T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU.86.86 METASTATİK VE BXPC-3 METASTATİK OLMAYAN PANKREAS KANSER HÜCRE HATLARINDA *KERATİN 19 (KRT19)* VE *TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (TMPRSS4)* GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

SEDA YAVUZARSLAN

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU.86.86 METASTATİK VE BXPC-3 METASTATİK OLMAYAN PANKREAS KANSER HÜCRE HATLARINDA *KERATİN 19 (KRT19)* VE *TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ 4 (TMPRSS4)* GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

SEDA YAVUZARSLAN

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ SÜREYYA BOZKURT

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı	Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER	Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğretim Üyesi Süreyya Bozkurt
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Veysel Sabri Hançer	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğretim Üyesi Süreyya Bozkurt	İstinye Üniversitesi
Prof. Dr. Matem Tunçdemir	İstanbul Üniversitesi

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum,“Su.86.86 Metastatik ve Bxpc-3 Metastatik Olmayan Pankreas Kanser Hücre Hatlarında *Keratin 19 (Krt19)* ve *Transmembran Serin Proteaz 4 (Tmprss4)* Genlerinin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması” adlı çalışmanın, 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 olmadığı beyan ederim.

Seda YAVUZARSLAN

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans eğitimimin başından sonuna ve tez çalışmasının planlanmasında, yazımında, yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, bilgileri ve tecrübeleriyle beni yönlendiren sayın tez danışmanı hocam Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT, tez yapım aşamasında göstermiş olduğu sabır ve yardımlarından dolayı sayın Dr. Öğr. Üyesi Muradiye ACAR'a ve katkılarından dolayı Araştırma Görevlisi Hüseyin AYHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı hocamız Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e de bu süreçte verdiği öneriler ve deney malzemelerindeki yardımlarıından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sürecinde hep yanımda olan ve yardımını hiç esirgeyen sevgili arkadaşım Merve SOYUĞUR'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın boyunca beni hep destekleyen, emeklerini hiç esirgemeyen babam Metin YAVUZARLAN'a, annem Vesile YAVUZARSLAN'a ve kardeşlerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
ETİK BEYANI ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... İX
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 2
1.1. Pankreas Kanseri 2
1.1.1. Epidemiyoloji 2
1.1.2. Pankreas Kanseri Aşamaları 3
1.1.3. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri 3
1.1.4. Erken Pankreas Gelişimini Düzenleyen Sinyal Yolakları 4
1.1.5. Pankreas Neoplazisinin Modeli 6
1.1.6. Pankreas Kanserinde Rol Alan Proto-Onkojenler Ve Tümör Baskılayıcılar 6
1.1.7. KRAS Onkogeni 8
1.2. *KERATİN19* Geni 8
1.3. *TMPRSS4* Geni 10
2. MATERYAL VE METOD 12
2.1. Hücre Kültürü 12
2.1.1. Hücre Hatlarının Stoktan Elde Edilmesi 12
2.1.2. Besiyeri Değiştirme 12
2.1.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması 12
2.1.4. Hücre Soylarının Stoklanması 13
2.1.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı 13
2.2. Total RNA İzolasyonu 13
2.3. cDNA Sentezi 14

2.4. Kantitatif PCR.....15
3. BULGULAR.....17
3.1. KANTİTATİF PCR (QPCR) SONUÇLARININ ANALİZİ.....17
4. TARTIŞMA.....19
5. SONUÇ.....23
KAYNAKÇA.....24

TABLOLAR LİSTESİ

TABLO 2.1: CDNA sentez reaksiyonunda kullanilan bileşenler 15
TABLO 2.2: Tasarlanan primer dizileri 15
TABLO 2.3: QPCR reaksiyonu için eklenenler 16
TABLO 2.4: QPCR döngü aşamalari 16

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Pankreas gelişimini koordine eden ana sinyal yollari (Bastidas-Ponce Et Al., 2017) 6
Şekil 1.2: Pankreas kanserinde en sık mutasyona uğrayan genler (Zavoral, Minarikova, Zavada, Salek, & Minarik, 2011) 8
Şekil 1.3: Pankreas kanseri ilerleme modeli 8

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

α : Alpha
β : Beta
δ : Delta
ε : Epsilon
µl : Mikrolitre
°C : Santigrat Derece
µg : Mikrogram
µM : Mikromolar
AKT : Akt serine
APC : Adenomatozis Polipozis Coli
BEAS-2B : İnsan Bronşiyal Epitel Hücre Hattı
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BRCA2 : Meme Kanseri Gen 2
BXPC-3 : Pankreas Kanseri Hücre Hattı
cDNA : Complementary DNA
CO_2 : Karbondioksit
Ct : Cycle of Treshold
CTNNB1 : Catenin β1
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP : Deoksi- Nucleoside Triphosphate
DTT : Dithiothreitol
EMT : Epithelial Mesenchymal Transition
FBS : Fetal Bovine Serum
FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2
FGF10 : Fibroblast Growth Factor 10
FGFR2 : Fibroblast Growth Factor Receptor 2
FGFR2b : Fibroblast Growth Factor Receptor 2b
GAPDH : Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz

GDP : Guanozin Difosfat

GKLF/KLF4 : Gut-enriched Krüppel-like factor

GTP : Guanozin trifosfat

Hes1 : Saçlı ve split tipi protein

KRT19 : Keratin 19

M : Molar

MMP : Matris Metaloproteinaz

mL : Mililitre

MPC : Multipotent Progenitör Hücreler

mRNA : Messanger RNA

ng : Nanogram

NSCLC : Küçük hücre dışı akciğer kanser hücresi

PanIN : Pankreas İntraepitelyal Neoplazi

PDAC : Pancreatic Ductal Adenocarsinoma

PDX1 : Pancreatic And Duodenal Homeobox 1

PIK3CA: : Phosphoinositide 3- Kinaze

PP: : Pancreatic Polypeptide

Ptf1a: : Pancreas Transcription Factor 1a

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA : Ribo Nükleik Asit

rpm : Rounds Per Minute

RPMI-1640 : Roswell Park Memorial Institue-1640

RTE : Reverse Transcription Enzyme

RT-PCR : Real- Time Polymerase Chain Reaction

Shh : Sonic Hedgehog

SOX9 : Sex-determining Region Y box 9

SU.86.86 : Metastatik Pankreas Kanseri Hücre Hattı

TGFB : Transforming Growth Factor Beta

Tm : Melting Temperature

TMPRSS4 : Transmembrane Serine Protease 4

TNM : Tümör, Lenf Nodu, Metastaz

TP16: : Tümör Protein 16

TP53 : Tümör Protein 53

TTSP: **:** Transmembran Serin Proteaz

ΔΔCt **:** Delta Delta Cycle Of Treshold

ÖZET

Yavuzarslan, S. (2020). Tezin Adı. Metastatik Ve Bxpc-3 Metastatik Olmayan Pankreas Kanser Hücre Hatlarında *Keratin 19 (Krt19)* Ve *Transmembran Serin Proteaz 4 (Tmprss4)* Genlerinin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Yüksek Lisans Programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Çalışmadaki amaç; Bu tez çalışmasında metastatik pankreas kanser hücre hattı SU.86.86 ile metastatik olmayan pankreas kanser hücre hattı BxPC3 hücrelerinde *Keratin 19* (*KRT 19)* ve *transmembran serin proteaz 4 (TMPRSS4)* genlerinin ifade düzeyleri, transkripsiyonel aşamada belirlenecek ve olası farklılıklar ortaya çıkarılacaktır. Buradan bu iki genin pankreas kanserinde metastatik biyobelirteç olabilme kapasiteleri değerlendirilecektir. Araştırmanın amacı doğrultusunda hücre kültürü teknikleri, RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve real time PCR yöntemleri kullanılmıştır. Pankreas hücre hatları kültüre edildikten sonra total RNA izolasyonu yapılıp komplementer DNA'lara dönüştürülmüştür. Kontrol grubu olarak insan bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B kullanılmıştır. KRT19 ve TMPRSS4 genlerine özgü primerler tasarlanarak real time PCR yapılmıştır.
Araştırmada elde edilen gerçek zamanlı PCR sonuçlarının ΔΔCt hesaplaması sonucunda SU8686 hücre hattında BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, *TMPRSS4* geninin ifadesinde 1,31 kat azalış olduğu; *KRT19* geninin ifadesinde ise 1234 kat artış olduğu saptanmıştır. Değerlendirilen diğer hücre hattı olan BxPC3 hücre hattında yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçlarının ΔΔCt hesaplaması sonucunda BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, *TMPRSS4* geninin ifadesinde 2,38 kat azalış, *KRT19* geninin ifadesinde 183 kat artış saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Pankreas kanseri, Keratin 19 geni, TMPRSS4 geni

ABSTRACT

Yavuzarslan, S. (2020). Comparison Of Expression Levels Of *Keratin 19 (Krt19)* And *Transmembrane Serine Protease 4 (Tmprss4)* Genes İn Su.86.86 Metastatic And Bxpc-3 Non-Metastatic Pancreatic Cancer Cell Lines. Istinye University, Institute of Health Science, Medical Biology And Genetics Master Program. Master Thesis. Istanbul.

The purpose of the study; In this thesis study, expression levels of *Keratin 19 (KRT 19)* and *transmembrane serine protease 4 (TMPRSS4)* genes in metastatic pancreatic cancer cell line SU.86.86 and nonmetastatic pancreatic cancer cell line BxPC3 cells will be determined at the transcriptional stage and possible differences will be revealed. Here, the capacity of these two genes to be metastatic biomarkers in pancreatic cancer will be evaluated. Cell culture techniques, RNA isolation, cDNA synthesis and real time PCR methods were used for the purpose of the study. After pancreatic cell lines were cultured, total RNA was isolated and transformed into complementary DNAs. Human bronchial epithelial cell line BEAS-2B was used as a control group. Real time PCR was performed by designing primers specific to *KRT19* and *TMPRSS4* genes.
As a result of the Ct calculation of the real-time PCR results obtained in the study, it was found that the expression of *TMPRSS4* gene decreased by 1.31 times in the SU8686 cell line compared to the BEAS-2B control cell line; A 1234-fold increase in expression of the *KRT19* gene was found. As a result of the real-time PCR calculation of the BxPC3 cell line, which was the other cell line evaluated, a 2.38-fold decrease in the expression of the *TMPRSS4* gene and an 183-fold increase in the expression of the *KRT19* gene were found compared to the BEAS-2B control cell line.

Key Words: Pancreas cancer, Keratin 19 gene, TMPRSS4 gene

GİRİŞ

Pankreas kanseri en ölümcül kanser tiplerinden biridir. Pankreas kanserinin erken tanısı diğer tüm kanserlerde olduğu gibi hayatta kalım süresini arttırmaktadır. Bu sebeple metastatik biyobelirteç olarak kullanılabilecek biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan az sayıdaki çalışmalarda *Keratin 19* ve *TMPRSS4* gen düzeylerinin metastatik pankreas kanserlerinde arttığı ve biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Cheng et al., 2019; Dugnani et al., 2018). Bu çalışmada amaç; pankreas kanser hücre hattı SU.86.86 ile metastatik olmayan pankreas kanser hücre hattı BxPC3 hücrelerinde *KRT 19* ve *TMPRSS4* genlerinin ifade düzeyleri, transkripsiyonel düzeyde araştırılmasıdır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Pankreas Kanseri

Kanser, hücrenin büyüme ve gelişmede normal davranışını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu oluşur. Hücrede temel görevleri; hücrede sinyal iletimi, hücre döngüsünün ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesidir. Bu işlemlerde görev alan birçok proteinin kontrolsüz çoğalarak anormal davranışları sebebiyle tanımlanmıştır. Vücudumuzdaki hücre çeşitliliğe bağlı olarak kanser herhangi bir hücrede meydana gelebilir ve vücudun başka bölgelerine yayılım gösterebilir. Pankreas vücudumuzda çift işleve sahip önemli bir salgı bezidir. Pankreas kanseri, pankreasta bulunan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile meydana gelir.

Pankreas kanseri genellikle erkeklerde ve 40-85 yaşlarında daha sık görülen ölümcül bir kanser türüdür. En çok görülen histolojik tipi Pankreas duktal adenokarsinomudur (Abreu, Liu, & Tsongalis, 2017). Tüm kanserlerin %2'sini ve kansere bağlı ölümlerin %5'ini oluşturur. Asemptomik kanser türleri içerisinde pankreas kanseri ilk sıradadır (Goral, 2015). Pankreas kanseri, batı ülkelerinde kansere bağlı olarak meydana gelen ölümlerin 4. nedendir (Del Chiaro, Segersvard, Lohr, & Verbeke, 2014).

Pankreas kanseri, hastalarda bulgu göstermemesi ve erken teşhis imkanı sağlamaması sebebi ile Amerika Birleşik devletlerinde yetişkinlerde en ölümcül 4. Kanser türü olarak gösterilmektedir. Lokalize aşamada yalnızca %9'u teşhis edilebilmektedir. Hastaların %29 'unda bölgesel lenf nodu yayılımı gözlenirken, % 52'si başka organlara sıçrayarak metastatik hastalık ile başvurur. Metastatik hastalık gösteren hasta için sağ kalım oranı %2,3 iken ve lokalize hastalık gösteren hasta için sağ kalım oranı %5,8'dir.

1.1.1. Epidemiyoloji

Dünyada görülen kanser türleri arasında pankreas kanseri 14. Sırada yer almaktadır ve kanserden kaynaklanan ölümlerin en fazla 7. Sebebi olarak gösterilmektedir (McGuigan et al., 2018). Dünya çapında pankreas kanseri oranları erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir.

Pankreas kanseri genellikle ileri yaşlarda görülen bir kanser türüdür. 55 yaş üzerinde yeni tanı konmuş hastaların oranı %90 'dır (Midha, Chawla, & Garg, 2016; H. E. Wood et al., 2006).

Ailesel risk faktörleri olan hastalar, aile öyküsü olmayanlara göre dokuz kat daha fazla pankreas kanseri riskine sahiptir. Daha önce 3 ya da daha fazla birinci derece akrabaya teşhis konduğunda 32 kat daha fazla risk oluşturmaktadır (Becker, Hernandez, Frucht, & Lucas, 2014).

2016 yılı Türkiye kanser istatistiklerine göre 50-69 yaş gruplarında en sık görülen kanserler arasında pankreas kanseri; erkeklerde yüzde %2,5 oranı ile 6. Sırada, kadınlarda %3.7 oran ile 6. sırada yer almaktadır. 70 yaş ve üzeri yaş gruplarında en sık görülen kanserler arasında pankreas kanseri; erkeklerde yüzde %2,5 oran ile 6.sırada, kadınlarda %3.7 oranı ile 6. Sırada yer almaktadır (TÜİK,2016).

1.1.2. Pankreas Kanseri Aşamaları

Pankreas kanserinde sağ kalım oranının iyileştirilmesi için erken ve doğru tanı gereklidir (Ansari et al., 2016). Tüm pankreas tümörleri TNM evreleme sistemine göre sınıflandırılır (Ansari et al., 2016).

TX: Birincil tümör olarak değerlendirilmemektedir.

T0: birincil tümör için kanıt gözlemlenememektedir.

Tis: Yerinde karsinom gözlemlenir.

T1: Tümör pankreas ile sınırlıdır, en büyük boyutta ≤ 2 cm

T2: Tümör pankreas ile sınırlıdır, en büyük boyutta >2 cm

T3: Tümör Pankreas dışarısına çıkmıştır, pankreas sınırları dışarısında dokulara, organlara uzanmaktadır.

T4: Tümör karın boşluğuna ya da mezenter arteri tutulumu gözlemlenir.

1.1.3. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri

Pankreas kanseri son yıllarda giderek artmakta olan tehlikeli bir kanser türüdür. Pankreas kanseri semptom göstermeyen kanser türleri arasında ilk sırada yer alır. %90 oranında olgular adenokarsinomdur. Pankreas kanserinde ailesel eğilim %10 oranındadır. Pankreas kanseri kalıtımsal ya da kanserle ilişkili genlerde meydana gelen

mutasyonlar sonucu olur. Kanserle ilişkili genlerde meydan gelen mutasyonlar kanserin metastaz yapmasına neden olur (Goral, 2015). Aile öyküsünde pankreas kanseri olan bireyler yüksek risk altındadır. Pankreas kanserinde farklı germline genetik mutasyonlar yer almaktadır. BRCA2 mutasyonunda meme, pankreas, prostat kanseri riskleri daha fazladır.

Yaş durumu, fazla kilolar, sigara içmek, uzun süreli alkol kullanımı, aile öyküsü pankreas kanseri için önemli risk faktörleridir (Wolfgang et al., 2013). Sigara içilmesi önemli bir risk faktörüdür. Sigara içen bir bireyin, sigara içmeyen bir bireye göre 2.2 kat daha fazla pankreas kanseri olma riski vardır. DNA fingerprinting yöntemi ile yapılan çalışmada sigara içen bireylerin, sigara içmeyen bireylere göre daha fazla mutasyon olduğu kanıtlanmıştır. Daha yüksek alkol tüketiminin de pankreas kanseri ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Kronik pankreatite sahip bireyler, kronik pankreatite sahip olmayan bireylere göre 2.7 kat daha fazla pankreas kanseri olma riskini artırır. Günümüzde pankreas kanserinin genetik bir eğilimden (kök hücre hastalığı) kaynaklandığına dair görüşler bulunmaktadır (Avila & Kissil, 2013; Fang et al., 2013; Gnoni et al., 2013; Hezel, Kimmelman, Stanger, Bardeesy, & Depinho, 2006; Jamieson et al., 2012; L. D. Wood, 2013).

1.1.4. Erken Pankreas Gelişimini Düzenleyen Sinyal Yolakları

Pankreas, sindirim enzimlerini üreten bir ekzokrin bölme ve pankreas hormonları üreten bir endokrin bölmeden oluşur (Bastidas-Ponce, Scheibner, Lickert, & Bakhti, 2017). Ekzokrin bölmesi, besin-sindirim zimojenlerini salgılayan asiner hücreleri ve bu enzimleri nötralize eden ve onları oniki parmak bağırsağına taşıyan bir duktal epitel içerir. Buna karşılık, endokrin hücreler, kan dolaşımına salgılanan birkaç peptid hormonu üreterek, glikoz homeostazında pankreasın düzenleyici işlevine aracılık eder. Bu hücreler, Langerhans adacıklarında kümelenir ve sırasıyla glukagon, insülin, somatostatin, pankreatik polipeptit ve grelin sentezleyen α-, β-, δ-, PP- ve ε hücrelerini içerir (Pan & Wright, 2011; Shih, Wang, & Sander, 2013).

Erken pankreasın indüksiyonu ve büyümesi bir dizi sinyal yolları mevcuttur (Tablo 2). Bu sinyallerin çoğu notokord, aort endoteli ve çevresindeki mezenşimden elde edilir. Örneğin, pankreas tomurcuklanmadan önce, olası dorsal endoderm notokordun yakınındadır (Wessells & Cohen, 1967). Pankreas oluşumunu indüklemek için aktivin-βB ve FGF2 dahil olmak üzere izin veren morfojenik sinyalleri serbest

bırakır (Kim et al., 2000; Kumar & Melton, 2003; Martin et al., 2005). Bu sinyaller esas olarak dorsal pankreas epitelindeki sonic hedgehog (Shh) sinyalini bastırarak pankreas gen ekspresyonunu aktive eder ve dolayısıyla uygun pankreas indüksiyonuna izin verir (Hebrok, Kim, & Melton, 1998; Xuan & Sussel, 2016). Aktivin reseptörü tip A ve B yoluyla sinyalleşme aynı zamanda Shh aktivitesini de inhibe eder ve buna paralel olarak aktivin reseptörlerindeki mutasyonlar, Shh ekspresyonunu artırır ve pankreas oluşumunu bozar (Hebrok et al., 1998; Kim et al., 2000)

Erken pankreasın gelişimi, pankreas epiteliyle çevreleyen mezenşim arasındaki aktif çapraz karışmaya da dayanır (Golosow & Grobstein, 1962). Mezenkim, pankreas gelişimini indükleyen FGF10, BMP'ler ve follistatin gibi faktörler üretir (Bhushan et al., 2001; Miralles, Czernichow, & Scharfmann, 1998; Norgaard, Jensen, & Jensen, 2003). FGF10 ve reseptörü FGFR2b aracılığıyla sinyalleşme, Pdx1 ve Ptf1a ekspresyonunu koruyarak ve güçlendirerek pankreas progenitör proliferasyonunu ve pankreas tomurcuklarının büyümesini indükler (Bhushan et al., 2001). Ek olarak, tomurcuk oluşumu sırasında Sox9, FGFR2 ve FGF10, FGF10'un epitelyal Sox9 ekspresyonunu koruduğu ve Sox9'un FGF10 sinyalleşmesine izin vermek için Fgfr2 ekspresyonunu düzenlediği bir ileri bilgi akışı oluşturur; Bu döngünün bozulması, hücre kimliğinin kaybına neden olur (Seymour et al., 2012).

Multipotent progenitör hücreler (MPCs) bakımını düzenleyen bir başka önemli ve iyi çalışılmış harici sinyal yolu, Notch / Delta sinyal yoludur (Hald et al., 2003; Murtaugh, Stanger, Kwan, & Melton, 2003). Dll1 gibi Notch ligandlarının ekspresyonu başlar ve pankreas epitelindeki birincil geçiş boyunca devam eder (Apelqvist et al., 1999), progenitör havuzunu korumak ve arttırmak için pankreas tomurcuklarında Hes1 ekspresyonunu indükler. Bu sadece MPC'lerin çoğalmasını artırarak değil, aynı zamanda progenitör durumunu koruyarak ve bir endokrin hücre kaderine doğru farklılaşmayı önleyerek elde edilir (Ahnfelt-Ronne et al., 2012; J. C. Lee et al., 2001).

Notch'un bu işlevi, uygun sayıda pankreas hücresi sağlamada önemlidir; Pankreas gelişiminin erken aşamalarında Hes1 delesyonu, progenitörlerin endokrin hücrelere farklılaşmasına neden olur ve pankreas hipoplazisini indükler (Horn et al., 2012; Jensen et al., 2000).

Gelişim evresi	Uyarıcı faktör	Engelleyici faktör
Dorsal ve versal tomurcuk indüksiyonu	RA, Activin, FGF, VEGF	Shh, FGF, BMP, Notch
MPC bakım ve yayılma	FGF10, Notch, Ihh, Wnt/β-catenin, Hippo	
MPC farklılaşma	Gdf11	Notch
Dallanma morfogenezi	EGF-ErbB, FGF10, Ephrin B2/3, ECM-integrin sinyali	Hh
Endokrin spesifikasyonu	TGFβ, EGF, Wnt/β-catenin, Wnt/PCP, VEGF, S1p	Notch

Şekil 1.1: Pankreas gelişimini koordine eden ana sinyal yolları (Bastidas-Ponce et al., 2017)

1.1.5. Pankreas Neoplazisinin Modeli

Klasik pankreas kanseri gelişimi modeli, öncü lezyonlardan invaziv karsinomaya morfolojik ve moleküler dönüşümü tanımlamaktadır (Hruban, Goggins, Parsons, & Kern, 2000). Kanal lezyonlarının sınıflandırılması için standart isimlendirme ve tanı kriterleri, temel olarak pankreas intraepitelyal neoplazi (PanIN) derecelerine dayanmaktadır (Hruban et al., 2001). 1A, 1B, 2 ve 3 dereceleri, polarite kaybı, nükleer kalabalıklaşma, genişlemiş çekirdekler, yalancı tabakalaşma ve hiperkromatizm ile karakterize büyüyen sitolojik atipiyi temsil eder. Her PanIN aşaması, belirli genleri ve genetik yolları etkileyen genetik düzensizliklerle karakterize edilen farklı bir moleküler süreç modeli ile karakterize edilir.

1.1.6. Pankreas Kanserinde Rol Alan Proto-Onkojenler Ve Tümör Baskılayıcılar

PanIN modelinde, genetik değişiklikler, hücre büyümesi, bölünmesi, apoptoz ve göç gibi tüm moleküler sistemlerin kararsızlığını indükleyen, hücresel sinyallerde önemli bir role sahiptir. Proto-onkojenler, büyüme faktörleri, sinyal dönüştürücüler, transkripsiyon faktörleri veya apoptotik inhibitörler gibi bu sistemler için pozitif

düzenleyiciler görevi gören proteinleri kodlar. Mutasyona uğramış formları olan onkojenler genellikle kanser hücrelerinde bulunur.

Mutasyon, onkojenlerin protein ürünlerinin kalıcı olarak aktive olmasına neden olur ve bu da kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur (Zavoral, Minarikova, Zavada, Salek, & Minarik, 2011).

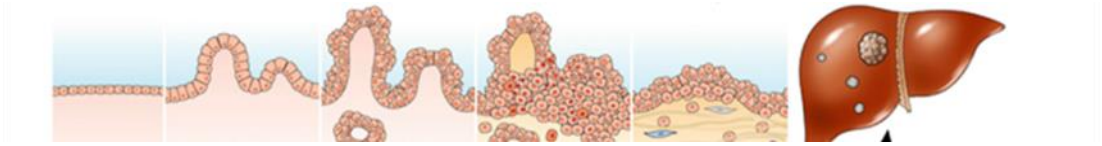
Onkojenik mutasyonlar baskın bir karaktere sahiptirler bu nedenle, burada meydana gelen bir alel eksikliği ölümcül bir sonuç için yeterlidir. KRAS, CTNNB1 (β-catenin), PIK3CA veya AKT1 dahil olmak üzere pankreas kanseri oluşumunda rol oynayan birkaç anahtar proto-onkojen vardır. En yaygın onkojenik mutasyon türleri nokta mutasyonu, delesyon, gen amplifikasyonu ve gen yeniden düzenlemesidir. Tümör baskılayıcı genler, sinyal inhibitörleri, negatif transkripsiyon faktörleri, apoptoz aktivatörleri veya DNA onarım sistemlerinin üyeleri gibi hücre proliferasyonuna karşı hareket eden proteinleri kodlar. Genetik değişimin bir sonucu olarak, normal işlevleri azalabilir veya tamamen ortadan kaldırılabilir. Tümör baskılayıcı deaktivasyonunun ayrı bir mekanizması hipermetilasyondur (Herman, Jen, Merlo, & Baylin, 1996). Pankreas kanserinde, sıklıkla etkilenen tümör baskılayıcılar arasında TP53, APC, SMAD4 ve TP16 bulunur. Pankreas kanserinde en sık mutasyona uğrayan genler Şekil 2.2'de listelenmiştir (Bamford et al., 2004; Jackson, Lea, Rashid, Peddada, & Dunnick, 2006).

Gene	**Protein ismi**	**Mutasyon sıklığı(%)**	**Tip**	**Ana sinyalleşme veya sistem**
KRAS	K-ras	58	Protoonkogen	Ras/Raf/ MAPK
TP53	Tümör protein p53	37	Tümör süpresör	Apoptoz hücre döngüsü kontrolü
CDKN2A	Tümör protein p16(INK4A)	29	Tümör süpresör	Hücre döngüsü kontrolü
CTNNB1	β-catenin	24	Protoonkogen	Wnt
SMAD4 DPC4	Smad Dpc4	22	Tümör süpresör	TNFbeta/SMAD
APC	Apc	16	Tümör süpresör	Wnt
PIK3CA	Fosfoinositide 3-kinase	5	Protoonkogen	PTEN/PI3K/AKT

Şekil 1.2: Pankreas kanserinde en sık mutasyona uğrayan genler (Zavoral, Minarikova, Zavada, Salek, & Minarik, 2011)

1.1.7. KRAS Onkogeni

K-Ras, pankreas kanseri hastalarının>% 90'ında nokta mutasyonlarıyla aktive olur ve düşük dereceli PanIN lezyonlarında bulunan en erken genetik değişikliktir (Jones et al., 2008; Kanda et al., 2012). Sürekli proliferasyon ve hayatta kalma için pankreas kanseri hücreleri için sürekli K-Ras sinyali gereklidir (Collins et al., 2012). Ras proteinleri küçük G proteini süper ailesine aittir ve aktiviteleri GTP ve GDP gibi guanin nükleotidleri tarafından düzenlenir.



Şekil 1.3: Pankreas kanseri ilerleme modeli

1.2. *KERATİN19* Geni

İnsan keratin-19 (KRT19), KRT19 geni tarafından kodlanan 40 kDa tip I keratin proteinidir. Keratin proteinleri, epitel hücrelerinin yapısal bütünlüğünden sorumlu olan ara filaman proteinleridir (Rogel, Jaitovich, & Ridge, 2010). KRT19 spesifik olarak epitel kaynaklı hücrelerde eksprese edilir ve genellikle sağlıklı kişilerin periferik kanında tespit edilemez. Son çalışmalar epitel kaynaklı kanserli hastaların kanında eser miktarda KRT19 proteini tespit etti. Ayrıca, göğüs kanseri (Kabir, Ronnstrand, & Kazi, 2014), tiroid kanseri (Prasad et al., 2005), hepatoselüler karsinom (Govaere et al., 2014), pankreas kanseri (de Albuquerque et al., 2012), oral skuamöz hücreli karsinom (Okamoto et al., 2013) ve renal hücreli neoplazilerde (Paiva et al., 2011) KRT19 aşırı ekspresyonu gözlemlenmiştir.

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), 2030 yılına kadar kansere bağlı ölümlerde dünyadaki ikinci neden olarak ilerlemektedir (Rahib et al., 2014). Pankreas

ductal adenokarsinomun, yeni ilaçlar ve hedefli tedaviler geliştirilmesine rağmen prognozu çok zayıftır. PDAC ameliyat ile çıkarılabilir olduğu durumlarda bile, lokal veya yaygın hastalık yineleme oranı yüksektir (Dugnani et al., 2018). PDAC insidansı ve mortalitesi, genellikle geç tanı, zor klinik aşaması ve kemoterapi ve radyoterapiye zayıf bir yanıtın kombinasyonu nedeniyle örtüşmektedir. PDAC'lı hastaların 5 yıllık genel sağ kalım oranları %6 civarındadır. PDAC'lı hastaların sadece %15-20'si lokalize ameliyat ile çıkarılabilir durumda ve tedavi edilebilir bir tümör ile tanıya gelir. Ameliyat edilen hastaların genel sağ kalım oranı, ameliyattan sonra 2 yıl içerisinde %60'ında lokal ya da metastatik yineleme gerçekleşmesiyle yetersiz kalmaktadır(Castellanos & Merchant, 2014; Van den Broeck et al., 2009; Wangjam et al., 2015).

Tedaviye direnç nedeniyle metastatik yayılmanın sonucunda kanserli hastaların %90'ından fazlası ölmektedir. Bununla birlikte, tümör hücresinin invazyonu ve metastazı, hücresel göçü, lenfotik sistemler yoluyla yayılmayı, yeni bir dokuda koloni oluşumu ve büyük metastazlara gelişmeyi içeren karmaşık bir süreçtir (Canel, Serrels, Frame, & Brunton, 2013).

Normal hücrelerde büyüme kontak intibisyonu ile kontrol edilmektedir. Epitel hücreler arasındaki hücre bağlantılarına desmozom ve sıkı bağlantılar aracılık eder (Itoh & Bissell, 2003). Hücre- hücre arasındaki bağlantılar tümör hücresi için oldukça önemlidir (Quail & Joyce, 2013). PDAC duktal epitelden meydana gelen malign bir tümördür (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2012). yeni teknolojiler bulunması ve teşhis yöntemlerinin gelişmesine rağmen pankreas kanserinin erken teşhisi konulamamaktadır. PDAC hastalarının % 85'inden fazlası genellikle metastazlı ileri bir aşamada teşhis edilir ve 5 yıllık sağkalım oranı% 5'in altındadır (Hidalgo, 2010; Siegel, Ma, Zou, & Jemal, 2014). Bununla birlikte, PDAC'nin metastazına ve kötü prognozuna dahil olan hücresel ve moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle, PDAC'nin erken tespitine izin verebilecek, metastaz ile ilişkili biyobelirteçleri tanımlamak önemlidir

Pankreas kanserinde uygulanacak terapötik tedaviyi en uygun hale getirmek için, tedaviye gelecek zamanlarda oluşabilecek nükse karşı tümör yanıtını tahmin yeteneği ile daha iyi prognostik biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Tutarlı bir şekilde, insan PDAC örneklerinde yüksek keratin19 ve mRNA seviyeleri, azalmış genel sağ kalım ve erken tekrarlama ile ilişkilendirilmiştir.

1.3. *TMPRSS4* Geni

Transmembran proteaz, serin 4 (TMPRSS4), onkojenik önemi ve moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, pankreas, tiroid, akciğer ve diğer kanser dokularında hücre yüzeyinde yüksek oranda eksprese edilen yeni bir tip II transmembran serin proteazdır (Liang, Wu, Bu, Zhao, & Xie, 2013). Başlangıçta TMPRSS3 olarak adlandırılan transmembran proteaz, serin 4 (TMPRSS4) geni, 11.q23.3 kromozomunda bulunur ve tip II transmembran serin proteazlar (TTSP'ler) ailesinin bir üyesini kodlar (Netzel-Arnett et al., 2003). Tip II transmembran serin proteazlar (TTSP'ler), plazma membranlarına doğrudan tutturulmuş proteolitik enzimler ailesidir (Szabo & Bugge, 2008).

TTSP'lerin hücre sinyal iletimi transdüksiyonuna katıldığı ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hooper, Clements, Quigley, & Antalis, 2001). TTSP'ler hücre dışı matrisi bozarak dokulardaki hücrelerin hem göçünü hem de difüzyon yeteneklerini artırabilir. Dahası, tümörün büyümesi ve ilerlemesi sırasında TTSP seviyeleri artar (Benaud, Oberst, Dickson, & Lin, 2002). TTSP'ler tümör hücrelerinin çoğalmasına, göçüne ve enfeksiyonuna katılabilir (Benaud et al., 2002; Hooper et al., 2001; Netzel-Arnett et al., 2003). TMPRSS4 inhibisyonunun, hücre apoptozu ve artırılmış radyoterapi etkinliğini teşvik ederek kanser hücresi çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (Fan et al., 2018; Huang et al., 2014; Jung et al., 2008; Y. Lee et al., 2016; Li et al., 2011).

Kanserin hücre içine işgali, 3 önemli basamaktan oluşan karmaşık bir süreçtir: hücre dışı matrikse değitirlmiş hücre adezyonu, hücreleri birincil tümör kütlesinden serbest bırakan matriks proteinlerinin bozulması ve yeni oluşturulmuş matriks bozulmasından hücre göçü gerçekleşmesidir (Stetler-Stevenson & Yu, 2001). Kanserin ayırt edici özelliğinden biri proteazların düzensizliğidir. Matris metaloproteinazlar (MMP'ler) ve serin proteazlar dahil olmak üzere hücre dışı proteolitik enzimler, hem doğrudan proteolitik aktivite hem de hücresel sinyal ve fonksiyonların düzenlenmesi yoluyla tümör hücresi invazyonuna ve metastaza katkıda bulunur (Andreasen, Kjoller, Christensen, & Duffy, 1997; Dano et al., 2005; Deryugina & Quigley, 2006; Duffy, 1996; Stetler-Stevenson & Yu, 2001).(Wallrapp et al., 2000)

Çoğu TTSP, esas olarak düzensiz ekspresyonlarına bağlı olarak, tümör gelişimi ve ilerlemesinde rol oynamıştır. TMPRSS4'ün pankreas kanserinde yukarı regüle

edildiği bildirilmiştir (Wallrapp et al., 2000) ve malign tiroid neoplazileri için tanısal bir belirteç olarak önerilmiştir (Kebebew et al., 2005). TMPRSS4'ün epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) kolaylaştırarak insan kanser hücrelerinin invazif ve metastatik potansiyelini kontrol ettiğini bildirdi (Jung et al., 2008).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Hücre Kültürü

Besiyeri, RPMI-1640 içerisinde %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 Penicilin/streptomisin olacak şekilde hazırlandı.

2.1.1. Hücre Hatlarının Stoktan Elde Edilmesi

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80°C den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; ilgili hücrenin büyütülmesinde kullanılan besiyeri içerisine alınarak falkon tüp, 21°C 800 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25 cm2'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO2 içeren ortamda inkübe edildi.

2.1.2. Besiyeri Değiştirme

Flask içerisindeki besiyer ortamı uzaklaştırılarak 1X PBS 25 cm^2'lik flask içerisine 2 ml, 75 cm^2'lik flask içerisine 4 ml eklendi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm^2'lik flask içerisine 5ml, 75 cm^2'lik flask içerisine 10 ml taze besiyeri eklendi.

2.1.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması

Hücre soyları, flask yüzeyini %60-70 kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25 cm^2'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS eklendi, ardından hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması gerçekleştirildi. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37^oC'de, %5 CO_2'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskop altında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına hasar vermesi önlenmiş olundu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 21 ^oC 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve kazanılan hücre peleti

1ml besiyerinde çözündükten sonra hücre süspansiyonu 75 $cm^{2'}$lik flasklara alınarak 37^{o}C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlanmış oldu.

2.1.4. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de, %5 CO2'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 21°C 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldı ve sonra süpernatant kısım aspire edildi. Pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO +5 ml FBS +40 ml DMEM) karanlık ortamda ilave edilerek hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtıldı ve hemen -80°C'ye kaldırıldı.

2.1.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımında; tripsinizasyon işlemi sonucunda kazanılan hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan konarak iyice karışmaları sağlandı. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2. Total RNA İzolasyonu

Kültürlenmiş 1 x 106 hücreden total RNA elde etmek için, Omega Biotek marka, R6834 katalog numaralı RNA izolasyon kit ürünü kullanıldı.

Kit içeriklerinden olan trizol TRK solüsyonuna çeker ocakta 1 mililitre/20 mikrolitre beta-merkaptoetanol ilave edilerek işleme başlandı. Ardından 1 mililitre besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonuna 350 mikrolitre TRK solüsyonu eklendi ve 21G ölçülü 5 mililitrelik steril şırıngalı enjektör ile 10 kez mekanik olarak homojenizasyon yapıldı.

500 mikrolitre %70'lik etil alkol ilave edilerek vortekslenen hücre lizatından 700 mikrolitresi, kit komponentlerinden olan spin kolonlu koleksiyon tüpüne aktarıldı. Örnek, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve koleksiyon tüpüne inen sıvı boşaltılıp santifüj tekrar yapıldı.

Kit içeriğinde olan RNA Yıkama Tamponu I'den 500 mikrolitre kolonlu tüpe eklenerek 10.000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Tüpe inen sıvı boşaltılıp aynı santrifüj, bu kez %99'luk etil alkol ile dilüe edilmiş RNA Wash Buffer II'den 500 mikrolitre eklendi ve tekrarlandı. Bu işlem bir kez daha yapıldı. Herhangi ekleme yapılmadan sadece santrifüj tekrarlanarak tüpe inen sıvı boşaltıldı.

Kolonlu tüp, koleksiyon tüpten ayrılıp kitte mevcut olan yeni bir koleksiyon tüpüne oturtuldu ve bir ekleme yapılmadan 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi.

Kolonlu tüp, boş 1,5 mililitrelik santrifüj tüpüne alındı ve 60 mikrolitre kitte mevcut olan nükleazdan arındırılmış steril distile su eklenerek 10.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Elde etmek istediğimiz RNA' -80 °C kaldırıldı.

RNA konsantrasyon ve saflık oranını ölçmek için, "Nanodrop" cihazı kullanıldı. Örnekten 1 mikrolitre alınarak OD ve konsantrasyon ölçümü yapıldı.

2.3. cDNA Sentezi

cDNA sentez için çalışmamızda Qiagen marka QuantiTect Reverse Transcription Kit ürünü kullanıldı. 10 mikrolitre RNA örnekleri, 65 °C 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 5 dakika yaklaşık olarak 4 °C buzda bekletildi.

5 mikrolitre 5X konsantrasyonlu reaksiyon tamponu, 2 mikrolitre deoksinükleozit trifosfat (dNTP) çözeltisi, 5,25 mikrolitre randomize primerler, 0,5 Molar RNaz inhibitörü, RNA'nın ikincil yapısını oluşturan bağları kırmak için 1,25 Molar dikloro difenil trikloroethan (DTT), 1 Molar ters transkriptaz (reverse transcriptase, RTE) enzimi ve 10 mikrolitre RNA örnekleri eklenere reaksiyon tüpü 25 °C 10 dakika, 50 °C 60 dakika ve 85 °C 5 dakika olacak şekilde işlem gerçekleştirildi. Reaksiyon bitiminde ise cihaz tüpleri 4 °C soğutmaya ayarlandı.

Tablo 2.1: cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
5X Reaksiyon tamponu	5 µl	1X
dNTP	2 µl	100 mM
Randomize primerler	5,25 µl	100 µm
RNaz inhibitörü	0,5 M	0,5 mM
DTT	1,25 M	1,25 mM
RTE	1 M	1 M
RNA örnekleri	10 µl	3 M
Toplam hacim:	25 µl	25 µl

2.4. Kantitatif PCR

qPCR yapılması için ilgili genlerin ifade düzeylerini saptamak için, Tablo 2.2'deki primerler tasarlandı.

Tablo 2.2: Tasarlanan primer dizileri

Genin Adı		Primer Dizilimi
GAPDH	Forward	CATGGCCTTCCGTGTTCCTA
GAPDH	Reverse	TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG
TMPRSS4	Forward	CCTGGCGAGTATCATCATTGTG
TMPRSS4	Reverse	GATCGGTCCTTGGAGAGGCG
KRT19	Forward	CGGGACAAATTCTTGGTGCC
KRT19	Reverse	ATCCAGCACCCTGCGCAGGCC

Amplifikasyon için, "Corbett Research Real-time PCR Thermal Cycler" cihazı kullanıldı ve reaksiyon tüpüne 2X konsantrasyondaki Sybr Green (HibriGen marka, mg-sybr-01-400 katalog numaralı ürün) içerikli karışımından 12 mikrolitre eklendi, reverse ve forward primerlerin her birinden 0,5 mikrolitre eklendi, 3 mikrolitre cDNA örneği ve

4 mikrolite nükleazdan arındırılmış su eklendi (5. Tabloya bakınız.) Reaksiyonun aşamaları 2.3. Tablodaki gibi yapıldı.

Tablo 2.3: qPCR reaksiyonu için eklenenler

İçerik	Miktar	Konsantrasyon
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	12µl	1 X
Forward Primer	0,5 µl	0,3 µm
Reverse Primer	0,5 µl	0,3 µm
Cdna	3 µl	<500 ng
Su	4 µl	
Toplam hacim:	20 µl	

Tablo 2.4: qPCR döngü aşamaları

qPCR Döngü Aşamaları		
Denatürasyon		94 ℃ 4 dakika
Çoğalma	1. Denatürasyon	95 ℃ 30 saniye
	2. Bağlanma	58 ℃ 30 saniye
	3. Uzama	72 ℃ 30 saniye, Floresan okuma
Sonlanma		72 ℃ 10 dakika
		X 36 DÖNGÜ

3. BULGULAR

3.1. Kantitatif PCR (QPCR) Sonuçlarının Analizi

Yapılan kantitatif PCR analizinde; farklı iki hücre hattında gerçekleştirilen *TMPRSS4 ve KRT19* genlerinin anlatım düzeyleri GAPDH genine göre normalize edilerek araştırılmıştır. İlgili genlerin Ct değerleri tablo 1 ve tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 3.1: SU8686 Hücre hattında ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları

	Ortalama Ct Değeri (BEAS-2B)	Ortalama Ct Değeri (SU8686)	ΔCt (BEAS-2B)	ΔCt (SU8686)	İfade Değişimi (Kat) $2^{-\Delta\Delta Ct}$
TMPRSS4	31,92	33,33	-11,16	-11,74	0,76
KRT19	30,78	21,54	-10,22	0,05	1234,74
GAPDH	20,56	21,59			

Tablo 3.2: BXPC3 hücre hattında ortalama Ct değerleriyle kat cinsinden ifade değişimi hesaplama sonuçları

	Ortalama Ct Değeri (BEAS-2B)	Ortalama Ct Değeri (BXPC3)	ΔCt (BEAS-2B)	ΔCt (BXPC3)	İfade Değişimi (Kat) $2^{-\Delta\Delta Ct}$
TMPRSS4	31,92	33,75	-11,36	-12,59	0,42
KRT19	21,16	23,86	-10,22	-2,7	183,54
GAPDH	20,56	21,16			

SU8686 ve BXPC3 hücre hatlarıı, deney grubu olarak kullanılırken BEAS-2B hücre hattı ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir gene ait hesaplamalar bağımsız 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve gen ifadeleri analiz edilirken bu üç deneyin ortalaması kullanılmıştır. Gen anlatımlarının normalize edilmesi için *GAPDH* geni referans gen olarak alınmıştır

Yapılan qPCR analizlerini değerlendirdiğimizde SU8686 hücre hattında BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, ΔΔCt hesaplaması ile *TMPRSS4* geninin ifadesinde 1,31 kat azalış, *KRT19* geninin ifadesinde ise 1234 kat artış saptanmıştır. Değerlendirilen diğer hücre hattı olan BXPC3 hücre hattında aynı genlere ait ifade düzeyleri belirlenmiştir. Buna göre *TMPRSS4* geninin ifadesinde 2,38 kat azalış gözlemlenirken, KRT19 geninin ifadesinde 183 kat artış saptanmıştır

4. TARTIŞMA

Pankreas kanseri son yıllarda giderek artmakta olan tehlikeli bir kanser türüdür. Pankreas kanseri semptom göstermeyen kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır. %90 oranında olgular adenokarsinomu oluşturmaktadır. Pankreas kanseri kalıtımsal ya da kanserle ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu olur. Kanserle ilişkili genlerde meydan gelen mutasyonlar kanserin metastaz yapmasına neden olur (Jianwei, Qi, Quanquan, Tianen, & Qingwei, 2018).

Başlangıçta TMPRSS3 olarak bilinen TMPRSS4, 11.q23.3 kromozomunda bulunur ve tip II TTSP ailesinin bir üyesini kodlar (Wallrapp et al., 2000). Çalışmalar, TMPRSS4'ün pankreas kanseri (Wallrapp et al., 2000), tiroid kanseri (Kebebew, Peng, et al., 2005), akciğer kanseri (Nguyen et al., 2012) ve hepatosellüler karsinom (C. H. Wang et al., 2015) gibi farklı kanser türlerinde yüksek oranda ifade edildiğini göstermiştir. Bu sebeple TMPRSS4 potansiyel olarak güçlü bir biyobelirteç olarak görülmektedir. İnsanda, TMPRSS4'ün fizyolojik rolleri bilinmemekle birlikte, TMPRSS4 mRNA'sı mesane, yemek borusu, mide, ince bağırsak, kolon ve böbrekte tespit edilmiştir (Wallrapp et al., 2000). Dahası, TMPRSS4 ekspresyonu, benign tiroid neoplazmı ile karşılaştırıldığında malignde yukarı regüle edildiği belirlenmiştir. Bu sebeple solid tümörlerde, hem tanısal hem de prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Kebebew, Greenspan, Clark, Woeber, & Grunwell, 2005; Kebebew et al., 2006). Birlikte ele alındığında, TMPRSS4 belirli kanser türlerinin prognozu için yeni bir biyobelirteç olabilir ve teşhis ve terapötikler için kullanılabilir.

Metastatik pankreas kanser hücre hattı olan SU8686 ve metastatik olmayan pankreas kanser hücre hattı olan BXPC3'de yaptığımız bu çalışma sonucunda, literatürde daha önce yapılan çalışmaların aksine, TMPRSS4 gen ifadeisi her iki hücre hattında da düşük bulunmuştur. Min-Sik Kim ve arkadaşları ile Yang Cheng ve arkadaşlarının pankreas kanserinde yaptıkları çalışmada, TMPRSS4'ün, pankreas kanseri hücrelerinin çoğalabilirliğini ve invazivliğini etkilediği ve aşırı ifade edilen edilen TMPRSS4'un kötü prognozu öngördüğü belirtilmiştir (Y. Cheng et al., 2019; M. S. Kim et al., 2012). Transmembran proteaz / serin 4 (TMPRSS4), ilk olarak pankreas kanserinde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Wallrapp et al., 2000). Prostat kanseri

hücrelerinde aşırı eksprese edilen TMPRSS4, EMT (epithelial to mesenchymal transition)'nin ilerlemesi yoluyla göçü desteklemektedir (Jianwei et al., 2018).

Çalışmamıza konu olan pankreas kanserinde TMPRSS4 ile ilgili olarak yapılan çalışmalar oldukça azdır. Ancak diğer solid tümörlerde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Örneğin kolorektal kanserde, TMPRSS4'ün yüksek ifade durumu, ileri TNM evresi ve öngörülen kötü prognoz ile önemli ölçüde ilişkilidir (Huang et al., 2013). Tiroid kanserinde, TMPRSS4'ün tiroid kanseri hücrelerinde proliferasyonun artmasıyla önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Guan et al., 2015). Mide kanserinde, TMPRSS4'ün yukarı regülasyonu, NF-κB / MMP-9 sinyallemesinin aktivasyonu yoluyla hücre göçünü ve istilasını kolaylaştırmaktadır (Jin, Shen, Chen, Bao, & Zhu, 2016). TMPRSS4 protein ekspresyonunun, ileri evrelerden insan kolorektal kanser dokularında (sırasıyla, III ve IV evrelerin % 52,5 ve % 50,0'ı) erken evreye (evre I'de% 6,3) göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdirr, bu da TMPRSS4 non-invaziv tümörlerin invaziv malignitelere ilerlemesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (S. Kim et al., 2010).

Dahası, birçok rapor TMPRSS4'ün tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. Larzabal vd. TMPRSS4'ün shRNA tarafından yıkılmasının H358, H441 ve H2170 hücre hatlarında in vitro hücre göçünü önemli ölçüde azalttığını ve dolayısıyla metastazda TMPRSS4'ün bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Larzabal et al., 2011; Nguyen et al., 2012).

TMPRSS4 belirli kanser türlerinin prognozu için yeni bir biyobelirteç olabilir ve teşhis ve terapötikler için kullanılabilir. Diğer yandan, TMPRSS4 ifadesinin modüle edildiği mekanizma iyi karakterize edilmemiştir. Son zamanlarda, Nguyen ve ark. (Nguyen et al., 2012), hipoksik koşullar altında küçük hücre dışı akciğer kanser (NSCLC) hücrelerinde TMPRSS4'ün arttığını bildirmişlerdir ve bu da tümör mikro ortamı içindeki hipoksinin TMPRSS4 ekspresyonunu artırabileceğini düşündürmüştür.

Ao Huang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmadaki bulgular ilk kez yüksek TMPRSS4'ün kolorektal kanser hastalarının kötü prognozu ile ilişkili olduğunu göstermiş ve diğer önceki yayınlarına göre, TMPRSS4 kolorektal kanser ilerlemesinde önemli bir role sahiptir (Huang et al., 2013).

Semi Kim ve arkadaşlarının çalışmalarında ise TMPRSS4 ekspresyonun, iyi huylu neoplazm veya normal dokularla karşılaştırıldığında kötü huylu tümörlerde yukarı regüle edilidiği ve bu nedenle kanserler için hem tanısal hem de prognostik bir öneme sahip olduğu önerilmektedir (S. Kim & Lee, 2014). Yakın tarihli qPCR çalışmaları, NSCLC hastalarında yüksek TMPRSS4 mesajı seviyelerinin kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (Larzabal et al., 2011). Yapılan bir diğer çalışmada da, yüksek TMPRSS4 ifade oranının, üçlü negatif meme kanseri hastalarında, daha az agresif olan meme kanseri hastalarına göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir (D. Cheng, Kong, & Li, 2013).

Bu tezde araştırılan diğer gen ise KRT19 genidir. Keratin 19 (KRT19) keratin protein ailesinin bir üyesidir. Keratin protein ailesinin üyeleri, epitel hücrelerinin yapısal bütünlüğünün düzenlenmesinde rol oynar. Epitel hücrelerinin yapısal bütünlüğünü korumanın yanı sıra, keratinler hücre sinyallemesinde, stres yanıtında ve apoptozda önemli rol oynarlar (Coulombe & Omary, 2002). Keratinler birden fazla çeviri sonrası değişikliğe uğrar. Apoptoz sırasında KTR19 kaspaz 3 tarafından parçalanır çözünür ve fraksiyonlar kanser hastalarında saptanabilir (Pujol et al., 1993).

Kanserde, K19'un çoklu tümör türleri için en güvenilir prognostik belirteçlerden biri olduğu gösterilmiştir, burada K19'un yüksek ifadesi, kötü sağkalım (Barak, Goike, Panaretakis, & Einarsson, 2004; Karantza, 2011) ile ilişkilendirilmiştir. Çeşitli kanser tiplerine sahip hastalar arasında artan KRT19 ekspresyonu ile kısa hayatta kalım oranları arasında pozitif korelasyon gösteren klinik verilere rağmen, bazı kanser tiplerinde örneğin meme kanserinde KRT19'un rolü belirsizliğini korumaktadır. Öte yandan hepatoselüler karsinoma (Tang et al., 2014), oral skuamöz hücre karsinomları (Crowe, Milo, & Shuler, 1999) ve akciğer kanseri (Ohtsuka et al., 2016) hücre hatlarını kullanan bulgular, klinik bulguları desteklemiş ve KRT19'un hücre proliferasyonu ve göçü gibi tümörü teşvik eden hücre davranışları sergilediğini göstermiştir. Kanserde KRT19, tanısal bir belirteç olarak hizmet ettiği çeşitli tiplerde yüksek oranda ifade edilmektedir (Sharma et al., 2019).

KRT19 ile ilgili olarak farklı solid tümör tiplerinde çeşitli çalışmalar yapılmış olsa da, pankreas kanseri ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Yapılan bu tez çalışmasında KRT19 geni transkripsiyonel düzeyde, sırasıyla metastatik ve metastatik olmayan SU8686 ve BXPC3 hücre hatlarında yüksek bulunmuştur. Ayrıca KRT19

geninin ifade düzeyine ait kat artışı, metastaik pankreas kanser hücre hattı olan SU8686'da, metastatik olmayan BXPC3'e göre çok daha fazladır. KRT19 genine ait elde edilen bu bulgular literatürdeki kısıtlı sayıdaki çalışmalara paralel niteliktedir. Örneğin; Yao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada pankreatik duktal adenokarsinomada KRT19 gen ifadesinin bening lezyonlu pankreatik dokulara göre daha fazla ifade olduğu gözlemlenmiştir (Yao et al., 2016). Ayrıca 2006 yılında Brembeck ve Rutsgi'nin yaptıkları çalışmada pankreatik asinar hücrelerinin normalde KRT19 ifade etmemelerine rağmen, gut-enriched Krüppel-like factor (GKLF/KLF4) and Sp1 transkripsiyon faktörlerinin etkisi ile KRT19'u aşırı ifade ettikleri bulunmuştur (Brembeck ve Rutsgi, 2000). Dugnani ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada,17 adet pankreatik duktal karsinoma (PDAC) hücre hattında ve 41 PDAC hastasının tümör örneklerinde, içinde KRT19'unda olduğu çeşitli genlerin mRNA seviyelerine baktıklarında, KRT geninin ifadesini yüksek bulduklarını ve düşük hayatta kalım ve erken hastalık tekrarı ile korele olduğunu bulmuşlardır (Dugnani et al., 2018) . Biz de yaptığımız bu çalışma ile literatürde çok az sayıda bulunan çalışmalara katkı sağladığımızı düşünüyoruz.

5. SONUÇ

SU8686 hücre hattında BEAS-2B kontrol hücre hattına göre, TMPRSS4 geninin ifadesinde 1,31 kat azalış gözlemlenmiştir. Diğer hücre hattı olan BXPC3 hücre hattında TMPRSS4 geninin ifadesinde 2,38 kat azalış gözlemlenmiştir. Bahsettiğimiz çalışmalarda aşırı ifade edilen TMPRSS4'ün kanserli dokuların tespit için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği söylenmektedir.

Bizim çalışmamızda ise SU8686 hücre hattında BEAS-2B kontrol hücre hattına göre KRT19 geninin ifadesinde ise 1234 kat artış saptanmıştır. BXPC3 hücre hattında ise KRT19 geninin ifadesinde 183 kat artış saptanmıştır. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, yapılan çalışmalar ve ileride yapılacak çalışmalar KRT19 geninin, prognozun bir göstergesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

TMPRSS4 geninin ifadesini yapılan çalışmalara ters olarak 1,31 kat azalma olarak bulduk. Bu veri bize TMPRSS4 geni üzerinde yapılacak protein düzeyinde araştırmalar yapılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Pankreas kanser ilerlemesinin düzenlenmesinde altta yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak ve biyobelirteç olarak TMPRSS4'ün kullanılması için daha fazla araştırılması gerekmektedir. BxPC3 geni ile yaptığımız araştırma sonucuna göre ileride yapılacak olan araştırmalar ile birlikte kanserin prognozunda biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKÇA

Abreu, F. B., Liu, X., & Tsongalis, G. J. (2017). miRNA analysis in pancreatic cancer: the Dartmouth experience. Clin Chem Lab Med, 55(5), 755-762. doi:10.1515/cclm-2017-0046

Ahnfelt-Ronne, J., Jorgensen, M. C., Klinck, R., Jensen, J. N., Fuchtbauer, E. M., Deering, T., Serup, P. (2012). Ptf1a-mediated control of Dll1 reveals an alternative to the lateral inhibition mechanism. Development, 139(1), 33-45. doi:10.1242/dev.071761

Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L., & Duffy, M. J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. Int J Cancer, 72(1), 1-22. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19970703)72:1<1::aid-ijc1>3.0.co;2-z

Ansari, D., Tingstedt, B., Andersson, B., Holmquist, F., Sturesson, C., Williamsson, C., Andersson, R. (2016). Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. Future Oncol, 12(16), 1929-1946. doi:10.2217/fon-2016-0010

Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. Nature, 400(6747), 877-881. doi:10.1038/23716

Avila, J. L., & Kissil, J. L. (2013). Notch signaling in pancreatic cancer: oncogene or tumor suppressor? Trends Mol Med, 19(5), 320-327. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.003

Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Wooster, R. (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. Br J Cancer, 91(2), 355-358. doi:10.1038/sj.bjc.6601894

Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K. W., & Einarsson, R. (2004). Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin Biochem, 37(7), 529-540. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.009

Bastidas-Ponce, A., Scheibner, K., Lickert, H., & Bakhti, M. (2017). Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. Development, 144(16), 2873-2888. doi:10.1242/dev.140756

Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., & Lucas, A. L. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. World J Gastroenterol, 20(32), 11182-11198. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11182

Benaud, C. M., Oberst, M., Dickson, R. B., & Lin, C. Y. (2002). Deregulated activation of matriptase in breast cancer cells. Clin Exp Metastasis, 19(7), 639-649. doi:10.1023/a:1020985632550

Bhushan, A., Itoh, N., Kato, S., Thiery, J. P., Czernichow, P., Bellusci, S., & Scharfmann, R. (2001). Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. Development, 128(24), 5109-5117.

Brembeck, F. H., Rustgi, A. K. (2000). The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 and Sp1. The Journal of biological chemistry, 275(36), 28230–28239. doi:10.1074/jbc.M004013200

Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C., & Brunton, V. G. (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. J Cell Sci, 126(Pt 2), 393-401. doi:10.1242/jcs.100115

Castellanos, J. A., & Merchant, N. B. (2014). Intensity of follow-up after pancreatic cancer resection. Ann Surg Oncol, 21(3), 747-751. doi:10.1245/s10434-013-3289-7

Cheng, D., Kong, H., & Li, Y. (2013). TMPRSS4 as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. Int J Mol Sci, 14(7), 14659-14668. doi:10.3390/ijms140714659

Cheng, Y., Wang, K., Geng, L., Sun, J., Xu, W., Liu, D., Zhu, Y. (2019). Identification of candidate diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic carcinoma. EBioMedicine, 40, 382-393. doi:10.1016/j.ebiom.2019.01.003

Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J. C., Galban, S., Galban, C. J., Pasca di Magliano, M. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. J Clin Invest, 122(2), 639-653. doi:10.1172/JCI59227

Coulombe, P. A., & Omary, M. B. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. Curr Opin Cell Biol, 14(1), 110-122. doi:10.1016/s0955-0674(01)00301-5

Crowe, D. L., Milo, G. E., & Shuler, C. F. (1999). Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential. J Dent Res, 78(6), 1256-1263. doi:10.1177/00220345990780061001

Dano, K., Behrendt, N., Hoyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L. R., Ploug, M., & Romer, J. (2005). Plasminogen activation and cancer. Thromb Haemost, 93(4), 676-681. doi:10.1160/TH05-01-0054

de Albuquerque, A., Kubisch, I., Breier, G., Stamminger, G., Fersis, N., Eichler, A., Stolzel, U. (2012). Multimarker gene analysis of circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: a feasibility study. Oncology, 82(1), 3-10. doi:10.1159/000335479

Del Chiaro, M., Segersvard, R., Lohr, M., & Verbeke, C. (2014). Early detection and prevention of pancreatic cancer: is it really possible today? World J Gastroenterol, 20(34), 12118-12131. doi:10.3748/wjg.v20.i34.12118

Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev, 25(1), 9-34. doi:10.1007/s10555-006-7886-9

Duffy, M. J. (1996). Proteases as prognostic markers in cancer. Clin Cancer Res, 2(4), 613-618.

Dugnani, E., Sordi, V., Pellegrini, S., Chimienti, R., Marzinotto, I., Pasquale, V., Piemonti, L. (2018). Gene expression analysis of embryonic pancreas development master regulators and terminal cell fate markers in resected pancreatic cancer: A correlation with clinical outcome. Pancreatology, 18(8), 945-953. doi:10.1016/j.pan.2018.09.006

Fan, X., Liang, Y., Liu, Y., Bai, Y., Yang, C., & Xu, S. (2018). The upregulation of TMPRSS4, partly ascribed to the downregulation of miR125a5p, promotes the growth of human lung adenocarcinoma via the NFkappaB signaling pathway. Int J Oncol, 53(1), 148-158. doi:10.3892/ijo.2018.4396

Fang, Y., Yao, Q., Chen, Z., Xiang, J., William, F. E., Gibbs, R. A., & Chen, C. (2013). Genetic and molecular alterations in pancreatic cancer: implications for personalized medicine. Med Sci Monit, 19, 916-926. doi:10.12659/MSM.889636

Gnoni, A., Licchetta, A., Scarpa, A., Azzariti, A., Brunetti, A. E., Simone, G., Silvestris, N. (2013). Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. Int J Mol Sci, 14(10), 19731-19762. doi:10.3390/ijms141019731

Golosow, N., & Grobstein, C. (1962). Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. Dev Biol, 4, 242-255. doi:10.1016/0012-1606(62)90042-8

Goral, V. (2015). Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. Asian Pac J Cancer Prev, 16(14), 5619-5624. doi:10.7314/apjcp.2015.16.14.5619

Govaere, O., Komuta, M., Berkers, J., Spee, B., Janssen, C., de Luca, F., Roskams, T. (2014). Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. Gut, 63(4), 674-685. doi:10.1136/gutjnl-2012-304351

Guan, H., Liang, W., Liu, J., Wei, G., Li, H., Xiu, L., Li, Y. (2015). Transmembrane protease serine 4 promotes thyroid cancer proliferation via CREB phosphorylation. Thyroid, 25(1), 85-94. doi:10.1089/thy.2014.0155

Hald, J., Hjorth, J. P., German, M. S., Madsen, O. D., Serup, P., & Jensen, J. (2003). Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. Dev Biol, 260(2), 426-437. doi:10.1016/s0012-1606(03)00326-9

Hebrok, M., Kim, S. K., & Melton, D. A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. Genes Dev, 12(11), 1705-1713. doi:10.1101/gad.12.11.1705

Herman, J. G., Jen, J., Merlo, A., & Baylin, S. B. (1996). Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. Cancer Res, 56(4), 722-727.

Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes Dev, 20(10), 1218-1249. doi:10.1101/gad.1415606

Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. N Engl J Med, 362(17), 1605-1617. doi:10.1056/NEJMra0901557

Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P., & Antalis, T. M. (2001). Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. J Biol Chem, 276(2), 857-860. doi:10.1074/jbc.R000020200

Horn, S., Kobberup, S., Jorgensen, M. C., Kalisz, M., Klein, T., Kageyama, R., Jensen, J. N. (2012). Mind bomb 1 is required for pancreatic beta-cell formation. Proc Natl Acad Sci U S A, 109(19), 7356-7361. doi:10.1073/pnas.1203605109

Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Offerhaus, G. J. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. Am J Surg Pathol, 25(5), 579-586. doi:10.1097/00000478-200105000-00003

Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res, 6(8), 2969-2972.

Huang, A., Zhou, H., Zhao, H., Quan, Y., Feng, B., & Zheng, M. (2013). High expression level of TMPRSS4 predicts adverse outcomes of colorectal cancer patients. Med Oncol, 30(4), 712. doi:10.1007/s12032-013-0712-7

Huang, A., Zhou, H., Zhao, H., Quan, Y., Feng, B., & Zheng, M. (2014). TMPRSS4 correlates with colorectal cancer pathological stage and regulates cell proliferation and self-renewal ability. Cancer Biol Ther, 15(3), 297-304. doi:10.4161/cbt.27308

Itoh, M., & Bissell, M. J. (2003). The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 8(4), 449-462. doi:10.1023/B:JOMG.0000017431.45314.07

Jackson, M. A., Lea, I., Rashid, A., Peddada, S. D., & Dunnick, J. K. (2006). Genetic alterations in cancer knowledge system: analysis of gene mutations in mouse and human liver and lung tumors. Toxicol Sci, 90(2), 400-418. doi:10.1093/toxsci/kfj101

Jamieson, N. B., Morran, D. C., Morton, J. P., Ali, A., Dickson, E. J., Carter, C. R., Oien, K. A. (2012). MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res, 18(2), 534-545. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0679

Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Madsen, O. D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. Nat Genet, 24(1), 36-44. doi:10.1038/71657

Jianwei, Z., Qi, L., Quanquan, X., Tianen, W., & Qingwei, W. (2018). TMPRSS4 Upregulates TWIST1 Expression through STAT3 Activation to Induce Prostate Cancer Cell Migration. Pathol Oncol Res, 24(2), 251-257. doi:10.1007/s12253-017-0237-z

Jin, J., Shen, X., Chen, L., Bao, L. W., & Zhu, L. M. (2016). TMPRSS4 promotes invasiveness of human gastric cancer cells through activation of NF-kappaB/MMP-9 signaling. Biomed Pharmacother, 77, 30-36. doi:10.1016/j.biopha.2015.11.002

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Science, 321(5897), 1801-1806. doi:10.1126/science.1164368

Jung, H., Lee, K. P., Park, S. J., Park, J. H., Jang, Y. S., Choi, S. Y., Park, Y. W. (2008). TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells

by facilitating an epithelial-mesenchymal transition. Oncogene, 27(18), 2635-2647. doi:10.1038/sj.onc.1210914

Kabir, N. N., Ronnstrand, L., & Kazi, J. U. (2014). Keratin 19 expression correlates with poor prognosis in breast cancer. Mol Biol Rep, 41(12), 7729-7735. doi:10.1007/s11033-014-3684-6

Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. Gastroenterology, 142(4), 730-733 e739. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.042

Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. Oncogene, 30(2), 127-138. doi:10.1038/onc.2010.456

Kebebew, E., Greenspan, F. S., Clark, O. H., Woeber, K. A., & Grunwell, J. (2005). Extent of disease and practice patterns for medullary thyroid cancer. J Am Coll Surg, 200(6), 890-896. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2004.12.011

Kebebew, E., Peng, M., Reiff, E., Duh, Q. Y., Clark, O. H., & McMillan, A. (2005). ECM1 and TMPRSS4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. Ann Surg, 242(3), 353-361; discussion 361-353. doi:10.1097/01.sla.0000179623.87329.6b

Kebebew, E., Peng, M., Reiff, E., Treseler, P., Woeber, K. A., Clark, O. H., Morita, E. (2006). A phase II trial of rosiglitazone in patients with thyroglobulin-positive and radioiodine-negative differentiated thyroid cancer. Surgery, 140(6), 960-966; discussion 966-967. doi:10.1016/j.surg.2006.07.038

Kim, M. S., Kuppireddy, S. V., Sakamuri, S., Singal, M., Getnet, D., Harsha, H. C., Pandey, A. (2012). Rapid characterization of candidate biomarkers for pancreatic cancer using cell microarrays (CMAs). J Proteome Res, 11(11), 5556-5563. doi:10.1021/pr300483r

Kim, S. K., Hebrok, M., Li, E., Oh, S. P., Schrewe, H., Harmon, E. B., Melton, D. A. (2000). Activin receptor patterning of foregut organogenesis. Genes Dev, 14(15), 1866-1871.

Kim, S., & Lee, J. W. (2014). Membrane Proteins Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Invasion: Studies on TMPRSS4 and TM4SF5. Genomics Inform, 12(1), 12-20. doi:10.5808/GI.2014.12.1.12

Kim, S., Kang, H. Y., Nam, E. H., Choi, M. S., Zhao, X. F., Hong, C. S., Park, Y. K. (2010). TMPRSS4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin alpha5 and its signaling pathways. Carcinogenesis, 31(4), 597-606. doi:10.1093/carcin/bgq024

Kumar, M., & Melton, D. (2003). Pancreas specification: a budding question. Curr Opin Genet Dev, 13(4), 401-407. doi:10.1016/s0959-437x(03)00089-3

Larzabal, L., Nguewa, P. A., Pio, R., Blanco, D., Sanchez, B., Rodriguez, M. J., Calvo, A. (2011). Overexpression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer is associated with poor prognosis in patients with squamous histology. Br J Cancer, 105(10), 1608-1614. doi:10.1038/bjc.2011.432

Lee, J. C., Smith, S. B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., German, M. S. (2001). Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. Diabetes, 50(5), 928-936. doi:10.2337/diabetes.50.5.928

Lee, Y., Ko, D., Min, H. J., Kim, S. B., Ahn, H. M., Lee, Y., & Kim, S. (2016). TMPRSS4 induces invasion and proliferation of prostate cancer cells through induction of Slug and cyclin D1. Oncotarget, 7(31), 50315-50332. doi:10.18632/oncotarget.10382

Li, T., Zeng, Z. C., Wang, L., Qiu, S. J., Zhou, J. W., Zhi, X. T., Tang, Z. Y. (2011). Radiation enhances long-term metastasis potential of residual hepatocellular carcinoma in nude mice through TMPRSS4-induced epithelial-mesenchymal transition. Cancer Gene Ther, 18(9), 617-626. doi:10.1038/cgt.2011.29

Liang, B., Wu, M., Bu, Y., Zhao, A., & Xie, F. (2013). Prognostic value of TMPRSS4 expression in patients with breast cancer. Med Oncol, 30(2), 497. doi:10.1007/s12032-013-0497-8

Martin, M., Gallego-Llamas, J., Ribes, V., Kedinger, M., Niederreither, K., Chambon, P., Gradwohl, G. (2005). Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. Dev Biol, 284(2), 399-411. doi:10.1016/j.ydbio.2005.05.035

McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World J Gastroenterol, 24(43), 4846-4861. doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846

Midha, S., Chawla, S., & Garg, P. K. (2016). Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. Cancer Lett, 381(1), 269-277. doi:10.1016/j.canlet.2016.07.022

Miralles, F., Czernichow, P., & Scharfmann, R. (1998). Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. Development, 125(6), 1017-1024.

Murtaugh, L. C., Stanger, B. Z., Kwan, K. M., & Melton, D. A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(25), 14920-14925. doi:10.1073/pnas.2436557100

Netzel-Arnett, S., Hooper, J. D., Szabo, R., Madison, E. L., Quigley, J. P., Bugge, T. H., & Antalis, T. M. (2003). Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. Cancer Metastasis Rev, 22(2-3), 237-258. doi:10.1023/a:1023003616848

Nguyen, T. H., Weber, W., Havari, E., Connors, T., Bagley, R. G., McLaren, R., Shankara, S. (2012). Expression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer and its modulation by hypoxia. Int J Oncol, 41(3), 829-838. doi:10.3892/ijo.2012.1513

Norgaard, G. A., Jensen, J. N., & Jensen, J. (2003). FGF10 signaling maintains the pancreatic progenitor cell state revealing a novel role of Notch in organ development. Dev Biol, 264(2), 323-338. doi:10.1016/j.ydbio.2003.08.013

Ohtsuka, T., Sakaguchi, M., Yamamoto, H., Tomida, S., Takata, K., Shien, K., Toyooka, S. (2016). Interaction of cytokeratin 19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway. Sci Rep, 6, 39557. doi:10.1038/srep39557

Okamoto, S., Niikura, H., Nakabayashi, K., Hiyama, K., Matoda, M., Takeshima, N., Yaegashi, N. (2013). Detection of sentinel lymph node metastases in

cervical cancer: assessment of KRT19 mRNA in the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. Gynecol Oncol, 130(3), 530-536. doi:10.1016/j.ygyno.2013.06.027

Paiva, F., Duarte-Pereira, S., Costa, V. L., Ramalho-Carvalho, J., Patricio, P., Ribeiro, F. R., Henrique, R. (2011). Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms. DNA Cell Biol, 30(2), 85-90. doi:10.1089/dna.2010.1108

Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. Dev Dyn, 240(3), 530-565. doi:10.1002/dvdy.22584

Prasad, M. L., Pellegata, N. S., Huang, Y., Nagaraja, H. N., de la Chapelle, A., & Kloos, R. T. (2005). Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. Mod Pathol, 18(1), 48-57. doi:10.1038/modpathol.3800235

Pujol, J. L., Grenier, J., Daures, J. P., Daver, A., Pujol, H., & Michel, F. B. (1993). Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. Cancer Res, 53(1), 61-66.

Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med, 19(11), 1423-1437. doi:10.1038/nm.3394

Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Res, 74(11), 2913-2921. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0155

Rhee, H., Kim, H. Y., Choi, J. H., Woo, H. G., Yoo, J. E., Nahm, J. H., Park, Y. N. (2018). Keratin 19 Expression in Hepatocellular Carcinoma Is Regulated by Fibroblast-Derived HGF via a MET-ERK1/2-AP1 and SP1 Axis. Cancer Res, 78(7), 1619-1631. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0988

Rogel, M. R., Jaitovich, A., & Ridge, K. M. (2010). The role of the ubiquitin proteasome pathway in keratin intermediate filament protein degradation. Proc Am Thorac Soc, 7(1), 71-76. doi:10.1513/pats.200908-089JS

Seymour, P. A., Shih, H. P., Patel, N. A., Freude, K. K., Xie, R., Lim, C. J., & Sander, M. (2012). A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. Development, 139(18), 3363-3372. doi:10.1242/dev.078733

Sharma, P., Alsharif, S., Bursch, K., Parvathaneni, S., Anastasakis, D. G., Chahine, J., Chung, B. M. (2019). Keratin 19 regulates cell cycle pathway and sensitivity of breast cancer cells to CDK inhibitors. Sci Rep, 9(1), 14650. doi:10.1038/s41598-019-51195-9

Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol, 29, 81-105. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122405

Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin, 64(1), 9-29. doi:10.3322/caac.21208

Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin, 62(1), 10-29. doi:10.3322/caac.20138

Soreide, K. (2018). Sweet Predictions Speak Volumes for Early Detection of Pancreatic Cancer. Gastroenterology, 155(2), 265-268. doi:10.1053/j.gastro.2018.06.054

Stetler-Stevenson, W. G., & Yu, A. E. (2001). Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. Semin Cancer Biol, 11(2), 143-152. doi:10.1006/scbi.2000.0365

Szabo, R., & Bugge, T. H. (2008). Type II transmembrane serine proteases in development and disease. Int J Biochem Cell Biol, 40(6-7), 1297-1316. doi:10.1016/j.biocel.2007.11.013

Tang, F., Li, W., Chen, Y., Wang, D., Han, J., & Liu, D. (2014). Downregulation of hnRNP K by RNAi inhibits growth of human lung carcinoma cells. Oncol Lett, 7(4), 1073-1077. doi:10.3892/ol.2014.1832

Van den Broeck, A., Sergeant, G., Ectors, N., Van Steenbergen, W., Aerts, R., & Topal, B. (2009). Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. Eur J Surg Oncol, 35(6), 600-604. doi:10.1016/j.ejso.2008.12.006

Wallrapp, C., Hahnel, S., Muller-Pillasch, F., Burghardt, B., Iwamura, T., Ruthenburger, M., Gress, T. M. (2000). A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer. Cancer Res, 60(10), 2602-2606.

Wang, C. H., Guo, Z. Y., Chen, Z. T., Zhi, X. T., Li, D. K., Dong, Z. R., Li, T. (2015). TMPRSS4 facilitates epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma and is a predictive marker for poor prognosis of patients after curative resection. Sci Rep, 5, 12366. doi:10.1038/srep12366

Wang, W., He, J., Lu, H., Kong, Q., & Lin, S. (2020). KRT8 and KRT19, associated with EMT, are hypomethylated and overexpressed in lung adenocarcinoma and link to unfavorable prognosis. Biosci Rep, 40(7). doi:10.1042/BSR20193468

Wangjam, T., Zhang, Z., Zhou, X. C., Lyer, L., Faisal, F., Soares, K. C., Zheng, L. (2015). Resected pancreatic ductal adenocarcinomas with recurrence limited in lung have a significantly better prognosis than those with other recurrence patterns. Oncotarget, 6(34), 36903-36910. doi:10.18632/oncotarget.5054

Wessells, N. K., & Cohen, J. H. (1967). Early Pancreas Organogenesis: Morphogenesis, Tissue Interactions, and Mass Effects. Dev Biol, 15(3), 237-270. doi:10.1016/0012-1606(67)90042-5

Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. CA Cancer J Clin, 63(5), 318-348. doi:10.3322/caac.21190

Wood, H. E., Gupta, S., Kang, J. Y., Quinn, M. J., Maxwell, J. D., Mudan, S., & Majeed, A. (2006). Pancreatic cancer in England and Wales 1975-2000: patterns and trends in incidence, survival and mortality. Aliment Pharmacol Ther, 23(8), 1205-1214. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02860.x

Wood, L. D. (2013). Pancreatic cancer genomes: toward molecular subtyping and novel approaches to diagnosis and therapy. Mol Diagn Ther, 17(5), 287-297. doi:10.1007/s40291-013-0043-6

Xuan, S., & Sussel, L. (2016). GATA4 and GATA6 regulate pancreatic endoderm identity through inhibition of hedgehog signaling. Development, 143(5), 780-786. doi:10.1242/dev.127217

Yao, H., Yang, Z., Liu, Z., Miao, X., Yang, L., Li, D., Yuan, Y. (2016). Glypican-3 and KRT19 are markers associating with metastasis and poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Biomark, 17(4), 397-404. doi:10.3233/CBM-160655

Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., & Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol, 17(24), 2897-2908. doi:10.3748/wjg.v17.i24.2897