



**ING-3 GENİNİN BAŞ BOYUN KANSERLERİNDE  
FONKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**Gölnur KUŞDEMİR**

**Yüksek Lisans Tezi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ**

**2022  
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ING3 GENİNİN BAŞ BOYUN KANSERLERİNDE FONKSİYONUNUN  
ARAŞTIRILMASI**

**Gölnur KUŞDEMİR**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Erzurum**

**2022**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

01 / 09 / 2022

Gölnur KUŞDEMİR

# ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

## **ING3 GENİNİN BAŞ BOYUN KANSERLERİNDE FONKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Gülnur KUŞDEMİR

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Agresif bir kanser türü olan baş ve boyun kanserleri dünya genelinde en sık tanısı konan kanserler arasındadır. Dünya genelinde baş ve boyun kanserleri 5 yıllık sağkalım oranları %60'lar civarında olmasına rağmen, ülkemizde bu oran dünya ortalamasının oldukça altındadır. Inhibitor of growth protein (ING) ailesi 5 üyeden oluşmaktadır (ING1-5). ING proteinleri çok sayıda hücrel süreçte önemli roller oynamaktadır. Bu nedenle ING genlerinin ifade değişiklikleri tümör oluşumu ile ilişkilendirilebilir. Bu tezde, ING ailesi üyelerinin ifadelerinin analizi ve baş ve boyun kanserlerinden olan larenks kanserinde ING genlerinin prognostik önemini değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, larenks tümör ve normal doku çiftlerinde rölatif ING gen ailesi ifadesi mRNA seviyesinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak, rölatif ING3 ifadesi protein seviyesinde Western blot analizi kullanılarak değerlendirildi. ING genlerinin ifade seviyeleri, genetik değişiklikleri ve sağkalım verileri online veritabanları kullanılarak araştırıldı ve ING3'ün protein etkileşim ağı STRING web portalı kullanılarak ortaya koyuldu. Baş ve boyun kanserlerinde ING3'ün genetik değişiklik oranının oldukça yüksek olduğu gösterildi. ING3'ün hem mRNA hem de protein seviyesinde larenks kanseri doku örneklerinde normal doku örneklerine kıyasla artan ifadeye sahip olduğu doğrulandı. Yüksek ING3 ifadesinin, baş ve boyun kanseri hastalarının hastalısız sağ kalımı ile ilişkili olduğu gösterildi. Ayrıca, birlikte ifade analizi, EPC1'in önemli ölçüde ING3 ile ilişkili kritik bir gen olduğunu ortaya koydu. Tez kapsamında elde edilen bulgular, ileri evre larenks kanseri vakalarında ING3'ün yüksek düzeyde ifade edildiği ve onkogenik potansiyel sergileyerek larenks kanser gelişim sürecine önemli derecede katkıda bulunduğunu gösterdi. ING3'ün ileri evre larenks kanser hastaları için hayati prognostik önemi, biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

**2022, 53 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Baş ve boyun kanseri, Larenks kanseri, ING gen ailesi, ING3

## ABSTRACT

MS. Thesis

### INVESTIGATION OF THE FUNCTIONS OF *ING3* GENE IN HEAD AND NECK CANCERS

Glnur KUŞDEMİR

Erzurum Technical University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. mer Faruk KARATAŞ

Among the most often diagnosed tumors worldwide are aggressive cancer forms that affect the head and neck (HNC). The 5-year survival rate for head and neck malignancies in our country is lower than the global average, despite the fact that it is about 60% worldwide. Inhibitor of growth protein (ING) family, is an important class of gene family, which consists of five genes. ING genes play a role in many biological processes. Therefore, altered expression of genes may be associated with tumorigenesis. In this thesis, we examined the relative mRNA expression of ING genes in laryngeal tumor-normal tissue pairings using quantitative real-time polymerase chain reaction, and the relative protein expression of ING3 using Western Blot analysis. We investigated expressions, genetic alterations, survival data for ING family members using various online tools and established a functional protein interaction network of ING3 using STRING web portal. HNCs have a comparatively higher rate of ING3 genetic alterations. ING3 expression was significantly upregulated in larynx cancer tissue samples at both mRNA and protein level compared with normal tissue samples. Poor disease-free survival in HNC patients was likewise associated with higher expression of ING3. Additionally, co-expression study demonstrated that the important ING3-related gene EPC1 significantly linked with the expression of ING3. The findings show that ING3 is highly expressed in advanced larynx cancer cases and contributes significantly to the laryngeal carcinogenesis by exhibiting oncogenic potential. The crucial predictive importance of ING3 in patients with advanced laryngeal carcinoma demonstrates its potential for application as a biomarker.

**2022, 53 page**

**Keywords:** Head and neck cancer (HNC), Larynx cancer, ING gene family, ING3

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla ben yönlendiren danışmanım Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a, materyallerin temini konusunda yardımlarını esirgemeyen Atatürk Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği'nden Doç. Dr. Arzu TATAR'a,

Çalışma arkadaşlarım Abdülmelik AYTATLI, Ahsen KILIÇ, Fatma ŐANLI, Neslişah BARLAK, Rasim GÜMÜŐ ve Özel ÇAPIK'e

Beni bu süreç de asla yalnız bırakmayan her derdimi dinleyen her konuda destekleyen canım dostum Merve AKÇİN YAVUZ'a

Üniversitemizin değerli enstitü çalışanlarından başda Ersin KÖROğLU olmak üzere Muhammed Ali GÜZELTEPE ve Serap LEVENT TAŐKIRAN'a

Son olarak tüm hayatım boyunca benim yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, sadece bu tez sürecinde değil bütün yaşamım boyunca beni cesaretlendiren ve moral veren annem Sevim KUŞDEMİR'e babam İbrahim KUŞDEMİR'e ve sevgili ablam İlknur KUŞDEMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

**Gülnur KUŞDEMİR**  
Eylül 2022

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Tümör Süpresör ve Onkogen.....	2
1.3. Baş Boyun Kanseri.....	3
1.3.1. Larenks kanseri.....	5
1.3.2. Larenks skuamöz karsinomu.....	7
1.4. ING Gen Ailesi.....	8
1.4.1. ING3.....	11
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	13
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Gereçler ve cihazlar.....	15
3.1.2. Çalışmada kullanılan ekipman ve sarf malzemeleri.....	15
3.1.3. Kitler ve solüsyonlar.....	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. <i>İn Siliko</i> analiz.....	17
3.2.2. Hastalar ve örneklerin temini.....	18
3.2.3. Doku örneklerinden RNA izolasyonu.....	19
3.2.4. cDNA sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı PCR.....	20
3.2.5. Western Blot analizi.....	21
3.2.6. FaDu hücrelerinin kültür koşulları.....	21
3.2.7. FaDu hücrelerine ING3 ve kontrol plazmitlerinin transfeksiyonu.....	22
3.2.8. Hücre sayımı.....	22

3.2.9. Yara kapama deneyi .....	23
3.2.10. Hücre canlılık testi .....	23
3.2.11. İstatistiksel analiz .....	23
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>24</b>
4.1. ING Gen Ailesi Üyeleri LSHK Hastalarında Artan İfadeye ve Önemli Genetik Değişikliklere Sahiptir .....	24
4.2. ING3 LSHK Dokularında Yüksek Düzeyde İfade Edilir ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilidir .....	25
4.3. ING3'ün Artan İfadesi LSHK Hastalarında Kötü Klinik Sonuçlarla İlişkilidir .....	28
4.4. ING3 Protein Seviyesi LSHK Hastalarında Artmıştır .....	30
4.5. ING3 DNA Hasarıyla İlişkili Önemli Genlerle Etkileşir .....	31
4.6. FaDu Hücrelerinde Yüksek Düzeyde İfade Edilen ING3 Hücre Canlılığını ve Göçünü Artırmıştır. ....	36
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>44</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler      Açıklama

g/dL	gram/desilitre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
%	Yüzde

### Kısaltmalar

PHD	Bitki homeodomain
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
EBV	Epstein-Barr Virüsü LKa Larenks Kanseri
qRT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HAT	Histon Asetil Transferazlar
HDAC	Histon deasetilaz
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
ING	Inhibitor of growth gene
LKa	Larenks Kanseri
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanser hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve bölünmesi sonucunda oluşur.....	1
Şekil 1.2. Baş ve boyun bölgesinin anatomik yapısı .....	3
Şekil 1.3. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomun küresel insidansı.....	4
Şekil 1.4. Larenksin anatomisi.....	6
Şekil 1.5. Fare ve insanda ING üyelerinin genomik organizasyonu.....	9
Şekil 1.6. İnsan ING proteinlerinin yapısı .....	10
Şekil 4.1. Baş ve boyun kanseri dokularında ING ailesi üyelerinde önemli genetik değişiklikler görülmektedir.....	24
Şekil 4.2. Baş ve boyun kanseri dokularında ING ailesi üyelerinin ifade profili .....	24
Şekil 4.3. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom örneklerinde normal örneklere kıyasla ING ailesi üyelerinin rölatif ifade seviyesi .....	25
Şekil 4.4. Larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının normal doku örneklerine kıyasla kanser doku örneklerinde ING ailesi üyelerinin ifade seviyesi.....	26
Şekil 4.5. Sengupta ve Ginos verisetlerinde rölatif ING3 ifade seviyesi.....	26
Şekil 4.6. UALCAN veritabanında yapılan analizler neticesinde farklı derece ve evrede baş ve boyun kanser hastalarının doku örneklerinde rölatif ING3 ifade seviyesi .....	27
Şekil 4.7. Hasta örnekleri kullanılarak yapılan analizler neticesinde farklı derece ve evrede baş ve boyun kanser hastalarının doku örneklerinde rölatif ING3 ifade seviyesi .....	28
Şekil 4.8. ING3 ifade seviyesinin baş ve boyun kanseri hastalarında genel sağkalım ile ilişkisi .....	29
Şekil 4.9. ING3 ifade seviyesinin baş ve boyun kanseri hastalarında hastalısız sağkalım ile ilişkisi .....	29
Şekil 4.10. Larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının normal ve tümör doku örneklerinde ING3 protein seviyesinin western blot analizi .....	30
Şekil 4.11. Larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının normal ve tümör doku örneklerinde rölatif ING3 protein seviyesi .....	31
Şekil 4.12. ING3 ile en yüksek protein-protein etkileşimi skoruna sahip proteinler.....	31
Şekil 4.13. ING3 ile ilişkili genlerin genetik değişiklik sıklıkları .....	33
Şekil 4.14. ING3 ve EPC1 ifadesinin korelasyon analizi .....	35

<b>Şekil 4.15.</b> Baş ve boyun kanseri hastalarında ileri histolojik evreye sahip olmak ile ING3 ve EPC1 değışikliklerinin ilişkisi .....	36
<b>Şekil 4.16.</b> FaDu-Kontrol ve FaDu-ING3 hücrelerinde mRNA düzeyinde rölatif ING3 seviyesi .....	36
<b>Şekil 4.17.</b> FaDu-Kontrol ve FaDu-ING3 hücrelerinde protein düzeyinde rölatif ING3 seviyesi .....	37
<b>Şekil 4.18.</b> Artmış ING3 seviyesi baş ve boyun kanseri hücrelerinin canlılığını artırdı	37
<b>Şekil 4.19.</b> Artmış ING3 seviyesi baş ve boyun kanseri hücrelerinin göç etme potansiyelini artırdı.....	38



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmaya dahil edilen hastaların kliniko-patolojik verileri.....	18
<b>Çizelge 3.2.</b> qRT-PCR primer dizileri .....	20
<b>Çizelge 4.1.</b> ING3 interaktörlerinin gen seti zenginleştirme analizi.....	32
<b>Çizelge 4.2.</b> Baş ve boyun kanser örneklerinde ING3 interaktörlerinde görülen genetik değişikliklerin birlikte var olma analizi .....	34

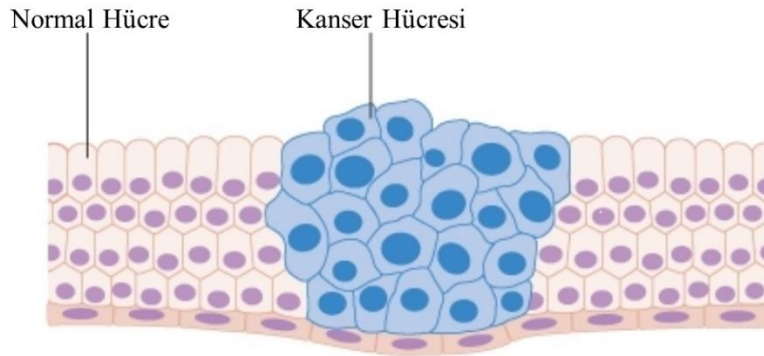


### 1. GİRİŞ

#### 1.1. Kanser

Kanser, herhangi bir doku ve organda hücrelerin kontrolsüz çoğalması sürecidir. Kanserli hücrelerde genetik ve epigenetik düzeyde hatalar hücre büyüme avantajı oluşturur ve kontrolsüz hücre bölünmesine yol açar (Koutsogiannouli et al. 2013). Günümüzde, buldukları organa ve köken aldıkları hücre türüne göre farklı isimler alan 100'den fazla kanser çeşidi tanımlanmış ve tahmini kanser çeşidinin 200'den fazla olabileceği ileri sürülmüştür (Sawyers et al. 2013). Kanser, dünya çapında ölüme yol açan ikinci hastalıktır (Zhu et al. 2015). GLOBOCAN veri tabanına göre dünyada 2020 yılı içerisinde 19,3 milyon yeni vaka ve 10,0 milyon ölüm bildirilmiştir.

Kanserin patogenezinde genetik değişimler kritik rol oynar (Zhu et al. 2015). Farklı kanser türlerinde yapılan genetik çalışmalar malin hücrelerin büyümesini ve ilerlemesini desteklemek için mutasyona uğraması veya değişmesi gereken az sayıda gen tanımlamıştır. Genel olarak kanserle ilgili genler, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki geniş sınıfa ayrılabilir (Wang et al. 2018). Kanser oluşumu hem tümör baskılayıcıların hem de kanser indükleyicilerinin (onkogenlerin) kombine etkileşimi sonucunda gözlemlenir (Zhang et al. 2007).



Şekil 1.1. Kanser hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve bölünmesi sonucunda oluşur. Association of NAMİBİA (WO30) 'dan değiştirilerek alınmıştır.

### 1.2. Tümör Süpresör ve Onkogen

Kanser, büyüme, çoğalma ve hücre ölümü gibi kritik işlevlerin yanlış düzenlenmesi ile karakterize olan karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Proliferasyon ve apoptoz gibi kanserin ayırt edici özelliklerini daha iyi anlamak için kansere neden olan genleri doğru bir şekilde belirlemek kritik önem taşır (Colaprico et al. 2020).

Proto-onkogenler genellikle hücrel büyüme destekleyen yollarda yer alır. Bu genler, mutasyonlar tarafından aktive edildiklerinde normal hücrelerin kanserli hale gelmesine neden olabilir. Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar tipik olarak dominanttır ve bu genlerin mutasyona uğramış versiyonları onkogenler olarak bilinir (Wang et al. 2018). Onkogenler hücrel veya viral (yani hücreye bir virüs tarafından eklenen) genlerdir; yüksek düzeyde ifadeleri bir neoplazinin gelişmesine neden olabilir. Proto-onkogenler normal hücrel genlerdir; onkogenlere dönüşümleri, genetik ve epigenetik çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilir.

Tümör baskılayıcılar (anti-onkogenler, resesif tümör genleri) hücrel genlerdir; bunların etkisiz hale getirilmesi, tümör oluşumu olasılığını artırırken, işlevlerinin geri kazanılması, tümör hücrelerinin büyümesini baskılayabilir (Kopnin 2000).

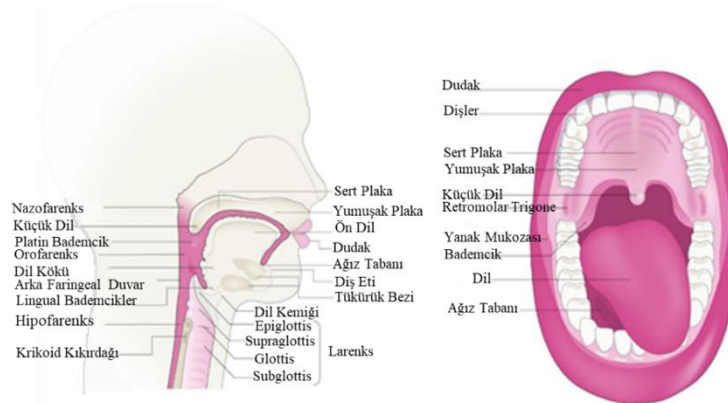
1969'da Knudson'un retinoblastomların gelişiminin kinetiğine dayanarak öne sürdüğü iki vuruşlu model hipotezine göre, iki allelin silinmesi veya inaktivasyonu yoluyla tümör süpresör genlerin fonksiyonunun kaybı meydana gelir. Tümör süpresör genlerdeki mutasyonların çekinik olduğu ortaya çıkmıştır; bu nedenle, tümör süpresör genlerdeki tek bir mutasyon karsinogeneze neden olmak için yeterli değildir. Tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna ek olarak ubiquitinasyon ile proteozomal parçalanma, anormal hücrel lokalizasyon benzeri durumlar da tümör süpresör genlerin kanserleşme sürecindeki rollerine katkı yapabilir (Wang et al. 2018; Morris and Chan 2015; Park et al. 2021).

### 1.3. Baş Boyun Kanserleri

Baş ve boyun kanserleri olarak bilinen üst solunum-sindirim sistemi kanserleri, çok sayıda bölgeden kaynaklanır ve her yıl teşhis edilen yaklaşık 630.000 yeni hasta ile her yıl 350.000'den fazla ölümlle sonuçlanan dünya çapında en yaygın altıncı kanserdir (Tobias 1994; Vigneswaran and Williams 2014).

Baş ve boyun kanserlerinin %90'dan fazlası ağız boşluğu, orofarenks, gırtlak ve hipofarenksin mukozal yüzeylerinden kaynaklanan baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomudur. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom baş ve boyun kanserlerinin en yaygın histolojik alt tipini temsil etmektedir. Baş ve boyun tümörleri aynı skuamöz epitel çeşidinden köken alsalar da farklı risk faktörleri, moleküler patojenler, farklı tedavi yanıtları ve prognozları gibi birçok açıdan biyolojik ve klinik olarak heterojen bir hastalıktır (Miranda-Galvis et al. 2021; Vigneswaran and Williams 2014).

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, ağız boşluğunun mukozal epitelinden (dudaklar, bukkal mukoza, sert damak, ön dil, ağız tabanı ve retromolar trigon), nazofarenks, orofarenks (palantin bademcikler, lingual bademcikler) dil, (yumuşak damak, küçük dil ve arka faringeal duvar), hipofarenks (boğazın alt kısmı, dil kemiğinden krikoid kıkırdağa uzanan) ve gırtlaktan kaynaklanır. İnsan papilloma virüsü ile ilişkili baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlar esas olarak orofarenksin palantin ve lingual bademciklerinden kaynaklanırken, tütünle ilişkili baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomları esas olarak ağız boşluğu, hipofarenks ve gırtlakta ortaya çıkar (Johnson et al. 2020).



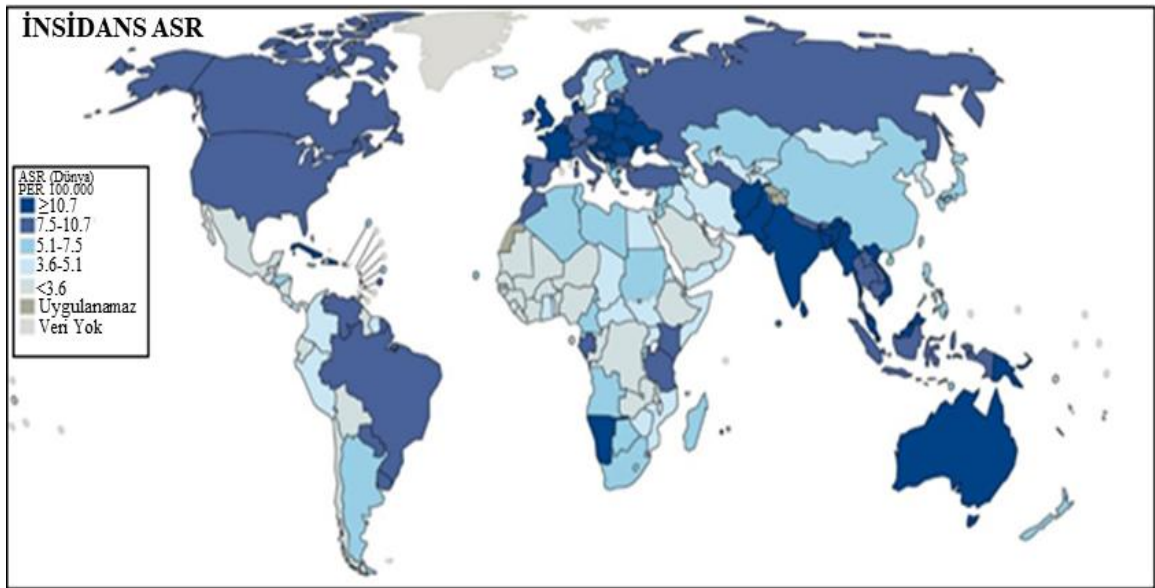
Şekil 1.2. Baş ve boyun bölgesinin anatomik yapısı Johnson et al.(2020)'dan değiştirilerek alınmıştır.

## 1. GİRİŞ

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomda bildirilen endişe verici ölüm oranları, yüksek lokal-bölgesel nüks ve/veya metastatik hastalık prevalansından kaynaklanmaktadır. Gerçekten de lokal olarak ilerlemiş baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarından etkilenen hastalar %50'nin altında 5 yıllık genel sağkalım oranlarına sahipken, erken evre hastalar, %80'e yakın sağkalım oranlarıyla belirgin şekilde iyi bir prognoza sahiplerdir (Miranda-Galvis et al. 2021).

Epidemiyolojik çalışmalar, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından sınıflandırıldığı üzere, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlar için çeşitli risk faktörlerini ortaya çıkarmıştır. Bu risk faktörleri arasında tütün tüketimi, alkol tüketimi, çevresel kirlenmelere maruz kalma ve HPV ve EBV gibi viral ajanlarla enfeksiyon yer almaktadır. İlginç bir şekilde, risk faktörleri coğrafi veya kültürel değişkenlik göstermektedir (Johnson et al. 2020).

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomların yaygınlığı ülkeler/bölgeler arasında değişir ve genellikle tütün türevi kanserojenlere maruz kalma, aşırı alkol tüketimi veya her ikisi ile ilişkilendirilmiştir. Her iki maddenin de ağır kullanıcılarının baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu geliştirme riskinin >35 kat daha fazla olduğunu belirtmek gerekir (Blot et al. 1988; Stein et al. 2015).



**Şekil 1.3.** Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomun küresel insidansı GLOBOCAN'dan değiştirilerek alınmıştır.

Ek olarak, genetik faktörler de baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom riskine katkıda bulunur. DNA onarımında bozulma (22 FANC geninden herhangi birinde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle) ile karakterize, nadir görülen, kalıtsal bir genetik hastalık olan Fankoni anemisi olan kişilerde, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom riskini artırır (Velleuer and Dietrich 2014; Johnson et al. 2020). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, tümör baskılayıcıların kaybı ile daha sık görülebilir. Çok sayıda çalışma, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom tümörlerinde sinyal proteinlerinin anormal ifadesi ve/veya sinyal yollarının aktivasyonunu göstermiştir. Örneğin yaygın olarak tümör gelişimini yönlendiren sinyal yolları arasında, PI3K/Akt/mTOR yolu, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında en sık bozulan onkojenik yollardan birisidir (Network 2015; Wang et al. 2017).

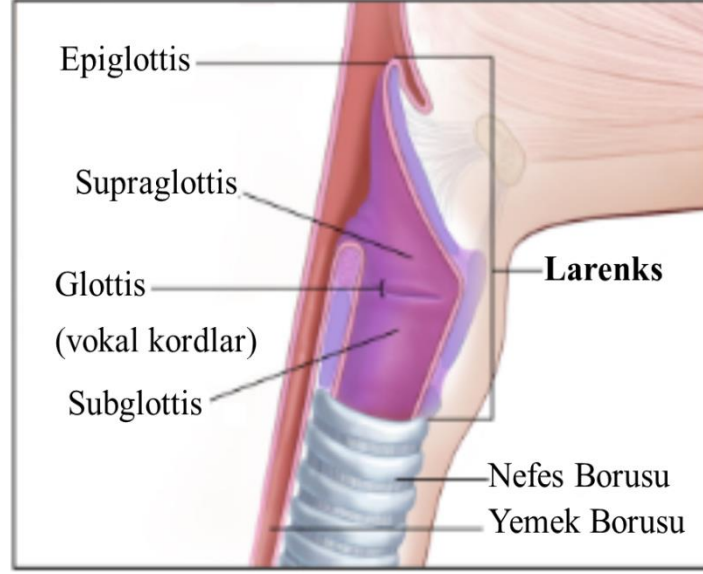
### 1.3.1. Larenks Kanseri

Agresif bir kanser olan larenks kanseri, dünya genelinde en sık tanısı konan baş ve boyun kanserlerinden biridir. Larenks kanserinin insidansı yaklaşık 100.000'de 4'tür ve erkeklerde kadınlara göre (4-5 kat), siyah ırkta da beyaz ırka göre (1,5-2 kat) daha yüksektir. Larenks kanserinin insidansı son 30 yılda düşüş göstermektedir, ne var ki ölüm oranlarındaki düşüş yeni vaka sayısındaki düşüş kadar güçlü olmamıştır. Ayrıca, dünya genelinde larenks kanseri 5 yıllık sağkalım oranları aynı süreçte %60'lar civarında seyretmiştir (Noone et al. 2017; Yao et al. 2021).

Türkiye'de ise larenks kanseri en sık görülen 7. kanser türüdür ve insidansı 2011 yılında 100.000'de 10,3 olarak tespit edilmiştir. 2004 ile 2011 yılları arasındaki veriler incelendiğinde, larenks kanseri insidansının bazı yıllarda düşüş gösterse de 100.000'de 10 civarında seyrettiği görülmektedir (Karatas et al. 2016). Larenks malignitelerinin %90'ı skuamöz hücreli karsinom olarak karşımıza çıkar. Larenks karsinomlu hastaların çoğunda ses kısıklığı gelişir, ancak diğer klinik belirtiler arasında boyunda kitle, yutma güçlüğü, stridor ve hemoptizi bulunur. Karsinomdan kaynaklanan bozulmuş gırtlak fonksiyonu, belirgin iletişim, nefes alma ve yutma bozukluklarına neden olur (Connor 2007).

## 1. GİRİŞ

Larenks üç anatomik bölgeye ayrılır; bu bölgeler supraglottik gırtlak, epiglot, yalancı ses telleri, ventriküller, aryepiglottik kıvrımlar ve aritenoidleri içerir. Glottis, gerçek ses tellerini ve ön ve arka komissürleri içerir. Subglottik bölge, gerçek ses tellerinin yaklaşık 1 cm altından başlar ve krikoid kıkırdak veya birinci trakeal halkanın alt sınırına kadar uzanır (Anonymous 2002).



**Şekil 1.4.** Larenksin anatomisi (Anonymous 2002) değiştirilerek alınmıştır

Supraglottik kanserler tipik olarak boğaz ağrısı, ağrılı yutma, kulak ağrısı, ses kalitesinde değişiklikler ile kendini gösterir. Erken ses teli kanserleri genellikle ses kısıklığı nedeniyle tespit edilir. Tespit edildiklerinde subglottik bölgede ortaya çıkan kanserler genellikle ses tellerinde tutulum yapar (Spaulding et al.1987).

Larenks kanserleri için en önemli olumsuz prognostik faktörler, artan T evresi ve N (bölgesel lenf nodu) evresidir. Diğer prognostik faktörler, cinsiyet, yaş, invazyon derecesi ve derinliği dahil olmak üzere tümörün çeşitli patolojik özelliklerini içerebilir (Yılmaz et al. 1998).

Lenf düğümlerine yayılmamış küçük gırtlak kanserlerinin prognozu, bölgeye, tümör kütesine ve infiltrasyon derecesine bağlı olarak %75 ile %95'lik oranı ile oldukça iyidir. Erken lezyonları olan çoğu hasta radyasyon tedavisi veya cerrahi ile tedavi edilebilse de radyoterapi ses tellerini korumak için makul bir tedavi yöntemidir. Radyasyon öncesi hemoglobün düzeyi 13 g/dL'den yüksek olan hastalar, anemik hastalara

göre daha yüksek lokal kontrol ve sağkalım oranlarına sahiptir (Fein et al. 1995; Reddy et al. 1998). Lokal olarak ilerlemiş lezyonlara sahip hastalar, cerrahi ile veya ameliyatsız radyasyon ve kemoterapiyi içeren kombine tedavi yaklaşımı ile tedavi edilir (Anonymous 2002; Forastiere et al. 2013). Orta dereceli lezyonlar, bölgeye, T evresine, N evresine bağlı olarak ara prognoza sahiptir. Bu lezyonlara sahip hastalar için tedavi önerileri, tedavi gerçekleştirilmeden önce bireyselleştirilmesi ve multidisipliner konsültasyonda (cerrahi, radyasyon tedavisi ve diş ve ağız cerrahisi) tartışılması gereken çeşitli karmaşık anatomik, klinik ve sosyal faktörlere dayanmaktadır (Anonymous 2002).

Sigara ve alkol tüketimi larenks kanserinin başlıca etiyolojik faktörleri olarak belirlenmiştir. Risk, gırtlaktaki tümör alt bölgesine göre farklılık gösterebilir ve alkol ve tütün kullanımı supraglotik bölge üzerinde daha güçlü bir etki yaratır. Kömür tozu, sert alaşımlı toz ve klorlu solventler gibi diğer mesleki maruziyet risk faktörleri de larenks kanseri ile ilişkilendirilmiştir. İnsan papiloma virüsünün (HPV) rolü, orofarenksin skuamöz hücreli karsinomu için iyi bilinmektedir ancak larenks kanser için belirsizliğini korumaktadır (de Miguel-Luken et al. 2016).

Ayrıca, larenks kanserli hastalar kronik hava-sindirim sistemi kanserojen maruziyeti nedeniyle ikinci primer tümörlere sahip olma riski altındadır: 5 yılda %14, 10 yılda %26 ve 15 yılda %37 (de Miguel-Luken et al. 2016). Öte yandan, meyve, sebze ve karoten içeren gıdaların tüketiminin gırtlak kanseri riskini azaltabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (de Miguel-Luken et al. 2016).

### **1.3.2. Larenks skuamöz hücreli karsinom**

Larenks skuamöz hücreli karsinomlar, baş ve boyun bölgesinin en yaygın agresif neoplazmlarından biridir ve tüm malign larenks tümörlerinin yaklaşık %85-90'ını oluşturur (Genden et al. 2007; Zheng et al. 2017; Machiels et al. 2020). Sigara, alkol tüketimi, hava kirliliği, diyet, HPV enfeksiyonu ve radyasyon larenks skuamöz hücreli karsinomların temel risk faktörleri arasındadır. Ayrıca larenks skuamöz hücreli karsinomlar çok sayıda tümör süpresör genlerin, onkogenlerin ifade değişiklikleri ve sinyal yollarının deregülasyonu ile karmaşık bir proseste ortaya çıkar ( Vassileiou et al. 2012; Yang et al. 2016; He et al. 2018).

## 1. GİRİŞ

---

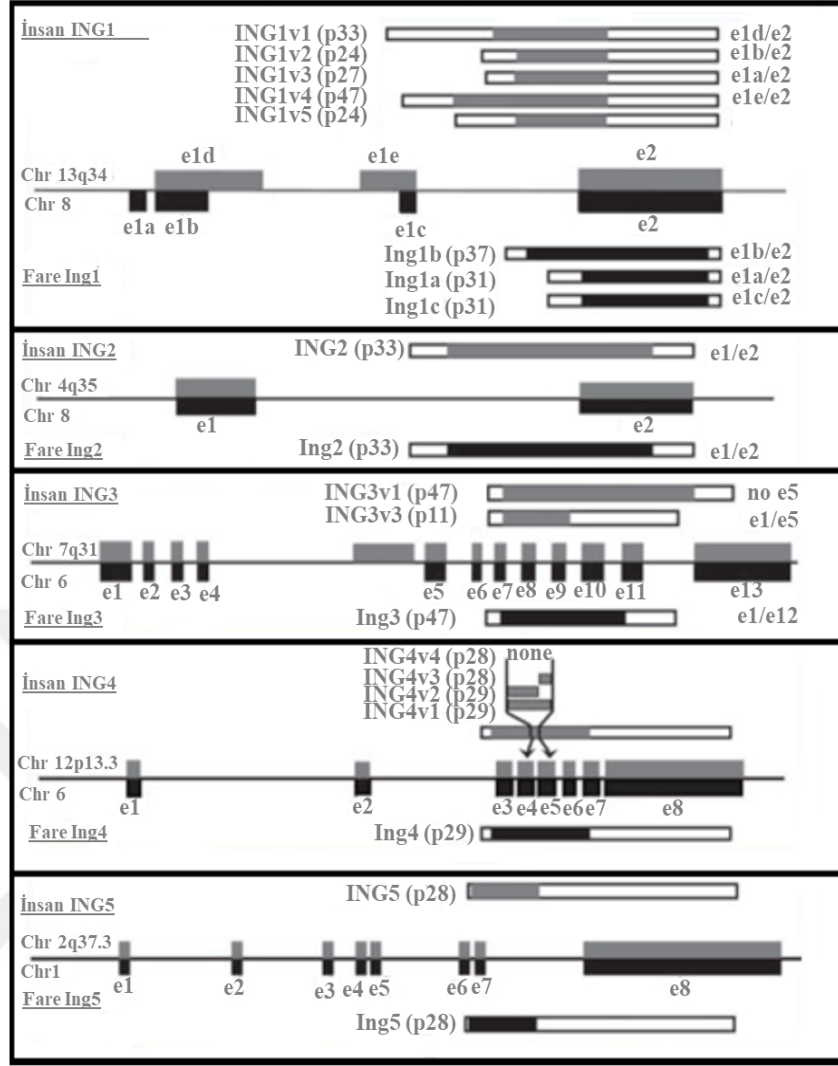
Larenks skuamöz hücreli karsinom ve diğer baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlar arasındaki kromozomal patern ve karsinojenik ilerlemedeki farklılıklar, karşılaştırmalı genomik çalışmalarla tespit edilmiştir. Özellikle, p53 larenks skuamöz hücreli karsinomda anormal olarak daha sık ifade edilir (Almadori et al. 2006).

Radyoterapi, kemoterapi, cerrahi ve adjuvan terapi yaklaşımlarında ve tanı tekniklerinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının yaklaşık %60'ı yaşam kalitesinde azalmaya neden olan nefes darlığı, disfaji ve disfoni deneyimler (Groome et al. 2003; Baek et al. 2010; Wierzbicka et al. 2014; Luo et al. 2016). Geç tanı ile birlikte saptanan invazyon, lenf metastazı ve tümör nüksü ileri evre larenks skuamöz hücreli karsinomda kötü prognoza ve yüksek mortalite oranlarına katkıda bulunan ana faktörlerdir (Liu et al. 2013). Ek olarak, larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarına ileri evrelerde konan geç tanı nedeniyle hastaların 5 yıllık sağkalım oranları, son 30 yılda değişmeden kalmıştır (Almadori et al. 2006). Bu nedenle, larenks skuamöz hücreli karsinom hastaları için klinik sonuçları daha iyi tahmin etmek için başarılı ve doğru prognostik belirteçlerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır.

### 1.4. ING Gen Ailesi

Inhibitor of growth (*ING*) gen ailesi 5 üyeden oluşan önemli bir gen sınıfıdır (Li et al. 2011). 1996 yılında *ING1* geninin meme kanseri hücrelerinde tümör süpresör özelliğinin keşfedilmesi sonrasında (Garkavtsev et al. 1996), bilgisayar destekli gerçekleştirilen biyoinformatik çalışmalarla *ING1* ile %32-76 dizi benzerliği gösteren *ING2*, *ING3*, *ING4* ve *ING5* genleri keşfedilmiştir (Shimada et al. 1998; Nagashima et al. 2001; Nagashima et al. 2003; Shiseki et al. 2003).

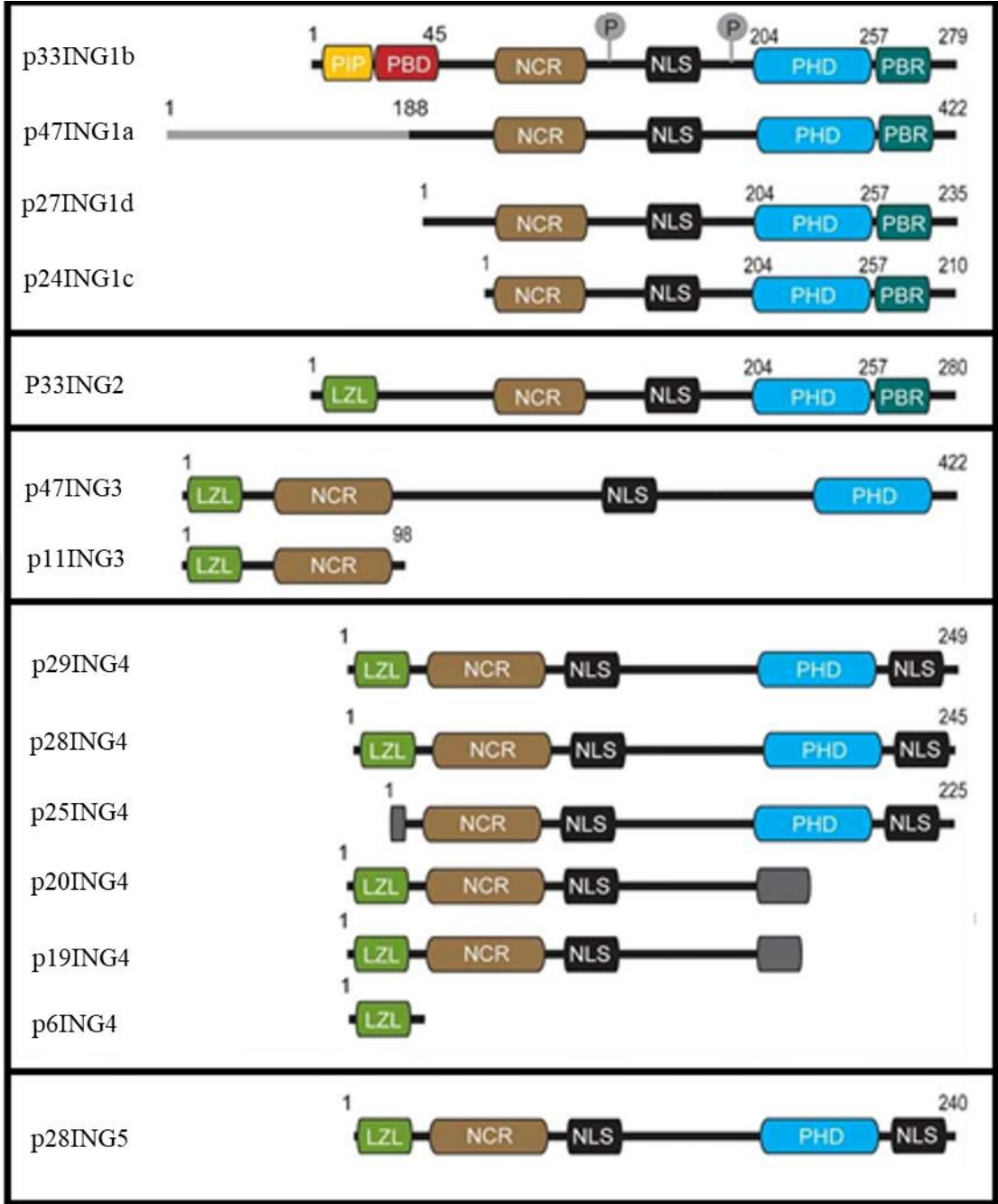
## 1. GİRİŞ



**Şekil 1.5.** Fare ve insanda ING üyelerinin genomik organizasyonu Coles and Jones (2009)'dan değiştirilerek alınmıştır.

ING Proteinleri, C-terminali yüksek oranda korunmuş PHD domain içerir (Gong et al. 2005). Bu domain, metillenmiş histonlara, özellikle lizin 4 (H3K4Me3) rezidüsünden metillenmiş histon 3'e yüksek afinite gösterir ve ayrıca fosfoinositol ile bağlanmaya yardımcı olur. Bu yüksek oranda korunmuş PHD domaini, H3 metilasyonuna kesin bağlanma sağlar ve histon asetil transferazlar ve histon deasetilaz ile etkileşim yoluyla kromatinlerin yeniden şekillenmesine yardımcı olur (Gunduz et al. 2002; Champagne and Kutateladze 2009; Coles and Jones 2009; Li et al. 2011).

## 1. GİRİŞ



Şekil 1.6. İnsan ING proteinlerinin yapısı. Coles and Jones (2009)'dan değiştirilerek alınmıştır.

C-terminal bölgesinde bir nükleer lokalizasyon sinyali olduğundan bu proteinler genellikle çekirdekte bulunur. Ayrıca ING proteinleri, başka hiçbir proteinde bulunmayan yeni korunmuş bölge (NCR) adı verilen bir bölgeye sahiptir. Ayrıca, ING ailesine ait proteinlerin N-terminal uçları birbirinden farklıdır (He et al. 2005; Lee et al. 2009).

## 1. GİRİŞ

---

ING genleri hücre büyümesi, koloni oluşumu, hücre döngüsü kontrolü, hücre yaşlanması, apoptoz, anjiyogenez, DNA tamiri, histon metilasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesi de dahil çok sayıda hücresel sürecin kontrol edilmesinde rol oynadıklarından, ING genlerindeki ifade değişiklikleri tümör oluşumu ile ilişkilendirilebilir (He et al. 2005; Wang et al. 2007; Gou et al. 2014; Gou et al. 2017; Dantas et al. 2019).

ING gen mutasyonları ve bu genlerin değişen ifadeleri şimdiye kadar akciğer, meme, prostat, mide, özofagus, beyin, baş boyun kanserlerinde, osteosarkomlarda, oral skuamöz hücre karsinomlarında gösterilmiştir (Campos et al. 2004; Li et al. 2011; Almami et al. 2016; Smolle et al. 2019; Gournay et al. 2019; Du et al. 2019). Fakat, literatürde ING genlerinin larenks kanseri tümör ve normal doku örneklerindeki ifade değişimleri ile alakalı bilgi bulunmamaktadır.

### 1.4.1. ING3

Kromozom 7q31.3 üzerinde bulunan, 12 ekzondan oluşan mRNA ürünü olan, 418 amino asit uzunluğunda ve 46,8 kDa büyüklüğünde protein kodlayan ING3 geni telomerik bölgede değildir ve bu özelliğiyle diğer ING gen ailesi üyelerinden ayrılır (Gunduz et al. 2002; Lu et al. 2012; Almami et al. 2016; Yang et al. 2017; Gou et al. 2017). ING3, histon H2A ve H4'ün asetilasyonundan sorumlu olan EPC1, EAF6 ve TIP60'ın da içerisinde bulunduğu NuA4-Tip60 MYST-HAT multi-subunit çekirdek kompleksinin bir parçasıdır (Gou et al. 2014; Fink et al. 2019; Dantas et al. 2019).

Bu kompleksin görevi H2A ve H4 histonlarını asetilemektir. ING3'ün hNuA4 ile etkileşime girmemesi, hücre döngüsü üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Bu sebeple, TIP60'ın hNuA4 kompleksine katılmadan hücre döngüsünü aktive ettiği sonucuna varılmıştır (Doyon et al. 2006; Coles and Jones 2009; Archambeau et al. 2019).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, *ING3*'ün birçok kanser türünde tip II tümör süpresör olarak ifadesinin azaldığı ve transkripsiyon, hücre döngüsü kontrolü ve apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynadığını gösterilmiştir (Nagashima et al. 2003; Wang et al. 2007; Gunduz et al. 2008; Lu et al. 2012; Yu et al. 2015). Bununla birlikte,

## 1. GİRİŞ

---

son çalışmalar ING3'ün hızla çoğalan insan dokularında yüksek düzeyde ifade edildiğini de göstermiştir (Nabbi et al. 2017; Fink et al. 2019). Ek olarak, tümör süpresör rolünün aksine, çeşitli çalışmalar ING3'ün yüksek düzeyde ifadesinin hücre proliferasyonunu, tümör büyümesini ve androjen reseptör aktivasyonunu uyardığını bildirmiştir.

Yüksek ING3 seviyeleri prostat kanserinde kötü prognoz ile korelasyon göstermiştir ve bu da ING3'ün onkogenik bir potansiyele de sahip olabileceğini ortaya koymaktadır (Nabbi et al. 2017; Ngollo et al. 2017).

Bu tezde, ING gen ailesinin baş ve boyun kanserindeki rolünün tespit edilmesi amaçlanmıştır. ING1 (ING1a ve ING1b), ING2, ING3, ING4 ve ING5 genlerinin mRNA düzeyinde ifade seviyesi araştırılmış, ING1a, ING1b, ING2, ING4 ve ING5'in ifade seviyelerinde normal ve tümör dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ING3'ün tümör dokularında normal dokulara kıyasla yüksek düzeyde ifade edildiği ve ileri evre larenks kanseri vakalarında daha yüksek ifadeye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca baş boyun kanseri hücre hattı FaDu hücrelerinde ING3'ün hücre canlılığı ve hücre göçü potansiyeli üzerine etkisi araştırılarak ING3'ün onkogenik rolü *in vitro* testlerle doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular, ING3'ün baş ve boyun kanserlerinde potansiyel prognostik biyobelirteç olarak hayati öneme sahip olduğuna işaret etmektedir ve prognostik bir belirteç olma potansiyelini güçlendirmek için yapılacak diğer fonksiyonel testlere ışık tutacaktır.

### 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Anna Melekhova ve arkadaşları 2021 yılında Prostat kanseri ve diğer malignitelerde ING gen ailesi üyelerinin hem tümör süpresör hem de onkogenik rol gösterebildiğini ve kanser tipine özgü analiz gerektireceği ileri sürmüştür.

Yu Tang ve arkadaşları 2022 yılında renal hücreli karsinomda ING4'ün p38 MAPK yolu üzerinden kanser kök hücre potansiyelini artırdığını ve renal hücreli karsinom kök hücreleri için ING4'ün potansiyel bir terapötik hedef olabileceği bulmuştur.

Yali Wang ve arkadaşları 2021 yılında ING5'in, IL-6/CXCL12 sinyal yolunu aşağı regüle ederek özofagus kanseri hücrelerinin göçünü ve istilasını engelleyebileceğini göstermiştir.

Wen Feng Gou ve arkadaşları 2014 yılında aşağı regüle edilmiş ING3 ifadesinin kolorektal epitel hücrelerinin malin transformasyonu için yeterli olabileceği ve kolorektal karsinogenez için bir biyobelirteç olarak kabul edilebileceğini göstermiştir.

Arash Nabbi ve arkadaşları 2017 yılında ING3'ün, TIP60 kompleksinin yapı iskeleti bileşeni olarak hareket etmesi, androjen reseptörü (AR) asetilasyonunu, nükleer translokasyonunu ve androjene duyarlı genlerin aktivasyonunu teşvik etmesi nedeniyle prostat kanserinde AR yolunu düzenlediğini göstermiştir.

Urszula L McClurg ve arkadaşları 2018 yılında ING3'ün, kanser hücrelerinin proliferasyonunu kontrol etmek için AR ve p53'e bağlı genlerin yanı sıra hücre döngüsü genlerini içeren karmaşık bir transkripsiyonel ağın ifadesini düzenlemek için tümör süpresör genlerle etkileştiğini ve artan ING3 seviyesinin, prostat kanserli hastalarında artan hücresel proliferasyon ve daha düşük sağ kalım ile ilişkili olduğunu ve bu nedenle, prostat kanseri hastaları için yeni bir kötü prognoz belirtecini temsil ettiğini ve bir onko-protein olabileceğini ileri sürmüştür.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

---

Limin Cai ve arkadaşları 2018 yılında ING4'ün aşırı ifadesinin, Fas/FasL yolağı gibi sinyal yolları yoluyla melanom hücrelerinin ve CD3+ T hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceğini ve melanom tedavisi için ING4 gen tedavisinin yeni bir yaklaşım olduğunu göstermiştir.

Wei Gao ve arkadaşları 2018 yılında insan tiroit kanseri dokularında ve hücre hatlarında ING5 ifadesinin önemli ölçüde azaldığı, ING5'in aşırı ifadesinin, tiroit kanseri hücrelerinin hepatosit büyüme faktörü ile indüklenen proliferasyonunu, göçünü ve epitelyal-mezenkimal geçişini belirgin şekilde inhibe ettiği ve ayrıca tümör büyümesini ve *in vivo* metastazı baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, c-Met/PI3K/Akt sinyal yolunun ING5'in tiroit kanseri üzerindeki inhibitör etkisinden sorumlu olduğunu bulmuştur.

Zizong Wang ve arkadaşları tarafından 2022 yılında LINC01554'ün miR-1267 aracılığıyla ING3 ifadesini doğrudan düzenlediği ve böylece Akt/mTOR yolunu düzenleyerek küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, invazyon, göçü ve epitelyal-mezenkimal geçişini etkilediği rapor edilmiştir.

Xin-Li Liu ve arkadaşları tarafından 2019 yılında ING5 aşırı ifadesinin,  $\beta$ -katenin'in fosforilasyona bağlı bozulmasını indükleyerek, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının aşağı regülasyonuna yol açarak akciğer kanseri hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş ve invazyonu inhibe ettiğini gösterilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Gereçler ve cihazlar

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan ekipman ve sarf malzemeleri

- Derin Dondurucu (-20°C) (Bosch, Manisa, Türkiye)
- Buzdolabı (4°C) (Edesa, İstanbul, Türkiye)
- Derin Dondurucu (-80°C) (ESCO Lexicon®, Changi, Singapur)
- Epoch Spektrofometre (BioTek, Winooski, VT, Amerika Birleşik Devletleri)
- Mikropipet (Corning Costar, Cambridge, MA, Amerika Birleşik Devletleri)
- Mini Santrifüj (WiseSpin, Dublin, İrlanda)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Almanya)
- Termal döngü cihazı (PZR) (SensQuest Labcyclers, Göttingen, Almanya)
- Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad ChemiDoc, Hercules, CA, Amerika Birleşik Devletleri)
- Vorteks (Wisd Wisemix VM-10, Lizbon, Portekiz)
- Eppendorf tüpler (0,2- 0,5- 1,5 ml) (LP Italiana, Milano, İtalya)
- Otoklav (Tomy SX-500E, California, Amerika Birleşik Devletleri)
- Saf Su Cihazı (Millipore Direct- Q-3 UV, Billerica, MA, Amerika Birleşik Devletleri)
- Pens
- Nitroselüloz Membran (GVS, Milano, İtalya)
- Whatman Kağıdı (Sigma-Aldrich, Milano, İtalya)
- Hassas Terazî (Shimadzu ATX224, Duizburg, Almanya)
- Trans-Blot Turbo Transfer Sistem (Bio-Rad, Hercules, CA, Amerika Birleşik Devletleri)
- Güç Kaynağı (Bio-Rad, Hercules, CA, Amerika Birleşik Devletleri)
- Yatay Çalkalayıcı (Wisemix, Lizbon, Portekiz)
- pH Metre (OHAUS Corporation, New Jersey, Amerika Birleşik Devletleri)
- Rotor-Gene Q Real-time PCR (Qiagen, Düsseldorf, Almanya)
- 96 kuyucuklu plate (NEST, Jiangsu, Çin)

- 6 kuyucuklu plate (NEST, Jiangsu, Çin)
- CO2 İnkübatör (ESCO, Changi, Singapur)
- Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet) (Mikrotest, Ankara, Türkiye)
- Epoch Spektrofotometre (BioTek, Winooski, Vermont, Amerika Birleşik Devletleri)
- İnvirt Mikroskop (Leica, Wetzlar, Almanya)
- Su Banyosu (WiseBath, Taquiq, Filipinler)
- Moleküler Biyoloji uygulamaları için gerekli diğer sarf malzemeler

#### 3.1.3. Kitler ve solüsyonlar

- TRIzol (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- Kloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- İzopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- Etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, Amerika Birleşik Devletleri)
- 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonya)
- RIPA Lizis Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye)
- Laemmlı Sample Buffer, 10x (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye)
- Beta Aktin Primer Antikor (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Amerika Birleşik Devletleri)
- ING3 Primer Antikor (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Amerika Birleşik Devletleri)
- Anti-mouse Sekonder Antikor (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Amerika Birleşik Devletleri)
- Ponceau S (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye)
- Süt Tozu
- Pierce ECL Western Blot Substrat (Thermo Scientific, Wilmington, DE, Amerika Birleşik Devletleri)
- Proteaz İnhibitör Kokteyl (Thermo Scientific, Wilmington, DE, Amerika Birleşik Devletleri)
- PMSF (Sigma-Aldrich, Milano, İtalya)

- Trizma Base (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- Akrilamid (BioShop, Ontario, Kanada)
- Bis-Akrilamid (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- RPMI 1640 besi yeri (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye)
- Tripsin (Gibco®, Grand Island, Amerika Birleşik Devletleri)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco®, Grand Island, Amerika Birleşik Devletleri)
- Penisilin-Streptomisin (Gibco®, Grand Island, Amerika Birleşik Devletleri)
- L-Glutamin (Sigma-Aldrich®, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich®, St. Louis Missouri, Amerika Birleşik Devletleri)
- Cell Viability Detection Kit-8 (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye)
- Lipofectamine 3000 (Invitrogen, San Diego, CA, Amerika Birleşik Devletleri)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *İn Siliko* analiz

cBioPortal web aracı, The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) veritabanında bulunan baş ve boyun hastalarına ait tümör ve normal doku örneklerine ait RNA dizileme verilerini kullanarak ING gen ailesi üyelerinin ve ING3'le etkileşen genlerin diferansiyel ifadesini ve kopya sayısı değişikliklerini analiz etmek için kullanıldı (Cerami et al. 2012). ING gen ailesi üyelerinin ifade seviyeleri, farklı evre ve T sınıfına sahip dokulardaki ING3 ifadesi ile ING3/EPC1 korelasyonu, kanser OMICS verilerini analiz etmede kullanılan kapsamlı bir web aracı olan UALCAN kullanılarak incelendi (Chandrashekar et al. 2017). Sengupta ve Ginos verileri, Oncomine (Rhodes et al. 2004)'dan elde edilen veriler kullanılarak oluşturuldu. ING3 için sağkalım analizi, Kaplan Meier Plotter web aracı (Györfy et al. 2010) kullanılarak yapıldı. ING3'ün etkileştiği protein ağı, String web aracı (Jensen et al. 2009) kullanılarak oluşturuldu.

### 3.2.2. Hastalar ve örneklerin temini

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmaya dahil olan bireylerden onam formu doldurmaları istendi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan alınan örneklerin patolojik incelemesi yapılarak skuamöz hücreli karsinom oldukları doğrulanan hastalar çalışmaya dahil edildi. En az %70 tümör hücresi içeriğine sahip 28 larenks tümör dokusu örneği ve bunlara karşılık gelen 28 komşu normal larenks doku örneği toplandı. Ameliyattan hemen sonra toplanan taze doku örnekleri RNA ve protein içeriklerinin bozulmasını önlemek için hızlı bir şekilde donduruldu ve -80°C'de saklandı. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik verileri Çizelge 3.1'de verilmektedir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik verileri

* Örnek adı	Yaşı / Cinsiyeti	Tümör Tipi	TNM Evre	Histolojik Evre	
1	C1	56 / E	Supraglottik	T4N2M0	IV
2	C2	70 / E	Supraglottik	T4N0M0	IV
3	C3	61 / E	Supraglottik	T3N1M0	III
4	C4	54 / K	Supraglottik	T2N0M0	II
5	C5	57 / E	Glottik	T2N1M0	III
6	C6	70 / E	Supraglottik	T1N0M0	I
7	C7	44 / E	Glottik	T4N2M0	IV
8	C8	63 / E	Glottik	T4N0M0	IV
9	C9	52 / E	Supraglottik	T2N0M0	II
10	C10	71 / E	Glottik	T4N0M0	IV
11	C11	63 / E	Glottik	T4N0M0	IV
12	C12	75 / K	Glottik	T1N0M0	I
13	C13	52 / E	Glottik	T2N0M0	II
14	C14	66 / E	Glottik	T2N0M0	II
15	C15	55 / E	Glottik	T4N2M0	IV
16	C16	52 / E	-	0	
17	C17	55 / E	Supraglottik	T4N1M0	IV
18	C18	57 / E	Supraglottik	T3N2M0	IV
19	C19	53 / E	Supraglottik	T4N2M0	IV

**Çizelge 3.1. (Devamı)**

<b>20</b>	C20	56/ E	Supraglottik	T2N0M0	II
<b>21</b>	C21	66/ E	Glottik	T4N0M0	IV
<b>22</b>	C22	30 / E	Glottik	T2N0M0	II
<b>23</b>	C23	58 / E	Glottik	T2N0M0	II
<b>24</b>	C24	51 / E	Supraglottik	T2N2M0	IV
<b>25</b>	C25	66 / E	Glottik	T3N2M0	IV
<b>26</b>	C26	68 / E	Supraglottik	T1N0M0	I
<b>27</b>	C27	60 / E	Glottik	T4N2M0	IV
<b>28</b>	C28	67 / E	Glottik	T3N2M0	IV

#### 3.2.3. Doku örneklerinden RNA izolasyonu

Eşit miktarda tümör ve normal larenks doku örnekleri sıvı nitrojen içerisinde havan yardımıyla parçalandı. Parçalanmış örnekler TRIzol solüsyonu (Invitrogen, San Diego, CA, Amerika Birleşik Devletleri) içerisine alındı ve üretici firmanın protokolü takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kısaca, doku örnekleri TRIzol solüsyonu içerisinde pipet yardımıyla iyice homojenize edildi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek dokuların iyice parçalanması sağlandı. Sonrasında örneklerin üzerine 100 µl kloroform eklenerek elde iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi ve 4°C’de 12,000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Faz ayrışması sonrasında üstteki RNA içeren sıvı fazlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Sıvı fazlara 250 µl izopropanol eklenerek örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 4°C’de 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüpün alt kısmında beyaz renkte çökelti şeklinde görülebilen RNA’lar %75 etil alkolle yıkanarak 4°C’de 7.500 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Kurumaya bırakılan RNA’lar iyice kuruduktan sonra nükleaz içermeyen moleküler grade su içerisinde çözüldü. Total RNA konsantrasyon ve saflıkları Epoch 2 Mikroplate Spektrofotometre (BioTek, Winooski, VT, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak ölçüldü.

#### 3.2.4. cDNA sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı PCR

Her örnek için toplam 1 µg RNA kullanılarak, 'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'i (Applied Biosystems, Foster City, CA, Amerika Birleşik Devletleri) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. ING ailesi üyelerinin rölatif gen ifade analizleri, 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonya) kullanılarak Rotor-Gene qRT-PCR (Qiagen, Düseldorf) cihazı ile kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (qRT-PCR) ile analiz edildi. GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı ve deneyler 2 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Rölatif kantitasyon analizi delta-delta-CT metodu kullanılarak yapıldı (Livak and Schmittgen 2001). Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** qRT-PCR primer dizileri

Gen	Dizi
ING1a-F	5'- GGCTCGGAGACAGTTTCAGG-3'
ING1a-R	5'- AGCTCCACCATCTGGCTCA-3'
ING1b-F	5'- TTGCAGAGAAATGTCTCGCTG-3'
ING1b-R	5'- CCACCATCTGGCTCACGAT-3'
ING2-F	5'- TCTGTGCTGCGAGAGCTG-3'
ING2-R	5'- TCCACCAATTCGAGCATTTGTG-3'
ING3-F	5'- CAAAACCTCCGGCGACAGC-3'
ING3-R	5'- ATCTCGCGCATTTCCGTGA-3'
ING4-F	5'- AGAGGACCTGAAGGCTGAAAT-3'
ING4-R	5'- TTGCACTTGCCATAGGCTTC-3'
ING5-F	5'- GCCATGTACTTGGAGCACTA-3'
ING5-R	5'- TCTGCAGCCAGGATGTCA-3'
GAPDH-F	5'- CCATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'
GAPDH-R	5'- GGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'

#### 3.2.5. Western Blot analizi

Proteinler, PMSF (Roche, Basel, İsviçre) ve fosfataz inhibitör kokteyli (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika Birleşik Devletleri) içeren RIPA Lysis Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanılarak izole edildi. İzole edilen protein örnekleri 9/1 oranında 10x Laemmli Sample Buffer (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ile karıştırıldı. Hazırlanan proteinler 100°C'de 5 dakika boyunca kaynatıldı ve deneylerde kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı. Her protein örneğinden eşit miktarlarda kullanılarak proteinler %10 SDS-PAGE jel ile ayrıldı ve Trans-Blot® Turbo TM Transfer Sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA, Amerika Birleşik Devletleri) ile nitroselüloz membranlara aktarıldı. Membranlar, 1×PBST tamponu (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) içerisinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Bloklanmış membranlar 4°C'de gece boyunca anti-ING3 (seyreltilmiş 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika Birleşik Devletleri) veya anti-β-aktin (seyreltilmiş 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika Birleşik Devletleri) primer antikoları ile blotlandı.

Membranlar PBST ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat HRP ile konjuge sekonder antikorla (seyreltilmiş 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Amerika Birleşik Devletleri) problandı. Protein sinyalleri Clarity Max ECL Western Blot Substrate (BioRad, Hercules, CA, Amerika Birleşik Devletleri) veya ClearBand Western Blotting Substrate (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanılarak görüntülendi.

#### 3.2.6. FaDu hücrelerinin kültür koşulları

FaDu hücreleri %1 penisilin/streptomisin) (Gibco®, Grand Island, Amerika Birleşik Devletleri), %1 L-Glutamin (Sigma-Aldrich®, St. Louis Missouri Amerika Birleşik Devletleri), %10 FBS (Gibco®, Grand Island, Amerika Birleşik Devletleri) eklenerek hazırlanan RPMI-1640 (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) besi yeri içerisinde çoğaltıldı. Hücreler, 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li nemlendirilmiş inkübatörde içerisinde kültüre edildi.

#### 3.2.7. FaDu hücrelerine ING3 ve kontrol plazmitlerinin transfeksiyonu

ING3'ün açık okuma çerçevesi pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA Ekspresyon Vektörüne (Thermo) üretici firmanın protokolü takip edilerek klonlandı. Doğru yönde insertlere (pcDNA-ING5) sahip olan koloniler koloni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak seçildi ve plazmitler EcoSpin Plazmid İzolasyon Kiti (EcoTech Biotechnology, Erzurum Türkiye) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek izole edildi.

Plazmidler daha sonra herhangi bir mutasyonun olmadığını tespit etmek için Sanger yöntemi kullanılarak dizilendi. Kontrol plazmid olarak pcDNATM3.1/V5-His-TOPO/lacZ (pcDNA-LacZ) kullanıldı. Transfeksiyon işlemi Lipofectamine 3000 Transfection Reagent kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyu için 150.000 hücre olacak şekilde ekildi. Bir gün sonra transfeksiyon işlemi kısaca tarif edildiği şekilde yapıldı. 6 kuyucuklu plakalara her kuyu için 1 µl LP 3000, 1,25 µl P3000 kullanılarak transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. 125 µl Opti-MEM besiyeri ile LP3000 ve ayrı bir tüpte de 125 µl Opti-MEM besiyeri ile P3000 karıştırıldı. Daha sonra bu iki karışım birleştirildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücreler bu transfeksiyon karışımı ile muamele edilerek 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

ING3 genini yüksek düzeyde ifade eden FaDu hücreleri ve kontrol hücrelerinin seçimini sağlamak amacı ile %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penicilin/ streptomisin, %1 L-Glutamin, 250µg/ml Geneticin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Amerika Birleşik Devletleri) eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besi yeri içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültür edildi. Dirençli hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltıldı.

#### 3.2.8. Hücre sayımı

T25 flasklarda ING3 genini yüksek düzeyde ifade eden FaDu-ING3 ile boş vektörle transfekte edilen FaDu-Kontrol hücreleri %75-85 konfluensiye ulaşması sonrasında PBS ile yıkandı. Tripsin ile kaldırılıp sonrasında santrifüj ile çöktürüldü. 2 ml RPMI-1640 besi yeri içerisinde çözüldü. Sayımı yapılacak hücreler Tripan mavisi

solüsyonu ile 1:1 oranda karıştırıldı ve hemositometre lam ve lameli arasına yüklendi. Mikroskopta sayım gerçekleştirildi ve Ortalama Hücre Sayısı x Dilüsyon oranı x 10.000 formülü kullanılarak hücre sayısı hesaplandı.

#### **3.2.9. Yara kapama deneyi**

FaDu-ING3 ve FaDu-Kontrol hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 500.000 hücre gelecek şekilde ekildi. Hücreler %100 yoğunluğa ulaştıktan sonra 100 µl'lik pipet ucu ile yaralar açıldı ve yaraların fotoğrafları çekildi. 24 saat sonra hücrelerin tekrar fotoğrafları çekildi ve göç etme potansiyelleri ile yara kapama oranları gruplar arasında karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

#### **3.2.10. Hücre canlılık testi**

FaDu-ING3 ve FaDu-Kontrol hücrelerinin canlılığı Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8, EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) kullanılarak değerlendirildi. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 2500 hücre gelecek şekilde ekildi. 2 gün boyunca ölçüm yapıldı. Hücrelerin canlılıklarını değerlendirmek için kuyucuklara %10 oranında CVDK-8 reaktifi eklendi ve kuyulardaki renk gelişimi için 37°C'de karanlıkta 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında 450 nm'de optik yoğunluklar, bir Epoch 2 Mikroplaka Spektrofotometresi (BioTek, Winooski, VT, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak ölçüldü.

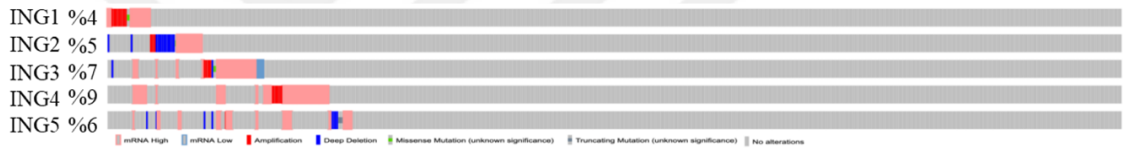
#### **3.2.11. İstatistiksel analiz**

ING3-EPC1 ifade korelasyonu Pearson's Korelasyon testi kullanılarak değerlendirildi. Sağkalım analizi Kaplan Meier analizi kullanılarak yapıldı. Tümör örneklerinde histolojik derecenin ING3 ve EPC1'den en az birinde bulunan genomik değişiklikler ile ilişkisi Ki-kare testi kullanılarak test edildi. 0,05' ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

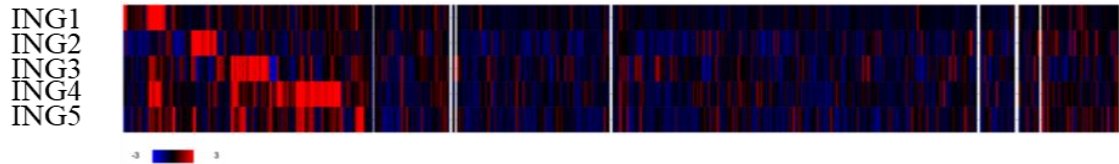
#### 4.1. ING Gen Ailesi Üyeleri LSHK Hastalarında Artan İfadeye ve Önemli Genetik Değişikliklere Sahiptir

Öncelikle, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom örneklerinde ING ailesi üyelerinin mutasyon taşıma durumları ve bu genlerde meydana gelen genetik değişiklikler cBioPortal online aracı kullanılarak analiz edildi. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastalarında ING ailesi üyelerinin yüksek mutasyon frekanslarına sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 4.1). ING3, ING4 ve ING5 genleri en yüksek dizi değişikliğine sahip olan üç gen olmakla birlikte mutasyon oranlarının sırasıyla %7, %9 ve %6 olduğu gösterildi (Şekil 4.1).



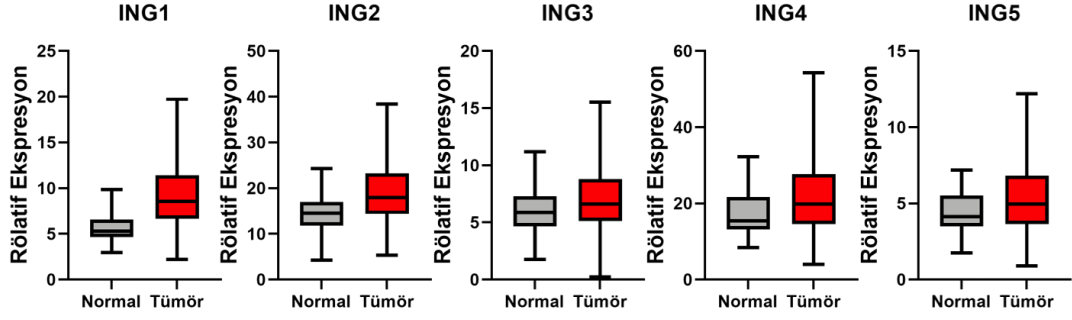
**Şekil 4.1.** Baş ve boyun kanseri dokularında ING ailesi üyelerinde önemli genetik değişiklikler görülmektedir.

Yine cBioPortal veritabanı kullanılarak yapılan analizler neticesinde ING gen ailesi üyelerinin ifadelerinin mRNA seviyesinde hasta örneklerinin önemli bir kısmında arttığı ortaya konuldu (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Baş ve boyun kanseri dokularında ING ailesi üyelerinin ifade profili

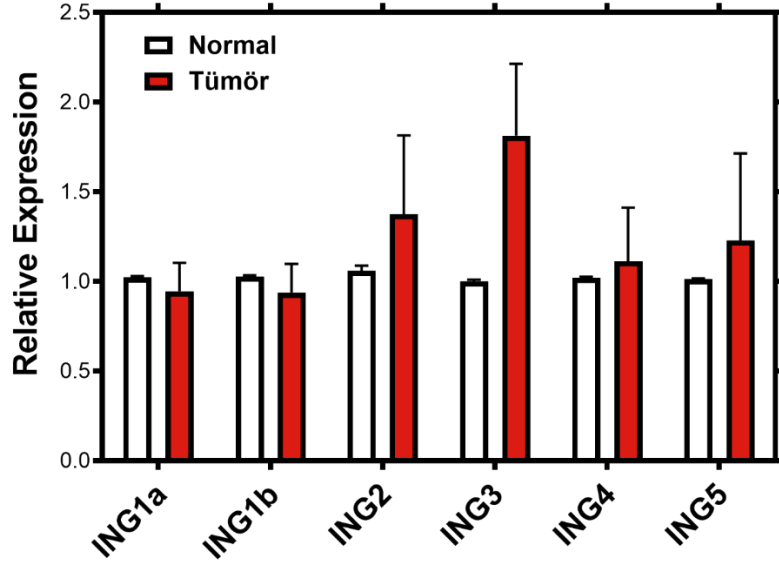
Daha sonra UALCAN web portalı kullanılarak baş ve boyun kanser ve normal dokularında ING ailesi üyelerinin ifadeleri mRNA düzeyinde araştırıldı. Elde ettiğimiz bulgular normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında primer baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinde ING ailesi üyelerinin anlamlı olarak yüksek düzeyde ifade edildiğini gösterdi ( $p < 0,05$ , Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom örneklerinde normal örneklerle kıyasla ING ailesi üyelerinin rölatif ifade seviyesi.

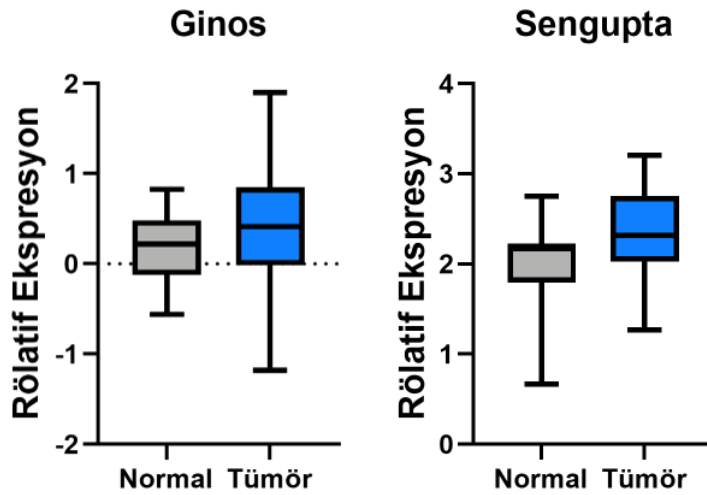
#### **4.2. ING3 Larenks Kanser Dokularında Yüksek Düzeyde İfade Edilir ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilidir**

In siliko analizler neticesinde elde edilen bulguları doğrulamak adına larenks kanseri hastalarından toplanan normal larenks ve tümör dokularında ING gen ailesi üyelerinin ifadeleri mRNA düzeyinde qRT-PCR ile incelendi. Sonuçlar, ING3 ifade seviyesinin kanser doku örneklerinde normal doku örneklerine kıyasla anlamlı olarak arttığını ortaya koyarken, ING1a, ING1b, ING2, ING4 ve ING5 ifadeleri açısından kanser doku örnekleri ve normal doku örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının normal doku örneklerine kıyasla kanser doku örneklerinde ING ailesi üyelerinin ifade seviyesi.

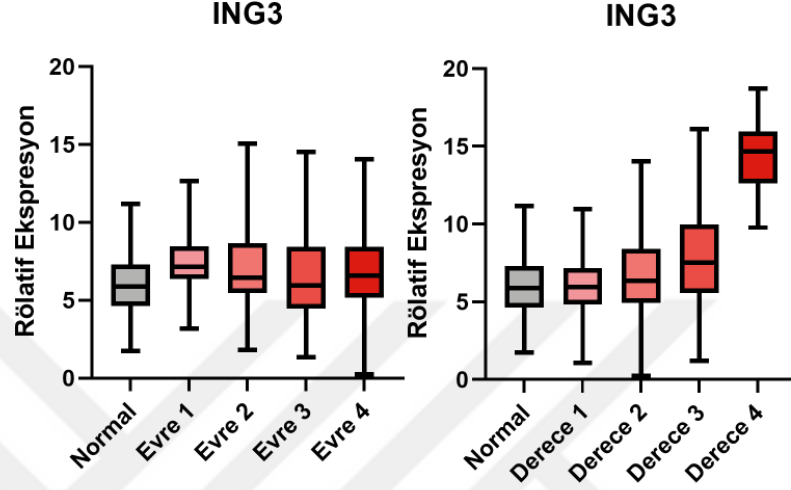
Hasta örnekleri kullanarak göstermiş olduğumuz ING3 genindeki ifade değişimini doğrulamak adına Oncomine online portalında bulunan verisetlerinde hasta örneklerinde ING3 geni ifade düzeyini inceledik. Sengupta ve Ginos verileri, ING3'ün baş ve boyun kanser doku örneklerinde normal doku örneklerine kıyasla anlamlı olarak yüksek ifade düzeyine sahip olduğunu gösterdi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5** Sengupta ve Ginos verisetlerinde rölatif ING3 ifade seviyesi

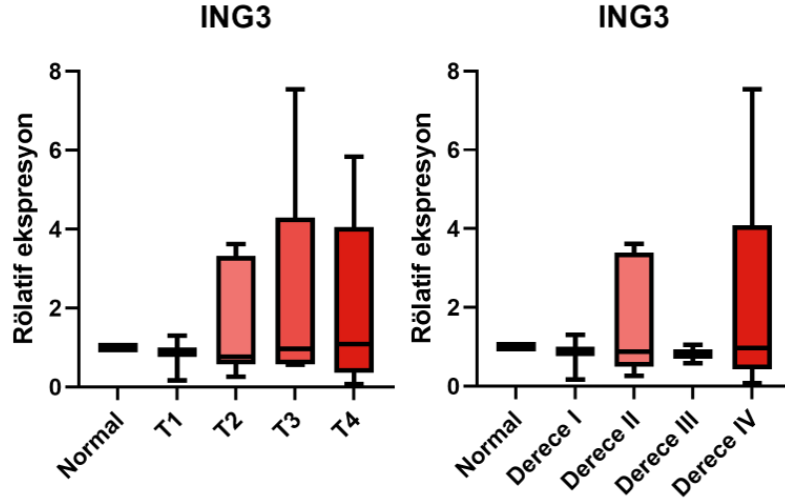
Sonrasında yine, UALCAN online veritabanı kullanılarak baş ve boyun kanseri hastalarında ING3 mRNA ifade seviyesinin klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

araştırıldı. Bulgularımız, ileri evre (evre 3 ve 4) ve yüksek dereceli (derece 3 ve 4) baş ve boyun kanseri olan hastaların tümör örneklerinde ING3 seviyesinin erken evre (evre 1 ve 2) ve düşük dereceli (derece 1 ve 2) hastaların tümör örneklerine göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** UALCAN veritabanında yapılan analizler neticesinde farklı derece ve evrede baş ve boyun kanser hastalarının doku örneklerinde rölatif ING3 ifade seviyesi.

Kendi doku örneklerini kullanarak yaptığımız analizler de benzer şekilde ileri evre (evre 3 ve 4) ve yüksek dereceli (derece 3 ve 4) baş boyun kanseri olan hastaların tümör örneklerinde ING3 seviyesinin daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.7).

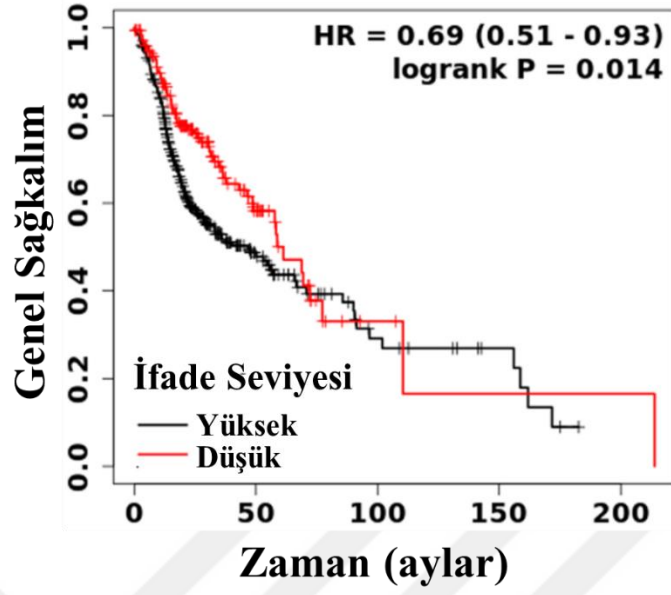


**Şekil 4.7.** Hasta örnekleri kullanılarak yapılan analizler neticesinde farklı derece ve evrede baş ve boyun kanser hastalarının doku örneklerinde rölatif ING3 ifade seviyesi.

### 4.3. ING3'ün Artan İfadesi Baş ve Boyun Kanseri Hastalarında Kötü Prognozla İlişkilidir

Baş ve boyun kanseri hastalarında yüksek ING3 ifadesinin prognostik önemini araştırmak için Kaplan-Meier Plotter veri tabanı kullanıldı. Analiz sonuçları, ING3 ifadesinin baş ve boyun kanseri hastalarının prognozu ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ortaya koydu. Onkojenik potansiyelinin aksine, daha düşük ING3 ifadesinin kötü genel sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya koydu (Şekil 4.8).

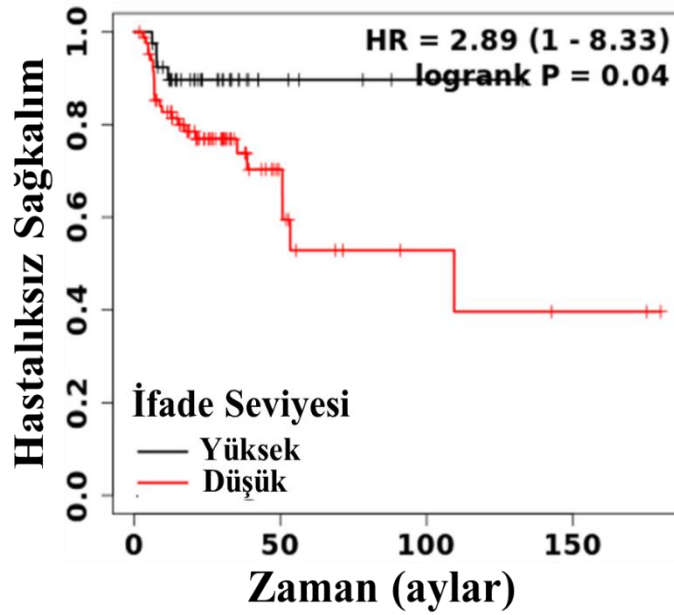
## ING3



Şekil 4.8 ING3 ifade seviyesinin baş ve boyun kanseri hastalarında genel sağkalım ile ilişkisi.

Diğer yandan, yüksek ING3 ifadesinin, bulgularımızla paralel olarak hastalısız sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu gösterdi (Şekil 4.9).

## ING3

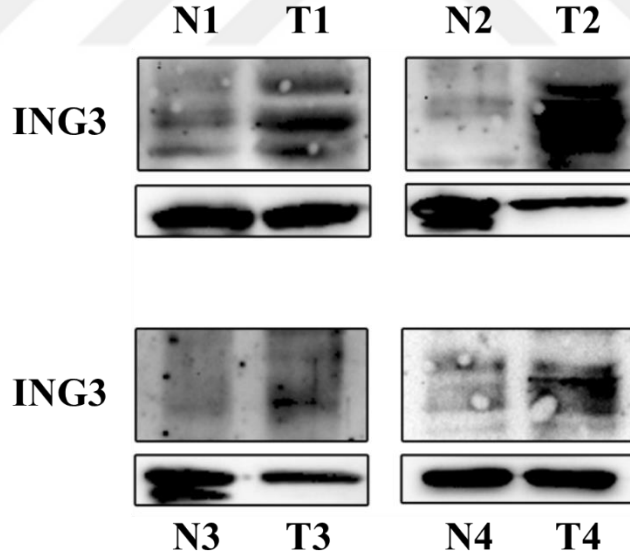


Şekil 4.9. ING3 ifade seviyesinin baş ve boyun kanseri hastalarında hastalısız sağkalım ile ilişkisi.

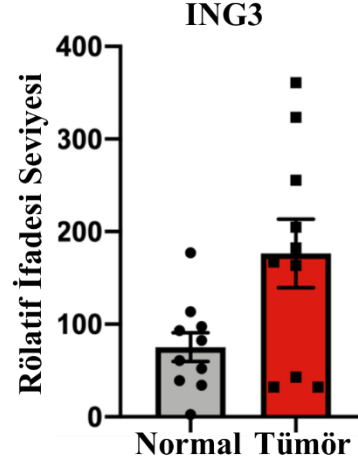
Elde edilen bu bulgular, ING3 ifadesinin baş ve boyun kanseri hastalarının prognozu ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ve larenks kanseri hastalarının sağ kalımının öngörülmesi için faydalı bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

#### 4.4. ING3 Protein Seviyesi Larenks Kanseri Hastalarında Artmıştır

Bulgularımız ING3'ün mRNA düzeyinde ifadesinin normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında larenks kanseri doku örneklerinde önemli ölçüde daha yüksek olduğu göstermişti. Elde edilen bu sonuçları doğrulamak için, larenks kanseri hastalarından toplanan 10 adet tümör ve normal doku çiftinde ING3 protein ifade seviyesi western blot analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar, qRT-PCR ve *in siliko* analizlerimiz ile paralel olarak ING3 ifadesinin protein seviyesinde, larenks tümör doku örneklerinde normal doku örneklerine kıyasla önemli ölçüde arttığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



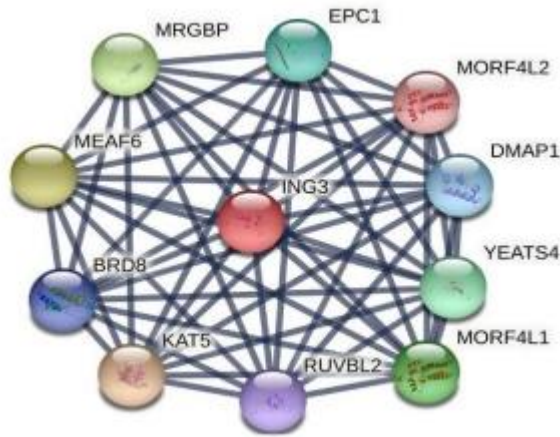
Şekil 4.10. Larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının normal ve tümör doku örneklerinde ING3 protein seviyesinin western blot analizi.



Şekil 4.11. Larenks skuamöz hücreli karsinom hastalarının normal ve tümör doku örneklerinde rölatif ING3 protein seviyesi.

#### 4.5. ING3 DNA Hasarıyla İlişkili Önemli Genlerle Etkileşir

Baş ve boyun kanseri hastalarında ING3'ün genetik değişiklikleri, ifade profili ve prognostik değeri açısından önemi gösterildikten sonra, ING3'ün etkileşimde olduğu olası fonksiyonel protein ağı STRING veritabanı kullanılarak ortaya çıkarıldı. ING3 ile en yüksek protein-protein etkileşimi skoruna sahip proteinlerin KAT5, BRD8, MEAF6, MRGBP, EPC1, MORF4L2, DMAP1, YEATS4, MORF4L1 ve RUVBL2 olduğu tespit edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. ING3 ile en yüksek protein-protein etkileşimi skoruna sahip proteinler

Daha ileri moleküler gen seti zenginleştirme analizi bu proteinlerin kromatin modifikasyonu, kromatin organizasyonu, histon asetilasyonu, DNA çift zincir kırıklarının

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

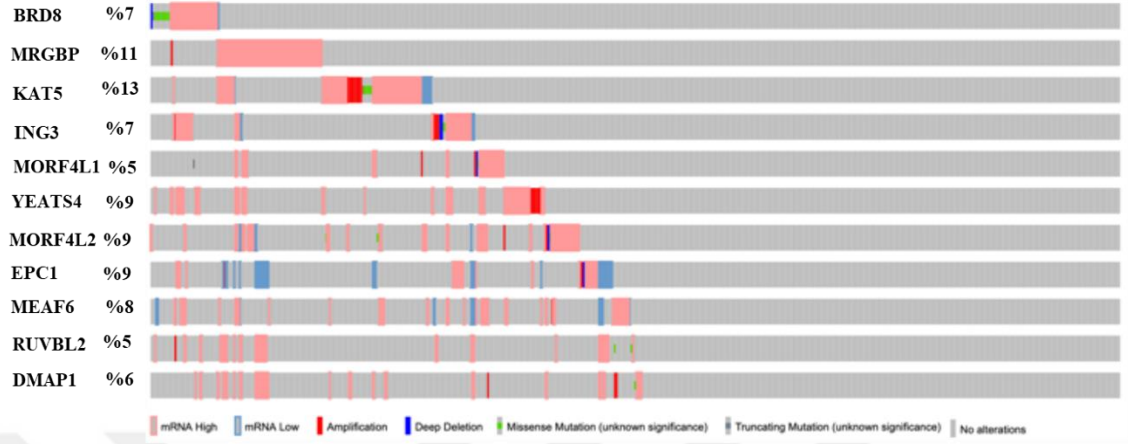
tanınması, telomeraz enzimi ile telomer bölgelerinin uzaması, TP53 aktivitesinin düzenlenmesi, AP-2 transkripsiyon faktörleri (TFAP2) ailesinin aktivasyonu, sentez bağımlı sarmal çözülme yoluyla D-döngü yapılarının çözülmesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** ING3 interaktörlerinin gen seti zenginleştirme analizi

Zenginleştirilmiş Gen Seti	Büyükük	Beklenti	Oran	p değeri
Kromatin değiştirici enzimler	275	0,28662	38,378	0
Kromatin organizasyonu	275	0,28662	38,378	0
HAT'ler histonları asetiller	142	0,148	74,324	0
DNA Çift Zincir	6	0,0062536	159,91	0,0062388
Kopmalarının Algılanması				
Telomeraz İle Telomer	6	0,0062536	159,91	0,0062388
Uzantısı				
TP53 Faaliyetinin	160	0,16676	11,993	0,011483
Düzenlenmesi				
TFAP2 (AP-2) transkripsiyon faktörleri ailesinin aktivasyonu	12	0,012507	79,955	0,012442
Genel Transkripsiyon Yolu	1169	1,2184	3,283	0,026095
Resolution of D-loop Structures through Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA)	26	0,027099	36,902	0,02678
Asetilasyon Yoluyla TP53 Aktivitesinin Düzenlenmesi	30	0,031268	31,982	0,030842

Daha sonra, baş ve boyun kanseri hastalarında ING3 ile ilişkili bu 10 genin genetik bilgisi ve işlevi cBioPortal web portalı kullanılarak araştırıldı. Baş ve boyun kanseri hastalarında tümör doku örneklerinde tespit edilen genomik değişiklikler araştırıldı ve ING3 ile ilişkili bu 10 genin baş ve boyun kanseri tümör doku örneklerinde önemli genetik değişikliklere sahip oldukları görüldü. Bu genlerde 5 farklı genetik değişikliğin

varlığı tespit edilmekle birlikte, yüksek mRNA ifadesi ve amplifikasyon en sık gözlenen genetik değişiklikler olarak belirlendi (Şekil 4.13).



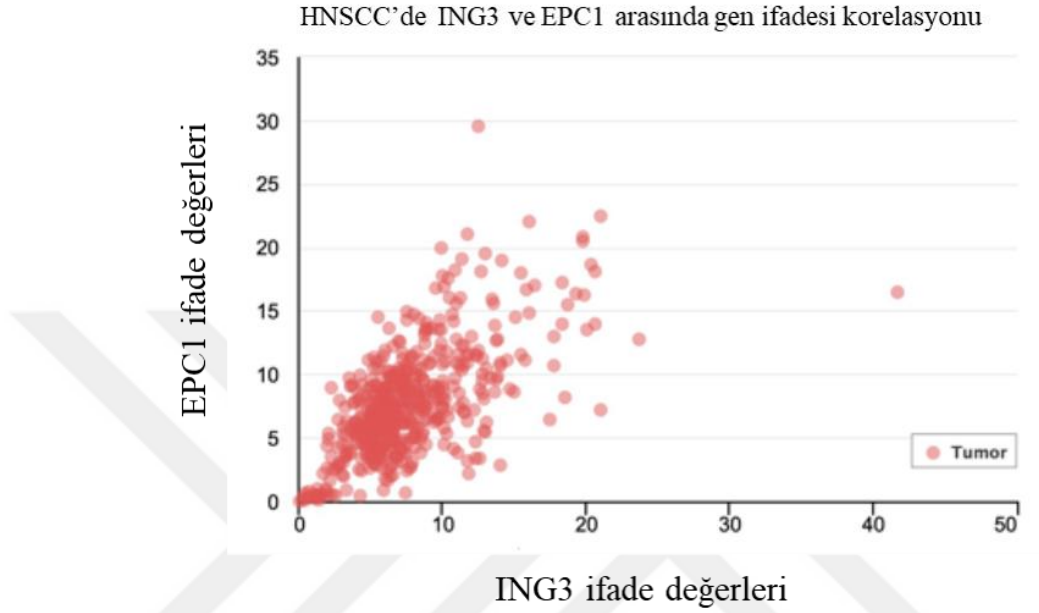
**Şekil 4.13.** ING3 ile ilişkili genlerin genetik değişiklik sıklıkları

Daha sonra, baş ve boyun kanseri örneklerinde ING3 interaktörlerinde görülen genetik değişikliklerin birlikte gözlemlenip gözlemlenmediği incelendi. Sonuçlar, ING3'ün hem EPC1 hem de MEAF6 ile yüksek düzeyde ilişkili olduğunu göstermesine rağmen yalnızca ING3'ün EPC1 ile korelasyonu istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.2). Bu nedenle, ileri analizler için EPC1 seçildi.

**Çizelge 4.2.** Baş ve boyun kanser örneklerinde ING3 interaktörlerinde görülen genetik değişikliklerin birlikte var olma analizi

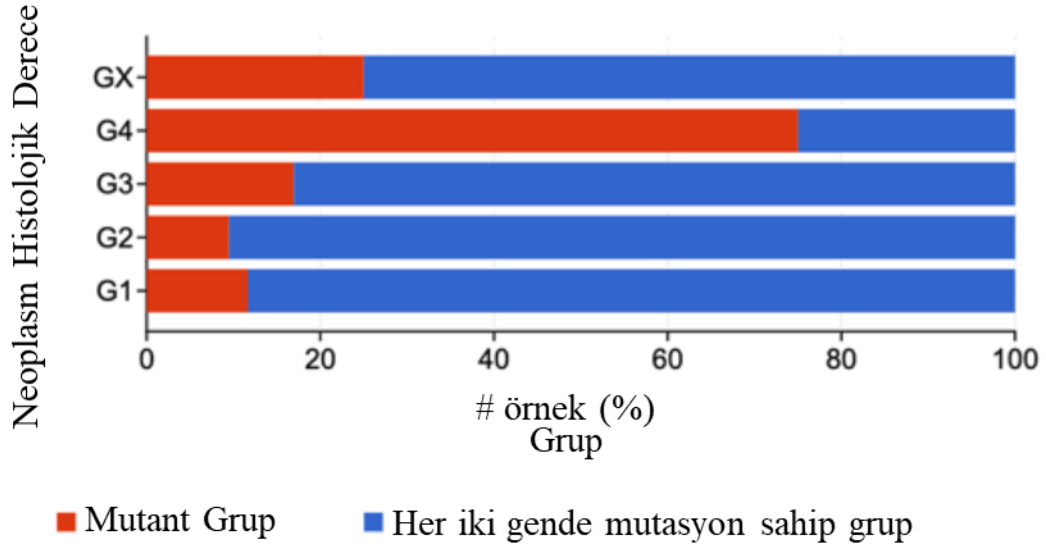
Gen 1	Gen 2	Hiçbirisinde	A'da fakat B'de değil	B'de fakat A'da değil	Her ikisinde de	Log Odds Oranı	p değeri	Eğilim
MEAF6	DMA1	194	6	0	3	>3	<0,001	Birlikte görülme
MORF4L2	MEAF6	182	12	5	4	>3	0,003	Birlikte görülme
ING3	MEAF6	187	7	6	3	>3	0,006	Birlikte görülme
MRGBP	MORF4L2	176	11	12	4	2.415	0,021	Birlikte görülme
ING3	EPC1	188	8	5	2	>3	0,04	Birlikte görülme

ING3 ve EPC1 arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için UALCAN web portalı kullanılarak korelasyon analizi gerçekleştirildi. Korelasyon analizi ING3 ifadesinin baş ve boyun kanseri hastalarında EPC1 ifadesi ile güçlü pozitif korelasyona sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** ING3 ve EPC1 ifadesinin korelasyon analizi

Daha sonra, cBioPortal web portalı kullanılarak bu iki genin ifadesinin değişimi ile baş ve boyun kanseri örneklerinin histolojik derecesi arasındaki ilişki araştırıldı. Bu iki genin ifade değişikliğine sahip hastaların ileri histolojik derece baş ve boyun kanserine sahip olma eğiliminde oldukları gösterildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Baş ve boyun kanseri hastalarında ileri histolojik evreye sahip olmak ile ING3 ve EPC1 değişikliklerinin ilişkisi.

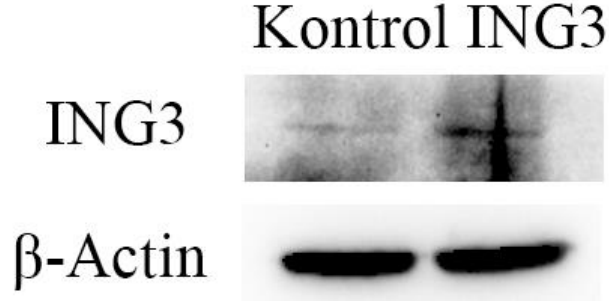
#### 4.6. FaDu Hücrelerinde Yüksek Düzeyde İfade Edilen ING3 Hücre Canlılığını ve Göçünü Artırmıştır

ING3'ün onkojenik potansiyelini değerlendirmek için baş boyun kanseri hücre hattı olan FaDu hücrelerine ING3 genini içeren bir plazmit transfekte edilip sonrasında seçilim yapılarak ING3'ü yüksek düzeyde ifade eden hücreler elde edildi. Bu hücrelerin ING3'ü yüksek düzeyde ifade ettiği qRT-PCR ile doğrulandı (Şekil 4.16).



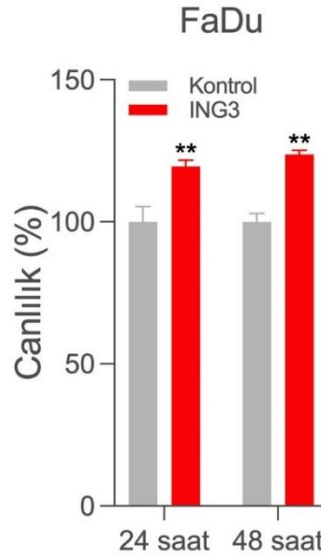
Şekil 4.16. FaDu-Kontrol ve FaDu-ING3 hücrelerinde mRNA düzeyinde rölatif ING3 seviyesi.

ING3 ifadesindeki artışın protein düzeyde de doğrulaması için Western Blot analizi yapıldı ve benzer şekilde FaDu-ING3 hücrelerinin FaDu-Kontrol hücrelerine göre daha yüksek ING3 seviyesine sahip oldukları doğrulandı (Şekil 4.17).



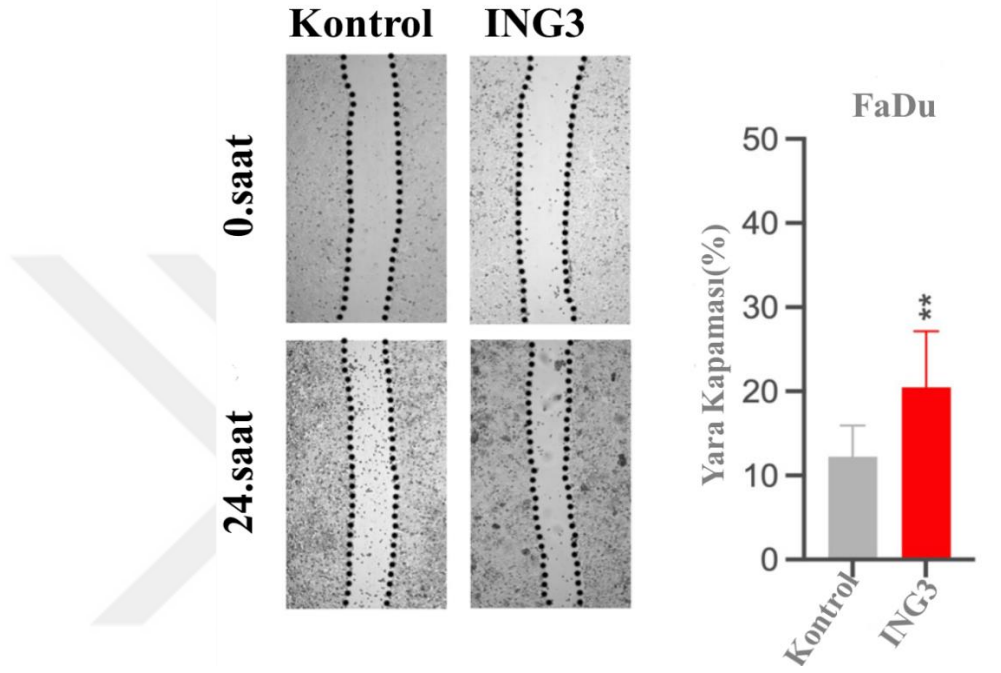
**Şekil 4.17.** FaDu-Kontrol ve FaDu-ING3 hücrelerinde protein düzeyinde rölatif ING3 seviyesi.

ING3'ün baş ve boyun kanseri hücrelerinde kanser ilişkili fenotipler üzerindeki etkilerini gözlemleyebilmek için öncelikle artmış ING3 seviyesinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendi. 96 kuyucuklu plakalara ekilen FaDu-Kontrol ve FaDu-ING3 hücreleri 24 ve 48 saat süre boyunca takip edildi ve artmış ING3 seviyesinin baş ve boyun kanser hücrelerinin canlılığını 48 saat sonunda anlamlı olarak arttırdığı gösterildi (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** Artmış ING3 seviyesi baş ve boyun kanseri hücrelerinin canlılığını artırdı

ING3'ün baş ve boyun kanseri hücrelerinin göçü üzerindeki etkileri yara kapama testi ile incelendi. 6 kuyucuklu plakalara ekilen FaDu-Kontrol ve FaDu-ING3 hücreleri 24 saat süre sonunda takip edildi ve artmış ING3 seviyesinin baş ve boyun kanser hücrelerinin göç etme potansiyelini 24 saat sonunda anlamlı olarak arttırdığı gösterildi (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Artmış ING3 seviyesi baş ve boyun kanseri hücrelerinin göç etme potansiyelini artırdı.

Bu bulgular ING3'ün baş ve boyun kanserinde onkogenik potansiyel taşıdığını doğrular niteliktedir.

Baş ve boyun kanserleri dünya genelinde en sık görülen agresif tümörlerden biridir. Cerrahi ve kanser ilişkili terapi yaklaşımlarında sürekli ilerlemeler olmasına rağmen baş ve boyun kanseri hastaları %50-70 genel 5 yıllık sağkalım oranıyla oldukça yetersiz sağkalım oranına sahiptir (Miranda-Galvis et al. 2021). Düşük sağkalım oranına ve kötü klinik sonuçlara yol açan ana faktörlerin sıklıkla tekrar eden bölgesel rekürens ve metastaz olduğu kabul edilir (Prabhu et al. 2015) ve güvenilir prognostik belirteçlerin olmaması mevcut tedavi yöntemlerini daha az etkili hale getirir. Bu durum baş ve boyun kanseri ile ilişkili altta yatan moleküler mekanizmaların tanımlanmasını önemli bir öncelik haline getirmektedir. Bu belirteçlerin tanımlanmasının, ameliyat sonrası daha

yüksek nüksetme ve metastaz potansiyeli olan hastaların belirlenmesine yardımcı olarak baş ve boyun hastalarının uygun adjuvan post-operatif tedavi stratejileri ile tedavi edilebilmeleri için fırsat sunacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, ING gen ailesinin farklı üyelerinin ifade seviyeleri araştırılarak ileri evre baş ve boyun kanseri hastaları için ING3'ün potansiyel bir biyobelirteç olabileceği ortaya koyuldu. ING3'ün normal doku örneklerine kıyasla tümör doku örneklerinde yüksek düzeyde ifade edildiği gösterildi ve baş ve boyun kanserinde onkogenik potansiyele sahip olduğu gösterildi. Yapılan *in siliko* analizler de bulgularımıza paralel olarak ING3'ün ileri evre ve yüksek dereceli baş ve boyun tümör dokularında anlamlı olarak yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermektedir.

Çok sayıda izoforma sahip olan beş farklı üyeden oluşan ING gen ailesi, DNA hasarının onarımı, apoptoz, yaşlanma, hücre döngüsünün düzenlenmesi, histon modifikasyonları ve transkripsiyonel regülasyon (proteinler veya DNA ile etkileşimleri ile) ile ilişkili hücre içi sinyallerin düzenleyicileri olarak önemli rollere sahiptir (Gou et al. 2017). Kanser hücrelerinde sık sık inaktivasyonları göz önüne alındığında, çoğunlukla tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilirler (Ludwig et al. 2011) ve baş boyun skuamöz hücreli karsinom dahil çeşitli kanser türlerinde ING3 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (Zhang et al. 2017). Bununla birlikte yakın zamanda yapılan bir çalışma, ING3'ün ince bağırsak ve kemik iliği gibi kendini yenileme kapasitesi yüksek olan ve hızla çoğalan dokularda yüksek düzeyde ifade edildiğinin gösterilmesi, ING3'ün hücrel büyümede de önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Nabbi et al. 2015). Benzer şekilde, hipertrofik kardiyomiyositlerde ING3'ün yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiş, yüksek düzeyde ING3 ifadesinin AMPK'nin inaktivasyonu ve p38 MAPK sinyal yolağının aktivasyonu ile kalp kasında anormal bir genişlemeye yol açtığı ortaya konulmuştur (Wang et al. 2014).

ING1 ve ING2'nin nakavt edildiği fare modellerinde spontan tümörlerin geliştiği gösterilmiş fakat ING4 nakavt fare modellerinde ise spontan tümör oluşumunun olmadığı bildirilmiştir. Ancak yakın zamanda yapılan bir çalışmada fare modellerinde azalan ING3 ifadesi araştırılmış ve homozigot ING3 kaybı olan farelerin embriyonik letal olduğu gösterilmiş ve ING3 eksikliği büyüme geriliği ile ilişkilendirilmiştir (Fink et al.

2019). Bu durumun, DNA hasarı ve PI3K/Akt sinyal yollarındaki bozulmalarla ilişkili olarak inhibe olmuş proliferasyon ve indüklenmiş apoptoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mouche et al. 2019). Bu bulgular doğrultusunda, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, güçlü ING3 nükleer boyaması ile malin melanom hastalarında hastalık-sağkalımı arasında anlamlı bir negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Wang et al. 2007). Başka bir çalışma, ING3'ün iyi huylu prostat dokularına kıyasla prostat kanseri dokularında yüksek düzeyde ifade edildiğini ve yüksek düzeyde ING3 ifadesinin terapötik direnç ve kötü klinik sonuç ile ilişkili olduğunu göstermiştir (McClurg et al. 2018). Aynı çalışma, yüksek düzeyde ektopik ING3 ifadesinin, tümörojenik olmayan normal insan dermal fibroblastlarını transforme etmek için tek başına yeterli olduğunu ve hücre proliferasyonu için gerekli olan bir gen ifade profilini oluşturduğunu bildirmiştir (McClurg et al. 2018). Ayrıca, DU145 prostat kanseri hücrelerinde ING3 ifadesinin baskılanması ile *in vitro* hücre göçü ve invazyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (Almami et al. 2016). İlginç bir şekilde, artan ING3 ifadesi, eritroblast transformasyonuna spesifik ilişkili gen (ERG) negatif prostat kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Almami et al. 2016). Ayrıca, iyi huylu veya lokalize prostat kanseri örneklerine kıyasla kastrasyona dirençli prostat kanseri dokularında daha yüksek ifadeye sahip ING3'ün de bulunduğu ERG benzeri 10 gen içeren bir gen setinin, hastaların klinik sonuçlarını ERG durumuna göre daha iyi tahmin ettiği gösterilmiştir (Bismar et al. 2014). Başka bir çalışmada, ING3'ün prostat kanseri hücrelerinin artan proliferasyonuna ve göçüne yol açan androjen reseptör (AR) nükleer translokasyon fonksiyonu ile AR ko-aktivatörü olduğu önerilmiştir (Nabbi et al. 2017).

Larenks kanserini içeren insan baş ve boyun kanserlerinde 2002 yılında allelik kayıp ve düşük ING3 ifadesi bildirilmiştir. Ancak, az sayıda larenks doku örnek sayısı ve protein düzeyinde tespit eksikliği göz önüne alındığında, bu çalışma ING3'ün işlevi hakkında güçlü ipuçları sağlamamaktadır (Gunduz et al. 2002). Aynı grup tarafından gerçekleştirilen mRNA seviyesinde baş ve boyun kanseri doku örneklerinde ING3 ifadesinin analizi, normal baş ve boyun dokularına kıyasla baş ve boyun kanserli doku örneklerinde ING3 ifadesinin azaldığını göstermiştir. Bununla birlikte, baş ve boyun kanseri hastalarından toplanan 71 doku çiftinin larenks kanseri hastalarına ait 13 çift doku örneklerinde ING3 ifadesi araştırılmış ve bu 13 örnekten 7 tümör dokusunda normal dokulara göre yüksek veya normal ING3 ifadesine sahip olduğu ortaya konulmuştur

(Gunduz et al. 2008). Bu bulgular, baş ve boyun kanserlerinde ING3 işlevinin karakterizasyonu için larenks kanserine özel bir dikkat gösterilerek daha fazla analiz yapılması gerektiğine işaret etmektedir. Sonuçlarımız, ortalama ING3 ifadesinin, normal doku örneklerine kıyasla larenks kanserli doku örneklerinde hem mRNA hem de protein düzeyinde daha yüksek olduğunu gösterdi. Öte yandan ING3'ün sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonunun karsinogenez sürecine katkıda bulunma potansiyeli açısından da önemlidir (Zhou et al. 2020). ING3'ün artan nükleer ifadesinin tespit edildiğinin bildirilmesine rağmen yakın zamanda yapılan bir çalışma, ING3'ün sitoplazmik ifadesinin normal doku örneklerine kıyasla baş ve boyun tümör doku örneklerinde önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Ayrıca, yüksek sitoplazmik ING3 ifadesinin, lenf düğümü metastazı ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Cengiz et al. 2010).

Büyüme inhibitörü olarak adlandırılmasına rağmen, ING2 ayrıca kolon kanserinde bir onko-protein olarak tanımlanmış; kanserli lezyonlarda aşırı ifadesi, diğer fonksiyonel testlerle desteklenmemesine rağmen tespit edilmiştir (Kumamoto et al. 2009). Larenks kanserinde potansiyel onkogen olarak rol alan ING3, amino asit sekansının ING1/2 ve ING4/5'e daha az benzerlik göstermesi ve ING ailesinin diğer üyelerinin aksine telomerik bölgelere daha uzak lokalizasyonu ile ING ailesinin en tanınmış üyesidir (Campos et al. 2004).

ING3, genel olarak transkripsiyonel aktivasyona bağlı H2A ve H4 asetilasyonundan sorumlu olan, NuA4-Tip60 MYST histon asetil transferaz kompleksi içerisinde yer alır. ING1 ve ING2'nin transkripsiyonel baskılayıcı özelliklerinin aksine ING3, larenks karsinogenezi sürecinde varsayılan onkojenik işlevi için önemli olabilecek transkripsiyonel aktivatör olarak işlev görür (Campos et al. 2004). İlginç bir şekilde, ING3 ile NuA4-Tip60 MYST histon asetil transferaz kompleksinin bileşeni EPC1 arasında güçlü bir bağlantı olduğunu gösterdik ve baş ve boyun kanserinde EPC1'in potansiyel rolünü ortaya koyduk. Ayrıca, EPC1 baskılanmasının, tümör hücresi hareketliliğinin inhibisyonuna yol açan DNA hasarının bir sonucu olarak E2F1 aracılı apoptotik sinyali indüklediği bildirilmiştir. Öte yandan EPC1'in, E2F1 ile birlikte özellikle ileri evre kanserlerde metastazla ilgili genlerin ifadesini indüklediği ortaya konulmuştur (Wang et al. 2016). İlginç bir şekilde, 500'den fazla mutant embriyonik kök hücre hattının kanserle ilişkili olan bir alt kümesinin araştırıldığı çalışmada, içerisinde

EPC1'in de bulunduğu gen setinin radyoterapiye yanıtla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Loesch et al. 2015). Bu bulgularla paralel olarak, mürin MLL-AF9 AML hücrelerinde Epc2 seviyesinin azaltılmasının apoptozun indüklenmesine ve lösemi hücrelerinin kök hücre potansiyelini kaybetmelerine yol açtığı rapor edilmiştir (Huang et al. 2014). Ek olarak, yüksek tümörjenik ve kendini yenileme potansiyeline sahip insan miyelom hücre hatlarının yan popülasyonunun içerisinde EPC1'in de bulunduğu gen seti açısından zenginleŐtiđi gösterilmiştir (Nara et al. 2013).



### 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Agresif bir kanser olan baş ve boyun kanseri dünya genelinde en sık tanısı konan kanserlerden biridir. Baş ve boyun kanserlerinin insidansı son 30 yılda düşüş trendi göstermesine rağmen ölüm oranlarındaki düşüş yeni vaka sayısındaki düşüş kadar güçlü olmamıştır (Noone et al. 2017; Yao et al. 2021).

Bu nedenle baş ve boyun kanserlerine bağlı ölümlerin azaltılabilmesi, baş ve boyun kanserine yakalanan bireylerin yaşam kalitelerinin artırılması adına baş ve boyun kanseri patogenezinin aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Bu tezin amacı, ING gen ailesi üyelerinin değişen ifadelerinin analiz etmek ve değişen ING gen ifadelerinin baş ve boyun kanseri prognozu ile ilişkisini değerlendirmektir.

Yapılan tez çalışmasında eşit miktarda toplanan normal ve tümörlü larenks dokuları ve baş boyun hücre hattı olan FaDu hücrelerinde ING3 geninin kanserleşme üzerinde pozitif etkisi olup olmadığı araştırmak amaçlanmıştır. Farklı online veri tabanlarında yapılan incelemeler sonucunda ING3 geninin baş ve boyun kanserli hastalara ait tümör örneklerinde ifadesinin artmış olması tezimizin çıkış noktasını oluşturmaktadır.

Normal ve tümör doku örneklerinden yapılan deneyler sonucunda normal dokulara kıyasla tümör dokularında hem RNA hem de protein düzeyinde ING3 ifadesinin arttığı gösterildi. Aynı zamanda baş boyun hücre hattı olan FaDu hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilen ING3'ün kontrol grubuna kıyasla hücrelerin canlılığını artırıcı bir etkiye sahip olduğu ortaya koyuldu. Benzer şekilde artmış ING3 ifadesinin hücrelerin göç etme kapasitesini de artırdığı gösterildi.

ING gen ailesinin bir üyesi olan ING3'ün daha önce prostat kanseri dahil birçok kanser türünde onkogenik bir potansiyele sahip olabileceği ileri sürülmüştür (Nabbi et al. 2017, Ngollo et al. 2017). Tezimizde yaptığımız çalışmalar doğrultusunda baş boyun kanserlerinde ING3 geninin onkogen olabileceğine dair veriler elde edildi.

## KAYNAKLAR

- Anonymous, 2002. Laryngeal cancer treatment (Adult) (PDQ®): Patient version. PDQ Cancer Information Summaries, Copyright and Permissions, USA
- Almadori, G., Bussu, F., Paludetti, G. 2006. Predictive factors of neck metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. Towards an integrated clinico-molecular classification. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 26(6), 326-334.
- Almami, A., Hegazy, S. A., Nabbi, A., Alshalalfa, M., Salman, A., Abou-Ouf, H., Riabowol, K., Bismar, T. A. 2016. ING3 is associated with increased cell invasion and lethal outcome in ERG-negative prostate cancer patients. *Tumour Biology*, 37(7), 9731-9738.
- Archambeau, J., Blondel, A., Pedoux, R. 2019. Focus-ING on DNA integrity: implication of ING proteins in cell cycle regulation and DNA repair modulation. *Cancers (Basel)*, 12, 58-77.
- Baek, S. K., Jung, K. Y., Kang, S. M., Kwon, S. Y., Woo, J. S., Cho, S. H., Chung, E. J. 2010. Clinical risk factors associated with cervical lymph node recurrence in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 20(2), 147-152.
- Baxter-Burrell, A., Chang, R., Springer, P., Bailey-Serres, J. 2003. Gene and enhancer trap transposable elements reveal oxygen deprivation-regulated genes and their complex patterns of expression in arabidopsis. *Annals of Botany*, 91(2), 129-141.
- Bismar, T. A., Alshalalfa, M., Petersen, L. F., Teng, L. H., Gerke, T., Bakkar, A., Al-Mami, A., Liu, S., Dolph, M., Mucci, L. A., Alhadjj, R. 2014. Interrogation of ERG gene rearrangements in prostate cancer identifies a prognostic 10-gene signature with relevant implication to patients' clinical outcome. *BJU International*, 113(2), 309-319.
- Blake, T. K., Kadyrzhanova, D., Shepherd, K. W., Islam, A. K. M. R., Langridge, P. L., McDonald, C. L., Erpelding, J., Larson, S., Blake, N. K., Talbert, L. E. 1996. STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression. *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 826-832.
- Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J. B., Stemhagen, A., Fraumeni, J. F. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research*, 48, 3282-3287.
- Boru, G., van Ginkel, M., Kronstad, W. E., Boersma, L. 2001. Expression and inheritance of tolerance to waterlogging stress in wheat. *Euphytica*, 117, 91-98.
- Campos, E. I., Chin, M. Y., Kuo, W. H., Li, G. 2004. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell and Molecular Life Sciences*, 61(19-20), 2597-2613.

- Cengiz, B., Gunduz, E., Gunduz, M., Beder, L. B., Tamamura, R., Bagci, C., Yamanaka, N., Shimizu, K., Nagatsuka, H. 2010. Tumor-specific mutation and downregulation of ING5 detected in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 127(9), 2088-2094.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., Schultz, N. 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401-404.
- Champagne, K. S., Kutateladze, T. G. 2009. Structural insight into histone recognition by the ING PHD fingers. *Current Drug Targets*, 10(5), 432-441.
- Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. S. K., Varambally, S. 2017. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*, 19(8), 649-658.
- Colaprico, A., Olsen, C., Bailey, M. H., Odom, G. J., Terkelsen, T., Silva, T. C., Olsen, A. V., Cantini, L., Zinovyev, A., Barillot, E., Noushmehr, H., Bertoli, G., Castiglioni, I., Cava, C., Bontempi, G., Chen, X. S., Papaleo, E. 2020. Interpreting pathways to discover cancer driver genes with Moonlight. *Nature Communications*, 11, 69.
- Coles, A. H., Jones, S. N. 2009. The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 218, 45-57.
- Collaku, A., Harrison, S. A. 2002. Losses in wheat due to waterlogging. *Crop Science*, 42, 444-450.
- Connor, S. 2007. Laryngeal cancer: how does the radiologist help? *Cancer Imaging*, 7(1), 93-103.
- Cox, M. C. H., Millenaar, F. F., van Berkel, Y. E. M. D., Peeters, A. J. M., Voesenek, L. A. C. J. 2003. Plant movement submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris* depends on hyponastic growth. *Plant Physiology*, 132(1), 282-291.
- Dantas, A., Al Shueili, B., Yang, Y., Nabbi, A., Fink, D., Riabowol, K. 2019. Biological functions of the ING proteins. *Cancers (Basel)*, 11(11), 1817.
- de Miguel-Luken, M. J., Chaves-Conde, M., Carnero, A. 2016. A genetic view of laryngeal cancer heterogeneity. *Cell Cycle*, 15(9), 1202-1212.
- Dennis, E. S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F. U., Grover, A., Ismond, K. P., Good, A. G., Peacock, W. J. 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 51, 89-97.

- Devetten, N. C., Ferl, R. J. 1995. Characterization of a maize G-box binding-factor that is induced by hypoxia. *The Plant Journal*, 7(4), 589-601.
- Dolferus, R., Klok, E. J., Delessert, C., Wilson, S., Ismond, K. P., Good, A. G., Peacock, W. J., Dennis, E. S. 2003. Enhancing the anaerobic response. *Annals of Botany*, 91, 111-117.
- Dordas, C., Rivoal, J., Hill, R. D. 2003. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Annals of Botany*, 91, 173-178.
- Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A. J., Côté, V., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., Yang, X. J., Côté, J. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Molecular Cell*, 21(1), 51-64.
- Du, Y., Cheng, Y., Su, G. 2019. The essential role of tumor suppressor gene ING4 in various human cancers and non-neoplastic disorders. *Bioscience Reports*, 39(1), 19.
- Ella, E. S., Kawano, N., Yamauchi, Y., Tanaka, K., Ismail, A. M. 2003. Blocking ethylene perception enhances flooding tolerance in rice seedlings. *Functional Plant Biology*, 30(7), 813-819.
- Fein, D. A., Lee, W. R., Hanlon, A. L., Ridge, J. A., Langer, C. J., Curran, W. J., Coia, L. R. 1995. Pretreatment hemoglobin level influences local control and survival of T1-T2 squamous cell carcinomas of the glottic larynx. *Journal of Clinical Oncology*, 13(8), 2077-2083.
- Fink, D., Yau, T., Nabbi, A., Wagner, B., Wagner, C., Hu, S. M., Lang, V., Handschuh, S., Riabowol, K., Rüllicke, T. 2019. Loss of ING3 expression results in growth retardation and embryonic death. *Cancers (Basel)*, 12(1), 80.
- Forastiere, A. A., Zhang, Q., Weber R. S., Maor, M. H., Goepfert, H., Pajak, T. F., Morrison, W., Glisson, B., Trotti, A., Ridge, J. A., Thorstad, W., Wagner, H., Ensley, J. F., Cooper, J. S. 2013. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(7), 845-852.
- Garkavtsev, I., Kazarov, A., Gudkov, A., Riabowol, K. 1996. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nature Genetics*, 14(4), 415-420.
- Genden, E. M., Ferlito, A., Silver, C. E., Jacobson, A. S., Werner, J. A., Suárez, C., Leemans, C. R., Bradley, P. J., Rinaldo, A. 2007. Evolution of the management of laryngeal cancer. *Oral Oncology*, 43(5), 431-439.
- Gong, W., Suzuki, K., Russell, M., Riabowol, K. 2005. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 37(5), 1054-1065.

- Gou, W. F., Sun, H. Z., Zhao, S., Niu, Z. F., Mao, X. Y., Takano, Y., Zheng, H. C. 2014. Downregulated inhibitor of growth 3 (ING3) expression during colorectal carcinogenesis. *The Indian Journal of Medical Research*, 139 (4), 561-567.
- Gou, W. F., Yang, X. F., Shen, D. F., Zhao, S., Sun, H. Z., Luo, J. S., Zheng, H. C. 2017. Immunohistochemical profile of ING3 protein in normal and cancerous tissues. *Oncology Letters*, 13(3), 1631-1636.
- Gournay, M., Paineau, M., Archambeau, J., Pedoux, R. 2019 Regulat-INGs in tumors and diseases: Focus on ncRNAs. *Cancer Letters*, 447, 66-74.
- Grimoldi, A. A., Insausti, P., Roitman, G. G., Soriano, A. 1999. Responses to flooding intensity in *Leontodon taraxacoides*. *New Phytologist*, 141, 119-128.
- Groome, P. A., O'Sullivan, B., Irish, J. C., Rothwell, D. M., Schulze, K., Warde, P. R., Schneider, K. M., Mackenzie, R. G., Hodson, D. I., Hammond, J. A., Gulavita, S. P., Eapen, L. J., Dixon, P. F., Bissett, R. J., Mackillop, W. J. 2003. Management and outcome differences in supraglottic cancer between Ontario, Canada, and the surveillance, epidemiology, and end results areas of the United States. *Journal of Clinical Oncology*, 21(3), 496-505.
- Gunduz, M., Beder, L. B., Gunduz, E., Nagatsuka, H., Fukushima, K., Pehlivan, D., Cetin, E., Yamanaka, N., Nishizaki, K., Shimizu, K., Nagai, N. 2008. Downregulation of ING3 mRNA expression predicts poor prognosis in head and neck cancer. *Cancer Science*, 99(3), 531-538.
- Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Ito, S., Jitsumori, Y., Nakashima, T., Nagai, N., Nishizaki, K., Shimizu, K. 2002. Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene*, 21(28), 4462-4470.
- Györfy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., Szallasi, Z. 2010. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(3), 725-731.
- Hamachi, Y., Furusho, M., Yoshida, T. 1989. Heritability of wet endurance in malting barley. *Japanese Journal of Breeding*, 39, 195-202.
- He, G. H., Helbing, C. C., Wagner, M. J., Sensen, C. W., Riabowol, K. 2005. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Molecular Biology Evolution*, 22(1), 104-116.
- He, Y., Yu, D., Zhu, L., Zhong, S., Zhao, J., Tang, J. 2018. miR-149 in Human cancer: A systemic review. *Journal of Cancer*, 9(2), 375-388.
- Huang, X., Spencer, G. J., Lynch, J. T., Ciceri, F., Somerville, T. D., Somerville, T. C. 2014. Enhancers of polycomb EPC1 and EPC2 sustain the oncogenic potential of MLL leukemia stem cells. *Leukemia*, 28(5), 1081-1091.

- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., von Mering, C. 2009. STRING 8-- a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research*, 37, D412-D416.
- Johnson, D. E., Burtneß, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., Grandis, J. R. 2020. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 92.
- Karatas, O. F., Suer, I., Yuceturk, B., Yilmaz, M., Oz, B., Guven, G., Cansiz, H., Creighton, C. J., Ittmann, M., Ozen, M. 2016. Identification of microRNA profile specific to cancer stem-like cells directly isolated from human larynx cancer specimens. *BMC Cancer*, 16(1), 853.
- Kopnin, B. P. 2000. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 65(1), 2-27.
- Koutsogiannouli, E., Papavassiliou, A. G., Papanikolaou, N. A. 2013. Complexity in cancer biology: is systems biology the answer?. *Cancer Medicine*, 2, 164-177.
- Kumamoto, K., Fujita, K., Kurotani, R., Saito, M., Unoki, M., Hagiwara, N., Shiga, H., Bowman, E. D., Yanaihara, N., Okamura, S., Nagashima, M., Miyamoto, K., Takenoshita, S., Yokota, J., Harris, C. C. 2009. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. *International Journal of Cancer*, 125(6), 1306-1315.
- Lamb, C., Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251-275.
- Lee, W. Y., Lee, D., Chung, W. I., Kwon, C. S. 2009. Arabidopsis ING and Alfin1-like protein families localize to the nucleus and bind to H3K4me3/2 via plant homeodomain fingers. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 58(3), 511-524.
- Li, X., Kikuchi, K., Takano, Y. 2011. ING genes work as tumor suppressor genes in the carcinogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oncology*, 2011, 963614.
- Libourel, I. G. L., van Bodegom, P. M., Fricker, M. D., Ratcliffe, R. G. 2006. Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. *Plant Physiology*, 142(4), 1710-1717.
- Liu, Y., Su, Z., Li, G., Yu, C., Ren, S., Huang, D., Fan, S., Tian, Y., Zhang, X., Qiu, Y. 2013. Increased expression of metadherin protein predicts worse disease-free and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 133(3), 671-679.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

- Loesch, K., Galaviz, S., Hamoui, Z., Clanton, R., Akabani, G., Deveau, M., DeJesus, M., Ioerger, T., Sacchettini, J. C., Wallis, D. 2015. Functional genomics screening utilizing mutant mouse embryonic stem cells identifies novel radiation-response genes. *PLoS One*, 10(4), e0120534.
- Loreti, E., Yamaguchi, J., Alpi, A., Perata, P. 2003. Sugar modulation of alpha-amylase genes under anoxia. *Annals of Botany*, 91, 143-148.
- Lu, M., Chen, F., Wang, Q., Wang, K., Pan, Q., Zhang, X. 2012. Downregulation of inhibitor of growth 3 is correlated with tumorigenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, 4(1), 47-52.
- Ludwig, S., Klitzsch, A., Baniahmad, A. 2011. The ING tumor suppressors in cellular senescence and chromatin. *Cell Bioscience*, 1, 25.
- Luo, J., Wu, J., Lv, K., Li, K., Wen, Y., Li, X., Tang, H., Jiang, A., Wang, Z., Wen, W., Lei, W. 2016. Analysis of postsurgical health-related quality of life and quality of voice of patients with laryngeal carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 95, e2363.
- Machiels, J. P., René Leemans, C., Golusinski, W., Grau, C., Licitra, L., Gregoire, V., 2020. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 31(11), 1462-1475.
- Mao, Z. C., Hu, Y. L., Zhong, J., Wang, L. X., Guo, J. Y., Lin, Z. P. 2003. Improvement of the hydroponic growth and waterlogging tolerance of petunias by the introduction of vhb gene. *Acta Botanica Sinica*, 45, 205-210.
- McClurg, U. L., Nabbi, A., Ricordel, C., Korolchuk, S., McCracken, S., Heer, R., Wilson, L., Butler, L. M., Irving-Hooper, B. K., Pedeux, R., Robson, C. N., Riabowol, K. T., Binda, O. 2018. Human ex vivo prostate tissue model system identifies ING3 as an oncoprotein. *British Journal of Cancer*, 118(5), 713-726.
- Miranda-Galvis, M., Loveless, R., Kowalski, L. P., Teng, Y. 2021. Impacts of environmental factors on head and neck cancer pathogenesis and progression. *Cells*, 10(2), 389.
- Morris, L. G., Chan, T. A. 2015. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*, 121, 1357-1368.
- Mouche, A., Archambeau, J., Ricordel, C., Chaillot, L., Bigot, N., Guillaudeux, T., Grenon, M., Pedeux, R. 2019. ING3 is required for ATM signaling and DNA repair in response to DNA double strand breaks. *Cell Death and Differentiation*, 26(11), 2344-2357.
- Nabbi, A., Almami, A., Thakur, S., Suzuki, K., Boland, D., Bismar, T. A., Riabowol, K. 2015. ING3 protein expression profiling in normal human tissues suggest its role in cellular growth and self-renewal. *European Journal of Cell Biology*, 94(5), 214-22.

- Nabbi, A., McClurg, U. L., Thalappilly, S., Almami, A., Mobahat, M., Bismar, T. A., Binda, O., Riabowol, K. T. 2017. ING3 promotes prostate cancer growth by activating the androgen receptor. *BMC Medicine*, 15, 103.
- Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S. P., Pedoux, R., Wang, X. W., Yokota, J., Riabowol, K., Harris, C. C. 2001. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proceeding of the National Academy Science of the USA*, 98, 9671-9676.
- Nagashima, M., Shiseki, M., Pedoux, R. M., Okamura, S., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Yokota, J., Harris, C. C. 2003. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene*, 22, 343-350.
- Nara, M., Teshima, K., Watanabe, A., Ito, M., Iwamoto, K., Kitabayashi, A., Kume, M., Hatano, Y., Takahashi, N., Iida, S., Sawada, K., Tagawa, H. 2013. Bortezomib reduces the tumorigenicity of multiple myeloma via downregulation of upregulated targets in clonogenic side population cells. *PLoS One*, 8, e56954.
- Network, C. G. A. 2015. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517, 576-582.
- Ngollo, M., Lebert, A., Daures, M., Judes, G., Rifai, K., Dubois L., Kemeny, J. L., Penault-Llorca F., Bignon Y. J., Guy L., Bernard-Gallon D. 2017. Global analysis of H3K27me3 as an epigenetic marker in prostate cancer progression. *BMC Cancer*, 17(1), 261.
- Nicholson, R. L., Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic-Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369-389.
- Nicot, N., Chiquet, V., Gandon, B., Amilhat, L., Legeai, F., Leroy, P., Bernard, M., Sourdille, P. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics*, 109(4), 800-805.
- Noone, A. M., Cronin, K. A., Altekruse, S. F., Howlader, N., Lewis, D. R., Petkov, V. I., Penberthy, L. 2017. Cancer Incidence and survival trends by subtype using data from the surveillance epidemiology and end results program, 1992-2013. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 26(4), 632-641.
- Park, S., Supek, F., Lehner, B. 2021. Higher order genetic interactions switch cancer genes from two-hit to one-hit drivers. *Nature Communication*, 12(1), 7051.
- Prabhu, R. S., Hanasoge, S., Magliocca, K. R., Hall, W. A., Chen, S. A., Higgins, K. A., Saba, N. F., El-Deiry, M., Grist, W., Wadsworth, J. T., Chen, A. Y., Beitler, J. J. 2015. Lymph node ratio influence on risk of head and neck cancer locoregional recurrence after initial surgical resection: implications for adjuvant therapy. *Head Neck*, 37(6), 777-782.

- Reddy, S. P., Mohideen, N., Marra, S., Marks, J. E. 1998. Effect of tumor bulk on local control and survival of patients with T1 glottic cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 47(2), 161-166.
- Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., Chinnaiyan, A. M. 2004. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*, 6(1), 1-6.
- Sawyers, C. L., Abate-Shen, C., Anderson, K. C., Barker, A., Baselga, J., Berger, N. A., Foti M., Jemal, A., Lawrence, T. S., Li C. I., Mardis, E. R., Neumann, P. J., Pardoll, D. M., Prendergast, G. C., Reed, J. C., Weiner, G. J., Committee, A. C. P. R. W. 2013. AACR Cancer progress report 2013. *Clinical Cancer Research*, 19, 4-98.
- Sayre, K. D., van Ginkel, M., Rajaram, S., and Monasterio, I. 1994. Tolerance to water-logging losses in spring bread wheat, effect of time of onset on expression. *Colorado State Universal In Annual Wheat Newsletter* 40, 165–171.
- Setter, T. L., Ellis, M., Laureles, E. V., Ella, E. S., Senadhira, D., Mishra, S. B., Sarkarung, S., Datta, S. 1997. Physiology and genetics of submergence tolerance in rice. *Annals of Botany*, 79, 67-77.
- Shimada, Y., Saito, A., Suzuki, M., Takahashi, E., Horie, M. 1998. Cloning of a novel gene (ING1L) homologous to ING1, a candidate tumor suppressor. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 83, 232-235.
- Shiseki, M., Nagashima, M., Pedoux, R. M., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Okamura, S., Onogi, H., Higashimoto, Y., Appella, E., Yokota, J., Harris, C. C. 2003. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Research*, 63(10), 2373-2378.
- Smolle, E., Fink-Neuboeck, N., Lindenmanni, J., Smolle-Juettner, F., Pichler, M. 2019. The biological and clinical relevance of inhibitor of growth (ING) genes in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*, 11(6).1118.
- Song, Q. J., Shi, J. R., Singh, S., Fickus, E. W., Costa, J. M., Lewis, J., Gill, B. S., Ward, R., Cregan P. B. 2005. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3), 550-560.
- Spaulding, C. A., Hahn, S. S., Constable, W. C. 1987. The effectiveness of treatment of lymph nodes in cancers of the pyriform sinus and supraglottis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 13, 963-968.
- Stein, A. P., Saha, S., Kraninger, J. L., Swick, A. D., Yu, M., Lambert, P. F., Kimple, R. J. 2015. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a systematic review. *Cancer Journal*, 21(3), 138-146.
- Swarup, A., Sharma, D. P. 1993. Influence of top-dressed nitrogen in alleviating adverse-effects of flooding on growth and yield of wheat in a sodic soil. *Field Crops Research*, 35(2), 93-100.

- Talbert, L. E., Blake, N. K., Chee, P. W., Blake, T. K., Magyar, G. M. 1994. Evaluation of sequence-tagged-site pcr products as molecular markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 87(7), 789-794.
- Tobias, J. S. 1994. Cancer of the head and neck. *BMJ*, 308, 961-966.
- VanToai, T. T., St Martin, S. K., Chase, K., Boru, G., Schnipke, V., Schmitthenner, A. F. Lark, K. G. 2001. Identification of a QTL associated with tolerance of soybean to soil waterlogging. *Crop Science*, 41(4), 1247-1252.
- Vassileiou, A., Vlastarakos, P. V., Kandiloros, D., Delicha, E., Ferekidis, E., Tzagaroulakis, A., Nikolopoulos, T. P. 2012. Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor. *B-ENT*, 8(4), 273-278.
- Velleuer, E., Dietrich, R. 2014. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Molecular and Cell Pediatrics*, 1, 9.
- Vigneswaran, N., Williams, M. D. 2014. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 26(2), 123-141.
- Wang, J., Liu, Z., Feng, X., Gao, S., Xu, S., Liu, P. 2014. Tumor suppressor gene ING3 induces cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of AMPK and activation of p38 MAPK signaling. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 562, 22-30.
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., Shin, Y. K. 2018. loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. *Cell Physiology Biochemistry*, 51(6), 2647-2693.
- Wang, Y., Alla, V., Goody, D., Gupta, S. K., Spitschak, A., Wolkenhauer, O., Pützer, B. M., Engelmann, D. 2016. Epigenetic factor EPC1 is a master regulator of DNA damage response by interacting with E2F1 to silence death and activate metastasis-related gene signatures. *Nucleic Acids Research*, 44(1), 117-133.
- Wang, Y., Dai, D. L., Martinka, M., Li, G. 2007. Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. *Clinical Cancer Research*, 13(14), 4111-4116.
- Wang, Z., Valera, J. C., Zhao, X., Chen, Q., Gutkind, J. S. 2017. mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. *Cancer Metastasis Reviews*, 36(3), 491-502.
- Wierzbicka, M., Waśniewska-Okupniak, E., Banaszewski, J., Pabiszczak, M., Piorunek, T. 2014. Evaluation of outcomes after reoperative neck dissection due to thyroid cancer. *Contemporary Oncology (Pozn)*, 18(4), 268-272.
- Xia, J. H., Saglio, P., Roberts, J. K. M. 1995. Nucleotide levels do not critically determine survival of maize root-tips acclimated to a low-oxygen environment. *Plant Physiology*, 108(2), 589-595.

- Yang, C., Gao, J., Yan, N., Wu, B., Ren, Y., Li, H., Liang J. 2017. Propofol inhibits the growth and survival of gastric cancer cells in vitro through the upregulation of ING3. *Oncology Reports*, 37(1), 587-593.
- Yang, C., Gao, S., Zhang, H., Xu, L., Liu, J., Wang, M., Zhang, S. 2016. CD47 is a potential target for the treatment of laryngeal squamous cell carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40, 126-136.
- Yao, X. D., Li, P., Wang, J. S. 2021. MicroRNA differential expression spectrum and microRNA-125a-5p inhibition of laryngeal cancer cell proliferation. *Experimental and Therapeutics Medicine*, 21(6), 545.
- Yeboah, M. A., Chen, X. H., Liang, G. H., Gu, M. H., Xu, C. W. 2008. Inheritance of waterlogging tolerance in cucumber. *Euphytica*, 162, 145-154.
- Yilmaz, T., Hoşal, S., Gedikoglu, G., Turan, E., Ayas, K. 1998. Prognostic significance of depth of invasion in cancer of the larynx. *The Laryngoscope*, 108(5), 764-768.
- Yu, G., Lee, Y. C., Cheng, C. J., Wu, C. F., Song, J. H., Gallick, G. E., Yu-Lee, L. Y., Kuang, J., Lin, S. H. .2015 RSK promotes prostate cancer progression in bone through ING3, CKAP2, and PTK6-mediated cell survival. *Molecular Cancer Research*, 13(2), 348-357.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A. 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1-12.
- Zhang, R., Jin, J., Shi, J., Hou, Y. 2017. ING3s are potential drug targets for cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(2), 189-197.
- Zheng, Z., Tian, R., Wang, P. 2017. Roles of KAI1 and nm23 in lymphangiogenesis and lymph metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 15(1), 211.
- Zhou, R., Rotte, A., Li, G., Chen, X., Chen, G., Bhandaru, M. 2020. Nuclear localization of ING3 is required to suppress melanoma cell migration, invasion and angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527(2), 418-424.
- Zhu, K., Liu, Q., Zhou, Y., Tao, C., Zhao, Z., Sun, J., Xu, H. 2015. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. *BMC Genomics*, 16(7), 8.