

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

PARAFİNE GÖMÜLÜ PANKREAS KANSERİ DOKU
ÖRNEKLERİNDE SİRKADİYEN RİTİM GENLERİNİN
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Uğur KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

PARAFİNE GÖMÜLÜ PANKREAS KANSERİ DOKU
ÖRNEKLERİNDE SİRKADİYEN RİTİM GENLERİNİN
EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Uğur KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2019-4720 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 01.01.2020

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Sema SEZGİN GÖKSU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem AYDIN ACAR
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Uğur KESKİN

İmza



DOÇ. DR. Ayşe Esra MANGUOĞLU

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel desteği, tecrübesi ile bana her alanda yol gösterip, sabır ve ilgiyle yardımlarını esirgemeyen, değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU'na;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve yol gösteren Anabilim Dalı başkanımız Pof. Dr. İbrahim KESER'e;

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve yol gösteren sayın Prof. Dr. Mustafa Tekinalp GELEN ve sayın Doç. Dr. Sema SEZGİN GÖKSU hocalarıma;

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca sahip oldukları bilgileri ve deneyimlerini aktaran ve yol gösteren tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, asistan arkadaşlarıma, çalışanlarına ve sekreterine;

Tez çalışmam süresince deneylerimi yaparken güler yüzlü destekleri ve her türlü yardımları için Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi çalışanlarına, özellikle Biyolog Ebru KALAY'a;

Her zaman yanımda olan dostlarım; Murat BİLLOR, Öznur TOKTA, Şeyda GÜLLÜ'ye;

Bilgi, birikim, tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Ufuk MERT'e;

Hayatta var olma sebebim olan, her zaman her konuda desteğini esirgemeyip bütün şartlarda beni sahiplenen, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Dede KESKİN, annem Meryem KESKİN'e;

Canım ailem; Halil KESKİN ve ailesine, Seyfettin KESKİN ve ailesine, Sedat KESKİN ve ailesine, Özlem BUYURAN ve ailesine;

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, yol arkadaşım, çözüm ortağım, her şeyim, canım KARDEŞİM Muharrem KESKİN'e;

Tüm sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Sirkadiyen ritim genleri hücrelerde önemli yolakların kontrolünü sağlar. Pankreas kanseri, tedavisi en zor kanserlerden birisi olup, 5 yıllık sağkalım ortalama %7 kadardır. Bu çalışmada pankreas kanseri dokularındaki sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Parafine gömülü pankreas tümörü ve tümör dokusuna bitişik normal dokulardan total RNA izolasyonu yapılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Daha sonra revers transkriptaz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve kuantitatif (quantitative) gerçek zamanlı (real-time) PZR (qRT-PCR) yapılarak, seçilen sirkadiyen ritim genlerinin BMAL1, CLOCK, PER1, PER2, CRY1, CRY2 ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen pankreas kanseri tanılı 22 hastanın 11'i kadın, 11'i erkek olup 43 ile 85 yaş aralığında dağılım göstermiştir. Üç tekrarlı olarak yapılan qPCR çalışması sonucunda elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri doğrultusunda Wilcoxon testi uygulanmıştır. Tümör ve tümör dokusuna bitişik normal dokularda seçilen genlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu doğrultuda BMAL1 için $p=0,529$ ($p>0,05$), CLOCK için $p=0,538$ ($p>0,05$), PER1 için $p=0,947$ ($p>0,05$), PER2 için $p=0,827$ ($p>0,05$), CRY1 için $p=0,886$ ($p>0,05$), CRY2 için $p=0,938$ ($p>0,05$) değerlerine ulaşılmıştır.

Sonuç: Pankreatik Duktal Adenokarsinom tanısı almış 22 hastanın tümör dokusu ve tümör dokusuna bitişik normal dokusunun sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon farklılıkları incelenmiştir. Ekspresyon düzeyleri 22 hastada toplu olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir değişim bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak, her hasta tek tek incelendiğinde, ekspresyonlarında bir takım değişimler saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sirkadiyen ritim, pankreas kanseri, qRT-PCR

ABSTRACT

Objective: Circadian rhythm genes control important pathways in cells. Pancreatic cancer is one of the most difficult cancers to treat. The aim of this study was to investigate the differences in expression levels of circadian rhythm genes in pancreatic cancer tissues.

Method: Total RNA was isolated from paraffin-embedded pancreatic tumor and normal tissues adjacent to tumor tissue and transformed into cDNA. BMAL1, CLOCK, PER1, PER2, CRY1, CRY2 expression levels of selected circadian rhythm genes were evaluated by performing reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Expression levels were analyzed statistically and clinically.

Results: Of the 22 patients with pancreatic cancer included in the study, 11 were female and 11 were male and their ages ranged from 43 to 85 years. The Wilcoxon test was applied in line with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ values obtained as a result of the qPCR study performed in triplicate. Expression levels of selected genes in normal tissues adjacent to tumor and tumor tissue were compared. Accordingly, $p = 0.529$ ($p > 0.05$) for BMAL1, $p = 0.538$ ($p > 0.05$) for CLOCK, $p = 0.947$ ($p > 0.05$) for PER1, $p = 0.827$ ($p > 0$ for PER2), $p = 0.886$ ($p > 0.05$) for CRY1, $p = 0.938$ ($p > 0.05$) for CRY2 values were reached.

Conclusion: Tumor tissue of 22 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and normal tissue adjacent to tumor tissue were examined for differences in expression of circadian rhythm genes. When the average expression levels were compared in 22 patients, no statistically significant change was found. However, when each patient was examined individually, some changes in their expression were detected.

Key words: Circadian rhythm, pancreatic cancer, qRT-PCR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sirkadiyen Ritim	3
2.1.1. Sirkadiyen Ritmin Memeli Hücresindeki Moleküler Mekanizması	4
2.1.2. Sirkadiyen Ritim Genleri ve Hücre Döngüsü	5
2.1.3. Sirkadiyen Ritim ve Kanser	7
2.2. Pankreas	9
2.2.1. Pankreas Kanseri	10
2.2.2. Pankreas Kanseri ve Genetik	10
2.2.3. Pankreas Kanseri ve Sirkadiyen Ritim	12
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Hasta Seçimi	14
3.2. Total Rna İzolasyonu	15
3.3. Kit ile cDNA Eldesi	17
3.4. Elde Edilen cDNA'nın PCR ile Çoğaltılarak Agaroz Jel Elektrofrozi Yapılması	17
	iii

3.5.	Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	18
3.6.	$2^{-\Delta\Delta CT}$ Metodu Kullanılarak qRT-PCR Ürünlerinin Hesaplanması	19
3.7.	İstatistiksel Değerlendirme	19
4.	BULGULAR	21
5.	TARTIŞMA	26
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	30
	KAYNAKLAR	31
	EKLER	37
	EK 1 Aydınlatılmış Onam Formu	37
	ÖZGEÇMİŞ	41

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Hastaların Klinikopatolojik Verileri	15
Tablo 3.2. cDNA master miks	17
Tablo 3.3. cDNA PCR Amplikasyon Basamakları	17
Tablo 3.4. PCR reaksiyon koşulları	17
Tablo 3.5. PCR Amplikasyon Basamakları	18
Tablo 3.6. qRT-PCR'ın Reaksiyon Koşulları	18
Tablo 3.7. qRT-PCR amplikasyon basamakları	18
Tablo 3.8. Genlerin primer dizleri	19
Tablo 3.9. Deneilerin sonucunda elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları	20

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Memeli hücresinde sirkadiyen ritim genlerinin transkripsiyon-translasyon döngüsü (Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2010).	5
Şekil 2.2. İnsanda nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının sirkadiyen ritim kontrolü (Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2010).	7
Şekil 4.1. Normal Dağılım Analizi Sonuçları	21
Şekil 4.2. Wilcoxon İşaretli Sıralar Analizi Sonuçları	21
Şekil 4.3. BMAL1 Geninin Boxplot Grafiği	22
Şekil 4.4. CLOCK Geninin Boxplot Grafiği	22
Şekil 4.5. PER1 Geninin Boxplot Grafiği	22
Şekil 4.6. PER2 Geninin Boxplot Grafiği	23
Şekil 4.7. CRY1 Geninin Boxplot Grafiği	23
Şekil 4.8. CRY2 Geninin Boxplot Grafiği	23
Şekil 4.9. BMAL1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği	24
Şekil 4.10. CLOCK $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği	24
Şekil 4.11. PER1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği	24
Şekil 4.12. PER2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği	25
Şekil 4.13. CRY1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği	25
Şekil 4.14. CRY2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği	25

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATM	: Mutant Ataksi Telenjektazi
ATR	: Rad3 İlişkili Ataksi Telejektazi
Bax	: BCL2-associated X protein
BMAL1	: Brain And Muscle Arly Hydrocarbon Receptor Nuclear Antigen 1
Cdk2	: Cyclin-dependent Kinase 2
CDKN2A	: Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
Chk 1-2	: Checkpoint Kinases 1-2
CKIε	: Kazein kinaz I Epsilom
CLOCK	: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CRY1-2	: Cryptochrome 1-2
E-box	: Enhancer Box
ER	: Estrogen Receptor
ERCC1	: Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 1
G1	: Gap 1
G2	: Gap 2
HNSCC	: Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom
IPMN	: İntraduktal Papiller Müsinö Neoplaziler
MCN	: Müsinöz Kistik Neoplaziler

NER	: Nükleotid Eksizyon Onarımı
PanIN	: Pankreatik İntraepitelyal Neoplaziler
PDA	: Pankreatik Duktal Adenokarsinol
PER1-3	: Period 1-3
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REV-ERB	: Nuclear Receptor Rev-ErbA-alpha
ROR	: Retinoid-related Orphan Receptor-alpha
RPA ve RPC	: Replikasyon Proteini A ve C
S	: DNA Sentez
SCN	: Supkiazmatik Çekirdek
TFIIH	: Transkripsiyon Faktörü IIH
TGFβ	: Transforming Growth Factor beta
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Wee1	: WEE1 homolog
XPA-G	: Kseroderma Pigmentozum Grup A-G

1. GİRİŞ

Bütün canlıların yenilenemeyen tek kaynağı zamandır. Bundan dolayı gerek canlılar gerekse doğa bu yenilenemeyen kaynağın kontrolünü sağlamak için refleksler geliştirmiştir. Özellikle canlı hayatında belirli mekanizmalar belirli zaman aralıklarında kontrole tabi olup belirli döngüler içerisine girmişlerdir. Bir canlı organizmanın yaklaşık 24 saatlik döngüsü ise sirkadiyen ritim olarak adlandırılır. Sirkadiyen ritim canlı organizmalarda gözlemlenebildiği gibi sistemler, organlar, dokular ve hücreler gibi daha alt yapılarda da gözlemlenir. Sirkadiyan ritimlerin kontrolünde hem genetik faktörler hem de çevresel uyaranlar rol oynar. Isı, gürültü, gibi çevresel uyaranların yanında en önemli uyaranı ışıktır. Organizma düzeyinde bakıldığında memelilerde sirkadiyen ritim epifiz bezi tarafından suprakiazmatik çekirdek üzerinden kontrol edilir. Suprakiazmatik çekirdek beynin ön hipotalamus bölgesinde lokalize olmuştur (Kondratov ve ark., 2007). Hücresel düzeyde bakıldığında negatif geri bildirim içeren moleküler bir ağ tarafından kontrol edilir. *CLOCK* (circadian locomotor output cycles kaput) ve *BMAL 1* (brain and muscle arly hydrocarbon receptor nuclear antigen 1) isimli transkripsiyon faktörü olan genler transkripte olarak heterodimer oluşturur ve *Periyod* (Per 1, Per 2 ve Per 3), *Kriptokrom* (Cry 1 ve Cry 2) isimli transkripsiyon faktörü genlerin transkripte olmasını sağlar. Per ve Cry genlerinin transkripsiyon ürünleri negatif geri bildirim yaparak kendi transkripsiyonlarını baskılar (Lowrey ve Takahashi, 2004; Ko ve Takahashi, 2006).

Hücre çoğalması, apoptoz, DNA tamiri ve DNA hasarına cevap gibi hücre açısından hayatı öneme sahip olaylar sirkadiyen ritim tarafından kontrol edilir (Mongrain ve Cermakian, 2009; Rana ve Mahmood, 2010). Böyle hayati mekanizmaları kontrol ediyor olması sirkadiyen ritmin önemini daha da artırmaktadır. Sirkadiyen ritimde meydana gelebilecek bir hasarın canlı organizmada birçok etkisi olacaktır (Hoffman ve ark., 2010; Weger ve ark., 2017).

Hücreler anormal olarak çoğaldıklarında, apoptoz fonksiyonlarını kaybettiklerinde veya her ikisi birden gerçekleştiğinde genellikle kanserleşebilirler. İnsan hayatını önemli ölçüde tehdit eden kanserde sirkadiyen ritim bozulması ciddi bir risk faktörü oluşturmakla beraber aralarındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Sirkadiyen ritmin kanser

hücrelerinde en önemli mekanizmalardan olan hücre çoğalması, apoptoz, DNA tamiri gibi mekanizmaları kontrol ediyor olması sirkadiyen ritmi daha da önemli hale getirmiştir. Bu durum sirkadiyen ritim ile kanser arasındaki ilişkinin aydınlatılmasıyla kanserin önemli ölçüde anlaşılabilceğini düşündürmektedir (Rana ve Mahmood, 2010; Savvidis ve Koutsilieris, 2012).

Pankreas; 14-20 cm uzunluğunda, 70-150 gr ağırlığında, karnın üst kısmı ile, on iki parmak bağırsak ve dalak arasında enine yerleşim gösteren retroperitoneal bir organdır. Pankreas; fizyolojik olarak baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 bölümden meydana gelirken işlevsel olarak; karbonhidrat, protein ve yağların sindirimi için gerekli enzimlerin salgılandığı ekzokrin kısım ile karbonhidrat metabolizmasını kontrol eden hormonları salgılayan endokrin kısım olmak üzere ikiye ayrılır (Slack, 1995; Neoptolemos ve ark., 2010).

Pankreas kanseri kötü prognozlu ve sağ kalım oranı oldukça düşük olan ölümcül kanserlerden biridir. Pankreas tümörleri bütün hücrelerden gelişebildiği gibi en fazla ekzokrin hücrelerden türemektedir. Pankreas kanseri gelişiminde, pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplaziler (IPMN) ve müsinöz kistik neoplaziler (MCN) olmak üzere 3 öncü lezyon rol oynamaktadır (Hruban ve ark., 2004).

Yapılan birçok çalışma sirkadiyen ritim bozulmasının tümör oluşumu ve gelişmesinde bireyin kalıtsal genetiğinden daha fazla rol oynadığını göstermiştir (Gery ve Koeffler, 2010; Rana ve Mahmood, 2010; Nirvani ve ark., 2018). Sirkadiyen ritimde oluşacak bir bozulma yalnızca malign tümör oluşumu ile ilişkili olmayıp prognoza ve tedavi sonucuna da etki etmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada pankreas kanseri doku örneklerinde sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerini ölçtük. Çalışmada pankreas kanser dokusunu seçmemizdeki en önemli etken pankreas kanser dokusu ile yapılan çalışmalarda bulunan sonuçların birbirleri ile çelişiyor olması, pankreas kanser dokusunda sirkadiyen ritim çalışmalarının az olması, sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri arasındaki farkın bir biyo belirteç olabileceği düşüncesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirkadiyen Ritim

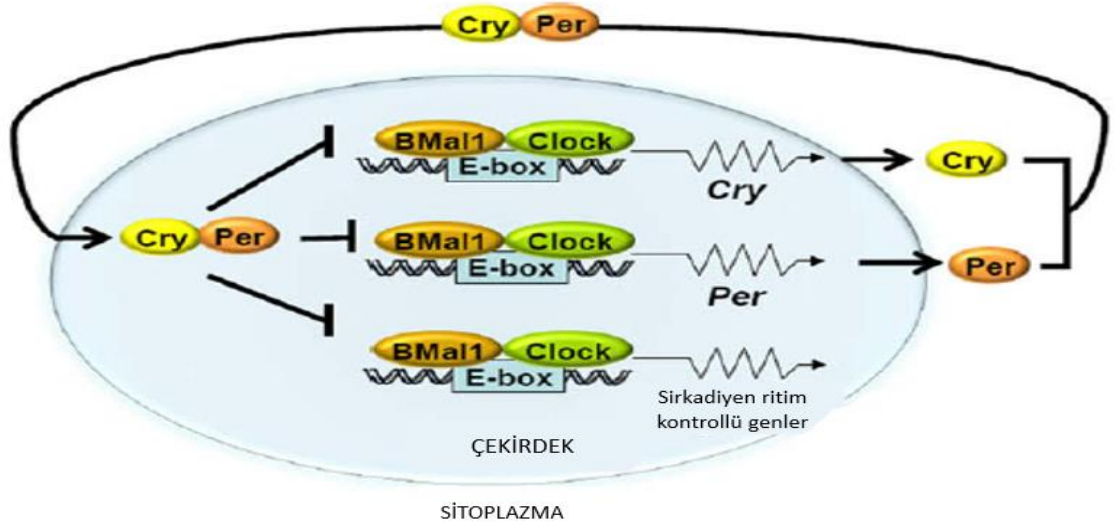
Yaşamsal sürecin devamlılığını sağlayan en önemli etkenlerden biriside döngüdür. Karbon döngüsü, azot döngüsü, su döngüsü gibi döngüler canlı hayatın devamlılığını sağlamaktadır. Yaşamsal sürecin her alanında olduğu gibi canlıların biyolojik yapılarında da hayati öneme sahip döngüler mevcuttur. Canlı formu ve yapısı ne olursa olsun bütün canlılarda ortak etkiye sahip döngüler vardır. 24 saatten kısa sürede döngü gerçekleştiren ritimlere ultradiyen, 24 saatten fazla sürede döngü gerçekleştiren ritimlere infradiyen, 12 aylık bir sürece sahip döngülere sirkannual ritimler denir (Özbayer ve Değirmenci, 2011). Canlıların en önemli biyolojik olaylarını kontrolü altında tutan ve yaklaşık 24 saatlik bir süreye sahip döngülere ise sirkadiyen ritim denir.

Prokaryotik ve ökaryotik bütün canlılarda bulunan sirkadiyen ritim, hücresel hemostazın verimli bir şekilde idaresini sağlayan 24 saatlik bir döngüdür. Hücre bu idareyi; 24 saatlik sürekli bir döngü, geniş bir fizyolojik sıcaklık aralığı ve ışık, beslenme gibi çevresel etkenler aracılığı ile gerçekleştirir (G. Sancar ve Brunner, 2014).

Memelilerde vücut ısısı, beslenme, uyku-uyanıklık döngüsü, hormon salgılanması, kan basıncı, pıhtılaşma faktörleri, birçok genin ekspresyonu sirkadiyen ritmin kontrolü altında tutularak düzenlenir. Bu düzenlenme organizma boyutunda Epifiz bezi ve Suprakiazmatik çekirdek (SCN) aracılığı ile gerçekleştirilir (Kondratov ve ark., 2007; Özbayer ve Değirmenci, 2011; Nirvani ve ark., 2018). Beynin ön hipotalamus bölgesinde lokalize olmuş Suprakiazmatik çekirdek ana osilatör merkezi olarak görev yapar ve dokulardaki periferel saatleri kontrolü altında tutar. (Kondratov ve ark., 2007). SNC periferel dokular üzerindeki kontrolünü nöronal ve endokrin sinyaller ile sağlar (Kondratov ve ark., 2007; Dibner ve ark., 2010). Göz retinasına ulaşan ışık retinohipotalamik yol üzerinden suprakiazmatik çekirdeği uyarak organizmanın ritimlerini düzenler (Schibler, 2005).

2.1.1. Sirkadiyen Ritmin Memeli Hücresindeki Moleküler Mekanizması

Birçok canlıda olduğu gibi memeli hücresinde de 24 saatlik bir döngüye sahip olan bütün mekanizmalar sirkadiyen ritim tarafından kontrol edilir. Moleküler seviyedeki sirkadiyen ritim bu kontrolü birbirine bağlı transkripsiyon-translasyon geri bildirim döngüleri ile sağlar. Bu transkripsiyon-translasyon döngülerini “circadian locomotor output cycles kaput” (*CLOCK*), “brain and muscle arly hydrocarbon receptor nuclear antigen 1” (*BMAL1*), “Period” (*Per 1, 2, ve 3*), “Cryptochrome” (*Cry 1 ve Cry 2*) genleri ve bu genlerin transkripsiyon ürünleri ile gerçekleştirir (Lowrey ve Takahashi, 2004; Ko ve Takahashi, 2006). Bu genlerden transkripsiyon faktörü olan *CLOCK* ve *BMAL1* heterodimer oluşturarak diğer sirkadiyen ritim genleri olan *PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2* ‘nin E-box bölgelerine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu sağlar ve bu negatif geri bildirimli döngünün pozitif tarafını oluşturur (Lowrey ve Takahashi, 2004; Ko ve Takahashi, 2006; Dibner ve ark., 2010). *CLOCK/BMAL1* heterodimerleri *BMAL1* geninin ekspresyonunun kontrolünü sağlayacak orphan nükleer reseptörlerden olan *ROR α* ve *REV-ERB* moleküllerinin de transkripsiyonunu sağlar (Ko ve Takahashi, 2006; G. Sancar ve Brunner, 2014). Transkripte olan *PER* ve *CRY* genlerinin proteinleri yeterli seviyeye ulaştıklarında sitoplazmadan çekirdeğe geçerek heterodimer oluşturur. Oluşan bu heterodimer E-box bölgesine bağlanarak kendi transkripsiyonunu negatif geri bildirim ile baskılamış olur (Lowrey ve Takahashi, 2004; Ko ve Takahashi, 2006; Dibner ve ark., 2010). Belirli bir süre sonra *CRY/PER* baskılayıcı kompleksin ortadan kalkmasıyla E-box bölgesine tekrar bağlanan *CLOCK/BMAL1* heterodimeri döngüyü yeniden başlatır (Okamura ve ark., 2010; Son ve ark., 2011). Sirkadiyen ritim genlerinin transkripsiyon-translasyonunu kontrol eden *BMAL1* geninin transkripsiyonu da kontrol altındadır. *ROR α* , *BMAL1* geninin transkripte olmasını sağlarken *REV-ERB* transkripsiyonunu durdurur (Ko ve Takahashi, 2006; G. Sancar ve Brunner, 2014). Sirkadiyen ritim genlerinin transkripsiyon-translasyon kontrolü şekil 2.1’de özetlenmiştir.



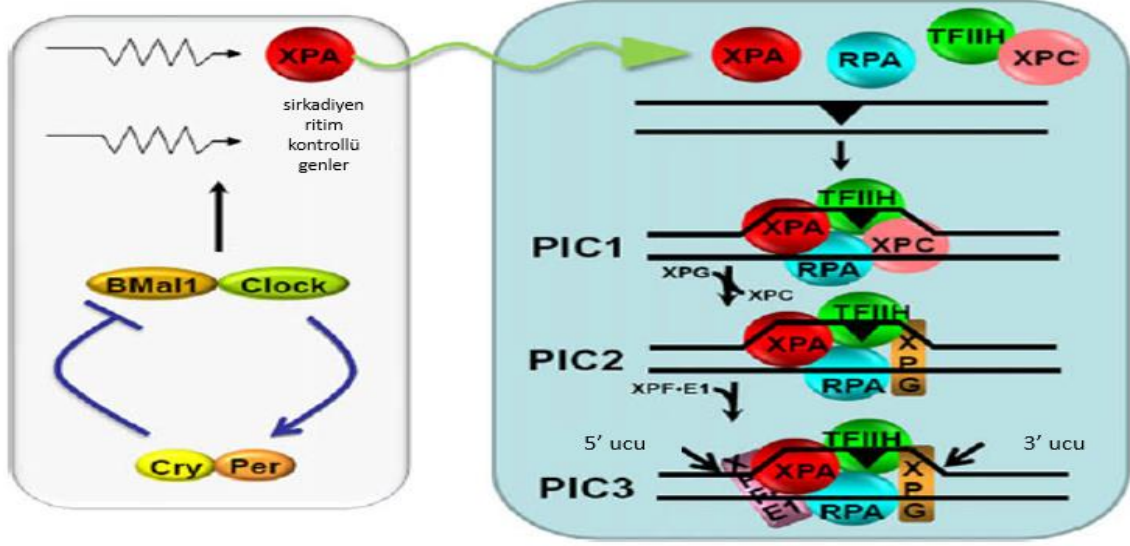
Şekil 2.1. Memeli hücresinde sirkadiyen ritim genlerinin transkripsiyon-translasyon döngüsü (; A. Sancar ve ark., 2010).

2.1.2. Sirkadiyen Ritim Genleri ve Hücre Döngüsü

Sirkadiyen ritim ve hücre döngüsü memelilerde birbirinden farklı mekanizmalar olsa da birbirini ile bağlantılıdır. Memeli genlerinin yaklaşık %10'nundan fazlasını kontrolü altında tutan sirkadiyen ritim genleri, hücrede en önemli mekanizmalardan birisi olan hücre döngüsünü de kontrolü altında tutmaktadır (Akhtar ve ark., 2002; Duffield ve ark., 2002; Rana ve Mahmood, 2010). Bütün canlılarda canlılığın devamı ve elde edilen bilginin aktarılması genetik bilgi ile gerçekleştirilir. Eksiksiz bir organizma oluşturmak için gerekli bilgi yeni nesillere ve yeni hücelere DNA aracılığı ile aktarılır ve bu hücre bölünmesi ile gerçekleştirilir. Her hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunda yaklaşık üç milyar baz çifti kullanılır ve yeni hücelere aktarılır. Bu önemli olayın sorunsuz gerçekleşmesi için hücre önlemler olsa da çevresel etkenler genomik DNA'nın bütünlüğünü tehdit etmektedir. İç kaynaklı veya çevresel etmenlerden dolayı DNA değişime uğrayabilir. DNA da meydana gelen bu değişimlere DNA hasarı adı verilir (Orren ve Sancar, 1987; Lindahl, 1993; A. Sancar ve ark., 2004). Hücre bu DNA hasarlarına karşı birkaç farklı mekanizma geliştirmiştir. Bunlardan biride hücre döngüsünün belirli noktalarında DNA'da hasar oluşması durumunda hücre döngüsünü durdurarak bu hasarın giderilmesini sağlamaktır. Hasarın giderilmediği durumda hücre döngüsünü durdurarak hücreyi apoptoz gibi savunma mekanizmalarına yönlendirir. Hücre döngüsünün bu kritik kontrol noktaları sirkadiyen ritim genlerinin kontrolü altındadır

(Orren ve Sancar, 1987; de Boer ve Hoeijmakers, 2000; Akhtar ve ark., 2002; Duffield ve ark., 2002; A. Sancar ve ark., 2004). Hücre döngüsü Gap1 (G1), Gap2 (G2), DNA sentez (S), ve M fazından oluşur. Hücre döngüsünün önemli noktalarından birisi olan G2/M geçişi Cdk2/siklin B kompleksi tarafından kontrol edilir (Hunt ve Sassone-Corsi, 2007). Sirkadiyen ritim genleri olan CLOCK/BMAL1 heterodimerleri wee 1 geninin E-box bölgesine bağlanarak ekspresyonunu sağlar. Hücre döngüsünün diğer önemli bir bileşeni olan Wee 1 aracılığı ile sirkadiyen ritim Cdk2/siklin B kompleksini kontrolü altında tutar (Hunt ve Sassone-Corsi, 2007). Wee 1 kinazın ekspresyonunu sağlayarak Cdk2/siklin B kompleksini fosforiller. Bu sayede G2/M geçişini kontrolü altında tutar. G1 fazının ilerleyişinin kontrolünü sağlayan bileşen, siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 i etkisi altında tutan REV-EBR bileşiğinin ekspresyonu sirkadiyen ritimin kontrolündedir (Geyfman ve Andersen, 2010). Diğer sirkadiyen ritim kontrolü altındaki Tim ve Per1 proteinleri aracılığı ile DNA hasar kontrol noktasını ATM (mutant ataksi telenjiektazi), ATR (Rad3 ilişkili ataksi telejiektazi), Chk (checkpoint kinases) 1 ve 2 kinazlar aracılığı ile kontrolü altında tutar (Ünsal-Kaçmaz ve ark., 2005; Gery ve ark., 2006; Walisser ve Bradfield, 2006; Hunt ve Sassone-Corsi, 2007).

Bir diğer DNA hasar tamir mekanizması olan nükleotid eksizyon onarımı (NER) sirkadiyen ritim kontrolündedir (A. Sancar ve ark., 2014). İnsanlarda nükleotid eksizyon onarımı RPA, XPA, XPC, TFIIH, XPG, XPF-ERCC1 bileşenleri ile gerçekleşir. DNA da meydana gelen hasarlı bölge RPA, XPA, XPC tarafından tanınarak işaretlenir. İşaretlenen bölgede XPA, XPC, TFIIH bir kompleks oluşturarak XPG ve XPF-ERCC1 ile etkileşime girerek 24-30 nükleotidlik hasarlı bölge kesilerek TFIIH ile birlikte hücre içi nükleazlar tarafından parçalanmak üzere salınır. Hasar bölgesinde oluşan boşluk DNA polimeraz yardımı ile doldurularak DNA hasarı giderilmiş olur (A. Sancar ve ark., 2014). Nükleotid eksizyon onarım mekanizmasının hız sınırlayıcı bileşeni olan XPA'nın kontrolü direk sirkadiyen ritim genleri tarafından sağlanır (şekil 2.2) (A. Sancar ve ark., 2014).



Şekil 2.2. İnsanda nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının sirkadiyen ritim kontrolü (A. Sancar ve ark., 2010).

2.1.3. Sirkadiyen Ritim ve Kanser

Hücre çoğalması, hücre döngüsü, apoptoz, DNA tamiri, detoksifikasyon, DNA hasarına yanıt, tümör baskılayıcı genler, gibi hücre için hayati öneme sahip mekanizmalar doğrudan veya dolaylı yollar ile sirkadiyen ritim tarafından kontrol edilir (Mongrain ve Cermakian, 2009; Rana ve Mahmood, 2010). Bu kadar önemli mekanizmaların kontrolünü sağlayan sirkadiyen ritim ve sirkadiyen ritim kontrollü genlerde meydana gelecek değişimlerin, obezite, depresyon, metabolik hastalıklar, kanser gibi birçok sağlık sorunları ve hastalığa yakalanma olasılığını arttırabileceğini bildirilmiştir (Costa ve ark., 2010; Gery ve Koeffler, 2010). On dört farklı tümör tipinin karşılaştırıldığı bir çalışmada sirkadiyen ritim genleri ve sirkadiyen ritim genlerinin kontrolünde olan genlerin en az % 90'ının ekspresyon seviyesinde değişim olduğunu göstermiştir (Ye ve ark., 2018). Yapılan klinik çalışmalar ve araştırmalar sirkadiyen ritim ile tümörigenez arasında bağlantı olduğunu gösterse de bu bağlantının moleküler mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Masri ve Sassone-Corsi, 2018).

Dünyada meydana gelen hızlı sanayileşme devrimleri ve insanların modern hayata ayak uydurma çabası, insan hayatının her alanına giren kısa dalga boylu ışık yayan cihazlar, insanlarda endojen homeostazın değişmesine ve bozulmasına neden olmaktadır. Bu değişimin kaçınılmaz bir sonucu olarak akciğer, meme, yumurtalık, prostat, pankreas gibi

kanserlerin görülme sıklığı artmıştır (Schernhammer ve ark., 2003; Kubo ve ark., 2006; Viswanathan ve ark., 2007). Sirkadiyen ritmi bozan ve kansere yakalanma riskini artıran yapay ışıklandırma hipotezi, ışık-karanlık döngüsünden etkilenmeyen ve endojen saatlerini farklı girdilerle düzenleyen görme engelli bireyler ile yapılan araştırmaların sonucu bu bulguları güçlendirmiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda aynı ortamı paylaşan diğer insanlara göre görme engelli bireylerde kansere yakalanma riskinin azaldığı bulunmuştur (Feychting ve ark., 1998; Verkasalo ve ark., 1999; Kliukiene ve ark., 2001). Dünyada sanayileşmenin getirdiği en büyük etkenlerden biriside vardiyalı çalışma ve bu çalışma şeklinin insan sağlığı üzerine olumsuz etkileridir. Yapılan epidemiyolojik araştırmalar vardiyalı çalışan kadınların meme kanserine yakalanma riskinin arttığı sonucunu vermiştir (Davis ve ark., 2001; Hansen, 2001; Schernhammer ve ark., 2003).

Sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların tümör oluşumu, apapotozu, sağ kalım süresi gibi önemli süreçlere etki ettiği yadsınamaz bir gerçek olmasına rağmen bu mekanizmalarla arasındaki moleküler ilişki halen aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda sirkadiyen ritim genlerinin farklı kanser türlerinde farklı ekspresyon seviyeleri sergilediğini göstermiştir. İnsan meme kanseri hücre hattının kullanıldığı bir çalışmada ER- α pozitif meme kanseri hücrelerinde *CLOCK* genin ifadesi azaltılmış ve proliferasyonda azalma olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte hücre hatlarına östrojen verilmesinin *CLOCK* genin ifadesinin artmasına ve meme kanseri hücrelerinin çoğalmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2014). Tedavi görmemiş 202 kolorektal kanseri hastasından elde edilen tümör dokusu ve bitişindeki normal dokunun sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında *CLOCK* geninin ve *CKI ϵ* geninin kanser dokusundaki ekspresyonunun anlamlı derecede yüksek iken *PER1* ve *PER3* genlerinin ekspresyon seviyelerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Oshima ve ark., 2011). Almanya'da yapılan bir çalışmada meme kanseri tanısı almış 766 hastanın tümör dokusunda sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde *PER2* genin yüksek ekspresyon seviyesinin metastaz ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Cadenas ve ark., 2014). Kolorektal kanseri tanılı 19 hastanın tümör dokusu ve tümör dokusunun yanındaki normal dokuda sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerinin klinik ve patolojik özellikleri ile ilişkisi araştırılmış ve tümör dokusundaki düşük *PER3* ekspresyonun belirgin bir şekilde daha düşük sağ

kalım ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Mazzocoli ve ark., 2011). Üç farklı kolorektal kanser hücresi ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmada ise daha yüksek BMAL1 ekspresyonunun daha az tümör hücresi proliferasyonu ve daha yüksek sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zeng ve ark., 2014). Boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) tanısı almış 40 bireyin tümör dokusu ve bitişik normal dokusunun sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiş, *PER1* ve *PER3* genlerinin düşük ekspresyonunun kötü sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hsu ve ark., 2012).

2.2. Pankreas

Dünya sağlık örgütünün 2018 verilerine göre pankreas kanseri dünyada en sık görülen 11'inci kanser türüdür. Erkeklerde en sık görülen 12'inci kanser iken kadınlarda 11'inci sırada yer almaktadır. Pankreas kanseri kötü prognozu sebebiyle malignitelere bağlı ölümlerde dünya çapında 7'inci sırada bulunmaktadır. Türkiye'de kanser tanısı almış olgularda ve kansere bağımlı ölümlerde pankreas kanseri 4'üncü sırada yer almaktadır. Yeni kanser tanısı almış olgularda ise 9'uncu sırada yer almaktadır.

Pankreas; 14-20 cm uzunluğunda, 70-150 gr ağırlığında, karnın üst kısmı ile, on iki parmak bağırsak ve dalak arasında enine yerleşim gösteren retroperitoneal bir organdır (Slack, 1995). Pankreas; fizyolojik olarak baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 bölümden meydana gelirken işlevsel olarak; karbonhidrat, protein ve yağların sindirimi için gerekli enzimlerin salgılandığı ekzokrin kısım ile karbonhidrat metabolizmasını kontrol eden hormonları salgılayan endokrin kısım olmak üzere ikiye ayrılır (Slack, 1995; Neoptolemos ve ark., 2010). Pankreasda ekzokrin kısım asiner ve kanal hücrelerinden oluşur ve pankreasın yaklaşık %85'lik bir bölümünü kapsar. Pankreasın %2'lik kısmını oluşturan endokrin kısmını ise Langerhans adacık hücreleri oluştururken geriye kalan kısmını ise ekstrasellüler matriks ve damarlar oluşturur (Neoptolemos ve ark., 2010).

Dallanmış kanal hücrelerinin uç kısımlarına lokalize olmuş asiner hücreleri aralarında amilaz, lipaz, nükleaz, tripsinojen, kimitripsinojen gibi proteazlarında bulunduğu yaklaşık 22 sindirim enziminin üretim ve salgılanmasından sorumludur. İnaktif olarak salgılanan bu enzimler duodenuma geçtikten sonra aktifleşirler. Pankreasın ekzokrin kısmı ise su ve elektrolit salgılanmasından sorumludur (Şimşek, 1993; Slack, 1995; Neoptolemos ve ark., 2010).

2.2.1. Pankreas Kanseri

Pankreas tümörlerinin bütün hücrelerden köken alabilmesine rağmen ekzokrin hücrelerden oluşma yüzdesi daha yüksektir. Ekzokrin hücre temelli tümörlerin büyük kısmı duktal epitel hücrelerden gelişen adenokarsinomlardır. Endokrin pankreas tümörleri ise genel olarak adacık hücrelerinden köken almaktadır (Singh ve ark., 2015).

Pankreas kanserinin %20 - 25 kadarının anatomik yeri saptanamamakla birlikte, %55'i baş kısmında, %9'u gövde, %8'i ise kuyruk kısmında oluşmaktadır (Singh ve ark., 2015). Pankreas tümörü 3 öncül lezyon olan, pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanIN), intraduktal papiller müsinö neoplaziler (IPMN), müsinöz kistik neoplaziler (MCN) den köken almaktadır (Hruban ve ark., 2004). Çapları 5 mm'den küçük, pankreatik kanallarda lokalize olmuş PanIN'ler bu özellikleri ile bir diğer pankreatik kanallara lokalize olmuş çapı 1 cm'den büyük olan IPMN'lerden ayrılırlar (Hruban ve ark., 2004). Müsin üretiminden sorumlu epitel hücrelerin aşırı çoğalmasıyla ve pankreatik kanalların genişlemesi ile karakterize olan IPMN'ler makroskopik lezyonlardır (Hruban ve ark., 2004; Kosmahl ve ark., 2004).

Büyüklikleri 2-35 cm arasında değişkenlik gösteren, genellikle pankreasın kuyruk ve gövde kısmında yer alan, müsin üretip bölümlü kist oluşturan, duktal sistemle etkileşim içerisinde olmayan epitelial neoplazilere MNC'ler denir (Fukushima ve Fukayama, 2007).

2.2.2. Pankreas Kanseri ve Genetik

Pankreas kanserinde tümör oluşumu ve gelişiminde genetik temelli yapılan analizler sonucunda kromozomal düzeydeki farklılıklar, onkogen ve tümör supressor genlerde meydana gelen mutasyonlar, epigenetik gen sessizleştirme, mikrosatellit kararsızlığı gibi çok çeşitli genetik değişimlerin bulunduğu gösterilmiştir (Maitra ve ark., 2006).

Pankreas kanserinin genetik yapısı incelendiğinde CDKN2A/p16/MTS1 lokuslarını içeren 9p kolunda, TP53 lokusunu içeren 17p kolunda, MADH4/SMAD4/DPC4 lokuslarına sahip 18q kollarında kayıp gözlemlenmiş, AKT2, K-ras2, MDM2, ERBB2, AIB1 onkogenlerini içeren 19q, 12p, 12q, 17q ve 20q kollarında ise çoğalma saptanmıştır (Mahlamäki ve ark., 1997; Schleger ve ark., 2000).

İnsan kanser türlerinin hepsi incelendiğinde %20'sinde K-ras mutasyonu gözlemlenmişken, pankreas kanserinde bu oran %95 gibi çok büyük bir değere ulaşmaktadır (Mahlamäki ve ark., 1997; Schleger ve ark., 2000). 12'inci kromozomun p kolunun 3'üncü bölgesinde lokalize olmuş K-ras geni hücrenin çoğalması, farklılaşması ve gelişmesi gibi kanserleşme anlamında önemli etkiye sahip hücrenel olaylarla yakından ilişkilidir. K-ras geninde meydana gelen bir mutasyon birçok sinyal yolağını etkileyerek kanser oluşumu ve gelişinde etkin rol oynayabilir. Bir onkogen olan AKT genin aktivasyonunu etkileyen PTEN/P13K/AKT yolağı bunlardan birisidir (Carnero ve ark., 2008). K-ras mutasyonu MEK ve ERK1/2'yi aktif hale getirerek ve VEGF'de (vasküler endotelial büyüme hormonu) artışa sebebiyet vererek etkilediğı sinyal yolaklarıyla anjiyogenez ve hücre çoğalasında etkin rol oynamaktadır (McCubrey ve ark., 2007).

Yirmi dört pankreas kanseri duktal adenokarsinom dokusunda 20 661 protein kodlayan genin incelendiğı bir çalışmada tümör baskılayıcı genler içerisinde en çok *TP53*, *SMAD4/DPC4* ve *CDKN2A/p16* genlerinin mutasyona uğradığı bilgisine ulaşılmıştır (Hong ve ark., 2011).

17'inci kromozomun p kolunda lokalize olmuş p53 proteinini kodlayan *TP53* geni hücre döngüsünün G2-M, G1-S kontrol noktalarının düzenlenmesi, apoptoz, DNA tamiri gibi önemli hücrenel olaylarda rol almaktadır. Bu gende meydana gelecek bir mutasyon DNA hasarının oluşması durumunda hücrenin hayatta kalmasına, bölünerek çoğalmasına ve kanser oluşumuna katkı sağlar (Vogelstein ve Kinzler, 2004). *TP53* genin mutasyonuna Pankreas kanserlerinin % 75'inde rastlanmıştır (Scarpa ve ark., 1993; Moore ve ark., 2001).

Hücre döngüsünün durdurulması, hücre göçü gibi kanserleşme açısından önemli mekanizmaları etkileyen TGF- β sinyal yolağının en önemli moleküler bileşeni olan SMAD4 proteini 18'inci kromozomun q kolunda lokalize olana *SMAD4* geninin transkripsiyon ürünüdür. *SMAD4* geninde meydana gelecek mutasyon kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanacak ve kanser oluşumuna katkı sağlayacaktır. Yapılan araştırmalar pankreas kanserlerinin %55'inin *SMAD4* gen mutasyonuna uğradığını göstermektedir (Hahn ve ark., 1996; Iacobuzio-Donahue ve ark., 2004).

Pankreas kanserinde mutasyon veya delesyona uğramış önemli genlerden biriside 9'uncu kromozomun p kolunda lokalize olmuş *CDKN2A* genidir. Pankreas kanserlerinin %95'inde *CDKN2A* geninin ifade kaybına rastlanmıştır (Delpu ve ark., 2011). *CDKN2A* geninin transkripsiyon ürünleri p16 ve p53 proteinleri, hücre döngüsünün negatif kontrolünün önemli moleküler bileşenleridir. Pankreatik karsinogenezde, P16'nın aktivasyon kaybı veya ifade düşüklüğü erken metastaz, tümör büyüklüğü ve sağ kalım oranı ile ilişkilendirilmiştir (Sasaki ve ark., 2003).

Ailede pankreas kanseri öyküsü olan bireylerde pankreatik maligniteler gelişme olasılığı yüksektir. Pankreas kanseri tanısı almış hastaların aile öyküleri incelendiğinde yaklaşık %10'unun aile bireylerinde de pankreas kanserine rastlanmıştır (Shi ve ark., 2009).

2.2.3. Pankreas Kanseri ve Sirkadiyen Ritim

Pankreas kanseri genellikle tanıda geç kalınan ve tedavisi en zor olan kanserlerden birisidir. Pankreasın vücutta bulunduğu konum genellikle tanının gecikmesine yol açmakta ve özellikle bu sebeple kötü prognoz ile sonuçlanmaktadır. Bundan dolayı pankreas kanseri tanısında biyolojik belirteçler oldukça önemlidir. Birçok kanserde olduğu gibi pankreas kanserinde de sirkadiyen ritim genlerinin etkisi yüksektir ve ekspresyon seviyelerinde ki farklılıkların bir biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği ön görülmektedir. Yapılan klinik araştırmalar bu hedef doğrultusunda ilerlerken aynı zamanda moleküler mekanizmaları da araştırılmaktadır.

Jiang ve arkadaşları pankreas kanseri tanısı almış 45 hastanın tümör dokusunu, tümör dokusuna bitişik normal dokunun sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırmış, *BMALI* genin ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu ve hastaların klinikopatolojik özellikleriyle yakından ilişkili olduğu bilgisine ulaşmışlardır. Pankreas tümör hücresinde *BMALI* genin düşük ekspresyonunun nasıl bir moleküler etki yarattığını araştırmak amaçlı pankreas kanseri hücre kültürü çalışması yapmışlardır. Çalışmalarında hücre kültüründe bir grup hücrenin *BMALI* genini shRNA ile susturarak diğer grubun vektör yardımı ile *BMALI* geninin ekspresyonunu artırmasını sağlamıştır. Yapılan incelemelerin sonucunda *BMALI* genin aşırı ekspre olduğu hücre grubunda hücre proliferasyonunu ve istilasını önemli ölçüde azalttığı ve bunu hücre döngüsü kontrol noktasında G2 / M geçişini durdurarak yaptığı sonucuna varmışlardır. *BMALI* genin

susturulduğu hücre hattında ise pankreas kanseri hücrelerin büyümesine katkı sağlandığı sonucuna varılmıştır. Bu sonucun altında yatan mekanizmanın ise *BMAL1* geninin p53 genin transkripte olmasını sağladığı ve bu hücre hattında p53 ekspresyonun gerçekleşmemesinden dolayı *BMAL1* geninin pankreas kanserinde anti-onkogen olarak davrandığı sonucuna ulaşımlardır (Jiang ve ark., 2016).

İnsan pankreas tümörü hücrelerinden türetilmiş hücre hattında yapılan bir çalışmada, insan *PER2* geninin bir homoloğu olan fare *Per2* geni rekombinat adenovirüs vektörü yardımı ile hücre kültüründeki hücrelere aktararak ekspresyonunun artması sağlanmıştır. *PER2* geninin ekspresyon artışının, hücre döngüsünü G2-/M kontrol noktasını baskılayarak ilerlemeyi durdurduğu, hücresel proliferasyonu azalttığı ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği sonucuna ulaşılmıştır. Aynı zamanda yapılan Western blot analizi Bcl-XL, Cdc2 ve siklin B1 proteinlerini azalttığını, buna karşılık Bax proteinini arttırdığını göstermiştir. Aşırı *PER2* geni ekspresyonuna sahip hücrelerde anti-kanser ajanı cisplatinin doza bağımlı snerjik etkisi ölçüldüğünde hücre öldürme etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir (Oda ve ark., 2009).

Pankreatik duktal adenokarsinol (PDA) tanısı almış 65 hasta dokusu, tümör dokusuna bitişik normal pankreas dokusu ve iyi huylu pankreas dokularının sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılarak, PDA dokularının klinikopatolojik ilişkilerinin incelendiği bir çalışma gerçekleştirilmiştir. PDA dokusunun sirkadiyen ritim genleri ve sirkadiyen ritim kontrollü genlerin ekspresyon seviyeleri, tümör dokusuna bitişik normal doku ve iyi huylu pankreas dokuları ile karşılaştırıldığında *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY2*, *Tipin* ve *CK1ε* genlerinin ekspresyonlarının düşük çıktığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu verilerin klinikopatolojik açıdan bir anlam belirtmediği vurgulanmıştır (Relles ve ark., 2013).

İki farklı pankreas kanseri hücre kültürünün kullanıldığı çalışmada, siRNA ile *PER1* geninin susturulması sonucu her iki hücre hattında da kaspas ve apoptozu artırdığı, Bax'in yukarı regülasyonu ve Bcl-2'nin aşağı regülasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir. *PER1*'in pankreas kanseri hücrelerinde anti-apoptotik etki gösterdiği vurgulanmıştır (Sato ve ark., 2009).

Pankreas duktal adenokarsinom tanısı almış 34 hastanın tümör ve tümöre bitişik normal dokusunun sirkadiyen ritim ve *SIRT1* genlerinin ekspresyon sevipleri karşılaştırılmış ve *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2*, *SIRT1* genlerin ekspresyon seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. *CLOCK* ve *BMAL1* genlerinin ekspresyon farklılıklarının istatistiksel olarak anlam ifade etmediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada 4 farklı pankreas kanseri hücre hattı (MIA-PaCa-2, BXPC3, CFPAC ve PANC-1) kullanılarak hücre kültürü kurulmuş ve bu hücrelerin açlık durumundaki sirkadiyen ritim genleri ve *SIRT1* geninin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. *SIRT1* geninin ekspresyonu MIA-PaCa-2 hücrelerinde düşmüş, PANC-1 hücrelerinde artmıştır. BXPC-3 ve CFPAC hücrelerinde değişmemiştir. BXPC-3 hücre hattında serum açlığı üzerine *BMAL1*, *CRY2*, *PER1*, *PER2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenirken *PER3* ve *CLOCK* genlerinin ifadesinin azaldığı bildirilmiştir. CFPAC hücre hattında *CLOCK* ve *PER1* genlerinde azalma, *CRY2*, *PER2*, *PER3* genlerinde artış olduğu belirtilmiştir. MIA-PaCa-2 hücrelerinde *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1* genlerinde azalma, *PER3* geninde artma gözlemlenmiştir. PANC-1 hücrelerinde *BMAL1*, *CLOCK*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY2* genlerinde artış, *CRY1* geninde ise düşüş gerçekleşmiştir (Tavano ve ark., 2015).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Projemiz Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını aldıktan sonra, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından Pankreatik Duktal Adenokarsinom tanısı almış, 22 hastanın parafine gömülü arşivden çıkarılan dokularından elde edilen tümör ve tümör dokusuna bitişik normal dokunun sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Patoloji Anabilim Dalı tarafından tümör alanını içeren 4 mikronluk kesitler alınarak boş lamlara yerleştirilmiş ve aynı bloklara ait tümör alanı işaretli hematoksilin eosin boyalı preparatlar yardımıyla tümör bölgeleri tespit edilerek 1,5 ml'lik nükleaz free eponдорf tüplerine yerleştirilmiştir. Aynı uygulama tümör dokusuna bitişik normal dokular içinde

uygulanmıştır. 11 kadın 11 erkekten oluşan hasta grubu 43 ile 85 yaş aralığında dağılım göstermektedir. Hastaların klinikopatolojik verileri tablo 3.1’de verilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalardan aydınlatılmış onam formu alınmıştır. Aydınlatılmış onam formunun bir örneği Ek 1 de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Hastaların Klinikopatolojik Verileri

HASTA KODU	YAŞ	CİNSİYET	HİSTOLOJİK TİP	TÜMÖR BOYUTU (cm)
1	85	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	3,2
2	76	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	4,5
3	74	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	
4	73	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	2,5
5	72	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	4,6
6	68	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	3
7	67	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	2,5
8	64	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	5
9	63	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	3
10	54	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	14
11	43	KADIN	DUKTAL ADENOKARSİNOM	3
12	76	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	4,5
13	74	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	4
14	69	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	1,5
15	69	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	2,5
16	68	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	2
17	64	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	3,5
18	64	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	2,5
19	61	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	4
20	59	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	3,5
21	52	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	5,2
22	51	ERKEK	DUKTAL ADENOKARSİNOM	3,6

3.2. Total Rna İzolasyonu

Macherey-Nagel NucleoSpin® totalRNA FFPE izolasyon kiti kullanılarak, kit protokolüne uygun olarak parafine gömülü dokudan total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucu elde edilen total RNA hemen cDNA’ya çevrilmiş ve tekrar ihtiyaç duyulması halinde kullanılmak için kalan RNA -20 °C’ de saklanmıştır.

Total RNA izolasyonu gerçekleştirilirken;

- ✓ Ependorf içerisinde kesitler halindeki doku parçalarına 1 ml parafin eritici eklenerek 56 °C de 5 dakika inkübe edilmiş ve 16000 g de 2 dakika santrifüj edilmiştir. İnkübasyon süresi parafin miktarına göre değişiklik gösterebilmektedir.

- ✓ Ependorfa 170 µl MLF buffer eklenerek 2 dakika 16000 g de santrifüj edilmiştir. Parafin çözücü pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır.
- ✓ 15 µl Proteinaz K eklenerek pipetaj yapılmış ve 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ İnkübasyon süresinin sonunda 15 µl MKA eklenip kısa vorteks yapıldıktan sonra buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 5 dakika 16000 g de santrifüj edilmiştir.
- ✓ Süpernatant yeni 1,5 ml'lik nükleaz-free santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 500 µl buffer MX eklenerek 2 defa 5'er saniye vortekslenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ Nükleospin RNA column'u yeni 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilerek inkübasyondaki örnek kolona yüklendi. 16000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldıktan sonra pellet atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- ✓ Üzerine 700 µl buffer MW2 eklenerek 16000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldıktan sonra pellet atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- ✓ Üzerine 250 µl buffer MW2 eklenerek 16000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pellet atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- ✓ Kolona 50 µl rDNase eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- ✓ Üzerine 100 µl buffer MX eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 16000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldıktan sonra pellet atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- ✓ Üzerine 700 µl buffer MW2 eklenerek 16000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldıktan sonra pellet atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- ✓ Üzerine 250 µl buffer MW2 eklenerek 16000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pellet atılarak kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- ✓ Kolon yeni 1,5 ml'lik nükleaz-free santrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µl RNaz-free su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılır.
- ✓ İnkübasyon süresinin sonunda 16000 g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Kolon atılarak total RNA elde edilmiş olur.

3.3. Kit ile cDNA Eldesi

Elde edilen total RNA Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (4368814) ile kit protokolü (Tablo 3-2, Tablo 3-1) doğrultusunda cDNA'ya çevrilerek -20 °C' de saklanmıştır. H₂O

Tablo 3.2. cDNA master miks

2X RT MASTER MİKS	1X (µl)
10X RT Buffer	2,00
25X dNTP Miks (10 mM)	0,80
10X RT Random Primer	2,00
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1,00
Rnas İnhibitor	1,00
Nuklease-Free H ₂ O	3,20
cDNA	10,00
Toplam Reaksiyon Hacmi	20,00

Tablo 3.3. cDNA PCR Amplikasyon Basamakları

PCR PROTOKOLÜ				
	1. BAS.	2. BAS.	3. BAS.	4. BAS.
SICAKLIK (°C)	25	37	85	4
SÜRE (DAK.)	10	120	5	∞

3.4. Elde Edilen cDNA'nın PCR ile Çoğaltılarak Agaroz Jel Elektrofozi

Yapılması

Elde edilen cDNA'nın verimliliğini ölçmek amaçlı çalıştığı bilinen ABL primerler tarafından belirtilen protokol doğrultusunda Thermo Scientific™ Taq DNA Polymerase, recombinant (EP0402) kiti kullanılarak PCR gerçekleştirilmiş, agaroz jelde elektrofozi yapılmış, spesifik band eldesi sağlanmıştır. Kullanılan PCR koşulları ve amplifikasyon protokolü tablo 3.5'te sunulmuştur.

Tablo 3.4. PCR reaksiyon koşulları

	1X
BUFFER (10X)	2,50
MgCl (25 mM)	2,20
dNTP (2 mM)	2,50
R Primer (10 mM)	0,60
F Primer (10 mM)	0,60
Taq DNA Polymerase (5 u/µl)	0,20
dH ₂ O	15,40
DNA (62,5 ng/µl)	1,00
Toplam Reaksiyon Hacmi	25,00

Tablo 3.5. PCR Amplikasyon Basamakları

	1. BASAMAK	2. BASAMAK	3. BASAMAK	4. BASAMAK	5. BASAMAK	6. BASAMAK
SICAKLIK (°C)	94	94	53	72	72	4
SÜRE (DAK.)	5	1	2	0,5	7	∞
TEKRAR	1		35		1	

3.5. Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Araştırılması planlanan sirkadiyen ritim genlerinden, *CLOCK*, *BMALI*, *PER1*, *PER2*, *CRY1* ve *CRY2* gen ifadeleri düzeylerinin ölçülmesi için Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR cihazı ve BrightGreen 2X qPCR MasterMix-ROX (MasterMix-R) kiti tablo 3.6 ve tablo 3.7’de belirtilen protokol doğrultusunda kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plate aynı hastanın tümör ve tümör dokusuna bitişik normal pankreas dokusundan elde edilen cDNA’ları içeren mikslere yerleştirilmiştir. Her hastanın tümör ve normal dokusu için üç tekrar gerçekleştirilmiştir. Analizi yapılan her gen için içerisinde cDNA bulunmayan negatif kontroller plate yüklenmiştir. Yapılan analizlerde housekeeping gene olan GAPDH geni kontrol gen olarak kullanılmıştır. Genler için kullanılan genlerin primer dizileri Tablo 3-8 de verilmiştir.

Tablo 3.6. qRT-PCR’in Reaksiyon Koşulları

BrightGreen 2X qPCR Master Mix	5 µl
R primer (10 mM)	0,3 µl
F primer (10 mM)	0,3 µl
Nuclease-free H2O	1 µl
DNA (100 ng/µl)	3,4 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µl

Tablo 3.7. qRT-PCR amplikasyon basamakları

	1. BASAMAK	2. BASAMAK	3. BASAMAK	4. BASAMAK	Melt Curve	
	1. BASAMAK	2. BASAMAK	3. BASAMAK	4. BASAMAK	5. BASAMAK	6. BASAMAK
SICAKLIK (°C)	95	95	60	95	40	95
SÜRE (DAK.)	10	0,25	1	0,25	1	0,25
TEKRAR	1	40		1	Sıcaklığı 40 °C’den başlayarak 95 °C’ye kadar her döngüde 0,3 °C artır.	

Tablo 3.8. Genlerin primer dizleri

GEN	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>BMAL1</i>	CAGGAAAAATAGGCCGAATG	GCGATGACCCTCTTATCCTG
<i>CLOCK</i>	GAGAGCGCGAAGGAAATCT	AGCAGCTTTGCAGGAACAA
<i>PER1</i>	GGACACTCCTGCGACCAG	GGGAGTGAGGTGGAAGATCTAA
<i>PER2</i>	GACTGCAAACCTGGCACTTC	GTGTCTGAGGGTTCATCACG
<i>CRY1</i>	CATCCTGGACCCCTGGTT	CAAGACACTGAAGCAAAAATCG
<i>CRY2</i>	GAGCAAGGATGCCTGAGACT	CGGTGATCAGCTTCTCTGC
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC

3.6. $2^{-\Delta\Delta CT}$ Metodu Kullanılarak qRT-PCR Ürünlerinin Hesaplanması

Gerçekleştirilen qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerlerinden altta belirtilen formüller ile tümör ve normal dokudaki *BMAL*, *CLOCK*, *PER1*, *PER2*, *CRY1*, *CRY2* genleri için ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır.

$$\Delta Ct = Ct (\text{ilgilenilen gen}) - Ct (\text{housekeeping gene})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tümör dokusu}) - \Delta Ct (\text{normal doku})$$

Gen ekspresyonunun miktar tayini $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Gen ekspresyonunun göreceli kat değişimi bir kalibratör ile deney örneğinin karşılaştırılarak kendi içerisinde normalleştirmesini baz almaktadır. Bu gen ekspresyon miktar tayini altta belirtilen eşitlik ile hesaplanır.

$$\text{Hedef gen ekspresyon seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Gerçekleştirilen deneylerin sonucunda elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri tablo 3.9'da verilmiştir. Bu değerler baz alınarak PASW Statistics 18 programı kullanılarak Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulanmıştır. Dokular arasında anlamlı fark için $P < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 3.9. Deneylerin sonucunda elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları

HASTA NO	NORMAL DOKU						TÜMÖR DOKU					
	BMAL-N	CLOCK-N	PER1-N	PER2-N	CRY1-N	CRY2-N	BMAL-T	CLOCK-T	PER1-T	PER2-T	CRY1-T	CRY2-T
1	1,239708	1,388313	0,530957	1,972465	1,753211	4,06522	1,693491	0,436282	3,024437	40,22443	1,172835	0,467596
	0,48971	0,084397	1,061914	0,312083	1,257013	0,508152	1,79005	0,878633	11,52477	17,38776	3,20428	0,66128
	1,647182	8,534658	1,773583	1,624505	0,45376	0,484085	1,310393	0,374577	0,146266	11,3924	5,578975	0,621288
2	0,271684	0,127922	0,123564	0,190782	0,040479	0,90125	0,779165	20,72548	7,691864	8,693879	0,604299	1,515717
	0,806642	4,009253	4,57361	0,939523	2,400497	0,094732	4,823231	11,82144	6,932296	2,969047	0,600124	9,513657
	4,563055	1,94981	1,76949	5,578975	10,29116	11,71269	7,94474	46,31262	2,757447	22,16175	9,803748	19,69831
3	0,609909	1,146047	0,118531	1,670176	0,293887	0,286512	1,440597	1,401204	0,028822	0,291183	2,224272	0,443396
	1,848899	1,114709	4,800995	0,271684	2,400497	0,343092	2,8219	1,654811	0,013261	0,058315	1,183724	1,047294
	0,886791	0,782773	1,757267	2,20381	1,417485	10,17295	3,498331	1,620756	2,996614	0,965936	1,477679	26,29409
4	1,094294	0,882703	1,114709	0,670511	0,437291	0,114229	0,309927	0,532185	3,571838	1,94981	0,065004	0,060371
	0,417544	0,598739	1,677912	0,439317	1,219819	1,624505	2,17347	0,578344	0,095833	1,233992	0,644685	0,078021
	2,188587	1,892115	0,53465	3,394816	1,874709	5,388934	1,301342	0,384219	0,157854	0,749154	1,450617	0,037681
5	0,215138	0,3423	0,461158	0,558644	0,819794	0,614152	0,359318	0,328356	0,347078	0,61132	0,395934	1,084227
	3,059579	2,178497	1,551145	1,658639	0,797377	1,24545	0,587774	0,289841	0,07196	0,366021	0,187288	0,212667
	1,519223	1,341022	1,39797	1,079228	1,52979	1,307369	0,675175	1,066832	4,542018	0,406126	2,224747	2,276262
6	0,156764	0,327598	0,427304	0,302149	0,742262	0,029839	0,131822	1,765406	0,775572	1,467472	3,031433	0,076063
	0,609909	1,729074	1,52979	1,745129	1,028114	4,179509	0,083427	1,958841	0,020665	0,587774	0,503478	3,638474
	10,45895	1,765406	1,52979	1,896492	1,310393	8,018505	0,322343	10,55606	0,713672	4,800995	22,00867	0,005731
7	0,339151	0,653685	1,42405	1,140764	0,526072	0,92445	0,125869	0,37285	0,297302	0,408951	0,702809	0,076062
	0,25	0,89296	1,231144	1,117287	0,897095	1,04006	0,108819	0,676737	0,228458	0,641713	1,639588	0,338368
	11,79415	1,713168	0,570382	0,784584	2,118926	1,04006	0,211686	0,905425	0,243164	0,547147	4,037139	80,82147
8	1,189207	0,95705	2,789487	0,802923	0,655197	0,621288	0,043889	0,788218	0,334482	0,287839	0,267943	0,445449
	1,079228	0,943874	1,319508	0,511687	1,292353	1,594753	0,143587	1,33484	0,50698	0,915945	1,013959	0,718636
	0,779165	1,107009	0,271684	2,434007	1,180993	1,009285	0,312083	1,823445	0,005719	17,42798	0,356013	0,412748
9	0,530957	0,690956	2,639016	2,776627	0,177186	1,404445	0,149339	0,05581	0,277392	0,670511	0,051237	0,081334
	2,123828	0,491978	0,624165	0,328356	2,608704	0,926588	0,156764	0,054284	0,301452	0,335256	0,006186	0,102238
	0,886791	2,941734	0,607097	1,096825	2,163449	0,768438	1,372367	0,08637	0,76313	1,709214	0,935191	0,220676
10	0,890899	0,988514	1,39797	1,081725	0,353553	0,621288	0,529732	5,669939	42,32192	0,508152	3,66604	3,189507
	1,551145	0,780967	0,754364	1,217004	0,15283	1,191958	0,504642	8,074278	25,69353	0,098984	1,815038	0,770215
	0,723635	1,295342	0,948246	0,759611	18,50701	1,35035	1,030492	1,883392	31,85247	0,344681	2,620787	2,7007
11	4,169863	0,547147	1,117287	1	0,7457	0,733736	25,99208	1,274561	11,79415	26,53823	48,05673	1,94981
	1,647182	2,907945	1,310393	0,570382	1,848899	0,131518	3,20428	2,566852	1,866066	7,012846	10,17295	0,522439
	0,145592	0,628507	0,68302	1,753211	0,725309	10,36274	0,846745	6,634556	3,97237	5,205367	89,05759	1,977028
12	1,03766	0,886791	0,051119	0,015128	0,840896	0,946058	0,254076	0,187722	1,827663	0,049836	0,01418	0,025916
	0,819794	0,886791	5,775717	11,02979	1,101905	0,882703	0,243726	0,097847	2,12874	0,138057	0,586417	0,303549
	1,175548	1,271619	3,386981	5,993228	1,079228	1,197479	4,637455	1,749165	18,76536	19,33755	7,361501	6,821079
13	0,607097	1,32256	0,008412	0,97716	1,304352	0,059816	5,169411	2,572789	10,82779	0,13742	0,257623	1,81085
	1,028114	2,163449	7,344512	0,378055	0,595979	2,372925	3,506423	8,359017	7,498836	1,107009	0,698985	5,92439
	1,60214	0,349492	16,18591	2,706947	1,286395	7,045327	0,460094	5,438969	6,900336	0,280616	0,347078	4,16024
14	1,79005	1,995384	5,630774	0,331405	1,670176	1,225468	2,265768	3,152872	0,366868	0,52003	9,317869	1,286395
	0,528509	0,983957	3,981559	5,157481	0,466516	0,359318	1,840375	0,844791	0,191224	1,632029	1,265757	1,39797
	1,057018	0,509328	0,044605	0,585064	1,283426	2,271009	2,549121	0,220166	0,337587	0,66742	1,815038	1,388313
15	0,233258	0,166086	0,023628	1,70527	1,189207	0,752623	0,128514	7,568461	0,298679	7,889862	0,381565	2,928171
	1,086735	2,770219	7,094331	5,169411	1,094294	1,918528	0,207919	2,989698	0,036314	0,287175	1,899045	1,301342
	3,944931	2,17347	5,965598	0,11344	0,768438	0,692555	5,735821	11,87619	0,071133	19,29293	3,271608	7,412704
16	0,911722	1,025741	1,639588	4,112455	0,959264	0,579682	1,061914	0,443396	6,932296	0,346277	0,184284	6,468061
	1,677912	0,569066	0,808508	0,466516	1,681793	0,770215	1,761332	0,394109	0,032427	0,234881	0,178006	1,175548
	0,653685	1,713168	0,754364	0,521233	0,619854	2,239743	1,861759	2,260539	0,055681	0,193446	0,072796	0,854607
17	1,420764	0,31864	0,733736	0,15932	0,443396	0,267943	2,037312	0,03082	0,197967	0,03901	0,004765	0,022251
	0,622725	2,027919	1,662476	0,301452	1,211393	0,659754	1,004632	0,15932	0,387786	0,095391	0,0255	0,033032
	1,130269	1,547565	0,819794	20,82147	1,861759	5,656854	0,990801	0,151774	0,579682	0,236514	0,027142	0,120742
18	1,197479	0,041521	1,089249	2,297397	1,140764	0,207809	0,189465	1,231144	0,587774	1,414214	0,655197	0,177186
	0,790041	4,40762	0,780967	0,846745	0,376312	2,133664	0,106579	1,205808	0,328356	2,42839	0,406126	0,451668
	1,057018	5,464161	1,175548	0,514057	2,329467	2,255322	0,594604	2,12874	0,470848	1,505247	0,426317	0,283876
19	1,197479	0,272312	1,587401	1,274561	2,514027	1,427344	0,0819	0,014115	0,051001	0,25	0,01176	0,252321
	2,17347	0,308498	0,827406	1,042466	1,22264	1,388313	0,255253	0,071463	0,062356	0,521233	0,055169	1,191958
	0,384219	11,90366	0,761368	0,752623	0,325335	0,504642	0,214641	0,091083	0,08518	0,752623	0,032804	0,890899
20	0,607097	0,217135	1,257013	0,385108	2,302711	0,582367	4,377175	0,97041	1,347234	0,515246	0,276114	1,853176
	3,386981	0,937354	2,281527	2,417194	0,591862	1,60214	2,602684	0,557354	1,042466	0,474123	6,119159	2,789487
	0,486327	4,913213	0,348686	1,074253	0,733736	1,071773	8,75435	9,296365	3,482202	0,03357	62,39391	7,464264
21	1,848899	2,422785	10,753	0,195242	0,461158	2,224272	1,151424	0,284533	4,397448	0,000578	0,269708	0,359318
	0,549681	2,490899	0,08697	3,324952	0,909618	0,791869	1,430646	0,166855	14,58756	0,139017	1,217004	0,56383
	0,983957	0,165702	1,0693	1,54043	2,383916	0,567752	0,66742	0,095833	1,677912	0,131518	2,537369	0,583714
22	0,431271	0,918064	0,66128	1,096825	0,835088	1,81085	0,695762	0,700602	0,791869	0,56383	1,101905	0,644685
	1,178267	0,498846	0,860551	1,745129	0,76313	0,309212	0,300756	0,538369	1,477679	0,941696	1,132884	0,911722
	1,967913	2,183537	1,757267	0,522439	1,569168	1,785919	0,905425	0,911722	1,572798	0,308498	1,905276	0,844791

4. BULGULAR

Elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin PASW Statistics 18 programında normal dağılım analizi yapıldı $p>0,05$ olası durumunda normal dağılım (parametrik) gösterdiği kabul edildi. Yapılan analiz sonucunda bütün genlerde $p<0,05$ değerine ulaşıldığı (şekil 4-1) için normal olmayan dağılım gösterdiği sonucuna varıldı. Normal dağılım göstermeyen bağımlı gruplarda uygulanması gereken Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulandı. Uygulanan test sonucunda $p<0,05$ olması durumunda tümör dokusunun gen ekspresyon seviyesindeki değişim anlamlı kabul edildi. Fakat yapılan istatistik analiz sonucunda bütün genlerde $p>0,05$ değerine (şekil 4-2) ulaşılmıştır. Tümör ve normal doku arasında ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir. Ayrıca incelenen her gen için box-plot grafikleri de hazırlandı (şekil 4.3., şekil 4.4., şekil 4.5., şekil 4.6., şekil 4.7., şekil 4.8.). Ek olarak, her olguda gen ekspresyon seviyelerinin göreceli değişimleri de sunuldu (şekil 4.9., şekil 4.10., şekil 4.11., şekil 4.12., şekil 4.13., şekil 4.14.).

Tests of Normality

DOKU TİPİ		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
BMAL	NORMAL	,304	22	,000	,606	22	,000
	TÜMÖR	,221	22	,006	,727	22	,000
CRY1	NORMAL	,418	22	,000	,437	22	,000
	TÜMÖR	,392	22	,000	,459	22	,000
CRY	NORMAL	,284	22	,000	,746	22	,000
	TÜMÖR	,322	22	,000	,556	22	,000
CLOCK	NORMAL	,297	22	,000	,703	22	,000
	TÜMÖR	,296	22	,000	,521	22	,000
PER2	NORMAL	,317	22	,000	,550	22	,000
	TÜMÖR	,321	22	,000	,659	22	,000
PER1	NORMAL	,308	22	,000	,643	22	,000
	TÜMÖR	,297	22	,000	,529	22	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Şekil 4.1. Normal Dağılım Analizi Sonuçları

Test Statistics^c

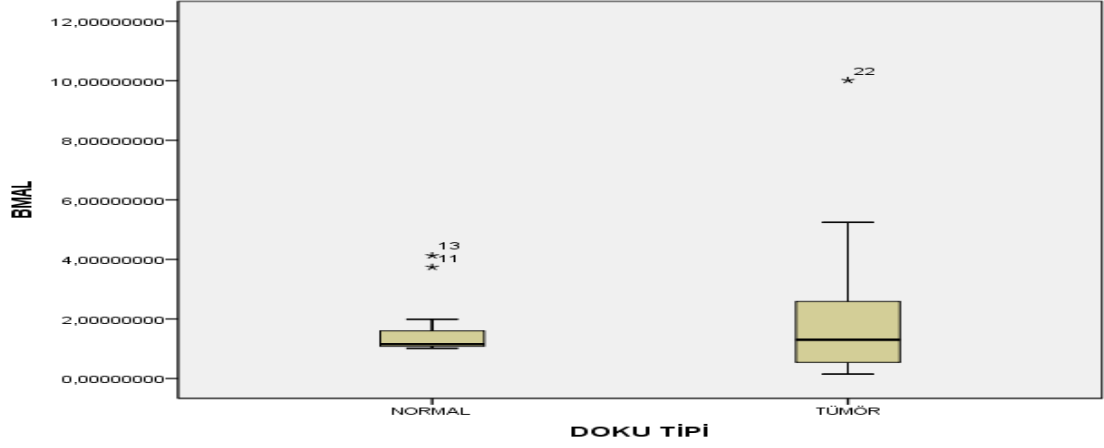
	BMAL-T - BMAL-N	CLOCK-T - CLOCK-N	PER1-T - PER1-N	PER2-T - PER2-N	CRY1-T - CRY1-N	CRY2-T - CRY2-N
Z	-,629 ^a	-,616 ^a	-,067 ^b	-,219 ^b	-,144 ^a	-,080 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,529	,538	,947	,827	,886	,936

a. Based on negative ranks.

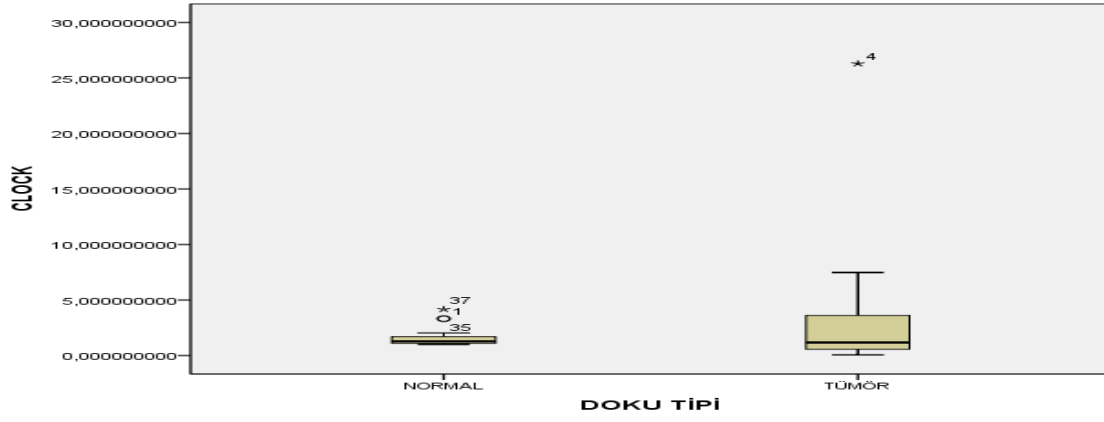
b. Based on positive ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

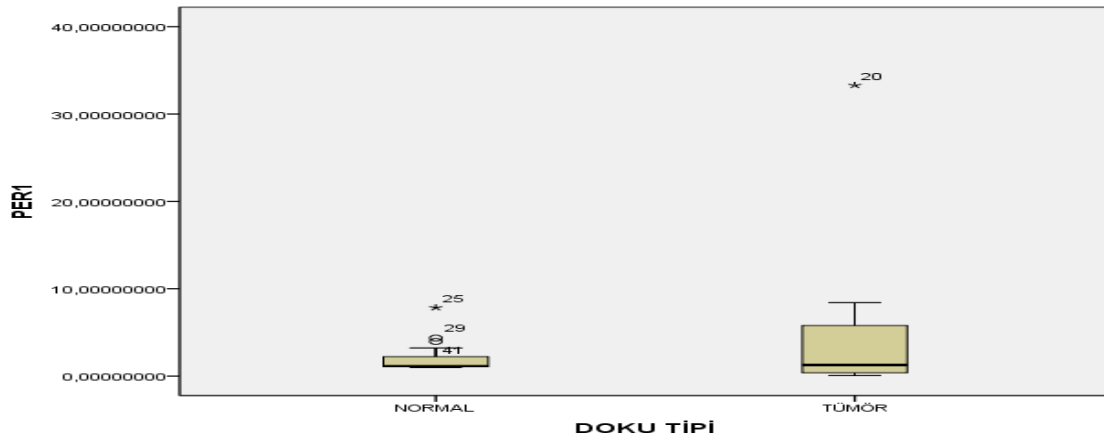
Şekil 4.2. Wilcoxon İşaretli Sıralar Analizi Sonuçları



Şekil 4.3. BMAL1 Geninin Boxplot Grafiği



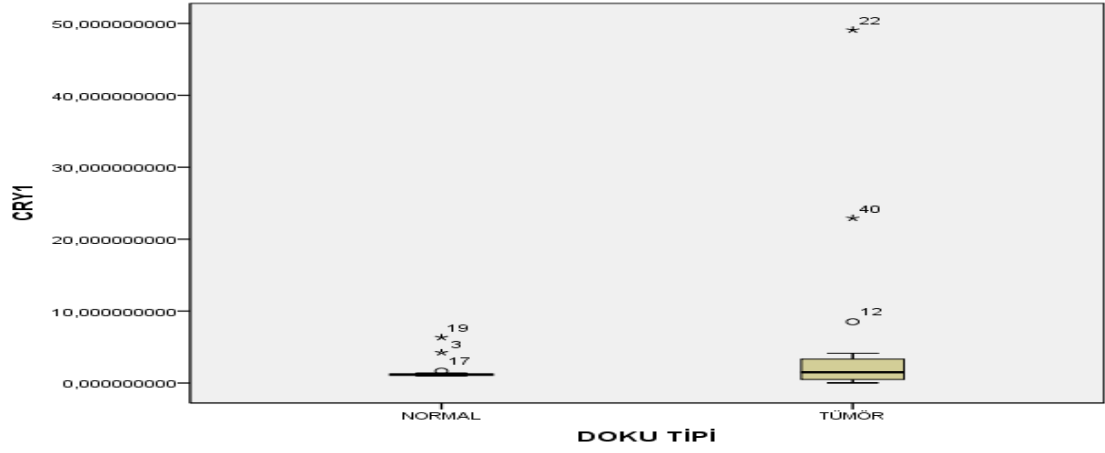
Şekil 4.4. CLOCK Geninin Boxplot Grafiği



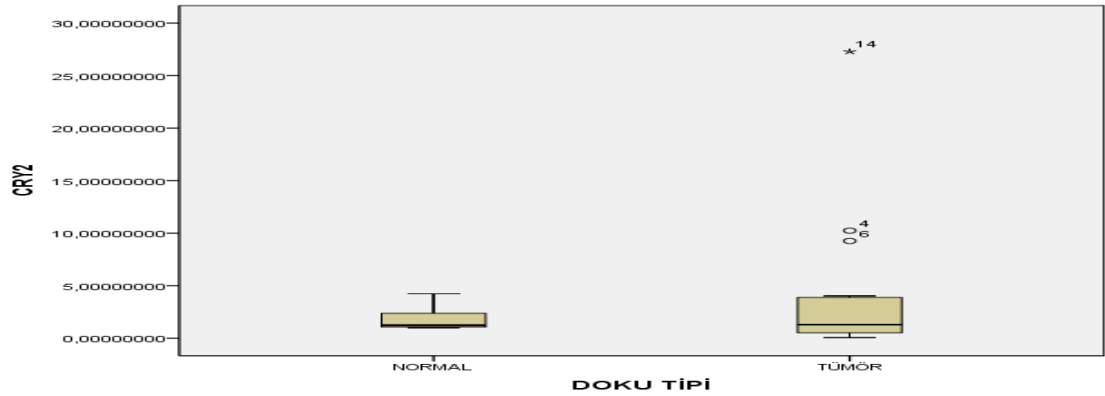
Şekil 4-.5. PER1 Geninin Boxplot Grafiği



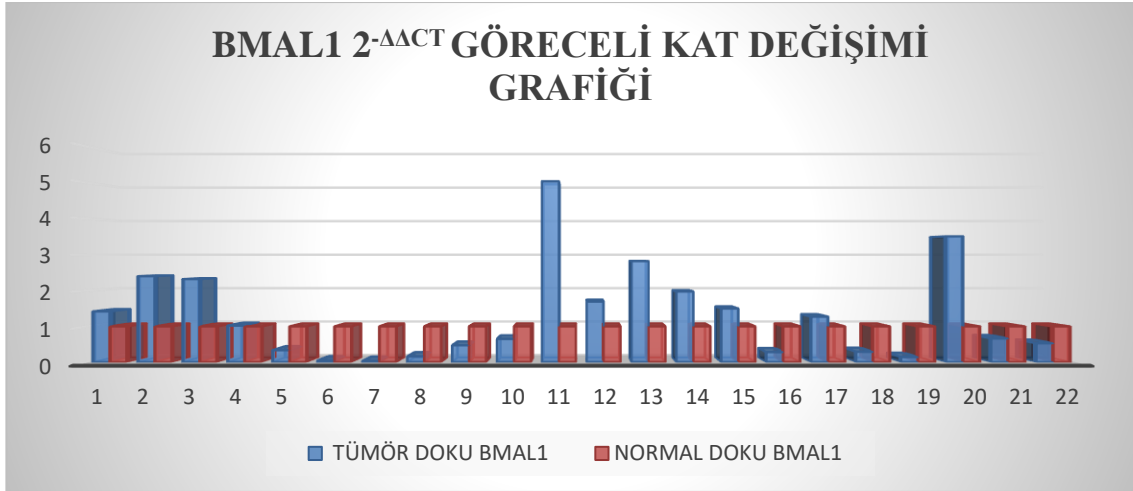
Şekil 4.6. PER2 Geninin Boxplot Grafiği



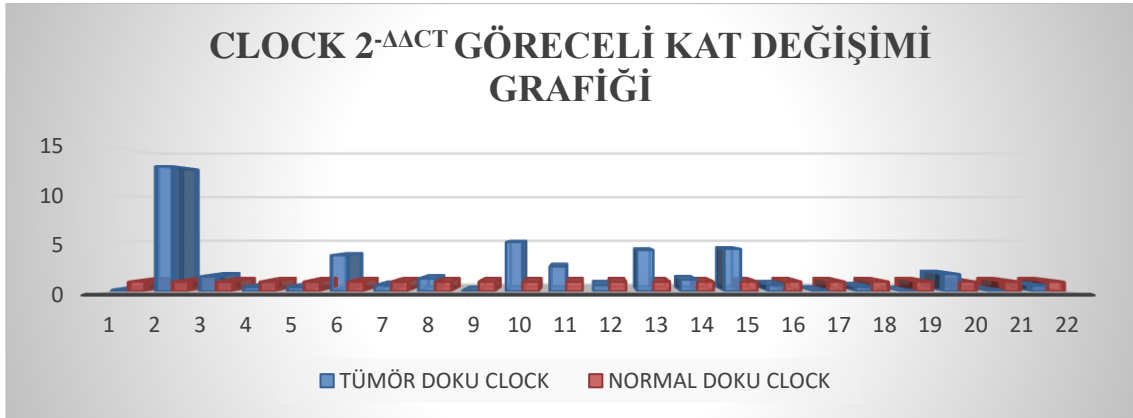
Şekil 4.7. CRY1 Geninin Boxplot Grafiği



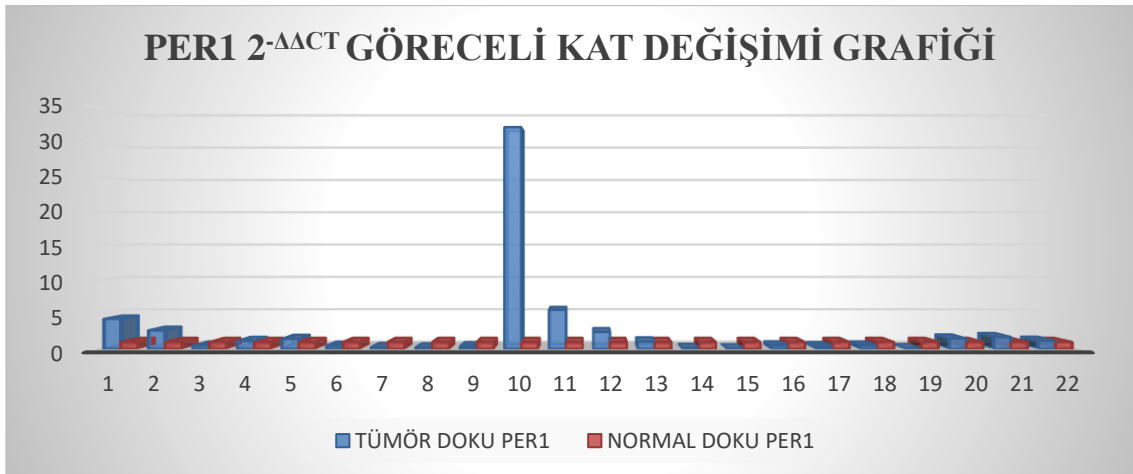
Şekil 4.8. CRY2 Geninin Boxplot Grafiği



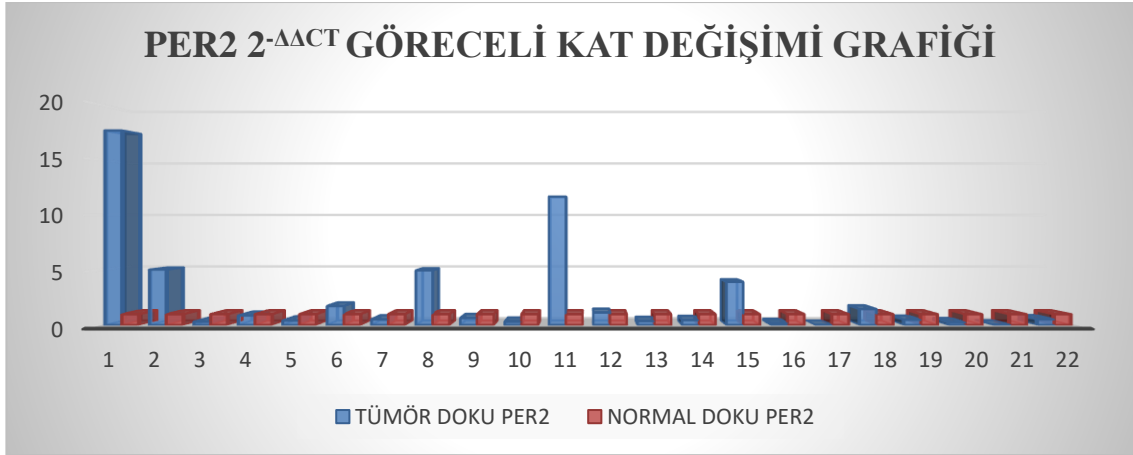
Şekil 4.9. BMAL1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği



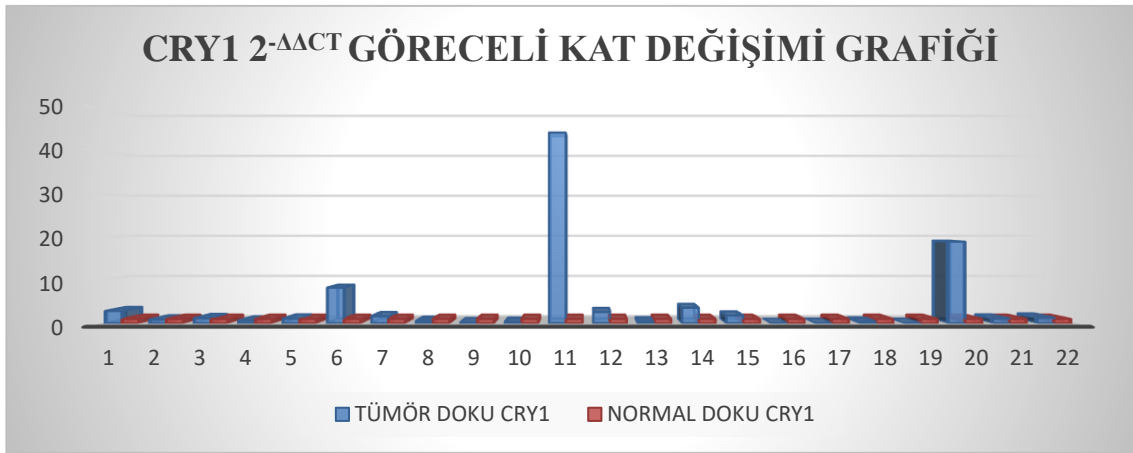
Şekil 4.10. CLOCK $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği



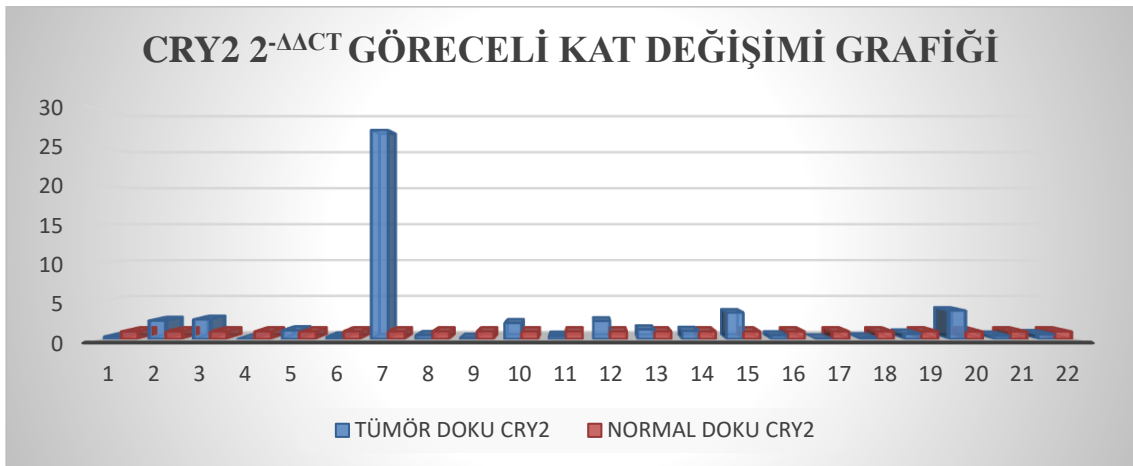
Şekil 4.11. PER1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafiği



Şekil 4.12. PER2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafığı



Şekil 4.13. CRY1 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafığı



Şekil 4.14. CRY2 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Göreceli Kat Değişimi Grafığı

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri dünyada en ölümcül kanserlerden birisi olup 5 yıllık sağ kalım oranı %7'dir. Tanıda genellikle geç kalınması ve tedavisinin zor olması, kötü prognoz göstermesi bu kanser türünde biyolojik belirteçlerin bulunmasını daha da önemli kılmaktadır. Sirkadiyen ritmin hücrenin önemli mekanizmalarını kontrolü altında tutuyor olması moleküler mekanizmanın anlaşılmasını zorlaştırdığı gibi önem derecesini de artırmıştır. Son zamanlarda kanserle alakalı sirkadiyen ritim çalışmaları hız kazanmış, sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların bir "biyo" belirteç olabileceği düşünülmüştür. Bilim insanları bu doğrultuda birçok klinik araştırmalar gerçekleştirmişler ve bulunan sonuçlarda farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Jiang ve arkadaşları pankreas kanseri tanısı almış 45 hastanın tümör dokusunu, tümör dokusuna bitişik normal dokunun sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırmış, tümör dokusunda *BMAL1* genin ekspresyon seviyesinin düşük olduğu ve hastaların klinikopatolojik özellikleriyle yakından ilişkili olduğu bilgisine ulaşmışlardır (Jiang ve ark., 2016).

Relles ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise Pankreatik Duktal Adenokarsinoma (PDA) tanısı almış 65 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada, 65 olgunun tümör dokusu ile tümör dokusuna bitişik normal pankreas dokusu ve iyi huylu pankreas dokularının sirkadiyen ritim genleri ve sirkadiyen ritim kontrollü genlerin ekspresyon seviyelerini karşılaştırmış tümör dokusunda *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY2*, *Tipin* ve *CKIε* genlerinin ekspresyonlarının düşük çıktığı gösterilmiştir. Bu verilerin klinikopatolojik açıdan bir anlam belirtmediği vurgulanmıştır (Relles ve ark., 2013).

Bu iki çalışmanın sonuçları birbirinden farklı olmasına rağmen sirkadiyen ritim genlerinin genel olarak tümör dokusunda düşük ekspresyon gösterdiği sonucuna varılabilir.

Jiang ve arkadaşları pankreas kanseri tümör dokusunda *BMAL1* geninin ekspresyon seviyesinin düşük olduğu bilgisine ulaşınca bu bilginin kontrolünü sağlamak ve arkasındaki moleküler mekanizmayı bulmak amaçlı hücre kültürü deneyi kurmuşlardır. Yaptıkları deneylerin sonucunda *BMAL1* geninin aşırı ekspre olduğu hücre grubunda

hücre proliferasyonunu ve istilasını önemli ölçüde azalttığını bunu hücre döngüsü kontrol noktasında G2 / M geçişini durdurarak yaptığını saptamışlardır. *BMAL1* geninin susturulduğu hücre hattında deneyler ile *BMAL1*'in sessizleştirilmesinin pankreas kanseri hücrelerinin büyümesine katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu sonucun altında yatan mekanizmanın ise. *BMAL1*'in *p53* geninin transkripsiyonunu sağlaması olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Jiang ve ark., 2016).

Oda ve arkadaşlarının yapmış olduğu hücre kültürü deneyinde, insan *PER2* geninin bir homologu olan fare *Per2* geni rekombinat adenovirüs vektörü yardımı ile hücre kültüründeki hücrelere aktararak ekspresyonunun artması sağlanmıştır. *PER2* geninin ekspresyon artışının sonucunda hücre döngüsünü G2-/M kontrol noktasında baskılayarak ilerlemeyi durdurduğu, hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği saptanmıştır. (Oda ve ark., 2009).

Bu iki hücre kültürü deneyleri karşılaştırıldığında deneylerde farklı sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyelerinin artırılmasına rağmen her iki deneyde de G2 / M kontrol noktasında baskılayarak ilerlemeyi durdurduğu, hücre proliferasyonu ve indüklenen apoptotik hücre ölümünü azalttığı belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde her deneyin farklı veriler ve farklı sonuçlar içermesine rağmen ortak kanı sirkadiyen ritim genlerinin hücre için çok önemli mekanizmaları kontrol ettiği ve bu genlerin birbirleriyle kompakt çalıştığı sonucudur. Bir genin ifadesinde meydana gelen azalış veya artış diğer genlerde de etki yaratmakta, hücre mekanizmaları etkileyerek kelebek etkisi oluşturmaktadır.

Yapılan bütün çalışmaların farklı sonuçlar vermesinin en temel gerekçelerinden bir tümör mikro çevresinin çok farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tümör dokusuna bitişik normal doku bir tümör dokusu olmadığı gibi tam anlamıyla bir normal doku da olmayabilir. Her ne kadar bu hücreler patolojik açıdan "normal" olarak değerlendirilmiş olsalar da, tümör hücrelerinden gelen moleküler sinyallere olası maruziyet sebebi ile bu hücrelerde bazı moleküler değişimler olmuş olabilir. Tümör mikro çevresine maruziyeti fazla olması moleküler düzeyde normal hücre özelliğinden uzaklaşılmasına sebebiyet verebilir.

Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada Pankreatik Duktal Adenokarsinom tanısı almış 22 hastanın tümör ve tümör dokusuna bitişik normal dokusunun sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen 22 hastaya ait veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. 22 olgunun tümör ve tümör dokusuna bitişik normal dokusunun genlerin ekspresyon seviyelerindeki ortalama artış veya azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak bir anlam ifade etmese de Boxplot ve göreceli kat değişimi grafikleri incelendiğinde özellikle *BMAL1* geninin ekspresyon seviyelerinde farklılıkların çok fazla olduğu göze çarparken, *CLOCK*, *PER1*, *PER2*, *CRY1*, *CRY2* genlerinin ekspresyonları bazı hastalarda artış gösterirken diğer hastalarda azalış göstermektedir. Tek tek genler incelendiğinde *BMAL1* geninde 11 hastada ekspresyon artarken, 11 hastada ise azalmıştır (şekil 4-9). *CLOCK* geninin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde 9 hastada artış görülürken, 13 hastada azalış görülmektedir (şekil 4-10). *PER1* geninin ekspresyon seviyelerinde 7 hastada artış görülürken, 15 hastada azalış görülmektedir (şekil 4-11). *PER2* geninin ifadesi 7 hastada artış göstermiş, 15 hastada azalış göstermiştir (şekil 4-12). *CRY1* geninin ifadesinde 7 hastada artış göstermiş, 15 hastada azalış göstermiştir (şekil 4-13). *CRY2* geninin ifadesi ise 7 hastada artış, 15 hastada azalış göstermiştir (şekil 4-13). 1, 2, 11, 12, 13, 15, 20 numaraları hastalarda bütün genlerde artış gözlemlenmiştir. Bu durum sirkadiyen ritmin her bireyde farklı olabileceği ile açıklanabilir. Her bireyin farklı yaşam tarzları, farklı uyku-uyanıklık döngüleri, kısa dalga boylu ışığa maruz kalma süreleri, farklı tümör heterojenitesi, gibi farklılıklardan kaynaklı olabilir. Aynı zamanda bu hastaların tümör boyutları, patolojik evreleri paralellikler gözlemlenmiştir. Dokuları kullanılan hastaların operasyon saatleri ve dokunun fikse edildiği saat bilinmemekle birlikte her hastanın kendi içerisinde normal ve tümör dokusu karşılaştırıldığında hastalar arasındaki bu farkın deney sonuçlarını etkileyebileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Yapılan deneylerde tümör ve normal doku arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamasının altında yatan olası sebepler arasında deneysel düzeneğimizde kullandığımız tekrar sayısının üç ile sınırlı olması, hasta sayısının az olması (Jiang ve ark., 2016), hastaların tümör dokuları arasındaki farklılıklar (Relles ve ark., 2013), parafine gömülü dokularda tümör ve tümör dokusuna bitişik normal dokuların boyutsal farklılıkları, her tümör dokusunun kendi içerisindeki heterojenitesi ve farklı çevresel

etkenler gibi faktörler bulunmaktadır. Ek olarak mRNA düzeyinde saptamış olduğumuz bulguların protein düzeyinde de sonraki çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır. Sonuç olarak pankreas tümörlerinin tümörögenezinde sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyonlarının normal dokuya göre farklılıklar gösterdiğini saptamış bulunmaktayız. Bu farklılıkların hücresel mekanizmasının tamamen aydınlatılması için daha sonra gerçekleştirilecek olan çalışmaların pankreas kanserinin tedavisi açısından kritik bir önem taşıdığı görüşündeyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sirkadiyen ritim canlı organizmalarda hayati fonksiyonların kontrolünü sağlayan en önemli mekanizmalardan bir tanesidir. Özellikle memeli hücresinde genlerin %10'undan fazlasını kontrolü altında tutması ve hücre döngüsü, apoptoz, DNA hasar tamiri gibi önemli mekanizmaları kontrol ediyor olması kanser başta olmak üzere birçok hastalığın anlaşılmasında, tedavi ve tanısında önemli yer tutmaktadır. Sirkadiyen ritim genlerinin hayati mekanizmaları kontrol ettiği ve bu mekanizmaların kanserle doğrudan bağlantılı olduğu su götürmez bir gerçektir. Önlenemeyen hastalıkların başını çeken kanserin anlaşılması, tedavi ve tanısı için sirkadiyen ritim odaklı çalışmaların artırılması gerekmektedir. Bu çalışmalarda tümör mikro çevresi, hücreler arası iletişim, insan dokusu, epigenetik etki, beslenme, ilaç alma zamanı ve direnci gibi parametreler bir bütün halinde düşünülerek yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Kyriacou, C. P. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*. 2002; 12 (7): 540-550.
- Cadenas, C., van de Sandt, L., Edlund, K., Lohr, M., Hellwig, B., Marchan, R., Hengstler, J. G. Loss of circadian clock gene expression is associated with tumor progression in breast cancer. *Cell Cycle*. 2014; 13 (20): 3282-3291.
- Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., & Leal, J. F. The pten/pi3k/akt signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current cancer drug targets*. 2008; 8 (3): 187-198.
- Costa, G., Haus, E., & Stevens, R. Shift work and cancer—considerations on rationale, mechanisms, and epidemiology. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 2010: 163-179.
- Davis, S., Mirick, D. K., & Stevens, R. G. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *Journal of the national cancer institute*. 2001; 93 (20): 1557-1562.
- de Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000; 21 (3): 453-460.
- Delpu, Y., Hanoun, N., Lulka, H., Sicard, F., Selves, J., Buscail, L., . . . Cordelier, P. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Current genomics*. 2011; 12 (1): 15.
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology*. 2010; 72: 517-549.
- Duffield, G. E., Best, J. D., Meurers, B. H., Bittner, A., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Current Biology*. 2002; 12 (7): 551-557.
- Feychting, M., Österlund, B., & Ahlbom, A. Reduced cancer incidence among the blind. *Epidemiology*. 1998: 490-494.
- Fukushima, N., & Fukayama, M. Mucinous cystic neoplasms of the pancreas: Pathology and molecular genetics. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2007; 14 (3): 238-242.
- Gery, S., & Koeffler, H. P. Circadian rhythms and cancer. *Cell cycle*. 2010; 9 (6): 1097-1103.

- Gery, S., Komatsu, N., Baldjyan, L., Yu, A., Koo, D., & Koeffler, H. P. The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Molecular cell*. 2006; 22 (3): 375-382.
- Geyfman, M., & Andersen, B. Clock genes, hair growth and aging. *Aging (Albany NY)*. 2010; 2 (3): 122.
- Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. S., Moskaluk, C. A., Da Costa, L. T., Rozenblum, E., . . . Hruban, R. H. *Dpc4*, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*. 1996; 271 (5247): 350-353.
- Hansen, J. Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology*. 2001; 12 (1): 74-77.
- Hoffman, A. E., Zheng, T., Ba, Y., Stevens, R. G., Yi, C.-H., Leaderer, D., & Zhu, Y. Phenotypic effects of the circadian gene cryptochrome 2 on cancer-related pathways. *BMC cancer*. 2010; 10 (1): 110.
- Hong, S.-M., Park, J. Y., Hruban, R. H., & Goggins, M. Molecular signatures of pancreatic cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011; 135 (6): 716-727.
- Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., . . . Furukawa, T. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *The American journal of surgical pathology*. 2004; 28 (8): 977-987.
- Hsu, C.-M., Lin, S.-F., Lu, C.-T., Lin, P.-M., & Yang, M.-Y. Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*. 2012; 33 (1): 149-155.
- Hunt, T., & Sassone-Corsi, P. Riding tandem: Circadian clocks and the cell cycle. *Cell*. 2007; 129 (3): 461-464.
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Song, J., Parmigiani, G., Yeo, C. J., Hruban, R. H., & Kern, S. E. Missense mutations of *madh4*: Characterization of the mutational hot spot and functional consequences in human tumors. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10 (5): 1597-1604.
- Jiang, W., Zhao, S., Jiang, X., Zhang, E., Hu, G., Hu, B., . . . Lu, Y. The circadian clock gene *bmal1* acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway. *Cancer letters*. 2016; 371 (2): 314-325.
- Kliukiene, J., Tynes, T., & Andersen, A. Risk of breast cancer among norwegian women with visual impairment. *British journal of cancer*. 2001; 84 (3): 397-399.
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics*. 2006; 15 (suppl_2): R271-R277.

Kondratov, R. V., Gorbacheva, V. Y., & Antoch, M. P. The role of mammalian circadian proteins in normal physiology and genotoxic stress responses. *Current topics in developmental biology*. 2007; 78: 173-216.

Kosmahl, M., Pauser, U., Peters, K., Sipos, B., Lüttges, J., Kremer, B., & Klöppel, G. Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: A review of 418 cases and a classification proposal. *Virchows Archiv*. 2004; 445 (2): 168-178.

Kubo, T., Ozasa, K., Mikami, K., Wakai, K., Fujino, Y., Watanabe, Y., . . . Suzuki, K. Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: Findings from the Japan Collaborative Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*. 2006; 164 (6): 549-555.

Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362 (6422): 709-715.

Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2004; 5: 407-441.

Mahlamäki, E. H., Höglund, M., Gorunova, L., Karhu, R., Dawiskiba, S., Andrén-Sandberg, Å., . . . Johansson, B. Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 1997; 20 (4): 383-391.

Maitra, A., Kern, S. E., & Hruban, R. H. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2006; 20 (2): 211-226.

Masri, S., & Sassone-Corsi, P. The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms. *Nature Medicine*. 2018; 24 (12): 1795.

Mazzoccoli, G., Panza, A., Valvano, M., Palumbo, O., Carella, M., Pazienza, V., . . . Andriulli, A. Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients. *Chronobiology International*. 2011; 28 (10): 841-851.

McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., . . . Tafuri, A. Roles of the raf/mek/erk pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2007; 1773 (8): 1263-1284.

Mongrain, V., & Cermakian, N. Clock genes in health and diseases. *Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open)*. 2009; 7 (1).

Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F. X., Lemoine, N. R., . . . Kalthoff, H. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. *Virchows Archiv*. 2001; 439 (6): 798-802.

Neoptolemos, J. P., Urrutia, R., Abbruzzese, J. L., Büchler, M. W., & Rovasio, R. A. Development and structure of the pancreas. *Pancreatic cancer*. 2010; 27-38.

Nirvani, M., Khuu, C., Utheim, T. P., Sand, L. P., & Sehic, A. Circadian clock and oral cancer. *Molecular and clinical oncology*. 2018; 8 (2): 219-226.

Oda, A., Katayose, Y., Yabuuchi, S., Yamamoto, K., Mizuma, M., Shirasou, S., . . . Hayashi, H. Clock gene mouse period2 overexpression inhibits growth of human pancreatic cancer cells and has synergistic effect with cisplatin. *Anticancer research*. 2009; 29 (4): 1201-1209.

Okamura, H., Doi, M., Fustin, J.-M., Yamaguchi, Y., & Matsuo, M. Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Advanced drug delivery reviews*. 2010; 62 (9-10): 876-884.

Orren, D., & Sancar, A. New discoveries in the enzymology of DNA repair. *Cancer Rev*. 1987; 7 (5).

Oshima, T., Takenoshita, S., Akaike, M., Kunisaki, C., Fujii, S., Nozaki, A., . . . Tanaka, K. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer. *Oncology reports*. 2011; 25 (5): 1439-1446.

Özbayer, C., & Değirmenci, İ. Sirkadiyen saat, hücre döngüsü ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*. 2011; 38 (4): 514-518.

Rana, S., & Mahmood, S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *Journal of circadian rhythms*. 2010; 8 (1): 3.

Relles, D., Sendecki, J., Chipitsyna, G., Hyslop, T., Yeo, C. J., & Arafat, H. A. Circadian gene expression and clinicopathologic correlates in pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2013; 17 (3): 443-450.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Ye, R., Chiou, Y.-Y., . . . Ozturk, N. Circadian clock, cancer, and chemotherapy. *Biochemistry*. 2014; 54 (2): 110-123.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Kang, T.-H., Reardon, J. T., Lee, J. H., & Ozturk, N. Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS letters*. 2010; 584 (12): 2618-2625.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*. 2004; 73 (1): 39-85.

Sancar, G., & Brunner, M. Circadian clocks and energy metabolism. *Cellular and molecular life sciences*. 2014; 71 (14): 2667-2680.

- Sasaki, S., Yamamoto, H., Kaneto, H., Ozeki, I., Adachi, Y., Takagi, H., . . . Miyakawa, H. Differential roles of alterations of p53, p16, and smad4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Oncology reports*. 2003; 10 (1): 21-25.
- Sato, F., Nagata, C., Liu, Y., Suzuki, T., Kondo, J., Morohashi, S., . . . Kijima, H. Period1 is an anti-apoptotic factor in human pancreatic and hepatic cancer cells. *Journal of biochemistry*. 2009; 146 (6): 833-838.
- Savvidis, C., & Koutsilieris, M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Molecular medicine*. 2012; 18 (9): 1249-1260.
- Scarpa, A., Capelli, P., Mukai, K., Zamboni, G., Oda, T., Iacono, C., & Hirohashi, S. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *The American journal of pathology*. 1993; 142 (5): 1534.
- Schernhammer, E. S., Laden, F., Speizer, F. E., Willett, W. C., Hunter, D. J., Kawachi, I., . . . Colditz, G. A. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003; 95 (11): 825-828.
- Schibler, U. The daily rhythms of genes, cells and organs. *EMBO reports*. 2005; 6 (S1): S9-S13.
- Schleger, C., Arens, N., Zentgraf, H., Bleyl, U., & Verbeke, C. Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridization (cgh). *The Journal of pathology*. 2000; 191 (1): 27-32.
- Shi, C., Hruban, R. H., & Klein, A. P. Familial pancreatic cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2009; 133 (3): 365-374.
- Singh, D., Upadhyay, G., Srivastava, R. K., & Shankar, S. Recent advances in pancreatic cancer: Biology, treatment, and prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2015; 1856 (1): 13-27.
- Slack, J. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 1995; 121 (6): 1569-1580.
- Son, G. H., Chung, S., & Kim, K. The adrenal peripheral clock: Glucocorticoid and the circadian timing system. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2011; 32 (4): 451-465.
- Şimşek, H. Pankreasın yapısı ve konjenital anomaliler. İç: Gastroenteroloji. Ed: Telatar H, Şimşek H. Ankara: Hekimler Yayın Birliği. 1993: 917-923.
- Tavano, F., Paziienza, V., Fontana, A., Burbaci, F. P., Panebianco, C., Saracino, C., . . . Di Sebastiano, P. Sirt1 and circadian gene expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: Effect of starvation. *Chronobiology international*. 2015; 32 (4): 497-512.
- Ünsal-Kaçmaz, K., Mullen, T. E., Kaufmann, W. K., & Sancar, A. Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25 (8): 3109-3116.

Verkasalo, P., Pukkala, E., Stevens, R., Ojamo, M., & Rudanko, S.-L. Inverse association between breast cancer incidence and degree of visual impairment in Finland. *British journal of cancer*. 1999; 80 (9): 1459.

Viswanathan, A. N., Hankinson, S. E., & Schernhammer, E. S. Night shift work and the risk of endometrial cancer. *Cancer research*. 2007; 67 (21): 10618-10622.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*. 2004; 10 (8): 789.

Walisser, J. A., & Bradfield, C. A. A time to divide: Does the circadian clock control cell cycle? *Developmental cell*. 2006; 10 (5): 539-540.

Weger, M., Diotel, N., Dorsemans, A.-C., Dickmeis, T., & Weger, B. D. Stem cells and the circadian clock. *Developmental biology*. 2017; 431 (2): 111-123.

Xiao, L., Chang, A. K., Zang, M.-X., Bi, H., Li, S., Wang, M., . . . Wu, H. Induction of the clock gene by e2- α signaling promotes the proliferation of breast cancer cells. *PloS one*. 2014; 9 (5): e95878.

Ye, Y., Xiang, Y., Ozguc, F. M., Kim, Y., Liu, C.-J., Park, P. K., . . . Lin, C. The genomic landscape and pharmacogenomic interactions of clock genes in cancer chronotherapy. *Cell systems*. 2018; 6 (3): 314-328. e312.

Zeng, Z.-l., Luo, H.-y., Yang, J., Wu, W.-j., Chen, D.-l., Huang, P., & Xu, R.-h. Overexpression of the circadian clock gene *bmal1* increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2014; 20 (4): 1042-1052.

EKLER

EK-1

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a. **Araştırmanın Adı:** Parafine Gömülü Pankreas Kanseri Doku Örneklerinde Sirkadiyen Ritim Genlerinin Ekspresyonlarının Araştırılması

b. **Araştırmanın İçeriği:**

c. **Araştırmanın Amacı:** Pankreas kanseri hücrelerinde sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülerek, bugüne kadar diğer kanser türleri ile yapılan çalışmalar ve pankreas kanserindeki sirkadiyen gen ekspresyonlarındaki çelişkili ve tutarsız bilgilerin giderilmesi ile birlikte bundan sonraki çalışmalara da bir ön veri oluşturması amaçlanarak bu laboratuvar çalışması planlanmıştır. Bu amaçlar doğrultusunda farklı aşamalardaki pankreas kanser örnekleri ile tümör dışı normal pankreas alanına ait dokusu arasındaki ekspresyon farklılıklarının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bununla birlikte, pankreas kanserinde sirkadiyen ritim moleküllerinin ilişkisi ve hastaların tümör aşamaları ile sirkadiyen genlerinin ekspresyonları arasındaki korelasyon da değerlendirilecektir

d. **Araştırmanın Nedeni:**

() Bilimsel araştırma

(X) Tez çalışması

e. **Araştırmanın Öngörülen Süresi:** Satın alma işlemleri tamamlandıktan sonra 1 yıl.

f. **Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı:** 22 olgu

g. **Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:**

- Parafine gömülü doku örneklerinden RNA izolasyonu

- Total RNA'dan cDNA elde edilmesi
- cDNA'dan ilgili genlerin Real-Time PCR analizi

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Kullanılacak doku örnekleri daha önceden alınarak parafine gömülü dokular olduğundan girişimsel bir işlem yapılmayacağı için herhangi bir risk veya zarar yoktur.

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Pankreas kanserinde sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenerek bundan sonraki tedavilere yönelik yeni yaklaşımların geliştirilebilmesine yarar sağlayacaktır.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Doç. Dr. Esra MANGUOĞLU Telefon: 249 69 77

Adı- Soyadı: Arş. Gör. Uğur KESKİN Telefon: 249 35 63

5. Zararların Karşılanması:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımıntarafından karşılanacağı bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- a. Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

- b. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- c. Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.
- 8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.**

9. Gizlilik:

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....
Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı: Doç. Dr. Esra MANGUOĞLU

İmzası:

Tarih:

Adı- Soyadı: Arş. Gör. Uğur KESKİN

İmzası:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	UĞUR	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KESKİN	Tel no	+90(534)2973664
Doğum tarihi	15.01.1988	e-posta	kanuniugurkeskin@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Orhan Sevinç Lisesi	2005
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği	2017
Lisans	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü	2015
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Tıbbi Genetik Bölümü	2020

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Üretim Müdürü	Hanedan Lokum Baharat Kuruyemiş Gıda San. Tic. Ltd. Şti.	2018 - 2019

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Parafine Gömülü Pankreas Kanseri Doku Örneklerinde Sirkadiyen Ritim Genlerinin Ekspresyonlarının Araştırılması	BAP	2018-2020

Burslar-Ödüller:**Yayınlar ve Bildiriler:**