



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOMA
HÜCRELERİNDE miRNA'NIN, OTOFAJİ ÜZERİNDE
DÜZENLEYİCİ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

H. ELİF SÖNMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. NİLGÜN GÜRBÜZ

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4792-YL1-16 nolu proje ile desteklenmiştir
(Western Blot Analizleri Kapsamında)**

**Bu Tez TÜBİTAK 114S501 nolu proje numarası ile desteklenmiştir
(Hücre Kültürü, Sitotoksisite Testi ve RT-PCR Analizleri Kapsamında)**

Tez No: 154

ISPARTA-2018

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/07/2018

Tez Danışmanı

: Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ
SDÜ, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD

Üye

: Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK
SDÜ, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD

Üye

: Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT
Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya AD

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

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

“Pankreatik Duktal Adenokarsinoma Hücrelerinde miRNA'nın, Otofaji Üzerinde Düzenleyici Etkisinin Değerlendirilmesi” adlı yüksek lisans tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü tez önerisi ve yazma yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Hafize Elif SÖNMEZ

İmza

Danışman

Doç.Dr. Nilgün GÜRBÜZ

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başlangıcından sonuna değin tüm aşamalarında bilgi ve deneyimleriyle her zaman destek olan değerli danışman hocam Doç.Dr.Nilgün GÜRBÜZ'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca her konuda yardımcı olan değerli hocam Prof.Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Bu sürecin başlangıcı ve sonrasındaki yardımları ve ayırdığı zaman için değerli hocam Prof.Dr. Nilüfer Şahin Calapoğlu'na,

Her zaman verdiği destek ve katkıları için değerli hocam Doç.Dr. Pınar Aslan Koşar'a,

Laboratuvar çalışmalarında destek olan Dr.Dilek Aşçı ÇELİK'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana destek olan eşim Oğuzhan Yusuf SÖNMEZ'e, aileme ve canım kızım Öyküm'e,

Bu çalışmayı 4792-YL1-16 nolu proje ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP) ve 114S501 nolu proje kapsamında destek sağlanan TÜBİTAK'a,
sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pankreas Kanseri Tanımı, Oluşumu, Tür ve Evreleri.....	3
2.2. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri.....	3
2.2.1. Kanser Öyküsü ve Kalıtsal Sendromlar.....	4
2.2.2. Peutz-Jeghers Sendromu.....	4
2.2.3. Lynch Sendromu.....	4
2.2.4. Ailesel Atipik Çok Amaçlı Mole Melanom.....	5
2.2.5. Melanoma-Pankreatik Kanseri Sendromu	5
2.2.6. Kalıtsal Meme ve Yumurtalık Kanseri	5
2.2.7. Kistik Lezyonlar	5
2.2.8. Pankreatit	5
2.2.9. Helicobacter Pylori Enfeksiyonu	6
2.2.10. Sigara ve Alkol	6
2.2.11. Aşırı Kilo, Obezite ve Diyabet	6
2.2.12. Diğer Risk Faktörleri	7
2.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi.....	7
2.4. miRNA.....	9
2.4.1. miRNA- Kanseri İlişkisi	10
2.4.2. miRNA ve Otofaji.....	12
2.4.3. miR-196	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Hücre Kültürü	18
3.2. miRNA Transfeksiyonu.....	19
3.3. Sitotoksosite (Hücre Canlılığı-MTS) Testi.....	20
3.4. Gen Ekspresyonu Analizi/RT-PCR	21
3.5. Western Blot Analizi	24

5.6. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	29
4.2. miR196a-nın PDAC Hücrelerinde Beklin-1 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi.	31
4.3. miR-196a-nın PDAC Hücrelerinde Atg5 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi	32
4.4. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinde Beklin-1 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi	34
4.5. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinde Atg5 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi	35
4.6. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinde Atg12 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR.....	44
ÖZET.....	45
ABSTRACT	46
KAYNAKLAR	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Annexin 1	: Hüresel protein
AsPC-1	: Pankreas kanseri hücre hattı
BCIP/NBT	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate /nitro blue tetrazolium
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
HNPCC	: Herediter non-polipozis kolorektal kanser
HOX	: HOX geni
HPAF-II	: Pankreatik hücre kültürü modeli
Huh- 7	: Karaciğer hücre hattı
ING5	: ING proteini
IPMN	: İntraduktal papiller müsinöz neoplaziler
MCN	: Müsinöz kistik neoplaziler
MDA-MB-468	: Meme kanseri hücre hattı
MiaPaCa-2	: MiaPaCa-2 pankreatik kanser hücre hattı
miRNA	: MikroRNA
mRNA	: Mesajcı RNA
NET	: Nöroendokrin tümörler
Panc-1	: Panc-1 pankreatik kanser hücre hattı
PDAC	: Pankreatik duktal adenokarsinoma
RNA	: Ribo nükleik asit
RNase III	: Ribonükleaz III
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat polyakilamid jel elektroforezis
T98G	: Gliyoblastoma tümör hücre hattı

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 1.** GLOBOCAN 2012 tahminlerine göre kanserlerin her 100.000 kişi için görülme sıklığı ve ölüm oranları. 8
- Çizelge 2.** Pankreatik duktal adenokarsinomada (PDAC) ekspresyonu artan ve azalan bazı miRNA'lar. 13



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pankreas Kanseri Evreleri	4
Şekil 2.2. miRNA'nın biyogenezi (Biyolojik Oluşumu).....	10
Şekil 2.3. Tümör oluşturuocu otofajik yollar	14
Şekil 3.1. Hücrelerin sitotoksisite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı	21
Şekil 3.2. Protein standart grafiği.	26
Şekil 4.1. miR-196a'nın hücre canlılığı üzerine etkisi.	31
Şekil 4.2. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Beklin-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.	32
Şekil 4.3. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Atg5 gen ekspresyonu üzerine etkisi.	34
Şekil 4.4. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Beklin-1 protein ekspresyonu üzerine etkisi.	36
Şekil 4.5. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Atg5 protein ekspresyonu üzerine etkisi.	37
Şekil 4.6. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Atg12 protein ekspresyonu üzerine etkisi.	38

1. GİRİŞ

Pankreas kanseri, metastaza ve nükse sebep olan invaziv kapasitesinin yüksek olmasından dolayı teşhisinden sonraki 5 yıl içerisinde % 2- 3 gibi oldukça düşük bir hayatta kalma oranının gözleendiği en ölümcül kanser türlerinden biridir. Başlangıçta pek belirti vermemesi ve henüz etkili bir tedavinin bulunmaması, pankreas kanserinin mortalitesinin bu denli yüksek olmasında başlıca etkenlerdendir. Sigara, alkol, kimyasal maruziyet, aile anamnezi, diyabet ve kronik pankreatit risk faktörleri olarak sayılırken iştahsızlık, kilo kaybı, dispepsi, bulantı, sarılık, üst abdominal ağrı, lomber bel ağrısı, ani ortaya çıkan diyabet, steatore ve diyopatik pankreatit ise hastalığın semptomları arasında yer almaktadır (1).

Çoğu kanser vakalarında, hücrel aktivitelere güçlü düzenleyici olarak rol oynayan miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde düzensizlik ve bazı genetik değişiklikler gözlemlenmiştir. Ökaryotik DNA'ların çok büyük bir bölümünün (% 90) RNA'ya transkripsiyonu gerçekleşirken, bunların çok azı (% 1-2) proteine dönüşmektedir. Proteine dönüşmeyen ve biyolojik süreçler için gerekli ve düzenleyici olan RNA'lar kodlanmayan RNA'lar (non-coding RNA) olarak belirtilmektedir ve bunlar nükleotit sayılarına göre uzun (>200 nt) ve kısa (<200 nt) olarak sınıflandırılmaktadır (2, 3). İşte, birden fazla geni hedefleme ve dolayısıyla çeşitli proteinlerin ekspresyonunu düzenleme yeteneğine sahip bir miRNA, olgun formdaki 18-28 nükleotid uzunluğundaki kodlayıcı olmayan RNA moleküllerinin oluşturduğu bir yapıdır. Keşfedildikleri sırayla rakamsal kodlar taşıyan miRNA'ların bulunduğu farklı yerleri ifade etmek üzere son kısmında harf kullanımı söz konusudur. miRNA'lar protein kodlayan ve kodlamayan gen dizilerinde genellikle kırılğan kromozomal bölgelerde yer almaları nedeniyle moleküler değişime duyarlıdır. miRNA dizileri, birer RNaz III endonükleazları olan Drosha ve DGCR8 enzimleri tarafından daha ileri düzeyde işlenebilmesi için RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. Ekspörtin 5 tarafından sitoplazmaya aktarılan miRNA'nın halkasının kaldırılması sonucu oluşan olgun miRNA dizisi ve ters tarafındaki eksik dubleks oluşturulma süreci Dicer (RNase III endonükleaz) tarafından gerçekleştirilir.

miRNA'ların hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümüne ilişkin biyolojik olaylardaki etkin rolleri yakın dönemde kanser ve diğer hastalıklarla miRNA ilişkisinin yoğun olarak çalışılmaya başlanmasına yol açmıştır. Nitekim miRNA'ların ekspresyonları kanser vakalarında (akciğer, mide, meme, prostat, kolon ve pankreas) normal hücrelerdekine göre farklılık göstermekte ve yine miRNA seviyelerindeki değişimler gen düzenlemesinde bozulmalara ve dolayısıyla bazı hastalıklara neden olmaktadır. Dolayısıyla miRNA-kanser ilişkisi; insanlarda bugüne değin belirlenebilmiş miRNA'ların bırakın tamamını sadece bir bölümünü oluşturması ve bunların işlev ve etkinliklerinin farklı kanser türlerinde değişkenlik göstermesi nedenleriyle bilinmezliklerin oldukça fazla ve araştırma potansiyelinin son derece yüksek olduğu bir konu olmaya daha uzun süre devam edecek gibi görünmektedir.

Passadouro ve Faneca (2016) tarafından yapılan bir derleme çalışmasında; miRNA'ların kanserlere ilişkin genleri hedefleyerek, çoğalmayı hızlandırma ve/veya apoptozu baskı altına alma yoluyla onkogen veya tümör oluşumundan sorumlu genleri baskılayarak tümör baskılayıcı olarak etki yapabildiği belirtilmiştir (4). Bu kadar karmaşık etkileşmelerin kısa sürede tümüyle aydınlatılmasının mümkün olmaması gerçeği en azından bazı bilinmeyenlerin açığa kavuşturulması çabaları üzerinde de bir baskı oluşturmamalıdır.

İşte bu ve yukarıda belirtilen nedenlerle, çalışmamızın hipotezi pankreas kanseri hücrelerinde otofajinin, miRNA ile gen düzeyinde kontrol edilebileceği ve böylece pankreas kanserinin progresyonunun inhibe olabileceği üzerine kurulmuştur. Bir çok farklı miRNA'nın, pankreas kanserinin oluşumundan ve gelişiminden sorumlu mediyatörlerin kontrolünü direkt gen düzeyinde sağladığı belirlenmiş olmakla birlikte, bu çalışmanın da amacını oluşturan, miRNA'nın pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) hücrelerinde otofajiyi ne şekilde kontrol ettiği konusunu içeren detaylı çalışmalara pek rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın sonuçları, terapötik amaçla değerli olup yeni çalışmalara ışık tutacağına kuvvetle inanmaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri Tanımı, Oluşumu, Tür ve Evreleri

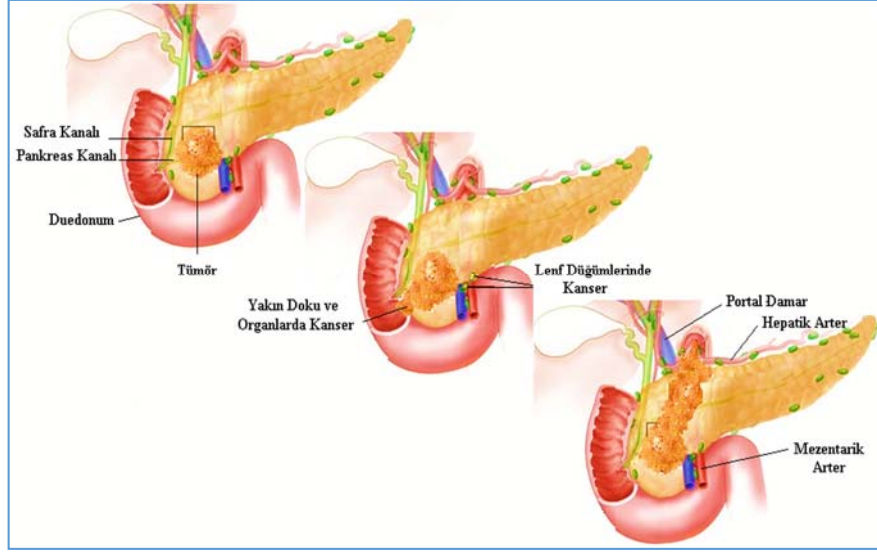
Pankreas, midenin duodenumla (ince bağırsağın ilk kısmı) karşılandığı karın sağ yanında baş ve dalağın sol tarafında kuyruk kısımları ile yaklaşık 12.5 cm uzunluk ve 5.0 cm genişliğinde bir organdır. Pankreasın ekzokrin ve endokrin olmak üzere 2 ana hücre türü bulunur ve söz konusu hücrelerin kontrolünün kaybedilmesi pankreas kanserini başlatır ve farklı türlerde tümörler oluşur. Pankreas kanserinin en yaygın türü olarak belirtilen ekzokrin pankreas kanseri türlerinin yaklaşık % 95'ini adenokarsinomlar oluşturmakta, daha az yaygın olarak adenoskuamöz, skuamöz hücreli, işaret halkalı hücre, farklılaşmamış ve dev hücreli farklılaşmamış karsinomlar ve ayrıca vater ampulla karsinoma bulunmaktadır (5).

Pankreas kanserinin başlangıç evresini, hiçbir belirti vermediği zar kısmındaki anormal hücrelerin ortaya çıkması oluşturmaktadır. Bunu tümör oluşum evresi ve doku ya da lenf düğümlerine yayılım evreleri izlemektedir (6).

Pankreas kanseri, metastaza ve nükse sebep olan invaziv kapasitesinin yüksek olmasından dolayı teşhisinden sonraki 5 yıl içerisinde % 2- 3 gibi oldukça düşük bir hayatta kalma oranının gözlendiği en ölümcül kanser türlerinden biridir. Zira başlangıçta pek belirti vermemesi, teşhis edildiğinde artık metastazın gerçekleşmiş ve hayatta kalış süresini bir parça uzatan cerrahi girişimlerin sınırlı olması ve dolayısıyla henüz etkili ve sonuç alınabilir bir tedavinin bulunmaması söz konusudur.

2.2.Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Pankreas kanseri sebebi hala bilinmemekle birlikte yakalanma olasılığını artıran bazı risk faktörlerinden sıklıkla söz edilmektedir. Aslında söz konusu risklerle ilgili de, gerek tüm risk faktörleri ve gerekse etkilerine ilişkin geniş bir veri seti bulunmamaktadır. Bu bağlamda sıklıkla, kanser öyküsü ve kalıtsal sendromlar, pankreatit, Helicobacter pylori sigara ve alkol, aşırı kilo, obezite ve diyabet, yaş, beslenme alışkanlıkları ve kan grubu gibi risk faktörleri sıralanmaktadır.



Şekil 2.1. Pankreas Kanseri Evreleri (Anonymous, 2017b'den uyarlanmıştır (6)).

2.2.1. Kanser Öyküsü ve Kalıtsal Sendromlar

Sindirim sistemi, meme, rahim, serviks, akciğer, testis ve diğer bazı kanser türlerinin varlığı pankreas kanserine yakalanma riskini artırır (7).

Ailesel pankreatik kanser, bir başka kalıtsal kanser için yeterli kriterleri karşılamayan ve birinci dereceden en az 2 akrabayı etkileyen pankreas duktal adenokarsinoması olarak tanımlanmaktadır. Pankreas kanseri ile ilişkili kalıtsal sendromlar aşağıda kısaca özetlenmiştir (8).

2.2.2. Peutz-Jeghers Sendromu

Hücre proliferasyonunun ve polaritesiyle ilgili STK11/LKB1 geninde bir germline mutasyonunun neden olduğu bu sendromun, pankreas kanseri riskini 132 kat artırdığı belirtilmektedir.

2.2.3. Lynch Sendromu

Bu sendromun (kalıtsal nonpolifozisli kolorektal kanser, HNPCC) DNA uyuşmazlığı onarma genlerinden birinde neden olduğu mutasyon (MLH1 ve MSH2) sonucu pankreas kanseri riski yükselmektedir.

2.2.4. Ailesel Atipik Çok Amaçlı Mole Melanom

Displastik nevüs olarak da bilinen bu otozomal sendrom vakalarının yaklaşık yarısında, pankreatik kanser gelişiminde gerekli görülen siklin bağımlı kinaz 2A (CDKN2A) geninde germline mutasyonu söz konusudur ve risk 13.1 kat daha yüksektir.

2.2.5. Melanoma-Pankreatik Kanser Sendromu

Displastik nevüs sendromunda gözlenen CDKN2A geni ile ilişkili ancak bu sendromun fenotipi olmayan bir pankreas kanseri ve melanomu sendromudur.

2.2.6. Kalıtsal Meme ve Yumurtalık Kanseri

BRCA1 veya BRCA2 germline mutasyonlarını taşıyanlarda pankreatik kanser için BRCA2’de daha yüksek nispi riskin (5.9 ve 6.6) söz konusu olduğu bildirilmiştir.

2.2.7. Kistik Lezyonlar

Pankreasın yaygın kistik neoplazileri malignant potansiyeli olmayan seröz ve malignant değişim potansiyeline sahip müsinözdür. Kadınlarda pankreas gövde veya kuyruğunda görülen müsinöz kistik neoplaziler (MCN) veya erkek ve kadın pankreas başında intraduktal papiller müsinöz neoplaziler (IPMN) olarak değerlendirilmektedir.

2.2.8. Pankreatit

Kronik pankreatitin tanınmış nedenleri arasında tropikal pankreatit ve otoimmün pankreatit sayılmakta ve kalıtsal da olabileceği ve pankreas kanseri riskini artırdığı belirtilmektedir. Keza kalıtsal pankreatit, genellikle çocukluk çağından başlayarak nispeten genç yaşta kronik pankreatitin geliştiği bir özellik arz eder ve katyonik tripsinojen geni (PRSS1) ile serin proteaz inhibitörü Kazal tip 1 (SPINK1) geni mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir (8). Kronik pankreatitin, artan hücre döngüsü

ve eksik DNA onarımı nedeni ile pankreatik kansere yol açabileceği belirtilmektedir. Bu kapsamda p16 ekspresyon kaybı ve K-ras mutasyonlarının bu yaklaşımı doğrular nitelikte olduğu bildirilmektedir (9).

2.2.9. Helicobacter Pylori Enfeksiyonu

Helicobacter pylori mide gastrit ve ülserlerine neden olan bir bakteridir ve bir mide kanserojeni olarak değerlendirilmektedir. Bu organizmanın mide kanseri ile olan yakın ilişkisi, pankreas kanseri ile ilişkisini de destekler niteliktedir (9). Helicobacter pylori ve pankreatik kanser ilişkisine yönelik bir araştırmada Helicobacter pylori, CagA + suşları ve pankreas kanseri arasındaki ilişkilerin mide kanseri için gözlenen derneklere benzerlik gösterdiğine değinilmiştir (10).

2.2.10. Sigara ve Alkol

Sigara ve puro içme ile tütün çiğnemenin pankreas kanserine neden olabileceği, bırakılmasının ise riskin azaltılmasında etkili olduğu değerlendirilmesi oldukça yaygındır. Pankreas kanseri insidansında 20. yüzyılın ikinci yarısındaki artış, 21. yüzyıl başlarında ABD ve Avrupa'daki azalış ve Çin gibi dünyanın diğer bölgelerindeki artış sigara kullanım yoğunluğu ve süresine bağlı olarak tütün dumanı kaynaklı kanserojenlerle ilişkilendirilmiştir (9).

Alkolün, pankreatik duktal adenokarsinoma'da bağışıklık sistemini bastırma ve tümör içine T hücre alımını engelleme yoluyla kanser ilerlemesini destekleyen M2 makrofaj sayısını artırdığı gözlenmiştir (11). Dolayısıyla bu durum, bazı çalışmalarda günde üç bardaktan fazla ağır alkollü içki tüketilmesinin pankreas kanseri gelişme riskini artırabileceğiyle değerlendirmesiyle uyumlu görünmektedir (7).

2.2.11. Aşırı Kilo, Obezite ve Diyabet

Aşırı kilo ya da obezliğin pankreas kanseri riskini artırdığı, riskin vücut kitle indeksi 23 kg m^{-2} den küçük olanlarla karşılaştırıldığında, 30 kg m^{-2} ve üzeri için % 72

yine 25 kg m⁻²'den küçük olanlarla karşılaştırıldığında 30.0-34.9 kg m⁻² için % 41 daha yüksek olduğu bildirilmiştir (8). Önemli bir örneklem büyüklüğü (9200) için pankreas kanseri ile 5 yıldan uzun ve kısa süreli diyabet arasındaki ilişkiler sırasıyla orta düzeyde ve daha yüksek olarak kaydedilmiştir (9).

Genel olarak, obezite ve tip2 diyabetin sinyalleşme ve metabolik yollardaki ve fibro inflamatuvar süreçlerdeki değişiklikler de dahil olmak üzere pek çok mekanizma aracılığı ile pankreatik duktal adenokarsinoma gelişimini teşvik edebileceğine değinilmiş ve bu kapsamda otofajik süreçler, gastrointestinal peptit sekresyonu ve bağırsak mikrobiyotik değişiklikleri de sayılmıştır (12).

2.2.12. Diğer Risk Faktörleri

Pankreas kanseri riski yaşın ilerlemesiyle artar. Yine kan grubu A olan kişilerde pankreas kanseri riski daha yüksek, O olanlarda ise daha düşüktür.

Doğal kırmızı etin ve farklı ön işlemlere tabi tutulmuş veya kimyasallar kullanılarak korumaya alınmış (sosis, jambon, pastırma, salam ve burger) etlerin pankreas kanseri riskini artırabileceği belirtilmektedir (7). Sıklıkla, meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kanser riskini azaltabileceği öne sürülmekte ise de yüksek düzeyde et ve yağ ağırlıklı beslenmeyle karşılaştırılmasının bunu pek doğrulamadığı bildirilmiştir (9).

2.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Son yıllardaki yeni değerlendirmelerde sıklıkla kullanılan GLOBOCAN 2012 tahminlerine göre kanser türlerinin görülme sıklıkları ve ölüm oranları verileri Çizelge 1.'de gösterilmiştir (13). Pankreas kanseri meme, prostat, akciğer, kolorektum gibi kanser türlerine göre düşük sayılabilecek bir görülme sıklığı sergilemekle birlikte 2012 yılı itibariyle yaklaşık 338 000 kişinin bu kanser türüne maruz kaldığı gözlenmektedir.

Erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazla görülen pankreas kanseri vakalarının yaklaşık % 85'ini adenokarsinoma oluşturmaktadır.

Çizelge 1. GLOBOCAN 2012 tahminlerine göre kanserlerin her 100.000 kişi için görülme sıklığı ve ölüm oranları (13).

Kanser Türü	Görülme Sıklığı		Ölüm	
	Dünya	Türkiye	Dünya	Türkiye
Meme	43.1	39.1	12.9	13.4
Prostat	30.6	40.6	7.8	22.8
Akciğer	23.1	34.7	19.7	31.1
Kolorektum	17.2	16.6	8.3	10.0
Serviks Uteri	14.0	4.3	6.8	1.7
Dudak- Ağız Boşluğu	4.0	2.1	1.9	0.7
Üst yutak	1.2	1.0	0.7	0.5
Diğer yutak	1.9	0.6	1.3	0.4
Özafagus	5.1	3.6	5.0	3.3
Mide	12.1	14.2	8.9	12.2
Karaciğer	10.1	3.2	9.5	3.0
Safra Kesesi	2.2	1.8	1.7	1.7
Pankreas	4.2	4.5	4.0	4.4
Gırtlak	2.1	4.0	1.1	1.6
Melanoma	3.0	2.1	0.7	0.9
Kaposi sarkomu	0.6	0.3	0.4	0.1
Korpus Uteri	8.2	10.1	1.8	2.6
Yumurtalık	6.1	6.3	3.7	4.2
Testis	1.5	3.2	0.3	1.3
Böbrek	4.4	5.6	1.8	3.8
Mesane	5.3	15.2	1.9	6.6
Beyin- sinir sistemi	3.4	6.1	2.5	3.7
Tiroit	4.0	10.9	0.5	1.4
Hodgkin lenfoma	0.9	2.1	0.3	1.1
Non-Hodgkin lenfoma	5.0	6.8	2.5	4.3
Çoklu Miyelom	1.5	2.9	1.0	2.3
Lösemi	4.7	5.8	3.4	4.6

Pankreas kanseri görülme sıklığı kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya/Yeni Zelanda'da en yüksek (sırasıyla 7.4, 6.8 ve 6.5 her 100000 kişide) olarak bulunurken, orta Afrika ve güney-merkez Asya'da en düşük (1.0 ve 1.2 her 100000 kişide) olarak belirlenmiştir. Yine Afrika'da söz konusu değerlerin Mısır ve Güney Afrika Cumhuriyeti'nde (4.7), Asya'da Ermenistan (9.3) ve Japonya (8.5), Amerika'da Fransız Guanası'nda (8.1), Avrupa'da Çek Cumhuriyeti (9.7), Slovakya (9.4) ve Macaristan'da (9.3) ve Okyanusya'da Avustralya (6.6) ve Yeni Kaledonya (6.5) için en yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, düşük görülme sıklığı bağlamında

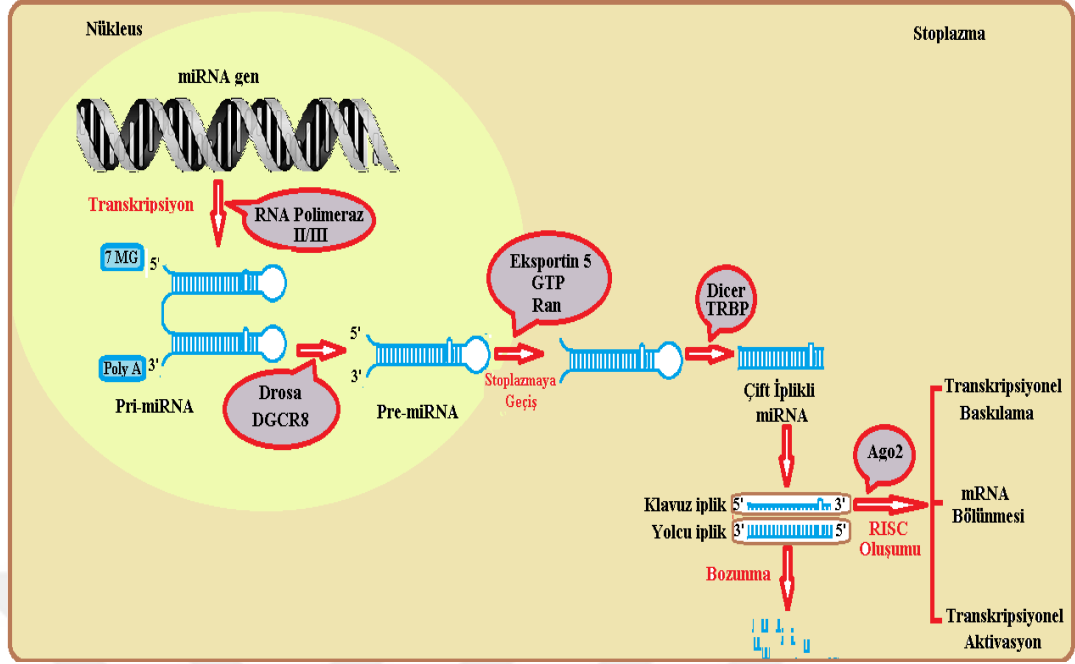
Afrika ve Asya'da Tanzania ve Pakistan için 0.2 ve 0.5 oranları söz konusu iken Amerika ve Asya'da Bolivya ve Haiti için 2.4 ve Bosna-Hersek için 3.8 gibi değerlerin bulunması bölgesel farklılıkların ne denli büyük olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. Türkiye için 4.5 düzeyinde bulunan bu değer, dünya ortalamasının (4.2) hafif üzerindedir. Türkiye'de vaka yönüyle ilk 10 kanser türü arasında yer almayan pankreas kanseri için 2010-2014 yılları arası bildirilen vaka sayısının 6966 ve 2014 yılı için görülme sıklığının erkekler ve kadınlar için 5.1 ve 3.4 olduğu belirtilmiştir (14).

Türkiye'de sözkonusu kanser türü için GLOBOCAN 2020 tahmini 2625 erkek ve 1700 kadın olmak üzere toplam 4325 vaka şeklindedir (13).

2.4. miRNA

Ökaryotik DNA'ların çok büyük bir bölümünün (% 90) RNA'ya transkripsiyonu gerçekleşirken, bunların çok azı (% 1-2) proteine dönüşmektedir. Proteine dönüşemeyen ve biyolojik süreçler için gerekli ve düzenleyici olan RNA'lar kodlanmayan RNA'lar (non-coding RNA) olarak belirtilmektedir ve bunlar nükleotit sayılarına göre uzun (>200 nt) ve kısa (<200 nt) olarak sınıflandırılmaktadır (2, 3). İşte, birden fazla geni hedefleme ve dolayısıyla çeşitli proteinlerin ekspresyonunu düzenleme yeteneğine sahip bir miRNA, olgun formdaki 18-28 nükleotid uzunluğundaki kodlayıcı olmayan RNA moleküllerinin oluşturduğu bir yapıdır. Keşfedildikleri sırayla rakamsal kodlar taşıyan miRNA'ların bulunduğu farklı yerleri ifade etmek üzere son kısmında harf kullanımı söz konusudur.

miRNA'lar protein kodlayan ve kodlamayan gen dizilerinde genellikle kırılğan kromozomal bölgelerde yer almaları nedeniyle moleküler değişime duyarlıdır. miRNA dizileri, Rnase III endonükleazları Drosha ve DGCR8 tarafından daha ileri düzeyde işlenebilmesi için RNA polimeraz II tarafından kopyalanır. Ekspresyonun 5 tarafından stoplazmaya aktarılan miRNA'nın halkasının kaldırılması sonucu oluşan olgun miRNA dizisi ve ters tarafındaki eksik dubleks oluşturulma süreci Dicer (RNase III endonükleaz) tarafından gerçekleştirilir. miRNA'nın oluşuma ilişkin süreç Şekil 2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. miRNA'nın biyogenezi (Biyolojik Oluşumu)

2.4.1. miRNA- Kanser İlişkisi

Tümör oluşumu ve gelişmesinde rol oynayan miRNA'lar bazı proteinleri hedef olarak yukarı yönlü bir düzenlenme sergilerken, tümör baskılayıcı miRNA'ların aşağı yönlü bir düzenlenme içerisinde olduğu ya da baskılandığı (15) ve ayrıca bunların sırasıyla tümör gelişmesini baskılayan ve ilerleten mRNA'ları hedef aldıkları (3) bilinmektedir. Diğer bir deyimle onkogen miRNA'ların tümör baskılayıcı genler ile hücre farklılaşması ve apoptozu kontrol eden genler üzerine etkileri nedeniyle tümör oluşumunu teşvik ettiği değerlendirilmektedir (16).

miRNA'ların hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümüne ilişkin biyolojik olaylardaki etkin rolleri yakın dönemde kanser ve diğer hastalıklarla miRNA ilişkisinin yoğun olarak çalışılmaya başlanmasına yol açmıştır. Keza, miRNA-kanser ilişkisi; insanlarda bugüne değin belirlenebilmiş olan miRNA'ların bırakın tamamını sadece bir bölümünü oluşturması ve bunların işlev ve etkinliklerinin farklı kanser türlerinde değişkenlik gösterebilmesi nedenleriyle bilinmezliklerin oldukça fazla ve araştırma potansiyelinin son derece yüksek olduğu bir konu olmaya daha uzun süre devam edecek gibi görünmektedir. Nitekim çok sayıda miRNA varlığına ek olarak, aynı miRNA'nın farklı kanser türleriyle ilişkisi yönelik, sözgelimi miRNA-410 ve

karaciğer, kolorektal (17), kemik tümörü (18), mide (19), ganadotropik (20), akciğer (21) ve pankreas (22) gibi çalışma örnekleri de göstermektedir ki çok geniş bir potansiyel araştırma alanı mevcuttur. Konuyla ilgili çeşitli derleme çalışmalarında kanser türleri ile ilişkisine değinilen bazı miRNA türleri arasında onkogen olanlardan miR-21, miR-155 ve miR-17-92 kümesi (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, miR-92-1) ve tümör baskılayıcı olarak miR-15a ve miR-16-1'e sıklıkla rastlanılmaktadır (23, 24, 25, 26, 27, 28).

miRNA'ların diğer kanser türlerinde olduğu gibi pankreas kanserinde de normal olmayan süreç ve ekspresyon işaretleri vermesinin potansiyel tanı veya prognostik araçlar olabileceği değerlendirmesinin yapılmasına yol açmış ve miRNA'ların bölgeye özel ve sürekli verilmesi yoluyla hedef gen ekspresyonunun bastırılabilmesi belirtilmiştir (29).

Albulescu ve ark. (2014) tarafından. miR-155, Panin-2 ve 3'te ve miR-21'in sadece Panin-3'te aşırı eksprese edildiği, miR-21, -221, 222 ve let-7a'nın lezyonun derecesi ile arttığı ve lezyonların üçte ikisinde maksimum ekspresyon görüldüğü belirtilmiş ve miR-21'in yukarı-regülasyonunun KRAS ve EGFR tarafından kontrol edildiğine değinilmiştir (15). Keza, Jin ve ark. (2015) de, pankreatik tümör oluşumu ve ilerlemesiyle ilişkili moleküler değişimler arasında, aktive olduğu zaman hücre gelişmesi ve canlılığına yol açan ve bir onkogen olan KRAS'a değinmişlerdir. Araştırmacılar pankreatik kanserde miR193b'nin G1 fazını durdurma ve S fazında hücrelerin fraksiyonunu azaltmanın teşvik edilmesi yoluyla hücresel döngünün yıkımına yol açtığı ve dolayısıyla hücre çoğalmasının kesintiye uğradığını belirtmişlerdir. Bu süreçte KRAS'ın mekanik olarak AKT ve ERK sinyal yollarını düzenleme ve pankreatik hücre gelişmesini baskılama yoluyla miR193b'nin direkt bir etken olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir (30).

Gen ekspresyonunda son derece önemli düzenleyiciler olarak görev yapan mikro RNA'ların, pankreas kanseri gelişiminde de tümör hücresi farklılaşması, çoğalması, hücre döngüsü ilerlemesi, invazyon ve metastaz gibi çeşitli fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Önemli görülen bazı miRNA'lar ve fonksiyonlarına ilişkin özet bilgiler Çizelge 2.'de gösterilmiştir. Brunetti ve ark. (2015), pankreatik duktal adenokarsinomada (PDAC) miRNA'ların rolü üzerine çok sayıda çalışma

yapıldığıнын gözlemlendiğini, keza bu tümörün erken tespit edilmesinin güçlüğü ve uygun biyolojik belirteçlerin bulunmamasının miRNA'lara olan ilginin artmasına neden olduğunu belirtmişlerdir (31).

2.4.2. miRNA ve Otofaji

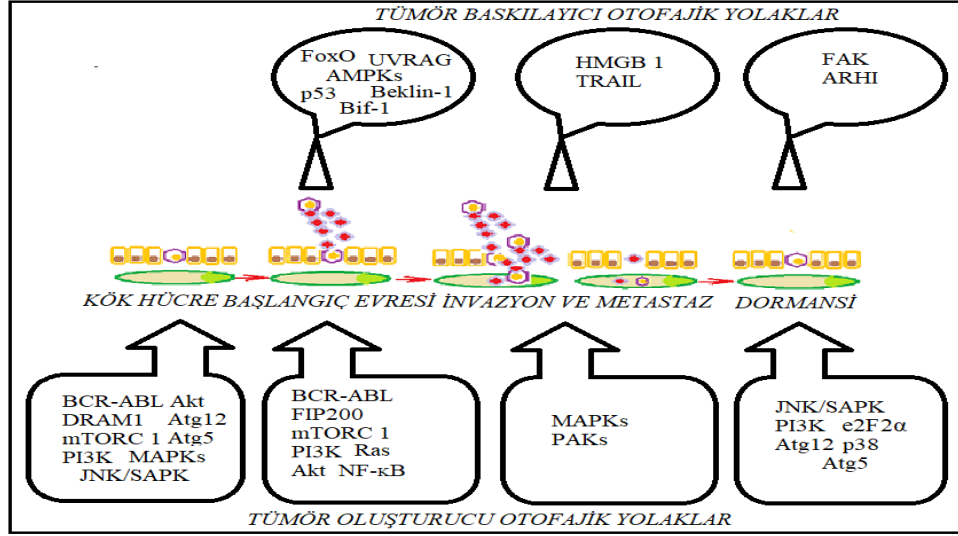
Otofaji, bilindiğı üzere hücrelerin organel, protein agregatları ve diğ er makro moleküllerini sindirimi şeklinde gerçekleş en katabolik bir süreç, lizozomal bir yıkım olayıdır. Kanser hücrelerinin açlık, hipoksi ve antikanser uygulamaları gibi stres koşulları altında kendilerini korumak için otofaji mekanizmasını kullanmakla birlikte; bazı kemoterapötik uygulamalar sonrası görülen aşırı otofaji (Tip II) önceki bahsedilenin tersine önemli bir hücre ölüm mekanizması olarak değerlendirilmektedir. Wang ve ark. (2013a), miR-23b'nin ATG12 proteinini hedef alarak otofaji oluşumu ile ilişkili olduğunu ve miR-23b ekspresyonunun, radyasyon nedenli otofajiyi durdurarak pankreatik kanser hücrelerini radyasyona karşı duyarlı hale getirdiğini bildirmektedir (32). Aynı araştırmacının bir başka çalışmasında miR-23b'nin, pankreatik kanser dokularında otofaji'nin potansiyel bir sınırlandırıcısı olduğu da gösterilmiştir (32). miRNA-216a'nın artan ekspresyonunun Beklin-1'in ekspresyonunu sınırladığı ya da diğ er bir yaklaşımla, otofaji aktivitesi ile miRNA-216a arasında negatif bir ilişkinin varlığını belirten diğ er araştırmacılar da benzer sonuca ulaşmışlardır (34).

Tümör oluşturucu otofajik yollar farklı dönemler itibariyle Şekil 2.3.'de gösterilmiştir (35).

Otofajinin çeşitli devrelerinde önemli rolleri tanımlanan bazı miRNA'lar; başlatma: miR-101, vezikül çekirdeklenmesi: miR-30a, uzama ve tamamlanma: miR-181a, yerleştirme ve füzyon: miR-34a, yıkım ve geri dönüşüm: miR-17/20/93/106 kompleksi olarak sayılmakta ve hücrenin hayatını sürdürme ve ölüm mekanizmalarını düzenleyen henüz tanımlanmamış çok sayıda miRNA varlığı olasılığından söz edilmektedir. Özafagus kanser hücrelerinin kimyasal duyarlılığının belirlenmesinde önemli olduğu ifade edilen miR-193b'nin aşırı ekspresyonunun 5-FU uygulaması sonrası iyileşme için kanser hücrelerinin yeteneğini önemli ölçüde azalttığı ve buna kısmen de olsa mikrotübül dinamiklerini düzenleyici yaygın bir sitozolik fosfoprotein

Çizelge 2. Pankreatik duktal adenokarsinomada (PDAC) ekspresyonu artan ve azalan bazı miRNA'lar (4, 31).

miRNA	Eks.	Hedef Genler	Karsiyogenesiste Rolü
miRNA-10a /10b	↑	HOXA1/TIP30	İstila/ Metastatik fenotipte artış
miRNA-21	↑	Bcl-2, PDCD4, TIMP3, PTEN	Hücre çoğalmasında artış, invazyon, metastaz, kemodirenç ve apoptozisten kaçış
miRNA-23a	↑	APAF-1	Hücre çoğalması
miRNA-34	↑	Notch1/2, Bcl-2	Apoptozisten kaçış ve hücre çoğalması, invazyonu
miRNA-34a	↓	E2F3, Bcl-2, c-MYC, Cyclin D1, Notch-1	Göçün, döngünün baskılanması, apoptozis
miRNA-155	↑	TP53INP1, SOCS1	Tümör gelişmesinde artış, Hücre çoğalması, invazyon ve göç
miRNA-100	↑	IGFR1	Hücre çoğalması ve metastaz
miRNA-106a	↑	TIMP-2	Hücre çoğalmasında artış, epitelyal-mezenkimal geçiş ve invazyon
miRNA-27a	↑	Spry-2	PDAC hücre gelişmesinde artış, koloni oluşumu ve göç
miRNA-221/222	↑	MMP-2, MMP-9, PDGF, p27 ^{Kip1} , p57 ^{Kip2} , PUMA, TIMP-2	PDAC hücre invazyonunda artış, çoğalma, göç, metastaz
miRNA-224,-486	↑	CD40	Yüksek ölçüde invazyon, metastatik fenotip
miRNA-194,-200b,-200c,-429	↑	EP300	Yüksek ölçüde metastatik fenotip
miRNA-196a	↑	NFKBIA, ING5	Hücre çoğalması, invazyon
miRNA-367	↑	Smad7	Epitelyal-mezenkimal geçiş , invazyon ve metastaz
miRNA-124	↓	Rac-1	Hücre çoğalmasında artış, invazyon ve metastaz
miRNA-148a	↓	CDC25B, CCKBR, Bcl-2, DNMT1	Metastaz baskısı
miRNA-615-5p	↓	IDF-2, JUNB	Hücre çoğalmasında artış, göç ve invazyon
miRNA-200	↓	Sox2, ZEB1, ZEB2	Metastatik fenotipte artış, hücre köklülük
miRNA-217	↓	KRAS, SIRT1	Hücre gelişiminin baskılanması
miRNA-219-1-3p	↓	MUC4, cyclin D1, AKT-ERK yolağı	Hücre çoğalmasında artış, hücre göçü
miRNA-203	↓	Survivin	Tümör gelişmesinde artış
miRNA-146a	↓	IRAK-1	İstilada artış
miRNA-17-92	↓	NODAL/ACTIVIN/ TGF-β1	Kemodirenç
miRNA-375	↓	PDPK1	Glukoz homeostosis



Şekil 2.3. Tümör oluşturuıcı otofajik yolaklar (Liu ve ark. 2013'den uyarlanmıştır (35))

olan statin 1 ekspresyonunu azaltmak yoluyla aracılık ettiği bildirilmektedir. Dolayısıyla miR-193b'nin artan ekspresyonunun otofajik hücre ölümünü artırdığı belirtilmekte (36) ve halen kanserin durdurulması ve geriletmesine ilişkin otofajik hücre ölümünü artırmaya yönelik araştırmalar sürdürülmektedir.

2.4.3. miR-196

miR-196'nın farklı kanser türlerindeki rollerine ilişkin yapılmış çalışmaların, istenilen düzeyde detay bilgileri sağlamadığı ve bu bağlamda araştırmaların sürdürüldüğü gözlenmektedir. miR-196 gen ailesi, embriyonik gelişim için gerekli homeodomain içeren transkripsiyon faktörlerini kodlayan HOX gen kümeleri bölgelerinde bulunur. Evrimsel kalıpları omurgalılarıdaki HOX genlerine çok benzeyen miR-196, HOXB9 ve HOXB10 genleri arasında kromozom 17'de bulunan miR-196a-1 geni, HOXC10 ve HOXC9 arasında kromozom 12 üzerinde miR-196a-2 geni ve HOXA9 ve HOXA10 genleri arasında kromozom 7'de bulunan miR-196b geni olmak üzere 3 farklı genden kopyalanır. Olgun nükleotid dizisi miR-196a-1 ve miR-196a-2 için aynı olmasına rağmen, olgun miR-196b miR-196a'dan bir nükleotid ile farklıdır ve miR-196a-1 ve miR196a-2 genlerinin aynı işlevsel olgunlaşmış miRNA dizisini (3p-GGGUUGUUGUACUUUGAUGGAU-5p) transkribe ettikleri, miR-

196b geninin ise küçük bir RNA (3pGGGUUGUUGUCCUUUGAUGGAU-5p) ürettiği bilinmektedir (37).

Bazı kanser türleri için gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Hoffman ve ark. (2009) miR-196a'nın onkojenik özelliklere sahip olduğu belirtilirken (38), Darda ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada; meme kanserinde HOXB9'un aşırı ekspresyonunun metastazı arttırdığı ve bazı kanserlerde bu durumun Wnt/Tcf yolağının kontrolü altında olduğu belirtilmiştir. miR-196a ifadesi, doku örneklerinde qPCR ile ölçülmüş, HOXB9 ekspresyonu hücrelerde western blot (WB) ve doku örneklerinde IHC ile değerlendirilmiştir (39). miR-196a'nın, Barrett's özafagus (BE) gelişiminde güçlü bir biyolojik belirteç olma potansiyeli olduğunun değerlendirilmesine ilişkin bir çalışmada; özofagus dokusunun neoplastik dönüşümü sırasında karakteristik olarak azaldığı veya kaybolduğu ve SPRR2C, S100A9 ve KRT5 genlerinin ekspresyonlarının azalmasında rol oynadığına değinilmiştir (40). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde miR-196a'nın ekspresyon paterninin ve tümör gelişimindeki biyolojik rolünün belirlenmesini de kapsayan bir çalışmada; kanserli örnek ve hücre hatlarında ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu ve DNA metilasyonundan etkilenebildiği belirtilmiştir (41). miR-196a'nın servikal kanser gelişimindeki rolü kapsamında yapılan bir çalışmada söz konusu miR'in potansiyel hedefleri olarak FOXO1 ve p27Kip1 belirlenmiştir (42). Biyomarkır olarak kullanılabilmesi öngörülerek üzerinde çalışılan iki miRNA'nın (miR-196a ve miRNA-196b) mide kanseri dokularında seviyelerinin arttığı bildirilmektedir (43). miRNA kodlama bölgesi varyantları ile kanser riski arasındaki korelasyon ve prognoza odaklanan Song ve ark. (2016), miR-196a-2 rs11614913 CC genotipi ile yumurtalık kanseri riskindeki artış arasında bir ilişki olduğunu ve miR-196a-2 rs11614913 C alelinin miR-196a ekspresyonunu teşvik ettiği belirtilmiştir (44).

miRNA'ların anormal ifadelerinin görüldüğü başlangıç döneminin erken teşhis için son derece uygun olabileceği ve yine tek bir miRNA'nın biyolojik belirteç olarak değerlendirilmesi kapsamında; yukarı yada aşağıya düzenlenme yoluyla tümörün ilerlemesinin yüksek duyarlılık ve özgüllükle ortaya konulabileceğini belirtmektedir (45).

Biyopsi örneklerinde miRNA düzeylerini belirlemek için TaqMan® analizlerinin kullanıldığı bir çalışmada; miR-196a ve miR-217 biyolojik belirteçlerinin kombinasyonunun, sağlıklı doku, pankreatik duktal adenokarcinoma (PDAC) ve kronik pankreatitin ayırımında etkili olduğu belirtilerek, miR-196a'nın PDAC'nin ilerlemesiyle paralellik gösterdiği bildirilmiştir (46).

95 miRNA'nın diferansiyel ifadesinin, QuantiMir sistemi kullanılarak gerçek zamanlı RT-PCR ile analiz edildiği bir çalışmada; pankreas kanseri doku örnekleri ya da kanser hücre çizgilerindeki miRNA ekspresyonunun U6 RNA'ya normalize edilmesi ve normal pankreas doku veya pankreatik duktal epitel (HPDE) hücrelerindeki ile karşılaştırılmıştır (47).

miR-148 ve miR-217'nin tümör baskılayıcı gibi rol oynadığı ve onların aşağı yönlü düzenlenmesinin, ROCK1, WNT10B, Bcl-2, TGIF2, DNMT3B ve KRAS gibi onkogenik hedeflerin baskılanmaması yoluyla tümör oluşumunu artırdığına işaret edilen bir çalışmada; miR-196a'nın yukarı yönlü düzenlenmesinin, p27 ve HOXA5 gibi tümör baskılayıcı genlerin direkt baskılanmaması yoluyla tümör oluşumunu ilerlettiğine değinilmiştir (48).

Pandey ve Bharadwaj (2014), öncü lezyonlardan duktal epitelden kaynaklanan ve başlangıçta mutasyon, silme, amplifikasyon, metilasyon gibi bir takım genetik değişikliklere neden olan pankreatik adenokarsinomda insülin benzeri, epidermal ve trombosit kaynaklı gibi bazı büyüme faktörlerinin ve bunların reseptörlerinin artması nedeniyle MAPK yolu, P13k, NF-κB gibi birtakım mitotik ve anti-apoptotik kaskadların aktivasyonunun söz konusu olduğuna değinilmektedir (49).

Pankreatik duktal adenokarsinoma'nın yaklaşık % 3'ünü oluşturan ailevi pankreatik kanserin nedeni gen kusurlarının henüz tanımlanmamış olduğunu ve risk altındakiler için miRNA'ların potansiyel biyogöstergeler olabileceğine değinen Slater ve ark. (2014), yüksek dereceli pankreatik intraepitel neoplazi (PanIN) ve başlangıç pankreatik kanserinin duyarlı bir şekilde belirlenmesini sağlayacak miRNA'yı (miRNA-21, miRNA-155, miRNA-196a, miRNA-196b, miRNA-210) tanımlamaya odaklanmışlardır (50).

Hernandez ve Lucas (2016), normal pankreas, kronik pankreatit ve pankreatik duktal adenokarcinoma dokularında miRNA ekspresyonunu karşılaştıran ilk analizi

Szafranska ve ark.(2008)'nin gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir (51). Bir derleme çalışmasında; normal, kronik pankreatit ve pankreatik adenokarsinoma'da (PDAC) miR-198, miR-217, miR21 ve miR-34a ekspresyonları incelenmiş, miR-198'in normal dokudan CP ve PDAC'ya doğru artarken, miR217'nin azaldığı ve sadece miR21 ve miR-34a'nın tümör dokusunda özel ekspresyon sergilemesi nedeniyle kronik pankreatit ve PDAC ayrımı için çok uygun biyolojik belirteçler olabileceği değerlendirilmiştir (52).

Pankreas kanseri ve farklı miRNA'larla yürütülen ve yukarıda özetlenen çalışma sonuçlarının, miR-196'nın diğerlerine göre biyolojik gösterge olma potansiyelinin yüksekliğine işaret etmesi nedeniyle bu kez de sadece söz konusu miRNA ve pankreas kanseri ilişkisinin değerlendirilmesine odaklanılmıştır. Bloomston ve ark (2007), sağkalımı önemli ölçüde etkileyebilecek bir miRNA'nın (miR196a-2) belirlendiğini; söz konusu miRNA'nın yüksek ekspresyonunun görüldüğü tümörlerde ortalama hayatta kalma süresinin 14.3 ay, düşük ekspresyon koşullarında ise 26.5 ay olduğunu belirtmişlerdir (53).

miR-196a'nın pankreas kanserindeki rolünü aydınlatmak amacıyla, hücre dizilerindeki ekspresyon modeli, biyolojik rolü ve hücre çekirdek faktörü kappa-B-inhibitör alfa geniyle etkileşiminin incelendiği bir araştırmada; Mikrodizi ve qRT-PCR yöntemlerinin, hücre hatlarında miR-196a'nın yukarı yönlü bir düzenlenme içerisinde olduğunu gösterdiği belirtilmiştir (54). miR-196a'nın aşırı ekspresyonunun MG63 ve U2OS hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını arttırdığına ve her iki habis kemik tümörü hücresinde de PTEN'in aşağı düzenlenmesi ile miR-196a'nın yukarı düzenlenmesi arasındaki korelasyona değinilen bir başka çalışmada, miR-196a mimikinin, p21/CIP1 ve p27/KIP1'in aşağı yönlü ve cyclin D1'in yukarı yönlü düzenlenmeleri ile MG63 ve U2OS hücrelerinin çoğalmasını taklit ettiği belirtilmiştir (55).

Yuan ve ark. (2016), ANXA1'in aşırı ekspresyonunun, pri-miR196a-1 ve pri-miR196a-2, premiR196a-1, pre-miR196a-2 ve olgun miR-196a'nın ekspresyonunu önemli düzeyde azalttığı ve siRNA ile susturulmasının ise artışa neden olduğu belirtilmiştir. miR-196a'nın, ANXA1 ekspresyonunu aşağı yönlü düzenleme yoluyla MCF7 hücre çoğalmasını teşvik edebildiğine değinilmiş, miR-196a'nın meme kanseri hücrelerinde kanserojen rol oynadığına işaret edilmiştir (56).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneysel aşamaları, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Hücre Kültürü/PCR/Western Blot Laboratuvarında yapılmış olup, hazırlanan solusyonlar ve kullanılan yöntemler aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

3.1. Hücre Kültürü

Hücre hattı İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr. Elif Damla ARISAN tarafından hediye edilmiştir.

Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

- ✓ Besiyeri: Orijinal şişesi içerisinde ve sıvı formdaki Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEMNM/F-12) besiyeri (Invitrogen-Carlsbad, CA, USA) kullanılmış olup analizler süresince +4°'de saklandı.
- ✓ Serum: Besiyerini güçlendirmek amacıyla hormon, enzim, büyüme faktörleri ve matris proteinlerini içeren Fetal Sığır Serumu (FBS) kullanıldı. Kullanıma hazır sıvı olarak temin edilen FBS (Invitrogen-Carlsbad, CA, USA) analizler süresince -20°'de saklandı.
- ✓ Tripsin-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (Tripsin-EDTA, % 0.25), 1X Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) ve Penisilin/Streptomisin Antibiyotik solusyonları, kullanıma hazır sıvı olarak Invitrogen'den temin edildi (Invitrogen-Carlsbad, CA, USA).
- ✓ Dimetil Sülfoksit (DMSO) ve Tripan Mavi (% 0.4) solusyonları ise kullanıma hazır sıvı olarak Sigma'dan (Sigma-St. Louis, MO, USA) temin edildi.

Hücre Kültürü İşlemi

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri (Pankreatik duktal adenokarsinoma hücre dizileri), laminar akımlı kabin içerisinde; steril koşullarda, % 10 FBS, bakteri

kontaminasyonuna karşı % 1 (100 ünite/ml penisilin+ 100 mg/ml streptomisin) oranında antibiyotik solusyonu ilave edilmiş DMEMNF/F-12 besiyeri içerisinde kültüre edildi. % 5 CO₂ içeren, %95 nemlilik koşullarında ve 37°C sıcaklıktaki inkübatörde çoğaltılan hücreler, % 80 yoğunluğa ulaştıktan sonra Tripsin-EDTA kullanılarak yapıştıkları flask yüzeyinden kaldırılarak yine kendi besiyeri içerisinde yeni bir flaskta çoğaltılmaya devam edildi. Kültürleme sırasında 1X PBS kullanılarak yıkanan hücreler, “tripan mavi” solusyonu ile toma lamında sayılarak ileriki deneylere hazır hale getirildi.

Hücrelerin Dondurulması: Tripsin-EDTA kullanılarak flask yüzeyinden ayrılması sağlanan hücrelerin içerisinde bulunduğu süspansiyon, 600 x g’de 8 dakika boyunca 25⁰C’de santrifüj edildi ve elde edilen hücre peleti dondurma medyumu (% 20 FBS ve % 10 DMSO içeren DMEMNF/F-12) ile resüspanse edilerek 2 ml’lik dondurma tüplerine aktarıldı. Kademeli dondurma sonrasında hücreler, sıvı nitrojende saklandı.

3.2. miRNA Transfeksiyonu

Prensip: miRNA’lar, hedef mRNA’nın 3’ UTR (untranslated region) bölgesine bağlanarak mRNA’nın yıkımına neden olurlar ve böylelikle hedef gen ekspresyonunu azaltırlar. Bu bağlamda, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, hem kontrol amacıyla negatif miRNA ile hem de miR-196a inhibitör ile ayrı ayrı transfekte edildiler.

Kullanılan Kimyasallar

- ✓ miR-196a inhibitör ve Negatif miRNA (Ambion- Austin, TX, USA),
- ✓ miRNA’ların memeli hücresine aktarılmasında kullanılan Hiperfect (Qiagen-Hilden, Germany),

miR-196a ve Negatif miRNA Hazırlanışı: Liyofilize formda temin edilen 20 nmol stok miR-196a ve 5 nmol stok negatif miRNA, Deoksiribonükleaz ve Ribonükleaz (DNaz-RNaz) içermeyen suda resüspanse edilerek final konsantrasyonları 50 nM olarak hazırlandı.

Transfeksiyon İşlemleri

- ✓ Hücre Canlılığı (MTS) Testi için, RT-PCR analizleri için ve Western Blot deneyleri için Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, miR-196a ve Negatif miRNA ile hiperfekt varlığında transfekte edildiler.
- ✓ Her deneye özgü olacak şekilde kuyucuk ya da flasklar içerisinde üretilen hücreler, final konsantrasyonu 50 nM olan miR196a/ negatif miRNA ve hiperfekt ile muamele edilerek laminar kabinde oda sıcaklığı koşullarında 25 dakika süresince inkübe edildiler. Süre sonunda karışımlar, hücrelerin bulunduğu kuyucuk/flask ortamlarına ilave edildi.
- ✓ Hücreler, negatif miRNA/miR196a ile; MTS testi için önce 8 saatlik ve süre bitiminde serumsuz besiyerinin uzaklaştırılıp 2X serum içeren besiyeri eklenmesi sonrası toplamda 72 saat süreyle, RT-PCR ve Western Blot analizleri için de 72'er saat süreyle inkübe edildiler.

3.3. Sitotoksosite (Hücre Canlılığı-MTS) Testi

Prensip: Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri üzerinde miR-196a'nın sitotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan ve kolorimetrik bir ölçüm yöntemi olan MTS'nin dayandığı temel prensip; suda çözünmeyen [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyumun (MTS), fenazin metosülfat (PMS) varlığında elektron taşıyıcılığını yapan hücre içi dehidrogenazlar tarafından suda çözünebilir formazana dönüştürülmesi, oluşan formazanın canlı hücre sayısı ile orantılı olması ve bununla ilişkili oluşan kahverengi renk yoğunluğunun 490 nm absorbans değerinde ölçülmesi şeklindedir.

Deney Prosedürü

Tripsin-EDTA kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılan Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, yukarıda da belirtildiği üzere önce 600 x g'de 8 dakika boyunca 25⁰C'de santrifüj edilmelerini takiben, besiyeri ile resüspanse edilerek 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara dağıtıldı. Yüze yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler, final konsantrasyonu 50 nM olan miR-196a veya

negatif miRNA ile 72 saat boyunca transfekte edildiler. Canlı hücrelerde formazan nedeniyle oluşan kahverengi rengin absorbans değerleri 490 nm’de ölçülerek sadece besiyeri içeren köre karşı değerlendirilmiştir. Hücre sitotoksiste ölçüm deneyleri, birbirinden bağımsız 3 farklı zamanda 3’er tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Panc-1			MiaPaCa-2		
Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
Negatif miRNA 50 nM	Negatif miRNA 50 nM	Negatif miRNA 50 nM	Negatif miRNA 50 nM	Negatif miRNA 50 nM	Negatif miRNA 50 nM
miR196a inhibitör 50 nM	miR196a inhibitör 50 nM	miR196a inhibitör 50 nM	miR196a inhibitör 50 nM	miR196a inhibitör 50 nM	miR196a inhibitör 50 nM

Şekil 3.1. Hücrelerin sitotoksiste deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı

3.4. Gen Ekspresyonu Analizi/RT-PCR

Prensip: Hedef DNA dizilerinin çoğaltılarak analiz edilmesini sağlayan RT-PCR yöntemi; önce hücrelerden RNA izole edilmesini, arkasından ters transkriptaz enzimi ile tamamlayıcı DNA’nın (complementary DNA: cDNA) sentezlenmesini, son olarak da gene özgü primerler aracılığıyla hedef gen bölgesinin çoğaltılmasını kapsamaktadır. Floresan boya yardımıyla görüntülenen spesifik gen bölgeleri, kontrol şartlara kıyaslanarak değerlendirildi.

Kullanılan Kit ve Solusyonlar

- ✓ Trizol reaktifi, DNA ladder ve Platinyum Taq DNA polimeraz kiti (Invitrogen-Carlsbad, CA, USA),
- ✓ 1-bromo-3-kloropropan (BCP), izopropanol ve absolut etanol (Sigma- St. Louis, MO, USA),
- ✓ cDNA sentezi kiti (Applied- Biosystem, Lithuania),

- ✓ Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu; 54 g Tris base, 27.5 g borik asit ve 20 ml EDTA kullanılarak 10X'lik 500 ml stok solusyon ve bundan 1X'lik kullanım solusyonu PCR sonrası agaroz jel elektroforezi için hazırlanmıştır.

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde yapılan RT-PCR deneyleri ile miRNA'nın, otofaji yolağındaki ana mediyatörlerden olan Beklin-1'in miRNA ekspresyonu üzerinde regülatör bir etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlar kontrol olarak kullanılan negatif miRNA ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla miRNA ile transfekte edilmiş hücrelerden önce RNA izole edilmiş ve sonrasında saflık oranı yüksek olan RNA'lardan cDNA sentezlenmiştir. Bu bağlamda öncelikle NCBI veri tabanında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kayıtlı Homo sapiens'de tanımlanan Beklin-1 mRNA gen dizilimleri belirlenmiştir. Bu dizilimler baz alınarak, gene özgü primer dizilimleri dizayn edilmiştir. Söz konusu primerlerin herhangi bir dimer oluşturup oluşturmadığı ve diğer gen dizilimleri ile çakışma durumu da ilgili web adresinde <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> değerlendirilmiştir. Ayrıca, tüm bantlarda eşit miktarda RNA miktarının bulunduğunu kanıtlamak amacıyla GAPDH mRNA ekspresyonu düzeylerine bakılmıştır. Elde edilen Beklin-1 mRNA ekspresyon bantının yoğunluğu, GAPDH bantının yoğunluğuna oranlanarak elde edilen veriler aracılığı ile kalitatif nitelikteki mRNA ekspresyon bantlarının, yarı-kantitatif olarak ifade edilmesi sağlanmıştır.

Primer Hazırlığı: Dizayn edilen gen primer dizilimleri sentezlettilmiş (Invitrogen- Carlsbad, CA, USA) ve geriye liyofilize şekilde gelen stok primerlerin DNaz ve RNaz içermeyen suda çözülerek 100 µM'lık stok çözeltileri oluşturulmuştur. Daha sonra bundan 10 µM'lık ara stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Hücrelerin hazırlanması ve RNA izolasyonu

Tripsin-EDTA kullanılarak flask yüzeyinden ayrılması sağlanan Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin içerisinde bulunduğu süspansiyonlar santrifüj (600 x g'de 8 dakika süreli) edilmişler ve daha sonra elde edilen hücre pelletleri besiyeri ile resüspanse edilerek her bir kuyucukta % 30 yoğunlukta bulunacak şekilde 6 kuyucuklu kaplara dağıtılmıştır. Bunlar hücrelerin yüzeye yapışmaları için gece

boyunca inkübatörde bekletilmiş ve final konsantrasyonu 50 nM olan miR-196a ve negatif miRNA transfeksiyonu sonrasında tekrar 72 saatlik bir inkübasyona tabi tutulmuşlardır. RNA izolasyonu için;

- ✓ Kuyucuklara 1ml trizol reaktifi eklenmiş ve oda ısısında 5 dakikalık inkübasyon sonrası 200 µl BCP eklenmiştir. Daha sonra süspansiyonlar 12000 x g, 4°C'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmişlerdir.
- ✓ Süspansiyonların en üstteki renksiz RNA içeren faz bir tüpe aktarılıp üzerine 500 µl izopropanol eklenmiştir. 12000 x g, 4°C'de 8 dakika süreli santrifüjle elde edilen pelete % 75'lik etanol eklenmesi sonrası ikinci kez 7500 x g, 4°C'de 5 dakikalık bir santrifüj uygulanmıştır. Yeni RNA peleti, RNaz içermeyen su ile resüspanse edilmiş ve 58°C'de 10 dakikalık inkübasyonla çözünmesi sağlanmıştır.
- ✓ RNA saflığının belirlenmesi için, nanodrop spektrofotometrede 260 ve 280 nm absorbans (A) değerleri belirlenmiş ve A_{260}/A_{280} oran değeri 1.7-2.0 olan örnekler analizde kullanılmıştır.

cDNA Sentezi

High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, Lithuania) sentez kiti kullanım protokolu kapsamında;

- ✓ 1µg RNA örnekleri; 10X RT buffer, 25X deoksiniükleosid trifosfat (dNTP) karışımı, 10X RT random primer, RNaz inhibitörü, DNaz ve RNaz'dan yoksun su ve RT enzim olmak üzere toplam 20 µl'lik karışım içerisinde reaksiyona maruz bırakılmış,
- ✓ Termal döngü cihazında
25°C'de 10 dakika,
37°C'de 120 dakika ve
85°C'de 5 dakika olmak üzere 3 aşamalı bir program uygulanmış,
- ✓ Elde edilen söz konusu cDNA ürünleri hedef genlerimizin ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Analiz ve Görüntüleme

- ✓ Her bir örnek için elde edilen cDNA, Platinyum Taq DNA Polimeraz kiti (Carlsbad, CA, USA) protokolu kapsamında; 1X'lik TBE tamponu, 0.2 mM'lık dNTP karışımı, 1.5 mMMgCl₂, 0.2 µM'lık sense ve antisense primer karışımı ve DNaz ve RNaz'dan yoksun suyun kullanıldığı toplam 25 µl hacim içerisine alınmıştır.
- ✓ PCR şartları olarak;
 - 94°C'de 2 dakika,
 - 94°C'de 30 saniye
 - 55°C'de 45 saniye,
 - 72°C'de 1 dakika,
 - 72°C'de 5 dakika,35 döngü yapıldı.
- ✓ Amplifikasyon ürünleri, yükleme tamponu ile sulandırılmış, % 2'lik agaroz jel üzerinde 1X TBE tamponu varlığında 30-35 dakika süre ile elektroforeze tabi tutulmuştur. Bu kapsamda marker olarak TrackIt DNA ladder 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kullanılmıştır.
- ✓ Söz konusu örnekler için, % 2'lik agaroz hazırlanması sırasında ilave edilen 1X SybrGreen Floresan boya yardımıyla bantlar, Blook LED Transilluminatörde (Genedirex, Miaoli County, Taiwan) görüntülenmiş ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Bantların yoğunluğu, Image J-Versiyon 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı kullanılarak kuantifiye edilmiştir.

3.5. Western Blot Analizi

Hücre Lizatlarının Hazırlanması

- ✓ 5X'lik hücre lizis tamponu (Promega- Madison, WI, USA), 1X'lik elde edilmek üzere sulandırılmıştır,
- ✓ 100X'lik inhibitör (proteaz ve fosfatataz) kokteyli (ThermoFisher Scientific-Rockford, IL, USA) hücre lizis tamponu kullanılarak 1X olarak seyreltilmiştir.

İşlem

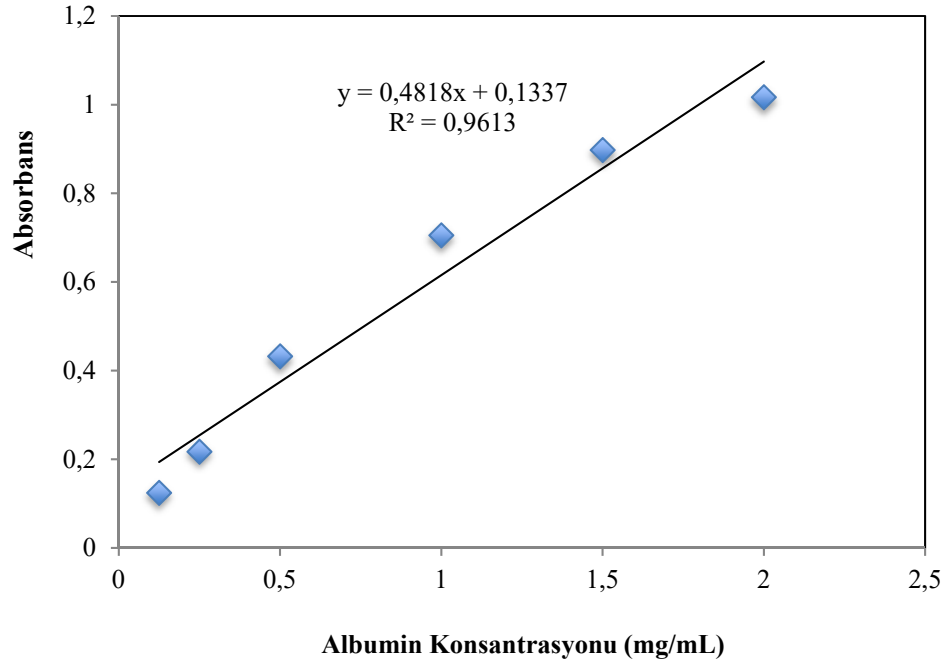
- ✓ Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, yüzeyinde buldukları flaktan Tripsin-EDTA yardımıyla alınarak elde edilen hücre süspansiyonu 600 x g, 25⁰C’de, 8 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen hücre peletleri, medyumunu ile resüspanse edilerek her bir kültür kabında % 30 yoğunlukta bulunacak şekilde dağıtılmışlardır.
- ✓ Hücreler, yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilmişler ve final konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde miR-196a ve negatif miRNA ile transfekte edilmişlerdir. 72 saatlik bir inkübasyon sonrası tripsin –EDTA aracılığı ile kültür kapları yüzeylerinden alınan hücre süspansiyonları 15 ml’lik tüplere aktarılmış ve yine aynı şartlarda santrifüj edilerek hücre peletleri elde edilmiştir.
- ✓ Her bir hücre peletinin 1X PBS ile yıkanması sonrası elde edilen yeni hücre peletleri, miktarlarına bağlı olarak 60- 120 µl değişen hacimlerdeki lizis tamponu ile resüspanse edilmişler ve sonrasında 10000 x g, 4°C’de 10 dakikalık santrifüj sonrası elde edilen süpernatant bir tüpe aktarılmıştır.
- ✓ Örnekler arasında farklılık oluşmaması adına, immunoblot analizi için kullanılacak süpernatantların protein miktarları kuantifiye edilmiştir.

Protein Miktarı Analizi

Prensip: Bradford yöntemiyle protein miktarının belirlenmesinde yararlanılan temel prensip, Coomassie brilliant blue (parlak mavi) G-250 boyasının proteinlere (özellikle arjinin gibi bazik aminoasitlere ve bazı aromatik aminoasitlere) bağlanması ve oluşan mavi rengin protein miktarına bağlı olarak farklılık göstermesidir.

İşlem

- ✓ Bradford protein analiz kiti (BioRad- Hercules,CA, USA) protokolü kapsamında; farklı konsantrasyonlardaki albumin standartları (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml) kullanılarak elde edilen standart grafiklerinden R² değeri 0.95 ve yukarısı olanlar deneylere dahil edildi. Her bir western blot öncesinde ayrı proteinler miktarları tayinleri yapılmış olup örnek bir grafik aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Protein standart grafiği.

- ✓ Örnekler için aynı dalga boyunda (595 nm) elde edilen absorbans değerlerinin karşılığı protein miktarları, standart grafikten yararlanılarak bulunmuştur.

Immunoblot Analizi

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-196a transfeksiyonu sonrasında otofajinin kilit mediyatörleri olan Beklin-1, Atg5 ve Atg12 protein ekspresyonlarındaki değişiklikler immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir.

Prensip: Sodyum Dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile moleküler ağırlığına göre ayrılan proteinlerin membrana aktarılması ve takibinde proteinlerin önce spesifik primer antikoru ile sonra da primer antikora uygun sekonder antikoru ile bağlanmaları sonrasında oluşan protein bantlarının görüntülenmesi esasına dayanır. Örneklerin eşit miktarda protein içerdiğini göstermek için ise, β -Aktin protein ekspresyonları tespit edildi.

Kullanılan Kit ve Solusyonlar

- ✓ 150 mM Tris-HCL (pH 6.8), 300 mM DTT, % 6 SDS, % 30 Gliserol, % 0.3 bromfenol mavisi içeren 3X SDS-PAGE yükleme tamponu (Biovision-Milpitas, CA, USA),
- ✓ 5X'lik stok elektroforez tamponu; 15 g Tris, 72 g Glisin ve 5 g SDS 1 L distile suda çözülerek 5X'lik stok solusyon ve bundan 1X 'lik kullanım solusyonu,
- ✓ 10X'lik blotlama tamponu (Blotting Buffer); 30.3 g Tris, 144 g Glisin ve 10 g EDTA 1 L distile suda çözülerek 10X'lik stok solüsyon ve bundan %20'lik metanol (Merck-Darmstadt, Germany) varlığında (tranfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunması için) 1X'lik kullanım solüsyonu,
- ✓ 10X'lik stok Tris Buffered Saline (TBS) solusyonu; 31.5 g Tris-HCL ve 80 g NaCl 1 L distile suda çözülerek 10X stok solüsyon ve bundan %0,1 oranında Tween-20 eklenerek 1X TBS-T kullanım solüsyonu,
- ✓ 20ml TBS-T içerisinde 1g yağsız süt tozu kullanılarak %5 blotlama solüsyonu,
- ✓ Primer ve sekonder antikorlar Cell Signaling (Danvers, MA, USA) firmasından temin edildi. Tavşan kökenli primer antikorlara uygun olan anti-rabbit sekonder antikor, alkalin fosfat (AP) ile konjuge haldedir.

İşlem

- ✓ 40 µg protein içeren örnek kuyucuklarına 4-15% Tris-HCL Precast Polyacrylamide hazır jel (BioRad- Hercules, CA, USA) kullanılarak SDS-PAGE elektroforezi uygulanmıştır. Jel plakalarının elektroforez tankına yerleştirilmesi sonrası, stok (5X) elektroforez tamponundan hazırlanan 1X'lik tampon kullanılarak önce iç hazne kuyucuklar tamamen örtülecek şekilde doldurulmuş, daha sonra da dış hazne aynı tamponla doldurulmuştur.
- ✓ Her bir kuyucuğa yerleştirilen ve 3X yükleme tamponu ile seyreltilerek 40 µg protein içermesi sağlanan örnekler, termoblok içerisinde inkübasyona (95°C'de 5 dakika) tabi tutulmuştur. Jelin ilk kuyucuğuna protein markerı olarak Kaleidoscope Prestained standartı (BioRad- Hercules, CA, USA), diğer kuyucuklara da örnekler yüklenmiştir. Elektroforez uygulaması kapsamında, 1X elektroforez tamponu varlığında örneklerin ayrıştırma jeline kadar aynı

anda toplanabilmesi için önce 80 V'luk bir akım ve sonrasında tam ayırışma için 120 V'luk bir akım uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

- ✓ Elektroforez sonunda plaka kalıpları arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde PVDF (Poliviniliden florür) membranı (metanol içerisinde 2-3 dakika rehidratasyon ve 2-3 dakika distile suyla yıkanarak hazırlanmış) ile sandviçlenmiştir.
- ✓ Sandviç aparatı, katottan anota doğru sünger, Whatmann kağıdı, jel, PVDF membran, Whatmann kağıdı ve sünger, üst üste yerleştirilerek sıkı bir şekilde kapatılmıştır. Daha sonra aparat, karşılığı aynı elektriksel kutuplar olacak şekilde transfer tankına yerleştirilmiş ve 1X transfer tamponu içerisinde 4°C ve 80 V'da 4.5 saat süre ile transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Transfer sonunda sandviç aparatından alınan membran, ilk olarak non-spesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla % 5'lik blotlama solusyonu ile oda ısısında 1 saat, daha sonra Beklin-1 Atg5 ve Atg12 spesifik primer antikoları ile 4°C'de gece boyunca ve son olarak ise sekonder antikor ile oda ısısında 1 saat süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur.
- ✓ Primer ve sekonder antikorlar ile işaretli örneklerdeki Beklin-1, Atg5 ve Atg12 protein ekspresyon bantlarının, sekonder antikor ile işaretli Alkalen Fosfatazın BCIP/NBT reaktifi (Sigma, St. Louis, USA) ile verdiği reaksiyon sonucu, kolorimetrik olarak Kodak Image Station 2000MM (USA) cihazında görünür hale getirilmiş ve bu bantların yoğunluğu Image J- Versiyon 1.36 (National Institute of Health Maryland, USA) dansitometre programı ile kuantifiye edilmiştir.

5.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS 20.0 paket programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar için non parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen farklılıklar, * simgesi ile gösterildi.

4. BULGULAR

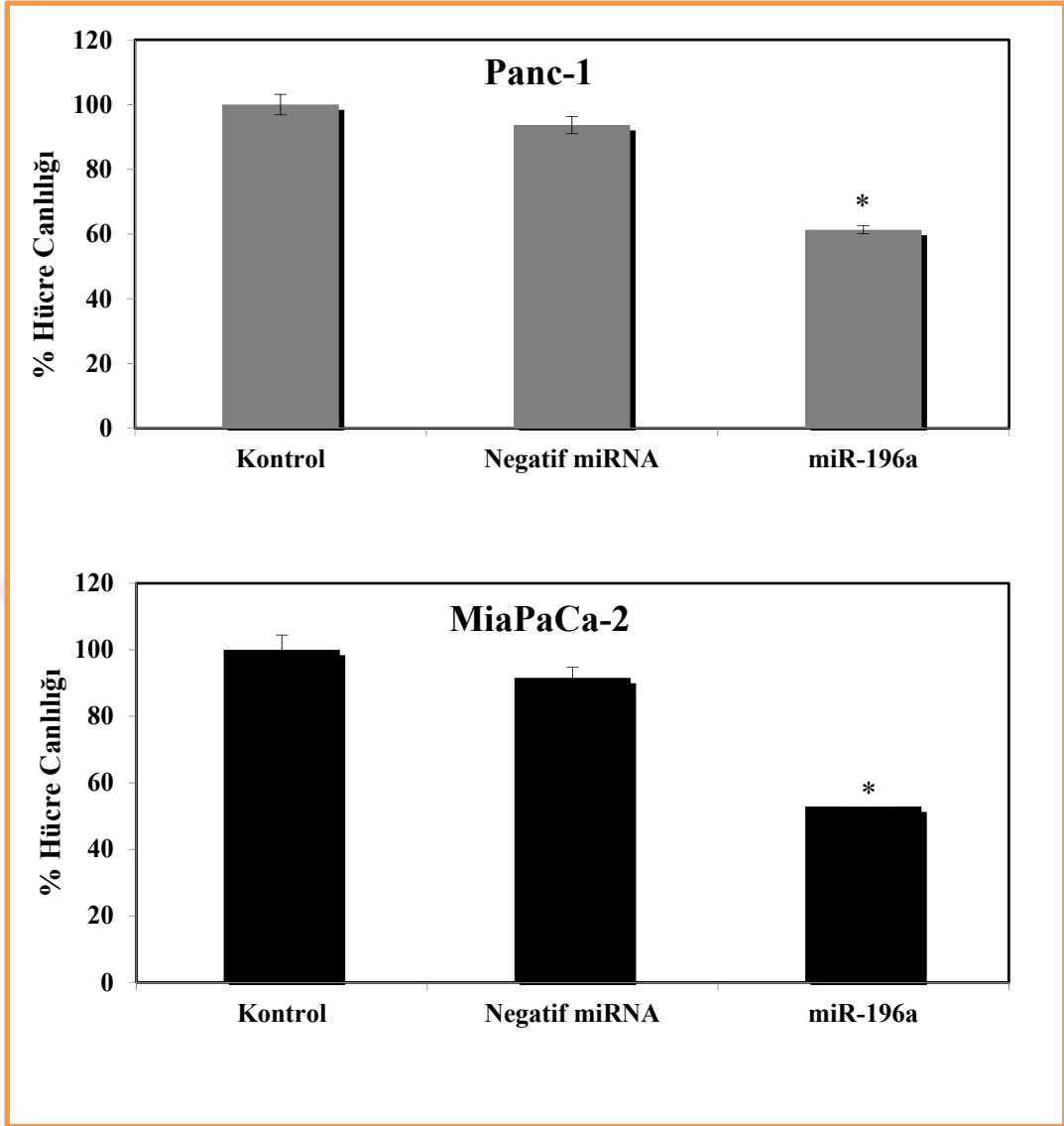
4.1. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

Herhangi bir maddenin uygulama dozu ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelerde neden olduğu zarar, sitotoksiste olarak belirtilmektedir. Bu zarar, genel olarak hücrelerin çoğalma özelliklerini ya da apoptoz, otofaji ve nekroz olayları sonucu canlılıklarını kaybetmesi şeklinde görülür. Sitotoksiste testleri, bir maddenin etkileri hakkında temel bilgiler vermesi ve sonrasında yapılacak hayvan veya klinik denemeler için kaynak oluşturması yönleriyle son derece değerli veriler sunar. Bu testler arasında genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler sayılmakta ve tümünde canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesi temel prensip olarak belirtilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan miR-196a'nın, sitotoksiste etkisini belirleme ya da diğer deyimle hücre canlılığı üzerine etkisini ortaya koymak amacıyla yukarıda sayılanlardan kolorimetrik MTS yöntemi kullanılmıştır. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin 50 nM miR-196a ile 72 saat süreli muamelesi şeklinde gerçekleştirilen MTS deney verileri; herhangi bir muameleye maruz kalmamış hücrelerde elde edilen verilere kıyaslanarak % olarak değerlendirilmiştir.

Panc-1 hücrelerinin negatif miRNA ile transfeksiyonu sonrasında hücre canlılığı için % 93.67 kontrol değeri bulunurken, diğer MiaPaCa-2 hücreleri için söz konusu değer % 91.54 kontrol olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Her iki hücre grubu için elde edilen değerler kontrole göre önemli bir farklılık göstermemiştir.

Panc-1 hücreleri için miR-196a uygulamasının, hücre canlılığını yaklaşık % 38.67 düzeyinde baskıladığı ve canlılığını sürdüren % 61.33 ± 0.56 'lık kısım itibariyle istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bir farklılığın ortaya çıkmasına neden olduğu belirlenmiştir. Benzer farklılık MiaPaCa-2 hücreleri için elde edilen % 52.88 ± 2.04 'lük değer için de söz konusudur.

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin miR-196a'ya dirençleri bakımından aralarında % 9.5 gibi hiç de azımsanmayacak düzeyde bir farklılık vardır. Keza, miR-196a'nın MiaPaCa-2 hücrelerinin yaklaşık yarısının canlılığına son vermesi; söz



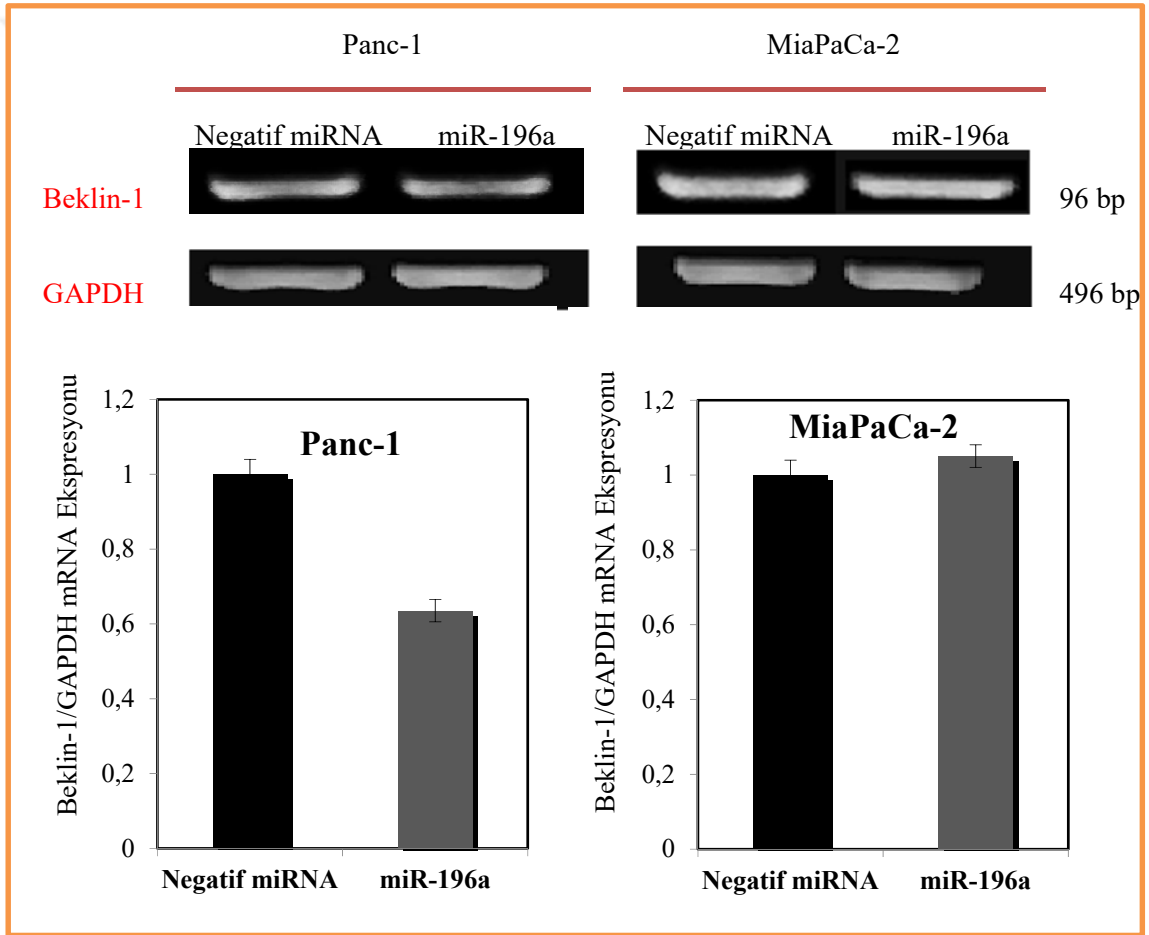
Şekil 4.1. miR-196a'nın hücre canlılığı** üzerine etkisi.

** % Hücre Canlılığı, [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum'un (MTS), fenazin metosülfat (PMS) varlığında oluşan formazanın 490 nm absorban değerinde ölçülmesi ve bununla canlı hücre oranı ilişkilendirilerek kontrolün %'si olarak hesaplanması prensibine dayalı olarak belirlenmiştir (*, p<0.05).

konusu hücre grubunun Panc-1'e göre daha duyarlı ya da diğer deyimle Panc-1 hücrelerinin daha agresif olduğunun bir göstergesi sayılmıştır. Bu çalışmada kullanılan miR-196a inhibitör konsantrasyonu güvenli bulunmuş hücrelerde sitotoksosite oluşturmayacağı belirlenmiştir.

4.2. miR196a-nın PDAC Hücrelerinde Beklin-1 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi.

miRNA'ların, hedef mRNA'nın 3' UTR (untranslated region) bölgesine bağlanarak (baz eşleşmesi) yıkımına ya da translasyona uğramasını engelleyerek gen ekspresyonunu azaltması için, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri hem kontrol amacıyla negatif miRNA ile hem de miR-196a ile transfekte edilmişlerdir. Bu kapsamda; Beklin-1 mRNA ekspresyon bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanmasıyla elde edilen veriler kullanılarak, yarı-kantitatif olarak Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Beklin-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi. RT-PCR ile elde edilen Beklin-1 ve GAPDH gen ekspresyon bantlarının, Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı tarama verilerinin oranları, kontrol hücrelerin oranı olarak alınmış ve 1 olarak kabul edilmiştir. Diğer grupların verileri kontrol grubunun %'sine dönüştürülerek değerlendirilmiştir.

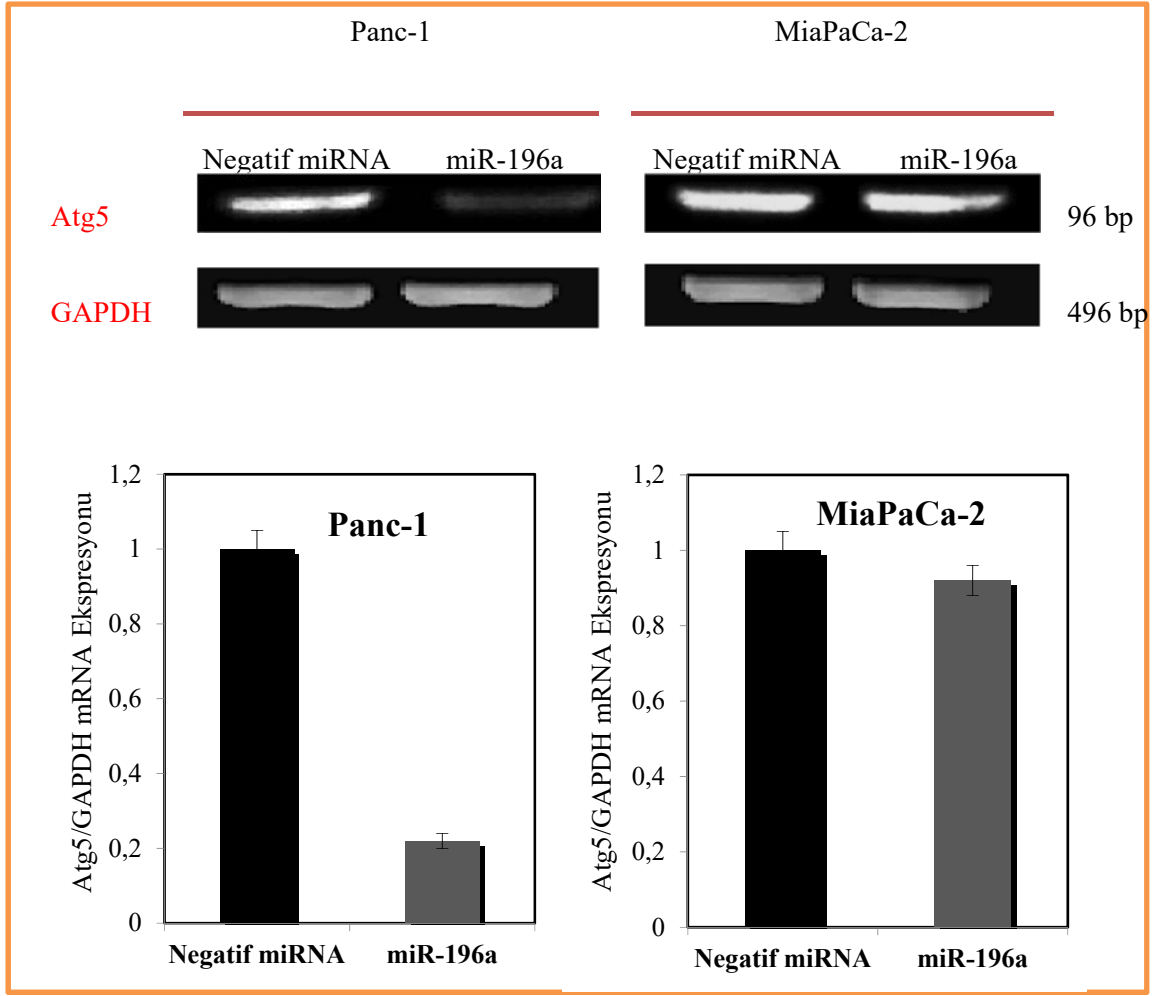
Tüm bantlarda eşit miktarda RNA miktarının bulunduğunu kanıtlamak amacıyla belirlenen GAPDH mRNA ekspresyon düzeyleri, Şekil 4.2’de de görüldüğü ve beklendiği gibi Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücre grupları için önemli farklılıklar göstermemiştir.

Panc-1 hücrelerinde, Beklin-1 mRNA ekspresyon bant yoğunluğu miR-196a uygulamasıyla azalmıştır. Nitekim, miR-196a için elde edilen bant kalınlığı, negatif miRNA için elde edilen banta göre daha incedir. MiaPaCa-2 hücreleri için ise bant yoğunlukları yaklaşık aynı bulunmuştur. Dolayısıyla, Beklin-1 RT-PCR sonuçlarına göre; Panc-1 hücrelerinde Beklin-1 mRNA ekspresyonu, miR196a ile transfeksiyon sonrasında negatif miRNA transfeksiyon sonrasına göre azalmıştır (Şekil 4.2). Panc-1 hücrelerinde Beklin-1 gen ekspresyon seviyesi % 63 olarak belirlenmiştir. Asıl olarak söz konusu ekspresyon seviyesi MiaPaCa-2 hücresi için belirlenen ekspresyon seviyesiyle karşılaştırıldığında önemli bir farklılığa işaret eder görünmektedir. MiaPaCa-2 hücrelerinde ise Beklin-1 mRNA ekspresyonu, miR196a ile transfeksiyon sonrasında negatif miRNA transfeksiyon sonrasına göre değişmeden kalmıştır. Nitekim MiaPaCa-2 hücrelerinde ekspresyon seviyesi % 105’e yakındır. Aynı zamanda Beklin-1 ve GAPDH ekspresyon seviyeleri yakınlığına işaret eden bu durum MiaPaCa-2 hücreleri için miR196a transfeksiyonunun küçük bir değişime neden olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular; Panc-1 hücrelerinin miR196a ile tranfekte edildiğinde Beklin-1 gen ekspresyonunun sınırlandığını göstermektedir.

4.3. miR-196a-nın PDAC Hücrelerinde Atg5 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Atg5 mRNA ekspresyon bantlarının yoğunluğunun GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanmasıyla elde edilen verilere ilişkin miRNA ekspresyon bantlarının yarı-kantitatif olarak ifadeleri Şekil 4.3.’de gösterilmiştir. GAPDH miRNA ekspresyon düzeyleri, Şekil 4.3. de de görüldüğü üzere Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücre gruplarında negatif miRNA ve miR-196a için farklılık göstermemiştir.

Atg5 mRNA ekspresyon bant yoğunluğu, Panc-1 hücrelerinde miR-196a uygulamasıyla büyük ölçüde azalmıştır. miR-196a, negatif miRNA’ya kıyasla Atg5



Şekil 4.3. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Atg5 gen ekspresyonu üzerine etkisi. RT-PCR ile elde edilen Atg5 ve GAPDH gen ekspresyon bantlarının, Image J (NIH, Maryland, USA) dantsitometre programı tarama verilerinin oranları, kontrol hücrelerin oranı olarak alınmış ve 1 olarak kabul edilmiştir. Diğer grupların verileri kontrol grubunun %'sine dönüştürülerek değerlendirilmiştir.

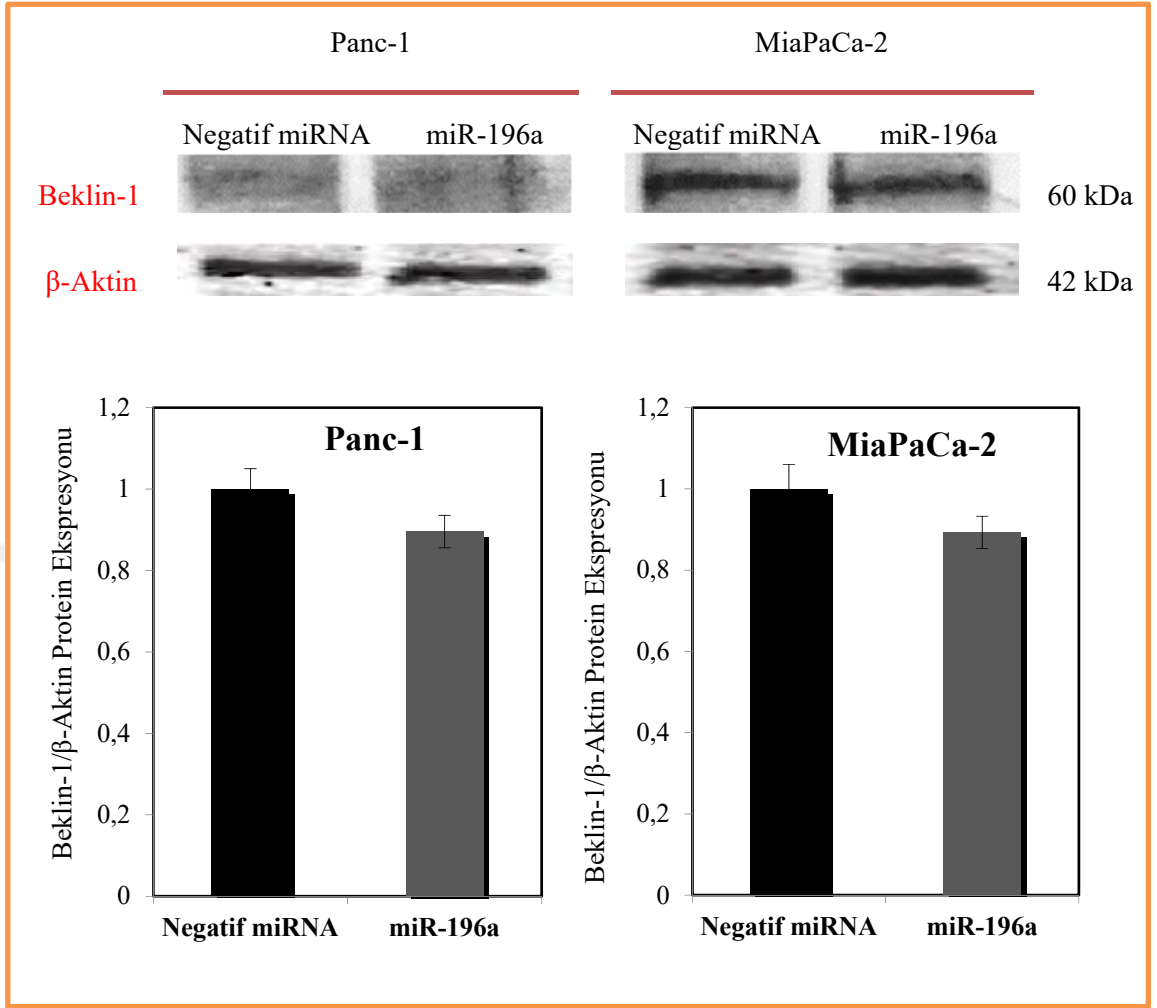
gen ekspresyonunu neredeyse tamamen silmiştir. MiaPaCa-2 hücreleri için de benzer bir durum söz konusu olmakla birlikte Atg5 mRNA ekspresyonu miR196a muamelesine cevaben azalmıştır. Atg5 RT-PCR sonuçları, Panc-1 hücrelerinde Atg5 mRNA ekspresyonunun, miR196a ile transfeksiyonu sonrasında negatif miRNA ile transfeksiyonu sonrasında göre büyük ölçüde azaldığını göstermektedir (Şekil 4.3). Panc-1 hücrelerinde ekspresyon seviyesi yaklaşık % 22 olarak belirlenmiştir. Atg5 mRNA ekspresyonu, MiaPaCa-2 hücrelerinde de miR196a ile transfeksiyon sonrasında negatif miRNA transfeksiyon sonrasında göre azalmış ve % 92 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, Panc-1 hücrelerinin miR196a ile transfeksiyonu, Atg5

gen ekspresyonunu çok büyük bir oranda inhibe olmasına neden olurken, MiaPaCa-2 hücrelerinde ise Panc-1'daki kadar etkili olmasa da inhibe edici etkisini ortaya koymuştur.

4.4. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinde Beklin-1 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde yapılan RT-PCR deneyleri ile miR-196a'nın, otofaji yolağındaki ana mediyatörlerden olan Beklin-1'in gen ekspresyonu üzerinde regülatör bir etkisinin olup olmadığı belirlenmesine ek olarak protein ekspresyonunu üzerindeki etkisi de western blot analizi ile incelenmiştir. Beklin-1 Western Blot bant yoğunluklarının, her örnek kuyucuğunda eşit düzeyde protein varlığını doğrulamak için kullanılan β -Aktin bant yoğunluğuna oranlanması ve bu değerin 1 kabul edilerek diğer bantların da sözkonusu değere göre bulunması sonrası elde edilen verilere ilişkin grafik Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.

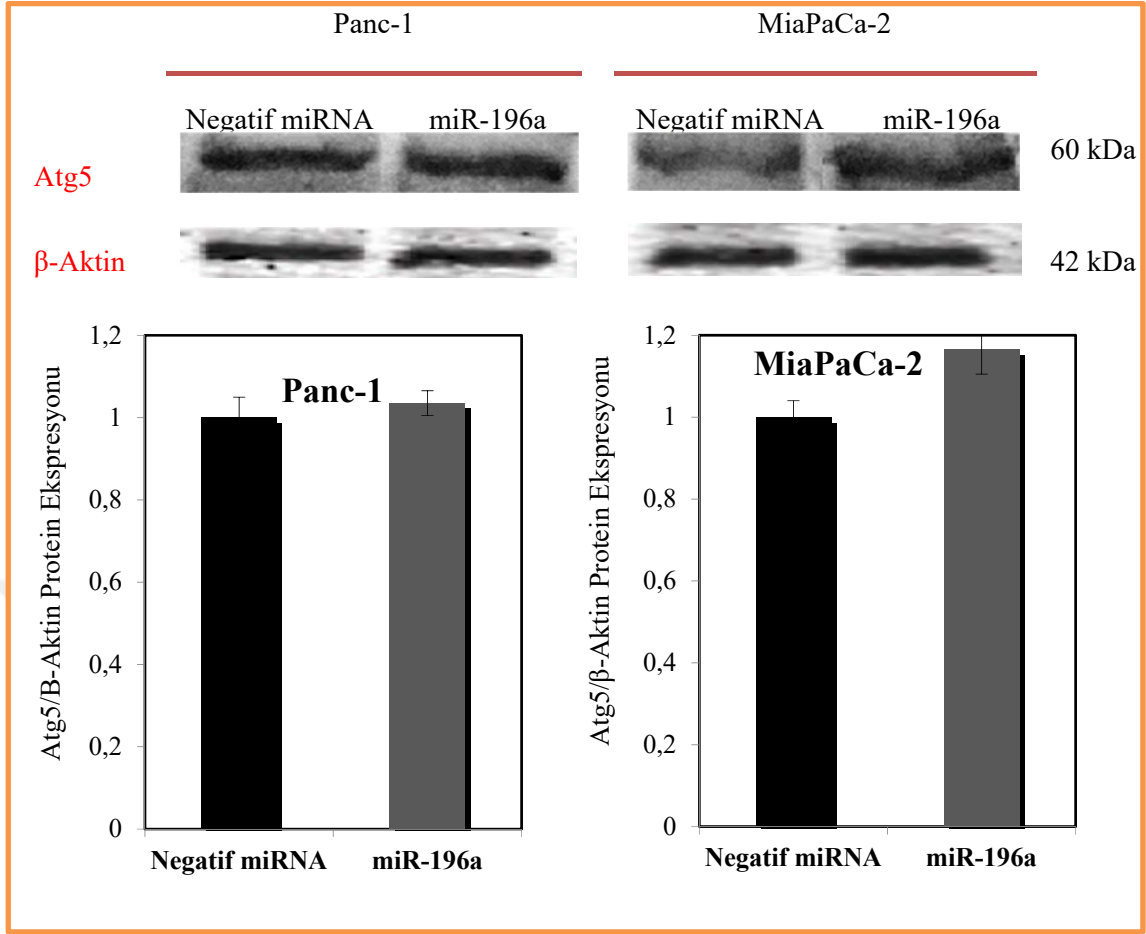
miR-196a transfeksiyonu sonucunda Beklin-1 protein ekspresyonunun, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde azaldığı belirlenmiştir. Söz konusu hücrelerde belirlenen ekspresyon azalışlarının birbirine son derece yakın % 11 düzeyinde olduğu bulunmuştur. Panc-1 hücrelerinde elde edilen ekspresyon seviyesi MiaPaCa-2 hücreleri için elde edilen seviyeden sadece yaklaşık % 0.3 daha büyüktür.



Şekil 4.4. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Beklin-1 protein ekspresyonu üzerine etkisi. Western Blot ile elde edilen Beklin-1 ve β-Aktin protein ekspresyon bantlarının, Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı tarama verilerinin oranları, kontrol hücrelerin oranı olarak alınmış ve 1 olarak kabul edilmiştir. Diğer grupların verileri kontrol grubunun %'sine dönüştürülerek değerlendirilmiştir.

4.5. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinde Atg5 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Negatif miRNA ve miR196a aracılı Atg5 Western Blot bant yoğunlukları ve β-Aktin bant yoğunluklarına ilişkin görüntüler Şekil 4.5'de gösterilmiştir. miR-196a transfeksiyonu sonucunda Atg5 proteini ekspresyonunun, Panc-1 hücreleri için yapılan değerlendirmede küçük bir artış, MiaPaCa-2 hücreleri için daha belirgin bir artış gösterdiği bulunmuştur. Bu bağlamda, Panc-1 hücrelerinde miR-196a transfeksiyonu

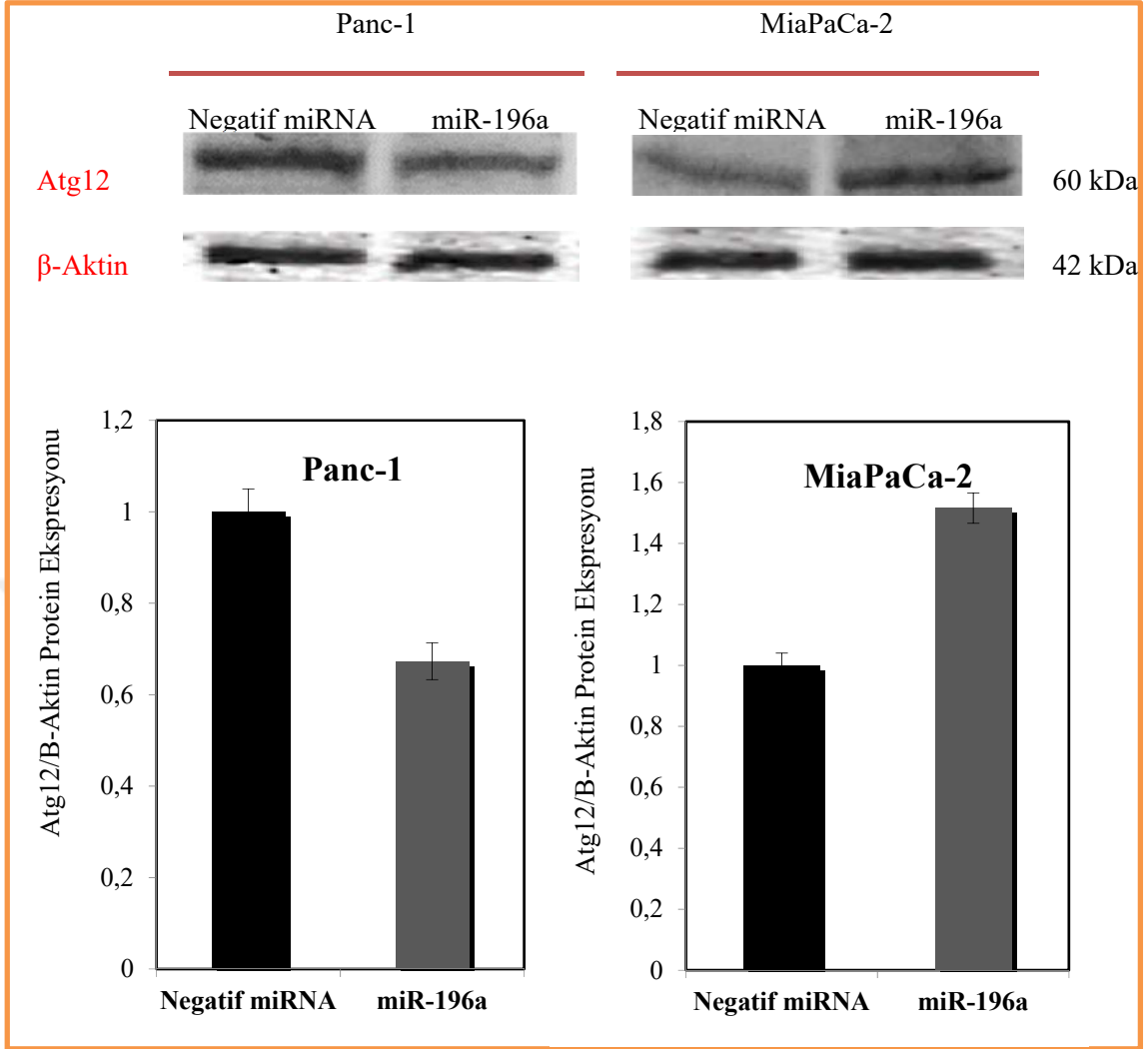


Şekil 4.5. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Atg5 protein ekspresyonu üzerine etkisi. Western Blot ile elde edilen Atg5 ve β-Aktin protein ekspresyon bantlarının, Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı tarama verilerinin oranları, kontrol hücrelerin oranı olarak alınmış ve 1 olarak kabul edilmiştir. Diğer grupların verileri kontrol grubunun %'sine dönüştürülerek değerlendirilmiştir.

sonrasında bulunan Atg5 ekspresyon seviyesi % 103 iken MiaPaCa-2 hücrelerinde % 117 olarak belirlenmiştir.

4.6. miR-196a'nın PDAC Hücrelerinde Atg12 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Atg12 Western Blot bant yoğunlukları ve β-Aktin bant yoğunluklarına ilişkin görüntüler Şekil 4.5'de gösterilmiştir. miR-196a transfeksiyonu sonucunda Atg12



Şekil 4.6. miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Atg12 protein ekspresyonu üzerine etkisi. Western Blot ile elde edilen Atg12 ve β-Aktin protein ekspresyon bantlarının, Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı tarama verilerinin oranları, kontrol hücrelerin oranı olarak alınmış ve 1 olarak kabul edilmiştir. Diğer grupların verileri kontrol grubunun %'sine dönüştürülerek değerlendirilmiştir.

proteini ekspresyonunun, Panc-1 hücreleri ve MiaPaCa-2 hücreleri için önemli bir farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim Panc-1 hücrelerinde Atg12 proteini ekspresyonu azalarak % 67 düzeyinde bulunurken, MiaPaCa-2 hücrelerinde yaklaşık %50'lik bir artış göstermiştir.

5. TARTIŞMA

İnsan hücrelerinde mevcut miR-196 genlerinden (miR-196a-1, miR-196a-2 ve miR-196b) yüksek benzerlik gösteren ikisinin (miR-196a ve miR-196b) farklı kanser türlerinde değişken rollere sahip olduğuna işaret edilmiş ve miR-196a'nın baş boyun, oral, gastrik, pankreas, servikal ve akciğer kanserlerinde fazla sentezlenirken benzer şekilde miR-196b'nin de oral, gastrik, kolorektal kanserlerde, ayrıca glioblastoma ve lösemi kanserlerinde arttığı belirtilmiştir. Kanserojen etkinin aksine miR-196 ailesinin tümör baskılayıcı olarak rol oynadığına değinilmiş ve bu kapsamda; miR-196a'nın melanoma ve meme kanserlerinde metastazı baskımlarken, miR-196b'nin ise farklı lösemi hücre tiplerinde ekspresyonlarının azaldığına işaret edilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında ayrıca; miR-196'nın ağız, yemek borusu, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsaktan oluşan sindirim sistemi kanseri dokularında fazla ifade edildiği ve hem miR-196a hem de miR-196b'nin ağız kanseri dokularında belirgin olarak yükseldiği, gastrik kanserde ileri patolojik evre, kanser nüksü ve hayatta kalma süresinin kısalığı ile ilişkili oldukları ve miR-196a'nın larinks kanserinde yukarı düzenlendiği gibi değerlendirmelere yer vermişlerdir (57).

Bu çalışmada, miR-196a uygulamasının Panc-1 hücreleri için, hücre canlılığını yaklaşık % 38.67 düzeyinde MiaPaCa-2 hücreleri için ise % 47.12 düzeyinde baskıladığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) bulunduğu göz önüne alındığında otofaji ve kanser ilişkisinin aydınlatılmasına katkı sağlayabileceği beklentisi güçlenmiştir.

HMGA biyolojik olaylarda son derece önemli hücre yapı taşlarıdır. HMGA1 ve HMGA2 olmak üzere iki türlü HMGA proteini bulunmaktadır. HMGA proteinlerinin ekspresyonu, normal dokuların çoğunda genellikle düşüktür, bu nedenle, aşırı ekspresyonu kanserde metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilidir. HMGA1'in belirgin olarak miR-196 ekspresyonunu durumunda, tümör progresyonunu uyaracağı, oysa miR-196'nın HMGA2 protein sentezini önemli düzeyde inhibe etmesi durumunda ise tümör ilerlemesini inhibe edebileceği belirtilmiştir. miR-196 esas olarak tümör baskılayıcı mRNA'ları hedef alırsa, onkojenik etki gösterecektir. Keza, pankreatik adenokarsinoma hastalarında miRNA-196a seviyelerinin sağkalımla ters yönlü bir korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. Bu bağlamda, meme ve pankreas

kanserlerinde miR196 ekspresyonunun arttığı ve farklı lösemi vakalarında miR-196a-1 seviyesinin HOX geni ifadesiyle açık bir korelasyon sergilediğine işaret edilmektedir. Yine, miR-196b'nin aşırı ekspresyonunun gerçekleştiği, miyeloid gelişiminde değişiklikler yarattığı ve miR-21'in ortak ifadesiyle granülopoileri tamamen bloke ettiği bildirilmektedir. Oesofageal, meme ve endometrial kökenli ve özofagus adenokarsinoması bulunan kanser hücre dizilerinde miR-196a düzeylerindeki artışın ise, Annexin A1 mRNA seviyeleri ile ters bir korelasyon sergilediğine değinilmektedir (37).

Çoğu kanser vakasında, miRNA'ların ekspresyonlarının artmasından ziyade daha çok azaldığı ancak pankreatik kanserde bu eğilimin farklılaştığına değinen Laurilla ve ark. (2012), toplamda 16 pankreas hücresinden 10'unda (Hs 700T, HupT4, AsPC-1, HPAF-II, CFPAC-1, Capan-2, HPAC, SW 1990, Panc-1, Hs 766T) miR-31'in ekspresyonunun arttığını ve kalan 6 hücre hattı (BxPc-3, DanG, Hup T3, SU.86.86, MiaPaCa-2, Capan-1) ile normal pankreas hücrelerinde ise çok düşük düzeyde bir ekspresyonun olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, pankreatik kanserlerde mezotelyomada olduğu gibi 9p21.3 lokusunda bir homozigot silinmenin gerçekleştiği ancak 9p kaybı ve miR-31 ekspresyon seviyesi arasında direkt bir korelasyonun bulunmadığı bildirmişlerdir. miR-31'in fonksiyonunun ortaya çıkarılması amacıyla; yüksek (AsPC-1 ve HPAF-II) veya çok düşük (MiaPaCa-2) endojen seviyelerinde pankreatik kanser hücrelerinde hem aşırı hem de düşük ekspresyon düzeyi koşulları dikkate alınmıştır. Artan miR-31 ekspresyonunun, düşük endojen seviyeli MiaPaCa-2 hücrelerinde göçü % 50'den fazla azalttığını belirtmişler, yüksek endojen seviyeli AsPC-1 hücrelerinde ise miR-31 ekspresyonunun hem engellenmesi hem de artmasının benzer şekilde göç ve invazyonu azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, inhibisyon ve zorla ekspresyonun, hücre çoğalmasının bozulmasına, göçe ve invazyona yol açtığını belirtmişlerdir (58).

Pankreatik nöroendokrin tümörlerinin teşhisinde kullanılacak miRNA'ları tanımlamak amacıyla yapılan bir çalışmada, hem pankreatik tümör gelişiminde hem de karaciğer metastazında miRNA-27b, miRNA-122, miRNA-142-5p, miRNA-196a, miRNA-223, miRNA-590-5p, miRNA-630 ve miRNA-944 ekspresyonlarının 2 kat ve daha fazla arttığı belirtilmiştir (59). Bunlar arasında sadece miRNA-196a'nın yüksek ekspresyon düzeyi, pankreas kanserinin patolojik evresi ile anlamlı düzeyde ilişkilidir.

Pankreatik kanser ile miR-196a ilişkisinin hala net olmadığına işaret eden Passadouro ve Faneca (2016), NF- κ B transkripsiyon faktörünün bir inhibitörü olan hücre çekirdek faktör κ B-inhibitörü α 'nın (NFKBIA) miR-196a'nın bir hedefi olduğuna değinmişlerdir. Daha yüksek miktarda miR-196a eksprese eden pankreatik kanser hücrelerinin azaltılmış apoptoz, artmış invazyon ve tümör büyümesiyle ilişkili ING5 (büyüme proteini 5 inhibitörü) ekspresyonunda azalmaya işaret ettiği belirtmişlerdir (4).

miR-196a'nın ING5'i düzenleyerek pankreas kanserinde apoptoz ve invazyonu etkileyebileceği, p21 proteinleri ile etkileşerek apoptozu ve hücre döngüsünü durdurabileceği ve büyüme inhibitörü p53'le bağlantılı bir tümör baskılayıcı gen ya da onkogen olarak işlev görebileceği öngörülerini kapsamında yürütülen bir çalışmada; hücrelerin miR-196a öncüsü ile transfeksiyonunu izleyen 48 saatlik sürede Panc-1 hücrelerinin çoğalmasında artışa karşılık, miR-196a inhibitörü ile transfeksiyonunun ise çoğalmayı önemli düzeyde azalttığı saptanmıştır. Dolayısıyla, miR-196a'nın Panc-1 pankreatik kanser hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı açıkça anlaşılmaktadır. Pankreas kanserinde miR-196a ile prognoz arasındaki ilişkiyi daha net bir şekilde ortaya koyabilmek adına yapılan Transwell invazyon testi sonrasında, miR-196a'nın ekspresyonundaki azalışın Panc-1 hücrelerinin invazyonunu engellediği gösterilmiştir. Fareler üzerinde yapılan çalışma kapsamında; in vivo deneylerin, miR-196a inhibitör ile transfekte edilmiş Panc-1 hücrelerinin daha küçük tümörler geliştirirken, miR-196a inhibitör ile transfekte hücrelerin daha büyük tümörler geliştirdiğini gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, miR-196a'nın pankreas kanseri hücrelerinde ING5 ekspresyonunu düzenlediğinin ve böylece tümörün büyümesini inhibe ettiğinin gösterilmesi, pankreas kanserinin prognozunun iyileştirilmesi için katkı sağlayacaktır (60).

Otofajinin kanserle olan karmaşık ilişkisinin gizemi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Tümör oluşturan hücreler kök, progenitor veya farklılaşmış hücrelerden kaynaklanabilir. Otofaji, kanser kök hücrelerinin tümör oluşturma potansiyelleri, farklılaşmaları, kendi kendini besleme ve ilaç direnci gelişiminde önemli rollere sahiptir. Hepatosellüler karsinoma Huh-7 hücrelerinde, hipoksi ve besin açlığının neden olduğu daha yüksek otofaji seviyelerinin, CD133+ karaciğer kanser kök hücrelerinde ciddi artışlara yol açtığı belirtilmektedir. Yine, protein kinaz C-delta

uygulanan pankreatik kanser kök hücrelerinde mikrotübül ile ilişkili LC3-I proteininin LC3-II'ye dönüşümü yanında ATG7 ve Beklin-1'in artmış ekspresyonlarının gözlemlendiğine değinilmiştir. Otofaji modülatörünün (DRAM1) otofagozomda p52 lokalizasyonunu ve otofajinin neden olduğu bozulmayı azaltabileceği belirtilmiş ve dolayısıyla p52 aracılı otofajide DRAM1'in önemli rolüne işaret edilmiştir. DRAM1 ekspresyonunun glioblastoma kök hücrelerindeki mezenkimal bir belirteç olan c-MET ve mitojenle aktive edilen protein kinazların aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. CD133+ glioma kök hücrelerinin ışınlanmasının hızla otofajiye yol açacağı ve sonrasında bunun da hücrelerin canlılığını azaltacağı bildirilmiştir. Tümör oluşturuca otofajik yollar; (1) kanser kök hücresi evresi, (2) kanser başlama ve ilerleme evreleri, (3) invazyon ve metastaz evreleri, ve (4) kanser dormansi evresi yolları olarak sıralanmaktadır (35).

Söz konusu tez çalışmamızda, kanserin başlaması ve ilerlemesi aşamalarında kilit öneme sahip bir otofajik mediyatör olan Beklin-1'in ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır. Keza hücre ölümü ya da sağ kalımı düzenleyici ve otofajiyi uyaran bir gen olarak tanımlanan Beklin-1'in ekspresyonunun, kanseri de içeren bazı hastalıklarda değiştiği gözlenmiştir.

miRNA'ların, hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanması sonucu mRNA'nın yıkımını sağlayarak translasyonu inhibe etmesi temeliyle çalışmamızda, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin negatif miRNA ve miR-196a inhibitör ile transfekte edilmeleri sonrası Beklin-1, Atg5 ve Atg12 ekspresyon düzeyleri oldukça önemli farklılıklar göstermiştir.

Panc-1 hücrelerinde, Beklin-1 mRNA ekspresyonunun azalmasıyla uyumlu olarak % 63 seviyesinde bulunan ekspresyon, bu kez MiaPaCa-2 hücreleri için bant yoğunluklarında çok sınırlı bir değişimle uyumlu olarak % 105 seviyesinde bulunmuştur. Dolayısıyla, Beklin-1 gen ekspresyonunda gözlediğimiz bu önemli azalış, otofajinin diğer önemli bir mediyatörü olan Atg5'de çok daha belirgindir. Nitekim Atg5 mRNA ekspresyonu, Panc-1 hücrelerinde miR-196a inhibitör uygulamasına bağlı olarak % 22 oranında, MiaPaCa-2 hücrelerinde ise değişim çok daha küçük düzeyde gerçekleşmiştir. Bu bağlamda yürütülen bir başka çalışmada; miR-30a'nın potansiyel bir hedefi olan Beklin-1'in ekspresyonunu negatif yönde

düzenleyebileceği ve bunun otofajik aktivitenin artmasına yol açabileceği belirtilmiştir. miR-30a taklidi ve inhibitör kullanılarak, miR-30a'nın Beklin-1 ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi sonucunda; T98G (glioma hücre hattı), MDA-MB-468 (meme kanseri hücre hattı) ve H1299 (akciğerkanserli hücre hattı) hücrelerinin miR-30a taklit ile transfeksiyonun Beklin-1 mRNA ekspresyonunda % 25-40 oranında ve Beklin-1 protein ekspresyonunda ise % 25-60 oranında azalmaya, inhibitör ile transfeksiyonunun ise Beklin-1 mRNA ekspresyonunda % 55-85 oranında ve Beklin 1 protein ekspresyonunda ise % 10-25 oranında artışa neden olduğu bildirilmiştir (61).

miR-196a inhibitör transfeksiyonunu takiben Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde Beklin-1 protein ekspresyonlarında gözlediğimiz azalışlarının % 11 düzeyinde ve birbirine son derece yakın bulunması, hücre farklılığının ekspresyon seviyesinde bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. miR-196a inhibitör transfeksiyonu sonucunda Atg5 proteini ekspresyonunun, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin her ikisi için de artmasına karşın, artış seviyeleri düşük ve farklılıkları ise % 14 olarak belirlenmiştir. miR-196a inhibitör transfeksiyonunun Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri için belirlenen en büyük farklılıkları Atg12 proteini ekspresyonunda gözlenmiştir. Keza, Atg12 proteini ekspresyonu Panc-1 hücrelerinde azalarak % 67 düzeyine inerken, MiaPaCa-2 hücrelerinde yaklaşık %50'lik bir artış sergilemiştir.

miR-196a inhibitör uygulaması sonucu; Panc-1 hücreleri için elde edilen Beklin-1 mRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonu değerleri negatif miRNA'ya kıyasla %63 ve %89 olarak belirlenirken MiaPaCa-2 hücrelerinde söz konusu değerler %105 ve %89 olarak bulunmuştur. Yani miR-196a inhibitör muamelesinin, sadece Panc-1 hücreleri için ve gen düzeyinde etkili olduğunu göstermiş bulunmaktayız.

Bulgularımıza göre miR-196a inhibitör uygulaması negatif miRNA'ya kıyasla, Panc-1 hücreleri için Atg5 mRNA ekspresyonunda büyük bir azalışa (%78), protein ekspresyonunda ise son derece küçük bir artışa (% 0.03) neden olmuştur. MiaPaCa-2 hücrelerinde ise Atg5 mRNA ekspresyonunda küçük bir azalış (%8) protein ekspresyonunda ise (%17'lik) bir artışa yol açmıştır. Dolayısıyla, miR-196a inhibitör

muamelesinin, yine Panc-1 hücreleri için gen düzeyinde farklılığa neden olduğuna işaret etmektedir.



6. SONUÇLAR

1. Kullanılan miR-196a inhibitör dozu, PDAC hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmadan öldürücü etki yaratmıştır. Bu da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
2. 50 nM miR-196a inhibitör ile 72 saat süreli uygulama şeklinde gerçekleştirilen MTS deney verileri itibarıyla, Panc-1 hücreleri canlılığı için 61.33 ± 0.56 ve diğer MiaPaCa-2 hücreleri için 52.88 ± 2.04 değerleri elde edilmiştir. Bu değerler negatif miRNA grubunda elde edilen MTS verileri ile kıyaslandığında miR-196a inhibitörünün pankreas kanseri hücrelerinin üzerinde yaptığı öldürücü etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır.
3. miR-196a inhibitör uygulaması, Panc-1 hücrelerinde, Beklin-1 ve Atg5 gen ekspresyonunu sınırlandırmıştır. Beklin-1 ekspresyonu % 63 ve Atg5 ekspresyonu % 22 düzeyinde gerçekleşmiştir.
4. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-196a inhibitör uygulamaları Beklin-1 protein ekspresyonları üzerinde önemli bir etki yaratmamış ve hücreler arasında bir farklılığa yol açmamıştır. Ekspresyon seviyeleri % 89 düzeyindedir. Atg5 protein ekspresyonu ise MiaPaCa-2 hücrelerinde daha yüksek bulunmuştur. Panc-1 hücrelerinde % 105 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde % 117 düzeyindedir.
5. miR-196a inhibitör transfeksiyonunun Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri üzerindeki etkilerine ilişkin en farklı sonuçlar Atg12 proteini ekspresyonu için elde edilmiştir. İki hücre grubu için Atg12 proteini ekspresyonu değerlerinin zıt yönlü (Panc-1 için % 67 azalış, MiaPaCa-2 için % 50 artış) ve kontrole önemli farklılıklar gösterdiği bulunmuştur.
6. miR-196a inhibitör uygulamalarının sadece Panc-1 hücre grubunda Beklin-1 ve Atg5 gen düzeylerindeki azalışları önemli ve anlamlı bulunmuştur.

ÖZET

PANKREATİK DUKTAL ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE miRNA'NIN, OTOFAJİ ÜZERİNDE DÜZENLEYİCİ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Pankreas kanseri bugün ve yakın gelecekte en düşük hayatta kalma oranının gözlendiği en ölümcül kanser türlerinden biri olmaya devam edecek gibi görünmektedir. miRNA'ların hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümüne ilişkin biyolojik olaylardaki etkin rolleri, kanserle ilişkisine olan ilginin artmasına yol açmıştır. Bu çalışmanın da amacını, otofajinin miRNA ile gen düzeyinde kontrol edilerek pankreas kanseri gelişiminin engellenebilirliğinin araştırılması oluşturmaktadır. Çalışma kapsamında Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerine miR196a'nın transfeksiyonu sonrası Beklin-1 ve Atg5 mRNA ekspresyonu ve Beklin-1, Atg5 ve Atg12 protein ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Hücrelerde sitotoksisite oluşturmayacak bir konsantrasyonda (50 nM) kullanılan miR-196a inhibitörü için, Panc-1 hücreleri canlılığı % 61.33 ± 0.56 ve diğer MiaPaCa-2 hücreleri ise % 52.88 ± 2.04 düzeylerinde bulunmuştur. miR-196a inhibitör uygulamasıyla, Panc-1 hücrelerinde Beklin-1 ve Atg5 gen ekspresyonları sırasıyla % 63 ve % 22 düzeylerinde gerçekleşmiştir. Beklin-1 protein ekspresyonu (% 89), Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri arasında farklılık göstermemiştir. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri arasındaki en önemli farklılık Atg12 proteini ekspresyonunda (Panc-1 için % 67 azalış, MiaPaCa-2 için % 50 artış) bulunmuştur. Çalışma sonuçları, önceki bazı araştırmalarda Beklin 1 ekspresyonunun azalmasının otofajik aktivitenin artmasına yol açabileceği değerlendirmeleriyle uyumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: miRNA, miR196a, pankreas kanseri, otofaji.

ABSTRACT

THE EVALUATION OF REGULATORY EFFECT OF miRNA ON AUTOPHAGY IN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA CELLS

Pancreatic cancer appears to continue to be one of the deadliest cancer types in the world today and in the near future with the lowest survival rate. The active roles of miRNAs in biological events related to cell proliferation, differentiation and death have led to an increased interest in cancer. The aim of this study is to investigate the inhibition of pancreatic cancer development by controlling gene expression of autophagy with miRNA. In the study, Bekin-1 and Atg5 mRNA expression and Beklin-1, Atg5 and Atg12 protein expression levels were determined in Panc-1 and MiaPaCa-2 cells after transfection of miR196a. For the miR-196a inhibitor, which was used at a concentration (50 nM) that would not produce cytotoxicity in the cells, the viability of Panc-1 cells was 61.33 ± 0.56 % and the other MiaPaCa-2 cells were found at 52.88 ± 2.04 %. With the miR-196a inhibitor application, the Beklin-1 and Atg5 gene expressions in Panc-1 cells were 63 % and 22 %, respectively. Beklin-1 protein expression (89 %) did not differ between the Panc-1 and MiaPaCa-2 cells. The most significant difference between the Panc-1 and MiaPaCa-2 cells was found in Atg12 protein expression (67 % decrease for Panc-1, 50 % increase for MiaPaCa-2). The results of the study were consistent with the findings that in some previous studies, decreased Beklin 1 expression might lead to an increase in autophagic activity.

Key words: miRNA, miR196a, pancreatic cancer, autophagy.

KAYNAKLAR

1. Perek, S. Pankreans Kanseri. Hepato-Bilier Sistem ve Pankreans Hastalıkları Sempozyum Dizisi. 2002, No, 28, 215-230.
2. Güzelgül F ve Aksoy K. Bir Gen İfade Düzenleyicisi miRNA. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2015; 24(4): 472-493.
3. Yanokura M, Banno K, Iida M, Irie H, Umene K, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D. MicroRNAs in Endometrial Cancer: Recent Advances and Potential Clinical Applications. EXCLI Journal. 2015; 14:190-198 – ISSN 1611-2156.
4. Passadouro M, Faneca H. Managing Pancreatic Adenocarcinoma: A Special Focus in MicroRNA Gene Therapy. Int. J. Mol. Sci. 2016; 17, 718; doi:10.3390/ijms17050718, www.mdpi.com/journal/ijms.
5. Anonymous. Pancreatic Cancer. American Cancer Society. 2017a; <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/what-is-pancreatic-cancer.html>. Erişim Tarihi. 23.10.2017.
6. Anonymous. Pancreatic Cancer. Stages of Pancreatic Cancer. National Cancer Institute. 2017b; <https://www.cancer.gov/types/pancreatic/patient/pancreatic-treatment-pdq>. Erişim Tarihi: 27.10.2017.
7. Anonymous. Pancreatic Cancer UK. Risk factors for pancreatic cancer. 2017c; <https://www.pancreaticcancer.org.uk/information-and-support/facts-about-pancreatic-cancer/risk-factors-for-pancreatic-cancer/>. Erişim Tarihi: 30.10.2017.
8. Decker GA, Batheja M J, Collins JM, Silva AC, Mekeel KL, Moss AA, Nguyen CC, Lake DF, Miller LJ. Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening. Gastroenterology & hepatology. 2010; 6(4): 246.
9. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2006; 20(2): 197-209.
10. Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, Perez-Perez G, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Helicobacter pylori seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. Journal of the National Cancer Institute. 2001; 93(12): 937-941.
11. Korc M, Jeon CY, Edderkaoui M, Pandol SJ, Petrov MS. Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2017; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691817300963>. Erişim Tarihi:01.11.2017.
12. Eibl G, Cruz-Monserrate Z, Korc M, Petrov MS, Goodarzi MO, Fisher WE, Habtezion A, Lugea A, Pandol SJ, Hart PA, Andersen DK. Diabetes Mellitus and Obesity as Risk Factors for Pancreatic Cancer. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics. 2017; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212267217310870>. Erişim Tarihi: 02.11.2017.

13. Anonymous. GLOBOCAN Project: Estimated Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer. 2017d; <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> and [http://globocan.iarc.fr/Pages /summary_table_site_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/summary_table_site_sel.aspx). Erişim Tarihi: 16.10.2017.
14. Anonim. Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2017; http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR._uzun.pdf. Erişim Tarihi: 23.10.2017.
15. Albulescu R, Popa AC, Codrici E, Popescu DI, Mihai S, Tanase C. (Editör: Kelly McCall) Pancreatic Cancer - Insights into Molecular Mechanisms and Novel Approaches to Early Detection and Treatment. Chapter: 3: miRNAs in Pancreatic Cancer. 2014; DOI: 10.5772/58397.
16. Tunalı NE, Tiryakioğlu NO. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2010; 30(5): 1690-1700.
17. Wang Y, Fu J, Jiang M, Zhang X, Cheng L, Xiaojie Xu X, Fan Z, Zhang J, Ye Q, Song H. MiR-410 Is Overexpressed in Liver and Colorectal Tumors and Enhances Tumor Cell Growth by Silencing FHL1 via a Direct/Indirect Mechanism. *PLOS ONE.* 2014; 9, 10, e108708. www.plosone.org.
18. Zhao D, Jia P, Wang W, Zhang G 2014. VEGF-mediated suppression of cell proliferation and invasion by miR-410 in osteosarcoma. *Mol Cell Biochem.*, 400: 87–95, DOI 10.1007/s11010-014-2265-2.
19. Shen J, Niu W, Zhou M, Zhang H, Ma J, Wang L, Zhang H. MicroRNA-410 Suppresses Migration and Invasion by Targeting MDM2 in Gastric Cancer. *Plos One.* 2014; 9, 8, e104510, www.plosone.org.
20. Mussnich P, Raverot G, Jaffrain-Rea M-L, Frassetta F, Wierinck A, Trouillas J, Fusco A, and D'Angelo D. Downregulation of miR-410 targeting the cyclin B1 gene plays a role in pituitary gonadotroph tumors. *Cell Cycle.* 2015; 14(16): 2590-2597.
21. Li D, Yang Y, Zhu G, Liu X, Zhao M, Li X, Yang Q. MicroRNA-410 promotes cell proliferation by targeting BRD7 in non-small cell lung cancer. *FEBS Lett.* 2015; 589(17): 2218-23. Doi: 10.1016.
22. Guo R, Gu J, Zhang Z, Wang Y, Gu C. MicroRNA-410 Functions as a Tumor Suppressor by Targeting Angiotensin II Type 1 Receptor in Pancreatic Cancer. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology.* 2015; 67 (1): 42–53.
23. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Leva GD, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C, Kipps TJ, Negrini M, Croce MC. A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1793-801.
24. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in Tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol.* 2007; 171: 728-38.

25. Nakano H, Yamada Y, Miyazawa T, Yoshida T. Gain-of-function microRNA Screens Identify miR-193a Regulating Proliferation and Apoptosis in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Oncology*. 2013; 42: 1875-1882.
26. Çelik DA, Koşar PA, Özçelik N. MikroRNA'lar ve Kanser ile İlişkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Der.* 2013; 20(3): 121-127.
27. Karagün BŞ, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınç Y. Mikro RNA ve Kanser. *Türk Klinik Biyokimya Der.* 2014; 12(1): 45-56.
28. Çınar İ, Dursun HG. miRNA Biyogenezi ve Kanser Patogenezindeki Fonksiyonu. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2015; 6(2): 64-71.
29. Sun T, Kong X, Du Y, Li Z. Aberrant MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Researches and Clinical Implications. *Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice*. 2014; Article ID 386561, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/386561>.
30. Jin X, Sun Y, Yang H, Li J, Yu S, Chang X, Lu Z, Chen J. Deregulation of the MiR-193b-KRAS Axis Contributes to Impaired Cell Growth in Pancreatic Cancer. *Plosone*. 2015; DOI:10.1371.
31. Brunetti O, Russo A, Scarpa A, Santini D, Reni M, Bittoni A, Azzariti A, Aprile G, Delcuratolo S, Signorile M, Gnoni A, Palermo L, Lorusso L, Cascinu S, Silvestris N. Micro-RNA in pancreatic adenocarcinoma: predictive /prognostic biomarkers or therapeutic targets? *Oncotarget*. 2015; 6(2), www.impactjournals.com/oncotarget/.
32. Wang P, Zhang J, Zhang L, Zhu Z, Fan J, Chen L, Zhuang L, Luo J, Chen H, Liu L, Chen Z, Meng Z. MicroRNA 23b Regulates Autophagy Associated With Radioresistance of Pancreatic Cancer Cells. *Gastroenterology*. 2013a; 145(5): 1133-1143.
33. Wang P, Zhang L, Chen Z, Meng Z. MicroRNA Targets Autophagy in Pancreatic Cancer Cells During Cancer Therapy. *Autophagy*. 2013b; 9(12): 2171-2172.
34. Zhang X, Shi H, Lin S, Ba M, Cui S. MicroRNA-216a Enhances the Radiosensitivity of Pancreatic Cancer Cells by Inhibiting Beklin-1-Mediated Autophagy. *Oncol Rep*. 2015; 34(3): 1557-1564.
35. Liu B, Wen X, Cheng Y. Survival or death: disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. *Cell Death and Disease*. 2013; 4, e892; doi:10.1038/cddis.2013.422. www.nature.com/cddis.
36. Nyhan MJ, O'Donovan TR, Boersma AW, Wiemer EA, McKenna SL. MiR-193b promotes autophagy and non-apoptotic cell death in oesophageal cancer cells. *BMC cancer*. 2016; 16(1): 101.
37. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q. MicroRNA-196: Critical Roles and Clinical Applications in Development and Cancer. *J. Cell. Mol. Med*. 2011; 15, 1, 14-23.
38. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, Zhang Y, Paranjape T, Zhu Y. microRNA miR-196a-2 and Breast Cancer: A Genetic and Epigenetic Association Study and Functional Analysis. *Cancer Res*. 2009; 69(14): 5970-5977.

39. Darda L, Lambert D, Morgan R, Hunter K. The Role of MiRNA-196a and HOXB9 in Head and Neck Cancer. *European Journal of Cancer*. 2012; 48(5): 25–288.
40. Maru DM, Singh RR, Hannah C, Albarracin CT, Li YX, Abraham R, Romans A.M., Yao, H., Luthra, M.G., Anandasabapathy, S., Swisher, S.G., Hofstetter, WL, Rashid A, Luthra R. MicroRNA-196a Is a Potential Marker of Progression during Barrett's Metaplasia-Dysplasia-Invasive Adenocarcinoma Sequence in Esophagus. *The American Journal of Pathology*. 2009; 174(5): 1940-1948. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080718.
41. Liu X-hua, Lu, K-hua, Wang K-ming, Sun M, Zhang E-bao, Yang J-song, Yin D-dan, Liu Z-li, Zhou J, Liu Z-jun, De W, Wang Z-xia. MicroRNA-196a Promotes non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation and Invasion Through Targeting HOXA5. *BMC Cancer*. 2012; 12, 348, <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/348>.
42. Hou T, Ou J, Zhao X, Huang X, Huang Y, Zhang Y. MicroRNA-196a Promotes Cervical Cancer Proliferation Through the Regulation of FOXO1 and p27Kip1. *British Journal of Cancer*. 2014; 110: 1260–1268, doi: 10.1038/bjc.2013.829.
43. Tsai MM, Wang CS, Tsai CY, Chen CY, Chi HC, Tseng YH, Chung PJ, Lin YH, Chung IH, Chen CY, Lin KH. MicroRNA-196a/-196b Promote Cell Metastasis via Negative Regulation of Radixin in Human Gastric Cancer. *Cancer Letters*. 2014; 351, 222-231.
44. Song ZS, WU Y, Zhao HG, Liu CX, Cai HY, Guo BZ, Xie Y, Shi HR. Association Between the rs11614913 Variant of miRNA-196a-2 and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncology Letters*. 2016; 11: 194-200.
45. Huang J, Liu J, Chen-Xiao K, Zhang X, Lee WP, Go VLW, Xiao GG. Advance in microRNA as a potential biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Biomarker research*. 2016; 4(1): 20.
46. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttes J, Munding JB, Barth RJ, Gutmann EJ, Suriawinata AA, Pipas JM, Tannapfel A, Korc M, Hahn SA, Labourier E, Tsongalis GJ. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clinical chemistry*. 2008; 54(10): 1716-1724.
47. Zhang Y, Li, M, Wang ., E. Fisher W, H. Lin P, Yao Q, Chen C. Profiling of 95 MicroRNAs in Pancreatic Cancer Cell Lines and Surgical Specimens by Real-Time PCR Analysis. *World J Surg*. 2008; DOI 10.1007/s00268-008-9833-0.
48. Xue Y, Tayoun ANA, Abo KM, Pipas JM, Gordon SR, Gardner TB, Bart Jr RJ, Suriawinata AA, Tsongalis GJ. MicroRNAs as diagnostic markers for pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor, pancreatic intraepithelial neoplasm. *Cancer genetics*. 2013; 206(6): 217-221. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.05.020>.
49. Pandey A, Bharadwaj KR. Translational research for biosensing of pancreatic cancer: concept and advancements. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 3(4): 1292-1300.

50. Slater EP, Strauch K, Rospleszcz S, Ramaswamy A, Esposito I, Klöppel G, Matthai E, Heeger K, Fendrich V, Langer P, Bartsch DK. MicroRNA 196-a and -196b as potential Biomarkers For The Early Detection of Familial Pancreatic Cancer. *Translational Oncology*.2014; 7(4): 464-471.
51. Hernandez YG, Lucas AL, MicroRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor lesions. *World J Gastrointest Oncol*. 2016; 8(1): 18-29.
52. Prinz C, Weber D. MicroRNAs as Indicators and Predictors of Pancreatic Adenocarcinoma. *JOP. J Pancreas (Online)*, 2016; 17(6): 561-565. [http://pancreas. imedpub.com/](http://pancreas.imedpub.com/).
53. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *Jama*. 2007; 297(17): 1901-1908.
54. Huang F, Tang J, Zhuang X, Zhuang Y, Cheng W, Chen W, Yao H, Zhang S. MiR-196a Promotes Pancreatic Cancer Progression by Targeting Nuclear Factor Kappa-B-Inhibitor Alpha. *PLOS ONE*. 2014; 9(2): 1-9. www.plosone.org.
55. Shang Y, Wang LQ, Guo QY, Shi TL. MicroRNA-196a Overexpression Promotes Cell Proliferation and Inhibits Cell Apoptosis Through PTEN/Akt/FOXO1 Pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(3): 2461-2472. www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP0005460.
56. Yuan Y, Anbalagan D, Lee LH, Samy RP, Shanmugam MK, Kumar AP, Sethi G, Lobie PE, Lim LHK. ANXA1 Inhibits miRNA-196a in a Negative Feedback Loop Through NF-kB and c-Myc to Reduce Breast Cancer Proliferation. *Oncotarget*. 2016; 7, 19: 27007-27020. www.impactjournals.com/oncotarget/.
57. Lu Ya-C, Chang JT, Chan Err-C, Chao Yin-K, Yeh Ta-S, Jinn-Shiun Chen Jinn-S, Cheng Ann-J. miR-196, an Emerging Cancer Biomarker for Digestive Tract Cancers. *Journal of Cancer*. 2016;7(6): 650-655. doi: 10.7150/jca.13460.
58. Laurila EM, Sandstro S, Rantanen LM, Autio R, Kallioniemi A. Both Inhibition and Enhanced Expression of miR-31 Lead to Reduced Migration and Invasion of Pancreatic Cancer Cells. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2012; 51:557–568.
59. Lee YS, Kim H, Kim HW, Lee JC, Paik KH, Kang J, Kim J, Yoon YS, Han HS, Sohn I, Cho J, Hwang JH. High Expression of MicroRNA-196a Indicates Poor Prognosis in Resected Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *Medicine*. 2015; 94(50): 1-8.
60. Liu-Minghao BS, Du- Yiqi MD, Gao- Jun MD, Liu- Jianqiang MD, Kong- Xiangyu MD, Gong- Yanfang BS, Li- Zhaoshen MD, Wu- Hongyu BS, Chen- Hui BS. Aberrant Expression miR-196a is Associated With Abnormal Apoptosis, Invasion, and Proliferation of Pancreatic Cancer Cells. *Pankreas*. 2013; 42(7): 1169-81. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182962ac
61. Zhu H, Wu H, Liu X., Li B, ChenY, Ren X, Liu CG, Yan JM. Research Paper Regulation of autophagy by a Beklin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*, 2009; 5(6): 816-823.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	: H. Elif	Soyadı	: SÖNMEZ
Doğ. Yeri	: Burdur	Doğ.Tar.	: 01.01.1990
Uyruğu	: TC	Tel	: 553 1339993

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezun Olduğu Yıl
Lisans	: SDÜ Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2008-2012
Lise	: Gülkent Lisesi	2004-2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
-	-	-

Yabancı Dilleri	YDS/YÖKDİL Puanı	Diğer Puanı
İngilizce	:	Orta