

Pankreatik Duktal Adenokarsinoma Hücrelerinde miR-196a'nın, Otofajinin Kontrolü Üzerindeki Rolü ve Terapötik Etkinliği

The Regulatory Role and Therapeutic Effect of miR-196a on Autophagy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells

H. Elif SÖNMEZ¹, Oğuz ÖZTÜRK², Nilgün GÜRBÜZ^{1*}

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Isparta

² Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Antalya

Alınış / Received: 12.10.2020 Kabul / Accepted: 02.12.2020 Online Yayınlanma / Published Online: 31.12.2020

Özet

Amaç: Pankreas kanseri, geç dönemde tanı konulması ve yüksek metastatik potansiyele sahip olması nedeniyle en agresif ve en ölümcül kanserlerin başında yer almaktadır. Fizyolojik şartlarda bir hücre ölüm mekanizması olarak tanımlanan otofaji, aslında tersine kanserde canlılığın devamı için gerekli major mekanizmadır. Bu nedenle, metastatik aşamadaki kanserin tedavisi için otofaji inhibe edilmelidir. Bu da ancak otofajinin kontrolünde rol oynayan üst mediyatörlerin tanımlanması ile sağlanabilecektir. Çalışmamızda, onkojenik etkiye sahip olan miR-196a'nın rolünün ve takibinde baskılanmasının, otofajinin inhibisyonu üzerinden pankreas kanseri hücrelerinde olası terapötik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. **Materyal-Metot:** Pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) hücreleri olan Panc-1 ve MiaPaCa-2'nin negatif-miR veya miR-196a inhibitör ile transfeksiyonu sonrasında; hücre canlılığı ve otofajinin önemli mediyatörlerinden olan Beclin-1, Atg5 ve Atg12'nin mRNA ve protein ekspresyonları sırasıyla MTS, RT-PCR ve western blot yöntemleri ile değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Sonuçlarımız; miR-196a'nın, PDAC hücrelerinin canlılığı ile ilişkili olduğunu ve miR-196a inhibisyonunun herhangi bir hücrel toksik etki oluşturmadan PDAC hücrelerinin canlılığını anlamlı düzeyde azalttığını göstermiştir. Ayrıca miR-196a inhibitör uygulamasının, özellikle Panc-1'de Beclin-1 ve Atg5 gen ekspresyonunu önemli düzeyde inhibe ettiğini, ayrıca tersine MiaPaCa-2'de Atg5 ve Atg12 protein ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-196a uygulamaları Beclin-1 protein ekspresyonları üzerinde önemli bir etki yaratmamış ve hücreler arasında bir farklılığa yol açmamıştır. Atg5 protein ekspresyonu ise MiaPaCa-2 hücrelerinde daha yüksek bulunmuştur. **Sonuç:** miR-196 inhibisyonunun, ileri evre Panc-1 hücresinde otofajiyi inhibe, metastatik özellikleri tanımlanmamış olan MiaPaCa-2'de ise otofajiyi uyardığını saptamış bulunuyoruz. Dolayısıyla miR-196a inhibitör tedavisi yaklaşımı, kanserde kontrolü bozulan otofajiyi düzenleyerek PDAC hücrelerinin proliferasyonu azaltmaktadır.

Anahtar Kelimeler: miRNA, miR196a, pankreas kanseri, otofaji

Abstract

Objective: Pancreatic cancer is one of the most aggressive and lethal cancers due to its late diagnosis and high metastatic potential. Although autophagy is defined as a cell death mechanism under physiological conditions, it is a required survival mechanism to continue cancer proliferation. Therefore, autophagy must be inhibited for the treatment of cancer in the metastatic stage. This can only be achieved by defining top mediators that play a role in the control of autophagy. In our study, it was aimed to investigate the role of miR-196a, which has an oncogenic effect, and its suppression in its follow-up, the possible therapeutic effects on pancreatic cancer cells through inhibition of autophagy. **Material-Method:** Followed by transfection of Panc-1 and MiaPaCa-2 cells with control-miR or miR-196a inhibitor, the cell viability and mRNA / protein expressions of Beclin-1, Atg5 and Atg12, which are important mediators of cell viability and autophagy, were evaluated by MTS, RT-PCR and western blot methods, respetively. **Results:** We showed that miR-196a is related to the viability of PDAC cells and also miR-196a inhibition significantly reduced PDAC cells proliferation without any cellular toxic effects. It was also shown that miR-196a inhibitor transfection significantly inhibited Beclin-1 and Atg5 gene expressions, especially in Panc-1, whereas increased Atg5 and Atg12 protein expressions in MiaPaCa-2. In Panc-1 and MiaPaCa-2 cells, miR-196a treatment did not have a significant effect on Beclin-1 protein expression and did not cause a difference between cells. Atg5 protein expression was higher in MiaPaCa-2 cells. **Conclusion:** miR-196 inhibition was shown to decrease autophagy in metastatic Panc-1 cells and induce autophagy in MiaPaCa-2, whose metastatic properties are not defined. Therefore, miR-196a inhibitor therapeutic approach decreases the proliferation of PDAC cells through regulating the autophagy that is impaired in cancer.

Keywords: miRNA, miR196a, pancreatic cancer, autophagy

Giriş

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 gözlemlendiği en ölümcül kanser türlerinden biridir [1]. Pankreas kanserinin etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte risk faktörleri içerisinde; kanser öyküsü ve kalıtsal sendromlar (Peutz-Jeghers sendromu, Lynch sendromu, ailesel atipik çok amaçlı mole melanom, melanoma-pankreatik kanser sendromu, kalıtsal göğüs ve yumurtalık kanseri, kistik lezyonlar) [2], pankreatit [3], *Helicobacter pylori* [4], sigara, alkol [5], aşırı kilo, obezite ve diyabet, yaş, beslenme alışkanlıkları ve kan grubu [6] bulunmaktadır. Pankreas kanselleri olguları arasında %85 ile en yüksek oranda pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) gelmektedir. PDAC'nin transformasyonunun, proliferasyonunun ve daha da ileri olarak metastazının gelişmesinin altında; hücre çoğalması ve farklılaşması, kanser kök hücre gelişimi, anjiyogenez, invazyon, metastaz, apoptozis, otofaji, hücre döngüsü gibi önemli hücre mekanizmalarının kontrolünün eş zamanlı bozulması yatmaktadır. Otofaji aslında programlı bir hücre ölüm mekanizması olarak tanımlansa da aslında tersine hücre için bir sağ kalım mekanizmasıdır. Kanser hücreleri, hızlı çoğalmalarına karşılık temel makro- ve mikromoleküllere olan gereksinimlerini karşılamak amacıyla sağlıklı hücrelerin ölümünü uyararak kendilerine gerekli besin desteğini sağlamaktadırlar. Ancak otofajinin kanserdeki paterni iki farklı şekildedir. Kanser erken evre dönemlerinde otofaji baskılanırken, ileri evrede ise tersine uyarılır [7]. O nedenle PDAC gibi metastatik potansiyeli yüksek agresif tipteki kanser hücreleri için otofajinin inhibisyonu oldukça önemlidir. Bu noktada PDAC'de, otofajinin kontrolünü sağlayan üst mediyatörlerin tanımlanması ve bunların inhibe edilmesi PDAC tedavisi için etkili hedefsel bir tedavi yaklaşımı olacaktır.

miRNA'lar; birden fazla mRNA'ları hedefleyerek degrade etme ve dolayısıyla çeşitli proteinlerin ekspresyonunu inhibe ederek düzenleme yeteneğine sahip, uygun formda 18-28 nükleotid uzunluğundaki kodlayıcı olmayan küçük RNA'lardır. Kanser gelişiminde, onkojenik ve tümör supressif karakterde olmak üzere iki farklı etkiye sahip olan miRNA'lar bulunur. Kanserde ekspresyonu artan onkojenik miR'ler, tümör supressör mRNA'lara spesifik olarak bağlanarak bu mRNA'ların degrade olmasına dolayısıyla protein sentezinin inhibe olmasına neden olurken [8]; tersine kanserde ekspresyonu azalan tümör supressör karakterdeki miRNA'lar ise onkojenik mRNA'lara yeterli düzeyde bağlanamayarak onkojenik genlerin susmasına aracılık edemezler [9]. PDAC'de ekspresyonu değişerek öne çıkan miRNA'lar içerisinde; miR-10b, miR-21, miR-23a, miR-31, miR-100, miR-143, miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a/b/c, miR-196a/b, miR-21, miR-210, miR-221, miR-222, miR-223, miR-376a ve miR-301 ekspresyonlarının aşırı derecede arttığı, diğer taraftan miR-148a, miR-217, miR-375 ve miR-34a ekspresyonlarının da azaldığı belirtilmiştir [10].

miR-196 gen ailesi, embriyonik gelişim için gerekli homeodomain içeren transkripsiyon faktörlerini kodlayan HOX gen kümeleri bölgelerinde bulunur. 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 [11]. Klinik olarak miRNA'ların tanısal potansiyelinin değerlendirildiği ve bu bağlamda biyopsi örneklerinde TaqMan analizleri ile miRNA düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, miR-196a ve miR-217'nin sağlıklı doku, pankreatik duktal adenokarcinoma (PDAC) ve kronik pankreatitin ayırımında etkili olduğu ve hatta miR-196a'nın, PDAC'nin derecelendirilmesiyle de paralellik gösterdiği gösterilmiştir [12]. Ancak miR-196a'nın PDAC'de hangi hücre mekanizmaları üzerinden kanserin gelişimine aracılık ettiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu noktadan hareketle çalışmamızda; PDAC'de miR-196a'nın, öncelikle kanserde önemli bir hayatta kalım mekanizması olan otofajinin kontrolü üzerinde üst regülatör olarak herhangi bir rolü olup olmadığı, takibinde ise miR-196a inhibisyonunun otofaji üzerinden olası terapötik potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla PDAC hücreleri olan Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücre dizilerinde miR-196a inhibitörünün, otofajinin kontrolünde rol oynayan kilit mediyatörlerin ekspresyonları üzerine olan etkiler incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışmamızın deneysel aşamaları, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Hücre Kültürü/PCR/Western Blot Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Hücre Kültürü

Tüm deneyler; PDAC hücreleri olan Panc-1 (yüksek metastatik potansiyele sahip) ve MiaPaCa-2 (metastaz mevcut değil) hücre dizilerinde (i) herhangi bir muamaleye tabi tutulmamış kontrol, (ii) negatif miRNA ile muamele edilmiş ve (iii) miR-196a inhibitör ile muamele edilmiş şartlar olmak üzere toplamda 3 grupta gerçekleştirildi. Hücreler, laminar akımlı kabin içerisinde steril koşullarda, %10 FBS (Invitrogen-Carlsbad, CA, USA) ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı içeren DMEM/F12 besiyeri (Invitrogen-Carlsbad, CA, USA) içerisinde, 37 °C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂ varlığında steril olarak inkübatör içerisinde kültüre edildi. kültüre edildiler. Hücreler, "tripan mavi" solusyonu (Sigma-St. Louis, MO, USA) ile toma lamında sayılarak deneylere hazır hale getirildi.

miR-196a inhibitör Transfeksiyonu

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, 50 nM miR-196a inhibitör veya kontrol amacıyla 50 nM negatif miRNA (Ambion- Austin, TX, USA) ile katyonik bir reaktif olan hiperfekt (Qiagen-Hilden, Germany) varlığında 72 saat süresince hücre kültürü şartlarından transfekte edildiler.

Hücre Proliferasyonu/Canlılığı Analizi

miR-196a inhibitörünün PDAC hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan hücre proliferasyonu testi için, Promega firmasına ait kit kullanıldı (Promega, Madison, WI, USA). Bu testin prensibi, hidrofobik karakterde renksiz tetrazolyum tuzu olan [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum'un (MTS), elektron taşıyıcısı olan fenazin metosülfat (PMS) varlığında hücre içi dehidrogenazlar aracılığıyla hidrofilik karakterde renkli formazana dönüşmesi ve oluşan formazanın da 490 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. Doğrusal olarak formazan miktarı ile artan hücre canlılığının sonuçları, kontrol şartlar baz alınarak % hücre canlılığı şeklinde verildi. Hücre canlılığı testi için Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, 50 nM negatif miRNA veya 50 nM miR-196a inhibitör ile 72 saat süresince 96 kuyucuklu kültür kapları içerisinde transfekte edildiler. Hücre canlılığı deneyleri birbirinden bağımsız 3 farklı zamanda 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

RT-PCR

RNA İzolasyonu

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin, 6 kuyucuklu kültür kaplarında 50nM miR-196a inhibitör ve negatif miRNA ile 72 saat süresince transfeksiyonu sonrasında, trizol reaktifi (Invitrogen- Carlsbad, CA, USA), hücrelerden RNA'lar izole edildi. RT-PCR öncesinde RNA saflığının ve miktar tayinin tespiti için Thermo Nanodrop cihazı kullanılarak; A260/A280 saflık oranı 1,7'nin üzerinde olan RNA örnekleri, RT-PCR analizlerinde kullanıldı.

cDNA Sentezi

1 µg RNA örnekleri kullanılarak yapılan cDNA sentezi için, yüksek kapasiteli cDNA sentez kiti kullanıldı (Applied Biosystem, MA, USA). Buna göre RNA örnekleri; RT tamponu, dNTP karışımı, Random primer, RNaz inhibitörü ve RT enzimi varlığında 25 °C 10 dakika, 37 °C 120 dakika ve 85 °C 5 dakika reaksiyon şartlarında tabi tutularak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

PCR

Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde miR-196a'nın, otofajinin kontrolünde üst regülatör olarak olası rolünün değerlendirilmesi amacıyla otofajinin önemli mediyatörleri olan Beklin-1 ve Atg5 mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi. Bu amaçla human Beklin-1 ve Atg5 genine özgü primerler, ayrıca internal kontrol amacıyla GAPDH genine özgü primer, NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) veri tabanları kullanılarak dizayn edildi. Platinyum Taq DNA Polimeraz kiti (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak gerçekleşen PCR reaksiyonu için cDNA örnekleri; PCR reaksiyon tamponu, MgCl₂, dNTP karışımı, gene özgü sense ve antisense primerler ve Taq DNA polimeraz enziminin varlığında 94 °C'de 2 dakika süreli

dentatürasyon basamağını takiben 35 döngü olacak şekilde 94 °C 30 saniye, 55 °C 45 saniye, 72 °C 1 dakika reaksiyonlarından sonra son olarak da 72 °C'de 5 dakika süreli zincir uzama reaksiyonuna tabi tutularak PCR ürünleri elde edildi. Elde edilen PCR ürünleri ise, SyberGreen fluoressan boya varlığında %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek elde edilen mRNA gen ekspresyon bantları Blook LED Transluminatör (Genedirex, Miaoli County, Taiwan) cihazında görüntülendi. Bantların yoğunluğu, Image J 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı kullanılarak kuantifiye edildi. RT-PCR ile elde edilen gen ekspresyon sonuçları, Beklin-1 veya Atg5 gen ekspresyonu/GAPDH gen ekspresyonu şeklinde oranlanarak, kontrol hücrelerin oranı 1 kabul edilerek 1'in katları olarak verildi.

Western Blot

PDAC hücrelerinde miR-196a'nın, otofajinin kontrolünde üst regülatör olarak olası rolünün değerlendirilmesi amacıyla Atg5 ve Atg12 protein ekspresyon düzeyleri western blot yöntemiyle incelendi. Bu amaçla; Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin 50 nM negatif miRNA veya miR-196a inhibitör ile 72 saat süresince transfekte edilmesi sonrasında toplanan, santifüj edilen ve soğuk PBS ile iki kez yıkanan hücre süspansiyonları, proteaz/fosfataz inhibitörü varlığında hücre lizis tamponu içerisinde homojenize edilerek 4 °C'de ve 13.000 g'de 10 dakika süresince santrifüj edilmesi sonucunda hücre lizatları elde edildi. Supernatant örneklerinde Bradford yöntemine göre protein miktarları tespit edildi [13] ve (BioRad- Hercules, CA, USA) her bir kuyucukta 40 µg protein olacak şekilde örnekler yükleme tamponu karıştırılarak %4-15 Tris-HCl jelde (BioRad- Hercules, CA, USA) SDS-PAGE elektroforezine tabi tutuldu. Elektroforez sonucunda proteinler PVDF membrana aktararak, önce Atg5 veya Atg12'e spesifik rabbit primer antikor (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) ile 4 °C'de gece boyunca, takibinde ise anti-rabbit AP-bağlı sekonder antikor (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) ile oda ısısında 1 saat süresince inkübe edildiler. BCIP/NBT reaktifi varlığında bantların varlığı kolorimetrik olarak görüntülendi. Image J 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı kullanılarak kuantifiye edilen protein bant sonuçları; Atg5 veya Atg12 protein ekspresyonu/β-Aktin protein ekspresyonu şeklinde oranlanarak, kontrol hücrelerin oranı 1 olarak kabul edilerek 1'in katları olarak verildi.

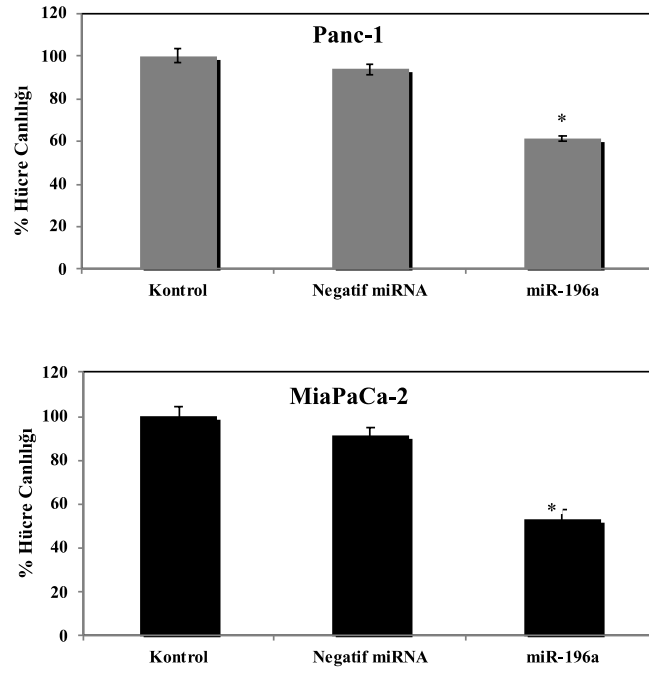
İstatistiksel Analiz

SPSS 20.0 istatistik programı kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerde, gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar için non parametrik Mann-Whitney U testi kullanıldı. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilerek farklılıklar, * simgesi ile gösterildi.

Bulgular

miR-196a, PDAC Hücrelerinin Canlılığını İndükler

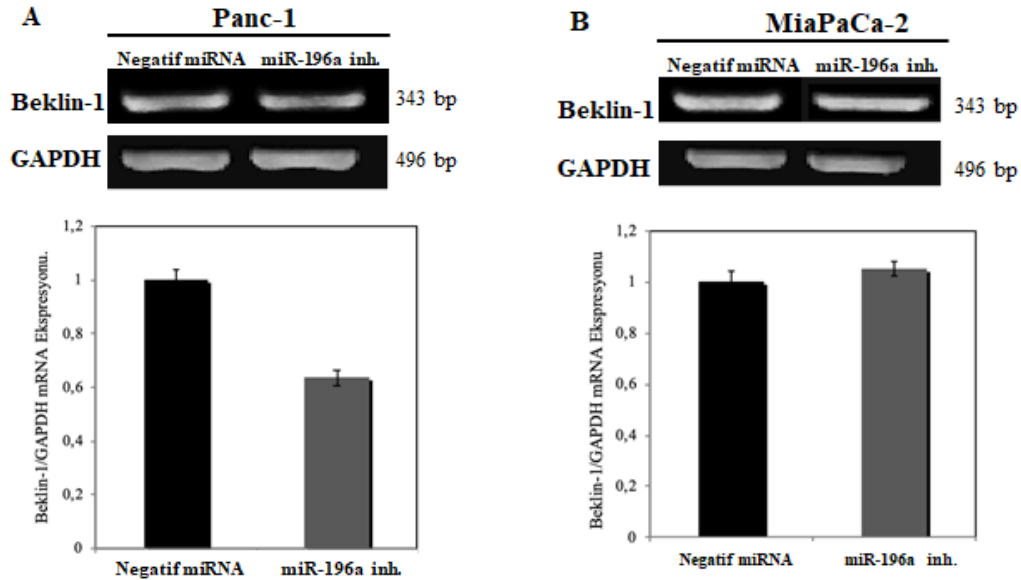
miR-196a'nın Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan MTS deneyleri sonucunda; Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin 50 nM negatif miRNA ile 72 saat süresince muamele edildiğinde hücre proliferasyonu kontrol şartlara kıyasla sırasıyla %93,67 ve %91,54 olarak saptanmışken, miR-196a inhibitör ile muamele edildiğinde bu değerler %61,33 ve %52,88 olarak gözlenmiştir (Şekil 1). Her iki hücre grubu için negatif miRNA, hücre canlılığını anlamlı düzeyde etkilemezken miR-196a inhibitör, PDAC hücrelerinin canlılığını/proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır (p<0,05). Bu sonuç da miR-196a'nın, PDAC hücrelerinin sağ kalımını uyararak pankreas kanser hücrelerinin canlılığını indüklediğini açıkça göstermektedir.



Şekil 1. Panc-1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) hücrelerinde 50 nM miR-196a inhibitörünün hücre canlılığı üzerine etkisi (*kontrolle kıyasla p<0,05)

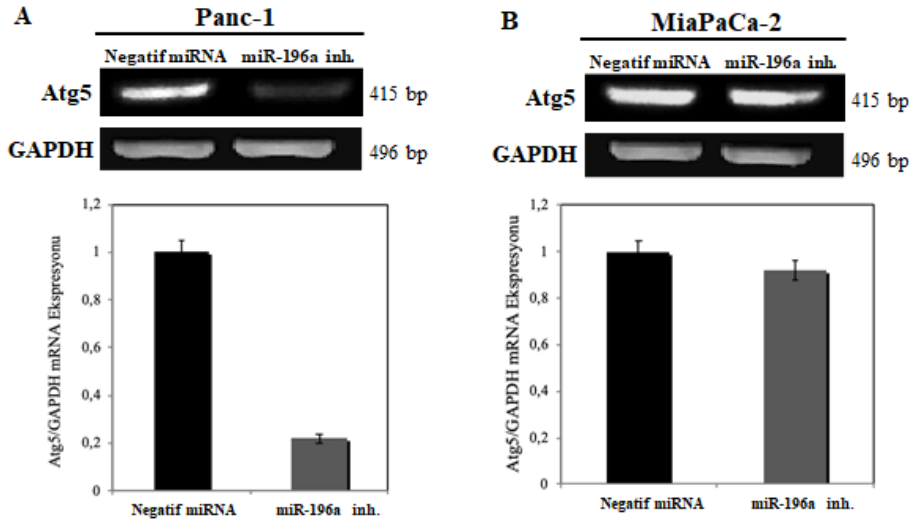
miR-196a, PDAC Hücrelerinde Beklin-1 ve Atg5 Gen Ekspresyonlarını Düzenler

miR-196a'nın otofajinin kontrolündeki olası rolünü incelemek amacıyla, otofajinin önemli mediyatörleri olan Atg5 ve Beklin-1'in mRNA ekspresyonları RT-PCR analizleri ile incelendi. Bu amaçla PDAC hücreleri 50 nM miR-196a inhibitör ile 72 saat süresince muamele edildiğinde; negatif miRNA'ya kıyasla Beklin-1 gen ekspresyonu Panc-1'da 0,37 kat azalırken (Şekil 2A), MiaPaCa-2'de ise değişmediği (Şekil 2B) gözlemlendi.



Şekil 2. Panc-1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) hücrelerinde miR-196a inhibitörünün Beklin-1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

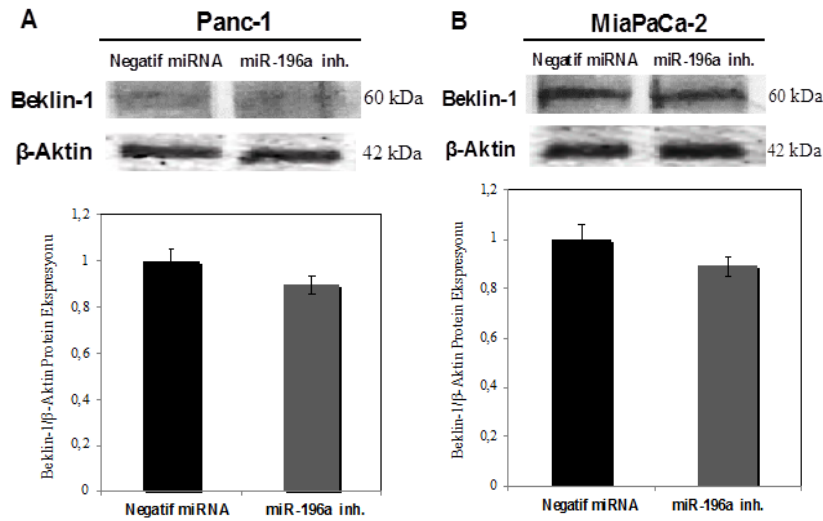
Atg5 mRNA ekspresyonu ise, Panc-1 hücrelerinde miR-196a inhibitör uygulamasına cevaben negatif miRNA'ya kıyasla büyük ölçüde azalmış olup bu oran 0,8 kat seviyelerindedir (Şekil 3A). Buna karşılık MiaPaCa-2 hücrelerinde de bir azalış gözlenmesine karşılık bu oran 0,1 kat gibi çok düşük bir değerdir (Şekil 3B).



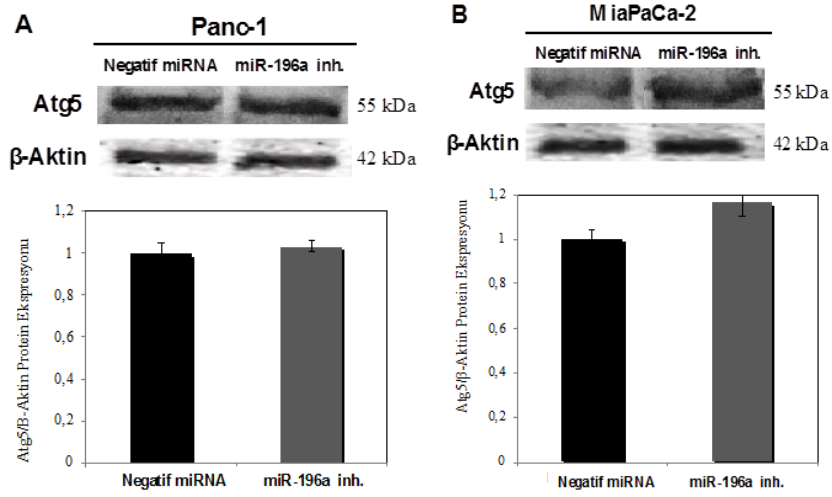
Şekil 3. Panc-1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) hücrelerinde miR-196a inhibitörünün Atg5 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

miR-196a'nın İnhibisyonu, PDAC Hücrelerinde Beklin-1, Atg5 ve Atg12 Protein Ekspresyonlarını Kontrol Eder

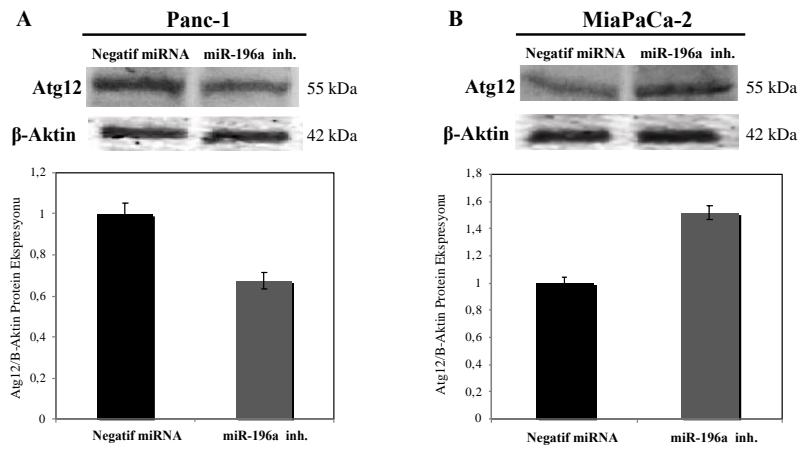
Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde yapılan RT-PCR deneyleri ile saptadığımız miR-196a'nın, otofaji yolağındaki ana mediyatörlerden olan Beklin-1 ve Atg5'in gen ekspresyonları üzerindeki regülatör etkisine ek olarak, protein ekspresyonu üzerine olan etkisi de western blot analizi ile incelenmiştir. miR-196a inhibitörü ile transfeksiyonu sonucunda Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde, Beklin-1 protein ekspresyonunun negatif miRNA'ya kıyasla eser düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Bu azalış her iki hücre için de yaklaşık 0,1 kat seviyesindedir (Şekil 4A ve 4B). Beklin-1'in aksine Atg5 protein ekspresyonunun ise her iki hücrede arttığı gözlemlendi. Panc-1'da 0,03 kat olarak az bir artış oranı saptanırken (Şekil 5A) MiaPaCa-2'da bu oran 0,17 kat düzeyindedir (Şekil 5B). Onkogenik karakterdeki miR-196a'nın, spesifik inhibitörü ile gen düzeyinde inhibisyonunun Atg12 protein ekspresyonunu, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinde farklı şekilde etkilediği gözlenerek önemli sonuçlara ulaşılmasına neden oldu. Nitekim Panc-1 hücrelerinde Atg12 proteini ekspresyonu 0,33 kat olarak belirgin azalmasına karşılık (Şekil 6A), MiaPaCa-2 hücrelerinde yaklaşık 0,5 katlık bir artış (Şekil 6B) göstermiştir. PDAC hücrelerinde miR-196a hedefli tedavi yaklaşımının; metastatik potansiyeli yüksek olan Panc-1 hücrelerinde Atg12 azalışı üzerinden otofajiyi inhibe ederek ve tersine daha erken evre olan MiaPaCa-2 hücrelerinde Atg12 artışını uyararak otofajiyi düzenlemesi PDAC'nin etkin tedavisi için önemli bir bulgudur.



Şekil 4. Panc-1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) hücrelerinde miR-196a inhibitörünün Beklin-1 protein ekspresyonu üzerine etkisi



Şekil 5. Panc-1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) hücrelerinde miR-196a inhibitörünün Atg5 protein ekspresyonu üzerine etkisi



Şekil 6. Panc-1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) hücrelerinde miR-196a inhibitörünün Atg12 protein ekspresyonu üzerine etkisi

Tartışma

İnsan miR-196 genlerinden miR-196a ve miR-196b'nin farklı kanser türlerinde değişken rollere sahip olduğuna işaret eden Lu ve ark. (2016); miR-196a'nın baş boyun, oral, gastrik, pankreas, meme, servikal ve akciğer kanserlerinde fazla düzeyde eksprese olduğunu, benzer şekilde miR-196b'nin de oral, gastrik, kolorektal kanserlerde, ayrıca glioblastoma ve lösemi kanserlerinde arttığını göstermiştir [14]. Pankreatik adenokarsinoma hastalarında miRNA-196a seviyelerinin sağkalımla ters yönlü bir korelasyon gösterdiği, farklı lösemi vakalarında miR-196a-1 seviyesinin HOX geni ifadesiyle açık bir korelasyon sergilediği ve yine miR-196b'nin aşırı ekspresyonunun gerçekleştiği, miyeloid gelişiminde değişiklikler yarattığı oesofageal, meme ve endometrial kökenli ve özofagus adenokarsinoması bulunan kanser hücre dizilerinde miR-196a düzeylerinde artışın, Annexin A1 mRNA seviyeleri ile ters bir korelasyona sahip olduğuna değinilmektedir [15].

Laurilla ve ark. (2012), çoğu kanser vakalarında miRNA düzeylerinin artışından ziyade daha çok azalma olduğuna, ancak pankreatik kanserinde bu durumun farklı olduğuna değinmiştir [16]. Lee ve ark. (2015) tarafından pankreatik nöroendokrin tümörlerin tanısında biyobelirteç olabilecek miRNA'ları tanımlamak amacıyla yapılan bir çalışmada; miRNA-27b, miRNA-122, miRNA-142-5p, miRNA-196a, miRNA-223, miRNA-590-5p, miRNA-630 ve miRNA-944'nin ekspresyon düzeylerinin karaciğer metastazında 2 kat ve daha fazlası arttığı tespit edilmiştir. Bunlar arasında sadece miRNA-196a'nın yüksek ekspresyon düzeyinin, patolojik evrelerle önemli ilişkisi olduğu belirtilmiştir [17]. Bu

raporlara paralel olarak; kronik pankreatite, PDAC'a ve benign pankreatik parankime sahip olan hastaların pankreas doku örnekleri ile normal pankreatik parankimli sağlıklı kişilerin pankreas dokularındaki miRNA ekspresyon değişimleri kıyaslandığında, yine miR-196a'nın diğerlerinden farklı olarak özellikle PDAC'lu hastalarda anlamlı derecede fazla eksprese edildiği saptanmıştır [18].

miR-196a'nın ING5'i (gelişme inhibitörü 5) düzenleyerek pankreas kanserinde apoptozu etkileyebileceği yönünde yapılan bir çalışmada; pankreas kanseri hücrelerinin miR-196a mimik ile transfeksiyonu sonrasında 48 saatlik sürede proliferasyonun artmasına karşılık, miR-196a inhibitörü ile transfeksiyonunda tersine proliferasyonun önemli düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuç, miR-196a'nın pankreas kanserinin gelişimini uyardığını açıkça göstermektedir. Pankreas kanserinde miR-196a ile prognoz arasındaki ilişkiyi daha net bir şekilde ortaya koyabilmek adına yapılan Transwell invazyon testi sonrasında, miR-196a inhibe edildiğinde Panc-1 hücrelerinin invazyonu da inhibe olmuştur. Sonuç olarak, miR-196a'nın pankreas hücreli karsinomadaki ING5 ekspresyonunu düzenlediği ve böylece tümörün büyümesini inhibe edecek olası mekanizmanın anlaşılmasına katkı sağladığı belirtilmiştir [19].

Pankreas kanseri hücrelerinde miR-196a'nın mekanistik etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada ise; miR-196a'nın, NfKB inhibitörü olan NFKBIA mRNA'sına direkt olarak bağlanabildiği bu nedenle NfKB aktivasyonuna neden olduğu, bunun sonucunda da pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu indüklediği gösterilmiştir [20].

Çalışmamızda miR-196a inhibitör uygulamasının; Panc-1 hücreleri için hücre canlılığını yaklaşık %38,67 düzeyinde, MiaPaCa-2 hücreleri için ise %47,12 düzeyinde baskıladığı gözlenmiştir. Buna göre miR-196a inhibitörünün, MiaPaCa-2 hücrelerinin yaklaşık yarısının canlılığına son vermesi nedeniyle MiaPaCa-2'nin, Panc-1'e göre miR-196a hedefli tedavi yaklaşımı için daha duyarlı olduğunun ya da diğer ifadeyle Panc-1 hücrelerinin daha dirençli olduğunun göstermiş bulunuyoruz. Ayrıca, kullanılan 50 nM miR-196a inhibitör dozu hücrelerde sitotoksik bir etki oluşturmamaktadır.

Otofajinin kanserle olan karmaşık ilişkisinin gizemi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Tümör oluşturan hücreler kök, progenitör veya farklılaşmış hücrelerden kaynaklanabilir. Otofaji, kanser kök hücrelerinin tümör oluşturma potansiyelleri, farklılaşmaları, kendi kendini besleme ve ilaç direnci gelişiminde önemli rollere sahiptir [21]. Hepatosellüler karsinoma hücreleri olan Huh-7 hücrelerinin CD133+ ekspresyonuna sahip olan kök hücrelerinde, hipoksi ve açlık ile ilişkili olarak otofajinin indüksiyonu söz konusudur. Ayrıca, protein kinaz C-delta (PKCδ) uygulanan pankreatik kanser kök hücrelerinde LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün, ATG7 ve Beklin-1'in ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir [22].

Pankreas kanserinde miR-196a'nın otofaji üzerindeki etkilerinin incelendiği literatürde bir yayın olmaması nedeniyle çalışmamızın sonuçları tamamen özgün niteliktedir. Ancak PDAC'de miR-30a'nın otofajinin kontrolü üzerindeki etkisinin incelendiği bir 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 mimik ve inhibitörünün Beklin 1 ekspresyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde; T98G (glioblastoma), MDA-MB-468 (metastatik meme kanseri) ve H1299 (küçük hücreli dışı akciğer kanseri) hücrelerinin mimik ile transfeksiyonu sonucunda Beklin-1 mRNA'da %25-40 ve Beklin-1 proteininde %25-60 oranında bir azalma, inhibitör ile transfekte edildiğinde ise Beklin-1 mRNA'da %55-85 ve Beklin-1 proteininde %10-25 oranında bir artış gözlemlendiği bildirilmiştir [23].

Kanserin başlangıcında ve progresyonunda rol oynayan önemli otofajik mediyatörlerden Beklin-1, Atg5 ve Atg12'nin miR-196a tarafından regülasyonu çalışmamızda irdelenmiştir. Otofajiyi indükleyici yönde role sahip olan Beklin-1'in ekspresyonunun, kanseri de içeren bazı hastalıklarda farklılaştığı gözlemlenmiştir. miRNA'ların, hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanarak yıkımına ya da translasyona uğramasını engelleyerek ekspresyonunu azaltabileceği temeline dayalı olarak mevcut çalışmamızda; Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin negatif miRNA ve miR-196a inhibitör ile transfekte edilmeleri sonrası Beklin-1, Atg5 ve Atg12 ekspresyon düzeyleri önemli farklılıklar göstermiştir. miR-196a inhibitör, Beklin-1 miRNA ekspresyonunu negatif miRNA'ya kıyasla Panc-1 hücrelerinde 0,37 kat

azaltırken, MiaPaCa-2 hücrelerinde ise herhangi bir değişime uğratmamıştır. Dolayısıyla, Beklin-1 gen ekspresyonunun sınırlandırıldığını gösteren bu durum, diğer otofajik yolak Atg5 için daha çok daha belirgindir. Nitekim Atg5 miRNA ekspresyon bant yoğunluğu, Panc-1 hücrelerinde miR-196a inhibitör uygulamasıyla 0,8 kat oranında büyük ölçüde azalmasına karşılık, MiaPaCa-2 hücrelerindeki azalma ise 0,1 kat gibi çok küçük bir düzeyde gerçekleşmiştir. Protein ekspresyonu düzeyinde otofaji mediyatörleri incelendiğinde ise, her iki PDAC hücresinde Beklin-1 protein ekspresyonunun negatif miRNA'ya kıyasla 0,1 katlık bir artışın saptanmasıyla miR-196a'nın, Beklin-1 protein ekspresyonu üzerinde herhangi bir regüle edici etkisinin olmadığını gözlemiş bulunuyoruz. miR-196a inhibitör transfeksiyonu sonucunda Atg5 proteini ekspresyonunun, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücrelerinin her ikisi için de artmasına karşın, artış seviyeleri farklılıkları ise %14 olarak belirlenmiştir. miR-196a inhibitör transfeksiyonunun Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri için belirlenen en büyük farklılığın, Atg12 proteini ekspresyonunda olduğu gözlenmiştir. miR-196a inhibitör, Panc-1 hücrelerinde Atg12 proteini ekspresyonunu belirgin olarak 0,33 kat azaltırken, MiaPaCa-2'de ise yaklaşık 0,5 kat artmıştır. Tüm bu sonuçlar ışığında miR-196a'nın, PDAC hücrelerinde otofajinin regülasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiş olup terapötik amaçla miR-196a inhibitör muamelesinin, gen düzeyinde sadece Panc-1 hücrelerinde hem Beklin-1 hem de Atg5 mRNA ekspresyonlarında, protein düzeyinde ise sadece Panc-1 hücresinde Atg12'nin protein ekspresyonunda etkili bir şekilde inhibisyon sağladığını ortaya koymaktayız. Sonuçlarımız oldukça çarpıcı niteliktedir. Çünkü kanserde ileri metastatik evrede artarak ve metastatik olmayan erken evrede azalarak çift yönlü bir etkiye sahip olan otofaji mekanizması üzerinde miR-196 inhibisyonunun, PDAC'nın en agresif hücrelerinden olan Panc-1 hücrelerinde otofajiyi inhibe ettiğini, tersine MiaPaCa-2'de bu yönde etki göstermediğini saptamamız, miR-196a temelli terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi için oldukça önemlidir.

Sonuçlar

Çalışmamız sonucunda; miR-196a'nın, PDAC hücrelerinin proliferasyonunu indükleyen onkojenik aktiviteye sahip bir üst mediyatör olduğunu göstermiş bulunuyoruz. Ayrıca ileri evrede bir sağ kalım mekanizması görevi görerek kanserin gelişimini indükleyen, tersine erken evrede ise bir hücre ölüm mekanizması rolünü üstlenerek kanserin başlamasını inhibe eden merkezi bir moleküler mekanizma olan otofajinin, PDAC hücrelerinde miR-196a tarafından kontrol edildiğini gözlemledik. Bu sonuçlarımızdan hareketle terapötik anlamda miR-196 inhibitörü kullandığımızda; PDAC hücre proliferasyonunun inhibe olduğu ve takibinde ileri evre PDAC hücresi olan Panc-1'da otofajik mediyatörlerin inhibe olduğu, metastatik özellikleri tanımlanmamış olan MiaPaCa-2'de ise bu mediyatörlerin arttığı saptanmıştır. miR-196a inhibitör tedavisi yaklaşımının, kanserde kontrolü bozulan otofajiyi düzenleyerek PDAC hücrelerinin proliferasyonu azaltmaktadır. Bu sonuçlarımızın, ileriki çalışmalara ışık tutması açısından miR-196a hedefli bir terapötik ajanın geliştirilmesine önemli bir adım düşünmekteyiz.

Teşekkür

Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 4792-YL1-16 nolu proje ile ve kısmi olarak TÜBİTAK tarafından 114S501 nolu proje ile desteklenmiş olup Hafize Elif SÖNMEZ'in Yüksek Lisans Tezidir. Her iki finansal destek kurumuna ve ayrıca PDAC hücrelerini hediye eden Gebze Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof.Dr. Elif Damla ARISAN'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *Cancer J Clin.* 2012;62:10-29.
2. Decker GA, Batheja MJ, Collins JM, Silva AC, Mekeel KL, Moss AA, et al. Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening. *Gastroentol Hepatol.* 2010;6(4):246.
3. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20(2):197-209.
4. Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, Perez-Perez G, Taylor PR, Virtamo J, et al. *Helicobacter pylori* seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(12):937-41.

5. Korc M, Jeon CY, Edderkaoui M, Pandol SJ, Petrov MS. Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(5):529-36.
6. Eibl G, Cruz-Monserrate Z, Korc M, Petrov MS, Goodarzi MO, Fisher WE, et al. Diabetes Mellitus and Obesity as Risk Factors for Pancreatic Cancer. *J Acad Nutr Diet*. 2018;118(4):555-67.
7. Kocaturk NM, Akkoc Y, Kig C, Bayraktar O, Gozuacik D, Kutlu O. Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *Eur J Pharm Sci*. 2019;15(134):116-37.
8. Albulescu R, Popa AC, Codrici E, Popescu DI, Mihai S, Tanase C. (Editor: 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.
9. Yanokura M, Banno K, Iida M, Irie H, Umene K, Masuda K, et al. MicroRNAs in Endometrial Cancer: Recent Advances and Potential Clinical Applications. *EXCLI J*. 2015;2(14):190-8.
10. Gurbuz N, Ozpolat B. MicroRNA-based Targeted Therapeutics in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res*. 2019;39:529-32.
11. Fantini S, Salsi V, Vitobello A, Rijli FM, Zappavigna V. MicroRNA-196b is transcribed from an autonomous promoter and is directly regulated by Cdx2 and by posterior Hox proteins during embryogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(8):1066-80.
12. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttgies J, Munding JB, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem*. 2008;54(10):1716-24.
13. Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
14. Lu YC, Chang JT, Chan EC, Chao YK, Yeh TS, Chen JS, et al. miR-196, an Emerging Cancer Biomarker for Digestive Tract Cancers. *J Cancer*. 2016;7(6): 650-5.
15. 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.
16. 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 Chromosom Cancer*. 2012;51(6):557-68.
17. Lee YS, Kim H, Kim HW, Lee JC, Paik KH, Kang J, et al. High Expression of MicroRNA-196a Indicates Poor Prognosis in Resected Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *Medicine*. 2015;94(50):1-8.
18. 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):217-21.
19. Liu-Minghao BS, Du- Yiqi MD, Gao- Jun MD, Liu- Jianqiang MD, Kong- Xiangyu MD, Gong- Yanfang BS, et al. Aberrant Expression miR-196a is Associated With Abnormal Apoptosis, Invasion, and Proliferation of Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas*. 2013;42(7):1169-81.
20. 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.
21. Liu B, Wen X, Cheng Y. Survival or death: disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. *Cell Death Dis*. 2013;4(10):e892.
22. Song YJ, Zhang SS, Guo XL, Sun K, Han ZP, Li R, et al. Autophagy contributes to the survival of CD133+ liver cancer stem cells in the hypoxic and nutrient-deprived tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 2013;339(1):70-81.
23. Zhu H, Wu H, Liu X, Li B, Chen Y, Ren X, et al. Research Paper Regulation of autophagy by a Beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*. 2009;5(6):816-23.