

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA TFAM
EKSPRESYON DÜZEYİNİN HÜCRE FONKSİYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm.Biol. Ceren NARİN ŞİMŞEK

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA TFAM
EKSPRESYON DÜZEYİNİN HÜCRE FONKSİYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm.Biol. Ceren NARİN ŞİMŞEK

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Füsun ÖZMEN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Neşe ÜNVER**

**ANKARA
2022**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pankreas Kanseri Hücre Hattında TFAM Ekspresyon Düzeyinin Hücre
Fonksiyonları Üzerine Etkisi

Öğrenci: Ceren Narin Şimşek

Danışman: Doç. Dr. Füsun Özmen

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Neşe Ünver

Bu tez çalışması 30/06/2022 tarihinde jürimiz tarafından “Tümör Biyolojisi ve
İmmünolojisi Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Güneş Esendağlı*
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Füsun Özmen*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Z. Ekim Taşkiran*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Güneş Dinç Akbulut*
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Begüm Kocatiürk*
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav
Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun
bulunmuştur.

27 Temmuz 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞCI ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren . . . ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

.../.../2022

Ceren NARİN ŞİMŞEK

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Füsun Özmen ve Dr. Öğr. Üyesi Neşe ÜNVER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ceren NARİN ŞİMŞEK

TEŞEKKÜR

Hayallerime benimle birlikte inanıp birlikte çıktığımız bu yolda, her zaman doğru yolu gösteren, değerli bilgileri ile yolumu aydınlatan, zor zamanlarımda beni bir anne şefkati ile sarıp sarmalayan, her gün yeni bir bilgi ile hayatıma yön veren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Füsün Özmen'e,

Engin bilgileriyle yoluma ışık tutan, çalışmanın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, farklı bakış açısıyla bakarak yol alırken yeni yönler bulmamı sağlayan ve iyi ki eş danışmanım olmuş dediğim değerli Dr. Öğr. Üyesi Neşe Ünver'e

Yüksek lisans eğitimime katkılarından dolayı Prof. Dr. Lale Doğan'a, ve Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya, Doç. Dr. Hande Canpınar'a, Dr. Öğr. Üyesi Begüm Kocatürk'e,

Yüksek lisansa başladığım ilk günden bu yana, yanımda olan, benimle birlikte bu çalışmaya gönül veren, kötü gün dostlarım, ablalarım İlknur Gündüz'e, Melek Günindi Korkut'a ve Işinsu Melis Deniz'e

Bölüme başladığım ilk günden bugüne kendisinden çok şey öğrendiğim Emre Gedik'e, yan yana sıralarda dirsek çürüttüğüm Başak Dalkıran'a, akım sitometri analizleri için değerli vakitlerini benim için ayıran Anıl Işık'a, Ece Tavukçuoğlu'na, Hamdullah Yanık'a, Sibel Gökşen'e, Ali Mert Sencer'e ve Sıla Ulutürk'e ve güler yüzlerini eksik etmeyen Temel Onkoloji Anabilim Dalı personellerine,

Hayattaki en büyük şansım olduğunu düşündüğüm, beni bugünlere getiren, bana inanmaktan asla vazgeçmeyen canım babam Haydar Narin'e, biricik annem Semra Narin'e ve kardeşim Ali Eren Narin'e

Son olarak hayatıma girdiği ilk andan itibaren içimde yeni umutlar filizlendiren, sonsuz sevgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan ve en önemlisi yaptığım işe saygı duyan yol arkadaşım Haydar Şimşek'e

Teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Narin Şimşek, C., Pankreas Kanseri Hücre Hattında TFAM Ekspresyon Düzeyinin Hücre Fonksiyonları Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Pankreas kanseri agresif, kötü prognoz ile seyreden malignitelerdendir. Erken tanısı ve tümöre özgü tedavinin uygulanması pankreas kanseri tümörlerinde oldukça önemlidir. Tanı ve tedavide bu nedenle yeni biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır. Protein kodlamayan RNA'lar olarak da bilinen mikro RNA'lar (miRNA), kanser biyobelirteçleri olarak hedeflenen endojen RNA'lardır. Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör A (TFAM), mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) nükleotitlerinin paketlenmesinde rol alan bağlayıcı şaperondur ve mtDNA replikasyonu ve transkripsiyonu için gereklidir. TFAM geninin birçok tümörde aşırı eksprese edildiği ve onkogen karakter gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, tümör baskılayıcı olarak görev yapan miR-200a-3p ile hedef genlerinden biri olan TFAM arasındaki ilişki gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiş ve TFAM'ın hücre proliferasyonu ve apoptozis üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda, miR-200a-3p gen ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu Panc-1 ve Miapaca-2 pankreas kanseri hücre hatlarında saptandı ve miR-200a-3p gen ekspresyonu mimik miR-200a-3p transfeksiyonu ile arttırıldı. miR-200a-3p gen ekspresyonunun artmasıyla pankreas kanseri hücre hatlarında yüksek düzeyde eksprese edilen TFAM gen ekspresyonunun azaldığı gösterildi. Panc-1 hücre hattında, TFAM'ın azalması ile birlikte hücre canlılığında ve proliferasyonda azalma, geç apoptozis ve hücre nekrozunda ise artış tespit edildi. Sonuç olarak Panc-1 hücre hattında miR-200a-3p gen ekspresyonunun artışı ile hücre canlılığı arasında negatif, geç apoptozis arasında ise pozitif korelasyon olduğu ilk kez bu çalışma ile gösterilmiş oldu. Elde edilen bu bulgular, pankreas kanserinde miR-200a-3p ekspresyonunun mimik veya inhibitör uygulaması sonucu modülasyonu ile hedef genlerinden biri olan ve kötü prognoz ile ilişkili TFAM'ın transkripsiyonel düzeyde düzenlendiğini ve miR-200a-3p'nin bir hedef biyobelirteç olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, mikro RNA, miR-200a-3p, TFAM

Destekleyen kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Proje No: TYL-2021-19185

ABSTRACT

Narin Şimşek, C., The effect of TFAM Expression Levels on Cell Functions in Pancreatic Cancer Cell Line, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Program Master Thesis, Ankara, 2022. Pancreatic cancer is an aggressive malignancy with a poor prognosis. Early diagnosis and application of tumor-specific treatment are very important in pancreatic cancer. Therefore, new biomarkers are needed in the diagnosis and treatment of tumors. Micro RNAs (miRNAs), also known as non-protein-coding RNAs, are endogenous RNAs targeted as cancer biomarkers. miRNAs cause low specificity binding of the target gene to messenger RNAs (mRNA), mRNA degradation and translational inhibition, and play important roles in the control of gene expression. In this study, the relationship between miR-200a-3p, which acts as a tumor suppressor, and one of its target genes, Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM), was examined at the gene expression level. TFAM is considered a binding chaperone in packaging nucleotides of mitochondrial DNA (mtDNA) and is required for mtDNA replication and transcription. It is known that the TFAM gene is overexpressed in many tumors and shows oncogene character. In our study, miR-200a-3p gene expression was increased by mimic transfection in Panc-1 and Miapaca-2 pancreatic cancer cell lines with low miR-200a-3p gene expression levels. It was shown that TFAM gene expression, which is highly expressed in pancreatic cancer cell lines, decreased with the increase of miR-200a-3p gene expression. It was found that there was a negative correlation between increased miR-200a-3p gene expression and cell viability and a positive correlation between late apoptosis. As a result of mimic miR-200a-3p transfection, its proliferation in the Panc-1 cell line was found to be decreased. These findings showed that TFAM, which is one of its target genes and associated with poor prognosis, is regulated at the transcriptional levels by modulation of miR-200a-3p expression in pancreatic cancer as a result of mimic or inhibitor application and miR-200a-3p can be a target biomarker.

Keywords: Pancreatic cancer, micro-RNA, miR-200a-3p, TFAM

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. (SRC Project No:TYL-2021-19185)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pankreas Kanseri	4
2.2. Pankreas Kanseri ve miRNA lar	7
2.2.1. miRNA Biyogenezi	7
2.2.2. miRNA'ların Hücre Proliferasyonu ve Apoptozu Üzerine Etkileri	8
2.3. miR-200a'nın Hedef Genlerinden Olan Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör A (TFAM)	27
2.3.1. Kanserde TFAM'ın Rolü	32
2.3.2. TFAM Ekspresyonunun miR-200a-3p Tarafından Hedeflenmesi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	37
3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	37
3.3. Hücre Hatlarının Çözülmesi	38
3.4. Hücre Pasajı	38
3.5. Mikoplazma Testi	39
3.6. Hücre Sayımı	40
3.7. Hücre Hatlarına Mimik ve İnhibitör miRNA'lar ile Transfeksiyonu	40
3.8. CFSE Hücre Proliferasyon Analizi	42
3.9. Annexin V-PI Hücre Apoptozu Analizi	44
3.10. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu	45

3.11. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon Tayini	47
3.12. cDNA Sentezi	47
3.13. Real Time-PCR ile Gen Ekspresyon Analizi	48
3.14. veri Tabanı Analizleri	50
3.15. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR	51
4.1. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında miR-200a-3p ve TFAM Gen Ekspresyon Düzeylerinin Profillenmesi	51
4.2. Pankreatik Duktal Adenokarsinomada TFAM Ekspresyon Düzeyi ile Sağkalım İlişkisi	51
4.3. Panc-1 ve Miapaca-2 Hücre Hatlarında miR-200a-3p ve TFAM Ekspresyon Düzeyleri	52
4.4. miR200a ve TFAM Ekspresyon Düzeylerinin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	55
4.5. miR200a ve TFAM Ekspresyon Düzeylerinin Apoptozis Üzerine Etkileri	59
4.5.1. Transfeksiyondan 24 saat sonra Apoptozis Analizleri	60
4.5.2. Transfeksiyondan 48 saat sonra Apoptozis Analizleri	62
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	79
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-2: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktör-1
ATP	Adenozin Trifosfat
Bcl-2	B- Hücre Lenfoma 2
BRCA2	Meme Kanseri 2
Ca 19-9	Kanser Antijen 19-9
CCLE	Cancer Cell Line Encyclopedia
CDK4	Siklin Bağımlı Kinaz 4
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2a
cDNA	Komplementer Dna
CFSE	Karboksiflorosikensüccinimidil Ester
Ct	Cycle Threshold
DGCR8	Digeorge Sendromu Kritik Bölge 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPC4	Deleted İn Pancreatic Cancer 4
EDTA	Etilendiamintetraasetik
EMT	Epitelyal - Mezenkimal Transizyon
ERK1/2	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Protein Kinaz
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
Facs	Floresan-Aktive Hücre Ayırma
FBS	Fötal Buzağı Serumu
GTP	Guanozin Trifosfat
Hif-1 A	Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör 1 Alfa
HMGB	High Mobility Group Box
H-Ras	Harvey Ras
HSP1	Heavy Strand Promoter 1
IP	İntraduktal Papiller
İPMN	İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazi
JAK	Janus Tirozin Kinaz
JNK	Jun-N-Terminal Kinaz

Keap1	Kelch Benzeri Ech İle İlişkili Protein 1
K-Ras	Kirsten Rat Sarkomu
Lrp5/6	Lipoprotein Reseptörü İle İlgili Proteinler 5 ve 6
LSP	Light Strand Promoter,
MAPK	Mitojenle İlişkili Olan Protein Kinaz
MCN	Müsinöz Kistik Neoplazm
MET	Mezenkimal - Epitel Transizyon
miRNA	Mikro RNA
MPF	Olgunlaşmayı Teşvik Eden Faktör
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NFKB	Hücrelerin Kapa-Hafif-Zinciri-Geliştiren Nükleer Faktörü
N-Ras	Neuroblastoma Ras
Nrf2	Nükleer Faktör Eritroid 2
PanIN	Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
PDAC	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PS	Fosfotidilserin
pTEN	Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RNA	Ribonükleik Asit
RNAse-III	Ribonukleaz-III
STAT	Transkripsiyonun Sinyal-Dönüştüren Aktivatörleri
TFAM	Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör A
TFB1M	Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör B1
TFB2M	Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör B2
TGF-B	Transforming Growth Faktör Beta
UTR	Untranslated Region
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
YAP1	Yes Associated Protein 1

ZEB Zinc Finger E-Box Binding Homeobox



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. PanIN' lerin oluşumu sırasında gerçekleşen mutasyonlar (22)	5
2.2. Normal pankreatik kanal yapısının, pankreatik adenokarsinomaya ilerlemesi sürecinde gelişen olaylar (30)	6
2.3. miRNA'nın biyogenezi (32)	8
2.4. İki ayrı kromozoma lokalize olan miR-200 ailesi üyeleri (136)	25
2.5. miR-200 ailesi üyelerinin nükleotit dizilimi (136).	25
2.6. Mitokondriyal DNA (156)	28
2.7. İnsan mitokondri DNA'sı transkripsiyonu için gerekli olan dört ana bileşen (154).	29
2.8. TFAM'ın olgun formunun domain yapısı (155)	30
2.9. mtDNA'ya bağlandıktan sonra, her TFAM molekülü bir U dönüşü uygulayarak, mtDNA'yı sıkıştırır (155)	31
2.10. LSP ve HSP1 üzerindeki TFAM fonksiyonunun karşılaştırılması (155)	32
2.11. miR-200a-3p hedef geni olan TFAM'ın <i>miRDB</i> veritabanında gösterilmesi (192)	36
3.1. Pankreas kanseri hücrelerinde mikoplazma PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü (357 bp). (Pozitif Kontrol 357-270 bp).	40
3.2. CFSE Proliferasyon analizi için kapılama stratejisi	44
3.3. Annexin V-PI hücre apoptozu analizi için kapılama stratejisi	45
3.4. miR-200a-3p ve SNORD (referans gen) gen ekspresyonlarının erime (melt) eğri grafikleri	49
3.5. TFAM ve GAPDH (referans gen) gen ekspresyonlarının erime (melt) eğrisi grafikleri	50
4.1. Pankreas kanseri hücre hatlarında (n=49) miR-200a ve TFAM gen ekspresyon düzeylerinin CCLE veritabanına göre gösterimi.	51
4.2. Pankreatik duktal adenokarsinomda TFAM gen ekspresyon düzeyine göre sağkalım analizi.	52
4.3. A-B. Panc-1 hücre hattında kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücre gruplarında miR-200a-3p ve TFAM gen ekspresyon düzeyinin gösterilmesi.	53
4.4. Panc-1 hücre hattında miR-200a-3p gen ekspresyonu ile TFAM gen ekspresyonu arasında korelasyon analizi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).	54
4.5. A-B. Miapaca-2 hücre hattında kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücre gruplarında miR-200a-3p ve TFAM gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi.	55

- 4.6.** Panc-1 hücre hattında transfeksiyon deneylerinden 48, 72 ve 96 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerinin temsili akım sitometri histogramları. 56
- 4.7.** A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerini göstermektedir (sırasıyla) C- 57
- 4.8.** A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 72 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerini göstermektedir (sırasıyla). 58
- 4.9.** A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 96 saat sonra hücre proliferasyon analizlerini göstermektedir (sırasıyla). 59
- 4.10.** A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra canlı hücre yüzdeleri (n=3). 60
- 4.11.** A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra erken apoptoz görülen hücre yüzdeleri (n=3). 61
- 4.12.** A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra geç apoptoz görülen hücre yüzdeleri (n=3). 61
- 4.13.** A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra nekrotik hücre yüzdeleri (n=3). 62
- 4.14.** Transfeksiyon deneylerinden 48 saat sonra yapılan canlılık ve apoptoz analizlerinin temsili akım sitometri histogramları. 62
- 4.15.** A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan canlı hücre analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile canlı hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -% Canlı Hücre) göstermektedir. 63
- 4.16.** A ve B grafikleri, Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra erken apoptoz analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile erken apoptoz hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -% Erken Apoptoz Hücre) göstermektedir. 65
- 4.17.** A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra geç apoptoz analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile geç apoptoz hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -%Geç Apoptoz Hücre) göstermektedir. 66
- 4.18.** A ve B grafikleri, Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra nekrotik hücre analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile nekrotik hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -% Nektotik Hücre) göstermektedir. 67
- 4.19.** Panc-1 hücre hattında yapılan korelasyon analizlerinin özeti 68

TABLULAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Mimik miR-200a-3p ve İnhibitör miR-200a-3p transfeksiyon bileşenleri ve miktarları.	42
3.2.	cDNA sentezinde kullanılan PCR bileşenleri.	48
3.3.	miR-200a-3p/SNORD (Referans gen) gen ekspresyon analizinde kullanılan PCR bileşenleri.	49
3.4.	TFAM/GAPDH (Referans gen) gen ekspresyon analizinde kullanılan PCR bileşenleri	49
3.5.	RT-PCR koşulları.	49



1. GİRİŞ

Pankreas endokrin ve ekzokrin fonsiyonları olan bir organdır. Vücutta glikoz, lipit ve protein metabolizmasını düzenleyen insülin ve glukagon hormonlarını sentezlemektedir. Pankreas tümörleri iki alt grup altında incelenir. Non-endokrin tümörler, benign ve malign olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Benign non-endokrin tümörler; adenoma, kistadenoma, lipoma, fibroma, hemanjioma, lenfanjioma, nöroma olarak sınıflandırılmaktadır. Malign tümörler ise, duktal adenokarsinoma, kistadenokarsinoma ve diğer (sarkomalar, metastatik v. s) farklı histolojik gruplara ayrılır.

Pankreas kanseri gelişiminde en önemli çevresel faktörler sigara kullanımı, belirli kimyasallara maruziyet olmakla birlikte, obezite ya da diyabet gibi hastalıklar risk faktörleri arasında bulunmaktadır. Bu faktörler değiştirilebilir faktörler olarak da bilinmektedir (1,2). Pankreas kanseri, erkeklerde nispeten daha yaygın görülen, genellikle 65 yaşından sonra ortaya çıkan, agresif ilerleyen ölümcül malign kanserler arasındadır. Semptom göstermeden gelişen kanser türleri arasında birinci sırada yer alır. İleri yaşlarda görülen diyabetes mellitus, pankreas kanserinin ilk sinyallerini verebilmektedir. Ailede kanser öyküsü olan bireylerde pankreas kanseri olma ihtimalini arttırmaktadır. Bunlara ek olarak yaş, kilo, sigara kullanımı, alkol tüketimi gibi etkenler de pankreas kanserinin risk faktörleri arasındadır. Pankreas kanseri, asemptomatik seyrettiği için genellikle ileri evrede ve primer organdan sekonder organlara metastaz yaptığında teşhis edilir. Bu nedenle pankreas kanserinin erken tanısı oldukça önemlidir. Pankreas kanserinin erken tanısı ve tedavisi için yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. MikroRNA'ların (miRNA) biyobelirteç olarak kullanılması ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır.

Birçok kanser malignitesinde miRNA'ların anormal ifadesi görülmektedir (3). miRNA'lar, 19-24 nükleotit uzunluğunda, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir (4,5) ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. miRNA'lar, aktif

RISC kompleksine (RNA-induced silencing complex) entegre olduktan sonra, argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına veya protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar. miRNA'lar, hücre proliferasyonu ya da apoptoz gibi karsinogenez için önemli biyolojik süreçlerde etkin rol oynamaktadırlar. Hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliklerine göre tümör baskılayıcı ya da onkojenik özellik kazanırlar. Tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA ekspresyonlarının azalmasıyla, hedeflerindeki onkogen ekspresyonları artar böylece tümör gelişmeye başlar.

miR-200 ailesi üyeleride tümör baskılayıcı fonksiyon göstermektedirler. Kromozom yerleşimlerine göre miR-200 ailesi iki kümeye ayrılmaktadır. Bu kümeler, miR-200a, miR-200b ve miR-429 kromozom 1p36 üzerinde yer alan miR-200ba / 429 kümesi, miR-200c ve miR-141 12p13 kromozomunda yer alan 200c / 141 kümesi olarak adlandırılır. miR-200 ailesi özellikle epitel dokularda daha fazla eksprese olurlar. miR-200 ailesinin üyeleri tümörigenezde ekspresyonlarının azaldığı ve metastazın ilk basamağı olan Epitel Mezenkimal Geçiş (EMT) inhibe ettiği bilinmektedir (6).

Bu tez çalışmasında miR-200a-3p ile hedef genlerinden olan Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör A (TFAM) arasındaki ilişki araştırılmıştır. Mitokondriyal DNA (mtDNA), nükleus DNA'sı (nDNA) gibi çift iplikli olmakla beraber halkasal yapıdadır. mtDNA, solunum zincirindeki proteinlerden yalnızca 13'ünü kodlar, geriye kalan proteinler nDNA tarafından kodlanmaktadır. mtDNA oksitativ fosforilasyon sonrası çıkan reaktif oksijen ürünlerine fazlasıyla maruz kalır. Bu nedenle yapısı bozulmaya müsaittir. Bunlara ek olarak nDNA'sı gibi histon proteinleriyle korunmamakla birlikte DNA tamir mekanizmalarının kapasitesi, nDNA kadar yeterli değildir. Dolayısıyla, mtDNA replikasyon sırasında çok fazla mutasyona uğrar. mtDNA replikasyonunda görev alan mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM), mitokondriyal promoter bölgelerinde sekansa spesifik olarak bağlanabilen ve DNA'nın çözülüp, bükülebilmesi gibi işlemlerinde görev alan bir transkripsiyon faktörü olmasının yanı sıra mtDNA'nın nükleoidlerce çevrelenmesinde de rol oynamaktadır. Fonksiyonel olarak nDNA'daki histon proteinlere benzemektedir. TFAM ekspresyonunun aşırı ekspresyonu ile bazı kanser türlerinin malignitesi

ilişkilendirilmiştir (7, 8, 9). Ayrıca kanser hücrelerinin metabolik gereksinimleri için kanser hücrelerinin lehine olarak metabolik yolları değiştirdiği gösterilmiştir (10). Bu literatür bilgileri, TFAM'ın tümör gelişimine katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir.

Bu bilgiler ışığında, tezin amacı pankreas kanseri hücre hatlarında, miR-200a-3p ile TFAM ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösterebilmek ve TFAM ekspresyonu değiştiğinde pankreas kanser hücrelerinin yaşamsal fonksiyonlarının bundan nasıl etkilendiğini incelemektir. Bunun için pankreas duktal adenokarsinoma hücre hatları olan Miapaca-2 ve Panc-1 kullanılmıştır. Bu hücelere mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p ile transfekte edilmiştir. miR-200a-3p gen ekspresyon düzeylerinin değişimine göre TFAM gen ekspresyonunun değişimi değerlendirilmiştir. Ayrıca TFAM ekspresyon düzeyi ile pankreas kanser hücrelerinin canlılık düzeyi proliferasyonu ve apoptozisi arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Miapaca-2 ve Panc-1 hücre hatlarında beklenildiği gibi miR-200a-3p ekspresyonu düşük düzeyde saptandı. Mimik miR-200a-3p transfeksiyonu sonucunda miR200a-3p gen ekspresyonu analizi ile transfeksiyon deneylerinin etkinliği doğrulandı. miR-200a-3p ekspresyonunun arttırılmasıyla TFAM gen ekspresyonunun baskılandığı Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile gösterildi. TFAM ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak Panc-1 hücre hattında, hücre proliferasyonunun transfeksiyon işleminden 48 saat sonra azaldığı gösterildi. miR-200a-3p gen ekspresyonunun artışı ile hücre canlılığı arasında negatif, geç apoptoz arasında ise pozitif korelasyon olduğu saptandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri

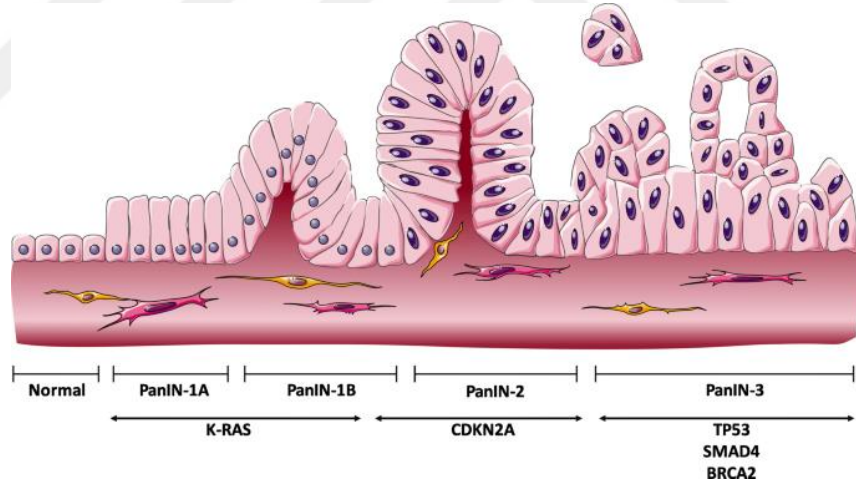
Pankreas kanseri kötü prognoz ile seyreden tümörlerden biri olup, görülme sıklığı giderek artmaktadır. En sık 65 yaşından sonra görülen pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %90'ı sporadik; %10'u ise kalıtsaldır. Pankreas kanseri, aşırı agresif seyreder ve düşük hayatta kalma oranına (%5) sahiptir. Pankreas kanseri gelişiminde en önemli çevresel faktörler sigara kullanımı, belirli kimyasallara maruziyet olmakla birlikte, obezite ya da diyabet gibi hastalıklar risk faktörleri arasında bulunmaktadır. Bu faktörler değiştirilebilir faktörler olarak da bilinmektedir. (1,2). Değiştirilemeyen risk faktörleri ise yaş, ırk, cinsiyet, aile öyküsü ve kalıtsal genetik sendromlar yer almaktadır (11,12). Pankreas kanseri, endokrin veya ekzokrin hücrelerden kaynaklanabilir ve histolojik incelemeler aracılığı ile bu tümörler birbirinden ayrılabilir. Endokrin tümörler nispeten nadirdir ve tüm pankreas kanserlerinin %5'inden az bir kısmını oluşturur iken; ekzokrin tümörler ise genellikle pankreatik adacık hücrelerinden kaynaklanır ve çoğunlukla yüksek seviyelerde pankreas hormonları üretir. Ekzokrin hücrelerden kaynaklanan pankreas kanserleri daha yaygındır ve bu tümörlerin çoğunluğunu epitel hücrelerden köken alan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) oluşturur ve tüm pankreas malignitelerinin %90'ından fazlasını teşkil eder (13).

Pankreas kanserinin gelişimi, iyi karakterize edilmiş genlerdeki mutasyonları kapsayan çok aşamalı bir süreçtir (Şekil 2.1) (14). Pankreas kanserinin prognozunda K-Ras2 (Kirsten Rat Sarkomu) mutasyonu, HER2/Neu gen ekspresyonu artışı, CDKN2A/p16 gen delesyonu, mutasyonu ve/veya hipermetilasyonu, BRCA2, MADH4/SMAD4/DPC4 genlerinin inaktivasyonu ve STK11 ile p53 gen ekspresyon değişiklikleri görülmektedir (15,16). Bu genetik mutasyonlar, pankreasın duktal hücrelerinde papiller benzeri yapılar oluşturan histolojik ve morfolojik anormalliklerle sonuçlanır.

Pankreas kanserogenezinde düşük dereceli lezyonlardan yüksek dereceli lezyonlar ve invaziv kanserler gelişmektedir (17,18). Bu süreçte öncü lezyonlar;

pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplazi (İPMN) ve müsinöz kistik neoplazm (MCN) olarak adlandırılır (19, 20, 21).

PanIN: PanIN'lerin oluşumu ve gelişimi, genetik mutasyonlarla eş zamanlı olarak, adım adım gerçekleşir ve invaziv (karsinom) tümör hücrelerinin gelişimi ile daha karmaşık yapılar meydana gelir. Böylece PanIN'ler hücre morfolojilerine göre PanIN-1A, -1B, -2 veya -3 olarak sınıflandırılmaktadır. Normal duktal hücrelere göre PanIN-1A ve PanIN-1B uzun kolumnar hücrelerden oluşan yassı lezyonlardır. A ve B alt grupları, K-RAS onkogeninin erken dönemde oluşan mutasyonu ile ilişkilidir. PanIN-2 ise CDKN2A'nın inaktivasyon mutasyonu ile lezyonların ilerlemesi ve orta derecede nükleer anormallikleri kazanmasıyla oluşur. p-16 ve SMAD-4'ün inhibitör mutasyonlarıyla birlikte lezyonlar nükleus atipi göstererek PanIN-3'ü oluşturur (22). PanIN-3, invaziv duktal adenokarsinom ile ilişkili olmakla birlikte *in situ* karsinom olarak da adlandırılmaktadır (22). PanIN, İPMN ve MCN'lerden pankreatik duktal adenokarsinom gelişmektedir (Şekil 2.2).

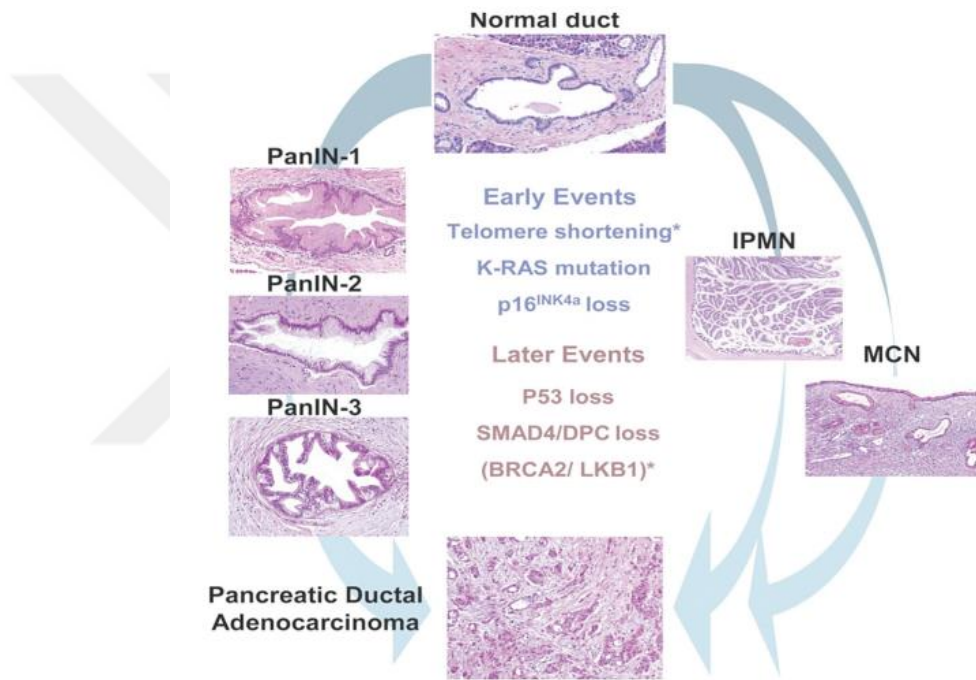


Şekil 2.1. PanIN'lerin oluşumu sırasında gerçekleşen mutasyonlar (22).

İPMN: İntraduktal papiller (IP) sigara kullanan bireylerde sıklıkla görülmekle birlikte daha yavaş ilerler ve genellikle asemptomatiktir. (23). IP'ler, malign transformasyon özelliklerine göre, *low*, *intermediate*, *high grade* displazi ve invaziv kanser olarak sınıflandırılmıştır (24). İmmünohistokimyasal analizler ile IP'leri histolojik olarak sınıflandırmak da mümkündür. Bu sınıflandırma müsin antikor boyanma özelliklerine göre, 4 alt grup altında gastrik, intestinal, pankreatobiliyer ve onkositik şeklinde yapılmaktadır. Gruplar arasında en yaygın olanı intestinal tiptir

(25). Genelde pankreasın baş kısmında, ampulla vateri civarında, pankreatik kanalın giriş yerinde görülmektedir (26).

MCN: MCN'ler, pankreasın müsin üreten ve septalı kist oluşturan epitelyal neoplazisi olarak tanımlanmaktadır. Kalın bir fibrotik duvara sahip olan MCN'lerin duktal sistemden bağımsızdır (27). MCN'ler, İPMN'lere göre daha az görünürler (28). Kadın-erkek oranı 20:1 olan MCN'lerin ortalama tanı yaşı 40 ile 50 arasındadır (29). Vakaların %95-98'inde neoplazmin görüldüğü yer, pankreasın gövdesi ve kuyruğudur (30).



Şekil 2.2. Normal pankreatik kanal yapısının, pankreatik adenokarsinomaya ilerlemesi sürecinde gelişen olaylar (30).

Pankreas kanserinin erken tanı ve tedavisine yönelik biyobelirteç bulunmasına yönelik araştırmalar yoğun bir şekilde yapılmaktadır. Pankreas kanserinin erken evrelerde asemptomatik seyretmesi hastalığın kötü prognozuna sebep olmakta ve kısa sağkalım süresi ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla hastalığın geç teşhisine neden olmaktadır. Pankreas kanserinin teşhisi için pankreas kanserine spesifik biyobelirteçlerin tanımlanması bu açıdan kritik önem taşımaktadır. Pankreas kanserinin tanı ve teşhisine katkıda bulunabilecek biyobelirteçlerden bir tanesi de mikroRNA (miRNA)'lardır. miRNA'ların anormal gen ifadesi, birçok insan malignitesinin ayırt edici özelliğidir (3). miRNA'ların, kanser gelişiminin

başlangıcında, ilerlemesinde, metastazında ve kemo-direncindeki rolleri oldukça önemlidir.

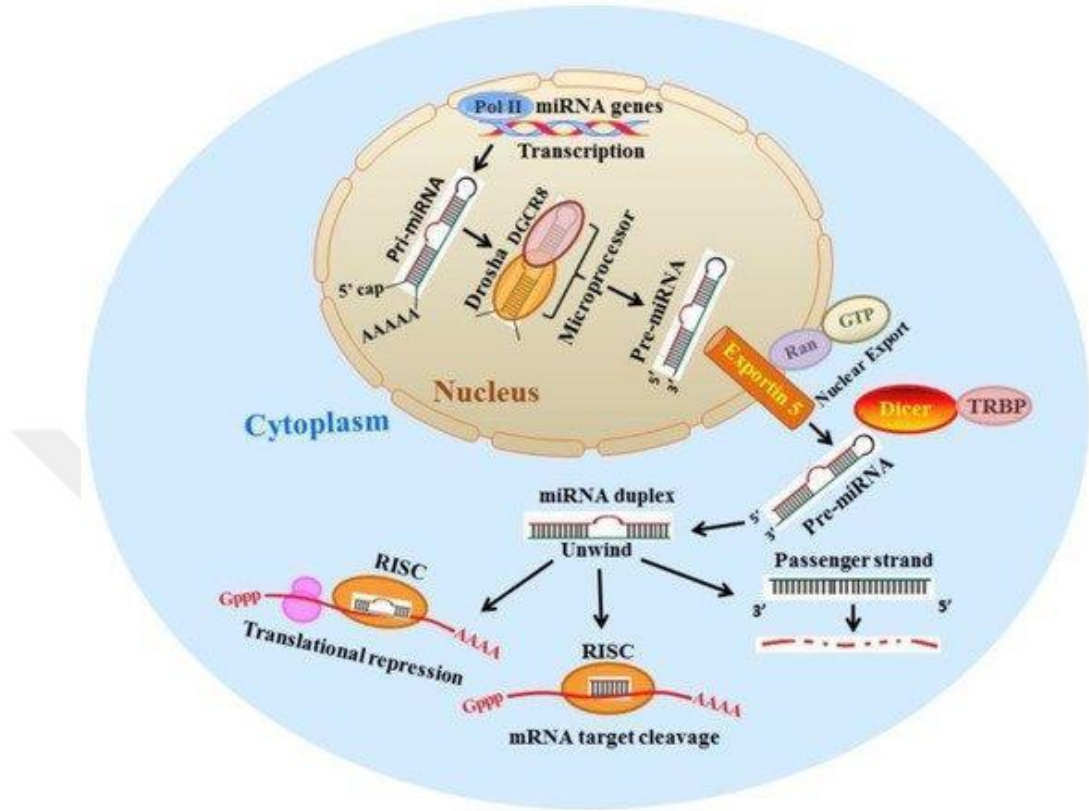
2.2. Pankreas Kanseri ve miRNA lar

2.2.1. miRNA Biyogenezi

miRNA yaklaşık 19-24 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülüdür. DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak proteine dönüşümü olmayan genler tarafından kodlanırlar. Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar (4, 5). Epigenetik mekanizmalar arasında önemli bir yere sahip olan miRNA'lar, hücrel savunmada, gelişimsel süreçlerde, farklılaşmada, DNA replikasyonunda, transkripsiyonda ve post-transkripsiyonel gen ifadesinin susturulmasında görev alırlar.

miRNA'ların biyogenezi, ilk olarak çekirdekte başlar ve sitoplazmada devam eder. (Şekil 2.3). *Pri-miRNA* olarak adlandırılan primer transkriptler işlenerek, önce *pre-miRNA* adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler. Pri-miRNA, olgun, aktif bir miRNA haline gelmeden önce iki endonükleaz işleme aşaması gerektirir (31). pri-miRNA, miRNA geninin RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonu ile başlar. Transkripsiyon sonrasında 100-1000 nükleotid uzunluğunda pri-miRNA oluşmaktadır. Oluşan pri-miRNA çekirdekte ribonükleaz kompleksi Drosha-DGCR8 tarafından 70-100 nükleotidlik saç tokası şeklinde bir ara pre-miRNA oluşturmak için işlenmektedir (32). Bir sonraki işleme adımını gerçekleştirmek için pre-miRNA, Exportin 5 ve Ran-GTP6 taşıyıcı proteinlerin yardımıyla sitoplazmaya aktarılır (33). Sitoplazmanın içinde başka bir endo ribonükleaz RNase III enzimi olan DICER, olgun bir miRNA (çift sarmallı, 19-24 nükleotit) oluşturmak için pre-miRNA'nın terminal döngüsünü ayırır. Dicer reaksiyonunun sonucu, dubleks bir RNA'dır. Dubleks RNA'nın bir ipliği, olgun bir miRNA olarak RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) yüklenir. Yıldız iplik olarak adlandırılan diğer iplik ise bozulur (24). Bu yıldız dizisini belirtmek için miRNA adına bir yıldız işareti (yıldız) eklenir (örneğin miR-150*). miRNA'lar tamamlayıcı dizilimi olan hedef mRNA'ya bağlanır veya hedefin parçalanmasına yardımcı olarak ya da translasyonel baskılama ile mRNA'yı negatif yönde düzenler.

Tek bir miRNA birkaç mRNA'yı düzenleyebileceği gibi bir mRNA da çok sayıda miRNA'nın hedefi olabilir.



Şekil 2.3. miRNA'nın biyogenezi (32).

2.2.2. miRNA'ların Hücre Proliferasyonu ve Apoptozu Üzerine Etkileri

Canlı organizmaların temel ihtiyaçlarından olan büyüme, hücre bölünmesi ile güçlü bir ilişkiye dayanmaktadır. Hücre bölünmesi iki mitoz bölünme arasında gerçekleşen geçici biyokimyasal aktiviteleri içeren biyolojik bir süreçtir. Bu süreç hücre döngüsü kontrol noktaları, tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve diğer kontrol mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde denetlenir. Hücre bölünme siklusu interfaz (G-1, S, G-2) ve mitoz (M) evrelerinden oluşmaktadır. Bölünme sinyali almayan hücreler dinlenme evresi (G-0) adı verilen evrede beklerler. Bölünme sinyali alan hücreler ise interfaz evresine girerek bölünmek için hazırlık aşamasına geçerler.

G-1 evresi: S evresine hazırlık evresi olmakla birlikte metabolizmanın en yüksek seviyeye çıktığı evredir. RNA ve protein sentezlenir.

S evresi : DNA replikasyonu olur, sentrozom kendini eşlemeye başlar ve RNA ve protein sentezleri devam eder.

G-2 evresi: DNA replikasyonu durur, sentrozom duplikasyonu tamamlanır ve RNA ve protein sentezi devam eder.

M evresi : Profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşur. Bu evrelerin sonunda aynı genetik materyali içeren iki yavru hücre oluşur.

Hücre siklusunun bu evreleri siklin adı verilen proteinler tarafından düzenlenmektedir (35, 36). Büyümekte olan bir hücrede, hücre döngüsünü yürüten kinazlar sabit bir derişimde ve inaktif halde bulunurlar. Hücre siklusunda siklinler, inaktif halde bulunan siklin-bağımlı kinazlara (CDK) bağlanarak onları aktif hale getirir (37). Hücre içindeki CDK aktivitesi, bağımlı olduğu siklinin derişimindeki değişikliğe göre artar ya da azalır. Örneğın, bir CDK türü olan MPF (Maturation Promoting Factor) interfazın G2 kontrol noktasını geçen hücrenin M fazına geçmesini sağlar. G2 sırasında siklinler CDK molekülleriyle bir araya geldiklerinde ortaya çıkan MPF kompleksi çeşitli proteinleri fosforile ederek mitozu başlatır.

Hücre siklusunun evreleri arasındaki kontrol noktalarında gerçekleşen bozukluklar, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve tümör gelişimine neden olur. Bu kontrol noktalarına ek olarak proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar da karsinogeneze yol açar (38). Proto-onkogenler hücrenin çoğalıp büyümesi için gerekli olan proteinlerin sentezlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu proteinlere, hücre siklusundaki proteinler, büyüme faktörleri ve reseptörleri ve hücre içi sinyal iletimden sorumlu proteinler örnek verilebilir (39). Tümör baskılayıcı genler ise; hücre bölünmesini baskılayan gen gruplarıdır. Onkogenlerde tek bir alel değişimi fonksiyon kaybına sebep olurken, tümör baskılayıcı genlerde iki alelin de mutasyona uğraması sonucu fonksiyon bozukluğu ve kanser oluşumu görülebilir. Hücresel düzeyde tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları, onkogenlere göre çekiniktir (40).

Hücre döngüsü, proliferasyonu ve tümörigenezin miRNA'lar tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. miRNA'lar DNA onarımında ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol almaktadır (41). Örneğın, hücre döngüsünün kritik

düzenleyicilerinden biri olan *miR-15a-16-1* ailesi; CDK1, CDK2 ve CDK6 gibi siklin-bağımlı kinazları, D1, D3 ve E1 gibi siklinleri hedefleyerek G1 fazında hücre döngüsünün durmasını indüklemektedir (42). Diğer bir miRNA, miR-21'in aşırı ekspresyonu sonucu tümör baskılayıcı gen olan PTEN, negatif olarak düzenlenir. PTEN geninin ürünü, tümör hücrelerinin çoğalmasını engeller ve normal hücrelerdeki hücre bölünme sayısını kontrol eder. Ayrıca miR-21'in aşırı ekspresyonu ile, PTEN mRNA transkriptinin 3' UTR bölgesindeki tamamlayıcı bölgeye bağlanarak PTEN'in tümör baskılayıcı fonksiyonlarını azaltır (43). Bunun aksine, miR-21'in inhibisyonu TGF-1 sinyal yolunu düzenleyerek osteosarkom hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (44). miR-203 ekspresyonunun azalması, hücrenin G1 fazına ilerlemesini indükleyerek, hücre proliferasyonunun artmasına sebep olur (45). MiR-26a, G1'den S fazına geçişle ilişkili olan Siklin E2' yi doğrudan düzenlenmektedir (46). Böylelikle, hücre döngüsünü teşvik eden Siklin E2 geninin ekspresyonunu düzenleyerek hücre proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır. miRNA'lar CDK4/pRB yolunun negatif düzenleyicilerini hedefleyerek hücre döngüsü girişini ve G1 ilerlemesini kolaylaştırmaktadır. miR-106a, pRB'yi doğrudan hedefler ve miRNA'nın aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinde pRB down regülasyonu ile sonuçlanır (47). pRB ailesinin diğer üyeleri olan p107/RBL1 ve p130/RBL2 genlerini, iki mikroRNA ailesi olan, *miR-290* ve *miR-17-92*'yi düzenler (48, 49). miRNA'lar, hücre döngüsü ve proliferasyonunda rol oynayan genleri düzenlemekle birlikte, hücre döngüsü ve proliferasyonla ilişkili yollarda da önemli rol oynarlar.

Bu sinyal iletim yollarından olan AKT/PI3K (Serin/Treonin Protein Kinaz AKT/ Fosfatidilinositol 3-kinaz PI3K) yolu, hücrenin hayatta kalması ve proliferasyonu ile ilgilidir (50). Belirli miRNA'ların, AKT/PI3K sinyal yollarında yer alan genlerin ekspresyonunu modüle ettiği bildirilmiştir. Bu mikroRNA'lardan miR-508-3p, PTEN/PI3K/ Akt sinyal yollarını hedefleyerek orta kulak kolesteasom hücrelerinin proliferasyonunu desteklemektedir (51). miR-221 ise birçok insan malignitesinde mutasyona uğradığı gösterilen bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN'i hedefler (52).

Tümör baskılayıcı miRNA'lar tümör oluşumunu, onkogenleri baskılayarak engellemektedirler. Tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA let-7 ekspresyonu

akciğer kanseri hücre kültürü modelinde arttırıldığında, kanser hücrelerinin büyümesinin önemli derece azaldığı rapor edilmiştir (53). miR-3174, ADAM15'i hedefleyerek mesane kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder (54). Dolayısıyla miRNA'lar, hücre siklusuyla ya da proliferasyonu ile ilgili hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özlelliklerine göre tümör süpresör ya da onkogen olarak görev almaktadırlar.

Hücrelerde normal koşullarda mitoz ve apoptozis, homeostazisi koruyarak dinamik bir denge oluşturmaktadır. Bir hücrede herhangi bir nedenden dolayı meydana gelen DNA hasarı, DNA onarımını ya da apoptozu beraberinde getirmektedir. Apoptozise giden bir hücre hacimce küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve büzülür. DNA yapısı hasara uğrayarak fragmentlerine ayrılır. Hücre içinde bulunan organeller parçalanır, kromatin piktonik hale gelir ve kalsiyum alımı artar. Sonuç olarak, apoptotik bir cisim haline gelen hücrenin komşu hücreler ile bağlantısı kesilir. Oluşan apoptotik cisimleri makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından yok edilir (55).

Hücre apoptozunun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 gen ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondri rol oynar (56). Bunlar arasında en önemli role sahip olan Bcl-2 gen ailesidir. Bu ailede tanımlanmış yaklaşık 25 genin bir kısmı pro-apoptotik olup apoptozu indükleyip, ölüm aktivatörleri olarak görev yaparken, diğer kısmı anti-apoptotik olup apoptozu engelleyip, yaşam aktivatörleri şeklinde fonksiyon üstlenir. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır ve sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bu proteinler de mitokondri dış membranında, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yer alırlar. Por oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenlerler. Özellikle hücredeki Ca⁺ oranını kontrol ederler. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler (57, 58, 59). Apoptoz sürecini Bax ve Bcl2 proteinlerinin dengesi belirler. Bax protein düzeyi, Bcl2'den fazla ise hücre apoptozu gider (60).

Düzenleyici bir protein olan p53 hücre bölünmesi sırasında DNA'da herhangi bir hasar oluştuğunda siklusu G-1 evresinde durdurarak DNA'daki hasarın tamiri için zaman verir. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax yapımını artırıp, Bcl-2 ve

Bcl-xL'yi baskılayarak apoptozu indükler (61). Bu sayede tümör oluşumunu inhibe etmektedir.

Apoptozisin düzenlenmesinde rol oynayan kaspazlar, hücrede inaktif halde bulunurlar. Hücre içi kalsiyum artışı ile aktifleşen kaspaz enzimleri hücre iskeletinin yıkılmasında etkilidir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad oluştururlar. 14 tane kaspaz tipi bulunmaktadır. Bunlar görevlerine göre 3'e ayrılırlar.

I- Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10)

II- Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7)

III- İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14).

miRNA'ların Pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonunu modüle ederek hücre apoptozunu regüle ettikleri düşünülmektedir. Birçok miRNA'nın, intrinsik apoptotik yolun düzenlenmesinde ve tümör büyümesinin inhibe edilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir.

Bu miRNA'lardan kolon kanserinde tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-92a, kolon kanseri dokularında hücre ölümünün anti-apoptotik molekülü Bcl-2'yi hedeflediği gösterilmiştir. Buna göre miR-92a'nın inhibisyonu kolon kanser hücrelerinde apoptozise neden olmaktadır (62). Bir başka miRNA ailesinden olan miR-766'nın aşırı ekspresyonunun, MDM4/p53 yolunun baskılanması yoluyla kolon kanseri hücrelerinde hücre büyümesini azalttığı ve apoptozu indüklediği bulunmuştur (63). Benzer şekilde tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-133a'nın osteosarkom hücre hatlarında ve dokularında ekspresyonunun az olduğu ve buna bağlı olarak da tümör gelişimini arttığı gösterilmiştir. miR-133a ekspresyonunun artırılmasıyla osteosarkom hücrelerinde, hücre proliferasyonunun azaldığı, apoptozun ise arttığı gözlemlenmiştir (64). Doku ve organ homeostazında önemli rolü olan NOTCH3 sinyal yolağını hedef alan miR-206'nın aşırı ekspresyonu, kolon kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozisi aktive etmiştir (65). miR-125b'nin Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik moleküllerini baskılayarak kolorektal hücre hatlarında apoptozisi teşvik ettiği ve miR-125b ekspresyonunun susturulmasının sonucunda tümör gelişiminin kolaylaştığı gözlenmiştir (66). miR-133 ve miR-24a ayrıca kaspaz-

9'un baskılanması yoluyla kanser hücresinin apoptoz veya hayatta kalma sürecini düzenlediği gösterilmiştir (67,68). miR-195, miR-24-2 ve miR-365-2'nin aşırı ekspresyonunun ise insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK-293T) ve meme kanseri hücrelerinde (MCF7) Bcl-2'nin anti-apoptotik aktivitesini bozabileceği bulunmuştur (69). Kronik lenfositler lösemi hastalarında düşük seviyede ekspresyonu olan iki miRNA'nın (miR-15a ve miR-16-1), direkt Bcl-2'yi hedefleyerek ve apoptozu desteklediği gösterilmiştir (70). Benzer şekilde miR-204, mide kanserinde Bcl-2'yi hedefleyerek apoptozu indüklemektedir (71). Dolayısıyla, miRNA'lar antiapoptotik molekülleri hedefleyip baskılayarak kanser hücrelerini apoptozise teşvik etmektedirler. Bu sayede tümör gelişimini inhibe edip kanser tedavisine yeni umut vermektedirler.

2. 2. 3. miRNA'ların Kanser İnvazyonu ve Metastazı Üzerine Etkileri

Kanser hücreleri dış uyaranlara bağlı olmaksızın bölünme sinyallerini kendileri vererek bölünebilirler. Hücre ölümünü minimum, proliferasyonu maksimum hale getiren kanser hücreleri tümör dokusunu oluşturmaktadır. Prolifere olan hücre sayısı arttıkça tümör dokusu genişlemektedir. Bu süreç uzun ve sessizken, tümör çevresinde oluşan damarlanma ile daha hızlı bir süreç başlar. Kanser hücreleri proliferere oldukları bölgede 2-3 mm büyüklüğe kadar damarlanmaya ihtiyaç duymadan var olan damarlardan beslenebilirler. Ancak daha fazla kanser hücresinin proliferasyonu için gereken yeni damar oluşumuna anjiyogenez denir. Anjiyogenez, kanser hücresinin primer dokudan ayrılıp sekonder dokulara yerleşebilmesi için gerekli olan ilk adımdır. Kanser hücresinin köken aldığı dokudan, organdan vücudun diğer doku ve organlarına yayılması metastaz olarak adlandırılır. Metastaz süreci çok aşamalı ve karmaşık bir süreçtir. Bu süreç lokal invazyon (Epitel-Mezenkimal Geçiş) EMT, intravazasyon, dolaşımda sağkalım, ekstravazasyon ve metastatik koloni oluşumu basamaklarından oluşur. Normal bir dokuda epitel hücreleri belirli proteinler ile birbirlerine sıkı bir şekilde bağlanarak yapısal bütünlüklerini korurlar. Ancak, kanser hücrelerinin invazif karakter kazanması için bu proteinler, yapısal değişikliğe uğramaktadırlar. Kanser hücrelerinin invazif karakter kazanmasında EMT ile ilişkili proteinler çok önemlidir.

Metastazın ilk basamağı olan EMT, transmembran proteinlerden olan E-kaderin ve N-kaderin dengesinin bozulmasıyla başlayan bir süreçtir. Bu süreçte, E-

kaderin ekspresyonu azalırken, N-kaderin ekspresyonu artar. E-kaderin ekspresyonundaki azalma epitel hücreleri arasındaki bağlantıların, hücre polaritesinin ve epitel doku yapısının bozulmasına neden olurken, N-kaderin ekspresyonundaki artış ise kanser hücrelerinin primer dokudan ayrılıp, invazif kapasite kazanmasını kolaylaştırır. Transmembran proteinlerde meydana gelen bu değişiklik literatürde "kaderin değişimi (cadherin-switch)" olarak adlandırılır ve bu olay tümörün invazifliği ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (72). EMT sürecinde transmembran proteinlerde meydana gelen değişikliklere ek olarak hücre-hücre adezyonu, hücre-ekstraselüler matriks (ECM) adezyonu çözülmeye ve hücre polaritesi kaybedilmeye başlar. ECM ile bağlantısı kesilip apoptoza giden epitel hücrelerinin aksine dokudan ayrılan tümör hücreleri hipoksi, yetersiz besin kaynağı, hipoperfüzyon, immün sistem gibi çevresel faktörlere rağmen hayatta kalıp diğer doku ya da organlara metastaz yapmayı başarırlar.

Hücrelerin bir arada kalmasını sağlayan ECM'i, tümör hücreleri, Matriks Metalloproteinaz (MMP) proteinleri salgılayarak ECM'nin bozulmasına sebep olurlar. Salgılanan bu MMP proteinlerinin (MMP-1, -2, ve -9) yardımı ile tümör hücreleri kan ve lenf damarlarına girerler. Bu olaya intravazasyon adı verilir (73). Dolaşıma geçen kanser hücreleri sitotoksik immün sistem hücreleri ile karşılaşır. Ancak kanser hücreleri doku faktörü, L- ve P- Selektinler, trombin, Katepsin B, MMP-2/-14 gibi faktörler salgılayarak platelet agregasyonunu uyarıp kendilerine platelet kalkını oluşturarak immün sistemden kaçarlara (74). Kanser hücreleri dolaşımda karşılaştıkları engelleri aşarak metastaz yapacağı organın damar sistemine girip lümende büyüyerek bir koloni oluştururlar. Daha sonra damar sisteminden çıkmak için damar duvarını geçen kanser hücreleri metastaz yapacağı organa ulaşırlar. Kan dolaşımında görülen kanser hücrelerinin damar sisteminden çıkıp ilgili organlara ulaşmasına ekstravazasyon adı verilir. Kanser hücreleri metastaz yapacağı organa geldikten sonra invazyon sürecinin başlangıcında gerçekleştirdiği EMT'yi tam ters yönde uygulayarak dokuya entegre olur ve Mezenkimal- Epitel Geçiş (MET) ile başka doku ya da organlarda metastatik odakları oluşturur.

Bugüne kadar miRNA'ların, metastatik kaskatta önemli biyolojik süreçler olan hücre proliferasyonu, EMT, anjiyogenez, invazyon gibi aşamalarda rolleri üzerine

araştırmalar devam etmektedir. Bu nedenle miRNA'lar ile metastaz arasındaki ilişkiyi inceleyen çok fazla çalışma mevcuttur Anjiyogenezi ve migrasyonu düzenleyici metastazı destekleyici miRNA'ların yanı sıra metastazı baskılayan miRNA'lar da vardır.

Metastatik kaskattaki biyolojik süreçlerden herhangi birinin inhibisyonu, metastazın baskılanmasını sağlar. Bu nedenle bu süreçlerden birçoğunda gerçekleşen inhibisyon, metastatik süreci daha güçlü bir Şekilde baskılayarak metastazı engeller. Meme kanseri ile yapılan bir çalışmada, miR-335 ve miR-206'nın anjiyogenezi ve invazyonu inhibe ederek metastazı baskıladığı gösterilmiştir (75). Meme kanserinde yapılan diğer bir çalışmada metastaz üzerinde miR-146'nın etkisi incelenmiştir. İki farklı kromozom üzerinde bulunan miR-146a ve miR146b iki nükleotitlik bir farkla birbirinden ayrılmaktadır. miR-146a/b NF-kappa B (NF-κB, Nükleer Faktör kappa B) sinyal yolağını negatif yönde düzenleyerek anjiyonegezi ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (76). miR-31'in ise meme kanserinde, invazyon kolonizasyon gibi basamakları baskılayarak, akciğer metastazını %95 azalttığı gösterilmiştir (77). Ma, Weinberg ve meslektaşları tarafından ilk kez keşfedilen metastamir olarak adlandırılan miRNA'lar ise metastaz basamaklarını düzenleyerek kanser hücrelerin primer organdan sekonder organa kolonize olmalarını sağlamaktadırlar (78). miR-10b, hücre migrasyonu ve invazyonunu destekleyerek meme kanseri hücrelerinin metastazını arttırdığı gösterilmiştir (79). Benzer Şekilde miR-373 ve miR-520c hücre migrasyonu ve adezyon molekülü olan CD44' düzenlenmesinde görev olarak metastazı desteklediği gösterilmiştir (80). Kolon kanseri, meme kanseri ve gliomada miR-21, -143 ve -182 hücre invazyon ve migrasyonunu arttırmaktadır (81, 82). miR-143'n ayrıca hepatoselüler karsinomun kötü prognozuna neden olduğu bilinmektedir (81). miR-141 ise pankreas kanserinde metastazı desteklediği gösterilmiştir (83).

2.2.4. Pankreas Kanserinde mikroRNA'ların Rolü

Birçok çalışmada miRNA ekspresyonlarının anormal ifadesi, çeşitli kanser türlerinde tümör oluşumunun nedeni ya da sonucu olarak gösterilmiştir. miRNA'ların ekspresyonlarındaki düzensizlik; kontrolsüz hücre proliferasyonu, tümör baskılayıcı sistemlerden kaçış, anjiogenez ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir. Pankreas kanserini de içine alan pek çok kanser türünde miRNA'lar ile ilgili çalışmalar

yapılmaktadır. Örneğin sağlıklı bireylerden alınan dokular ile pankreas kanseri hastalarından alınan dokular karşılaştırıldığında, kanser dokularında eksprese edilen miRNA'lar ile sağlıklı dokularda eksprese edilen miRNA'lar arasında anlamlı derecede bir fark olduğu anlaşılmıştır. Bu bulgular ile miRNA'ların, pankreas kanserinin teşhisinde ve anti-kanser tedavilerinde kullanılabilir umut vaad eden biyobelirteçler olabileceği literatüre geçmiştir (84, 85). Sağlıklı ve hasta bireylere ait karşılaştırma analizlerinin yanı sıra diğer bir çalışmada, PDAC dokusu ile komşu normal pankreas dokusu karşılaştırıldığında 158 miRNA'nın farklı şekilde eksprese edildiği bulunmuştur (86). Benzer şekilde PDAC ve normal pankreas dokularının formalinle fikse edilip parafine gömülen dokular üzerinde yapılan çalışmada ise 43 miRNA'nın ekspresyonunun arttığı, 41 miRNA'nın ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (87). Bu çalışmaların ışığında miR-21 ve miR-155'in anormal ekspresyonu ile pankreas kanserinin gelişimi arasında bir ilişki olduğu anlaşılmıştır (88).

Sağlıklı ve tümör dokularının karşılaştırmaları ile birlikte dolaşımdaki miRNA'ların ekspresyonel düzensizliği ile ilgili de çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmalarda, pankreas kanserinin gelişiminden metastazına kadar geçen süreçte miRNA'ların rolü olduğu gösterilmektedir. Bu süreçte farklı aşamalarda roller üstlenen miRNA'lar hakkında yeterli bilginin elde edilmesi, kanser prognozunun moleküler seviyede anlaşılabilmesini sağlayarak pankreas kanserinin tedavisine katkıda bulunacaktır.

Pankreas kanseri gelişiminde miRNA'ların hücre proliferasyonunda, apoptozunda ve metastazında etkin rol oynadığı gösterilmiştir. Onkogenik miRNA'ların aşırı ekspresyonu, tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunu negatif yönde etkileyerek pankreas kanserinde hücre proliferasyonunun artmasına sebep olmaktadır. Hücre proliferasyonunun kontrolsüz artması kanser gelişiminin kaçınılmaz nedenidir. Hücre siklusunun düzenlenmesinde rol alan CDK'in inhibitörü olan CDKN1B geninin translasyonu, miR-221'in aşırı ekspresyonundan etkilenerek pankreas kanserinde hücre proliferasyonunun artmasına neden olur. Bu şekilde miR-221'in aşırı ekspresyonu, hücre siklusu kontrol mekanizmasını inhibe eden genin ekspresyonunu arttırarak CDK'nin görevini yerine getirememesine sebep olur ve hücre siklusunun

kontrol edilememesine yol açar (89, 90). Diğer bir çalışmada, pankreas kanserinde, hücre proliferasyonu, invazyonu ve angiyojenezi düzenlenmesinde rol oynayan miR-424-5p'nin aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (91). miR-203 ekspresyonunun azalması ise hücreleri G-1 evresine iterek hücre proliferasyonunun artmasına neden olmaktadır (45). Ayrıca miR-203 ekspresyon artışı ile hücre döngüsünün durduğunu buna bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığını ve apoptozun indüklendiğini gösteren çalışmalar miR-203'ün tümör baskılayıcı bir rol üstlendiğine işaret etmektedir. (92). Dolayısıyla miRNA ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerin hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin oldukça önemli olduğu anlaşılmaktadır.

Pankreas kanseri gelişiminde önemli rol oynayan K-RAS onkogeninin ekspresyon artışında miR-143, let-7-d ve miR-126'nın aşırı ekspresyonu söz konusudur. Bu miRNA'lar, kanser hücre proliferasyonunun artmasına katkıda bulunur (93, 94). Pankreas kanserinde miRNA ekspresyon paternleri, belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle pankreas kanseri tanısında miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılması yeni umutlar vaat etmektedir.

DNA'da meydana gelen hasarların doğrultusunda normal hücreler bu hasarları onarmaya ya da apoptoza giderken, kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam ederler. Apoptozis hücre döngüsü gibi miRNA'lar aracılığı ile düzenlenerek indüklenmekte ya da inhibe edilmektedir. Pankreas kanserinde, miR-24, Bcl-2 ailesinin antiapoptotik proteini ile ilişkili olan BIM ekspresyonunu düzenleyerek tümör oluşumunu indükler (95). DNA'da meydana gelen hasarın onarılması için ya da hücrenin apoptoza gitmesi için sinyaller veren p53 geni ile miR-155 arasında negatif korelasyon olduğu, miR-155'in aşırı ekspresyonu aracılığıyla p53 geni baskılanarak pankreas kanserinde apoptozun baskılandığı bulunmuştur. (96). Benzer şekilde miR-23a, apoptozun düzenlenmesinde görev alan sitokrom c ve kaspaz 9 gibi önemli molekülleri aktive eden APAF1'i baskılayarak hücrenin apoptoza gitmesini engeller ve hücre proliferasyonunun artmasına yol açar (97).

Pankreas kanserinde miRNA'lar, hücre döngüsü ve apoptozisine ek olarak çok aşamalı süreçler olan metastaz ve invazyonda da etkin rol oynamaktadır. Metastatik kanser hücreleri bazal membrandan ayrılıp başka bir organa invaze olurken; EMT

olarak adlandırılan morfolojik değişiklikler meydana gelir. EMT’de mezenkimal fenotipe sahip bu hücreler hareket kabiliyeti kazanarak kan ya da lenf damarları içine girerler.

Pankreas kanseri hücrelerinin, EMT sürecinde E-kaderin azalırken, N-kaderin artar. EMT sürecini düzenleyen miR-200 ve miR-203, tümör baskılayıcı özellik gösterirken; miR-208 onkojeniktir. E-kaderin baskılayıcılarından olan ZEB1 ve SIP1 ile aralarında negatif korelasyon bulunan miR-200 ailesinin (miR-141, miR-429, miR-200a, miR-200b ve miR-200c) EMT’yi düzenlediği gösterilmiştir (45). Pankreas kanserinde miR-200 ailesinin ekspresyonunda meydana gelen azalma, ZEB1 ve SIP1’in artmasına neden olur ve EMT indüklenir. Benzer şekilde miR-203 ekspresyonunda meydana gelen azalma pankreas kanser hücrelerinin invazif özellik kazandırarak metastazını uyarır (98). Ayrıca miR-208’in aşırı ekspresyonu da E-kaderin ekspresyonunun azalmasına sebep olur ve EMT sürecini aktive eder.

EMT sürecinin haricinde invazyon ve metastazda rol oynayan miRNA’lar da mevcuttur Metastaz baskılayıcı transkripsiyon faktörlerinden olan HOX faktörleri (HOXB1, HOXB2 ve HOXA1) miR-10a’nın aşırı ekspresyonu ile inhibe olurlar. Böylece metastaz baskılanamaz, miR-10a pankreas kanserinde onkogen olarak davranır (99). Metastaz promotörü olan Smad3 proteini ile miR-34 ekspresyonu arasında negatif korelasyon bulunur. miR-34 ekspresyonunun azalmasıyla Smad3 ekspresyonu artar. Smad3 ekspresyonunun artmasıyla metastaz desteklenmiş olur (100). Bununla birlikte miR-143, K-RAS, MMP-2 ve MMP-1 gibi onkojenik özellik gösteren genleri direkt olarak hedefler. Pankreas kanseri hücrelerinde miR-143 ekspresyonunun arttırılmasıyla, K-RAS, MMP-2 ve MMP-1 ekspresyonlarının ve protein düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bu durum miR-143 ile onkojenik genlerin arasında negatif korelasyon olduğunu gösterir. miR-143 ekspresyonunun azalması sonucunda tümör büyümesi artar, invazyon ve metastaz desteklenmiş olur (95). Bu çalışmalar ile pankreas kanserinde miRNA-aracılı yapılan tedavilerde invazyon ve metastazın baskılanarak, sağkalımın artmasına katkı sağlanabileceği belirtilmektedir.

Pankreas Kanserinde Rol Alan Sinyal İletim Yolaklarının miRNA'lar Tarafından Düzenlenmesi

Pankreas kanserinde miRNA'lar, bir kanser hücresinin oluşumunda, çoğalıp tümör dokusunu oluşturmasında ve bu tümör dokusundan ayrılan hücrelerin başka bir organda sekonder tümör oluşmasına kadar geçen süreçte fonksiyon göstermektedir. Bir miRNA'nın hedeflediği birden fazla gen olduğu için, miRNA ekspresyonunda meydana gelen düzensizlikler gen ekspresyonlarının artmasına ya da azalmasına neden olur. Gen ekspresyonlarındaki bu düzensizlik, birçok hücre içi sinyal yolağının fonksiyonel olarak değişimine yol açar.

Bu sinyal iletim yolakları hücre içi sinyalizasyonda oldukça önemlidirler. Bir hücre sinyal vereceği zaman ligand adı verilen moleküller sentezler. Sentezlenen bu ligandlar sinyalin hedefindeki diğer hücrede bulunan reseptörlerine bağlanarak verilen sinyalin etkinleşmesini sağlar. Bu hücre içi sinyal yolaklarına meydana gelen genetik veya epigenetik değişiklikler kanser gelişimi ile ilişkilidir. Pankreas kanserinde miRNA'ların birçok sinyal yolağında fonksiyon gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu sinyal yolakları arasında K-RAS, PI3K/AKT, JAK/STAT, WNT/ β -Catenin ve TGF- β sinyal yolakları yer almaktadır.

K-RAS sinyal yolağı; Ras geni ve gen ürünü ilk kez sıçanlarda retrovirüsler ile oluşturulan sarkom tümörlerinde (Ras=rat sarcoma) bulunmuştur. Ras protein ailesinin reseptörleri, G proteinleri (guanin nükleotid-bağlayıcı proteinler) ile eşleşebilmektedir. G proteinleri, dışarıdan gelen sinyalleri hücre içine ileten proteinler olarak bilinmektedir. Bu nedenle GTPazlar'dan gelen sinyalleri başka bir sinyale dönüştürme özelliğine sahiptirler. Ras proteinleri hücre membranının bir ucundan diğer ucuna bağlantı kurarak sinyallerin geçişini sağlamaktadırlar. Memelilerde H(arvey)-ras, K(irsten)-ras ve N(euroblastoma)-ras olmak üzere 3 ayrı alt tip bulunmaktadır. Bu genler, hücre içi sinyalizasyonda, proliferasyonunda, farklılaşmada ve hücre iskeleti oluşumunda görev almaktadırlar. Bu genlerin mutasyona uğraması sonucunda birçok tümör oluşmaktadır. Pankreas tümörlerinin %90'ı K-ras mutasyonu ile ilişkilidir. Pankreas kanserinde K-RAS geni ile direkt olarak ilişkili miRNA'lar bulunmuştur (101, 102, 103). Bu miRNA'lar arasında miR-143, let-7-d ve miR-126 bulunmaktadır.

Pankreas kanserinde, K-RAS gen ekspresyonunun artışına Let-7 ailesinden olan miRNA'ların ekspresyonlarındaki azalmanın, sebep olduğu gösterilmiştir (101). Ayrıca miR-217 ekspresyonunun azalması K-RAS gen ekspresyonunun artması ile ilişkilidir. Buna karşın, miR-217 ekspresyonunun arttırılması ile K-RAS ekspresyonu azalmış ve pankreas kanser hücrelerinin proliferasyonu inhibe edilmiştir (102). Diğer örnek ise miR-96'dir ve miR-96 ekspresyonunun arttırılmasıyla K-RAS ekspresyonu azalmış olup; proliferasyonu ve invazyonu inhibe edilmiştir (103).

Pankreas kanserinde, miR-21, miR-181a ve miR-221 PI3K/AKT sinyal yolağı ile ilişkili genleri fonksiyonel olarak etkilemektedir. Bu sinyal iletim yolağı, EGFR gibi hücre dışı büyüme faktörlerinin transmembran reseptör tirozin kinazlara (RTK'ler) bağlanmasıyla aktive olur. Bu bağlanmanın sonucunda fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) etkinleşir. PI3K, fosfataz ve tensin homologu (PTEN) tarafından regüle edilmektedir. AKT ise serin/treonin kinaz fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforillenerek aktive olmaktadır ve ve fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) sinyal yolagında rolü olan mTOR ile düzenlenmektedir. (104). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, hücre proliferasyonu ve hücrenin hayatta kalması için önemlidir. (52, 105, 106, 107,108, 109). miR-21, miR-181a ve miR-221, PI3K/AKT sinyal yolağı ile ilişkili tümör baskılayıcı gen olan PTEN'i hedefleyerek PI3K/AKT sinyal yolağını dolaylı olarak etkilemektedirler (52, 105, 106, 107). miR-375, PI3K/AKT yolundaki bir kinaz olan PDK1'in (Piruvat dehidrojenaz lipoamid kinaz izozimi 1) mRNA transkriptini hedefleyerek kanser prognozunu pozitif yönde etkiler ve malign gelişimi baskılar (108, 109).

JAK/STAT sinyal yolağı; JAK (Janus Kinazlar) sitokin reseptörleri ile birleşen tirozin kinaz ailesidir. Bu reseptörlere ligand bağlandığında tirozin üzerinde gerçekleşen fosforilasyonla Sinyal Transdüserleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri (STAT) ailesinin üyeleri aktifleşir. Etkinleşen STAT'lar dimerler oluşturarak hücre çekirdeğine yerleşirler. Oluşan sinyal ile hedeflenen genlerin yanıt reseptörlerine bağlanarak bu genleri transkripsiyonel olarak düzenlerler. JAK/STAT yolağı sitokinler ve büyüme faktörleri ile uyarılır. JAK aktivasyonu, hücre proliferasyonunu, göçünü ve apoptozu uyararak hücreleri fonksiyonel olarak etkilemektedir. JAK/STAT yolağı çeşitli sitokinlerle negatif ve pozitif yönde düzenlenmektedir (110).

Pankreas kanserinde, JAK/STAT yolağını hedefleyerek hücrenin yaşamsal fonksiyonları üzerinde değişikliğe sebep olan miRNA'lar saptanmıştır. Bir sitoplazmik tirozin kinaz geni olan Janus kinaz 2 (JAK2), 9. kromozomun kısa kolunda bulunan bir gendir. JAK2 ekspresyonundaki artış bazı onkogenlerin aktivasyonuna sebep olmaktadır. Pankreas kanserinde miR-216, JAK2 ekspresyonu inhibe ederek JAK2 ekspresyonu ile aktive olan onkogenlerin inhibisyonuna sebep olur. Bunun sonucunda tümör baskılayıcı bir rol oynayarak tümör büyümesini azaltıp hücrelerin apoptoza gitmesini sağlar (111, 112). Buna karşın, onkojenik bir miRNA olan miR-155, JAK/STAT yolunda tümör baskılayıcı rol oynayan SOCS1 gen ekspresyonu hedefleyerek bu geninin inhibisyonuna neden olur. Bunun sonucunda STAT3 uyarılır ve pankreas kanseri hücrelerinde invazyon ve metastazı destekleyerek, kanser prognozunu kötü yönde etkiler (113).

WNT/ β -Catenin sinyal yolağı; embriyonik gelişim ve normal yetişkin homeostazisi için hücre proliferasyonu, sağ kalım, hücre yenilenmesi ve farklılaşmada fonksiyonel rol oynar. Bu sinyalizasyon, Wnt ligandının Frizzled (Fz) reseptörüne ve Fz'nin ko-reseptörü olarak tanımlanan düşük yoğunluklu protein olan LRP5/6 proteinine bağlanması ile birlikte başlar ve sinyal yolağının aktivasyonunda bu üçlü Fz-Wnt-LRP5/6 kombinasyonu gerekmektedir (114). miRNA'lar, WNT/ β -Catenin yolağının düzenleyicilerini hedefleyerek pankreas kanseri tümörigenezinde görev almaktadır. FRATL, LRP-6, FZD4 ve FZD5, WNT sinyalinin aktivasyonunu arttıran düzenleyicilerdendir. miR-29c, doğrudan bu düzenleyici molekülleri hedefler. miR-29c'nin inhibisyonu bu düzenleyici moleküllerin aktivasyonuna sebep olarak WNT/ β -Catenin yolağının anormal ifadesi ile sonuçlanarak pankreas kanserinin gelişimine neden olur (115). Benzer şekilde, miR-23a ve miR-24 ekspresyonu da TMEM92, HNF1- β ve FZD5'in ekspresyonlarını doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyerek pankreas kanseri gelişiminde önemli rol oynar (116).

TGF- β sinyal yolağı; kaskadlar şeklinde ilerler ve sinyalizasyon ligandın reseptörlere bağlanması ile başlar. Hücre membranında TGF β tip I (TbRI) ve TGF β tip II (TbRII) olmak üzere iki tip reseptör bulunur. TbRI ve TbRII reseptörleri serin/treonin kinaz özellik göstermektedir. Ligand önce tip II reseptörüne bağlanır ve reseptörün kinaz aktivasyonu ortaya çıkar. Bu aktivasyonla tip I reseptörün yapısında

bulunan GS (glisin, serin) bölgesi fosforillenir. Aktive edilen TbRI sitozolde bulunan 8 alt tipi bulunan Smad proteinlerini fosforiller ve bu protenler DNA'ya bağlanarak birçok genin transkripsiyonunu düzenler.

Tümör baskılayıcı özellik gösteren SMAD4 ekspresyonunun pankreas kanseri hastalarının %55'inde inaktive olduğu bilinmektedir (117). miR-421 ve miR-483-3p onkojenik özellik göstererek SMAD4'ü doğrudan hedefleyip, SMAD4 ekspresyonunda inhibisyona neden olarak pankreas kanserinin gelişmesine neden olmaktadır (118). Pankreas kanserinde azalan SMAD4 ekspresyonu, tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-494 ekspresyonunun azalmasına neden olur. miR-494 ekspresyonu ile aralarında negatif korelasyon bulunan FOXM1 ve β -katenin, miR-494 ekspresyonunun azalmasıyla ekspresyonları artarak pankreas kanserinin gelişimini indükler (119).

Pankreas Kanserinde miRNA'ların Diyagnoz, Prognoz ve Terapötik Hedefleme Açısından Önemi

Pankreas kanseri genellikle erken evrelerde semptom göstermediğinden dolayı kötü prognozla ilerlemekte ve buna bağlı olarak da sağkalım oldukça düşük tespit edilmektedir. Dolayısı ile erken teşhis için spesifik biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Pankreas kanserinin tanı ve tespit edilmesinde genellikle kan ya da dokudan alınan biyopsiler kullanılmaktadır. Karbonhidrat antijeni 19-9 (CA19-9), pankreas kanserinin tanısında kullanılan onaylanmış bir kan antijenidir. Ancak düşük özgüllük göstererek diğer hastalıklarda da spesifik olmayan ekspresyonu olduğu için pankreas kanserinin tanısal uygulamasını kısıtlamaktadır (120). Bu nedenle pankreas kanserinin diyagnozu için daha özgül ve daha güvenilir tanısal bilgiler verecek yeni tümör biyobelirteçlerin keşfi oldukça önemlidir. Bu anlamda miRNA'ların plazmada stabil ve kolaylıkla saptanabilir olmalarından dolayı tanısal biyobelirteç olarak kullanılabilirleri devam eden araştırma konuları arasındadır.

Pankreas kanserinin gelişiminin farklı evrelerinde miRNA ekspresyonlarındaki değişiklikler izlenerek çalışmalar yapılmıştır (121, 122). Sağlıklı bireylerden ve

pankreas kanseri hastalarından alınan kan örnekleri ile yapılan bir çalışmada elde edilen miRNA ekspresyon profili (miR-22, miR-642b ve miR-885-5p), pankreas kanserine erken evrede tanı konulmasına yardımcı olabileceğini açıkça göstermektedir (123). Başka bir çalışma ise, miR-21, miR-23a, miR-31, miR-100, miR-143, miR-155, miR-2214'ün aşırı ekspresyonu ile miR-148a, miR-375 ve miR-217'nin azalmış ekspresyon profilinin, sağlıklı bir birey ile pankreas kanseri hastalarını çok net bir şekilde birbirinden ayırdığını göstermiştir (124). Bu çalışmaya ek olarak, sağlıklı bireylerin plazmasına göre pankreas kanseri hastaların plazmasında miR-21, miR-155, miR-196a ve miR-210'un aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (125). Benzer şekilde, sağlıklı bireyler ve pankreas kanseri hastalarından alınan plazma örneklerindeki miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında pankreas kanseri hastalarının plazmasında miR-192 ve miR-18a aşırı ekspresyonları dikkat çekmiştir (126, 127). PanIN lezyonlarındaki 700 farklı miRNA ekspresyonlarının kıyaslandığı kapsamlı bir çalışmada, 35 farklı miRNA'nın anormal ifade gösterdiğini bu miRNA'ların 24 tanesinin artan, 6 tanesinin ise azalan ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir. Bu miRNA'ların içinde ise PanIN-3 lezyonlarını tanımlanmasında miR-196b'nin potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur (125).

Bu verilere ek olarak pankreas kanseri hastalarının plazmasında taranan 735 farklı miRNA arasında, miR-1290 umut verici bir biyobelirteç olarak belirtilmiştir (128). Pankreas kanserinin tanısında CA19-9 antijeni ile miR-1290, miR-16 ve miR-196a ekspresyonlarının

kombine olarak değerlendirilmesi pankreas kanserinin daha özgül tespit edilmesine olanak sağlayacaktır (128,129).

Kanser hücreleri, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara direnç göstererek ilaçların anti-kanser özelliklerini azaltmaktadırlar. miRNA'lar ilaç direncinde de önemli rol oynamaktadırlar. miRNA ekspresyonlarının anormal ifadeleri, kanser hücreleri tarafından ilaçlara karşı geliştirilen direnci arttırabilir ya da durumu tam tersine çevirerek direncin ortadan kalkmasını sağlayıp kanser hücrelerini ilaca karşı duyarlı hale getirebilirler. Çalışmalar, miRNA ekspresyonlarının kanser hücrelerini kanser ilaçlarına duyarlı hale getirmekle kalmayıp ilaç direnci için tanısal biyobelirteçler olarak da görev aldıklarını göstermektedir (130). Örneğin; pankreas

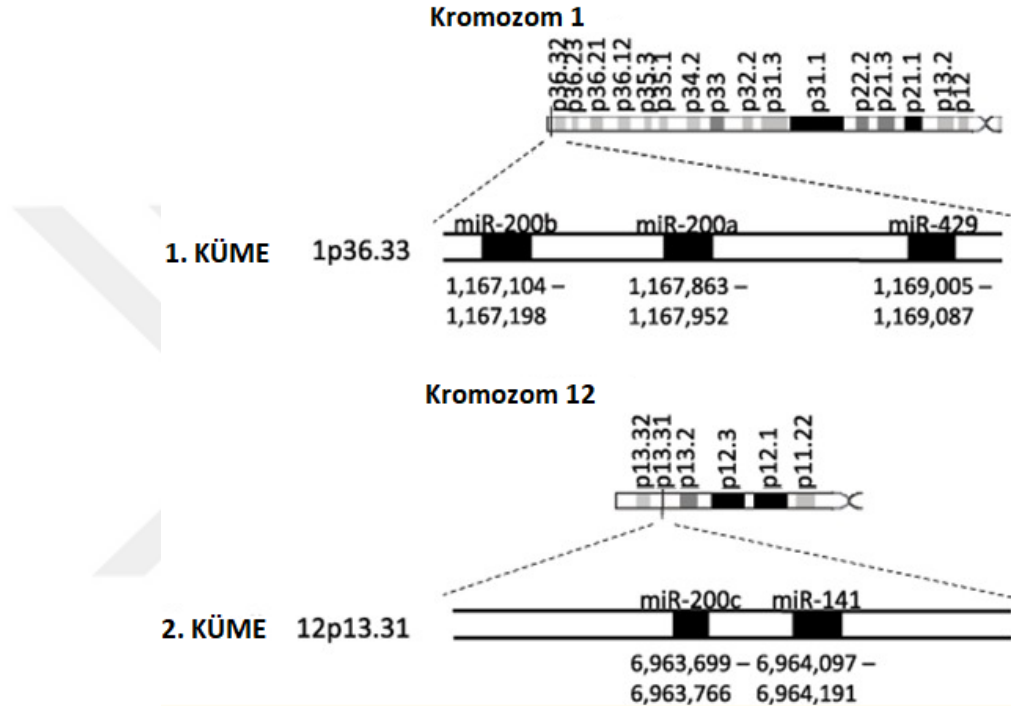
kanserinde miR-142-5p ekspresyonunun inhibisyonu gempitabin ilacına karşı gösterilen direnç ile korelasyon göstermektedir. Bu durumda miR-142-5p ekspresyonu arttırıldığında, gempitabine karşı oluşturulan direnç ortadan kalkar ve sağkalım artar (131). Bir diğeri miRNA, miR-320c' nin aşırı ekspresyonu ise pankreas kanserinde gempitabine karşı oluşturulan direncin nedenlerinden biridir. miR-320c ekspresyonu inhibe edilerek pankreas kanserinde gempitabin direnci engellenerek prognoz iyi yönde etkilenebilir (132). Pankreas kanseri hastalarında miR-222, miR-203, miR-155, miR-210 ekspresyonları ile sağkalım arasındaki ilişkinin incelendiği başka bir çalışmada ise, bu 4 farklı miRNA'nın aşırı ekspresyonunun mortaliteyi 6. 2 kat arttırdığı gösterilmiştir (133).

Pankreas kanserinin miRNA'lar ile terapötik tedavisi, tümör baskılayıcı özellik gösteren miRNA ekspresyonlarını arttırıp bu miRNA'ların hedefindeki onkojenik genlerin ekspresyonlarını inhibe edilerek gerçekleştirilmelidir. Pankreas kanserinde ekspresyonları azalan tümör baskılayıcı miRNA'ları taklit eden ilaçların tedavide kullanılarak onkojenik genleri hedeflemesi prognozu iyi yönde etkileyebilecektir. Bazı çalışmalarda pankreas kanseri hücrelerine transfekte edilen tümör baskılayıcı miRNA'ların, kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettikleri, bu hücreleri kemoterapi ya da radyasyon tedavilerine duyarlı hale getirerek maligniteyi azalttıkları gösterilmiştir. Örneğin; miR-143/145'in virüsler aracılığıyla pankreas kanseri hücrelerinde transdüksiyonu gerçekleştirilmiş ve tümör büyümesi inhibe edilmiştir (134). miR-143'ün pankreas kanseri hücrelerine adenovirüs aracılığıyla transdüksiyonun yapıldığı bir diğeri çalışmada, metastazın bloke edilerek prognozun iyi yönde etkilendiği gösterilmiştir (135).

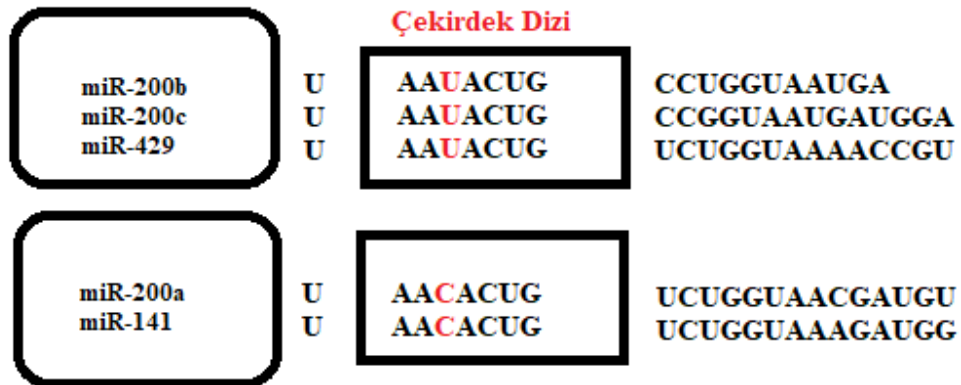
Pankreas Kanserinde miR-200a'nin Rolü

miR-200 ailesi kromozom konumlarına bağlı olarak iki kümeye ayrılır ve beş üyeden oluşur. Bu kümeler iki ayrı kromozom üzerinde yer alır. miR-200a, miR-200b ve miR-429 kromozom 1p36 üzerinde yer alan miR- 200ba / 429 kümesi ile miR-200c ve miR-141 12p13 kromozomunda yer alan 200c / 141 kümesi olarak adlandırılır (Şekil 2.4) (136). miRNA'lar, 5' bağlanma bölgesinde yer alan seed-çekirdek-tohum dizileri ile hedef genlerinin 3' UTR (untranslated region)'lerine bağlanır. Bu nedenle çekirdek dizileri gen ekspresyonu üzerinde önemli yere sahiptirler. Benzer çekirdek

dizileri içeren farklı kümelere ait olan miRNA'lar, benzer hedef profillere sahip olarak aynı biyolojik roller oynayabilirler. miR-200 ailesi üyeleri, çekirdek dizilerinin benzerliklerine göre ise iki fonksiyonel gruba da ayrılmaktadırlar (Şekil 2.5). miR-200ba / 429 AAUACUG çekirdek dizisini içerirken, 200c / 141 AACACUG çekirdek dizisini içermektedir. İki küme arasında yalnızca bir nükleotit değişiklik göstermektedir.



Şekil 2.4. İki ayrı kromozoma lokalize olan miR-200 ailesi üyeleri (136).



Şekil 2.5. miR-200 ailesi üyelerinin nükleotit dizilimi (136).

Epitel dokular, miR-200 ailesi bakımından oldukça zengindir (137). Normal epitel hücrelerinde yüksek oranda eksprese olan miR-200 ailesi, mezenkimal orijinli

normal fibroblast hücrelerinde eksprese edilmezler. miR-200 ailesinin ekspresyonu promotörleri tarafından düzenlenir. Promotörler, genlerin transkripsiyonunu başlatan ilgili DNA parçalarıdır. Genellikle hedef genlerinin transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın kısımlarda ve genle aynı DNA iplikçığı üzerinde bulunurlar. miR-200c/-141 kümesinin promotör bölgesinin hipermetilasyon ile, miR-200b/-200a/-429 kümesinin promotör bölgesinin ise histon modifikasyonları yoluyla düzenlendiği gösterilmiştir (138, 139, 140). miR-200 ailesinin promotör bölgeleri, çinko *finger e-box bind homeobox 1* ve *2* sırasıyla; (ZEB1), (ZEB2)' ye ve özgüllük proteini 1 (SP1) ve p53 transkripsiyon faktörüne bağlanmaktadır.

miR-200 ailesinin düşük ekspresyonları, yüksek insidans gösteren hemen hemen tüm kanser türlerinde tespit edilmiştir. miR-200 ailesinin malign özellik gösteren hücreleri inhibe etmede ve tümör başlamasını engellemede önemli roller oynadığını gösteren birçok çalışma vardır. miR-200 ailesinin aşırı ekspresyonunun kanserojen madde olan arsenik ile maruziyet sonrası oluşan malign hücre oluşumunu inhibe ederek tümör oluşumunu önlediği gösterilmiştir (141). Diğer bir kanserojen madde olan tütüne maruziyet sonrası oluşan malign hücrelerde miR-200 ailesinin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. miR-200 ailesinin ekspresyonları arttırılarak yapılan benzer bir çalışmada ise tütüne maruziyet sonrasında epitel hücrelerin morfolojilerinin korunduğu ve koloni oluşumunun önüne geçildiği gösterilmiştir (142). Bu iki farklı çalışmada kanserojen maddelerin miR-200 ailesinin promotör bölgelerinde metilasyonu arttırarak, miR-200 ailesinin ekspresyonlarını susturduğu gösterilmiştir. Malign hücreler kontrolsüz çoğalarak tümörü oluştururlar. Tümörler belirli bir büyüklüğe ulaştığında yeterli besini alamadığı için yeni kan damarlarını oluşturmaya yani anjiyogeneze ihtiyaç duyarlar. miR-200 ailesinin anjiyogenezi engelleyebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu aileye ait üyelerden olan miR-200b, anjiyenez kaskadının belirleyici ligandı olan vasküler endotelial büyüme faktörü A'yı (VEGFA) doğrudan hedefleyerek, bu kaskad sisteminde önemli bir rol oynamaktadır (143). miR-200 ailesinin üyeleri, epitel- mezenkimal geçişi (EMT) en etkin düzenleyen miRNA'lardır (144). Buna ek olarak miR-200 ailesi üyelerinden olan miR-200b, -200c, -141 ve -429'un düzensiz ekspresyonları, kanser hücrelerinin sekonder organa invaze olmasını sağlayan mezenkimal-epitel geçiş de (MET) neden

oldukları gösterilmiştir (145). miR-200 ailesinin, EMT sırasında azalan E kaderin ekspresyonu düzenleyerek EMT inhibisyonunu indüklediği de gösterilmiştir (6).

2.3. miR-200a'nın Hedef Genlerinden Olan Mitokondriyal Transkripsiyon Faktör A (TFAM)

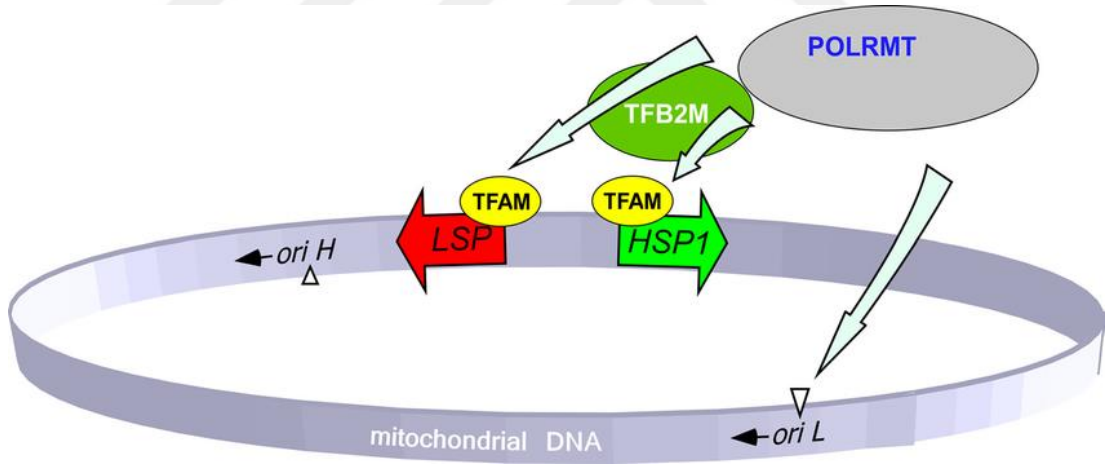
Hücreler canlılığını devam ettirmek ve metabolik aktiviteleri için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Enerji ihtiyacı canlı türlerine, hücrenin yapısına ve işlevine göre değişkenlik göstermektedir. Hücreler, adenozin trifosfat (ATP) adı verilen molekül ile enerjilerini üretmektedirler (146). Enerji üretimi ökaryotik hücrelerde mitokondri adı verilen kompleks bir organel tarafından gerçekleştirilmektedir. Mitokondrinin şekilleri hücreden hücreye farklılık göstermekle birlikte ovalden çubuğa kadar değişkenlik göstermektedir. Şekillerine ek olarak sayıları da hücreden hücreye farklılık gösterir. Bazı hücreler tek sayıda mitokondri içerirken, kas ve sinir hücreleri gibi enerji ihtiyacı fazla olan hücrelerde çok sayıda mitokondri bulunmaktadır.

Mitokondri dış zar, iç zar, zarlar arası (periferal) bölge ve matriksden oluşmaktadır. Dış zar dışta bulunduğu için iç zara göre daha kalın yapıdadır, üzerinde porin adı verilen taşıyıcı proteinler bulunmaktadır. Porinler, mitokondri içerisine alınacak su ve iyon gibi maddeleri taşırlar. İç zar ise dış zara göre daha seçici geçirgendir. İç ve dış zar arasında kalan bölgeye periferal bölge adı verilir. İç zar matrikse doğru girintiler yaparak krista adı verilen yapıları oluşturur. İç zar üzerinde elektron taşıma sisteminde (ETS) görev alan proteinler bulunmaktadır. Bu sebeple enerji ihtiyacı fazla olan hücrelerde krista sayısı da fazladır. Matriks ise genomik yapının ve oksidatif enzimlerin yoğun olduğu bölgedir (147). Mitokondriler, kendilerine ait ribozom, DNA ve RNA gibi genetik materyal bulundurmasıyla diğer organellerden ayrılmaktadır. Mitokondri hücrelerde enerji üretmekle kalmaz, aynı zamanda apoptoz, kalsiyum homeostazı, doğal immünite sinyalleri ve hücre yaşlanması gibi fizyolojik süreçlerde de görev alırlar. Bu olaylar dışında pirimidinler, aminoasitler, fosfolipitler ve nükleotitler gibi moleküllerin yapımında, steroid sentezi ve hormonal sinyalizasyon oluşumunda da görev alırlar (148, 149).

Kanser hücrelerinin metabolik aktiviteleri, normal hücrelere kıyasla daha farklıdır. Normal hücreler ile kanserli hücreler arasındaki bu metabolizma farkı

taşımakla görevlidirler (153). Oksidatif fosforilasyon sonrası ortaya çıkan reaktif ürünler mtDNA'nın bozulmasına sebebiyet vermektedir. mtDNA, nDNA gibi histon proteinlerle korunmaz. mtDNA, replikasyon öncesi ya da sırasında tamir mekanizması açısından sınırlı olduğu için replikasyon sonrası oluşan ipliklerde hataya eğilim fazladır. Bu yüzden mtDNA mutasyonlara açıktır.

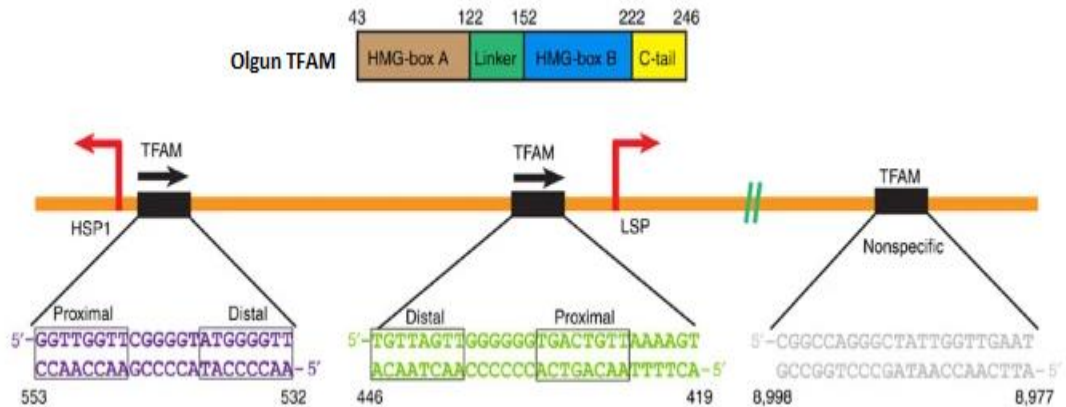
İnsan mitokondrilerindeki transkripsiyon, yapısal olarak T3 ve T7 bakteriyofajlarındaki RNA polimerazlara benzeyen mtRNA polimeraz (POLRMT) adı verilen DNA'ya bağımlı bir RNA polimeraz tarafından yürütülmektedir. Yardımcı proteinler olmadan promotör bölgeleri tanıyabilen bakteriyofaj polimerazların aksine POLRMT, işlem yapabilmesi için ek faktörlere ihtiyaç duymaktadır (Şekil 2.7). Transkripsiyonun başlaması, POLRMT'un mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM), mitokondriyal transkripsiyon faktörü B1 ve B2 (TFB1M ve TFB2M) (sırasıyla mtTFA, mtTFB1 ve mtTFB2 olarak da adlandırılırlar) ile etkileşimini gerektirmektedir (154).



Şekil 2.7. İnsan mitokondri DNA'sı transkripsiyonu için gerekli olan dört ana bileşen (154).

TFAM, nükleusda kodlanan bir proteindir. Bu protein memeli hücrelerinde çok miktarda bulunmaktadır, her bir mtDNA molekülüne başına yaklaşık 1.000 TFAM protein molekülüne üretilmektedir. Bu da mtDNA'nın her 16 bp'sinde bir TFAM molekülüne olduğunu göstermektedir (154). Bu mitokondriyal protein, mtDNA promotör bölgelerine sekansa spesifik olarak bağlanabilen, DNA'nın çözülüp, bükülebilmesi gibi işlemlerde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. mtDNA'nın nükleotidlerce çevrenmesinde de rol oynamaktadır (155). Mitokondriyal genomun

hafif iplikçik promotörü (*Light Strand Promoter*, LSP) ve ağır iplikçik promotörü 1'den (*Heavy Strand Promoter*, HSP1) gelen transkriptlerin üretiminde merkezi bir rol oynamaktadır (Şekil 2.10). Bu mitokondriyal transkriptler, oksidatif fosforilasyondan enerji üretimi için gerekli 13 temel bileşenini kodlarlar (156). Bu nedenle TFAM, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimi için gereklidir (157). LSP'deki TFAM bağlama bölgesi 22 baz çifti (bc) uzunluğundadır ve iki yarım bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.8). TFAM, iki adet *high mobility group box* (HMGB) içermektedir; HMGA ve HMGB B. İki HMGB bölgesi arasında, DNA'nın negatif yüklü omurgası ile etkileşime giren pozitif yüklü bir yüzeye sahip sarmal bir bağlayıcı bulunmaktadır. Her interkalasyon DNA'nın bozulmasına katkıda bulunarak LSP dizisinin U dönüşü yapmasını sağlar (Şekil 2.9). Ayrıca, TFAM'da bulunan C-terminal kuyruğu transkripsiyonel aktivasyonu başlatmaktadır (158). TFAM/LSP yapısında, karboksil terminali HMGB alanı, transkripsiyonel başlangıç bölgesinden uzaktaki yarım bölgeye bağlanır. C-terminali kuyruğu, HMGB'ye bitişik olduğundan, LSP DNA'sındaki U-dönüşü, C-terminali kuyruğunun transkripsiyonel POLRMT ve TFB1 ve 2'ye temas etmesini sağlar.

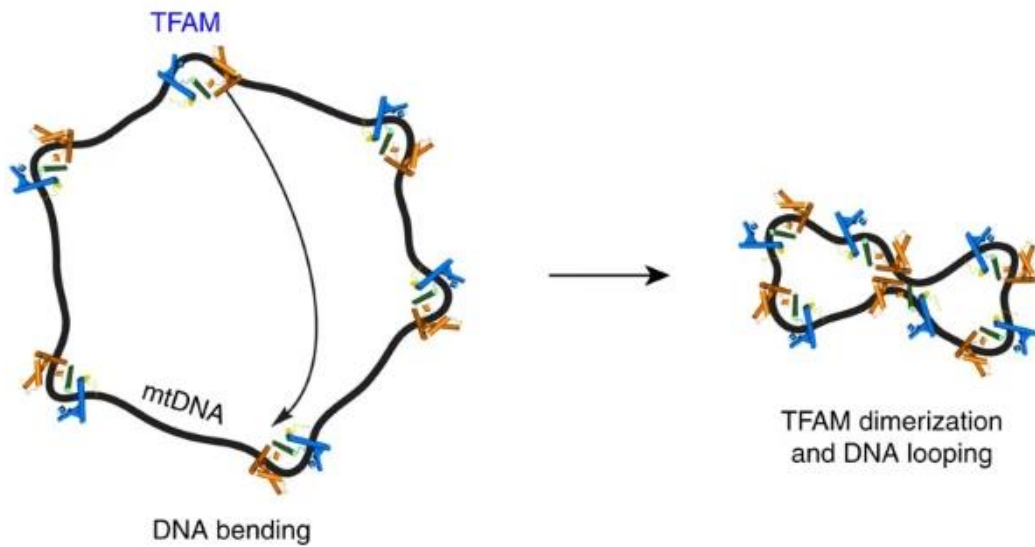


Şekil 2.8. TFAM'ın olgun formunun domain yapısı (155).

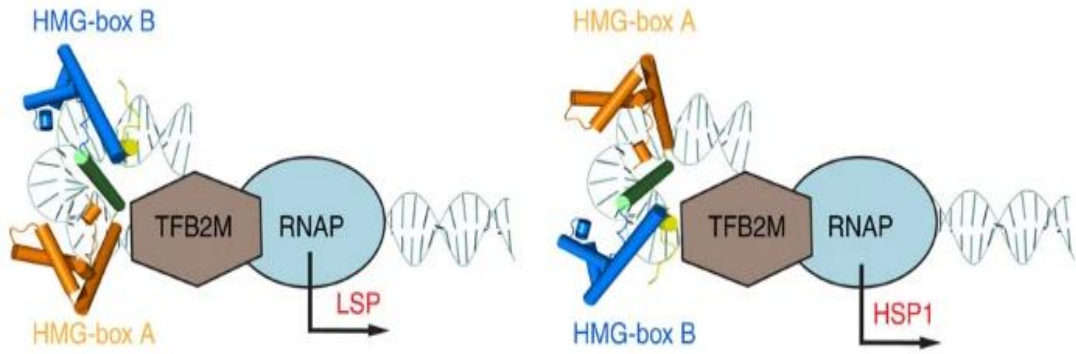
TFAM, gerçek bir mtDNA paketleme faktörünün kriterlerini sıkı bir şekilde yerine getirebilen nükleoid ilişkili tek proteindir. TFAM proteininin düşük veya yüksek ekspresyonu, mtDNA metilasyonunun azalmasına neden olmaktadır (159). DNA metilasyonu normal gelişim için gereklidir. Metilasyonda etkin elemanların baskılanması ya da aşırı ekspresyonu karsinogeneze yol açmaktadır. mtDNA metilasyonu genellikle kodlamayan D-loop ve gen başlangıç bölgelerinde (GSS)

bulunmaktadır (160). Genomda bulunan CpG dinükleotitleri, metilasyonun meydana geldiği en belirgin bölgelerdir. CpG bölgelerinin çok olması hayvan, mantar, protist ve bitki mitokondriyal genomlarında değişiklik olduğunu göstermektedir. HSP1’de CpG’nin metilasyonunu artırmak için TFAM, multimerizasyonu indükleyerek metillenmemiş DNA’ya kıyasla mtDNA’ya bağlanma afinitesini artırır.

mtDNA nükleoidlerinin protein dizilimi, aynı nDNA nükleozomlarındaki histonlar gibi, epigenetik ve translasyon sonrası modifiye edilebilmektedir. mtDNA’yı epigenetik olarak düzenleyen 50 farklı protein vardır. Bu proteinlerden olan TFAM, nDNA’daki histon proteinlere benzeyen tek proteindir. Bu nedenle mitokondriyal nükleoid modifikasyonları, TFAM modifikasyonları ile ilişkilidir. TFAM, asetillenme, fosforillenme gibi değişikliklerle modifiye olmaktadır. TFAM, HMGB1 içinde lizinle asetillenerek, farklı kinetik yollar aracılığıyla spesifik olmayan DNA ile etkileşime girmesinin azaldığı gösterilmiştir (161). Yine aynı çalışmada, TFAM’ın HMGB1’deki serin ile fosforilasyonunun, TFAM’ın hedef gen promotör bölgelerine bağlanmasını bloke ederek mtDNA transkripsiyonunun düzenlediği ortaya konulmuştur.



Şekil 2.9. mtDNA'ya bağlandıktan sonra, her TFAM molekülü bir U dönüşü uygulayarak, mtDNA'yı sıkıştırır (155).



Şekil 2.10. LSP ve HSP1 üzerindeki TFAM fonksiyonunun karşılaştırılması (155).

2.3.1. Kanserde TFAM'ın Rolü

Kanser hücreleri hayati fonksiyonlarını sürdürmek için hücrel metabolizmalarını yeniden düzenlerler. Bu nedenle atipik metabolik özellik gösterirler. Normal hücreler oksijen varlığında, glikozu pirüvata glikolizis yoluyla parçalar ve daha sonra oluşan pirüvatin büyük çoğunluğunu oksidatif fosforilasyon yoluyla mitokondride tamamen okside edip CO_2 'e dönüştürürler. Anaerobik koşullarda ise, normal hücreler glikolitik pirüvati mitokondrial oksidasyona yönlendirmeyip, onun yerine büyük ölçüde laktata indirgerler (162). Normal hücrelerin aksine, hızlı çoğalan tümör hücreler, 1 molekül glikozdan elde edilen ATP miktarının çok az olmasına rağmen glikozu aerobik ortamda laktata dönüştürürler. Bu olay Warburg etkisi olarak kabul edilir (163). Mitokondriyal disfonksiyon, Warburg etkisinin olası bir nedeni olarak görülerek birçok araştırmaya konu olmuştur. Mitokondriyal disfonksiyonun altında yatan moleküler mekanizmalar çeşitli tümör tiplerinde incelenmiştir.

mtDNA'nın transkripsiyonunda, başlatma (POLRMT, TFAM, TFB2B) ve uzamada (TEFM, MTERF1) yer alan birkaç gen vardır, ancak bugüne kadar sadece TFAM'deki mutasyonların insan hastalıklarına neden olduğu gösterilmiştir. Nükleus DNA'sı tarafından kodlanan TFAM, elektron taşıma zincirinin kritik bileşenlerini kodlayan mtDNA'nın transkripsiyonunda ve replikasyonunda önemli bir rol oynar. Bu yüzden TFAM, oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretimi için hayati bir önem taşımaktadır. TFAM, mitokondriyal transkripsiyon başlatma mekanizmasının temel bir bileşeni olarak ve mtDNA'yı mitokondriyal nükleoidlere paketleyen anahtar faktör

olarak ikili rolü nedeniyle memelilerde mitokondri fonksiyonunun önemli bir düzenleyicisidir (164).

HIF-1 α , hücrede hipoksik benzeri (Warburg etkisi) bir durumu destekler. HIF-1 α proteini, c-Myc ile etkileşime girerek, TFAM'ın c-Myc tarafından düzenlenen transkripsiyonunu azaltır (165). TFAM ekspresyon seviyesi, mtDNA kopya sayısını doğrudan kontrol etmektedir (166). TFAM-mtDNA oranı, hem mtDNA biyogenezini hem de homeostaz için kritiktir. TFAM-mtDNA oranındaki küçük değişiklikler bile mitokondriyal gen transkripsiyonunu ve mtDNA replikasyonunu etkileyebilmektedir (167). Bu nedenle kanser araştırmalarında TFAM ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Düşük TFAM/mtDNA oranı, mtDNA'nın kararsızlığına yol açarken yüksek TFAM/mtDNA oranı ise mtDNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bloke eder (168). mtDNA kopya sayısının artması, mitokondriyal transkripsiyonun inhibisyonuna ve solunum zinciri disfonksiyonuna neden olmaktadır (169). Mitokondriyal disfonksiyonu bulunan tümör hücreleri metabolik değişiklikler göstererek hayatta kalmaya devam ederler. Bu özelliği gösteren kanser hücreleri, biyoenerji gereksinimlerini sağlamak için genellikle glutamin metabolizmasından üretilen α -ketoglutarat'ı kullanırlar (170). Glikoliz reaksiyonlarından yoksun melanom hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, TFAM'ın, kanser hücrelerinin metabolik gereksinimlerini korumak için enerji metabolizmasını amino asit yollarına özellikle de glutamine doğru düzenleyebileceği gösterilmiştir (10).

TFAM ekspresyonunun artması, kolorektal kanserinin kötü prognozuyla ilişkili, glioma malignitesinin derecesi ile pozitif korelasyon göstermektedir (171, 172). Küçük hücre dışı akciğer kanserinde TFAM ekspresyonu inhibisyonunun, hücre biyoenerjiyi azaltıp, ROS aracılı JNK/p38, MAPK ve p53/p-p53(ser15)/p21 sinyal yolunu aktive ederek tümör oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Benzer şekilde baş boyun kanseri hücrelerinde TFAM ekspresyonu inhibisyonunun, indüklenmiş ERK1/2 ve Akt aktivitesinin baskılanmasını sağlayarak hücre canlılığını etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (8). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, seröz ve müsinöz over kanseri dokularında artan peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-gama koaktivatörü 1 α (PGC1 α) ve TFAM'ın, over kanserinde kötü prognoza neden oldukları bildirilmiştir (9). Benzer şekilde over kanserinde, TFAM

ekspresyonunun, tümör bitişiğindeki normal dokulara kıyasla tümör dokularında artış göstermesi over kanserinde TFAM'ın bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini düşündürmüştür (173). Genomun koruyucusu olarak bilinen, apoptozu indükleme ve onkogenezi önlemede kritik bir role sahip olan p53'ün, mtDNA içeriğini düzenlemek için TFAM ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (174). Buna ek olarak p53, TFAM promotörü ile etkileşime girerek TFAM ekspresyonunu desteklemektedir (175). p53, hücre ölümünü düzenlemek için TFAM ile bağlanır (176, 177). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise TFAM gen ekspresyonunun azaltılması, mtDNA kopya sayısını azaltmakta, ROS kaynaklı kaspaz bağımlı apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin sispaltine duyarlılığını arttırmaktadır (178).

TFAM ekspresyonunda meydana gelen değişimlerin kanserle ilişkili olduğunu gösteren doğrudan bir kanıt yoktur. Ancak TFAM'ın post-translasyonel modifikasyonları kendisinin stabilitesini ya da fonksiyonunu önemli ölçüde etkilediğinden, modifikasyonları da tümör progresyonu ile sıkı bir şekilde ilişkilendirilmektedir (179).

Mitokondriyal disfonksiyon ve gen mutasyonları, hücresel metabolizma homeostazından tümör proliferasyonunu destekleyen bir duruma geçişle ilişkilendirilmektedir (180). Mitokondriyal işlev bozuklukları, pankreas kanseri hücrelerinin hızlı büyümesini destekleyen reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine yol açmaktadır (181). Elektron taşıma elemanlarının kaybı, enerji ile ilgili işlev bozuklukları ve mitokondriyal anormalliklere bağlı bozulmuş protein sentezi de pankreas karsinogenezi ile yakından ilişkilendirilmektedir (182). Hipoksik olarak stresli mikroçevre, mitokondriyal metabolik yeniden programlamayı indükleyen ve böylece kanser sağkalımını destekleyen hızla büyüyen tümörlerin bir özelliğidir (183). Pankreas kanseri hücrelerinde hipoksi kaynaklı mitokondriyal biyogenez için mitokondriyal fonksiyonun kilit düzenleyicisi olarak bilinen HMGB1 gerekmektedir. Hipoksik koşullar altında, pankreas kanseri hücrelerinde HMGB1 ekspresyonunun negatif yönde düzenlenmesi ile NFR1/TFAM mRNA ve protein seviyelerinin, mitokondri sayısının, mtDNA kopya sayısının ve ATP miktarının azaldığı hücre proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir (184).

Ferroptoz, hidroperoksitlenmiş fosfolipidlerin birikmesi ile karakterize edilen, demire bağımlı bir hücre ölümüdür (185). Morfolojik olarak ferroptoz, mitokondri boyutunda azalma, çift katmanlı membran yoğunluğunda artış ve mitokondriyal krista azalması veya kaybolması gibi fizyolojik olaylar meydana gelen hücrelerde görülmektedir (186). Ferroptotik hücre ölümünü bloke eden NUPR1 geni, PDAC'ın gelişimini ve ilerlemesini indüklemektedir (187). NUPR1 inhibisyonu yapan ZZW-115, pankreas kanseri hücrelerinde hidroperoksitli lipidlerin birikimini arttırarak ferroptotik hücre ölümünü indüklemektedir. Mitokondriyal biyogenezin kilit düzenleyicisi olan TFAM, NUPR1 inhibitörü olan ZZW-115'i inhibe ederek pankreas kanserinde, ferroptotik hücre ölümünün bir antagonisti olarak rol oynamaktadır (188). Benzer şekilde, PDAC'da TFAM ekspresyonunun artması, apoptoz inhibisyonuna neden olarak, hastaların klinik seyrini kötü yönde etkilemektedir (189).

2.3.2. TFAM Ekspresyonunun miR-200a-3p Tarafından Hedeflenmesi

Pri-miRNA'lar ve pre-miRNA'lar, Drosha ve Dicer ile işlenerek miRNA'ları oluştururlar. miRNA, pre-miRNA'nın 5p veya 3p ipliklerinden, bu ipliklerin hidrojen bağı etkinliğine göre üretilir. Tipik miRNA oluşumuna dayalı olarak, bir iplik bol miktarda aktif olgun miRNA üretebilirken, diğer iplik nadir ve inaktif miRNA üretebilir. İnaktif üretilen miRNA'lar, miRNA*: asteriks ile işaretlenen miRNA, aynı zamanda yolcu zincir olarak da adlandırılır. Bununla birlikte, artan kanıtlar, her iki ipliğinde belirli gelişim aşamaları altında olgun miRNA'lar üretebileceğini göstermektedir (190, 191). Buna bağlı olarak pre-miRNA'dan üretilen iki ürünün (miR-#-5p ve miR-#-3p) ekspresyon seviyeleri farklılık gösterse de iki olgun miRNA olarak üretilmektedir. Bu çalışmada miR-200 ailesi üyelerinden olan miR-200a-3p ile *miRDB* veritabanında miR-200a-3p hedefi olarak gösterilen TFAM geni (hedef skoru 78) ekspresyonu incelenmiştir (192). Literatürden bilindiği gibi benzer çekirdek dizisine sahip olan miRNA'lar aynı genleri hedefleyerek ekspresyonlarının düzenlenmesinde görev alabilirler. miR-200a'nın *miRDB* veritabanından bilinen, iki farklı ipliğinden biri olan miR-200a-3p UAACACUGUCUGGUAACGAUGU çekirdek dizisine sahipken, miR-200a-5p CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA çekirdek dizisine sahiptir. miR-200a-3p ve miR-200a-5p farklı çekirdek dizilerine sahip oldukları için aynı genleri hedefleyemezler. miR-200a-3p, TFAM'ın 1345, 1860,

2312, 3208. çekirdek dizilerini hedefleyerek TFAM'ın, gen ekspresyonunu düzenler (Şekil 2.11).

MicroRNA and Target Gene Description:

miRNA Name	hsa-miR-200a-3p	miRNA Sequence	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
Previous Name	hsa-miR-200a		
Target Score	78	Seed Location	1345, 1860, 2312, 3208
NCBI Gene ID	7019	GenBank Accession	NM_001270782
Gene Symbol	TFAM	3' UTR Length	4173
Gene Description	transcription factor A, mitochondrial		

Şekil 2.11. miR-200a-3p hedef geni olan TFAM'ın *miRDB* veritabanında gösterilmesi (192).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Dulbecco's modified eagle medium *high glucose* (DMEM), L-glutamin, sodyum prüvat, fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), 10x Tripsin-EDTA (Biological Industries, İsrail; Lonza, İsviçre; Biowest, Fransa). Fosfat tamponlu salin (phosphate buffered saline, PBS) (Advansta, ABD), etanol, kloroform, hücre yıkama solüsyonu, miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Almanya), QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Almanya), hsa-mimik miR-200a-3p (QIAGEN, United States), hsa-miRNA inhibitör miR-200a-3p (QIAGEN, United States), HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN, Almanya), CFSE Cell Division Tracker Kit (BioLegend, San Diego), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI, miScript II RT Kit (QIAGEN, Almanya), SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Almanya), polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler; miRCURY LNA miRNA PCR Assay hsa-miR-200a-3p (QIAGEN, United States), QuantiTect Primer Assay Hs_TFAM_1_SG (QIAGEN, USA), miScript Primer Assay Hs_SNORD61_11 (QIAGEN, USA), GAPDH.

3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponlu Salin (PBS) Çözeltisinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen PBS tabletleri belirtilen protokole göre hazırlandı. Buna göre, 1 adet PBS tableti, 500 ml distile su ile çözüldü. Ardından 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı. Steril edilen PBS çözeltisi, kontaminasyonu önlemek amacıyla alikotlanarak +4°C'de muhafaza edildi.

Fetal Sığır Serumunun (FBS) İnaktivasyonu:

Ticari olarak temin edilen FBS çözüldükten sonra 55°C' de 30 dakika bekletilerek inaktive edildi. Kontaminasyonu önlemek amacıyla 50 ml'lik steril tüplere alikotlandı ve -20°C'de muhafaza edildi.

Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarının kültüründe *high glucose* DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, marka) kullanıldı. Bazal besiyeri içerisine son konsantrasyonları %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin (pen-strep), %1 L-Glutamin, %1 Sodyum Piruvat içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan medyum +4°C'de muhafaza edildi.

3.3. Hücre Hatlarının Çözülmesi

Bu çalışmada, pankreas kanseri hücre hatları olan Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri kullanıldı.

Çalışmalara dondurulmuş hücrelerin çözülmesi ile başlandı. Kabinin içi steril edildikten sonra önceden hazırlanmış olan high glucose DMEM 37°C'ye getirilip %70 etanol ile temizlenerek kabin içine alındı.

1. Azot tankından çıkarılan hücreler 37°C su banyosunun içinde 1-2 dakika bekletilerek çözüldü.
2. Vial hızlı bir şekilde %70 etanol ile silinerek kabin içine alındı.
3. Vial içinde eriyik halde bulunan hücreler hızlı şekilde 5ml besiyeri içerisine boşaltıldı. Süspanse halde bulunan hücreler, 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant serolojik pipetle çekilerek atıldı, hücre peletine 5ml taze besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı.
4. Medyum ve hücre süspanسیونu serolojik pipetle çekilerek 25cm²'lik kültür kabına ekildi ve %5 CO₂ ve 37°C kültür koşullarında inkübe edildi.

3.4. Hücre Pasajı

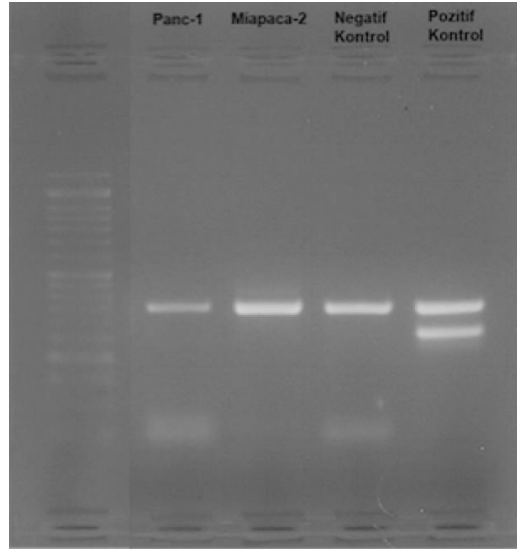
1. 25cm²'lik kültür kabına ekilen hücreler mikroskop altında gözlemlendi. %80-90 doluluğa ulaşan hücreler pasajlandı. Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri aderan hücreler oldukları için kültür kabının yüzeyine yapışmaktadır. Pasajlamadan önce çalışılacak kabin steril edildi. Kültür kabı, kabin içine alındı.
2. Kültür kabın içerisindeki besiyeri serolojik pipetle çekilip atıldı. Kabının yüzeyinin besiyeri kalıntılarında arınması için 2 ml PBS ile yıkandı.

3. Kültür kabının yüzeyine 2 ml tripsin eklenerek 37°C’de 5 dakika inkübe edildi. Tripsinizasyon işlemi 4 ml besiyeri ile inaktive edildi.
4. Total hacim serolojik pipetle çekilerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1800 rpm’de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant serolojik pipetle çekilerek atıldı.
5. Tüpte kalan pelete 1 ml besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı.
6. 1 ml’de bulunan hücre sayısı belirlenerek 75 cm²’lik kültür kabına yeniden ekildi ve hücrelerin kültürüne %5 CO₂ içeren 37°C’lik inkübatörde devam edildi.

3.5. Mikoplazma Testi

Çalışmada kullanılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatları deneyler öncesinde mikoplazma kontaminasyonu kontrol edilmek üzere Mikoplazma testi yapıldı.

1. Hücrelerin kültüre edildiği besiyerlerinden örnekler alınıp, 2000 rpm’de 90 saniyede santrifüj edildi ve süpernatantlar toplandı.
2. Süpernatantlar 14000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Tüpte kalan hücre peletlerine 50 µl Assay Buffer eklenerek 95 °C’ de 3 dakika inkübe edildi.
4. PCR için karışım hazırlandı ve total hacim 50 µl olacak şekilde PCR tüplerine dağıtıldı.
5. PCR karışımının çalıştığını göstermek amacıyla bir tüpe Internal Control DNA eklendi.
6. 35 döngülük PCR süreci başlatıldı ve tamamlandıktan sonra örnekler jel elektroforezde yürüldü.
7. Jelde oluşan bantlar görüntülendi.



Şekil 3.1. Pankreas kanseri hücrelerinde mikoplazma PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü (357 bp). (Pozitif Kontrol 357-270 bp).

3.6. Hücre Sayımı

Hücre sayımında tripan mavisi boyası kullanıldı.

1. 1 ml besiyeri içinde süspanse edilen hücrelerden 20µl mikropipet ile çekilip 20 µl tripan mavisi ile birleştirildi.
2. Homojenizasyonu sağlamak amacıyla pipetaj yapılarak hücre-tripan mavisi karışımından 20 µl mikropipetle çekilip thoma lamına 45 derecelik açı ile konuldu.
3. Thoma lamı mikroskop altına alınarak hücreler sayıldı.

Thoma lamı 4 ayrı alandan oluşmaktadır. Mavi ile boyanan (ölü) ve boyanmayan (canlı) hücreler bu alanlarda görülmektedir Böylece total hücre ve canlı hücre sayımı kolaylıkla yapılmaktadır.

3.7. Hücre Hatlarına Mimik ve İnhibitör miRNA'lar ile Transfeksiyonu

Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatları 75cm²'lik kültür kabında kültüre edildi. Kültür kabının tabanı %80-90 doluluğa ulaştıncaya hücreler transfeksiyon işlemi için deneye dahil edildi.

1. Kültür kabından mevcut besiyeri serolojik pipetle çekildi ve kabın yüzeyi 4 ml PBS ile yıkandı.

2. Aspire edildikten sonra yüzeye 4 ml tripsin eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tripsinizasyon işlemi 8 ml besiyeri ile inaktive edildi ve toplam hacim çekilip santrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Tüp, 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı.
4. Tüpte kalan hücre peletine 1 ml pen-strep içermeyen besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı.
5. Hücreler tripan mavisi ile thoma lamında sayıldı.
6. Ardından kuyu başına 100. 000 hücre pen-strep içermeyen besiyeri ile 24 kuyucuklu kültür kabına ekildi.
7. Kültür kabı %5 CO₂ ve 37°C koşullarında 4-6 saat inkübe edildi.
8. Transfeksiyon işlemi öncesinde kültür kabı mikroskop altında gözlemlendi. Hücrelerin kültür kabının tabanına yapışmış olmasına dikkat edildi.
9. Mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu için iki ayrı karışım hazırlandı.
10. Karışımlar üretici firmanın önerisi doğrultusunda, serum ve antibiyotik içermeyen bazal DMEM, hsa-mimik miR-200a-3p (katalog no: 339173 YM00471816-ADA, QIAGEN, United States) ve hsa-miRNA inhibitör miR-200a-3p (katalog no: 330121 YI04101798-ADA, QIAGEN, United States), son olarak HiPerFect Transfection Reagent (katalog no: 301704 QIAGEN, Almanya) ile hazırlandı. Hacim ve konsantrasyonlar tablo 3.1 de gösterilmiştir.
11. Hazırlanan karışım hafif vortekslendi ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.
12. İnkübasyondan sonra 24 kuyucuklu kültür kabına ekilmiş olan hücrelerin üzerine damla damla pipetlendi.
13. Transfeksiyon bileşenlerinin homojen şekilde yayılması için hafifçe çalkalanıp %5 CO₂ ve 37°C koşullarında inkübatörde kültüre edildi.
14. Panc-1 ve Miapaca-2 pankreas kanseri hücre hatlarında mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapıldı. Ayrıca transfeksiyon işlemi yapılmayan Panc-1 ve Miapaca-2 pankreas kanseri hücreleri de deneye dahil edilerek kıyaslamalar yapıldı. Buna göre; 3 farklı koşul uygulanan pankreas kanseri hücreleri 24 kuyucuklu kültür kabında inkübe edildi.

Tablo 3.1. Mimik miR-200a-3p ve İnhibitör miR-200a-3p transfeksiyon bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler	Karışım 1 (Mimik miR-200a-3p) µl	Karışım 2 (İnhibitör miR-200a-3p) µl
Mimik miR-200a-3p	0.45	-
İnhibitör miR-200a-3p	-	0.6
Transfeksiyon Reagent	3	3
High Glukoz DMEM	100	100
Total Konsantrasyon	50nM	50nM

3.8. CFSE Hücre Proliferasyon Analizi

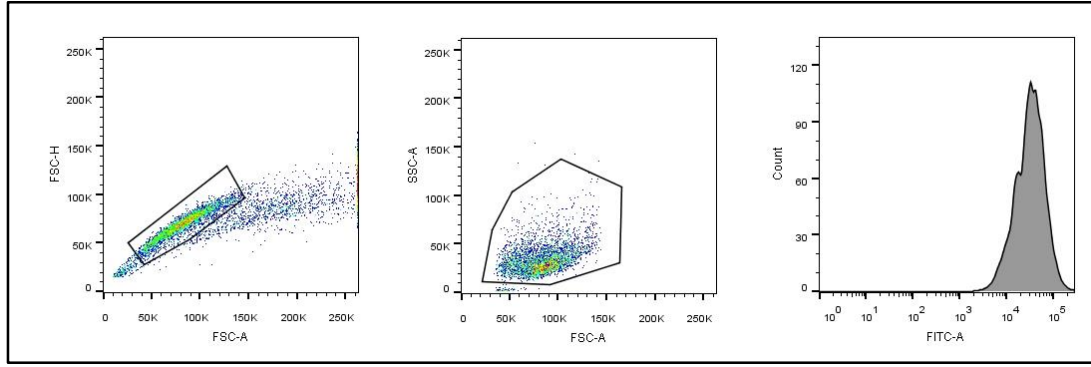
CFSE hücre proliferasyonu analizi için mimik ve miR-200a-3p, inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 24 saat sonra, kontrol (transfeksiyon işlemi yapılmayan) Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri, mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri 24 kuyucuklu kültür kabından birbirinden ayrı şekilde kaldırıldı. Kaldırma işlemi diğer kuyularda ekili olan hücelere zarar vermeden yapıldı.

1. Hücrelerin kültür kabının tabanından kaldırılması için kuyulardaki eski besiyeri aspire edildi.
2. Kuyu tabanı besiyeri kalıntılarından arındırılması için 250 µl PBS ile yıkayıp aspire edildi.
3. Tripsinizasyon işleminin başlaması için kuyulara 250 µl tripsin eklendi ve 5 dakika %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Tripsin 500 µl besiyeri ile inaktive edildikten sonra kuyulardaki total hacim mikropipetle çekilerek 3 ayrı koşul 3 farklı santrifüj tüpüne alındı.
4. 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı.
5. Tüpte kalan hücre peletlerine 100 µl PBS eklenerek pipetlendi. Bu aşamadan sonra kabin ışığı kapatılarak çalışmaya devam edildi.
6. Hücre süspansiyonlarına 1 µl CFSE boyası (katalog no: 423801, BioLegend, San Diego) eklenerek pipetlendi ve karanlık ortamda, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. İnkübasyondan sonra hücreler kabin içine tekrar alındı ve boyanın yıkanması için 5 ml besiyeri eklendi.
8. Boyanın tamamen uzaklaşması için tüpler santrifüje alınarak 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı ve hücre peletlerine 1 ml taze besiyeri eklenerek pipetlendi.
9. 1 ml besiyeri içinde bulunan hücreler thoma lamında tripan mavisi ile sayıldı.
10. Kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücre grupları, 24, 48, 72 saat sonra proliferasyon analizi yapılmak üzere 24 kuyucuklu kültür kabına ekilerek %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi.

CFSE boyamasından 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler akım sitometri (*akım sitometri cytometry*) cihazında analiz için tripsinize edildi. Bu işlem yine kabin ışığı açılmadan yapıldı.

1. Kuyulardan mevcut olan besiyeri aspire edildi ve besiyeri kalıntılarını uzaklaştırmak için 250 µl PBS ile yıkama yapıldı.
2. Tripsinizasyon işleminin için 250 µl tripsin eklendi ve 5 dakika %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Tripsin 500 µl *high glucose* DMEM ile inaktive edildikten sonra kuyulardaki total hacim akım sitometri tüplerine alındı.
3. Hücrelerden tripsin ve besiyerini uzaklaştırmak için 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı ve hücre peletlerine 100 µl PBS eklenip pipetlendi sonrasında akım sitometri cihazına okuma için götürüldü. veriler, FACS Diva yazılımında kaydedilen . fcs formatındaki okuma dosyalarının, FlowJo yazılımına aktarılıp, düzenlenerek analiz edildi (Şekil. 3.3).



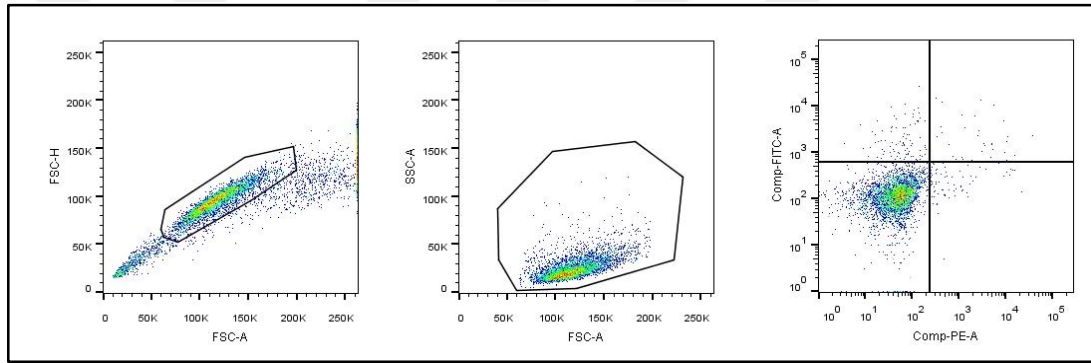
Şekil 3.2. CFSE Proliferasyon analizi için kapılama stratejisi.

3.9. Annexin V-PI Hücre Apoptozu Analizi

miR-200a transfeksiyonundan 24 ve 48 saat sonra, kontrol (transfeksiyon işlemi yapılmayan) Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri, mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri 24 kuyucuklu kültür kabından birbirinden ayrı şekilde kaldırıldı. Kaldırma işlemi diğer kuyularda ekili olan hücelere zarar vermeden yapıldı.

1. Hücrelerin kültür kabının tabanından kaldırılması için kuyulardaki eski besiyeri içerisinde ölü hücre barındırdığı için atılmadan okuma yapılacak akım sitometri tüplerine aktarıldı.
2. Kuyu tabanı besiyeri kalıntılarından arındırılması için 250 µl PBS ile yıkayıp, eski besiyeri bulunan akım sitometri tüplerine aktarıldı.
3. Tripsinizasyon işleminin başlaması için kuyulara 250 µl tripsin eklendi ve 5 dakika %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Tripsin 500 µl besiyeri ile inaktive edildikten sonra kuyulardaki total hacim mikropipetle çekilerek akım sitometri tüplerine alındı.
4. 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı. Bu aşamadan sonra kabin ışığı kapalı tutuldu. Annexin-PI boyaması için FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (katalog no: 640914) kiti kullanıldı.
5. Hücre pelletlerine kit içinden çıkan 100 µl Annexin Binding Buffer eklenerek pipetlendi.

6. Bu süspansiyonun içine 2,5 µl Annexin V boyası eklendi ve +4°C ile karanlık ortamın sağlandığı koşullarda 40 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra aynı ortamda süspansiyona 1,5 µl PI eklenerek 5 dakika daha inkübe edildi.
8. Hücreleri boyalardan arındırmak için süspansiyona 2 ml soğuk hücre yıkama tamponu eklenerek yıkandı ve 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı ve hücre peletlerine 100 µl PBS eklenip pipetlendikten sonra akım sitometri cihazına analiz edilmek üzere götürüldü. veriler, FACS Diva yazılımında kaydedilen . fcs formatındaki okuma dosyalarının Flow Jo yazılımına aktarılıp, düzenlenerek analiz edildi (Şekil. 3.4).



Şekil 3.3. Annexin V-PI hücre apoptozu analizi için kapılama stratejisi.

3.10. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

Kontrol (transfeksiyon işlemi yapılmayan) mimik miR-200a-3p ile inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücrelerinden 48 saat sonra total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu için miRNeasy Mini Kit (katalog no: 217004, QIAGEN, Almanya) kiti kullanıldı.

1. Hücrelerin kültür kabının tabanından kaldırılması için kuyulardaki eski besiyeri aspire edildi.
2. Kuyu tabanı besiyeri kalıntılarında arındırılması için 250 µl PBS ile yıkayıp aspire edildi.
3. Tripsinizasyon işleminin başlaması için kuyulara 250 µl tripsin eklendi ve 5 dakika %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Tripsin 500 µl

besiyeri ile inaktive edildikten sonra kuyulardaki total hacim mikropipetle çekilen 3 ayrı koşul 2 ml'lik tüplere alındı.

4. Tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı.
5. Tüplerde kalan hücre peletlerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent (katalog no: 79306, QIAGEN, Almanya) hücre lizis edici solüsyon eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Süspansiyona 140 µl kloroform eklenerek 15 saniye elde parmak darbeleri ile çalkalandı ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
7. Tüpler 12,000xg' de, + 4°C sıcaklıkta 15 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası tüplerde 3 ayrı faz oluştu.
9. RNA içeren şeffaf faz, organik madde bulunan beyaz faz içeren kısımaya değdirilmeden mikropipetle çekilip yeni bir tüpe aktarıldı.
10. Tüplere 525 µl absolüt etanol eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.
11. Elde edilen solüsyonlardan 700 µl çekilerek spin kolonlara bırakıldı ve oda sıcaklığında 10. 000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüp atıldı ve filtre kuruluşuna dikkat edildi.
12. Spin kolonlara 700 µl RWT tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 10. 000xg' de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüp atıldı ve filtre kuruluşuna dikkat edildi.
13. Spin kolonlara 500 µl RPE tamponu eklendi oda sıcaklığında 10. 000xg' de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüp atıldı ve filtre kuruluşuna dikkat edildi.
14. Spin kolonlara 500 µl RPE tamponu eklendi oda sıcaklığında 10. 000xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüp atıldı ve filtre kuruluşuna dikkat edildi.
15. Filtrenin tamamen kuruması ve saf RNA'nın elde edilmesi için spin kolonlar, oda sıcaklığında 10. 000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
16. Filtreler RNA'nın saklanacağı 1,5 ml'lik tüplere alındı ve filtrelerin üzerine 30 µl RNAase içermeyen su direkt olarak bırakıldı.
17. Filtreler oda sıcaklığında 10. 000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.

18. Elde edilen RNA örnekleri direkt olarak buz üzerine alınıp konsantrasyon ölçümleri yapıldıktan sonra -80°C 'de saklandı.

3.11. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon Tayini

İzole edilen RNA örnekleri buz üzerine alınarak konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometre cihazında ölçüldü. RNA örneklerinin kalitesi değerlendirildi. A260/280 oranı 1,8-2,0; A260/230 oranı ise 2,0-2,2 aralığında olan RNA örneklerinden final konsantrasyonu 1000 ng/ μl olacak şekilde cDNA sentezi yapıldı.

3.12. cDNA Sentezi

Final konsantrasyonları 1000ng/ μl olacak şekilde hesaplanan RNA örneklerinden cDNA sentezi miScript II RT Kiti kullanılarak yapıldı. Bu kit hem miRNA'ların hemde mRNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca kitin içerisinde iki ayrı tampon bulunmaktadır. Bu tamponlardan HiFlex, hem miRNA'ları hemde mRNA'yı cDNA'ya dönüştürmek için kullanıldı. Böylece miR-200a ve TFAM gen ekspresyon analizleri için miScript II RT Kiti (katolog no: 218193 QIAGEN, Almanya) ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Kontrol, mimik miR-200a-3p ile inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücrelerinden izole edilen RNA'lar buz üzerinde çözündürüldü. Kit içerisindeki HiFlex Tamponu, *Nucleics* Karışımı ve RNaz içermeyen su oda sıcaklığında çözüldü. Kit içerisindeki *Reverse* Transkriptaz Enzim Karışımı ise kullanımdan hemen önce -20°C 'den çıkarılıp kullanıldıktan hemen sonra -20°C 'ye kaldırıldı. (Tablo 3.11) verilen miktarlar ile hazırlanan karışımlar RNA'ya zarar vermeyecek şekilde buz üzerinde hafif pipetlenedi ve santrifüj edildi. Ardından 37°C 'de 60 dakika, 95°C de 5 dakika koşullarının sağlandığı cihazda reaksiyon yapıldı.

Tablo 3.2. cDNA sentezinde kullanılan PCR bileşenleri.

Bileşen	Reaksiyon Hacmi (µl)	Final Konsantrasyon
5x miScript HiFlex Tamponu	4	1X
10x miScript Nucleics Karışımı	2	1X
miScript Reverse Transkriptaz Enzim	2	-
RNaz içermeyen su	Değişken	-
RNA	Değişken	1µg
Total Hacim	20	-

3.13. Real Time-PCR ile Gen Ekspresyon Analizi

Panc-1 ve Miapaca-2 hücrelerinde miR-200a-3p ve TFAM gen ekspresyonlarının analizi için miScript SYBR Green PCR Kiti (katolog no: 218073, QIAGEN, Almanya) kullanıldı. miR-200a-3p ve TFAM ekspresyon analizleri için PCR bileşenleri hazırlanırken ayrı ayrı hazırlandı.

Kontrol, mimik miR-200a-3p ile inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan Panc-1 ve Miapaca-2 hücrelerinden izole edilen RNA'lardan dönüştürülen cDNA'lar buz üzerine alındı. Real Time PCR için kullanılacak olan kitin bileşenleri oda sıcaklığında çözüldü ve buz üzerine alındı. PCR bileşenleri Tablo 3.12 gösterilen miktarlarda karıştırılarak hazırlandı. Tüplere cDNA pipetlenerek eklendi. Tablo 3.13 gösterilen PCR koşullarının sağlandığı RT-PCR analizi Rotor Gene 6000 Real-Time PCR cihazında reaksiyon gerçekleştirildi. Analizler *Syber Green*'in yaptığı ışımının eşik değerini geçtiği *Cycle threshold* (Ct) değeri esas alınarak gerçekleştirildi ve

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak karşılaştırmalı analizler yapıldı. Kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfekte edilen hücre grupları, kontrol grubuna göre normalize edilerek analiz edildi. İlk delta referans gene göre (gen-referans gen) yapılırken, ikinci delta normalize edilen kontrol grubuna göre hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\text{gen-referans gen}) - (\text{kontrol-referans gen})}$. 40 döngü sonrasındaki Ct değerleri, spesifik bir amplifikasyonu göstermediği için analize dahil edilmedi. Ayrıca elde edilen amplifikasyon eğrilerinin spesifik ya da non-spesifik amplifikasyon olup olmadığının anlaşılabilmesi için "*melting curve*" (erime eğrisi) analizleri yapıldı.

Tablo 3.3. miR-200a-3p/SNORD (Referans gen) gen ekspresyon analizinde kullanılan PCR bileşenleri.

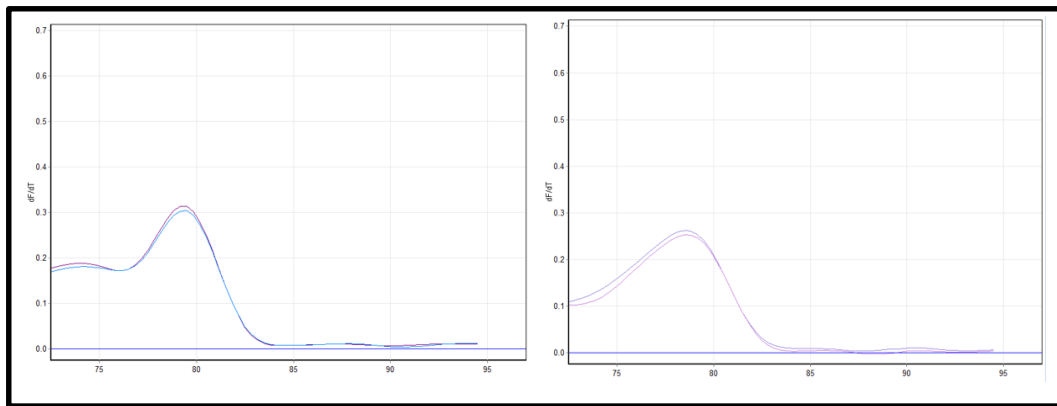
Bileşen	Reaksiyon Hacmi (µl)	Final Konsantrasyon
2x SYBER Green Master mix	10	1X
10x miScript Universal Primer	2	1X
10x miScript Primer Assay (miR-200a/SNORD)	2	1X
RNase içermeyen su	4	-
cDNA	2	1µg
Total Hacim	20	-

Tablo 3.4. TFAM/GAPDH (Referans gen) gen ekspresyon analizinde kullanılan PCR bileşenleri.

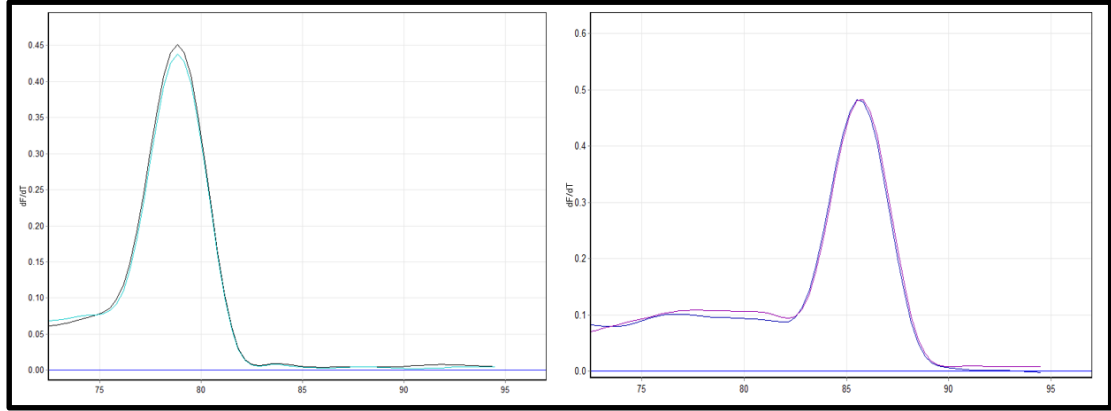
Bileşen	Reaksiyon Hacmi (µl)	Final Konsantrasyon
2x SYBER Green Master mix	10	1X
10x miScript Primer Assay (TFAM/GAPDH)	2	1X
RNase içermeyen su	6	-
cDNA	2	1µg
Total Hacim	20	-

Tablo 3.5. RT-PCR koşulları.

PCR Aşamaları	Sıcaklık (°C)	Zaman
İlk Denatürasyon	95	15 dakika
Denatürasyon	94	15 saniye
Primer Bağlanması	55	30 saniye
Uzama	70	30 saniye
Toplam 40 Döngü		

miR-200a-3p SNORD (Referans gen)**Şekil 3.4.** miR-200a-3p ve SNORD (referans gen) gen ekspresyonlarının erime (melt) eğri grafikleri.

TFAM GAPDH (Referans gen)



Şekil 3.5. TFAM ve GAPDH (referans gen) gen ekspresyonlarının erime (melt) eğrisi grafikleri.

3.14. veri Tabanı Analizleri

Çalışmada kullanılan Miapaca-2 ve Panc-1 hücre hatlarında miR-200a-3p ve TFAM gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi için *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) veritabanı kullanılmıştır (193). Ayrıca *Kaplan Meier plotter* veritabanı kullanılarak, pankreas duktal adenokarsi nom hastalarında TFAM gen ekspresyonu seviyesi ile sağkalım ilişkisi incelenmiştir (194).

3.15. İstatistiksel Analiz

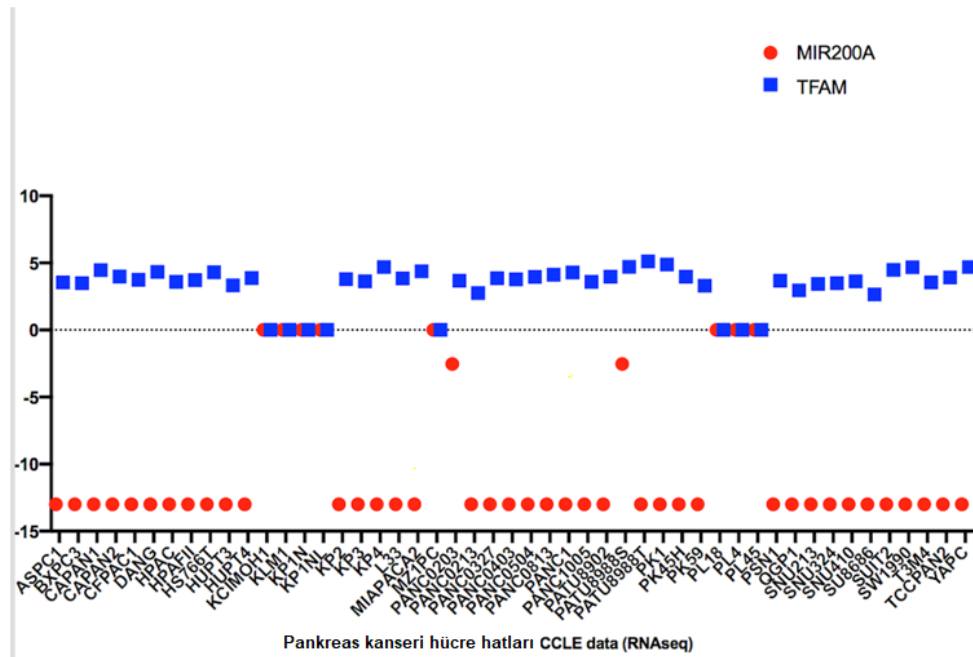
Analiz sonuçları Panc-1 hücre hattı için 6 bağımsız deneyden, Miapaca-2 hücre hattı için 3 bağımsız deneyden elde edilmiştir. Non-parametrik, bağımsız gruplar arasındaki farkı göstermek için Kruskal-Wallis testi, korelasyon analizleri için Spearman testi ve gen ekspresyonu analizlerinde için Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Korelasyon analizleri sadece Panc-1 hücre hattının sonuçları ile yapılmıştır. Miapaca-2 hücre hattında inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu başarılı gerçekleştirilemediğinden korelasyon analizlerinin değerlendirilmesinde kullanılmamıştır.

Analizler GraphPad Prism sürüm 9.1.2 (GraphPad SoftWare, Inc.) kullanılarak yapılmıştır. GraphPad Prism’de oluşturulan grafiklerde veriler standart sapma veya standart hata değerleri ile birlikte gösterilmiştir. $p < 0.05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında miR-200a-3p ve TFAM Gen Ekspresyon Düzeylerinin Profillenmesi

49 farklı pankreas kanseri hücre hattında *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) veritabanı (193) kullanılarak miR-200a ve TFAM ekspresyonları profillenmiştir (Şekil 4.1) (193). Pankreas kanseri hücre hatlarında, literatürde de belirtildiği üzere miR-200a ekspresyonu oldukça düşük iken, TFAM daha yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Pankreatik duktal adenokarsinoma Miapaca-2 ve Panc-1 hücre hatları değerlendirildiğinde ise; benzer şekilde miR-200a ekspresyonunun düşük, TFAM ekspresyonunun ise yüksek düzeyde olduğu tespit edildi.

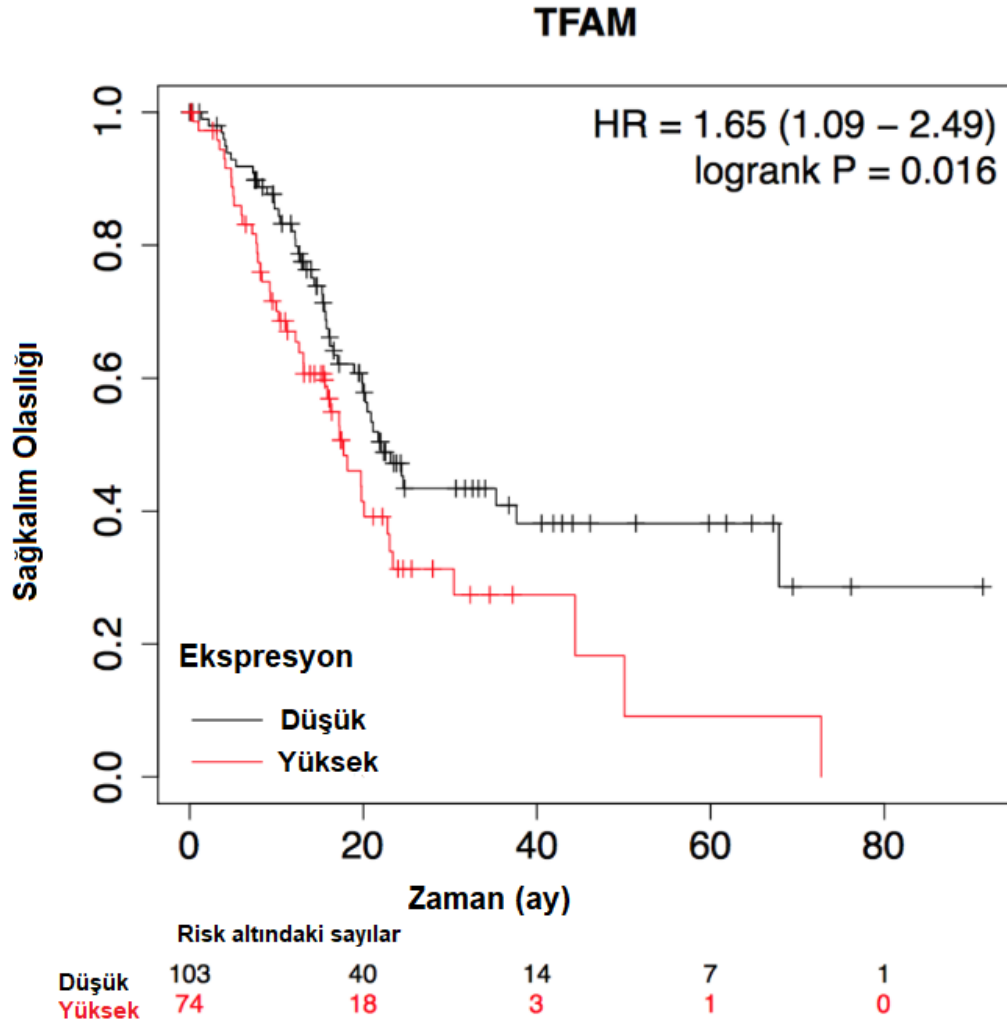


Şekil 4.1. Pankreas kanseri hücre hatlarında (n=49) miR-200a ve TFAM gen ekspresyon düzeylerinin CCLE veritabanına göre gösterimi.

4.2. Pankreatik Duktal Adenokarsinomada TFAM Ekspresyon Düzeyi ile Sağkalım İlişkisi

Kaplan Meier plotter (194) veritabanından yararlanılarak pankreatik duktal adenokarsinoma hastalarında TFAM gen ekspresyon seviyeleri ile sağkalım analizleri gerçekleştirildi (193). TFAM ekspresyonunun yüksek olduğu pankreatik duktal adenokarsinoma hastalarında sağ kalım oranının daha düşük olduğu tespit edildi. Bu

sonuç TFAM ekspresyon düzeyinin kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.2. Pankreatik duktal adenokarsinomda TFAM gen ekspresyon düzeyine göre sağkalım analizi.

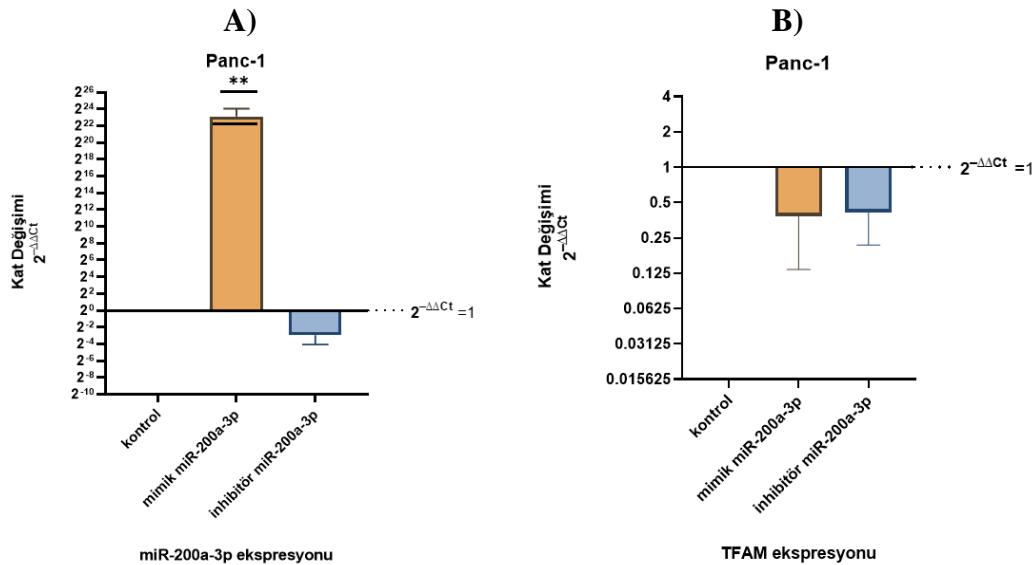
4.3. Panc-1 ve Miapaca-2 Hücre Hatlarında miR-200a-3p ve TFAM Ekspresyon Düzeyleri

Hücreler, transfekte edilmeyen (kontrol), mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu koşulları için gruplandırıldı. Miapaca-2 ve Panc-1 hücreleri, transfeksiyon deneylerinden önce (1×10^5 hücre/24 kuyulu hücre kültürü plağı), antibiyotik içermeyen besiyerinde kültüre edildi. Koşulların sabit tutulması için grupların kültüründe aynı kültür kabı kullanıldı ve 4-6 saat sonra mimik miR-200a-3p

ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyon deneyleri yapıldı. Transfeksiyon deneylerinden 48 saat sonra RNA izole edildi. Elde edilen RNA'lar, cDNA'ya çevrildikten sonra miR-200a-3p ve TFAM genlerinin gen ekspresyonlarındaki değişim gerçek zamanlı PCR analiziyle (qPCR) belirlendi. Mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücreler ile inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrelerdeki gen ekspresyon değişimleri, transfeksiyon yapılmayan (kontrol) grubuna göre normalize edildi. Gen ekspresyon analizleri, Panc-1 hücre hattında 6 bağımsız deney sonucuna göre analiz edilirken, Miapaca-2 hücre hattında 3 bağımsız deney ile analiz edilmiştir.

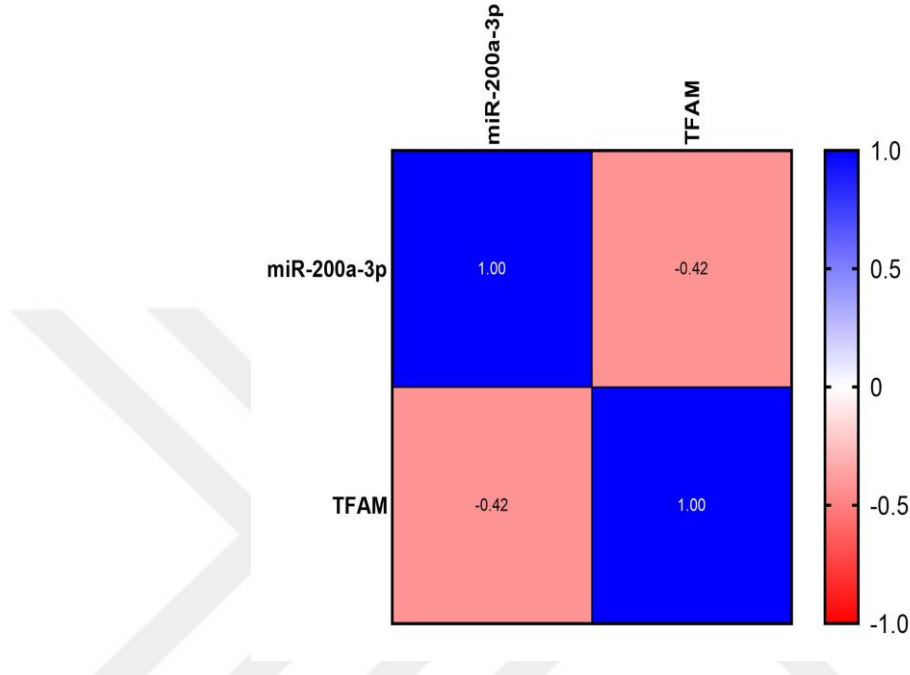
Panc-1 hücre hattına mimik miR-200a-3p transfeksiyonu sonrasında miR-200a-3p ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede 18.07 kat arttırılmıştır ($p=0,0022$) (Şekil 4.3. A). Buna bağlı olarak, TFAM gen ekspresyonu 5,55 kat azalmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.3. B).

Panc-1 hücre hattına inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapıldığında ise miR-200a-3p gen ekspresyonu 3.26 kat azalmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.3. A). İnhibitör miR-200a-3p transfekte edilen hücrelerde TFAM gen ekspresyonu ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p>0,05$) (Şekil 4.3. B).



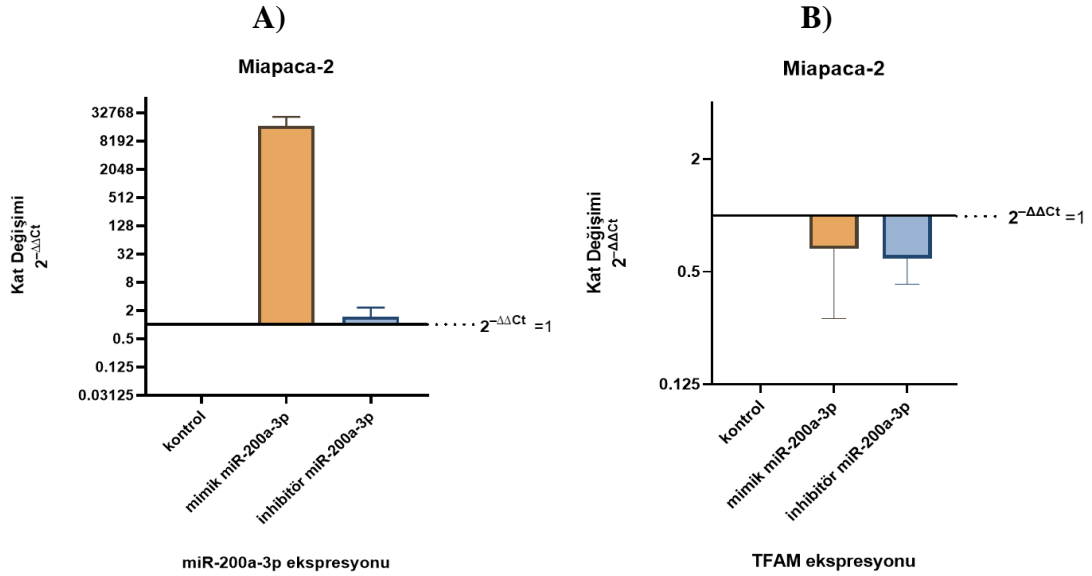
Şekil 4.3. A-B. Panc-1 hücre hattında kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücre gruplarında miR-200a-3p ve TFAM gen ekspresyon düzeyinin gösterilmesi.

Panc-1 hücre hattında 6 bağımsız deney sonuçlarına göre, miR-200a-3p gen ekspresyonu ile TFAM geni arasında negatif (ters) yönde, orta şiddette bir korelasyon saptandı ama bu istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (Spearman $r:-0,42$, $p=0,08$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Panc-1 hücre hattında miR-200a-3p gen ekspresyonu ile TFAM gen ekspresyonu arasında korelasyon analizi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

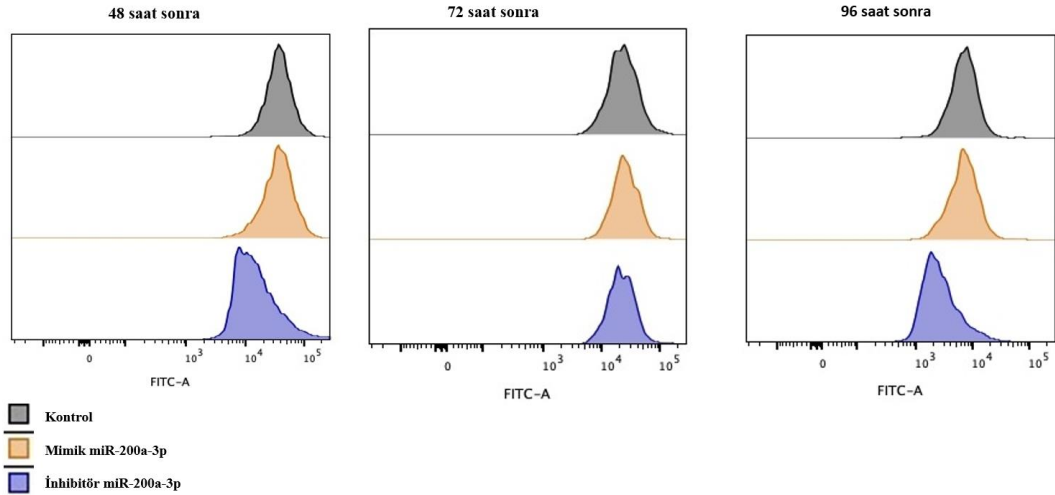
Miapaca-2 hücre hattında ise mimik miR-200a-3p transfeksiyonu sonrasında miR-200a-3p gen ekspresyonu 11.8 kat arttırılmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.5A). Buna bağlı olarak TFAM gen ekspresyonu ise 2.13 kat azaldığı gösterilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.5B). Ancak inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu sonrasında Miapaca-2 hücre hattında miR-200a-3p gen ekspresyonu 1.04 kat olarak tespit edilmiş olup, anlamlı derecede inhibisyon elde edilmemiştir (Şekil 4.5A).



Şekil 4.5. A-B. Miapaca-2 hücre hattında kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücre gruplarında miR-200a-3p ve TFAM gen ekspresyon seviyesinin gösterilmesi.

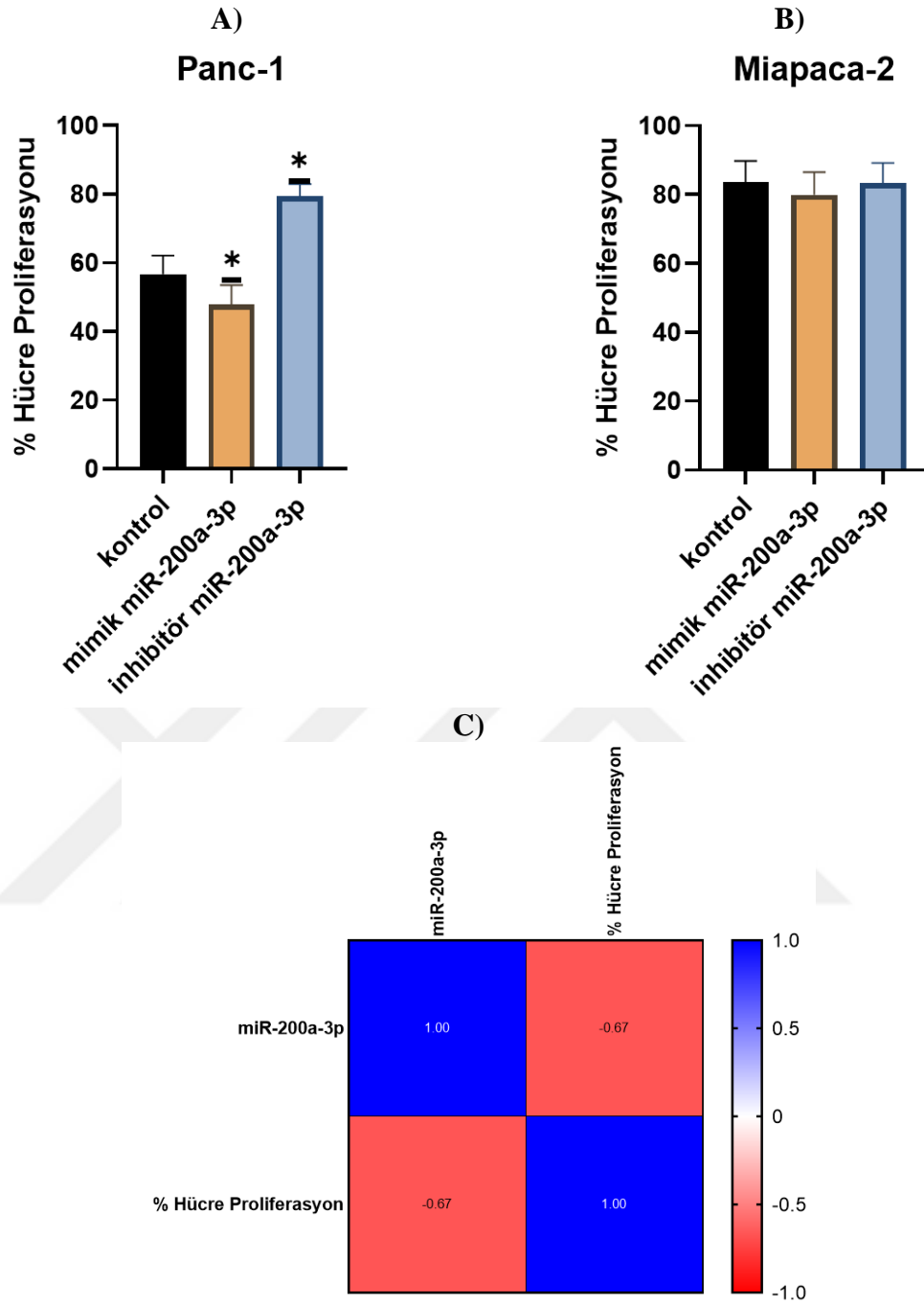
4.4. miR200a ve TFAM Ekspresyon Düzeylerinin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

Hücreler, transfekte edilmeyen (kontrol), mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu koşulları için gruplandırıldı. Panc-1 ve Miapaca-2 hücreleri transfeksiyon deneylerinden önce (1×10^5 hücre/24 kuyulu hücre kültürü plağı), antibiyotik içermeyen besiyerinde kültüre edildi. Koşulların sabit tutulması için grupların kültüründe aynı kültür kabı kullanıldı ve 4-6 saat sonra miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyon deneyleri yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre grupları kültür plağından kaldırılarak CFSE boyası ile işaretlendi. İşaretlenen hücre grupları $2,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde 24 kuyulu hücre kültür plağına kültüre edildi. Transfeksiyon deneyinden 48, 72, 96 saat sonra hücre proliferasyon analizleri değerlendirildi. Panc-1 hücre hattında 6 bağımsız deney ile hücre proliferasyon analizleri değerlendirilmiştir. Miapaca-2 hücre hattında ise 3 bağımsız deney ile analizler yapılmıştır.



Şekil 4.6. Panc-1 hücre hattında transfeksiyon deneylerinden 48, 72 ve 96 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerinin temsili akım sitometri histogramları.

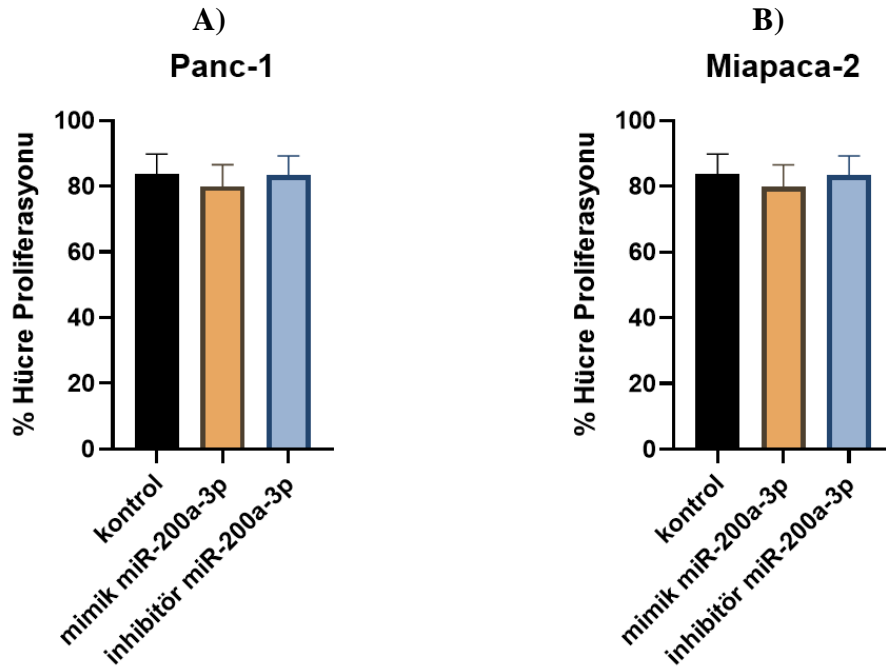
Mimik miR-200a-3p transfekte edilen Panc-1 hücre hattında, 48. saatte, hücre proliferasyonunun azaldığı, tespit edildi ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). İnhibitör miR-200a-3p ile transfekte edildikten 48 sonra ise Panc-1 hücre hattında, hücre proliferasyonunun, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.7. A). Miapaca-2 hücre hattında mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 48 saat sonra yapılan hücre proliferasyonu analizlerinde ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır. (Şekil 4.7. B). Transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizinde Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile hücre proliferasyonu arasında negatif (ters) yönde, kuvvetli bir korelasyon tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (Spearman $r: -0,67$ $p=0,07$) (Şekil 4.7. C).



Şekil 4.7. A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerini göstermektedir (sırasıyla) C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile hücre proliferasyonu arasında yapılan korelasyon analizi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -% Hücre Proliferasyonu)

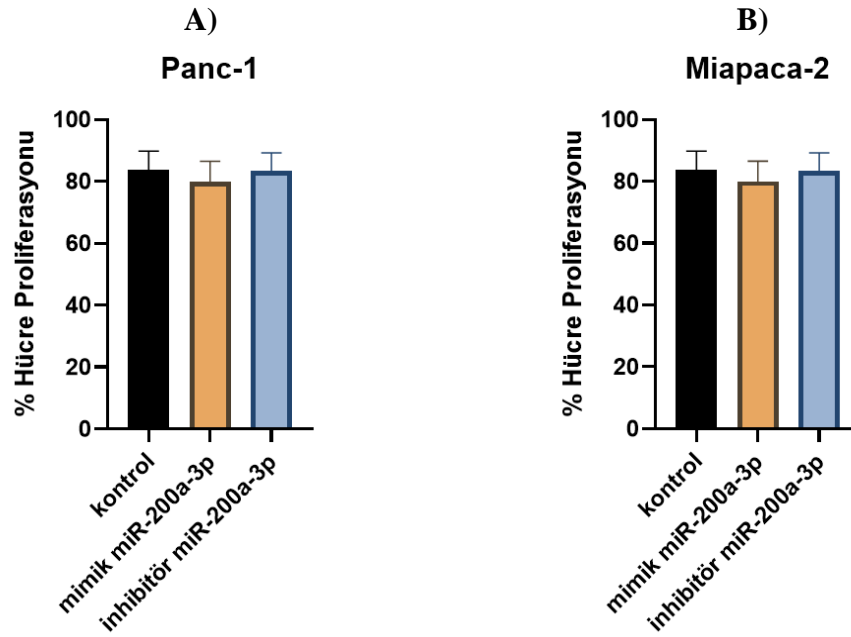
Yapılan proliferasyon analizi sonuçlarına göre, Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyondan 72 saat

sonra hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.8. A-B).



Şekil 4.8. A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 72 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerini göstermektedir (sırasıyla).

Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında 96 saat sonra yapılan hücre proliferasyonu analizlerinde de mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyondan hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.9. A,B).



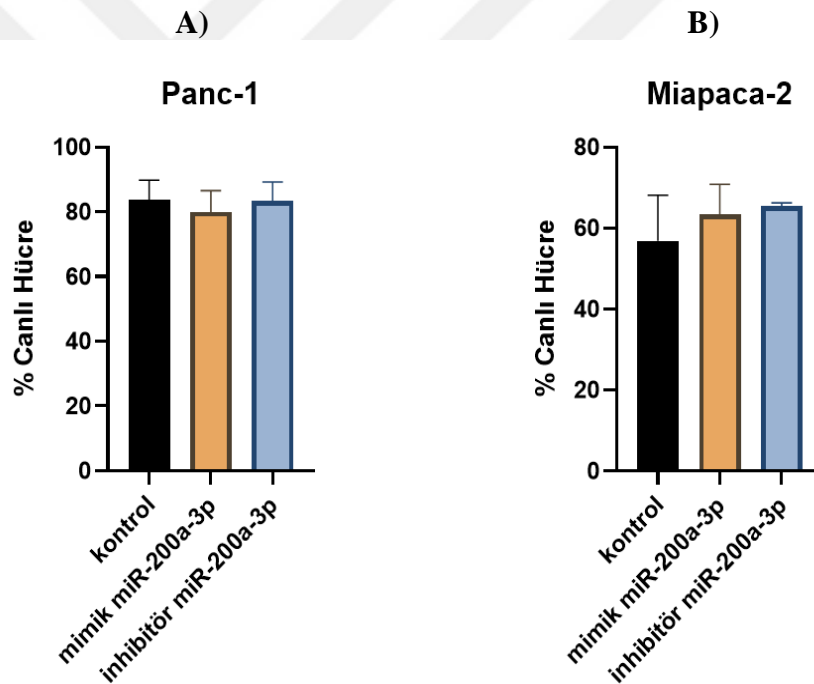
Şekil 4.9. A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 96 saat sonra hücre proliferasyon analizlerini göstermektedir (sırasıyla).

4.5. miR200a ve TFAM Ekspresyon Düzeylerinin Apoptozis Üzerine Etkileri

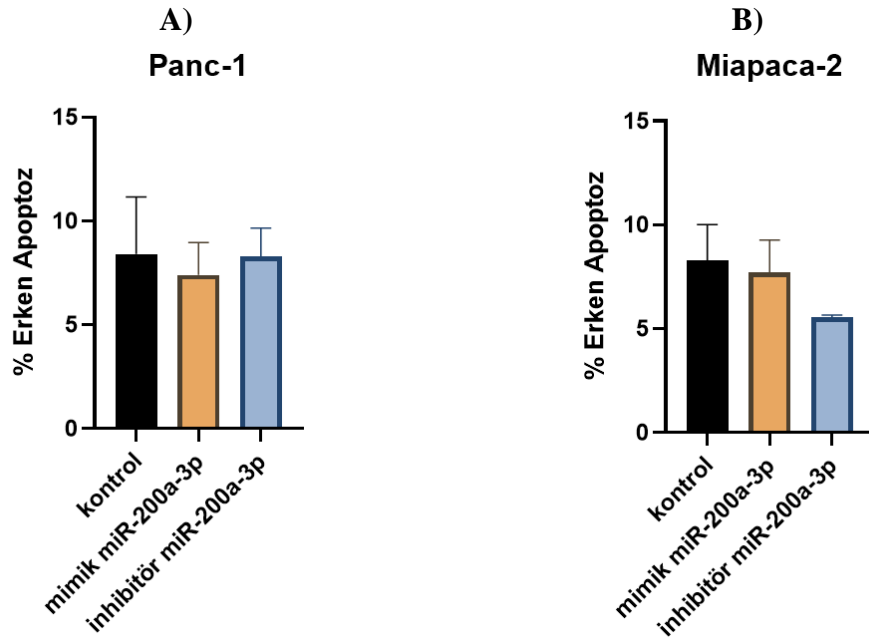
Normal hücrelerin membran yüzeylerinin sitoplazmaya bakan kısmında fosfotidilserin (PS) lipitleri bulunur. Hücrenin apoptoza gitmesi durumunda PS'ler hücre membranının dış yüzüne translokale olur. Bu yer değiştirme, hücre bütünlüğünü bozmasada hücrenin erken apoptoza gittiğini gösterir. Apoptoz analizinde kullandığımız Annexin V, hücrenin dış membranında bulunan PS'lere bağlanabilen bir proteindir. Floresan bir madde (FITC) ile Annexin V işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirildi. Annexin V, nekrotik hücrelerin yüzeylerine de bağlanabildiğinden, nekrotik hücreleri ayırt etmek için ikinci boya olarak propidium iyodür kullanıldı. Miapaca-2 ve Panc-1 hücreleri kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyon deneyleri için gruplandırıldı. Gruplar, Annexin V-FITC (*green fluorescence*) ve propidium iodide (*red fluorescence*) ile aynı zamanda boyandı ve canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler (FITC+PI+) analiz edildi.

4.5.1. Transfeksiyondan 24 saat sonra Apoptozis Analizleri

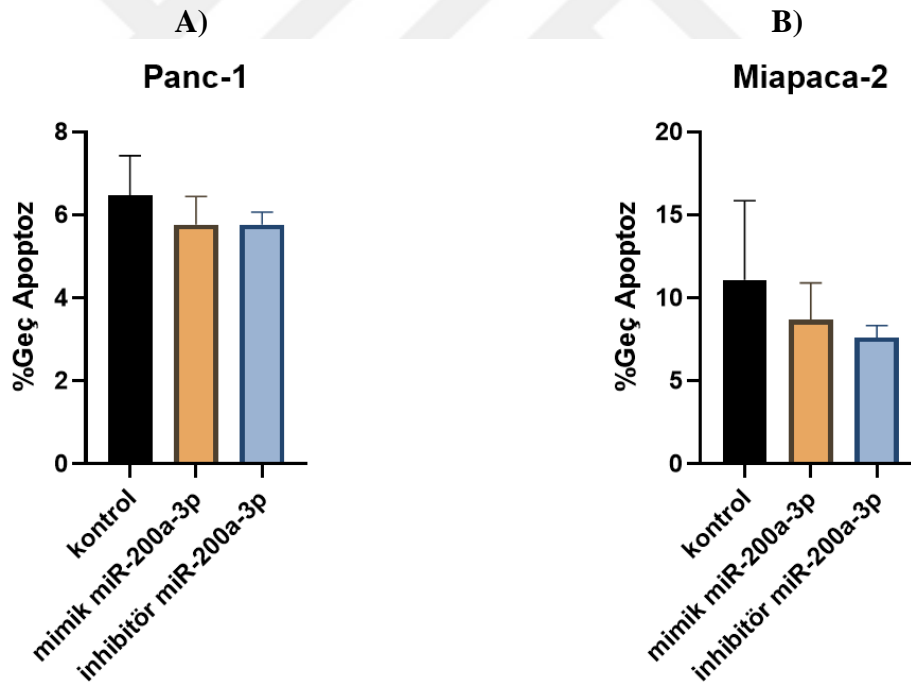
Panc-1 ve Miapaca-2 hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra yapılan Annexin-PI boyamalarına göre, canlı (FITC-PI-) hücre yüzdeleri ile gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (n=3) (Şekil 4.10. A-B). Erken (FITC+PI-) ve geç apoptoz (FITC+PI+) yüzdelere bakıldığında ise Panc-1 hücre hattında mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrelerde erken apoptoz yüzdesinin azalmasına rağmen Miapaca-2 hücre hattında olduğu gibi hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.11. A-B), (Şekil 4.12. A-B). Transfeksiyondan 24 saat sonra nekrotik hücre (FITC+PI+) yüzdelere bakıldığında, Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında nekrotik hücre yüzdesi ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.13. A-B).



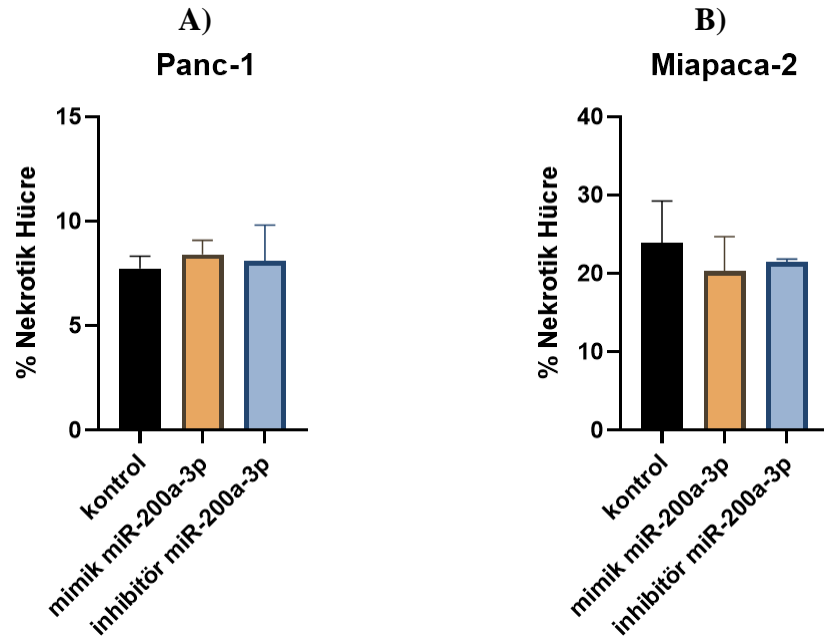
Şekil 4.10. A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra canlı hücre yüzdeleri (n=3).



Şekil 4.11. A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra erken apoptoz görülen hücre yüzdeleri (n=3).



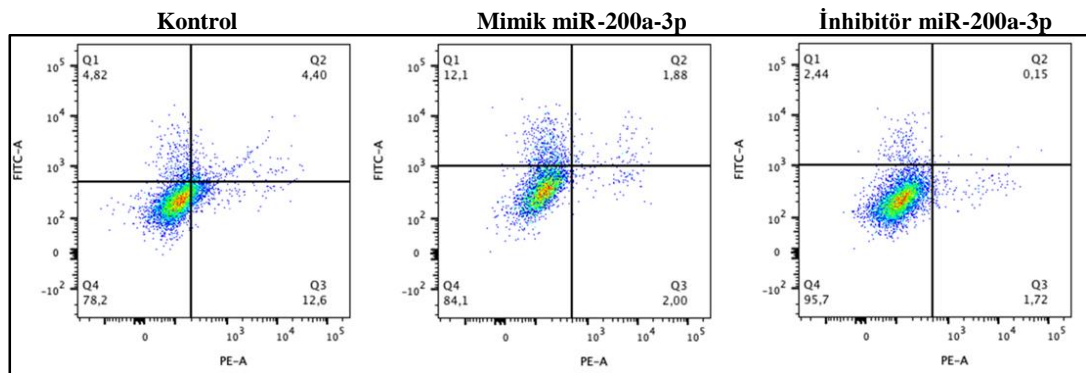
Şekil 4.12. A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra geç apoptoz görülen hücre yüzdeleri (n=3).



Şekil 4.13. A-B. Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 24 saat sonra nekrotik hücre yüzdeleri (n=3).

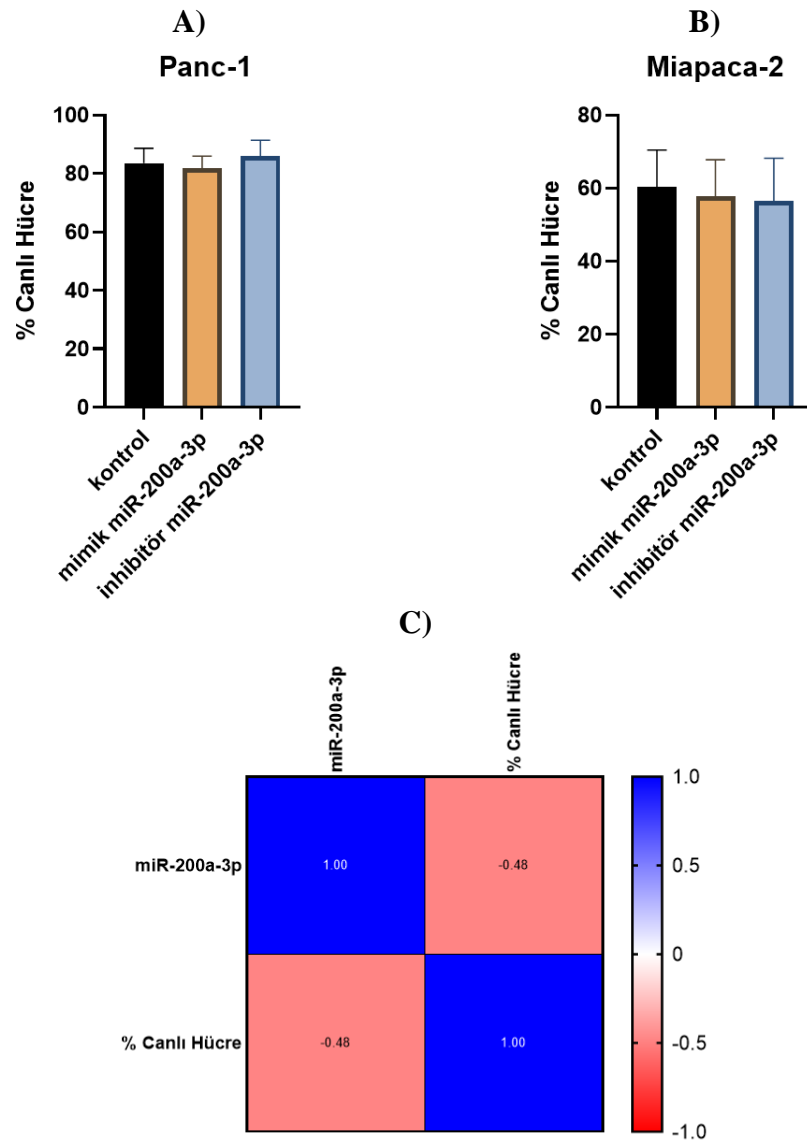
4.5.2. Transfeksiyondan 48 saat sonra Apoptozis Analizleri

Mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyon deneyinden 48 saat sonra apoptoz analizleri için, hücre grupları kültürden kaldırılarak V-FITC (*green fluorescence*) ve propidium iodide (*red fluorescence*) ile aynı zamanda boyandı. Hücre grupları boyalar ile işaretlendikten sonra akım sitometri cihazında FITC-PI-, FITC+PI- ve FITC+PI+ özelliklerine göre analiz edildi. Panc-1 hücre hattında 6 bağımsız deney analiz edilirken, Miapaca-2 hücre hattında 3 bağımsız deneye göre analizler elde edildi.



Şekil 4.14. Transfeksiyon deneylerinden 48 saat sonra yapılan canlılık ve apoptoz analizlerinin temsili akım sitometri histogramları.

Transfeksiyondan 48 saat sonra Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında yapılan canlılık analizinde kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücre grupları arasında, (FITC-PI-) yüzdeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.15. A-B). Analiz sonuçlarına göre Panc-1 hücre hattında miR-200a-3p ekspresyonu ile canlı hücre yüzdesi arasında negatif (ters) yönde, orta şiddette ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptandı (Spearman r : -0,484 p = **0,042**) (Şekil 4.15. C).

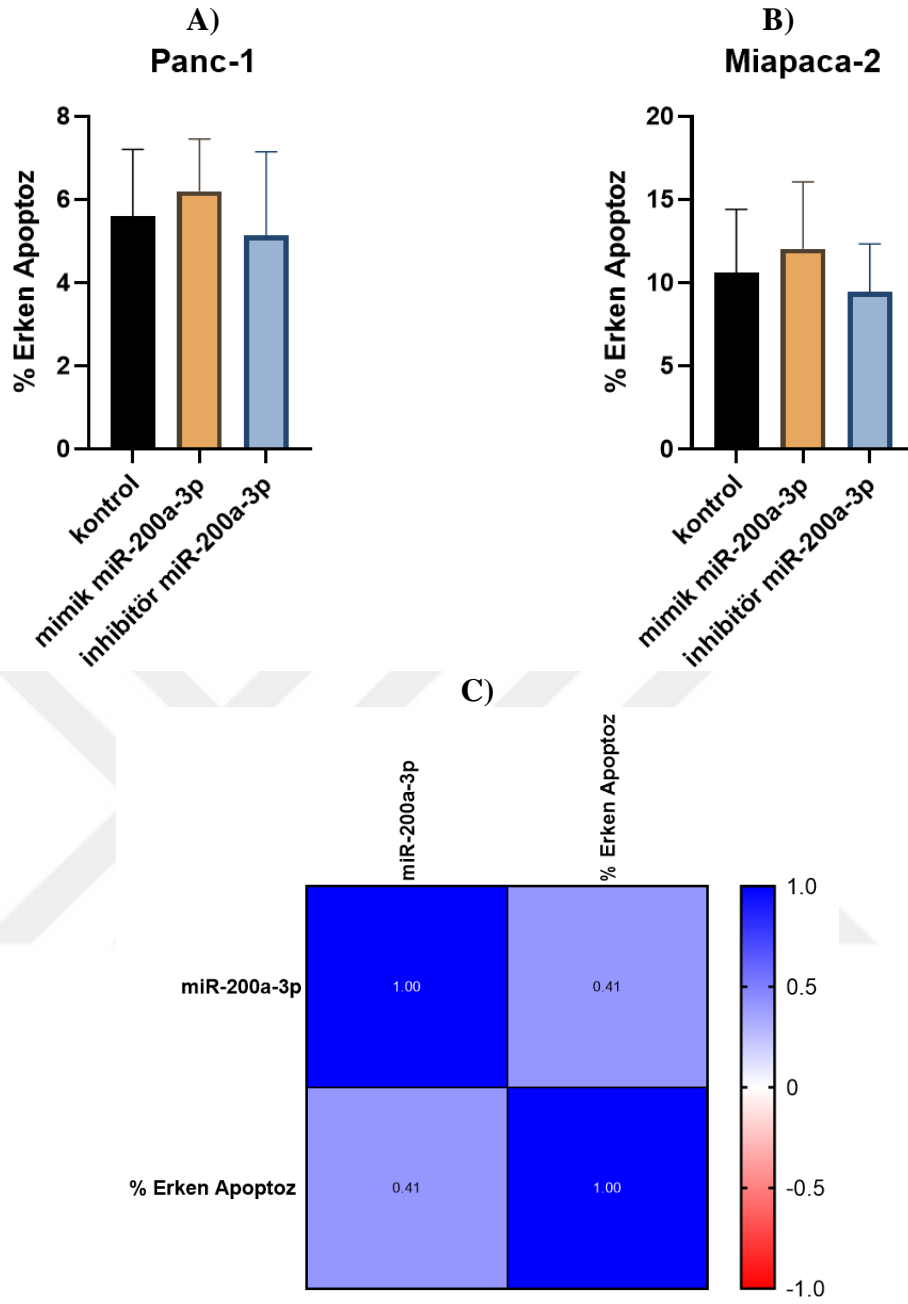


Şekil 4.15. A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan canlı hücre analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile canlı hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -% Canlı Hücre) göstermektedir.

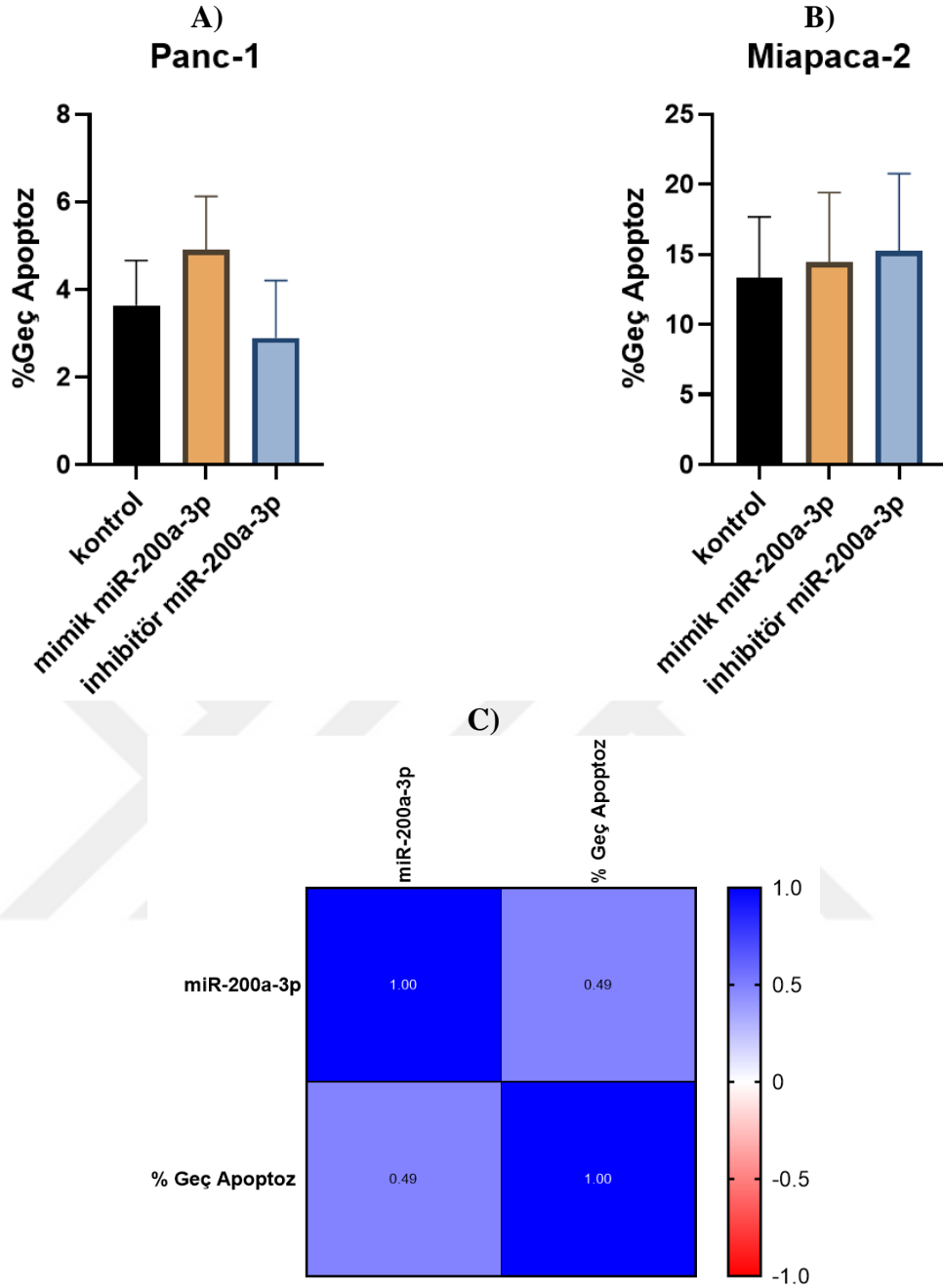
Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında 48 saat sonra yapılan erken apoptoz yüzdelerinde ise mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrelerde erken apoptoz yüzdesinin artışı görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.16. A-B). Yapılan analiz sonuçlarına göre Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile erken apoptoz yüzdesi arasında, pozitif yönde, orta şiddette ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan korelasyon saptandı (Spearman $r: 0,41$ $p=0,09$) (Şekil 4.16. C).

Panc-1 ve hücre hattında 48 saat sonra yapılan geç apoptoz yüzdelerinde mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrelerde geç apoptoz yüzdesi artış gösterse de Miapaca-2 hücre hattında yapılan analiz gibi hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.17. A-B). Yapılan analiz sonuçlarına göre, Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile geç apoptoz yüzdesi arasında pozitif yönde, orta şiddette ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı (Spearman $r: 0,486$ $p= 0. 04$) (Şekil 4.17. C).

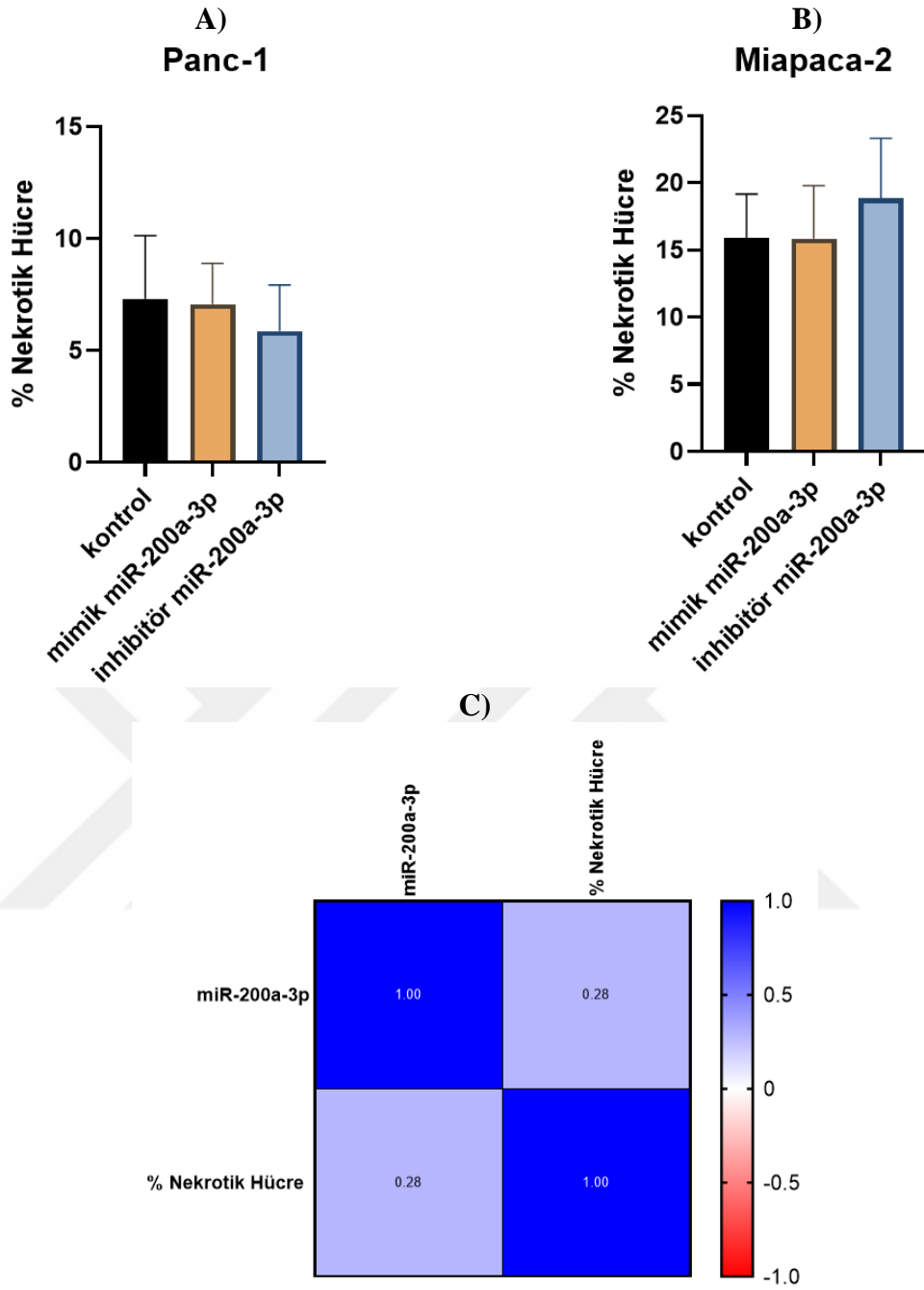
Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra yapılan nekrotik hücre analizlerinde ise kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.18. A-B). Yapılan analiz sonuçlarına göre Panc-1 hücre hattında ise miR-200a-3p ekspresyonu ile nekrotik hücre yüzdesi arasında, pozitif yönde, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan korelasyon saptandı (Spearman $r:0,283$ $p=0,255$) (Şekil 4.18. C).



Şekil 4.16. A ve B grafikleri, Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra erken apoptoz analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile erken apoptoz hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -% Erken Apoptoz Hücre) göstermektedir.









Şekil 4.17. A ve B grafikleri Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra geç apoptoz analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile geç apoptoz hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -%Geç Apoptoz Hücre) göstermektedir.



Şekil 4.18. A ve B grafikleri, Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında transfeksiyondan 48 saat sonra nekrotik hücre analizlerini (sırasıyla), C- grafiği Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p ekspresyonu ile nekrotik hücre yüzdeleri arasında yapılan korelasyon analizini ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -% Nektotik Hücre) göstermektedir.

Panc-1 hücre hattında yapılan korelasyon analizleri Şekil 4.19'da şematize edilmiştir.

 miR-200a-3p 18.07 Kat ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		 TFAM 5.55 Kat ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
 % Canlı Hücre $p < 0.05$	 % Erken Apoptoz Hücre $p > 0.05$	 % Geç Apoptoz Hücre $p < 0.05$	 % Nekrotik Hücre $p > 0.05$	 % Hücre Proliferasyonu $p > 0.05$

Şekil 4.19. Panc-1 hücre hattında yapılan korelasyon analizlerinin özeti

5. TARTIŞMA

Pankreatik duktal adenokarsinom, solid tümör maligniteleri arasında en yüksek ölüm oranına sahip olup, ortalama 5 yıllık sağkalım %5'in altındadır ve medyan sağkalım süresi 6 aydan azdır. Dolayısıyla agresif ve semptom göstermeden seyreden pankreas kanserinde erken tespit ve terapötik stratejilerin geliştirilmesinde, yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi kritik öneme sahiptir.

Küçük kodlayıcı olmayan RNA'lar olan mikroRNA'lar (miRNA'lar), birçok biyolojik süreçte genlerin ekspresyonunu değiştirerek, pankreas kanseri gelişiminde önemli rol oynamaktadır. miRNA'lar, kanser hücrelerinde rol alan sinyal iletim yolları ile ilişkili genleri posttranskripsiyonel düzeyde ekspresyonlarını düzenleyerek, kanser hücrelerinin, proliferasyonunu, invazyonunu, ve apoptozunu modüle eder. Bu nedenle miRNA'lar, tedavi için etkili teşhis belirteçleri ve ilaç hedefleri olarak kullanılabilirler.

Mitokondriyal transkripsiyon faktör A (TFAM), yüksek mobilite grubu (*High Mobility Group*, HMG) protein ailesinin bir üyesi olmakla beraber mitokondriyal genomun D-loop bölgesinden transkripsiyonu aktive eder. Mitokondri, normal hücre proliferasyonu gibi kanser hücrelerinin metabolizmasında da kritik bir rol oynar. Ayrıca mitokondri sayısı, kanser hücrelerinin büyüme hızı ile ilişkilendirilmektedir.

Çalışmamızda pankreas kanseri hücre hatları olan Miapaca-2 ve Panc-1 hücrelerinde miR-200a-3p ekspresyonu bazal düzeyde incelendi ve düşük miR-200a-3p ekspresyonu özgül mimik miR-200a-3p ile artırılıp, inhibitörü ile ekspresyonu azaltılmaya çalışıldı. Buna bağlı olarak miR-200a-3p hedef genlerinden biri olan TFAM gen ekspresyonunun semi-kantitatif analizi yapıldı. Gen ekspresyonu analizlerinin yanı sıra mimik ve inhibitör miRNA transfeksiyonları sonucunda hücre proliferasyonu, canlılığı ve apoptozu değerlendirildi.

Birçok miRNA arasında, miR-200 ailesi tümör baskılayıcı olarak bilinmektedir ve pek çok kanserde düşük düzeyde eksprese edilirler. miR-200 ailesinin ekspresyonunun kaybı, EMT fenotipinin kazanılmasına ve ilaç direncine katkıda bulunur. Epitel dokularda ise miR-200a-3p ekspresyonu oldukça yüksektir (137). miR-

200a-3p'nin hedefleri arasında, kanserlerin gelişimi ve ilerlemesi için önemli özellikleri düzenleyen ZEB1, ZEB2, SIP1 ve SIRT1 gibi epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır (6).

Farklı kanser türlerinde miR-200a-3p ekspresyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Örneğin, kolorektal kanseri hastalarında düşük miR-200a-3p ekspresyonunun kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (195). Meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada da miR-200a-3p'nin ekspresyonu kolorektal kanseri hastalarında saptandığı gibi düşük düzeyde bulunmuştur (196). Bizim çalışmamızda da pankreas kanseri hücre hatları olan Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında miR-200a gen ekspresyonu literatür ile uyumlu olarak düşük düzeyde bulunmuştur.

Meme kanseri hücre hatlarında miR-200a-3p ekspresyonundaki azalmanın, Keap1 ekspresyonunun artmasıyla korele olduğu gösterilmiştir. Keap1 ekspresyonunun artmasıyla, G1 fazında hücre döngüsü durmasını indükleyerek tümör hücresi büyümesini inhibe eden Nrf2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (196). Pankreas kanseri kök hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada ise miR-200a'nın vimentin, N-cadherin ve ZEB1 ekspresyonunu inhibe ederek epitelyal-mezenkimal geçişi inhibe ettiği ve kanser kök hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu azalttığı saptanmıştır (197).

Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM, aynı zamanda mtTFA, TCF6 olarak da adlandırılır), mtDNA'nın nükleotitlerinin paketlenmesinde bağlayıcı şaperon olarak kabul edilir ve mtDNA replikasyonu ve transkripsiyon için gereklidir (155). TFAM'ın, mtDNA bütünlüğünün korunmasında ve mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. mtDNA'nın promotorlarına bağlanabilir ve sonuç olarak transkripsiyon sürecini düzenleyebilir. Birkaç çalışma, TFAM ekspresyonunun azalmasıyla normal hücrelerin fonksiyonlarının bozulabileceğini, inflamatuvar ve fibroz gibi mitokondri ile ilgili hastalıklara yol açabileceğini göstermiştir (198, 199). Bununla birlikte, TFAM'ın aşırı ekspresyonunun tümörlerin gelişiminde rol oynadığı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmalardan birinde TFAM'ın hem çekirdekte hem de mitokondrideki

ekspresyonunun tümör hücresinin proliferasyonunu destekleyebileceği gösterilmiştir (200). Benzer diğer bir çalışmada ise, hepatoselüler karsinom dokularında komşu normal dokulara kıyasla TFAM ekspresyonunun arttığı ve artan TFAM gen ekspresyonunun kolorektal kanserde kötü prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir (201, 202). Endometriyum tümörlerinde, tümör dokusunun bitişiğindeki normal dokuya göre, TFAM geninin aşırı eksprese edildiği bilinmektedir (173). TFAM geninin aşırı ekspresyonu glioma hücrelerinde ise migrasyonu arttırıp koloni oluşumunu indüklemektedir (203). Küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinde de benzer sonuçların elde edildiği, TFAM geninin inhibisyonu ile hücre döngüsünün G1 fazında durdurulup hücre bölünmesinin durakladığı ve apoptozun indüklenerek tümör gelişiminin baskılandığı gösterilmiştir (7). Literatürdeki bu bilgiler, TFAM geninin birçok tümörde aşırı eksprese edilerek kötü prognoza neden olduğunu göstermektedir. TFAM ekspresyonu pankreas kanseri ve diğer kanser türlerinde onkojenik özellik göstererek tümör gelişimine ve maligniteye sebep olarak kötü prognozla koreledir. Panc-1 ve Miapaca-2 pankreas kanseri hücre hatları ile yapılan bu çalışmada da TFAM ekspresyonunun yüksek olduğu tespit edilmiştir

Bizim çalışmamızda benzer şekilde TFAM gen ekspresyonunun baskılanıp buna bağlı olarak hücrenin yaşamsal fonksiyonlarının değerlendirilmesine ilişkin literatürde çalışmalar mevcuttur. X. Chen ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, gliomada, tümör baskılayıcı bir gen olan Krüppel benzeri faktör (KLF) üyelerinden KLF16'nın TFAM promotör bölgesi ile etkileşime girerek TFAM gen ekspresyonunu transkripsiyonel olarak baskıladığı gösterilmiştir. TFAM gen ekspresyonunun baskılanmasıyla p-Rb, p-FOXO1, siklin E ve siklin D1 gen ekspresyonlarının azaldığı ve p21 gen ekspresyonunun ise arttığı ve buna bağlı olarak hücre döngüsünün durduğu, hücre proliferasyonunun azaldığı gösterilmiştir (204). Mide kanseri hücre hattında yapılan diğer bir çalışmada ise, TFAM ekspresyonunun inhibisyonu ile tümör ilerlemesinin inhibe edildiği gösterilmiştir (205). TFAM gen ekspresyonunun baskılanmasıyla, CFAP65 ve PCK1 genlerinin ekspresyonları artar ve hücre proliferasyonu inhibe edilir (210). miR-214 ile baskılanan TFAM ekspresyonu sonucunda serviks kanserinde proliferasyonunun azaldığı saptanmıştır (206). Bununla birlikte küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, TFAM ekspresyonunun inhibisyonu, hücresel biyoenerjiyi azaltıp, ROS aracılı JNK/p38 MAPK ve p53/p-

p53(ser15)/p21 sinyal yolağını aktive ederek tümör oluşumunu inhibe etmektedir (7). Bu çalışmalar doğrultusunda TFAM geninin yüksek ekspresyonu ile kanser hücrelerinin proliferasyonunun arttığı, buna karşın TFAM gen ekspresyonunun azalmasıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı yorumu yapılabilir. Yamauchi M. ve arkadaşlarının pankreas duktal adenokarsinom hastalarından elde edilen dokularda yaptığı bir araştırmaya göre de, TFAM gen ekspresyonunun artmasıyla sağkalımın düştüğü, karaciğere lenfovasküler invazyonun arttığı ve TFAM gen ekspresyonu ile metastatik nüks arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (208). Dolayısıyla, kanser hücrelerinin metastatik fenotip kazanmasında da TFAM'ın rol üstlenebileceği düşünülmektedir. Meme kanserinde yapılan bir çalışmada, miR-200a gen ekspresyonunun uzun kodlamayan RNA olan TP73-AS1 ile baskılanması sonucu, miR-200a ekspresyonunun artmasıyla azalan TFAM gen ekspresyonunun, yeniden arttığı gösterilmiştir (207).

Bizim çalışmamızda, Miapaca-2 ve Panc-1 hücrelerine mimik miR-200a-3p transfekte edildiğinde miR-200a gen ekspresyonu kontrole göre sırasıyla; 11,8 ve 17,08 kat arttığı tespit edildi. Buna bağlı olarak TFAM gen ekspresyonu hücrelerde kontrole göre sırasıyla; 2,13 ve 5,55 kat azalmıştır. Panc-1 hücre hattında yapılan miR-200a-3p ekspresyonu ile TFAM gen ekspresyonu arasında yapılan korelasyon analizinin sonucunda miR-200a-3p ile TFAM geninin arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da orta şiddette negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı çıkmaması standart sapmanın yüksek olmasından kaynaklanabilir, deney sayısı artırılarak analizlerin tekrar yapılması ile anlamlı bir korelasyon elde edilebilir. Ayrıca TFAM'ın daha fazla baskılanamaması teknik nedenlerle olabileceği gibi TFAM molekülünün önemi göz önüne alındığında, başka yollar üzerinden TFAM baskılanması engelleniyor olabilir.

Bu bulguların devamında pankreas kanseri hücre hatlarında proliferasyon ve apoptoz deneyleri yapılmıştır. Panc-1 hücre hattında, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 48 saat sonra yapılan analizlere göre, miR-200a-3p gen ekspresyonu ile hücre proliferasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yüksek derecede negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak mimik miR-200a-3p transfekte edilen Panc-1 hücrelerinde hücre

proliferasyonunda anlamlı bir azalış ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrelerde ise, hücre proliferasyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır. Mimik miR-200a-3p transfeksiyonu ile artan miR-200a-3p ekspresyonu, onkojenik karakter gösteren TFAM genini hedefleyerek, TFAM gen ekspresyonunun azalmasını sağlayarak, sonuçta hücre proliferasyonunun baskılanması gözlenmiştir.

Miapaca-2 hücre hattında ise inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilemediğinden miR-200a-3p ve hücre proliferasyonu arasındaki korelasyon analiz edilememiştir. Buna bağlı olarak kontrol, mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücreler arasında hücre proliferasyonu açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında yapılan mimik miR-200a-3p ve inhibitör mimik miR-200a-3p transfeksiyonundan 72 ve 96 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerinde ise kontrol, mimik miR-200a-3p transfeksiyonu inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücreler arasında hücre proliferasyonu açısından anlamlı fark elde edilmemiştir. 72 ve 96 saat sonra yapılan hücre proliferasyon analizlerinde anlamlı sonuç bulunmamasının sebebinin transfeksiyon etkinliğinin zamana bağlı olarak azalmasından dolayı olabilir. Mimik miR-200a-3p transfeksiyon sonrası arttırılan miR-200a-3p ekspresyon seviyesinin zamana bağlı olarak azaldığı ve buna bağlı olarak TFAM geni üzerindeki baskılamanın da azaması olasıdır. Kalıcı transfeksiyonlar ile miR-200a-3p ekspresyonları arttırılıp, stabil miR-200a-3p ekspresyon artışının sağlanması ile hücre proliferasyon analizlerini yeniden değerlendirilebilir.

Çalışmada yapılan canlılık, apoptoz analizlerinde Panc-1 ve Miapaca-2 hücre hatlarında yapılan mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 24 saat sonra yapılan canlılık ve apoptoz analizlerinde, canlı hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve nekrotik hücre popülasyonları kontrol ile karşılaştırıldığında aralarında bir fark bulunamadı. Anlamlı sonuçların bulunmamasının sebebinin, hücrelerin transfeksiyon etkinliği için yeterli sürede kültüre edilmemesinden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 24 saat sonra hücreler kültür ortamından,

canlılık ve apoptoz analizleri için uzaklaştırıldığından transfeksiyonun etkin bir şekilde gerçekleşmediğini düşünmekteyiz.

Panc-1 hücre hattında yapılan mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 48 saat sonra yapılan canlılık analizlerinde ise, miR-200a-3p ekspresyonu ile canlı hücre popülasyonu arasında negatif korelasyon olduğu sonucu elde edilmiştir. miR-200a-3p gen ekspresyonunun arttırılmasıyla, hedef genlerinden olan TFAM'ın gen ekspresyonunun azalması söz konusudur. Onkogen olarak rol alan TFAM gen ekspresyonunun azalmasıyla hücre canlılığının da azalması, TFAM geninin kanser hücresindeki etkinliğini doğrulamaktadır.

Panc-1 hücre hattında yapılan mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 48 saat sonra yapılan erken apoptoz analizinde, miR-200a-3p ekspresyonu ile erken apoptoz hücre popülasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da orta şiddette pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrelerde erken apoptoz hücre popülasyonunda artış görülse de kontrol ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonuna göre anlamlı bir fark bulunamadı. Miapaca-2 hücre hattında ise mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrede erken apoptoz hücre popülasyonunda artış görülse de diğer hücre koşulları ile aralarında anlamlı bir fark bulunamadı.

Çalışmamızda, Panc-1 hücre hattında yapılan mimik miR-200a-3p ve inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonundan 48 saat sonra yapılan geç apoptoz analizinde, miR-200a-3p ekspresyonu ile geç apoptoz hücre popülasyonu arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Mitokondrinin, programlanmış hücre ölümünde kritik sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. mtDNA'dan yoksun embriyo hücrelerinin ve farklılaşmış hücrelerin apoptoza gittikleri *in vivo* olarak gösterilmiştir (209). Bununla birlikte apoptozun ya da nekrozun hücre içi ATP seviyelerine bağlı olduğu da bildirilmiştir. (210). Bizim bulgumuz da literatürle uyumlu olarak, miR-200a-3p gen ekspresyon artışının, TFAM gen ekspresyonunu baskılaması sonucu mtDNA'nın transkripsiyonunu engelleyerek apoptoz artışına neden olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak mimik miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücrede erken apoptoz hücre popülasyonunda artış görülse de,

Miapaca-2 hücre hattında olduğu gibi, kontrol, mimik miR-200a-3p, inhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu yapılan hücreler arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Bu çalışmada, miR-200a-3p ve bu miRNA'nın hedef genlerinden olan TFAM geni arasındaki ilişki transkripsiyonel düzeyde incelenmiştir. Ancak biliyoruz ki bir miRNA'nın hedefinde binlerce gen yer almaktadır. Pankreas kanseri hücre hatlarında miR-200a-3p'nin, TFAM genini hedefleyerek, TFAM gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, miR-200a-3p'nin TFAM geni dışında hedef skoru 50-100 olan 1087 adet geni regüle ettiği bilinmektedir (*MiRDB veritabanı*). Dolayısı ile miR-200a-3p'nin yüksek skor ile hedeflediği diğer genlerin de yer aldığı yeni analizlerin yapılması yeni hedef moleküllerin tespit edilmesi açısından yararlı olabilir. miR-200a-3p'nin yüksek skor (Hedef skor= 88, *MiRDB veritabanı*) ile hedeflediği ve pankreas kanseri hücrelerinde aşırı düzeyde eksprese edildiği literatürde yapılan çalışmalarda gösterilen Yes Associated Protein 1 (YAP1) geni (211) ile aralarındaki ilişkinin incelenmesi önemli olabilir. Transkripsiyonel koaktivatör YAP1, doku büyümesi, onarımı, rejenerasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi biyolojik süreçler için önemli yollardan olan Hippo sinyal yolunu negatif yönde düzenlemekle birlikte mitokondriyal işlevlerde ve biyogenezde de rol almaktadır (212). Oksidatif fosforilasyon sonrası ortaya çıkan reaktif ürünlere karşı hassas olan mtDNA, bir dizi enzim-protein ilişkili mekanizmalar ile korunup, onarılmaktadır. Telomerlerin korunmasından sorumlu olan telomeraz kompleksinin enzimatik alt birimi olan telomeraz ters transkriptazın (TERT), bu mekanizmalardan olup Hippo/YAP1 yolağı ile düzenlenmektedir (213). Ayrıca YAP1 ekspresyonu, mtDNA'nın biyogenezi ve onarımında büyük rol oynayan TFAM gen ekspresyonu ile de korele olduğu saptanmıştır (214).

Sonuç olarak, Panc-1 ve Miapaca-2 pankreas kanseri hücre hatlarında yapılan bu çalışmada, miR-200a-3p gen ekspresyonunun düşük, TFAM gen ekspresyonunun ise yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Pankreas kanseri hücre hatlarında da TFAM'ın, miR-200a-3p'nin hedef geni olduğu doğrulanmış ve miR-200a-3p tarafından baskılandığı gen ekspresyonu analiz sonuçlarına göre ilk kez gösterilmiştir. Panc-1 hücre hattında mimik miR-200a-3p transfeksiyonu ile miR-200a-3p gen ekspresyonu arttırılarak transfeksiyondan 48 saat sonra hücre proliferasyonunun

azaldığı, apoptozun ise indüklendiği tespit edilmiştir. miR-200a-3p ekspresyonu ile geç apoptoz hücre yüzdesi arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak TFAM geninin apoptozla ilişkili yollarda da rol oynadığı düşünülmektedir. TFAM'ın miR-200a-3p aracılığı ile hedeflenebileceği ve pankreas kanserindeki potansiyel rollerinin belirlenmesinde fonksiyonel olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca tümör süpresör gen olarak rol oynayan miR-200a-3p'nin hedeflenmesi, etki ettiği genler düşünüldüğünde tümör regresyonu açısından beklenenden çok daha fazla yarar sağlayabilir. Bu nedenle miR-200a-3p ile ilgili gen ve moleküller arasındaki ilişkileri açıklayan *in vitro* ve *in vivo* araştırmaların yapılması transkripsiyonel araştırmaların planlanmasına öncülük edecektir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

-Panc-1 hücre hattında, miR-200a-3p geninin düşük seviyede eksprese edildiği bulundu. Mimik miR-200a-3p transfeksiyonu sonucunda Panc-1 hücrelerinde, miR-200a-3p gen ekspresyonu 17.08 kat artış gösterirken; TFAM gen ekspresyonunun 5.55 kat azaldığı saptandı.

-Panc-1 hücre hattında inhibitör miR-200a-3p transfeksiyon deneyinden sonra miR-200a-3p gen ekspresyonunda 3.26 kat azaldığı gösterildi. Mimik miR-200a-3p transfeksiyonu sonrasında elde edilen kat artışı kadar yüksek seviyede bir azalma sözkonusu olmadığı için miR-200a-3p inhibisyonu sonrası TFAM gen ekspresyonu değerlendirilemedi.

-Miapaca-2 hücre hattında ise mimik miR-200a-3p transfeksiyonu sonucunda miR-200a-3p gen ekspresyonu 11,8 kat arttırıldı. Buna bağlı olarak TFAM gen ekspresyonunun 2,13 kat azaldığı gösterildi. İnhibitör miR-200a-3p transfeksiyonu sonrası, Miapaca-2 hücrelerinde bazal seviyede eksprese edilen miR-200a-3p gen ekspresyonu inhibe edilemedi.

-miR-200a-3p'nin TFAM genini hedefleyerek TFAM gen ekspresyonunu regüle ettiği ve aralarında negatif bir ilişki olduğu saptandı.

-Panc-1 hücrelerinde miR-200a-3p gen ekspresyonunun artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunun ve canlılığının azaldığı, apoptozun ise arttığı gösterildi.

Bu bulgular dikkate alındığında;

-miR-200a-3p transfeksiyonu sonucunda Miapaca-2 ve Panc-1 hücrelerinde TFAM ekspresyonu protein düzeyinde western blot ve/veya immünohistokimya yöntemleri ile analiz edilebilir.

-miR-200a-3p yüksek skorla hedeflediği diğer genler olan; YAP1, ZEB1 ve ZEB2 çalışmaya dahil edilerek aralarındaki ilişkinin hücre yaşamsal fonksiyonları üzerindeki etkileri incelenebilir

-miR-200a-3p gen ekspresyonu arttırılan hücrelerde canlılık, proliferasyon, apoptoz gibi süreçlerin değerlendirilmesinin yanı sıra kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik karakterleri değerlendirilebilir.

-TFAM gen ekspresyonunun pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin net bir şekilde anlaşılabilmesi için TFAM geni siRNA ile susturulup, yaşamsal fonksiyonlar analiz edilebilir.

-Hücre hatlarının dışında pankreas kanseri dokularında da miR-200a-3p ve TFAM gen ekspresyon düzeylerinin korele olup olmadığı teyit edilebilir.

-Hasta kaynaklı ksenograft (PDX) modelleri ile pankreas kanseri hücrelerinde miR-200a-3p ve TFAM ekspresyon düzeyleri hem gen hem de protein düzeyinde incelenebilir.

-Transgenik pankreas kanseri hayvan modellerinde, miR-200a-3p'nin TFAM geni üzerindeki düzenleyici etkisi mekanistik olarak araştırılabilir.

-TFAM ile benzer etkileri bulunan YAP1 geninin hedeflenmesiyle hücresel ve moleküler deneyler gerçekleştirilerek miR-200a-3p'nin etkisi değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Nitsche C, Simon P, Weiss FU *et al.* Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig. Dis.* 29(2), 235–242 (2011).
2. Bracci PM. Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol. Carcinog.* 51(1), 53–63 (2012).
3. Slack, F.J., Weidhaas, J. B. *Microna İn Cancer Prognosis.* *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 2720–2722.
4. Friedman, R. C., Farh, K.K., Burge, C. B., Bartel, D. P. Most Mammalian Mrnas Are Conserved Targets of Micronas. *Genome Res.* 2009, 19, 92–105.
5. Lewis, B. P., Burge, C.B., Bartel, D. P. Conserved Seed Pairing, often Flanked By Adenosines, İndicates That Thousands of Human Genes Are Microna Targets. *Cell* 2005, 120, 15–20.
6. Gravgaard. KH, Lyng MB, Laenkholm AV, Sokilde R, Nielsen BS, Litman T, Ditzel, HJ. The Mirna-200 Family and Mirna-9 Exhibit Differential Expression İn Primary versus Corresponding Metastatic Tissue İn Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* 2012; 134:207-217.
7. Downregulation of TFAM İnhibits The Tumorigenesis of Non-Small Cell Lung Cancer By Activating ROS-Mediated JNK/P38mapk Signaling and Reducing Cellular Bioenergetics
8. Mitochondrial Genome and İts Regulator TFAM Modulates Head and Neck Tumourigenesis Through İntracellular Metabolic Reprogramming and Activation of Oncogenic Effectors
9. Signorile A, De Rasmio D, Cormio A, Musicco C, Rossi R, Fortarezza F, Palese LL, Loizzi V, Resta L, Scillitani G, Cicinelli E, Simonetti F, Ferretta A, Russo S, Tufaro A, Cormio G. Human Ovarian Cancer Tissue Exhibits İncrease of Mitochondrial Biogenesis and Cristae Remodeling. *Cancers.*
10. Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) Shapes Metabolic and İnvasion Gene Signatures İn Melanoma
11. JunjieHuang, veeleahLok, Chun HoNgai *et al.* Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology.* 744-754. 2021
12. P. V. Roder, B. Wu, Y. Liu, W. Han Pancreatic regulation of glucose homeostasis *Exp Mol Med*, 48 (2016), p. e219
13. Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol.* 2016;22(9):2678-700.
14. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, *et al.* Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* (80-). 2008 Sep;321(5897):1801 LP – 1801806.
15. De Braud F, Cascinu S, Gatta G. Cancer of pancreas. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;50(2):147–55.

16. Rozenbium E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, et al. Tumor-suppressive Pathways in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* 1997;57(9):1731–4
17. Mohammed S, Van Buren G 2nd, Fisher WE: Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World J Gastroenterol* 2014;20:9354-9360.
18. Saiki Y, Horii A: Molecular pathology of pancreatic cancer. *Pathol Int* 2014;64:10-19.
19. Fendrich V, Langer P, Bartsch DK: Familial pancreatic cancer-status quo. *Int J Colorectal Dis* 2014;29:139-145.
20. Benzel J, Fendrich V: Molecular characterization and pathogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Eur Surg Res* 2015;55:352-363.
21. Crippa S, Salvia R, Warshaw AL, et al. : Mucinous cystic neoplasm of the pancreas is not an aggressive entity: Lessons from 163 resected patients. *Ann Surg* 2008;247:571-579.
22. Afra Z, Daoud, Eoghan J. Mulholland, Grace Cole & Helen O. McCarthy. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators. *BMC Cancer* volume 19. 1130 (2019)
23. MaossaTanaka,Carlos Fernández-Del Castillo, Terumi Kamisawa: Revisions of international consensus Fukuoka guidelines for the management of IPMN of the pancreas. *Sep-Oct 2017;17(5):738-753.*
24. Norman Oneil Machado, Hani al Qadhi, Khalifa al Wahibi: Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of Pancreas. *N Am J Med Sci.* 2015 May; 7(5): 160–175.
25. Michael Noë, Lodewijk A. A. Brosens, Gastric- and intestinal-type IPMN: two of a kind?, *European Journal of Pathology*, 477, pages17–19 (2020)
26. European Evidence-Based Guidelines On Pancreatic Cystic Neoplasms
27. Demographics, Clinical Features, and Prevalence of Cancer. Reddy RP, Smyrk TC, Zapiach M, Levy MJ, Pearson RK, Clain JE, Farnell MB, Sarr MG, Chari Stclin. *Pancreatic Mucinous Cystic Neoplasm Defined By Ovarian Stroma: Gastroenterol Hepatol.* 2004 Nov; 2(11):1026-31.
28. Kosmahl M, Pauser U, Peters K, Sipos B, Lüttges J, Kremer B, Klöppel G *Virchows Arch. Cystic Neoplasms of The Pancreas and Tumor-Like Lesions With Cystic Features: A Review of 418 Cases and A Classification Proposal.* 2004 Aug; 445(2):168-78.
29. Le Borgne, Joël, de Calan, Loïc; Partensky, Christian. Cystadenomas and Cystadenocarcinomas of the Pancreas. *Annals of Surgery*: August 1999. 152
30. vedat Göral. Pankreas Kanseri: Patogenez ve Tanı. *Güncel Gastroenteroloji* 18/4
31. Biogenesis of Small Rnas İn Animals. Kim VN, Han J, Siomi MC *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Feb; 10(2):126-39.

32. Manmeet Rawat 1, Kavita Kadian, Yash Gupta, Anand Kumar, Patrick S. G. Chain, Olga Kovbasnjuk, Suneel Kumar and Gulshan Parasher MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. *Genes* 2019, 10(10), 752.
33. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., Gorlich, D. Exportin 5 Is A RanGTP-Dependent Dsrna-Binding Protein That Mediates Nuclear Export of Pre-Mirnas. *RNA* 2004, 10, 185–191.
34. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. An RNA-Directed Nuclease Mediates Post-Transcriptional Gene Silencing In *Drosophila* Cells. *Nature* 2000, 404, 293–296.
35. Regulation of G1 Cell-Cycle Progression By Oncogenes and Tumor Suppressor Genes
36. Targets of Onkogenes and Tümör Suppressors: Key For Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis.
37. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control.
38. Çefle, K., (N. D.), Kanser Genetiği, Erişim Adresi: http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/9.pdf
39. Köktürk, N., Kırıçoğlu, C., E. & Öztürk, C., (2003), Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi, 5-3 (S. 127-138), Erişim Adresi: <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-akciger-kanseri-molekuler-biyolojisi-35247.html>
40. Yokuş, B. & Çakır, D., Ü., (2012), Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1(2):7-18, Elektronik:ISSN: 1308-0679, Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/347971>
41. Chen D, Farwell MA, Zhang B. Microrna As A New Player In The Cell Cycle. *J Cell Physiol.* 2010; 225: 296-301.
42. Down-Regulation of The Cyclin E1 Oncogene Expression By Microrna-16-1 Induces Cell Cycle Arrest In Human Cancer Cells
43. Park, J. K., Lee, E. J., Esau, C., Schmittgen, T. D. Antisense Inhibition of Microrna-21 Or -221 Arrests Cell Cycle, Induces Apoptosis, and Sensitizes The Effects of Gemcitabine In Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas* 2009, 38, E190–E199.
44. Xiaoming Hu, Lihua Li, Yao Lu, Xiangui Yu, Hai Chen, Qingshui Yin, Yu Zhang. miRNA-21 inhibition inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting PTEN and regulating the TGF-β1 signaling pathway. *Oncology Letters.* 16: 4337-4342, 2018
45. Halkova T., Cuperkova R., Minarik M., Benesova L. Micromnas In Pancreatic Cancer: Involvement In Carcinogenesis and Potential Use For Diagnosis and Prognosis. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2015;2015:892903. Doi: 10.1155/2015/892903.

46. Deng, J., He, M., Chen, L., Chen, C., Zheng, J., Cai, Z. The Loss of Mir-26a-Mediated Post-Transcriptional Regulation of Cyclin E2 In Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Decreased Patient Survival. *Plos ONE* 2013, 8, E76450
47. A Microna Expression Signature of Human Solid Tumors Defines Cancer Gene Targets
48. Mir-17-92 Cluster Accelerates Adipocyte Differentiation By Negatively Regulating Tumor-Suppressor Rb2/P130
49. A Mammalian Microna Cluster Controls DNA Methylation and Telomere Recombination Via Rbl2-Dependent Regulation of DNA Methyltransferases *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15 (2008), Pp. 268-279
50. Ferro, R., Falasca, M. Emerging Role of The KRAS-PDK1 Axis In Pancreatic Cancer. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 10752–10757.
51. Mir-508-3p, PTEN/PI3K/AKT Yolunu Hedefleyerek Orta Kulak Kolesteatom Hücrelerinin Proliferasyonunu Destekler ve Apoptozunu İnhibe Eder
52. Sarkar, S., Dubaybo, H., Ali, S., Goncalves, P., Kollepara, S. L., Sethi, S., Philip, P. A., Li, Y. Down-Regulation of Mir-221 İnhibits Proliferation of Pancreatic Cancer Cells Through Up-Regulation of PTEN, P27(Kip1), P57(Kip2), and PUMA. *Am. J. Cancer Res.* 2013, 3, 465–477.
53. Sevli S, Uzumcu A, Solak M Et Al. The Function Micronas, Small Potent Molecules İn Human Prostate Cancer. *Prostate Cancer P D* 2010;13: 208-217.
54. Yu, C., Wang, Y., Liu, T., Sha, K., Song, Z., Zhao, M., Wang, X. The Microna Mir-3174 Suppresses The Expression of ADAM15 and İnhibits The Proliferation of Patient-Derived Bladder Cancer Cells. *Oncotargets Ther.* 2020, 13, 4157–4168.
55. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed Cell Death: Alive and Well İn The New Millennium. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: 526-34.
56. Hengartner MO. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.
57. Adams JM, Cory S. Life Or Death Decisions By The Bcl-2 Family. *Trends. Biochem Sci* 2001;26:61-6.
58. Adrain C, Martin SJ. The Mitochondrial Apoptosome: A Killer Unleashed By The Cytochrome Seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:390-7.
59. Spierings DC, De Vries EG, Vellenga E. Et Al: Tissue Distribution of The Death Ligand TRAIL and Its Receptors. *J Histochem Cytochem* 52(6): 821-831; 2004.
60. Cory S, Adams JM. The Bcl2 Family: Regulators of The Cellular Life-Or-Death Switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647- 56.
61. Vousden KH, Lu X. Live Or Let Die: The Cells Response To P53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594- 604.
62. Tsuchida, A., Ohno, S., Wu, W., Borjigin, N., Fujita, K., Aoki, T., Ueda, S., Takanashi, M., Kuroda, M. Mir-92 İs A Key Oncogenic Component of The Mir-17–92 Cluster İn Colon Cancer. *Cancer Sci.* 2011, 102, 2264–2271

63. Chen, W., Cai, G., Liao, Z., Lin, K., Li, G., Li, Y. Mirna-766 Induces Apoptosis of Human Colon Cancer Cells Through The P53/Bax Signaling Pathway By MDM4. *Exp. Ther. Med.* 2019, 17, 4100–4108.
64. Ji F, Zhang H, Wang Y, Li M, Xu W, Kang Y, Wang Z, Wang Z, Cheng P, Tong D. Microrna-133a, Downregulated In Osteosarcoma, Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis By Targeting Bcl-Xl and Mcl-1. *Bone.* 2013;56:220–226.
65. Wang, X. -W., Xi, X. -Q., Wu, J., Wan, Y. -Y., Hui, H. -X., Cao, X. -F. Microrna-206 Attenuates Tumor Proliferation and Migration Involving The Downregulation of NOTCH3 In Colorectal Cancer. *Oncol. Rep.* 2015, 33, 1402–1410.
66. Gong, J., Zhang, J. -P., Li, B., Zeng, C., You, K., Chen, M. -X., Yuan, Y. -F., Zhuang, S. -M. Microrna-125b Promotes Apoptosis By Regulating The Expression of Mcl-1, Bcl-W and IL-6R. *Oncogene* 2013, 32, 3071–3079
67. The Muscle-Specific Micrnas Mir-1 and Mir-133 Produce Opposing Effects On Apoptosis By Targeting HSP60, HSP70 and Caspase-9 In Cardiomyocytes
68. Microrna-24a Is Required To Repress Apoptosis In The Developing Neural Retina
69. Downregulation of BCL2 By Mirnas Augments Drug-Induced Apoptosis—A Combined Computational and Experimental Approach
70. Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro-RNA Genes Mir15 and Mir16 At 13q14 In Chronic Lymphocytic Leukemia
71. Mir-204 Targets Bcl-2 Expression and Enhances Responsiveness of Gastric Cancer
72. Gheldof A, Berx G. Cadherins and Epithelial-To-Mesenchymal Transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013; 116: 317-36
73. Pacmayr E, Treese C, Stein U. Underlying Mechanisms For Distant Metastasis - Molecular Biology. *Visc Med.* 2017; 33: 11-20.
74. Yan M, Jurasz P. The Role of Platelets In The Tumor Microenvironment: From Solid Tumors To Leukemia. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 392-400
75. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Et Al. Endogenous Human Micrnas That Suppress Breast Cancer Metastasis. *Nature* 2008; 451: 147–52.
76. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of Microrna-146 Suppresses NF-Kb Activity With Reduction of Metastatic Potential In Breast Cancer Cells. *Oncogene* 2008; 27: 5643–7.
77. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Et Al. A Pleiotropically Acting Microrna, Mir-31, Inhibits Breast Cancer Metastasis. *Cell* 2009; 137: 1032–46.
78. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour Invasion and Metastasis Initiated By Microrna-10b In Breast Cancer. *Nature* 2007; 449: 682–8.
79. Edmonds MD, Hurst DR, Vaidya KS, Stafford LJ, Chen D, Welch DR. Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 (BRMS1) Coordinately Regulates Metastasis-Associated Microrna Expression. *Int J Cancer* 2009; 125: 1778–85.
80. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, Et Al. The Micrnas Mir-373 and Mir-520c Promote Tumour Invasion and Metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 202-10.

81. Zhang X, Liu S, Hu T, Liu S, He Y, Sun S. Up-Regulated MicroRNA-143 Transcribed By Nuclear Factor K B Enhances Hepatocarcinoma Metastasis By Repressing Fibronectin Expression. *Hepatology* 2009; 50: 490–9.
82. Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Et Al. Aberrant Mir-182 Expression Promotes Melanoma Metastasis By Repressing FOXO3 and Microphthalmia-Associated Transcription Factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 1814–9.
83. Lncrna TP73-AS1 Sponges Mir-141-3p To Promote The Migration and Invasion of Pancreatic Cancer Cells Through The Up-Regulation of BDH2
84. Khan S. A., Kumar D., Jaggi M., Chauhan S. C. Targeting MicroRNAs In Pancreatic Cancer: Microplayers In The Big Game. *Cancer Res.* 2013;73:6541–6547. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1288
85. Zen K., Zhang C. Y. Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Biomarkers To Diagnose and Monitor Human Cancers. *Med. Res. Rev.* 2012;32:326–348. Doi: 10.1002/Med.20215.
86. Hong T. H., Park I. Y. MicroRNA Expression Profiling of Diagnostic Needle Aspirates From Surgical Pancreatic Cancer Specimens. *Ann. Surg. Treat. Res.* 2014;87:290–297. Doi: 10.4174/Astr.2014.87.6.290.
87. Schultz N. A., Werner J., Willenbrock H., Roslind A., Giese N., Horn T., Wojdemann M., Johansen J. S. MicroRNA Expression Profiles Associated With Pancreatic Adenocarcinoma and Ampullary Adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* 2012;25:1609–1622. Doi: 10.1038/Modpathol.2012.122.
88. Habbe N., Koorstra J. B., Mendell J. T., offerhaus G. J., Ryu J. K., Feldmann G., Mullendore M. E., Goggins M. G., Hong S. M., Maitra A. MicroRNA Mir-155 Is A Biomarker of Early Pancreatic Neoplasia. *Cancer Biol. Ther.* 2009;8:340–346. Doi: 10.4161/Cbt.8.4.7338.
89. Basu A., Alder H., Khiyami A., Leahy P., Croce C. M., Haldar S. MicroRNA-375 and MicroRNA-221: Potential Noncoding RNAs Associated With Antiproliferative Activity of Benzyl Isothiocyanate In Pancreatic Cancer. *Genes Cancer.* 2011;2:108–119. Doi: 10.1177/1947601911409212
90. Su A., He S., Tian B., Hu W., Zhang Z. MicroRNA-221 Mediates The Effects of PDGF-BB On Migration, Proliferation, and The Epithelial-Mesenchymal Transition In Pancreatic Cancer Cells. *Plos ONE.* 2013;8:E71309. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0071309.
91. Wu K., Hu G., He X., Zhou P., Li J., He B., Sun W. MicroRNA-424-5p Suppresses The Expression of SOCS6 In Pancreatic Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 2013;19:739–748. Doi: 10.1007/S12253-013-9637-X.
92. Xu D., Wang Q., An Y., Xu L. Mir203 Regulates The Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle Progression of Pancreatic Cancer Cells By Targeting Survivin. *Mol. Med. Rep.* 2013;8:379–384. Doi: 10.3892/Mmr.2013.1504.
93. Hu Y., Ou Y., Wu K., Chen Y., Sun W. Mir-143 Inhibits The Metastasis of Pancreatic Cancer and An Associated Signaling Pathway. *Tumor Biol.* 2012;33:1863–1870. Doi: 10.1007/S13277-012-0446-8

94. Jiao L. R., Frampton A. E., Jacob J., Pellegrino L., Krell J., Giamas G., Tsim N., Vlavianos P., Cohen P., Ahmad R., Et Al. *Micrnas Targeting Oncogenes Are Down-Regulated In Pancreatic Malignant Transformation From Benign Tumors.* Plos ONE. 2012;7:E32068. Doi: 10. 1371/Journal. Pone. 0032068
95. Liu R., Zhang H., Wang X., Zhou L., Li H., Deng T., Qu Y., Duan J., Bai M., Ge S., Et Al. *The Mir-24-Bim Pathway Promotes Tumor Growth and Angiogenesis In Pancreatic Carcinoma.* Oncotarget. 2015;6:43831–43842. Doi: 10. 18632/Oncotarget. 6257.
96. Gironella M., Seux M., Xie M. J., Cano C., Tomasini R., Gommeaux J., Garcia S., Nowak J., Yeung M. L., Jeang K. T., Et Al. *Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1 Expression Is Repressed By Mir-155, and Its Restoration Inhibits Pancreatic Tumor Development.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007;104:16170–16175. Doi: 10. 1073/Pnas. 0703942104.
97. *Oncogenic Mir-23a In Pancreatic Ductal Adenocarcinogenesis Via Inhibiting APAF1Y*
98. L. Miao, X. Xiong, Y. Lin ve Diğerleri, "Mir-203, Pankreas Kanseri Hücrelerinde Caveolin-1 Yoluyla Tümör Hücreleri Göçünü ve İstilasını Engeller" *Oncology Letters*, Cilt. 7, Hayır. 3, S. 658-662, 2014.
99. Ohuchida K., Mizumoto K., Lin C., Yamaguchi H., Ohtsuka T., Sato N., Toma H., Nakamura M., Nagai E., Hashizume M., Et Al. *Microrna-10a Is Overexpressed In Human Pancreatic Cancer and Involved In Its Invasiveness Partially Via Suppression of The HOXA1 Gene.* Ann. Surg. Oncol. 2012;19:2394–2402. Doi: 10. 1245/S10434-012-2252-3.
100. Liu C., Cheng H., Shi S., Cui X., Yang J., Chen L., Cen P., Cai X., Lu Y., Wu C., Et Al. *Microrna-34b Inhibits Pancreatic Cancer Metastasis Through Repressing Smad3.* Curr. Mol. Med. 2013;13:467–478. Doi: 10. 2174/1566524011313040001.
101. *RAS Is Regulated By The Let-7 Microrna Family.* Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack Fjcell. 2005 Mar 11; 120(5):635-47.
102. *The Mir-217 Microrna Functions As A Potential Tumor Suppressor In Pancreatic Ductal Adenocarcinoma By Targeting KRAS.* Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, Ma YH, Gu YM, Chen J Carcinogenesis. 2010 Oct; 31(10):1726-33.
103. *Mirna-96 Suppresses KRAS and Functions As A Tumor Suppressor Gene In Pancreatic Cancer.* Yu S, Lu Z, Liu C, Meng Y, Ma Y, Zhao W, Liu J, Yu J, Chen J Cancer Res. 2010 Jul 15; 70(14):6015-25.
104. Hay N. *The Akt-Mtor Tango and Its Relevance To Cancer.* Cancer Cell 2005;8:179-3.
105. Yonemori K., Kurahara H., Maemura K., Natsugoe S. *Microrna In Pancreatic Cancer.* J. Hum. Genet. 2017;62:33–40. Doi: 10. 1038/Jhg. 2016. 59.
106. *LPS Induced Mir-181a Promotes Pancreatic Cancer Cell Migration Via Targeting PTEN and MAP2K4.* Liu J, Xu D, Wang Q, Zheng D, Jiang X, Xu L Dig Dis Sci. 2014 Jul; 59(7):1452-60.

107. Park J. K., Lee E. J., Esau C., Schmittgen T. D. Antisense Inhibition of MicroRNA-21 Or -221 Arrests Cell Cycle, Induces Apoptosis, and Sensitizes The Effects of Gemcitabine In Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas*. 2009;38:E190–E199.
108. MicroRNA-375 Targets PDK1 In Pancreatic Carcinoma and Suppresses Cell Growth Through The Akt Signaling Pathway. Zhou J, Song S, He S, Zhu X, Zhang Y, Yi B, Zhang B, Qin G, Li D *Int J Mol Med*. 2014 Apr; 33(4):950-6.
109. MicroRNA-375 Targets The 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 Gene In Pancreatic Carcinoma. Song SD, Zhou J, Zhou J, Zhao H, Cen JN, Li DC *Oncol Lett*. 2013 Oct; 6(4):953-959.
110. The JAK/STAT Signaling Pathway. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DAJ *Cell Sci*. 2004 Mar 15; 117(Pt 8):1281-3.
111. Mir-216a May Inhibit Pancreatic Tumor Growth By Targeting JAK2. Hou BH, Jian ZX, Cui P, Li SJ, Tian RQ, Ou JRFEB *FEBS Lett*. 2015 Aug 4; 589(17):2224-32.
112. MicroRNA-216a Inhibits Pancreatic Cancer By Directly Targeting Janus Kinase 2. Wang S, Chen X, Tang *Moncol Rep*. 2014 Dec; 32(6):2824-30.
113. Regulation of Mir-155 Affects Pancreatic Cancer Cell Invasiveness and Migration By Modulating The STAT3 Signaling Pathway Through SOCS1. Huang C, Li H, Wu W, Jiang T, Qiu *Zoncol Rep*. 2013 Sep; 30(3):1223-30.
114. Chen X., Yang J., Evans P. M., Liu C. 2008. Wnt Signaling: The Good and The Bad. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40(7); 577-94.
115. Reduction of Mir-29c Enhances Pancreatic Cancer Cell Migration and Stem Cell-Like Phenotype. Jiang J, Yu C, Chen M, Zhang H, Tian S, Sun C *Oncotarget*. 2015 Feb 20; 6(5):2767-78.
116. Dmitry Litonin, Marina Sologub, Yonghong Shi, Maria Savkina. Human mitochondrial transcription revisited: Only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 285(24):18129-33. June 2010
117. Tumor-Suppressor Genes In Pancreatic Cancer. Hruban RH, Offerhaus GJ, Kern SE, Goggins M, Wilentz RE, Yeo CJ
118. MicroRNA 483-3p Suppresses The Expression of DPC4/Smad4 In Pancreatic Cancer. Hao J, Zhang S, Zhou Y, Hu X, Shao C *FEBS Lett*. 2011 Jan 3; 585(1):207-13.
119. Down-Regulation of MicroRNA-494 Via Loss of SMAD4 Increases FOXM1 and B-Catenin Signaling In Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. Li L, Li Z, Kong X, Xie D, Jia Z, Jiang W, Cui J, Du Y, Wei D, Huang S, Xie K *Gastroenterology*. 2014 Aug; 147(2):485-97. E18.
120. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The Clinical Utility of Serum CA 19–9 In The Diagnosis, Prognosis and Management of Pancreatic Adenocarcinoma: An Evidence Based Appraisal. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(2):105-119.
121. MicroRNA Alterations of Pancreatic Intraepithelial Neoplasias. Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M *Clin Cancer Res*. 2012 Feb 15; 18(4):981-92.

122. Microrna Targeted Therapeutic Approach For Pancreatic Cancer. Li Y, Sarkar Fhmt J Biol Sci. 2016; 12(3):326-37.
123. Novel Blood-Based Microrna Biomarker Panel For Early Diagnosis of Pancreatic Cancer. Ganepola GA, Rutledge JR, Suman P, Yiengpruksawan A, Chang DH World J Gastrointest Oncol. 2014 Jan 15; 6(1):22-33.
124. A Microrna Meta-Signature For Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Frampton AE, Giovannetti E, Jamieson NB, Krell J, Gall TM, Stebbing J, Jiao LR, Castellano L Expert Rev Mol Diagn. 2014 Apr; 14(3):267-71.
125. Micrnas In Plasma of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients As Novel Blood-Based Biomarkers of Disease. Wang J, Chen J, Chang P, Leblanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen Scancer Prev Res (Phila). 2009 Sep; 2(9):807-13.
126. Novel Diagnostic Value of Circulating Mir-18a In Plasma of Patients With Pancreatic Cancer. Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Nagata H, Konishi H, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Taniguchi H, Otsuji E Br J Cancer. 2011 Nov 22; 105(11):1733-40.
127. Diagnostic and Biological Significance of Microrna-192 In Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Zhao C, Zhang J, Zhang S, Yu D, Chen Y, Liu Q, Shi M, Ni C, Zhu M Oncol Rep. 2013 Jul; 30(1):276-84.
128. Microrna Array Analysis Finds Elevated Serum Mir-1290 Accurately Distinguishes Patients With Low-Stage Pancreatic Cancer From Healthy and Disease Controls. Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH, Goggins M Clin Cancer Res. 2013 Jul 1; 19(13):3600-10.
129. Combination of Plasma Micrnas With Serum CA19-9 For Early Detection of Pancreatic Cancer. Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wang W, Kong X Int J Cancer. 2012 Aug 1; 131(3):683-91.
130. Wu, Q., Yang, Z., Nie, Y., Shi, Y., & Fan, D. (2014). Multi-Drug Resistance In Cancer Chemotherapeutics: Mechanisms and Lab Approaches. Cancer Letters, 347(2), 159–166.
131. Ohuchida K., Mizumoto K., Lin C., Yamaguchi H., Ohtsuka T., Sato N., Toma H., Nakamura M., Nagai E., Hashizume M., Et Al. Microrna-10a Is Overexpressed In Human Pancreatic Cancer and Involved In Its Invasiveness Partially Via Suppression of The HOXA1 Gene. Ann. Surg. Oncol. 2012;19:2394–2402. Doi: 10. 1245/S10434-012-2252-3.
132. Mir-320c Regulates Gemcitabine-Resistance In Pancreatic Cancer Via SMARCC1. Iwagami Y, Eguchi H, Nagano H, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Tomokuni A, Tomimaru Y, Mori M, Doki Y Br J Cancer. 2013 Jul 23; 109(2):502-11.
133. Elevated Expression of Micrnas 155, 203, 210 and 222 In Pancreatic Tumors Is Associated With Poorer Survival. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H Int J Cancer. 2010 Jan 1; 126(1):73-80.

134. Repression of The Mir-143/145 Cluster By Oncogenic Ras Initiates A Tumor-Promoting Feed-Forward Pathway. Kent OA, Chivukula RR, Mullendore M, Wentzel EA, Feldmann G, Lee KH, Liu S, Leach SD, Maitra A, Mendell JT *Genes Dev.* 2010 Dec 15; 24(24):2754-9.
135. Hu Y., Ou Y., Wu K., Chen Y., Sun W. Mir-143 Inhibits The Metastasis of Pancreatic Cancer and An Associated Signaling Pathway. *Tumor Biol.* 2012;33:1863–1870. Doi: 10. 1007/S13277-012-0446-8
136. Brock Humphries, Chengfeng Yang. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget.* 2015; 6:6472-6498.
137. Lu J, Getz G, Miska EA, Et Al. (Haziran 2005). "Microna Ekspresyon Profilleri İnsan Kanserlerini Sınıflandırır". *Doğa* . 435 (7043): 834-8. Doi : 10. 1038/Nature03702 . PMID 15944708 .
138. Neves R, Scheel C, Weinhold S, Honisch E, Iwaniuk KM, Trompeter HI, Niederacher D, Wernet P, Santourlidis S, Uhrberg M. Role of DNA Methylation In Mir-200c/141 Cluster Silencing In Invasive Breast Cancer Cells. *BMC Research Notes.* 2010;3:219
139. Castilla MÁ, Diaz-Martín J, Sarrió D, Romero-Pérez L, López-García MÁ, Vieites B, Biscuola M, Ramiro-Fuentes S, Isacke CM, Palacios J. MicroRNA-200 Family Modulation In Distinct Breast Cancer Phenotypes. *Plos ONE.* 2012;7:E47709.
140. Lim YY, Wright JA, Attema JL, Gregory PA, Bert AG, Smith E, Thomas D, Lopez AF, Drew PA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. Epigenetic Modulation of The Mir-200 Family Is Associated With Transition To A Breast Cancer Stem-Cell-Like State. *J Cell Sci.* 2013;126:2256–2266.
141. Wang Z, Zhao Y, Smith E, Goodall GJ, Drew PA, Brabletz T, Yang C *Toxicol Sci.* Reversal and Prevention of Arsenic-Induced Human Bronchial Epithelial Cell Malignant Transformation By MicroRNA-200b 2011 May; 121(1):110-22.
142. Tellez CS, Juri DE, Do K, Bernauer AM, Thomas CL, Damiani LA, Tessema M, Leng S, Belinsky SA. EMT and Stem Cell-Like Properties Associated With Mir-205 and Mir-200 Epigenetic Silencing Are Early Manifestations During Carcinogen-Induced Transformation of Human Lung Epithelial Cells. *Cancer Res.* 2011 Apr 15; 71(8):3087-97.
143. Choi YC, Yoon S, Jeong Y, Yoon J, Baek K *Mol Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling By Mir-200b.* *Cells.* 2011 Jul; 32(1):77-82.
144. D'Amato NC, Howe EN, Richer JK. MicroRNA Regulation of Epithelial Plasticity In Cancer. *Cancer Letters.* 2013; 341:46-55.
145. Yeh TS, Wang F, Chen TC, Yeh CN, Yu MC, Jan YY, Chen MF. Expression Profile Of Mir-200 Family In Hepatocellular Carcinoma With Bile Duct Tumor Thrombus. *Ann Surg.* 2014; 259(2):346-54.
146. Kramer P, Our BP (Mother's) Mitochondria and Our Mind. *Perspect Psychol Sci.* 2018;13:88-100.

147. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria In Health and Disease. *Cells*. 2019;8:680
148. Brand, M. D., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., & Quinlan, C. L. (2013). The Role of Mitochondrial Function and Cellular Bioenergetics In Ageing and Disease. *The British Journal of Dermatology*, 169 Suppl 2(0 2), 1–8. <https://doi.org/10.1111/Bjd.12208>
149. Picard, M., Wallace, D. C., & Burrelle, Y. (2016). The Rise of Mitochondria In Medicine. *Mitochondrion*, 30, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.003>
150. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017;19:163-194.
151. Sharma P, Sampath H. Mitochondrial DNA Integrity: Role In Health and Disease. *Cells*. 2019;8:100.
152. Hahn A, Zuryn S. Mitochondrial Genome (Mtdna) Mutations That Generate Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8:392.
153. Barshad G, Marom S, Cohen T, Mishmar D. Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation: An Evolutionary Perspective. *Trends Genet*. 2018;34:682-692.
154. Farge, G., and Falkenberg, M. (2019). Organization of DNA In Mammalian Mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 20:2770. [doi: 10.3390/ijms20112770](https://doi.org/10.3390/ijms20112770)
155. Huu B. Ngo, Geoffrey A. Lovely, Rob Phillips & David C. Chan. Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nature Communications* 5. 3077 (2014)
156. Metehan Karataş, Matem Tunçdemir İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. *Mitokondriyal Epigenetik ve Kanser*
157. Falkenberg, M., Larsson, N. G. & Gustafsson, C. M. DNA Replication and Transcription In Mammalian Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*
158. Bonawitz, N. D., Clayton, D. A. & Shadel, G. S. Initiation and Beyond: Multiple Functions of The Human Mitochondrial Transcription Machinery. *Mol. Cell* 24, 813–825 (2006)
159. Rebelo, A. P., Williams, S. L., and Moraes, C. T. (2009). In Vivo Methylation of Mtdna Reveals The Dynamics of Protein-Mtdna Interactions. *Nucleic Acids Res.* 37, 6701–6715. [doi: 10.1093/nar/gkp727](https://doi.org/10.1093/nar/gkp727)
160. Mposhi A., Van Der Wijst M. G., Faber K. N., Rots M. G. (2017). Regulation of Mitochondrial Gene Expression, The Epigenetic Enigma. *Front. Biosci.* 22 1099–1113. [doi: 10.2741/4535](https://doi.org/10.2741/4535)
161. King G. A., Hashemi Shabestari M., Taris K. H., Pandey A. K., Venkatesh S., Thilagavathi J., Et Al. (2018). Acetylation and Phosphorylation of Human TFAM Regulate TFAM-DNA Interactions Via Contrasting Mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 46 3633–3642. [doi: 10.1093/nar/gky204](https://doi.org/10.1093/nar/gky204)

162. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding The Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-1033.
163. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discov* 2012; 2: 881-898.
164. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM (2002) Mitokondriyal Transkripsiyon Faktörleri B1 ve B2 İnsan Mtdna'sının Transkripsiyonunu Aktive Eder. *Nat Genet* 31: 289–294. 10. 1038/Ng909
165. Partial Reversal of Skeletal Muscle Aging By Restoration of Normal NAD⁺ Levels
166. Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N, Kang D (2004) Architectural Role of Mitochondrial Transcription Factor A In Maintenance of Human Mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* 24: 9823–9834. 10. 1128/MCB. 24. 22. 9823-9834. 2004
167. Farge G, Mehmedovic M, Baclayon M, Van Den Wildenberg SM, Roos WH, Gustafsson CM, Wuite GJ, Falkenberg M. In Vitro-Reconstituted Nucleoids Can Block Mitochondrial DNA Replication and Transcription. *Cell Rep*. 2014;8:66–74.
168. Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS. Mitochondrial Lon Protease Regulates Mitochondrial DNA Copy Number and Transcription By Selective Degradation of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:18410–18415.
169. Ylikallio E, Tynismaa H, Tsutsui H, Ide T, Suomalainen A (2010) High Mitochondrial DNA Copy Number Has Detrimental Effects In Mice. *Hum Mol Genet* 19: 2695–2705. 10. 1093/Hmg/Ddq163
170. Mullen, A. R. Et Al. Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required For Reductive Carboxylation In Cancer Cells With Mitochondrial Defects. *Cellreports* 7, 1679–1690 (2014).
171. Yoshida Y, Hasegawa J, Nezu R, Kim YK, Hirota M, Kawano K, Izumi H, Kohno K. Clinical Usefulness of Mitochondrial Transcription Factor A Expression As A Predictive Marker In Colorectal Cancer Patients Treated With FOLFOX. *Cancer Sci*. 2011;102:578–582.
172. Jiang J, Yang J, Wang Z, Wu G, Liu F. TFAM Is Directly Regulated By Mir-23b In Glioma. *Oncol Rep*. 2013;30:2105–2110.
173. Wen Hu, Shao-Lin Ma, Li-Li Liu, Ying-Hui Zhu, Ting-Ting Zeng, Yan Li, and Xin-Yuan Guan. Impact of mitochondrial transcription factor A expression on the outcomes of ovarian, endometrial and cervical cancers. *Am J Transl Res*. 2020; 12(9): 5343–5361. 2020 Sep 15.
174. Saleem A, Hood DA. Acute Exercise Induces Tumour Suppressor Protein P53 Translocation To The Mitochondria and Promotes A P53-Tfam-Mitochondrial DNA Complex In Skeletal Muscle. *The Journal of Physiology*. 2013;591:3625–3636.

175. P53 Increase Mitochondrial Copy Number Via Up-Regulation of Mitochondrial Transcription Factor A In Colorectal Cancer
176. Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Et Al. P53 Physically Interacts With Mitochondrial Transcription Factor A and Differentially Regulates Binding To Damaged DNA. *Can Res.* 2003;63:3729–3734.
177. Mei H, Sun S, Bai Y, Et Al. Reduced Mtdna Copy Number Increases The Sensitivity of Tumor Cells To Chemotherapeutic Drugs. *Cell Death Dis.* 2015;6:E1710.
178. Gasparre G, Porcelli AM, Lenaz G, Romeo G. Relevance of Mitochondrial Genetics and Metabolism In Cancer Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2). Doi:10. 1101/Cshperspect. A011411
179. Dong Z, Pu L, Cui H. Mitoepigenetics and Its Emerging Roles In Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:4
180. Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, Et Al. Origins and Functional Consequences of Somatic Mitochondrial DNA Mutations In Human Cancer. *Elife.* 2014;3. Doi:10. 7554/Elife. 02935
181. Jeong Y, Lim JW, Kim H. Lycopene Inhibits Reactive Oxygen Species-Mediated NF-Kappab Signaling and Induces Apoptosis In Pancreatic Cancer Cells. *Nutrients.* 2019;11(4). Doi:10. 3390/Nu11040762
182. Hardie RA, Van Dam E, Cowley M, Et Al. Mitochondrial Mutations and Metabolic Adaptation In Pancreatic Cancer. *Cancer Metab.* 2017;5(2). Doi:10. 1186/S40170-017-0164-1
183. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646–674. Doi:10. 1016/J. Cell. 2011. 02. 013
184. Knockdown of HMGB1 Suppresses Hypoxia-Induced Mitochondrial Biogenesis In Pancreatic Cancer Cells
185. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Et Al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell.* 2012;149:1060–72.
186. Ang WS, Stockwell BR. Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death In Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chem Biol.* 2008;15:234–45.
187. Hamidi T, Algül H, Cano CE, Sandi MJ, Molejon MI, Riemann M, Et Al. Nuclear Protein 1 Promotes Pancreatic Cancer Development and Protects Cells From Stress By Inhibiting Apoptosis. *J Clin Invest.* 2012;122:2092–103.
188. NUPR1 Inhibitor ZZW-115 Induces Ferroptosis In A Mitochondria-Dependent Manner
189. Mitochondrial Transcription Factor A Worsens The Clinical Course of Patients With Pancreatic Cancer Through Inhibition of Apoptosis of Cancer Cells
190. S. C. Li, W. C. Chan, M. R. Ho et al., “Discovery and characterization of medaka miRNA genes by next generation sequencing platform,” *BMC Genomics*, vol. 11, no. 4, article S8, 2010.

191. W. C. Cheng, I. F. Chung, T. S. Huang et al., “YM500: a small RNA sequencing (smRNA-seq) database for microRNA research,” *Nucleic Acids Research*, vol. 41, no. 1, pp. D285–D294, 2013.
192. Yuhao Chen, Xiaowei Wang. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. PMID: 31504780 PMCID: PMC6943051 DOI: 10.1093/nar/gkz757
193. Jordi Barretina, Giordano Caponigro, Nicolas Stransky, Kavitha Venkatesan, Adam A. Margolin. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* volume 483, pages603–607 (2012)
194. Balázs Györffy, Pawel Surowiak, Jan Budczies, andrás Lániczky. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2014;9(10):e111842
195. M Pichler, A L Ress, E Winter, V Stiegelbauer, M Karbiener, D Schwarzenbacher, M Scheideler, C Ivan, S W Jahn, T Kiesslich, A Gerger, T Bauernhofer, G A Calin & G Hoefler. MiR-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer* volume 110, pages1614–1621 (2014)
196. Gabriel Eades, Muhua Yang, Yuan Yao, Yongshu Zhang, Qun Zhou. miR-200a Regulates Nrf2 Activation by Targeting Keap1 mRNA in Breast Cancer Cells* *Gene Regulation* | Volume 286, Issue 47, P40725-40733, November 2011
197. Yuhua Lu, Jingjing Lu, Xiaohong Li, Hui Zhu, Xiangjun Fan, Shajun Zhu, Yao Wang, Qingsong Guo, Lei Wang, Yan Huang, Mingyan Zhu & Zhiwei Wang. MiR-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem. *BMC Cancer* volume 14, Article number: 85 (2014)
198. Chung KW, Dhillon P, Huang S, Sheng X, Shrestha R, Qiu C, Kaufman BA, Park J, Pei L, Baur J, Palmer M, Susztak K. Mitochondrial damage and activation of the STING pathway lead to renal inflammation and fibrosis. *Cell Metab*. 2019;30:784–799. e785.
199. Baixauli F, Acin-Perez R, Villarroya-Beltri C, Mazzeo C, Nunez-andrade N, Gabande-Rodriguez E, Ledesma MD, Blazquez A, Martin MA, Falcon-Perez JM, Redondo JM, Enriquez JA, Mittelbrunn M. Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory T cell responses. *Cell Metab*. 2015;22:485–498.
200. Han B, Izumi H, Yasuniwa Y, Akiyama M, Yamaguchi T, Fujimoto N, Matsumoto T, Wu B, Tanimoto A, Sasaguri Y, Kohno K. Human mitochondrial transcription factor A functions in both nuclei and mitochondria and regulates cancer cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408:45–51.
201. Yazdani HO, Roy E, Comerci AJ, van der Windt DJ, Zhang H, Huang H, Loughran P, Shiva S, Geller DA, Bartlett DL, Tsung A, Sheng T, Simmons RL, Tohme S. Neutrophil extracellular traps drive mitochondrial homeostasis in tumors to augment growth. *Cancer Res*. 2019;79:5626–5639.

202. Katsuki T, Nakayama Y, Akiyama M, Sawatsubashi Y, Nagata J, Minagawa N, Torigoe T, Izumi H, Kohono K, Hirata K. Prognostic significance of mitochondrial transcription factor A expression in patients with right- or left-sided colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2018;38:569–575.
203. Jiang J, Yang J, Wang Z, Wu G, Liu F. TFAM is directly regulated by miR-23b in glioma. *Oncol Rep.* 2013;30(5):2105-2110.
204. Xiangrong Chen, Shun Li, Yumin Ke, Shukai Wu, Tianzao Huang, Weipeng Hu. KLF16 suppresses human glioma cell proliferation and tumourigenicity by targeting TFAM. Pages 608-615 | Received 09 Jan 2018, Accepted 18 Jan 2018, Published online: 29 Jan 2018
205. Woo Rin Lee, Heeju Na, Seon Woo Lee, Won-Jun Lim, Namshin Kim, J. Eugene Lee & Changwon Kang. Transcriptomic analysis of mitochondrial TFAM depletion changing cell morphology and proliferation. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 17841 (2017)
206. Z. Wen, Z. Lei, M. Jin-An, L. Xue-Zhen, Z. Xing-Nan, D. Xiu-Wen. The inhibitory role of miR-214 in cervical cancer cells through directly targeting mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2014, 35(6), 676–682;
207. Jia Yao, Feng Xu, Danhua Zhang, Wenjun Yi, Xianyu Chen, Gannong Chen, Enxiang Zhou. TP73-AS1 promotes breast cancer cell proliferation through miR-200a-mediated TFAM inhibition. *Journal of cellular biochemistry.* 21 June 2017
208. Yamauchi, Masumi ; Nakayama, Yoshifumi, Minagawa, Noritaka; Torigoe, Takayuki, Shibao, Kazunori, Yamaguchi, Koji. Mitochondrial Transcription Factor A Worsens the Clinical Course of Patients With Pancreatic Cancer Through Inhibition of Apoptosis of Cancer Cells. *Pancreas*: April 2014 - Volume 43 - Issue 3 - p 405-410
209. Jianming Wang, José P. Silva, Claes M. Gustafsson, Pierre Rustin, and Nils-Göran Larsson. Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *BIOLOGICAL SCIENCES.* March 20, 2001 98 (7) 4038-4043
210. M Leist, B Single, AF Castoldi, S Kuhnle, P Nicotera *J Exp Med* 185, 1481–1486 (1997).
211. Caroline H. Diep, Kelly M. Zucker, Galen Hostetter, Aprill Watanabe, Chengcheng Hu, Ruben M. Munoz, Daniel D. Von Hoff, Haiyong Han. Down-Regulation of Yes Associated Protein 1 Expression Reduces Cell Proliferation and Clonogenicity of Pancreatic Cancer Cells. *Plos One.* March 1, 2012.
212. Mammoto, A., Muyleart, M., Kadlec, A., Gutterman, D. and Mammoto, T. (2018). YAP1-TEAD1 signaling controls angiogenesis and mitochondrial biogenesis through PGC1alpha. *Microvasc. Res.* 119, 73-83.
213. Zhang, Q., Liu, N., Bai, J., Zhou, Q., Mao, J., Xu, L., Liu, J., Wei, H., Ren, C., Wu, X. et al. (2020b). Human telomerase reverse transcriptase is a novel target of Hippo-YAP pathway. *FASEB J.* 34, 4178-4188.

- 214.** Shruti Patrick, Pruthvi Gowda, Kirti Lathoria, Vaishali Suri, Ellora Sen. YAP1-mediated regulation of mitochondrial dynamics in IDH1 mutant gliomas. *Cell Sci* (2021) 134 (22): jcs259188.



8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA TFAM EKSPRESYON DÜZEYİNİN HÜCRE FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 9	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.thefreelibrary.com İnternet Kaynağı	% 1
2	dspace.balikesir.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.bilimvetekno.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<% 1

EK-2: Dijital Makbuz

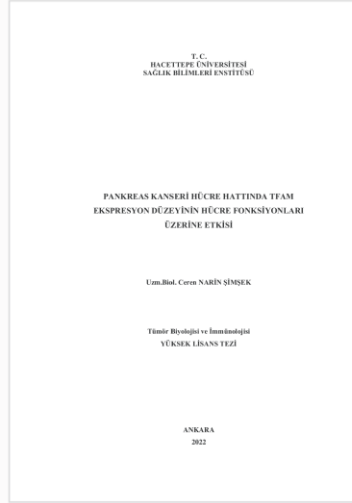


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ceren Narin
Ödev başlığı: Ceren Tez
Gönderi Başlığı: PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA TFAM EKSPRESYON D...
Dosya adı: Ceren_Tez_27072022.docx
Dosya boyutu: 2.87M
Sayfa sayısı: 115
Kelime sayısı: 17,542
Karakter sayısı: 125,559
Gönderim Tarihi: 27-Tem-2022 02:52ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1875797459



9. ÖZGEÇMİŞ

Ceren Narin Şimşek

