

Pankreas Kanseri Hücrelerinde *Tripartite Motif-Containing Protein 3 (TRIM3)* Gen Ekspresyonunun Araştırılması

Investigation of *Tripartite Motif-Containing Protein 3 (TRIM3)* Gene Expression in Pancreatic Cancer Cells

Muradiye ACAR¹ ¹İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, TÜRKİYE

Öz

Amaç: Pankreas kanseri, tüm kanserler içinde en kötü prognoza sahip olanlar arasındadır. *Tripartite Motif-Containing Protein 3 (TRIM3)* geni tümör baskılayıcı bir gen olarak kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu kontrol ederek tümör baskılayıcı olarak rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı, AsPC1, BxPC-3 ve PANC-1 pankreas kanseri hücre hatlarındaki *TRIM3* geninin mRNA seviyesindeki ekspresyonunu araştırmaktır.

Materyal ve metod: AsPC1, BxPC-3 ve PANC-1 hücre hatları 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edildi ve total RNA izolasyonu yapıldı. *TRIM3* geni mRNA ekspresyon seviyesi Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (RT-qPCR) metodu ile incelendi. Rölatif gen ekspresyonu verilerinin analizi 2^{-ΔΔCT} metodu kullanılarak yapıldı.

Bulgular: Üç hücre hattında da *TRIM3*'ün mRNA ekspresyon seviyelerinin çok düşük olduğu tespit edildi. İlaveten kat değişimi hesaplandığında hücre hatları arasında istatistiksel fark gözlenmedi.

Sonuç: *TRIM3* geni karsinogenez sürecinde tümör baskılayıcı gen olarak rol oynamaktadır ve kanser hücrelerinde *TRIM3* ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Literatürdeki diğer kanser türleri ile uyumlu şekilde pankreas kanseri hücrelerinde *TRIM3* mRNA ekspresyonunun çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma AsPC1, BxPC-3 ve PANC-1 pankreas kanseri hücre hatları ve *TRIM3* arasındaki ilişkiyi araştıran tek çalışma olması sebebiyle bundan sonra yapılacak fonksiyonel çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, *TRIM3*, AsPC1, BxPC-3, PANC-1

Abstract

Background: Pancreatic cancer is among those with the worst prognosis of all cancers. The *Tripartite Motif-Containing Protein 3 (TRIM3)* gene, as a tumor suppressor gene, plays a role as a tumor suppressor by controlling the proliferation, migration and invasion of cancer cells. The aim of this study was to investigate the expression of *TRIM3* gene at the mRNA level in AsPC1, BxPC-3 and PANC-1 pancreatic cancer cell lines.

Materials and Methods: AsPC1, BxPC-3 and PANC-1 cell lines were cultured at 37°C in an environment containing 5% CO₂ and total RNA was isolated. *TRIM3* gene mRNA expression level was analyzed by Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) method. Analysis of relative gene expression data was performed using the 2^{-ΔΔCT} method.

Results: The mRNA expression levels of *TRIM3* were found to be very low in all three cell lines. In addition, when fold change was calculated, no difference was observed between cell lines.

Conclusions: *TRIM3* gene plays a role as a tumor suppressor gene in the process of carcinogenesis and it has been shown that *TRIM3* expression is decreased in cancer cells. Consistent with other cancer types in the literature, *TRIM3* mRNA expression was found to be very low in pancreatic cancer cells. Since this study is the only study investigating the relationship between AsPC1, BxPC-3 and PANC-1 pancreatic cancer cell lines and *TRIM3*, it will shed light on future functional studies.

Key Words: Pancreatic cancer, *TRIM3*, AsPC1, BxPC-3, PANC-1

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Muradiye ACAR

İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı,
İstinye Üniversitesi Topkapı Kampüsü,
Teyyareci Sami Sk. No.3, 34010
Zeytinburnu/İstanbul, TÜRKİYE

E-mail: acarmuradiye@yahoo.com

Geliş tarihi / Received: 26.05.2022

Kabul tarihi / Accepted: 01.12.2022

DOI: 10.35440/hutfd.1121746

Giriş

Pankreas kanseri, tüm kanserler içinde en kötü prognoza sahip olanlar arasındadır ve 5 yıllık sağkalım oranı %9'dur (1). Son yıllarda, hastalığın tanısı ve tedavisinde birçok ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen hastaların genel sağkalımında önemli ölçüde iyileşme olmamıştır (2). Genom ve epigenom çapında ilişkilendirme çalışmaları, pankreas kanseri ile ilişkili genlerin belirlenmesinde büyük katkı sağlamıştır (3-6).

Tripartite Motif (TRIM) ailesi proteinleri tipik olarak E3 ubiquitin ligaz aktivitelere sahiptir ve hedef proteinlerin proteazom tarafından parçalanmasında önemli rol oynarlar. TRIM ailesi proteinleri, bir RING (R) alt birimi, bir veya iki çinko bağlayıcı B-kutusu (B-box) ve yumaksı sarmal (coiled-coil) alt birimlerini içeren benzer bir karakteristik yapıyı paylaşırlar (7).

TRIM proteinlerinin; proliferasyon, apoptoz ve transkripsiyonel düzenleme dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer aldığı gösterilmiştir (8, 9). Tripartite motif-containing 3 (TRIM3) proteini, TRIM protein ailesinin bir üyesidir ve 11p15.5'de lokalizedir (10, 11, 12). Literatürde, TRIM3'ün kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu kontrol edebildiğini ve karaciğer kanseri, glioblastomlar ve kolorektal kanser gibi çeşitli kanserlerde bir tümör inhibitörü olarak hareket edebileceği bildirilmiştir (8, 13, 14). Mevcut çalışmalar, karaciğer kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri ve rahim ağzı kanseri dahil olmak üzere birçok insan kanserinde TRIM3 ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. TRIM3 ekspresyonunun yukarı düzenlenmesi hücre malignite davranışlarını inhibe ederken, TRIM3'ün aşağı düzenlenmesi ise hücre malignitesini kontrol etmektedir (8, 14-16).

TRIM3 ekspresyon kaybının, glioblastomaların gelişimini ve ilerlemesini desteklediği, aşırı ekspresyonun ise glioblastomaların tümörjenitesini azalttığı bildirilmiştir. Glioblastoma'daki TRIM3'ün tümör baskılayıcı işlevi, cdk inhibitörü olan p21'in düzenlenmesi ile bağlantılıdır (17, 18).

miR-4513'ün TRIM3 ekspresyonunu aşağı yönde regüle ederek meme kanseri hücre hatlarının hücre büyümesini, koloni oluşumunu, migrasyonunu ve invazyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular miR-4513 veya TRIM3'ün meme kanseri için potansiyel yeni terapötik hedefler olabileceğini göstermektedir (19). TRIM3'ün meme kanserinde iyi prognoz ile ilişkili olduğu, ancak yalnızca P53 yabanıl tip meme kanseri hastalarında kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. TRIM3'ün P53 yıkımını desteklediğini ve P53 hedef gen ekspresyonunu baskıladığını, bu şekilde kanser hücreleri büyümesini teşvik ettiğini ve P53 yabanıl tip meme kanseri hücrelerinde sisplatin kaynaklı apoptozu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar vardır. Bu sonuçlar ile TRIM3, P53 sinyal yolağının yeni keşfedilen bir modülatörü olarak P53 yabanıl tip meme kanserini tedavi etmek için umut verici bir hedef olabilmektedir (20). TRIM3'ün tamoksifene dirençli meme kanserinde önemli ölçüde yukarı regüle edildiği ve tamoksifen tedavisi sırasında meme kanserli hastaların kötü sağkalımıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (21).

Lu ve arkadaşları, ilk kez TRIM3'ün Ewing sarkom hücrelerinde Beclin1'in yıkımını sağlayarak otofajiyi negatif olarak düzenlediğini ortaya koymuştur ve bu bulguların Ewing sarkom araştırması için fikirler sağlayabileceğini söylemiştir (22).

TRIM3, G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurur ve hücre proliferasyonunu azaltarak karaciğer kanseri gelişiminde tümör baskılayıcı bir rol oynamaktadır (8). TRIM3 ekspresyonunun hepatosellüler karsinomda hem mRNA hem de protein seviyelerinde aşağı yönde regüle edildiği ve düşük TRIM3 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (23).

Birçok araştırmacı TRIM3'ü aday bir tümör baskılayıcı gen olarak değerlendirmiştir, çünkü aşırı ekspresyonu kanser hücreleri proliferasyonunu inhibe etmektedir ve TRIM3 ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir (23). Bununla birlikte, pankreas kanserinde TRIM3'ün işlevi hala belirsizdir.

Bu çalışmada, Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (RT-qPCR) metodu ile pankreas kanseri hücrelerinde TRIM3 mRNA ekspresyonunu incelendi.

Materyal ve Metod

Hücre hatları ve hücre kültürü

Çalışmada AsPC1, BxPC-3 ve PANC-1 pankreas kanseri hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları American Type Culture Collection'dan (Manassas, VA, ABD) temin edildi.

AsPC1 ve PANC-1 hücreleri pankreas başı adenokarsinomudur. AsPC1 hücrelerinin birçok karın içi organa metastazı mevcutken PANC-1 hücreleri duodenum duvarına invaze olmuştur (24, 25). BxPC-3 hücre hattında primer tümör pankreasın gövde kısmında yer almaktadır ve metastazı yoktur (26).

Hücreler, %10 ısıyla inaktive edilmiş fetal bovine serum (Hyclone, USA) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Hyclone, USA) antibiyotigi ile desteklenmiş RPMI-1640 (Hyclone, USA) besiyerinde kültüre edildi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş havaya sahip inkübatörde steril koşullarda çoğaltıldı.

Total RNA izolasyonu

Pankreas kanseri hücre hatlarından total RNA izolasyonu TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) ile üreticinin protokolüne göre yapıldı. Total RNA konsantrasyonu, NanoDrop 2000 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ile 260 nm dalga boyunda ölçüldü. Total RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ve 260 nm, 280 nm, 230 nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri ile incelendi.

Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR (RT-qPCR)

cDNA sentezinde Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kullanıldı. 1 µg total RNA, 100 µM oligo(dT)₁₈ primer, 5xReaction Buffer, 20 unite Ribolock RNase İnhibitor, 10 mM dNTP mix, 200 unite RevertAid Reverse Transcriptase içeren reaksiyon karışımı nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlandı.

Elde edilen cDNA'lar, *TRIM3* mRNA ekspresyon seviyesini ölçmek için qPCR reaksiyonunda kullanıldı. Referans gen olarak β -aktin seçildi. *TRIM3* ve β -aktin genlerine spesifik primerlerin dizileri Tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1. RT-qPCR'da kullanılan primerlerin dizileri

GEN	İLERİ PRİMER (5'-3')	GERİ PRİMER (5'-3')
<i>TRIM3</i>	TGGGAGCCAACTGA- AGAGGA	GAGACATAATTGTGGCAGAC- TATGA
<i>B-AKTIN</i>	TTCTGGGCAT- GGAGTCCT	AGGAGGAGCAAT- GATCTTGATC

Güvenilir RT-qPCR sonuçları elde etmek için iki önemli noktaya dikkat edilerek RNA'ya özgü primerler dizayn edildi. İlk olarak ileri ve geri primer, ekzon-ekzon birleşme noktaları içerecek şekilde tasarlandı. İkinci olarak da ileri ve geri primerler arasında en az iki intron bölgesi bırakılarak genomik DNA'dan kaynaklanabilecek yanlış çoğalmalar engellendi. qPCR reaksiyonu SYBR® Green Master Mix Kit (Qiagen, Almanya) ile yapıldı. 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (1x) 12,5 µl, cDNA 500 ng, ileri primer 0.3 µM ve geri primer 0.3 µM içeren PCR miksinde toplam hacim 25 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklendi. Pankreas kanseri hücre hatlarının *TRIM3* ekspresyon seviyelerini ölçmek için *TRIM3* ve β -aktin PCR ürünlerinden seri on kat seyreltmeler hazırlandı ve standartlar olarak kullanıldı. Amplifikasyon Rotor Gene Q5 Plex/ 5 Plex HRM Real Time PCR cihazı ile Tablo 2'de belirtilen koşullara göre gerçekleştirildi. Erime Eğrisi (Melt Curve) Analizi ile hedef bölgelerin amplifikasyonları kontrol edildi. Rölatif gen ekspresyonu verilerinin analizi $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak yapıldı.

Tablo 2. qPCR protokolü

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyon	95°C	15 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	38 döngü
Primer bağlanma	58°C	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	
Melting curve	72-95°C	1 °C/5 sn	

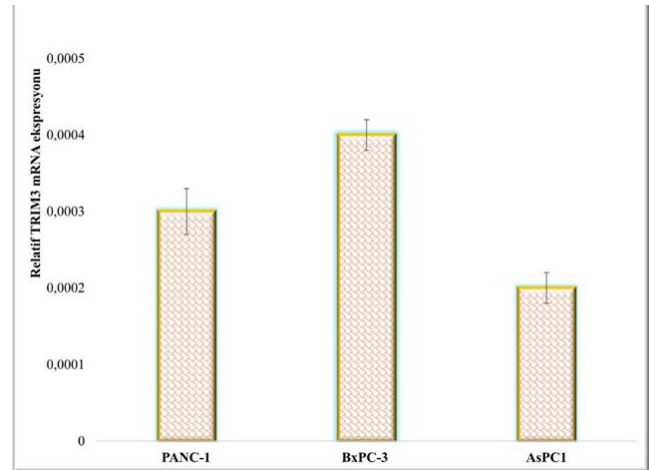
Veriler, Rotor-Gene Q Series yazılımı v2.1.0 (Qiagen) kullanılarak analiz edildi ve standart eğri yöntemi kullanılarak ekspresyon seviyeleri hesaplandı. Deney setleri 3'er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş olup, ortalamaları alınarak hesaplamalar yapıldı. Rölatif gen ekspresyonu verilerinin analizi $2^{-\Delta\Delta CT}$ [($\Delta Ct = Ct_{TRIM3} - Ct_{\beta-aktin}$), $\Delta\Delta CT = (Ct_{TRIM3} - Ct_{\beta-aktin})_{grup1} - (Ct_{TRIM3} - Ct_{\beta-aktin})_{grup2}$] metodu kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Tüm veriler SPSS 20.0 (SPSS, ABD) veya excel ile analiz edildi. Tüm sonuçlar, ortalama \pm standart sapmalar (SD) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Student's t-testi ile yapıldı ve p değeri 0.01'den küçükse sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Pankreas kanseri hücre hatlarının *TRIM3* mRNA ekspresyon farklılıkları değerlendirmek için RT-qPCR yöntemi kullanıldı. Rölatif gen ekspresyonunu ölçmek için referans gen olarak β -aktin kullanıldı. Üç hücre hattında da *TRIM3*'ün mRNA ekspresyon seviyelerinin çok düşük olduğu tespit edildi (Şekil 1). İlaveten hücre hatları arasındaki kat değişimi hesaplandığında *TRIM3* ekspresyonunun birbirine çok yakın olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). PANC-1 ve BxPC-3 hücrelerinde ekspresyon yaklaşık aynı seviyede iken AsPC1 hücresinde diğer iki hücreye kıyasla çok az düşüktü (Şekil 2).



Şekil 1. *TRIM3* mRNA ekspresyon seviyesi

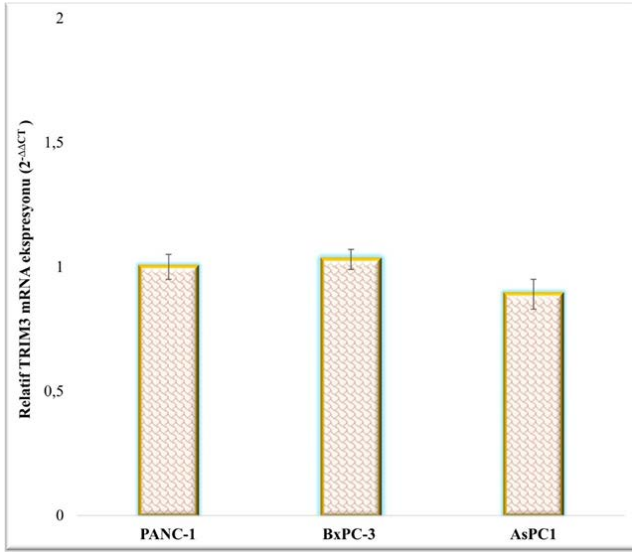
Pankreas kanseri hücre hatlarında *TRIM3*'ün mRNA ekspresyon seviyesi RT-qPCR ile ölçüldü.

Tartışma

TRIM3'ün pankreas kanserindeki potansiyel rolünü araştırmak için, AsPC1, BxPC-3 ve PANC-1 hücre hatlarında *TRIM3*'ün ekspresyonu RT-qPCR metodu ile incelendi. Sonuçlar, *TRIM3*'ün mRNA ekspresyon seviyelerinin üç hücre hattında da çok düşük olduğunu ortaya koydu (Şekil 1). Literatüre bakıldığında benzer şekilde farklı kanserlerde *TRIM3* ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir.

TRIM proteinleri, RING tipi E3 ubiquitin ligazlarının alt ailelerindedir ve neoplastik süreçlerin kritik düzenleyicileri olarak kabul edilirler (27, 28). TRIM proteinlerinin proliferasyon, apoptoz, transkripsiyonel düzenleme ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçlerde görevlidirler (8, 9, 29).

TRIM3 geni, çok sayıda kanserle ilişkili genin bulunduğu 11p15.5 lokusunda yer almaktadır ve bu bulgu *TRIM3*'ün yeni bir tümör ilişkili gen olabileceğini göstermektedir (12, 30). *TRIM3* kolorektal kanser (14), meme kanseri (19), hepatoselüler karsinom (23) ve glioblastoma (18, 31) gibi çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı rol oynamaktadır. Ayrıca, *TRIM3*, karaciğer kanseri (8), özofagus skuamöz hücreli karsinom (32), kolon kanseri (14) ve mide kanseri (15) dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde aşağı yönde regüle edilmektedir ve hücre proliferasyonu, invazyonu ve metastazı inhibe etmektedir.



Şekil 2. Rölatif *TRIM3* mRNA ekspresyonu PANC-1, BxPC-3 ve AsPC1 pankreas kanseri hücre hatlarında rölatif *TRIM3* mRNA ekspresyonu $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplandı.

TRIM3'ün mide kanserinde hücre büyümesini ve metastazı inhibe ederek tümör baskılayıcı olarak işlev görmesi *TRIM3*'ün tanısal bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir (15). Bununla birlikte mide kanseri hastalarında *TRIM3* mRNA seviyesindeki azalmanın kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İlaveten bu hastalarda *TRIM3*'ün yukarı yönde regüle edilmesinin daha uzun sağkalım oranlarına eşlik etmesi sebebiyle artan *TRIM3* mRNA seviyesinin, mide tümörlerinin ilerlemesindeki rollerini hafifletmek için β -katenin, CyclinD ve BCL2'nin aşırı ekspresyonuna bir yanıt olduğu düşünülmektedir (33). Chao ve arkadaşları, hepatoselüler karsinom tümör dokularını kanserli olmayan dokularla karşılaştırdığında *TRIM3* ekspresyonunun hem mRNA hemde protein seviyesinde önemli ölçüde aşağı yönde regüle edildiğini bulmuşlardır ve aynı zamanda düşük *TRIM3* ekspresyonunun kötü prognozun bağımsız bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (23). *TRIM3* ekspresyonunun karaciğer kanseri hücrelerinde normal karaciğer hücrelerine göre daha düşük olduğu bulunmuştur. *TRIM3*'ün aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve koloni oluşumunu önemli ölçüde inhibe ederken, *TRIM3* ekspresyonunun baskılanmasının bu süreçleri desteklediği gösterilmiştir (8).

TRIM3 ekspresyonunun meme kanseri hücre hatlarında normal hücre hattına kıyasla önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir ve *TRIM3*'ün meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı fonksiyon göstermesine karşın miR-4513'ün onkogenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. miR-4513'ün aşağı yönde düzenlenmesi, *TRIM3*'ü hedefleyerek hücre çoğalmasını, koloni oluşumunu, migrasyonu ve invazyonu baskılamıştır (19). *TRIM3*'ün insan meme kanseri hücrelerinde P53 sinyalinin düzenleyicisi olarak rol oynadığı gösterilmiştir. *TRIM3*, P53 protein seviyesini baskılamakta ve

meme kanseri hücre büyümesini ve anti-apoptozu desteklemektedir. P53 sinyal yolunun yeni keşfedilen bir modülatörü olarak *TRIM3*, P53 yabanıl tip meme kanserini tedavi etmek için umut verici bir hedef olarak gözükmektedir (20). Song ve arkadaşları, miR-454-3p'nin rahim ağzı kanseri tümör büyümesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. miR-454-3p'nin ektopik ekspresyonu, doğrudan *TRIM3*'ü hedef alarak, P38 MAPK sinyalinin aktivasyonu yoluyla P53'ün aşağı yönde düzenlenmesine ve kaspaz-3'ün yarıklanmasına yol açarak rahim ağzı kanserinde hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Böylece miR-454-3p, rahim ağzı kanseri tedavisi için yeni bir gen olarak tanımlanmaktadır (34). Literatürde pankreas kanseri ile ilgili tek bir çalışma bulunmaktadır. Nahakira ve arkadaşları pankreas kanseri hücre hattı MiaPaCa2 hücrelerini gempitabine dirençli hale getirmişlerdir ve gempitabine direnç genlerini araştırırken *TRIM3*'ün aşağı yönde regüle olduğunu bulmuşlardır (35). Yapılan literatür taramasına göre; bu çalışma AsPC1, BxPC-3 ve PANC-1 hücre hatları ve *TRIM3* arasındaki ilişkiyi bildiren tek çalışma olması sebebiyle bundan sonra yapılacak fonksiyonel çalışmalara ışık tutacaktır.

Etik onam: Bu çalışma etik onam alınması gereken çalışmalar kapsamında dışında olan hücre kültürü çalışmasıdır.

Yazar Katkıları:

Konsept: M.A.

Literatür Tarama: M.A.

Tasarım: M.A.

Veri toplama: M.A.

Analiz ve yorum: M.A.

Makale yazımı: M.A.

Eleştirel incelenmesi: M.A.

Fon sağlama (mevcut ise): M.A.

Çıkar Çatışması: Herhangi bir çıkar çatışmamız bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Araştırma kapsamında herhangi bir kurum ya da kuruluştan finansal destek sağlanmamıştır.

Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2020. *Ca Cancer J Clin.* 2020; 70:7-30.
2. Sharma C, Eltawil KM, Renfrew PD, Walsh MJ, Molinari M. Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990-2010. *World J Gastroenterol* 2011; 17(7):867-897.
3. Omura N, Li CP, Li A, Hong SM, Walter K, Jimeno A, et al. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7(7):1146-1156.
4. Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, Borges M, Zhang X, Parsons DW, et al. Exomic Sequencing Identifies PALB2 as a Pancreatic Cancer Susceptibility Gene. *Science.* 2009; 324(5924): 217-219.
5. Klein AP, Wolpin BM, Risch HA, Stolzenberg-Solomon RZ, Mucci E, Zhang M, et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nature Communications.* 2018; 9:556-566.
6. Wolpin BM, Rizzato C, Kraft P, Kooperberg C, Petersen GM, Wang Z, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nature Genetics.* 2014; doi:10.1038/ng.3052.

7. Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*. 2005; 27(11):1147-1157.
8. Huang XQ, Zhang XF, Xia JH, Chao J, Pan QZ, Zhao JJ, et al. Tripartite motif containing 3 (TRIM3) inhibits tumor growth and metastasis of liver cancer. *Chin J Cancer* 2017; 36: 77.
9. Wang M, Wu J, Guo Y, Chang X, Cheng T, The tripartite motif-containing protein 3 on the proliferation and cytokine secretion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Mol. Med. Rep.* 2017; 15,1607-1612.
10. El-Husseini AE, Vincent SR. Cloning and characterization of a novel RING finger protein that interacts with class V myosins. *J Biol Chem.* 1999; 274(28):19771-7.
11. El-Husseini AE, Kwasnicka D, Yamada T, Hirohashi S, Vincent SR. BERP, a novel ring finger protein, binds to alpha-actinin-4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 267(3):906-11.
12. El-Husseini AE, Fretier P, Vincent SR. Cloning and characterization of a gene (RFN22) encoding a novel brain expressed ring finger protein (BERP) that maps to human chromosome 11p15.5. *Genomics.* 2000; 71:363-7.
13. Mukherjee S, Tucker-Burden C, Zhang C, Moberg K, Read R, Hadjipanayis C, et al. Drosophila brat and human ortholog TRIM3 maintain stem cell equilibrium and suppress brain tumorigenesis by attenuating Notch nuclear transport. *Canc. Res.* 2016; 76:2443-2452.
14. Piao MY, Cao HL, He NN, Xu MQ, Dong WX, Wang WQ, et al. Potential role of TRIM3 as a novel tumour suppressor in colorectal cancer (CRC) development. *Scand J Gastroenterol.* 2016; 51:572-582.
15. Fu H, Yang H, Zhang X, Wang B, Mao J, LiX, et al. Exosomal TRIM3 is a novel marker and therapy target for gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37:162.
16. Song Y, Guo Q, Gao S, Hua K. Tripartite motif-containing protein 3 plays a role of tumor inhibitor in cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 498: 686-692.
17. Chen G, Kong J, Tucker-Burden C, Anand M, Rong Y, Rahman F, et al. Human Brat ortholog TRIM3 is a tumor suppressor that regulates asymmetric cell division in glioblastoma. *Cancer Res.* 2014; 74(16): 4536-4548.
18. Liu Y, Raheja R, Yeh N, Ciznadija D, Pedraza AM, Ozawa T, et al. TRIM3, a tumor suppressor linked to regulation of p21 Waf1/Cip1. *Oncogene.* 2014; 33:308-15.
19. Li Y, Zhu H, Wang J, Qian X, Li N. miR-4513 promotes breast cancer progression through targeting TRIM3. *Am J Transl Res.* 2019; 11(4):2431-2438.
20. Wang X, Zhang Y, Pei X, Guo G, Xue B, Duan X, et al. TRIM3 inhibits P53 signaling in breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2020; 20:559-570.
21. Ye R, AiErken N, Kuang X, Zeng H, Shao N, Lin Y, et al. Tripartite motif-containing 3 (TRIM3) enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Oncogenesis.* 2021; 10:60.
22. Lu Q, Zhang Y, Ma L, Li D, Li M, Liu P, et al. TRIM3 Negatively Regulates Autophagy Through Promoting Degradation of Beclin1 in Ewing Sarcoma Cells. *OncoTargets and Therapy.* 2019; 12: 11587-11595.
23. Chao J, Zhang XF, Pan QZ, Zhao JJ, Jiang SS, Wang Y, et al. Decreased expression of TRIM3 is associated with poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2014; 31:102.
24. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer.* 1975; 15:741-747.
25. Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, Shimano T, Penetrante R, Sanders WH, et al. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro.* 1982; 18:24-34.
26. Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, et al. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.* 1986; 4:15-23.
27. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(11):792-804.
28. Cambiaghi V, Giuliani V, Lombardi S, Marinelli C, Toffalorio F, Pelicci PG. TRIM proteins in cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 770:77-91.
29. Kawai T, Akira S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol Med.* 2011; 3(9):513-527.
30. Koi M, Johnson LA, Kalikin LM, Little PF, Nakamura Y, Feinberg AP. Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science.* 1993; 260:361-4.
31. Boulay JL, Stiefel U, Taylor E, Dolder B, Merlo A, Hirth F. Loss of heterozygosity of TRIM3 in malignant gliomas. *BMC Cancer.* 2009; 9:71.
32. Zhu J, Wu G, Ke Z, Cao L, Tang M, Li Z, et al. Targeting TRIM3 deletion-induced tumor-associated lymphangiogenesis prohibits lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2019; 38:2736-49.
33. Farhadi J, Goshayeshi L, Motavalizadehkakhky A, Mehrzad J, Mehrad-Majd H. Decreased expression of TRIM3 gene predicts a poor prognosis in gastric cancer. *Journal of Gastrointestinal Cancer.* doi.org/10.1007/s12029-020-00563-0.
34. Song Y, Guo Q, Gao S, Hua K. miR-454-3p promotes proliferation and induces apoptosis in human cervical cancer cells by targeting TRIM3. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2019; 516:872-879.
35. Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takahashi Y, Okami J, Yoshioka S, et al. Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int. J. Cancer.* 2007; 120:1355-1363.