

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİYUM KANSER GELİŞİMİNDE ERİTROPOİETİN ve
ERİTROPOİETİN RESEPTÖR GENLERİNİN İFADELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Hacer İlke ÖNEN

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ

ANKARA
AĞUSTOS 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİYUM KANSER GELİŞİMİNDE ERİTROPOİETİN ve
ERİTROPOİETİN RESEPTÖR GENLERİNİN İFADELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Hacer İlke ÖNEN

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-27 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
AĞUSTOS 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 13.11/2009

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Genel. Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Akın Meneviş

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Genel. Üniversitesi
Prof. Dr. Selda Meneviş

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Genel. Üniversitesi
Prof. Dr. Atilla Hakan Elengün

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Genel. Üniversitesi
Doç. Dr. Mehmet Öner

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Hacettepe. Üniversitesi
Prof. Dr. Feri Önce

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler	V
Tablolar	VII
Semboller, Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.Uterusun Anatomisi	2
2.2.Uterusun Histolojisi	2
2.3.Uterus Tümörleri	3
2.4.Endometriyum Kanseri	3
2.5.Endometriyal Kanserlerin Histolojik Sınıflandırılması	4
2.6.Endometriyum Kanserinde Prognostik Faktörler	6
2.7.Eritropoietin (EPO) Proteini	7
2.7.1.EPO Geni	7
2.8.Eritropoietin Reseptör (EPOR) Proteini	8
2.8.1.EPOR Geni	10
2.9.EPO ve EPOR Sinyal Yolağı	10
2.10.EPO ve EPOR' un Eritropoezdeki Rolü	11
2.11.EPO ve EPOR' un Diğer Dokulardaki Roller	13
2.12.EPO ve EPOR Proteinlerinin Tümör Dokularındaki Roller	14
2.13.EPO' nun Klinikte Kullanımı	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1.Araç ve Gereçler	18
3.1.1.Cihazlar	18
3.1.2. Kimyasal Maddeler	18
3.1.3. Kitler	20
3.2.Çözeltilerin Hazırlanışı	21

3.2.1. 1 M Tris (pH 8.0) Stok Çözeltisi	21
3.2.2. %10' luk Sodyum Deoksikolat Stok Çözeltisi	21
3.2.3. %20' lik Stok SDS Çözeltisi	21
3.2.4. %10' luk Stok SDS Çözeltisi	21
3.2.5. %1' lik Brom Fenol Mavisi	21
3.2.6. RIPA Tamponu	21
3.2.7. 5X Elektroforez Tamponu	22
3.2.8. 1X Elektroforez Tamponu	22
3.2.9. Laemmli (2X) Tamponu (Yükleme tamponu)	22
3.2.10. Transfer Tamponu	22
3.2.11. Membran Bloklama Çözeltisi	22
3.3.Yöntemler	23
3.3.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler	23
3.3.2. Doku Örneklerinin Alınması	23
3.3.3. Endometriyum Dokusundan Total RNA Saflaştırılması	24
3.3.4. cDNA Sentez Tepkimesi	25
3.3.4.1. RT-PCR Programı	26
3.3.5. Real Time PCR Reaksiyon Verimliliğinin Kontrolü	27
3.3.6. EPO, EPOR Genlerinin İfade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi	27
3.3.6.1. EPO Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	27
3.3.6.2. EPOR Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	29
3.3.6.3. GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	30
3.4. Western Blot (WB) Yöntemi	33
3.4.1. Dokudan Protein İzolasyonu	33
3.4.2. Protein Miktarının Ölçümü	34
3.4.3. Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) Yürütülmesi	34
3.4.4. Örneklerin Yükleme İçin Hazırlanması	36
3.4.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi	37
3.4.6. Elektrobloiting (Protein Örneklerinin Nitroselüloz Membrana	37

Aktarılması)	
3.4.7. Bloklama	38
3.4.8. Membran Üzerindeki Proteinin İmmunolojik Gösterilmesi	38
3.4.9. Film Çekimi	38
3.4.10. Membranın EPO (H-162) Antikoru İle Muamelesi	39
3.4.11. Membranın EPOR (M-20) Antikoru İle Muamelesi	39
3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	39
4. BULGULAR	40
4.1. EPO Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi	45
4.2. EPOR Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi	46
4.3. EPO ve EPOR Protein İfadesinin WB Yöntemi ile Analizi	49
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	56
7. ÖZET	57
8. SUMMARY	58
9. KAYNAKLAR	59
10. EKLER	81
11. ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

	Sayfa No
Şekil 1: Tip I endometriyum kanserinde gözlenen moleküler değişimler	5
Şekil 2: Tip II endometriyum kanserinde gözlenen moleküler değişimler	6
Şekil 3: Eritropoietin' in reseptörü ile etkileşimi	11
Şekil 4: Eritropoezin kontrolü	12
Şekil 5: EPO ve EPOR' un hücre içinde farklı iletim yollarını uyarması	13
Şekil 6: EPO'nun Otokrin/Parakrin Etkisi	17
Şekil 7: EPO mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	28
Şekil 8: EPOR mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	29
Şekil 9: GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	30
Şekil 10: EPO geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	43
Şekil 11: EPOR geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	44
Şekil 12: GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri	44
Şekil 13: EPO, EPOR proteinlerinin Western blot yöntemi ile gösterimi	49
Grafik 1: Hastaların tümör ve normal dokularında EPO, EPOR genlerine ait sonuçların kutu grafiği ile gösterimi	46
Grafik 2: Tümör ve sağlıklı kontrollerin endometriyum dokularında EPO, EPOR genlerine ait sonuçların kutu grafiği ile gösterimi	47

Grafik 3: Hastaların EPO, EPOR mRNA ifade düzeylerinin 48
tümör ve normal dokularda karşılaştırılması

Grafik 4: EPO, EPOR mRNA ifade düzeylerinin tümör ve 48
sağlıklı kontrollere ait dokular ile karşılaştırılması

TABLÖLAR

Sayfa No

Tablo 1: RT-PCR tepkime karışımı	26
Tablo 2: EPO Real-time PCR tepkime karışımı	28
Tablo 3: EPOR Real-time PCR tepkime karışımı	30
Tablo 4: GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı	31
Tablo 5: Hasta ve sağlıklı bireylere ait klinik ve histopatolojik özellikler	42

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrad Derece
AKT	: Protein kinaz B
AP	: Amonyum Persülfat
BFU-E	: Patlama Oluşturan Birim-Eritroid
BSA	: Sığır Serum Albumini
cDNA	: Komplementer DNA
CHO	: Çin Hamster Over
CEPO	: Karbomillenmiş EPO
CFU-E	: Koloni Uyarıcı Birim-eritroid
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile Su
dk	: Dakika
dNTP	: Deoksinükleozidtrifosfat
E2	: Estradiol-17 β
EPO	: Eritropoietin
EPOR	: Eritropoietin Reseptörü
FIGO	: Uluslar Arası Jinekoloji ve Obstetrik Topluluğu
g	: Gram
GAPDH	: Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz
GMC-SF	: Granülosit Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktör
Hif-1α	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör Alfa
HNF-4	: Hepatik Nükleer Faktör 4
HRE	: Hipoksi Cevap Elementi
HRP	: Horseradish Peroksidaz
βcR	: Yaygın β Reseptörü
IHC	: İmmunohistokimya
IL-3	: İnterlökin-3
IL-5	: İnterlökin-5
JAK2	: Janus Kinaz 2

Kb	: Kilo baz
kDa	: Kilo Dalton
M	: Molar
mA	: Miliamper
MAPK	: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mRNA	: Elçi RNA
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
nm	: Nanometre
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
PI3K	: Fosfotidil İnoзит 3 Kinaz
pmol	: Pikomol
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog
RBC	: Kırmızı Kan Hücresi
RCC	: Böbrek Hücreli Karsinom
REST	: Relatif Ekspresyon Software Tool
rHuEpo	: Rekombinant EPO
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Dakika Başına Dönme Sayısı
RT-PCR	: Ters transkriptaz-Polimeraz Zincir Tepkimesi
SDS	: Sodyumdodesilsülfat
SH2	: SRC Homoloji 2
sn	: Saniye
STAT5	: Sinyal İleticisi ve Transkripsiyonun Aktivatörü 5
TEMED	: Tetrametiletildiamin
UPL	: Universal Prob Kütüphanesi
UV	: Ultraviyole
V	: Voltaj

VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WB	: Western Blot
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
α	: Alfa
β	: Beta

1.GİRİŞ

Endometriyum kanseri gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında en sık gözlenen jinekolojik kanserdir. Çoğunlukla postmenapozal kadınlarda görülür ve yaş arttıkça seyri kötüleşir. Kırk yaşından önce nadir görülür, 55-65 yaş arasında görülme sıklığında artış gözlenir. Endometriyum kanseri uterus kanserinin %90'ını oluşturur.

Eritropoietin (EPO) glikoprotein yapısında bir hormon olup hematopietin ya da hemapoietin olarak da adlandırılır. Hematopietik hücrelerde, EPO reseptörü (EPOR) aracılığıyla etkisini göstermektedir. Eritroid hücrelerde EPO/EPOR sinyalinin aktivasyonu proliferasyonun uyarılması, eritroblastların farklılaşması ve apoptozun baskılanması gibi birçok hücreyel olayla sonuçlanır.

Hematopietik doku dışında endotel hücrelerinin yüzeyinde, akciğer, beyin ve kadın üreme organlarında da EPOR' un ifade edildiği belirlenmiştir.

EPO ve EPOR sinyalinin tümör gelişimini etkileyen yeni bir faktör olduğu düşünülmektedir. Bu yolağın tümörün oluşumunda, progresyonunda ve anjiyogenezinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir.

Bu bilgiler ışığında, endometriyum kanseri hastalardan alınan tümör ve normal dokular ile sağlıklı kontrollerden alınan endometriyum örneklerinde EPO ve EPOR 'un ifadesini mRNA ve protein düzeyinde belirlemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Uterusun Anatomisi

Uterus, alt bölgede serviks yukarı bölgede korpus olmak üzere iki kısımdan oluşur ¹. Pelvis boşluğunda yer alan uterusun korpus kısmı mesane üzerinde yer alırken serviks kısmı ise mesane ile rektum arasında yer alır ². Uterus yaklaşık 7-9 cm uzunluğunda, 3-4 cm genişliğinde ve 2-3 cm kalınlığında olup 100-120 g ağırlığındadır ³.

2.2. Uterusun Histolojisi

Uterus dıştan içe doğru perimetrium (tunica serosa, peritoneal epitelyum), miyometrium (tunica muscularis) ve endometrium (tunica mucosa) tabakalarından oluşur ³.

Seroza, periton uterus korpusu ve serviksin posteriorunu örten kısımdır ¹.

Miyometrium 1.5-2 cm genişliğindedir ve uterus duvarının en geniş tabakasıdır ³. Miyometrium bağ dokusu ile ayrılmış olan düz kas liflerinden oluşur. Düz kas ağı zor tanımlanan 4 farklı tabakadan oluşturur. Birinci ve dördüncü tabakalar esas olarak organın uzun eksenine paralel olan kas liflerinden oluşurken ortadaki tabakalar kan damarlarından oluşur ⁴.

Endometrium, bazal hücre tabakası ve işlevsel endometriyal tabakadan oluşur. İşlevsel endometrium tabakası tubular glandları içeren hücresel bağ dokusundan oluşur ^{3,4}. Endometrium menstrüel siklusta aktif olarak iş görür ve siklusun her aşamasında yapısında değişiklikler olur ³.

2.3. Uterus Tümörleri

Kadın üreme organları olan vulva, vajina, serviks, uterus, fallop tüpleri ve overlerde görülen kanserler genel olarak jinekolojik kanserler olarak adlandırılmaktadır. Uterus kanserleri %90'ı uterus epitelinden köken alır ve endometriyal karsinom olarak sınıflandırılır. Geriye kalan kısmını ise sarkom ve leiomyosarkomlar oluşturur. Sarkomlar uterusun bağ dokusundan gelişen tümörlerdir. Leiomyosarkomlar ise miyometriyum yapısını oluşturan düz kas hücrelerinden gelişir ¹.

2.4. Endometriyum Kanseri

Endometriyum kanseri kadınlar arasında meme, akciğer, kolon kanserinden sonra en sık görülen dördüncü kanser türüdür. Erken evrede teşhis edilmeleri nedeniyle genellikle prognozları iyidir ⁶. Gelişmiş ülkelerde ise jinekolojik kanserler arasında ise en sık gözlenen türdür ^{7,8}. Diğer kanser türlerinin görülme sıklığı ve ölüm oranı son on yılda azalma eğilimi gösterirken, endometriyum kanseri görülme sıklığı artmaktadır ^{7,9}. Endometriyum kanseri Sağlık Bakanlığı'nın 2003 yılına ait sağlık istatistikleri verilerine göre ülkemizde kadınlar arasında en sık gözlenen kanserler arasında sekizinci sırada yer almaktadır. Görülme sıklığının %3.22 olduğu bildirilmiştir ¹⁰.

Endometriyum kanseri görülme sıklığı etnik kökenlere göre farklılık göstermektedir ⁶. Siyahlarda beyazlara göre %33 oranında daha az görülmektedir. Ancak benign jinekolojik nedenlerle bu ırkda histerektominin fazla görülmesi sonucu bu oran yanıltıcıdır ¹². Ölüm oranı siyahlarda beyazlara oranla %80 daha fazladır ^{6,13}.

Endometriyum kanseri 40 yaşından önce nadir görülür, 55-65 yaş arasında görülme sıklığında artış gözlenir ¹⁴. Endometriyum kanserinin %10'u kalıtsal, %90'ı sporadikdir ⁸.

Endometriyum kanseri gelişiminde çeşitli risk faktörlerinin olduğu bilinmektedir. Bu risk faktörleri arasında nulliparite, geç menapoz, obezite, diyabet, polikistik over sendromu, tamoksifen kullanımı, atipik endometriyum hiperplazisi gibi faktörler yer almaktadır¹.

2.5.Endometriyal Kanserlerin Histolojik Sınıflandırılması

Endometriyum kanserinin %90'ı tipik endometriyal adenokarsinomlarıdır ⁷. Adenoskuamöz karsinomlar ise skuamöz farklılaşma gösteren klasik endometriyal adenokarsinomlar olarak sınıflandırılmaktadır ¹⁴.

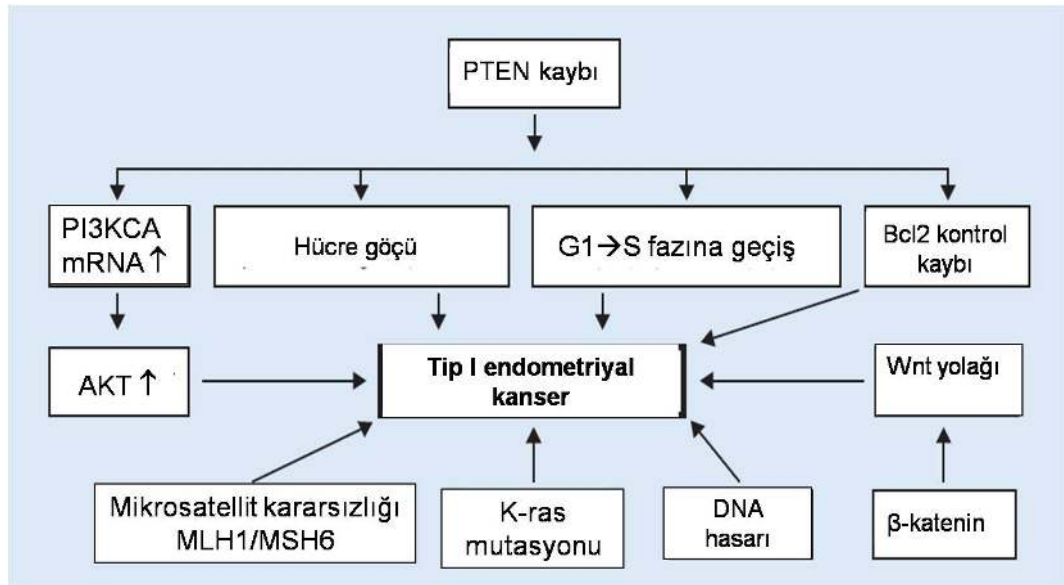
Papiller seröz karsinom, berrak hücreli karsinom, papiller endometrioid karsinom ve musinöz karsinom nadir görülür ve geriye kalan %10'luk kısmı oluşturur ¹⁴.

Endometriyum kanserinin iki patogenetik tipi olduğu belirlenmiştir ¹⁵. Endometriyal tümörler östrojen bağımlı gelişen endometrioid adenokarsinomların yer aldığı Tip I karsinomlar ve geriye kalan alt tipleri içeren östrojenden bağımsız gelişen Tip II karsinomlar olarak iki grupta sınıflandırılabilir ^{16,17}.

Tip I endometriyum kanseri tüm olguların %75' inde görülür ve atipik endometriyal hiperplaziden köken alır ¹⁸. Tip II endometriyum kanseri ise genellikle yaygın görülmeyen ileri yaşta ortaya çıkan, yüksek uterus dışı metastaz riski olan, seröz veya berrak hücre histolojisi gösteren ve prognozu kötü olan gruptur ^{16,18}.

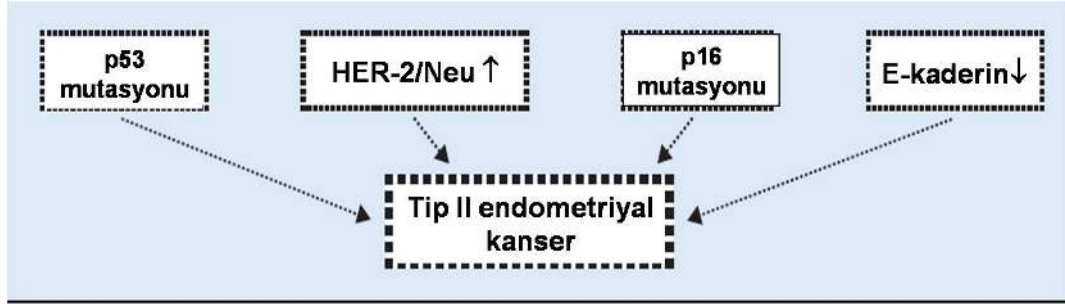
Tip I ve Tip II endometriyum kanserinin gelişiminde farklı moleküler yolların rolleri vardır. Her iki tipin moleküler profili birbirinden farklıdır ^{17,19}.

Tip I kanserler özellikle hücre zarına bağlı olan ve hücre adezyonu ile sinyal iletiminden sorumlu genlerdeki genetik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Protein kinaz enzimini kodlayan PTEN geninin kaybı Tip I kanserlerin çoğunda görülmektedir. PTEN kaybına bağlı olarak hücre göçü, hücre bölünmesinin ve apoptozun kontrolü ortadan kalkar. Ayrıca Wnt sinyal yolağının kaybı, DNA hasarı, K-ras genindeki mutasyonlar ve mikrosatellit kararsızlığı gibi durumlar Tip I kanserlerin gelişiminde gözlenmektedir ^{17,19} (Şekil 1).



Şekil 1: Tip I endometriyum kanserinde gözlenen moleküler değişimler ²⁰

Tip II tümörlerde ise p53 genindeki mutasyonlar daha sık gözlenmektedir ^{17,19}. Ayrıca Her-2/neu miktarının artışı, E-kaderin gen kaybı ve p16 genindeki mutasyonlar Tip II kanserin gelişiminde rol oynamaktadır ¹⁷ (Şekil 2).



Şekil 2: Tip II endometriyum kanserinde gözlenen moleküler değişimler²⁰.

Endometriyum kanseri evrelendirmesinde Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Topluluğunun (FIGO) sistemi kullanılmaktadır²¹. FIGO sisteminde miyometriyal invazyon, tümörün servikte görülmesi, adneksiyal kitle, peritoneal sitoloji ve lenf nodu metastazı gibi faktörler değerlendirilen kriterler arasındadır^{14,22}.

2.6. Endometriyum Kanserinde Prognostik Faktörler

Tümör büyüklüğü, tümörün histolojik tipi, tümör derecesi, miyometriyal invazyonun derinliği, lenf nodlarının durumu, peritoneal sitolojinin kanser hücreleri için pozitif olması, ve adneksiyal veya üst abdominal metastazların varlığı, östrojen ve progesteron reseptörlerinin tümör dokusundaki yüksek ifadesi, endometriyum kanserinin prognozunda önemlidir^{18, 23}.

Sinyal iletim yollarında görev alan proteinlerde oluşan yapısal ve ifade düzey değişimleri kanser gelişiminde önemlidir. Endometriyal neoplazi gelişiminde çok sayıda sinyal iletim yolağının rol oynadığı bilinmektedir²⁴. Bunlardan biri de EPO/EPOR yolağıdır.

2.7. Eritropoietin (EPO) Proteini

EPO glikoprotein yapısında bir hormondur ve hematopoietin ya da hemapoietin olarak da adlandırılır ²⁵⁻²⁷. EPO, eritroid öncüllerinin apoptozunu baskılayıp, proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyararak fetal, neonatal ve yetişkin hayatta kırmızı kan hücrelerinin üretiminin devamını sağlar ²⁸⁻³¹. Yetişkinlerde EPO normalde çoğu böbrekte, daha az oranda karaciğerde üretilirken, fetal dönemde sadece karaciğerde üretilir ²⁵⁻²⁷. EPO böbreğin korteks ve dış medullasında bulunan peritubular fibroblast benzeri tip 1 intersitisyel hücrelerinde üretilir ^{32,33}. Böbreğin aksine karaciğerde iki farklı hücre tipi (hepatositler ve Ito hücreleri) EPO üretmektedir ^{33,34}.

EPO molekülü üç tane N-bağlı, bir tane O-bağlı şekerle sahiptir ³⁵. O-bağlı şekerin önemli bir işlevi yokken N-bağlı şekerler dolaşımdaki EPO molekülünün kararlılığı açısından gereklidir ^{35,36}. Glikozillerini kaybetmiş EPO biyolojik olarak aktiftir ancak ömrü çok kısadır ³⁷.

EPO' nun reseptörü ile etkileşen 2 bölgesi vardır. Bu bölgelerden biri reseptörüne yüksek ilgiyle bağlanırken, diğeri ise düşük ilgiyle bağlanır. Bu bölgelerdeki meydana gelen değişimler bağlanma ilgisini etkilemektedir ³⁸.

2.7.1. EPO Geni

EPO geni 7q21'de yerleşmiştir ve 5 eksondan oluşur. Memeliler arasında EPO' nun nükleotit ve amino asit dizilimleri yüksek oranda korunmuştur ³⁹.

Anemi ve sonrasında gelişen doku hipoksisine bağlı olarak EPO mRNA düzeyi artar ⁴⁰. EPO geninin oksijene bağımlı kontrolünde, genin 3' ucunda 2 bç ile birbirinden ayrılmış olan 2 adet hipoksi yanıt elementi (HRE) önemlidir ⁴¹.

EPO geninin karaciğer ve böbrekte ifade edilmesinden sorumlu olan kontrol dizileri tanımlanmıştır. Buna göre, EPO geninin karaciğerde hipoksik koşullarda uyarılmasını sağlayan kontrol dizileri genin kodlayan bölümünün 0.4 kb yukarı bölgesi ile 0.7 kb aşağı bölgesi arasında yer almaktadır. Genin 3' kısmında bulunan enhancer hem HIF-1 α bağlanma dizisi olan HRE hem de hepatik nükleer faktör 4 (HNF-4) için bağlanma dizisi içerir ⁴². Genin yukarı bölgesinde -0.4 kb ile -6 kb arasında olan bölgede negatif düzenleyici olarak iş gören kontrol dizisi bulunur ⁴³. EPO geninin böbrekte ifadesini yöneten dizi ise genin yukarı bölgesinde -9.5 kb ile -14 kb arasında yerleşmiştir ⁴⁴.

EPO geni 193 amino asit'den oluşan öncül bir polipeptit sentezler. Polipeptidin amino ucundaki 27 amino asitlik lider dizinin kesilmesiyle 166 amino asit uzunluğunda işlevsel bir protein oluşur. Ancak, rekombinant insan EPO geni, Çin hamster over (CHO) hücre hattında sentezlettiğinde 166. argininin olmadığı ve 165 amino asit' den oluştuğu belirlenmiştir. Plazma da yer alan EPO' nun da 165 amino asit'den oluştuğu saptanmıştır. Ancak bu oluşumun mekanizmaları bilinmemektedir. EPO geni, 30.4 kDa' luk bir protein şifreler ⁴¹.

2.8. Eritropoietin Reseptör (EPOR) Proteini

EPOR proteini EPO' nun hücre zarında yer alan reseptörüdür. EPO hücrelerde işlevini transmembran özellikteki bu

reseptör aracılığıyla gösterir ^{45,46}. EPO ve EPOR etkileşimi oldukça dinamiktir ve EPOR hücre yüzeyine hızlı bir şekilde taşınır ⁴⁷. Ancak sentezlenen EPOR proteininin %1' inden daha azı hücre yüzeyine taşınmaktadır ⁴⁸. EPOR' un kinaz aktivitesi olmamasına rağmen sitoplazmik tirozin kinazlara bağlanır ve uyarır ^{49,50}.

EPO reseptörü sitokin reseptör süper ailesinin üyesidir ⁵¹. Bu aile üyeleri genel olarak hidrofobik transmembran bölge ile sitoplazmik ve hücre dışı bölgelere sahiptir ^{52,53}.

Reseptörün hücre dışında yer alan bölgesi 225 amino asitten oluşur ve korunmuş sistein birimleri ile WSXWS motifini içerir ^{52,53}. Bu motif EPOR' un ligand bağlamasında internalizasyonunda ve sinyal iletiminde önemlidir ^{54,55}. Bu bölgede ayrıca iki tane fibronektin tip III benzeri motif bulunur. Bu bölgeler birbirine 6 halka yapısı ile bağlanmış olan 7 tane beta zincirinden oluşur. Beta zincirlerini birbirine bağlayan halkaları oluşturan amino asitlerden bazıları EPO'ya bağlanmada önemlidir ⁵⁶. Bu bölgenin karboksi (C) ucunda dimerizasyon bölgesi de tanımlanmıştır ve EPO' nun bağlanması ile molekül yapısal bir değişiklik geçirerek hücre içinde sinyal iletimini başlatır ⁵⁷.

Reseptörün sitoplazmik kısmı ise 236 amino asitten oluşur ve Box1 ile Box2 motifleri bulunur. Box1 motifi JAK2 kinazın reseptöre bağlanması için gereklidir ^{58,59}. Sitoplazmik kısımda ayrıca internalizasyon fosforilasyon ve aktivasyon için gerekli bölgelerde bulunur ⁶⁰. Sinyal iletimi sonrası EPOR hücre içine alındıktan sonra proteozomlarda ve lizozomlarda yıkılır ⁶¹.

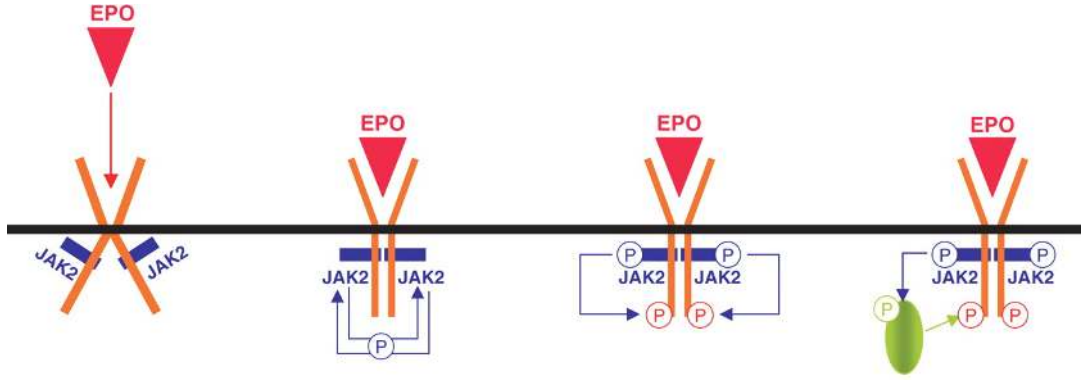
2.8.1.EPOR Geni

1990' da Winkelmann ve ark. tarafından 19p13.3'de yerleştığı bulunmuştur ⁶². 508 amino asitden oluşan 66 kDa'luk protein şifreler ⁶³. 1991 yılında insan EPOR geninin 8 eksondan oluştuğu ve 6 kb'lık bölgeye yerleştığı gösterilmiştir. İlk 5 ekson hücre dışı bölgeyi, 6. ekson transmembran bölgeyi ve 7 ile 8. eksonlar ise sitoplazmik bölgeyi şifreler ⁶⁴. EPOR geninin 5' ucunda GATA1 ve SP1 kontrol dizileri bulunur ⁶⁵. Ayrıca CCACC kontrol motifi de +79 ile +175. nükleotitler arasında yer almaktadır ⁶⁶.

2.9. EPO ve EPOR Sinyal Yolağı

Hematopoietik sistemde EPO/EPOR sinyal yolağının aktif olduğu bilinmektedir. Bu sinyal yolağı, eritroblastların farklılaşması ve çoğalması, sağkalımın uyarılması için gereklidir⁶⁷.

EPO, reseptörüne bağlandığında dimer oluşturarak yapısal bir değişim geçirir. Bu yapısal değişiklik sonucu iki reseptör alt birimi ile ilişkili olan Janus kinaz 2 (JAK2) enzimleri yaklaşarak birbirlerini fosforile ederler. Fosforillenmiş JAK2 molekülleri eritropoietin reseptörünün sitoplazmik bölgesinde yer alan tirozin amino-asitlerini fosforiller. Aktifleşmiş JAK2 SRC homoloji 2 (SH2) bölgesi içeren çok sayıda farklı ikincil haberci molekülü ile etkileşebilir ⁶⁸ (Şekil 3).

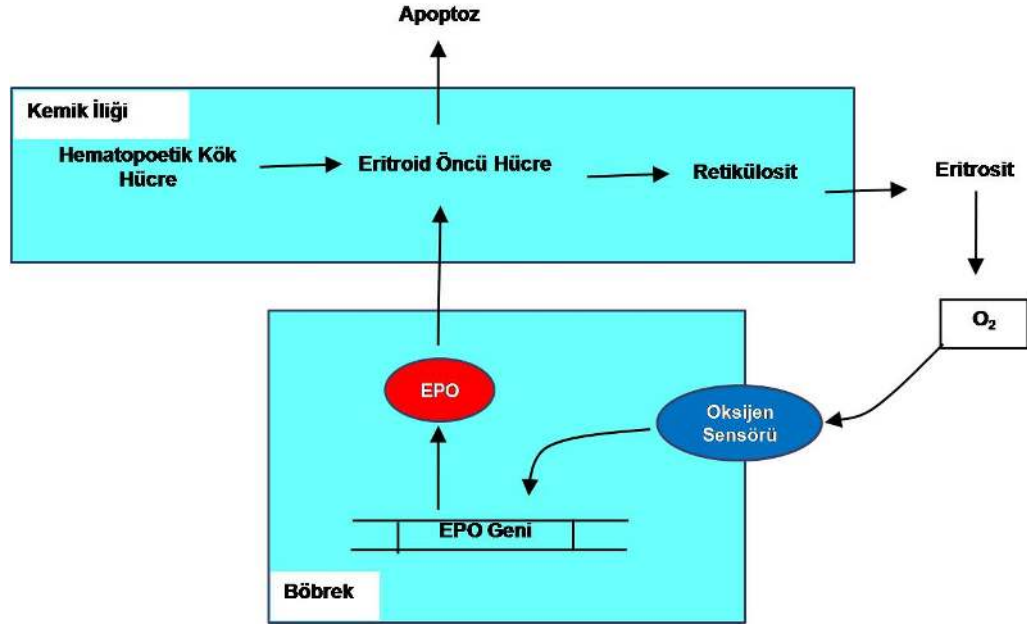


Şekil 3: Eritropoietin' in reseptörü ile etkileşimi

2.10. EPO ve EPOR' un Eritropoezdeki Rolü

Eritropoez – kırmızı kan hücresi eritrositlerin yapımı-, kemik iliğinde ya da karaciğerde gerçekleşir. Kırmızı kan hücrelerinin (RBC) görevi akciğerlerden O_2 taşınmasını ve tüm dokulara iletilmesini sağlamaktır ⁶⁹. Eritropoez, oksijen taşıma kapasitesinin artırılmasında önemli rol oynar ⁷⁰. Kırmızı kan hücrelerinin oluşumu çeşitli aşamalardan sonra gerçekleşir. Öncelikle erken hematopoietik öncüller eritroid serideki erken dönem hücrelerine (BFU-E) farklılaşır ⁷¹. BFU-E hücrelerinde EPOR ilk defa görülürken EPO bu dönemde gerekli değildir. Daha sonra ise BFU-E hücreleri eritroid serideki geç dönem hücrelerine (CFU-E) dönüşür. Bu hücreler için EPO yaşamsal önem taşımaktadır ve EPOR sentezini de arttırmaktadır ^{72,73}. EPO' nun sürekli uyarılması hücrelerin retikülositlerin çekirdeksiz formu olan eritroblastlara farklılaşmasını tetikler. Sonraki 5 gün içerisinde ise retikülin kaybı gerçekleşir ve olgun kırmızı kan hücreleri oluşur. Retikülositler ve RBC 'ler EPOR sentezini durdurur ve hücreler EPO cevabına bağımlı olmaktan çıkarlar ⁷³.

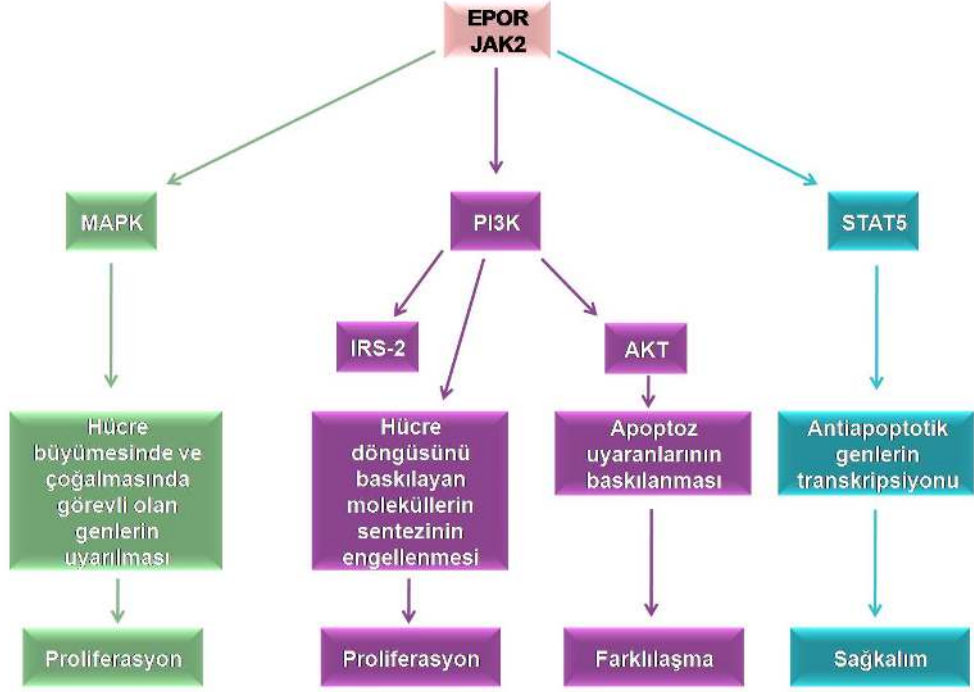
EPO kemik iliğinde tek başına eritropoezi uyarmaz. EPO aracılı eritropoezde farklı moleküllerin de görev aldığı bilinmektedir ^{74,75}



Şekil 4: Eritropoezin kontrolü

Oksijenin azalması sonucunda böbrek hücrelerinde bulunan oksijen sensörleri aracılığıyla EPO geni uyarılır. Sonuç olarak EPO ifadesi parakrin etki göstererek kemik iliğindeki eritrosit öncüllerini uyarır ve eritrosit yapımını tetikler ⁷⁶. (Şekil 4).

IL-3 ve EPO gibi hematopoietik sitokinler hematopoezin kontrolünden sorumludurlar ve STAT5, PI3K/AKT ve Ras/MEK/ERK sinyal yollarını aktive ederler⁷⁷. PI3K' nın hematopoietik hücrelerde yüksek düzeyde ifade edildiği gözlenmiştir. Hematopoietik hücrelerin sitokinle uyarılması IL-3 reseptöründe PI3K bağlanma bölgesi oluşturularak PI3K' nın hızlı bir şekilde aktivasyonuna yol açar ⁷⁸. Aynı zamanda STAT5A ve STAT5B' nin hematopoietik hücrelerin sağkalımı ve proliferasyonunda önemli rol aldığı bilinmektedir ⁷⁹. Şekil 5'de özetlendiği gibi EPO/EPOR sinyal iletim yolağı farklı ikincil habercileri uyarak farklı hücresel cevaplar oluşturur.



Şekil 5: EPO ve EPOR' un hücre içinde farklı iletim yollarını uyarması

2.11. EPO ve EPOR' un Diğer Dokulardaki Roller

Yapılan çalışmalar EPO ve EPOR moleküllerinin hematopoietik olmayan çeşitli dokularda (beyin, kalp, kan damarları, gastrointestinal dokular, dalak, pankreatik adacıklar, testis, uterus, plasenta ve meme epitelyum hücreleri) ifade edildiğini göstermiştir ^{35,80-85}. Farklı organlarda üretilen bu EPO molekülleri arasında yapısal ya da işlevsel olarak farklı olan bir varyant tanımlanmamıştır ⁸⁵.

EPO mRNA' sı insan ve fare beyinlerinin korteks ve hipokampus bölgelerinde sürekli ifadelenir ⁸⁶. Hücresel düzeyde nöronlar ve astrositler serebral EPO' nun esas kaynağıdır ve kan-beyin bariyeri ile sistemik dolaşımdan ayrılmıştır ^{86,87}. Gelişimsel olarak EPO üretiminde önemli değişikliklerin olmadığı bildirilmiştir ⁸⁸. Merkezi Sinir Sistemin

(MSS)' de sürekli EPO ifade edilmesinin kontrolünü sağlayan enhancer gibi dokuya özgü kontrol dizileri bilinmemektedir. Serebral EPO'nun işlevi olarak endokrin-den daha çok parakrin etkili olabileceği düşünülmektedir. İskemi ve hipoksiye karşı endojen olarak koruyucu olarak iş gördüğü gibi nöronal hücrelerin sağ kalımı için nörotrofik faktör olarak işlev görür^{86,88}. Nöronal kök ve progenitor hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır^{88,89}.

EPO mRNA ifadesi akciğer, dalak, testis ve plasenta da tanımlanmıştır ancak akciğer ve dalaktaki ifade düzeyi düşüktür. Bu organların bölgesel ve sistemik EPO homeostazı üzerindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak testis dikkate alındığında testis-kan bariyeri nedeniyle beyinde olduğu gibi endokrin etkiden çok parakrin etki gösterebilir⁹⁰.

EPO kalpte miyositler ve fibroblastlar üzerinde anti-apoptotik etki gösterir^{91, 92}.

Fare uterusunun östrojen varlığında EPO VE EPOR mRNA'sını ifade ettiği belirlenmiştir⁹³. Sağlıklı insan uterusunda EPO ve EPOR düzeyini araştıran tek çalışmada menstrüel döngü boyunca her iki genin mRNA düzeylerinin değiştiği gösterilmiştir. Her iki proteinin miktarının proliferatif fazda artmaya başladığı ve sekretuar fazda yüksek miktarını koruduğu belirlenmiştir⁸¹.

2.12. EPO ve EPOR Proteinlerinin Tümör Dokularındaki Roller

EPO/EPOR yolağının diyabetik retinopati ve kanser gibi patolojik anjiyogeneizde etkili olduğu gösterilmiştir⁹⁴. EPO ve EPOR' un

çeşitli tümör dokularında ifade edildiği belirlenerek, kanser gelişimine neden olabileceği önerilmiştir ^{95,96}.

EPO molekülü tümör gelişiminde önemli bir faktör olan hipoksik koşullardan etkilenmektedir ve dolaşımdaki düzeyi artmaktadır. Aynı zamanda EPO, VEGF gibi anjiyojenik moleküller ile artan HIF-1 α tarafından indüklenir ⁹⁷. Özellikle EPO neoanjiyogenez, kanser hücrelerinin sağkalımı ve tümör gelişiminde önemli rol oynamaktadır ⁷⁶.

Meme ve servikal kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar sonucunda EPO veya EPOR sinyalinin tümör progresyonunu etkileyen yeni bir faktör olabileceği belirtilmiştir ⁹⁸. Lai ve ark. baş ve boyun kanserlerinde yaptıkları bir çalışmada EPO/EPOR/STAT5 yolağının aktif olduğunu göstermişlerdir ⁹⁹. Meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucunda eritropoietin'in etkisini MAP kinaz bağımlı yol aracılığıyla gösterdiği belirlenmiştir ¹⁰⁰. Ayrıca hamster over hücrelerinde MAP kinaz bağımlı yolağın dışında PI3K aracılığıyla sinyal iletiminin gerçekleştiği gösterilmiştir ¹⁰¹. İnsan melanom hücre hattına yapılan başka bir çalışmaya göre rekombinant EPO uygulaması sonucu EPOR' un arttığı ve PI3K/AKT yolağının aktifleşerek sağkalımı arttırdığı gözlenmiştir ¹⁰² (Şekil 5).

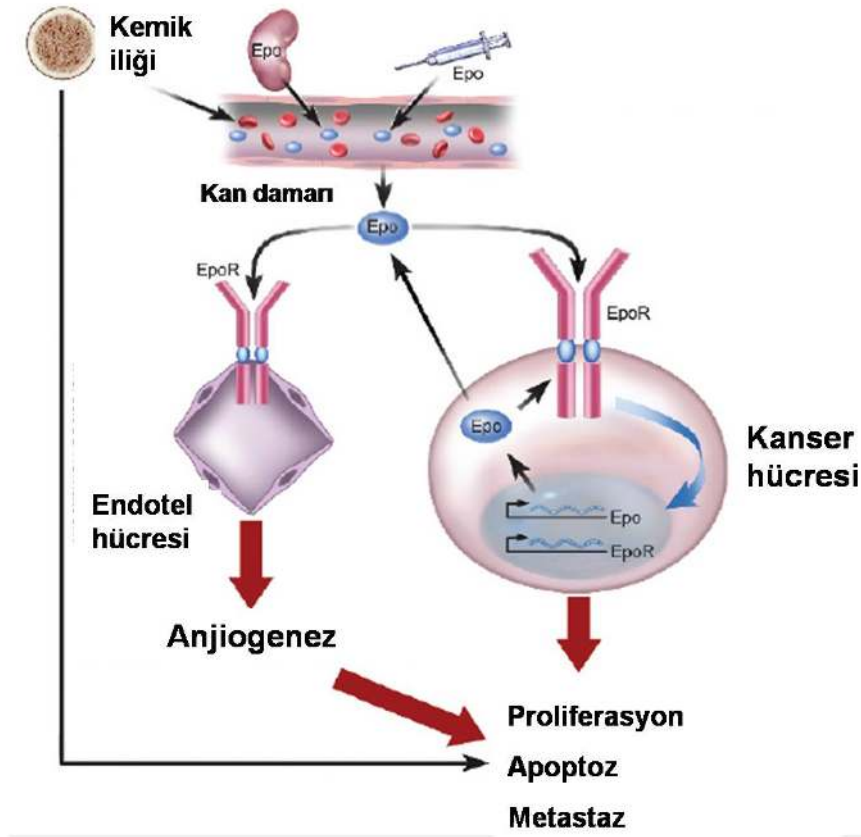
2.13. EPO'nun Klinikte Kullanımı

Anemi, kanser hastalarında bağımsız bir prognostik faktördür ¹⁰³. Kronik hastalıklarda görülen anemiye ek olarak beslenme yetersizliği, kanama, hemoliz ve kemoradyoterapi anemiye neden olmaktadır ⁷⁶. EPO' nun eritropoezi uyarma yeteneği, anemi ile seyreden kronik hastalıklarda EPO' nun klinik kullanımına olanak sağlamaktadır. Birçok kanser tipinde rekombinant EPO (rHuEPO) tedavi amaçlı kullanılabilir ⁷⁶. Epoetin- α , epoetin- β ve darbepoetin- α gibi rHuEPO kullanımı tedavi gören hastaların yaşam kalitesinin yükselmesi ve hemoglobin düzeylerinin

artmasına yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda rHuEPO kullanımı anemik kanser hastaları için önemli olan kan transfüzyonunun daha az kullanılmasını sağlamaktadır ¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Birçok klinik çalışmada anemik kanser hastalarında rHuEPO kullanımının hastaların sağkalımında önemli etki gösterdiği gözlenmiştir. Kemoradyasyon ve rHuEPO birlikte kullanımı skuamöz hücre karsinomlarında kontrollere oranla sağkalım oranını önemli derecede arttırmıştır ¹⁰⁸.

rHuEPO' nun anemik kanser hastalarındaki faydalarının yanı sıra çeşitli yan etkilerinin olduğu da bilinmektedir ^{109,110}. Örneğin kemoterapi alan meme kanseri hastaları ¹¹⁰ ve radyoterapi alan baş ve boyun kanserli ¹⁰⁹ hastalara rHuEPO terapisi uygulandığında sağ kalım oranının düştüğü ve tümör büyümesinin gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca, meme kanserli hastalarda derin venöz trombozu insidansında artış gözlenmiştir. Bunun nedeninin tümör hücrelerinde EPOR varlığı olabileceği önerilmiştir ¹¹¹.

Son zamanlarda renal kanser gelişimindeki EPO sinyalinin parakrin ve otokrin rolü olduğu bilinmektedir ¹¹². Şekil 6' da gösterilen modele göre böbrek hücrelerinde üretilen ya da dışarıdan alınan EPO sistemik dolaşım aracılığıyla reseptörüne bağlanır. EPOR, otokrin/parakrin etkiyle damar endotel hücrelerinde anjiogenezi, tümör hücrelerinde proliferasyon ve metastazı uyarırken, apoptozu baskılayabilir ^{67,113}.



Şekil 6: EPO'nun Otokrin/Parakrin Etkisi ⁷⁶

Bu bilgiler ışığında, genel olarak EPO/EPOR moleküllerinin ve aktifleştirdiği sinyal yollarının hematopoetik dokularda ve diğer dokularda normal hücresel işlevlerin gerçekleşmesi için gerekli olduğu görülmektedir. EPO/EPOR' un normal etkilerine ek olarak tümör hücreleri ve dokularında yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, EPO/EPOR' un kanser hücrelerinin çoğalmasında ve anjiogeneizde de etkili olduğunu göstermiştir.

Bu doktora tez çalışmasında, endometriyum tümör hücreleri ile sağlıklı hücreler arasında EPO, EPOR' un mRNA düzeyinde ifade farklılığı olup olmadığının kantitatif olarak belirlenmesini ve bu sonuçların protein düzeyinde de doğrulanmasını amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1.Cihazlar

- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Homojenizatör (T10 Basic Ultra-Turrax, IKA-Werke, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan FV-2400, Rusya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan TDB-120, Rusya)
- Masaüstü mini soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, ABD)
- pH metre (pH422, WTW, Almanya)
- Mikropipetler (Beta-Pette™ B.10, B.100, B.1000, CLP, ABD)
- Derin dondurucu (-86 °C) (Sanyo MDF-U53865, Japonya)
- Derin dondurucu (-30 °C) (Sanyo MDF-U333, Japonya)
- Güvenlik Kabini (DanLaf VFRS 1206, Danimarka)
- Azot tankı (Air liquide GT21, Fransa)
- Otomatik Isı Döngü Cihazı (Thermo Hybaid PCR-sprint, ABD)
- Real time PCR cihazı (Roche LightCycler, Almanya)
- Güç kaynağı (Thermo 3000P, ABD)
- Dikey elektroforez tankı (CBS Scientific DSG-190-02, ABD)
- Elektrobloiting tankı (CBS Scientific EBU-102P, ABD)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 100, Almanya)
- Çalkalayıcı (Biosan Multi Bio 3D, Rusya)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Tris-HCl (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- MgCl₂ (Merck, Almanya)

- CaCl_2 (Merck, Almanya)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- Sodyum hidroksit peleti (Merck, Almanya)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Steril distile su (Eczacıbaşı, Türkiye)
- DEPC'li (Dietilpirokarbonat) su (Biological Industries, İsrail)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- İzopropanol (Amresco, ABD)
- Saf etanol (Carlo Erba, İtalya)
- DNaz I rekombinant (Roche, Almanya)
- TaqMan Master mix (Roche, Almanya)
- EPO, EPOR ve GAPDH primerleri (Tıbbolbiol, Almanya)
- EPO, EPOR ve GAPDH LNA problemleri (UPL, Roche, Almanya)
- EPO primer antikoru (H-162), EPOR primer antikoru (M-20), β -aktin primer antikoru (#4967, Cell Signaling Technology, ABD)
- HRP bağlı anti-rabbit IgG sekonder antikoru (#7074, Cell signaling Technology, ABD)
- Protein moleküler ağırlık belirteci (Chemiluminescent BlueRanger, Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- Kodak GBX Developer/Replenisher (Sigma, ABD)
- Kodak GBX Fixer (Sigma, ABD)
- NaCl (Sigma, ABD)
- Na_2HPO_4 (Sigma, ABD)
- NaH_2PO_4 (Sigma, ABD)
- Tris bazı (Sigma, ABD)
- Akrilamid (Amresco, ABD)
- Bisakrilamid (Amresco, ABD)
- TEMED (Amresco, ABD)
- Amonyum persülfat (Amresco, ABD)

- Sodyum deoksikolat (Gerbü, Almanya)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma, ABD)
- NP-40 (Gerbü, Almanya)
- Tween-20 (Gerbü, Almanya)
- β -merkaptöetanol (Merck, Almanya)
- Gliserol (Gerbü, Almanya)
- Brom fenol mavisi (Merck, Almanya)
- Glisin (Gerbü, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- BupHTM Tris-Glycine Buffer Pack (Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- CL-XPosure Film (Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- RestoreTM Western Blot Stripping tamponu (Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- StartingBlockTM (TBS) Blocking Tamponu (Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- HaltTM Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- Ponceau S Boyası (Applichem, Almanya)
- Nitroselüloz Membran (Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- Whatman 3MM filtre kağıdı (Whatman, İngiltere)

3.1.3. Kitlet

- peqGOLD TriFastTM Dokudan RNA İzolasyon kiti (Pqqlab, Erlangen, Almanya)
- Transcriptör First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)
- BCA Protein Assay (Pierce/Thermo Scientific, ABD)
- Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce/Thermo Scientific, ABD)

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. 1 M Tris (pH 8.0) Stok Çözeltisi

1.211 g Tris bazı tartılıp son hacim 10 ml olacak şekilde distile su içerisinde çözöldü.

3.2.2. % 10' luk Sodyum Deoksikolat Stok Çözeltisi

1 g Sodyum deoksikolat tartılıp 10 ml distile su içerisinde çözöldü. Işıktan korunarak saklandı.

3.2.3. % 20' lik Stok SDS Çözeltisi

10 g SDS tartılıp son hacim 50 ml olacak şekilde distile suda çözöldü.

3.2.4. % 10' luk Stok SDS Çözeltisi

1 g SDS tartılıp son hacim 10 ml olacak şekilde distile su içerisinde çözöldü.

3.2.5. %1' lik Brom Fenol Mavisi

0.05 g Brom fenol mavisi tartılarak son hacmi 5 ml olacak şekilde distile su içerisinde çözöldü.

3.2.6. RIPA Tamponu

İçeriği 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH: 8.0), %0.5 Sodyum deoksikolat, %0.1 SDS, %0.1 NP-40 şeklindedir. RIPA tamponunun hazırlanmasında 0.438 g NaCl, 1M Tris bazından (pH: 8.0) 2.5 ml, %10' luk Sodyum deoksikolat stok çözeltisinden 2.5 ml, %10' luk stok SDS çözeltisinden 0.5 ml ve 0.5 ml NP-40 alınarak son hacim 50 ml' ye distile su ile tamamlandı.

3.2.7. 5X Elektroforez Tamponu

Son konsantrasyonu 125 mM Tris bazı, 960 mM Glisin ve %0.5 SDS içerecek şekilde hazırlandı. Çözeltinin pH' sı 8.3 olacak şekilde ayarlandı. 5X elektroforez tamponunun hazırlanması için 7.57 g Tris bazı, 36 g Glisin ve %20' lik stok SDS çözeltisinden 12.5 ml alınarak son hacim distile su ile 500 ml' ye tamamlandı.

3.2.8. 1X Elektroforez Tamponu

5X elektroforez tamponundan 200 ml alınarak 1000 ml' ye distile su ile tamamlandı.

3.2.9. Laemmli (2X) Tamponu (Yükleme tamponu)

İçeriği %4 SDS, %10 β -merkaptetanol, %20 Gliserol, %0.004 Brom fenol mavis, 0.125 M Tris-HCl şeklindedir. Çözeltinin pH' sı 6.8 'e ayarlanır. Laemmli (2X) tamponunun hazırlanması için %10' luk stok SDS çözeltisinden 4 ml, β -merkaptetanolden 1 ml, Gliserol 2 ml, %1' lik stok Brom fenol mavisinden 40 ul ve 0.197 g Tris-HCl karıştırılarak son hacim 10 ml' ye distile su ile tamamlandı.

3.2.10. Transfer Tamponu

Bir adet BupHTM Tris-Glycine Buffer paketi 400 ml distile su ile 100 ml metanol içerisinde çözüldü. Bunun sonucunda oluşan karışım 25 mM Tris bazı ve 192 mM Glisin (pH 8.0) içermektedir.

3.2.11. Membran Bloklama Çözeltisi

20 ml StartingBlockTM (TBS) Bloklama tamponu içerisinde son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde 20 μ l Tween-20 eklenerek hazırlandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2007-27 kodlu bu çalışma üniversitemiz yerel etik kurulu tarafından onaylandı. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Jinekolojik Onkoloji Bölümü'nde endometriyum kanseri tanısı alan 51 birey çalışmaya dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubunu ise 6'sı premenapozal, 5'i postmenopozal olmak üzere 11 gönüllü oluşturdu. Tüm hastalar ve sağlıklı gönüllüler çalışmaya alınmadan önce araştırma konusunda bilgilendirildi. Tüm olgulardan aydınlatılmış onamları alındı.

3.3.2. Doku Örneklerinin Alınması

Histerektomi sonrasında endometriyum kanseri hastalarının tümörlü ve normal dokularına ait örnekler patolog tarafından alınarak, her bir doku RNA ve protein izolasyonu yapılmak üzere 2 parçaya ayrıldı. Kontrol grubunda örneklemelerin tamamı steril pipette kanülü ile yapıldı. Örneklem sonucunda elde edilen doku üç eşit parçaya ayrıldı. Parçalardan ikisi RNA ve protein izolasyonu için ayrılırken, kalan parça Noyes¹¹⁴ kriterlerine göre endometriyal günlendirme yapılması için patolojiye gönderildi. Postmenopozal bireylere ait örnekler patoloji sonucuna göre herhangi bir endometriyal anormallik gözlenmediği durumlarda çalışıldı. Protein ve RNA izolasyonu için mikrosantrifüj tüplerine alınan örnekler sıvı azot tankına aktararak çalışılincaya kadar -80 °C' de saklandı.

3.3.3. Endometriyum Dokusundan Total RNA Saflaştırılması

Endometriyum doku örnekleri steril petride serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50 mg – 100 mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNaz ve RNaz içermeyen 1.5 ml' lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu. Örnekler izole edilinceye kadar - 80 °C' de saklandı.

Doku örneklerinden total RNA saflaştırma işlemi peqGOLD TriFast™ dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile işlemler güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- 1- 1.5 ml' lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokuların üzerine 1000 mikrolitre (μ l) TriFast eklendi ve homojenizatör ile parçalandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 2- 200 μ l kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- 3- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 4- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 μ l izopropanol eklenip karıştırıldı.
- 5- Örnekler 1.5 saat -20 °C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.

- 6- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 µl DNaz (µg başına 5U DNaz), 300 µl DNaz Buffer I ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dk 37 °C' de bekletildi.
- 7- Örneklerin üzerine 300 µl 25mM EDTA eklendi ve 65 °C' de 10 dk bekletildi.
- 8- 13.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 9- 1000 µl %75' lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 10- Çökelti üzerine tekrar 1000 µl %75' lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 11- Çökelti kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı.

3.3.4. cDNA Sentez Tepkimesi

Elde edilen RNA'ların saflık ve miktar değerleri NanoDrop ND-1000 spektrofotometre cihazında ölçülerek belirlendi. Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hegzamerler	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite (U)	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 U	0.5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

RT-PCR karışımı ince çeperli 0.2 ml' lik tüplere hazırlandıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

3.3.4.1. RT-PCR Programı

Otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lardan cDNA elde edildi.

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

Tepkime sonrası cDNA örnekleri Real Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20 °C' de saklandı.

3.3.5. Real Time PCR Reaksiyon Verimliliğinin Kontrolü

Elde edilen cDNA' lardan 5 dilüsyon serisi oluşturdu ve EPO, EPOR, ve GAPDH için bu dilüsyonlardan Real Time PCR yapılarak reaksiyonların verimliliği belirlendi.

3.3.6. EPO, EPOR Genlerinin İfade Düzeylerinin Real-Time PCR ile Değerlendirilmesi

EPO, EPOR, genlerinin ifadesinin kantitatif değerlendirmesi için Light Cycler™ (LC) cihazı kullanıldı. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu ve LC TaqMan Master mix kullanılarak gerçekleştirildi. EPO, EPOR, gen ifadelerini normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, GAPDH genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanılarak da çalışıldı. Tüm cDNA örnekleri her üç gen için de ikişer kez çalışıldı.

3.3.6.1. EPO Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

EPO genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 7' de gösterildi.

EPOF 5'- TCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTA-3'

EPOR 5'- CCCTGCCAGACTTCTACGG -3'

58 numaralı prob dizisi: 5'-GGATGGAG-3'

5' -TCCCAGACACCAAAGTTAATTCTA-3' 5' -GG

181 AGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTCTATGCCTGGAAGAGG

ATGGAG-3'

241 ATGGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAACTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCT

3' -GGCATCTTCAGACCGTCCC-5'

Şekil 7: EPO mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000252723 giriş no'lu dizi). (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 7' de gösterilen primer ve prob lar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: EPO Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
EPO PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
EPO PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
EPO TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

3.3.6.2. EPOR Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

EPOR genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 8'de gösterildi.

EPORF 5'-TTGGAGGACTTGGTGTGTTTC-3'

EPORR 5'-AGCTTCCATGGCTCATCCT-3'

69 numaralı prob dizisi: 5'-GGAGGAAG-3'

```

                                     5' -TTGGAGGACTTG
121 TTGCTGGCGGCCCGGGGGCCGAAGAGCTTCTGTGCTTCACCGAGCGGTTGGAGGACTTG
    GTGTGTTTC-3'
181 GTGTGTTTCTGGAGGAAGCGGCGAGCGCTGGGGTGGGCCCGGGCAACTACAGCTTCTCC
    5' -GGAGGAAG-3'
241 TACCAGCTCGAGGATGAGCCATGGAAGCTGTGTCGCCTGCACCA
    3' -TCCTACTCGGTACCTTCGA-5'
```

Şekil 8: EPOR mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000222139 giriş no'lu dizi). (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 8' de gösterilen primer ve proplar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: EPOR Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
EPOR PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
EPOR PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
EPOR TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

3.3.6.3. GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 9'de gösterildi.

GAPDHF 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

GAPDHF 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

60 numaralı prob dizisi: 5'-TGGGGAAG-3'

5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

61 TCTTCTTTTGGCTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTC

5'-TGGGGAAG-3'

121 GGAGTCAACGGATTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGT

3'-CCTAAACCAGCATAACCCG-5'

Şekil 9: GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. (Referans: ENST00000229239 giriş no'lu dizi).

Şekil 9'de gösterilen primer ve proplar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4'de gösterildi.

Tablo 4: GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
GAPDH PrimerF (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
GAPDH PrimerR (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µl
GAPDH TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
TaqMan mix (10x)	1x	1 µl
cDNA	-	1 µl

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'ler eklendi. Kapiller tüpler 3000-5000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler yerleştirildikten sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. EPO, EPOR ve GAPDH genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

EPO, EPOR ve GAPDH LC Deney Programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)

Program Verisi

Değer

Döngüler

1

Analiz Modu

-

Sıcaklık Hedefleri

Kısım 1

Hedef Sıcaklık (°C)

95

İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)

10:00 dk

Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)

20.0

Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)

Program Verisi

Değer

Döngüler

50

Analiz Modu

Çoğalma

Sıcaklık Hedefleri

Kısım 1

Kısım 2

Hedef Sıcaklık (°C)

95

60

İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)

10 sn

20 sn

Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)

20.0

10.0

Program 3. Soğutma

Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	30 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Reaksiyon sonucu her bir bireye ait EPO, EPOR ve GAPDH genleri mRNA ifade düzeyini gösteren crossing point (Cp) değerleri belirlendi. EPO, EPOR genlerinin ifade düzeyleri GAPDH' e göre normalize edildi.

3.4. Western Blot (WB) Yöntemi

Endometriyum kanseri hastalarının tümör ve normal doku örnekleri ile sağlıklı bireylere ait endometrial biyopsilerden ve EPOR ifadesinin pozitif olduğu bilinen normal böbrek dokusu ile renal hücreli kanser tümör dokusundan protein izole edildi. EPO ve EPOR proteinlerinin dokulardaki ifadesinin varlığı Western blot yöntemiyle belirlendi. Bunun için öncelikle β -aktin proteini WB yöntemi ile gösterilerek protein izolasyonunun gerçekleştiği ve kullanılan yöntemin çalıştığı gösterildi. Sonraki aşamada aynı örneklerde sırasıyla EPO ve EPOR molekülünün varlığı araştırıldı.

3.4.1. Dokudan Protein İzolasyonu

100 mg doku örneği buz üzerinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı 1000 μ l RIPA (parçalama) çözeltisi eklenip 10 μ l

proteinaz inhibitör kokteyli eklendi. Doku örnekleri homojenizatör yardımıyla 10 sn boyunca buz üzerinde parçalandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Örnekler +4 °C'de, 20 dakika 12.000 rpm' de santrifüj edilerek üst kısım bir başka mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve protein miktarının ölçümü yapıldı.

3.4.2. Protein Miktarının Ölçümü

Elde edilen total protein miktarının ölçümünde BCA Protein Assay kiti kullanıldı. Kit protokolüne uygun olacak şekilde konsantrasyonları 25 µg ile 2000 µg arasında değişen 7 adet Bovine Serum Albumin (BSA) dilüsyonları oluşturuldu. Kit içerisinde bulunan A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak elde edilen karışım standart protein dilüsyonlarına eklendi ve 30 dk 60 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda standartların konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 cihazında 562 nm dalga boyunda ölçülerek standart eğri hazırlandı. Dokudan izole edilen protein örnekleri de benzer şekilde hazırlandıktan sonra absorbans değerleri ölçülüp oluşturulan standart eğri yardımıyla protein miktarları belirlendi.

3.4.3. Proteinlerin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) Yürütülmesi

Jelin dökülmesi sırasında kullanılacak olan camlar öncelikle %100' lük etanol ile temizlendikten sonra, %70' lik etanol ile silinip distile sudan geçirildi ve üzerin toz parçası kalmayacak şekilde temizlendi. Büyük camın üzerine ayıraçlar yerleştirilip üstüne küçük cam kapatıldı ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde bantlanarak kısıkaçlar ile sabitlendi. Ayırma jelinin döküleceği seviyeyi belirlemek için camların arasına tarak yerleştirilerek tarakların 1.5 cm aşağısı işaretlendi. Bundan sonra ayırma jeli döküldü.

%8' lik SDS-PAGE jelinin (ayırma jeli) hazırlanması;

%30' luk Akrilamid karışımı	13.3 ml
1.5 M Tris bazı (pH 8.8)	12.5 ml
%10 SDS	0.5 ml
%10 Amonyum persülfat (AP)	0.5 ml
TEMED	0.03 ml

Son hacim dH₂O ile 50 ml' ye tamamlanır.

Yukarıda belirtilen miktarlarda Akrilamid, Tris bazı ve SDS bir miktar distile suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldükten sonra karışım Whatman kağıdından geçirilerek süzüldü ve son hacim 50 ml' ye tamamlandı. Bu karışım içine jeli dökmeden hemen önce yukarıda belirtilen miktarlarda AP ve TEMED eklendi. Jel karışımı daha önceden hazırlanan camların arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde işaretlenen düzeye kadar döküldü. Jelin kurumasını önlemek için üzeri distile su ile kapatıldı ve jel dik konumda yaklaşık bir saat tutularak polimerizasyonun olması beklendi. Polimerize olduktan sonra üst kısımdaki distile su uzaklaştırılarak %5' lik SDS-PAGE jelinin dökülmesi aşamasına geçildi.

%5' lik SDS-PAGE jelinin hazırlanması;

%30' luk Akrilamid karışımı	1.7 ml
1.0 M Tris bazı (pH 6.8)	1.25 ml
%10 SDS	0.1 ml
%10 Amonyum persülfat (AP)	0.1 ml
TEMED	0.01 ml

Son hacim dH₂O ile 10 ml' ye tamamlanır.

Yukarıda belirtilen miktarlarda Akrilamid, Tris bazı ve SDS bir miktar distile suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldükten sonra karışım Whatman kağıdından geçirilerek süzüldü ve son hacim 10 ml' ye tamamlandı. Bu karışım içine jeli dökmeden hemen önce yukarıda belirtilen miktarlarda AP ve TEMED eklendi. Jel karışımı daha önceden polimerize olmuş olan ayırma jelinin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü ve tarak yerleştirilerek kısıkaçlar ile sabitlendi. Jel dik konumda yaklaşık bir saat tutularak polimerizasyonun olması beklendi.

3.4.4. Örneklerin Yükleme İçin Hazırlanması

Daha önceden toplam protein konsantrasyonları belirlenmiş olan örneklerin her birinden 40 µg olacak şekilde protein karışımı alındı ve üzerine aynı hacimde Laemmli 2X SDS jel yükleme tamponu eklendi. Bu karışım 100 °C' de 5 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandıktan sonra yükleninceye kadar +4 °C' de bekletildi.

3.4.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi

Yürütmeden 1 saat kadar önce jel 4 °C' den alınıp oda ısısında bekletildi. Taraklar çıkartılarak dikey elektroforez tankına yerleştirildi ve 5X Tris-Glisin elektroforez tamponundan 1X tampon hazırlanarak jel tankına döküldü. Jel tanka yerleştirildi ve enjektör yardımı ile kuyucuklardaki akrilamid kalıntıları temizlendi. Denatüre edilmiş olan protein örnekleri ve boyalı peroksidaz işaretli protein moleküler ağırlık belirteci kuyucuklara yüklenerek elektroforez işlemi başlatıldı. Jelin yığınlama kısmında 100 V, 300 mA akım uygulanırken, örnekler ayırma jeline geçtiğinde ise voltaj 150' ye çıkartıldı ve yükleme boyası jelin alt kısmına gelince işlem sonlandırıldı.

3.4.6. Elektrobloiting (Protein Örneklerinin Nitroselüloz Membrana Aktarılması)

Bu amaçla ıslak transfer yöntemi kullanıldı. Elektroforez işlemi bittikten camların ayrılması ile ortaya çıkartılan jelin üst kısmı ve alt kısımları nitroselüloz membran büyüklüğüne uygun olacak şekilde kesilip atıldı ve jel 1X transfer tamponu içeren kabın içerisine alındı. Başka bir kabın içerisinde de Whatman 3 MM kağıtları koyularak transfer tamponu içerisinde ıslatıldı. Transfer kasedinin negatif kutuba bakacak olan kısmına bir adet sünger yerleştirilip tampon içerisinde ıslandıktan sonra üstüne 2 adet Whatman kağıdı koyuldu. Üzerine jel yerleştirildi. Jelin üstüne de daha önceden distile su içerisinde ıslatılıp transfer tamponunda bekletilen nitroselüloz membran yerleştirildi. Membranın üstüne de sırayla iki adet Whatman kağıdı ve bir sünger koyuldu. Bundan sonra transfer kasedi kapatılarak elektrobloiting tankına yerleştirildi ve tank 1X transfer tamponu ile dolduruldu. Transfer işlemi 300 mA' de 100 V akımda 2 saat süreyle gerçekleştirildi. Süre sonunda proteinlerin jelden nitroselüloz membrana aktırılıp aktarılmadığı Ponceau S boyası ile boyanarak kontrol edildi. Bu amaçla membran Ponceau S boya çözeltisinin içerisinde 3 dk bekletildi.

Örneklere ve protein moleküler ağırlık belirteci ait olan proteinlerin hepsi kırmızı bantlar şeklinde membranda görüldükten sonra membran distile suda 10 dk bekletilerek Ponceau S boyası uzaklaştırıldı ve bloklama aşamasına geçildi.

3.4.7. Bloklama

Membran yüzeyine antikorun özgül olmayan bağlanma yapmasını engellemek için StartingBlock™ (TBS) Bloklama tamponu kullanıldı. Bu tampona kullanmadan hemen önce %0.1 oranında Tween-20 eklendi. Tampon ile bloklama işlemi 30 dakika oda ısısında otomatik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirildi.

3.4.8. Membran Üzerindeki Proteinin İmmunolojik Gösterilmesi

Dokuda ifade edilen proteininin gösterilmesi için primer antikor bloklama amaçlı kullanılan tamponun içerisinde 1:1000 oranında seyreltildi. Membran 4 °C' de otomatik karıştırıcı kullanılarak bir gece inkübe edildi. Süre sonunda membran bloklama tamponu içerisinde 15 dk 4 kere yıkandı. Sonra proteinleri görünür hale getirebilmek için, primer antikorları tanıyacak olan 1:1000 oranında sulandırılan HRP konjuge anti-rabbit IgG sekonder antikorunu ile tekrar 60 dk inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez yıkanarak film çekimine geçildi.

3.4.9. Film Çekimi

Membran üzerine üretici firma talimatına uygun olarak reaktifleri 1:1 oranında karıştırılan Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate ile kaplandı ve 5 dakika bekletildi. Sonra kaset içerisine membran ve CL-XPosure™ Film yerleştirilerek 1-3 dk bekletildi ve film banyosu aşamasına geçildi. Bunun için Kodak GBX Developer/Replenisher ve Fixer çözeltileri kullanıldı. Bu solüsyonlarda

ikişer dakika bekletildikten sonra film distile su ile yıkandı ve protein bantları analiz edildi.

3.4.10. Membranın EPO (H-162) Antikoru İle Muamelesi

β -aktin proteini membran üzerinde yukarıda anlatılan şekilde gösterildikten sonra aynı membran üzerinde EPO proteini gösterildi. Bu amaçla membran Restore™ Western Blot Stripping tamponu içerisine yerleştirilerek 30 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra yukarıda anlatıldığı şekilde sırayla membran üzerindeki proteinin immünolojik gösterilmesi ve film çekimi işlemleri EPO'un gösterilmesi amacıyla tekrarlandı.

3.4.11. Membranın EPOR (M-20) Antikoru İle Muamelesi

EPO proteini membran üzerinde yukarıda anlatılan şekilde gösterildikten sonra aynı membran üzerinde EPOR proteini gösterildi. Bu amaçla membran Restore™ Western Blot Stripping tamponu içerisine yerleştirilerek 30 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra yukarıda anlatıldığı şekilde sırayla membran üzerindeki proteinin immünolojik gösterilmesi ve film çekimi işlemleri EPOR'un gösterilmesi amacıyla tekrarlandı.

3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Çalışılan endometriyum dokularında izlenen EPO ve EPOR mRNA ifadesine ait veriler REST (2008 Beta V2.0.7) programı ile karşılaştırıldı ¹¹⁵. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Çalışmada gruplar arasındaki, menapozal durum, hipertansiyon, diyabet, koroner arter hastalığı, obezite, sigara kullanımı, aile öyküsüne ait değerlendirmeler Pearson ve Fisher'in ki-kare testi ile, yaşa ait analizler ise one-way ANOVA testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Dr. Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Jinekolojik Onkoloji Bölümü'nde endometriyum kanseri tanısı alan 51 birey çalışmaya dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubunu Noyes günlendirmesine göre lüteal fazda olduğu belirlenen 6 birey ile postmenopozal dönemde olan 5 birey oluşturdu. Çalışma grubunu oluşturan olgulara ait klinik ve histopatolojik özellikler Tablo 5' de verilmiştir. Endometriyum kanseri hastaların yaşları 18-77 arasında değişmekte olup, ortalama yaşları 56.08 ± 11.67 ' di. Olguların tanı aldığı sırada 17 tanesi (%33.33) premenopozal, 34 tanesi ise (%66.66) postmenopozal dönemdeydi. Olgulardan 33' ü (%64.70) klasik tip, 5 (%9.80) tanesi skuamöz farklılaşma gösteren, bir (%1.96) tanesi sekretuar olmak üzere 39 olgu (%76.47) endometrioid adenokarsinom tanısı alırken, 2 (%3.92) olgu papiller seröz adenokarsinom, bir (%1.96) olgu berrak hücreli karsinom, 2 (%3.92) olgu müsinöz karsinom, bir olgu (%1.96) skuamöz karsinom ve 6 (%11.76) olgu mikst tip tanısı aldı. Histopatolojik tümör evrelendirmesi açısından hastaların 41 (%80.39)' i evre I, bir (%1.96)' i evre II, 6 (%11.76)' sı evre III ve 3 (%5.88)' ü evre IV olarak tanımlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların 32 (%62.74)' si %50' nin altında miyometrial invazyon gösterirken, 19 (%37.25)' u %50' nin üstünde miyometriyal invazyon göstermiştir. Hastaların 43 (%88.23)' ünde lenf nodu tutulumu negatifken, 8 (%15.68) tanesinde lenf nodu pozitifliği gözlenmiştir.

Çalışma kapsamına alınan hastaların 29 (%56.8)'unda hipertansiyon gözlenirken, 22 (%43.13) sinde gözlenmemiştir. 9 (%17.64) olgu diyabet hastasıyken, 42 (%82.35) olguda diyabet gözlenmemiştir. 51 olgunun sadece bir (%1.96)' inde koroner arter hastalığı, 4 (%7.84) ünde obezite, 3 (%5.88) ünde sigara alışkanlığı ve 4 (%7.84) hastada ailede

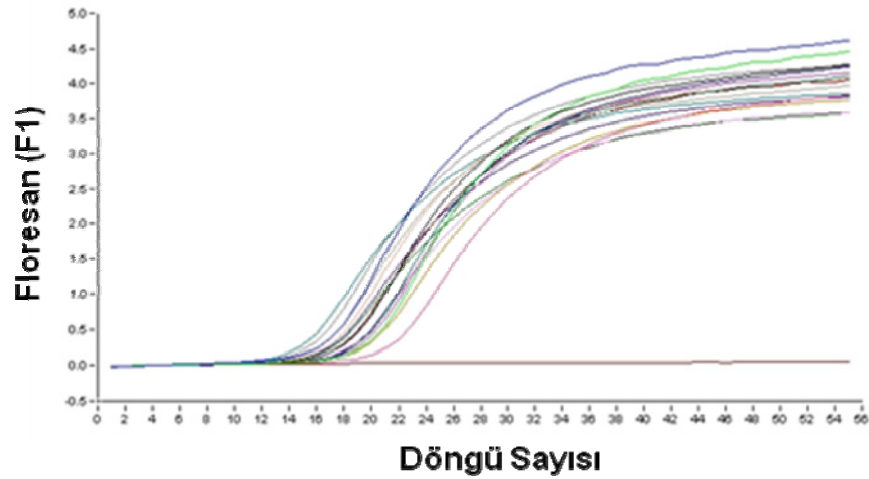
kanser öyküsü bulunmaktadır. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı olan bireylerde ise yaş ortalaması 50.18 ± 14.14 olup yaşları 32-69 arasında değişmekteydi. Sağlıklı bireylerin 6 (%54.54) tanesi premenapozal (luteal fazda) iken 5 (%45.45) tanesi postmenapozal dönemdedir. Sağlıklı bireylerin 3 (%27.27)'ünde hipertansiyon, bir (%8)'inde diyabet, bir (%8)'inde koroner arter hastalığı, bir (%8)'inde sigara alışkanlığı ve bir (%8) bireyde kanser öyküsü gözlenmiştir. Hasta ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında yaş, menapozal durum, hipertansiyon, diyabet, koroner arter hastalığı, obezite, sigara kullanımı ve aile öyküsü açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlemedik ($p < 0.05$) (Tablo 5).

Tablo 5: Hasta ve sağlıklı bireylere ait klinik ve histopatolojik özellikler

Klinikopatolojik Özellikler	Olgu sayısı (n=51)	(%)	Sağlıklı kontroller (n=11)	(%)	P değeri
Ortalama yaş	56.08±11,67		50.18±14.14		0.149
(≤45)	10	19.60	6	54.54	0.115
(>45)	41	80.39	5	45.45	
Menapozal durum					
Premenapozal	17	33.33	6	54.54	0.499
Postmenapozal	34	66.66	5	45.45	
Histopatolojik Tip					
Endometrioid (klasik tip)	33	64.70	-	-	
Endometrioid (skuamoz dif)	5	9.80	-	-	
Sekretuar	1	1.96	-	-	
Papiller seröz adenokarsinom	2	3.92	-	-	
Berrak hücreli karsinom	1	1.96	-	-	
Musinöz karsinom	2	3.92	-	-	
Skuamöz karsinom	1	1.96	-	-	
Mikst tip	6	11.76	-	-	
Histopatolojik Evre					
I	41	80.39	-	-	
II	1	1.96	-	-	
III	6	11.76	-	-	
IV	3	5.88	-	-	
Miyometrial invazyon					
<1/2	32	62.74	-	-	
>1/2	19	37.25	-	-	
Lenf nodu tutulumu					
Negatif	43	88.23	-	-	
Pozitif	8	15.68	-	-	
Hipertansiyon					
Negatif	22	43.13	8	72.73	0.075
Pozitif	29	56.86	3	27.27	
Diyabet					
Negatif	42	82.35	10	91	0.484
Pozitif	9	17.64	1	8	
Koroner Arter Hastalığı					
Negatif	50	98.03	10	91	0.326
Pozitif	1	1.96	1	8	
Obezite					
Negatif	47	92.15	11	100	0.448
Pozitif	4	7.84	0		
Sigara kullanımı					
Negatif	48	94.11	10	91	0.552
Pozitif	3	5.88	1	8	
Aile Öyküsü					
Negatif	47	92.15	10	91	0.890
Pozitif	4	7.84	1	8	

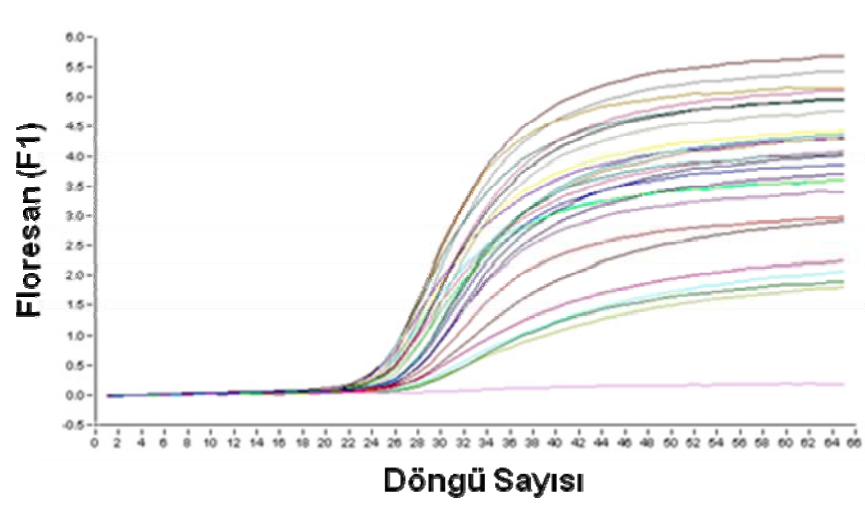
EPO, EPOR genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler™ cihazı kullanıldı. Hastaların tümör ve normal dokularıyla, sağlıklı kontrol grubundan alınan doku örneklerinden elde edilen cDNA'larda EPO, EPOR, ve GAPDH genleri özgül primerler ve UPL LNA probları kullanılarak çalışıldı. Tüm doku örneklerinde EPO ve EPOR'un mRNA düzeyinde ifade edildiğini belirledik.

EPO geninin mRNA düzeyinde ifade düzeyini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 10'da gösterilmiştir.



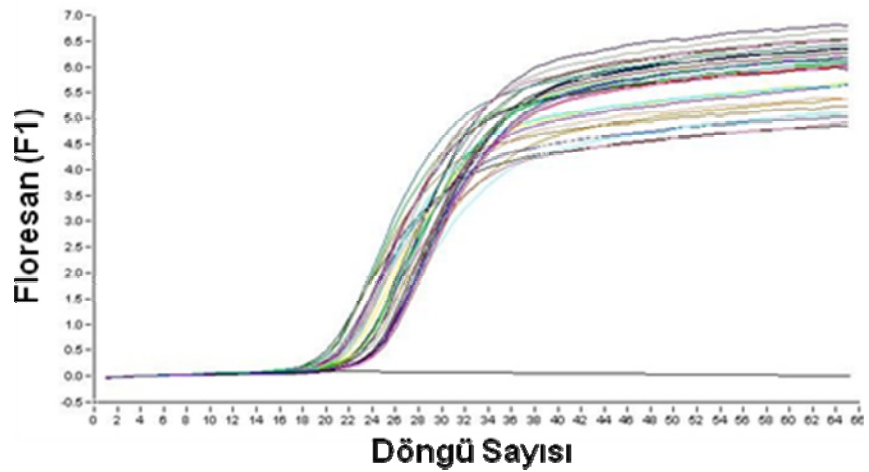
Şekil 10: EPO geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri; EPO geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

EPOR geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11: EPOR geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. EPOR geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

EPO, EPOR genlerinin normalize etmek için seçilen GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 12’ da gösterilmiştir.



Şekil 12: GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Relatif gen ifade sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı ¹¹⁵. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E (\text{hedef})^{\Delta Ct (\text{kontrol} - \text{hasta})}}{E (\text{referans})^{\Delta Ct (\text{kontrol} - \text{hasta})}}$$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresans sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade eder. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

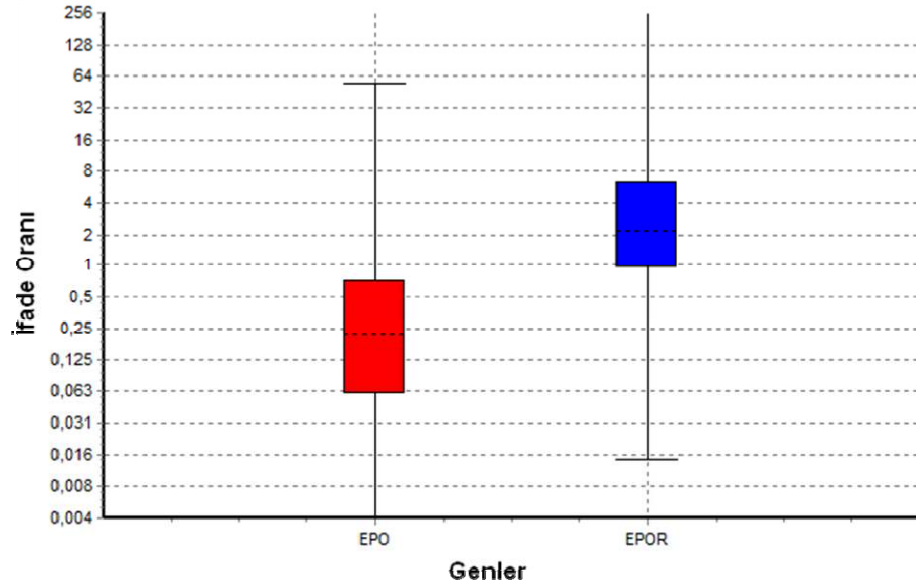
4.1. EPO Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi

EPO geninin mRNA düzeyinde ifadesinin tümör dokularında normal dokulara göre 4.62 kat daha az olduğunu saptadık (ifade oranı= 0.216). Tümör dokusundaki bu azalmyı istatistiksel olarak da anlamlı bulduk (p=0.0001). Tümör dokularına ait sonuçlar sağlıklı kontrol sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, tümör dokusunda EPO geninin mRNA ifadesinin 5.31 (ifade oranı=0.188) kat azaldığını belirledik. Bu azalmanın istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu gösterdik (p=0.0001).

4.2. EPOR Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirmesi

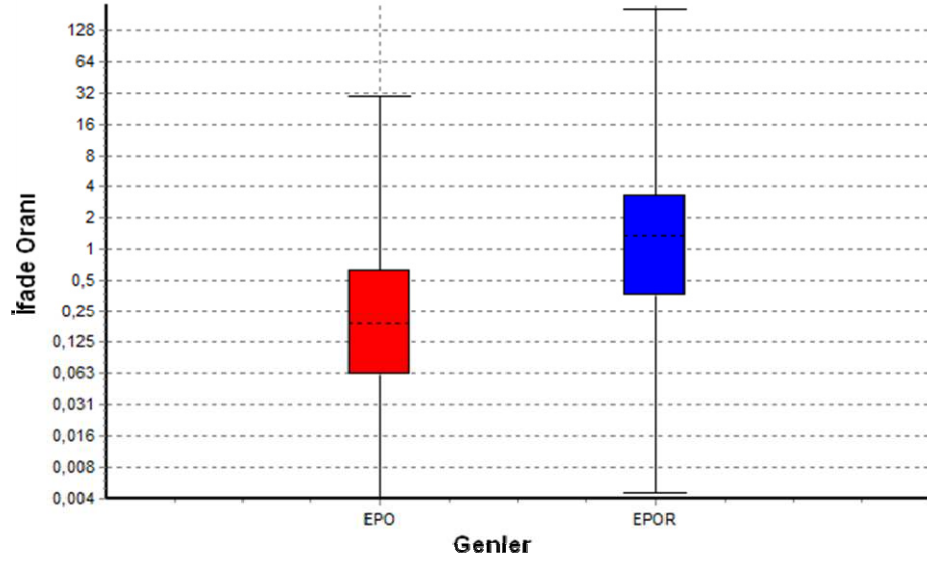
EPOR geninin mRNA düzeyinde ifadesinin tümör dokularında normal dokulara göre 2.69 kat daha fazla olduğunu gördük (ifade oranı= 2.692). Tümör dokusundaki bu artışı istatistiksel olarak da anlamlı bulduk ($p=0.0001$). Tümör dokularına ait sonuçlar sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, iki grup arasında anlamlı bir fark gözlemedik ($p=0.626$).

Grafik 1'de hastalara ait tümör ve normal dokuların karşılaştırılması sonucu elde edilen EPO, EPOR genlerine ait sonuçların REST programıyla yapılan kutu grafiği gösterilmiştir.



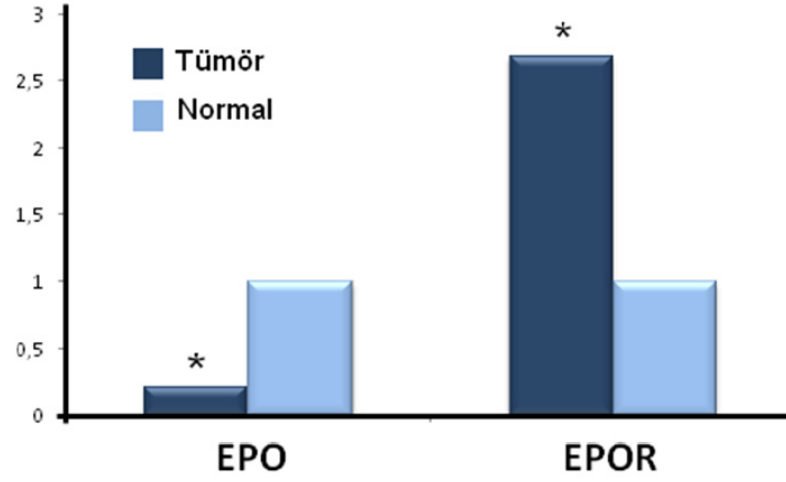
Grafik 1: Hastaların tümör ve normal dokularında EPO, EPOR genlerine ait sonuçların kutu grafiği ile gösterimi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. Kutunun ortasındaki çizgi ortanca, kutunun yukarısına veya aşağısına uzanan çizgiler sınır olarak bilinir. Üst sınırın sonunda en yüksek değer alt sınırın sonunda da en düşük değer gösterilmektedir.

Grafik 2' de ise Sağlıklı kontrollerden alınan dokular ile tümör dokuların karşılaştırılması sonucu elde edilen EPO, EPOR genlerine ait sonuçların REST programıyla yapılan kutu grafiği gösterilmiştir.



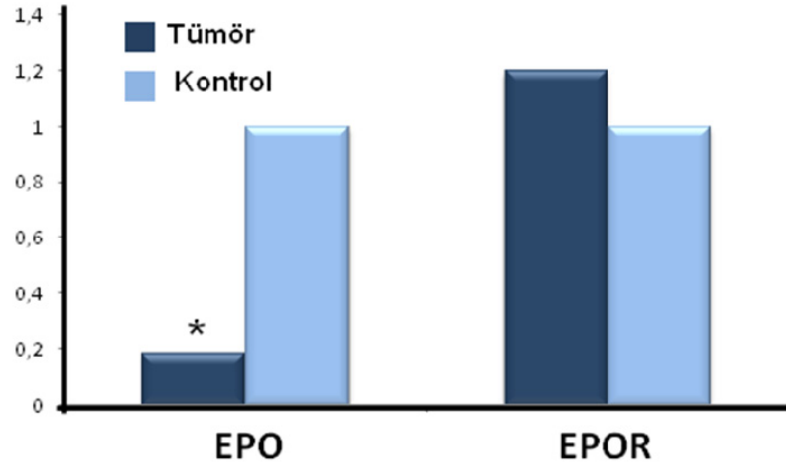
Grafik 2: Tümör ve sağlıklı kontrollerin endometriyum dokularında EPO, EPOR genlerine ait sonuçların kutu grafiği ile gösterimi. Kutular çeyrekler arası aralığı gösterir. Kutunun ortasındaki çizgi ortanca, kutunun yukarısına veya aşağısına uzanan çizgiler sınır olarak bilinir. Üst sınırın sonunda en yüksek değer alt sınırın sonunda da en düşük değer gösterilmektedir.

Hastaların tümör ve normal dokuların karşılaştırılmasıyla elde edilen EPO, EPOR genlerine ait mRNA ifadelerinde görülen artma ve azalma Grafik 3'de gösterilmiştir.



Grafik 3: Hastaların EPO, EPOR mRNA ifade düzeylerinin tümör ve normal dokularda karşılaştırılması. * Tümör ve normal dokular arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

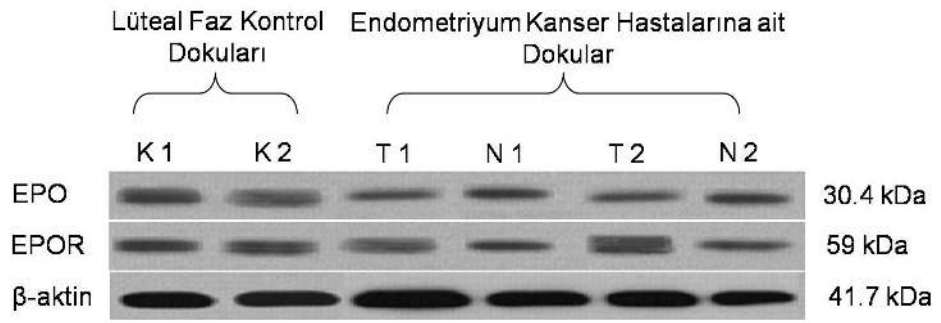
Sağlıklı kontrollerden alınan dokular ile tümör dokularının karşılaştırılması sonucu elde edilen EPO, EPOR genlerine ait mRNA ifadelerinde görülen azalma Grafik 4’ de gösterilmiştir.



Grafik 4: EPO, EPOR mRNA ifade düzeylerinin tümör ve sağlıklı kontrollere ait dokular ile karşılaştırılması. * Tümör dokuları ve sağlıklı kontrol endometriyum dokuları arasında istatistiksel olarak anlam olduğunu göstermektedir.

4.3. EPO ve EPOR Protein İfadesinin WB Yöntemi ile Analizi

mRNA düzeyinde elde edilen sonuçlar protein düzeyinde Western blot yöntemi ile doğrulandı. mRNA sonuçlarına uygun olarak EPO ve EPOR proteini sağlıklı kontrollerde ve endometriyum kanser hastalarına ait tümör ve normal dokularının hepsinde belirledik (Şekil 13).



Şekil 13: EPO, EPOR proteinlerinin Western blot yöntemi ile gösterimi.

K: sağlıklı kontrol dokusu, T: tümör dokusu, N:normal doku

5.TARTIŞMA

Endometriyum kanseri, batılı ülkelerde kadınlar arasında en sık görülen dördüncü kanserdir. Dünyada ise kadınlar arasında görülen kanserlerin %4'ünü oluşturur ¹¹⁶. Yapılan tahminlere göre 2009 yılında 42.160 kadının endometriyum kanseri tanısı alacağı ve bunlardan 7.780'inin ise hayatını kaybedeceği beklenmektedir. Endometriyum kanseri kadınlar arasında kansere bağlı ölümler sıralamasında sekizincidir ⁶.

Kanser gelişiminde sinyal iletim yollarında görülen anormal değişiklikler önemlidir. Bu yollarda görev alan moleküllerin aktivitelerinde ve miktarlarında görülen değişimler tümör gelişiminde etkilidir ¹¹⁷. Tümör gelişiminde etkili olduğu düşünülen EPO/EPOR sinyal iletim yolağı son yıllarda birçok kanser türünde çalışılmıştır.

EPO/EPOR yolağı esas olarak eritropoez olarak adlandırılan kırmızı kan hücrelerinin oluşturulmasında görevliken, bu yolağın hematopoetik olmayan dokularda da aktif olduğu ve bu dokulardaki hücrelerin fonksiyonları için gerekli olduğu belirlenmiştir ⁶⁶. Son yıllarda yapılan çalışmalar EPO/EPOR sinyal yolağının varlığını bazı kanser doku ve hücre hatlarında göstererek, bu sinyal iletim yolağının kanser hücrelerinin çoğalması adına, hücre bölünmesini tetiklediğini, apoptozu baskıladığını ve angiogenezi uyardığını belirlemiştir ⁷⁶. Bu çalışmalarda EPO ve EPOR mRNA' ları ile proteinleri çeşitli yöntemlerle gösterilerek kanserle olan bağlantısı araştırılmıştır.

Günümüze kadar semikantitatif yöntemle meme ^{96, 118, 119}, böbrek ¹¹², kolon ¹¹⁹, mide ¹¹⁹, prostat ¹¹⁹, pankreas ¹¹⁹, kadın üreme organları ¹¹⁹⁻¹²³, karaciğer ¹²⁴, beyin ¹²⁴, deri ¹¹⁹, ve akciğer ¹¹⁹ tümör dokuları ile hücre hatlarında EPO ve EPOR mRNA'larının ifade edildiği

belirlenmiştir. Ayrıca EPOR mRNA' sının varlığı prostat kanseri ¹²⁵ ile melanomlarda ¹²⁶ semikantitatif olarak gösterilmiştir.

EPO ve EPOR mRNA' larının semikantitatif olarak çeşitli tümörlerde ve hücre hatlarında araştıran çalışmalar fazla olmasına rağmen bu genlerin mRNA' larının kantitatif olarak tümör dokusunda araştıran sadece bir çalışma vardır. Bu çalışmada baş ve boyun tümör dokularında hem EPO hem de EPOR mRNA düzeyleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, lenf nodu metastazlı tümörlerde primer tümörlere göre hem EPO hem de EPOR mRNA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir ⁹⁹.

Kanser hücre hatlarında yapılan ve sadece EPOR mRNA düzeyinin kantitatif olarak belirlendiği çalışmaların sayısı da oldukça azdır. Literatürde belirlenen dört çalışma bulunmaktadır. Baş ve boyun kanseri ¹²⁷, melanom ¹⁰², glioblastom ¹²⁸ ve mesane kanseri ¹²⁹ hücre hatları EPOR mRNA' sının bakımından pozitif bulunmuştur.

Çeşitli kanser ve hücre hatlarında EPO, EPOR genlerinin ifadesini protein düzeyinde immunohistokimyasal yöntemle belirleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda EPO proteininin varlığı çeşitli kanserlere ait tümör dokularında belirlenmiştir ^{99,118,121,124,130,131}. Ancak, farklı tümör dokularındaki EPO ifadesi karşılaştırıldığında protein ifade durumunun homojen olmadığı görülmektedir. Örneğin, Arcasoy ve ark. ¹¹⁸ EPO'nun meme kanserinde %60 oranında ifade edildiğini göstermiştir. Bu orana yaklaşık olacak şekilde Dagnon ve ark. ¹³⁰ ise akciğer kanserinde EPO ifadesini %50 oranında olduğunu göstermiştir. Buna karşın, Acs ve ark. ⁹⁶ ise tümör dokusunun sadece hipoksik bölgelerinde EPO proteini gözlemiştir.

Çeşitli kanserlerde EPOR proteininin varlığını immunohistokimyasal yöntemle belirleyen çalışmalar olmasına rağmen

ticari olarak piyasada satılan anti-EPOR antikorlarının özgül olmamasından dolayı elde edilen sonuçlar güvenilir değildir. Bu durum 2006 yılında Elliott ve ark.¹³² tarafından EPOR proteininin dizisinin çıkartılmasıyla ortaya çıkmıştır. EPOR proteinin aslında literatürde o zamana kadar belirtildiği gibi 66 kDa değil, 59 kDa olduğu gösterilmiştir¹³². Elliott ve ark.¹³² ticari olarak satılan ve en çok çalışılan anti-EPOR antikorlarını seçerek yaptığı çalışmada, bu antikorların EPOR'a özgül olarak bağlanmadığını ısı şoku proteinine (HSP70) de bağlandığını belirlemiştir. EPOR proteinin varlığının sadece Western blot yöntemi ile M-20 (Santa Cruz) antikoru kullanarak belirlenebileceği gösterilmiştir. Ancak, bu antikoru da immunohistokimyasal olarak kullanımının yanıltıcı olduğu belirtilerek kullanılması önerilmemiştir¹³². EPOR proteininin yüksek oranda ifade edildiği böbrek dokusunda yapılan bir çalışmada, Elliot ve ark.¹³² tarafından Western blot yöntemi ile çalışılması önerilen M-20 antikoru özgülüğü doğrulanmıştır¹³³. Brown ve ark.¹³⁴ 2007 yılında küçük hücre dışı akciğer kanserleri (NSCLC) hastalara ait doku örneklerinde C-20 antikoru immunohistokimyasal analizler için uygun olmadığını göstermiştir.

Gliablastom¹²⁸ ve mesane¹²⁹ hücre hatlarında yapılan çalışmalarda uygun antikor kullanımıyla EPOR proteinin varlığı Western blot yöntemi ile gösterilmiştir.

EPOR molekülü için uygun M-20 antikoru kullanarak Western blot yöntemi ile yaptığımız çalışmada endometriyum kanseri hastalarına ait tümör ve normal dokular ile sağlıklı kontrollere ait endometriyum örneklerinde EPOR ifadesini film üzerinde 59 kDa büyüklüğe karşılık gelen band şeklinde gösterdik.

Ancak Elliott¹³² 'ın C-20 antikoru immunohistokimyasal olarak kullanılmasının yanıltıcı olduğunu belirtmesinden sonra da serviks¹³⁵, beyin^{136,137}, meme^{138,139}, prostat¹⁴⁰ ve dil¹⁴¹ kanserlerinde EPOR' un

varlığı bu antikor ile immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Dolayısı ile son yıllarda yapılan bu çalışmalar ve benzer şekilde antikorun uygun olmadığının belirtilmesinden önce yapılmış olan meme^{80,96,118}, serviks¹²⁰, baş ve boyun¹⁴², akciğer¹³⁰ ve endometriyum¹⁴³ kanserlerindeki araştırmalardan alınan sonuçların tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir. Çünkü bu çalışmalarda elde edildiği söylenen EPOR immunreaktivitesinin bir kısmı aslında HSP70 proteininden kaynaklandığı için araştırılan dokularda EPOR' un ifadesinde gözlemlendiği belirtilen değişiklikler tam olarak gerçeği yansıtmamaktadır. Bu nedenle, EPOR molekülüne özgül olarak bağlanan antikorların geliştirilmesi araştırmalardan elde edilen sonuçların doğruluğu ve tutarlılığı açısından gereklidir.

EPO ifadesini protein düzeyinde araştıran ve EPOR ifadesini yine açıkladığımız nedenden dolayı kısmen hatalı şekilde protein düzeyinde belirleyen çalışmalar arasında endometriyum kanserine ait tek çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada EPO ve EPOR ifadesi sadece protein düzeyinde immünohistokimyasal yöntem kullanılarak gösterilmiştir. Acs ve ark.¹⁴³ endometriyum tümör dokusunda EPO' nun %95 oranında, EPOR' un ise %100 oranında ifade edildiğini saptamışlardır. Bu araştırmadan elde edilen veriler ile kendi bulgularımız karşılaştırıldığında, çalışma grubumuzu oluşturan tüm dokularda EPO ve EPOR' un protein düzeyinde belirlenmesi nedeniyle sonuçlarımız uyumludur (Şekil 13). Ancak, endometriyum kanser dokularında EPOR varlığını uygun olmayan antikor kullanarak gösteren bu çalışmada EPOR ifadesi bakımından hatalı pozitif örneklerinde olabileceği unutulmamalıdır¹⁴³.

Sonuçlarımıza göre EPO mRNA ve protein düzeyi endometriyum kanser hastalarının tümör dokusunda normal dokusuna göre düşmüştür (Grafik 3). Normal endometriyumda EPO östrojen ile uyarılırken, tümör hücrelerinde ifade miktarının HIF-1α ile kontrol edildiği gösterilmiştir¹⁴³. Ancak, HIF-1α'nın çeşitli kanserlerde tümör

dokularındaki ifadesi %40-80 arasında olup, oldukça değişkendir ¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. EPO'nun tümör dokusundaki miktarının azalmasının, HIF-1 α 'nın tümör dokusunda düşük olması nedeniyle olabileceğini düşündürmektedir. Ozbudak ve ark. endometrioid adenokarsinomlarda HIF-1 α düzeyini düşük dereceli tümörlerde %9 olarak belirlemiştir ¹⁴⁸. Tablo 5' de görüldüğü gibi çalışmaya dahil ettiğimiz tümör dokularının büyük çoğunluğunun düşük dereceli endometrioid tiptir. Ozbudak ve ark.¹⁴⁸ çalışması EPO ifade düzeyinin tümör dokusunda azalmasından HIF-1 α 'ın sorumlu olabileceği düşüncemizi desteklemektedir.

Tümör dokusunda EPO miktarının sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında daha da düştüğü gözlenmiştir (Grafik 4). EPO ifadesi menstrüel siklus boyunca değişmektedir. Ancak luteal fazda en yüksek düzeyine ulaşmaktadır ⁸¹. EPO ifadesi sağlıklı endometriyum hücrelerinde östrojenden etkilenmektedir ¹⁴³. Sağlıklı kontrollerde EPO' nun ifade düzeyinin yüksek olması sağlıklı kontrol grubumuzun çoğunluğunu luteal fazda premenopozal bireylerin oluşturması olarak açıklanabilir. Ayrıca, tümör dokusunda EPO mRNA'sının hızlı parçalanmasına neden olabilecek olası moleküler değişimler nedeniyle, EPO mRNA'sı kontrol dokusuna oranla daha az oranda ifade edilmiş olabilir.

Tümör dokusundaki EPOR reseptör düzeyi sağlıklı kontrol sonuçları ile karşılaştırıldığında farklılık belirlenmemiştir. EPOR ifadesinin menstrüel siklus boyunca değiştiği, proliferatif fazın ortalarında miktarının arttığı ve bundan sonra geç sekretuar fazın sonuna kadar miktarının sabit olduğu gösterilmiştir. Luteal fazda ise en yüksek düzeyine ulaşmaktadır ⁸¹. Sağlıklı kontrollerde EPOR'un ifade düzeyinin tümör dokusundaki kadar yüksek olması sağlıklı kontrol grubumuzun çoğunluğunu luteal fazda premenopozal bireylerin oluşturması olarak açıklanabilir.

Hematopoietik doku dışında, EPOR moleküllerinin yapısal etkileşimleri henüz aydınlatılamamıştır. EPO ile etkileştikten sonra dimer

oluşturan EPOR molekülünün, farklı dokularda, hücre tiplerinde ya da farklı fizyolojik koşullarda başka reseptörler ile de etkileşerek değişik sinyal yollarının aktivasyonuna neden olabilir. Yapılan çalışmalarda, Granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF), interlökin 3 (IL-3) ve interlökin 5 (IL-5) reseptörlerinin alt ünitesi olan yaygın β reseptörünün (h β cR)'nin EPOR ile fiziksel birlikteliği ¹⁴⁹ ve işlevsel etkileşimi ¹⁵⁰ gösterilmiştir. Ancak, β cR knockout farelerde normal eritrosit olgunlaşmasının görülmesi reseptörün eritropoezde görevli olmadığını göstermiştir ¹⁵¹. Brines ve ark. β cR' nin EPOR ile birlikte ifade edildiği hematopoietik olmayan dokularda görevli olabileceğini önermiştir ¹⁵².

EPOR' un farklı reseptörlerle etkileştiğini gösteren çalışmalara ek olarak, EPOR' un EPO' dan bağımsız aktivasyon gösterebileceği de belirlenmiştir. Örneğin Paragh ve ark. ¹⁵³ over kanser hücre hatlarında yaptığı çalışmada EPOR' un bazı kanser hücrelerinde EPO yokluğunda bile aktif olduğunu göstermiştir. EPO' nun görev almadığı, sadece EPOR aracılı bir yolağın var olabileceğini ve bu yolağın bazı kanserlerin gelişiminde rol oynayabileceğini önermiştir.

Sonuç olarak; bulgularımız endometriyal tümörlerde EPOR'un ifade edildiğini göstermektedir. Ancak, endometriyum kanserinde reseptörün hangi ikincil habercileri uyardığı, dokuya özgü ifade artışından hangi moleküler mekanizmaların sorumlu olduğu ve reseptörün dokuda olası başka reseptörler ile etkileşime girip girmediğine ilişkin sorular cevaplandırılmayı beklemektedir. İleri moleküler tekniklerin kullanıldığı çalışmalarla daha detaylı bilgi elde edilebilecek, EPOR aracılı yolağın işlevsel olup olmadığının belirlenmesiyle, EPOR' un endometriyum kanser gelişimdeki rolü daha iyi anlaşılabilir. Böylece tanı, tedavi ve kanserden korunma anlamında yeni stratejiler oluşturulabilir.

6.SONUÇ

Bu tez çalışmasında, EPO/EPOR sinyal yolağının endometriyum kanser gelişimdeki olası etkisini araştırdık. Öncelikle hastalara ait tümör ve normal doku örnekleri ile sağlıklı kontrollerden alınan endometriyum örneklerinde EPO ve EPOR ifadesini mRNA düzeyinde karşılaştırdık. Elde edilen sonuçları protein düzeyinde doğruladık.

EPO geninin mRNA düzeyinde ifadesinin tümör dokularında normal dokulara göre 4.62 kat daha az olduğunu gördük (ifade oranı= 0.216). Tümör dokusundaki bu azalmayı istatistiksel olarak da anlamlı bulduk ($p=0.0001$). Tümör dokularına ait sonuçlar sağlıklı kontrol sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, tümör dokusunda EPO geninin mRNA düzeyinin 5.31 (ifade oranı=0.188) kat azaldığını belirledik. Bu azalmayı istatistiksel olarak da anlamlı bulduk ($p=0.0001$).

Bulgularımıza göre, EPOR geninin mRNA düzeyinde ifadesinin tümör dokularında normal dokulara göre 2.69 kat daha fazla olduğunu saptadık (ifade oranı= 2.692). Tümör dokusundaki bu artma istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p=0.0001$). Tümör dokularına ait verileri sağlıklı kontrollerle karşılaştırdığımızda, iki grup arasında anlamlı bir fark gözlemedik ($p=0.626$).

Sonuç olarak, endometriyum kanser oluşumunun moleküler temelini açıklanmasında EPO/EPOR yolağının etkisinin belirlenmesi için in vitro bulgularla da desteklenen çok yönlü başka moleküler çalışmaların da yapılması gerekmektedir.

7. ÖZET

Endometriyum Kanseri Gelişiminde Eritropoietin ve Eritropoietin Reseptör Genlerinin İfade Edilmesi

Endometriyum kanseri, kadın genital yollarının sıkça rastlanan neoplazisidir. Genetik ve epigenetik değişimler endometriyum kanseri gelişimi için risk faktörü olabilir. Eritropoietin reseptörü (EPOR) eritropoietin (EPO)' e bağlanarak etkisini gösteren sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda EPO/EPOR sinyal iletim yolağının kanser gelişiminde rol alabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, EPO ve EPOR genlerinin ifade düzeylerini belirleyerek endometriyum kanseri gelişimindeki olası rolünü araştırmayı amaçladık. Çalışmaya 51 endometriyal kanser hastası ve 11 sağlıklı birey dahil edildi. Tümör ve normal endometriyum dokularından ve sağlıklı bireylerden alınan endometriyum örneklerinden total RNA ve protein izolasyonu yapıldı. EPO ve EPOR genlerinin nicel mRNA ifade düzeyleri Real time PCR yöntemi ile ölçüldü. Tümör ve normal doku örneklerine ait sonuçlar karşılaştırıldığında, tümör dokularında EPO geninin mRNA ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken, EPOR mRNA düzeyinin anlamlı olarak arttığı belirlendi. Tümör ve sağlıklı bireylerden alınan endometriyum örneklerine ait sonuçlar karşılaştırıldığında ise, tümör dokularında EPO geninin mRNA ifade düzeyinin kontrol dokularına göre anlamlı olarak azaldığı gözlenirken, EPOR mRNA ifadesinin değişmediği saptandı. Her iki genin Western blot yöntemi ile protein analizleri yapılarak mRNA ifade düzeylerinde gözlenen değişimler doğrulandı. Endometriyum kanseri gelişiminde EPO/EPOR sinyal iletim rolünün belirlenmesinde için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Endometriyum kanseri, Eritropoietin, Eritropoietin reseptörü, Gen ifadesi, Western blot, Real-time PCR

8. SUMMARY

Expression of Erythropoietin and Erythropoietin Receptor Genes in the Development of Endometrial Cancer

Endometrial cancer is a common neoplasia of female genital track. Genetic and epigenetic alterations may constitute risk factors for development of endometrial cancer. Erythropoietin receptor (EPOR) activated by binding to erythropoietin (EPO) is a member of the cytokine receptor super family. Recent studies suggest that EPO/EPOR signaling pathway may play a role in cancer development. In this study, we aimed to investigate the possible roles of expression levels of EPO and EPOR genes in development of endometrial cancer. 51 endometrial cancer patients and 11 healthy controls took part in the study. Total RNA and protein were isolated from the endometrial samples obtained from tumor and normal endometrium tissues as well as healthy controls. Quantitative mRNA expression levels of the EPO and EPOR genes were identified by real-time PCR. When the results pertaining to tumor and normal tissue samples were compared, while a statistically significant decrease was observed in the mRNA expression level of the EPO gene in tumor tissues, an increase was observed in the mRNA expression level of the EPOR gene. When the results pertaining to the endometrium samples obtained from tumor and controls were compared, it was understood that while mRNA expression level of the EPO gene in the tumor tissue indicated a decrease as opposed to that of controls, mRNA expression level of the EPOR gene remained unchanged. The changes in the mRNA expression levels in both genes were verified through protein analysis by Western blot. Further studies are required to identify the role of EPO/EPOR signaling pathway in the development of endometrial cancer.

Key Words: Endometrial cancer, Eritropoietin, Eritropoietin receptor, Gene expression, Western blot, Real-time PCR

9. KAYNAKLAR

1. Berek JS, Adashi EY, Hillard PA. Uterus Kanseri, Eren L., Eren T., (çev), Bölüm 31, Ahmet Erk (editör), Novak Jinekoloji, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1998, sayfa 1057-110.
2. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. 5th Ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
3. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3rd Ed., Philadelphia, Saunders Company, 2006.
4. Luiz Junqueira L, Carneiro J, Basic Histology: Text & Atlas. 11th Ed. New York, The McGraw-Hill Companies, 2007.
5. Netter FH. Atlas of Human Anatomy. 4th edition, Philadelphia, Saunders Company, 2004.
6. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009; 59(4): 225-49.
7. Burke TW, Heller PB, Woodward JE, Davidson SA, Hoskins WJ, Park RC. Treatment failure in endometrial carcinoma. Obstet Gynecol 1990; 75: 96-101.
8. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. J Steroid Biochem Mol Biol 2008; 108 (3-5): 221-9.
9. Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, von Gruenigen VE. Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers,

prevention and survivorship. Gynecol Oncol 2009; 114(1): 121-7.

10. T.C.Sağlık Bakanlığı 2006 yılı istatistikleri
<http://www.ttb.org.tr/kutuphane/istatistik2006.pdf>

11. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 th edition, Philadelphia Saunders Company, 1999.

12. Sherman ME, Carreon JD, Lacey JV Jr, Devesa SS. Impact of hysterectomy on endometrial carcinoma rates in the United States. J Natl Cancer Inst 2005; 97(22):1700-2.

13. Wright JD, Fiorelli J, Schiff PB, Burke WM, Kansler AL, Cohen CJ, et al. Racial disparities for uterine corpus tumors: changes in clinical characteristics and treatment over time. Cancer. 2009; 115(6): 1276-85.

14. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, Cancer, Principles and Practice of Oncology. 6th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

15. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 1983; 15(1): 10-7.

16. Cirisano FD Jr, Robboy SJ, Dodge RK, Bentley RC, Krigman HR, Synan IS, et al. Epidemiologic and surgicopathologic findings of papillary serous and clear cell endometrial cancers when compared to endometrioid carcinoma. Gynecol Oncol 1999; 74(3): 385-94.

17. Liu FS. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. Taiwan J Obstet Gynecol 2007; 46(1): 26-32.
18. Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Hoffman B, Bradshaw K, Cunningham F, Williams Gynecology. New York, The McGraw-Hill Companies, 2007.
19. Luesley DM, Lawton FG, Berchuck A, Uterine Cancer. New York, Taylor & Francis Group, 2006.
20. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. Cancer Control 2009; 16(1): 8-13.
21. Benedet JL, Bender H, Jones H III, Ngan HYS, Pecorelli S. FIGO staging classifications and the clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Int J Gynecol Obstet 2000; 70: 209-262.
22. Kantarjian HM, Wolff RA, Koller CA, MD Anderson Manual of Medical Oncology, New York, The McGraw-Hill Companies, 2006.
23. Hacker N, Moore JG, Gambone J, Essentials of Obstetrics and Gynecology, 4th Edition, Philadelphia, Saunders Company, 2004.
24. Boruban MC, Altundag K, Kilic GS, Blankstein J. From endometrial hyperplasia to endometrial cancer: insight into the biology and possible medical preventive measures. Eur J Cancer Prev 2008; 17(2): 133-8.

25. Siren 2001 Sirén AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001; 101(3): 271-6.
26. Tilbrook PA, Klinken SP. The erythropoietin receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(10): 1001-5.
27. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999; 94: 1864–77.
28. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72(2): 449-89.
29. Muta H, Funakoshi A, Baba T, Uike N, Wakasugi H, Kozuru M, et al. Gene expression of erythropoietin in hepatocellular carcinoma. *Intern Med* 1994; 33(7): 427-31.
30. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 1997; 273: R1829-44
31. Palis J, Segel GB. Developmental biology of erythropoiesis. *Blood Rev* 1998; 12(2): 106-14.
32. Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-50-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 335–41.

33. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 1993; 44(5): 1149-62.
34. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991; 77(11): 2497-503.
35. Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 1775-93.
36. Mulcahy L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* 2001; 28(suppl 8): 19-23.
37. Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1985; 116: 2293-9.
38. Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, et al. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat Struct Biol* 1998; 5(10): 861-6.
39. Romanowski RR, Sytkowski AJ. The molecular structure of human erythropoietin. *Hemat Oncol Clin North Am* 1994; 8: 885-94. Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. *Science* 1994; 264: 1415 - 21.
40. Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol* 1986; 6(7): 2731-3.

41. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12(12):5447-54.
42. Galson DL, Tsuchiya T, Tendler DS, Huang LE, Ren Y, Ogura T, et al. The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol* 1995; 15(4): 2135-44.
43. Semenza GL, Dureza RC, Traystman MD, Gearhart JD, Antonarakis SE. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Mol Cell Biol* 1990; 10(3): 930-8.
44. Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD, Antonarakis SE. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(19): 8725-9.
45. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998; 83(8): 724-32.
46. Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG. EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 2002; 20(6): 485-92.
47. Sawyer ST, Hankins WD. The functional form of the erythropoietin receptor is a 78-kDa protein: correlation with cell surface expression, endocytosis and phosphorylation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; 90: 6849-53.

48. Hilton DJ, Watowich SS, Murray PJ, Lodish HF. Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(1): 190-4.
49. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14 (Suppl. 2): 22-8.
50. Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4895-902.
51. Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998; 43: 40-9.
52. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995; 11: 69-74.
53. Ihle JN, Thierfelder W, Teglund S, Stravopodis D, Wang D, Feng J, et al. Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 865: 1-9.
54. Quelle DE, Quelle FW, Wojchowski DM. Mutations in the WSAWSE and cytosolic domains of the erythropoietin receptor affect signal transduction and ligand binding and internalization. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 4553-61.
55. Yoshimura A, Zimmers T, Neumann D, Longmore G, Yoshimura Y, Lodish HF. Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor. *J Biol Chem* 1992; 267: 11619-25.

56. Syed RS, Reid SW, Li C, Cheetham JC, Aoki KH, Liu B, et al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature*. 1998; 395(6701): 511-6.
57. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 1992; 255: 306–12.
58. Tanner JW, Chen W, Young RL, Longmore GD, Shaw AS. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 6523–30.
59. Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF. The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Mol Cell* 2001; 7: 377–85.
60. Zhang MY, Barber DL, Alessi DR, Bell LL, Stine C, Nguyen MH, et al. A minimal cytoplasmic subdomain of the erythropoietin receptor mediates p70 S6 kinase phosphorylation. *Exp Hematol* 2001; 29(4): 432-40.
61. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood*. 2005; 105(2): 600-8.
62. Winkelmann JC, Penny LA, Deaven LL, Forget BG, Jenkins RB. The gene for the human erythropoietin receptor: analysis of the coding sequence and assignment to chromosome 19p. *Blood* 1990; 76(1): 24-30.

63. Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG. Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood* 1990; 76(1): 31-5.
64. Penny LA, Forget BG. Genomic organization of the human erythropoietin receptor gene. *Genomics* 1991; 11(4): 974-80.
65. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10638–41.
66. Maouche L, Lucien N, Cartron JP, Chretien S. A CCACC motif mediates negative transcriptional regulation of the human erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 1995; 233: 793–9.
67. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nuñez G, Fernández-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 1996; 88(5): 1576-82.
68. Rossert J, Eckardt KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(6): 1025-8.
69. Elliott SG, Foote M, Molineux G. Erythropoietins, Erythropoietic Factors, And Erythropoiesis: Molecular, Cellular, Preclinical, And Clinical Biology. 2nd Revised and Extended Ed., Basel: Springer Science and Media 2009.
70. Elliott S, Phama E, Macdougall LC. Erythropoietins: A common mechanism of action, *Experimental Hematology* 2008; 36: 1573–84.

71. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83: 59–67.
72. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 1991; 77: 2583–90.
73. Sawada K, Krantz SB, Kans JS, Dessypris EN, Sawyer S, Glick AD, Civin CI. Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J Clin Invest* 1987; 80(2): 357–66.
74. Cynshi O, Satoh K, Higuchi M, Imai N, Kawaguchi T, Hirashima K. Effects of recombinant human erythropoietin on anaemic W/W^v and Sl/Sl^d mice. *Br J Haematol* 1990; 75: 319–324.
75. Pharr PN, Hofbauer A, Worthington RE, Longmore GD. Residual erythroid progenitors in W/W mice respond to erythropoietin in the absence of steel factor signals. *Int J Hematol* 2000; 72: 178–185.
76. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2): 332–9.
77. Iiyama M, Kakihana K, Kurosu T, Miura O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell Signal* 2006; 18: 174–182.

78. Shelton JG, Steelman LS, Lee JT, Knapp SL, Blalock WL, Moyer PW, et al. Effects of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 2003; 22(16): 2478-92.
79. Santos SC, Lacronique V, Bouchaert I, Monni R, Bernard O, Gisselbrecht S, et al. Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene* 2001; 20(17): 2080-90.
80. Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A. Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer* 2002; 95(5): 969-81.
81. Yokomizo R, Matsuzaki S, Uehara S, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(5): 441-6.
82. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin on a tightrope: balancing neuronal and vascular protection between intrinsic and extrinsic pathways. *Neurosignals* 2004; 13(6): 265-89.
83. Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol.* 2004; 83(11): 673-86.
84. Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R977–R988.

85. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3233–42.
86. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000; 30(3): 271-8.
87. Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 2001; 79(3-4): 228-35.
88. Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 2000; 20(19): 7377-83.
89. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001; 21(24): 9733-43.
90. Tan CC, Eckardt KU, Ratcliffe PJ. Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 1991; 40(1): 69-76.
91. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279(20): 20655-62.

92. Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 2006; 101(1): 31-9.
93. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25381-87.
94. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2005; 353(8): 782-92.
95. Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 2004; 9: 18-30.
96. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3561-5.
97. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(23): 12969-73.
98. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; 15: 2627-36.
99. Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, et al. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling

contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005 Jun 23; 24(27): 4442-9.

100. Fu P, Jiang X, Arcasoy MO. Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379(3): 696-701.
101. Guillard C, Chrétien S, Pelus AS, Porteu F, Muller O, Mayeux P, et al. Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i)protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *J Biol Chem* 2003; 278(13): 11050-6.
102. Kumar SM, Yu H, Fong D, Acs G, Xu X. Erythropoietin activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human melanoma cells. *Melanoma Res* 2006; 16(4): 275-83.
103. Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer* 2001; 91: 2214-21.
104. Vansteenkiste J, Pirker R, Massuti B, Barata F, Font A, Fiegl M, et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of darbepoetin alfa in lung cancer patients receiving chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(16): 1211-20.
105. Glaspy J, Bukowski R, Steinberg D, Taylor C, Tchekmedyian S, Vadhan-Raj S. Impact of therapy with epoetin alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies during cancer chemotherapy in community oncology practice. Procrit Study Group. *J Clin Oncol.* 1997; 15(3): 1218-34.

106. Demetri GD, Kris M, Wade J, Degos L, Cella D. Quality- of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin a is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. Procrit Study Group. J Clin Oncol 1998; 16: 3412-25.
107. Gabrilove JL, Cleeland CS, Livingston RB, Sarokhan B, Winer E, Einhorn LH. Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin a in chemotherapy patients: improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing. J Clin Oncol 2001; 19(11): 2875-82.
108. Glaser CM, Millesi W, Kornek GV, Lang S, Schüll B, Watzinger F, et al. Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 50(3): 705-15.
109. Henke M, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, doubleblind, placebo controlled trial. Lancet 2003; 362: 1255-60.
110. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, et al. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin a in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. J Clin Oncol 2005; 23: 5960-72.
111. Wun T, Law L, Harvey D, Sieracki B, Scudder SA, Ryu JK. Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent

- chemotherapy, radiation, and erythropoietin. *Cancer* 2003; 98: 1514 -20.
112. Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 2000; 58(2): 647-57.
113. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 143-56.
114. Noyes RW, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25.
115. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
116. Allen NE, Key TJ, Dossus L, Rinaldi S, Cust A, Lukanova A, et al. Endogenous sex hormones and endometrial cancer risk in women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Endocr Relat Cancer* 2008; 15(2): 485-97.
117. Lobbezoo MW, Giaccone G, Van Kalken C; NDDO Research Foundation. Signal transduction modulators for cancer therapy:from promise to practice? *Oncologist* 2003; 8(2): 210-3.
118. Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, Chou SC, Raleigh JA, Varia MA, et al. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest* 2002; 82(7): 911-8.

119. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, et al. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003; 24(6): 1021-9.
120. Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, et al. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* 2003; 162(6): 1789-806.
121. Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, Musha T, Ueda K, Tanaka H, et al. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis* 2002; 23(11): 1797-805.
122. Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, Tanaka H, Shiokawa S, Nakamatsu K, et al. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *Ital J Anat Embryol* 2001; 106:(2) (Suppl 2): 215-22.
123. Jeong JY, Feldman L, Solar P, Szenajch J, Sytkowski AJ. Characterization of erythropoietin receptor and erythropoietin expression and function in human ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 122(2):274-80.
124. Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest* 2003; 83(10): 1477-87.

125. Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *Prostate* 2006; 66(2): 135-45.
126. Selzer E, Wacheck V, Kodym R, Schlagbauer-Wadl H, Schlegel W, Pehamberger H, et al. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanoma Res* 2000; 10(5): 421-6.
127. Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C, Lai SY, Cohen N, Acs G, et al. Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2005; 7: 537-43.
128. Yin D, Kawabata H, Tcherniamtchouk O, Huynh T, Black KL, Koeffler HP. Glioblastoma multiforme cells: expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin. *Int J Oncol* 2007; 31(5):1193-8.
129. Belda-Iniesta C, Perona R, Carpeño Jde C, Cejas P, Casado E, Manguan-García C, et al. Human recombinant erythropoietin does not promote cancer growth in presence of functional receptors expressed in cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(10): 1600-5.
130. Dagnon K, Pacary E, Commo F, Antoine M, Bernaudin M, Bernaudin JF, et al. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3): 993-9.

131. Chan CC, Chew EY, Shen D, Hackett J, Zhuang Z. Expression of stem cells markers in ocular hemangioblastoma associated with von Hippel-Lindau (VHL) disease. *Mol Vis* 2005; 11: 697-704.
132. Elliott S, Busse L, Bass MB, Lu H, Sarosi I, Sinclair AM, et al. Anti-EPO receptor antibodies do not predict EPO receptor expression. *Blood* 2006; 107(5): 1892-5.
133. Sturiale A, Campo S, Crascì E, Coppolino G, Bolignano D, Grasso G, et al. Erythropoietin and its lost receptor. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(5): 1484-5.
134. Brown WM, Maxwell P, Graham AN, Yakkundi A, Dunlop EA, Shi Z, et al. Erythropoietin receptor expression in non-small cell lung carcinoma: a question of antibody specificity. *Stem Cell* 2007; 25(3): 718-22.
135. Leo C, Horn LC, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, et al. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006; 12(23): 6894-900.
136. Diensthuber M, Ilner T, Rodt T, Samii M, Brandis A, Lenarz T, Stöver T. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in vestibular schwannoma: potential role in tumor progression. *Otol Neurotol*. 2007; 28(4): 559-65.

137. Sartelet H, Fabre M, Castaing M, Bosq J, Racu I, Lagonotte E, et al. Expression of erythropoietin and its receptor in neuroblastomas Cancer 2007; 110(5): 1096-106.
138. Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Leśniewicz T, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S. STAT3, HIF-1alpha, EPO and EPOR - signaling proteins in human primary ductal breast cancers. Folia Histochem Cytobiol 2007; 45(2): 81-6.
139. Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, Dambaki K, Darivianaki K, Vrekoussis T, et al. Erythropoietin and its receptor in breast cancer: correlation with steroid receptors and outcome. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16(10): 2016-23.
140. Zhou T, Xu C, He M, Sun Y. Upregulation of erythropoietin receptor in human prostate carcinoma and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. Prostate Cancer Prostatic Dis 2008; 11(2): 143-7.
141. Li HG, Li JS, Chen WL, Wang L, Wu DH, Lin ZY. Prognostic significance of erythropoietin and erythropoietin receptor in tongue squamous cell carcinoma. BrJ Oral Maxillofac Surg 2009 Jun 24 (*in press*)
142. Arcasoy MO, Amin K, Chou SC, Haroon ZA, Varia M, Raleigh JA. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. Clin Cancer Res 2005; 11(1): 20-7.

143. Acs G, Xu X, Chu C, Acs P, Verma A. Prognostic significance of erythropoietin expression in human endometrial carcinoma. *Cancer* 2004; 100(11): 2376-86.
144. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59(22): 5830-5.
145. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157(2): 411-21.
146. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4): 309-14.
147. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Panagopoulos I, Maltezos E, Harris AL, et al. C2028T polymorphism in exon 12 and dinucleotide repeat polymorphism in intron 13 of the HIF-1alpha gene define HIF-1alpha protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 53(3): 257-62.
148. Ozbudak IH, Karaveli S, Simsek T, Erdogan G, Pestereli E. Neoangiogenesis and expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor, and glucose

transporter-1 in endometrioid type endometrium adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* 2008; 108(3): 603-8.

149. Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 1997; 90(5): 1867-73.
150. Blake TJ, Jenkins BJ, D'Andrea RJ, Gonda TJ. Functional cross-talk between cytokine receptors revealed by activating mutations in the extracellular domain of the beta-subunit of the GM-CSF receptor. *J Leukoc Biol* 2002; 72(6): 1246-55.
151. Scott CL, Robb L, Papaevangeliou B, Mansfield R, Nicola NA, Begley CG. Reassessment of interactions between hematopoietic receptors using common beta-chain and interleukin-3-specific receptor beta-chain-null cells: no evidence of functional interactions with receptors for erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, or stem cell factor. *Blood* 2000; 96(4):1588-90.
152. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(41): 14907-12.
153. Paragh G, Kumar SM, Rakosy Z, Choi SC, Xu X, Acs G. RNA interference-mediated inhibition of erythropoietin receptor expression suppresses tumor growth and invasiveness in A2780 human ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 2009; 174(4): 1504-14

10. EKLER

Doktora eğitimim sırasında bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Sevda Menevşe ve Sn. Prof. Dr. Adnan Menevşe' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca desteğini her zaman hissettiğim Sn. Yrd. Doç. Dr. Ece Konaç'a teşekkürü bir borç bilirim. Hasta örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Sn. Doç. Dr. Tayfun Güngör' e, Sn. Doç. Dr. Anıl Onan'a, Doç. Dr. Çağatay Taşkiran'a ve Op. Dr. Ömer Tapısız'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca dostluklarını esirgemeyen, tezimin hazırlanması sırasında da çok büyük yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Ebru ALP, Araş Gör. Akın YILMAZ'a ve bölüm arkadaşlarıma tesekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen bilgi ve deneyimleriyle yönlendiren değerli hocam, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Abdullah Ekmekçi' ye teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim annem Süheyla Önen' e, babam İbrahim Önen' e ve kardeşim Tuğçe Önen' e gösterdikleri anlayış ve özveri için şükranlarımı sunarım.



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURULU

Tarih

25.12. 2006

Sayı

393

Konu

Etik Kurul Kararı Hk.

Fakültemiz Öğretim Üyesi Prof.Dr.Abdullah Ekmekçi'nin sorumlu araştırmacısı olduğu **"Endometriyum Kanseri Gelişiminde Epo, EpoR, ve Moleküler Yoldaki ilgili Genlerinin İfadelemesi"** başlıklı çalışması, Etik Kurulumuzca değerlendirilmiş ve bütçe dışında uygun bulunmuştur.

Etik Kurul kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Etik Kurula bildirilmesi gerekmektedir.

Prof.Dr.Türkiz GÜRSEL
BAŞKAN

Prof.Dr.Candan TUNCER
ÜYE (Katılmadı)

Prof.Dr.Leyla MEMİŞ
ÜYE (Katılmadı)

Prof.Dr.Ceyda KARADENİZ
ÜYE

Prof.Dr.Aysel ARICIOĞLU
ÜYE

Prof.Dr.Ayşe GÜLEKON
ÜYE

Prof.Dr.Fatma AKAR
ÜYE (Katılmadı)

Prof.Dr.Reha KURUOĞLU
ÜYE

Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN
ÜYE

Doç.Dr.Canar UĞLU
ÜYE

Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU
ÜYE

Doç.Dr.Kenan HİZEL
ÜYE

GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK

ARAŞTIRMALAR BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Endometriyum Kanseri Gelişiminde EPO, EPOR ve Moleküler Yoldaki İlgili Genlerinin İfade Edilmesi

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Diğer Araştırmacıların Adı: Araş. Gör. H. İlke ONEN, Yrd. Doç. Dr. Ece KONAÇ, Doç. Dr. Anıl ONAN, Doç. Dr. Çağatay TAŞKIRAN

Destekleyici: Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Saymanlığına proje önerisi olarak sunulacaktır.

“Endometriyum Kanseri Gelişiminde EPO, EPO-R ve Moleküler yoldaki ilgili Genlerinin İfade Edilmesi” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

a. Neden özellikle bu kişi / hasta seçilmiştir?

Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni size rahim kanseri tanısı konmasıdır. Rahim kanseri rahim iç tabakasının atipik çoğalması sonucu rahimin diğer katlarına, lenf bezlerine daha ileri evrede akciğere

yayılma riski gösterir. Bu yüzden cerrahi olarak rahminizin tamamının ve yayılabileceği lenf bezi ve bağırsak örtüsünün çıkarılması gerekir. Bu cerrahi müdahale kanserinizin yayılım alanını belirleyerek ek kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilere ihtiyacınız olup olmadığını gösterir. Katılımınız ile bu hastalığının moleküler düzeyde etkilendiğini tahmin ettiğimiz genlerin düzeylerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir.

b. Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?

Genler, DNA olarak isimlendirilen genetik materyalden oluşurlar. DNA hücrenin bir bölümüdür ve kalıtsal özelliklerin (göz rengi gibi) oluşmasından sorumludur. Genlerin büyük çoğunluğu protein olarak adlandırılan fonksiyonel moleküllerin oluşumunu şifrelemektedir. Endometriyum kanseri ile ilgili çeşitli genler bulunmuştur. Endometriyum kanseri dokularında yapılan çalışmaların sonuçları normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında bazı genlerin oluşturduğu ürünlerdeki miktarsal artış veya azalışların olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada tedavi için gerekli olan ve cerrahi operasyon ile sizden alınması gereken endometriyum dokusunu alıp çalışmak ve sizden alınan doku örneğinde öncelikle EPO, EPOR ve sonuç alınmadığı takdirde moleküler yolaktaki farklı genlerinin ürünlerinin miktarsal olarak değişip değişmediğini araştırmak istiyoruz. Ayrıca etkili bir kanser cerrahisi için cerrahi sınır olarak ifade edilen kanserli doku ile normal doku arasındaki sınır normal doku aleyhine çıkarılarak kanser nüksünün oluşması önleneyeceği için, normal endometriyum dokusundan bir miktar örnek alarak bu dokudan elde edilecek verileri kanser dokusundan elde edilecek verilerle karşılaştırmak istiyoruz.

c. Çalışmaya toplam kaç kişinin katılması planlanmaktadır?

Çalışma kapsamını 50 endometriyum kanser hastası oluşturacaktır.

2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar vererseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

3. Genetik araştırma nasıl yapılacak?

a. Hangi örnek alınacak ve nasıl alınacak ?

Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, tedaviniz için, ameliyat sırasında uzaklaştırılması gereken kanser dokusu (endometriyum dokusu) alındıktan sonra analizinin yapılması için tarafımıza gönderilecektir. Bu doku alınması işlemi, size anlatılan araştırma çalışması için yapılmamaktadır. Hastaların tedavisi için yapılan bir normal ve gerekli olan bir işlemdir. Ayrıca araştırmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda bir miktar normal endometriyum dokusunda alınarak kanser dokusundan elde edilen verilerin karşılaştırılması için kullanılacaktır.

b. Örnekte neler araştırılacak ?

Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz aldığımız doku örneğinde kanserli ve normal dokuda ifadelenen gen ürünlerinin miktarsal analizi yapılacaktır.

c. Örnekler nerede çalışılacak?

Toplanan dokular Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarında tetkik edilecektir. Yeterli materyal elde edilmediği durumlarda sizden bir daha örnek istenmeyecektir. Yurt içi veya dışındaki başka bir labotatuvara kesinlikle gönderilmeyecektir.

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor ?

Gönüllülerden toplanan dokular (diğer çalışmalarda kullanımına izin verilmediği takdirde) tıbbi atık imha işlemleri ile imha edilecektir

4.Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilir mi?

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

1- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

2- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

3- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

4- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

5. Çalışmanın riskleri nelerdir?

Doku alınması sırasında oluşabilecek riskler: Kansere dokusunun alınması işlemi, size anlatılan araştırma çalışması için yapılmamaktadır. Cerrahi olarak uzaklaştırılması gereken kanser dokusu (endometriyum dokusu) imha edilmek yerine alındıktan sonra analizinin yapılması için tarafımıza gönderilecektir. Kanserin cerrahi tedavisi kanseri kapsayan doku ile beraber yayılması muhtemel doku ve organların çıkarılmasına dayanır. Etkili bir kanser cerrahisi için cerrahi sınır olarak ifade edilen kanserli doku ile normal doku arasındaki sınır normal doku aleyhine çıkarılarak kanser nüksünün oluşması önlenir. Dolayısıyla, aynı hastalardan normal doku örneği de alınıp kontrol grubu oluşturulacaktır. Doku alımının ayrıca bir riski söz konusu değildir.

a. Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler: Yapılan testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir

hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

6. Çalışmanın yararları nelerdir?

Biz bu çalışmamızda daha önceden yapılmamış EPO, EPOR ve moleküler yolaktaki ilgili genlerinin ifadesinin endometriyum kanser gelişimindeki rolünü araştırmayı amaçladık. Çalışmamız, şuan için çalışma kapsamına dahil ettiğimiz hastalara tedavide bir yarar sağlamamaktadır. Ancak ileride, bahsettiğimiz gen ürünlerinin miktarlarının artışı veya azalması ile epitel over kanseri geliştirme riski arasında bir ilişki bulunduğu takdirde, hastalığın gelişimde bu gen ürünlerinin rolünün ve hastalığın moleküler temelinin daha iyi anlaşılması sağlanacak ve buna bağlı tedavi biçimleri belirlenebilecektir.

7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak ?

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum

☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Dokunuz genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızda bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.

8. Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir ?

a. Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak ?

Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağı ve bu konudaki tüm harcamaların üstlenileceği tüm araştırmacılar tarafından beyan ve taahhüt edilmiştir.

11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Doç. Dr. Anıl Onan, Doç. Dr. Çağatay Taşkiran

GÖREVİ : Doç. Dr.

Hastanın Beyanı

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimlerle ilgili olarak parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Doç. Dr. Anıl Onan ve Doç. Dr. Çağatay Taşkiran’ı arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

Görüşme tanığı
Adı, soyadı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:
Adres:
Tel:
İmza:
Tarih:

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KONTROL GRUBU OLARAK İNCELENECEK “SAĞLIKLI GÖNÜLLÜLER” İÇİN OLUR FORMU

Fakültemizde, Doç. Dr. Çağatay TAŞKIRAN ve Doç. Dr. Anıl ONAN'ın sorumlu araştırmacı olduğu, 01/2007-27 kod'lu “Endometriyum Kanseri Gelişiminde EPO, EPOR ve Moleküler Yolaktaki İlgili Genlerinin İfadelenmesi” isimli bir araştırma yapılmaktadır.

Çalışmanın amacı, EPO, EPOR ve moleküler yolaktaki ilgili genlerinin ifadesinin endometriyum kanseri gelişiminde rolü olup olmadığını belirlemektir. Bu çalışma ile gen ürünü miktarlarının artışı veya azalması ile endometriyum kanseri geliştirme riski arasında bir ilişki bulunduğu takdirde hastalığın gelişiminde bahsedilen gen ürünlerinin rolünün ve hastalığın moleküler temelini daha iyi anlaşılması sağlanacak ve buna bağlı tedavi biçimleri belirlenebilecektir.

Bu çalışmaya, “sağlıklı kontrol grubu” olarak katılmayı kabul ederseniz, sizden istenen tek şey, yaklaşık 10 cm uzunluğunda, 0,5 cm çapında ince bir aletle rahim iç zarından parça alınması işlemi için çağrıldığınız zamanda gelmenizdir. Bu işlem sırasında geçici bir rahatsızlık hissi, karında kramp tarzında ağrılar olabilir.

Vereceğiniz endometriyal yani rahim iç zarı örneğinden EPO/EPOR ve moleküler yolaktaki ilgili genlerin ifade farkı olup olmadığı endometriyum tümör dokusuyla karşılaştırılarak, bu genlerin kanser gelişimindeki rolü araştırılacaktır. Yapılacak işlem pipelle denilen oldukça ince bir kanülle endometriyumdan yaklaşık 10 mg doku alınmasından ibarettir. Çalışma doktorunuz sizden elde edilen sonuçları, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimliğiniz gizli tutulacaktır.

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir.

NOT: Bu çalışmada sağlıklı kontrol grubu olacak hastalar polikliniğe başvuran rutin kontrol sırasında hiçbir endometriyal rahatsızlığı olmadığı belirlenen postmenopozal kadınlar arasından seçilecektir.

(Katılımcının Beyanı)

GÜTF Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalında, Doç. Dr. Çağatay TAşKIRAN ve Doç. Dr. Anıl ONAN tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu koşullarla “sağlıklı kontrol grubu” olarak, 1 kez, pipelle endometriyal örnekleme yapılması işlemini kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Hacer İlke
Soyadı : ÖNEN
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 21.10.1978

Eğitimi :

2004- Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora Eğitimi

2001-2004 Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Eğitimi

1996-2000 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans Eğitimi

1992-1996 Çankaya Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı Lise), Lise Eğitimi

1989-1992 Ankara Bahçelievler Ortaokulu, Ortaokul Eğitimi

1984-1989 Hamdullah Suphi İlkokulu, İlkokul Eğitimi

Yabancı Dili : İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

Bilimsel Etkinlikleri :

- 1- 2009 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Prostat Kanserinde Diagnostik ve Prognostik Moleküler Biyobelirteçler” konulu 01-2009/32 kodlu proje
- 2- 2009 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Prostat Kanserinde RASSF1A Geninin Genetik ve Epigenetik Değişimleri” konulu 01-2009/22 kodlu proje
- 3- 2009 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Prostat Kanseri Moleküler Mekanizma Yolağı İle İlişkili Olan CpG Adalarının Metilasyon Örüntüsünün Klinikopatolojik Özellikler İle İlişkilendirilmesi” konulu 01-2009/21 kodlu proje
- 4- 2007 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Surface Enhanced Laser Desorption/İonization Time-Of-Flight (Seldı-TOF)” Teknolojisi İle Serum Proteomik Profillerinin Belirlenerek Meme, Prostat ve Over Kanserlerinin Erken Tanısı İle Prognozlarının Belirlenmesi” konulu 01/2007-57 kodlu proje
- 5- 2007 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Epitel Over Kanseri Gelişiminde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, Reseptörü ve Moleküler Yolaktaki İlgili Genlerin İfadelenmesi” konulu 01/2007-26 kodlu proje
- 6- 2007 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Endometriyum Kanseri Gelişiminde EPO-EPOR ve Moleküler Yolaktaki İlgili Genlerinin İfadelenmesi” konulu 01/2007-27 kodlu proje
- 7- 2006 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Türk Toplumunda Aurora-A Gen Polimorfizmleri ve Akciger Kanseri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi” konulu 01/2006-01 kodlu proje (2007’de tamamlandı.)

- 8-** 2005 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen 'Türk Toplumunda Hipoksiyi İndükleyen Faktör 1alfa (HIF1A) Gen Polimorfizmleri İle Jinekolojik Kanserler Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi' konulu 01/2005-18 kodlu proje (2007'de tamamlandı.)
- 9-** 2005 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen '“Açıklanamayan infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları ve IVF’ de implantasyon başarısızlığı olan olgularda endometriyumdaki imprint genlerin ekspresyonu” konulu 01/2005-65 kodlu proje (2009'da tamamlandı.)
- 10-** 2004 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Türk Toplumunda Vitamin D Reseptör Gen Polimorfizmleri ile Prostat Kanseri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi” konulu 01/2004-87 kodlu proje (2006'da tamamlandı.)
- 11-** 2003 yılında Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından desteklenen “Türk Toplumunda Prostat Kanseri Hastalarda CYP 17,5-alfa Redüktaz Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi” konulu ve 11/2003-05 kodlu yüksek lisans projesi (2004'de tamamlandı.)