T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANC-1 VE BxPC-3 PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARINA JUGLON UYGULAMASININ MİTOKONDRİAL BİYOGENEZ VE AKTİVASYONLA İLGİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine Merve DEMİRBAŞ BÜYÜKTÜT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU

KONYA-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANC-1 VE BxPC-3 PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARINA JUGLON UYGULAMASININ MİTOKONDRİAL BİYOGENEZ VE AKTİVASYONLA İLGİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine Merve DEMİRBAŞ BÜYÜKTÜT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21202128 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2023

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca engin bilgi, birikim ve tecrübelerinden yararlandığım, katkılarıyla beni yönlendiren, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bana vizyonel bir bakış açısı kazandıran ve ilham olan sayın hocalarım Prof. Dr. Hilal ARIKOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Dudu ERKOÇ KAYA'ya,

Çalışmamızın laboratuvar sürecinde kendisinden çok şey öğrendiğim, günün hangi saatinde gidersem gideyim tüm içtenlik ve nezaketiyle her zaman yardımıma koşan Arş. Gör. Fatma GÖKTÜRK'e

Çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, araya mesafeler girse de yorulduğum anlarda beni silkeleyip tekrar devam etmemi sağlayan, kıymetli meslektaşlarım ve canım arkadaşlarım Uzm. Biyolog Hamza BAYHAN, Arş. Gör. Saliha AYDIN, Uzm. Biyolog Büşra KALDIRIM ve Uzm. Biyolog Şuheda Ebrar YILMAZ'a,

Beni her daim koşulsuz şartsız destekleyen, varlıklarını her daim hissettiğim, beni bu günlere getiren ve bugün olduğum kişi olmamı sağlayan canım ailem; başta babam Ahmet DEMİRBAŞ ve annem Nuray DEMİRBAŞ'a, ağabeyim Emin DEMİRBAŞ ve eşi Duygu DEMİRBAŞ'a, kardeşim, en yakın arkadaşım Emre DEMİRBAŞ'a ve hayatımızın neşesi biricik yeğenim Nehir DEMİRBAŞ'a

Sevmenin ve sevilmenin ne büyük bir haz olduğunu anlayışı, desteği, varlığı, her koşulda yanımda duruşuyla bana her daim gösteren sevgili eşim, hayat arkadaşım Bahri BÜYÜKTÜT'e

Sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız.

E.Merve DEMİRBAŞ BÜYÜKTÜT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER ve KISALTMALAR iv
1. GİRİŞ 1
1.1. Pankreas 3
1.2. Pankreas Kanseri 5
1.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri 7
1.3.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri 9
1.3.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri 11
1.4. Pankreas Kanseri ve Genetik 12
1.5. Kanser ve Mitokondri İlişkisi 14
1.5.1. Metabolik Yeniden Programlanma 15
1.5.2. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türleri 20
1.5.3. Mitokondrial Hücre Ölümü; Apoptoz 20
1.5.4. Mitokondrial DNA Mutasyonları 21
1.5.5. Mitokondrial Retrograde Sinyalizasyonu 22
1.5.6. Mitokondrial Biyogenez, Dinamikleri ve Düzenlenmesi 23
1.6. Glukoz Regüle Protein 75 (GRP75, Mortalin,HSPA9, HSPA9B, mt-HSP70) 30
1.7. Mitokondrial Transkripsiyon Faktörü A (TFAM) 34
1.7. Rapamisinin Mekanik Hedefi (mTOR) 37
1.9. Juglon 43
2. GEREÇ VE YÖNTEM 45
2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar 45
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 45
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler 45
2.2. Hücre Kültürü 46
2.2.1. Hücrelerin Dondurulması 47
2.2.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Çözdürülmesi 47
2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması 47
2.2.4. Juglon Stok Solüsyonun Hazırlanması 48
2.2.5. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 48
2.2.6. Gen İfade Analizleri 48
2.2.7. Total RNA İzolasyonu 49

2.2.9. qPCR Analizi 50
3.BULGULAR 52
3.1. Pankreas Kanseri Hücre Hatları 52
3.1.1. PANC-1 Pankreas Kanseri Hücre Hattı 52
3.1.2. BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücre Hattı 53
3.2. Juglonun Sitotoksik Etkisi 53
3.3. Juglonun Mitokondrial Biyogenez ve Aktivitasyonla ilgili Hedef Genler olan GRP75, TFAM ve mTOR Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi 55
3.3.1. Juglonun PANC-1 Hücre Hattında Hedef Genlerin İfade Düzeylerine Etkisi 55
3.3.2. Juglonun BxPC-3 Hücre Hattında Hedef Genlerin İfade Düzeylerine Etkisi 57
4.TARTIŞMA 60
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 67
6. KAYNAKÇA 68
7. EKLER 88
Ek-A: Etik Kurul 88
Ek-B: Turnitin Raporu 89
8.ÖZGEÇMİŞ 92

SİMGELER ve KISALTMALAR

A	Alfa
B	Beta
Δ	Delta
E	Epsilon
AFL	Atipik Düz Lezyonlar
AKT	Protein Kinaz-B
AML	Akut Miyeloid Lösemi
CREB	cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı
DEPTOR	mTOR Etkileşimli Protein
DRP1	Dinaminle İlişkili Protein
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Endoplazmik Retikulum
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FIS1	Fisyon 1 Proteini
GLOBOCAN	Küresel Kanser Gözlemevi
GLUT	Glukoz Taşıyıcıları
GPCR	G Proteine Bağlı Reseptör
GRP75	Glukoz Regule Protein 75
HATs	Histon Asetil Transferazlar
HG-PanIN	Yüksek Dereceli Pankreas İntraepitelyal Neoplazi
HMG	Yüksek Hareketlilik Grubu
HSP70	Isı Şoku Proteini 70
IGFR	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
IP3R	İnositol 1,4,5-Trifosfat Reseptör
IPMN	İnraduktal Papiller Müsinoz Neoplezi

JHDM	Jumunji-C Histondemetilaz
JNK	Jun Amino-terminal Kinaz
LC3	Hafif Zincir 3
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LG-PanIN	Düşük Dereceli Pankreas İntraepitelyal Neoplazi
LNCaP	Androjene Bağımlı Prostat Kanseri
MAM	Mitokondriyle İlişkili Zar
MAPK	Mitojenle aktifleştrilmiş Protein Kinaz
MCN	Müsinoz Kistik Neoplazma
MCU	Mitokondriyal Kalsiyum Uniporter
MFF	Mitokondriyal Fisyon Faktörü
Mfn1/2	Mitofusin 1/2
MiDs	Mitokondrial Dinamik Proteinler
mLST8,GbL	Memeli sec-13 Protein 8
MPP	Matriks Peptidaz
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mthsp70	Mitokondriyal Isı Şoku Proteini 70
mTOR	Rapamisinin Mekanik Hedefi
mTORC1	mTOR Kompleksi 1
mtSSB	Mitokondriyal Tek Sarmallı DNA Bağlayıcı Protein
NF-kB	Nükleer Faktör -kB
NRF-1/2	Nükleer Solunum Faktörleri 1-2
PanIN	Pankreas İntraepitelyal Neoplazi
PanNET	Pankreas Nöroendokrin Tümör
PARL	Romboid Benzeri Protein
PBP74	Peptit Bağlayıcı Protein 74

PDAK	Pankreas Duktal Adenokarsinom
PDGFR	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PDK1	Fosfoinositide Bağımlı Kinaz-1
PGC-1a	Peroksizom-çoğaltıcı-aktive edilmiş y ko-aktivatör-1a
PHD	Prolil Hidroksilaz
PI3K	Fosfoinositid 3-kinaz
PIP2	Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat
PIP3	Fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfat
PKM2	Prüvat Kinaz M2
PRAS40	Prolin Açısından Zengin AKT/PKB Substratı 40
PTEN	Tensin Homoloğu
RAPTOR	Düzenleyici İlişkili mTOR Protein
RICTOR	mTOR'un Rapamisine Duyarsız Proteini
ROS	Reakif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz 7
SOD2	Süperoksit Dismutaz
TCA	Trikarboksilik Asit Döngüsü
TET	Translokasyon Metilsitozin Dioksigenaz
TFAM	Trankripsiyon Faktörü A
TG2	Transglutaminaz tip-2
TME	Tümör Mikro Ortamı
TSC 1/2	Tüberoz Skleroz Kompleksleri
VDAC	Voltaja Bağlı Anyon Kanalları
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANC-1 VE BxPC-3 PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARINA JUGLON UYGULAMASININ MİTOKONDRİAL BİYOGENEZ VE AKTİVASYONLA İLGİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine Merve DEMİRBAŞ BÜYÜKTÜT

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2023

Pankreas kanseri genellikle hastalığın son evrelerinde belirti veren, klinikte kullanılan kemoterapötik ajanlara direncin gözlendiği, uygulanan tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı, tanısındaki güçlükler ve yüksek ölüm oranlarıyla birlikte oldukça agresif bir kanser türüdür. GRP75 (HSPA9/Mortalin), mitokondride lokalize olan ve tümör hücrelerinde sıklıkla yukarı regüle edilen, tümör hücresi proliferasyonunu/hayatta kalmasını, metastazı ve anjiyogenezi teşvik ettiği ve apoptotik sinyali azalttığı gösterilen, ER-mitokondri arasındaki fiziksel ve kimyasal bağlantıyı sağlayan proteindir. TFAM, mtDNA'nın nükleoidlere yoğunlaşması için gerekli bağlayıcı şaperon olarak kabul edilir ve mtDNA replikasyonu ve transkripsiyonu için gereklidir. mTOR, katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında anahtar işlevi olan bir kinaz olup, özellikle kanserde yukarı akış sinyallerine yanıt olarak hücrenin hayatta kalması, metabolizması, büyümesi, protein sentezinin düzenlenmesi ve mitokondrial biyogenezi ve işlevinde önemli rol oynar. Juglon, (5-hdroxy-1, 4-napthoquinone), ceviz ağaçlarının taze olgun meyve kabuğunda, köklerinde ve yapraklarında bulunan bir tür naftokinondur. Juglonun çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkisi gösterilmiş, daha önceki araştırmalarımızda PANC-1 ve BxPC-3 insan pankreas kanseri hücre hatlarında bu etkilerinin yanı sıra anti-invaziv ve anti-metastatik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada kanser hücrelerinin sağkalımı ve metastaz sürecinde mitokondri biyogenezi ve fonksiyonunda merkezi rol oynaması nedeniyle, juglonun, PANC-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücre hatlarında, mitokondri biyogenezi ve aktivasyonu ile ilişkili anahtar proteinleri kodlayan GRP75, TFAM ve mTOR genleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda MTT testi sonuçlarından elde edilen IC_{50} değeri dikkate alınarak 5, 10, 15 ve 20 µM juglon konsantrasyonları uygulama dozu olarak seçilmiş ve juglonun belirlenen dozlardaki 24 saatlik uygulamasından sonra hedef genlerin ifadeleri qPCR yöntemiyle incelenmiştir. Çalışma sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde juglonun her iki hücre hattında da GRP75 gen ifadesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. TFAM ve mTOR gen ifadeleri üzerine, özellikle PANC-1 hücrelerinde 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonlarda juglon uygulamasının ise önemli düzeyde etkilerinin olduğu ve bu etkilerini gen ifadelerini yukarı yönde regüle ederek gösterdikleri ortaya konulmuştur. Ancak ilginç olarak PANC-1 hücrelerinde mTOR geni ifadelerindeki güçlü artışın aksine BxPC-3 hücrelerinde juglonun sadece 20 µM konsantrasyonda mTOR gen ifadesini etkilediği ve dramatik bir şekilde azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Çalışma bulgularımız, hücresel homeostazda, hücre büyümesi, hayatta kalması ve metabolizması dahil olmak üzere bir dizi hücresel olayda merkezi rol oynayan mTOR ifadesi üzerindeki bu etkileri ile juglonun geliştirilebilir bir potansiyele sahip olduğu ve pankreas kanseri ile savaşta yeni stratejiler için umut vaadeden bir teröpotik ajan olduğu düşüncemizi desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: GRP75, Juglon, mTOR, Pankreas Kanseri, TFAM

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF JUGLONE APPLICATION ON THE EXPRESSION LEVELS OF THE GENES RELATED TO MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND ACTIVATION IN PANC-1 AND BxPC-3 PANCREATIC CANCER CELL LINES

Emine Merve DEMİRBAŞ BÜYÜKTÜT

Department of Medical Biology

MASTER THESIS / KONYA-2023

Pancreatic cancer is a highly aggressive type of cancer that is usually symptomatic at the last stages of the disease, with resistance to chemotherapeutic agents used in the clinic, inadequate treatment methods, diagnostic difficulties and high mortality rates. GRP75 (HSPA9/Mortalin) is a protein localized in mitochondria and frequently upregulated in tumor cells which has been shown to promote tumor cell proliferation/survival, metastasis and angiogenesis and reduce apoptotic signaling by providing the physical and chemical link between ER and mitochondria. TFAM is considered as the essential binding chaperone for the condensation of mtDNA into nucleoids and is required for mtDNA replication and transcription. mTOR is a kinase with a key function between catabolic and anabolic metabolisms and plays important roles in cell survival, metabolism, growth, regulation of protein synthesis and mitochondrial biogenesis and function especially in response to upstream signals in cancer. Juglone, (5-hydroxy-1, 4-napthoquinone) is a type of naphthoquinone found in the fresh ripe fruit peel, roots and leaves of walnut trees. Juglone has been shown to have cytotoxic and apoptotic effects in various cancer cell lines and besides this effects it was reported to have anti-invasive and anti-metastatic effects in PANC-1 and BxPC-3 human pancreatic cancer cell lines in our previous studies. In this study, we investigated the effects of juglone on GRP75, TFAM and mTOR genes encoding key proteins associated with mitochondria biogenesis and activation in PANC-1 and BxPC-3 pancreatic cancer cell lines due to their central roles in mitochondria biogenesis and function in cancer cell survival and metastasis. In our study; 5, 10, 15 and 20 μM juglone concentrations were selected as the application doses considering the IC_{50} value determined after MTT test results and the expressions of the target genes were analyzed by qPCR method after application of juglone at determined doses for 24 hours. When our study results were evaluated totally, it was showed that juglone had no significant effect on GRP75 gene expression in both cell lines. It was revealed that juglone application at 10, 15 and 20 μM doses had significant effects on TFAM and mTOR gene expressions, especially in PANC-1 cells, by up-regulating gene expressions. Interestingly, in contrast to the strong increase in mTOR gene expression in PANC-1 cells, it was determined that juglone was effective only at 20 μM concentration on mTOR gene expression in BxPC-3 cells and caused a dramatic decrease. Our findings suggest that juglone has a developable potential and is a promising theurapeutic agent to develop new strategies for the battle with cancer with those effects on mTOR gene which plays a central role in cellular homeostasis and several cellular events including cell growth, survival and metabolism.

Keywords: GRP75, Juglone, mTOR, Pancreatic cancer, TFAM

1. GİRİŞ

Pankreas kanseri, tümörün biyolojik agresifliği, kemoteröpotik ajanlara yüksek direnç ve düşük sağkalım oranları ile ilişkili olarak dünya çapında en agresif malignitelerden biridir (Rahib ve ark 2014, Del Chiaro ve ark 2019). Ayrıca, pankreas tümörleri uzun süre asemptomatik kalma eğilimindedir ve sıklıkla hastalığın ileri evrelerinde, vasküler yapıların invazyonunun mevcut olduğu veya yayılmış metastazların geliştiği durumlarda teşhis edilir. Genel olarak, hastaların sadece %20'si tanı anında ameliyat için uygundur ve bunların %80'i ameliyat sonrası bir noktada ölümcül bir nükse maruz kalmaktadır (Foley ve ark 2016). Genel prognoz son derece kötüdür ve hayatta kalma süresinin 1 yıldan az olması beklenmektedir. Bu nedenle, pankreas kanserinin şu anda dünya çapında kansere bağlı ölümlerin 7. nedenini temsil ettiği tahmin edilmektedir (Rahib ve ark 2014). Pankreas kanserinin en yaygın şekli pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK)'dur ve vakaların yaklaşık %90'ında görülür. PDAK, pankreasın ana ekzokrin fonksiyonlarını yerine getiren pankreas kanallarında ortaya çıkar (Oldfield ve ark 2017). Kemoterapiyle ilgili birçok araştırma olmasına rağmen, hayatta kalma oranında son on yılda yalnızca küçük iyileşmeler görülmüştür. Bunun bir nedeni, ilaç direncinin olmasıdır (Sarvepalli ve ark 2019). Bu nedenle, prognozu iyileştirmek ve mevcut sağkalım oranlarını arttırmak için pankreas kanseri tedavisine yönelik yeni yaklaşımlara şiddetle ihtiyaç vardır.

Juglon (5-hdroxy-1, 4-napthoquinone), Juglans nigra (kara ceviz) ve Juglans regia (İngiliz veya İran cevizi) dahil olmak üzere birçok ceviz ağacı türünün yapraklarında, köklerinde, kabuğunda bulunan bir naftokinondur (Ahmad ve Suzuki 2019). Çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik etkisi bilinen juglonun (Bhargava ve Westfall 1968, Cenas ve ark 2006), özellikle ROS yoluyla hücre redoks homeostazını düzenleyerek mitokondrial aracılı apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Xu ve ark 2013). Juglonun pankreas kanseri hücreleri üzerinde anti-metastatik ve anti-invaziv etkileri olduğunu gösteren kanıtlar önceki çalışmamızda da gösterilmiştir (Avcı ve ark 2016).

Kanser gelişimi, hem nükleer hem de mitokondrial genomlarda bulunan çeşitli genetik değişikliklerin ve mutasyonların birikimini içerir (Zhu ve ark 2005). Kanser hücreleri oldukça heterojen olmasına rağmen, hepsi bazı ortak özellikler veya işaretler sergiler ve mitokondri bu tür işaretlerde önemli bir rol oynar (Giampazolias ve Tait 2016).

Başlıca rolünün ATP üretimi olması nedeniyle hücrenin enerji santrali olarak bilinen mitokondri, ROS üretimi, hücre sinyalinin regülasyonu, hücre ölümü ve biyosentez olayları

gibi birçok önemli işlevleri de üstlenmektedir. Fizyolojik koşullardaki bu çoklu işlevleri nedeniyle mitokondriler, önemli hücresel stres sensörleridir ve çevreye adaptasyonunda hücreye esneklik kazandırır. Bu esneklik besin kıtlığı, hipoksi gibi stres durumlarında hücrenin hayatta kalmasını sağlar. Bu nedenle mitokondri karsinogenezin kilit oyuncusudur. Kanser hücresinin zorlu çevresel koşullara adapte olmasını sağlayarak, metabolimayı ve ilgili tüm olayları yeniden düzenleyerek, kanser hücresinin hayatta kalması, ilerlemesi ve metastazını hatta tedaviye direnç gelişimini destekler (Vyas ve ark 2016, Porporato ve ark 2018).

GRP75 başlangıçta bir mitokondrial moleküler şaperon olarak tanımlanmış olsa da (Leustek ve ark 1989), sıklıkla kanser hücrelerinin farklı hücre altı bölümlerinde saptanır ve bu da kanserde fonksiyonel olarak değiştiğini düşündürür (Dundas ve ark 2005, Kaul ve ark 2007). GRP75, mitokondride lokalizedir. Tümör hücrelerinde sıklıkla yukarı regüle edilen, tümör hücresi proliferasyonunu/hayatta kalmasını, metastazı ve anjiyogenezi teşvik ettiği ve apoptotik sinyali azalttığı gösterilen, ER-mitokondri arasındaki fiziksel ve kimyasal bağlantıyı sağlayan proteindir. GRP75 sitoplazmada p53'ü sekestre eder ve normal transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe eder. GRP75 ve p53, sitoplazmada veya sentrozomda, aynı zamanda p53 aktivitesini de tehlikeye atan ve böylece stres koşulları altında apoptozu önleyen bir kompleks oluşturur (Li ve ark 2022).

Mitokondrial transkripsiyon faktörü A (mtTFA, mtTF1, TFAM), nükleer kodlu ve yüksek hareketlilik grubu (HMG) proteinlerinin bir üyesidir (Alam ve ark 2003). Pek çok HMG-ailesi proteini, dizi özgünlüğünden bağımsız olarak DNA'yı bağlama, sarma, bükme ve çözme yeteneğine sahiptir. TFAM hem mitokondrial transkripsiyon başlangıcını hem de mtDNA kopya sayısını düzenlemek için dizi özgüllüğü olan ve mtDNA'yı bağlayan temel bir proteindir (Campbell ve ark 2012). TFAM, mtDNA promotörlerinin yukarı akışına bağlanır ve mtDNA'nın transkripsiyonunu destekler. TFAM, mitokondrial transkripsiyon başlatma mekanizmasının çekirdek bileşeni ve mtDNA'yı mitokondrial nükleoidlere paketleyen anahtar faktörü olarak oynadığı ikili rolü nedeniyle memelilerde mitokondrial fonksiyonun önemli bir düzenleyicisidir (Fisher ve Clayton 1988). TFAM'ın hücre hayatta kalması, çoğalması ve göçünün düzenlenmesine katıldığı da bildirilmiştir (Kim ve ark 2013).

mTOR yolu, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve otofaji gibi birçok temel biyolojik ve fizyolojik süreci düzenler ve bu sebeple mTOR yolundaki bileşenler, kanserlerde en sık mutasyona uğrayan genleri içerir (Mayer ve Arteaga 2016). mTOR yolu; mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki protein kompleksinden oluşur. mTORC1, hücre proliferasyonunu,

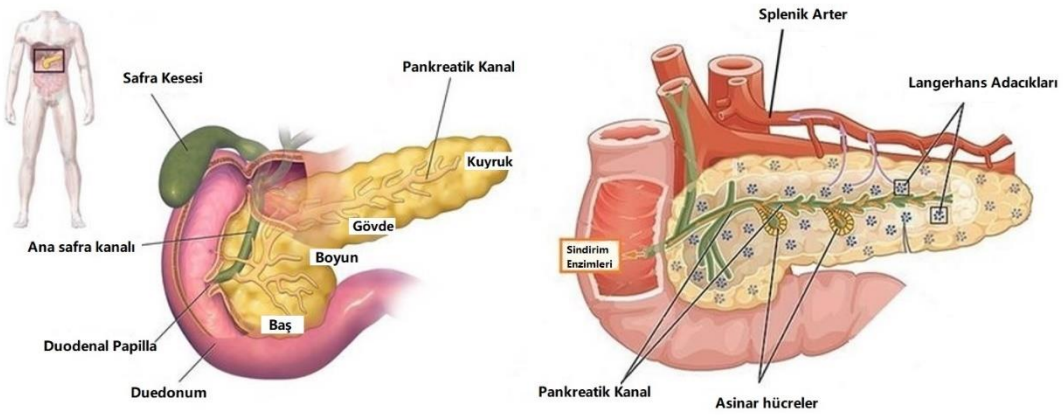
hayatta kalmasını ve anjiyogenezi etkileyen çeşitli aşağı akış sinyal efektörlerini ve transkripsiyon faktörlerini modüle eder. mTORC1 ayrıca translasyonu, ribozom biyogenezini, metabolizmayı ve hipoksi ve otofajiye hücresel yanıtı düzenler (Dancey 2010). mTORC1'in mitokondrial metabolizmayı düzenleyici işlevi de gösterilmiştir (de la Cruz López ve ark 2019). mTORC2 sinyali, AKT aktivasyonunu arttırmaya ek olarak, aktin hücre iskeletinin organizasyonunda yer alır (Copp ve ark 2009). mTOR sinyaline bağlı birçok onkogen veya tümör baskılayıcı gen göz önüne alındığında, mTORC1 fonksiyonunun tüm insan tümörlerinin %70'ine kadar hiperaktive olabileceği tahmin edilmektedir (Forbes ve ark 2011).

Karsinogenez sürecinde ve özellikle metastaz sürecinde, enerji metabolizmasının yeniden düzenlemesi ve mitokondrial dinamiklerin regülasyonunun merkezi rolü nedeniyle, çalışmamızda juglonun mitokondrial biyogenez ve aktivasyonunda anahtar moleküller olan GRP75, TFAM ve mTOR genlerinin ifade düzeyleri üzerine etkisini PANC-1 ve BxPC-3 insan pankreas kanseri hücre hatlarında araştırmayı amaçladık.

1.1. Pankreas

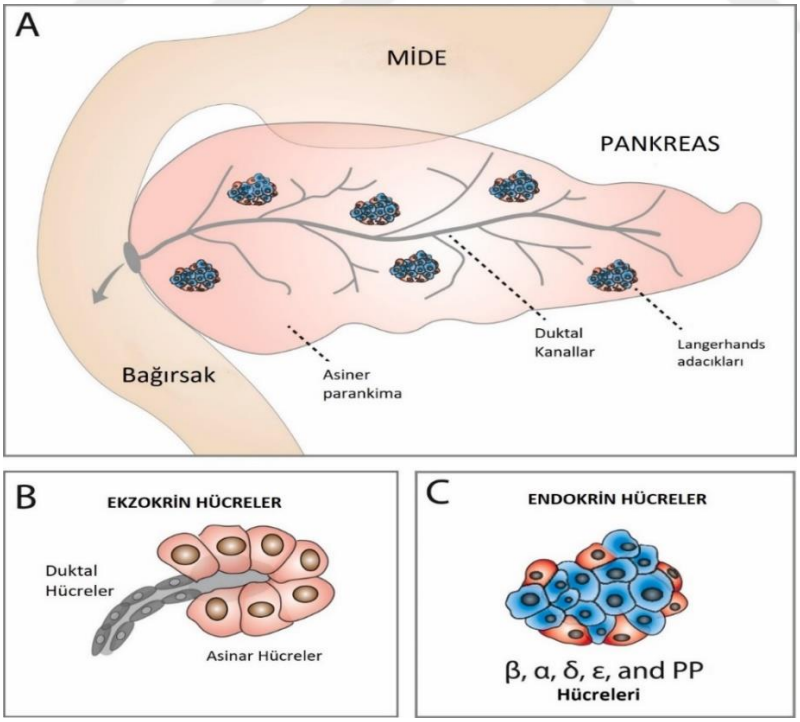
Pankreas, karın arka duvarında, bel bölgesinde yer alan omurlar olan lomber vertebra olarak bilinen omurlardan L1 ve L2 omurlarının gövdelerini çaprazlayan, retroperitoneal olarak bulunan, yardımcı bir sindirim bezidir. Pankreas, sağda duodenum ve solda dalak arasında üst karında enine uzanır. Anatomik olarak baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere dört bölüme ayrılır. Baş; inferior vena kava ve renal ven üzerinde yer alır ve duodenum ile çevrilidir (Şekil 1.1.). Pankreasın kuyruğu dalak hilusuna kadar uzanır. Ortalama olarak 100-150 g ağırlığında ve 15-25 cm uzunluğundadır (Talathi ve ark 2022).

Fizyolojik olarak pankreas; yapısal olarak farklı olsa da işlevsel olarak ekzokrin ve endokrin pankreas olmak üzere entegre iki glandüler sistemden oluşur. Endokrin hücreler, kan glikozunu düzenlemek için insülin ve glukagon gibi hormonları salgılar. Pankreasta bu endokrin hücrelerin kümeleri Langerhans adacıkları olarak da bilinir. Ekzokrin hücreler, sindirime yardımcı olmak için ürettiği hormonları ince bağırsağa bırakır. Bu hücreler, pankreas boyunca mevcut olan kanalların ucunu kaplar (Liaquat ve Kasi 2022).



Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı (Röder ve ark 2016).

Pankreasın %98-99 gibi çok büyük bir kısmını ekzokrin salgı yapan asinar hücreler ile boşaltım kanalları oluşturur. Yalnız %1-2 gibi küçük bir kısmı endokrin salgı yapan Langerhans adacıklarından oluşmuştur (Şekil 1.1) (Alvarez Fallas ve ark 2021).



Şekil 1.2. Endokrin ve ekzokrin pankreas hücreleri (Alvarez Fallas ve ark 2021).

Pankreasın ekzokrin sekresyonunu salgılayan kısmı tükürük bezlerine benzer yapıdadır. Ekzokrin pankreas esas olarak bezin hacminin yaklaşık %90'ını oluşturan asiner hücreler ve geri kalan %10'u oluşturan duktal hücreler (Şekil 1.2.) olmak üzere iki tip epitel hücresinden oluşur. Duktal hücreler, bez boyunca yayılan karmaşık, tübüler bir ağ oluşturur ve büyük hacimlerde bikarbonat içeren sıvı salgılar. Asiner hücreler ise bu kanallara salınan ve daha sonra gıdaların sindirimine yardımcı oldukları duodenuma geçen sindirim enzimleri (zimojenler) ve sodyum klorürce zengin sıvının öncülerini üretir ve taşırlar (Saint-Criq ve Gray 2017).

Endokrin pankreas; pankreas boyunca dağılmış ve pankreas kütlesinin yaklaşık %1-2'sini oluşturan Langerhans adacıklarından oluşur. Normal bir pankreasta yaklaşık 1.000.000 Langerhans adacığı vardır (Moo ve ark 2009). Adacıklar çeşitli hücre tiplerini içerir. Sayıca en fazla olanları insülin üreten beta (β) hücreleri, glukagon üreten alfa (α) hücreleri ve somatostatin üreten delta (δ) hücreleridir. Ayrıca, memeli adacıklarında grelin üreten epsilon (ε) hücreleri ve pankreatik polipeptit (PP) hücreleri de tanımlanmıştır. Hormon üreten bu hücrelerin yanı sıra, Langerhans adacıkları ayrıca bağışıklık hücrelerini ve otonom sinir sistemi uçlarını barındıran bir damar ağı tarafından kaplıdır (Arrojo e Drigo ve ark 2015).

1.2. Pankreas Kanseri

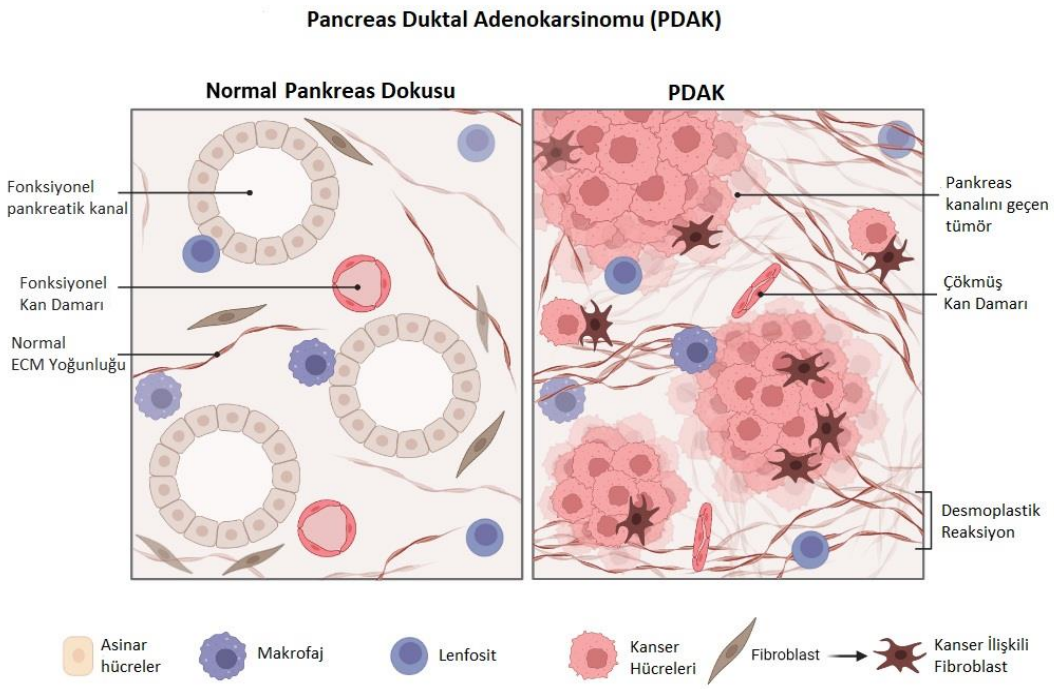
Pankreasta başlayan ve buradan köken alan kansere tipik olarak pankreas kanseri denir. Pankreas kanseri çeşitli maligneteler için çatı bir terimdir. Pankreas kanseri temel olarak iki tip pankreas kanserine ayrılır: pankreasın ekzokrin bezlerinde ortaya çıkan en yaygın olan ve vakaların yaklaşık %90'ını oluşturan pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK) ve daha az yaygın olan (%5'ten az) ve pankreasın endokrin dokusunda oluşan pankreas nöroendokrin tümörü (PanNET)'dir.

Pankreas duktal adenokarsinomu de nova olarak ortaya çıkmadığı ve temel olarak iki tip öncü lezyondan, pankreas intraepitelyal neoplazi (PanIN)'den ve intraduktal papiller müsinöz neoplazmalar (IPMN'ler)'dan köken aldığı bilinmektedir. Bu lezyonlar düşükten yüksek dereceli displaziye doğru histolojik ve genetik progresyona uğrayarak sonunda invaziv karsinoma dönüşmektedir (Minici ve ark 2022). PDAK'ın öncül lezyonları olan, PanIN ve IPMN'ın yanı sıra müsinöz kistik neoplazmalar (MCN) ve muhtemelen atipik düz lezyonlar (AFL) gibi farklı öncü lezyonlardan kaynaklanabileceği de bilinmektedir (Opitz ve ark 2021).

Pankreas adenokarsinomunun baskın öncüsünü temsil ettiği düşünülen öncü lezyon PanIN'dir. PanIN, küçük intralobüler pankreas kanallarından kaynaklanan mikroskobik

(genellikle <5 mm) düz veya papiller bir lezyondur. Pankreasın duktal adenokarsinomu olan hastalardan alınan rezeke edilmiş pankreas çalışmaları, birçok hastanın tümörü çevreleyen ve pankreasın geri kalanında multifokal, mikroskobik PanIN'ler olduğunu göstermiştir (Distler ve ark 2014). PanIN lezyonlarının, düşük dereceli PanIN'den (LG-PanIN) yüksek dereceli PanIN'e (HG-PanIN) ve son olarak pankreas duktal adenokarsinoma genetik ve epigenetik değişimlerin adım adım birikmesiyle geliştiği düşünülmektedir. HG-PanIN, PDAK'ın önemli bir öncü lezyonu olmasına rağmen, nadiren teşhis edilir; çoğu HG-PanIN lezyonu, PDAK içeren rezeke edilmiş örneklerde tesadüfen bulunur. Ek olarak, PanIN lezyonlarından PDAK gelişim mekanizmalarına ilişkin ayrıntılar da büyük ölçüde bilinmemektedir (Fujiwara ve ark 2019).

PDAK'ın ayırt edici özelliği immünsüpresif bir tümör mikro-ortamı (TME)'nın oluşmasıdır ve bu sayede immün gözetimden kaçabilir. TME, büyük ölçüde kanserle ilişkili fibroblastlardan, immünosupresif immün hücrelerden, immün düzenleyici çözünür faktörlerden, nöronal ağ hücrelerinden ve karmaşık karşılıklı etkileşimlere sahip endotelyal hücrelerden oluşan PDAK dokusu içindeki bir desmoplastik stroma topluluğudur (Şekil 1.3.) (Opitz ve ark 2021).



Şekil 1.3. Pankreas duktal adenokarsinomu (Osei-Bordom ve ark 2021).

IPMN'ler ise yine pankreas kanseri için öncü lezyonlar olarak iyi bilinmektedir. Esas olarak ana pankreas kanalından veya yan dallardan birinden kaynaklanmasına göre sınıflandırılan geniş bir patoloji grubunu temsil ederler. Bu ayrım önemlidir, çünkü malignite riski önemli ölçüde farklıdır. Örneğin, birkaç çalışmada, çıkarılan yan dal lezyonlarının ortalama %25'ine kıyasla, rezeke edilen ana kanal IPMN'lerinin ortalama %70'inde karsinoma in situ dahil olmak üzere malign hücrelerin mevcut olduğu bulunmuştur (Tanaka ve ark 2006).

Lokalize pankreas tümörlerinin çoğu asemptomatiktir ve pankreas adenokarsinomunun bilinen mevcut semptomları genellikle belirsiz ve heterojendir (Greer ve Brand 2007). Tümörün cerrahi rezeksiyonu, PDAK'lı hastalar için tek küratif seçenek olmaya devam etmektedir ancak hastalık esas olarak küratif amaçlı tedavinin mümkün olmadığı bir aşamada teşhis edilir. Geç tanı konması nedeniyle sınırlı sayıda hastada bu tedavi uygulanabilmektedir (Greer ve Brand 2007). Tümör genellikle pankreasın başında bulunur. Buradan çevre dokulara yayılır; karaciğer, dalak ve peritona metastaz yapar. Metastaz yaygındır ve bu nedenle, hasta sonuçlarını iyileştirmek için adjuvan kemoterapi reçete edilir (Jain ve Bhardwaj 2021). Uygun hastalarda palyatif bakım veya cerrahinin yanı sıra, mevcut tedavi seçenekleri DNA'ya zarar veren kemoteröpotik ajanlara dayanmaktadır, ancak yine de üç yılda %40'tan daha az bir yaşam beklentisi sunmaktadır (Conroy ve ark 2018).

Şu anda asıl sorun, geç tanı ve buna bağlı olarak sınırlı tedavi seçenekleri ile birlikte bu kötü prognozdur.

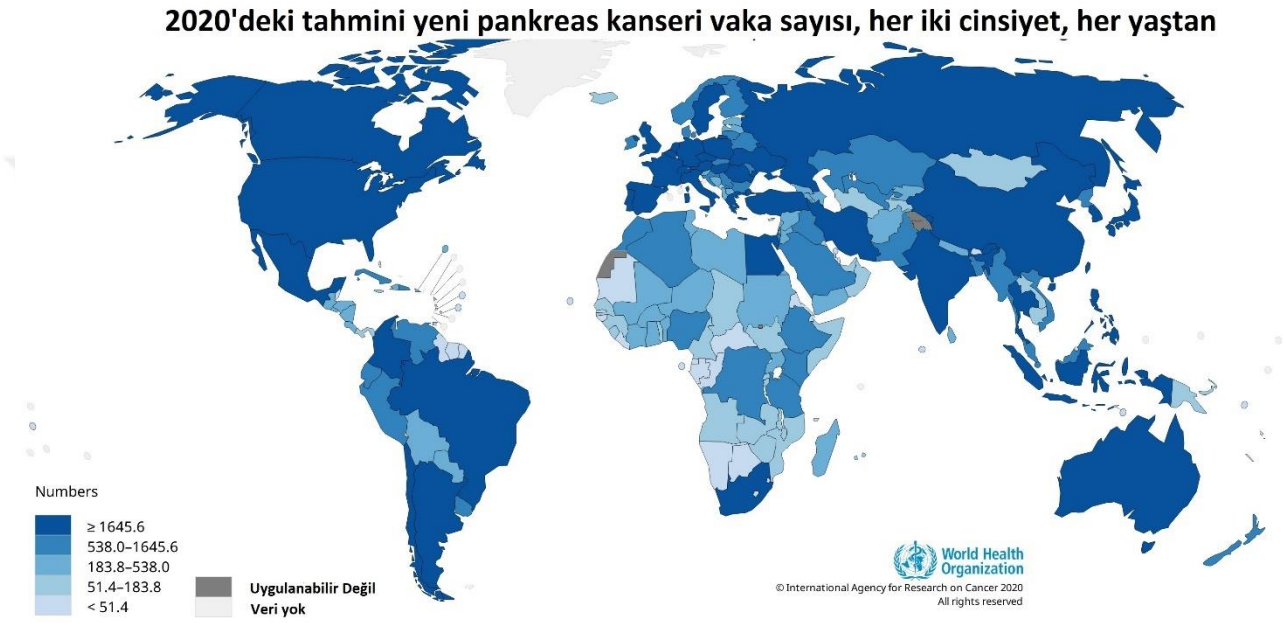
1.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Pankreas kanseri insidansı coğrafyaya ve popülasyonlara göre değişkenlik gösterir. Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN)' ne göre 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 495.773 yeni pankreas kanseri vakası kaydedilerek tüm malign tümörler arasında pankreas kanseri 12. sırada yer almaktadır. 2020 yılında pankreas kanserinden 466.003 kişi yaşamını kaybetmiştir. Kansere bağlı ölümlerde ise pankreas kanseri 7. sırada yer almaktadır. İnsidans ve mortalite erkeklerde kadınlara göre daha yüksekti. Yaşa göre standartlaştırılmış oran (ASR)' a göre Türkiye'de pankreas kanseri indisansı ise 100.000 kişide 7.9'dur. Pankreas kanserine bağlı ölüm oranı ise Türkiye'de 100.000 kişi başına 7.7 olarak kaydedilmiştir.

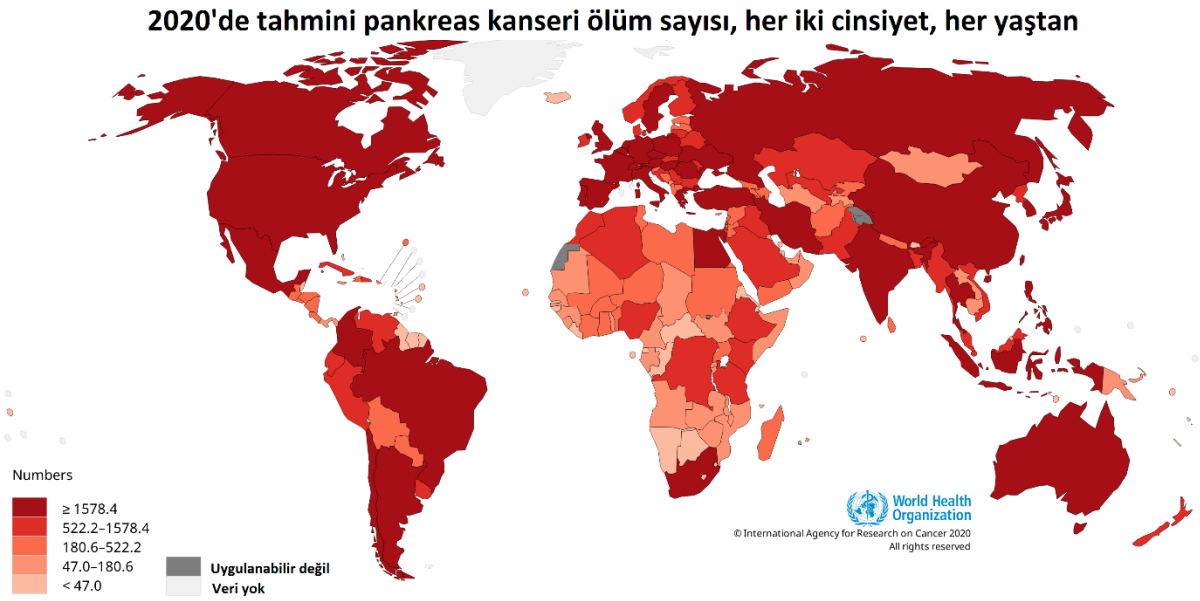
Pankreas kanseri; Amerika Birleşik Devletleri'nde, yılda yaklaşık 49.800 ölümün nedeni olarak, kansere bağlı ölümlerin akciğer ve kolon kanserinden sonra üçüncü önde gelen nedenidir. 2030 yılına kadar kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olması

beklenmektedir (Siegel ve ark 2020). Gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere kıyasla daha yüksek insidans oranlarına ilişkin genel bir eğilim vardır. Daha yüksek insani gelişme indeksi ülkelerinde hem erkeklerde hem de kadınlarda pankreas kanseri insidansı daha yüksektir (Wong ve ark 2017).

2020'de dünya çapındaki farklı ülkelerin insidans ve ölüm oranları Şekil 1.4. ve Şekil 1.5. ‘de gösterilmektedir.



Şekil 1.4. Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) verileri pankreas kanseri insidansı (Cai ve ark 2021).



Şekil 1.5. Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) verileri pankreas kanseri ölüm oranları (Cai ve ark 2021).

Pankreas kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan PDAK, 5 yıllık genel sağkalımı yalnızca %5 ila %7 olan, oldukça agresif bir tümördür (Minici ve ark 2022). Pankreas kanserinin diğer kanserlere oranla nispeten düşük insidansı ve düşük sağkalımı nedeniyle, hastalığın gelişimi ile ilişkili risk faktörleri vaka kontrol çalışmaları kullanılarak araştırılmıştır. Ne yazık ki, bu çalışma tasarımlarının seçim yanlılığı ve hatırlama yanlılığı gibi bir takım zayıf yönleri vardır. Aşağıda pankreas kanseri risk faktörleri, değiştirilemeyen ve değiştirilebilir risk faktörleri şeklinde iki ana başlıkta sunulmuştur.

1.3.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

1.3.1.1. Yaş

Pankreas kanseri ağırlıklı olarak yaşlı bireylerin bir hastalığıdır. Yaşamın ilk otuz yılında pankreas kanseri oldukça nadirdir. Ancak 30 yaşından sonra insidans oranları katlanarak artar ve yaşamın 7. ve 8. dekatlarında zirve yapar. ABD'de, pankreas kanseri olan hastaların çoğuna 40 ila 80 yaşları arasında teşhis konur ve ortalama pankreas kanseri teşhisi yaşı 71'dir. Erken evre kanserli hastaların ortalama yaşı, ileri evre kanserli hastalardan yaklaşık 2.3 yıl daha küçüktür, ki bu da kanserin ilerlemesinde erken evreden geç evreye ilerlemesinin yaklaşık 1-2 yıl sürdüğünü düşündürmektedir (Midha ve ark 2016).

1.3.1.2. Cinsiyet

Dünya çapında pankreas kanseri insidansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Yaş insidansı, erkeklerde 5.5 iken, kadınlarda 4.0'tür (McGuigan ve ark 2018). Yüksek gelişmişlik indeksi olan ülkelerde bu eşitsizlik daha fazla görünmektedir. Wahi ve ark.'nın (Wahi ve ark 2009) yaptığı, 15 çalışmanın sistematik bir incelemesinde, kadınlarda üreme faktörlerinin pankreas kanseri ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, pankreas kanseri insidansındaki erkek birey çokluğu için alternatif açıklamalar olarak çevresel veya genetik faktörler için farklı maruziyetlere işaret etmektedir.

1.3.1.3. Aile Öyküsü ve Genetik Yatkınlık

Aile öyküsü, pankreas kanseri için bilinen bir risk faktörüdür ve hastalık riskinin önemli bir göstergesidir. PDAK'ın %10 kadarının kalıtsal bir bileşene sahip olduğu bildirilmiştir (Klein ve ark 2007). Bu ailesel yatkınlık paterninin küçük bir kısmı, bilinen genlerdeki örneğin; BRCA2, p16/CDKN2A, PRSS1 ve STK11 v.b. kalıtsal mutasyonlarla açıklanabilirken, çoğunluğunun genetik temeli halen bilinmemektedir. Pankreas kanserinden etkilenen yalnızca bir akrabaya sahip olmanın, PDAK geliştirme riskinin %80 oranında artmasıyla sonuçlandığını gösteren meta-analiz çalışması vardır (Permuth-Wey ve Egan 2009). Genetik mutasyonlara sahip olma riski yüksek olan bireylerin belirlenmesi ve sınıflandırılması, pankreas kanserine neden olan bu pankreas neoplazmalarının erken tespit edilmesinin yanı sıra hedefe yönelik ve gene özgü tedavide geliştirilmesi ve hastaların bundan yarar sağlayabilmesi bakımından önemlidir (Becker ve ark 2014). Lynch sendromu, Ailesel atipik çoklu mol melanom sendromu, Peutz-Jeghers sendromu, kalıtsal meme ve yumurtalık kanseri sendromu, Li-Fraumeni sendromu, Ailesel adenomatöz polipoz dahil olmak üzere pankreas kanseri riskini arttırdığı bilinen birçok kalıtsal genetik bozukluk vardır. Bu hastalıklara sebep olan PRSS1, K-RAS, p16, p53 ve BRCA2 gibi genlerde mutasyon veya delesyon bulunan kişilerde pankreas kanseri gelişme riski de artmaktadır (Ilic ve Ilic 2016).

1.3.1.4. Diyabet

Diyabet mellitus, hem pankreas kanseri için bir risk faktörü hem de pankreas kanseri sonucunda oluşan bir hastalıktır. Yeni teşhis edilmiş pankreas kanseri olan birçok hasta, diyabetin başladığını, diyabetlilerde ise hastalığın kötüleştiğini bildirmektedir. 3 yıl ve daha uzun süre devam eden diyabet, pankreas kanseri riskinin 1,5-2,4 kat artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Everhart ve Wright 1995). Pankreas kanserinde diyabetin çok yüksek prevalansı ve bunun kanser teşhisi ile yakın zamansal ilişkisi, pankreas kanserinin diyabete

neden olduğu fikrini destekleyen güçlü epidemiyolojik kanıtlar sağlar (Chari ve ark 2008). Bu hipotez için bir destekleyici kanıt da, tümörün alınmasının, glikoz toleransını iyileştirdiğinin ve metabolik kusuru tersine çevirdiğinin gösterildiği küçük klinik çalışmalardır (Permert ve ark 1993).

1.3.1.5. Etnik Köken

Birçok çalışma, pankreas kanseri insidansında ırklar arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir (Brotherton ve ark 2016). Asyalı-Amerikalılarda ve Pasifik Adalılarda pankreas kanseri insidans oranları en düşükken, Afrikalı-Amerikalılarda pankreas kanseri insidans oranları Kafkasyalılardan daha yüksektir (Midha ve ark 2016). Genel olarak, siyahi insanlarda pankreas kanseri riski, diğer herhangi bir ırk grubuna göre oldukça yüksektir (Yadav ve Lowenfels 2013). Pankreas kanserine yakalanmış Çinli hastaların, diğer pankreas kanserli Batılı veya Japon hastalardan farklı bir KRAS ve p53 ifadelerine sahip olduğu da bulunmuştur (Song ve ark 2000). Bu bulgular, diğer tümörlerde görülenlere benzer şekilde pankreas kanserinde insidansı ve biyolojik davranışı etkileyebilecek ırk ve etnik kökene bağlı genetik ve moleküler farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir. Irklar arasında pankreas kanseri insidansındaki farklılıklar diyet, alkol, sigara ve D vitamini yetersizliği gibi değiştirilebilir risk faktörlerine bağlanabilir.

1.3.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri

1.3.2.1. Sigara Kullanımı

Epidemiyolojik çalışmalar, birçok nedensel faktörün pankreas kanseri ile ilişkili olmasına rağmen kanser geliştirme riskinin en güçlü pozitif ilişkiye sahip olan etmeninin değiştirilebilir bir risk faktörü olan sigara içmek olduğunu göstermiştir (Ghadirian ve ark 2003). Sigara içmek, pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %20- 25'inin gelişimine katkıda bulunabilen bir etmen olmasının yanı sıra en önlenebilir olanıdır. Pankreas kanseri teşhisinden önce sigara içen hastaların ölüm riski, hiç sigara içmemiş olanlara kıyasla yaklaşık %40 daha fazladır (Yuan ve ark 2017). Avrupa'da yapılan büyük bir vaka kontrol çalışması, sigara içenlerin hiç sigara içmeyenlere kıyasla %72 daha fazla pankreas kanseri geliştirme riskine sahip olduğunu doğrulamış ve çalışma aynı zamanda tüm pankreas kanseri teşhislerinin yaklaşık %16'sının tütün önleyici tedbirler yoluyla önlenebileceğini rapor etmiştir (Molina-Montes ve ark 2020). Kaçınılabilir bir risk faktörü olarak, sigara içmek özel bir endişe kaynağıdır ve bu nedenle, tütün dumanındaki karsinojenlerin, kanserojen mekanizmalarının araştırılmasının ve ilgili

mekanizmaların aydınlatılmasının, her yıl teşhis edilen PDAK vakalarının sayısını önemli ölçüde azaltacağı öngörülmektedir (Hu ve ark 2021).

1.3.2.2. Obezite ve Diyet

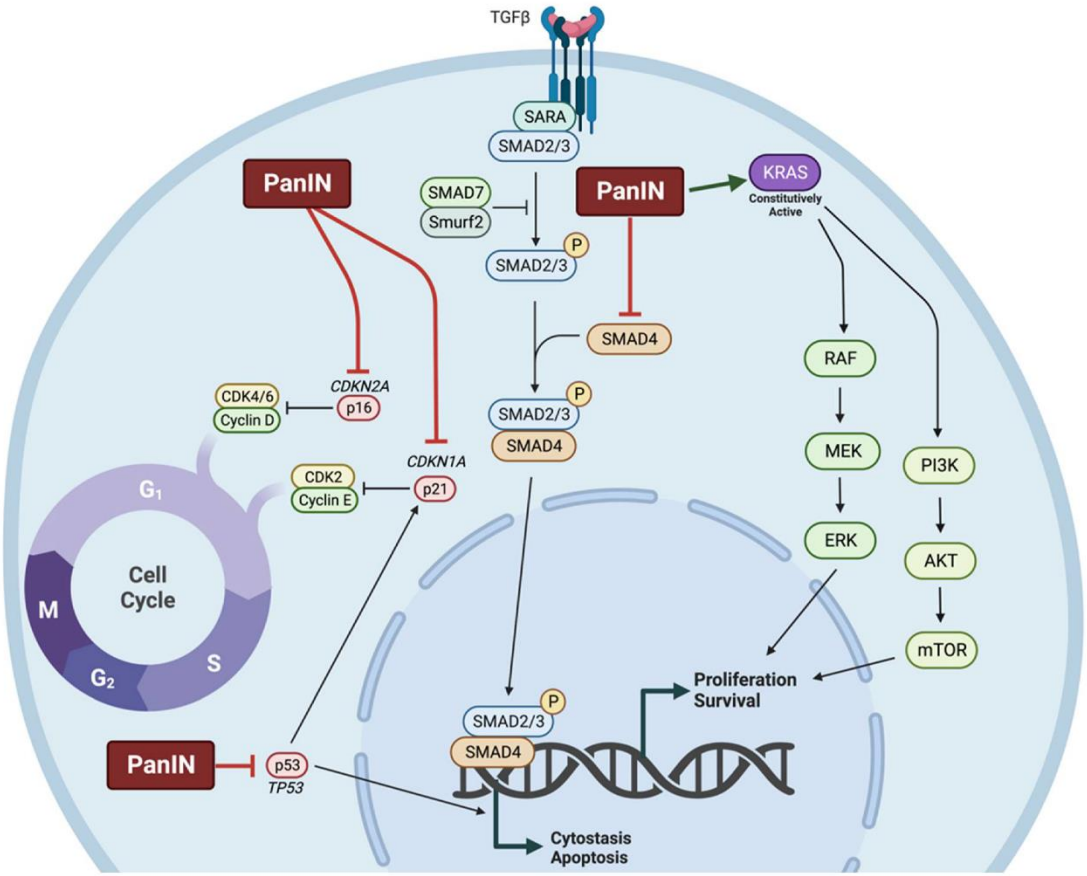
Yaygın bir küresel sağlık sorunu olan obezite, pankreas kanseri için de risk faktörleri arasında kabul edilmektedir. Birleşik Krallık'tan bir vaka kontrol çalışması, artan vücut kitle indeksi ile pankreas kanseri riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (Carreras-Torres ve ark 2017). 2020 yılında farelerde yapılmış yeni bir çalışma, obezitenin anormal pankreatik adacık kolesistokinin ekspresyonunu indükleyerek, onkojenik KRAS yönlendirmeli pankreas duktal tümör oluşumunu hızlandırdığını bildirmiştir. Yine aynı çalışmada kilo kaybının obezite kaynaklı PDAK ilerlemesini durdurma veya geciktirme gibi etkileri olduğu bildirilmiştir (Chung ve ark 2020). Son araştırmalar, yüksek yağlı diyetlerin, siklooksijenaz-2 aracılığıyla onkojenik KRAS'ı aktive edebileceğini, bunun da pankreatik fibrozise, inflamasyon ve pankreas kanserinin öncü lezyonları olan PanIN'lerin ve PDAK'ın gelişimine yol açabileceğini ortaya koymıştur (Philip ve ark 2013).

1.4. Pankreas Kanseri ve Genetik

Kanser, kontrolsüz ve sınırsız hücre büyümesi ve bu hücrelerin metastatik özellikler kazanması ile karakterize bir hastalıktır. Çoğu durumda, kanser, tümör baskılayıcı genlerin aktive olmaması ve/veya onkogenlerin aktivasyonuyla birlikte, kontrolsüz hücre döngüsünün ilerlemesi ve apoptotik mekanizmaların inaktive olmasıyla oluşur. İyi huylu (bening) tümörlerin aksine, kötü huylu (malign) kanserler, kısmen dokuya özgü hücre-hücre bağlanması için gerekli olan hücre yapışma reseptörlerinin aşağı regülasyonu ve hücre hareketliliğini artıran reseptörlerin yukarı regülasyonu nedeniyle ortaya çıkan metastazik özellik kazanır. Ek olarak, membran metaloproteazlarının aktivasyonu, metastatik kanser hücrelerinin yayılması için fiziksel bir yol sağlar. Bu genetik ve hücresel değişikliklerin meydana geldiği farklı mekanizmalar vardır. Genlerdeki mutasyonlar, kromozomlarda oluşan translokasyon veya delesyonlar veya sinyal yollarının düzensiz ekspresyonu veya aktivitesi hücreyi kanserleşme sürecine götüren etkenlerdir. Bu olaylar, düzensiz hücre döngüsünü destekleyen ve/veya apoptotik yolları inaktive eden genleri aktive edebilir (Sarkar ve ark 2013).

Pankreatik duktal adenokarsinomu moleküler düzeyde oldukça heterojen bir hastalıktır. Dört farklı gendeki sürücü mutasyonların ana sebep olduğu gösterilmiştir. Bunlar, onkojenik KRAS mutasyonları ve tümör baskılayıcı genler olan; TP53,

CDKN2A ve SMAD4 mutasyonlarıdır. Aktive edici KRAS mutasyonları, PDAK vakalarının %90'ından fazlasında bulunur (Bailey ve ark 2016). Pankreas duktal adenokarsinom vakalarının öncül lezyonları olan PanIN'lerde bozulan hücre sinyal yolları Şekil 1.6'da gösterilmiştir. PanIN, p16 ve p21'i kodlayan CDKN2A ve CDKN1A tümör baskılayıcı genlerdeki inaktive edici mutasyonlarla karakterize edilir. Bu inaktive edici mutasyonlar hücrelerin, hücre döngüsünün G1'den S-fazına ilerlemesine yol açar. Lezyonların %90'ından fazlası, RAF-MEK-ERK ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) / Protein kinaz B (AKT) / mTOR sinyalinin aşırı aktivasyonuna sebep olan yapısal olarak aktif KRAS mutasyonlarına sahiptir, bu da daha fazla proliferasyon ve hayatta kalma ile sonuçlanır. Ayrıca PanIN, SMAD4 inhibisyonu yolu ile aşağı akış TGFβ sinyalini keserek apoptoz ve sitostazın azalmasına yol açar. Son olarak, PanIN sıklıkla tümör baskılayıcı p53'ü kodlayan TP53 geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarına neden olur (Vlavcheski ve ark 2022).



Şekil 1.6. PanIN lezyonlarının oluşum mekanizmaları (Vlavcheski ve ark 2022).

KRAS onkogeni (kromozom 12p), pankreas kanserlerinin yaklaşık %90'ında nokta mutasyonu ile aktive edilir ve bu mutasyonlar en yaygın olarak 12.kodonda, ayrıca 13. ve 61.kodonda da ortaya çıkmaktadır (Caldas ve Kern 1995). KRAS'taki mutasyonlar ayrıca pankreas neoplazisinin gelişiminde gözlemlenen en erken genetik anormalliklerden biridir (Löhr ve ark 2005).

Tüm kanser türlerinin dizilemesindeki en tutarlı ve dikkate değer bulgulardan biri de; tüm kanserlerin önemli bir bölümünün (~ %10), artan kanser riski ile ilişkili bir germline varyantı olan bireylerde ortaya çıkmasıdır (Campbell ve ark 2020). Pankreas kanseri ile yapılan çalışmalar, pankreas kanserinin %20'sinden fazlasının kalıtsal dizi varyasyonundan kaynaklandığını göstermektedir (Raphael ve ark 2017).

1.5. Kanser ve Mitokondri İlişkisi

Mitokondri, enerji metabolizması, hücre ölümü, hücre çoğalması ve farklılaşması için önemli olan sinyal yollarını düzenleyen temel hücre içi organeldir. Bu nedenle mitokondri; başlama, büyüme, metastaz, nüksetme ve edinilmiş ilaç direnci dahil olmak üzere kanser biyolojisinde temel olarak yer alır. Bu çıkarımlara dayanarak, mitokondri, kanser tedavisi için önemli bir terapötik hedef olarak önerilmiştir. Mitokondrinin kanser biyolojisindeki klasik görüşüne ek olarak, son çalışmalar kanserde mitokondrinin yeni patofizyolojik rollerini ortaya koymuştur (Kim ve ark 2017).

Mitokondri, onları diğer organellerden farklı kılan benzersiz özelliklere sahiptir. Yapısal olarak mitokondri, iyon kanalları, taşıyıcılar, reseptörler ve elektron taşıma sistemleri (ETS) dahil olmak üzere çeşitli membran proteinleri içeren bir çift katlı lipid membrana sahiptir. Mitokondrinin merkezi rolünden biri enerji üretmektir. Bu organellerin son derece organize ETS ve ATP sentez sistemleri, biyoenerji molekülü ATP'nin büyük miktarda ve çok etkin bir şekilde üretilmesini sağlamaktadır (Acuña-Castroviejo ve ark 2001).

Sağlıklı bir hücrede, mitokondri trikarboksilik asit döngüsü (TCA), oksidatif fosforilasyon, yağ asidi oksidasyonu ve kalsiyum homeostazı yoluyla bazı hayati hücresel işlevleri düzenler. Mitokondri ayrıca HEM biyosentezini, ketogenezi, üre döngüsünü, glukoneogenezi ve demir–kükürt kümesi oluşumunu da düzenlemektedir (Reichert ve Neupert 2004). Mitokondri iki katlı iç ve dış membran, membranlar arası boşluk, matriks ve kristadan oluşur. Mitokondrial matriksin iç boşluğunun çoğunu, geniş kıvrımlarından oluşan kristalar kaplamaktadır. Bu mitokondrial alanların her biri belirli roller oynar (Wallace 2012). Ayrıca mitokondri, matriksinde 2-10 adet sirküler yapıda kendi DNA'sına (mtDNA) sahiptir.

Bir hücrenin normal işleyişi için mitokondri ve diğer organeller arasındaki uygun karşılıklı etkileşim (cross-talk) çok önemlidir. Bu bağlantıdaki herhangi bir bozulma, belirli bir takım onkogenleri ve mitokondrial genom mutasyonunu aktive edebilen hücresel ortamın değişmesine yol açabilmektedir (Hasnat ve ark 2019). Mitokondrinin stabilitesi için, çekirdek ve mitokondri arasında sıkı bir kontrol vardır. Bu iki organel arasındaki herhangi bir karşılıklı cross-talk bozukluğu, hem DNA hasarına hem de büyüme faktörlerinin anormal aktivasyonuna, Ca^{+2} aşırı yüklenmesine ve kanserin belirgin özellikleri olan metabolik bozukluklara yol açabildiğine dair kanıtlar vardır (Guha ve Avadhani 2013, Tu ve ark 2018). Ayrıca güçlü cross-talk etkileşimi Endoplazmik Retikulum (ER) ve mitokondri arasında da mevcuttur. Fizyolojik ve mekanik olarak sağlanan bu etkileşimler sayesinde Ca^{+2} sinyali, apoptozun düzenlenmesi, ER stres yanıtı, fosfolipid biyosentezi ve ER'den mitokondriye translokasyon gibi önemli hücresel biyolojik fonksiyonların koordinasyonu gerçekleşir. Bir diğer karşılıklı etkileşim mitokondri ve peroksizomlar arasında gerçekleşir ki bu etkileşim, reaktif oksijen türleri (ROS) ve lipid homeostazı için çok önemlidir (K ve ark 2021).

Mitokondri, en az beş mekanizma aracılığıyla kanser fenotiplerinin gelişiminde önemli katkı sağlamaktadır. Birincisi, oksidatif strese aracılık eden ve kanser oluşumunun ve ilerlemesinin başlıca nedeni olan yüksek miktarda mitokondrial ROS üretimidir (Kumari ve ark 2018). İkincisi, zorlu çevresel koşulların neden olduğu talepleri karşılamak üzere metabolik yeniden programlama sürecidir. Üçüncü olarak, mitokondrinin, apoptotik hücre ölümü düzenlemesindeki kilit rolüdür (Kumari ve ark 2018). Dördüncüsü, başta ETS alt birimleri olmak üzere mitokondrial proteinleri kodlayan mtDNA ve çekirdek DNA'sında mutasyonların oluşu ve/veya birikimidir (Wallace 1999). Beşincisi, mitokondri biyogenez homeostazının bozulmasıdır. Bu listeye artan oksidatif stres sırasında, apoptozu önlemek için mitokondrial fonksiyonları korumak, oksidatif stresi azaltmak ve mtDNA ve nükleer DNA'yı oksidatif hasardan korumak için hücrenin kullandığı yollardan biri olarak telomeraz ters transkriptazın çekirdekten mitokondriye mekik dokuması (Muzza ve ark 2016) ve diğer işlevler de eklenebilir.

1.5.1. Metabolik Yeniden Programlanma

1924 yılında Otto Heinrich Warburg, kanser hücrelerinin oksijen varlığında glikozu fermente ettiğini gözlemlemiş ve mitokondrial solunumdaki bazı defektlerin kanserin sebebi olabileceği görüşünü ortaya atmıştır. Enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve özellikle yüksek glikoz alımı, glikoliz ve laktat üretimi, kanserin ayırt edici özelliğidir. Hızlı kanser hücresi büyümesini desteklemek amacıyla, makromolekül biyosentezi için metabolik

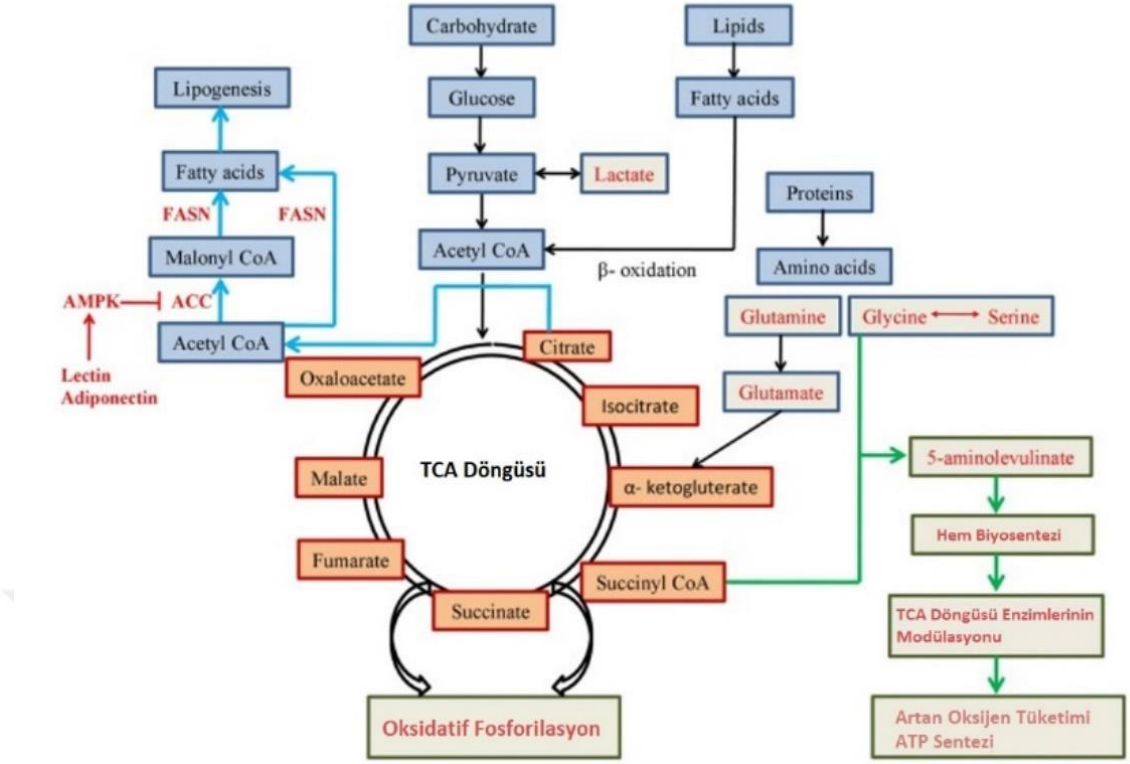
ara ürünler sağlamak üzere glikoliz oldukça yükselir. Kanser hücrelerindeki piruvatın büyük bir kısmı laktat dehidrogenaz (LDH) tarafından laktata dönüştürülmektedir. Ayrıca, sitoplazmadaki fazla laktatın, kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimi teşvik etmek üzere taşınabileceği ve kanser hücresi göçü ve invazyonunu desteklemek üzere mikroçevreyi etkileyebileceği öngörülmektedir (Zhao ve ark 2013).

Mitokondrial metabolik yeniden programlanma kanser hücrelerinde onkogenler tarafından düzenlenmektedir (Badrinath ve Yoo 2018). PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonu ile glukoz taşıyıcıları (GLUT)'nın hücre yüzeyinde artan ifadesi ve onun sonucu olarak glikoz alınımında ve glikoliz yolunda artış gerçekleşmektedir (Elstrom ve ark 2004, Buzzai ve ark 2005).

Kanser hücreleri yukarıda bahsedildiği gibi aerobik glikoliz yolunu ağırlıklı olarak kullansa da son kanıtlar, artmış laktat üretimine rağmen, glikozun pirüvat üreterek de mitokondrial sitrik asit döngüsüne girdiğini göstermektedir. Glikolitik yolun son ve sınırlayıcı faktörü prüvat kinaz M2 (PKM2) izoformudur. PKM2 dimer formunda düşük kinaz aktivitesine sahip olup pirüvatı laktat oluşumuna yönlendirirken, tetramer formu yüksek kinaz aktivitesine sahip olup pirüvatın mitokondriye geçerek Asetil koenzim A (Asetil CoA)'ya dönüşmesi ve sitrik asit döngüsüne girmesini yönlendirir (Wong ve ark 2013). Kanserde PKM2 ifadesinin arttığı ve glikolizi, proliferasyon, migrasyon ve metastazı indüklediği düşünülmektedir (Luo ve Semenza 2012, Keller ve ark 2014, Tang ve ark 2016).

Hızlı bölünen ve büyüyen kanser hücrelerinin enerjiye olduğu kadar makromoleküle gereksinimleri de oldukça yüksektir. Mitokondri makromoleküllerin ara ürünlerinin üretilmesinde metabolik yolların merkezi olarak rol oynayan organel olduğundan kanser metabolizmasında da bu özelliğiyle önemli yere sahiptir (Chattopadhyay ve Roy 2017). Yapılan çalışmalar yağ asitleri ve aminoasitlerin sentez yollarının kanser hücrelerinde upregüle olduğunu göstermiştir (Denkert ve ark 2008, Nomura ve ark 2010).

Mitokondri ve hücre için önemli bir molekül olan Asetil CoA, glikolizden gelen pirüvatın, mitokondride dönüştürülmesiyle sentezlenerek sitrik asit döngüsüne katılır ya da sentezlenen Asetil CoA lipogenez ve asetilasyonda kullanılmak üzere mitokondriden sitozole geçer. Asetil CoA'nın pirüvattan sentezi pirüvat dehidrogenaz kompleksi ile yalnızca mitokondride gerçekleşmektedir. Glikolizden gelen piruvat dışında, amino asit ve yağ asidi metabolizmasından gelen diğer metabolik substratlar da daha ileri metabolik aktiviteler için mitokondriye taşınmaktadır (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Mitokondrial metabolitleri içeren metabolik yolların şematik görünümü. Kırmızı yazı tipiyle belirtilen yolaklar ve metabolitlerin kullanımı kanser hücrelerinin değiştirilmiş metabolizma tercihlerini göstermektedir (Chattopadhyay ve Roy 2017).

Mitokondri merkezli metabolik yeniden programlama sürecinde amino asit metabolizması da önemli yere sahiptir. 1978'de Lawrence ve arkadaşları HeLa hücrelerinde glutaminin major enerji kaynağı olduğunu göstermiştir (Reitzer ve ark 1979). Daha sonra Dornier ve ark. tümör gelişiminin ilerlemesinde glutamat gibi glutaminoliz ile üretilen metabolitlerin rolüne işaret eden kanıtlar sunmuşlardır (Dornier ve ark 2017). Glutaminoliz, prolifere olan hücrelerin sitozol ve mitokondri matriksinde gerçekleşen bir dizi reaksiyondur. Bir amino asit olan glutamin glutamat, amonyum, aspartat, prüvat ve diğerlerine degrede olur. Glutamin, glutamat ve aspartat nükleik asit sentezinde kullanılırken glutamin aynı zamanda glutamat dehidrogenaz enzimi ile, krebs döngüsünün ara ürünü olan, alfa-keto gluteratı yeniler (de la Cruz López ve ark 2019). Glutaminoliz tarafından üretilen alfa-keto gluterat sitrik asit döngüsünün başlıca anaplerotik kaynağıdır (de la Cruz López ve ark 2019). Glutamin esansiyel olmayan amino asittir ve kanserde olduğu gibi stresli koşullarda esansiyeldir (Matés ve ark 2009). Stresli koşullarda glutamin türevli alfa-keto gluteratın lipid

sentezini stimüle etmede kullanıldığı gösterilmiştir (Metallo ve ark 2011). Glutamin türevi karbonlar, yağ asiti ve amino asit sentezinde kullanılmaktadır (Altman ve ark 2016). Ayrıca glutamin, pürin ve pirimidin nükleotid sentezinde nitrojen vericisi olarak ve de aspartat, alanin, glisin ve serin gibi esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezinde amino grup vericisi olarak iş görerek nükleik asit ve protein sentezine iştirak eder (Matés ve ark 2009, Matés ve ark 2020).

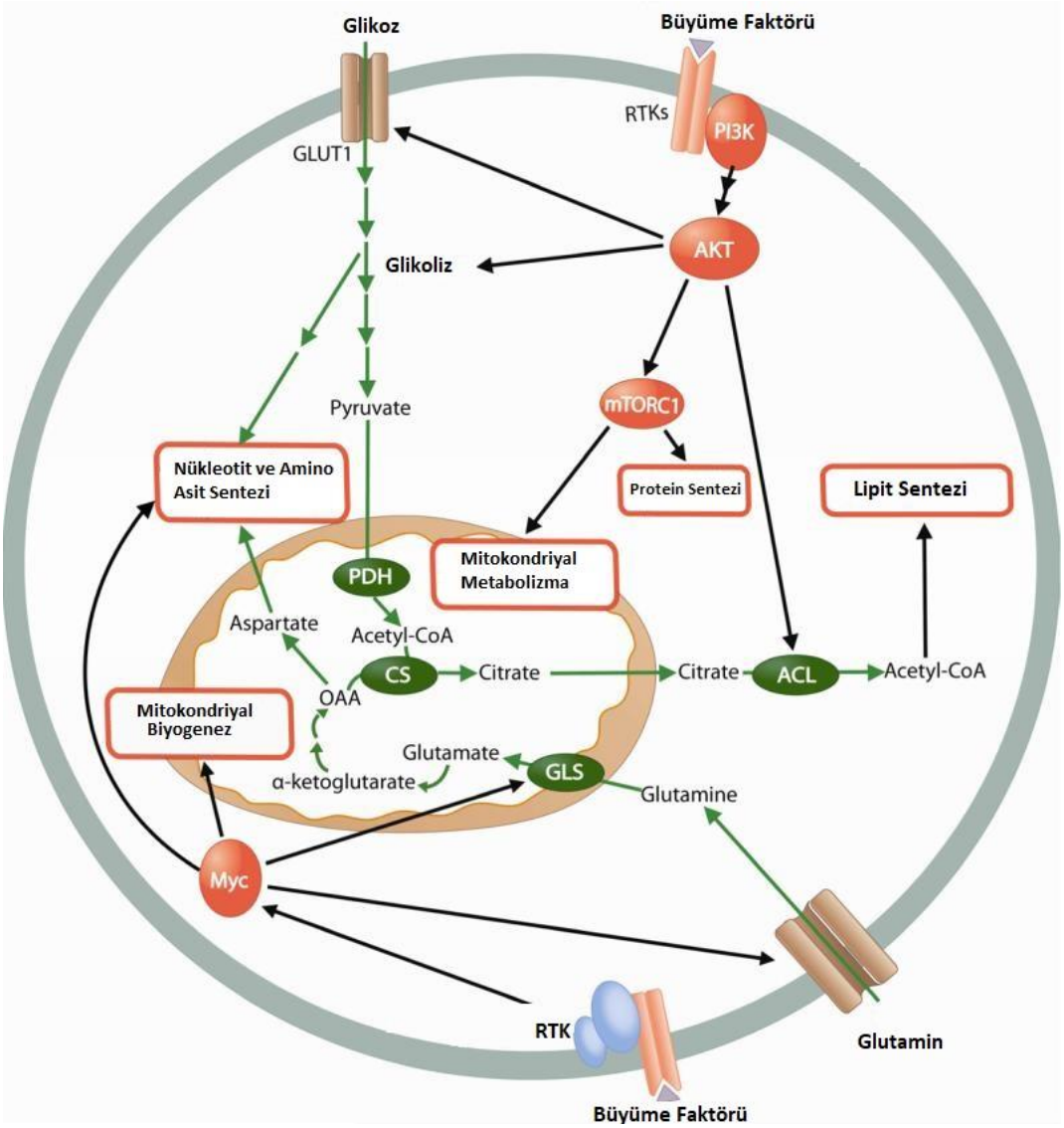
Glutaminin makromolekül sentezinin yanı sıra enerji üretimi için kullanılması ve çok hızlı çoğalan hücrelerde tüketilen nitrojen gereksinimini karşılaması kanser gelişiminde glutamini önemli kılmaktadır (DeBerardinis ve ark 2007). İnvaziv meme kanser hücrelerinin normal dokulardan glutamini aldığı ancak glutamin salgılamadığı, hücre dışı matrikste glutamat düzeyinin düşük olduğu gösterilmiştir (Dornier ve ark 2017). Kanser hücrelerinde glutamin kullanımının onkogenik Myc ifadesinin artışıyla regüle edildiği çalışmalarla ortaya konmuştur (Fan ve ark 2010).

Glisin ve serin amino asitleri kanser metabolizmasında önemli diğer iki amino asitidir. Birbirine dönüştürülebilen bu her iki amino asidin biyosentezi, sitozolik ve mitokondrial enzimatik yolları içermektedir. Serin ve glisin biyosentezinin aşırı aktivasyonunun tümör oluşumunu hızlandırabileceği ileri sürülmüştür (Amelio ve ark 2014).

Kanserde metabolik yeniden düzenlemenin bir diğer önemli alanı lipogenezdir. Hücresel zarların sentezi, enerji üretimi, proteinlerin lipid modifikasyonları, sinyal moleküllerinin üretimi gibi lipidlerin temel olduğu hücresel olaylar, yüksek proliferatif kanser hücrelerinin ihtiyacını karşılamak üzere, yüksek düzeyde lipogeneze yol açar. Kanser hücreleri, çoğunlukla ekzojen lipid kaynaklarını kullanan normal hücrelerin aksine, yağ asitlerinin de novo sentezini kullanırlar. Pek çok kanserin ortak özelliği olan artmış lipogenezin sebebinin artmış yağ asiti sentaz enzimi olduğuna dair de kanıtlar vardır (Chattopadhyay ve Roy 2017).

Son yıllarda bazı kanserlerde değişen metabolizmanın bir diğer oyuncusunun Asetil CoA üretiminde alternatif bir kaynak olan ekzojen asetat olduğu ileri sürülmektedir. Tümör hücreleri özellikle hipoksik koşulların hakim olduğu durumlarda, Asetil CaA'yı üretebilmek için karbon kaynağı olarak %50 ekzojen asetat, kalan miktarı ise glikoz ve glutamin kaynaklarından sağlamaktadır (Chattopadhyay ve Roy 2017).

Yukarda da görüldüğü gibi mitokondrial sitrik asit döngüsü anabolizma için önemli bazı ara ürünler ve yapı taşlarının tedarikçisidir. Krebs döngüsü, çok sayıda substrat ile beslenebildiğinden, hücresel metabolizmada bir merkez üssü konumundadır (Şekil 1.8.). Bu şekilde değiştirilmiş krebs döngüsü düzenlenmesi ve düzensiz oksidatif fosforilasyon ile devam eden geri bildirimi, kanserin ilerlemesi için oldukça önemli gözükmektedir (K ve ark 2021).



Şekil 1.8. Hücrede değişen mitokondrial metabolizma (Ward ve Thompson 2012).

1.5.2. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türleri

Süperoksit, hidroksil serbest radikaller ve hidrojen peroksit formundaki reakrif oksijen türleri (ROS), tüm hücrelerde fizyolojik metabolik reaksiyonlardan üretilmektedir. Mitokondri, iç zarında taşıdığı elektron taşıma sistemleri ve NAD(P)H oksidan sistemleri nedeniyle, hücresel ROS'a önemli katkıda bulunan bir organeldir. Hücreler, süperoksit dismutaz (SOD2), glutatyon, tioredoksin ve peroksiredoksinler dahil olmak üzere ROS'u nötralize etmek için çoklu antioksidan yollara sahiptir.

Normal hücreler, ROS ve antioksidan yollar arasında sabit bir denge sağlarlarken kanser hücreleri bu durumun aksine daha fazla ROS üretirler. Yüksek düzeyde ROS, proteinler, lipidler ve DNA gibi makromoleküllerin oksidasyonunu indükler. İç zardaki ETS'den taşınan elektronların sızıntısından kaynaklanan ROS mitokondrial matrikste bulunan mtDNA'yı etkiler.

Kanser hücrelerinin artmış ROS seviyelerine sahip olduğuna dair bu bulgular, ROS'u inhibe etmenin başarılı bir terapötik strateji olabileceği görüşüne neden olmuştur. Ancak ROS'un sinyalleşmeyi ve proliferasyonu uyardığı ve bununla birlikte antioksidan yolların düzenlenmesinin ROS aracılı sitotoksisiteyi önlediği ve hatta tümör sağkalımını artırabileceği ortaya çıkmıştır (Sullivan ve Chandel 2014, Shadel ve Horvath 2015). Artmış ROS miktarının hipoksiyle uyarılan HIF-1α sinyal yolunu aktive ederek, glikolitik enzimlerin ifadesini artırmak yoluyla, oksidatif fosforilasyondan glikolize metabolik kaymaya neden olabileceği de gösterilmiştir (Chattopadhyay ve Roy 2017).

Kanser hücrelerinde ROS birikimindeki artışın limiti aşması durumunda ise sitokrom c salınımı ile programlanmış hücre ölümünün tetiklendiği gösterilmiştir (Gorrini ve ark 2013, Zhang ve Xu 2016). Son yıllarda, bu kanıtlara dayanarak kanser tedavisinde ROS düzeyini daha da artırarak hücrenin apoptoza girişini indüklemeye yönelik yaklaşımlar üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

1.5.3. Mitokondrial Hücre Ölümü; Apoptoz

Hücre ölümü, gelişim, doku homeostazı ve stres durumlarının fizyolojik düzenleyicisidir. Mitokondri, apoptotik hücre ölümünün yanı sıra otofaji ve nekroptoz gibi diğer hücre ölüm yollarında da rol oynar (Gozuacik ve Kimchi 2004, Galluzzi ve Kroemer 2008).

Proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri BAX ve BAK mitokondri dış membranında oligomerize olarak dış mambranın geçirgenliğini etkileyerek por oluşumuna sitokrom c'nin sitozole salınımına ve dolayısıyla hücre ölümü yürütücüsü olan kaspaz aktivasyonuna neden olur ve apoptotik hücre ölümü gerçekleşir. Normal fizyolojik koşullarda antiapoptotik aile üyeleri Bcl-2 ve Bcl-XL, bağlanarak BAX/BAK kompleksini inhibe eder.

Kanserin ayırt edici bir özelliği de mitokondriye sıkıca bağlı bir fenomen olan hücre ölümünden kaçmasıdır. Kanser hücreleri proapoptotik Bcl-2 gen ifadesini aşağı regüle ederek ve/veya antiapoptotik genleri yukarı regüle ederek apoptozdan kaçabilirler. Böylece proapoptotik/antiapoptotik balans değişir. Bu değişim aynı zamanda kanser hücrelerinin apoptoza duyarlılığını ve kemoterapiye direnci etkiler (Sarosiek ve ark 2013).

Kanser hücrelerinde aşırı ifade olan bir diğer mitokondrial protein de Survivin'dır. Hücre ölümünün uyarılmasına yanıt olarak hızla sitozole geçer ve kaspaz aktivasyonunu durdurur ve apoptozu inhibe eder (Dohi ve ark 2004). Survivin'in ısı şok proteini 60 (Hsp60) ile etkileşimi de apoptozun baskılanmasında da önemli görünmektedir. Yapılan bir çalışmada Hsp60 gen ifadesinin inhibisyonunun mitokondrial Survivin havuzunu bozduğu ve mitokondrial disfonksiyona yol açarak apoptozun aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Ghosh ve ark 2008). Bu durumun Hsp60-p53 kompleksini de bozarak p53'ün stabilizasyonuna yol açmak suretiyle apoptoz aktivasyonunun güçlendirdiği de ortaya konmuştur (Ghosh ve ark 2008).

Yukarda bahsedilen proteinlerin dışında da birçok faktör apoptozda rol oynadığı için kanserde de bu anahtar moleküllerin ifadesinde değişiklikler apoptozla ilişkili bulunmuştur. Bu faktörlerden bazıları; apoptoz inhibitörleri (IAP), başta kaspaz 3 ve 7 olmak üzere kaspazlar, dinaminle ilişkili protein (DRP1) ve mitofusin (Mfn1 ve Mfn2) gibi mitokondrial dinamiklerle ilişkili proteinler sayılabilir (Hunter ve ark 2007, Sheridan ve Martin 2010).

1.5.4. Mitokondrial DNA Mutasyonları

Memeli mitokondrisinin proteomiği incelendiğinde, büyük bir kısmının nükleer genom tarafından kodlanan ve buradan ifade edilen yaklaşık 1200 proteinden oluştuğu görülmektedir. Bu proteinlerin yalnızca küçük bir kısmı mitokondrial genom tarafından kodlanmaktadır. İnsan mitokondrial genomu, halkasal, 16.5 kb büyüklüğünde olup 13 ETS alt ünitesi, rRNA ve tRNA genlerini kodlamaktadır. Hücre tipine özgü olarak mitokondri sayısı değişkenlik gösterir ve hücre başına 100 ila 10.000 kopya bulunabilir (Gammage ve Frezza 2019). mtDNA, esas olarak mitokondrial transkripsiyon faktörü A (TFAM) ile nükleoidler

olarak bilinen protein-DNA kompleksleri halinde paketlenerek, mitokondrial matriksde iç mitokondrial membrana sıkıca bağlı halde bulunur (Kukat ve ark 2015). Farklı kanserlerdeki mitokondrial anormalliklere ek olarak, bazı vakalarda yüksek seviyelerde mtDNA mutasyonları bildirilmiştir (Gammage ve Frezza 2019). Bu mutasyonlar delesyon, inversiyon, nokta mutasyonu ve kopya sayısındaki değişimler olabilmektedir. Bu mutasyonların birçoğunun fonksiyonel sonucu iyi anlaşılmamış olsa da, ETS genlerinde meydana gelen mutasyonların ETS işlev bozukluğuna bağlı olarak tümörijenezi teşvik eden artmış oksidatif stresle sonuçlanabildiği düşünülmektedir (Vyas ve ark 2016). Mitokondri, birden çok mtDNA kopyasını içerdiğinden, hücreler, mtDNA bileşimlerine göre homoplazmik veya heteroplazmiktir. Genomun mutant kopyaları, fisyon ve füzyon döngüleri yoluyla mitokondrial ağ boyunca yayılır. Bu şekilde, klonal bir hücre popülasyonunda baskın mtDNA mutasyonları gözlenebilir (van Gisbergen ve ark 2015).

mtDNA mutasyonları, akciğer kanseri, kolorektal kanser, baş ve boyun kanseri, pankreas kanseri, mesane kanseri, yumurtalık kanseri, mide kanseri, meme kanseri ve diğer bazı tümörlerin büyük bir kısmında rapor edilmiştir (Jakupciak ve ark 2008). Bu mutasyonlar germline ve somatik mutasyonlar olabilmektedir (Badrinath ve Yoo 2018).

İlginç olarak, ciddi mtDNA hasarı oluşturulmuş, yani mtDNA'sı olmayan kanser hücreleri olarak kabul edilen hücreler ile yapılan çalışmalarda mitokondrial genom kazanımı görülmüştür. Kazanılan bu mitokondrilerin tümör mikroçevresindeki konak hücrelerinden edinilmiş olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca bu süreçte respirasomun ve metastatik potansiyelin kademeli iyileştiği de gözlenmiştir (Tan ve ark 2015).

1.5.5. Mitokondrial Retrograde Sinyalizasyonu

Hücrenin çevresel şartlarına uyum sağlamasında, bir stres sensörü olan, mitokondrinin retrograd sinyalizasyonu, özellikle mitokondri-nükleus arasındaki sıkı koordinasyonu, önemli yer tutar ve iki kompartımanın da işlevlerini yürütebilmesi için birbirlerine ihtiyaçları vardır. Mitokondri ihtiyaç duyduğu proteinlerinin %90'ından fazlasını nükleer genomda kodlanan genlerden, onların nükleer transkripsiyonu ve sonrasında sitozolik translasyonlarından karşılamaktadır. Mitokondri ise, sitrik asit döngüsü, beta oksidasyonu ve ETS gibi mitokondrial yollardan üretilen metabolitler ile sitozolik sinyal yolaklarını, nükleer transkripsiyonu ve kromatin modifikasyonunu etkilemektedir. Örneğin krebsin ara ürünü olan alfa-keto gluterat pek çok sitozolik ve nükleer enzimin kosubstratıdır. Bu enzimlere prolil hidroksilaz (PHD) ailesi, 10-11 translokasyon metilsitozin dioksigenaz (TET) ve kromatin modifiye eden enzimlerden jumunji-C histondemetilaz (JHDM) ailesi örnek verilebilir. Alfa-

keto gluterat, TET bağımlı demitilasyona katılır (Carey ve ark 2015). Mitokondrial sitrattan üretilen Asetil CoA histon asetil transferazlar (HATs) tarafından kullanılır (Wellen ve ark 2009, Lee ve ark 2014). Ayrıca bu Asetil CoA sitozolik ve mitokondrial proteinlerin post translasyonal düzenlenmesinde, asetilasyon ile modifikasyonunda kullanılmaktadır.

Mitokondrial membran potansiyeli ($\Delta\psi m$) ve mitokondrial dış membran permeabilizasyonu dahil olmak üzere mitokondrinin bütünlüğü de hücrenin sağlıksız/işlevsiz mitokondriye yanıt vermesini sağlayan önemli sinyaller olarak işlev görmektedir. Sağlıklı mitokondrinin zar potansiyeli, proteinlerin (mitokondrial matriks üzerindeki TIM22 ve TIM23) translokatör kompleksleri ile, mitokondrial matrikse ve zarlar arası boşluğa alınımı için gereklidir. Dolayısıyla mitokondri membranları üzerinden gerçekleşen sitozol-mitokondri arasındaki yoğun taşınımın gerçekleştirilebilmesi için sağlıklı membran yapısı kritik öneme sahiptir. Bu taşınımdaki bozukluk şiddetli olduğunda hücre mitofajiyi başlatmaktadır.

Ayrıca, ETS tarafından üretilen ATP sonucunda oluşan AMP/ATP oranı ETS düzeyinin bir göstergesidir ve AMPK sinyalinin düzenlenmesinde önemlidir. Karsinogenezde ETS disfonksiyonu, NAD+ seviyelerinin düşmesine de neden olur ki NAD+ bu süreçte birçok işlevi olan hem Sirtuin hem de poli (ADP-riboz) protein aileleri için bir yardımcı substrattır (German ve Haigis 2015, Vyas ve ark 2016).

1.5.6. Mitokondrial Biyogenez, Dinamikleri ve Düzenlenmesi

Mitokondri, hücre içi sinyal kaskadlarının çalışmasının düzenlenmesi, reaktif oksijen türlerinin üretilmesi, yağ asitlerinin β-oksidasyonunun yürütülmesi, aminoasit metabolizması, pirimidin sentezi, fosfolipid modifikasyonları, kalsiyum düzenlemesi ve hücrelerin hayatta kalmasına, yaşlanmasına ve ölümüne katılan çoklu fonksiyonların yürütüldüğü dinamik bir organeldir (Popov 2020). Aynı zamanda hücresel taleplere, çevresel koşullara ve değişen erişilebilir substratlara uyum sağlamak için bu çoklu işlevlerini uyarlayabilme kabiliyeti ile de hücre sağkalımında önemli role sahiptir (Sun ve ark 2018).

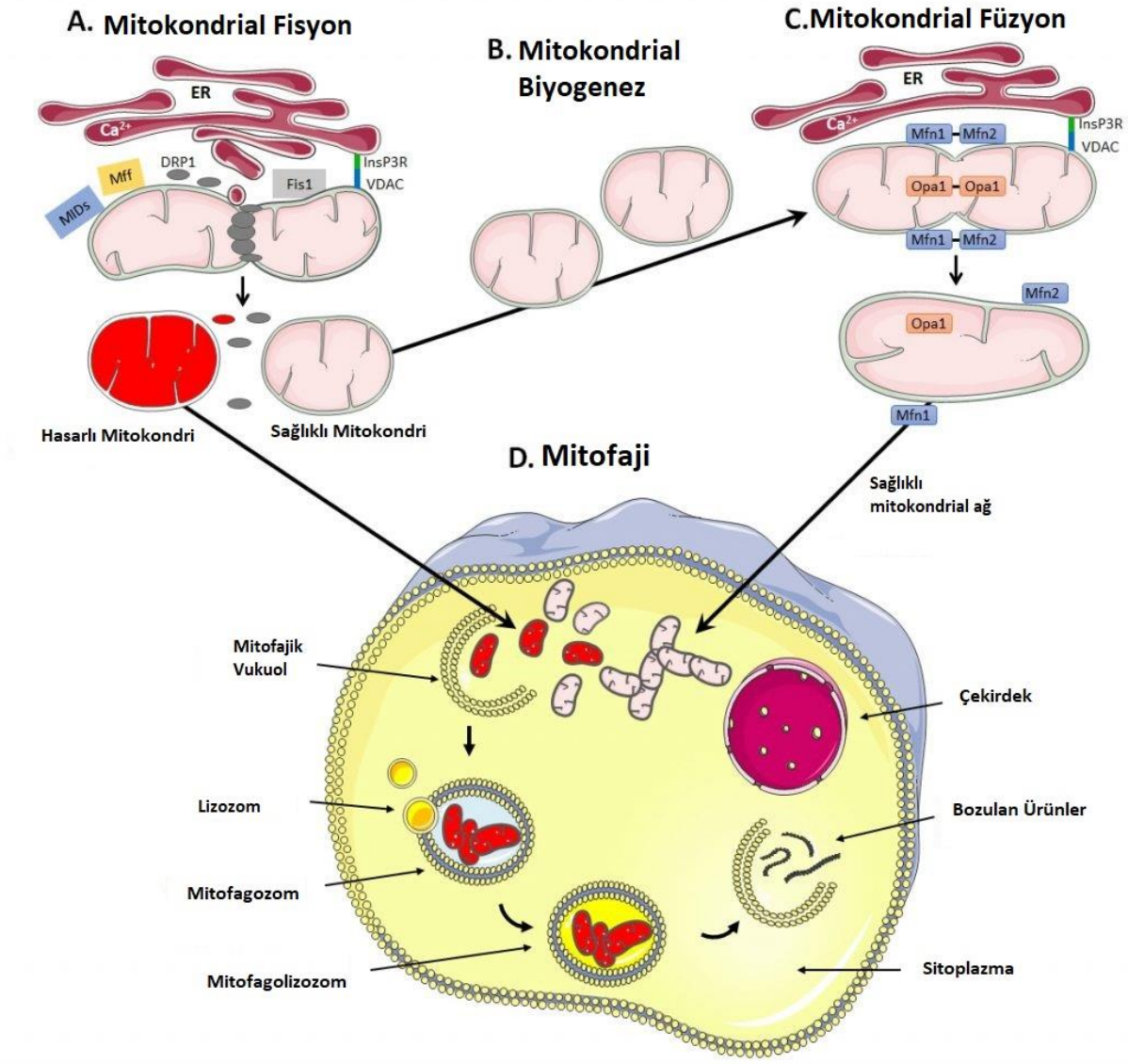
Hücre içi sinyallere ve değişen koşullara yanıt olarak mitokondrial homeostaz düzenlenir. Mitokondrial homeostazın korunması, mitokondrial biyogenez ile yeni mitokondri oluşumu ve mitofaji ile hasarlı mitokondrinin ortadan kaldırılması şeklinde cereyan eden iki karşıt süreç arasındaki ince koordinasyonla sağlanır (Golpich ve ark 2017, Ploumi ve ark 2017). Mitokondrinin biyogenezi ve mitofaji ile ortadan kaldırılma döngülerinin ince ayarı ile ilgili proteinlerin ve genlerin deşifre edilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ince ayara dahil olan spesifik moleküller arasında, mitokondrial biyogenezin ana regülatörü olarak peroksizom prolifatörü ile aktive edilen reseptör-γ koaktivatörü (PGC)-1α (Scarpulla ve ark

2012, Wenz 2013, Untereiner ve ark 2016), mitofaji için hasarlı mitokondride protein sentezini aktive eden PTEN kaynaklı putatif kinaz 1 (PINK1)-Pakin'i (Zhang ve Xu 2016) ve de oksidatif stresten koruyucu olarak da işlev gören ligandla aktive olan transkripsiyon faktörü aril hidrokarbon reseptörü bulunmaktadır (Wang ve ark 2019).

Fisyon, halihazırda mevcut olan mitokondriden 2 ya da daha fazla mitokondrinin üretildiği bir kendini yenileme yoludur. Tersine, mitokondrial füzyon, birkaç komşu mitokondrinin birleşmesi ile tanımlanır (Youle ve van der Bliek 2012). Her iki süreç de yeni ve fonksiyonel organellerin oluşumuna izin vermek ve intramitokondrial içerik kaybını önlemek için yüksek oranda düzenlenmiş mekanizmalar gerektirir.

Normal hücreler, uygun işlevleri sürdürmek için sürekli olarak fisyon ve füzyon döngüleri sergiler (Ren ve ark 2021). Sürekli füzyon ve bölünme döngüleri, hücredeki mitokondrial popülasyonun birbirine karışmasıyla sonuçlanır (Chan 2012). Bu karşıt süreçler aynı zamanda mitokondrial morfolojiyi de belirler. Artan füzyon veya azaltılmış fisyon, uzun mitokondrial ağların oluşumunu teşvik ederken, artan fisyon veya azalmış füzyon mitokondrial parçalanmaya neden olur. Fisyon ve füzyon makine proteinleri ayrıca intrinsik apoptotik yolları da düzenler (Grandemange ve ark 2009).

Fisyonun önemli bir özelliği de, hasarlanmış mitokondrinin mitofajiyle degredasyona ilerletimesini sağlamaktır. Aynı zamanda fisyon, hücre içinde dinamik davranış sergileyen mitokondrinin hücre iskelet ağında hareketini kolaylaştırır, apoptozu ve Ca^{+2} homeostazını regüle eder (Suen ve ark 2008, Youle ve van der Bliek 2012, Burté ve ark 2015).



Şekil 1.9. Birçok kanser hücresinde yüksek mitokondrial devir hızı kanser hücresinin karakteristik özelliğidir (Grasso ve ark 2020).

Mitokondrial fisyon ve füzyonla ilgili ana proteinler, dinamin ailesinin üyeleridir. Fisyona esas olarak dinaminle ilişkili protein 1 (DRP1) ve FIS1 aracılık eder. Sitozolik GTPaz olan DRP1 mitokondri dış membranına transloke olur ve membrana çapalanmış reseptör protein Fis1'i, kuyruğuyla membrana çapalanmış (Mff) ve yine membrana çapalı bir protein olan mitokondrial dinamik proteinler (MiDs)'i bir araya toplar (Yoon ve ark 2003, Gandre-Babbe ve van der Bliek 2008, Lee ve Yoon 2016). Bu proteinler birlikte mitokondriyi çevreler, onu daraltır ve iki parçaya ayrılmasını sağlar (Şekil 1.9.) (Grasso ve ark 2020).

Moleküler olarak füzyon ise, üç dinamin ailesi üyesi tarafından düzenlenir (Yang ve ark 2021). Mitofusin (Mfn) 1 ve 2 mitokondri dış membranında, optik atrofi protein 1 (Opa1) iç mitokondri membranındadır (Delettre ve ark 2000, Chen ve ark 2003). Opa1'in üç uzun izoformu (L-Opa1) ve üç kısa izoformu (S-Opa1) bulunmaktadır (Guillery ve ark 2008). Füzyon proteinleri mitokondri dış membran proteinlerinin ubikitinasyonu ve iç membran proteinlerinin proteolitik kesimleriyle düzenlenirler (Saita ve ark 2016). İki mitokondrinin birbiriyle yakınlaşmasıyla Mfn1 ve Mfn2 homo ve heterotipik etkileşimlerle dimerleşmeye başlarlar ve lipid çift tabakalarının kaynaşarak mitokondri dış membranlarının füzyonuna izin verirler (Koshiba ve ark 2004). Mfn2 proteininin ER'de de bulunması, ki ER ve mitokondri arasında Ca^{+2} sinyalinin paylaşıldığı temas noktaları bilinmektedir, ER'nin bu iki mitokondrinin füzyonun da kolaylaştırıcı etkisinin olduğunu düşündürmektedir (de Brito ve Scorrano 2008). Mitokondrial iç membranların birleşmesi ise daha sonra Mfn1 ile birlikte Opa1 tarafından sağlanır (Cipolat ve ark 2004).

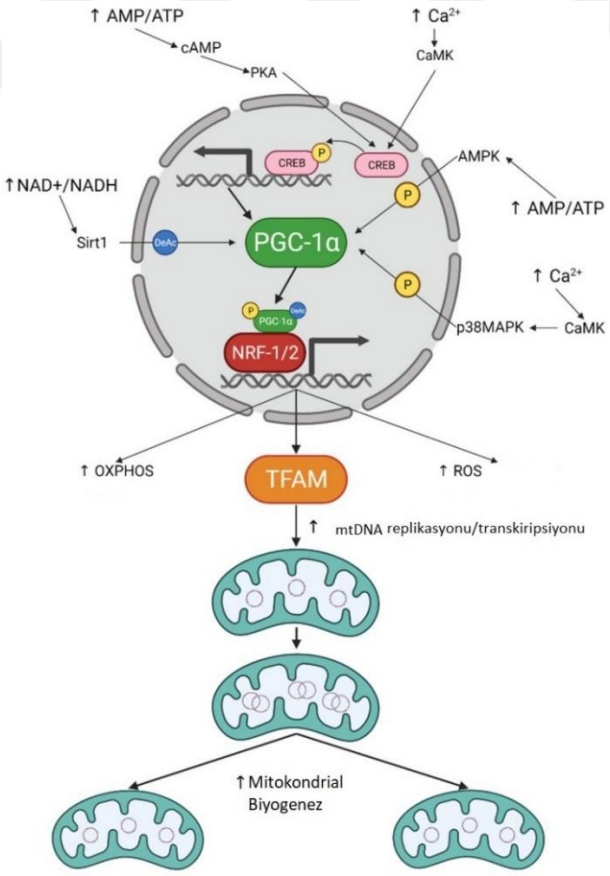
Son zamanlarda artan kanıtlar, kanser gelişiminin düzensiz mitokondrial dinamiklerle yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. DRP1 fosforilasyonu veya ekspresyon seviyelerinin, mitokondrial fisyon ve füzyonun düzenlenmesinde yer aldığı bildirilmiştir (Yu ve ark 2021). Özellikle, pankreas kanserlerinde mutant KRAS'ın akış aşağısındaki sinyalin, in vivo KRAS kaynaklı tümör büyümesi için gerekli olan süreçler olan mitokondrial fisyona ve DRP1'in artan aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Anderson ve ark 2018). Normal hücrelerle karşılaştırıldığında, akciğer adenokarsinomunun daha düşük Mfn2 seviyeleri ve daha yüksek DRP1 seviyeleri ifade ettiği bildirilmiştir. Hücre döngüsünün farklı aşamaları, hücre proliferasyonunu sürdürmeye yardımcı olan DRP1 düzensizliği ile de kontrol edilir. DRP1 ayrıca p53'ü inhibe eder ve hücre döngüsünün ilerlemesini destekler (Simula ve ark 2017).

Mitokondrial biyogenez süreci sağlıklı hücreler için temeldir. Kanserli hücrelerde de gelişmiş oksidatif fosforilasyon ve mitokondrial biyogenez invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Mitokondrial biogenez, mitokondrial ve nükleer genomun kompleks ve çok basamaklı süreçlerle koordinasyonuyla gerçekleşir (Popov 2020).

Mitokondrial biyogenezin uzman düzenleyicisi peroksizom-çoğaltıcı-aktive edilmiş y ko-aktivatör-la (PGC-1α) olarak bilinmektedir (Popov 2020). PGC-1α, ETS için nükleer genlerin ifadesini, NRF-1 and NRF-2 transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilen mtDNA transkripsiyon ve replikasyonunu, tümör supresör gen olan SIRT3 ifadesini, nükleustan kodlanan POLRMT gibi mitokondrial enzimlerin ve TFAM'ın ifadelerini düzenler

(Li ve ark 2005, Kong ve ark 2010, Lee ve ark 2011, Salem ve ark 2012, LeBleu ve ark 2014). İnvaziv kanser hücrelerinde aktive olan PGC-1α'nın oksidatif fosforilasyonu, oksijen tüketimini artırdığı ve mitokondrial biogenezi uyararak metastazı artırdığı gösterilmiştir. Mitokondrial biyogenez için PGC-1α aktivasyonunu sağlayan sinyal yolaklarının AMPK, NO–cGMP, cAMP–PKA–CREB, p38, and ERRα sinyal yolakları olduğu bildirilmiştir (Nisoli ve ark 2003, Schreiber ve ark 2004, Favre ve ark 2010).

Ca+2 düzeyi ve AMP/ATP oranı mitokondrial biyogenezin ana uyarıcılarıdır (Şekil 1.9). Artmış $Ca+^{2}$ ve AMP seviyeleri, PGC-la ifadesini teşvik etmek için transkripsiyon faktörü olan; cAMP yanıt elemanı bağlayıcı (CREB)'yı fosforile edebilen farklı kinazları aktive eder veya aktivasyonuna yol açan PGC-la'yı doğrudan fosforile ederler. Artan NAD+/NADH oranı ayrıca Sirt1 tarafından deasetilasyon yoluyla PGC-1α aktivasyonuna neden olur. Aktive edildikten sonra, PGC-la, TFAM dahil olmak üzere çeşitli mitokondrial proteinlerin ekspresyonunu teşvik etmek için NRF-1/2'ye bağlanır ve sonuçta artan mitokondrial biyogenez ile sonuçlanır (Şekil 1.10.) (Cardanho-Ramos ve Morais 2021).



Şekil 1.10. Mitokondrial biyogenez mekanizması (Cardanho-Ramos ve Morais 2021).

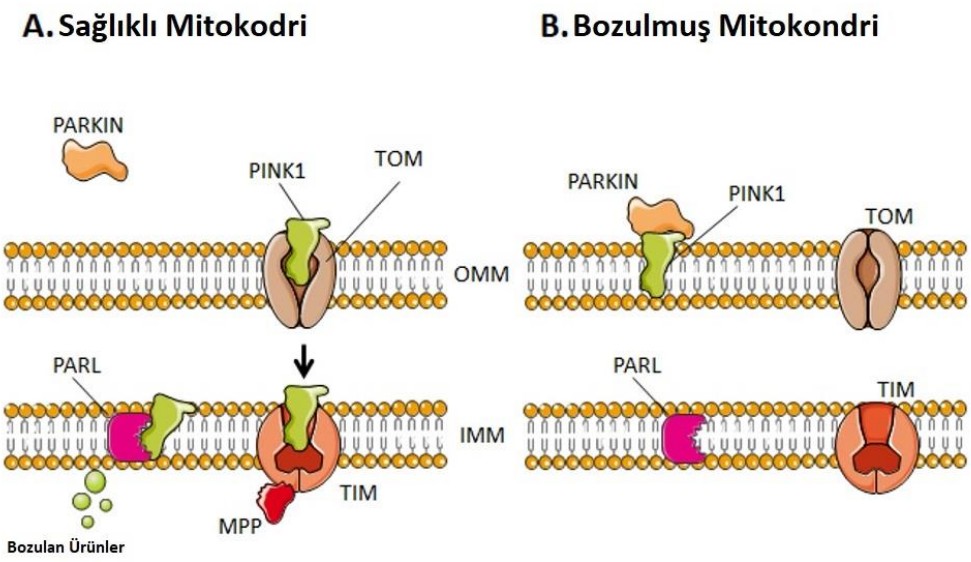
1.5.7. Mitokondrinin Otofaji Yoluyla Yıkımı; Mitofaji

Mitofaji, disfonksiyonel ve hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılma sürecidir (Grasso ve ark 2020). Makro-otofaji sürecinin moleküler oyuncularının rol oynadığı özgün bir degredasyon süreci olan mitofaji, mitokondrial kalite kontrolünün sağlanmasına ve hücresel mitokondri miktarının korunmasına katkıda bulunur. Ayrıca mitofaji, hücresel farklılaşma ve oksijen yoksunluğuna bir yanıt olarak gerçekleşebildiği gibi erken embriyogenez sırasında sperm kaynaklı paternal mitokondrinin seçici olarak ortadan kaldırılması için de tetiklenir (Sato ve Sato 2017, Pickles ve ark 2018).

Beyin, iskelet kası, kalp, karaciğer ve böbrek gibi yüksek miktarda ATP tüketen dokularda, mitokondri, enerji talebi ve arzı arasındaki uygun dengeyi korumak için oldukça gelişmiştir. Bu hücreler normoksiden hipoksiye kaydırıldığında, mitokondri miktarını azaltmak üzere mitofajiyi indükler, böylece hücresel metabolizma anaerobik koşullara uyarlanır (Wu ve Chen 2015). Bu nedenle, mitokondrial biyogenez ve bozunma, mitokondri miktarını belirleyen iki karşıt süreçtir (Ploumi ve ark 2017). Pek çok kanserde mitofaji disfonksiyonunun tümör başlama ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (O'Flanagan ve O'Neill 2014, Bernardini ve ark 2017).

PINK1/Parkin yolu, mitofaji için önemli bir indükleyici olarak görülmektedir. Bu yolak mitokondrial membran depolarizasyonu ile aktive olur. Mitokondrial membran depolarizasyonu, indirgeyici moleküllerin eksikliği, hipoksi ve bozulmuş ETS'yi içeren çeşitli sebeplerden kaynaklı mitokondrial disfonksiyonun bir sinyalidir. Hipoksi ve açlık gibi stres koşullarında Parkin (E3 ubikitin ligaz) PINK1'i toplar ve mitokondri dış membranındaki VDAC, Mfn1 ve Mfn2 hedef proteinlerinin proteozomal yıkımını sağlar (Kim ve ark 2008, Geisler ve ark 2010, Narendra ve ark 2010, Koyano ve ark 2014).

Farklı kanserlerde tespit edilen yıkılmamış hasarlı mitokondrilerin varlığı, mitofajinin tümör süpresör özelliğine işaret etmektedir. Ayrıca solid tümörlerde Parkin'in kaybının Warburg hipotezini doğruladığı yani aerobik glikolizi tetiklediği gösterilmiştir (Bernardini ve ark 2017). Eğer mitokondri sağlıklı (polarize) ise, PINK1 sitozolden mitokondri matriksine, mitokondri dış membranında bulunan TOM ve iç membranında bulunan TİM aracılığıyla geçer. İç membranı geçtiğinde, mitokondrial presenilin-ilişkili romboid benzeri protein (PARL) ve matriks peptidaz (MPP) aracılığıyla kesime uğrar ve sitozole geri döner (Şekil 1.11.) (Greene ve ark 2012, Jin ve Youle 2012).



Şekil 1.11. Disfonksiyonel mitokondrinin mitofajiye hedeflenmesi (Grasso ve ark 2020).

Tersine, mitokondri disfonksiyonel ise iç membran depolarize olur ve PINK1 kesime uğramaz ve iç mebrana taşınmaz ve dış membranda birikir. Böylece Parkin'i toplayamaz ve aktive edemez (Kondapalli ve ark 2012, Kane ve ark 2014, Koyano ve ark 2014). Parkin bir kez aktive olduğunda mitokondrial dış memnbrandaki proeteinleri (Mfn1, Mfn2, VDAC1, TOM20, mitokondrial Rho GTPaz1) ubikitinler ve mitofajiyi başlatır (Gegg ve ark 2010, Geisler ve ark 2010, Yoshii ve ark 2011). Bu kaskatta, optineurin gibi otofaji resptörleri ve Unc-51 benzeri otofaji aktive eden kinaz 1 (ULK1) gibi otofaji başlatıcıları toplanır ve aktive olurlar. Protein ubikitasyonu, normalde sitozolde LC3-I formunda bulunan, mikrotubül-ilişkili protein hafif zincir 3 (LC3) aktivasyonuna yol açar. LC3 aktive olduğunda fosfotidil etanolamine LC3-II formunda bağlanır (Tanida ve ark 2008). Bu işaret çift membranın ++6otofagozom için toplanmasını tetikler. Bu kanonik yolun yanı sıra farklı bir doğal yol ile de mitofajinin uyarıldığı bulunmuştur. Mitokondrial dış membran proteini FUN14 domeyn içeren 1 (FUNDC1) ve LC3 arasında ya da BH3 domeyn proteinleri (BNIP3 ve NIX), beklin ve ULK1 arasında direkt etkileşim gerçekleşir (Chen ve ark 2020). Ayrıca erken oksidatif strese yanıtta mitokondri türevi veziküller oluştuğu ve bu veziküllerin LC3'den bağımsız olarak direkt lizozoma ulaşarak mitofajiyi indüklediği gösterilmiştir (Soubannier ve ark 2012).

Mitokondrial biyogenezin kanserdeki rolü, metabolik durum, tümör heterojenliği, doku tipi, mikroçevre ve tümör evresi gibi birçok faktör tarafından belirlenir. Ek olarak, mitokondri için seçici otofajik yol olan mitofaji, sağlıklı bir mitokondrial popülasyonu korur.

Daha da önemlisi, hem mitokondrial biyogenezin hem de mitofajinin yanlış düzenlenmesi, anahtar onkojenik sinyal yollarının merkezinde yer alır.

Son yıllarda kanser tedavisine dirençte mitofajinin ikili rolü olabileceği gösterilmiştir. Mitofajinin kolerektal kanser hücrelerinde (CSC) inhibisyonu ve preklinik AML modelinde indüksiyonunun, doksorubusin gibi kemoterpötik ilaçlara duyarlılığı artırdığı belirlenmiştir (Yan ve Li 2018). Ayrıca baş ve boyun kanserlerinde radyoterapiye dirence mitofajinin katkıda bulunduğu da gözlenmiştir (Grasso ve ark 2020).

1.6. Glukoz Regüle Protein 75 (GRP75, Mortalin,HSPA9, HSPA9B, mt-HSP70)

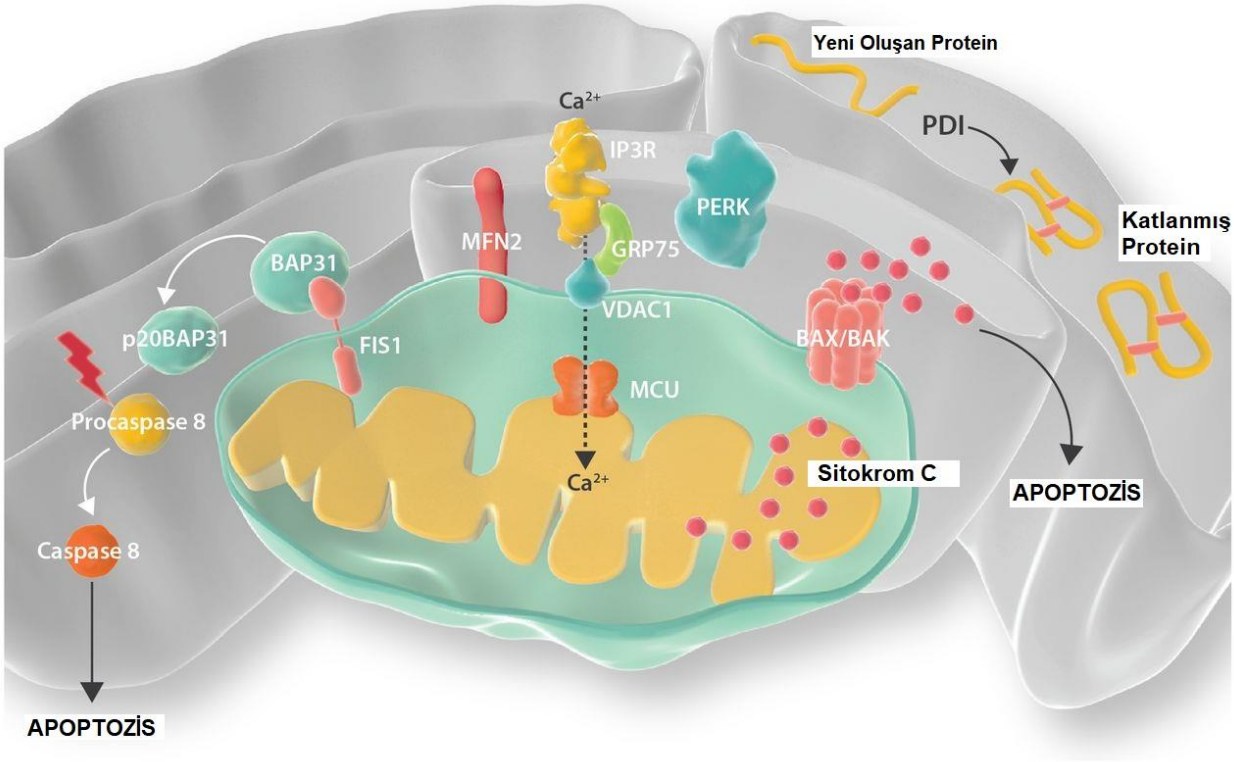
Glukoz Regüle Protein 75, bağımsız araştırma grupları tarafından keşfedilen ve bu yüzden birden fazla şekilde isimlendirilen, yüksek oranda korunmuş ısı şoku proteini 70(HSP70) şaperon ailesinin bir üyesidir. GRP75, aynı zamanda mortalin, peptit bağlayıcı protein 74 (PBP74) ve mitokondrial ısı şoku proteini 70 (mthsp70) olarak da bilinir (Domanico ve ark 1993, Wadhwa ve ark 1993, Bhattacharyya ve ark 1995, Massa ve ark 1995). Hsp70 şaperon ailesi, hücresel homeostaz ve stres yanıtında kilit rol oynar. Hsp70 ailesi üyeleri sadece yeni oluşan proteinlerin katlanmasını düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda protein agregasyonunu önler, ayrışmayı teşvik eder ve yanlış katlanmış proteinleri yeniden katlar. Uygun katlanma, proteinlerin işlevi için çok önemlidir ve yanlış katlanmış proteinler hücre için toksik olabilirler. HSP70 ailesi üyeleri, düzenleyici proteinlerin konformasyonel kontrolü, hücre içi trafik, klatrin kaplı veziküllerin kaplamasının açılması ve hücre içi membranlar boyunca protein translokasyonu dahil olmak üzere ek hücresel süreçlere katılırlar (Mayer ve Bukau 2005). Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin uygun şekilde katlanmasını veya bozulmasını sağlayarak kanser gelişiminde, ilerlemesinde ve ilaç direncinde kritik roller oynarlar (Hartl ve ark 2011). Kanser hücrelerinin yaşadığı stresli koşullar, sıklıkla proteinlerin yanlış katlanmasına ve homeostazı sürdürmek için moleküler şaperonlara ihtiyaç duyulmasına yol açar. Bu nedenle, HSP proteinlerinin kanserde yükseldiğinin bulunması ve kanser tedavisi ve önlenmesinin geliştirilmesinde hedeflenmesi şaşırtıcı değildir (Albakova ve ark 2020).

GRP75, ısıyla aktive olan bir protein olmamasına rağmen, dizi benzerliğine dayalı olarak, şaperon proteinlerinin ısı şoku proteini 70 (HSP70) ailesinin başka bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (Deocaris ve ark 2006). Nükleer gen HSPA9B tarafından kodlanan GRP75, kalsiyum bağımlı otofosforilasyona uğrayan bir N-terminal 46-amino asit uzunluğunda sinyal peptidi içeren, 66 kDa'lık bir proteindir ve GRP75, birden fazla hücre altı bölgeye yerleşebilse

de, birincil konumu, amino-terminal lider dizisi tarafından yönlendirildiği gibi mitokondridedir (Wadhwa ve ark 2005). GRP75 bugüne kadar incelenen tüm hücre tiplerinde ve dokularda, ifade düzeyleri önemli ölçüde farklılık gösterse de ifade edilmektedir (Wadhwa ve ark 2002). Açık bir çıkarım, GRP75'in temel hücresel işlevler için hayati olduğudur. Moleküler bir şaperon olarak GRP75, stabilizasyon, nükleer gen ürünlerinin ithali ve öncü proteinlerin mitokondriye yeniden katlanmasında aktif olarak yer alır (Deocaris ve ark 2006). GRP75'in glikoz yoksunluğu, düşük doz iyonlaştırıcı radyasyon ve kalori kısıtlaması gibi çeşitli stres tepkilerinde ifade edildiği bilinmektedir. Ayrıca GRP75, tümör baskılayıcı p53 dahil olmak üzere birçok proteine bağlanır (MIZUKOSHI ve ark 1999).

Yaygın olarak mitokondri ile ilişkili zar (MAM) olarak adlandırılan mitokondrial-ER arayüzü, hücresel hayatta kalma ve ölüm arasındaki dengeyi kontrol eden iki organel arasındaki çift yönlü iletişimi kolaylaştıran ve proteinlerden oluşan bir bağdır (Prudent ve McBride 2017). Bu arayüzdeki temasın ve metabolitlerin değişimi, enerji üretimini, mitokondrial şekli ve daha da önemlisi apoptozu kontrol eder. Mitokondrial hücre ölümünün ve enerji üretiminin en önemli düzenleyicilerinden biri, ER kalsiyumun mitokondriye salınmasıdır. Böylece mitokondri iç zarındaki geçirgenlik, depolarizasyonu ve sitokrom C salınımını kolaylaştırır.

Bir dizi proteinin ER-mitokondri temasını stabilize ettiği bilinmektedir (Carroll ve Evensen 2019). Kalsiyum, ER'den hücre içi kalsiyum salma kanalları inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörleri (IP3R'ler) ve dış mitokondrial zardaki voltaja bağlı anyon kanalları (VDAC'ler) yoluyla salınabilir ve sonunda mitokondriye aktarılabilir. VDAC1'in IP3R1'e MAM ile GRP75 aracılığıyla fiziksel olarak bağlı olduğunu gösterilmiştir. GRP75, IP3R-GRP75-VDAC1 kompleksi aracılığıyla ER-mitokondri Ca^{+2} sinyalini modüle eden MAM arayüzünde anahtar bir protein olarak kabul edilir. GRP75 doğrudan ER'den mitokondriye kalsiyum transferini düzenler (Şekil 1.12.) (Szabadkai ve ark 2006).



Şekil 1.12. IP3R-GRP75-VDAC yolu ile mitokondriye kalsiyum salınımı (Carroll ve Evensen 2019).

GRP75, ER ve mitokondriyi mekanik ve işlevsel olarak bağlayan protein olduğu için geniş çapta incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, GRP75 yıkımının mitokondrial Ca^{+2} seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ve mitokondrial homeostazı tehlikeye attığını göstermiştir (Helle ve ark 2013). Bununla birlikte, mitokondriye aşırı Ca^{+2} girişi, mitokondrial Ca^{+2} aşırı yüklenmesine yol açarak apoptozu tetikleyebilmektedir.

MAM'de değiştirilmiş Ca^{2+} sinyali, hücresel metabolizmayı ve hücre ölümüne karşı direnci etkileyebildiği göz önüne alındığında, tümör hücrelerinin önemli bir ayırt edici özelliğidir (Bittremieux ve ark 2016). Mitokondrial Ca^{2} alımının azalması, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına izin verebilir. Ayrıca, Mitokondrial kalsiyum uniporter (MCU) yoluyla mitokondriye doğru Ca^{+2} akışı, tümör büyümesi ve metastatik davranış için belirleyici olduğu gösterilmiştir (Tosatto ve ark 2016, Gueguinou ve ark 2017). Benzer şekilde GRP75 susturma, hücresel stres koşulları altında mitokondrial Ca^{2+} aşırı yüklenmesini önleyerek hücre ölümüne karşı koruduğu da gösterilmiştir (Simoes ve ark 2020).

2019 yılında yapılmış olan bir çalışmada, Ca^{+2} salınımının yeni bir protein modülatörü ve GRP75 ile etkileşime giren apoptotik süreçler tanımlanmıştır. Transglutaminaz tip-2 (TG2), MAM'da GRP75'e bağlanarak ER-mitokondrial Ca^{+2} akısının düzenlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (D'Eletto ve ark 2018). D'eletto ve meslektaşları, TG2'nin yokluğunda IP3R ve GRP75 arasındaki etkileşimi arttırdığını ve Mitokondri-endoplazmik retikulum temaslarının sayısını azalttığını göstermiştir (D'Eletto ve ark 2018). TG2'nin meme kanserinde aşırı eksprese edildiği ve PI3K / AKT yolunun aktivasyonu yoluyla kanser hücresi sağkalımına, metastaz ve hareketliliğine katkıda bulunduğu bulunmuştur (Mangala ve ark 2007). Bu nedenle, GRP75 ekspresyonunun düzenlenmesi ve MAM'da ER-mitokondrial Ca^{+2} crosstalk'u ile bağlantısı, hücre ölümü ve anti-kanser tedavisi paradigmalarında yeni bir koruyucu yaklaşımdır.

GRP75 başlangıçta Leustek ve arkadaşları tarafından bir mitokondrial moleküler şaperon olarak tanımlanmış olsa da (Leustek ve ark 1989), sıklıkla kanser hücrelerinin farklı hücre altı bölümlerinde saptanır ve bu da kanserde fonksiyonel olarak değiştiğini düşündürür (Dundas ve ark 2005, Kaul ve ark 2007) GRP75 sitoplazmada p53'ü sekestre eder ve normal transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe eder. GRP75 ve p53, sitoplazmada veya sentrozomda, aynı zamanda p53 aktivitesini de tehlikeye atan ve böylece stres koşulları altında apoptozu önleyen bir kompleks oluşturur (Wadhwa ve ark 2002). Ayrıca GRP75'in yukarı regülasyonunun insan karsinogenezine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Wadhwa ve ark 2006). Buna karşılık, GRP75'in aşağı regülasyonu, ölümsüzleştirilmiş insan hücrelerinde büyümenin durmasıyla sonuçlanır (Wadhwa ve ark 2004). GRP75, kanser hücreleri için kanserojenez ve çoğalmada önemli görünmektedir.

GRP75 seviyeleri, çok sayıda kanserli dokuda ve tümörden türetilmiş hücre dizilerinde artar ve ayrıca, GRP75 aşırı ekspresyonunun temelde malignite ile ilişkili olduğu yönünde ortaya çıkan ilkeyi doğrular. GRP75'in normal ve dönüştürülmüş hücrelerdeki hücre içi dağılımını karşılaştıran immünofloresan deneylerinde elliden fazla malign insan hücre hattı üzerinde çalışılmıştır (Wadhwa ve ark 1995). Tüm neoplastik hücreler, farklı pansitoplazmik olmayan GRP75 boyama modelleri göstermiştir. Bu çalışmalar, çok çeşitli tümör türevli doku ekstraktlarında ve bunların hastayla uyumlu normal dokularda GRP75 ekspresyonunun seviyesi incelenerek daha da genişletilmiş ve 24 tümör tipinden 16'sı, aynı bireyden alınan normal kontrollerden daha yüksek seviyelerde GRP75 ekspresyonu göstermiştir. Yüksek seviyede ekspresyon gösteren tümör dokları; beyin, duodenum, kolon, karaciğer, safra kesesi, pankreas, parotis, böbrek, üreter, mesane, prostat, meme, fallop tüpü, uterus, tiroid, timus

neoplazmaları iken, 8 tümör dokusu (akciğer, yemek borusu, mide, rektum, yumurtalık, adrenal bez, testis ve lenfoma) bu ilk çalışmada GRP75 ekspresyon seviyesinde önemli bir değişiklik göstermemiştir (Wadhwa ve ark 2006).

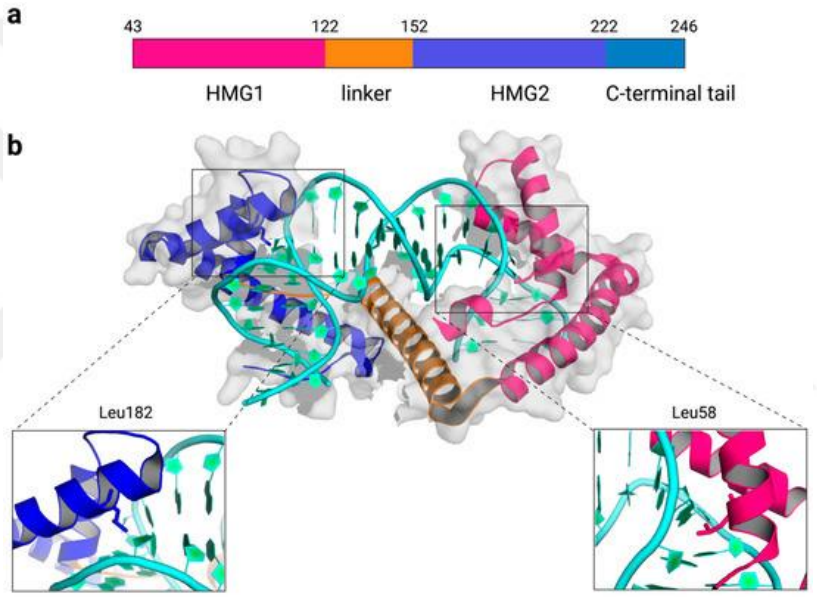
Birkaç çalışma meme, beyin ve kolon tümörlerinde GRP75 yukarı regülasyonunun tutarlı bir anormallik olduğunu göstermektedir (Takano ve ark 1997). Normal meme dokusu ile karşılaştırıldığında, insan meme duktal karsinomunda mortalin ekspresyonu yukarı doğru düzenlenir (Bini ve ark 1997). Ek olarak, kronik viral hepatit C'li hastalarda ortaya çıkan hepatosellüler karsinomda GRP75 proteininin iki kat yukarı regülasyonunu bildirmiştir (Blanc ve ark 2005).

1.7. Mitokondrial Transkripsiyon Faktörü A (TFAM)

Nükleer genomdan bağımsız, yaklaşık 16 kb'lık dairesel insan mitokondrial genomu; 2 rRNA, 22 tRNA ve 13 protein kodlar. Bu 13 proteinin tümü, mitokondrial solunum zincirinin temel alt birimleri olarak kabul edilir (Kang ve Hamasaki 2002). ATP üretiminin çoğunun solunum zincirine bağlı olduğu göz önüne alındığında, mitokondrial genomun korunması, bireylerin normal sağlıklarını sürdürmeleri için açık bir şekilde kritik öneme sahiptir. Mitokondri, enerji üretimi ve oksidatif fosforilasyonda kritik bir rol oynar. mtDNA'lar, çevresel kanserojenlerin neden olduğu hasara karşı özellikle hassastırlar çünkü intron içermezler, koruyucu histonları veya histon olmayan proteinleri yoktur ve sürekli olarak endojen ROS'a maruz kalırlar (Tan ve ark 2006). Ayrıca mtDNA'nın tamir mekanizmasının zayıf olması da; mtDNA'nın mutasyon oranının nükleer DNA'nınkinden en az 10 kat daha yüksek olmasına eden olur.

Mitokondrial transkripsiyon faktörü A (mtTFA, mtTF1, TFAM), nükleer kodlu ve yüksek hareketlilik grubu (HMG) proteinlerinin bir üyesidir ve iki HMG kutusu alanı içerir (Şekil 1.13.) (Alam ve ark 2003). Pek çok HMG-ailesi proteini, dizi özgünlüğünden bağımsız olarak DNA'yı bağlama, sarma, bükme ve çözme yeteneğine sahiptir. TFAM hem mitokondrial transkripsiyon başlangıcını hem de mtDNA replikasyonunu düzenlemek için dizi özgünlüğü olan ve mtDNA'yı bağlayan temel bir proteindir (Campbell ve ark 2012). TFAM proteini, bir bağlayıcı ile ayrılan ve ardından transkripsiyon aktivasyonu için gerekli olan kısa bir C-terminal kuyruğu tarafından takip edilen iki yüksek mobiliteli grup kutusu alanından oluşan 25-kDa'lık bir DNA bağlayıcı proteindir (Fisher ve Clayton 1988). Mitokondrial transkripsiyon regülasyonunda işlev gören ve aynı zamanda mtDNA replikasyonu ve onarımında da görev yapan bir mitokondrial transkripsiyon faktörü olan

TFAM muhtemelen replikasyon için RNA primerleri sağlayarak mtDNA replikasyonunu başlatır. TFAM, mitokondride en bol bulunan iki nükleer proteinden biridir, diğeri mitokondrial tek sarmallı DNA bağlayıcı protein (mtSSB)'dir (Bogenhagen 2012). TFAM, aynı zamanda mtDNA'yı yoğunlaştırılmış nükleoid yapıya paketleyen birincil proteindir (Ylikallio ve ark 2010). TFAM, mtDNA promotörlerinin yukarı akışına bağlanır ve mtDNA'nın transkripsiyonunu destekler. TFAM, mitokondrial transkripsiyon başlatma mekanizmasının çekirdek bileşeni olarak ikili rolü ve mtDNA'yı mitokondrial nükleoidlere paketleyen anahtar faktör olması nedeniyle memelilerde mitokondrial fonksiyonun önemli bir düzenleyicisidir (Fisher ve Clayton 1988).



Şekil 1.13. TFAM-DNA kompleksine genel bakış (Chew ve Zhao 2021).

TFAM nakavt farelerin üzerinde yapılan çalışmalar, bu farelerin mtDNA'dan yoksun olduğunu ve embriyonik letal olduğunu göstermiştir. TFAM kaybının aynı zamanda dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna yol açtığına dair çalışmalar da vardır (Ekstrand ve ark 2007). İnsan TFAM genini aşırı eksprese eden transgenik farelerde yapılan başka bir çalışmada ise nöronal ölümü geciktiren ve mitokondrial hastalık fenotiplerini iyileştiren artmış bir mtDNA kopya sayısı raporlanmıştır (Nishiyama ve ark 2010). Bu nedenle TFAM, mitokondrial fonksiyondaki kusurların çekici bir göstergesidir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, TFAM için birkaç çelişkili işlev bildirilmiştir. TFAM'ı aşırı eksprese eden transgenik farelerin, kalpte ve kaslarda artan bir

mtDNA kopya sayısı, genişlemiş nükleoid ve kusurlu solunum zinciri aktivitesi sergilediği gösterilmiştir (Ylikallio ve ark 2010) . Ayrıca, *Drosophila melanogaster* üzerinde yapılan bir çalışmada ise TFAM'ı aşırı eksprese eden meyve sineklerinin ömrünün normal koşullar altında kontrollerden daha kısa olduğu ve fakat güçlü oksidatif stres koşulları altında daha uzun olduğu gösterilmiştir (Matsuda ve ark 2013). Bu raporlar, TFAM'ın aşırı ekspresyonunun stres koşullarına bağlı olarak yaşam süresi üzerinde hem olumsuz hem de olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, TFAM, PGC-la ve NRF-1'in aşırı ekspresyonu ile mtDNA miktarının arttırılması, mitokondrial fonksiyon bozukluğu olan hastalıkları tedavi etmek için terapötik yaklaşımlar olarak önerilmiştir (Ahn ve ark 2010)

TFAM ifadesinin, çeşitli kanser hücrelerinin çekirdeklerinde ve mitokondrilerinde arttığı bulunmuştur. TFAM kanser hücresi büyümesinde yer alan bazı nükleer genlerin ifadesini düzenlediği gösterilmekle beraber (Han ve ark 2011) NRF-1, Sp1 ve PGC-la'nın katılımı dışında, TFAM aracılı transkripsiyonun yukarı akış düzenleyicilerine ilişkin ayrıntılar tam olarak anlaşılamamıştır (Choi ve ark 2006). NRF'ler, çoklu mitokondrial fonksiyonlarda yer alan birkaç nükleer geni aktive eder. NRF-1 bağlanma bölgeleri, sitokrom c'nin promotörlerinde bulunurken, sitokrom c oksidaz promotörünün bir NRF-2 bağlanma bölgesi vardır. TFAM'ın promotörünün ise, hem NRF-1 hem de NRF-2 tanıma bölgeleri bulunur. NRF'ler, TFAM transkripsiyonunun diziye özgü aktivasyonu yoluyla mtDNA kodlu gen ekspresyonunun düzenlenmesine katılır. NRF aracılı TFAM transkripsiyonel aktivasyonu, mitokondrial ve nükleer gen ifadesi arasında bir bağlantı sağlıyor olabilir (Virbasius ve Scarpulla 1994).

TFAM'ın hücre hayatta kalması, çoğalması ve göçünün düzenlenmesine katıldığı da bildirilmiştir. TFAM ekspresyonunun düşürülmesinin p21'e bağlı G1 hücre döngüsü durmasını indüklediği bulunduğundan, TFAM'ın hücre döngüsü ilerlemesinin kritik bir düzenleyicisi olan p21'i düzenlediği gösterilmiştir (Kim ve ark 2013). Ayrıca TFAM, malign tümörlerin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynar. TFAM'ın, kolorektal kanserde mtDNA tükenmesi ve apoptotik direnci indüklediği gösterilmiştir (Guo ve ark 2011). Ek olarak, TFAM'nin glioma hücre hattında ve glioma doku numunelerinde yukarı regüle edildiğine dair kanıt sağlamıştır (Lee ve ark 2017), bu da onun kanserdeki potansiyel onkogen rolünü göstermektedir.

1.7. Rapamisinin Mekanik Hedefi (mTOR)

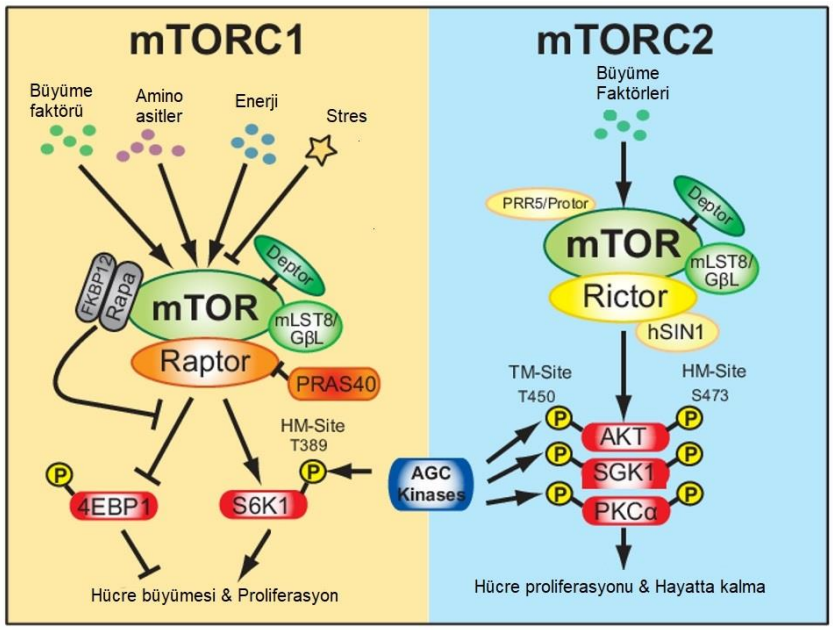
Rapamisinin memeli veya mekanik hedefi (mTOR), çoklu hücre içi ve çevresel sinyalleri algılamak ve entegre etmek için yapısal ve işlevsel olarak farklı iki protein kompleksi, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) aracılığıyla hareket eden bir serin/treonin kinazdır (Laplante ve Sabatini 2012). mTOR, PI3K/Akt sinyal yolunun bir protein kinazıdır. Büyüme, besin ve enerji sinyallerine yanıt olarak mTOR'un aktivasyonu, tümör gelişimi için gerekli olan protein sentezinde bir artışa yol açar.

İlk olarak 1975 yılında Paskalya Adası'nda (Rapa Nui) toplanan bir toprak örneğinden izole edilen, *Streptomyces hygroscopicus* bakteri türü tarafından üretilen bir makrolid olan rapamisin, antifungal ve immünosupresif bir ajan olarak karakterize edildi ve daha sonra tümörlerde anti-proliferatif özelliklere sahip olduğu gösterildi (Sehgal ve ark 1975). Rapamisin, prolil izomeraz FKBP12 ile bir kompleks oluşturur ve birlikte büyüme ve metabolizmanın kontrolünde merkezi bir rol oynayan bir protein kinaz olan mTOR'a bağlanır (Heitman ve ark 1991).

mTOR yolu, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve otofaji gibi birçok temel biyolojik ve fizyolojik süreci düzenler ve bu sebeple mTOR yolundaki bileşenler, kanserlerde en sık mutasyona uğrayan genleri içerir (Mayer ve Arteaga 2016). mTOR yolunun düzenlenmesi, mTOR ile cross-talk yapan negatif ve pozitif düzenleyicilerinden de etkilenir, örneğin PI3K/AKT, mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), nükleer faktör-κB (NF-κB) ve p53 vb., çok daha karmaşık bir sinyalleşme kaskadı içerir (Conciatori ve ark 2018).

mTORC1 ve mTORC2 farklı fizyolojik işlevleri yönetir. Farklı substrat spesifikliğine sahiptirler ve farklı şekillerde aktive edilirler. Bu nedenle fonksiyonları sıkı bir şekilde düzenlenir. Genel olarak, mTORC1, besin mevcudiyeti ve büyüme faktörlerine yanıt olarak hücre büyümesini kontrol ederken, mTORC2 hücre çoğalmasına ve hayatta kalmasına aracılık eder (Loewith ve ark 2002). mTORC1'in bileşenleri şunları içerir: substrat tanımada yer alan, düzenleyici ilişkili mTOR proteini (Raptor), mTORC1 inhibitör modülatörleri prolin açısından zengin AKT/PKB substratı 40 kDa (PRAS40), DEP alanı içeren mTOR etkileşimli protein (Deptor), ve pozitif mTORC1 regülatörü öldürücü memeli sec-13 protein 8 (mLST8, GβL) (Jewell ve Guan 2013). mTORC2'nin temel bileşenleri arasındaysa; mTOR, mTOR'un rapamisine duyarsız proteini (Rıctor), SIN1, mLST8 (GβL), PRR5/Protor, ve DEP alanı içeren Deptor bulunur (Şekil 1.14.) (Oh ve Jacinto 2011). mTOR aracılığıyla sinyal vermek,

hücre büyümesiyle ilgili çok çeşitli süreçleri modüle eder. Temel olarak, PI3K/AKT, tüberoz skleroz kompleksleri (TSC) 1/2 ve Deptor döngüsü dahil olmak üzere mTOR aktivitesini düzenleyen farklı önemli yollar vardır (Moschetta ve ark 2014).

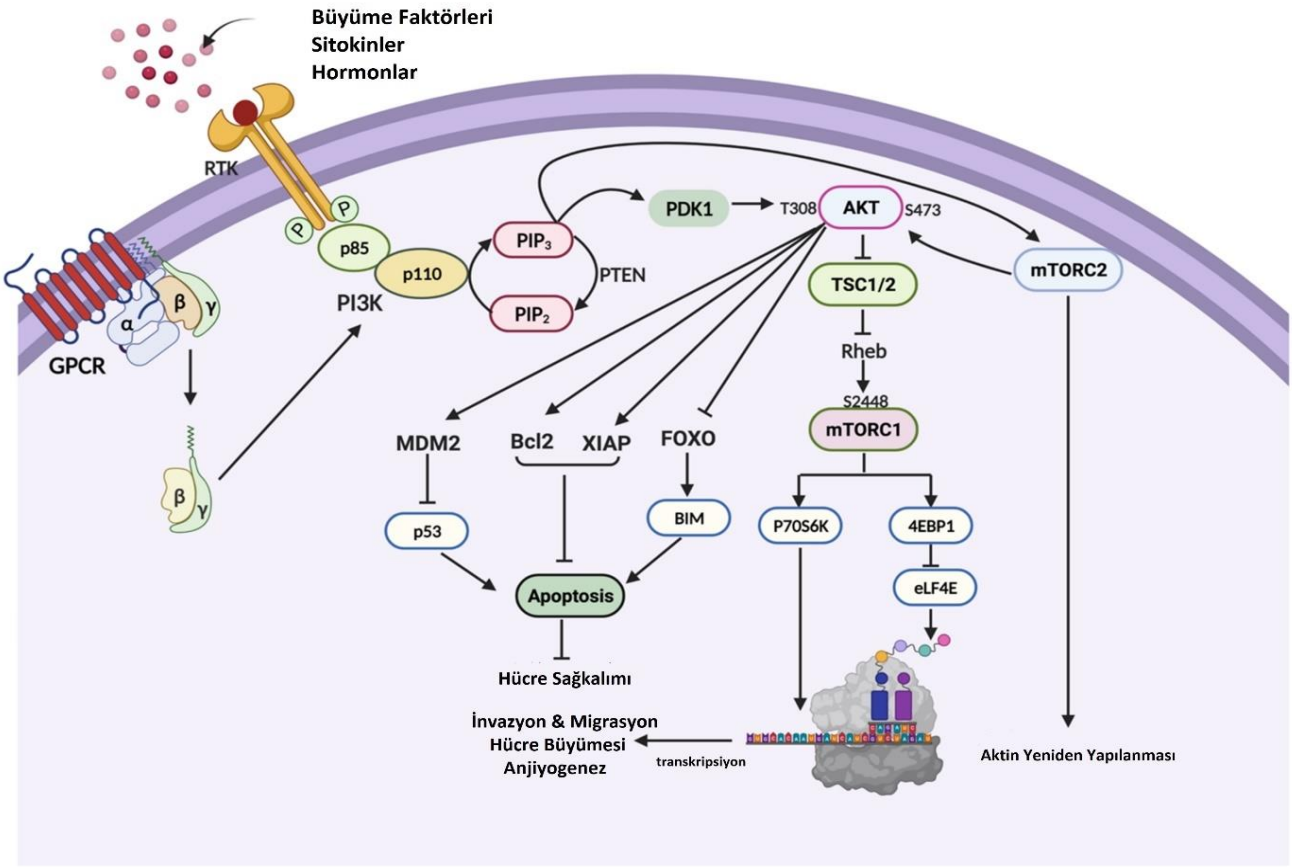


Şekil 1.14. mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri (Foster ve Fingar 2010).

PI3K/AKT yolu üzerinden sinyalizasyon, esas olarak hücre membran reseptörlerine bağlanan büyüme faktörlerinden gelen mitojenik sinyaller tarafından başlatılır. Bu reseptörler, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) içerir. İnsülin gibi büyüme faktörleri ve hormonlar, TSC1/TSC2 kompleksinin ve PRAS40'ın mTORC1 sinyali üzerindeki inhibitör etkisini tersine çeviren sınıf I PI3K ve onun aşağı akış efektörü AKT'nin aktivasyonu ile mTORC1 sinyalini düzenler (Vander Haar ve ark 2007).

AKT/mTOR yolu PI3K aktivasyonu ile başlatılır. Serin/treonin kinaz ailesinden bir enzim olan PI3K, normalde lipid sentezinde yer alır. Heterodimerik bir protein olan PI3K, p110 katalitik ve p85 düzenleyici alt birimlerden oluşur (Engelman ve ark 2006). Sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi çeşitli hücre dışı sinyallere yanıt olarak aktive olan bir aşağı akış efektörüdür. G proteinine bağlı reseptör (GPCR) ve reseptör tirozin kinaz (RTK) dahil olmak üzere büyüme faktörlerinin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, PI3K'nin dimerizasyonunu ve fosforilasyonunu indükleyen reseptör kompleksini aktive eder (Iksen ve

ark 2021). PI3K'nın alt birimi, fosfatidilinositol 4,5-bifosfatı (PIP2) fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüştürür. PIP2 ve PIP3 olarak bilinen fosfolipitler, plazma zarının iç tabakasında yer alan PH alanı proteinleri ile etkileşime girerek protein moleküllerinde konformasyonel değişikliklere neden olur (Denley ve ark 2009). Aktivasyon sırasında PIP3, fosfoinositide bağımlı kinaz-1'in (PDK1) ve AKT'nin aşağı akış hedeflerinin aktivasyonunu indükler. Normal koşullar altında, fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), AKT'nin aktivasyonunu baskılayan bir tümör baskılayıcı protein olarak işlev görür (Şekil 1.15.).



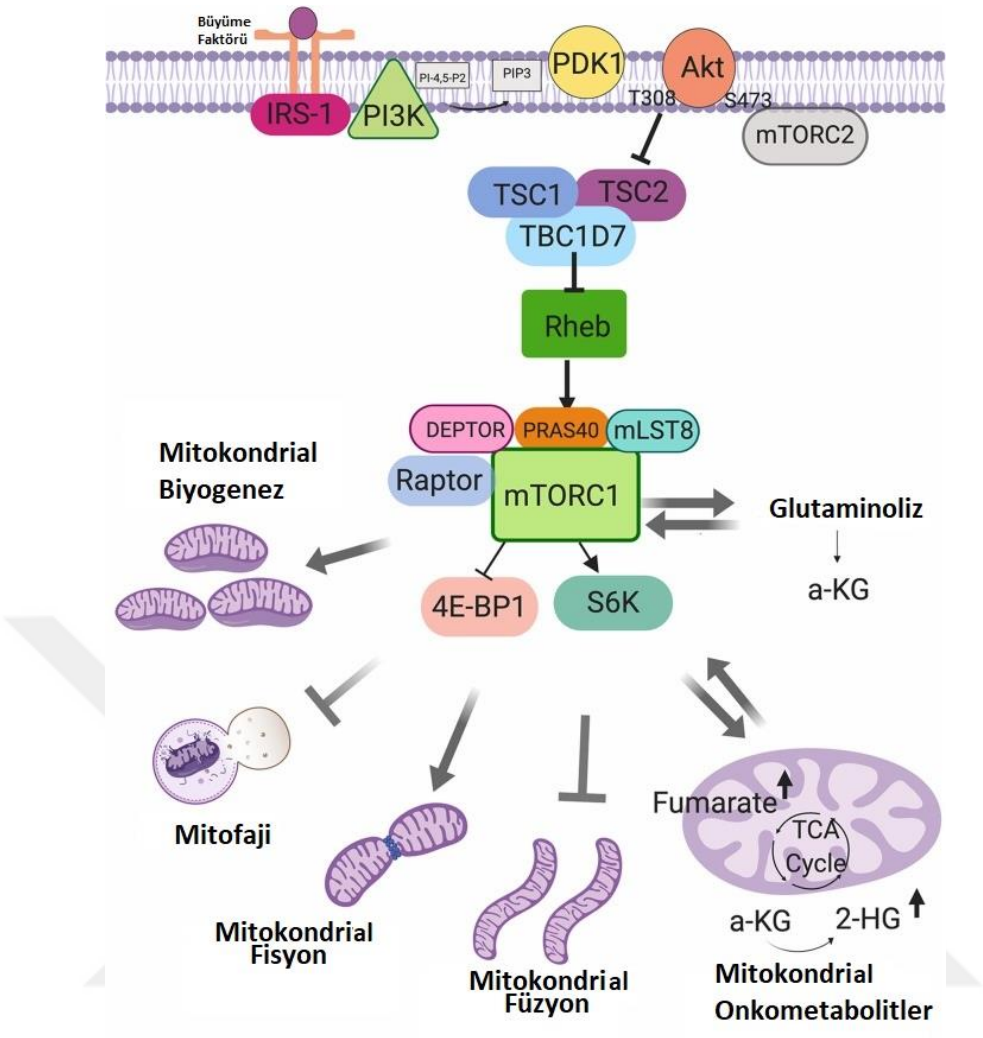
Şekil 1.15. PI3K/AKT/mTOR yolu (Iksen ve ark 2021).

AKT, bir treonin kalıntısı (T308) içeren bir çekirdek kinaz alanı ve mTORC2'ye bağlanan bir C- terminal kuyruk alanı içeren bir serin/treonin kinazdır. Birkaç çalışma, fosforile AKT'nin hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenez gibi agresif kanser davranışlarını desteklediğini ve birkaç aşağı akış efektörünün düzenlenmesi yoluyla programlanmış hücre

ölümünü önlediğini bildirmiştir (Brunet ve ark 1999, Qiao ve ark 2008, Kunter ve ark 2014). AKT'nin üç farklı izoformu tanımlanmıştır: AKT1, AKT2 ve AKT3. AKT proteininin Ser473 ve Thr308'de aktive edici fosforilasyonu ayrıca, TSC1/2 işlevini inhibe etmek için fosforilasyonunu indükler; sonuç olarak Rheb, mTORC1'i etkinleştirir (Inoki ve ark 2002, Tee ve ark 2003, Shaw ve ark 2004).

Hipoksi ve düşük amino asit seviyeleri de mTOR'u negatif olarak düzenler. mTORC1, hücre proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve anjiyogenezi etkileyen çeşitli aşağı akış sinyal efektörlerini ve transkripsiyon faktörlerini modüle eder. mTORC1 ayrıca translasyonu, ribozom biyogenezini, metabolizmayı ve hipoksi ve otofajiye hücresel yanıtı düzenler (Dancey 2010). AKT aktivasyonunu arttırmaya ek olarak, mTORC2 sinyali, aktin hücre iskeletinin organizasyonunda yer alır (Copp ve ark 2009).

Hücre çoğalması ve büyümesinde gerekli anabolik yollar yüksek düzeyde ATP tükettiğinden hücre dışı ortamla hücre homeostazını korumaktan sorumlu birkaç besin sensörü vardır (Wullschleger ve ark 2006). Bu sensörler, MTORC1 ve AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) gibi sensörlerdir. AMPK hücresel AMP seviyelerini algılar ve hipoksi ve hipoglisemi gibi enerji yoksunluğu koşullarında anabolizmadan katabolizmaya doğru bir metabolik geçişi koordine eder (Lin ve Hardie 2018). AMPK, MTORC1'in hedeflerinden biridir ve AMPK'nın artan aktivasyonu mTORC1 sinyalini baskılar, böylece PGC-1a, SREBP1/2 ve HIF-1a gibi anahtar proteinlerin ifadelerini düzenlemek yoluyla enerji metabolizmasını regüle eder (Dodd ve ark 2015). Ayrıca mTORC1'in mitokondrial oksidatif metabolizmayı düzenlediği de gösterilmiştir (Şekil 1.16.) (Arsham ve ark 2003, Toschi ve ark 2008).



Şekil 1.16. Mitokondrial fonksiyonların düzenleyicisi olarak mTORC1 (de la Cruz López ve ark 2019).

mTOR-mitokondri etkileşimi gösteren bir diğer kanıtta, Desai ve ark. (Desai ve ark 2002)'nın insan T hücrelerinde yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada hücrelerin subselüler fraksiyonlarında mTOR'un mitokondri elementleri ile etkileşimini ve spesifik olarak dış mitokondri membranıyla bağlantısı gösterilmiştir. Ayrıca mTORC1'in Mtf1 translasyonu aracılığıyla fisyon ve füzyon dinamiklerinin regülatörü olarak iş gördüğüne dair kanıtlar da vardır (Larsson ve ark 2012).

Çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda ve sonrasında yapılan bir başka çalışmada, radyasyon stresi altında mTOR'un mitokondriye geçtiği ve biyoenerji yolunu aerobik glikolizden oksidatif fosforilayona kaydırdığı ve bunun da radyoterapiye artan direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Roberts ve ark 2014, Lu ve ark 2015).

mTOR sinyaline bağlı birçok onkogen veya tümör baskılayıcı gen göz önüne alındığında, mTORC1 fonksiyonunun tüm insan tümörlerinin %70'ine kadar hiperaktive olabileceği tahmin edilmektedir; mTORC2 için çok daha az bilgi mevcuttur, ancak bunun PI3K/Fosfataz ve PTEN üzerindeki tensin homologu ile bağlantısı tümör hücrelerinde de aktive olduğunu düşündürmektedir (Forbes ve ark 2011). İnsan kanserinde mTOR'un anormal aktivasyonu, mTOR yolunu aktive eden mutasyonlara, amplifikasyona veya mTOR komplekslerinin bileşenlerinin aşırı ekspresyonuna veya mTOR negatif düzenleyicilerinin kaybına bağlanabilir. PIK3CA mutasyonları, insan kanserinde sıklıkla tespit edilmektedir. PI3K aktivasyonu, hem mTORC1 hem de mTORC2 aktivasyonunu destekler. Ek olarak, KRAS ve BRAF'taki mutasyonlar mTORC1 aktivasyonuna yol açabilir. Özellikle KRAS, PIK3CA'ya (p110α) doğrudan bağlanabilir ve PI3K yolunu aktive ederek mTOR aktivasyonuna yol açar (Rodriguez-Viciana ve ark 1994).

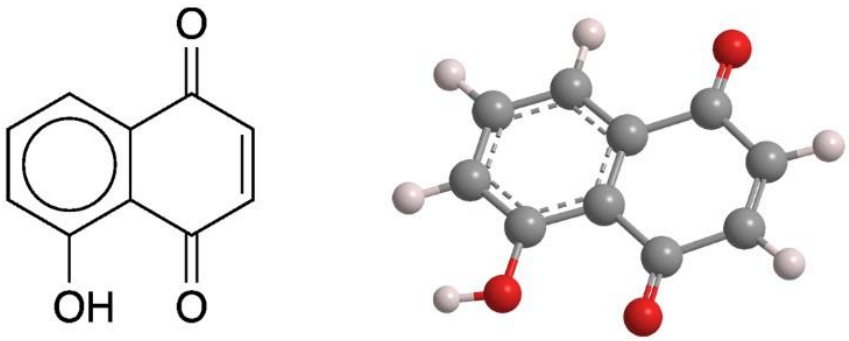
Böbrek kanserinde mTOR aktive edici mutasyonlar rapor edilmiştir. mTOR aktivitesi genellikle büyüme faktörleri ve amino asitler tarafından yukarı regüle edilirken, mTOR'daki mutasyonların aktive edilmesi, Rheb'den bağımsız mTOR hiperaktivasyonuna, dolayısıyla büyüme faktörlerine ve amino asitlere olan bağımlılığın kaybolmasına neden olabilir (Xu ve ark 2016). Rheb'deki nokta mutasyonları böbrek kanseri ve endometriyal kanserde de tespit edilmiştir (Ghosh ve ark 2015). Rheb1, akut miyeloid lösemide (AML) aşırı eksprese edilmekte ve AML ilerlemesini desteklediği düşünülmektedir (Gao ve ark 2016). İnsan kanserinde mTOR amplifikasyonu nadir iken, Rictor amplifikasyonu meme kanseri, mide kanseri ve karaciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde tespit edilmiştir (El Shamieh ve ark 2018). Ayrıca, Rictor'un beyin, meme, akciğer, mide, kolon, karaciğer ve dilin insan kanserlerinde aşırı eksprese edildiği gözlenmiştir (Kim ve ark 2017).

PDAK hastalarının %90'ından fazlası onkojenik KRAS mutasyonlarını barındırır. Mutasyona uğramış KRAS, MEK/ERK veya PI3K-PDK1 dahil olmak üzere karmaşık özel bir sinyalleşme başlatır. PI3K-PDK1 sinyal yolu, pankreasta bir KRAS efektörüdür. PI3K alt birimi p110a veya PDK1'in genetik olarak silinmesi, genetik olarak tasarlanmış fare modellerinde invaziv kanserlerin gelişiminin yanı sıra preneoplastik lezyonların oluşumunu engellediği gözlenmiştir. Ayrıca, p110α'nın H1047R sıcak nokta mutantı pankreasta karsinojenezi tetikler (Hassan ve ark 2018). Pankreatik duktal adenokarsinomlar, mTOR'un Ser2448 fosforilasyonunu taşır, bu sinyalleşme düğümünün aktivasyonunu işaretlemektedir (Kong ve ark 2016). PDAK hastalarının önemli bir bölümündeki aktivasyonla uyumlu olarak, mTOR kinazı, iki ana sürücü yolunun sinyalini bütünleştirir; MEK-ERK ve PI3K yolları

(Hassan ve ark 2018). mTOR ile yapılan çalışmalarda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, mTOR sinyalini hedeflemek kanser tedavisinde çekici bir strateji haline gelmiştir.

1.9. Juglon

Kanser, insan toplumu için bir yük oluşturuyor olsa da, kapsamlı bir tedavi henüz keşfedilememiştir. Anti-tümör tedavilerin başlıca sınırlarından ikisi; terapötik indeksin düşük olması ve farmakoterapiye dirençtir. Doğal ürünler, biyoaktif moleküllerin mükemmel bir kütüphanesini temsil eder. Bu sebeple, doğal dünyaya dokunmak, uygun farmako-toksikolojik profillere sahip yeni terapötik seçeneklerin belirlenmesinde yararlı olabilir. Ceviz eski çağlardan beri sadece gıda olarak tüketilmemiş, farklı kısımları geleneksel tıpta, daha sonradan da kozmetik ve ilaç sanayinde kullanılmıştır (Oliveira ve ark 2008)



Şekil 1.17. Juglonun moleküler yapısı (Ahmad ve Suzuki 2019).

Juglon (5-hdroxy-1, 4-napthoquinone), ceviz ağaçlarının taze olgun meyve kabuğunda, köklerinde, yapraklarında bulunan bir tür naftokinon maddesidir (Şekil 1.17.). Ceviz ağaçlarının ürettiği doğal bir toksindir. Anti-bakteriyel, anti-inflamasyon, anti-kanser, anti-virüs, hipoglisemik ve insan cilt hastalıkları üzerinde tedavi edici etkileri gibi geniş spektrumlu antibakteriyel özelliklere sahiptir (Pereira ve ark 2007, Wang ve ark 2020).

Naftokinonlar, maruz kalan hücrelerde oksidatif strese neden olabilir ve bu nedenle redoks sinyalini etkileyebilir. Anti-tümör potansiyellerinin temelini oluşturan ana mekanizma, hücre içi ortamda semikinon radikallerinin ve diğer ROS'ların üretilmesidir (Pereira ve ark 2007). ROS üretilmesi yoluyla, biyomoleküller oksidatif strese maruz kalır. Antioksidanlar ROS'u azaltır ve ROS ile antioksidanlar arasındaki denge, oksidatif stresi tanımlar. Fenolik bileşikler, ROS üreten enzimleri inhibe ederek, ROS'u doğrudan söndürerek, geçiş metali

iyonlarını şelatlayarak, hidrojen atomu transferini ve E vitamininin rejenerasyonunu engelleyerek bu reaksiyonları inhibe edebilir (Leopoldini ve ark 2004, Tejero ve ark 2007).

Juglon mükemmel redoks döngüleyicileridir ve bu kinonlara maruz kalan hücrelerde ROS oluşumuna neden olur (Klotz ve ark 2014). Juglonun sitotoksisitesinin altında yatan etki mekanizmasını açıklamak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu molekülün apoptoz dahil olmak üzere birçok etkisi olmasına rağmen, bu etkilerin hücre tipine özgü olduğu iyi bilinmektedir ve tam mekanizma belirsizliğini korumaktadır (Ahmad ve Suzuki 2019). Juglonun bitki kaynağı olan *Juglans regia*'nın anti-kanser kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark 2015). Bu nedenle juglon, farklı insan kanser hücre dizilerinde araştırılmıştır. ROS, kanserde çeşitli roller oynadığından, kanserli hücrelerin redoks durumunu modüle etmek umut verici bir terapötik yaklaşım olarak görünmektedir. Juglon ile yapılan çalışmalar, juglonun kanserle ilişkili inhibitör etkilerinin, gelişmiş ROS üretimi ve lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarılmıştır (Zhang ve ark 2015).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler ile markaları

Cihaz	Marka
Sınıf II biyogüvenlik kabini	Metisafe
CO2'li inkübatör	Thermo Scientific
Inverted mikroskop	Leica
Işık mikroskobu	Olympus
Floresan mikroskop	Olympus
Mikroplate okuyucu	Biotech
Real-Time PCR	Roche
Nanodrop spektrofotometre	Thermo Scientific
Santrifüj	Nüve
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific
Su banyosu	WiseBath
Vorteks	Nüve
Manyetik karıştırıcı	Stuart
Çalkalyıcı	WiseShake
Hassas terazi	KERN
Otomatik pipet	Thermo Scientific
Derin dondurucu -20°C	Arçelik
Derin dondurucu -86°C	Haier
Buzdolabı +4°C	Uğur

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çizelge 2.2. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler ile markaları

Kimyasal/Sarf Malzeme	Marka
RPMI 1640	Gibco
DMEM	Gibco
Penisilin/streptomisin	Biochrome
Fosfat tamponlu su (PBS)	Sigma
Dulbacco'nın fosfat tamponlu su (DPBS)	Sigma
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Gibco

Çizelge 2.2. (Devam) Kullanılan kimyasal ve saf malzemeler ile markaları

Kimyasal/Sarf Malzeme	**Marka**
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applicem
Tripsin-EDTA (%0.05)	Gibco
Juglon	Sigma
MTT	Sigma
TRidity G	Applicem
Tripan Mavisi	Sigma
Kristal Viyole	Sigma
Kloroform	Merck
Asetik asit	Merck
Ethanol	Dop Organik Kimya
2-propanol	Merck
SYBR Green Qpcr Master Mix	Thermo Scientific
cDNA Sentez Kiti	Vivantis
Thoma Lamı	Superior Marienfeld
T75 Flask	Isolab
T25 Flask	Isolab
6-kuyucuklu plate	Costar
96-kuyucuklu plate	Costar Steril
0.22 mikronluk enjektör filtresi	Chromlab
15 ml falkon tüp	Isolab
50 ml falkon tüp	Isolab
RNAaz	Fermentas

2.2. Hücre Kültürü

Çalışmada kullandığımız PANC-1 ve BxPC-3 insan pankreas kanseri hücre hatları, (Çizelge 2.3) American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edildi. PANC-1 hücreleri %10 FBS (fetal sığır serum) ve uygun miktarda antibiyotik [(penisilin (100 U/ml), streptomisin (100 µg/ml)] içeren DMEM besiyerinde %5'lik CO_2'li etüvde, 37 °C'de inkübasyona bırakılarak kültüre edildi. BxPC-3 hücreleri ise yine %10 FBS ve uygun miktarda antibiyotik penisilin [(100 U/ml), streptomisin (100 µg/ml)] eklenen RPMI-1640 besiyerde %5lik CO_2 'li inkübatörde kültüre edildi.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan PANC-1 ve BxPC-3 hücre hattının özellikleri.

Özellikleri	**PANC-1 Hücre Hattı**	**BxPC-3 Hücre Hattı**
Organizma:	Homo sapiens, insan	Homo sapiens, insan
Doku:	Pankreas; kanal	Pankreas
Yaş:	56 yıl	61 yıl
Cinsiyet:	Erkek	Kadın
Morfoloji:	Epitelyal	Epitelyal
Büyüme özellikleri:	Yapışık(adherent)	Yapışık(adherent)
Hastalık:	Epitelioid karsinom	Adenokarsinom
ATCC kodu:	CRL-1687	CRL-1469

2.2.1. Hücrelerin Dondurulması

Deneyde kullandığımız PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarının her ikisi de yapışarak çoğalan (aderent) hücre yapısında olduğu için dondurma işlemi sırasında her iki hücre hattına da aynı protokol uygulandı. Yapışık haldeki hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için 1-2 ml kadar %0,05 Tripsin/EDTA uygulandı ve 37 °C'de %5'li CO^2'li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında inverted mikroskop ile hücrelerin tamamen kalktığı teyit edildikten sonra flaska taze besiyer ilave edildi. Hücre-besiyer karışımı falkon tüpe alındı 4 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 9:1 oranında besiyer ve DMSO'dan oluşan dondurma çözeltisinden 1- 2ml eklendi. Hücreler kriyotüplere alınarak önce -20 ˚C'de 1 saat dondurulduktan sonra -80 ˚C'e stoklandı.

2.2.2. Dondurulmuş Hücre Hattının Çözdürülmesi

Kriyotüplerde bulunan hücre hatları -86 °C'den alındıktan sonra, kapaklarından tutularak 37°C'de bulunan su banyosunda hızlıca sallayarak çözdürüldü. Çözünen hücreler, içerisinde 5-6 ml besiyer bulunan falkonun içine aktarıldı ve 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak ekim yapılacak flaska göre uygun miktarda besiyer ile birlikte homojen olana kadar pipetaj yapılarak çözdürülüp flaska ekim yapıldı. 37 °C'de %5 CO2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Günaşırı kontrol edilip besiyer değişimi yapıldı. Bu protokol PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarının her ikisi için de aynı şekilde uygulandı.

2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücresel yoğunluğu %80-90 seviyesine ulaştığında canlılıklarının devam edebilmesi için hücreler daha geniş bir ortama alınarak pasajlama (subkültür) işlemi yapıldı. Öncelikle eski besiyer uzaklaştırıldı ve ardından 1X'lik DPBS solüsyonundan 1-2 ml alınarak yıkama

işlemi yapıldı. Flask yüzeyindeki hücreleri kaldırmak amacıyla flaska 1-2 ml %0.05'lik Tripsin EDTA eklendi ve hücreler etüvde 2-3 dk inkübasyona bırakıldı. İnvert mikroskopta tamamıyla flask yüzeyinden kalktığı görülen hücrelerin üzerine Tripsin EDTA miktarının iki katı kadar taze besiyer eklenerek hücre-besiyer karışımı bir falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak dipte kalan pellet kısmı 5 ml besiyerle homojenize olana kadar çözdürüldü. Falkon içerisinden alınan yaklaşık 10µl örnek tripan mavi boyası ile boyandıktan sonra Thoma lamı kullanılarak ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısına göre flasklara ekim yapıldı ve çoğalmaları için etüve kaldırıldı.

2.2.4. Juglon Stok Solüsyonun Hazırlanması

Ticari olarak (Sigma, St Louis, Amerika, Katalog No: H47003) katı bir şekilde temin edilen juglon, 5-hidroksi-1-4- naftakinon açık kimyasal formülüne ve 174.15 molekül ağırlığına sahip organik bir bileşiktir. Çalışmamız için DMSO içinde çözdürülerek konsantrasyonu 20mM olacak şekilde juglon stok solüsyonu hazırlandı, sonrasında 0,22 µm'lik filtreden geçirerek steril edildi ve -20˚C'de saklandı. Hazırlanan bu stok solüsyondan PANC-1 hücreleri için DMEM besiyeri ile seri dilüsyon yapılarak kullanılacak konsantrasyonlar elde edildi. BxPC-3 hücre hattı için ise RPMI-1640 besiyeri ile seyreltmeler yapılarak çalışmada kullanılacak olan konsantrasyonlar elde edildi.

2.2.5. Juglonun Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Juglonun, PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisini belirlemek için yaygın olarak kullanılan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi daha önceki çalışmalarımızda, çalışma grubumuz tarafından yapılmıştır (Avcı ve ark 2016). MTT testi, sarı renkli tetrazolyum tuzunun, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan suksinat dehidtogenaz enziminin aktivitesi ile, spektrofotometrik olarak ölçülebilen yoğun mor-mavi renkli formazanına indirgenmesi prensibine dayanır. Çalışma grubumuzun MTT analizi ile bulduğu IC_{50} değeri, PANC-1 hücreleri için 21,25 µM ve BxPC-3 hücreleri için ise 21,05µM idi. Bu değerler referans alınarak uygulama dozları belirlenmiştir (Avcı ve ark 2016).

2.2.6. Gen İfade Analizleri

MTT analizi sonuçlarına göre belirlenen IC_{50} değerleri dikkate alınarak 5, 10, 15 ve 20 µM konsantrasyonları juglon uygulama dozları olarak belirlendi. Juglonun PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde mitokondrial aktivasyonla ilgili GRP75, mTOR, TFAM genlerinin ifade

düzeyleri üzerine etkileri (Roche LightCycler 1.2) kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile araştırıldı.

2.2.7. Total RNA İzolasyonu

6 kuyucuklu platelere $2x10^5$ hücre bulunacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 24 saatlik inkübasyona bırakıldı ve plate'e tutunmaları sağlandı. 24 saatin ardından kontrol grubu hariç uygulamaların 5, 10 15 ve 20 µM juglon eklenilip tekrar 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra %0,05'lik TripsinEDTA ile muamele edilerek 3-5 dakika etüvde bekletildi ve hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Takibinde hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve 1500 rpm de 4 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve her bir örneğin üzerine 1ml TRidity G eklenerek pipetaj yapıldı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarılan süspanse hücre-kimyasal karışımının üzerine 200 µl kloroform eklenerek tüpler alt üst edildi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler 12000 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant temiz 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 250 µl 2-propanol ilave edilerek 10 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon ardından tekrar soğutmalı santrifüjde 12000 g'de +4˚C'de 10 dk santrifüj edildi. Ardından tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılarak üzerine %70'lik etanol eklendi ve 12000 g'de +4˚C'de 5 dakika daha santrifüj edildi. Bütün tüplerdeki supernatant uzaklaştırılarak RNA pelletleri 5 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletlerin üzerine 50 µl nükleaz-free su eklenerek çözdürüldü. Total RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi için Nanodrop spektrometre cihazı ile 1µl RNA örneği alınarak ölçüm yapıldı ve RNA konsantrasyonları ng/µl olarak elde edildi. Her örnek için bu işlem tekrar edildi.1 µg RNA örneği cDNA sentezi için kullanılırken kalan örnekler -86˚C'de muhafaza edildi.

2.2.8. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi, Vivantis "2-steps RT-PCR Kiti" (Vivantis, RTPL2) kullanılarak gerçekleştirildi. 2 adımlı olan sentez basamağının ilkinde, bir tüp içerisinde 1 µg RNA, 1ul oligo (dT)18 primer (40 uM), 1µl 10 mM dNTP miks'ten oluşan karışım nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlandı. Bu işlem diğer 9 tüp içinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları denatürasyon için thermal cycler (Mycycler, Bio-rad) cihazında 65˚C'de 5 dk inkübe edildikten sonra, buz üzerinde alınarak 2 dk bekletildi. Süre sonunda tamamlanan birinci aşamayı, her bir tüp içerisine 10µl cDNA sentez miks (2µl 10X Buffer M-MuLV, 100 ünite MMuLV Reverse Transcriptase enzimi, son hacmi 10µl'ye tamamlayacak miktarda

nükleaz içermeyen dH2O) ilave edildikten sonra sentez için 42°C'de 60 dakika inkübe edilmesiyle gerçekleşen ikinci adım takip etti. Süre sonunda reaksiyonu sonlandırmak amacıyla her tüp 85°C'de 5 dk inkübe edildi ve elde edilen cDNA'lar qPCR analizlerinde kullanılmak üzere -20'de muhafaza edildi.

2.2.9. qPCR Analizi

qPCR analizi, "SYBR Green qPCR Master Mix" (Thermoscientific, K0251) kullanılarak gerçekleştirildi. GRP75, TFAM, mTOR hedef genleri ile referans olarak kullanılan β-aktin genine ait primerler Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Hedef genler ve primer dizileri

Gen	**Primer Dizisi**	**Referans**
GRP75	F: 5'-GCTGTCAATCCTGATGAGGCTGTG-3' R:5'-CTGGCTCTTCTTGGTTGGAATAGTGG-3'	(Dai ve ark 2021)
mTOR	F: 5' AGTGGACCAGTGGAAACAGG3' R: 5-'TTCAGCGATGTCTTGTGAGG-3'	(Makker ve ark 2016)
TFAM	F: 5'-AGCTCAGAACCCAGATGC-3' R: 5'- CCACTCCGCCCTATAAGC -3'	(Lee ve ark 2017)
β-actin	F: 5'-ACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3 R:5'-ATCTCCATGCATGCATCCTGTC-3	(Hsu ve ark. 2005)

F: Forward primer, R:Reverse primer

Hedef genlerin ifade düzeylerini belirlemek için aşağıdaki şekilde verilen reaksiyon hazırlandı.

Çizelge 2.5. qPCR analizi için hazırlanan reaksiyon

Reaksiyon Bileşeni	**Hacim**
SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	12.5 µl
Forward primer (50 µM)	0,25 µl
Reverse primer (50 µM)	0,25 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz free su	10 µl
Toplam	**25 µl**

Çizelge 2.5'e göre hazırlanan karışım, Roche Light Cycler 1.2 gerçek zamanlı Real Time PCR cihazına uygun tüplere konularak yerleştirildi ve denatürasyon, amplifikasyon ve soğuma basamaklarından oluşan qPCR protokolü Çizelge 2.6'da belirtildiği şekilde uygulandı.

Çizelge 2.6. PCR Basamakları

Denatürasyon	95˚C'de 10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	94˚C'de 30 sn 60˚C'de 30 sn 72˚C'de 30 sn
Soğuma	40˚C'de 30 sn

GRP75, TFAM ve mTOR gen ifadeleri düzeyi, Ct değerleri üzerinden yorumlandı. Normalizasyon için β-aktin geni kullanıldı, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile kontrol gurubu genleri ile 5,10,15, ve 20 µM konsantrasyonda juglon uygulanan grupların genlerinin ifade düzeyleri karşılaştırıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin hesaplanması sonucu 2 üzeri kat artış ve azalışları anlamlı ifade değişimleri olarak değerlendirildi.

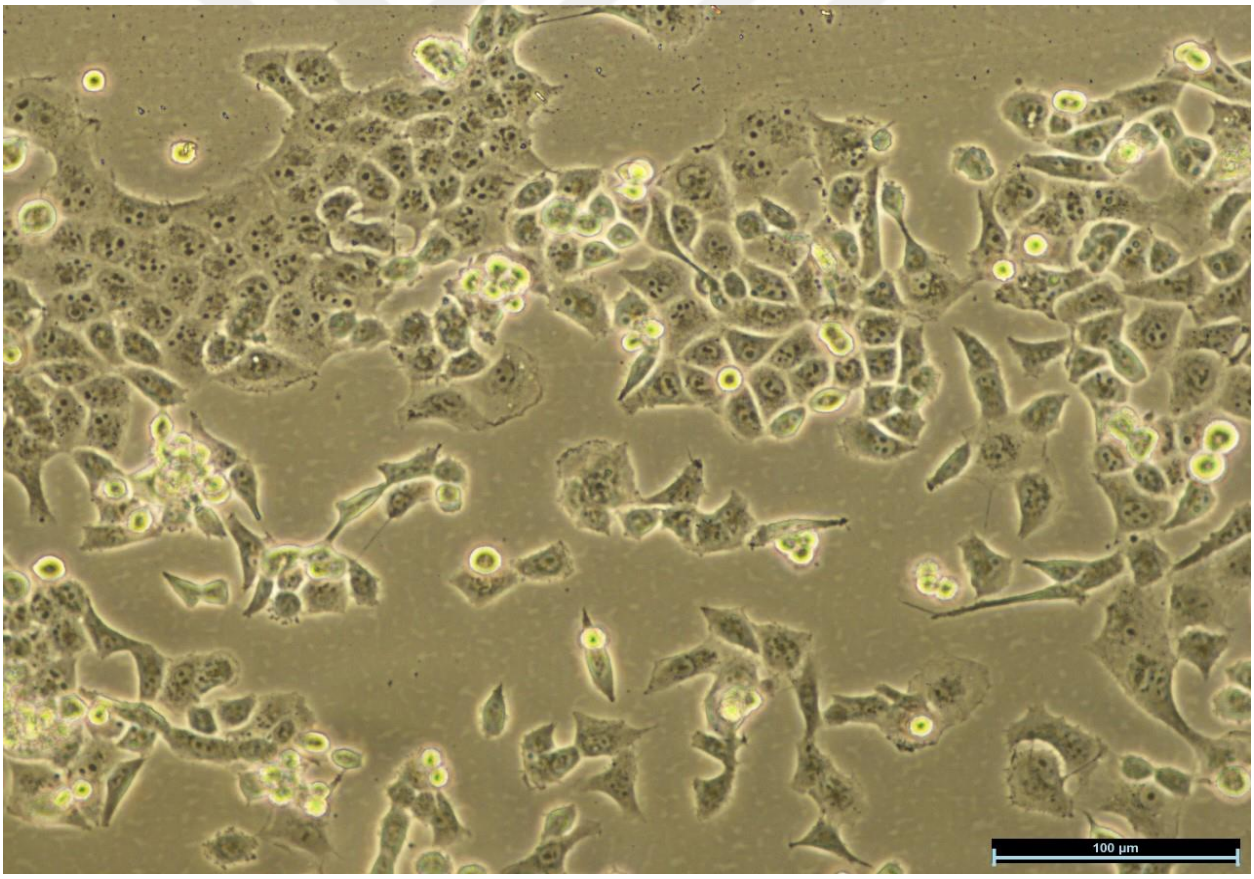
3.BULGULAR

3.1. Pankreas Kanseri Hücre Hatları

Çalışmamızda PANC-1 ve BxPC-3 hücre hattı olmak üzere iki farklı pankreas kanseri hücre hattı kullanıldı. PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarında mitokondrial biyogenez ve aktivitasyonla ilgili anahtar genler olan GRP75, TFAM ve mTOR genlerinin ifadeleri, üzerine Juglon muamelesi yapılmış hatlarda ilgili genlerin ifade düzeyleri değerlendirildi.

3.1.1. PANC-1 Pankreas Kanseri Hücre Hattı

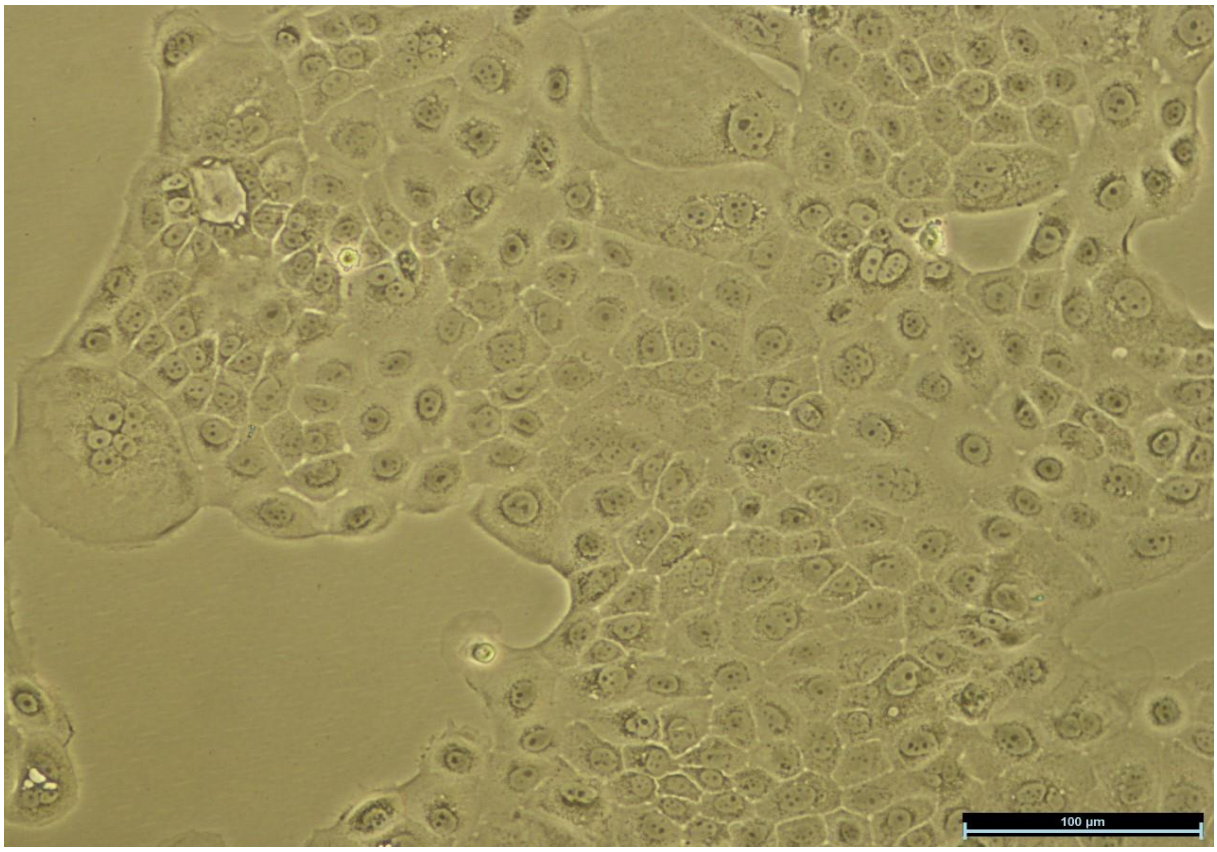
Çalışmamızda kullandığımız ilk hücre hattı olan PANC-1 hücre hattında %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 mg/ml streptomisin ve 100 IU/ ml penisilin içeren DMEM besiyeri hazırlanarak, hücreler 37˚C'de %5 CO2'li etüvde kültüre edildi. Kültüre edilen PANC-1 hücreleri, inkübasyon sonrasında günaşırı olacak şekilde flask yüzeyindeki görüntüsü inverted mikroskopta kontrol edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. PANC-1 hücrelerinin inverted mikroskopta görüntülenmesi (X10 büyütme).

3.1.2. BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücre Hattı

Çalışmada kullanılan diğer pankreas kanseri hücre hattı olan BxPC-3, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/ ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde, 37˚C'de %5 CO_2'li etüvde kültüre edildi. Kültüre edilen BxPC-3 hücrelerinin, inkübasyon sonrası günaşırı flask yüzeyindeki görüntüsü inverted mikroskopta kontrol edilerek çalışmaya devam edildi (Şekil 3.2).



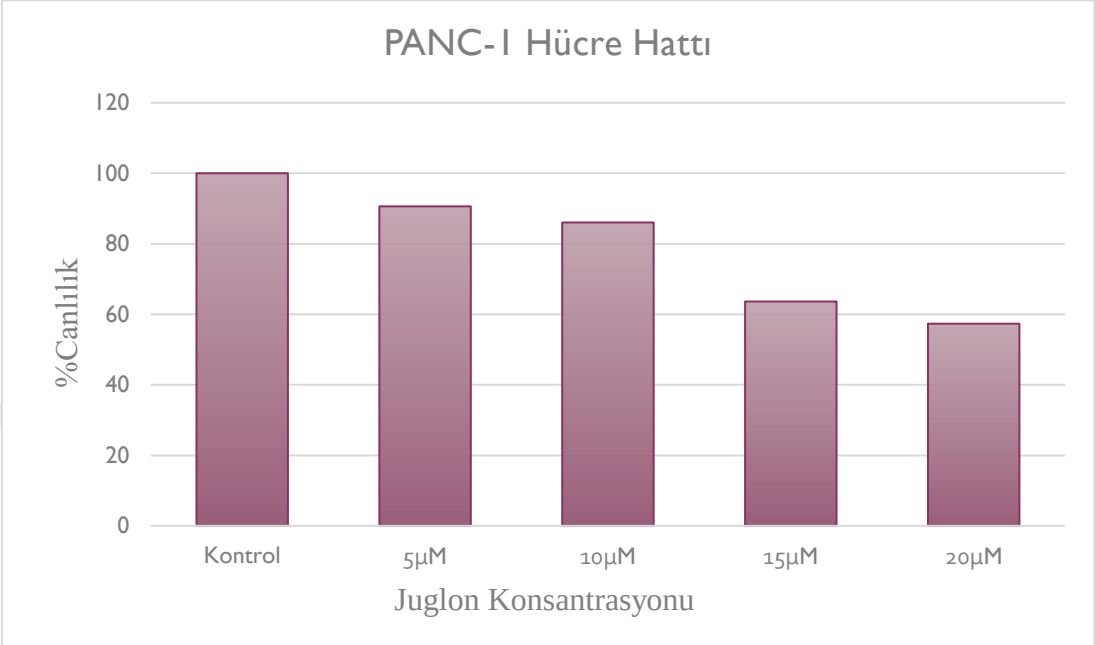
Şekil 3.2. BxPC-3 hücrelerinin inverted mikroskopta görüntülenmesi (X10 büyütme).

3.2. Juglonun Sitotoksik Etkisi

Kullanılan her iki hücre hatları için de, çalışma grubumuzun daha önceki çalışmalarda MTT analizi ile belirlediği IC_{50} dozunun altında kalan 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM'lık konsantrasyonlar uygulama dozu olarak belirlendi.

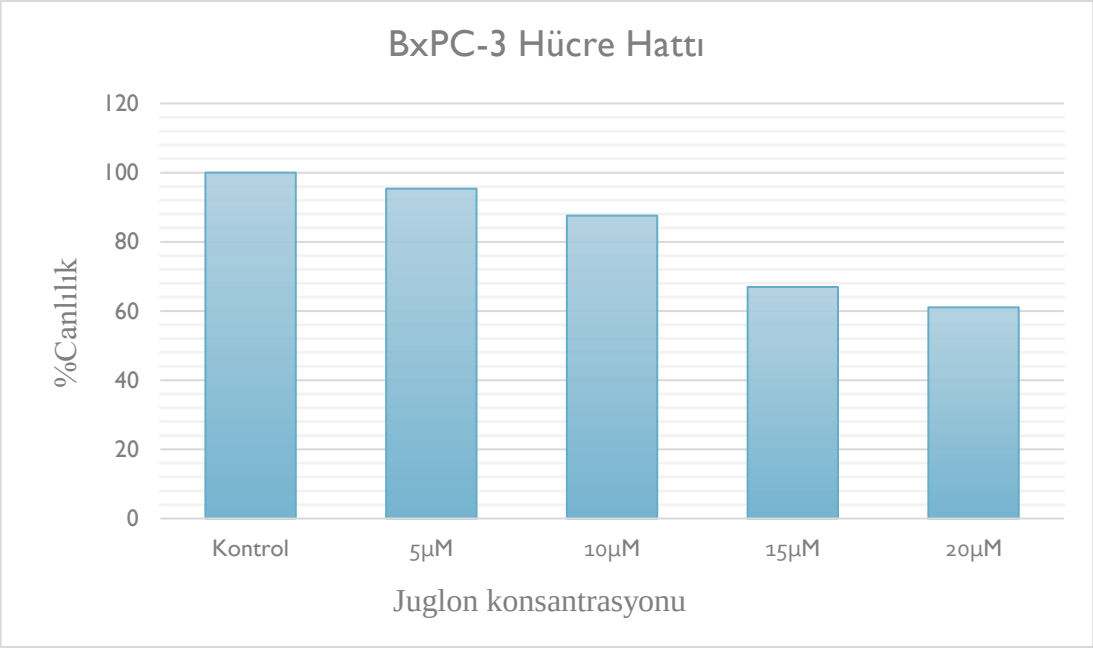
PANC-1 hücrelerine juglonun 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 24 saatlik uygulamasının ardından canlılığına etkisi Şekil 3.3.'de gösterilmiştir. 24 saat sonunda 5 µM juglon uygulanan gruptaki hücre canlılığı %90,62 olarak belirlenmiştir. 10, 15

ve 20 µM juglon uygulamaları için ise hücre canlılığı sırasıyla %86,05, %63,63, %57,33 olarak tespit edilmiştir.



Şekil. 3.3. Uygulama dozlarının PANC-1 hücrelerinin canlılığına etkisi

BxPC3 hücrelerinin ise belirlediğimiz dozlar olan 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM konsantrasyonlu juglon uygulamasının canlılığına etkisi Şekilde 3.4. gösterilmiştir. Sonuçlara göre, 24 saat sonunda 5 µM juglon uygulanan grupta hücre canlılığı %95,37 olarak belirlenirken 10, 15 ve 20 µM juglon uygulamaları için hücre canlılığı sırasıyla %87,58, %66,94, %61,05 olarak tespit edilmiştir.



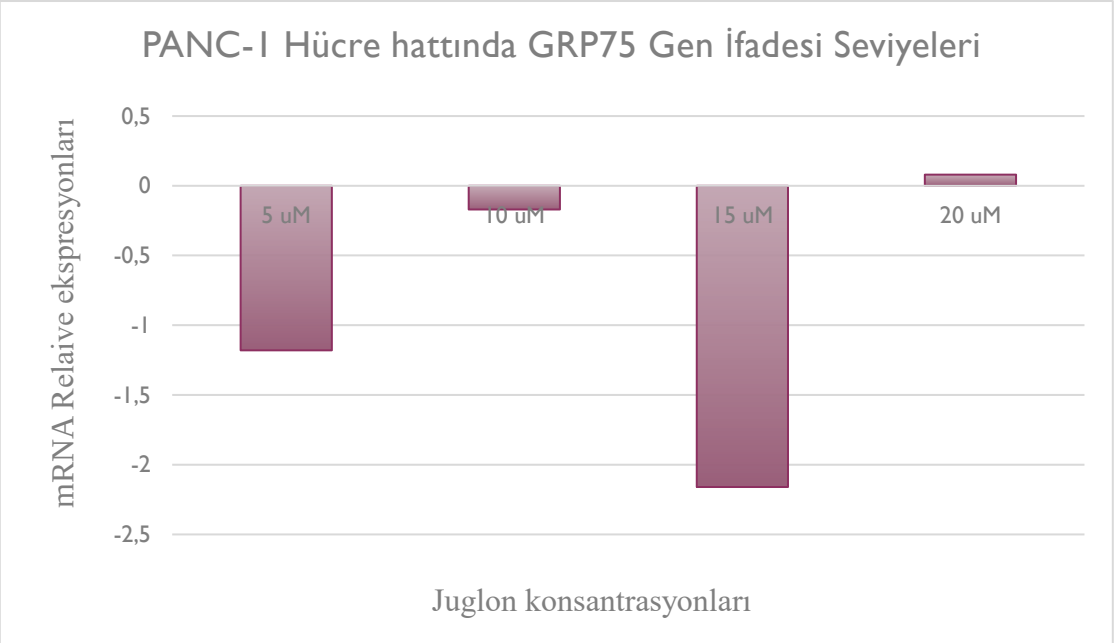
Şekil. 3.4. Uygulama dozlarının BxPC-3 hücrelerinin canlılığına etkisi

3.3. Juglonun Mitokondrial Biyogenez ve Aktivitasyonla ilgili Hedef Genler olan GRP75, TFAM ve mTOR Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi

PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarında 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 24 saat juglon uygulamasının, GRP75, TFAM ve mTOR genlerinin ifade düzeylerine etkisi Real-time PCR yöntemi ile analiz edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak, Juglon uygulanmayan kontrol hücre grubu ile farklı dozlarda juglon uyguladığımız deney grupları arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar hesaplandı. Kontrol grubuna kıyasla 2 üzeri ve altı şeklinde elde edilen artış ve azalışlar anlamlı kabul edildi.

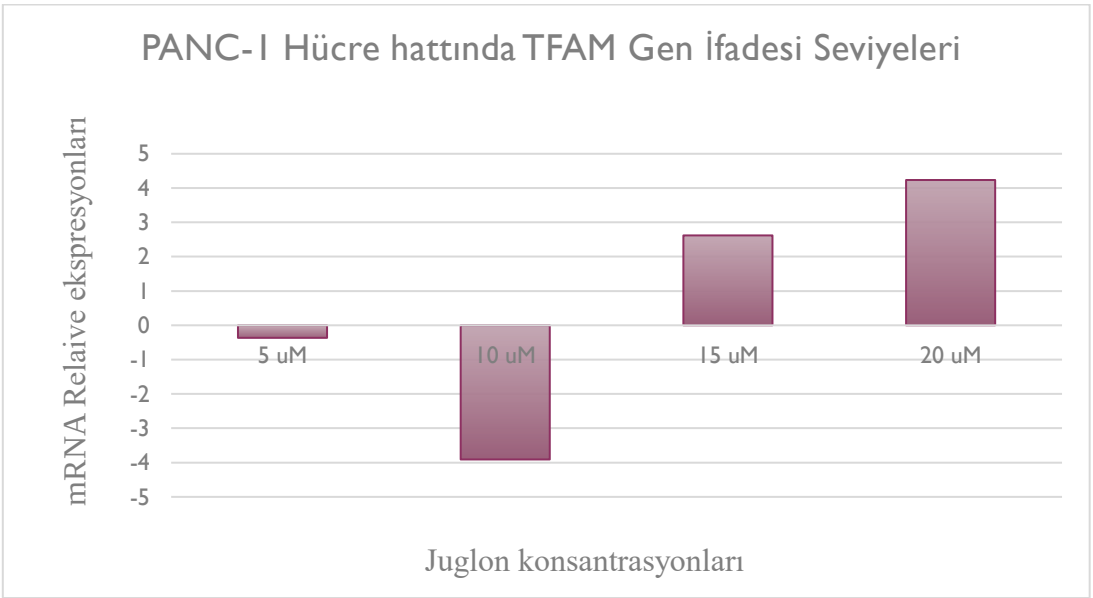
3.3.1. Juglonun PANC-1 Hücre Hattında Hedef Genlerin İfade Düzeylerine Etkisi

PANC-1 hücrelerinde GRP75 geni ifade düzeyi 24 saatlik juglon uygulaması sonrasında, kontrol grubuna göre 5 µM, 10 µM ve 15 µM'da sırasıyla 1,18 kat, 0,17 kat ve 2,16 kat azalış kaydedildi. Anlamlı azalış sadece 15µM'da tespit edildi. 20 µM juglon muamelesi sonrası ise 0,08 kat artış gözlendi (Şekil.3.5).



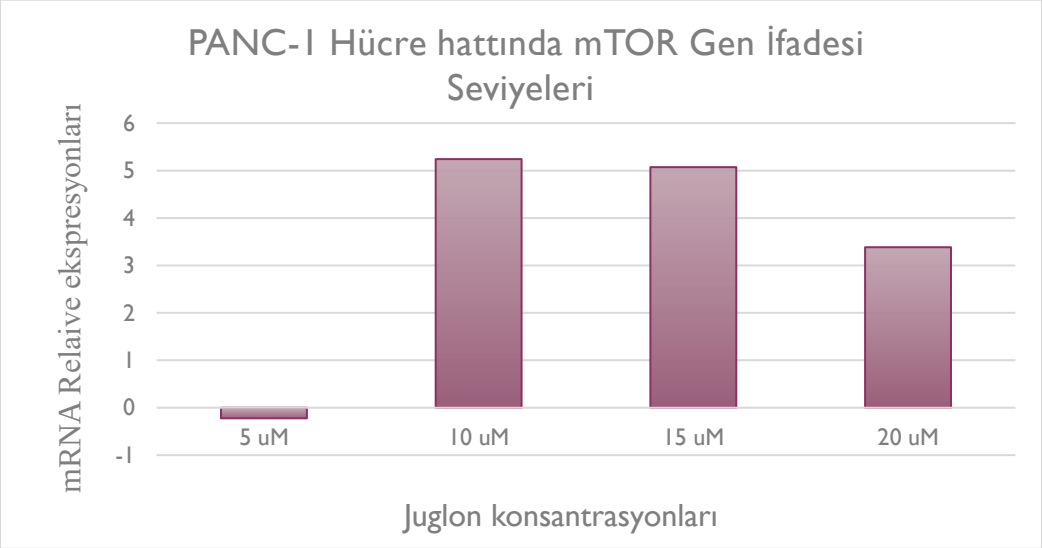
Şekil. 3.5. PANC-1 hücre hattında GRP75 gen ifade seviyeleri

PANC-1 hücre hattında 24 saatlik juglon uygulaması sonunda kontrol grubuna göre TFAM gen ifade düzeyleri, 5 µM ve 10µM juglon konsantrasyonunda sırasıyla 0,37 kat azalış ve 3,91 kat anlamlı azalış görüldü. 15 µM ve 20 µM juglon dozlarında ise sırasıyla 2,62 ve 4,23 kat anlamlı artış görüldü (Şekil 3.6.).



Şekil. 3.6. PANC-1 hücre hattında TFAM gen ifade seviyeleri

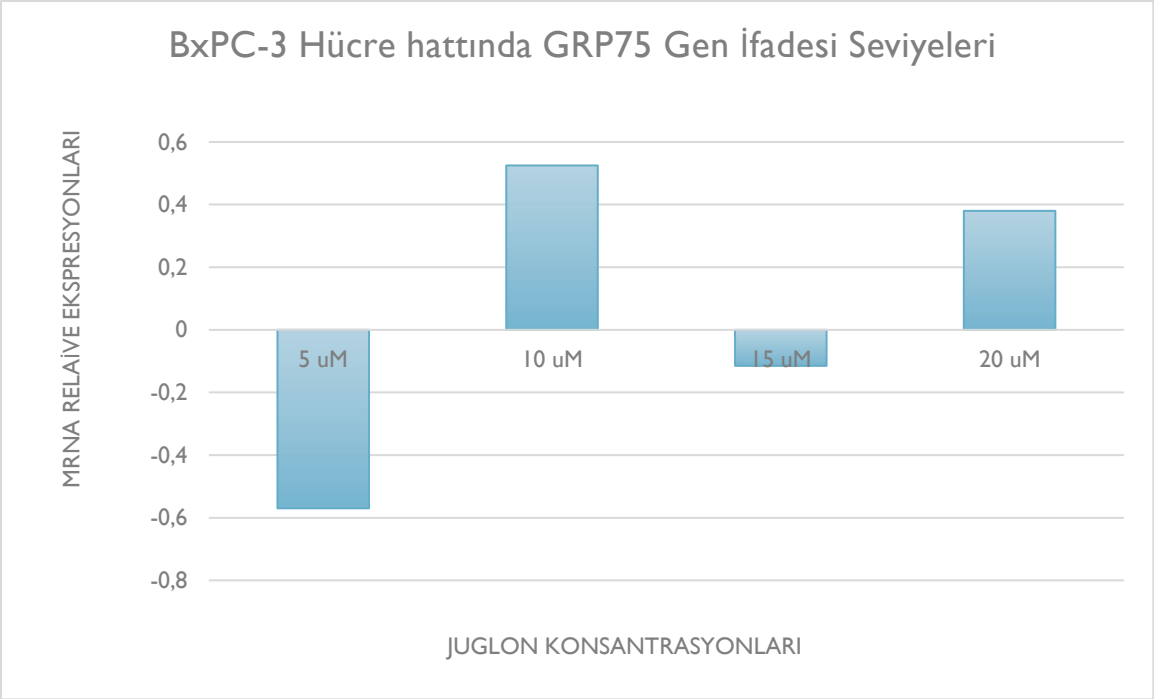
24 saatlik 5 µM juglon uygulaması sonrasında PANC-1 hücrelerinde mTOR geni ifade düzeyi kontrol grubuna göre 0,22 kat azalış gösterdi.10 µM juglon konsantrasyonunda 5,24 kat anlamlı artış, 15 µM juglon konsantrasyonunda 5,07 kat ve son uygulama dozumuz olan 20 µM juglon konsantrasyonunda ise 3,38 kat artış kaydedildi (Şekil 3.7.).



Şekil. 3.7. PANC-1 hücre hattında mTOR gen ifade seviyeleri

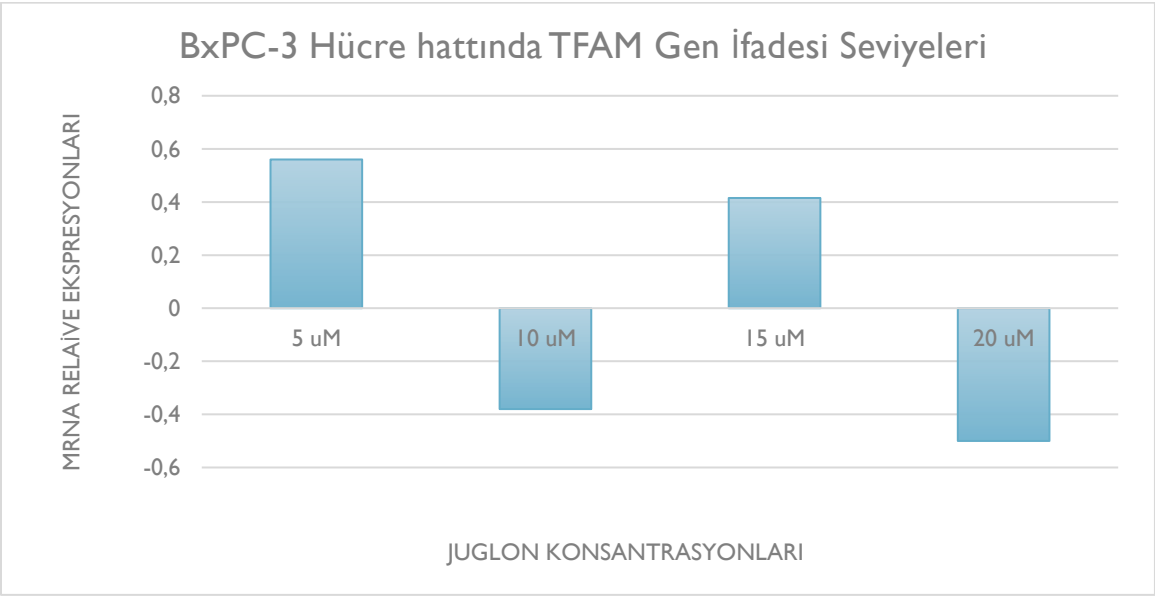
3.3.2. Juglonun BxPC-3 Hücre Hattında Hedef Genlerin İfade Düzeylerine Etkisi

BxPC-3 hücre hattında 24 saatlik juglon muamelesinin ardından hedef genlerimizden ilki olan GRP75'in kontrol grubuna göre ifade düzeyi; 5 µM ve 15µM'da sırasıyla 0,57 ve 0,11 kat azalış şeklinde, 10µM ve 20µM'da ise sırasıyla 0,52 ve 0,38 kat artış şeklinde tespit edildi (Şekil 3.8.). Değişiklikler anlamlı düzeyde değildi.



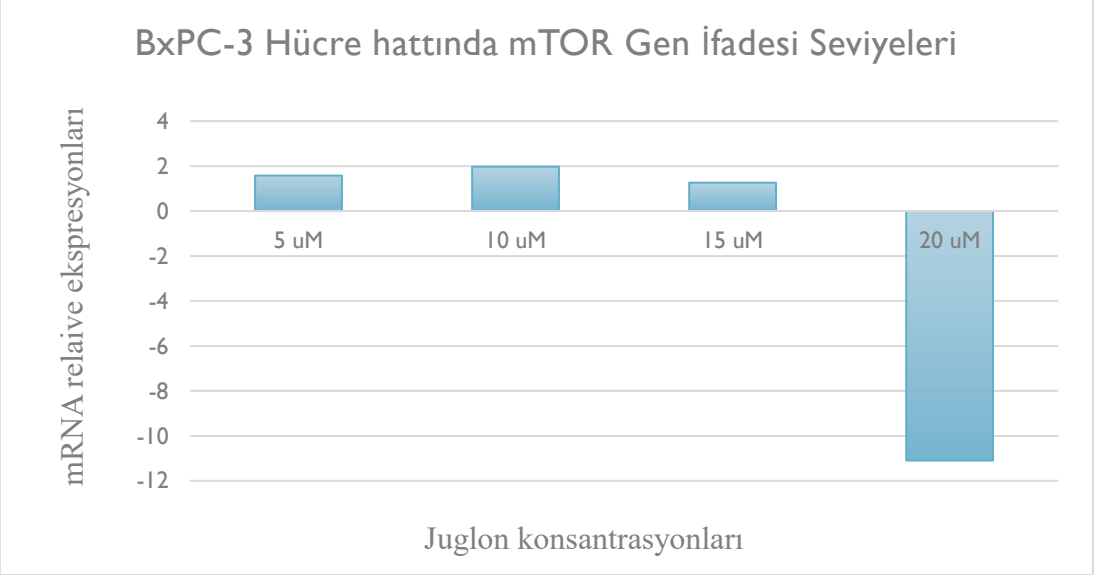
Şekil. 3.8. BxPC-3 hücre hattında GRP75 gen ifade seviyeleri

BxPC-3 Hücre hattında TFAM gen ifadesinin 24 saatlik juglon muamelesinin ardından kontrol grubuna göre değişimi, 5 µM, ve 15µM'da sırasıyla 0,56 ve 0,46 kat artış şeklide tespit edildi. 10 ve 20 µM'da ise 0,38 ve 0,5 azalış kaydedildi (Şekil 3.9). Değişimler anlamlı düzeyde değildi.



Şekil. 3.9. BxPC-3 hücre hattında TFAM gen ifade seviyeleri

24 saatlik 5 µM juglon uygulaması sonrasında BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerinde mTOR geni ifade düzeyi, kontrol grubuna göre 1,57 kat artış gösterdi. 10 µM ve 15 µM juglon uygulaması sonucunda sırasıyla 1,97 ve 1,26 kat artış gösterdi. 20 µM juglon konsantrasyonunda ise 11, 09 kat azalış kaydedildi (Şekil 3.10.).



Şekil. 3.10. BxPC-3 hücre hattında mTOR gen ifade seviyeleri

4.TARTIŞMA

Pankreas kanseri, son derece kötü prognoz gösteren en ölümcül kanserlerin başında gelmektedir. Pankreas kanserinin ortaya çıkan semptomları genellikle belirsizdir ve spesifik değildir. Hastaların çoğu ya lokal olarak ilerlemiş ve küratif tedavinin mümkün olmadığı bir safhada ya da metastatik durumda başvurur. GLOBOCAN 2020 verilerine göre pankreas kanseri en yaygın görülen kanser türleri arasında dünya çapında 14. sırada, bütün kanserler arasındaki ölüm oranı ise 7. sırada yer almaktadır. Kansere bağlı ölümlerin ilk sıralarında yer alan akciğer, kolon ve mide kanserlerinin beş yıllık sağkalımı sırasıyla %19, %65 ve %20 iken 7. sırada yer alan pankreas kanserinde bu oranın %7 olması pankreatik tümörleri en ölümcül neoplazmlardan birisi yapmaktadır (Siegel ve ark 2020).

Kanser, hala tüm dünyada sağlık ve ekonomik bakımdan büyük bir yük oluşturmaktadır. Pek çok anti-kanser ajan tanımlanmış ve kullanılıyor olmasına rağmen, anti-kanser ajanların toksik etkileri ve ilaca karşı verdiği direnç, bu anti-kanser ajanların kullanımlarına çok büyük sınırlar getirmektedir. Vakaların çoğunda, geleneksel ilaçların yan etkileri iyi klinik sonuçlara ulaşılmasını engellemektedir. Gemsitabin, 1997'den bu yana pankreas kanseri hastaları için birinci basamak terapötik bir ilaç olmuştur (Burris ve ark 1997). Bununla birlikte, geleneksel kemoterapi ve radyasyon tedavisi, 5 yıllık sağkalım oranlarında yalnızca çok küçük bir iyileşme göstermiştir (Von Hoff ve ark 2013). Modifiye FOLFIRINOX ve nab-paklitaksel artı gemsitabin, kayda değer toksisite ile nispeten düşük bir sağkalım göstermiş olmasına rağmen, genellikle en iyi adjuvan kemoterapi rejimleri olarak kabul edilir. Ayrıca, çoklu yeni hedefli tedaviler, genel sağkalımı etkin bir şekilde iyileştirmede başarısız olurken, gemsitabin ile kombine erlotinib marjinal bir klinik fayda göstermiştir (Assenat ve ark 2021). Bu nedenle, yenilikçi anti-tümör gücüne sahip yeni tedavilere ihtiyaç vardır.

Doğal ürünler, çok hedefli bir etki biçimine dönüşecek aktif moleküller içeren çeşitlendirilmiş bir bileşime sahiptir. Bitkilerin içeriğinde bulunan fitokimyasallar, nihai bir biyolojik etkiyi sağlamak için sinerjistik bir şekilde hareket edebilir. Bununla birlikte, doğal ürünler genellikle geleneksel ilaçlara kıyasla daha iyi bir toksikolojik profil ile karakterize edilir. Bu nedenle kullanımları, geleneksel anti-kanser ajanlarının etkinliğini artırmak ve aynı zamanda toksisitelerini azaltmak için tasarlanmıştır.

Juglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon) ceviz ağaçlarının taze olgun meyve kabuğunda, yapraklarında, köklerinde ve kabuğunda bulunan farmakolojik olarak aktif naftokinondur.

Juglon üzerinde yapılan önceki çalışmalar, çeşitli in vivo tümör modellerinde juglonun potansiyel anti-kanser aktivitesini kabul edilebilir şekilde ortaya koymaktadır (Bhargava ve Westfall 1968, Segura-Aguilar ve ark 1992). Buna ek olarak, güncel çalışmalarda da, juglonun çeşitli kanser hücre hatlarına karşı önemli sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Cenas ve ark 2006, Ji ve ark 2011). Juglonun sitotoksik aktivitesinin, öncelikle, hücrede apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olan değişmiş bir redoks homeostazına yol açan reaktif oksijen türlerinin indüklenmesine sebep olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Naftokinonlar gibi birçok kinoid bileşiği, redoks özellikleri ve elektrofiliklikleri nedeniyle hem farmakolojik hem de toksikolojik öneme sahiptir (Powis 1989). Yapılan çalışmalarda naftokinonların sitotoksik, anti-tümör, ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Ahmad ve Suzuki 2019). Naftokinonlar, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilen en aktif doğal ürünler arasındadır ve biyolojik aktivitelerini, hücre nükleofillerine karşı reaktivite, ROS oluşumu ve proteinlerin inhibisyonunu içeren mekanizmalar yoluyla gösterirler.

Kinonlar, çeşitli kanser türlerinde bazı anti-proliferasyon ve anti-metastaz etkileri üreten bitki kaynaklı sekonder metabolitlerdir. Birkaç anti-kanser ilacı kinon çekirdeği içerir ve kanser kemoterapisinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Kinonlar, insan kanserini tedavi etmek için en sık kullanılan ilaçlar arasındadır. Geri dönüşümlü enzimatik indirgeme ve oksidasyona uğrarlar ve semikinonlar ve oksijen radikalleri oluştururlar, böylece oksidatif stresi artırarak tümör hücrelerine zarar verirler. Kinonların anti-tümör aktivitesinin sıklıkla alkilleyici türlerin veya oksijen radikallerinin neden olduğu DNA hasarıyla da bağlantılıdır (Powis 1989). 1,4-naftokinonlar gibi doğal kinonlar, kanser hücrelerini hedeflemek için umut verici görünmektedir (Kayashima ve ark 2009). Juglonun bitki kaynağı olan juglans regia'nın anti-kanser kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark 2015). Bu nedenle, izole edilmiş aktif kimyasal bileşen olan juglon, farklı insan kanser hücre hatlarında araştırılmıştır.

Juglon, prostat kanserlerinin hem androjene bağımlı (LNCaP) hem de bağımsız (DU145) in vitro modeli çalışmasında ilginç anti-tümör potansiyeli göstermiştir (Kanaoka ve ark 2015). Juglon; LNCaP hücrelerinde, içsel yol boyunca apoptozu tetikleyerek kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonunu teşvik etmiş ve mitokondrial potansiyeli düşürmüştür (Kanaoka ve ark 2015). Dikkate değer bir durum olarak, farklı çalışma grupları tarafından, aynı hücre hattı (LNCaP) üzerinde çalışmalar yürütülmüş, ancak juglonun potansiyeli konusunda ortak bir fikre varamamışlardır. Bir çalışmada, 24 saat sonra juglon, 32.2 μM'lik bir IC_{50} değeri gösterirken (Fang ve ark 2018), aynı zamanda başka bir çalışmada (Xu ve ark 2013), 13.8

μM'lik bir IC_{50} değeri ortaya çıkaran çift etkililik elde edilmiştir. Aynı hücre hattı üzerinde yapılan üçüncü bir çalışmada yaklaşık 15 μM'lik bir IC_{50} bulunmuş, ancak 48 saatlik tedaviden sonra, tutarlılık adına birinci ve üçüncü değerlerin daha güvenilir olduğu varsayımına yol açmıştır (Catanzaro ve ark 2018).

Daha önceden çalışma grubumuzun yaptığı çalışmada ise PANC-1 ve BxPC-3 pankreas kanseri hücre hatlarında juglonun, IC_{50} değeri PANC-1 için 21,24 uM, BxPC-3 için 21,05 uM olarak tespit edilmiştir. Ve IC_{50} değeri dikkate alınarak belirlenen dozlarda juglon uygulanmasının PANC-1 ve BxPC-3 hücre hatlarında pankreatik hücrelerin adezyon özelliklerini azalttığı ve hücre invazyonlarını PANC-1 için ise %80 ve BxPC-3 için %56 oranında baskıladığı ortaya konmuştur. Ayrıca yine önceki çalışmamızda invazyon, anjiogenez ve migrasyon belirteçlerinden MMP-9, VEGF ve Phactr-1'in ifade seviyelerinin de önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Avcı ve ark 2016).

Juglon, farklı meme kanseri modellerinde de anti-kanser etkiler göstermiştir. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada (Sajadimajd ve ark 2016) askorbat ile birlikte uygulandığında juglonun hücrelerde artan ROS seviyeleri ile ilişkili olduğunu, ROS'un yönlendirdiği apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. MCF-7 üzerine yapılmış bir diğer çalışmada ise; juglonun, hücre içi Ca^{+2} seviyelerini ve Bax/Bcl2 oranını arttırarak, mitokondrial membran potansiyelinin ($\Delta\Psi$) bozulmasını, sitokrom c salınımını ve kaspaz 3 aktivasyonunu arttırdığını kanıtlayarak apoptotik yolun aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Ji ve ark 2016). Fareler üzerinde yapılmış bir başka ilginç çalışma, juglon sitotoksisitesinin en azından kısmen DNA hasarına atfedildiğini gösterdi (Ourique ve ark 2015).

Juglon, kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen ve yağda çözünen bir molekül olduğundan glioblastomalar üzerindeki anti-tümör aktivitesi de araştırılmıştır. Glioma, beynin veya omurganın glial hücrelerinde başlayan bir tümör türüdür. Mevcut veriler, peptidil-prolil cis/trans izomeraz Pin1'in insan glioblastoma multiforme numunelerinde aşırı eksprese edildiğini gösterir. Bir Pin1 inhibitörü olan juglonun, U251 glioma hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli tümör hücrelerinde güçlü anti-kanser aktivite gösterdiği ve anjiyogenezi bozduğu rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Wang ve ark 2017). Juglonun ayrıca merkezi sinir sisteminin en yaygın ve ölümcül tümörlerini temsil eden C6 glioblastoma multiforme hücrelerinde kanser hücresi ölümünü destekleme yeteneğinde olduğunu, solunum kompleksi I ile etkileşim yoluyla ROS üreterek glioma C6 hücrelerinde anti-kanser etkiler sergilediği de gösterilmiştir (Meskelevicius ve ark 2016, Sidlauskas ve ark 2017).

Juglon, insan rahim ağzı kanseri üzerinde de ilginç etkiler göstermiştir (Zhang ve ark 2012, Lu ve ark 2017). Juglonun rahim ağzı kanseri hücrelerinde JNK/c-Jun pro-apoptotik yolu aktive ederek ve aşağı akış mitokondrial yol ve ölüm reseptörü yolunda apoptotik moleküllerin ekspresyonunu arttırarak apoptozu önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir (Lu ve ark 2017). Bir başka çalışmada ise juglonun, HeLa hücrelerinde Bcl-2'nin ifadesini kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde aşağı regüle ederken, Bax'ın ifadesi önemli ölçüde yukarı regüle ederek apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Zhang ve ark 2012).

Juglon, insan kolon karsinomundan türetilen HCT-15 hücreleri gibi kültürlenmiş malign hücreler üzerindeki büyümeyi inhibe edici etkileri açısından incelenmiştir ve temel olarak hücre döngüsünün S fazını bloke ettiği gösterilmiştir (Kamei ve ark 1998). Mitokondriye bağımlı apoptoz yolları ve yüksek Bax/Bcl-2 oranı yoluyla HL-60 insan lösemi hücrelerinde (Xu ve ark 2010), SGC-7901 insan mide kanseri hücrelerinde (Ji ve ark 2011) ve SKOV3 yumurtalık kanseri hücrelerinde (Fang ve ark 2015) apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Mitokondri sadece hücrenin güç merkezi değildir, aynı zamanda çoğalan hücrelerin metabolizmasında da kritik bir rol oynar. Hücre büyümesi ve bölünmesindeki bu bilinen işlevlere rağmen, mitokondrinin karsinojenezdeki rolü, "Warburg hipotezi" nedeniyle uzun yıllardır büyük ölçüde göz ardı edilmiştir. Bu hipoteze göre; kanser hücreleri yüksek oksijen seviyelerinde bile anaeorobik solunum yapar ve bunun nedeni olarak da kanser hücrelerindeki mitokondrial defektler olduğu düşünülmektedir. Ancak yapılan son araştırmalar, bütün kanserler olmasa da, çoğu kanser hücresinin glikolitik yolu tercih ettiğini fakat bu durumun mitokondrial biyoenerjideki kusurlarla ilişkili olmadığını kanıtlamıştır. Hatta mitokondrilerin birçok kanser hücresinde işlevsel olduğu ve glikoliz ile birlikte hücre proliferasyonunu sürdürmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Koppenol ve ark 2011).

İnsan meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada kanser hücrelerinde mitokondrial biyogenezi indükleyen bazı moleküller incelenmiş ve bu moleküllerin tümör büyümesini desteklediği gösterilmiştir (Salem ve ark 2012). Artan mitokondrial biyogenezin, kanser hücrelerinde bir "onkojen" veya tümör promotörü olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. (Salem ve ark 2012).

Mitokondrial enerji metabolizmasının hedeflenmesi son zamanlarda kanser tedavisinin potansiyel bir odak noktası karşımıza çıkmaktadır. Mitokondrial enerji metabolizmasının pankreas kanseri hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalmasındaki rolü ve potansiyel

mekanizmalar henüz belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle çalışmamızda pankreas kanseri hücrelerinde juglon uygulamalarının mitokondrial biyogenez ve aktivitasyonla ilgili anahtar genler olan GRP75, TFAM ve mTOR, ifadeleri üzerindeki etkilerini araştırmayı hedefledik.

GRP75 ekspresyon düzeylerine bakıldığında; PANC-1 hücre hattında 15 µM doz juglon uygulamasından sonra GRP75 ifade seviyesinde 2.16 kat anlamlı düşüş olduğu aşağı yönde bir regülasyon olduğu gözlenmiştir. BxPC-3 hücre hattına bakıldığında ise tüm dozlarda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. GRP75'in özellikle mitokondri-ER arayüzünde mekanik ve fizyolojik etkileşimde anahtar işlevinin olması mitokondri aktivasyonunda rol oynadığını düşündürmekle birlikte, sonuçlarımızın sadece PANC-1 hücrelerinde 15 µM doz juglon uygulamasında anlamlı düşüşe neden olması juglonun bu gen ifadesi üzerinde çok etkili olmadığını düşündürmüştür. Literatüre bakıldığında GRP75 geni ile ilgili yeterli bir çalışma olmamakla beraber, kanserde GRP75 seviyelerinin yükseldiği görülmüştür (Srokowski ve ark 2004). Literatürde pankreas kanserinde GRP75 geni spesifik olarak değerlendirilmemiştir. Fakat mesane kanseriyle ilgili T24 hücre hattına yapılmış olan bir çalışmada, doğal bir karotenoid olan fukoksantinin 40 uM konsantrasyonda, sitoplazmadan nükleer translokasyona p53 salan GRP75'in aşağı regülasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wang ve ark 2014).

TFAM, HMG proteininin bir süper ailesine aittir. mtDNA için bir transkripsiyon faktörü olarak da bilinen TFAM, çok işlevli bir proteindir. TFAM mtDNA'nın nükleoid benzeri yapıya paketlenmesinde rol oynamasının yanı sıra mtDNA replikasyonunda ve mtDNA'da oluşan hasarların onarımında işlev görmektedir (Kang ve Hamasaki 2005). Yapılan bir çalışmada; TFAM'ın KB insan epidermoid kanser hücrelerinde ifadesinin yukarı regülasyonu ve hasar tanıma aktivitesindeki değişiklik, sisplatin kaynaklı apoptozdan kaçınarak hücrelerin kanserleşme sürecine katkı sağladığı gösterilmiştir (Yoshida ve ark 2003). Akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan bir başka çalışmada ise, TFAM'ın aşağı regülasyonunun G1 fazında hücre döngüsü durmasına neden olduğunu ve ROS'un indüklediği c-Jun amino-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu yoluyla hücre büyümesi ve göçünü önemli ölçüde durdurduğu rapor edilmiştir (Xie ve ark 2016). Pankreas adenokarsinomu geliştirmiş hastalardan alınan örneklerle yapılmış bir çalışmada ise TFAM ekspresyonu, apoptozun inhibisyonu yoluyla PDAK'ın ilerlemesine izin vererek PDAK'lı hastaların klinik seyrini kötüleştirdiği rapor edilmiştir. Mitokondrial transkripsiyon faktörü A, pankreatektomi sonrası PDAK'lı hastalarda kötü prognoz için bağımsız bir belirteç olarak değerlendirilmiştir (Yamauchi ve ark 2014). Bahsedilen çalışmalar doğrultusunda TFAM geninin yüksek

ifadesinin kanser gelişimine katkıda bulunarak, hücre proliferasyonunu arttığı, TFAM gen ifadesinin azalmasıyla ile de kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı yorumunda bulunulabilir. Çalışmamızda TFAM ifade seviyelerine baktığımızda, literatürle uyumlu olarak PANC-1 hücre hattında 10 µM da 3,91 kat azalış gözlenirken, 15 µM ve 20 µM juglon uygulamalarında 2,62 ve 4,23 kat artış tespit edilmiştir. Sonucun farklı yönlerde çıkması doza göre farklı yanıt oluşumuna yol açtığını göstermektedir. 15 ve 20 µM dozlardaki artış mitokondri aktivasyonunun artışını güçlendirerek farklı mekanizmaları etkileyebileceğini düşündürmektedir. Kanserde artmış ROS düzeyini daha da artırarak hücrenin apoptoza gidişinin indüklenmesi gibi TFAM ifadesinin de daha da artırılarak mitokondriyi zorlamak belki de mitofajiyi uyararak antikanser etki gösterebileceği düşünülmektedir. Ancak bu durumun daha detaylı araştırılmasına ve sadece mRNA düzeyinde değil protein düzeyinde de incelenmesine ihtiyaç vardır. BxPC-3 hücre hattında ise TFAM gen ifade düzeyleri üzerine juglonun herhangi bir anlamlı etkisi tespit edilmemiştir.

mTOR, fosfatidilinositol kinaz ile ilişkili protein kinazlar familyasına ait, oldukça korunmuş bir serin-treonin kinazdır (Zoncu ve ark 2011). mTOR; hücresel homeostazda merkezi bir rol oynar ve hücre büyümesi, hayatta kalması ve metabolizması dahil olmak üzere bir dizi hücresel olayda rol oynar. Artan sayıda kanıtlar, mTOR sinyalinin aktivasyonunu insan kanserlerinde yaygın bir olay olarak tanımlamaktadır (Laplante ve Sabatini 2009). Ayrıca, mTOR, neoplastik hastalıkla güçlü bir şekilde bağlantılı olan PI3K/AKT yolu ile yakından iç içedir (Laplante ve Sabatini 2009). Bu özellikler, mTOR'u moleküler hedefli tedavilerin geliştirilmesi için çekici bir seçenek haline getirmiştir. Çalışmamızda PANC-1 hücrelerine juglon 10, 15 ve 20 µM uygulamalarından sonra mTOR gen ifadelerinde sırasıyla 5,24, 5,07 ve 3,38 kat artış tespit edilirken, BxPC-3 hücre hattında sadece 20 µM juglon uygulamasının 11 kat gibi çok keskin bir azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Bu durum her iki hücre hattının farklı kökenlerden kaynaklanması, dolayısıyla her iki hücrede sürücü mutasyonların farklı olmasından kaynaklı farklı moleküler mekanizmaların olduğunu ve uygulamaya verdikleri hücresel yanıtların farklı yollarla olduğunu göstermektedir.

Literatürde PANC-1 hücrelerine uygulanan doğal bir flavonoid olan fisetinin hücre proliferasyonunu azalttığını ancak AMPK/mTOR sinyal yolunun fisetin uygulamasından sonra aktivasyonunun arttığının gözlenmesi de PANC-1 hücrelerinde elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir (Jia ve ark 2019).

Literatürdeki çalışmaların çoğunluğu, mTOR inhibisyonunun kanser metabolizmasını hedeflemede terapötik bir strateji olarak öngörmektedir. Buna karşılık yapılan bazı

çalışmalarda, mTOR'un bir yandan kanserde kemoterapiye ve hedeflenen ilaçlara karşı direnci tetikleyen, ancak diğer andan metabolik savunmasızlığı tetikleyen iki ucu keskin kılıç olarak tanımlamaktadır (Gremke ve ark 2020). mTOR'un yüksek ifadesinin kanser hücrelerinde oluşturduğu metabolik güvenlik açığının hedeflenmesi halinde, kanser hücrelerinin etkili bir şekilde tedavi edilebileceği düşünülmektedir (Gremke ve ark 2020). Çalışmamızda PANC-1 hücrelerinde juglonun mTOR gen ifadesini daha da artırarak bu metabolik açığı hedeflemiş olabileceğini öngörmekteyiz.

Diğer taraftan çalışmamızda, BxPC-3 hücrelerinde ise 20 μM juglon uygulaması sonrasında mTOR ifadesinin yaklaşık 11 kat azalması dikkat çekicidir. Her iki hücre hattında da juglonun güçlü ancak zıt yönde etki göstermesi durumu, ilaç geliştirme ve tedavi yaklaşımlarında kanser hücresinin moleküler kimliği ve tipinin oldukça önemli olduğu gerçeğini desteklemektedir. Ancak bu durumun daha kapsamlı çalışmalar ile araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışma sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde juglonun her iki hücre hattında da GRP75 gen ifadesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı, ancak mTOR ve TFAM gen ifadeleri üzerine özellikle PANC-1 hücrelerinde önemli düzeyde etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bu etkilerini de gen ifadelerini yukarı yönde regüle ederek gösterdikleri ortaya konmuştur. Ancak ilginç olarak PANC-1 hücrelerindeki mTOR gen ifadesindeki güçlü artışın aksine, BxPC-3 hücrelerinde juglonun 20 μM konsantrasyonda mTOR gen ifadesini çarpıcı şekilde azalttığını göstermiştir. Ayrıca juglon uygulamasına yanıt olarak özellikle PANC-1 hücrelerinde mTOR ve TFAM gen ifade düzeylerindeki artışın her iki hücre hattında da benzerlik göstermesi TFAM'ın mTOR'un aşağı yönde kilit efektörlerinden olabileceğini düşündürmektedir.

Geleneksel anti-kanser ajanların sitotoksik aktivitesini güçlendirmek ve toksisitelerini azaltmak için onkolojik alanda sıklıkla doğal ürünler önerilmektedir. Juglonun anti-tümör potansiyelinin kendine özgü kimyasal bileşiminde sağlam bir temel bulduğu kesindir, ancak bu potansiyelden yararlanmanın en iyi yaklaşımını belirlemek ve etkinliğini doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamız juglonun pankreas kanseri üzerinde etkisini gösteren önceki çalışmalarımızı desteklemektedir. Juglonun her iki hücre hattında da özellikle mTOR gen ifadesi üzerine önemli etkilerinin olduğu ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; ikincil bir metabolit naftakinon bileşiği olarak bilinen juglonun PANC-1 ve BxPC-3 insan pankreas kanseri hücre hatlarında mitokondrial aktivasyon ve biyogenez ile ilgili genlerden GRP75, TFAM, mTOR genlerinin ifade seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarımız juglonun özellikle mTOR ifadesi üzerinde her iki hücre hattında da zıt ama güçlü etkisinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Juglonun farklı kökenden gelen her iki hücre hattındaki bu çok farklı etkisi iki farklı kanser hücre hattında kanser gelişimi sürecinde farklı moleküler mekanizmaların ve oyuncularının etkin olduğunu ve tedaviye yanıtlarının da çok farklı yollar üzerinden olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda juglonun, mitokondrial aktivasyonun anahtar molekülü, TFAM üzerindeki etkilerinin de mTOR ifadesindeki değişikliklerle benzer yönde olması TFAM'ın mTOR'un aşağı yönde efektörü olabileceği göstermiştir.

Çalışmamız juglonun pankreas kanseri hücrelerinde mitokondrial biyogenez ve aktivasyonuna yönelik etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışma bulgularımızın ışığında mitokondrial biyogenez ve aktivasyon sürecinin diğer önemli belirteçlerinin ve mTOR proteinlerinin merkezinde yer aldığı mTORC1 ve mTORC2 komplekslerinin efektörlerinin gen ve protein düzeyinde araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Ayrıca, juglonun mitokondrial ve aktivasyon üzerindeki etki mekanizmalarının araştırılmasının yanı sıra juglonun yüksek toksik özelliğe ve düşük çözünürlüğe sahip olması nedeniyle yeni uygulama yaklaşımlarının da geliştirilerek biyoyararlanımının artırılmasına yönelik çalışmalar kuşkusuz son derece önemli olacaktır.

6. KAYNAKÇA

Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ, 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. Journal of pineal research, 30, 2, 65-74.

Ahmad T, Suzuki YJ, 2019. Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. Antioxidants (Basel), 8, 4.

Ahmad T, Suzuki YJ, 2019. Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. Antioxidants, 8, 4, 91.

Ahn SY, Choi Y-S, Koo H-J, Jeong JH, Park WH, Kim M, Piao Y, Pak YK, 2010. Mitochondrial dysfunction enhances the migration of vascular smooth muscles cells via suppression of Akt phosphorylation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1800, 3, 275-81.

Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D, 2003. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. Nucleic Acids Research, 31, 6, 1640-5.

Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM, 2020. HSP70 multi-functionality in cancer. Cells, 9, 3, 587.

Altman BJ, Stine ZE, Dang CV, 2016. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. Nat Rev Cancer, 16, 10, 619-34.

Alvarez Fallas ME, Pedraza-Arevalo S, Cujba AM, Manea T, Lambert C, Morrugares R, Sancho R, 2021. Stem/progenitor cells in normal physiology and disease of the pancreas. Mol Cell Endocrinol, 538, 111459.

Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G, 2014. Serine and glycine metabolism in cancer. Trends Biochem Sci, 39, 4, 191-8.

Anderson GR, Wardell SE, Cakir M, Yip C, Ahn Y-r, Ali M, Yllanes AP, Chao CA, McDonnell DP, Wood KC, 2018. Dysregulation of mitochondrial dynamics proteins are a targetable feature of human tumors. Nature Communications, 9, 1, 1677.

Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren P-O, Boehm BO, 2015. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. Diabetologia, 58, 10, 2218-28.

Arsham AM, Howell JJ, Simon MC, 2003. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. Journal of Biological Chemistry, 278, 32, 29655-60.

Assenat E, Mineur L, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Lombard-Bohas C, Samalin E, Portales F, Walter T, de Forges H, Dupuy M, 2021. Phase II study evaluating the association of gemcitabine, trastuzumab and erlotinib as first-line treatment in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma (GATE 1). International Journal of Cancer, 148, 3, 682-91.

Avcı E, Arıkoğlu H, Erkoç Kaya D, 2016. Investigation of juglone effects on metastasis and angiogenesis in pancreatic cancer cells. Gene, 588, 1, 74-8.

Badrinath N, Yoo SY, 2018. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. Carcinogenesis, 39, 12, 1419-30.

Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, Miller DK, Christ AN, Bruxner TJ, Quinn MC, Nourse C, Murtaugh LC, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourbakhsh E, Wani S, Fink L, Holmes O, Chin V, Anderson MJ, Kazakoff S, Leonard C, Newell F, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wilson PJ, Cloonan N, Kassahn KS, Taylor D, Quek K, Robertson A, Pantano L, Mincarelli L, Sanchez LN, Evers L, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Jones MD, Colvin EK, Nagrial AM, Humphrey ES, Chantrill LA, Mawson A, Humphris J, Chou A, Pajic M, Scarlett CJ, Pinho AV, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra JS, Kench JG, Lovell JA, Merrett ND, Toon CW, Epari K, Nguyen NQ,

Barbour A, Zeps N, Moran-Jones K, Jamieson NB, Graham JS, Duthie F, Oien K, Hair J, Grützmann R, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Corbo V, Bassi C, Rusev B, Capelli P, Salvia R, Tortora G, Mukhopadhyay D, Petersen GM, Munzy DM, Fisher WE, Karim SA, Eshleman JR, Hruban RH, Pilarsky C, Morton JP, Sansom OJ, Scarpa A, Musgrove EA, Bailey UM, Hofmann O, Sutherland RL, Wheeler DA, Gill AJ, Gibbs RA, Pearson JV, Waddell N, Biankin AV, Grimmond SM, 2016. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. Nature, 531, 7592, 47-52.

Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL, 2014. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. World J Gastroenterol, 20, 32, 11182-98.

Bernardini JP, Lazarou M, Dewson G, 2017. Parkin and mitophagy in cancer. Oncogene, 36, 10, 1315-27.

Bhargava UC, Westfall BA, 1968. Antitumor activity of Juglans niga (black walnut) extractives. J Pharm Sci, 57, 10, 1674-7.

Bhargava UC, Westfall BA, 1968. Antitumor activity of Juglans nigra (black walnut) extractives. Journal of Pharmaceutical Sciences, 57, 10, 1674-7.

Bhattacharyya T, Karnezis AN, Murphy SP, Hoang T, Freeman BC, Phillips B, Morimoto RI, 1995. Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. J Biol Chem, 270, 4, 1705-10.

Bini L, Magi B, Marzocchi B, Arcuri F, Tripodi S, Cintorino M, Sanchez JC, Frutiger S, Hughes G, Pallini V, 1997. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. Electrophoresis, 18, 15, 2832-41.

Bittremieux M, Parys JB, Pinton P, Bultynck G, 2016. ER functions of oncogenes and tumor suppressors: Modulators of intracellular Ca2+ signaling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1863, 6, 1364-78.

Blanc JF, Lalanne C, Plomion C, Schmitter JM, Bathany K, Gion JM, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Bonneu M, Rosenbaum J, 2005. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatocellular carcinoma developed in patients with chronic viral hepatitis C. Proteomics, 5, 14, 3778-89.

Bogenhagen DF, 2012. Mitochondrial DNA nucleoid structure. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1819, 9-10, 914-20.

Brotherton L, Welton M, Robb SW, 2016. Racial disparities of pancreatic cancer in Georgia: a county-wide comparison of incidence and mortality across the state, 2000-2011. Cancer Med, 5, 1, 100-10.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME, 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. cell, 96, 6, 857-68.

Burris Hr, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Christine Cripps M, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. Journal of clinical oncology, 15, 6, 2403-13.

Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P, 2015. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurol, 11, 1, 11-24.

Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, DeBerardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, Thompson CB, 2005. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid β-oxidation. Oncogene, 24, 26, 4165-73.

Cai J, Chen H, Lu M, Zhang Y, Lu B, You L, Zhang T, Dai M, Zhao Y, 2021. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. Cancer Letters, 520, 1-11.

Caldas C, Kern SE, 1995. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. Int J Pancreatol, 18, 1, 1-6.

Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA, 2012. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 1819, 9, 921-9.

Campbell PJ, Getz G, Korbel JO, Stuart JM, Jennings JL, Stein LD, Perry MD, Nahal-Bose HK, Ouellette BFF, Li CH, Rheinbay E, Nielsen GP, Sgroi DC, Wu C-L, Faquin WC, Deshpande V, Boutros PC, Lazar AJ, Hoadley KA, Louis DN, Dursi LJ, Yung CK, Bailey MH, Saksena G, Raine KM, Buchhalter I, Kleinheinz K, Schlesner M, Zhang J, Wang W, Wheeler DA, Ding L, Simpson JT, O'Connor BD, Yakneen S, Ellrott K, Miyoshi N, Butler AP, Royo R, Shorser SI, Vazquez M, Rausch T, Tiao G, Waszak SM, Rodriguez-Martin B, Shringarpure S, Wu D-Y, Demidov GM, Delaneau O, Hayashi S, Imoto S, Habermann N, Segre AV, Garrison E, Cafferkey A, Alvarez EG, Heredia-Genestar JM, Muyas F, Drechsel O, Bruzos AL, Temes J, Zamora J, Baez-Ortega A, Kim H-L, Mashl RJ, Ye K, DiBiase A, Huang K-l, Letunic I, McLellan MD, Newhouse SJ, Shmaya T, Kumar S, Wedge DC, Wright MH, Yellapantula VD, Gerstein M, Khurana E, Marques-Bonet T, Navarro A, Bustamante CD, Siebert R, Nakagawa H, Easton DF, Ossowski S, Tubio JMC, De La Vega FM, Estivill X, Yuen D, Mihaiescu GL, Omberg L, Ferretti V, Sabarinathan R, Pich O, Gonzalez-Perez A, Taylor-Weiner A, Fittall MW, Demeulemeester J, Tarabichi M, Roberts ND, Van Loo P, Cortés-Ciriano I, Urban L, Park P, Zhu B, Pitkänen E, Li Y, Saini N, Klimczak LJ, Weischenfeldt J, Sidiropoulos N, Alexandrov LB, Rabionet R, Escaramis G, Bosio M, Holik AZ, Susak H, Prasad A, Erkek S, Calabrese C, Raeder B, Harrington E, Mayes S, Turner D, Juul S, Roberts SA, Song L, Koster R, Mirabello L, Hua X, Tanskanen TJ, Tojo M, Chen J, Aaltonen LA, Rätsch G, Schwarz RF, Butte AJ, Brazma A, Chanock SJ, Chatterjee N, Stegle O, Harismendy O, Bova GS, Gordenin DA, Haan D, Sieverling L, Feuerbach L, Chalmers D, Joly Y, Knoppers B, Molnár-Gábor F, Phillips M, Thorogood A, Townend D, Goldman M, Fonseca NA, Xiang Q, Craft B, Piñeiro-Yáñez E, Muñoz A, Petryszak R, Füllgrabe A, Al-Shahrour F, Keays M, Haussler D, Weinstein J, Huber W, Valencia A, Papatheodorou I, Zhu J, Fan Y, Torrents D, Bieg M, Chen K, Chong Z, Cibulskis K, Eils R, Fulton RS, Gelpi JL, Gonzalez S, Gut IG, Hach F, Heinold M, Hu T, Huang V, Hutter B, Jäger N, Jung J, Kumar Y, Lalansingh C, Leshchiner I, Livitz D, Ma EZ, Maruvka YE, Milovanovic A, Nielsen MM, Paramasivam N, Pedersen JS, Puiggròs M, Sahinalp SC, Sarrafi I, Stewart C, Stobbe MD, Wala JA, Wang J, Wendl M, Werner J, Wu Z, Xue H, Yamaguchi TN, Yellapantula V, Davis-Dusenbery BN, Grossman RL, Kim Y, Heinold MC, Hinton J, Jones DR, Menzies A, Stebbings L, Hess JM, Rosenberg M, Dunford AJ, Gupta M, Imielinski M, Meyerson M, Beroukhim R, Reimand J, Dhingra P, Favero F, Dentro S, Wintersinger J, Rudneva V, Park JW, Hong EP, Heo SG, Kahles A, Lehmann K-V, Soulette CM, Shiraishi Y, Liu F, He Y, Demircioğlu D, Davidson NR, Greger L, Li S, Liu D, Stark SG, Zhang F, Amin SB, Bailey P, Chateigner A, Frenkel-Morgenstern M, Hou Y, Huska MR, Kilpinen H, Lamaze FC, Li C, Li X, Li X, Liu X, Marin MG, Markowski J, Nandi T, Ojesina AI, Pan-Hammarström Q, Park PJ, Pedamallu CS, Su H, Tan P, Teh BT, Wang J, Xiong H, Ye C, Yung C, Zhang X, Zheng L, Zhu S, Awadalla P, Creighton CJ, Wu K, Yang H, Göke J, Zhang Z, Brooks AN, Fittall MW, Martincorena I, Rubio-Perez C, Juul M, Schumacher S, Shapira O, Tamborero D, Mularoni L, Hornshøj H, Deu-Pons J, Muiños F, Bertl J, Guo Q, Gonzalez-Perez A, Xiang Q, The ITP-CAoWGC, 2020. Pan-cancer analysis of whole genomes. Nature, 578, 7793, 82-93.

Cardanho-Ramos C, Morais VA, 2021. Mitochondrial Biogenesis in Neurons: How and Where. Int J Mol Sci, 22, 23.

Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB, 2015. Intracellular α-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. Nature, 518, 7539, 413-6.

Carreras-Torres R, Johansson M, Gaborieau V, Haycock PC, Wade KH, Relton CL, Martin RM, Davey Smith G, Brennan P, 2017. The Role of Obesity, Type 2 Diabetes, and Metabolic Factors in Pancreatic Cancer: A Mendelian Randomization Study. J Natl Cancer Inst, 109, 9.

Carroll WL, Evensen NA, 2019. Targeting a major hub of cell fate decisions - the mitochondrial-associated membrane. Haematologica, 104, 3, 419-21.

Catanzaro E, Greco G, Potenza L, Calcabrini C, Fimognari C, 2018. Natural Products to Fight Cancer: A Focus on Juglans regia. Toxins (Basel), 10, 11.

Cenas N, Prast S, Nivinskas H, Sarlauskas J, Arnér ES, 2006. Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells. Journal of biological chemistry, 281, 9, 5593-603.

Cenas N, Prast S, Nivinskas H, Sarlauskas J, Arnér ES, 2006. Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells. J Biol Chem, 281, 9, 5593-603.

Chan DC, 2012. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. Annual review of genetics, 46, 265-87.

Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Timmons LJ, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM, 2008. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. Gastroenterology, 134, 1, 95-101.

Chattopadhyay E, Roy B, 2017. Altered Mitochondrial Signalling and Metabolism in Cancer. Front Oncol, 7, 43.

Chen G, Kroemer G, Kepp O, 2020. Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. Front Cell Dev Biol, 8, 200.

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC, 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. J Cell Biol, 160, 2, 189-200.

Chew K, Zhao L, 2021. Interactions of Mitochondrial Transcription Factor A with DNA Damage: Mechanistic Insights and Functional Implications. Genes, 12, 8, 1246.

Choi Y-S, Hong J-M, Lim S, Ko KS, Pak YK, 2006. Impaired coactivator activity of the Gly482 variant of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α (PGC-1α) on mitochondrial transcription factor A (Tfam) promoter. Biochemical and biophysical research communications, 344, 3, 708-12.

Chung KM, Singh J, Lawres L, Dorans KJ, Garcia C, Burkhardt DB, Robbins R, Bhutkar A, Cardone R, Zhao X, Babic A, Vayrynen SA, Dias Costa A, Nowak JA, Chang DT, Dunne RF, Hezel AF, Koong AC, Wilhelm JJ, Bellin MD, Nylander V, Gloyn AL, McCarthy MI, Kibbey RG, Krishnaswamy S, Wolpin BM, Jacks T, Fuchs CS, Muzumdar MD, 2020. Endocrine-Exocrine Signaling Drives Obesity-Associated Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cell, 181, 4, 832-47.e18.

Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L, 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 45, 15927-32.

Conciatori F, Ciuffreda L, Bazzichetto C, Falcone I, Pilotto S, Bria E, Cognetti F, Milella M, 2018. mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy. Cancers (Basel), 10, 1.

Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, Choné L, Francois E, Artru P, Biagi JJ, Lecomte T, Assenat E, Faroux R, Ychou M, Volet J, Sauvanet A, Breysacher G, Di Fiore F, Cripps C, Kavan P, Texereau P, Bouhier-Leporrier K, Khemissa-Akouz F, Legoux JL, Juzyna B, Gourgou S, O'Callaghan CJ, Jouffroy-Zeller C, Rat P, Malka D, Castan F, Bachet JB, 2018.

FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. N Engl J Med, 379, 25, 2395-406.

Copp J, Manning G, Hunter T, 2009. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. Cancer research, 69, 5, 1821-7.

D'Eletto M, Rossin F, Occhigrossi L, Farrace MG, Faccenda D, Desai R, Marchi S, Refolo G, Falasca L, Antonioli M, 2018. Transglutaminase type 2 regulates ER-mitochondria contact sites by interacting with GRP75. Cell reports, 25, 13, 3573-81. e4.

Dai Y, Li F, Jiao Y, Wang G, Zhan T, Xia Y, Liu H, Yang H, Zhang J, Tang L, 2021. Mortalin/glucose-regulated protein 75 promotes the cisplatin-resistance of gastric cancer via regulating anti-oxidation/apoptosis and metabolic reprogramming. Cell Death Discovery, 7, 1, 140.

Dancey J, 2010. mTOR signaling and drug development in cancer. Nature Reviews Clinical Oncology, 7, 4, 209-19.

de Brito OM, Scorrano L, 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. Nature, 456, 7222, 605-10.

de la Cruz López KG, Toledo Guzmán ME, Sánchez EO, García Carrancá A, 2019. mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. Front Oncol, 9, 1373.

DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB, 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 49, 19345-50.

Del Chiaro M, Rangelova E, Halimi A, Ateeb Z, Scandavini C, Valente R, Segersvärd R, Arnelo U, Verbeke CS, 2019. Pancreatectomy with arterial resection is superior to palliation in patients with borderline resectable or locally advanced pancreatic cancer. HPB, 21, 2, 219-25.

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP, 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet, 26, 2, 207-10.

Denkert C, Budczies J, Weichert W, Wohlgemuth G, Scholz M, Kind T, Niesporek S, Noske A, Buckendahl A, Dietel M, Fiehn O, 2008. Metabolite profiling of human colon carcinoma--deregulation of TCA cycle and amino acid turnover. Mol Cancer, 7, 72.

Denley A, Gymnopoulos M, Kang S, Mitchell C, Vogt PK, 2009. Requirement of Phosphatidylinositol (3, 4, 5) Trisphosphate in Phosphatidylinositol 3-Kinase-Induced Oncogenic TransformationRequirement for PIP3. Molecular Cancer Research, 7, 7, 1132-8.

Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R, 2006. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. Cell Stress Chaperones, 11, 2, 116-28.

Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R, 2006. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. Cell stress & chaperones, 11, 2, 116.

Desai BN, Myers BR, Schreiber SL, 2002. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 7, 4319-24.

Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R, 2014. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. Biomed Res Int, 2014, 474905.

Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR, 2015. mTORC1 drives HIF-1α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. Oncogene, 34, 17, 2239-50.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC, 2004. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. J Clin Invest, 114, 8, 1117-27.

Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Green JM, Pierce SK, 1993. Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. Mol Cell Biol, 13, 6, 3598-610.

Dornier E, Rabas N, Mitchell L, Novo D, Dhayade S, Marco S, Mackay G, Sumpton D, Pallares M, Nixon C, Blyth K, Macpherson IR, Rainero E, Norman JC, 2017. Glutaminolysis drives membrane trafficking to promote invasiveness of breast cancer cells. Nat Commun, 8, 1, 2255.

Dundas SR, Lawrie LC, Rooney PH, Murray GI, 2005. Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 205, 1, 74-81.

Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S, Hofstetter C, Lindqvist E, Thams S, Bergstrand A, Hansson FS, Trifunovic A, 2007. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 4, 1325-30.

El Shamieh S, Saleh F, Moussa S, Kattan J, Farhat F, 2018. RICTOR gene amplification is correlated with metastasis and therapeutic resistance in triple-negative breast cancer. Pharmacogenomics, 19, 9, 757-60.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer research, 64, 11, 3892-9.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC, 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nature Reviews Genetics, 7, 8, 606-19.

Everhart J, Wright D, 1995. Diabetes Mellitus as a Risk Factor for Pancreatic Cancer: A Meta-analysis. JAMA, 273, 20, 1605-9.

Fan Y, Dickman KG, Zong WX, 2010. Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition. J Biol Chem, 285, 10, 7324-33.

Fang F, Chen S, Ma J, Cui J, Li Q, Meng G, Wang L, 2018. Juglone suppresses epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells via the protein kinase B/glycogen synthase kinase-3β/Snail signaling pathway. Oncol Lett, 16, 2, 2579-84.

Fang F, Qin Y, Qi L, Fang Q, Zhao L, Chen S, Li Q, Zhang D, Wang L, 2015. Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells. Iranian journal of basic medical sciences, 18, 6, 544.

Favre C, Zhdanov A, Leahy M, Papkovsky D, O'Connor R, 2010. Mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier (PNC1) regulates mitochondrial biogenesis and the invasive phenotype of cancer cells. Oncogene, 29, 27, 3964-76.

Fisher RP, Clayton DA, 1988. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. Molecular and cellular biology, 8, 8, 3496-509.

Foley K, Kim V, Jaffee E, Zheng L, 2016. Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer. Cancer Lett, 381, 1, 244-51.

Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, Futreal PA, 2011. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Nucleic Acids Res, 39, Database issue, D945-50.

Foster KG, Fingar DC, 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. J Biol Chem, 285, 19, 14071-7.

Fujiwara S, Saiki Y, Ishizawa K, Fukushige S, Yamanaka M, Sato M, Ishida M, Motoi F, Unno M, Horii A, 2019. Expression of SNAIL in accompanying PanIN is a key prognostic indicator in pancreatic ductal adenocarcinomas. Cancer Med, 8, 4, 1671-8.

Galluzzi L, Kroemer G, 2008. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. Cell, 135, 7, 1161-3.

Gammage PA, Frezza C, 2019. Mitochondrial DNA: the overlooked oncogenome? BMC Biol, 17, 1, 53.

Gammage PA, Frezza C, 2019. Mitochondrial DNA: the overlooked oncogenome? BMC biology, 17, 1, 1-10.

Gandre-Babbe S, van der Bliek AM, 2008. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. Mol Biol Cell, 19, 6, 2402-12.

Gao Y, Gao J, Li M, Zheng Y, Wang Y, Zhang H, Wang W, Chu Y, Wang X, Xu M, 2016. Rheb1 promotes tumor progression through mTORC1 in MLL-AF9-initiated murine acute myeloid leukemia. Journal of hematology & oncology, 9, 1, 1-14.

Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW, 2010. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. Hum Mol Genet, 19, 24, 4861-70.

Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W, 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. Nat Cell Biol, 12, 2, 119-31.

German NJ, Haigis MC, 2015. Sirtuins and the Metabolic Hurdles in Cancer. Curr Biol, 25, 13, R569-83.

Ghadirian P, Lynch H, Krewski D, 2003. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. Cancer detection and prevention, 27, 2, 87-93.

Ghosh AP, Marshall CB, Coric T, Shim EH, Kirkman R, Ballestas ME, Ikura M, Bjornsti MA, Sudarshan S, 2015. Point mutations of the mTOR-RHEB pathway in renal cell carcinoma. Oncotarget, 6, 20, 17895-910.

Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC, 2008. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. J Biol Chem, 283, 8, 5188-94.

Giampazolias E, Tait SW, 2016. Mitochondria and the hallmarks of cancer. The FEBS journal, 283, 5, 803-14.

Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A, 2017. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. CNS Neurosci Ther, 23, 1, 5-22.

Gorrini C, Harris IS, Mak TW, 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. Nature reviews Drug discovery, 12, 12, 931-47.

Gozuacik D, Kimchi A, 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene, 23, 16, 2891-906.

Grandemange S, Herzig S, Martinou J-C. Mitochondrial dynamics and cancer. Seminars in cancer biology, 50-6.

Grasso D, Medeiros HCD, Zampieri LX, Bol V, Danhier P, van Gisbergen MW, Bouzin C, Brusa D, Grégoire V, Smeets H, Stassen APM, Dubois LJ, Lambin P, Dutreix M, Sonveaux P, 2020. Fitter Mitochondria Are Associated With Radioresistance in Human Head and Neck SQD9 Cancer Cells. Front Pharmacol, 11, 263.

Grasso D, Zampieri LX, Capelôa T, Van de Velde JA, Sonveaux P, 2020. Mitochondria in cancer. Cell Stress, 4, 6, 114-46.

Greene AW, Grenier K, Aguileta MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, McBride HM, Park DS, Fon EA, 2012. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. EMBO Rep, 13, 4, 378-85.

Greer JB, Brand RE, 2007. Screening for pancreatic cancer: current evidence and future directions. Gastroenterol Hepatol (N Y), 3, 12, 929-38.

Gremke N, Polo P, Dort A, Schneikert J, Elmshäuser S, Brehm C, Klingmüller U, Schmitt A, Reinhardt HC, Timofeev O, Wanzel M, Stiewe T, 2020. mTOR-mediated cancer drug resistance suppresses autophagy and generates a druggable metabolic vulnerability. Nature Communications, 11, 1, 4684.

Gueguinou M, Crottès D, Chantôme A, Rapetti-Mauss R, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Girault A, Fourbon Y, Jézéquel P, Guérin-Charbonnel C, 2017. The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca2+ homeostasis. Oncogene, 36, 25, 3640-7.

Guha M, Avadhani NG, 2013. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. Mitochondrion, 13, 6, 577-91.

Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombès A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M, 2008. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. Biol Cell, 100, 5, 315-25.

Guo J, Zheng L, Liu W, Wang X, Wang Z, Wang Z, French AJ, Kang D, Chen L, Thibodeau SN, 2011. Frequent Truncating Mutation of TFAM Induces Mitochondrial DNA Depletion and Apoptotic Resistance in Microsatellite-Unstable Colorectal CancerTFAM Mutation in mtDNA Depletion and Apoptotic Resistance of. Cancer research, 71, 8, 2978-87.

Han B, Izumi H, Yasuniwa Y, Akiyama M, Yamaguchi T, Fujimoto N, Matsumoto T, Wu B, Tanimoto A, Sasaguri Y, Kohno K, 2011. Human mitochondrial transcription factor A functions in both nuclei and mitochondria and regulates cancer cell growth. Biochemical and Biophysical Research Communications, 408, 1, 45-51.

Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M, 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature, 475, 7356, 324-32.

Hasnat M, Yuan Z, Naveed M, Khan A, Raza F, Xu D, Ullah A, Sun L, Zhang L, Jiang Z, 2019. Drp1-associated mitochondrial dysfunction and mitochondrial autophagy: a novel mechanism in triptolide-induced hepatotoxicity. Cell Biology and Toxicology, 35, 3, 267-80.

Hassan Z, Schneeweis C, Wirth M, Veltkamp C, Dantes Z, Feuerecker B, Ceyhan GO, Knauer SK, Weichert W, Schmid RM, Stauber R, Arlt A, Krämer OH, Rad R, Reichert M, Saur D, Schneider G, 2018. MTOR inhibitor-based combination therapies for pancreatic cancer. British Journal of Cancer, 118, 3, 366-77.

Heitman J, Movva NR, Hall MN, 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science, 253, 5022, 905-9.

Helle SC, Kanfer G, Kolar K, Lang A, Michel AH, Kornmann B, 2013. Organization and function of membrane contact sites. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1833, 11, 2526-41.

Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, Gao F, 2021. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. World J Gastroenterol, 27, 27, 4298-321.

Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG, 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis, 12, 9, 1543-68.

Iksen, Pothongsrisit S, Pongrakhananon V, 2021. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. Molecules, 26, 13, 4100.

Iksen, Pothongsrisit S, Pongrakhananon V, 2021. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. Molecules, 26, 13.

Ilic M, Ilic I, 2016. Epidemiology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol, 22, 44, 9694-705.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L, 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. Nature cell biology, 4, 9, 648-57.

Jain A, Bhardwaj V, 2021. Therapeutic resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma: Current challenges and future opportunities. World J Gastroenterol, 27, 39, 6527-50.

Jakupciak JP, Maragh S, Markowitz ME, Greenberg AK, Hoque MO, Maitra A, Barker PE, Wagner PD, Rom WN, Srivastava S, Sidransky D, O'Connell CD, 2008. Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer. BMC Cancer, 8, 285.

Jewell JL, Guan KL, 2013. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. Trends Biochem Sci, 38, 5, 233-42.

Ji Y-B, Qu Z-Y, Zou X, 2011. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. Experimental and toxicologic pathology, 63, 1-2, 69-78.

Ji Y, Xin G, Qu Z, Zou X, Yu M, 2016. Mechanism of juglone-induced apoptosis of MCF-7 cells by the mitochondrial pathway. Genet. Mol. Res, 15, 10.4238.

Jia S, Xu X, Zhou S, Chen Y, Ding G, Cao L, 2019. Fisetin induces autophagy in pancreatic cancer cells via endoplasmic reticulum stress-and mitochondrial stress-dependent pathways. Cell death & disease, 10, 2, 1-15.

Jin SM, Youle RJ, 2012. PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. J Cell Sci, 125, Pt 4, 795-9.

K SA, Almatroudi A, Alsahli MA, Aljaghwani A, A ME-K, Rahmani AH, Khan AA, 2021. Novel Strategies for Disrupting Cancer-Cell Functions with Mitochondria-Targeted Antitumor Drug-Loaded Nanoformulations. Int J Nanomedicine, 16, 3907-36.

Kamei H, Koide T, Kojima T, Hashimoto Y, Hasegawa M, 1998. Inhibition of cell growth in culture by quinones. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 13, 3, 185-8.

Kanaoka R, Kushiyama A, Seno Y, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Fukushima T, Tsuchiya Y, Sakoda H, Fujishiro M, Yamamotoya T, Kamata H, Matsubara A, Asano T, 2015. Pin1 Inhibitor Juglone Exerts Anti-Oncogenic Effects on LNCaP and DU145 Cells despite the Patterns of Gene Regulation by Pin1 Differing between These Cell Lines. PLoS One, 10, 6, e0127467.

Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y, Yamano K, Sarraf SA, Banerjee S, Youle RJ, 2014. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. J Cell Biol, 205, 2, 143-53.

Kang D, Hamasaki N, 2002. Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. Current genetics, 41, 5, 311-22.

Kang D, Hamasaki N, 2005. Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. Annals of the New York Academy of Sciences, 1042, 1, 101-8.

Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R, 2007. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. Experimental gerontology, 42, 4, 263-74.

Kayashima T, Mori M, Yoshida H, Mizushina Y, Matsubara K, 2009. 1, 4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. Cancer letters, 278, 1, 34-40.

Keller KE, Doctor ZM, Dwyer ZW, Lee YS, 2014. SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells. Mol Cell, 53, 5, 700-9.

Kim AJ, Jee HJ, Song N, Kim M, Jeong S-Y, Yun J, 2013. p21WAF1/CIP1 deficiency induces mitochondrial dysfunction in HCT116 colon cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 430, 2, 653-8.

Kim HK, Noh YH, Nilius B, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J, 2017. Current and upcoming mitochondrial targets for cancer therapy. Semin Cancer Biol, 47, 154-67.

Kim S, Kim S, Klempner S, Yoon J, Kim N, Ahn S, Bang H, Kim K-M, Park W, Park S, 2017. Rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR) amplification defines a subset of advanced gastric cancer and is sensitive to AZD2014-mediated mTORC1/2 inhibition. Annals of Oncology, 28, 3, 547-54.

Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon SK, Lee SH, Kitada T, Kim JM, Chung J, 2008. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. Biochem Biophys Res Commun, 377, 3, 975-80.

Klein AP, de Andrade M, Hruban RH, Bondy M, Schwartz AG, Gallinger S, Lynch HT, Syngal S, Rabe KG, Goggins MG, Petersen GM, 2007. Linkage analysis of chromosome 4 in families with familial pancreatic cancer. Cancer Biol Ther, 6, 3, 320-3.

Klotz L-O, Hou X, Jacob C, 2014. 1,4-Naphthoquinones: From Oxidative Damage to Cellular and Inter-Cellular Signaling. Molecules, 19, 9, 14902-18.

Kondapalli C, Kazlauskaite A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gourlay R, Burchell L, Walden H, Macartney TJ, Deak M, Knebel A, Alessi DR, Muqit MM, 2012. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. Open Biol, 2, 5, 120080.

Kong B, Wu W, Cheng T, Schlitter AM, Qian C, Bruns P, Jian Z, Jäger C, Regel I, Raulefs S, 2016. A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/Erk-induced hyperactive mTOR signalling. Gut, 65, 4, 647-57.

Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y, 2010. Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. PLoS One, 5, 7, e11707.

Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV, 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nature Reviews Cancer, 11, 5, 325-37.

Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC, 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. Science, 305, 5685, 858-62.

Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N, 2014. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. Nature, 510, 7503, 162-6.

Kukat C, Davies KM, Wurm CA, Spåhr H, Bonekamp NA, Kühl I, Joos F, Polosa PL, Park CB, Posse V, 2015. Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112, 36, 11288-93.

Kumari S, Badana AK, Malla R, 2018. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. Biomarker insights, 13, 1177271918755391.

Kunter I, Erdal E, Nart D, Yilmaz F, Karademir S, Sagol O, Atabey N, 2014. Active form of AKT controls cell proliferation and response to apoptosis in hepatocellular carcinoma. Oncology reports, 31, 2, 573-80.

Laplante M, Sabatini DM, 2009. mTOR signaling at a glance. Journal of cell science, 122, 20, 3589-94.

Laplante M, Sabatini DM, 2012. mTOR signaling in growth control and disease. Cell, 149, 2, 274-93.

Larsson O, Morita M, Topisirovic I, Alain T, Blouin M-J, Pollak M, Sonenberg N, 2012. Distinct perturbation of the translatome by the antidiabetic drug metformin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, 23, 8977-82.

LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, de Carvalho FM, Damascena A, Domingos Chinen LT, Rocha RM, Asara JM, Kalluri R, 2014. PGC-1α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. Nat Cell Biol, 16, 10, 992-1003, 1-15.

Lee CH, Wu SB, Hong CH, Liao WT, Wu CY, Chen GS, Wei YH, Yu HS, 2011. Aberrant cell proliferation by enhanced mitochondrial biogenesis via mtTFA in arsenical skin cancers. Am J Pathol, 178, 5, 2066-76.

Lee H, Park J, Tran Q, Kim D, Hong Y, Cho H, Kwon SH, Brazil D, Kim SH, Park J, 2017. Mitochondrial transcription factor A (TFAM) is upregulated in glioma. Mol Med Rep, 15, 6, 3781-6.

Lee H, Yoon Y, 2016. Mitochondrial fission and fusion. Biochem Soc Trans, 44, 6, 1725-35.

Lee JV, Carrer A, Shah S, Snyder NW, Wei S, Venneti S, Worth AJ, Yuan ZF, Lim HW, Liu S, Jackson E, Aiello NM, Haas NB, Rebbeck TR, Judkins A, Won KJ, Chodosh LA, Garcia BA, Stanger BZ, Feldman MD, Blair IA, Wellen KE, 2014. Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell histone acetylation. Cell Metab, 20, 2, 306-19.

Lee WR, Na H, Lee SW, Lim W-J, Kim N, Lee JE, Kang C, 2017. Transcriptomic analysis of mitochondrial TFAM depletion changing cell morphology and proliferation. Scientific Reports, 7, 1, 17841.

Leopoldini M, Marino T, Russo N, Toscano M, 2004. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. The Journal of Physical Chemistry A, 108, 22, 4916-22.

Leustek T, Dalie B, Amir-Shapira D, Brot N, Weissbach H, 1989. A member of the Hsp70 family is localized in mitochondria and resembles Escherichia coli DnaK. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86, 20, 7805-8.

Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim JW, Yustein JT, Lee LA, Dang CV, 2005. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. Mol Cell Biol, 25, 14, 6225-34.

Li J, Qi F, Su H, Zhang C, Zhang Q, Chen Y, Chen P, Su L, Chen Y, Yang Y, Chen Z, Zhang S, 2022. GRP75-faciliated Mitochondria-associated ER Membrane (MAM) Integrity controls Cisplatin-resistance in Ovarian Cancer Patients. Int J Biol Sci, 18, 7, 2914-31.

Liaquat MT, Kasi A, 2022. Pancreatic Islet Cell Cancer. In: StatPearls. Eds. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., p.

Lin S-C, Hardie DG, 2018. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status. Cell metabolism, 27, 2, 299-313.

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN, 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Mol Cell, 10, 3, 457-68.

Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J, 2005. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. Neoplasia, 7, 1, 17-23.

Lu C-L, Qin L, Liu H-C, Candas D, Fan M, Li JJ, 2015. Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition-a Warburg-reversing effect. PloS one, 10, 3, e0121046.

Lu Z, Chen H, Zheng X-M, Chen M-L, 2017. Experimental study on the apoptosis of cervical cancer Hela cells induced by juglone through c-Jun N-terminal kinase/c-Jun pathway. Asian Pacific journal of tropical medicine, 10, 6, 572-5.

Luo W, Semenza GL, 2012. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. Trends Endocrinol Metab, 23, 11, 560-6.

Makker A, Goel MM, Mahdi AA, Bhatia V, Das V, Agarwal A, Pandey A, 2016. PI3K/Akt/mTOR signaling & its regulator tumour suppressor genes PTEN & LKB1 in human uterine leiomyomas. Indian J Med Res, 143, Supplement, S112-s9.

Mangala L, Fok J, Zorrilla-Calancha I, Verma A, Mehta K, 2007. Tissue transglutaminase expression promotes cell attachment, invasion and survival in breast cancer cells. Oncogene, 26, 17, 2459-70.

Massa SM, Longo FM, Zuo J, Wang S, Chen J, Sharp FR, 1995. Cloning of rat grp75, an hsp70-family member, and its expression in normal and ischemic brain. J Neurosci Res, 40, 6, 807-19.

Matés JM, Di Paola FJ, Campos-Sandoval JA, Mazurek S, Márquez J, 2020. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. Semin Cell Dev Biol, 98, 34-43.

Matés JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ, Márquez J, 2009. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. Int J Biochem Cell Biol, 41, 10, 2051-61.

Matsuda T, Kanki T, Tanimura T, Kang D, Matsuura ET, 2013. Effects of overexpression of mitochondrial transcription factor A on lifespan and oxidative stress response in Drosophila melanogaster. Biochemical and biophysical research communications, 430, 2, 717-21.

Mayer IA, Arteaga CL, 2016. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. Annu Rev Med, 67, 11-28.

Mayer MP, Bukau B, 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci, 62, 6, 670-84.

McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS, 2018. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World J Gastroenterol, 24, 43, 4846-61.

Meskelevicius D, Sidlauskas K, Bagdonaviciute R, Liobikas J, Majiene D, 2016. Juglone Exerts Cytotoxic, Anti-proliferative and Anti-invasive Effects on Glioblastoma Multiforme in a Cell Culture Model. Anticancer Agents Med Chem, 16, 9, 1190-7.

Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O, Stephanopoulos G, 2011. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. Nature, 481, 7381, 380-4.

Midha S, Chawla S, Garg PK, 2016. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. Cancer Letters, 381, 1, 269-77.

Minici C, Testoni S, Della-Torre E, 2022. B-Lymphocytes in the Pathophysiology of Pancreatic Adenocarcinoma. Front Immunol, 13, 867902.

MIZUKOSHI E, SUZUKI M, LOUPATOV A, URUNO T, Hayashi H, MISONO T, KAUL SC, WADHWA R, IMAMURA T, 1999. Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. Biochemical Journal, 343, 2, 461-6.

Molina-Montes E, Van Hoogstraten L, Gomez-Rubio P, Löhr M, Sharp L, Molero X, Márquez M, Michalski CW, Farré A, Perea J, 2020. Pancreatic Cancer Risk in Relation to Lifetime Smoking Patterns, Tobacco Type, and Dose–Response RelationshipsSmoking and Pancreatic Cancer Risk. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 29, 5, 1009-18.

Moo T-A, Zarnegar R, Brunaud L, 2009. Pancreas: Embryology, Anatomy, and Physiology. In: Endocrine Surgery: Principles and Practice. Eds: Hubbard J, Inabnet WB, Lo C-Y. London: Springer London, p. 459-69.

Moschetta M, Reale A, Marasco C, Vacca A, Carratù MR, 2014. Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. Br J Pharmacol, 171, 16, 3801-13.

Muzza M, Colombo C, Cirello V, Perrino M, Vicentini L, Fugazzola L, 2016. Oxidative stress and the subcellular localization of the telomerase reverse transcriptase (TERT) in papillary thyroid cancer. Molecular and Cellular Endocrinology, 431, 54-61.

Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ, 2010. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. PLoS Biol, 8, 1, e1000298.

Nishiyama S, Shitara H, Nakada K, Ono T, Sato A, Suzuki H, Ogawa T, Masaki H, Hayashi J-I, Yonekawa H, 2010. Over-expression of Tfam improves the mitochondrial disease phenotypes in a mouse model system. Biochemical and Biophysical Research Communications, 401, 1, 26-31.

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO, 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science, 299, 5608, 896-9.

Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF, 2010. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. Cell, 140, 1, 49-61.

O'Flanagan CH, O'Neill C, 2014. PINK1 signalling in cancer biology. Biochim Biophys Acta, 1846, 2, 590-8.

Oh WJ, Jacinto E, 2011. mTOR complex 2 signaling and functions. Cell Cycle, 10, 14, 2305-16.

Oldfield LE, Connor AA, Gallinger S, 2017. Molecular Events in the Natural History of Pancreatic Cancer. Trends Cancer, 3, 5, 336-46.

Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L, Pereira JA, 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks. Food Chem Toxicol, 46, 7, 2326-31.

Opitz FV, Haeberle L, Daum A, Esposito I, 2021. Tumor Microenvironment in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. Cancers (Basel), 13, 24.

Osei-Bordom DC, Sachdeva G, Christou N, 2021. Liquid Biopsy as a Prognostic and Theranostic Tool for the Management of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Front Med (Lausanne), 8, 788869.

Ourique F, Kviecinski MR, Felipe KB, Correia JF, Farias MS, Castro LS, Grinevicius VM, Valderrama J, Rios D, Benites J, Calderon PB, Pedrosa RC, 2015. DNA damage and inhibition of akt pathway in mcf-7 cells and ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. Oxid Med Cell Longev, 2015, 495305.

Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira ICFR, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L, 2007. Walnut (Juglans regia L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial

activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45, 11, 2287-95.

Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, von Schenck H, Arnquist HJ, Larsson J, 1993. Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer. Br J Surg, 80, 8, 1047-50.

Permuth-Wey J, Egan KM, 2009. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. Fam Cancer, 8, 2, 109-17.

Philip B, Roland CL, Daniluk J, Liu Y, Chatterjee D, Gomez SB, Ji B, Huang H, Wang H, Fleming JB, Logsdon CD, Cruz-Monserrate Z, 2013. A high-fat diet activates oncogenic Kras and COX2 to induce development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Gastroenterology, 145, 6, 1449-58.

Pickles S, Vigié P, Youle RJ, 2018. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. Curr Biol, 28, 4, R170-r85.

Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N, 2017. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. Febs j, 284, 2, 183-95.

Popov LD, 2020. Mitochondrial biogenesis: An update. J Cell Mol Med, 24, 9, 4892-9.

Porporato PE, Filigheddu N, Pedro JMB-S, Kroemer G, Galluzzi L, 2018. Mitochondrial metabolism and cancer. Cell research, 28, 3, 265-80.

Powis G, 1989. Free radical formation by antitumor quinones. Free radical biology and medicine, 6, 1, 63-101.

Prudent J, McBride HM, 2017. The mitochondria–endoplasmic reticulum contact sites: a signalling platform for cell death. Current opinion in cell biology, 47, 52-63.

Qiao M, Sheng S, Pardee AB, 2008. Metastasis and AKT activation. Cell cycle, 7, 19, 2991-6.

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM, 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, 2913-21.

Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C, Robertson AG, Cherniack AD, Gupta M, Getz G, 2017. Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer cell, 32, 2, 185-203. e13.

Reichert AS, Neupert W, 2004. Mitochondriomics or what makes us breathe. Trends in genetics, 20, 11, 555-62.

Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D, 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. J Biol Chem, 254, 8, 2669-76.

Ren K, Zhou D, Wang M, Li E, Hou C, Su Y, Zou Q, Zhou P, Liu X, 2021. RACGAP1 modulates ECT2-Dependent mitochondrial quality control to drive breast cancer metastasis. Experimental Cell Research, 400, 1, 112493.

Roberts D, Tan-Sah V, Ding E, Smith J, Miyamoto S, 2014. Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. Molecular cell, 53, 4, 521-33.

Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J, 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. Nature, 370, 6490, 527-32.

Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W, 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. Experimental & Molecular Medicine, 48, 3, e219-e.

Saint-Criq V, Gray MA, 2017. Role of CFTR in epithelial physiology. Cellular and Molecular Life Sciences, 74, 1, 93-115.

Saita S, Ishihara T, Maeda M, Iemura S, Natsume T, Mihara K, Ishihara N, 2016. Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. Genes Cells, 21, 5, 408-24.

Sajadimajd S, Yazdanparast R, Roshanzamir F, 2016. Augmentation of oxidative stress-induced apoptosis in MCF7 cells by ascorbate–tamoxifen and/or ascorbate–juglone treatments. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 52, 2, 193-203.

Salem AF, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP, 2012. Mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells promotes breast cancer tumor growth and confers autophagy resistance. Cell Cycle, 11, 22, 4174-80.

Salem AF, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP, 2012. Mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells promotes breast cancer tumor growth and confers autophagy resistance. Cell Cycle, 11, 22, 4174-80.

Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, Longacre M, 2013. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. Int J Mol Sci, 14, 10, 21087-113.

Sarosiek KA, Chi X, Bachman JA, Sims JJ, Montero J, Patel L, Flanagan A, Andrews DW, Sorger P, Letai A, 2013. BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. Mol Cell, 51, 6, 751-65.

Sarvepalli D, Rashid MU, Rahman AU, Ullah W, Hussain I, Hasan B, Jehanzeb S, Khan AK, Jain AG, Khetpal N, Ahmad S, 2019. Gemcitabine: A Review of Chemoresistance in Pancreatic Cancer. Crit Rev Oncog, 24, 2, 199-212.

Sato K, Sato M, 2017. Multiple ways to prevent transmission of paternal mitochondrial DNA for maternal inheritance in animals. J Biochem, 162, 4, 247-53.

Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP, 2012. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. Trends Endocrinol Metab, 23, 9, 459-66.

Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, Oakeley EJ, Kralli A, 2004. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 17, 6472-7.

Segura-Aguilar J, Jönsson K, Tidefelt U, Paul C, 1992. The cytotoxic effects of 5-OH-1, 4-naphthoquinone and 5, 8-diOH-1, 4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HL-60). Leukemia research, 16, 6-7, 631-7.

Sehgal SN, Baker H, Vézina C, 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. J Antibiot (Tokyo), 28, 10, 727-32.

Shadel GS, Horvath TL, 2015. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. Cell, 163, 3, 560-9.

Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC, 2004. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. Cancer cell, 6, 1, 91-9.

Sheridan C, Martin SJ, 2010. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. Mitochondrion, 10, 6, 640-8.

Sidlauskas K, Sidlauskiene R, Li N, Liobikas J, 2017. 5-Hydroxy-1, 4-naphthalenedione exerts anticancer effects on glioma cells through interaction with the mitochondrial electron transport chain. Neuroscience Letters, 639, 207-14.

Siegel R, Miller KD, Sauer A, 2020. Cancer facts & figures 2020. CA Cancer J Clin, 70, 1, 7-30.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A, 2020. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin, 70, 1, 7-30.

Simoes ICM, Morciano G, Lebiedzinska-Arciszewska M, Aguiari G, Pinton P, Potes Y, Wieckowski MR, 2020. The mystery of mitochondria-ER contact sites in physiology and pathology: A cancer perspective. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1866, 10, 165834.

Simula L, Nazio F, Campello S. The mitochondrial dynamics in cancer and immune-surveillance. Seminars in Cancer Biology, 29-42.

Song MM, Nio Y, Dong M, Tamura K, Furuse K, Tian YL, He SG, Shen K, 2000. Comparison of K-ras point mutations at codon 12 and p21 expression in pancreatic cancer between Japanese and Chinese patients. Journal of surgical oncology, 75, 3, 176-85.

Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, Braschi E, Rippstein P, Fon EA, McBride HM, 2012. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. Curr Biol, 22, 2, 135-41.

Srokowski T, Pfeifer JD, Li J, Olson LM, Rader JS, 2004. Expression and Localization of GRP75 in Human Epithelial Tumors and Normal Tissues. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 12, 2, 132-8.

Suen DF, Norris KL, Youle RJ, 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. Genes Dev, 22, 12, 1577-90.

Sullivan LB, Chandel NS, 2014. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Cancer Metab, 2, 17.

Sun L, Suo C, Li S-t, Zhang H, Gao P, 2018. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1870, 1, 51-66.

Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R, 2006. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca2+ channels. J Cell Biol, 175, 6, 901-11.

Takano S, Wadhwa R, Yoshii Y, Nose T, Kaul SC, Mitsui Y, 1997. Elevated levels of mortalin expression in human brain tumors. Experimental cell research, 237, 1, 38-45.

Talathi SS, Zimmerman R, Young M, 2022. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. In: StatPearls. Eds. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., p.

Tan AS, Baty JW, Dong LF, Bezawork-Geleta A, Endaya B, Goodwin J, Bajzikova M, Kovarova J, Peterka M, Yan B, Pesdar EA, Sobol M, Filimonenko A, Stuart S, Vondrusova M, Kluckova K, Sachaphibulkij K, Rohlena J, Hozak P, Truksa J, Eccles D, Haupt LM, Griffiths LR, Neuzil J, Berridge MV, 2015. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. Cell Metab, 21, 1, 81-94.

Tan D-J, Chang J, Liu L-L, Bai R-K, Wang Y-F, Yeh K-T, Wong L-JC, 2006. Significance of somatic mutations and content alteration of mitochondrial DNA in esophageal cancer. BMC cancer, 6, 1, 1-11.

Tanaka M, Chari S, Adsay V, Carlos Castillo F-D, Falconi M, Shimizu M, Yamaguchi K, Yamao K, Matsuno S, 2006. International Consensus Guidelines for Management of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas. Pancreatology, 6, 1, 17-32.

Tang R, Yang C, Ma X, Wang Y, Luo D, Huang C, Xu Z, Liu P, Yang L, 2016. MiR-let-7a inhibits cell proliferation, migration, and invasion by down-regulating PKM2 in gastric cancer. Oncotarget, 7, 5, 5972-84.

Tanida I, Ueno T, Kominami E, 2008. LC3 and Autophagy. Methods Mol Biol, 445, 77-88.

Tee AR, Anjum R, Blenis J, 2003. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and-2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and-independent phosphorylation of tuberin. Journal of Biological Chemistry, 278, 39, 37288-96.

Tejero I, González-García N, González-Lafont À, Lluch JM, 2007. Tunneling in green tea: understanding the antioxidant activity of catechol-containing compounds. A variational transition-state theory study. Journal of the American Chemical Society, 129, 18, 5846-54.

Tosatto A, Sommaggio R, Kummerow C, Bentham RB, Blacker TS, Berecz T, Duchen MR, Rosato A, Bogeski I, Szabadkai G, 2016. The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF-1α. EMBO molecular medicine, 8, 5, 569-85.

Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA, 2008. Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1α and 2α on mTORC1 and mTORC2. Journal of Biological Chemistry, 283, 50, 34495-9.

Tu C, Zeng Z, Qi P, Li X, Guo C, Xiong F, Xiang B, Zhou M, Liao Q, Yu J, 2018. Identification of genomic alterations in nasopharyngeal carcinoma and nasopharyngeal carcinoma-derived Epstein–Barr virus by whole-genome sequencing. Carcinogenesis, 39, 12, 1517-28.

Untereiner AA, Fu M, Módis K, Wang R, Ju Y, Wu L, 2016. Stimulatory effect of CSE-generated H2S on hepatic mitochondrial biogenesis and the underlying mechanisms. Nitric Oxide, 58, 67-76.

van Gisbergen MW, Voets AM, Starmans MH, de Coo IF, Yadak R, Hoffmann RF, Boutros PC, Smeets HJ, Dubois L, Lambin P, 2015. How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. Mutat Res Rev Mutat Res, 764, 16-30.

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH, 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. Nat Cell Biol, 9, 3, 316-23.

Virbasius JV, Scarpulla RC, 1994. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91, 4, 1309-13.

Vlavcheski F, O'Neill EJ, Gagacev F, Tsiani E, 2022. Effects of Berberine against Pancreatitis and Pancreatic Cancer. Molecules 27, 23. Erişim Adresi.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. New England Journal of Medicine, 369, 18, 1691-703.

Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC, 2016. Mitochondria and Cancer. Cell, 166, 3, 555-66.

Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y, Sugimoto Y, 1993. Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. Exp Cell Res, 207, 2, 442-8.

Wadhwa R, Pereira-Smith OM, Reddel RR, Sugimoto Y, Mitsui Y, Kaul SC, 1995. Correlation between complementation group for immortality and the cellular distribution of mortalin. Experimental cell research, 216, 1, 101-6.

Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Aida S, Yaguchi T, Kaul Z, Hirano T, Taira K, Kaul SC, 2005. Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mtHsp70 and HSP60. Biochem J, 391, Pt 2, 185-90.

Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocaris CC, Pereira-Smith OM, Reddel RR, Kaul SC, 2006. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. International journal of cancer, 118, 12, 2973-80.

Wadhwa R, Takano S, Taira K, Kaul SC, 2004. Reduction in mortalin level by its antisense expression causes senescence-like growth arrest in human immortalized cells. The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications, 6, 4, 439-44.

Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, Mitsui Y, Reddel RR, Kaul SC, 2002. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. Experimental cell research, 274, 2, 246-53.

Wahi MM, Shah N, Schrock CE, Rosemurgy II AS, Goldin SB, 2009. Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature. Annals of epidemiology, 19, 2, 103-11.

Wallace DC, 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science, 283, 5407, 1482-8.

Wallace DC, 2012. Mitochondria and cancer. Nature Reviews Cancer, 12, 10, 685-98.

Wang G, Luo Y, Yang J, Hou C, Li J, 2020. Inhibitory effects of polyphenols-enriched extracts from Debregeasia orientalis leaf against human cervical cancer in vitro & in vivo. Food and Agricultural Immunology, 31, 1, 176-92.

Wang J, Liu K, Wang X-F, Sun D-J, 2017. Juglone reduces growth and migration of U251 glioblastoma cells and disrupts angiogenesis. Oncology reports, 38, 4, 1959-66.

Wang L, Zeng Y, Liu Y, Hu X, Li S, Wang Y, Li L, Lei Z, Zhang Z, 2014. Fucoxanthin induces growth arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells by up-regulation of p21 and down-regulation of mortalin. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 46, 10, 877-84.

Wang X, Li S, Liu L, Jian Z, Cui T, Yang Y, Guo S, Yi X, Wang G, Li C, Gao T, Li K, 2019. Role of the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in promoting mitochondrial biogenesis against oxidative damage in human melanocytes. J Dermatol Sci, 96, 1, 33-41.

Ward PS, Thompson CB, 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. Cancer Cell, 21, 3, 297-308.

Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB, 2009. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. Science, 324, 5930, 1076-80.

Wenz T, 2013. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1α under cellular stress. Mitochondrion, 13, 2, 134-42.

Wong MCS, Jiang JY, Liang M, Fang Y, Yeung MS, Sung JJY, 2017. Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. Sci Rep, 7, 1, 3165.

Wong N, De Melo J, Tang D, 2013. PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. Int J Cell Biol, 2013, 242513.

Wu H, Chen Q, 2015. Hypoxia activation of mitophagy and its role in disease pathogenesis. Antioxid Redox Signal, 22, 12, 1032-46.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN, 2006. TOR signaling in growth and metabolism. Cell, 124, 3, 471-84.

Xie D, Wu X, Lan L, Shangguan F, Lin X, Chen F, Xu S, Zhang Y, Chen Z, Huang K, Wang R, Wang L, Song X, Liu Y, Lu B, 2016. Downregulation of TFAM inhibits the tumorigenesis of non-small cell lung cancer by activating ROS-mediated JNK/p38MAPK signaling and reducing cellular bioenergetics. Oncotarget, 7, 10.

Xu H-L, Yu X-F, Qu S-C, Zhang R, Qu X-R, Chen Y-P, Ma X-Y, Sui D-Y, 2010. Anti-proliferative effect of Juglone from Juglans mandshurica Maxim on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway. European Journal of Pharmacology, 645, 1-3, 14-22.

Xu H, Yu X, Qu S, Sui D, 2013. Juglone, isolated from Juglans mandshurica Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 23, 12, 3631-4.

Xu H, Yu X, Qu S, Sui D, 2013. Juglone, isolated from Juglans mandshurica Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. Bioorg Med Chem Lett, 23, 12, 3631-4.

Xu J, Pham CG, Albanese SK, Dong Y, Oyama T, Lee CH, Rodrik-Outmezguine V, Yao Z, Han S, Chen D, Parton DL, Chodera JD, Rosen N, Cheng EH, Hsieh JJ, 2016. Mechanistically distinct cancer-associated mTOR activation clusters predict sensitivity to rapamycin. J Clin Invest, 126, 9, 3526-40.

Yadav D, Lowenfels AB, 2013. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. Gastroenterology, 144, 6, 1252-61.

Yamauchi M, Nakayama Y, Minagawa N, Torigoe T, Shibao K, Yamaguchi K, 2014. Mitochondrial Transcription Factor A Worsens the Clinical Course of Patients With Pancreatic Cancer Through Inhibition of Apoptosis of Cancer Cells. Pancreas, 43, 3, 405-10.

Yan C, Li TS, 2018. Dual Role of Mitophagy in Cancer Drug Resistance. Anticancer Res, 38, 2, 617-21.

Yang Z, Wang L, Yang C, Pu S, Guo Z, Wu Q, Zhou Z, Zhao H, 2021. Mitochondrial Membrane Remodeling. Front Bioeng Biotechnol, 9, 786806.

Ylikallio E, Tyynismaa H, Tsutsui H, Ide T, Suomalainen A, 2010. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. Human molecular genetics, 19, 13, 2695-705.

Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA, 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. Mol Cell Biol, 23, 15, 5409-20.

Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, Kohno K, 2003. p53 Physically Interacts with Mitochondrial Transcription Factor A and Differentially Regulates Binding to Damaged DNA1. Cancer Research, 63, 13, 3729-34.

Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N, 2011. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. J Biol Chem, 286, 22, 19630-40.

Youle RJ, van der Bliek AM, 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. Science, 337, 6098, 1062-5.

Yu Y, Peng X-D, Qian X-J, Zhang K-M, Huang X, Chen Y-H, Li Y-T, Feng G-K, Zhang H-L, Xu X-L, 2021. Fis1 phosphorylation by Met promotes mitochondrial fission and hepatocellular carcinoma metastasis. Signal transduction and targeted therapy, 6, 1, 1-15.

Yuan C, Morales-Oyarvide V, Babic A, Clish CB, Kraft P, Bao Y, Qian ZR, Rubinson DA, Ng K, Giovannucci EL, Ogino S, Stampfer MJ, Gaziano JM, Sesso HD, Cochrane BB, Manson JE, Fuchs

CS, Wolpin BM, 2017. Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer Survival. J Clin Oncol, 35, 16, 1822-8.

Zhang W, Liu A, Li Y, Zhao X, Lv S, Zhu W, Jin Y, 2012. Anticancer activity and mechanism of juglone on human cervical carcinoma HeLa cells. Canadian journal of physiology and pharmacology, 90, 11, 1553-8.

Zhang X-B, Zou C-L, Duan Y-X, Wu F, Li G, 2015. Activity guided isolation and modification of juglone from Juglans regia as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15, 1, 1-8.

Zhang X-B, Zou C-L, Duan Y-X, Wu F, Li G, 2015. Activity guided isolation and modification of juglone from Juglans regia as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15, 1, 396.

Zhang Y, Xu H, 2016. Translational regulation of mitochondrial biogenesis. Biochem Soc Trans, 44, 6, 1717-24.

Zhao D, Xiong Y, Lei QY, Guan KL, 2013. LDH-A acetylation: implication in cancer. Oncotarget, 4, 6, 802-3.

Zhu W, Qin W, Bradley P, Wessel A, Puckett CL, Sauter ER, 2005. Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid. Carcinogenesis, 26, 1, 145-52.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM, 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nature reviews Molecular cell biology, 12, 1, 21-35.

7. EKLER

Ek-A: Etik Kurul

Ek-B: Turnitin Raporu

PANC-1 VE BxPC-3 PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARINA JUGLON UYGULAMASININ MİTOKONDRİAL BİYOGENEZ VE AKTİVASYONLA İLGİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%11	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%6
2	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%3
3	kongre.akademikiletisim.com İnternet Kaynağı	<%1
4	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	<%1
5	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.iku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1

9	locus.ufv.br İnternet Kaynağı	<%1
10	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
11	Submitted to (school name not available) Öğrenci Ödevi	<%1
12	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
13	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
14	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
15	Submitted to Istanbul Kultur University Öğrenci Ödevi	<%1
16	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
17	Submitted to University of Cambridge Öğrenci Ödevi	<%1
18	guncel.tgv.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
19	Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA, Hale GÖKSEVER ÇELİK, İsmail Mert ALKAÇ, Tuba GÜNEL. "Cancer and Endothelial Cells", LLM Dergi, 2018	<%1

20	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
21	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1

Alıntıları çıkart	Kapat	Eşleşmeleri çıkar	Kapat
Bibliyografyayı Çıkart	Kapat		

8.ÖZGEÇMİŞ