSVMN
H7_2WTD1		SVTTSTQTINVD	H7_2WTD1		SVTTSTQTINVD	H7_2WTD1		SVTTSTQTINVD
B8_2WTF1		FTNLPGISLNKR	B8_2WTF1		FTNLPGISLNKR	B8_2WTF1		FTNLPGISLNKR
B9_2WTF2		MSYKLNSQRMPT	B9_2WTF2		MSYKLNSQRMPT	B9_2WTF2		MSYKLNSQRMPT
C8_2WTG1		YLRHPSAEYRFL	C8_2WTG1		YLRHPSAEYRFL	C8_2WTG1		YLRHPSAEYRFL
C9_2WTG2		YSLHVDLSNANL	C9_2WTG2		YSLHVDLSNANL	C9_2WTG2		YSLHVDLSNANL
D8_2WTH1		KWVQLRDSYSTN	D8_2WTH1		KWVQLRDSYSTN	D8_2WTH1		KWVQLRDSYSTN
D9_2WTH2		FHSTWPTYSVMN	D9_2WTH2		FHSTWPTYSVMN	D9_2WTH2		FHSTWPTYSVMN
E8_2WTA2		QQMHEWYFQSLP	E8_2WTA2		QQMHEWYFQSLP	E8_2WTA2		QQMHEWYFQSLP
E9_2WTA4		VPVPKKMSLDPT	E9_2WTA4		VPVPKKMSLDPT	E9_2WTA4		VPVPKKMSLDPT
F7_2WTB1		FHSTWPTYSVMN	F7_2WTB1		FHSTWPTYSVMN	F7_2WTB1		FHSTWPTYSVMN
F8_2WTB2		YTPNWHFRWMPA	F8_2WTB2		YTPNWHFRWMPA	F8_2WTB2		YTPNWHFRWMPA
F9_2WTB4		FDFSSIIQHKTR	F9_2WTB4		FDFSSIIQHKTR	F9_2WTB4		FDFSSIIQHKTR
H9_2WTD4		MKLNTVLYDYMT	H9_2WTD4		MKLNTVLYDYMT	H9_2WTD4		MKLNTVLYDYMT
G7_2WTC1		QQMHEWYFQSLP	G7_2WTC1		QQMHEWYFQSLP	G7_2WTC1		QQMHEWYFQSLP
G9_2WTC4		STALKQLPSVST	G9_2WTC4		STALKQLPSVST	G9_2WTC4		STALKQLPSVST
G8_2WTC2		YTPNWHFRWMPA	G8_2WTC2		YTPNWHFRWMPA	G8_2WTC2		YTPNWHFRWMPA
consensus>30		f...w...y..mn	consensus>50		f.....	consensus>70		

Şekil 4.28 GTP – doğal tip Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları (3. biyopanning)

4.7.4 GTP – doğal tip kras hedef proteinine bağlanan faj partikülleri dna izolasyon verileri (4. biyopanning)

GTP – doğal tip Kras faj sunumundan (4. biyopanning sonrası) elde edilen faj partiküllerine ait DNA izolasyon değerleri önceki çalışmalardan elde edilenler ile benzer bulunmuştur. Örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüleri şekil 4.29’da ve DNA konsantrasyon ve saflık değerleri çizelge 4.20’de verilmiştir. Çembersel, tek iplikli faj DNA örnekleri, elektroforez koşulları nedeniyle birden fazla bant görüntüsü vermiştir. Bu grup için 20 DNA örneğinde DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.29 GTP – doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüleri (4. biyopanning)

Çizelge 4.20 GTP - doğal tip Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri (4. biyopanning)

Örnek	Konsantrasyon (ng / uL)	Saflık (A260/A280)
4E WT A1	94,6	4,462
4E WT B1	71,1	4,709
4E WT C1	94,6	4,57
4E WT D1	61,5	3,75
4E WT E1	88,9	4,805
4E WT F1	54,4	3,726
4E WT G1	60,8	3,494
4E WT H1	63,3	4,032
4E WT A2	64,5	5,039
4E WT B2	47	4,159
4E WT C2	52,5	3,523
4E WT D2	52	4,407
4E WT E2	50,5	5,739
4E WTF2	57,4	3,752
4E WTG2	56,5	3,266
4E WTH2	71,3	2,109
4E WTA3	69,4	7,462
4E WTB3	83,6	8,8
4E WTC3	46,3	3,858
4E WTD3	52,9	2,32
4E WTE3	61,7	2,135
4E WTF3	57,5	4,356
4E WTG3	54,5	2,455

4.7.5 GTP – doğal tip kras faj sunumu biyoinformatik analizler (4. biyopanning)

GTP – doğal tip Kras faj sunumu, 4. biyopanning sonucunda elde edilen 20 faj DNA örneğinin Sanger dideoksi sekans analizi yapılmıştır. Bu verilerin biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada Finch TV programı ile FASTA dizileri üzerinden 36 nükleotidlik insert dizileri belirlenmiştir (çizelge 4.21). Bu nükleotid dizileri ExPASy alignment aracı ile peptid dizisine dönüştürülmüştür (çizelge 4.22). Peptid dizileri arasında konsensus sekans varlığının analizi için ESPript sekans analiz programı kullanılmıştır. Bu analizlere ait sonuçlar şekil 4.30’da verilmiştir.

Bu çalışmalar kapsamında GTP – doğal tip Kras’a bağlanan “fhstwtptysvmn” konsensus (30) dizisi tanımlanmıştır. Bu grup faj sunumunun bir önceki biyopanning’inde “f...w..y..mn” konsensus sekansının elde edilmiş olması, faj sunumu sırasında peptid enrichment’ının başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Faj ELIZA deneyleri optimize olamadığında New England Biolabs firması ile görüşmemizde ELIZA’dan her zaman anlamlı veri gelemeyebileceği ve Kras’a bağlanan peptid dizilerinin tanımlanmasında ELIZA’ya alternatif olarak 4. biopanning döngüsünün uygulanması önerilmişti. Bu sonuçlar ELIZA yerine biopanning döngü sayısının artırılması yönündeki optimizasyonun başarılı olduğunu; 3. biyopanning’de elde edilen “f...w..y..mn” konsensus sekansının, 4.biyopanning sonrasında “fhstwtptysvmn” konsensus dizisinin “enrichment”ını sağladığını göstermektedir.

Çizelge 4.21 GTP – doğal tip Kras faj sunumu nükleotid dizileri (4. biyopanning)

Örnek	Nükleotid Dizileri
A11_4EWTA2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
A12_4EWTA3	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
B11_4EWTB2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
B12_4EWTB3	GCTCTTGCTCCGCATAATCGGAATGTGATTCTTCGG
C11_4EWTC2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
C12_4EWTC3	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
D11_4EWTD2	ATTTCGACGTCTCATACGGTTGATAGTTTTGATATT
D12_4EWTD3	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
E11_4EWTE2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
E12_4EWTE3	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
G10_4EWTG1	TTTATTTCTAAGGTGCCTCAGACGGAGTTTAGTACG
G11_4EWTG2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
G12_4EWTG3	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
H10_4EWTH1	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
H11_4EWTH2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
A7_4EWTC1	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
C7_4EWTE1	CATATTAGTTATAATGAGTATGGGTTTTGGTTTCAG
E12_4EWTA1	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
F12_4EWTB1	GCGACGTTTTGGAAGGTTGATAGGCTGGGGATTAGG
B7_4EWTD1	AGTTGGAATTTGTATATTGGTCGTCCTTATGATACT

Çizelge 4.22 GTP – doğal tip Kras faj sunumu peptid dizileri

Örnek	Peptid Dizileri
A11_4EWTA2	FHSTWPTYSVMN
A12_4EWTA3	FHSTWPTYSVMN
B11_4EWTB2	FHSTWPTYSVMN
B12_4EWTB3	ALAPHNRNVILR
C11_4EWTC2	FHSTWPTYSVMN
C12_4EWTC3	FHSTWPTYSVMN
D11_4EWTD2	ISTSHTVDSFDI
D12_4EWTD3	FHSTWPTYSVMN
E11_4EWTE2	FHSTWPTYSVMN
E12_4EWTE3	FHSTWPTYSVMN
G10_4EWTG1	FISKVPQTEFST
G11_4EWTG2	FHSTWPTYSVMN
G12_4EWTG3	FHSTWPTYSVMN
H10_4EWTH1	FHSTWPTYSVMN
H11_4EWTH2	FHSTWPTYSVMN
B7_4EWTD1	SWNLYIGRPYDT
A7_4EWTC1	FHSTWPTYSVMN
C7_4EWTE1	HISYNEYGFWFQ
E12_4EWTA1	FHSTWPTYSVMN
F12_4EWTB1	ATFWKVDRLGIR

	1	10		1	10		1	10
A11_4EWTA2	FHSTWPTYSVMN		A11_4EWTA2	FHSTWPTYSVMN		A11_4EWTA2	FHSTWPTYSVMN	
A12_4EWTA3	FHSTWPTYSVMN		A12_4EWTA3	FHSTWPTYSVMN		A12_4EWTA3	FHSTWPTYSVMN	
B11_4EWTB2	FHSTWPTYSVMN		B11_4EWTB2	FHSTWPTYSVMN		B11_4EWTB2	FHSTWPTYSVMN	
B12_4EWTB3	ALAPHNRRNVILR		B12_4EWTB3	ALAPHNRRNVILR		B12_4EWTB3	ALAPHNRRNVIL	
C11_4EWTC2	FHSTWPTYSVMN		C11_4EWTC2	FHSTWPTYSVMN		C11_4EWTC2	FHSTWPTYSVMN	
C12_4EWTC3	FHSTWPTYSVMN		C12_4EWTC3	FHSTWPTYSVMN		C12_4EWTC3	FHSTWPTYSVMN	
D11_4EWTD2	ISTSHTVDSFDI		D11_4EWTD2	ISTSHTVDSFDI		D11_4EWTD2	ISTSHTVDSFD	
D12_4EWTD3	FHSTWPTYSVMN		D12_4EWTD3	FHSTWPTYSVMN		D12_4EWTD3	FHSTWPTYSVMN	
E11_4EWTE2	FHSTWPTYSVMN		E11_4EWTE2	FHSTWPTYSVMN		E11_4EWTE2	FHSTWPTYSVMN	
E12_4EWTE3	FHSTWPTYSVMN		E12_4EWTE3	FHSTWPTYSVMN		E12_4EWTE3	FHSTWPTYSVMN	
G10_4EWTC1	FISKVPQTEFST		G10_4EWTC1	FISKVPQTEFST		G10_4EWTC1	FISKVPQTEFS	
G11_4EWTC2	FHSTWPTYSVMN		G11_4EWTC2	FHSTWPTYSVMN		G11_4EWTC2	FHSTWPTYSVMN	
G12_4EWTC3	FHSTWPTYSVMN		G12_4EWTC3	FHSTWPTYSVMN		G12_4EWTC3	FHSTWPTYSVMN	
H10_4EWTH1	FHSTWPTYSVMN		H10_4EWTH1	FHSTWPTYSVMN		H10_4EWTH1	FHSTWPTYSVMN	
H11_4EWTH2	FHSTWPTYSVMN		H11_4EWTH2	FHSTWPTYSVMN		H11_4EWTH2	FHSTWPTYSVMN	
B7_4EWTD1	SWNLYIGRPYDT		B7_4EWTD1	SWNLYIGRPYDT		B7_4EWTD1	SWNLYIGRPYD	
A7_4EWTC1	FHSTWPTYSVMN		A7_4EWTC1	FHSTWPTYSVMN		A7_4EWTC1	FHSTWPTYSVMN	
C7_4EWTE1	HISYNEYGFWFQ		C7_4EWTE1	HISYNEYGFWFQ		C7_4EWTE1	HISYNEYGFWF	
E12_4EWTA1	FHSTWPTYSVMN		E12_4EWTA1	FHSTWPTYSVMN		E12_4EWTA1	FHSTWPTYSVMN	
F12_4EWTB1	ATFWKVDRLGIR		F12_4EWTB1	ATFWKVDRLGIR		F12_4EWTB1	ATFWKVDRLGL	
consensus>30	fhstwptysvmn		consensus>50	fhstwptysvmn		consensus>70	fhstwptysvmn	

Şekil 4.30 GTP – doğal tip Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları (4. biyopanning)

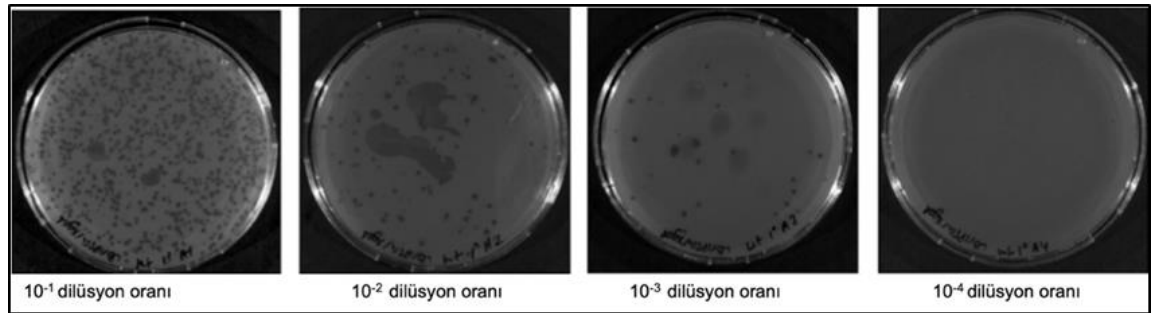
Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler kapsamında, GTP - doğal tip Kras’a bağlanan “fhstwptysvmn” konsensus dizisi saptanmıştır. Bu grup faj sunumunun bir önceki biyopanning sonucunda “f...w..y..mn” konsensus sekansının elde edilmiş olması, faj sunumu sırasında peptid enrichment’ının başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

4.7.6 GTP - Mutant kras proteini faj sunumu

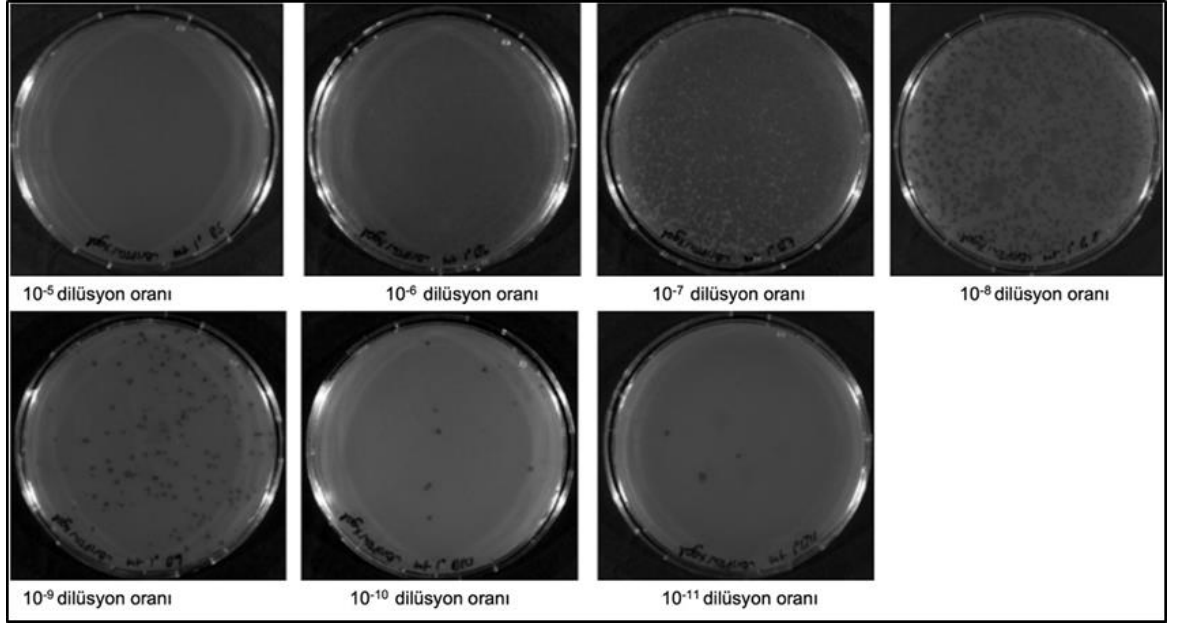
GTP – mutant Kras proteinin hedef olarak kullanıldığı faj sunumu prosedüründe üç ardışık “biyopanning” uygulaması gerçekleştirilmiştir. Aşağıda üç biyopanning uygulamasında elde edilen titrasyon deneylerinin sayısal verileri ve ilgili petrilerin fotoğrafları bulunmaktadır. Burada elde edilen titrasyon değerleri faj sunumu prosedürünün başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Çizelge 4.23 GTP – mutant Kras proteini 1. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

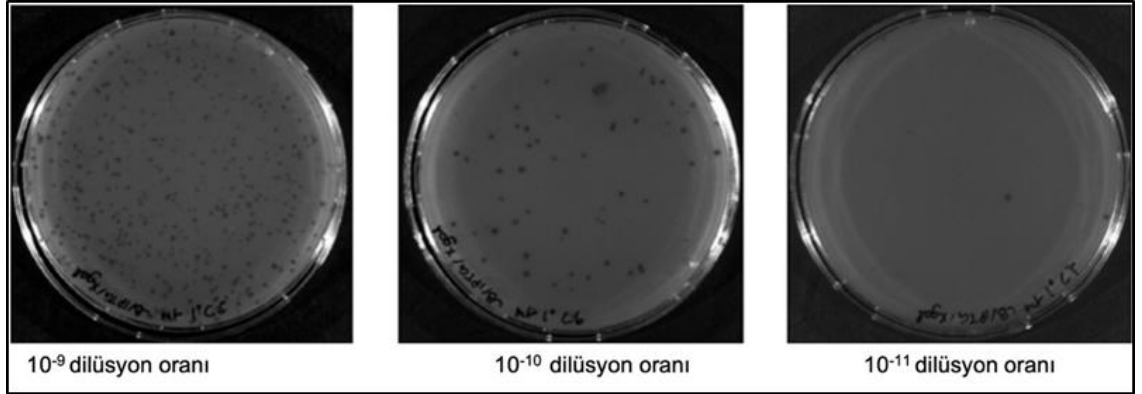
Hedef Protein	Elüat (A-Serisi)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
GTP-Mutant Tip Kras	Elüat (A-serisi)	10^{-1}	çok sayıda	—	—
		10^{-2}	108	108×10^4	$12,4 \times 10^4$
		10^{-3}	14	14×10^5	$16,1 \times 10^4$
		10^{-4}	1	1×10^5	$11,5 \times 10^4$
	Amplifiye Elüat (B-serisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	Amplifiye elüat (B-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	çok sayıda	—	—
		10^{-9}	143	143×10^{11}	$28,6 \times 10^{11}$
		10^{-10}	12	12×10^{12}	$2,4 \times 10^{12}$
		10^{-11}	3	3×10^{13}	6×10^{12}
	PEG Süpernatanı (Cserisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	PEG süpernatanı (C-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	70	70×10^8	14×10^{10}
		10^{-7}	4	4×10^9	80×10^9



Şekil 4.31 GTP – mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A1 serisi) plak fotoğrafları



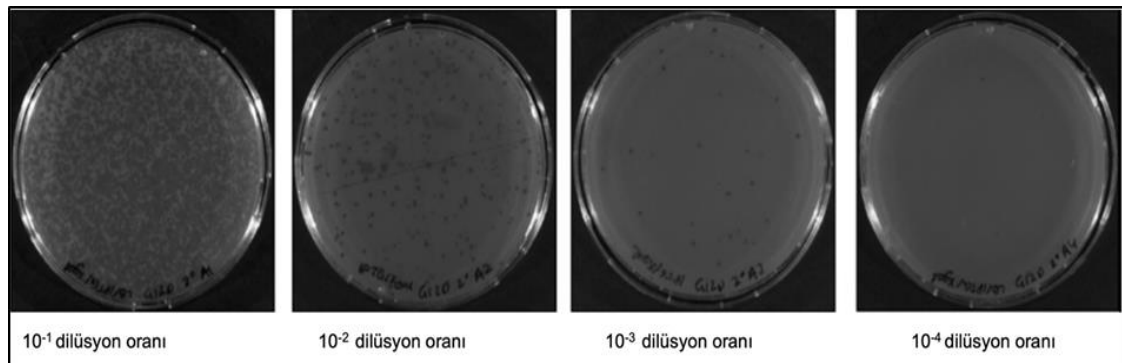
Şekil 4.32 GTP – mutant Kras, 1. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B1 serisi) plak fotoğrafları



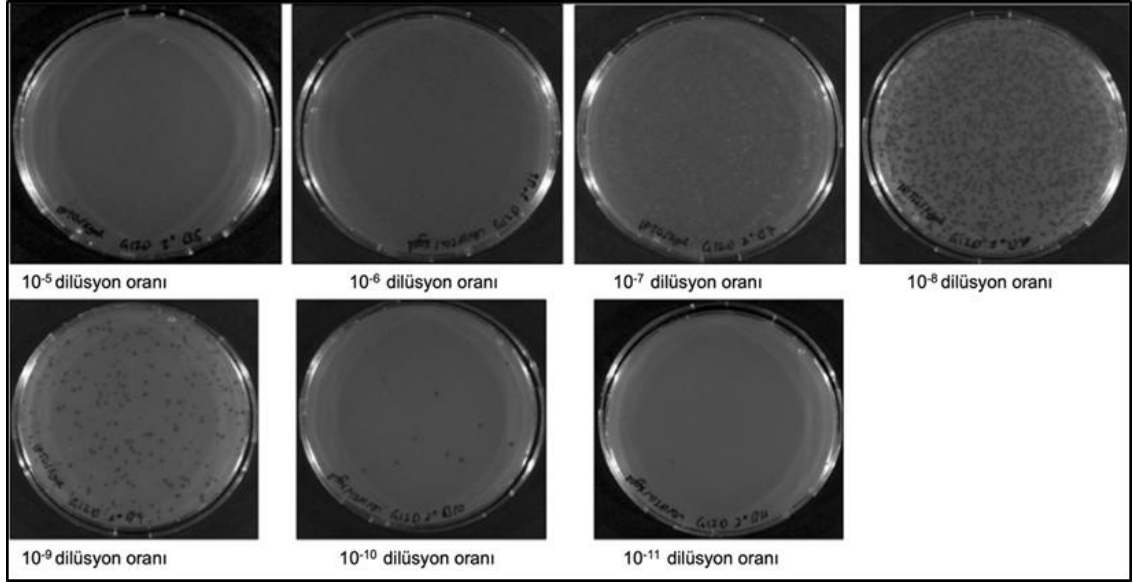
Şekil 4.33 GTP – mutant Kras, 1. biyopanning, PEG süpernatanı (C1 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.24 GTP – mutant Kras proteini 2. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

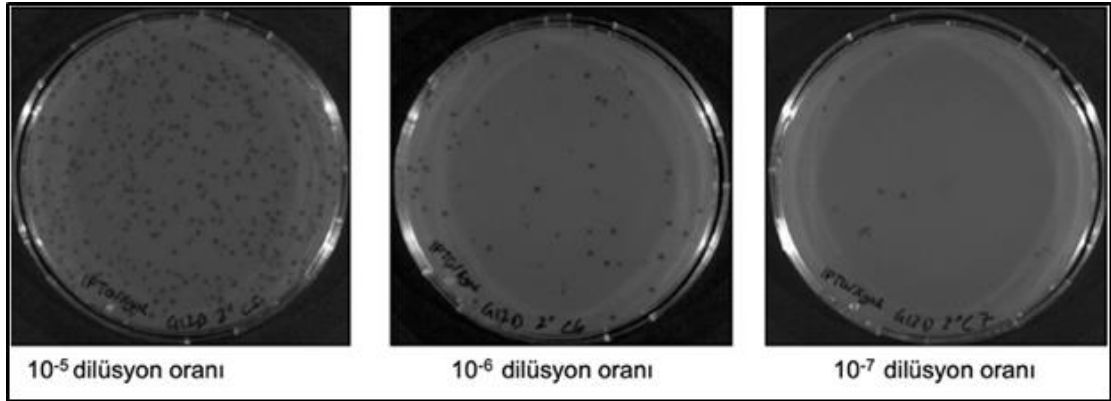
Hedef Protein	Elüat (A-Serisi)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
GTP-Mutant Tip Kras	Elüat (A-serisi)	10^{-1}	çok sayıda	—	—
		10^{-2}	251	$25,1 \times 10^5$	$28,8 \times 10^4$
		10^{-3}	28	28×10^5	$32,2 \times 10^4$
		10^{-4}	2	2×10^6	$2,3 \times 10^4$
	Amplifiye Elüat (B-serisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	Amplifiye elüat (B-serisi)	10^{-5}	çok sayıda	—	—
		10^{-6}	çok sayıda	—	—
		10^{-7}	çok sayıda	—	—
		10^{-8}	çok sayıda	—	—
		10^{-9}	247	$24,7 \times 10^{12}$	$4,94 \times 10^{12}$
		10^{-10}	17	17×10^{12}	$3,4 \times 10^{12}$
		10^{-11}	1	1×10^{13}	2×10^{12}
	PEG Süpernatanı (Cserisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	PEG süpernatanı (C-serisi)	10^{-5}	275	$27,5 \times 10^8$	$5,5 \times 10^{10}$
		10^{-6}	61	61×10^8	$12,2 \times 10^{10}$
		10^{-7}	7	7×10^9	1×10^{10}



Şekil 4.34 GTP – mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A2 serisi) plak fotoğrafları



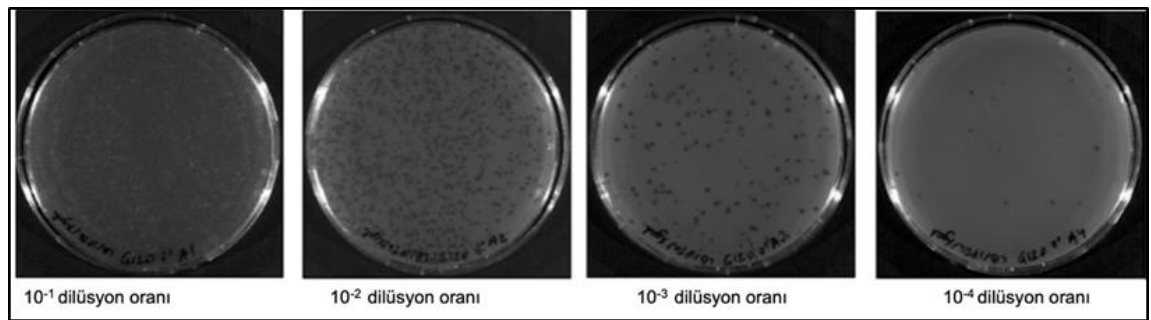
Şekil 4.35 GTP – mutant Kras, 2. biyopanning, amplifiye olmuş eluat (B2 serisi) plak fotoğrafları



Şekil 4.36 GTP – mutant Kras, 2. biyopanning, PEG süpernatanı (C2 serisi) plak fotoğrafları

Çizelge 4.25 GTP – mutant Kras proteini 3. biyopanning işlemi sonrasında elde edilen M13 fajı titrasyon değerleri

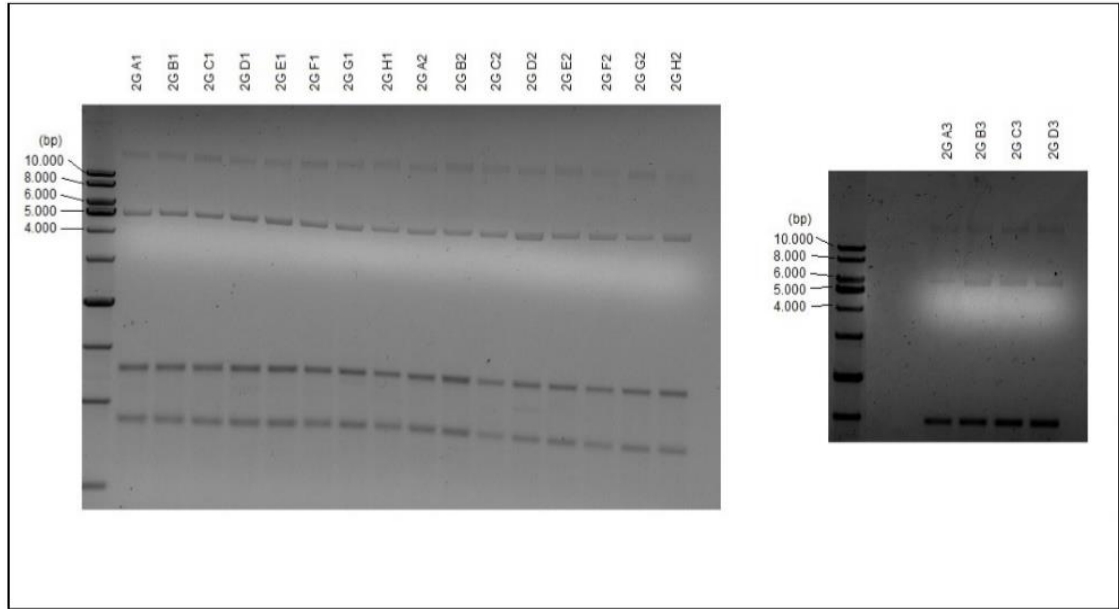
Hedef Protein	Elüat (A-Serisi)	Dilüsyon Oranı	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
GTP- Mutant Tip Kras	Elüat (A-serisi)	10^{-1}	çok sayıda	—	—
		10^{-2}	çok sayıda	—	—
		10^{-3}	161	161×10^5	$18,5 \times 10^5$
		10^{-4}	17	17×10^6	$19,5 \times 10^5$
	Amplifiye Elüat (B-serisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	PEG Süpernatanı (Cserisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)
	PEG süpernatanı (C-serisi)	Dilüsyon	Gözlenen Plak Sayısı	Faj Titrasyonu (pfu/ml)	Toplam Plak Sayısı (pfu)



Şekil 4.37 GTP – mutant Kras, 3. biyopanning, amplifiye olmamış eluat (A3 serisi) plak fotoğrafları

4.7.7 GTP – mutant kras hedef proteinine bağlanan faj partikülleri dna izolasyon verileri

GTP – mutant Kras faj sunumundan elde edilen faj partiküllerine ait DNA izolasyon değerleri önceki çalışmalardan elde edilenler ile benzer bulunmuştur. Örneklerin agaroz jel elektroforez görüntüleri şekil 4.38 ve DNA konsantrasyon ve saflık değerleri çizelge 4.26’da verilmiştir. Çembersel, tek iplikli faj DNA örnekleri, elektroforez koşulları nedeniyle birden fazla bant görüntüsü vermiştir. Bu grup için 20 DNA örneğinde DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.38 GTP – mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait jel görüntüler

Çizelge 4.26 GTP - mutant Kras faj sunumu DNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek	Konsantrasyon (ng / uL)	Saflık (A260/A280)
2G_A1	92,00	2,714
2G_B1	119,8	2,958
2G_C1	78,40	2,489
2G_D1	95,10	2,372
2G_E1	96,20	2,448
2G_F1	114,6	2,378
2G_G1	115,4	2,808
2G_H1	104,4	2,610
2G_A2	77,10	2,268
2G_B2	98,00	2,306
2G_C2	104,8	4,062
2G_D2	126,4	2,748
2G_E2	90,10	2,789
2G_F2	127,3	4,514
2G_G2	103,0	2,943
2G_H2	122,8	3,01
2G_A3	122,2	3,070
2G_B3	130,0	2,610
2G_C3	197,5	5,051
2G_D3	277,5	4,938

4.7.8 GTP – mutant kras faj sunumu biyoinformatik analizler

GTP – mutant Kras faj sunumu sonucunda elde edilen 20 faj DNA örneğinin Sanger dideoksi sekans analizi yapılmıştır. Örneklerin 3 tanesinde sekans analiz kalitesi yeterli olmadığından dolayı kalan 17 örneğin biyoinformatik analizi gerçekleştirilmiştir.

Biyoinformatik analizler, gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada Finch TV programı ile FASTA dizileri üzerinden 36 nükleotidlik insert dizileri belirlenmiştir (çizelge 4.27). Sonrasında bu nükleotid dizileri ExPASy alignment aracı ile peptid dizisine dönüştürülmüştür (çizelge 4.28) Peptid dizileri arasında konsensus sekans varlığının analizi için ESPript sekans analiz programı kullanılmıştır. Bu analizlere ait sonuçlar şekil 4.39’da verilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında GDP - mutant tip Kras’a bağlanan herhangi bir konsensus dizi elde edilmemiştir. Ancak “FHSTWPTY SVMN” peptid dizisinin B11_2GB2, C12_2GC3 ve F10_2GF1 örneklerinde, temsil edildiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.27 GTP – mutant Kras faj sunumu nükleotid dizileri

Örnek	Nükleotid Dizileri
H11_2GH2	TTTCATCTTCCTCCGCCTAAGAGGCTTATTGCTACG
A11_2GA2	GATCATCTGTCTGAATCGTATTCATCATGAGCATGTG
A12_2GA3	GTTTCAGGTTAGGGATAATCTTCCGACTACGACGGGT
B10_2GB1	ATGATTAAGGGTAATATGGCGAATCTGCATACTCAT
B11_2GB2	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
B12_2GB3	TTTGATTTTTCTAGTATTATTCAGCATAAGACTCGG
H10_2GH1	TGGGAGAGTGAGTGGCAGGATTATGGTAGGCCGTAT
C10_2GC1	GAGTTGACTGTGATGGTTGCTTCTACGGATAGGTAT
C11_2GC2	ATTGATAGTATGGTGTGGAGTGATCTTGATGAGTAT
C12_2GC3	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
D10_2GD1	GGGAGTTGGTGGGTGAATGGGCTTCTCAGTTGGCT
D12_2GD3	TGGGATATGTGGCCGTCTATGGATTGGAAGGCGGAG
E10_2GE1	AAGCCGTTGTCTGCTGACGGAGGCGCCTGGTACTAGT
E11_2GE2	TGGTGTATGCTGAATCATTGTATTACGGTTCAGCAT
F10_2GF1	TTTCATAGTACTTGGCCTACTTATTCTGTTATGAAT
F11_2GF2	TGGGATATGTGGCCGTCTATGGATTGGAAGGCGGAG
G11_2GG2	GTGGATTTGCATGATAATTGGTATTCTCATAATGGG

Çizelge 4.28 GTP – mutant Kras faj sunumu peptid dizileri

Örnek	Peptid Dizileri
A11_2GA2	DHLSNRIHHEHV
A12_2GA3	VQVRDNLPTTTG
B10_2GB1	MIKGNMANLHTH
B11_2GB2	FHSTWPTY SVMN
B12_2GB3	FDFSSIIQHKTR
H10_2GH1	WESEWQDYGRPY
C10_2GC1	ELTVMVASTDRY
C11_2GC2	IDSMVWSDLDEY
C12_2GC3	FHSTWPTY SVMN
D10_2GD1	GSWWVNGLSQLA
D12_2GD3	WDMWPSMDWKAE
E10_2GE1	KPLSLTEAPGTS
E11_2GE2	WCMLNHCITVQH
H11_2GH2	FHLPPPKRLIAT
F10_2GF1	FHSTWPTY SVMN
F11_2GF2	WDMWPSMDWKAE
G11_2GG2	VDLHDNWYSHNG

	1	10		1	10		1	10
A11_2GA2	D	H	A11_2GA2	D	H	A11_2GA2	D	H
A12_2GA3	V	Q	A12_2GA3	V	Q	A12_2GA3	V	Q
B10_2GB1	M	I	B10_2GB1	M	I	B10_2GB1	M	I
B11_2GB2	F	H	B11_2GB2	F	H	B11_2GB2	F	H
B12_2GB3	F	D	B12_2GB3	F	D	B12_2GB3	F	D
H10_2GH1	W	E	H10_2GH1	W	E	H10_2GH1	W	E
C10_2GC1	E	L	C10_2GC1	E	L	C10_2GC1	E	L
C11_2GC2	I	D	C11_2GC2	I	D	C11_2GC2	I	D
C12_2GC3	F	H	C12_2GC3	F	H	C12_2GC3	F	H
D10_2GD1	G	S	D10_2GD1	G	S	D10_2GD1	G	S
D12_2GD3	W	D	D12_2GD3	W	D	D12_2GD3	W	D
E10_2GE1	K	P	E10_2GE1	K	P	E10_2GE1	K	P
E11_2GE2	W	C	E11_2GE2	W	C	E11_2GE2	W	C
H11_2GH2	F	H	H11_2GH2	F	H	H11_2GH2	F	H
F10_2GF1	F	H	F10_2GF1	F	H	F10_2GF1	F	H
F11_2GF2	W	D	F11_2GF2	W	D	F11_2GF2	W	D
G11_2GG2	V	D	G11_2GG2	V	D	G11_2GG2	V	D
consensus>30	.dl.....		consensus>50			consensus>70		

Şekil 4.39 GTP – mutant Kras proteinine bağlanan peptidlerin üç farklı konsensus değerindeki karşılaştırmaları

4.7.8 Yüzey plazmonan rezonans uygulaması

Faj sunumu deneylerinde Kras doğal tip ve KrasG12D proteinlerine bağlanma afinitesi en yüksek olan inhibitör peptidler yüzey plazmonan rezonans yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre seçilen 7 peptid dizisinden:

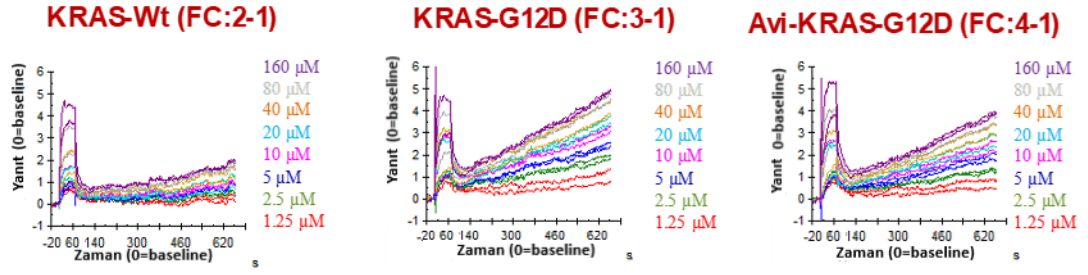
- Peptid 3'ün, doğal tip Kras proteinine bağlanma KD değeri 27.9 μ M, mutant Kras'a bağlanma KD değeri 15.7 μ M;
- Peptid 4'ün doğal tip Kras proteinine bağlanma KD değeri 40.9 μ M, mutant Kras'a bağlanma KD değeri 38.2 μ M;
- Peptid 5'in, doğal tip Kras proteinine bağlanma KD değeri 52.0 μ M, mutant Kras'a bağlanma KD değeri 7.8 μ M olarak saptanmıştır.

Diğer dört peptid dizileri ile gerçekleştirilen yüzey plazmonan rezonans analizlerinde Kras proteinlerine yönelik ya hiç bağlanma gözlenmemiş ya da elde edilen verilerin kalitesi yeterli bulunmamıştır. Bu deneylerde rekombinant CD99 proteini negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Biacore analizlerinden elde edilen bulgular çizelge 4.29'da ve şekil 4.40'ta sunulmuştur.

Çizelge 4.29 Biacore analizlerinden elde edilen bulgular

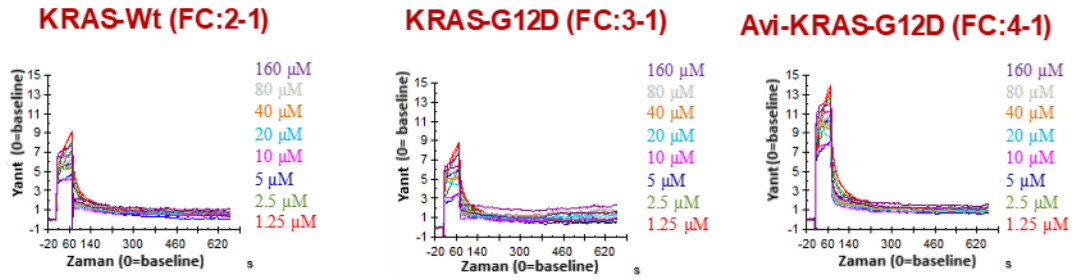
Analit	Ligand		
	KRAS-Wt (FC:2-1) KD	KRAS-G12D (FC:3-1) KD	Avi-KRAS-G12D (FC:4-1) KD
Peptid 1	NA	NA	NA
Peptid 2	NA	NA	NA
Peptid 3	27.9 μ M	15.7 μ M	27.7 μ M
REF1-RBD	0.4 μ M	0.8 μ M	0.8 μ M
Analit	Ligand		
	KRAS-Wt (FC:2-1) KD	KRAS-G12D (FC:3-1) KD	Avi-KRAS-G12D (FC:4-1) KD
Peptid 4	40.9 μ M	38.2 μ M	50.0 μ M
Peptid 5	52.0 μ M	7.8 μ M	54.6 μ M
Peptid 6	NA	NB	27.7 μ M
Peptid 7	NA	NA	0.8 μ M

Peptid 1



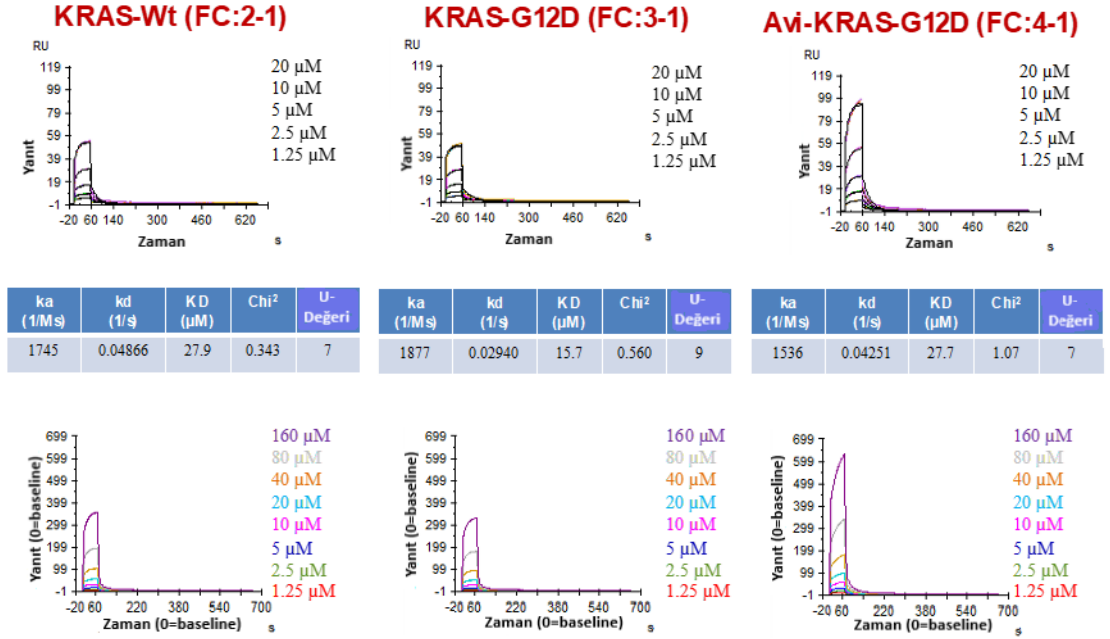
Şekil 4.40 Peptid 1'in CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri

Peptid 2



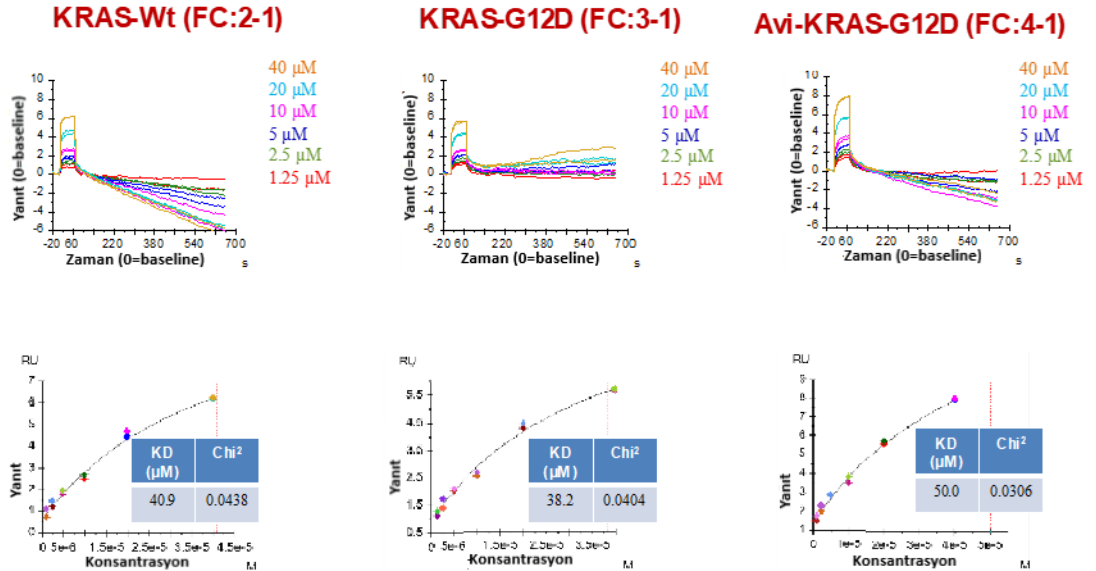
Şekil 4.41 Peptid 2'nin CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri

Peptid 3



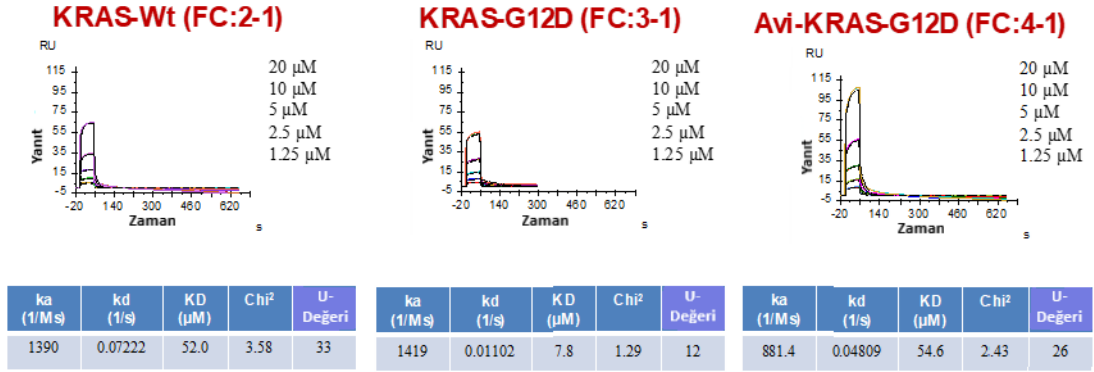
Şekil 4.42 Peptid 3'ün CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri

Peptid 4



Şekil 4.43 Peptid 4'ün CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri

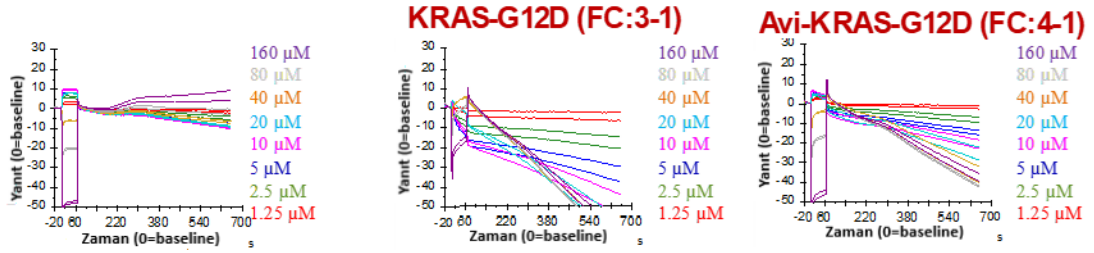
Peptid 5



*Döngünün sonuna doğru ayrışma sinyalleri kullanılmadı

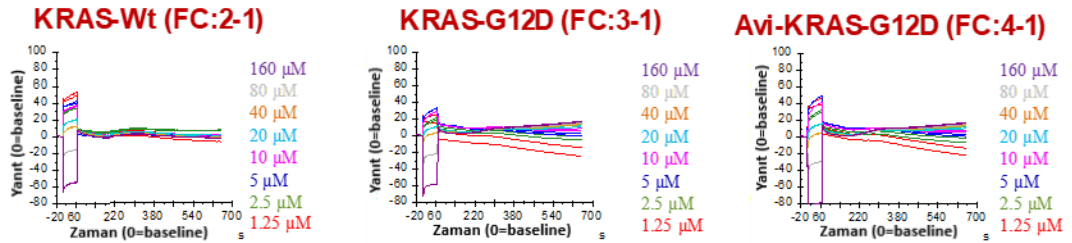
Şekil 4.44 Peptid 5'in CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri

Peptid 6



Şekil 4.45 Peptid 6'nın CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri

Peptid 7



Şekil 4.46 Peptid 7'nin CM5 Biacore çipi üzerine immobilize halde bulunan rekombinant doğal tip, mutant KrasG12D ve avidin takılı mutant KrasG12D proteinlerine bağlanma afiniteleri

4.7.9 Hücre düzeyinde deneyler

4.7.9.1 Faj sunumu sonrası seçilen peptidlerin pankreas kanseri hücrelerinin (AsPC1 ve BxPC3) proliferasyonu üzerindeki etkileri ve sitotoksosite (IC50) analizleri

Yüzey plazmonan rezonans uygulaması ile belirlenen Kras'a yüksek afinite ile bağlanan inhibitör peptidlerin bu onkoprotein üzerindeki fonksiyonel etkilerinin analiz edilmesi planlanmıştır. Bu deneylerde, doğal tip Kras geni taşıyan BxPC-3 hücre hattı negatif kontrol ve pankreas kanserinde en sık gözlenen Kras mutasyonu olan G12D mutasyonunu taşıyan AsPC-1 hücre hattı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Bu aşamada hücreler, inhibitör peptidler ile belirli konsantrasyon ve zaman aralıklarında muamele edilmiş ve inhibitör peptidlerin pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri ve sitotoksosite (IC50) analizi gerçekleştirilmiştir.

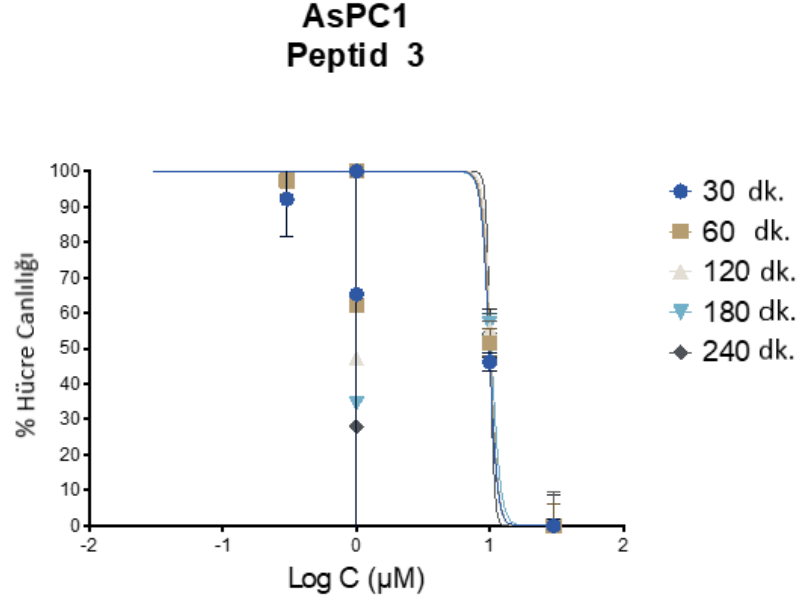
Faj sunumu deneyleri sonucunda 7 peptid tanımlanmıştır. Bu peptidlerin doğal tip ve mutant Kras proteinlerine bağlanma özellikleri yüzey plazmon rezonans yöntemi ile analiz edildiğinde 3 peptidin rekombinant Kras proteinlerine karşı spesifik bağlanma gösterdiği saptanmıştır. Her bir peptid dizisinin -NH₂ ucuna, hücre membranından penetrasyonunu destekleyecek 16 amino asitlik Antenopedia dizisi (Ant; RQIKIWFQNRRMKWKK) eklenmesi kararlaştırılmıştır. Peptidlerin hücre içi lokasyonunu belirleyebilmek amacıyla yine her bir peptid dizisinin -COOH ucuna FITC floresan işaretinin eklenmesi, FITC işaretinin -COOH ucuna eklenebilmesi için dizinin sonuna ilave bir Lizin amino asidi ilave edilmesi ve FITC'nin bu lizinin yan zincirinde bulunan amino grubuna dahil edilmesi kararlaştırılmıştır.

Peptid 3, 4 ve 5 ile muamele edilen AsPC1 ve BxPC3 hücrelerinin wst analizi

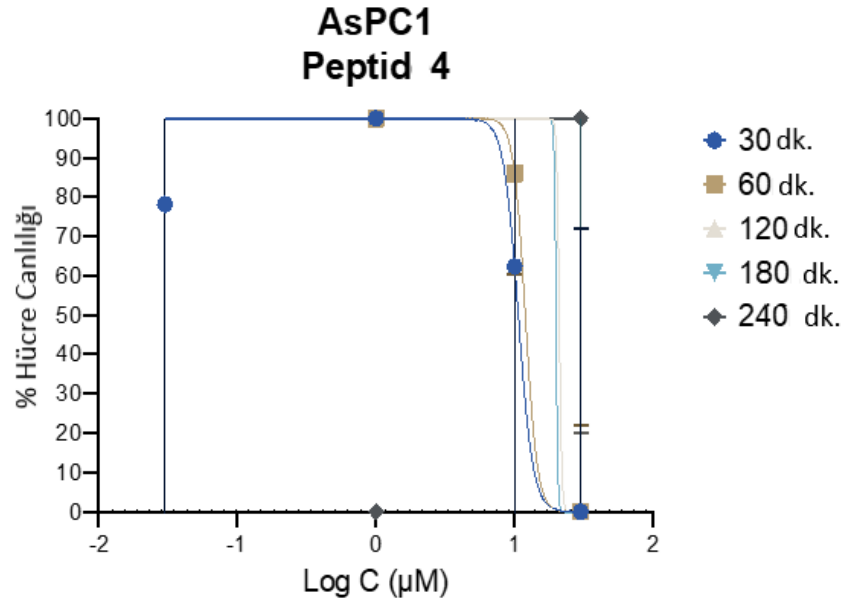
Bu analizlerde, 5,000 ve 20,000 hücre/kuyu olacak şekilde, 48 ve 96 saatlik inkübasyon süreleri ve 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM ve 30 µM peptid konsantrasyon aralıkları denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre AsPC1 hücrelerinde Peptid 3'ün IC50 değeri 12 µM, Peptid 4'ün IC50 değeri 3 µM ve Peptid 5'in IC50 değeri 10 µM olarak

saptanmış olup BxPC3 hücreleri üzerinde peptidlerin farklı konsantrasyon değerlerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir.

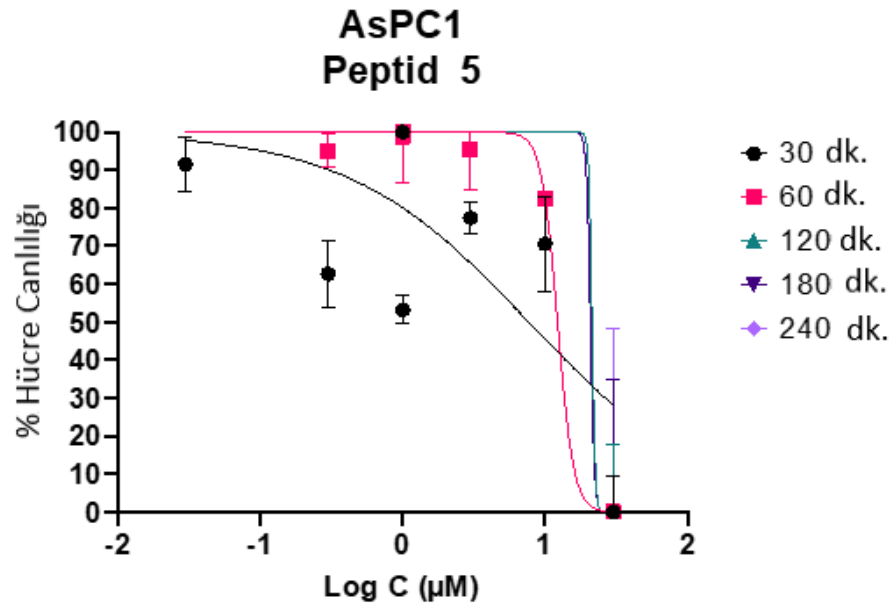
Peptid 3, 4 ve 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinin wst analizi



Şekil 4.47 Peptid 3 Muamele Edilen AsPC1 hücrelerinin WST analizi

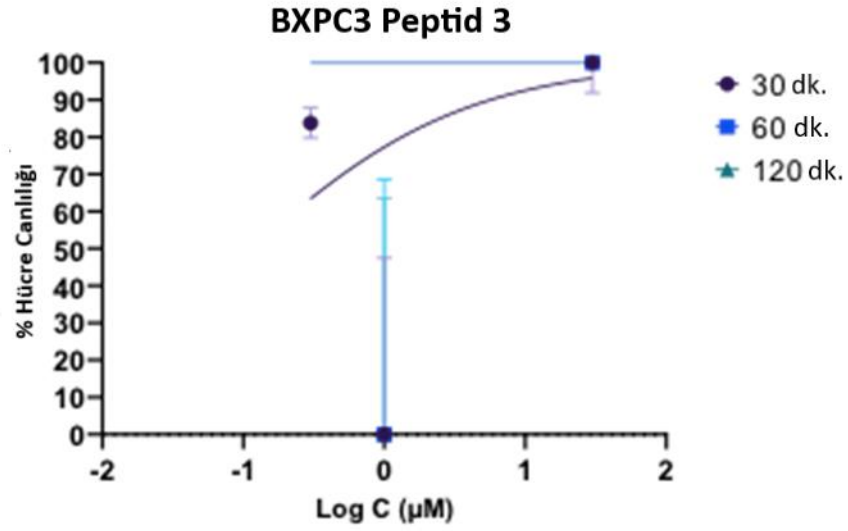


Şekil 4.48 Peptid 4 Muamele Edilen AsPC1 hücrelerinin WST analizi

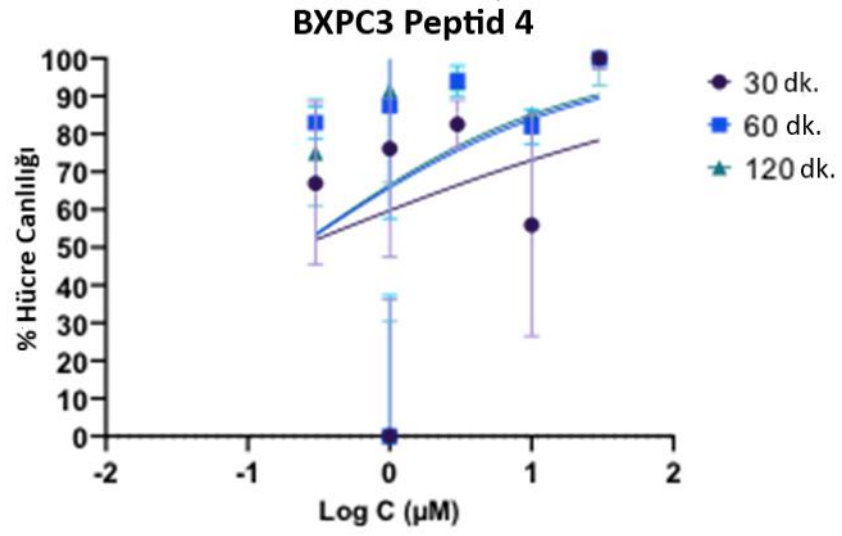


Şekil 4.49 Peptid 5 Muamele Edilen AsPC1 hücrelerinin WST analizi

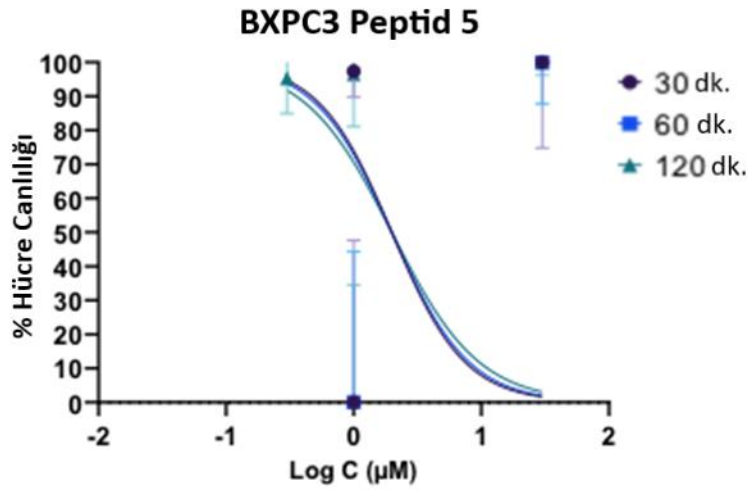
Peptid 3, 4 ve 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinin wst analizi



Şekil 4.50 Peptid 3 Muamele Edilen BxPC3 hücrelerinin WST analizi



Şekil 4.51 Peptid 4 Muamele Edilen BxPC3 hücrelerinin WST analizi



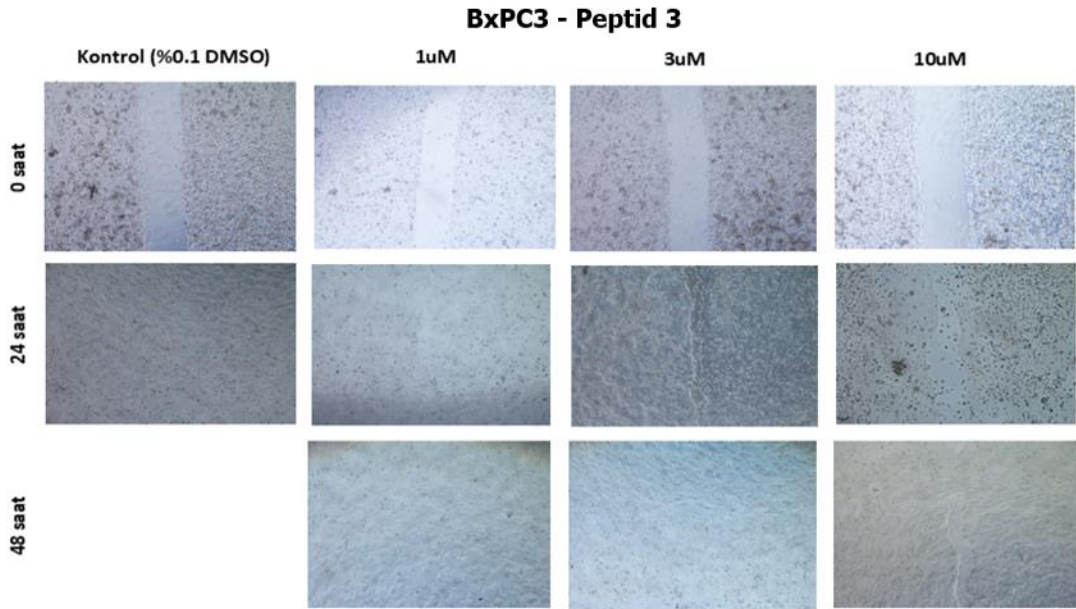
Şekil 4.52 Peptid 5 Muamele Edilen BxPC3 hücrelerinin WST analizi

4.7.9.2 Tanımlanan inhibitör peptidlerin BxPC3 ve AsPC1 pankreas kanseri hücrelerinin motilitesi üzerindeki etkisi yara iyileşme analizi

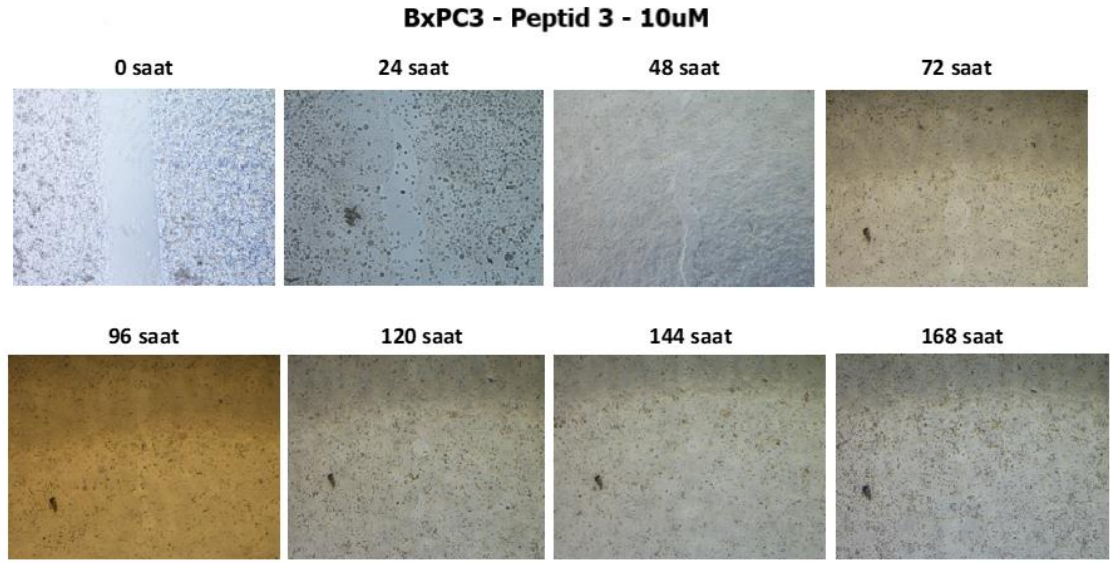
Tanımlanan inhibitör peptidlerin BxPC3 ve AsPC1 pankreas kanseri hücrelerinin motilitesi üzerindeki etkisi yara iyileşme modeli ile analiz edilmiştir.

BxPC3 hücrelerinin peptidlerin 1uM, 3uM ve 10uM konsantrasyonlarındaki muamelesi eşliğinde gerçekleşen yara iyileşmesi deneyi sonucunda herhangi bir peptid ile muamele edilmeyen kontrol koşulunda yaranın 24 saatte kapandığı, peptidler ile muamele edilen örneklerde ise konsantrasyona bağlı olarak yara kapanmasında anlamlı yavaşlama olduğu gözlenmiştir. En anlamlı fark hücreler, 10uM Peptid 3 ile muamele edildiğinde gözlenmiş olup bu yaranın 168. saatte halen kapanmamış olduğu saptanmıştır.

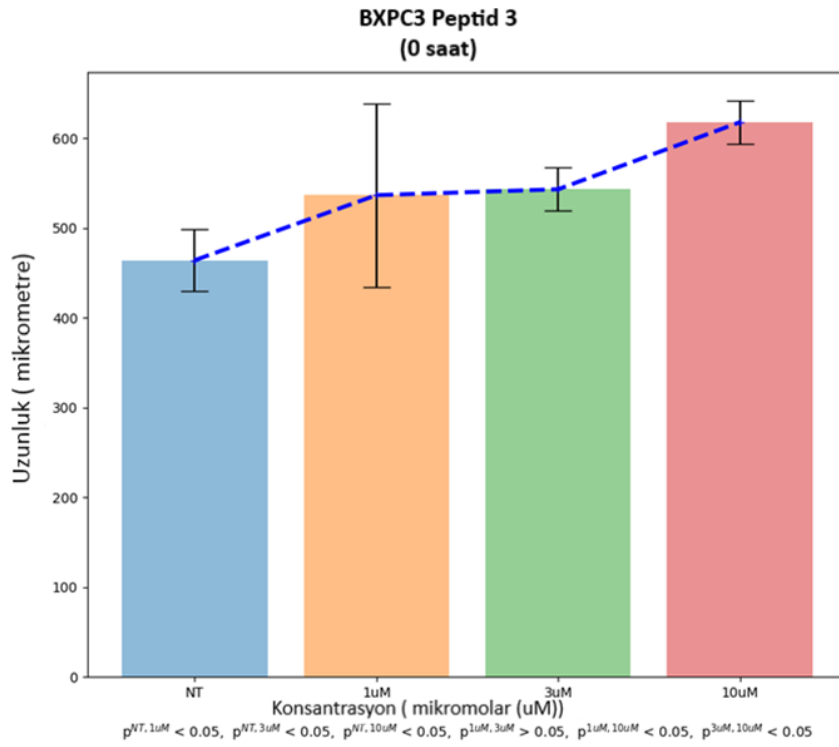
AsPC1 hücrelerinin peptidlerin 1uM, 3uM ve 10uM konsantrasyonlarındaki muamelesi eşliğinde gerçekleşen yara iyileşmesi deneyi sonucunda ise herhangi bir peptid ile muamele edilmeyen kontrol örneğinde yaranın 96 saatte halen kapanmadığı gözlenmiştir. 96. saatlik süreyi takiben hücre sayısı yoğunluğuna bağlı olarak hücre debrisinin çok arttığı ve yaranın mikroskop altında takibinin zorlaştığı bulgulanmıştır. Ayrıca kontaminasyon riski de göz önüne alınarak deneyin 96. saatinde hücreler PBS ile ikişer defa yıkandıktan sonra deney sonlandırılmıştır ve yara bölgeleri fotoğraflanmıştır. Bu analiz sonucunda, peptidler ile muameleye bağlı olarak AsPC1 hücrelerinin motilitesinde anlamlı bir yavaşlama gözlenmiştir.



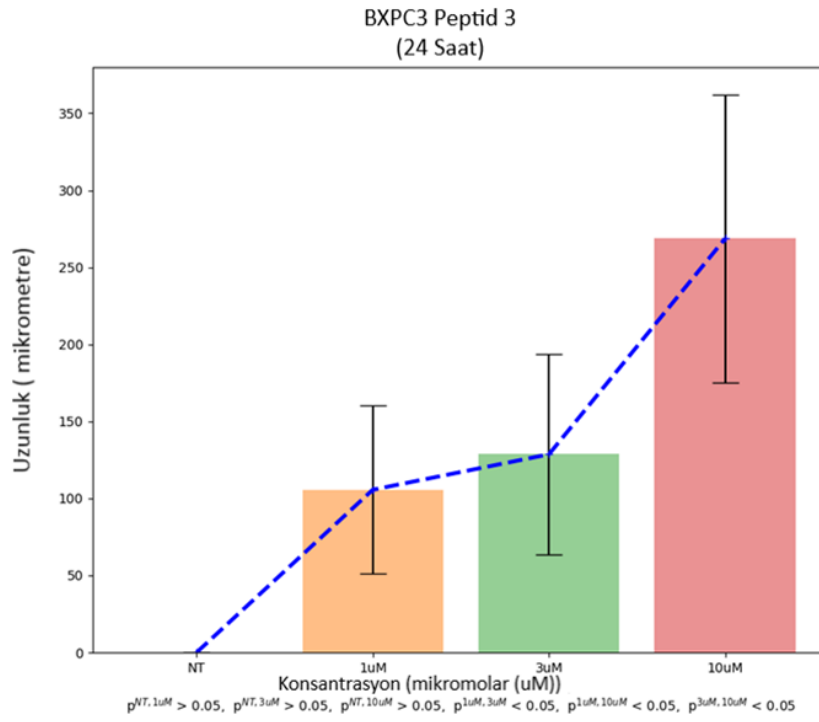
Şekil 4.53 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi



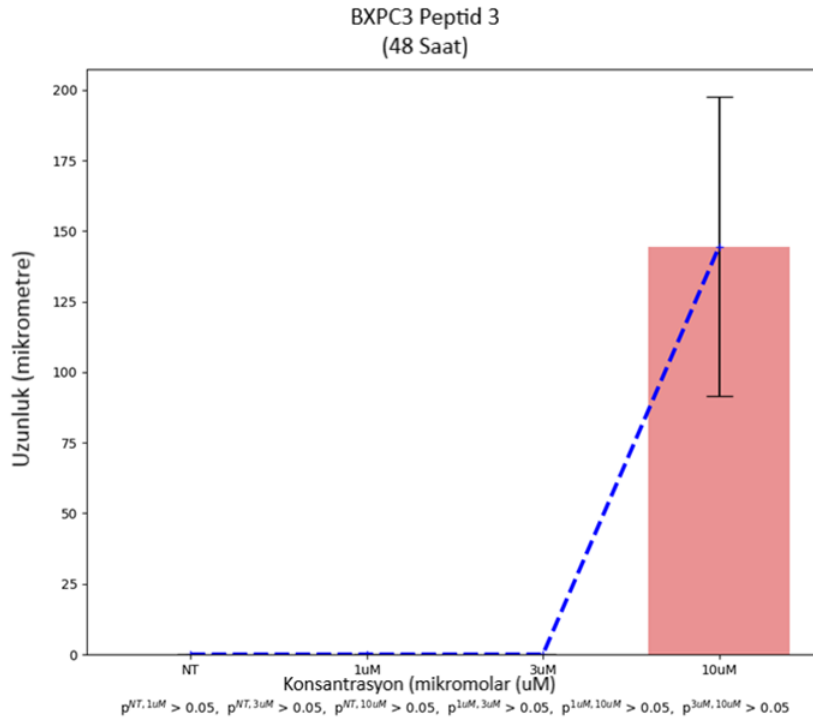
Şekil 4.54 Peptid 3 (10 μ M) ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde 0-168 saat aralığında gerçekleşen yara iyileşme deneyi



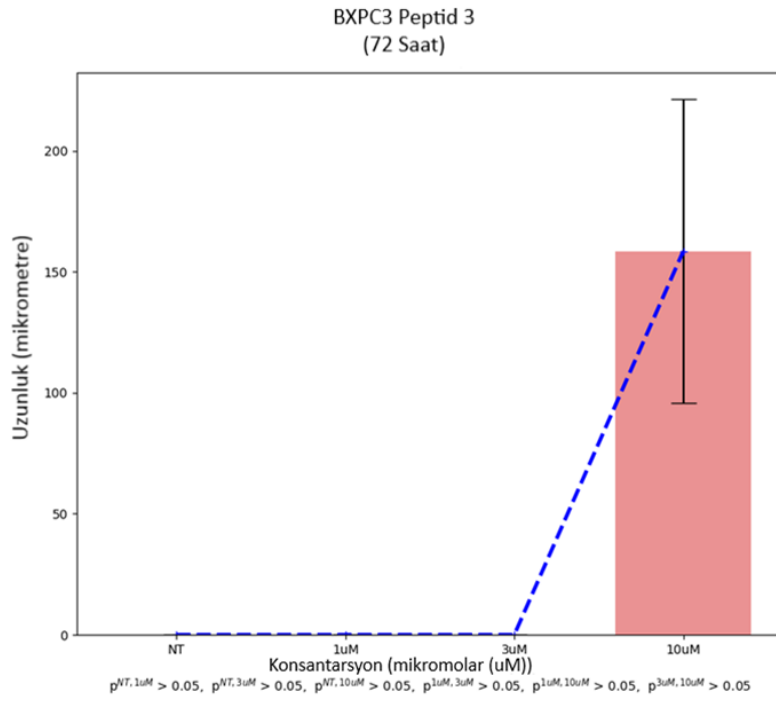
Şekil 4.55 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)



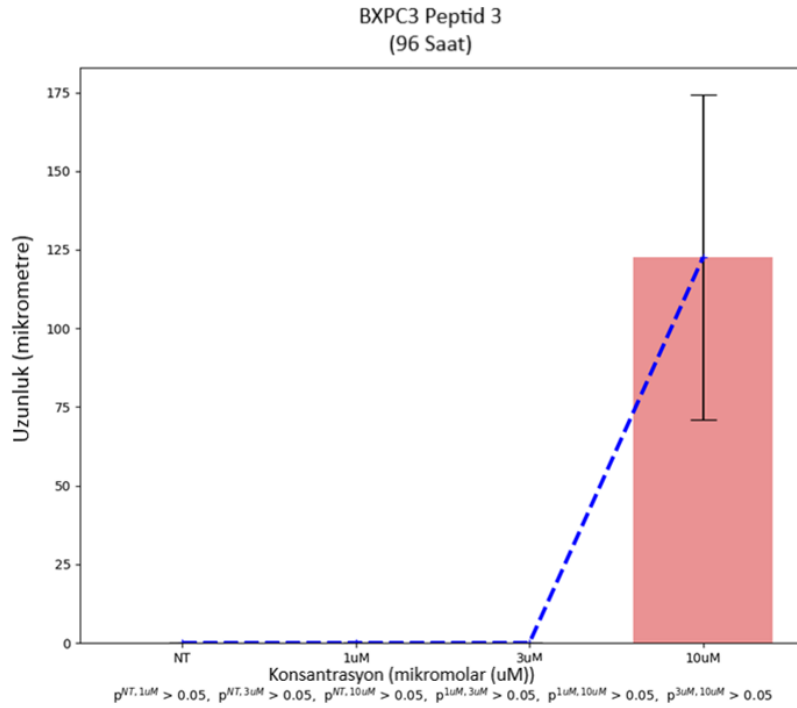
Şekil 4.56 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)



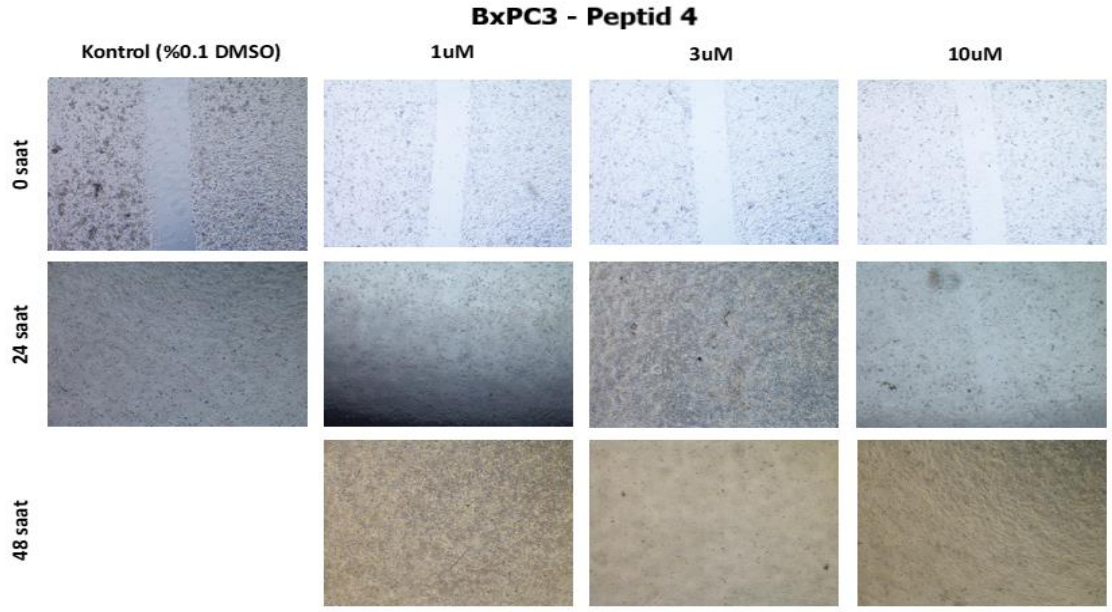
Şekil 4.57 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)



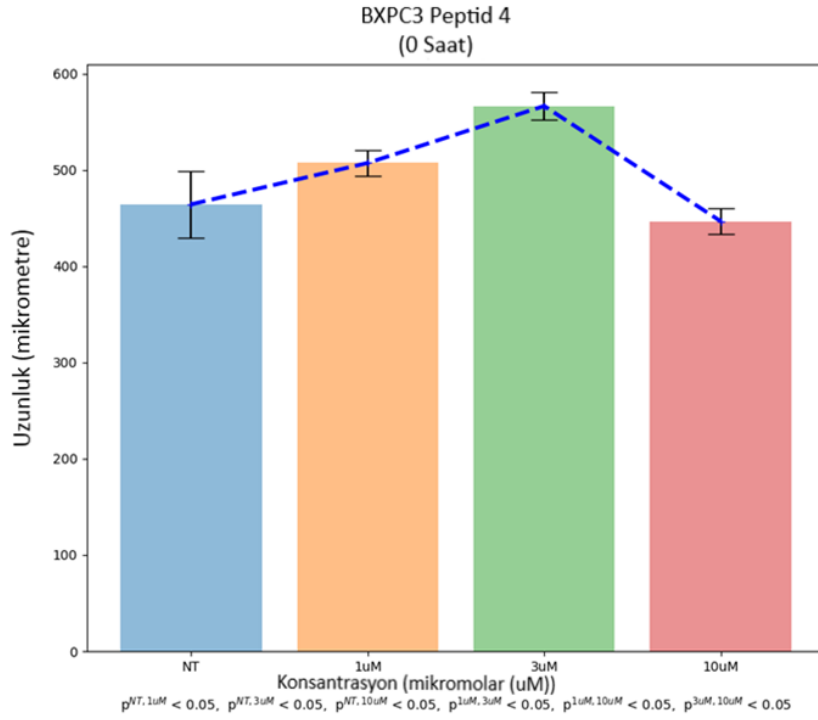
Şekil 4.58 Peptid3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)



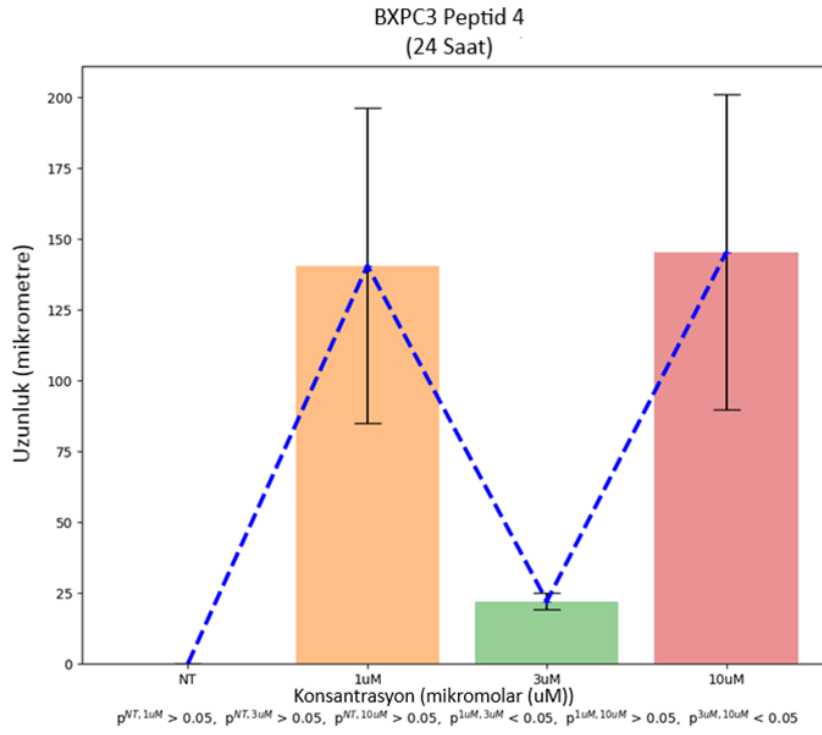
Şekil 4.59 Peptid 3 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (96 saat)



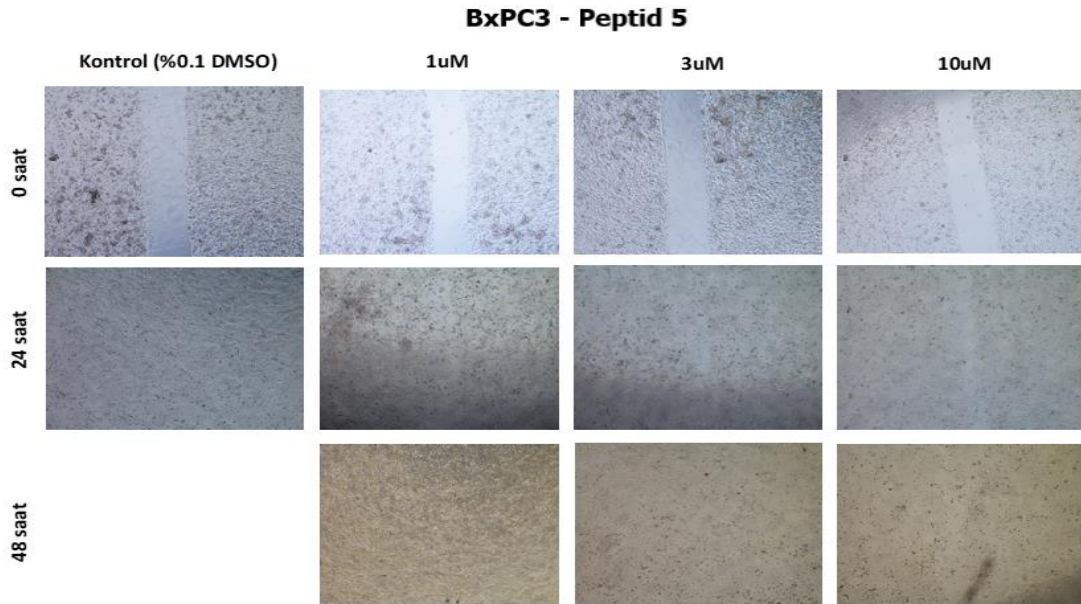
Şekil 4.60 Peptid 4 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi



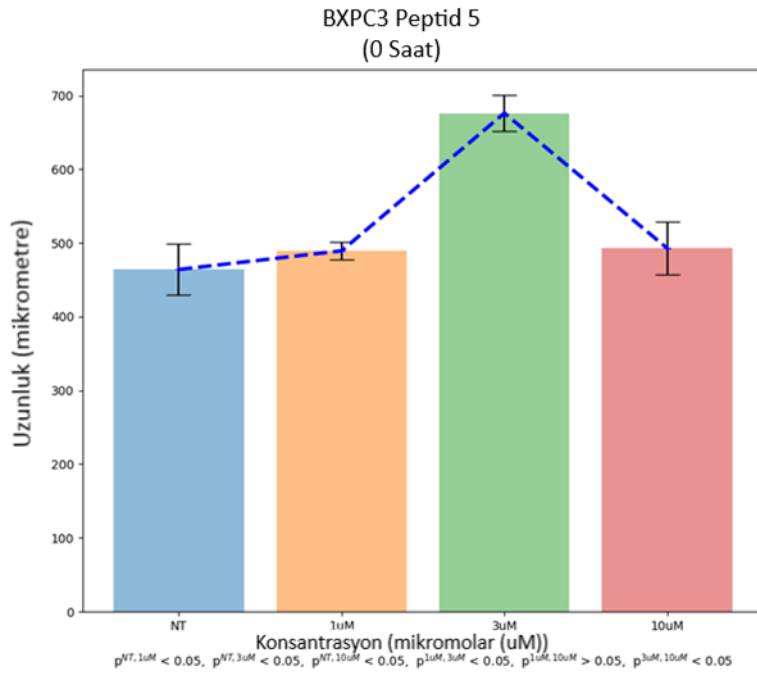
Şekil 4.61 Peptid 4 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)



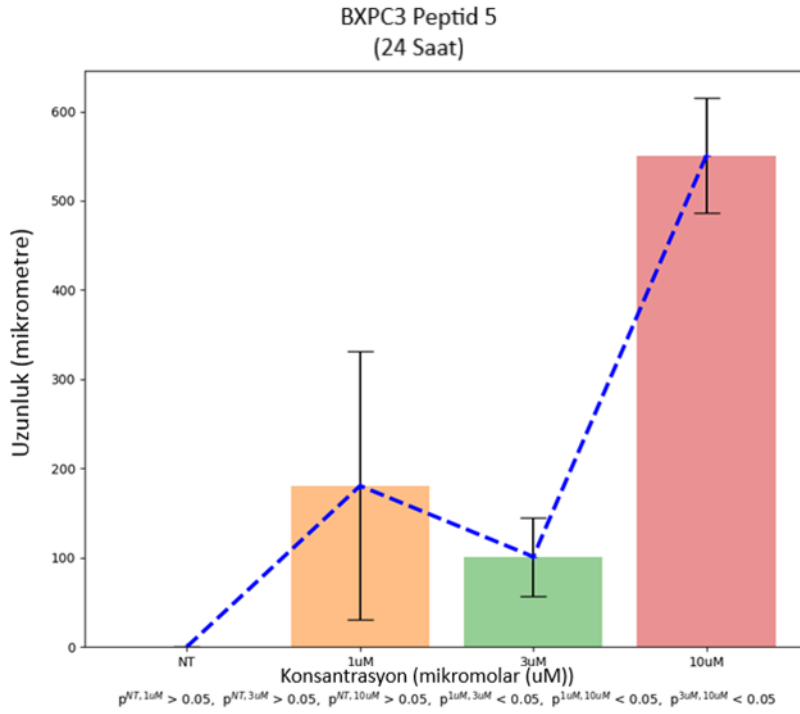
Şekil 4.62 Peptid 4 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)



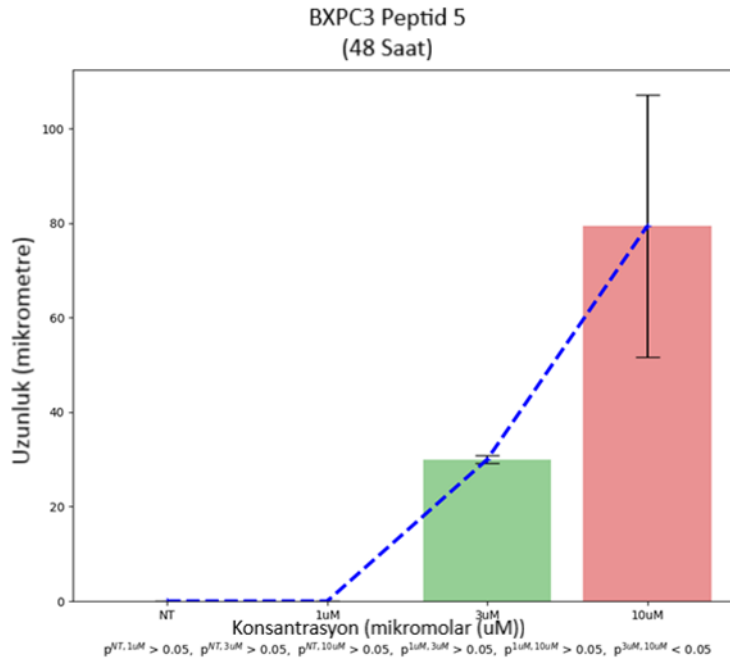
Şekil 4.63 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyi



Şekil 4.64 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)

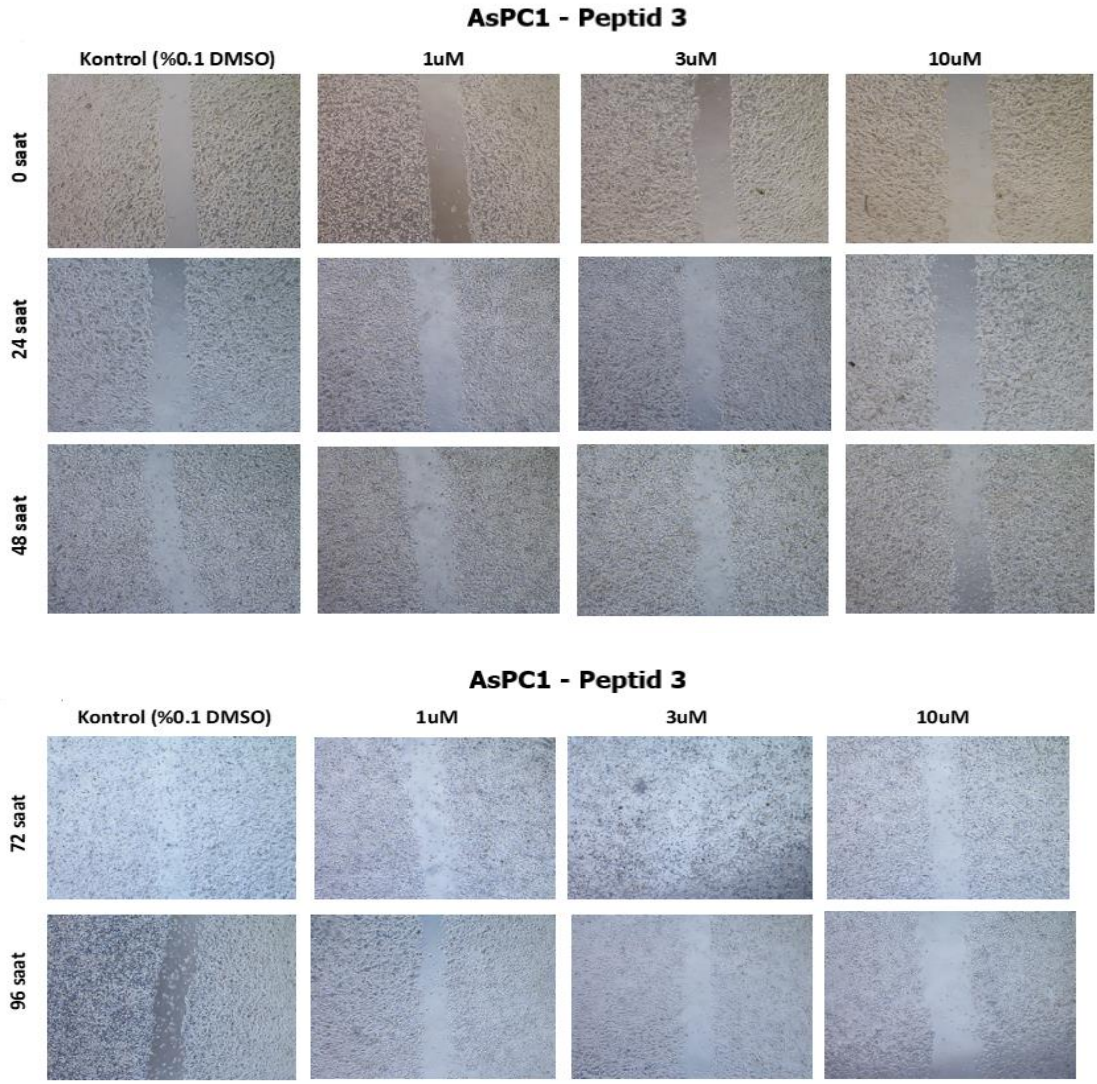


Şekil 4.65 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)

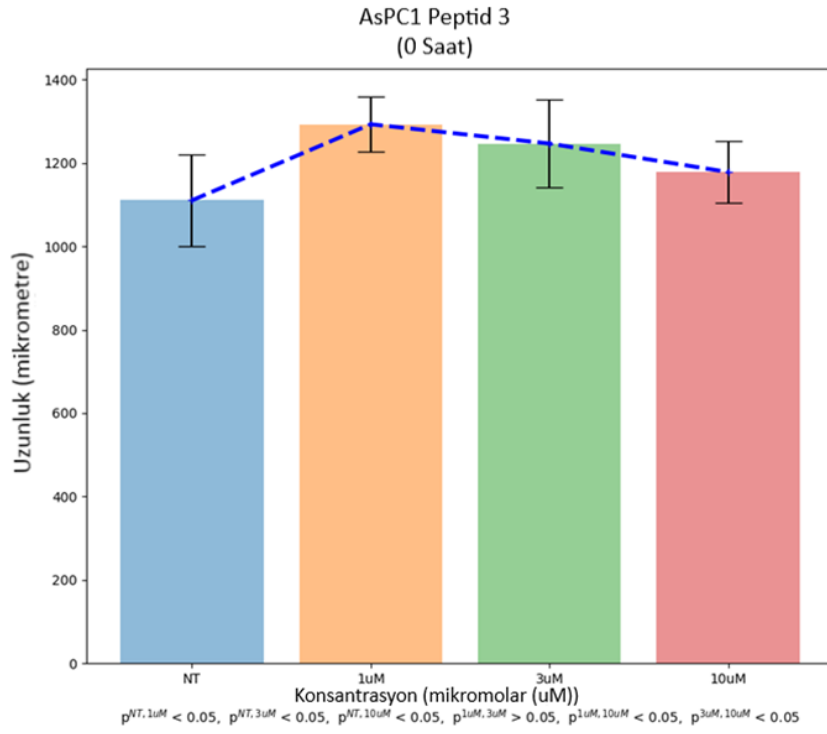


Şekil 4.66 Peptid 5 ile muamele edilen BxPC3 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)

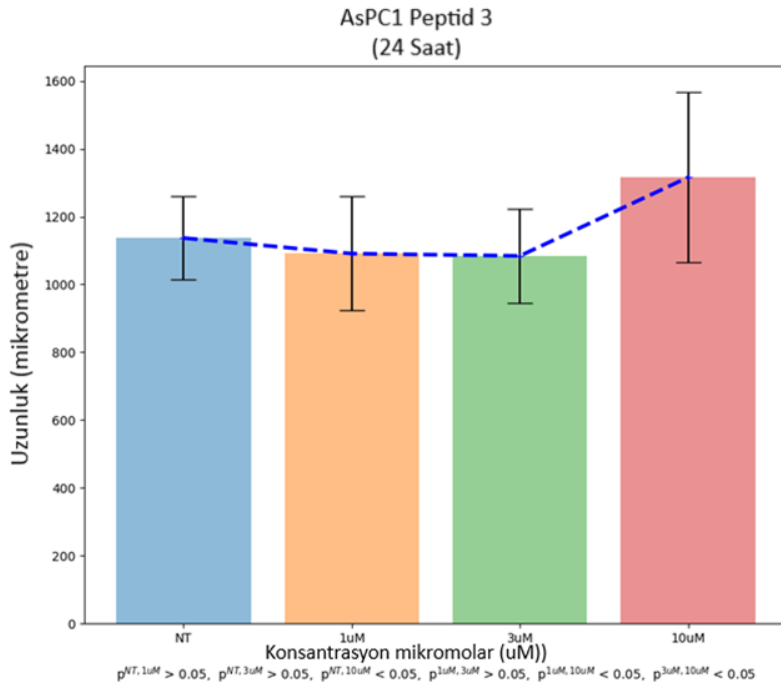
AsPC1 hücrelerinin peptitlerin 1 μ M, 3 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarındaki muamelesi eşliğinde gerçekleşen yara iyileşmesi deneyi sonucunda ise herhangi bir peptit ile muamele edilmeyen kontrol örneğinde yaranın 96 saatte halen kapanmadığı gözlenmiştir. 96. saatlik süreyi takiben hücre sayısı yoğunluğuna bağlı olarak hücre debrisinin çok arttığı ve yaranın mikroskop altında takibinin zorlaştığı bulgulanmıştır. Ayrıca kontaminasyon riski de göz önüne alınarak deneyin 96. saatinde hücreler PBS ile ikişer defa yıkandıktan sonra deney sonlandırılmıştır ve yara bölgeleri fotoğraflanmıştır. Bu analiz sonucunda, peptitler ile muameleye bağlı olarak AsPC1 hücrelerinin motilitesinde anlamlı bir yavaşlama gözlenmiştir.



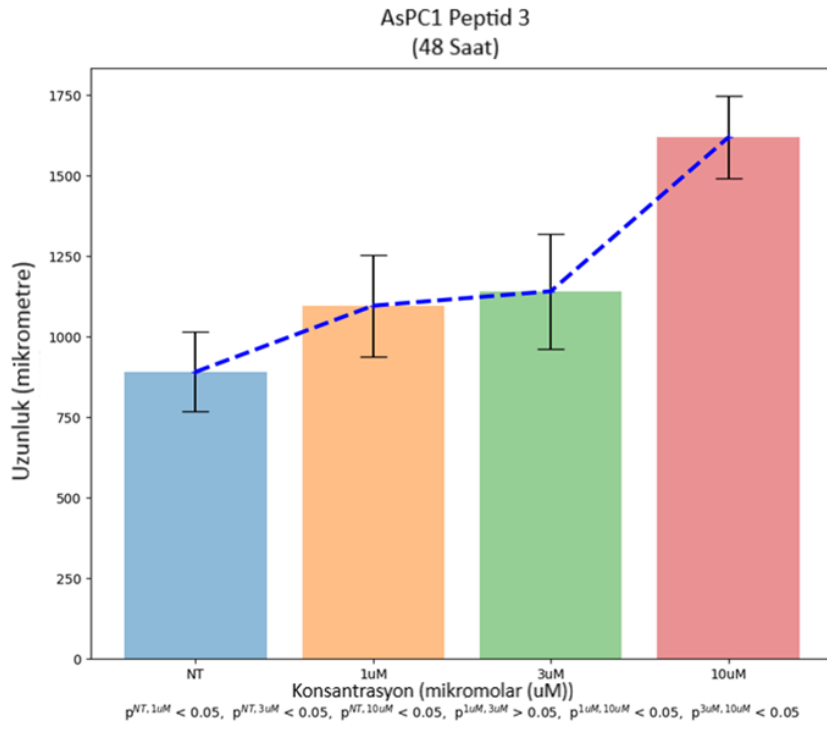
Şekil 4.67 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyi



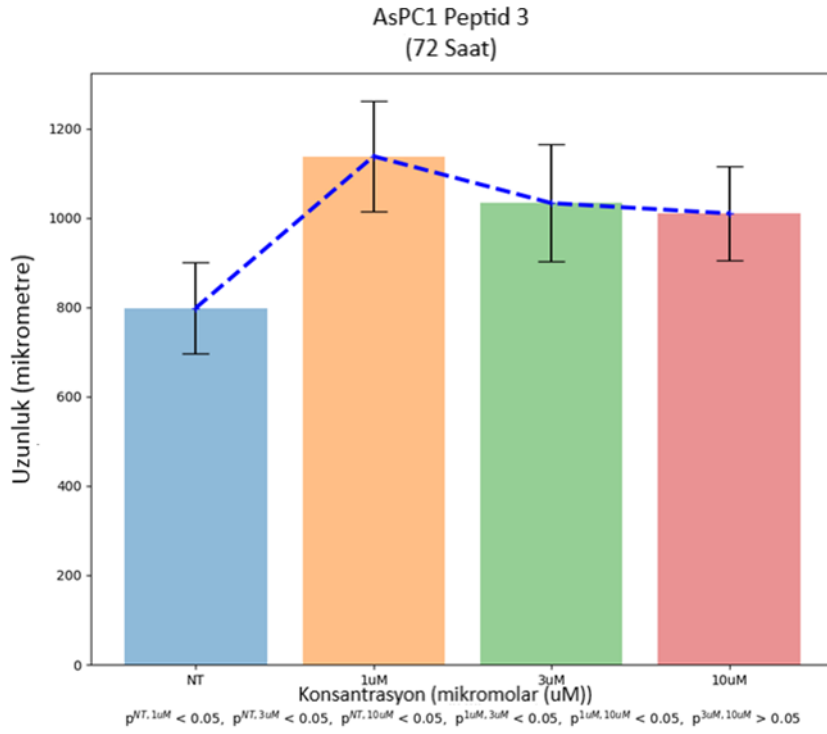
Şekil 4.68 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)



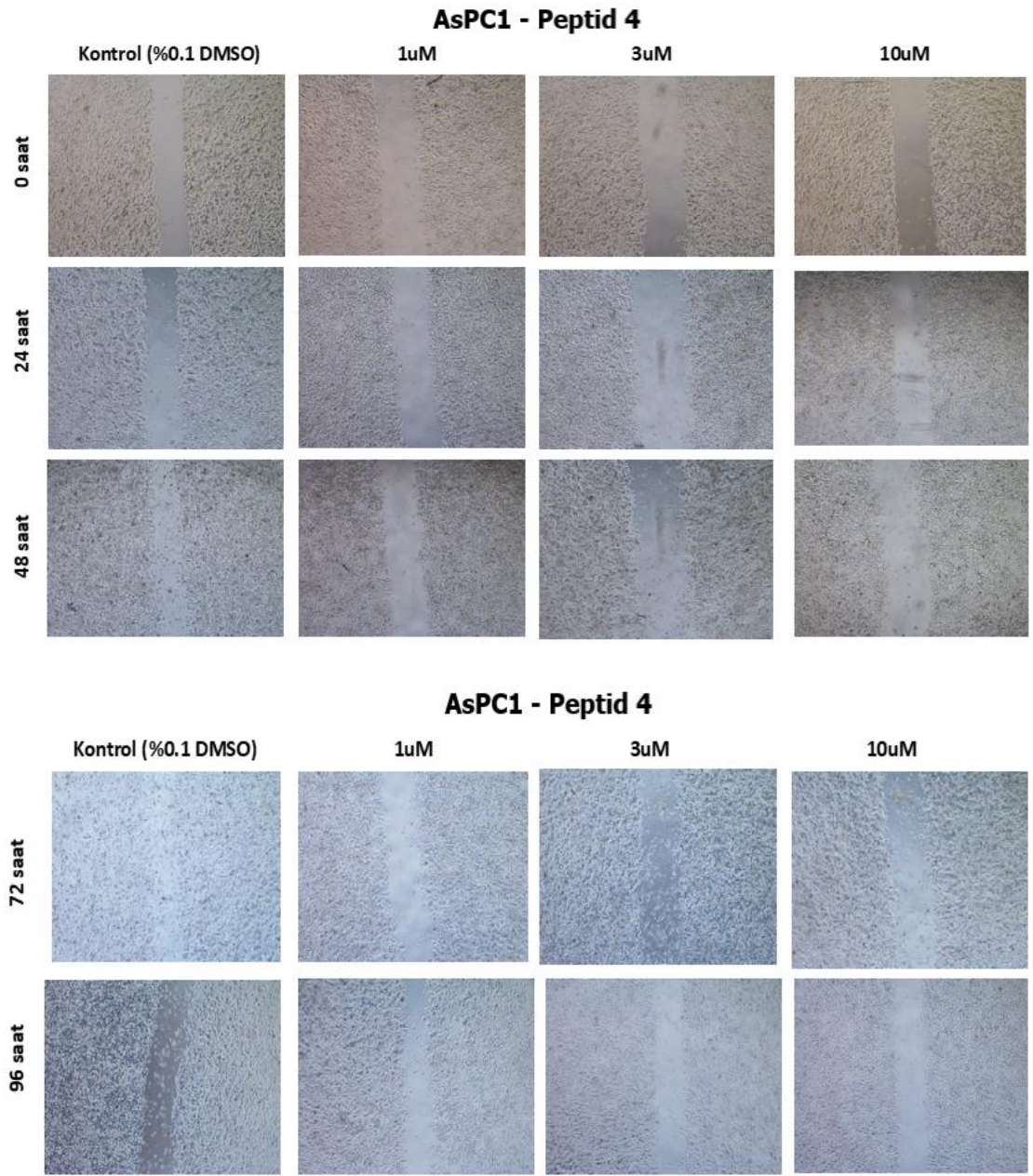
Şekil 4.69 Peptid3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)



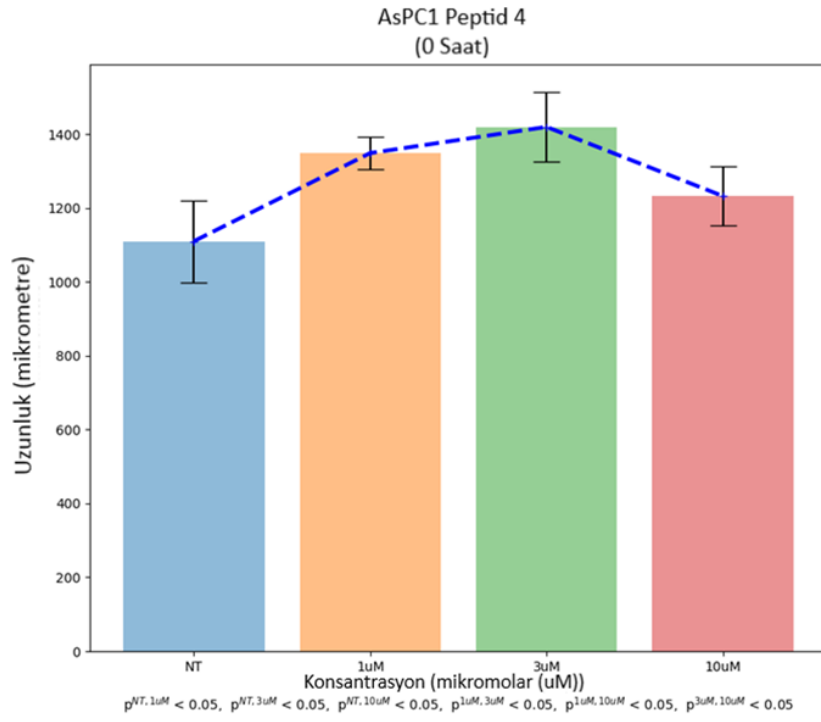
Şekil 4.70 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)



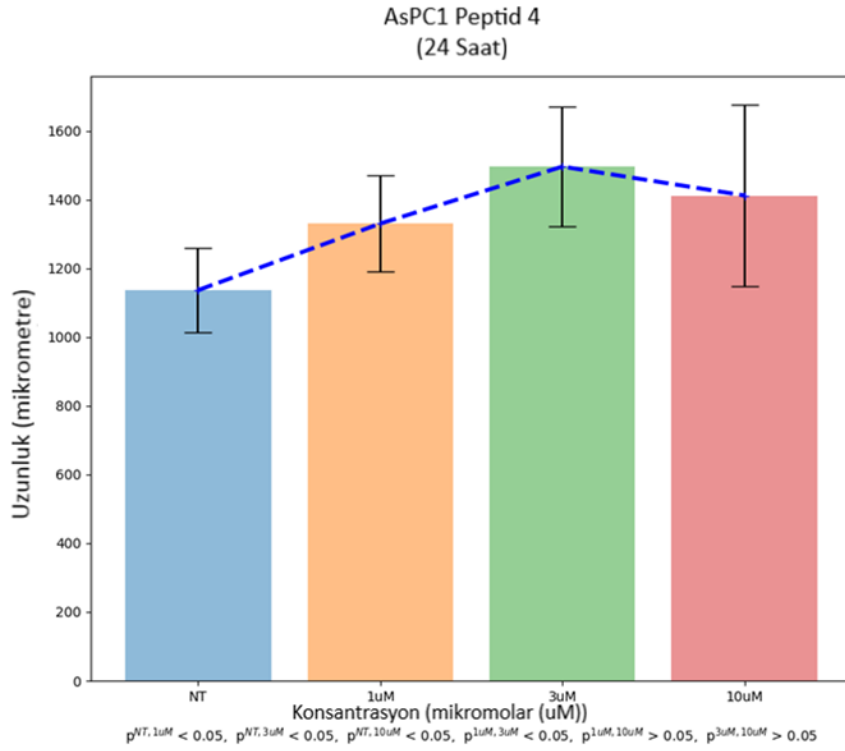
Şekil 4.71 Peptid 3 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)



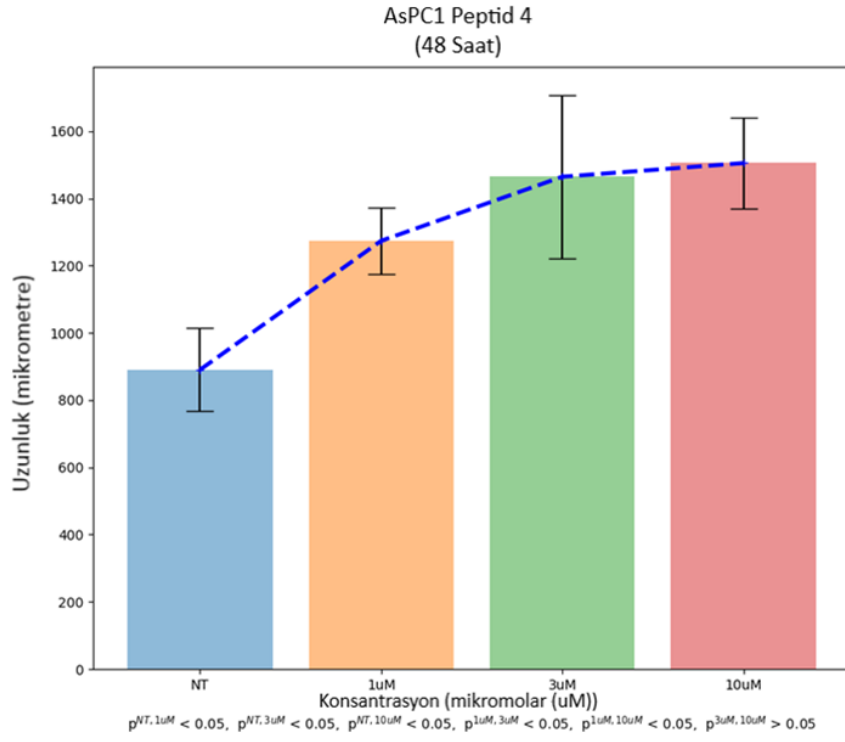
Şekil 4.72 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyi



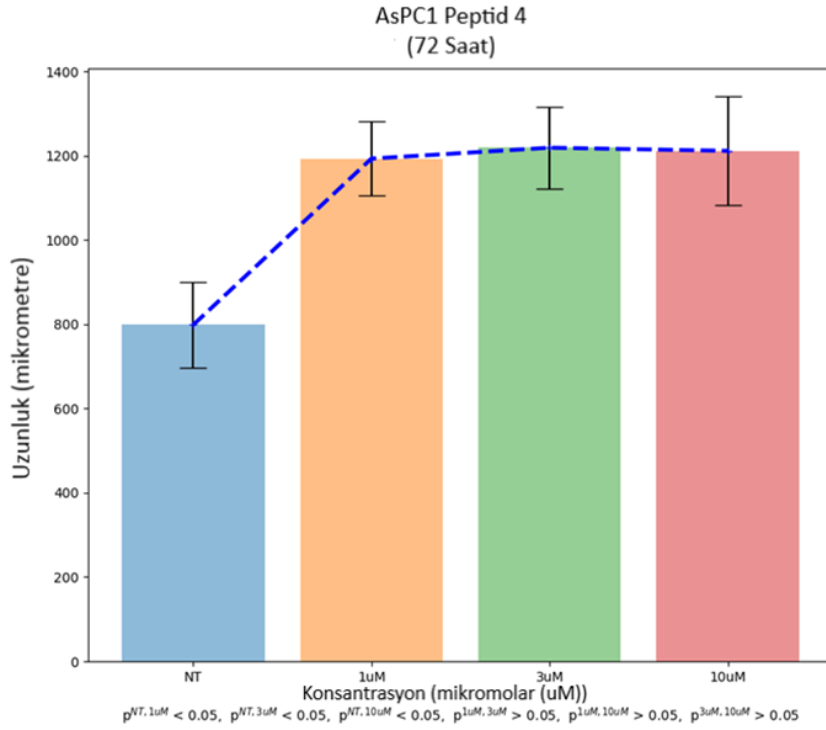
Şekil 4.73 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)



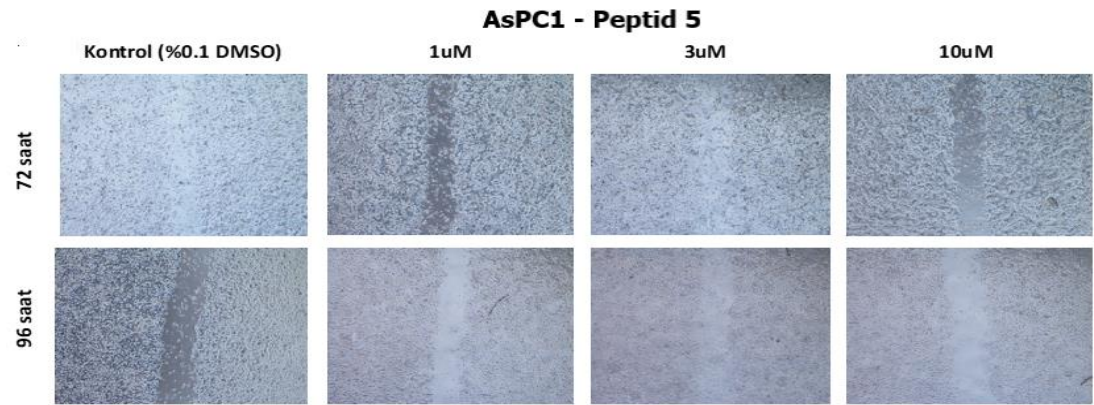
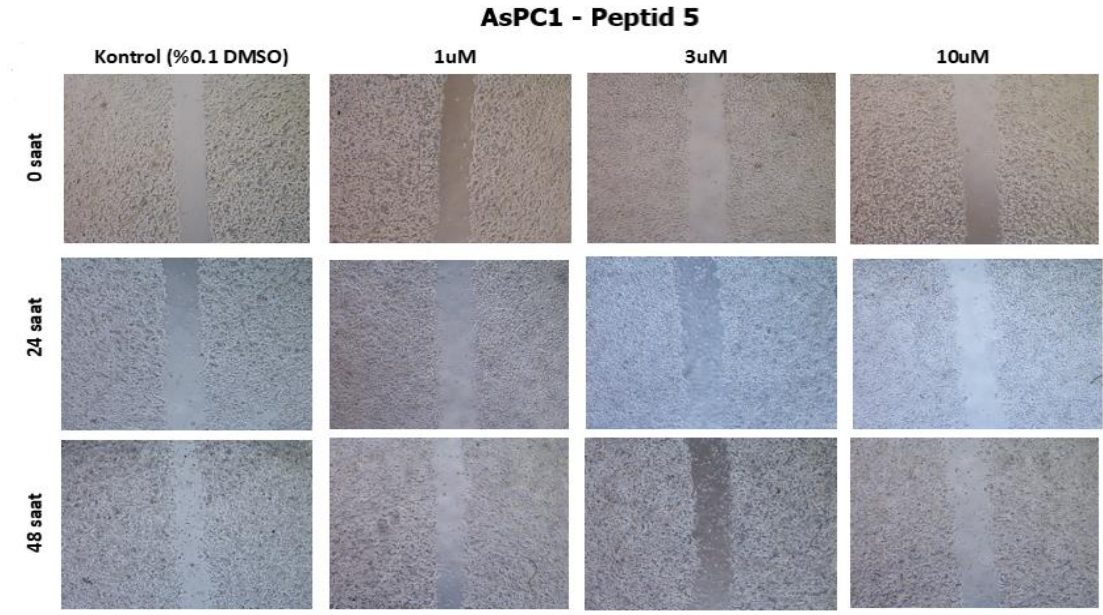
Şekil 4.74 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)



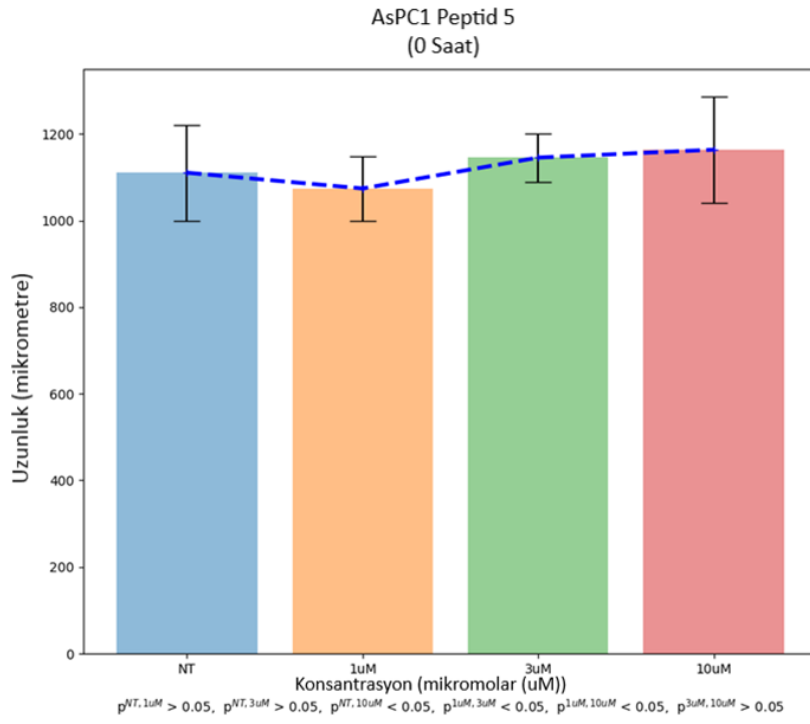
Şekil 4.75 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)



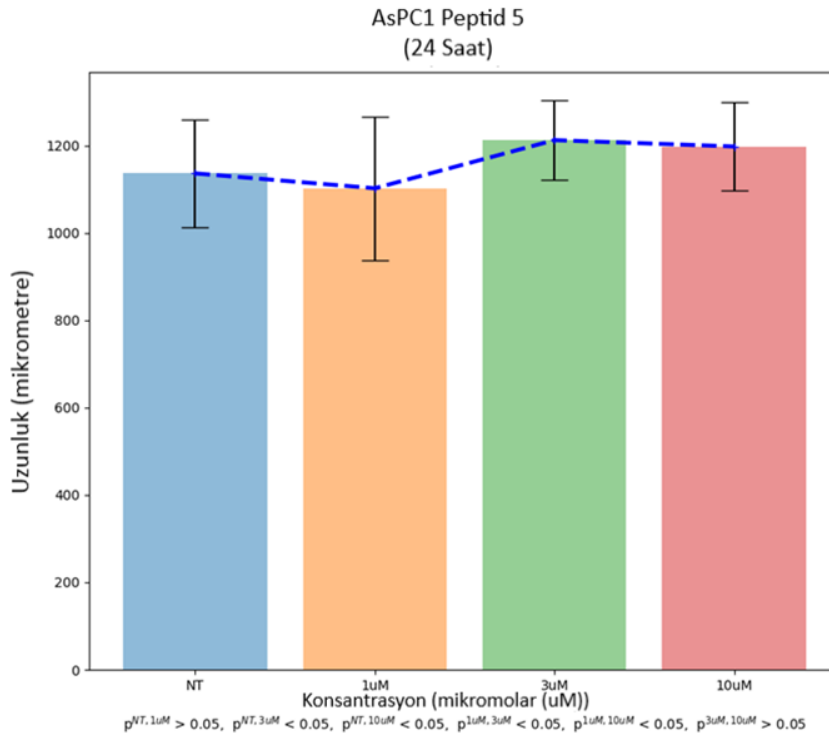
Şekil 4.76 Peptid 4 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)



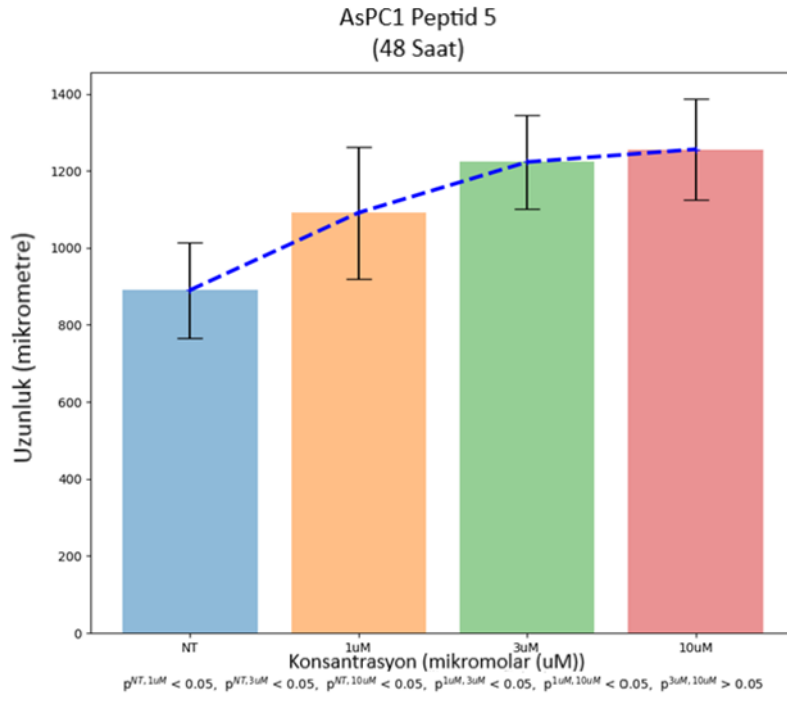
Şekil 4.77 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyi



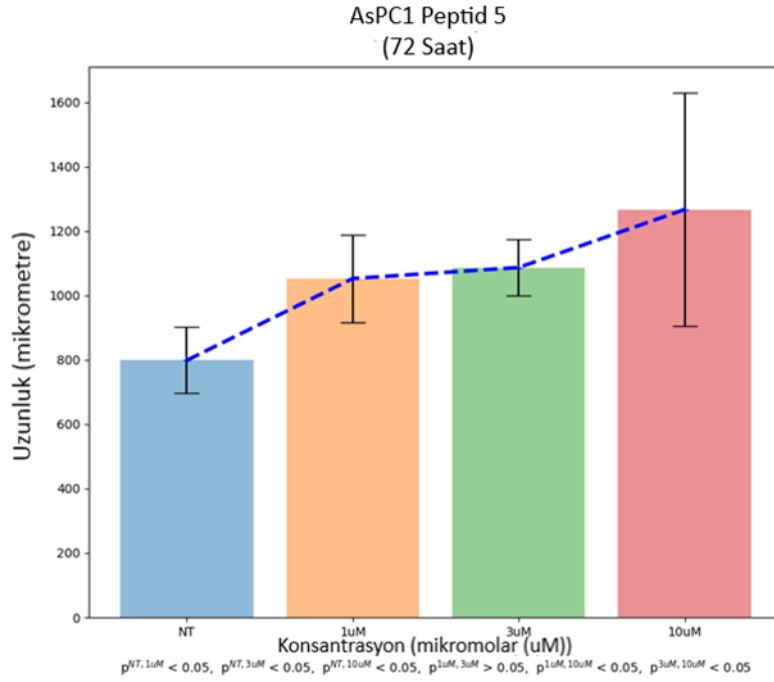
Şekil 4.78 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (0 saat)



Şekil 4.79 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (24 saat)



Şekil 4.80 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (48 saat)



Şekil 4.81 Peptid 5 ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinde yara iyileşme deneyine ait grafik (72 saat)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, hücrel büyüme ve ölüm arasındaki hücrel homeostazı bozan genetik ve epigenetik modifikasyonları içeren çok adımlı bir süreçtir. Kanser, dünya genelinde her yıl milyonlarca bireyi öldüren önemli bir hastalıktır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'na göre, yılda yaklaşık 18.1 milyon kanser vakası ve 9.6 milyon kanser ölümü gerçekleşmektedir. Kanser, gelişmiş ülkelerde morbidite ve mortaliteye neden olan en ciddi küresel sağlık sorunları arasında yer almaktadır (Das vd. 2023).

Pankreas kanseri, diğer kanserlere kıyasla kötü prognoza sahip, oldukça agresif ve ölümcül bir malignitedir. Genellikle ileri bir aşamada tespit edilir, bu da sınırlı tedavi seçeneklerine ve düşük genel sağkalım oranına yol açar. Pankreas kanserinin kötü prognozu, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olmasıyla sonuçlanmıştır. Ayrıca, pankreas kanseri ile ilişkili ekonomik yük de son birkaç on yılda artmıştır. Bu durum, pankreas kanserli hastalar için daha iyi tedavi seçeneklerinin bulunmasına duyulan acil ihtiyacı vurgulamaktadır (Klein 2021).

PDAK'ın 2040'tan önce kolorektal kanseri geçerek kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olarak sadece akciğer kanserinin gerisinde kalacağı tahmin edilmektedir. PDAK'ın ölümcüllüğüne yol açan faktörler çok sayıdadır ve hastalığın ilerlemesinin sonlarına kadar, genellikle uzak metastazdan sonra tespit edilememesine odaklanmaktadır. Ayrıca, germ hattı mutasyonlarına veya müsinöz kistik lezyonlar ve kronik pankreatit gibi bilinen risk faktörlerine atfedilen vakaların azınlığı (%10 - %15) dışında, çoğu hasta için atfedilebilir tek bir risk faktörü yoktur. Lokalize hastalığın büyük ölçüde asemptomatik olması veya kötü tanımlanmış semptomların eşlik etmesi, erken evre tümörler için tanısal biyobelirteçlerin azlığı ve pankreasın ulaşılması zor anatomik konumu, rutin klinik içi tarama yapılabilmesini engellemektedir. Obezite salgını ve daha uzun yaşam beklentisi gibi faktörlerin bir araya gelmesiyle giderek artan hastalık insidansı, çoğu hastaya fayda sağlamak için yeni terapötik stratejilerin belirlenmesi ve uygulanmasına yönelik acil ihtiyacın altını çizmektedir (Chen vd. 2021).

Ras onkogenleri [Hras, Nras, Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homologu (Kras)], kanserlerin ~%30'unda tanımlanan, kanserde en sık mutasyona uğrayan gen ailesini oluşturur. Ras ailesi, büyüme ve çoğalma gibi önemli hücresel süreçlerde kritik bir rol oynar; dolayısıyla bu genlerdeki aktive edici bir mutasyon, tümör oluşumuna yol açabilir. Bu grup içinde Kras, kanserde en sık mutasyona uğrayan izoformdur ve tüm Ras mutant kanserlerinin ~%84'ünde tanımlanır. Ras proteinlerinin kanser gelişimindeki önemi uzun zamandır bilinmesine rağmen hala bu protein üyelerini hedef alan ilaçlar bulunamamıştır (Zhang 2023).

Mutasyona uğramış Ras'ı, özellikle de mutasyona uğramış Kras onkoproteinini doğrudan hedef alan bir ilacın geliştirilmesi, kanser tedavilerinde kemoterapi araştırmalarının hedeflerinden biridir. KrasG12D mutasyonunun PDAK'de en baskın mutasyon olduğu (~%41) göz önüne alındığında, KrasG12D inhibitörleri PDAK klinik tedavisi için yüksek bir terapötik potansiyele sahiptir (Zhang 2023).

Farklı yaklaşımlar üzerine kurulu ilaç geliştirme stratejilerinin, Ras mutasyonu içeren kanser olgularına karşı mücadelede başarı oranını artırabileceği öngörülmektedir. Bu stratejilerin en yenilikçi noktası, Kras(G12D)-eksprese eden hücre hattı proliferasyonunu seçici olarak baskılayan ve Kras(G12D) fonksiyonlarını bloke eden bir peptit molekülünün iki yaklaşım üzerinden etkili olmasıdır: RasGDP-SOS1 etkileşiminin inhibisyonu ve RasGTP-BRAF etkileşiminin hedeflenmesidir. Kras'ı hedefleyen inhibitör yapılar ya da peptit uygulamaları yanı sıra bu onkoproteini hedefleyen antisens moleküller de Kras'ın hedeflenmesinde olasılık dahilinde incelenmiştir (Sakamoto vd. 2017). Örneğin 2018 yılında AstraZeneca güçlü protein knockdown aktivitesi gösteren ancak mutasyona uğramış Kras'a karşı seçici olmayan antisens oligonükleotidi AZD4785'nin kullanımını bildirmiştir. AstraZeneca, doğal tip Kras yıkımının fare ve maymunların kullanıldığı hayvan deneylerinde herhangi bir istenmeyen yan etkiye neden olmadığını bildirmiştir (Ross vd. 2017). Ancak uzun süreli insan üzerindeki uygulamalarda bu antisens moleküle bağlı hangi yan etkilerin ortaya çıkabileceği belirsiz olduğundan AZ4785 üzerindeki çalışmalar 2019 yılında durdurulmuştur. Kras'ı hedefleyen ilaç geliştirme yaklaşımlarından en heyecan verici olanı 2021 yılında Wang ve ark., tarafından MRTX1133'ün kovalent olmayan, seçici bir KrasG12D inhibitörü

olarak bildirilmesidir (Wang vd. 2022). Otuz örneklik bir çalışmada, KrasG12D için küçük molekülü bir inhibitör olan MRTX1133, KrasG12D ile mutasyona uğramış 11 PDAK CDX ve PDX'in 8'inde belirgin tümör gerilemesi ($\geq 30\%$) göstermiştir. Son zamanlarda Kemp ve arkadaşları, immünokompetan KrasG12D mutant PDAK modellerinde MRTX1133'ün özgüllüğünü, gücünü ve etkinliğini göstermiştir. Bu çalışmada MRTX1133, test edilen tüm in vivo modellerde belirgin tümör gerilemesi sergilemiştir (Kemp vd. 2023).

Doğal ve G12 D mutant Kras proteinlerine bağlanan M13 faj partiküllerinin faj görüntüleme yöntemi kullanılarak seçilimi yapılmıştır. Daha sonra yapılan biyoinformatik analizleri neticesinde çeşitli konsensus dizileri elde edilmiştir. GDP - doğal tip Kras'a bağlanan "nhw.y.lemmyn" konsensus dizisi ve GTP - doğal tip Kras'a bağlanan "fhstwptysvmn" konsensus dizisi saptanmıştır. Biyoinformatik analizler sonucunda GDP - mutant tip Kras'a bağlanan ve GTP - mutant tip Kras'a bağlanan herhangi bir konsensus dizisi elde edilmediği görülmüştür.

GDP –doğal tipinde, B9_WTF3, C9_WTG1, E9_WTH1 ve F9_WTH3 örneklerinden ortak AHWHYMLSMYP peptid dizilimi, GDP – mutant tipinde ise E8_GC10 ve D6_GA8 örneklerinden "HWYRLWPNGHFS" peptid dizisi, B7_GD10 ve F6_GA12 örneklerinden AHWHYMLSMYP" peptid dizisi elde edilmiştir. GTP – mutant tipinde B11_2GB2, C12_2GC3 ve F10_2GF1 örneklerinden "FHSTWPTYSVMN" peptid dizisi elde edilmiştir.

Faj görüntüleme sonucunda Kras doğal tip ve KrasG12 D proteinlerine bağlan yüzdesi en yüksek olan inhibitör peptidler yüzey plazmonan rezonans yöntemiyle belirlenmiştir. Seçilen yedi peptid dizisinden üçünde anlamlı bir bağlanma gözlemlenmiştir. Diğer dört peptid dizisinde bir bağlanma görülmemiş ya da veriler kaliteli bulunmamıştır. Yüzey plazmonan rezonans analizi sonucunda anlamlı bağlanma gösteren peptid 3,4 ve 5 sonraki yapılacak analizlere dahil edilmiştir.

Seçilen üç peptidin çalıştığımız onkoprotein üzerindeki fonksiyonel etkilerinin araştırılması için iki tip hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar doğal tip Kras geni taşıyan

BxPC-3 hücre hattı ve Kras mutasyonu olan G12D mutasyonunu taşıyan AsPC-1 hücre hattıdır.

İntibitör peptidlerin pankreas kanseri hücrelerindeki proliferasyonu üzerindeki etkileri ve sitotoksite (IC50) analizi yapılmıştır. Seçilen üç peptidin -NH₂ ucuna, hücre membranından bağlanmaya destek vermesi için 16 amino asitlik Antenopedia dizisi (Ant; RQIKIWFQNRRMKWKK) eklenmiştir. Peptidlerin hücre içindeki yerini belirlemek açısından da her bir peptid dizisine -COOH ucuna FITC floresan işareti eklenmiştir.

Çeşitli eklemeler yapılarak yeniden tasarlanan peptidler ile WST analizi yapılmıştır. Yapılan analizin sonuçlarına göre AsPC1 hücrelerinde Peptid 3'ün IC50 değeri 12µM, Peptid 4'ün IC50 değeri 3 µM ve Peptid 5'in IC50 değeri 10 µM olarak saptanmıştır. BxPC3 hücreleri üzerinde peptidlerin farklı konsantrasyon değerlerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir.

Sonraki aşamada daha önce belirlenen bu üç inhibitör peptidlerin BxPC3 ve AsPC1 pankreas kanseri hücrelerinin motilitesi üzerindeki etkisi yara iyileşme modeli ile analiz edilmiştir. BxPC3 hücrelerindeki peptidlerin 1 µM, 3 µM ve 10 µM konsantrasyonlarındaki muamelesi sonucunda yapılan yara iyileşme deneyi sonucunda herhangi bir peptidle muamele edilmeyen hücredeki yaranın 24 saatte kapandığı, belirlenen peptidlerle muamele edilen hücrelerde ise yara kapanmasında yavaşlama olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda en anlamlı verinin 10 µM Peptid 3 ile muamele edilen hücredeki yaranın 168. saatte halen kapanmamış olduğu saptanmıştır.

AsPC1 hücrelerindeki peptidlerin 1 µM, 3 µM ve 10 µM konsantrasyonlarındaki muamelesi sonucunda yapılan yara iyileşme deneyi sonucunda herhangi bir peptidle muamele edilmeyen hücredeki yaranın 96 saatte hala kapanmadığı gözlemlenmiştir. 96. saatlik süreyi takiben hücre sayısı yoğunluğuna bağlı olarak hücre debrisinin çok arttığı ve yaranın mikroskop altında takibinin zorlaştığı bulgulanmıştır. Deney sonlandırılmıştır. Bu analiz neticesinde de peptidler ile muamele edilen AsPC1 hücrelerinin motilitesinde yavaşlama saptanmıştır.

Sonuç olarak, elde edilen tüm veriler göz önüne alındığında, tezde hedeflenen amaçlar doğrultusunda, pankreas kanserinde Ras onkogenini hedefleyen ilaç öncüllerinin bulunması hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Faj sunumu deneyi sonrasında tanımlanan 7 peptidin doğal tip ve mutant Kras proteinlerine bağlanma özellikleri yüzey plazmon rezonans yöntemi ile analiz edildiğinde 3 peptit dizisinin doğal ve mutant tip Kras proteinlerine yüksek afinite ile bağlanma gösterdiği bulunmuştur. Sonrasında uygulanan hücre kültürü deneylerinde özellikle peptid 3 ile ilgili anlamlı veriler ortaya çıkmıştır. Bu peptit dizilerinden peptit 3'ün pankreas kanseri hücrelerinin motilitiesini anlamlı seviyede inhibe ettiği gözlenmiştir. Tez çalışmasında ortaya çıkan veriler, daha sonra yapılabilecek hayvan denemeleri veya klinik denemelere kaynak oluşturmaktadır. İleride gerçekleştirilecek analizler ile özellikle peptid 3 molekülünün ileri hücresel ve hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesi bu peptitin etki mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını ve inhibe ettiği mekanizmaların tanımlanmasını, ilaç öncülü olarak potansiyelinin daha iyi değerlendirilmesini mümkün kılacaktır. Bununla birlikte, pankreas kanseri biyolojisini anlamak üzere yapılacak çalışmalar, pankreas kanserinin erken teşhisi ve hedefe yönelik tedavisi için yeni fırsatlar ortaya çıkaracaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmadi, S.E., Rahimi, S., Zarandi, B. 2021. MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *J Hematol Oncol*, 14; 121.
- Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, PK., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, DK., Langer, P., Chiblak, S., Dürr, A. 2012. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*, 226; 723-34.
- Aier I, Semwal R, Sharma A, Varadwaj P.K. 2019. A systematic assessment of statistics, risk factors, and underlying features involved in pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology* 58; 104-110.
- Alfaleh, MA., Alsaab, HO., Mahmoud, AB., Alkayyal, AA., Jones, ML., Mahler, SM., Hashem AM. 2020. Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Front Immunol*, 11; 1986.
- Ali, S., Ahmad, A., Aboukameel, A., Bao, B., Padhye, S., Philip, PA., Sarkar, FH. 2012. Retracted: Increased Ras GTPase activity is regulated by miRNAs that can be attenuated by CDF treatment in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*, 319(2); 173-181.
- Ansari, D., Tingstedt, B., Andersson, B., Holmquist, F., Stureson, C., Williamsson, C., Sator, A., Borg, D., Bauden, M. and Andersson, R. 2016. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. *Future Oncology*, 12(16); 1929-46.
- Ansari, D., Williamsson, C., Tingstedt, B., Andersson, B., Lindell, G. and Andersson, R. 2014. Pancreaticoduodenectomy – the transition from a low- to a high-volume center. *Scand. J. Gastroenterol*, 49(4); 481–484.
- Appleman, VA., Ahronian, LG., Cai, J., Klimstra, DS., Lewis, BC. 2012. K-RAS(G12D)- and BRAF(V600E)-induced transformation of murine pancreatic epithelial cells requires MEK/ERK-stimulated IGF1R signaling. *Mol. Cancer Res*, 10; 1228-1239.
- Ardito, CM., Grüner, BM., Takeuchi, KK., Lubeseder-Martellato, C., Teichmann, N., Mazur, PK., Delgiorno, KE., Carpenter, ES., Halbrook, CJ., Hall, JC., Pal, D., Briel, T., Herner, A., Trajkovic-Arsic, M., Sipos, B., Liou, GY., Storz, P., Murray, NR., Threadgill, DW., Sibilio, M., Washington, MK., Wilson, CL., Schmid, RM., Raines, EW., Crawford, HC., Siveke, JT. 2012. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*, 22(3); 304-17.
- Asati, V., Mahapatra, DK., Bharti, SK. 2017. K-Ras and its inhibitors towards personalized cancer treatment: Pharmacological and structural perspectives. *Eur J Med Chem*, 125; 299-314.

- Baines, AT., Xu, D., Der, CJ. 2011. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med. Chem*, 3 (14); 1787-1808.
- Balzano, G., Zerbi, A., Capretti, G., Rocchetti, S., Capitanio, V. and Di Carlo, V. 2008. Effect of hospital volume on outcome of pancreaticoduodenectomy in Italy. *Br. J. Surg*, 95(3); 357–362.
- Bar-Sagi, D. 2001. A Ras by Any Other Name. *Mol. Cell. Biol*, 21(5); 1441-1443.
- Becker, A.E., Hernandez, Y.G., Frucht, H. and Lucas, A.L. 2014. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterology*, 20; 11182-11198.
- Bernards, A., and Settleman, J. 2004. GAP control: Regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol*, 14; 377–385.
- Berndt, N., Hamilton, AD., Sebt, SM. 2011. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 11; 775-791.
- Bister K. 2015. Discovery of oncogenes: The advent of molecular cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (50); 15259-60.
- Bos, JL., Rehmann, H., Wittinghofer, A., 2007. GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129; 865–877.
- Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P., Buscail, L. 2016. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: hopes and realities. *Vncer*, 54; 75-83.
- Bratkovič, T. 2010. “Progress in phage display: evolution of the technique and its applications”, *Cell.Mol. Life Sci.*, 67, 749-767.
- Campbell, PM., Der, CJ. 2004. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol*, 4 (2); 105 -114.
- Campbell, JD., Alexandrov, A., Kim, J. 2016. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet*, 48; 607-16.
- Carriere, C., Young, AL., Gunn JR., Longnecker, DS., Korc, M. 2009. Acute pancreatitis markedly accelerates pancreatic cancer progression in mice expressing oncogenic K-Ras, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 382; 561-565.
- Chan, KL., Palmai-Pallag, T., Ying, S., Hickson, ID. 2009. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol*. 11; 753–60.
- Chavan, TS., Jang, H., Khavrutskii, L., Abraham, SJ., Banerjee, A., Freed, BC. 2015. High-Affinity interaction of the K-Ras4B hypervariable region with the ras active site. *Biophys. J*, 109 (12); 2602-2613.

- Chen, X., Zeh, HJ., Kang, R., Kroemer, G., Tang, D. 2021. Cell death in pancreatic cancer: from pathogenesis to therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18(11); 804-823.
- Christensen, JG., Olson, P., Briere, T., Wiel, C., Bergo, MO. 2020. Targeting KRASg12c-mutant cancer with a mutation-specific inhibitor. *J Intern Med*. 288; 183-191.
- Christensen D.J., Gottlin E.B., Benson R.E., Hamilton P.T. 2001. "Phage display for target-based antibacterial drug discovery", *DDT*, 6 (14); 721-727.
- Chuang, HC., Huang, PH., Kulp, SK., Chen, CS. 2017. Pharmacological strategies to target oncogenic KRAS signaling in pancreatic cancer. *Pharmacol Res*, 117; 370-376.
- Cisowski, J., Sayin, VI., Liu, M., Karlsson, C., Bergo, MO. 2015. Onco-gene-induced senescence underlies the mutual exclusiveness of oncogenic KRAS and BRAF. *Oncogene*, 35; 1328–33.
- Cisowski J, and Bergo MO. 2017. What makes oncogenes mutually exclusive?. *Small GTPases*, 8; 187-92.
- Collins, M.A. 2012. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest*, 122(2); 639-53.
- Cox, AD., Der, CJ., Philips, MR. 2015. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery?. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(8); 1819-27.
- Dariya, B., Alam, A. and Nagaraju, G. P. 2019. Biology, pathophysiology, and epidemiology of pancreatic cancer, In *Theranostic Approach for Pancreatic Cancer*, 1–50.
- Das, S., Devireddy, R., Gartia, MR. 2023. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor for Cancer Biomarker Detection. *Biosensors (Basel)*, 13(3); 396.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417; 949-954.
- De Bardet, J.C., Cardentey, C.R., González, B.L., Patrone, D., Mulet, I.L., Siniscalco, D., Robinson-Agramonte, M.D.Ll.A. 2023. Cell immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. *BioTech*, 12(1); 14.
- Dhillon, AS., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26; 3279-3290.
- Di Magliano, MP., Logsdon, CD. 2013. Roles for K-Ras in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*, 144; 1220-1229.
- Donovan, S., Shannon, KM., Bollag, G. 2002. GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *BBA-Rev. Cancer* 1602; 23-45.

- Drilon, A., Laetsch, T.W., Kummar, S., DuBois, S.G., Lassen, U.N., Demetri, G.D., Nathenson, M., Doebele, R.C., Farago, A.F., Pappo, A.S., Turpin, B., Dowlati, A., Brose, M.S., Mascarenhas, L., Federman, N., Berlin, J., El-Deiry, W.S., Baik, C., Deeken, J., Boni, V., Nagasubramanian, R., Taylor, M., Rudzinski, E.R., Meric-Bernstam, F., Sohal, D.P.S., Ma, P.C., Raez, L.E., Hechtman, J.F., Benayed, R., Ladanyi, M., Tuch, B.B., Ebata, K., Cruickshank, S., Ku, N.C., Cox, M.C., Hawkins, D.S., Hong, D.S., and Hyman, D.M. 2018. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *The New England journal of medicine*, 378(8); 731-739.
- Duan, YF., Li, DF., Liu, YH., Mei, P., Qin, YX., Li, LF., Lin, QX., Li, ZJ. 2013. Decreased expression of DAB2IP in pancreatic cancer with wild-type K-RAS. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 12; 204-20.
- Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., Greenman, C., Davies, H., Dalgliesh, G., Forbes, S. 2006. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 5; 928-932.
- Eguchi, H., Kobayashi, S., Gotoh, K., Noda, T. and Doki, Y. 2020. Characteristics of early-onset pancreatic cancer and its association with familial pancreatic cancer and hereditary pancreatic cancer syndromes. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 4(3); 229-233.
- Ehrlich, G.K., Bailon, B., Berthold, W. 2000. "Phage display technology. Identification of peptides as model ligands for affinity chromatography", *Methods Mol. Biol.* 147; 209-220.
- El-Serag, H.B., Engels, E.A., Landgren, O., Chiao, E., Henderson, L., Amaratunge, H.C. and Giordano, T.P. 2009. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: A populationbased study of US veterans. *Hepatology*, 49; 116-123.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., Saur, D. 2014. Oncogenic K-RAS signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 111; 817-822.
- Esposito, I., Konukiewicz, B., Schlitter, A., Klöppel, G. 2012. New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis. *Pathologe*, 33; 189-93.
- Forbes, SA., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C. Y., Beare, D. 2011. COSMIC: Mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*, 39; 945–950.
- Fujii, S., Fukamachi, K., Tsuda, H., Ito, K., Ito, Y., Ochiai, A. 2012. RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(3); 1074-9.

- Gareiss, PC., Schneekloth, AR., Salcius, MJ., Seo, SY., Crews, CM. 2010. Identification and characterization of a peptidic ligand for Ras. *Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology*, 11(4); 517-522.
- Ghaneh, P., Costello, E. And Neoptolemos, J.P. 2007 Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*, 56; 1134-52.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, JE. 1992. Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Molecular and cellular biology*, 12(5); 2050-6.
- Gonzalez, S., Klatt, P., Delgado, S., Conde, E., Lopez-Rios, F., Sanchez-Cespedes, M. 2006. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature*, 440; 702–6.
- Grabocka, E., Pylayeva-Gupta, Y., Jones, MJ., Lubkov, V., Yemanaberhan, E., Taylor, L. 2014. Wild-type H- and N-Ras promote mutant K-Ras-driven tumorigenesis by modulating the DNA damage response. *Cancer Cell*, 25; 243–56.
- Gram, H., Marconi, L.A., Barbas, C.F., Collet, T.A., Lerner, R.A., Kang, A.S. 1992. “In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89; 3576-3580.
- Grøn, H., Hyde-DeRuyscher, R. 2000. “Peptides as tools in drug discovery”, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 3; 636-645.
- Gurreri, E., Genovese, G., Perelli, L., Agostini, A., Piro, G., Carbone, C., Tortora, G. 2023. KRAS-Dependency in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Mechanisms of Escaping in Resistance to KRAS Inhibitors and Perspectives of Therapy. *Int J Mol Sci*, 24(11); 9313.
- Guo, J., Xie, K., Zheng, S. 2016. Molecular biomarkers of pancreatic intraepithelial neoplasia and their implications in early diagnosis and therapeutic intervention of pancreatic Cancer. *Int. J. Biol. Sci*, 12; 292-301.
- Güngör, C., Hofmann, B. T., Wolters-Eisfeld, G., Bockhorn, M. 2014. “Pancreatic cancer”, *British Journal of Pharmacology*, 171; 849–858.
- Hall, BE., Bar-Sagi, D., Nassar, N. 2002. The structural basis for the transition from Ras-GTP to Ras-GDP, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19); 12138-42.
- Hamzeh- Mivehroud, M., Akbar Alizadeh, A., Morris M.B., Church, W.B., Dastmalchi, S. 2013. “Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery”. *Drug Discovery Today*, 18 (23-24); 1144-1157.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. “The Hallmarks of Cancer”, *Cell*, 100(1); 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5); 646-674.

- Hancock, JF. 2003. Ras proteins: different signals from different locations *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 4 (5); 373-384.
- Harrington, K.J. and Nenclares, P. 2023. The biology of cancer. *Medicine*, 51(1);1-6.
- Harrington, K.J. and Nenclares, P. 2020. The biology of cancer. *Medicine*, 48(2);67-72.
- Hartl, M., Bister, K. 2013. “Oncogenes”, In *Brenner’s Encyclopedia of Genetics*, 5, 164-166.
- Henis, YI., Hancock, JF., Prior, IA. 2009. Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters. *Mol. Membr. Biol*, 26(1); 80-92.
- Hingorani, S.R., Petricoin E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA. 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4; 437-450.
- Hofmann, MH., Gerlach, D., Misale, S., Petronczki, M., Kraut, N. 2022. Expanding the Reach of Precision Oncology by Drugging All KRAS Mutants. *Cancer Discov*, 12(4); 924-937.
- Hruban, R.H., Canto, M.I., Goggins, M., Schulick, R. and Klein, A.P. 2010. Update on familial pancreatic cancer. *Adv Surg*, 44; 293-311.
- Hruban, R.H., Maitra, A., Goggins, M. 2008. “Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia”. In *Int J Clin Exp Pathology*, 1; 306-316.
- Hruban, RH., Wilentz, RE., Kern, SE. 2000. Genetic progression in the pancreatic ducts, *Am. J. Pathol*, 156 (6); 1821-1825.
- Hu, J.X. Zhao, C.F. Chen, W.B. Liu, Q.C. Li, Q.W. Lin, Y.Y. and Gao, F. 2021 Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*, 27(27); 4298- 4321.
- Huang, L., Guo, Z., Wang, F. and Fu, L. 2021. KRAS mutation: From undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Target Therapy* 6(1); 386.
- Ideno, N., Ohtsuka, T., Kono, H., Fujiwara, K., Oda, Y., Aishima, S., Ito, T., Ishigami, K., Tokunaga, S., Ohuchida, K. 2013. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas with distinct pancreatic ductal adenocarcinomas are frequently of gastric subtype. *Ann Surg*, 258; 141-151.
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P. and Lowenfels, A.B. 2008. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*, 393; 535-545.
- Ja, W.W., Roberts, R.W. 2005. “G-protein-directed ligand discovery with peptide combinatorial Libraries”, *Trends Biochem. Sci.*, 30, 318-324.

- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. 2010. Cancer statistics, 2010, CA. Cancer J. Clin, 60 (5); 277-300.
- Jin, C. and Bai L.2020. Pancreatic cancer–current situation and challenges. Gastroenterology &Hepatology Letters, 2(1); 1-3.
- Jonckheere, N., Vasseur, R., Van Seuning, I. 2017. The cornerstone K-RAS mutation in pancreatic adenocarcinoma: From cell signaling network, target genes, biological processes to therapeutic targeting. Crit Rev Oncol Hematol, 111; 7-19.
- Karnoub, AE. and Weinberg, RA. 2008. Ras oncogenes: split personalities. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol, 9 (7); 517-531.
- Kapoor, A., and Travesset, A. 2015. Differential dynamics of RAS isoforms in GDP- and GTP-bound states. Proteins, 83(6); 1091–1106.
- Kemp, SB., Cheng, N., Markosyan, N., Sor, R., Kim, IK., Hallin, J., Shoush, J., Quinones, L., Brown, NV., Bassett, JB., Joshi, N., Yuan, S., Smith, M., Vostrejs, WP., Perez-Vale, KZ., Kahn, B., Mo, F., Donahue, TR., Radu, CG., Clendenin, C., Christensen, JG., Vonderheide, RH., Stanger, BZ. 2023. Efficacy of a Small-Molecule Inhibitor of KrasG12D in Immunocompetent Models of Pancreatic Cancer. Cancer Discov, 13(2); 298-311.
- Kim, HJ., Lee, HN., Jeong, MS., Jang, SB. 2021. Oncogenic KRAS: Signaling and Drug Resistance. Cancers (Basel), 13(22); 5599.
- Klein, A.P. 2021. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 18; 493–502.
- Konstantinopoulos, P. A., Karamouzis, M. V., Papavassiliou, A. G. 2007. Posttranslational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. Nat Rev Drug Discov, 6; 541–555.
- Kotsantis, P., Petermann, E., Boulton, SJ. 2018. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. Cancer Discov, 8(5); 537-555.
- Krumpe, L.R., Mori, T. 2006. “The use of phage-displayed peptide libraries to develop tumor-targeting drugs”, Int. J. Pept. Res. Ther., 12 (1), 79–91.
- Ledford, H. 2015. Cancer: The Ras renaissance. Nature, 520 (7547); 278-280.
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., Laustsen, A. 2018. “Basic of Antibody Phage Display Technology”, Toxins, 10, 236.
- Lee, E. S., Lee, M. and Lee, J. M. 2014. “Imaging diagnosis of pancreatic cancer: A state-of-the-art review”, World Journal of Gastroenterology, 20 (24); 7864–7877.
- Li, X., Xu, H.ve Gao, P. 2018. ABO blood group and diabetes mellitus influence the risk for pancreatic cancer in a population from China. Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res. 24; 9392-9398.

- Lin, L., Liu, A., Zhao, C., Weng, S., Lei, Y., Liu, Q., Lin, X., Chen, Y. 2013. A chronocoulometric LNA sensor for amplified detection of K-ras mutation based on site-specific DNA cleavage of restriction endonuclease. *Biosens Bioelectron*, 42; 409-14.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen RS. 2011. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol*, 13; 243–53.
- Luo, J. 2021. Kras mutation in pancreatic cancer. *Seminars in Oncology*, 48(1); 10-18.
- Macheret, M., Halazonetis, TD. 2015. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol*, 10; 425–48.
- Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, PJ., de Lange, T. 2015. Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell*, 163; 1641–54.
- Mahoney, K.M., Rennert, P.D. and Freeman, G.J. 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(8); 561-84.
- Maitra, A. And Leach, SD. 2012. Disputed paternity: the uncertain ancestry of pancreatic ductal neoplasia. *Cancer Cell*, 22; 701-3.
- Makohon-Moore, A., Iacobuzio-Donahue, C. A. 2016. “Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective”. In *Nature Reviews Cancer*, 16 (9); 553–565.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer*, 3; 459-465.
- Matikas, A., Mistriotis, D., Georgoulas, V., Kotsakis, A. 2017. Targeting KRAS mutated non-small cell lung cancer: A history offailures and a future of hope for a diverse entity. *Crit RevOncol Hematol*, 110;1-12.
- Matsunaga, H., Kubota, K., Inoue, T., Isono, F., Ando, O. 2014. IQGAP1 selectively interacts with K-Ras but not with H-Ras and modulates K-Ras function. *Biochem Biophys Res Commun*, 444(3); 360-4.
- McDonald, ER., de Weck, A., Schlabach, MR. 2017. Project DRIVE:A compendium of cancer dependencies and synthetic lethalrelationships uncovered by large-scale. Deep RNAi Screening.*Cell*, 170; 577-592.
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R.C., Jones, C., Coleman, H.G. and McCain, R.S. 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterology*, 24(43); 4846-4861.
- Midha, S., Chawla, S., and Garg, P.K. 2016. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett*, 381; 269-277.

- Moore, A. and Donahue, T. 2019. Pancreatic cancer. *JAMA*, 322(14); 1426.
- Molek, P., Strukelj, B., Bratkovic, T. 2011. "Peptide Phage Display as a Tool for Drug Discovery: Targeting Membrane Receptors". *Molecules*, 16; 857-887.
- Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M. and Parulekar, W. 2007. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* 25(15); 1960-1966.
- Nagano, K. and Tsutsumi, Y. 2021. Phage Display Technology as a Powerful Platform for Antibody Drug Discovery. *Viruses*, 13(2); 178.
- Nagarajan, A., Malvi, P., Wajapeyee, N. 2016. Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. *Trends Cancer*, 2(7); 365-377.
- Nanduri, V., Sorokulova, I.B., Samoylov, A.M., Simonian, A.L., Petrenko, V.A., Vodyanoy, V. 2007. "Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption". *Biosens. Bioelectron.*, 22; 986-992.
- Navas, C., Hernandez-Porras, I., Schuhmacher, A.J., Sibilio, M., Guerra, C., Barbacid, M. 2012. EGF receptor signaling is essential for K-Ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 22; 318-330.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., Halazonetis, T.D. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11; 220–8.
- Newman, M.R., Benoit, D.S.W. 2018. In Vivo Translation of Peptide-Targeted Drug Delivery Systems Discovered by Phage Display. *Bioconjug Chem*, 29(7); 2161-2169.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. and Kojiro, M. 2006. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2(3); 213-9.
- Nixon, A.E., Sexton, D.J., Ladner, R.C. 2014. Drugs derived from phage display. *mAbs*, 6(1); 73-85.
- Nussinov, R., Tsai, C.J., Jang, H. 2021. Anticancer drug resistance: An update and perspective. *Drug Resist Updat*, 59; 100796.
- Omerovic, J., Hammond, D.E., Clague, M.J., Prior, I.A. 2008. Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines. *Oncogene*, 27(19), 2754-2762.
- Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., Shoka, K.M. 2013. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503 (7477);548-551.

- Ozeri-Galai, E., Lebofsky, R., Rahat, A., Bester, AC., Bensimon, A., Kerem, B. 2011. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Mol Cell*, 43; 122–31.
- Quah, SY., Tan, MS., Teh, YH., Stanslas, J. 2016. Pharmacological modulation of oncogenic Ras by natural products and their derivatives: Renewed hope in the discovery of novel anti-Ras drugs. *Pharmacol Ther*, 162; 35-57.
- Pandol, S. 2011. *The Exocrine Pancreas*. Morgan & Claypool Life Sciences San Rafael, 64 s, USA.
- Patel, PL., Suram, A., Mirani, N., Bischof, O., Herbig, U. 2016. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113; 5024–33.
- Patricelli, MP., Janes, MR., Li, LS., Hansen, R., Peters, U., Kessler, LV., Chen, Y., Kucharski, JM., Feng, J., Ely, T. 2016. Selective inhibition of oncogenic KRAS output with small molecules targeting the inactive state. *Cancer Discov*, 6; 316-329.
- Permeth-Wey, J. and Egan, K.M. 2009. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. *Fam Cancer*, 8; 109-117.
- Plug-DeMaggio, AW., Sundsvold, T., Wurscher, MA., Koop, JI., Klingelutz, AJ., McDougall, JK. 2004. Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6. *Oncogene*, 23; 3561–71.
- Porta, M., Crous-Bou, M., Wark, PA., Vineis, P., Real, FX., Malats, N., Kampman, E. 2009. Cigarette smoking and K-ras mutations in pancreas, lung and colorectal adenocarcinomas: etiopathogenic similarities, differences and paradoxes. *Mutat Res*, 682(2-3):83-93.
- Porta, M., Ayude, D., Alguacil, J., Jarrod, M. 2003. Exploring environmental causes of altered ras effects: fragmentation plus integration? *Mol. Carcinog*, 36; 45–52.
- Poruk, K. E., Firpo, M. A., Adler, D. G., Mulvihill, S. J. 2013. “Screening for pancreatic cancer: Why, how, and who?”, *In Annals of Surgery*, 257 (1); 17–26.
- Prakash, P., Zhou, Y., Liang, H., Hancock, JF., Gorfe, AA. 2016. Oncogenic K-Ras Binds to an Anionic Membrane in Two Distinct Orientations: A Molecular Dynamics Analysis. *Biophys J*, 110(5);1125-38.
- Prior, IA., and Hancock, J. F. 2012. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin Cell Dev Biol*, 23(2); 145–153.
- Prior, IA., Lewis, PD., Mattos, C. 2012. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*, 72(10); 2457-2467.

- Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G., Hancock, J.F., 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol*, 160 (2); 165-170.
- Rogers, S.J., Harrington, K.J., Rhys Evans, P., O-Charoenrat, P. and Eccles, S.A. 2005 Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 24(1); 47-69.
- Rothe, A., Hosse, R.J., Power, B. 2006. “In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics”, *FASEB J.*, 20 (10), 1599–1610.
- Saad, II., Saha, SB., Thomas, G. 2014. The RAS subfamily Evolution – tracing evolution for its utmost exploitation. *Bioinformation*, 10(5); 293-298.
- Schmidt, A., and Hall, A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, 16; 1587–1609.
- Schubbert, S., Shannon, K., Bollag, G. 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7; 295–308.
- Sever, R., and Brugge, JS. 2015. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(4); a006098.
- Sharma, A., Boise, L.H. ve Shanmugam, M. 2019. Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. *Cancers*, 11(8); 1144.
- Shibata, H., Komura, S., Yamada, Y., Sankoda, N., Tanaka, A., Ukai, T., Kabata, M., Sakurai, S., Kuze, B., Woltjen, K., Haga H., Ito, Y., Kawaguchi, Y., Yamamoto, T. and Yamada, Y. 2018. In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development. *Nature Communications*, 9; 2081.
- Shields, JM., Pruitt, K., McFall, A. Shaub, A., Der, CJ. 2000. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol*, 10;147-154.
- Shih, TY., Papageorge, AG., Stokes, PE., Weeks, MO., Scolnick EM. 1980. Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virüs. *Nature*, 287; 686– 691.
- Sidhu, S.S., Lowman, H.B., Cunningham, B.C., Wells, J.A. 2000. “Phage display for selection of novel binding peptides”, *Methods Enzymol*, 328, 333–363.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. 2013. Cancer statistics, 2013, *Ca Cancer Journal for Clinicians*, 63(1); 11–30.
- Simanshu, DK., Nissley, DV., McCormick, F. 2017. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1); 17-33.
- Simatou, A., Simatos, G., Goulielmaki, M., Spandidos, D.A., Baliou, S., Zoumpourlis, V. 2020. Historical retrospective of the SRC oncogene and new perspectives . *Molecular and Clinical Oncology*, 13; 21.

- Slattery, ML., Wolff, RK., Curtin, K. 2009. Colon tumor mutations and epigenetic changes associated with genetic polymorphism: insight into disease pathways. *Mutat. Res*, 660;12–21.
- Smith, G.P. 1985. “Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface”. *Science*, 228; 1315-1317.
- Smith, G.P., Petrenko, V.A. 1997. “Phage Display”. *Chem. Rev.*, 97; 391-410.
- Smyth, LA. and Collins, I. 2009. Measuring and interpreting the selectivity of protein kinase inhibitors. *J. Chem. Biol*, 2 (3); 131-151.
- Stevens, R.J., Roddam, A.W. and Beral, V. 2007. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 96; 507-509.
- Stout, MC. and Campbell, PM. 2018. RASpecting the oncogene: New pathways to therapeutic advances. *Biochem Pharmacol*, 158; 217-228.
- Suram, A., Kaplunov, J., Patel, PL., Ruan, H., Cerutti, A., Boccardi, V. 2012. Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *EMBO J*, 31; 2839–51.
- Talmadge, J. E., Fidler, I. J. 2010. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. In *Cancer Research*, 70 (14); 5649–5669.
- Tao, LY., Zhang, LF., Xiu, DR., Yuan, CH., Ma, ZL., Jiang, B. 2016. Prognostic significance of K-Ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis, *World J. Surg. Oncol*, 14; 146.
- Tomasetti, C., Vogelstein, B. 2015. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347; 78-81.
- Tsai, F.D., Lopes, M.S., Zhou, M., Court, H., Ponce, O., Fiordalisi, J.J., et al., 2015. K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 112 (3); 779–784.
- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, PG. 2017. Defining a cancer dependency map. *Cell*, 170:564-576.
- Ungkulpasvich, U., Hatakeyama, H., Hirotsu, T. and di Luccio, E. 2023. Pancreatic Cancer and Detection Methods, *Biomedicines* 11(9); 1-30.
- Vivanco, I., and Sawyers, CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(7); 489-501.
- Waller, D.G. 2016. *Oncology and Haematology*. Elsevier, 1048 s., İngiltere.
- Walker, A.E. (2018) *The adult pancreas in trauma and disease*. *Academic Forensic Pathology*, 8(2); 192–218
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., Der, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 118(5); 843–846.

- Wang, W., Fang, G., Rudolph, J. 2012. Ras inhibition via direct Ras binding--is there a path forward?. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(18); 5766-76.
- Wang, X., Allen, S., Blake, JF., Bowcut, V., Briere, DM., Calinisan, A., Dahlke, JR., Fell, JB., Fischer, JP., Gunn, RJ., Hallin, J., Laguer, J., Lawson, JD., Medwid, J., Newhouse, B., Nguyen, P., O'Leary, JM., Olson, P., Pajk, S., Rahbaek, L., Rodriguez, M., Smith, CR., Tang, TP., Thomas, NC., Vanderpool, D., Vigers, GP., Christensen, JG., Marx, MA. 2022. Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRASG12D Inhibitor. *J Med Chem*, 65(4); 3123-3133.
- Wong, KK., Qian, Z., Le, Y. 2016. The role of precision medicine in pancreatic Cancer: challenges for targeted therapy, immune modulating treatment, early detection, and less invasive operations, *Cancer Transl. Med*, 2 (2); 41-47.
- Wood, H.E., Gupta, S., Kang, J.Y., Quinn, M.J., Maxwell, J.D., Mudan, S. and Majeed, A. 2006. Pancreatic cancer in England and Wales 1975-2000: patterns and trends in incidence, survival and mortality. *Aliment Pharmacol Ther*, 23; 1205-1214.
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., Hannun, YA. 2016. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529; 43.
- Xianhua, H., Rendan, Z., Jiaxin, Y., BO, M. and Chunyan Z. 2023. Wild-type KRAS inhibits the migration and invasion of pancreatic cancer through the Wnt/ β -catenin pathway. *Molecular Medicine Reports*, 27(4); 1-9.
- Xu, M., Jung, X., Hines, O.J., Eibl, G. and Chen, Y. 2018. Obesity and pancreatic cancer: Overview of epidemiology and potential prevention by weight loss. *Pancreas*, 47(2); 158-162.
- Yao, Y. ve Dai, W. 2014. Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen*, 5; 1-17.
- Yoshioka, R., Yasunaga, H., Hasegawa, K., Horiguchi, H., Fushimi, K., Aoki, T., Sakamoto, Y., Sugawara, Y. and Kokudo N. 2014. Impact of hospital volume on hospital mortality, length of stay and total costs after pancreaticoduodenectomy. *Br. J. Surg*, 101(5); 523–529.
- Zamboni, G., Hirabayashi, K., Castelli, P., Lennon, AM. 2013. Precancerous lesions of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 27; 299-322.
- Zehir, A., Benayed, R., Shah, RH. 2017. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*, 23; 703-13.
- Zhang, J., Darman, L., Hassan, MS., Von Holzen, U., Awasthi, N. 2023. Targeting KRAS for the potential treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma: Recent advancements provide hope. *Oncol Rep*, 50(5); 206.

Zhou, Y., Hancock, J.F., 2015. Ras nanoclusters: versatile lipid-based signaling platforms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1853 (4); 841–849.