



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESANE KANSERLERİNDE KROMOZOM 13Q33-34 BÖLGESİNİN
MİKROSATELLİT HARİTALAMASI, ING1 GENİNİN MUTASYON
ANALİZİ VE GEN İFADE DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehri İĞCİ
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Gaziantep
2010

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

09.07.2010

Mehri İĞCİ

TEŞEKKÜR

Değerli bilimsel katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. AHMET ARSLAN’a, tezimin fikir aşamasından sonlandırılmasına kadar süren yardım ve desteğinden dolayı Yard. Doç. Dr. BEYHAN CENGİZ’e, deneysel süreçteki yardımlarından dolayı Dr. SERDAR ÖZTUZCU, ESMA ÖZKARA, ZEYNEP EŞLİK ve AYSEL DAĞCI’ya, klinik katkılarından dolayı Doç. Dr. M. SAKIP ERTURHAN ve Prof. Dr. METİN KARAKÖK’e ve Patoloji ABD çalışanlarından MUSTAFA YILMAZ’a teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm doktora sürecimde yanımda olan sevgili eşim ve en yakın arkadaşım YUSUF ZİYA İĞCİ’ye, masumca sabrı için biricik yavrum MEHMET ŞAHİN İĞCİ’ye, doktora eğitimim boyunca vermiş oldukları destekten ve göstermiş oldukları sabırdan dolayı SEVGİLİ ANNE ve BABAM, AYŞE ve MEHMET CANTÜRK ve TÜM AİLEM’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı tarafından “2211 Yurt İçi Doktora Bursu” ile desteklenmiştir.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.10.16 numaralı proje ile desteklenmeye layık görülmüştür.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE ve KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1 GİRİŞ ve AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER	8
2.1 Kanser	8
2.2 Mesane Kanseri.....	10
2.2.1 Mesane epiteli.....	11
2.3 Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler	13
2.3.1 Onkogenler	13
2.3.2 Tümör baskılayıcı genler	13

2.4	Heterozigotluğun kaybı	16
2.5	ING Ailesi	17
2.5.1	ING1 geninin keşfi	18
2.5.2	ING proteinlerinin işlevleri	19
2.5.3	ING1 geninin alt tipleri.....	21
2.5.4	ING ve DNA tamiri	22
2.5.5	ING1 geni	22
2.5.6	ING1 ve p53	23
3	GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
3.1	Grupların Oluşturulması ve Doku Örneklerinin Temini	25
3.2	Kullanılan çözeltiler	25
3.3	DNA eldesi.....	26
3.4	13q33-34 Bölgesinin Mikro kayıp Analizi	27
3.4.1	Kullanılan DS belirleyiciler	27
3.4.2	PCR karışımının hazırlanması ve PCR şartlarının DS belirleyicilere göre uyumlandırılması	28
3.5	Elektroforez.....	29

3.5.1	Agaroz jel elektroforezi	30
3.5.2	Denature poliakrilamid jel elektroforezi (DPGE)	30
3.5.3	DPGE'nin yapılışı.....	31
3.6	RNA Eldesi	32
3.7	mRNA İfadesinin Kıyaslamalı Olarak Belirlenmesi.....	33
3.7.1	RNA'ların spektrofotometrik ölçümü	33
3.7.2	cDNA (complementer DNA) yapımı	36
3.7.3	ING1 geni ifade analizi.....	37
3.8	Mutasyon Analizi	42
3.8.1	Polimeraz zincir tepkimesi	42
3.8.2	Elde edilen ürünlerin SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) yöntemiyle taranması.....	43
3.8.3	Dizin analizi.....	44
4	BULGULAR.....	46
4.1	Hastalara Ait Patoloji Bulguları	46
4.2	Heterozigotluk Kaybı	46
4.3	Gen İfade Analizi Sonuçları.....	51

4.3.1	ING1 geni özendirici bölgesine ait bulgular.....	52
4.4	Mutasyon Analizi	56
4.4.1	SSCP sonuçlarının değerlendirilmesi	56
4.4.2	Dizin Analizi Sonuçları	58
5	TARTIŞMA	59
6	KAYNAKLAR	71
	ÖZGEÇMİŞ	90

SİMGE ve KISALTMALAR

°C	Santigrad derece
µl	Mikrolitre
13q33-34	13. kromozomun q kolu 33-34. bölgeleri
APS	Amonyum persülfat
cDNA	Komplementer DNA
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DPGE	Denature poliakrilamid jel elektroforezi
EDTA	Etilen di amin tetra asetik asit
EST	Expressed sequence tag
GAG	Glikoz amino glikan
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HAT	Histon asetilaz
HDAC	Histon deasetilaz
ING1	Inhibitor of growth 1
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MSH2	Mut S homoloğu 2
NLS	Nuclear localization sequence
p53	Protein 53
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PHD	Plant homeo domain
PI5P	Fosfoinositid 5 fosfat
RB	Retinoblastoma proteini
Rb	Retinoblastoma geni
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TBE	Tris, borik asit, EDTA

TEMED	Tetra methyl ethylene diamine
T _m	Melting temperature (erime sıcaklığı)
UV	Ultra violet
XPA	Xeroderma pigmentosum A
XPB	Xeroderma pigmentosum B

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre Türkiye'de en sık görülen kanser türlerinin grafik gösterimi (3).	11
Şekil 2.2. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler normal hücrelerde denge halindeyken tümör hücrelerinde bu denge hali ortadan kalkmaktadır (Dr. Beyhan Cengiz tarafından çizilmiştir).	16
Şekil 2.3. ING ailesine mensup genlerin kromozomal yerleşimleri (57).	18
Şekil 2.4. ING proteinlerine ait domainleri gösteren şema. Homoloji gösteren bölgeler açıkça görülmektedir (57).	20
Şekil 2.5. ING1 geni ekzonları ve mRNA çeşitlerinin şematik gösterimi. Siyah kutular kodlanan bölgeleri göstermektedir (17).	23
Şekil 3.1. D13S158, D13S1315 ve D13S779 isimli DS belirleyiciler için yapılan gradient PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü.	28
Şekil 3.2. ING1 ve GAPDH genlerinin bir arada yürütüldüğü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	39
Şekil 3.3. ING1 genine ait özendirici böge dizini. NCBI Nucleotide (108) veritabanından elde edilmiş ve 5000 nükleotid uzunluğundadır.	40
Şekil 4.1. D13S779, D13S158, D13S278, D13S796, D13S1315, D13S285 isimli DS belirleyicilere ait kromozomal harita. Kırmızı işaretli 13q33-34 bölgesinin büyütülmüş hali sağ tarafta görülmektedir. Bu bölgede yerleşik bulunan genler ve DS belirleyiciler beraber gösterilmiştir. ING1 geni yine kırmızı olarak işaretlenmiştir. Bu şekil NCBI Map Viewer veri tabanından alınmış parçaların birleştirilip düzenlenmesiyle oluşturulmuştur (109).	47

- Şekil 4.2. Heterozigotluk kaybı analizleri sonucu elde edilen denatüre jel görüntüsünün ImageJ programı yardımıyla çizilen grafiksel görüntüsü. Pikler arasındaki uzunluk farkı açıkça görülmektedir..... 48
- Şekil 4.3. Kullanılan DS belirleyicilerle elde edilen heterozigotluk kaybı yüzdelere ait grafik görünümü. Dikey ekseninde DS belirleyiciler, yatay ekseninde yüzdelik dilimler gösterilmiştir. 50
- Şekil 4.4. Çalışmaya katılan hastalara ait ING1 geni ifade analizi jel görüntüsü. Sol tarafta ING1 geni, sağ tarafta aynı hastalara ait GAPDH geni, normal ve tümörlü dokular sıralı şekilde görülmektedir. GAPDH geninin ifadesi hiçbir normal ve tümörlü doku arasında farklılık göstermezken, ING1 geninde bantların değişik miktarlarda yoğunluğa sahip olduğu görülmektedir. 52
- Şekil 4.5. Genomatix-MatInspector ve TFSEARCH programları yardımıyla ING1 geninin özendirici bölgesinde tespit edilen BPTF, ABL, E2F, HIF1, NRSF ve ESR proteinlerine ait bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. 55
- Şekil 4.6. Genomatix-MatInspector ve TFSEARCH programları yardımıyla ING1 geninin özendirici bölgesinde tespit edilen CARP, SOX, c-ETS ve c-Rel proteinlerine ait bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. 56
- Şekil 4.7. Ekzon 1b_1, ekzon 2_1 ve ekzon 2_3'e ait SSCP jel görüntüleri. Ekzon 2'nin üçüncü bölgesinde (E2_3) okla gösterilen örnekte değişik bir bant görülmektedir. 57
- Şekil 4.8. ING1 geninin 2 numaralı ekzonunun bir kısmına ait dizin analizi görüntüsü. Herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. 58

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Tümör baskılayıcı genler ve ilgili oldukları kanser türleri (38).	15
Tablo 3.1. Heterozigotluk kaybı analizlerinde kullanılan DS belirleyiciler, dizinleri ve ürün büyüklükleri.....	27
Tablo 3.2. DS belirleyiciler kullanılarak yapılan PCR'ın karışım oranları.	28
Tablo 3.3. Gradient PCR neticesinde belirlenen en uygun bağlanma sıcaklıkları.	29
Tablo 3.4 PCR tepkime koşulları.....	29
Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan örneklerle ait RNA ölçüm değerleri görülmektedir.	34
Tablo 3.6. RT-PCR deneyleri için hazırlanan karışımın içeriği.	36
Tablo 3.7. cDNA yapımında kullanılan RT-PCR koşulları.....	36
Tablo 3.8. ING geni ifade analizi çalışmaları için kullanılan ING1 ve GAPDH primerlerine ait dizinler.	37
Tablo 3.9. ING1 ve GAPDH genlerinin çoğaltılması için hazırlanan PCR karışımı.	38
Tablo 3.10. ING1 ve GAPDH genlerinin çoğaltıldığı koşullar.	38
Tablo 3.11. ING1 geninin mutasyon analizi deneylerinde kullanılan primerlere ait bilgiler.....	42
Tablo 3.12. ING1 geni ekzonlarının çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı.	43
Tablo 3.13. ING1 geni ekzonlarının çoğaltıldığı PCR koşulları.	43
Tablo 3.14. Dizin PCR'ı için kullanılan karışımın içeriği.....	44

Tablo 3.15. Dizin PCR'ı için kullanılan koşullar.	45
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan tümör örneklerine ait patolojik bulgular. Tümör aşama ve dereceleri görülmektedir.	46
Tablo 4.2. Heterozigotluk kaybı analizleri sonucu elde edilen bulguların tablo gösterimi. Sol sütunda DS belirleyiciler, üst satırda hasta numaraları, sağ sütunda ise heterozigotluk kaybı yüzdeleri görülmektedir. Boş kutular heterozigotluğu, gri kutular bilgi vermeyen homozigot örnekleri, siyah kutular ise heterozigotluk kaybını göstermektedir.	49
Tablo 4.3. D13S1315 ve D13S285 isimli DS belirleyicilerinin arasında kalan genler ve açık isimleri (109).	51

ÖZET

MESANE KANSERLERİNDE KROMOZOM 13Q33-34 BÖLGESİNİN MİKROSATELLİT HARİTALAMASI, ING1 GENİNİN MUTASYON ANALİZİ VE GEN İFADE DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehri İĞCİ

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof Dr Ahmet ARSLAN

Temmuz 2010, 89 sayfa

Ülkemizde mesane kanseri sık karşılaşılan kanserler arasında üçüncüdür. Kanser çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin hücrede birikmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu genetik değişiklikler onkogenlerin etkinliğinde artışa veya tümör baskılayıcı genlerin etkinliğinde azalmaya neden olabilir. Tümör baskılayıcı genlerin kaybı veya etkinliğinin bozulması tümör oluşumuna yol açabilmektedir. ING ailesi genlerinin çeşitli kanser tiplerinde önemli rol alan tümör baskılayıcı genler olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada mesane kanseri 30 hastadan alınan normal ve tümörlü dokular kullanılarak, kromozom 13q33-34 bölgesinde mikrokayıp analizi, ING1 geni ifade analizi ve ING1 geninde dizin analizi ile mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir. Yanısıra ING1 geninin özendirici bölgesi hakkında bilgi bulunmadığı için TFSEARCH ve Genomatix-MatInspector gibi çevrimiçi programlarla buraya bağlanan transkripsiyon faktörleri araştırılmıştır. 13q33-34 bölgesi için seçilen DS belirleyiciler D13S285, D13S1315, D13S796, D13S278, D13S158 ve D13S779'dur. Elde edilen heterozigotluk kaybı oranları ise sırası ile %23.3, %20, %6.7, %3.3, %6.7 ve %0 şeklindedir. En fazla heterozigotluk kaybı ING1 genini çevreleyen D13S285 ve D13S1315'te gözlenmiştir. Gen ifade analizleri neticesinde ise 30 hastadan 7'sinin ING1 gen ifadesinde değişiklik gözlenmiştir. Fakat dizin analizi yöntemiyle incelenen ING1 geninin ekzonlarında mutasyona rastlanmamıştır. Değişik kanser tiplerinin baskılanmasında rol alan ING1 geninin mesane kanserinde önemli bir tümör baskılayıcı gen olmadığı görülmektedir. Heterozigotluk kaybı bulgularından yola çıkarak mesane kanserinde 13q33-34 bölgesinin farklı "aday" tümör baskılayıcı gen veya genler barındırdığı düşünülebilir. İşlevsel özellikleri dikkate alındığında bu genlerin COL4A1, COL4A2 veya SOX1 olabileceği söylenebilir. Transkripsiyon faktörü analizleri ise ING1 geni özendirici bölgesine bağlanan faktörlerden bazılarının, ING1 işlevi ile ilişkili olabilecek, c-Rel, c-Ets gibi çeşitli faktörler olduğunu göstermiştir. ING1 özendirici bölgesinin moleküler açıdan incelenmesinin gerekliliği görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Gen ifade analizi, heterozigotluğun kaybı, ING1 geni, ING1 özendirici bölgesi, mesane kanseri, mutasyon tarama, nükleotid dizin analizi, transkripsiyon faktörleri

ABSTRACT

MICROSATELLITE MAPPING OF CHROMOSOME 13Q33-34 REGION, MUTATION SCREENING OF ING1 GENE AND ANALYSIS OF ING1 mRNA EXPRESSION IN BLADDER CANCERS

Mehri İĞCİ

Doctoral thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof Dr Ahmet ARSLAN

July 2010, 89 pages

In Turkey, the frequency of bladder cancer is the third among other cancer types. Cancer is a result of the accumulation of genetic and epigenetic alterations in the cell which can lead to activation of oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes (TSG). Loss or inactivation of TSGs can lead formation of tumors. Members of ING family are discovered as TSGs in different cancer types. In this study 30 paired normal and tumor tissue samples were used for microdeletion analysis of chromosome 13q33-34 region, ING1 expression analysis and ING1 mutation screening via nucleotide sequence analysis. Because there is no data available about the transcription factors which bind to ING1 promoter, the promoter sequence was analyzed via Genomatix-MatInspector and TFSEARCH programs. DS markers used for 13q33-34 region were D13S285, D13S1315, D13S796, D13S278, D13S158, and D13S779 where loss of heterozygosity (LOH) results were as 66.7%, 20%, 6.7%, 3.3%, 6.7%, and 0%, respectively. The highest LOH scores were obtained with markers D13S285 and D13S1315 which were flanking the ING1 gene. Seven of 30 cases showed alterations in expression analysis. However, no mutation was detected in the exons of ING1. A significant TSG activity of ING1 in bladder cancer was not observed while higher activity was reported in different cancer types. As for the LOH data 13q33-34 region may contain different candidate TSGs like COL4A1, COL4A2 and SOX1. As a result of promoter analysis, some factors like c-Rel, c-Ets were associated with the promoter region. Molecular analysis of ING1 promoter warrants further analysis.

Key words: Bladder cancer, gene expression analysis, ING1 gene, ING1 promoter, loss of heterozygosity, mutation screening, nucleotide sequence analysis, transcription factors

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser günümüzün en ölümcül hastalıklarından biridir. Kanser vakaları dünya genelinde ölümlerin 1/8'inden (1), Amerika'da ise toplam ölümlerin %25'inden (2) sorumludur. Ülkemizde en sık görülen kanserler, Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre, akciğer, prostat, mesane, kolorektal ve mide kanserleri olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.1) (3).

Mesane abdomende yer alan içi boş bir organdır (4). Böbrek tarafından üretilen idrar üreter denilen tüplerden geçerek mesaneye gelir ve depolanır (4). Mesanenin dolması durumunda mesane duvarındaki kaslar sıkışır ve idrar üretra denilen bir başka tüp yoluyla mesaneyi terk eder (4).

Mesane duvarı dıştan içe doğru *serosa*, *muscularis*, *submucosa*, *muscularis mucosa* ve *lamina propria* denilen kısımlardan oluşmaktadır (5). Mesanenin iç yüzeyini kaplayan epitel hücre tabakası *lamina propria*'nın üzerini örten ürotelyumdur (5). Ürotelyum da glikozaminoglikan (GAG) bir tabaka ile kaplıdır (6). Ürotelyum mesanenin, depolama esnasında idrarın kompozisyonundaki değişimleri en alt düzeyde tutmasına yardımcı olur (7).

Mesane duvarı transisyonel ve skuamoz diye adlandırılan hücrelere sahiptir. Mesane kanserlerinin %90'dan fazlası transisyonel hücrelerde başlar ve bu tip mesane kanseri transisyonel hücre karsinomu olarak adlandırılır (4). Mesane kanseri hastalarının yaklaşık %8 kadarı skuamoz hücre karsinomuna sahiptir (4).

Kanser çok nedenli genetik bir hastalıktır (8). Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki normal bir hücre denge içerisinde (8). Bu denge, kanser genleri (oncogen) ile tümör baskılayıcı (tumor suppressor gene) genler arasındadır (8). Herhangi bir etken sonucu tümör baskılayıcı genler veya onkogenlerde meydana gelen genetik dengesizlik sonucunda kanser meydana gelmektedir (8). Günümüz modern dünyasının en önemli

sağlık problemi olarak kabul edilen kanser üzerine yapılan birçok çalışma sonucunda geliştirilen teknikler sayesinde yavaş da olsa bazı gelişmeler sağlanmaktadır.

Mesane kanseri batıda genital-üriner sistemin ikinci en yaygın kanseridir (9). Mesane kanseri gelişiminde çevresel etkenler ve genetik yatkınlık söz konusudur (9). Sigara, bir takım endüstriyel kimyasallar, diyetle alınan nitratlar ve arsenik en önemli çevresel risk faktörleridir (9). Kromozomal anomaliler, bazı genlerin özendirici gen bölgelerinin (promoter) metilasyonla susturulmaları, tümör baskılayıcı genlerde veya proto-onkogenlerde meydana gelen değişimler mesane karsinogenezinde rol alan moleküler mekanizmalardır (9).

Mesane kanseri gelişiminde meydana gelen gen ifadesi değişikliklerini gözlemlemek amacıyla, 17,842 bilinen gen ve EST (expressed sequence tags) içeren cDNA mikrosarariler (microarray) kullanılarak erken ve ileri aşamadaki mesane tümörlerinin gen ifade profilleri kıyaslanmıştır (10). Bu çalışma (10) mesane kanserlerinde ING1 geni ile ilişki ortaya koyan tek araştırmadır. Sitokeratin 20, nöropilin-2, p21 ve p33ING1 genlerinin ifade modellerinin patolojik safha, tümör derecesi ve değişen retinoblastoma gen ifadesi ile önemli derecede ilişkili olduğu görülmüştür (10). Ayrıca, p33ING1 gen ifade seviyesinin hayatta kalma ile de ciddi oranda ilişkili olduğu gözlenmiştir (10). Ancak gen üzerinde detaylı moleküler analizler yapılmamıştır.

1971 yılında A.G. Knudson retinoblastoma (RB) üzerine yapmış olduğu istatistiksel bir çalışma ile ilk kez Two-Hit (iki vuruş) hipotezini ortaya koymuştur (11). Özellikle kanserli hastalardaki mikro kayıplarla, kanser arasındaki ilişkinin varlığını saptamıştır (11).

2000 yılında Gündüz ve arkadaşları (12); baş boyun kanserinde kromozom kayıplarını incelerken, kromozom 13q33-34 bölgesindeki kayıp oranlarını yüksek bulmuşlardır. Bu bölgede yaptıkları araştırma sonucunda, ING1 (INhibition Growth1) geninin baş boyun kanserlerinde tümör baskılayıcı gen olduğunu tespit etmişlerdir (12).

2002 yılında Gündüz ve arkadaşları (13) yapmış oldukları yeni bir çalışma ile, kromozom 7q31 bölgesindeki mikro kayıp sıklığının fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bölgede yaptıkları çalışma sonucunda, ING1 ile aynı işlevsel bölgeleri taşıyan bir gen olan ING3 (INhibition Growth3) ile baş boyun kanserleri arasındaki ilişkinin varlığını ortaya koymuşlardır (13).

2005 yılında Gündüz ve arkadaşları (14), kromozom 12p13 lokusunda yaptıkları inceleme sonucunda, baş boyun kanserlerinde mikro kayıp sıklığının oranını yüksek bulmuşlardır. Bu bölge incelendiğinde; bu bölgede bulunan ING4 (INhibition Growth4) ile baş boyun kanserleri arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (14).

2007 yılında yapılmış bir çalışmada; kromozom 2q37.3 lokusunda ağız karsinomlarında mikrokayıp sıklığının yüksek olduğu gösterilmiştir (15). Bu bölgede bulunan ING5 (INhibition Growth5) geni üzerinde yapılan incelemeler sonucunda, bu karsinom tipine özel üç adet mutasyon tanımlanmıştır (15).

2008 yılında Borkosky ve arkadaşlarının (16) yapmış oldukları bir çalışmada; baş boyun kanserli 80 hastada ING2 (INhibition Growth2) geninin yer aldığı lokusta mikrokayıp oranı yüksek bulunmuştur (16).

ING1 geninin biyolojik işlevleri klonlandığı günden bu yana araştırılmaktadır. ING1 geninin p24ING1, p47ING1, p33ING1 ve p27ING1 olmak üzere bilinen 4 izoformu mevcuttur (17).

ING1 cDNA'sının yapısı üzerinde yapılan ilk araştırmalarda 33,350 Da ağırlığında olan p33ING1 proteini ortaya çıkarılmıştır (18). Fakat daha sonra klonlama hatası yapıldığı, p33ING1 olduğu sanılan dizininin N ucundan kesilmiş, 23,656 Da ağırlığındaki 210 amino asitten oluşan ve en kısa ING1 izoformu olarak bilinen p24ING1 olduğu anlaşılmıştır (19). Dolayısıyla bu düzeltme yapılana kadar geçen süre içinde p33ING1 üzerinde yapıldığı sanılan pek çok çalışma aslında p24ING1 ile gerçekleştirilmiştir.

Akış sitometri analizi, p24ING1 ile transfekte edilmiş normal fibroblastların hücre döngüsünün G0/G1 geçişinde durakladıklarını göstermiştir (18). Fakat p24ING1 aracılı hücre döngüsü tutulumu (cell cycle arrest) işlevsel p53'ün katılımını gerektirmektedir (20). p53 insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan bir gen olması nedeniyle (21,22), hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, hücre yaşlanması, damar oluşumu ve DNA tamirinde antitümör özellikleri en fazla çalışılan bir tümör baskılayıcı genidir (23-28). p24ING1'in aşırı ifadesi p21Waf1 özendirici bölgesinin (promoter) p53 bağımlı etkinliğini artırabilir (20). p21Waf1 siklin bağımlı kinaz önleyicidir (inhibitor) (20). p21Waf1'in artan gen ifadesi p24ING1'e etkin haldeki p53 ile birlikte hücre çoğalmasını engelleme kabiliyeti kazandırır (20). ING1 ve p53 arasında fiziksel bir ilişkinin varlığı immün çöktürme deneyleri ile izlenmiştir (20). İki proteinin birbirine bağlanmasının yapısal değişikliğe neden olup p53'ün transkripsiyon faktörü olarak işlev kazanmasına aracılık ettiği düşünülmektedir (20). Fakat hangi ING1 ürününün bu yapının oluşmasında rol sahibi olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Ayrıca, p24ING1 hücre yaşlanmasında da rol almaktadır. Karşıt anlamlı (antisense) p24ING1 geni yerleştirilmiş insan normal fibroblastlarındaki p24ING1 gen ifadesinin replikatif yaşamlarını yedi kat artırdığı görülmüştür (29). ING1 proteinin ifadesi ve mRNA'sının, genç ve çoğalmakta olan diploid insan fibroblastlarına nazaran yaşlı hücrelerde daha fazla olduğu görülmüştür (29). Bu çalışmada, ayrıca, hücre döngüsü boyunca ING1 gen ifadesinin durumu da izlenmiştir. ING1 proteininin G0-G1 geçişinde azaldığı, geç G1'de arttığı, S fazında en yüksek seviyeye ulaştığı ve takiben G2'de düştüğü bildirilmiştir (29). Fakat ING1 izoformları hakkında bilgi olmadığı için hangi ING1 proteini veya mRNA'sının izlendiği açıklanamamıştır (29).

ING1'in aynı zamanda apoptozisi düzenlediği görülmüştür (30). p24ING1'in artan gen ifadesi p19 fare teratokarsinom ve NIH 3T3 hücrelerinde serum açlığı ile tetiklenen hücre ölümünü (serum starvation-induced apoptosis) artırmaktadır (30). c-myc ve p24ING1'in birliktelikli gen ifadesi; p24ING1 aracılı hücre ölümü ile c-myc apoptotik yolağının ilişkili olduğunu düşündürmektedir (30). p24ING1'in ayrıca, p53 varlığında, hücreleri kemoterapötik ajanlara ve radyasyona karşı hassaslaştırdığı da gösterilmiştir (20). Shinoura ve arkadaşları (31) glioma hücre hatlarıyla yaptıkları çalışmada p33ING1

ve p53'ü ayrı ayrı aşırı sentezleyen hücrelerde apoptoz gerçekleşmezken; iki glioma hücre hattına p33ING1 ve p53'ün adenovirüs aracılıklı aktarımını takiben apoptozun tetiklendiğini göstermişlerdir (31). Bu çalışmalar ING1'in her iki izoformu p24ING1 ve p33ING1'in proapoptotik düzenleyiciler olarak görev yaptıklarını ortaya koymuştur.

ING1 izoformlarına ait moleküler mekanizmaların araştırıldığı ilk çalışma Skowyre ve arkadaşları (32) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada p33ING1'in Sin3, SAP30, HDAC1, RbAp48 ve histon öbeklerinin deasetilasyonunda görevli diğer proteinlerle ilişki içinde olduğu, fakat p24ING1 ve p47ING1'in deasetilasyon ilişkili proteinlerle herhangi bir fiziksel ilişkiye girmediği görülmüştür (32). P33ING1'in kültür hücrelerinde transkripsiyonu baskıladığı bulunmuştur (32). P33ING1'in N uç kısmında bulunan 99 amino asit uzunluğundaki bölgenin deasetilasyonla ilgili proteinlerle ilişkiye girdiği ve transkripsiyonun baskılanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (32). p24ING1 ve p37ING1 N uçtaki 99 amino asite sahip değildir ve dolayısıyla sözü edilen işlevsel özellikleri sergileyemezler (32). Fakat bu çalışmada (32), Garkavtsev ve ark (20) bildirdiğinin aksine p53 proteini ING1 izoformlarının herhangi biriyle bağlanma isteği göstermemiştir. Bu farklılık farklı hücre hatlarının kullanılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir.

ING gen ailesine mensup genler çok çeşitli kanser tiplerinde tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanmıştır. ING1 geninin yer aldığı 13q33-34 bölgesinde çok sayıda kanser çalışmasında heterozigotluk kaybı gösterdiği gözlenmiştir. Ancak mutasyon tespit edilebilen kanser tipleri oldukça sınırlıdır. ING ailesi genleri histon asetilasyon ve deasetilasyon olaylarında önemli rol oynarlar. Dolayısıyla burada ING genleri aslında transkripsiyonun düzenlenmesinde önemli görev sahibidirler. Bu görev ING1 genini önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak göz önüne çıkarmaktadır. Ülkemizde sıklık sıralamasında üçüncü olan mesane kanserinin araştırıldığı ING ailesi genleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. ING ailesi genlerinin mesane kanseri ile başlamak üzere farklı kanser tiplerinde moleküler olarak incelenmesi planlanmaktadır. Elde edilecek verilerin klinik olarak kanser tanı ve tedavisine yaklaşımda yol göstermesi, gerekli bilgi ve tecrübenin kazanılması amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanserin dünya genelinde ölüme sebebiyet verme oranı 1/8'dir (1). Kanser çok sayıda hücre tipinden ve organdan kaynaklanması, risk faktörlerinin çeşitliliği, sağlıklı doku ve organları istila edebilme ve yayılım kabiliyeti dolayısıyla oldukça tehlikeli bir hastalıktır.

Tümörler genomik, genetik ve epigenetik değişimlerin yol açtığı fenotipik oluşumlardandır (33). Kanser gelişiminde genomun sahip olduğu merkezi rol David von Hanseemann (34) ve Theodor Boveri (35) isimli araştırmacılar tarafından ortaya çıkarılmıştır. Mikroskop altında bölünen kanser hücrelerini inceleyerek kromozomal sapmaların varlığını gözlemlemişlerdir (34,35). Bu sayede kalıtsal materyalden kaynaklanan anormal hücre kümelerinin kanseri oluşturduğu görüşü ortaya çıkmıştır. DNA'nın kalıtsal materyal olduğunun keşfi (36) ve yapısının çözülmesinin (37) ardından DNA'yı etkileyen ve mutasyon oluşmasına neden olan ajanların gösterilmesi bu görüşü desteklemiştir (33). Yapılan bu buluşun ardından kanser gelişiminin altında yatan anormal genler geniş bir biçimde araştırılmaya başlanmış ve araştırmalar günümüzde halen devam etmektedir. Tüm kanserlerin aynı patogenezi paylaştığı düşünülmektedir. Kanser gelişimi; rastgele mutasyonların ortaya çıkardığı kalıtsal genetik çeşitliliklerin hücrede birikmesiyle ve fenotipik çeşitlilikle sonuçlanan doğal seçim yollarının birleşmesiyle meydana gelmektedir (33,38).

Tümörler kontrol dışı çoğalmaya başlayan ve klon denilen tek bir hücreden gelişir, ancak; tümör gelişiminin başlamasından sonra klonal hücre ve hücrelerarası etkileşimin yol açtığı birbirini izleyen değişiklikler sonucu organizma için giderek kötüleşen çok aşamalı bir durumdur (38). Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları takiben, çoğalma, sağkalım, istila ve yayılma yetenekleri zamanla artan hücrelerin seçilmesi şeklinde meydana gelir (38).

Kanser hücreleri normal hücrelerin aksine yoğunluğa bağlı engellenmeden etkilenmez (39). Hücre kültüründeki normal hücreler ortamda bulunan büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalırlar ve bu yoğunluğa ulaşıldığında hücre döngüsünün G₀ evresinde dururlar (39). Ancak kanser hücrelerinde bu mekanizma ortadan kaybolmuştur. Bazı durumlarda kanser hücreleri çoğalmak için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileri de salgılayabilirler ve kendilerini sürekli olarak çoğalmaya uyarırlar (40). Bu durum otokrin çoğalma uyarımı olarak adlandırılmaktadır (40).

Kanser hücrelerinde hücreler arası yüzeysel tutunum (adhesion) moleküllerinin gen ifadesindeki azalma nedeniyle çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür (41). Karsinom gelişiminde önemli bir yüzeysel tutunum molekülü olan E-kaderinin ortadan kalkması büyük önem taşır. Yüzeysel tutunum moleküllerinin gen ifadesinin azalmasıyla kanser hücrelerinin diğer hücre ve dokularla etkileşimindeki kısıtlamalar ortadan kalkar ve kanser hücrelerinin yayılma ve istila yeteneği artar (41). Tutunma yeteneklerinin azalması nedeniyle kanser hücrelerinin hücre iskeleti ve morfolojisi de değişir. Dolayısıyla kanser hücreleri normal hücrelere nazaran daha yuvarlaktırlar (41).

Kültür ortamındaki normal hücreler bir başka hücre topluluğuyla temas edinceye kadar ilerler ve temas kurulduğu anda hareketlilikleri son bulur ve normal hücreler birbirlerine tutunarak düzenli şekilde sıralanırlar (38). Fakat aynı şartlarda tümör hücrelerini harekete devam ederler ve hücrelerin üstüne çıkarak düzensiz çok katlı kümeler oluştururlar (38). Kısacası, tümör hücreleri çoğalmayı engelleyen bu temasa duyarsızdırlar.

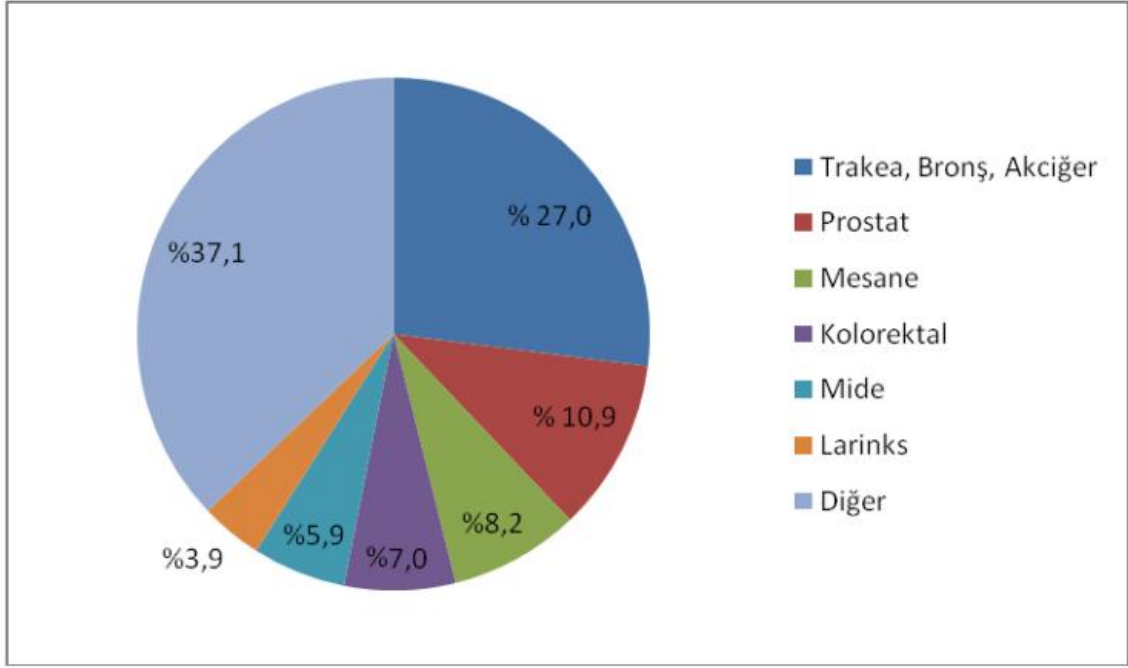
Kanser hücrelerinin istila ve yayılım yeteneklerini kazanmalarında rol alan bir takım özellikleri daha vardır. İlk olarak; kötü huylu tümör hücreleri proteazlar salgılayarak hücre dışı matriksi parçalayabilir ve farklı dokuların arasına bu şekilde yerleşebilir (42). Örneğin; kollajenazlar karsinomların bazal laminayı parçalayarak bağ dokusuna girmesini sağlarlar (42). Bir diğer özellik ise kanser hücrelerinin anjiyogenezi hızlandıran büyüme faktörleri salgılamalarıdır (42). Hücre sayısı bir milyonu aştığında

hücrelerin besin ve oksijen ihtiyacını sağlayabilmeleri adına kan damarlarına ihtiyaçları vardır (42). Çevredeki endotel hücreleri uyarak yeni kılcal damarların oluşmasını sağlayan tümör hücreleri besin ihtiyacını karşılamının yanı sıra bu kılcallara kolaylıkla geçebildikleri için kan dolaşımı yoluyla yayılma imkanı da bulurlar (42).

Kanser hücreleri sürekli olarak bölünme ve çoğalmaya odaklı olduklarından farklılaşmazlar (43). Birçok hücre türünde apoptoz farklılaşmanın ana unsurlarındandır (43). Fakat kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz görülmediğinden normal hücrelerden uzun yaşarlar (43). DNA hasarı dahi gerçekleşse kanser hücreleri apoptoza girmez, ayrıca; kromozom uçlarını kısaltmaktan koruyan telomeraz sentezi ile sınırsız bölünme yeteneğine sahip olurlar (43).

2.2 Mesane Kanseri

Ülkemizde mesane kanseri en sık görülen üçüncü kanser türüdür (Şekil 2.1) (3). Mesane kanseri dünya genelinde 9. en yaygın kanser türüdür ve en fazla ölüme sebebiyet veren kanserler arasında 13. sıradadır (44). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008 yılında tahmin edilen mesane kanseri vakası sayısı 68810, ölümlerin sayısı da 14100 olarak belirlenmiştir (2). Mesane kanserinin ekonomik açıdan bakıldığında diğer kanser türleri arasında en yüksek maliyetli kanser olduğu görülmüştür. Bunun nedeni pek çok hastanın yaşam periyodunun uzun olması ve tanının konulması ile başlayan takip sürecinin yüksek harcamaları da beraberinde getirmesidir (45).



Şekil 2.1. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre Türkiye'de en sık görülen kanser türlerinin grafik gösterimi (3).

Mesane kanseri genel olarak orta yaş ve üzeri kişilerde görülmesine rağmen her yaşta rastlanabilecek bir kanserdir (9). Erkeklerde ortaya çıkma yaşı ortalama olarak 69, kadınlarda ise 71'dir ve erkeklerde kadınlara nazaran 3 katı daha yaygındır (9). Mesane kanserlerinin % 98'i epitelyal kötü huylu oluşumlar, kalan kısmı ise transisyonel hücre karsinomudur (9). Diğer nadir görülen histolojik kanser tipleri skamoz hücre karsinomu, adenokarsinom ve epitelyal olmayan kanserlerdir (9).

2.2.1 Mesane epiteli

Urotelyum tüm urotelyal tümörlerin köken aldığı özelleşmiş bir epiteldir (46). Urotelyum stratejik açıdan idrar ve kan arasında bir bariyer görevi görür, normal urotelyum bir yandan gerisindeki dokuları toksik üriner maddelerden korurken, diğer yandan idrara çıkma döngüsü boyunca etkin ve geri dönüşümlü bir şekilde kendi yüzey alanını iyileştiren bir role sahiptir (7).

2.2.1.1 Mesane kanseri tipleri

Çoğu mesane kanserleri transisyonel hücre karsinomlarıdır (4). Mesane kanserinin diğer tipleri ise skamoz hücre karsinomu ve adenokarsinomdur (4). Skamoz hücre karsinomu ve adenokarsinom mesanenin iç kısmında kronik iritasyon ve yangı neticesinde gelişir (4).

Mesaneden gelişen tümörler küçük iyi huylu papillomlardan büyük istilacı kanserlere kadar değişiklik gösterir (47). Bu tümörler; nadir iyi huylu papillom, düşük kötü huylu potansiyelli papiller, ürotelyal neoplazi grubu ve iki dereceli ürotelyal karsinom (düşük ve yüksek derece) olarak sınıflandırılırlar (47). Oldukça nadir görülen iyi huylu papillomlar istilacı değildirler, bir kez çıkarıldıktan sonra nadiren tekrarlarlar (47).

Ürotelyal (transisyonel) hücreli karsinomların değişik şekilleri vardır. Bunlar, papiller veya düz, istila yapmayan veya yapan ve düşük dereceli veya yüksek dereceli olabilirler (48). Düşük dereceli karsinomlar daima papilerdir ve nadiren istilacıdırlar (48). Fakat cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra tekrarlarlar (48). Bu yeniden büyümenin bir yinelenme mi yoksa ikinci bir birincil gelişim mi olduğu bilinmemektedir (48). Papiller büyümelerde ileri derecede hücrel atipi ve anaplazi görülebilir ve buna lezyonun büyüklüğünde artış ve submukoza veya kas tabakalarına istila bulguları eşlik eder (48). Yüksek dereceli tümörler papiller ya da düz olabilir (48). Bu tümörler düşük dereceli tümörlere nazaran mukozal yüzeyin büyük kısımlarını kaplar ve pürütlü nekrotik bir yüzeye sahiptir (48). Bazen bu kanserler skamoz hücre farklılaşma odakları gösterirler (48). Mesane kanserlerinin sadece %5'i gerçek skamoz hücreli karsinomlardır (48). II. ve III. dereceli karsinomlar çevre yapılara nüfuz ederler (48). Bölgesel lenf nodüllerine yayılırlar ve bazen geniş çaplı yayılma gösterirler (48).

Belirgin karsinoma ek olarak sıklıkla önceden papiller veya eş zamanlı papiller veya istilacı tümörleri olan hastalarda in situ evrede mesane karsinomu görülebilir (47). Geniş atipik hiperplazi ve displazi alanları sıklıkla mevcuttur (47). Artık bu epitelyum değişikliklerinin ve in situ lezyonların olası karsinojenlerin üriner epitel üzerine yaygın etkisi ile oluştuğu ve bunların bazı hastalarda istilacı karsinomların öncülleri olabileceği

düşünülmektedir (47). Ancak epitelyal lezyonların yaygın olarak bulunmasına hatta çoklu olmasına rağmen mesane tümörleri monoklonal kaynaklıdır (47).

2.3 Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler

2.3.1 Onkogenler

Kanser genellikle birden fazla sayıdaki çeşitli genlerin yapısında, gen ifadesinde ve dolayısıyla işlevinde meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır (49). Hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen önemli genlerde meydana gelen değişikliklerden köken alır (38). Tümör virüsleri ile yapılan araştırmalar bazı genlerin hücreleri transforme ettiğini göstererek kanserin moleküler temellerini anlamaya yönelik ilk bulgular ortaya çıkarmışlardır (50,51). İnsan kanserleri %80 oranında radyasyon ve kimyasal kaynaklı olarak ortaya çıkıyor (38) olsa da bu çalışmalar hücresel kaynaklı onkogenlerin varlığına işaret etmiştir.

Onkogenler retroviral onkogenler ve protoonkogenler olarak iki tiptir (38). İnsan tümörlerinde görülen onkogenlerin bir bölümü retroviruslarda tanımlanmış olan onkogenlerin homoloğu iken, bir bölümü ise ilk kez insanlarda tanımlanan onkogenlerdir (38).

Onkogen proteinlerinin büyük çoğunluğu büyüme faktörlerinin uyarılarına bağlı olarak hücre çoğalma ve sağ kalımında rol alan sinyal ileti yollarında görev yaparlar (52). Polipeptid büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve hücre içi sinyal yolağı üyeleri bunlardan bazılarıdır (52).

2.3.2 Tümör baskılayıcı genler

Hücresel onkogenlerin etkinlik kazanması kanser gelişimi ile alakalı iki temel olaydan biridir. Diğeri ise tümör baskılayıcı genlerin etkinliğini yitirmesidir. Tümör baskılayıcı genler normal şartlarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini engellerler (8). Birçok

tümörde, bu genlerin zarar görerek etkinliğini yitirmesi sonucu hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki yok olur ve tümör hücreleri anormal derecede çoğalma kabiliyeti kazanır (38).

Sitogenetik analizler, pek çok insan tümörünün ortaya çıkmasında genetik materyalin belirli bir kromozomal bölgede kaybolduğunu ortaya çıkarmıştır (38). Bu kayıplar tümör tipine özgündür ve kanser tipleri arasında değişiklik gösterir (38).

Tümör baskılayıcı genlerin etkinliği ilkin somatik hücre hibridizasyon deneyleri ile gösterilmiştir (53). Normal ve tümör hücrelerinin birleştirilmesiyle iki hücrenin de kromozomlarını içeren hibrid hücreler oluşur ve bu hücreler tümör geliştirme özelliğine sahip değildirler (53). Normal hücrelerden gelen tümör baskılayıcı genlerin kanser oluşumunu engellediği düşünülmüştür (53).

Tümör baskılayıcı genlerin moleküler düzeyde anlaşılması retinoblastomun incelenmesi ile olmuştur (54). Retinoblastomaya yatkınlık, baskın bir karakter olarak taşındığı halde, yatkınlık geninin varlığı normal retina hücresinin tümör hücresine dönüşmesini sağlamaz (54). Bu gözlemler tümör gelişimini tetikleyen farklı olayların da gerektiğini ortaya koymaktadır. Alfred Knudson (11) 1971 yılında retinoblastom gelişmesi için iki mutasyonun gerektiği hipotezini ortaya koymuştur. Günümüzde normal diploid bir hücrede tümör gelişebilmesi için homolog kromozomlar üzerinde yer alan Rb (retinoblastoma) tümör baskılayıcı geninin iki sağlam kopyasının da ortadan kalkması gerektiği bilinmektedir. Knudson bu durumu “iki vuruş” hipotezi olarak açıklamıştır (11). Birinci vuruş ilgili gen bölgesinde meydana gelen eksilme mutasyonu (delesyon) ile ilk sağlam kopyanın kaybını, ikinci vuruş ise diğer sağlam kopyada meydana gelen mutasyon sonucu ikinci sağlam kopyanın kaybını veya ilgili başka bir gen veya onkogende meydana gelen mutasyonu işaret etmektedir. (11).

Rb geninin tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanması birçok farklı kanser türü ile ilgili tümör baskılayıcı genlerin izahında örnek teşkil etmiştir (38). Bunlardan bazıları ender kanser türlerinde Rb genininkine benzer rol oynarken, diğer tümör baskılayıcı genler de

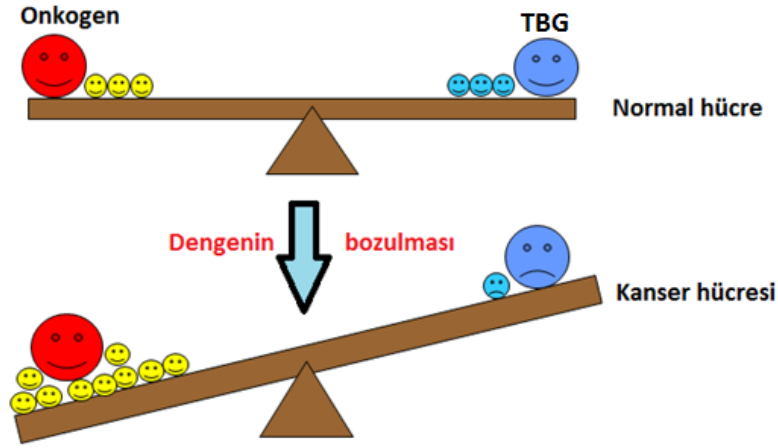
erişkinlerde sık görülen ve kalıtsal olmayan kanser türlerinde mutasyonu veya delesyonu tespit edilen genlerdir (Tablo 2.1) (38).

Tablo 2.1. Tümör baskılayıcı genler ve ilgili oldukları kanser türleri (38).

Gen	Kanser Türü
APC	Kolon/rektum karsinomu
BRCA 1	Meme ve over karsinomları
BRCA 2	Meme karsinomu
INK4	Melanom, akciğer karsinomu, beyin tümörü, lösemi, lenfoma
NF1	Nörofibrosarkom
NF2	Meningiom
P53	Beyin tümörleri, meme, kolon/rektum, özofagus, karaciğer ve akciğer karsinomları, sarkomlar, lösemi ve lenfomalar
PTC	Bazal hücreli karsinom
PTEN	Beyin tümörleri, melanom, prostat, endometrium, böbrek ve akciğer karsinomları
Rb	Retinoblastom, sarkomlar, mesane, meme ve akciğer karsinomları
Smad2	Kolon/rektum karsinomu
Smad4	Kolon/rektum karsinomu, pankreas karsinomu
TβRII	Kolon/rektum karsinomu, mide karsinomu
VHL	Renal hücreli karsinom
WT1	Wilms tümörü

Tümör baskılayıcı genler iki sınıfa ayrılır: Tip 1; genellikle genomun bakımından sorumlu genlerdir ki bunlar genomu mutasyonlardan koruyan XPB ve MSH2 gibi DNA tamir genleridir, tip 2 tümör baskılayıcı genler ise hücre gelişiminin kontrolü üzerinden kanser oluşumunu engellemeye çalışan p53 ve p16 gibi çeşitli genlerdir (55).

Normal bir hücrede onkogenler ve tümör baskılayıcı genler arasında bir denge mevcuttur. Bu dengenin bozulması kanseri kaçınılmaz kılar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler normal hücrelerde denge halindeyken tümör hücrelerinde bu denge hali ortadan kalkmaktadır.

2.4 Heterozigotluğun kaybı

Kanser hücresine dönüşmüş bir hücrede etkinliğini yitirmiş bir genin tanımlanması etkinliği artmış bir genin bulunmasından farklı bir yaklaşım gerektirir. Orada olmayan bir geni tanımlamak için hücre transformasyon yöntemi kullanılamaz. Bu nedenle tümör baskılayıcı genlerin aranması için izlenen yol onkogen bulunması amacıyla izlenen yoldan oldukça farklıdır (56).

İlk tümör baskılayıcı genin keşfi çok nadir bir insan kanseri olan retinoblastom çalışmalarından gelmiştir (56). Kalıtsal bir hastalığa ait herhangi bir iz yokken, tümör baskılayıcı genleri, yalnızca tümör hücrelerinde değil tüm hücrelerde bulunuyor olmasının avantajı ile belirleme yoluna gidilir. Bu aynı hastaya ait tümör hücreleri ile normal hücrelerin karşılaştırılmasını gerektirir. Çünkü burada, tümör hücresinin normalden farklılaşarak tümörleşmesine yol açan değişikliği ortaya koymak amaçlanmaktadır. Bu değişim normal hücrelerde doğal olarak gözlenmeyecektir. Gen

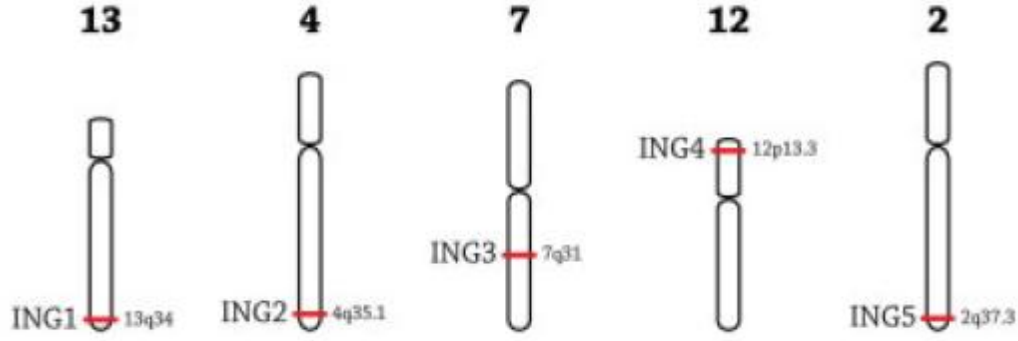
kaybı genellikle kromozomun bir parçasının eksilmesi (delesyon) ile meydana gelir (38). Bir kromozom üzerindeki büyük kayıp çok daha kolay tespit edilmesini sağlar.

Delesyon belirleme yaklaşımının temelinde anne ve babaya ait kromozom takımlarının ayırt edilebilecek kadar farklı olmasını sağlayan doğal insan genetik çeşitliliği yatar (38). İnsan DNA'sı ortalama olarak 1000 nükleotitte 1 farklı, yani heterozigottur (38). Dolayısıyla bir kromozomun büyük bir parçasının kaybolduğu yerde heterozigotluğun kaybı söz konusudur. Bu durumda her değişken DNA dizisinin sadece bir türevi kalır.

Heterozigotluğun insan genomunda bulunan 1 milyon üstündeki genel heterozigotluk bölgeleri insan genom projesi dahilinde haritalanmıştır (38). Bu noktalar her biri çokyapılı (polimorfik) olduğu bilinen, insan toplumunda genelde iki ya da daha fazla değişik türevi bulunan özgün DNA dizileri olarak nitelendirilmektedir (38). Tümör DNA'sında, bu çokyapılı dizin türevlerinden hangisinin bulunduğu kontrol edilebilir. Karşılaştırma amacıyla aynı hastanın sağlam dokusundan alınan DNA örneğinde de aynı yol izlenir. Birçok çokyapılı bölge içeren genomun belirli bir kısmında heterozigotluğun kaybı ya da normal DNA örneğinde görülen genetik belirteç dizinin kaybı, kromozomal bir bölgenin delesyona uğradığını gösterir.

2.5 ING Ailesi

ING ailesi ING1-5 olmak üzere beş üyeden oluşan bir ailedir (57). ING2, 3, 4 ve ING5 genleri ailenin sonradan tanımlanmış üyeleridir (58-60). Tüm ING genleri farklı kromozomlar üzerinde yer almaktadırlar (Şekil 2.3) (57).



Şekil 2.3. ING ailesine mensup genlerin kromozomal yerleşimleri (57).

ING genlerinin ana biyolojik süreçlerdeki önemi; insan, fare, sıçan, kurbağa ve maya gibi organizmalarda rapor edilmiştir (61). ING2 geni kromozom 4'te 4q35.1 bölgesinde yerleşiktir ve tek alttip (variant) kodlar, ING3 geni kromozom 7'de 7q31 bölgesinde yer alır ve iki farklı kaynaşım sonucu (splicing) sonucu oluşan 2 alttip kodlamaktadır (57). ING4 geni kromozom 12'nin 12q13.3 bölgesinde yer almakta ve çok sayıda farklı kaynaşım neticesinde 8 ayrı ING4 alttipi kodlamaktadır (57). ING5 geni ise kromozom 2'nin 2q37.3 bölgesinde yerleşik olup tek varyant kodlamaktadır (Şekil 2.3) (57).

2.5.1 ING1 geninin keşfi

Tümör baskılayıcı genlerin ifadesi normal hücrelerde düşükken kanser hücrelerinde hiç gözlenmeyebilir (57). Tümör baskılayıcı genlerin gen ifadeleri çoğunlukla hücrede strese verilen cevap için gerekmektedir (57). Yeni bir tümör baskılayıcı gen tanımlamak için Karl Riabowol'un çalışma gurubu bir strateji tasarladı (18). Bu strateji, kaybolduğu takdirde hücre gelişimine ve tümör oluşumuna sebep olan genlerin tanımlanmasını amaçlıyordu (18). Bu amaca uygun olarak genetik baskılayıcı elementler (genetic suppressor elements, GSE) tasarlandı. (18). Bu genetik baskılayıcı elementler normal ve kanser epitel hücrelerinden elde edilen ve antisens olarak klonlanmış cDNA'lar kullanılarak oluşturuldu (18). Bu tümör baskılayıcı elementler preneoplastik memeli epitel hücresine yerleştirildi ve hücreler fareye enjekte edildi (18). Tümör oluşurken alındı ve kısmi cDNA'lar ve onlara karşılık gelen açık okuma çerçeveleri tespit edildi (18). Bu yöntemi kullanarak araştırmacılar ING1 (INHibitor of Growth 1) adını

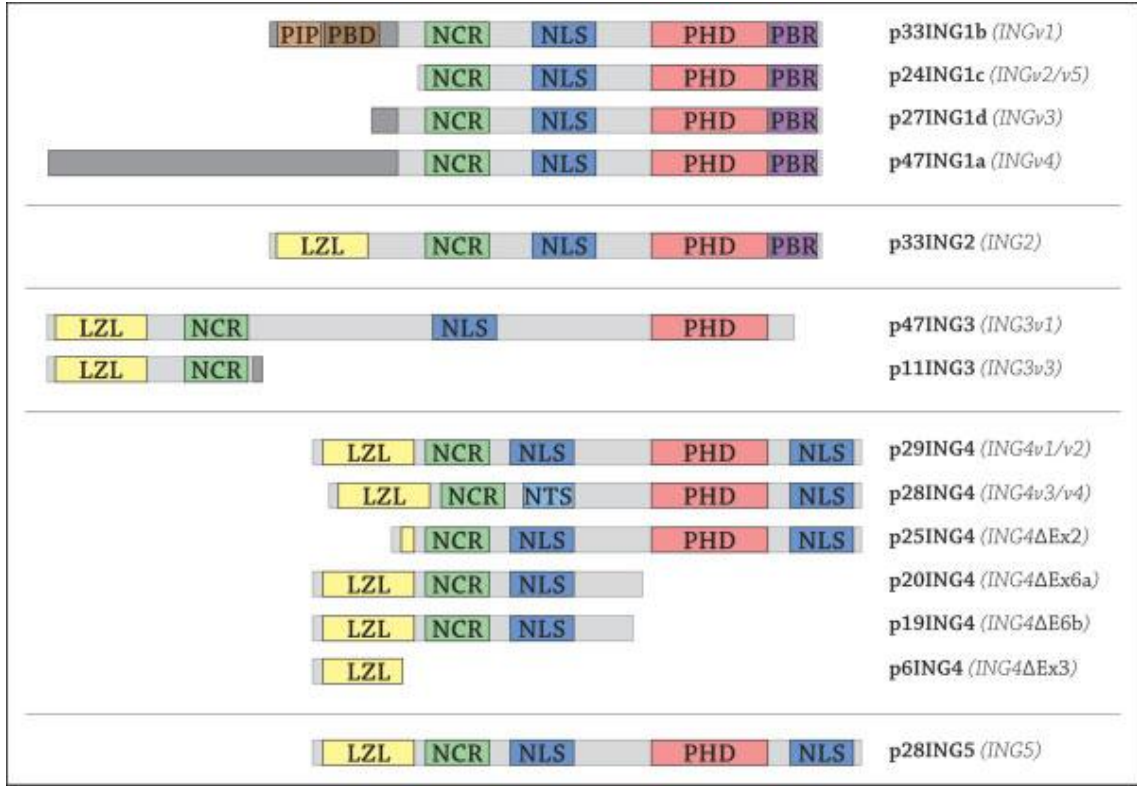
verdikleri yeni bir “aday” tümör baskılayıcı gen tanımladılar (18). Dolayısıyla bu gen tip II tümör baskılayıcı gen olarak ortaya çıkmıştır.

ING1 geni kromozom 13q33-34 bölgesinde yer alır ve farklı özendirici bölgelerin etkinliği, farklı ekzonların katımı ve çeşitli intron ayıklanmalarının (splicing) sonucunda 4 izoform kodlamaktadır (57). ING1’in tümör baskılayıcı gen olduğu çok sayıda kanser tipinde gen ifadesinin kaybı ve ING1 geni çıkarılmış farelerin kansere yatkın oluşları ile kanıtlanmıştır (62). ING1 genindeki bir bozulma lenfomaların yüksek sıklıkla ortaya çıkmasına neden olmaktadır (62). p33ING1b’nin bozulması ise foliküler B-hücre lenfomasına yüksek sıklıkla sebep olmaktadır (63).

2.5.2 ING proteinlerinin işlevleri

ING proteinlerinin C uçları yüksek homoloji gösteren ortak işlevsel ya da bağlanma bölgelerine (domain) sahiptirler (57). Her ING proteininin N-uç kısmı ise kendine özgüdür (57). (Şekil 2.4). C-uç bölgesi en az 1 çekirdek yerleşim dizisi (nuclear localization sequence; NLS) ve bitki homeo domain (plant homeo domain; PHD) parmak yapısı içerir (Şekil 2.4) (57) PHD parmak, kromatinlerin yeniden yapılanmasında görev alan proteinlerde bulunmaktadır (64,65). Filogeni çalışmaları ING1 ve ING2 proteinlerinin birbirleriyle; ING4 ve ING5 proteinlerinin de kendi aralarında yüksek homolojiye sahip olduklarını ve dolayısıyla yakın ilişkili işlevlere sahip olduklarını ortaya koymuştur (61). Çeşitli çalışmalarla, ING proteinlerinin, gelişimin düzenlenmesi, hücre yaşlanması, apoptoz, DNA tamiri ve hücre göçü gibi önemli hücresel süreçlerde ciddi roller oynadığı görülmüştür (66,67). p33ING1b’nin, tümör baskılayıcı protein p53 ile fiziki olarak etkileşime girdiği ve p53’ün transkripsiyonel etkinliği için gerekli olduğu, dolayısıyla, sağlam bir p33ING1b’nin p53’ün hücre çoğalmasının negatif düzenlemesindeki etkinliği için gerekli olduğu düşünülmektedir (20). Bunun yanı sıra tüm ING proteinlerinin p53 uyarı-ileti yolağının bir parçası olarak hücre döngüsünün durağanlaştırılmasını sağladığı, programlı hücre ölümü ve hücre yaşlanmasını tetiklediği düşünülmektedir (20,58-60,68). Fakat ING1 geni çıkarılmış (knockout) fare ve hücrelerle yapılan deneyler fizyolojik şartlarda ING1

proteinlerinin işlevlerinin p53 uyarı-ileti yolağından büyük oranda bağımsız olabileceğini göstermiştir (62,63).



Şekil 2.4. ING proteinlerine ait domainleri gösteren şema. Homoloji gösteren bölgeler açıkça görülmektedir (57).

Mayalarda yapılan çalışmaların sonucunda ING proteinlerinin histon asetilaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) oluşumlarının bileşenleri olduğu gösterilmiştir (69,70). Aslında her bir ING proteini farklı HAT ve HDAC komplekslerine; ING1 ve ING2 mSin3a HDAC 1/2 kompleksine, ING3 Tip60/NuA4 kompleksine, ING4 HBO1 kompleksine ve ING5 ise HBO1 ve MOZ/MORF komplekslerine dahil olmaktadır (71). ING2 üzerine yapılan çalışmalar sonucu C-ucu bölgesinin önemli 2 işlevi ortaya konmuştur. Birincisi, PI5P'ın (fosfoinositid 5 fosfat) bağlandığı PHD parmak bölgesine komşu çoklu baz içeren (ÇİB) bölgedir. PI5P hücre uyarı iletiminde ikincil mesajcı işlevini gören genotoksik strese cevaben p53'e bağlı apoptoz açısından önemli bir moleküldür. Böylece ING2 fosfoinositidlerin nükleer alıcısı olarak tanımlanmıştır (72,73). İkincisi, PHD parmak bölgesinin genotoksik strese cevaben hücre döngüsü

ilerlemesinde yer alan siklin D1 ve c-myc gibi genlerin promotor bölgelerine mSin3a/HDAC baskılayıcı komplekslerini hedefleyen 4. lizinden trimetilasyona uğramış histon 3'e yüksek derecede bağlanma eğilimi mevcuttur (74,75). Sonuç olarak, ING2 hücre uyarı iletimi, kromatin yeniden düzenlenmesi ve gen ifadesi işlevlerinin kesişiminde yer alabilir. ING4 işlevine yönelik çalışmalara göre, bu gen ING proteinlerinin ortak işlevlerine ek olarak tümör oluşumunda tamamen farklı bir rol üstlenebilir (57). Aslında, ING4 tümörlerde damar oluşumunun engellenmesinde rol almanın yanında hücrenin yayılımı ve göçünün de önlenmesinde rol alabilir (76). Bu proteinin kaybı temas yoluyla engellenmenin (contact inhibition), NF-kB transkripsiyonal işlevinin engellenmesinin ve gelişmiş hücre göçünün de kaybına sebebiyet vermektedir (76-79). ING4'ün kaybı kötü huylu dokunun ilerlemesinde, özellikle de glioblastomada önemli bir aşama olabilir (77).

2.5.3 ING1 geninin alt tipleri

Bu zamana kadar, ING1 ve ING4 genlerinin farklı transkript ve proteinleri tanımlanmıştır (57). Bu alt tipler farklı işlevlere sahiptirler (57). Farklı alttiplerin değişik işlevleri bulunmakta olduğu ve bu alt tiplerin ifadelerinin birbiri ile arasındaki dengenin, bazı alt tiplerin sahip olabilecekleri dominant negatif etki dolayısı ile tümör oluşumunda etkisinin olabileceği düşünülmektedir (57). İşlevsel hücre çalışmaları neticesinde ING1 alt tiplerinin farklı HAT ve HDAC komplekslerinde dahil oldukları gösterilmiştir (62,63,80,81). Tek hücre seviyesinde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak p33ING1b'nin aşırı ifade edilmesinin H3 ve H4 histonlarının hiperasetilasyonunu etkilemektedir, fakat p47ING1a bu etkiye sahip değildir (80). p47ING1a *in vitro* ve *in vivo* olarak histon asetilasyonunu engellemekte ve histon deasetilaz HDAC1'e bağlanmaktadır (80). Farelerde bütün ING1 lokusu susturulduğunda tümör oluşum şekli sadece tek bir alt tipin, INGv1.3'ün susturulduğundan daha farklı olarak gözlenmiştir (63). Buna göre farklı alt tipler tümör oluşumunda farklı roller üstlenmektedir.

2.5.4 ING ve DNA tamiri

Her geçen gün artan veriler ING proteinlerinin DNA tamirinde rol aldıklarını göstermektedir. UV etkili DNA hasarına cevaben ING proteinleri (örn. ING1) a) kromatin gevşemesini tetikleyebilir b) histon asetillenmesi dinamiklerini değiştirebilir c) XPA gibi DNA tamir proteinlerinin erişimlerini kolaylaştırabilir (82-85). Ek olarak, bazı verilere göre p33ING1b çoğalan hücre nükleer antijeni (proliferating cell nuclear antigen - PCNA) ve p300'ün fiziksel ilişkisinin derecesini etkilemektedir, bu ilişki DNA tamiri ile kromatin yeniden düzenlenmesini birbirine bağlamaktadır (80,86). Böylece Tip-II Tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanan ING proteinleri aynı zamanda Tip-I tümör baskılayıcı gen olarak da etki edebilirler.

Bu işlevsel çalışmaların sonuçlarına göre apoptoz ve yaşlanma gibi tümör baskılayıcı yollar içerisinde yer alan ING proteinleri aynı zamanda genom bütünlüğünün korunmasında kiritik öneme sahip DNA tamirinde de rol almaktadırlar (80,82-86). Böylece, ING proteinleri tümör oluşumunda kritik bir rol üstleniyor olabilirler.

2.5.5 ING1 geni

ING1 geni 1996 yılında Garkavtsev ve ark. tarafından klonlanmış (18) ve aday bir tümör baskılayıcı gen olarak ortaya çıkmıştır. Bunun başlıca sebepleri, baş ve boyun kanserleri dahil olmak üzere pek çok tümör türünde sıklıkla eksilme tipi mutasyonlar gözlenen 13q bölgesinde yer alıyor oluşu (87,88), nöroblastom hücre hattında genetik değişikliğe uğradığının tespiti ve çeşitli meme kanseri hücre hatlarında azalan protein sentezinin gözlenmesi (18), in vitro şartlarda p53 proteini ile etkileşmesi ve p33ING1 ile p53 proteinlerinin biyolojik etkilerinin birbirleriyle ilişkili olması (20) şeklinde sıralanabilir. İnsan ING1 geni 13. kromozomun uzun kolunda subtelomerik bölgede (13q34) yerleşiktir (89). Çeşitli kanser çalışmalarında 13q bölgesinde yüksek oranlarda heterozigotluk kaybı gözlenmiştir. Bunlar arasında özofagus kanseri (90), akciğer kanseri (91), mesane kanseri (92), over kanseri (93), böbrek kanseri (94), meme kanseri (95) ve baş ve boyun kanserleri (96) sayılabilir.

arasındaki ilişkiyi araştırmaya başladılar. Bazı tümör tiplerinde gerçekten ING1 ve p53 arasında bir bağlantı olduğu ortaya konuldu. Gastrik kanserlerde, tümörlerin büyük çoğunluğunda p33ING1b gen ifadesinin önemli derecede düştüğü ve tümörlerin %80'inde p33ING1b gen ifadesinin olmadığı ve yabanıl tip p53 geninin bulunduğu görülmüştür (100). Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda (non small cell lung carcinoma, NSCLC) yapılan bir çalışmada, NSCLC'nin %42'sinde p33ING1b gen ifadesi azalmış görülürken, %47'sinde p53 geninde mutasyon olduğu ve %17'sinde hem azalmış p33ING1b gen ifadesi hem de p53 mutasyonu gözlenmiştir (101). Ayrıca; NSCLC tümörlerinin %72'sinde azalmış p33ING1b gen ifadesi veya p53 mutasyonu görülmüş ve ING1 gen ifadesindeki azalmanın p53 efektör genleri p21 ve bax genlerinin ifadelerinin azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (101). Bu sonuçlar göstermektedir ki; azalmış p33ING1b gen ifadesi yabanıl tip p53 geni taşıyan tümörlerin karsinogenezinde önemli bir role sahiptir. Meme kanserinde yapılan bir çalışmada en ideal düzeydeki p53 işlevinin p33ING1b'ye bağlı olduğu görülmüştür (102). İstilacı göğüs karsinomlarında görüldüğü gibi p33ING1b gen ifadesindeki azalmanın p53 işlevine katkıda bulunduğu (102) yabanıl tip p53 içeren tümörlerde de ING1 ifadesinin ciddi derecede düştüğü gözlenmiştir (103). Bu çalışmalara göre ING1'in ve p53'ün tümör baskılayıcı işlevleri her iki gene de bağlı görünmektedir. Diğer taraftan özofagogastrik birleşme noktasındaki adenokarsinomlarda p53 ve ING1 değişimleri arasında bir ilişki görülmemiştir (104). Anlaşıldığı üzere; bazı tümörlerde ING1 ve p53'ün durumu açısından bir bağlantı görülebilen, tümör tipine bağlı olarak görülmediği durumlar da olabilmektedir. Bu iki tümör baskılayıcı gen arasındaki ilişkinin netleştirilebilmesi için yeterli sayıda tümör örneğinin olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Grupların Oluşturulması ve Doku Örneklerinin Temini

Bu çalışmada; klinik olarak mesane kanseri tanısı konmuş, yaş ortalaması 65,7 (± 20) olan 30 hasta bireyden alınan normal ve tümörlü taze doku örnekleri kullanıldı. Hastalar 23 erkek ve 7 kadın bireyden oluşmaktadır.

Hastalara mesane tümörü tanısı Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılan incelemeler sonucu konmuş, tümörlerin derece ve aşamaları tespit edilmiştir.

Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır. Etik Kurul Karar No: 02-2009 /63.

Cerrahi müdahale esnasında alınan taze doku örnekleri bekletilmeden taşınabilir sıvı azot tankına nakledildi ve DNA ve mRNA eldesine kadar geçen süre içerisinde -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.2 Kullanılan çözeltiler

10X TBE (108 g tris, 55 g borik asit, 8,3g EDTA), gümüş nitrat çözeltisi (2 g gümüş nitrat, 2,5 ml %37'lik formaldehit, 2 litre saf su), sodyum karbonat çözeltisi (60 g sodyum karbonat, 420 μl 10 mg/ml sodyum tiyosülfat, 2 litre saf su), jel bağlama çözeltisi (3 μl gamma-metakriloksipropil-trimetoksi silane, 5 μl asetik asit, 1000 μl %96'lık etil alkol), jel yükleme tamponu (0,025 g bromfenol mavisi, 0,025 g ksilen siyanol, 10 ml saf su)

3.3 DNA eldesi

Derin dondurucuda (-80 °C’de) saklanan taze doku örneklerinden Roche Applied Science High Pure PCR Template Preparation Kit (Kat. No. 11 796 828 001) kullanılarak DNA eldesi aşağıdaki şekilde sağlandı.

Homojenizatör ile parçalanmış 25-50 mg kadar doku örneği otoklavlanmış 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 200 µl doku parçalama tamponu (Tissue Lysis Buffer) ve 40 µl Proteinaz K eklendi. Vorteks yardımıyla karıştırılarak 1 saat 55°C’de doku tümüyle parçalanana kadar inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan alınan örneklerle 200 µl bağlama çözeltisi (Binding Buffer) eklendi ve 10 dakika 70°C’de inkübe edildi. Üzerlerine 100 µl isopropanol ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

Bu aşamadan sonra filtreli tüpler toplama tüplerine yerleştirildi ve sıvı haldeki doku örneği filtreli tüpe aktarıldı. Takiben 1 dakika 8000 g devirde santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirilerek (her santrifüj sonrası değiştirilmektedir) filtreli tüpe 500 µl inhibitör uzaklaştıran tampon (Inhibitor Removal Buffer) konuldu ve 1 dakika 8000 g devirde santrifüj edildi. Üzerlerine 500 µl yıkama tamponu (Wash Buffer) eklenip 1 dakika 8000 g devirde santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Yıkama tamponunun tamamen uzaklaşmasını sağlamak için tüpler 10 saniye en yüksek hızda santrifüj edildi.

Filtreli tüpler bu kez 1,5 ml’lik temiz tüplere konuldu ve DNA’yı filtreden geçirmek için 200 µl önceden 70 °C’ye ısıtılmış çözücü tampon (Elution Buffer) filtreli tüplere eklendi ve 1 dakika 8000 g devirde santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda 1,5 ml’lik tüplerde DNA bulunmaktadır.

Elde edilen DNA’lar saklanmak üzere -20°C’lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.4 13q33-34 Bölgesinin Mikroayıp Analizi

Bu çalışmada DNA ve mRNA analizleri için kullanılan PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniğı, ilgili gen bölgesinin laboratuvar ortamında çoğaltılmasına dayanan, pratikliği ve güvenilirliği ile günümüzde moleküler biyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan tekniklerden biridir (105).

DS belirleyiciler ile kromozom 13q33-34 bölgesinin çoğaltılması işlemi Eppendorf Mastercycler gradient PCR cihazı ile yapıldı. PCR tepkimesi için gerekli karışımların tümü otoklavlanmış malzemeler kullanılarak steril kabinde hazırlandı.

3.4.1 Kullanılan DS belirleyiciler

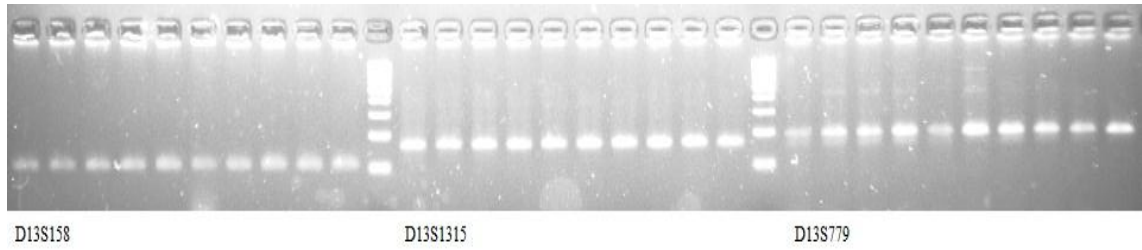
Bu tezde kullanılan DS belirleyiciler D13S285, D13S1315, D13S796, D13S278, D13S158 ve D13S779'dur. Bu DS belirleyicilere ait dizinler ve PCR ürün büyüklükleri Tablo 3.1'de görüldüğü gibidir.

Tablo 3.1. Heterozigotluk kaybı analizlerinde kullanılan DS belirleyiciler, dizinleri ve ürün büyüklükleri.

İsim	Dizin (5'-3')	Ürün büyüklüğü (bp)
D13S285	ATATATGCACATCCATCCATG GGCCAAAGATAGATAGCAAGGTA	92-106
D13S1315	TACACGATAAGTAAGCCAAGCA AACTCAACAGTCACAAGAGCAAT	162-180
D13S796	CATGGATGCAGAATTCACAG TCATCTCCCTGTTTGGTAGC	152-168
D13S278	GGGGTAGTTTGTACCTACA CAGGTGATCTACCTAACTCAGC	244
D13S158	GTACCCACGGAGTGAAAGAA GCTTTGACAATTTAGCAGCA	99-113
D13S779	AGAGTGAGATTCTGTCTCAATTAA GGCCCTGTGTAGAAGCTGTA	180-198

3.4.2 PCR karışımının hazırlanması ve PCR şartlarının DS belirleyicilere göre uyumlandırılması

PCR tepkimesinde kullanılan DS belirleyicilerin en verimli çalışabilecekleri erime sıcaklıklarının tespit edilmesi ve tepkime koşullarının iyileştirilmesi amacı ile 30 çift DNA içerisinden 1 örnek DNA seçildi ve 6 çift primer takımı için iyileştirme ve gradient PCR yapıldı (Şekil 3.1). İyileştirme yapılan örnekler için toplam karışım hacmi 10 µl olarak ayarlandı (Tablo 3.2). Bu işlem neticesinde elde edilen erime sıcaklıkları Tablo 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.1. D13S158, D13S1315 ve D13S779 isimli DS belirleyiciler için yapılan gradient PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü.

Tablo 3.2. DS belirleyiciler kullanılarak yapılan PCR’ın karışım oranları.

Eklenen Kimyasal Madde	Miktar (µl)
Kalıp DNA	0,5
Steril deiyonize su	4,135
10X Amonyum sülfatlı PCR tamponu	0,5
25 mM MgCl ₂	0,3
2 mM dNTP karışımı	0,4
100 mM F primeri	0,07
100 mM R primeri	0,07
5 U/µL Taq DNA polimeraz	0,025

Tablo 3.3. Gradient PCR neticesinde belirlenen en uygun bağlanma sıcaklıkları.

DS belirleyici	Erime sıcaklığı °C
D13S285	58
D13S1315	58
D13S796	57.6
D13S278	58
D13S158	57
D13S779	56

Bütün primer çiftlerinin tepkime koşullarının iyileştirilmesi bittikten sonra kalan diğer örnekler için toplam karışım hacmi, baştaki oran korunarak 10 µl olarak hazırlandı.

Tepkime koşullarına ait değişkenler primerlere ait erime sıcaklıkları haricinde tüm tepkimelerde aynı tutulmuştur (Tablo 3.4). Elde edilen ürünler DPGE (denaturated polyacrilamide gel electrophoresis) yöntemi ile heterozigotluğun kaybı yönünden araştırıldı.

Tablo 3.4 PCR tepkime koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika
Denatürasyon	95 °C	30 saniye
Bağlanma	Tablo 3.3' deki değerler	30 saniye
Uzama	72 °C	30 saniye
	35 tekrar	
Son uzama	72 °C	2 dakika

3.5 Elektroforez

Elektroforez, yüklü moleküllerin doğrusal elektrik akımı yardımı ile birbirinden ayrılması için kullanılan bir fiziksel ayırım yöntemidir (105). Elektroforetik

tekniklerden, bu çalışmada agaroz jel elektroforezi, DPGE ve SSCP (single strand conformation polymorphism) yöntemi kullanılmıştır.

3.5.1 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi PCR tepkimelerinin verimli çalışıp çalışmadığının kontrolünde ve “3.7.3. ING1 Geni İfade Analizi” başlığı altında belirtildiği gibi mRNA ifadesinin analizinde kullanıldı. Örnekler, yüzde 2 oranında hazırlanmış olan agaroz jelde 100 voltta 30 dakika kadar 100 bp DNA belirleyici (100-1500 bp aralığında) eşliğinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV (ultra violet) ışık altında görüntülendi.

3.5.2 Denature poliakrilamid jel elektroforezi (DPGE)

Denature poliakrilamid jel elektroforezi (DPGE), DNA üzerindeki farklılıkları tesbit amacıyla geliştirilen yöntemler içerisinde çok çaba ve kimyasal gerektirmemesiyle ve pratik oluşuyla en çok kullanılan yöntemlerden biridir (105). Ekleme/çıkarma tipi mutasyonlar, yeniden düzenlenme tipi mutasyonlar gibi durumların tespiti için çok uygundur (105). Bunun yanında, tek bir baz çifti kayıp ve kazanımlarını dahi DPGE ile yakalamak mümkündür (105).

Yöntem, denatüre edilerek tek sarmal haline getirilen DNA parçacıklarının denatüre edici üre içeren poliakrilamid jelde yürütülmesi esasına dayanmaktadır (105). Analiz edilen DNA parçacığının molekül ağırlığına göre elektromanyetik alanda hareket etmesi esasına dayanmaktadır. DPGE, kıyasa dayalı bir yöntemdir. Bu nedenle doğru analiz yapabilmek için sağlıklı kontrol kullanmak şarttır.

Bu yöntemin en büyük avantajı hızlı bir şekilde çok sayıda örneğin taranabilmesine imkan vermesidir. Kullanılan jelin derişimi ve elektroforez süresinin uzunluğu değiştirilerek mutasyon %100 oranında güvenilirlikle tespit edilir.

3.5.3 DPGE'nin yapılışı

3.5.3.1 Camların hazırlanması

Kullanılacak olan, U şekilli ve dikdörtgen şekilli her iki cam da ilk önce %70'lik ardından da %96'lık etil alkol ile iyice temizlendi. Jelin bağlanması istenen düz cama 1000 µl jel bağlama çözeltisi (3 µl gamma-metakriloksipropil-trimetoksi silane, 5 µl asetik asit, 1000 µl %96'lık etil alkol) hav bırakmayan peçete ile dikkatlice yayıldı ve 10 dakika kuruması için beklendi. U cama ise 650 µl kayganlaştırıcı çözelti (sigmacote) hav bırakmayan peçete ile yayıldı ve 10 dakika kuruması için beklendi. Yanlara aralık çubukları, üste ve alta da ters olarak birer tarak yerleştirildikten sonra camlar birbiri üzerine kapatılıp mandalla birbirine tutturuldu (105).

3.5.3.2 Jelin hazırlanması

Jel karışımı, 250 ml'lik beher içerisine 49:1 akrilamid:bisakrilamid oranında hazırlandı. Jel karışımı, 14 ml %50'lik stok akrilamid çözeltisi, 6 ml 10X TBE ve 80 ml saf su şeklinde hazırlandı ve iyice çözünmesi sağlandı. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan karışıma burada 450 µl %10 APS ve 45 µl TEMED eklendi. 4-5 saniye karışması beklendikten sonra beher yardımıyla yavaşça ve hava kabarcığı bırakmamaya özen göstererek iki cam arasına döküldü ve köpek balığı dişli tarak ters olarak jelin üst kısmına yerleştirildi. Jelin donması için en az 45 dakika beklendi.

3.5.3.3 Örneklerin hazırlanması

Örnekler, 0,2 ml lik tüplere 10 µl'lik toplam hacmin 3 µl'si PCR ürünü ve 7 µl'si yükleme tamponu olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan örnekler 95,5°C'de 3 dakika denatürasyonun hemen ardından buz üzerine alındı ve buz üzerinde en az 5 dakika bekletildi.

3.5.3.4 Örneklerin yüklenmesi

Jel donduktan sonra alttaki ve üstteki taraklar ile mandallar çıkarıldı. Camlar U cam arkada kalacak şekilde ve elektroforez tankında sızmaya meydan vermeyecek şekilde yerleştirildi. Tankın üst ve alt kısımlarına 1X TBE dolduruldu. İki cam arasındaki jel kalıntıları temizlendikten sonra köpek balığı dişli tarak düz olarak yerleştirildi. Güç kaynağı ile bağlantılar yapılarak 1500 Volt'ta 30 dakika boş olarak pH dengesinin sağlanması ve jelin ısınması amacıyla ön yürütme yapıldı. Ön yürütmenin ardından, hazırlanan örnekler kuyucuklara 3'er µl hacimde yüklendi ve 1500 Volt'ta (35-45 W) 3 saat yürütüldü.

3.5.3.5 Örneklerin görüntülenmesi

Yürütmenin ardından tanktan alınan camlar birbirinden ayrıldı. Üzerinde jel olan düz cam, çalkalayıcı üzerinde %10'luk 2 litre asetik asit içinde 15 dakika bekletildi. Ardından, 10 dakika 2 litre saf su içinde bekletildi. Gümüş nitrat çözeltisi içerisinde 45 dakika bekletildikten sonra soğuk sodyum karbonat çözeltisi içine alındı. Bantların görünmesiyle zemin kararmadan hemen önce tekrar %10'luk asetik asit çözeltisine alınarak bantların sabitlenmesi sağlandı. Beş dakika bekletildikten sonra tekrar saf suya alınarak ortamdan fazla asetik asitin uzaklaştırılması sağlandı. Bunun ardından cam kurumaya bırakıldı. Kurumanın ardından, jelin görüntüsü 1200 dpi tarayıcı kullanılarak bilgisayara aktarıldı.

3.6 RNA Eldesi

RNA eldesi Roche Applied Science High pure RNA Tissue Kit (Kat. No. 12 033 674 001) ile aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Donmuş doku örneklerinden 20-25 mg alınarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 400 µl parçalama/bağlama tamponu (Lysis/Binding Buffer) eklenerek homojenizatör yardımıyla parçalandı. Elde edilen eriyik 2 dk en yüksek hızda

santrifüj edildi. Çökelen eriyiğin üzerine 200 µl mutlak etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

Bu aşamadan sonra filtreli tüpler ile toplama tüpleri birleştirilerek örnekler filtreli tüplere aktarıldı, 30 saniye 13,000 x g hızda santrifüj edildi.

Toplama tüpü boşaltılarak tekrar filtreli tüple birleştirildi. Bu esnada temiz bir 1,5'luk tüp içerisine örnek başına 90 µl DNaz inkubasyon tamponu (DNase Incubation Buffer) ve 10 µl DNaz I (DNase I working solution) konularak karıştırıldı. Hazırlanan karışım 100'er µl olacak şekilde filtreli tüplere konuldu ve 15 dk. 15-25 °C'de inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben 500 µl birinci yıkama tamponu (Wash Buffer I) filtreli tüpe eklendi ve 15 sn 8000 x g hızda santrifüj edildi.

Toplama tüpü boşaltıldıktan sonra 500 µl ikinci yıkama tamponu (Wash Buffer II) eklendi ve 15 sn 8000 x g hızda santrifüj edildi. İkinci yıkama tamponundan 300 µl tekrar konularak 2 dk. 13,000 x g hızda santrifüj edildi. Bu santrifüj aşamasında yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılması amaçlanmaktadır.

Filtreli tüpler temiz 1,5'luk tüplere konularak içlerine 100 µl çözücü tampon (Elution Buffer) eklendi ve 1 dk 8000 x g devirde santrifüj edildi. Bu aşamada RNA 1,5'luk tüplere aktarılmış oldu.

RNA'lar saklanmak üzere -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.7 mRNA İfadesinin Kıyaslamalı Olarak Belirlenmesi

3.7.1 RNA'ların spektrofotometrik ölçümü

Mesajcı RNA ifadesinin seviyesinin belirlenmesi sürecinde en hassasiyetle üzerinde durulması gereken nokta tüm örneklerin aynı koşullar altında işleme tabi tutulması, yani standardizasyondur. Bu sağlanamadığı takdirde sonuçların güvenilirliğinden söz

edilemez. Dolayısıyla gen ifade analizine başlanmadan evvel tüm RNA örneklerinin derişimlerinin belirlenmesi ve RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction) tepkimesinin bu değerler dikkate alınarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada kullanılan örneklere ait RNA ölçüm değerleri Tablo 3.5'te görölmektedir.

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan örneklere ait RNA ölçüm değerleri görölmektedir.

Örnek no	ng/ul	A260	A280	260/280
1N	18.8	0.47	0.213	2.21
1T	65.95	1.649	0.799	2.06
2N	61.2	1.53	1.053	1.45
2T	54.4	1.36	0.909	1.5
3N	43.01	1.075	0.537	2
3T	233.7	5.842	2.9	2.01
4N	15.86	0.397	0.18	2.2
4T	4.83	0.121	0.075	1.61
5N	22.22	0.555	0.273	2.03
5T	20.35	0.509	0.236	2.16
6N	95.99	2.4	1.189	2.02
6T	36.98	0.924	0.456	2.03
7N	2.07	0.052	0.031	1.69
7T	3.23	0.081	0.047	1.73
8N	3.96	0.099	0.05	1.99
8T	13.53	0.338	0.23	1.47
9N	30.21	0.755	0.572	1.32
9T	14.18	0.354	0.167	2.13
10N	21.28	0.532	0.271	1.96
10T	25.35	0.634	0.315	2.01
11N	30.69	0.767	0.393	1.95
11T	100.56	2.514	1.239	2.03
12N	4.36	0.109	0.055	1.98
12T	184.95	4.624	2.333	1.98
13N	17.62	0.441	0.212	2.08
13T	6.2	0.155	0.058	2.66
14N	26.34	0.659	0.452	1.46
14T	21.97	0.549	0.312	1.76

15N	32.16	0.804	0.491	1.64
15T	154.46	3.861	1.967	1.96
16N	22.56	0.564	0.384	1.47
16N	99.81	2.495	1.188	2.1
17N	108.51	2.713	1.36	2
17T	150.66	3.766	1.834	2.05
18N	11.81	0.295	0.142	2.08
18T	25.19	0.63	0.3	2.1
19N	5.37	0.134	0.028	4.8
19T	171.5	4.288	2.098	2.04
20N	25.53	0.638	0.442	1.44
20T	119.96	2.999	2.049	1.46
21N	146.13	3.653	1.767	2.07
21T	302.63	7.566	3.742	2.02
22N	21.52	0.538	0.383	1.41
22T	25.52	0.638	0.306	2.09
23N	6.38	0.159	0.124	1.29
23T	3.54	0.089	0.083	1.07
24N	2.8	0.07	0.011	6.2
24T	42.68	1.067	0.684	1.56
25N	47.13	1.178	0.586	2.01
25T	57.7	1.442	0.75	1.92
26N	10.85	0.271	0.163	1.66
26T	92.91	2.323	1.583	1.47
27N	5	0.125	0.056	2.24
27T	8.94	0.224	0.09	2.5
28N	39.93	0.998	0.486	2.05
28T	76.78	1.919	1.016	1.89
29N	83.24	2.081	1.524	1.37
29T	53.76	1.344	0.877	1.53
30N	50.96	1.274	0.897	1.42
30T	79.13	1.978	1.388	1.43

3.7.2 cDNA (complementer DNA) yapımı

Elde edilen RNA'lerden cDNA yapmak üzere RT-PCR tepkimeleri Roche Applied Science First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Kat. No. 11 483 188 001) kiti kullanılmıştır. Kit; tampon, $MgCl_2$, dNTP, RNaz önleyici (RNase Inhibitor), transkriptaz enzim (AMV Reverse Transcriptase) ve primerler [oligo dT ve random (rastgele) primer] ihtiva etmektedir. RT-PCR tepkimelerinde kullanılan oranlar toplam hacim 20 μ l olacak şekilde ayarlanmıştır ve Tablo 3.6'da görülmektedir. Tüm RNA örneklerinin toplam tepkime miktarı içindeki derişimi eşit olacak şekilde RNA ve distile su hacimleri değiştirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. RT-PCR deneyleri için hazırlanan karışımın içeriği.

Kimyasal Madde	Miktar (μ l)
Su	Değişken
10x PCR Tamponu	2.0
$MgCl_2$	4.0
dNTP	2.0
RNaz Önleyici	0.4
AMV ters yönlü transkriptaz	0.2
Oligo dT	1.0
RNA	Değişken
Toplam Hacim	20 μ l

cDNA'ların yapımında kullanılan RT-PCR koşulları Tablo 3.7'de verilmiştir. Çoğaltma işlemi Eppendorf Mastercycler Gradient cihazı ile yapılmıştır.

Tablo 3.7. cDNA yapımında kullanılan RT-PCR koşulları.

Sıcaklık	Süre
44 °C	30 dakika
95 °C	5 dakika
5 °C	5dakika

Elde edilen cDNA'lar cihazdan alınınca hiç vakit kaybetmeden soğuk blok üzerinde 0.2 ml'lik PCR tüplerine 1'er µl olarak dağıtılmış ve bu şekilde -20 °C'de saklanmıştır. Bu sayede 20 µl toplam hacimdeki cDNA örneklerinin her PCR işlemi öncesinde eritilmesi gerekmemiştir. Çünkü cDNA tek iplikli kararsız yapılı bir nükleik asit zinciridir. Fazlaca dondurma ve çözündürme işlemi yapısının bozulmasına sebep olacak ve deneylerdeki verimlilik azalacaktır. Kullanılan AMV ters yönlü transkriptaz enziminin oldukça pahalı bir enzim olduğunu da unutmamak gerekir.

3.7.3 ING1 geni ifade analizi

ING1 geninin ifade analizi, ING1 mRNA'sı dikkate alınarak tasarlanan bir çift primer ile tüm hastalara ait normal ve tümörlü dokuların cDNA'larının çoğaltılması ve yine aynı cDNA'lardan çoğaltılan GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) hamarat (housekeeping) geninin ifadesi ile agaroz jel elektroforezi neticesinde kıyaslanarak gerçekleştirildi. ING1 ve GAPDH genleri için kullanılan primer çiftleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. ING geni ifade analizi çalışmaları için kullanılan ING1 ve GAPDH primerlerine ait dizinler.

Gen	Primer	Dizin (5'-3')
ING1	Fw	GAGATCGACGCGAAATACCAA
	Rv	CTCCTGGCTGCGGATCAG
GAPDH	Fw	AGACCACAGTCCATGCCATCAC
	Rv	GGTCCACCACCCTGTTGCTGT

ING1 ve GAPDH genlerinin çoğaltılması için hazırlanan PCR karışımı Tablo 3.9'da, çoğaltıldığı koşullar ise Tablo 3.10'da görüldüğü gibidir. Çoğaltma işlemi Eppendorf Mastercycler Gradient cihazı ile yapılmıştır.

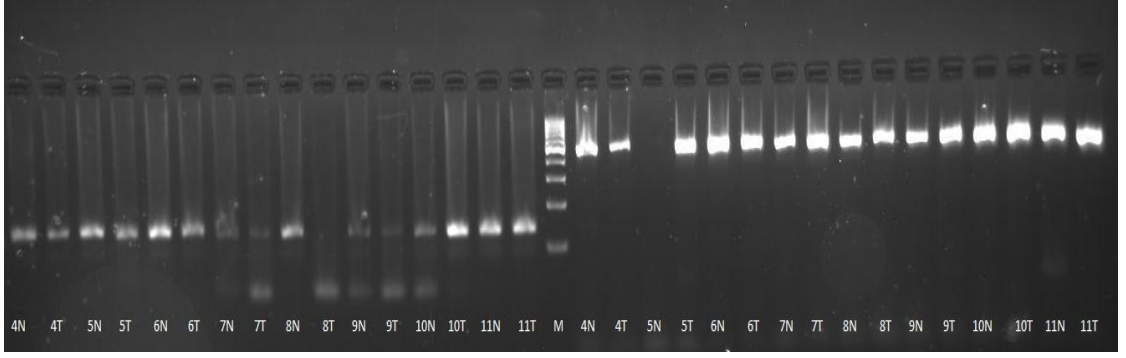
Tablo 3.9. ING1 ve GAPDH genlerinin çoğaltılması için hazırlanan PCR karışımı.

Kimyasal Madde	Miktar (μl)
Distile su	6.15
10x PCR tamponu	1.0
MgCl ₂	0.8
dNTP	0.8
Fw primer	0.1
Rv primer	0.1
Taq polimeraz	0.05
cDNA	1.0
Toplam Hacim	10.0

Tablo 3.10. ING1 ve GAPDH genlerinin çoğaltıldığı koşullar.

ING1			GAPDH		
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	
	95 °C	5 dakika	95 °C	5 dakika	
	95 °C	30 saniye	95 °C	30 saniye	
40 döngü	62.7 °C	45 saniye	65 °C	30 saniye	30 döngü
	72 °C	30 saniye	72 °C	30 saniye	
4 °C	∞	4 °C	∞		

Çoğaltma işlemini takiben örnekler çiftler halinde (1N, 1T, 2N, 2T...30N, 30T) %2'lik agaroz jele yüklenmiş ve 30 dakika 100 voltta yürütülmüştür. ING1 ve GAPDH bölgelerine ait PCR ürünleri araya boyut belirleyici konularak ayrılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. ING1 ve GAPDH genlerinin bir arada yürütüldüğü agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

3.7.3.1 ING1 geni özendirici bölgesinin irdelenmesi

ING1 geninin özendirici bölgesi ve buraya bağlanan transkripsiyon faktörleri hakkında çalışma ve bilgi mevcut değildir. Bu noktadan hareketle bu çalışmada ING1 geninin özendirici bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörlerini Genomatix-MatInspector (106) ve TFSEARCH (107) isimli bilgisayar programlarını kullanarak tahmin etmeye çalıştık. Her iki yazılımın da çalışma sistemi programa kullanıcı tarafından yüklenen özendirici bölge dizinini analiz ederek, bilinen transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini tanımlamak şeklindedir. Programlarda analiz edilen özendirici bölge dizini NCBI veri tabanından (108) elde edilmiş ve Şekil 3.3’de görüldüğü gibidir.

-5000

CAGGAGACGTTCTCTGGTTTTTTGTTGTTGTTTTAGTTTGCTTTGGTGTTTTATTAAA
AAGCAAAGGTTTAAGTAGAGACAAACAAGTGTGTACCTAGAGTAGTTTCTCAATATC
CTGGAGTCCAACTCTGCAATTCGTGTTTCAAGCTAACTGTAGTCTAATGTAATCTATTG
TCTAATTTAATAAGGTTAAATGTTAGAATTAGGAGACCTATAGCCTACATCAATGC
TAACCACTCATGTTACCTAACTACTCTAAATTCTCCTGAATATTATCACTTCTTGCCGTG
CCTTATGTTATTTTGTAACTTTCCAGTGCTGTGTGTATATTTATCTCCCTGAGTATCTT
AAATTGTACATTATTTTGAACCTTCTCACTGTGCCCTGCACTAAATTCAGAAAAAGGACT
TGGGTTTTGTTGTTTTGTTTTGCTGTGGCTGGAAAAAATAATTTAGAAGAAATAAA
AGGGCTTGTGTAATGTTGATGAATTAATCCCTTACGAAAGGGATTAAATTGTGCAGGTG
GGAAGAAATCTGGGTAGTAAATACTTGATAAAGCTGATTGAGATATTAGATGTGCC
AGTAAATAAAGCAAATTAACAAAAAGCTCAGTTGCAATCTGTGAGAACACACGAATT
CAAGGAAATAACTGGAGCAGAGATTCTGAAAAGCAGCTTAGTAACACTGAAGATCAA
ATCTGCACATGAATCTGGACATGCGGTATATTTGAATTGTTTCATAGAACATCACAACT
TTTAAATTAACAATAGTATCTTCTGTCTTCAGAAAAATTCATGTAATGTTTTTAGCCCT
CACTGGCAGTGATTCTATTATGTTTTCTTTTTTTTTTTTGGAGGCAGTCTTGCTCTGTCA
CCAGGCTGGAGTGACAGTGGCCTGATCTGGGTTCAGTGCAGCCTCTGCCCTCTGGTTCA
AGCAATCCTCCTGCTTCAGCCTCCACAGTAGCTGAGATTACAAGTGCACACCACCGT
GCCCAGCTAATTTTTGCATTTTTATTTTTATTTTTATGTATTTATTTTTGAGACAGAGTC
TCACTCTATCACCCAGGCTGGAGTGACAGTGGCACGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCA
CCTCCCAGATTCAAGTGATTCTTCTGCCCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGGATTACAGGT
GCGTGCCACCACGCTCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCATCATG
TTGGCCAGGCTGGTCTGGGACTCTGGAACCTCTGACCTCAAGTGATCCAGCCACCTCA
GCCCTCCAAAGCGGTGGGAATACCGGCCTAAGCCACCACACCTGGCCAAATCTCTTTT
CTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGATGGAGTTTCACTCTTGTGCCCAGGCTGGAGT
GCAATGGCGTGATCTCCTGGGTTCAGCGATTCTCCTGCCTCTTTCTCACGTCTCCCG
GGTTCAAGCAATTCCTGCTTGTCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGTGCCAC
CATGCCCAGCTAATTTTGTATTTTTAGTACAGATGGGGTTTTCTCCATGTTAGTCAGGCT
GGTCTTGAACCTCCGACCCAGGTGATCCGCCCACCTCGGTCTCTGAAAGTGCTGGG
ATTACAGGCATGAGCCACCGTGCCCGGCAGCTAATCTGTTTTCTTAAGGCTTTTGCG
GATCATCAAAACAAGGAGAAACATAGCTCATTACCTAATGATGGTTAGAAAATGTGAT
CTTTTTGCATATTGAATATCTGCAGGTGTAATATTAAGGTAAAGTAAAAATAGACTGCT
AATGCTCTTCACTTATACTTACCTCCAGCCTACATCTTTCTCCTGTGCTGGGTGCTTCT
GCCCTCGAACATCAGACTCCAAGTCTTTCAGTTTTGGGACTCAGACTGGCTCTCCTTG
CTCTCAGCTTGCGGACAGTCTATTGTGGGACCTTGTGATTATGTAAGTTAGTACTTA
ATAAACATATATATGTATATACATTATATATATCTATATCTCCATCCTATTAGTTCTGT
CCCTCTAGAGAACCCTGACTAATACACCATATATACATAAAAAAGAGGATCCATTTAA
TTGAAGTCACCTCCCTCTCCAATCTAGGTGAGAACGAGGAAGTGTGTTAAAGTTAATG
ATTCCAAAAATCACTAATGCCATTTCTCAGTCTTAATGACAACAATAACAAAATCA
AGTTCTCAGTATTACATTTTCTTTCAAGGCAAAATCTTGTAATCAGAAGTAGAGTTG
ATTACGGTAGCATA TGTTTTAGGGGTTTTCAAGTTTAAGATGAATGAGTTTGCAATTA
TTTTTTAAGCACTTTGAACTTAAACAATTCTATGCTTGCCAGGCGCGGTGGTTCAC
GCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGACAGGCGGATCACCTGAGGTGAGGAG
TTCGAGACCAGCCTGGGCCAACATGACAAAACCTCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAA
TTAGTTGGGCATGGCGTCCGGCACCCGTAATCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAG
GAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCACTGC
ACTCCAGTCTGGGTGACAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAGAAAAAGAATTATA

-2333

Şekil 3.3. ING1 genine ait özendirici bölge dizini. NCBI Nucleotide (108)
veritabanından elde edilmiş ve 5000 nükleotid uzunluğundadır.

TGTTTCATCTCTTATATCTGACTCTCATAGGTTTGAGCATTTTTCAGTTAGACTGGAAATA
TAATTTTATAGAAAAAAGTTTAAATTTTAAATGTTTCTTTTAAATCCATTTGAAATTTCTGT
TCTACGGAAAAGTTTAAACATCCATTTTTCGCAACACGCCACAGGAAACAAAACCTGAA
AGAGACAAGATTCTTCAACGTATCTTCAAAATTAAAGCACCTTTCTTCAATGACATTTA
AAATTCGTTATCAAAGGTAATTATGTTTTATTGCTTGATCTTCTAAGTTTGTTCAAAA
AAGATAAAATCTTTTTTGACTTTTTATCCCAAGGGGTGGGCTAAAAGTTTATGGAAT
GTAAAGCTCCAAAAAATTTTCACTACTGTATCCCCAGCGCACGGACCAAGTAGTTGG
CACATGGTAGACACTCGTCAATATTCCTTGTTGAATGCTTAAGATGCCTTTTTGGTTTA
TGTGTATGTGAAGAGAGTACATAACTAGAGGAACAAATCATTACTCAGATTGTA
GTGTTGTGATTTTTTTTTTAAAAAGAAAACCTAGGTTAACTCCATCTTATCTTTGTA
AAGGGTAAATTACTTCCAATTTTATTCTTGAGTTCAGATAAACACTATTCATTCTAGA
GCCAATGAATGCTAGGAATAGAAGAACCGGTCTATTTCTTACTATTGTACTTTTAAAT
TACTTATATGCTTTTTGAGGGAAAGGCGTAATTTTCTTATTCAACTTTGTACTCCCTC
TATACTCTGTATTCGACATAATGTTTGTTTCCACATAATGTTATCTTGTCGTAGTCTTT
TTTTCTTTTTTTTTCCGAGATAGTCTTGCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCA
CAATCTCGGCTCACTGCAACCTCCCTCCTAGGTTCAAGTGATTCTGTCTCAGCCTCC
CCAATAGCTGGGACTACAGGCACGCGCCACCATGCCCTGCTAATTTTTTGTATTTTTA
GTAGAGACAGGGTTTACCATGTTGCCCAAGCTGGTCCCGAAGCTCCTGATCTCAGGC
AATTCGCCCGCTCGGCCTCCCAAGTGGTAGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCGTC
CGGCCAAGTGTTATAGTCTTTTGTGCAGACCAAGTAGTGCCAATAAATCTTGTAGAA
ACTAAAGTACTCATTGCTTTTAACTAGGCCAAGACTAGAAATAGCGTGATCTGTAAGT
AAAATAACAGCCATTTCCCAAAATATCAAAGCCAAAGCTCTCCTGCTGTGTAGGTGA
GATGAAGGGGCTTAAAGTGAAGATTAAATCCACTTCAAAGTGTAAGAGTATCCAT
CCATTTATCATTGCAGCAACGTTGCAACGTGAACAAATCCGATTCCAAAACAAAAACA
GCTTAATTACAGTCTCTTTGCCGTACTCACATCCATAGCACAAAATACCCGGCAGGGCC
CTGGAATGAGCACCCTGCGGTTAATAATCTACTCTATAAACTACTGGACGAATCCAA
ATTTTTACTGGATTACACAGAATACGTTTTTAAAAAATCCAAAGAGTTTTAGATGTTA
CAACAGGGTTCCATCAAATACCACGTTTCCAAATCTTACCACCAGAATGTGTATCCAT
TTCAACTGCAATTATTTGTGTCTAAACTGTGTACTCTGCTTTGCAACAGGATAAAC
CCGGTGGATAAAAGCTGAAATCCGACCTGTCTAATTAAGAGGCTAAGAAAAATGG
AGAACCGCGCTGGCGTGGAGTTGATACAGAAACACTGCAAGGGCTGGGGACAGGGC
TTAGTTCTGTGAATACACAGGCAGCACCAACCCCGGCTCTCCGGAAGAGAAAG
TCCAGTGAGAAAGGTGAAACTGACAAGGCACCGTTCTCCGACTTGCTGAAAAAAG
ACAATGCAATAGAGCAGGGTCCAAGGCGGAAGAAAATCAGAGAAAAGCAGGCAG
CCAAGCGTGGCGAACACAGCTCTCGGGGCCACCCCGGAGGGGACCCGCGGCGGCCG
CAGCGGGCGGAGGCCGAAGCCGAGGCCGCCCGGAACCAGAGAGCCAGGCGGGA
AGTGACAAAAGGCACGAGGCCACGCCAGGAGGGCGGGCCCTTTGGCCGGAAGGG
GGGGGGCCGGCGCGCGGGCCGGTGCCTAGGCAACGGGCTCGCGTGCGCTCCAGG
CTTCTCAGAAAGCCCAAATCCGGGAGCTTTGGGAGGGTAGAGGGGCGACGCGGGG
GAGGGCGGTCCGGGGAGCTGAATGGCTCAGGACGCCGGCCGACCGGGTGTCTGCAT
ACTGTGGCGGCCCTTCCAAGTGTGGGGAGCGG

Ekzon 1

Şekil 3.3. (Devamı). ING1 genine ait özendirici bölge dizini. NCBI Nucleotide (108) veritabanından elde edilmiş ve 5000 nükleotid uzunluğundadır.

3.8 Mutasyon Analizi

Mutasyon analizi deneyleri, hasta bireylerin tümör ve normal dokularından elde edilen DNA'lar kullanılarak yapılmıştır. ING1 geninin üç ekzonu tarafımızca tasarlanan primerler yardımıyla çoğaltılmış ve SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ve dizin analizi yöntemiyle mutasyon tayini amaçlanmıştır. Ekzon 1a iki çift primer, ekzon 1b 1 çift primer ve ekzon 2 ise üç çift primer yardımıyla çoğaltılmıştır. Bu amaçla kullanılan primer dizinleri, erime sıcaklıkları (T_m), bağlanma sıcaklıkları ve ürün büyüklükleri Tablo 3.11'de verilmektedir.

Tablo 3.11. ING1 geninin mutasyon analizi deneylerinde kullanılan primerlere ait bilgiler.

Primer Adı	Dizini (5'-3')	Primerin Erime Sıcaklığı (°C)	Primer çiftinin bağlanma sıcaklığı (°C)	Ürün Boy (bp)
E1b_1 Fw	GACCGCTATCCCCGAAAGTA	61.32	61.5	409
E1b_1 Rv	GGAGGAGAACCAACCACACC	61.74		
E1b_2 Fw	CCAGCCTTGGATTGGTTCTT	61.37	63.3	404
E1b_2 Rv	GTGGACGCAGCCCCAGTC	65.37		
E1a Fw	GTGGAGGAAGCGGAAAGC	60.89	56.6	363
E1a Rv	GGACCTTGGCGAATCAAAG	60.58		
E2_1 Fw	GCGAGTGACGCCTGTCCTTC	65.69	65.5	341
E2_1 Rv	CGCTTGCTGTTGGGCTTGTC	66.43		
E2_2 Fw	GCGACACAGCGGGCAACA	68.12	66.3	243
E2_2 Rv	CGGCAGGGGACGCCTCTC	68.94		
E2_3 Fw	GCCAAGACCTCCAAGAAGAAGA	62.10	62.5	341
E2_3 Rv	GGTTTATTTGTCCTCCTCACACC	62.08		

3.8.1 Polimeraz zincir tepkimesi

Polimeraz zincir tepkimesi Tablo 3.11'de gösterilen primerler kullanılarak Tablo 3.12'deki PCR karışımı ve Tablo 3.13'deki koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.12. ING1 geni ekzonlarının çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı.

Kimyasal Madde	Miktar (μ l)
Distile su	5.99
10x PCR tamponu	1.0
MgCl ₂	1.0
dNTP	0.8
Fw primer	0.08
Rv primer	0.08
Taq polimeraz	0.05
cDNA	1.0
Toplam Hacim	10.0

Tablo 3.13. ING1 geni ekzonlarının çoğaltıldığı PCR koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika
Denatürasyon	95 °C	30 saniye
Bağlanma	Tablo 3.11'deki değerler	45 saniye
Uzama	72 °C	30 saniye
	40 tekrar	
Son uzama	72 °C	2 dakika

3.8.2 Elde edilen ürünlerin SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) yöntemiyle taranması

Elektroforez “3.4.2. Denature poliakrilamid jel elektroforezi” başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Camların ve örneklerin hazırlanması denature jel dökmek için yapılan hazırlıkla birebir aynıdır. Ancak hazırlanan jel denature edici özelliğe sahip değildir. Jelin içeriği şu şekildedir:

Distile su	80 ml
10X TBE tamponu	6 ml
Akrilamid/ bisakrilamid karışımı (49:1, % 50'lik)	14 ml
APS	450 µl
TEMED	45 µl

3.8.3 Dizin analizi

Çalışmaya katılan hasta bireylerin normal ve tümörlü dokuları kullanılarak yapılan SSCP deneyleri neticesinde normal-tümör arasında farklılık gösteren örnekler seçilmiş ve mutasyonun tespiti amacıyla dizin analizi ile daha ileri araştırmaya tabi tutulmuştur. Öncelikle ilgili örneklerle ait PCR ürünlerine ExoSap ile aşağıdaki şekilde muamele edilmiştir:

5 µl PCR ürünü ile 2 µl ExoSap 0.2'lik tüpte birleştirilmiş ve PCR cihazına konularak 30 dakika 37 °C'de, 15 dakika 80 °C'de bekletilmiştir. Bu işlemi takiben ürünler dizin PCR'ı için kullanılmıştır. Tepkime karışımı Tablo 3.14'de, şartları ise Tablo 3.15'de görülmektedir.

Tablo 3.14. Dizin PCR'ı için kullanılan karışımın içeriği.

Kimyasal Madde	Miktar (µl)
Distile su	4
Tampon	2
Big Dye	1
Primer (Fw)	2
PCR ürünü	1
Toplam hacim	10

Tablo 3.15. Dizin PCR'ı için kullanılan koşullar.

Uygulanan Sıcaklık (°C)	Süre
96	1 dakika
96	10 saniye
50	5 saniye
60	4 dakika
25 döngü	
4	∞

Dizin PCR'ının ardından örnekler ABI 3130 dizin analiz cihazına yüklenerek farklılık gösteren örneklerle ait dizinler görüntülenmiştir. Bu yolla mutasyon tespiti amaçlanmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Hastalara Ait Patoloji Bulguları

Gaziantep Üniversitesi Patoloji AD’de yapılan incelemeler sonucunda hastaların mesane tümörlerinin derece ve aşamaları tespit edilmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibidir. Aşama, kanserleşmenin mesane yapısının hangi tabakalarını etkilediğini, derece ise bu tabakalarda ne kadar hasar verdiğini açıklamaktadır.

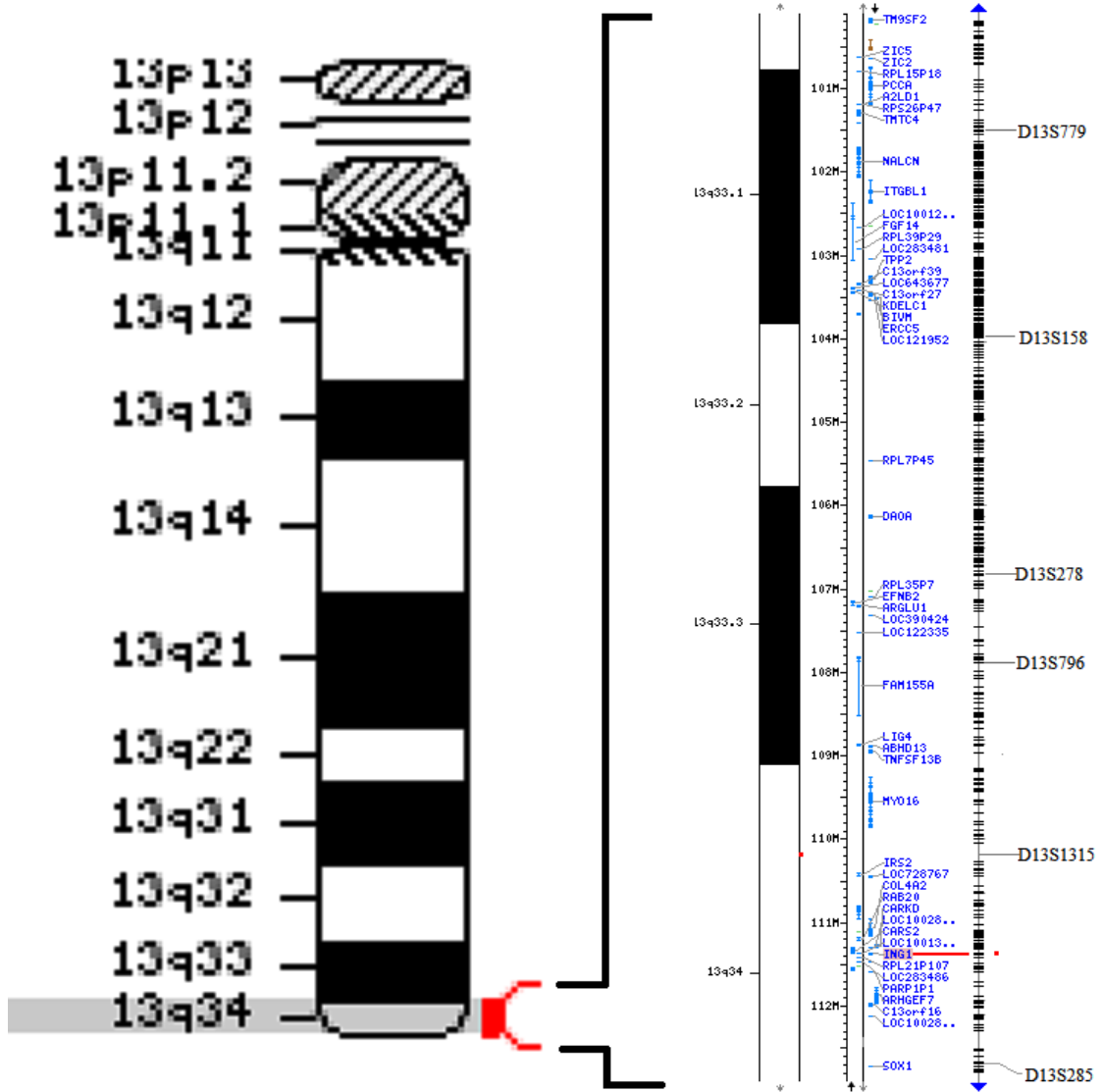
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan tümör örneklerine ait patolojik bulgular. Tümör aşama ve dereceleri görülmektedir.

HASTA NO	PATOLOJİK DURUM		HASTA NO	PATOLOJİK DURUM	
	DERECE	AŞAMA		DERECE	AŞAMA
1	DÜŞÜK	ÜROTELYAL	16	DÜŞÜK	ÜROTELYAL
2			17	YÜKSEK	ÜROTELYAL
3	YÜKSEK	ÜROTELYAL	18	DÜŞÜK	ÜROTELYAL
4	YÜKSEK	ÜROTELYAL, YAYILIMCI	19	DÜŞÜK	ÜROTELYAL
5	YÜKSEK	ÜROTELYAL, YAYILIMCI	20	DÜŞÜK	ÜROTELYAL
6			21		
7	YÜKSEK	ÜROTELYAL	22		
8	YÜKSEK	ÜROTELYAL, YAYILIMCI	23		
9	YÜKSEK	ÜROTELYAL, YAYILIMCI	24	YÜKSEK	ÜROTELYAL
10	YÜKSEK	ÜROTELYAL, YAYILIMCI	25		
11			26	YÜKSEK	ÜROTELYAL
12	YÜKSEK	ÜROTELYAL	27		ÜROTELYAL
13	YÜKSEK	ÜROTELYAL	28		
14		ÜROTELYAL	29	YÜKSEK	ÜROTELYAL
15	YÜKSEK	ÜROTELYAL, YAYILIMCI	30	YÜKSEK	ÜROTELYAL, YAYILIMCI

4.2 Heterozigotluk Kaybı

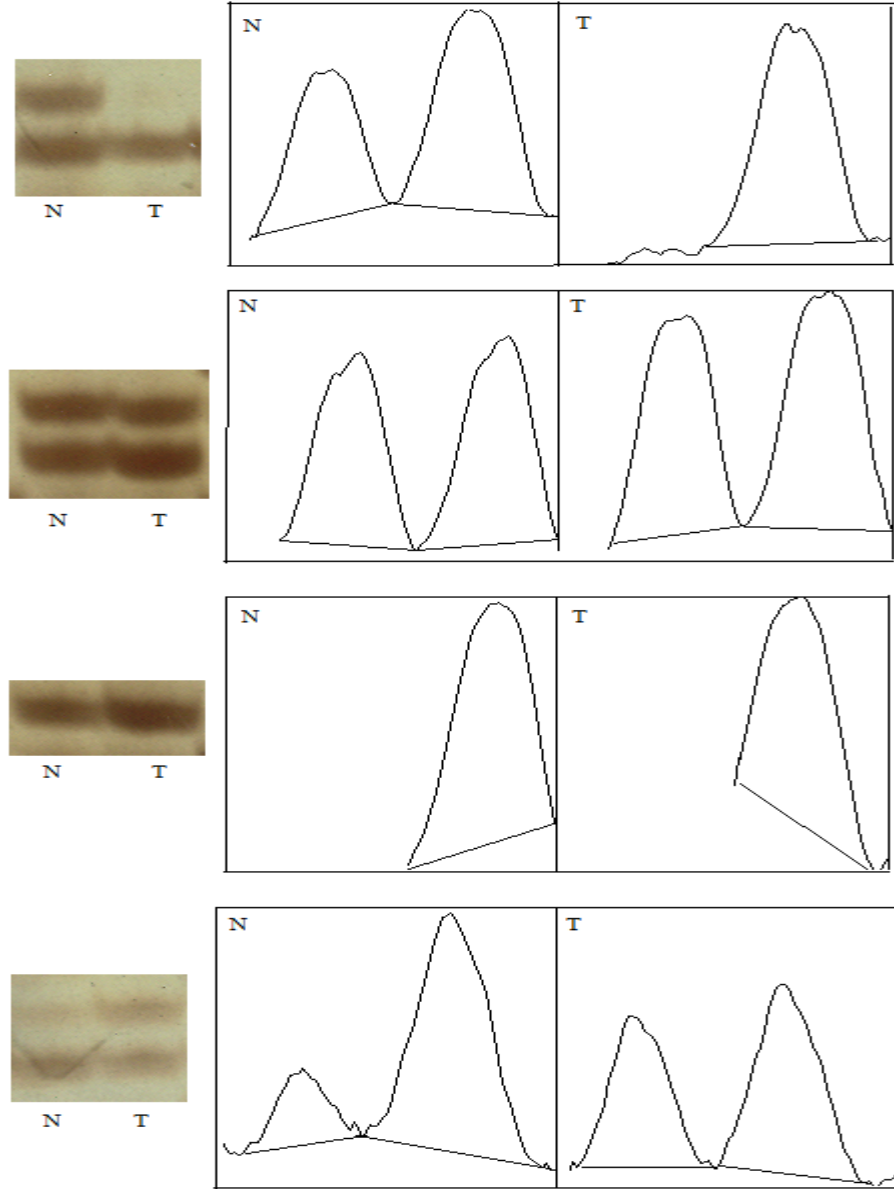
Hastalara ait DNA örnekleri 13q33-34 bölgesini kapsayan 6 adet DS belirleyici kullanılarak heterozigotluk kaybı yönünden incelenmiştir. Bu DS belirleyiciler sentromerden telomere doğru D13S779, D13S158, D13S278, D13S796, D13S1315, D13S285 olacak şekilde sıralanmaktadırlar. DS belirleyicilere ait kromozom haritası

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, ING1 geni D13S1315 ve D13S285 belirleyicilerinin tanımladığı bölgeler arasında yer almaktadır.



Şekil 4.1. D13S779, D13S158, D13S278, D13S796, D13S1315, D13S285 isimli DS belirleyicilere ait kromozomal harita. Kırmızı işaretli 13q33-34 bölgesinin büyütülmüş hali sağ tarafta görülmektedir. Bu bölgede yerleşik bulunan genler ve DS belirleyiciler beraber gösterilmiştir. ING1 geni yine kırmızı olarak işaretlenmiştir. Bu şekil NCBI Map Viewer veri tabanından alınmış parçaların birleştirilip düzenlenmesiyle oluşturulmuştur (109).

Deneysel işlemlerin sonucunda elde edilen denature poliakrilamid jel görüntüleri ImageJ isimli programda analiz edilmiş ve bulgular sayısal ve grafiksel olarak ifade edilebilmiştir. ImageJ programı ile elde edilen grafik değerleri Şekil 4.2’de örnek olarak gösterilmiştir.



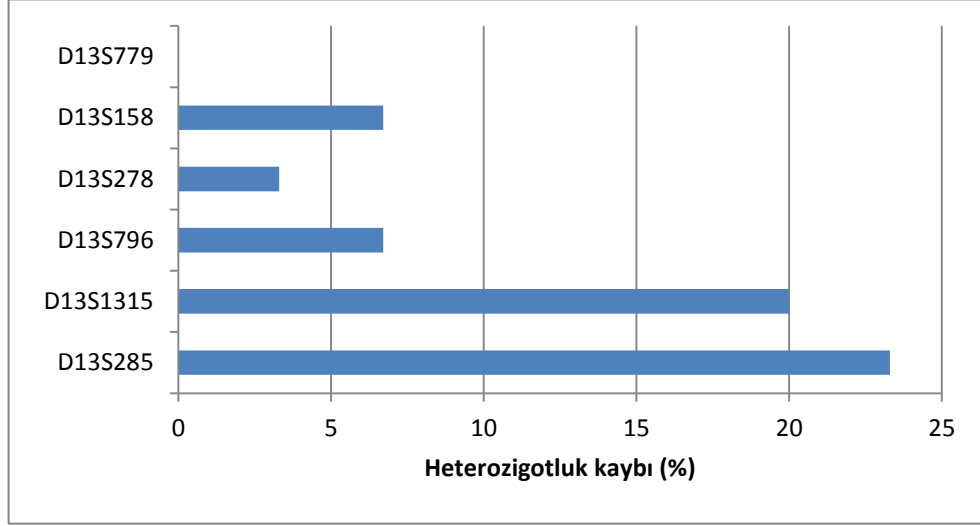
Şekil 4.2. Heterozigotluk kaybı analizleri sonucu elde edilen denatüre jel görüntüsünün ImageJ programı yardımıyla çizilen grafiksel görüntüsü. Pikler arasındaki uzunluk farkı açıkça görülmektedir.

Yapılan analizler sonucunda ilgili bölgede D13S779 isimli DS belirleyici ile hiç heterozigotluk kaybına rastlanmazken, D13S158 ile 2 hastada, D13S278 ile 1 hastada, D13S796 ile 2 hastada, D13S1315 ile 6 hastada ve D13S285 ile 7 hastada heterozigotluk kaybı gözlenmiştir. Yüzdelik olarak ifade ettiğimizde bu oranlar sırasıyla %0, %6.7, %3.3, %6.7, %20 ve %23.3'tür (Tablo 4.2, Şekil 4.3). En fazla heterozigotluk kaybı gösteren DS belirleyiciler ING1 genini çevreleyen D13S1315 ve D13S285'tir.

Tablo 4.2. Heterozigotluk kaybı analizleri sonucu elde edilen bulguların tablo gösterimi. Sol sütunda DS belirleyiciler, üst satırda hasta numaraları, sağ sütunda ise heterozigotluk kaybı yüzdeleri görülmektedir. Boş kutular heterozigotluğu, gri kutular bilgi vermeyen homozigot örnekleri, siyah kutular ise heterozigotluk kaybını göstermektedir.

Sentomer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	% HK
D13S779																															0
D13S158																															6,7
D13S278																															3,3
D13S796																															6,7
D13S1315																															20
D13S285																															23,3

Telomer



Şekil 4.3. Kullanılan DS belirleyicilerle elde edilen heterozigotluk kaybı yüzdelere ait grafik görünümü. Dikey ekseninde DS belirleyiciler, yatay ekseninde yüzdelik dilimler gösterilmiştir.

En fazla heterozigotluk kaybına rastlanan D13S1315 ve D13S285 DS belirleyicileri arasında yer alan genler; IRS2 (insulin receptor substrate 2), COL4A1 (collagen, type IV, alpha 1), COL4A2 (collagen, type IV, alpha 2), RAB20 (member RAS oncogene family), CARKD (carbohydrate kinase domain containing), CARS2 (cysteinyI-tRNA synthetase 2, mitochondrial), ING1 (inhibitor of growth family, member 1), RPL21P107 (ribosomal protein L21 pseudogene 107), ANKRD10 (ankyrin repeat domain 10), PARP1P1 [poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 pseudogene 1], ARFGEF7 [Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7], SOX1 [SRY (sex determining region Y)-box 1] olarak sıralanabilir (Tablo 4.3) (109).

Tablo 4.3. D13S1315 ve D13S285 isimli DS belirleyicilerinin arasında kalan genler ve açık isimleri (109).

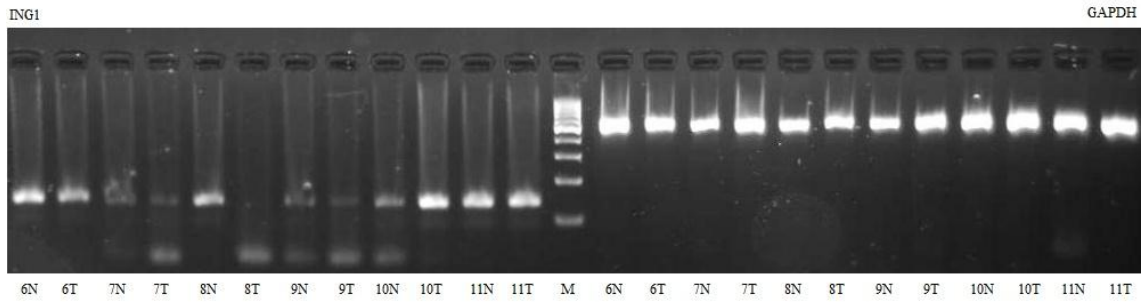
Başlangıç	Bitiş	Sembol	Yön	Açık İsim
110406184	110438914	IRS2	-	insulin receptor substrate 2
110434126	110460599	LOC728767	+	hypothetical LOC728767
110801310	110959496	COL4A1	-	collagen, type IV, alpha 1
110959631	111165374	COL4A2	+	collagen, type IV, alpha 2
111109000	111115441	LOC100129836	-	hypothetical protein LOC100129836
111175413	111214071	RAB20	-	RAB20, member RAS oncogene family
111268008	111292343	CARKD	+	carbohydrate kinase domain containing cysteinyI-tRNA synthetase 2,
111293759	111358463	CARS2	-	mitochondrial (putative)
111294579	111298625	LOC100289537	+	hypothetical protein LOC100289537
111362831	111365875	LOC100131435	-	hypothetical LOC100131435
111365083	111373421	ING1	+	inhibitor of growth family, member 1
111415003	111415525	RPL21P107	-	ribosomal protein L21 pseudogene 107
111462023	111465435	LOC283486	-	hypothetical protein LOC283486
111465811	111471491	LOC100129390	+	hypothetical LOC100129390
111520519	111522655	C13orf29	-	chromosome 13 open reading frame 29
111530887	111567416	ANKRD10	-	ankyrin repeat domain 10
111589050	111592578	PARP1P1	+	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 pseudogene 1
111767624	111958081	ARHGEF7	+	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7
111973015	111996594	C13orf16	+	chromosome 13 open reading frame 16
112111256	112112975	LOC100287321	+	hypothetical protein LOC100287321
112721913	112726020	SOX1	+	SRY (sex determining region Y)-box 1

4.3 Gen İfade Analizi Sonuçları

Gen ifade analizi deneyleri neticesinde 30 mesane kanseri hastasından 7'sinde ING1 geninin ifade seviyesinde değişiklik gözlenmiştir. ING1 ve GAPDH genlerinin ifadelerinin agaroz jel görüntüleri (Şekil 4.4). ImageJ isimli programda analiz edilmiş

ve sayısal değerler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ING1 geninin ifadesinin 7 hastanın tümör dokusunda azaldığını ortaya koymuştur.

Gen ifadesindeki bu değişiklik oransal olarak ifade edilirse $7/30 = \% 23,3$ sonucuna ulaşılmaktadır.



Şekil 4.4. Çalışmaya katılan hastalara ait ING1 geni ifade analizi jel görüntüsü. Sol tarafta ING1 geni, sağ tarafta aynı hastalara ait GAPDH geni, normal ve tümörlü dokular sıralı şekilde görülmektedir. GAPDH geninin ifadesi hiçbir normal ve tümörlü doku arasında farklılık göstermezken, ING1 geninde bantların değişik miktarlarda yoğunluğa sahip olduğu görülmektedir.

4.3.1 ING1 geni özendirici bölgesine ait bulgular

ING1 geninin özendirici bölgesi veya ING1 geninin ifadesini düzenleyen faktörler hakkında bilgi bulunmamaktadır. Buraya bağlanan transkripsiyon faktörlerini bulabilmek amacıyla ING1 genine ait 5000 nükleotid uzunluktaki özendirici bölge Genomatix-MatInspector ve TFSEARCH isimli programlarla incelenmiştir.

Analiz neticesinde ING1 özendirici bölgesinde bağlanma bölgesi bulunduğu tahmin edilen protein ve faktörler şunlardır: TEAF (TEA/ATTS DNA binding domain factors), BPTF (Bromodomain and PHD domain transcription factors), CABL (C-abl DNA binding sites), MEF2 (myocyte-specific enhancer binding factor), LEF1/TCF, FKHD (Fork head domain factors), HOXC (HOX - PBX complexes), SATB (Special AT-rich sequence binding protein), CDXF (Vertebrate caudal related homeodomain protein), LHXF (Lim homeodomain factors), OCT1 (Octamer binding protein), ABDB (Abdominal-B type homeodomain transcription factors), BRNF (Brn POU domain

factors), NKX6 (NK6 homeobox transcription factors), Cart-1 (cartilage homeoprotein 1), HOMF (Homeodomain transcription factors), KLFS (Krueppel like transcription factors), ATBF (AT-binding transcription factor), RUSH (SWI/SNF related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA binding motif), CEBP (Ccaat/Enhancer Binding Protein), PARF (PAR/bZIP family), ZFHX (Two-handed zinc finger homeodomain transcription factors), XBBF (X-box binding factors), MYT1 (MYT1 C2HC zinc finger protein), OVOL (OVO homolog-like transcription factors), HNF1 (Hepatic Nuclear Factor 1), PLZF (C2H2 zinc finger protein PLZF), MYBL (Cellular and viral myb-like transcriptional regulators), CREB (cAMP-responsive element binding proteins), SORY (SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors), CLOX (CLOX and CLOX homology (CDP) factors), HBOX (Homeobox transcription factors), BCDF (Bicoid-like homeodomain transcription factors), ARID (AT rich interactive domain factor), PAX2 (PAX-2 binding sites), HOXH (HOX - MEIS1 heterodimers), DMRT (DM domain-containing transcription factors), HAML (Human acute myelogenous leukemia factors), CAAT (CCAAT binding factors), RORA (v-ERB and RAR-related orphan receptor alpha), VTBP (Vertebrate TATA binding protein factor), STAT (Signal transducer and activator of transcription), PDX1 (Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor), GATA (GATA binding factors), EVI1 (EVI1-myleoid transforming protein), NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), HEAT (Heat shock factors), FAST (FAST-1 SMAD interacting proteins), CHRF (Cell cycle regulators: Cell cycle homology element), E2FF (E2F-myc activator/cell cycle regulator), CIZF (CAS interating zinc finger protein), HOXF (Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D), PAXH (PAX homeodomain binding sites), PIT1 (GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor), DLXF (Distal-less homeodomain transcription factors), MYOD (Myoblast determining factors), NEUR (NeuroD, Beta2, HLH domain), RBPF (RBPJ - kappa), STAF (Selenocysteine tRNA activating factor), GFI1 (Growth factor independence transcriptional repressor), HMTB (Human muscle-specific Mt binding site), AP1 (Activating protein 1), NF1F (Nuclear factor 1), RFF (Interferon regulatory factors), RXRF (RXR heterodimer binding sites), PCBE (PREB core-binding element), SRFF (Serum response element binding factor), PURA (Pur-alpha), CP2F (CP2-erythrocyte

Factor), BRAC (Brachyury gene, mesoderm developmental factor), SALL (Spalt-like transcription factors), VTBP (Vertebrate TATA binding protein factor), CHOP (C/EBP homologous protein), GLIF (GLI zinc finger family), IKRS (Ikaros zinc finger family), AHRR (AHR-arnt heterodimers and AHR-related factors), HESF (Vertebrate homologues of enhancer of split complex), SIXF (Sine oculis (SIX) homeodomain factors), AARF (AARE binding factors), RREB (Ras-responsive element binding protein), HAND (Twist subfamily of class B Bhlh transcription factors), HDGF (Hepatoma-derived growth factor), EBOX (E-box binding factors), BARB (Barbiturate-inducible element box from pro+eukaryotic genes), IRFF (Interferon regulatory factors), HZIP (Homeodomain-leucine zipper transcription factors), HIFF (Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family), BCL6 (POZ domain zinc finger expressed in B-Cells), P53 (p53 tumor suppressor), CHRE (Carbohydrate response elements), GCNR (Germ cell nuclear receptors), HDGF (Hepatoma-derived growth factor), SP1 (GC-Box factors SP1/GC), PCBE (PREB core-binding element), YBXF (Y-box binding transcription factors), NRSF (Neuron-restrictive silencer factor), MEF3 (MEF3 binding sites), CSEN (Calsenilin, presenilin binding protein, EF hand transcription factor), EREF (Estrogen response elements), INRE (Core promoter initiator elements), SF1F (Vertebrate steroidogenic factor), SNAP (snRNA-activating protein complex), TF3C (General transcription factor IIIC, GTF3C), PPAR (Peroxisome proliferator activated receptor homodimers), SNR2F (Nuclear receptor subfamily 2 factors), NOLF (Neuron-specific-olfactory factor), MTEN (Core promoter motif ten elements), GREF (Glucocorticoid responsive and related elements),MAZF (Myc associated zinc fingers), WHNF (Winged helix binding sites), MZF1 (Myeloid zinc finger 1 factors), TALE (TALE homeodomain class recognizing TG motifs), DMTF (Cyclin D binding myb-like transcription factor), RREB (Ras-responsive element binding protein), NFKB (Nuclear factor kappa B/c-rel), C-ETS (ETS oncogene).

Bu veriler elde edildikten sonra NCBI_OMIM (110) veritabanı kullanılarak ING1 geni ile işlevsel olarak en yakından ilişkili faktörler araştırıldı. Bu araştırma sonucunda ABL, E2F, HIF1, SOX, P53, BPTF, NRSF, c-Rel ve c-ETS öne çıkan faktörlerdir. Özendirici bölge üzerindeki bağlanma yerleri Şekil 4.5 ve 4.6’da gösterilmiştir.

-5000
CAGGAGACGTTCTCTGGTTTTTGTGGTTGTTTTAGTTTGCTTTGGTGTTTTATTA AAAAGCAAAG
BPTF
GTTTAAGTAGAGACAAACAAGTGTGTACCTAGAGTAGTTTCTCAATATCCTGGAGTCCAACCTCGC
AATTCTGTTTCAAGCTAACTGTAGTCTAATGTAATCTATTGCTAATTTAATAAGGTTAAAAATGTTA
GAATTAGGAGACCTATAGCCTACATCAATGCTAACC ACTCATGTTACCTAACTACTCTAAATTCTC
CTGAATATTATCACTTCTTGCCTGCCTTATGTTATTTTGTAAC TTTCAGTGCTGTGTGTATATTTAT
CTCCCTGAGTATCTTAAATTGTACATTATTTTGAAC TTCTACTGTGCCCTGC ACTAAATTCAGAAA
AGGACTTGGGTTTGTGGTTTGTGTTTGTCTGTTGGCTGGAAAAAAAATTTAGAAGAAATAAAAG
ABL E2F
GGCTTGTGAATGTTGATGAATTAATCCCTTACGAAAGGGATTAATTGTGCAGGTGGGAAGAAATC
TGGGTAGTAAATACCTGATAAAGCTGATTACAGATATTAGATGTGCCAGTAAATAAGCAAATTA
CAAAAAGCTCAGTTGCAATCTGTGAGAACAACGAATTC AAGGAAATAACTGGAGCAGAGATTCT
GAAAGCAGCTTAGTAACACTGAAGATCAAACTGACATGAATCTGGACATGCGGTATATTTGAAT
TGTTCATAGAACATCAAACTTTTAAATTAACAATAGTATCTTCTGTCTTCAGAAAATTCATGTAAT
GTTTTTAGCCCCCTCACTGGCAGTGATTCTATTATGTTTTCTTTT TTTTTTTTGGAGGCAGTCTTGCTCTG
TCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCCTGATCTGGGTTCACTGCAGCCTCTGCCTCTGGTTCAAGCA
ATCCTCCTGCTTCAGCCTCCACAGTAGCTGAGATTACAAGTGCACACCACCGTGCCAGCTAATTTT
TGCAATTTTATTTTATTTTATGTAATTTATTTTGTAGACAGAGTCTCACTCTATCACCCAGGCTGGA
GTGCAGTGGCAGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCAGATTCAAGTGATTCTTCTGCCTCA
GCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTGCGTGCCACCACGCTCAGCTAATTTTGTATTTTAGTAG
AGATGGGGTTTCATCATGTTGGCCAGGCTGGTCTGGGACTCTGGAACCTCTGACCTCAAGTGATCC
AGCCACCTCAGCCTCCCAAAGCGGTGGGAATACC GGCTAAGCCACCACACCTGGCCAATTCTCTT
TTCTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTGTAGATGGAGTTTCACTCTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAATGG
CGTGATCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCTTCTCACGTCTCCCGGTTCAAGCAATTCTCC
HIF1
TGCTTGCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCATGTGCCACCATGCCAGCTAATTTTGTATTTTA
GTACAGATGGGGTTTCTCCATGTTAGTCAAGGCTGGTCTTGAAC TCCCGACCCAGGTGATCCGCCC
ACCTCGGTCTCTGAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCGTGCCCGGAGCTAATTTCTGTTT
TCTTAAGGCTTTTGC GGATCATCAAAACAAGGAGAAACATAGCTCATTACCTAATGATGGTTAGAA
ATGTGATCTTTTGCATATTGAATATCTGCAGGTTGAATATTAAGGTAAAGTAAATAGACTGCTA
ATGCTCTTCACTATACCTCCCAGCCTACATCTTCTCCTGTGCTGGGTGCTTCTGCCCCTCGAAC
NRSF
ATCAGACTCCAAGTTCTTCAGTTTTGGGACTCAGACTGGCTCTCCTTGCTCCTCAGCTTGCGGACAG
TCTATTGTGGGACCTTGTGATTATGTAAGTTAGTACTTAATAAACATATATATGTATATACATTATA
TATATCTATATCTCCATCCTATTAGTTCTGTCCCTCTAGAGAACCCTGACTAATACACCATATATAC
ATAAAAAGAGGATCCATTAATTGAAGTCACTCCCTCTCCAATCTAGGTCAGAACGAGGAAGTGT
ESR
GTAAAGTTAATGATTCCAAAATATCACTAATGCCATTTCTCAGTCCTTAATGACAACAATAACAA

-2797

Şekil 4.5. Genomatix-MatInspector ve TFSEARCH programları yardımıyla ING1 geninin özendirici bölgesinde tespit edilen BPTF, ABL, E2F, HIF1, NRSF ve ESR proteinlerine ait bağlanma bölgeleri gösterilmiştir.

-1530

```
TTGTCGTAGTCTTTTTTCTCTTTTTTCCGGAGATAGTCTTGCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAG
TGGCACAATCTCGGCTCACTGCAACCTCCCCTCCTAGGTTCAAGTGATTCTGTCTCAGCCTCCCCAA
TAGCTGGGACTACAGGCACGCGCCACCATGCCCTGCTAAATTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGGT
TTCACCATGTTGCCAAGCTGGTCCCGAACTCCTGATCTCAGGCAATTCGCCGCCTCGGCCTCCCA
AAGTGGTAGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCGTCCGGCCAAGTGTATAGTCTTTTGTGCAGACCA
AGTAGTGGCCAATAAATCTTGTAAGAACTAAAGTACTCATTTGCTTTTAACTAGGCCAAGACTAGA
ATAGCGTGATCTGTAAGTAAAATAACAGCCATTTCCCCAAATATCAAAGCCAAAGCTCTCCTGCTG
TGTAGGTGAGATGAAGGGGCTTAAAAGTGAAGATTAAATCCACTTCAAAGTGTAAGAGATATCCA
CARP
TCCATTTATCATTGCAGCAACGTTGC AACGTGAACAATCCGATTCCAAATACAAAACAGCTTAATT
SOX
CAGTCTCTTTGCCGTACTCACATCCATAGCACAAAATACCCGGCAGGGCCCTGGAATGAGCACAC
TGCGGTTAATAATCTACTCTATAAATACTGGACGAATCCAAATTTTACTGGATTACACAGAATAC
GTTTTTAAAAAATCCAAAGAGTTT TAGATGTTACAACAGGGTTCCATCAAAATACCACGTTTCCAAA
TCTTACCACCAGAATGTGTATCCATTTCAACTGCAATTATTTGTGTCTAAAACGTGTACTCTGCTT
TGCAACAGGATAAAACCCGGTGGATAAAAAGCTGAAATCCGACCCTGTCCTAATTAAGAGGCTAAGA
AAAATGGAGAACC GCGCTGGCGTGAGTTGATACAGAAACACTGCAAGGGCTGGGGACAGGGCTT
AGTTCGTGGAATACACAGGCAGCACCAACCCGGCTCTCCGGAAGAGAAAGTCCAGTGAGA
AAGGTGAAAAC TGACAAGGCACC GTTCTCCGACTTGCTGAAAAAAGACAATGCAAATAGAGCAG
GGTCCAAGGCGGAAGAAAATCAGAGAAAAGCAGGCAGCCAAGCGTGCGAACACAGCTCTCGGG
GCCACCCCGGAGGGGACCCGCGGC GGCCGCAGCGGGGCGGAGGCCGAAGCCGAGGCCGCCCGG
AACCAGAGAGCCAGGCGGGAAGTGCACAAAGGCACGAGGCCACGCCAGGAGGGGCGGGCCCTT
c-ETS
TGCCGGAAGGGGGGGGCCGGCGCGCGGGGCCGGTGCCTAGGCAACGGGCTCGCGTGCGGTCC
c-ETS
AGGCTTCTCAGAAAGCCCCAAAATCCGGGAGCTTTGGGAGGGTAGAGGGGCGACGCGGGGGAGGGC
GGTCCGGGGAGCTGAATGGCTCAGGACGCCGGCCGACC GGGTGTCTGCATACTGTGGGCGGCCTT
TCCAAGTGTTGGGAGCGG ➡ c-Rel
EKZON 1
```

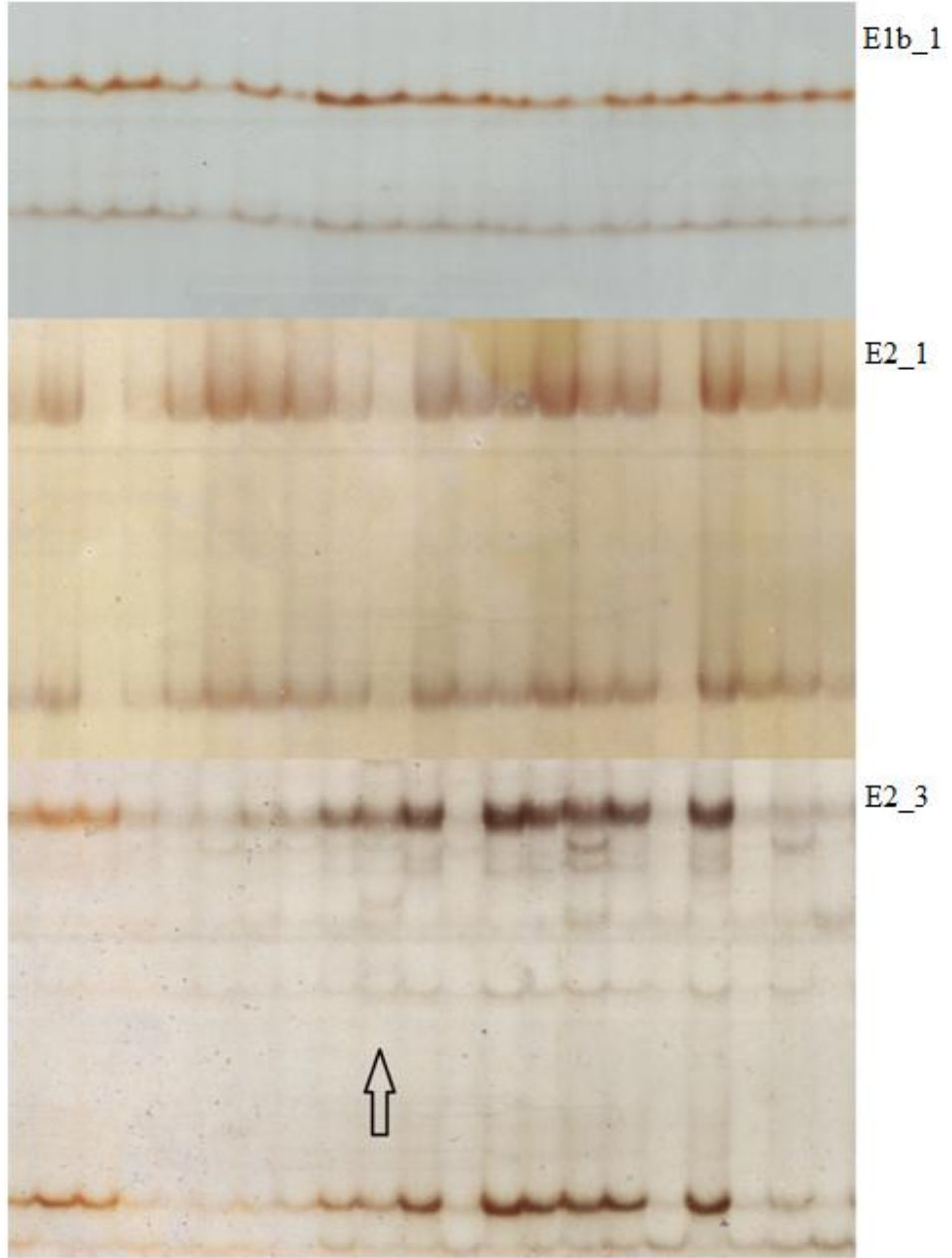
Şekil 4.6. Genomatix-MatInspector ve TFSEARCH programları yardımıyla ING1 geninin özendirici bölgesinde tespit edilen CARP, SOX, c-ETS ve c-Rel proteinlerine ait bağlanma bölgeleri gösterilmiştir.

4.4 Mutasyon Analizi

4.4.1 SSCP sonuçlarının değerlendirilmesi

ING1 geninin kodlanan kısmı ekzon 1a, ekzon 1b ve ekzon 2 olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır. Tarafımızca tasarlanan primerler kullanılarak bu bölgeler çoğaltılmış ve SSCP ile analiz edilmiştir. Farklılık gösteren örnekler dizin analizine tabi tutulmuştur. SSCP deneyleri DNA örnekleri kullanılarak yapılmıştır. SSCP sonucunda ekzon 1a ve

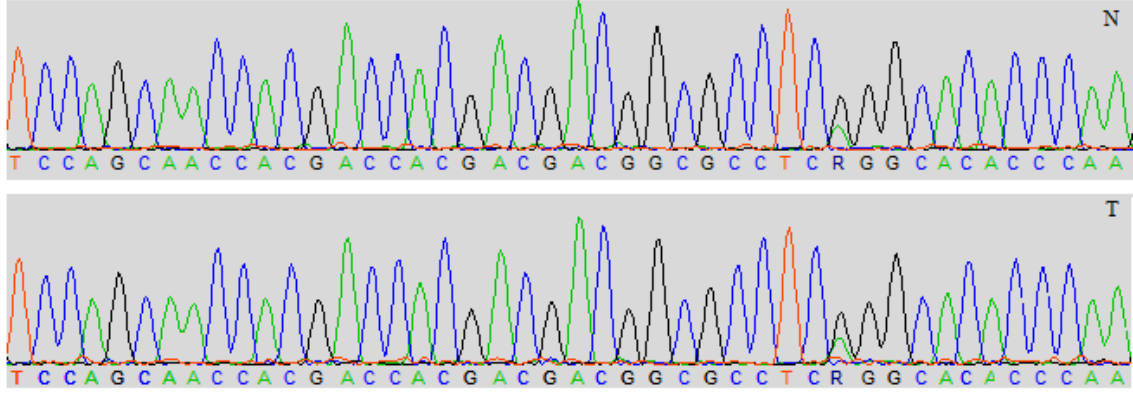
1b'de farklılık bulunmazken, ekzon 2'nin 2. ve 3. bölgelerinde çeşitli bantlar görülmüştür (Şekil 4.7). Bu bantlar dizin analizi yapmak üzere hazırlanmıştır.



Şekil 4.7. Ekzon 1b_1, ekzon 2_1 ve ekzon 2_3'e ait SSCP jel görüntüleri. Ekzon 2'nin üçüncü bölgesinde (E2_3) okla gösterilen örnekte değişik bir bant görülmektedir.

4.4.2 Dizin Analizi Sonuçları

SSCP sonucunda Ekzon 2_2 ve Ekzon 2_3 bölgelerinde farklılık gösteren bantlar tespit edilmiş ve ait olduğu hastanın normal ve tümörlü doku örneklerinin ilgili kısımlarının dizinleri çıkarılmıştır. Ancak bu bölgeler içerisinde dizin analizi ile mutasyon tespit edilememiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. ING1 geninin 2 numaralı ekzonunun bir kısmına ait dizin analizi görüntüsü. Herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.

5 TARTIŞMA

Kanser tüm dünya genelinde 1/8 oranında ölüme sebebiyet vermektedir (1). Amerika Birleşik Devletlerinde ise toplam ölümlerin %25'inden sorumludur (2). Ülkemizde en sık görülen ilk beş kanser, akciğer, prostat, mesane, kolorektal ve mide kanserleri olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.1) (3).

ING ailesine mensup genlerin yapılan çeşitli kanser çalışmalarında tümör baskılayıcı gen olarak rol oynadıkları ortaya çıkarılmıştır (12-16).

Mesane kanseri gelişiminde meydana gelen gen ifadesi değişikliklerini gözlemek amacıyla, gen ifade seviyeleri kıyaslanarak yapılan bir araştırmada sitokeratin 20, nöropilin-2, p21 ve p33ING1 genlerinin ifade seviyelerinin patolojik safha, tümör derecesi ve değişen retinoblastoma gen ifadesi ile önemli derecede ilişkili olduğu görülmüştür (10). Ayrıca, p33ING1 gen ifade seviyesinin hayatta kalma ile de ilişkili olduğu gözlenmiştir (10). Bu çalışma (10) mesane kanserlerinde ING1 geni ile ilişki ortaya koyan tek araştırmadır. Ancak gen üzerinde bizim yaptığımız gibi detaylı moleküler analizler yapılmamıştır.

Bu çalışmada tümör baskılayıcı gen olduğu, yukarıda bahsedildiği üzere, bilinmekte olan ING1 geninin ve bulunduğu 13q33-34 kromozomal bölgesinin moleküler teknikler kullanılarak incelenmesi; 13q33-34 bölgesinde yer alan ING1 ve komşu genlerinin mesane kanseri oluşumuyla ilişkili birer tümör baskılayıcı gen olup olmadıkları ve ING1 geninin mutasyonları araştırılmıştır.

Knudson'un 1971 yılında retinoblastom ile yaptığı istatistiksel çalışma sonucu ortaya koyduğu "iki vuruş" hipotezi bugün kanserin moleküler genetiği çalışmalarında önemli bir yere sahiptir (11). Bu hipotez kanserin meydana gelebilmesi için iki mutasyonun meydana gelmesi gerektiğine işaret eder. İlk mutasyon ilgili tümör baskılayıcı genin bir kopyasının kaybolması (delesyon), ikinci mutasyon ise diğer sağlam kopyanın mutasyona uğraması veya onkogenlerden herhangi birinin bir allelinde mutasyon meydana gelmesi şeklinde açıklanabilir. Bu çalışmada elde edilen bulgular 13q33-34

bölgesinde D13S1315 ve D13S285 isimli DS belirleyiciler ile taranan bölgenin heterozigotluk kaybı gösterdiği yönündedir. Bu durumda bir tümör baskılayıcı gen olarak bilinen ING1 geni ve komşu genlerin delesyona uğradığı düşüncesi kuvvet kazanmıştır. Fakat mesane kanseri ve ING1 geni arasında doğrudan bir bağlantı kurabilmek için bu bulgu yeterli değildir. ING1 geninin mRNA ifadesinin araştırıldığı gen ifade analizi sonuçlarının da heterozigotluk kaybı sonuçları ile paralellik göstermesi gerekir. Bunun yanı sıra ING1 geninde mutasyon da gözlemlendiği takdirde mesane kanseri oluşumundan ING1 geni sorumlu tutulabilir. Ancak ING1 geninin ifade analizi çalışması ile % 23.3 oranında ifadesinde değişiklik olduğu ve ING1 genine ait 1a, 1b ve 2 numaralı üç ekzonun 6 çift primer takımı ile yapılan SSCP ve dizin analiz deneyleri neticesinde mutasyon taşımadığı görülmüştür.

ING1 gen ifadesinin incelenmesiyle elde edilen % 23.3 gibi düşük bir oranda gen ifadesindeki değişiklik ve ING1 geninde mutasyona rastlamamış olmamız ING1 geninin mesane kanserlerinde önemli bir tümör baskılayıcı gen olmadığını düşündürmektedir.

Bildiğimiz kadarıyla ING1 geninde mutasyon tanımlayan ilk çalışma Gündüz ve ark (12) tarafından yapılmıştır. Toyama ve ark tarafından 1999 yılında meme kanseri, yumurtalık kanseri ve hücre hatlarından oluşan toplam 452 adet örnek üzerinde yapılan geniş çaplı bir çalışmada hiçbir örnekte ING1 mutasyonu bulunmamıştır (111). Bu nedenle Gündüz ve ark (12) ING1 gen mutasyonların yalnızca baş-boyun kanserlerine özgü olabileceği yorumunu çıkarmışlardır. Mesane kanserlerinde de ING1 geninde mutasyon bulunmadığı bu çalışmada sunulan sonuçlardan anlaşılmaktadır.

ING1 geni aday bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlandıktan sonra pek çok çalışma ile insan kanserlerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Hem tümör örnekleriyle hem de kanser hücreleriyle yapılan bu çalışmalar, mide, meme, özafagus, akciğer, kan ve beyin gibi kanser tiplerinde ING1 gen ifadesinin azaldığını veya kaybolduğunu göstermiştir (57). ING1 proteininin sentezindeki azalma ve kaybolmanın sebebi, doğal olarak, mRNA ifadesindeki azalması ve yanı sıra mRNA'nın kararlılığının bozulması anlaşılır. ING1 geninin NLS veya PHD bölgelerinde gelişebilecek bir mutasyon ING1 proteininin işlevini doğrudan doğruya etkiler, çoğu zaman da gelişen kanserle bu

bölgelerden herhangi birisinde oluşan mutasyon arasında ilişki vardır (57). Meme ve beyin tümörlerinde, melanomada ve lenfoblastik lösemide, NLS veya PHD bölgelerinde olan mutasyona bağlı olarak, ING1 proteininin hücrede yanlış yerleştiği (mislocalization) çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (102, 112-114). ING1 proteini normal şartlarda çekirdekte yerleşiktir (17). ING1'in hücresel yanlış yerleşimi, genin NLS bölgesinde olabilecek bir mutasyonla ilgili olup bu durumda ING1 proteini çekirdeğe göç edeceği yerde sitoplazmada yığılır. Bu halde ING1'in toksik etkisinin de dikkate alınması ve yığılımın hücre fizyolojisine etkisinin açıklığa kavuşturulması gereği ortaya çıkmaktadır. ING1 proteininin sitoplazmada yerleşmesine sebep olan mekanizmalar büyük olasılıkla ING1'in birlikte çalıştığı proteinleri de etkileyecektir. Bu konuda yapılmış bir çalışmada, hatalı yerleşimin ING1 proteininin siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21^{Waf1}'in ifadesinin düzenlenmesi gibi bazı görevlerini yerine getirememesine neden olduğu gözlenmiştir (115). Ancak ING1 geninde mutasyon nadiren ortaya çıkan bir durumdur (17). Bu nedenle ING1'in etkinliğini yitirmesinde ING1 mutasyonunun ana mekanizma olmadığı düşünülebilir.

ING1 gen ifadesinin azaldığı veya kaybolduğu görülmüş tümörlerde çeşitli diğer mekanizmalar tanımlanmıştır. Baş boyun kanserleri (12) ve özafagal skamoz karsinomlarda (116) yapılan çalışmalar vakaların %50'sinden fazlasında ING1 bölgesinde heterozigotluk kaybını ortaya çıkarmıştır. Yumurtalık kanserlerinde ise vakaların %25'inde ING1 geni özendirici bölgesinde (promoter) hipermetilasyon tespit edilmiştir (117). DNA metilasyonu, genin özendirici bölgesindeki CpG adaları denilen sitozin-guanin dinükleotidlerince zengin olan bölgelerde meydana gelen kimyasal bir olaydır (118). Metilasyonun azalması sessiz durumdaki proto-onkogenlerin veya atasal veya anasal yolla etkinleştirilmiş (imprinted) genlerin etkin hale geçerek sentez yapabilmelerine ve hücre çoğalmasını uyarımlarına izin verebilir (118). Tam tersine; tümör baskılayıcı genlerin özendirici bölgelerindeki metilasyonun artması ise transkripsiyonun engellenmesi nedeniyle sessizleşmelerine ve hücrenin çoğalması üzerindeki negatif etkinin, baskının ortadan kalkmasına neden olur (118). ING1 geni özendirici bölgesi CpG dinükleotidlerince zengin bir bölgedir (12). Özendirici bölge CpG metilasyonu over kanserlerinde sıklıkla görülmektedir (119-121). Bu durumda

özendirici bölge metilasyonlarının tümör baskılayıcı genlerin etkinliğini yitirmesinde önemli bir olay olduğu dikkat çekmektedir. ING1 geni özendirici bölge metilasyonlarının insan kanserlerinde araştırılması gerekmektedir.

Bir başka önemli nokta ise tümör baskılayıcı genlerde de *haploinsufficiency* veya allel yetersizliğinin olabileceğidir. İki ayrı çalışmada *transforming growth factor-b1* ve mürin geni *p27^{Kip1}*, de allel yetersizliği tespit edilmiştir (122,123). Bir allelin kayıp olduğu düşünülürse sağlam allel herhangi bir karsinojene maruz kaldığında, haploid yetersizlik nedeniyle tümöre yatkın bir fenotipe dönüşür (12). Sigara, mesane kanseri oluşumunda etkin (9), toplumumuzda sıklıkla tüketilen bir karsinojendir. Bu konuda, daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

ING1 gen ifadesindeki azalmayı açıklayabilmek için bilinen bazı mekanizmaların da açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Özendirici bölgedeki kromatin yeniden biçimlendirilmesi (chromatin remodeling), ING1 gen ifadesinden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin etkinliğinin kaybı ve miRNA ifadesi gibi potansiyel mekanizmalar üzerinde yapılmış bir çalışma yoktur. Bu konuların çalışılması ile, yüksek oranda heterozigotluk kaybı gösteren ING1 geninde nadiren mutasyon gözlenmesi açıklanabilir. ING genlerinin etkinliğini kaybetmesine yol açan mekanizmaların anlaşılması, ING genlerinin ifadelerinin yeniden sağlanması yönünde çalışmalara yön verecek olması, dolayısıyla; tedaviye yönelik amaçlarla kullanılabileceği için önemlidir.

ING genlerinin ifade kaybında özendirici bölgelerine bağlanan proteinler, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri veya transkriptozomun herhangi bir protein alt ünitesinde veya genin özendirici bölgesinin artırıcı (enhancer) bölgesinde oluşan mutasyon nedeniyle de ING genlerinin ifadesinde azalma görülebilir. ING1 geni özendirici bölgesinde meydana gelmiş herhangi bir mutasyon transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına ve transkripsiyonun gerçekleşmesine engel olabilir. Dolayısıyla ING1 gen ifadesinin azalmasına sebep olabilir. ING1 geninin özendirici bölgesi, buraya bağlanan transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici moleküller hakkında bilgi bulunmamaktadır. İnternet üzerinden erişilebilen Genomatix-MatInspector (106) ve TFSEARCH ver.1.3 (107) isimli programlar herhangi bir özendirici bölge üzerinde

yer alan transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgelerini tahmin edebilmektedir. Genomatix-MatInspector ve TFSEARCH programlarını kullanarak ING1 geninin özendirici bölgesini analiz ettik. Analiz neticesinde ortaya çıkan moleküller çok sayıda olup “5.3.1.ING1 geni özendirici bölgesine ait bulgular” başlığı altında detaylı biçimde sıralanmıştır. Bu faktörler tahmine dayalı olarak elde edildiği için, aralarında kanserle ve ING işlevi ile ilişkili olabilecek olanlar NCBI_OMIM (110) veri tabanı kullanılarak ayıklanmıştır ve burada tartışılacaktır (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Bunlar arasında ABL, E2F, HIF1, SOX, P53, BPTF, NRSF, c-Rel ve c-ETS’nin işlevsel özellikleri nedeniyle kanser oluşumuyla yakından ilişkili oldukları araştırma neticesinde görülmüştür.

ABL1 protoonkogeni sitoplazma ve çekirdekte görev alan, hücre farklılaşması, bölünmesi, hücreler arası yapışma ve stres cevabında rol alan tirozin kinazı kodlamaktadır (124). ABL’nin DNA’ya bağlanma etkinliği CDC2-aracılı fosforilasyon ile düzenlenmektedir (125). Çekirdeksel ABL’nin tirozin kinaz etkinliğinin hücre döngüsü sırasında retinoblastoma proteini ile özgün bir etkileşim sonucu düzenlendiği gösterilmiştir (126). Çekirdeksel ABL tirozin kinaz transkripsiyonu artırabilmektedir ve bu etkinliği RB tarafından engellenmektedir. Dolayısıyla çekirdeksel ABL transkripsiyonunun düzenlenmesinde doğrudan rol alan bir S fazı tirozin kinazıdır. Transkripsiyonunu düzenlediği genler arasında ING1 geninin de olduğu ING1 geni özendirici bölgesinin ABL bağlanma bölgesini içermesinden anlaşılmaktadır.

Genomatix ve TFSEARCH programlarınca ING1 geni özendirici bölgesinin içerdiği bağlanma nükleotid dizileri bir diğer transkripsiyon faktörü olan E2F ile ilgilidir. E2F transkripsiyon faktörü; hamarat (housekeeping) genler denilen sınıf II genlerin mRNA’larının ifadelerinde önemlidir (127). Aynı ayrı yapılan iki çalışmada (128,129) E2F1’in RB ile birlikte E2F DNA tanıma dizinlerine bağlandığı ve gen etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörü E2F memeli hücre döngüsü esnasında G1/S geçişinde önemli bir belirleyici olarak, DNA replikasyonu için gerekli olan bir kısım genlerin transkripsiyonunu etkinleştirerek rol oynamaktadır (130). Halbuki, RB hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişini engellemektedir (130). RB çok sayıda hücre proteinle etkileşime girer, ancak; bu etkileşimlerin doğası ve hücre döngüsünün düzenlenmesindeki önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Phillips ve ark (131) E2F1’in

ölüm reseptörüne bağımlı bir mekanizmayla, TRAF2 proteininin gen ifadesini azaltarak ve NFkB gibi antiapoptotik uyarıların etkinliğini engelleyerek apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir. Bu yolla p53'ten bağımsız olarak E2F1 gen ifadesi hücrelerin apoptoza karşı hassaslaşmalarına yol açar (131). İnsan tümörlerinin pek çoğunda E2F1'in düzenlenmesi ile ilgili sorunlar gözlenmiştir. RB, kanser hücrelerinde, E2F-bağımlı özendirici bölgelerin etkinliğinde artışa sebep olmaktadır (132). Dolayısıyla; E2F'nin ING1 geni üzerindeki bu yöllu bir etkisinin, ING1 geni özendirici bölgesinde E2F bağlanma dizini üzerinde meydana gelmiş herhangi bir mutasyon ile engeleniyor olduğu düşünülebilir.

SRY ve SOX proteinleri HMG kutusu olarak bilinen, 79 amino asitten oluşan, DNA bağlanma bölgesine sahiptirler (133). Tüm SOX proteinleri HMG kutusu ile doğrusal DNA'ya dizine özgün biçimde bağlanır ve DNA'nın geniş açılarla bükülmesine neden olur (133). Bükülme belli bir mesafede DNA sarmalının açılmasına ve SOX1, SOX2 ve SOX3 gibi SRY ile çok yakın homoloji gösteren transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanarak etkileşimine yol açar (133). SOX proteinlerinin, farelerde, esas olarak gelişmekte olan sinir sisteminde ifade edildiği gösterilmiştir (133). Bu genler evrimsel süreçte ciddi biçimde korunmuştur. SOX1 geni ileride de tartışıldığı gibi heterozigotluk kaybının yüksek oranda gözleendiği bölge içerisinde kalmaktadır. Dolayısıyla çalışmamız sonucunda aday bir tümör baskılayıcı gen olarak ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda ING1 geni özendirici bölgesinde bağlanma dizininin yer alması, mesane kanserlerinde, SOX1 geninin irdelenmesi gerektiği düşüncemizi kuvvetlendirmektedir.

Genomatix ve TFSEARCH programlarıyla tespit edilen bir diğer transkripsiyon faktörü BPTF'dir (bromodomain and PHD domain transcription factor). Kromatinin değişik bölgelerinde tek çift veya üç metilli durumda histon lizinleri yer almaktadır (134). Bunlar heterokromatin oluşumu, X kromozomu inaktivasyonu ve transkripsiyonel düzenlenme gibi özelleşmiş biyolojik işlevler için işaret görevi görürler (134). H3K4me3 (üç metilli (trimethylated) histon H3/lizin-4) etkin genlerin transkripsiyon başlama bölgeleri ile ilişki içindedir (134). Nükleozomu yeniden biçimlendirme faktörünün [nucleosome remodeling factor (NURF)] bitki *homeodomain* parmak (PHD finger) yapısı üç metilli (trimethylated) histon H3/lizin-4 kuyruklarıyla doğrudan

ilişkiye girmektedir (135). BPTF proteini NURF oluşumunun en büyük alt ünitesidir (134). Üç metilli H3K4 PHD parmak yapısının yüzeyindeki antiparalel beta yaprak oluşumu üzerinden ilişki kurar (134). PHD parmak çok sayıda kromatin ilişkili proteinde yer alan kromatin bağlanma birimi olarak çalışmaktadır (134). ING genleri de PHD bölgesi içerirler ve histon asetilasyonu ve deasetilasyonu üzerinde rol sahibidirler (99). ING1 geninin yine bir PHD proteini tarafından uyarılıyor olması kromatin yeniden düzenlenmesinin zengin ve karmaşık bir olay olduğuna işaret ediyor olabilir.

HIF1 (Hypoxia-inducible factor-1) memeli hücrelerinde oksijen azlığı durumunda sentezlenen ve hipoksiye karşı hücrel ve sistemik homeostatik cevap verilmesinde önemli role sahip bir transkripsiyon faktörüdür (136). HIF1 120-kD HIF1-alfa alt ünitesi ile 91-94 kD HIF1-beta alt ünitesinin birleşmesinden oluşur (136). HIF1 enerji metabolizması, damar oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi hücrel olaylarda rol alan genlerin düzenlenmesinde görev alarak hipoksiye karşı hücrel cevapta anahtar bir rol oynamaktadır (136). HIF1'in alfa alt ünitesi normal koşullarda proteozomca parçalanırken oksijen yetersizliğinde kararlı haldedir (136). Özer ve ark (137) hipoksik şartlarda ING4'ün HIF'in hedef genlerinin gen ifadesini baskıladığını göstermişlerdir. ING4, HPH2 [HIF-prolyl hydroxylase 2, (EGLN1)] ile doğrudan ilişki kurmaktadır (137). HPH2, HIF'in kararlılığından sorumlu aracıdır (137). ING4 ile HPH2 arasındaki ilişki hidroksilazın etkinliğini veya HIF'in kararlılığını etkilemez, ancak; HIF'in etkinliğini kromatinin durumuna bağımlı bir biçimde baskılar (137). HIF geni, ING1 özendirici bölgesine bağlandığını tahmin ettiğimiz genler arasında, ING ailesiyle, Özer ve ark (137) yaptığı çalışma ile arasındaki ilişki kanıtlanmış bir gendir. Bu sonuç Genomatix ve TFSEARCH programlarının güvenilirliğine de işaret etmektedir.

Transkripsiyon faktörleri arasında c-Ets ve c-Rel işlevsel özellikleri nedeniyle dikkat çekicidir. ETS transkripsiyon faktörleri; kök hücre gelişimi, hücre yaşlanması ve ölümü ve tümör oluşumunda rol alan pek çok genin düzenlenmesinde görev almaktadır (138). Bu proteinlerdeki korunmuş ETS bölgeleri sarmal-dönüş-sarmal DNA bağlanma bölgeleri olup hedef gendeki GGAA/T uyum dizisini tanımaktadır (138). Bu dizi ING1 özendirici bölgesinin -206/ -209 ve -258/ -261 aralıklarında tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

c-Rel, REL geni tarafından kodlanan, Rel/NFkB ailesine mensup bir transkripsiyon faktörüdür (139). Bu aileye üye proteinler “Rel bölgesi” denilen yüksek derecede korunmuş N uçları ile DNA’ya bağlanma, dimerleşme, çekirdekte yerleşim (nuclear localization) ve NFkB inhibitörüne bağlanma gibi işlevlerden sorumludur (139). Romieu-Mourez ve ark. (140) solid ve hematolojik kanser gelişiminde c-Rel geninde amplifikasyon, yeniden düzenlenme ve aşırı gen ifadesi gözlemlemişlerdir. Genomatix-MatInspector ve TFSEARCH programları yardımıyla -17/-25 aralığında c-Rel bağlanma bölgesi tespit edilmiştir (Şekil 5.1). ING1 proteininin yukarıda da bahsedildiği üzere, NLS bölgesinde olan mutasyon(lar) sebebiyle, hücresel yanlış yerleşiminin gözlemlendiği çalışmalar mevcuttur (102,112-114). Her ne kadar hücresel yanlış yerleşimden ING geninin NLS bölgesi sorumlu görünse de farklı mekanizmaların da NLS’de meydana gelmiş bir mutasyonun etkilerine katkı sağladığı düşünülebilir. ING geninin sitoplazmik artışı bu durumda yine gözlemlenebilir.

REST (RE1-silencing transcription factor) gen ifadesini düzenleyen transkripsiyonel bir baskılayıcıdır (141). REST, hedef gende 21 baz çiftinden oluşan baskılayıcı element-1 (RE-1, repressor element-1) bölgesine bağlanır (141). REST çeşitli kromatin düzenleyen enzimlerin orta göbeğinde yer alarak gen baskılanmasına aracılık etmektedirler (141). ING1 geni kromatinin yeniden biçimlendirilmesinde görev almaktadır (99). HAT proteinleri histonları asetilleyerek ve HDAC proteinleri de histonlardan asetili uzaklaştırarak (deasetilasyon) kromatin yapısının yeniden biçimlenmesinde ve dolayısıyla gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (99). ING1 proteinleri hem fiziksel hem de işlevsel olarak HAT ve HDAC etkinliğine sahip pek çok faktörle ilişki kurmaktadır (99). ING1’in tümör baskılayıcı işlevi kromatinin yeniden biçimlendirilmesi ile bağlantılı gibi görünmektedir. Yani çeşitli biyolojik etkinliklere sahip olan ING1’in tümör oluşumunu baskılayabilmesi, yalnızca kromatinin yeniden biçimlendirilmesi üzerindeki rolünün sonucu olabilir. REST transkripsiyon faktörünün bu olaylarda ING1 ile beraber rol alması muhtemeldir.

Bu çalışmada elde edilen en önemli bulgu heterozigotluk kaybı bulgularıdır. D13S1315 ve D13S285 adlı DS belirleyiciler ile taranan bölgede genomik kayıpların olduğu görülmektedir. Heterozigotluk kaybı bulguları iki önemli noktaya işaret etmektedir.

Heterozigotluk kaybı eksilme mutasyonu nedeniyle ortaya çıkabileceği gibi rekombinasyon dolayısıyla da ortaya çıkabilir (142). Burada birbirinden çok farklı iki yol izlenir. Bu bölgede eksilme veya kopya sayısında değişiklik olduğu düşünülebilir. Genomdan genoma bir DNA bölgesinin uzunluğu değişiklik gösteriyorsa bu “değişmiş kopya sayısı” (copy number variant; CNV) olarak adlandırılır (142). DNA bölgesinin uzunluğu 1 kilobazdan megabazlara kadar değişkenlik gösterebilir. (143). İnsanda her kromozomun iki kopyası bulunmaktadır (144). Kopya sayısı değişikliği eksilme, duplikasyon, ters dönme (inversiyon) ve translokasyon gibi genomik yeniden düzenlenmelerle meydana gelir (144). Düşük kopya tekrarları (Low copy repeats; LCRs) olarak bilinen bölgeye özgün tekrar dizinleri kopya sayısında değişikliğe neden olan genomik düzenlenmelere yatkındırlar. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kopya sayısı değişikliğinin eksilme tipi düzenlenme sonucu gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu düzenlenmeler homolog olmayan (non-homolog) rekombinasyondur. Dolayısıyla normal ve tümörlü dokular bu açıdan birbirlerinden farklıdır. Populasyon genetiğinde, bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) denilen bir durum vardır ki, iki veya daha fazla lokustaki, hatta aynı kromozomda yer almayan allellerin sık rastlanmayan bir ilişkisini işaret eder (145). Bağlantı dengesizliği şu şekilde tanımlanabilir: Bir popülasyonda allel veya genetik belirleyicilerin bazı kombinasyonlarının sıklığı haplotiplerin rastgele oluşumundan beklenen sıklığa nazaran az veya çok olabilir (145). Bununla ilişkili olarak kopya sayısındaki değişiklik hem kromozomal yapıda dengesizliğe, hem de genlerin mesafelerinde değişiklik meydana gelmesi, genomik kararsızlığa ve dolayısıyla gen ifadelerinin etkilenmesine sebep olabilir. Gen ifadesindeki değişiklik gen ürününün azalmasına neden olabilir. Eşbaskın allellerde gen sayısı fenotip üzerinde etki sahibidir (142). Bu durum “doz etkisi” (dosage effect) olarak anılır (142).

Tablo 4.2 incelendiğinde D13S278, D13S796 ve D13S1315 DS belirleyicilerin bazı örneklerde homozigotluk gösterdiği farkedilmektedir. Bu bulgu ilgili bölgenin rekombinasyona yatkın bir bölge olabileceğini düşündürmektedir. Homolog rekombinasyon sonucu bu bölgedeki genler bağlı genler durumuna gelmiş olabilir. Genetik bağlantı (genetic linkage) belirli bir genomik bölgenin veya allellerin birlikte kalıtılması anlamına gelmektedir (146). Aynı kromozomdaki genetik bölgeler (lokus)

fiziksel olarak yakındırlar ve mayoz esnasında birlikte kalırlar, genetik olarak bağıdırlar (146). Dolayısıyla bu çalışma neticesinde D13S278, D13S796 ve D13S1315 DS belirleyicilerin taradığı alanlarda yer alan genlerin ING1 geninin düzenlenmesinde rol sahibi olabileceği düşüncesi kuvvetlenmiştir. Bu bölgedeki genler RPL35P7, EFNB2, ARGLU1, FAM155A, LIG4, ABHD13, TNFSF13B, MYO16'dır (Şekil 4.1) (109). Ancak Genomatix ve TFSEARCH programlarıyla, ING1 geni özendirici bölgesi ile ilişkili transkripsiyon faktörleri ve çeşitli molekülleri tespit etmek üzere yaptığımız incelemede ING1'in özendirici bölgesinde bu sekiz adet gene ait bağlanma dizinleri tespit edilememiştir. Dolayısıyla bu düşüncemizi destekler bir sonuç ortaya çıkmamıştır.

D13S1315 ve D13S285 adlı DS belirleyiciler ile elde edilen yüksek heterozigotluk kaybı oranları bu bölge üzerinde mesane kanserleri ile ilişkilendirilebilecek tümör baskılayıcı genler dahil olmak üzere başka aday gen veya genlerin varlığını düşündürmektedir. NCBI tabanlı (109) yaptığımız araştıma neticesinde bu bölgede yer alan genler tespit edilmiştir. Bu genler arasında IRS2 (insulin receptor substrate 2), COL4A1 (collagen, type IV, alpha 1), COL4A2 (collagen, type IV, alpha 2), RAB20 (RAS oncogene (onkogen) family (ailesi) üyesi), CARKD (carbohydrate kinase domain containing; karbohidrat kinaz işlevini içeren bölge), CARS2 (cysteinyl-tRNA synthetase 2, mitokondriyal), ING1 (inhibitor of growth family, member 1), RPL21P107 (ribosomal protein L21 pseudogene 107), ANKRD10 (ankyrin repeat domain 10), PARP1P1 [poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 pseudogene 1], ARFGEF7 [Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7], SOX1 [SRY (sex determining region Y)-box 1] genleri dikkat çekmektedir (Tablo 4.2) (109).

Çalışma neticesinde heterozigotluk kaybı tespit edilen bölgede COL4A1 (collagen, type IV, alpha 1) ve COL4A2 (collagen, type IV, alpha 2) genleri yer almaktadır. Tip IV kollajen bazal zarın ana makromoleküler bileşenlerindendir (147). Bazal zarlar özelleşmiş bir hücre dışı matriksin ince katmanlarıdır (148). Bu matriks, üzerinde gelişmekte olan epitel ve endotel hücrelere onları destekleyen bir yapı sağlamaktadır (148). Bazal zarlar her zaman hücrelerle ilişki halindedirler ve mekanik destek görevi görmenin yanı sıra farklılaşma ve çoğalma gibi hücresel davranışları da etkilerler (149). Damar bazal zarı yeni oluşan kılcallar için çözünmez bir duvar oluşturur ve damar bazal

zarının pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik olaylarda önemli düzenleyici rollere sahip olduğu tartışılmaktadır (150). Genellikle, tip IV kollajen; hücre tutunmasını, hücre göçünü, farklılaşmasını ve gelişimini özendirir (150). Tip IV kollajen A1-A6 olarak isimlendirilen 6 farklı alfa zincir şeklinde sentezlenir, üçlü sarmal oluşturular ve bazal zarda yer alan diğer makromoleküller için iskele görevi görececek bir ağ oluştururlar (151). Bu α -zincirler, N-ucu 7S bölgesi, orta üçlü sarmal bölgesi ve C-ucu globular kollajen olmayan (noncollagenous) (NC1) bölge olmak üzere üç bölgeden (domain) oluşurlar (152). A1 ve A2 izoformları insan bazal zarlarında yer alırlar (148). Tip IV kollajenin çeşitli nonkollajen bölgelerinin anjiyogenez, tümör gelişimi, çoğalması ve göçünü engellediği görülmüştür (153,154). Buradaki analizden COL4A1 ve COL4A2 mesane kanseri oluşumunda aday tümör baskılayıcı genler olduğu anlaşılmaktadır.

SOX1 gelişim sürecinde önemli bir transkripsiyon faktörüdür (155). Transkripsiyon faktörlerinin kanserdeki rolleri hakkında fazla bilgi mevcut değildir. Fakat son yıllarda yapılan bir çalışmada, SOX1 ifadesinin, nöral kök hücre transplantasyonundan sonra nöronal öncüllerin tümörleşme potansiyellerini azalttığı gözlenmiştir (156). Aynı zamanda Genomatix ve TFSEARCH programlarınca ING1 özendirici bölgesine bağlandığı tahmin edilen SOX1 geninin mesane kanserleri için aday bir tümör baskılayıcı gen olduğu söylenebilir.

Toujani ve ark. (157) tarafından 2009 yılında gerçekleştirilmiş geniş çaplı bir hücre kültürü çalışmasında Burkitt lenfomasında meydana gelmiş kromozomal değişiklikler incelenmiştir. Bu araştırmada, üç tümörde, kromozom 13q33.q34 bölgesinde 30dan fazla sayıda gen barındıran 10 megabazlık bir kısmın kaybolduğunu gözlemlemişlerdir (157). Bu genler arasında ING1, COL4A2, COL4A1, RAB20, LIG4 (Ligase 4), TNFSF13B [tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b], EFNB2 (ephrin-B2), ERCC5 (excision repair cross complementation group 5), FGF14 (fibroblast growth factor 14), PCCA (propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide), SLC10A2 [solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2], IRS2, ARHGEF7, ANKRD10 gibi genler bu kaybın içinde yer almaktadırlar (157). Bu çalışmaya ait bulgular bizim çalışmamızın bulgularını destekler niteliktedir.

Çalışma neticesinde COL4A1, COL4A2 ve SOX1 genlerinin mesane kanserlerinde öncelikli olarak incelenmesi gereken aday tümör baskılayıcı genler olduklarını, ING1 geninin özendirici bölgesinin metilasyon durumunun incelenmesi gerektiğini, özendirici bölgeye bağlandığını yazılımsal olarak tahmin ettiğimiz transkripsiyon faktörü ve düzenleyici moleküllerin genetik analizlerinin yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. İlgili genler hakkında yapılacak detaylı moleküler analizler kanser oluşumundaki rolleri hakkındaki yeni bilgiler ortaya koyabilir.

6 KAYNAKLAR

1. http://www.cancer.org%2Fdocroot%2FSTT%2Fcontent%2FSTT1xGlobal_Cancer_Facts_and_Figures_2007.asp&ei=OScjTNCsE9i4jAfToN1X&usg=AFQjCNG9cEB-4SJwLEl2SI4puppBG13sZQ&sig2=f3ryp_gW03WIrSzEnICKKA, Eriřim Tarihi: 20 Nisan 2010
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *A Cancer J Clin*. 2008;58:71-96.
3. Sağlık Bakanlığı, Kanserle Savař Dairesi Başkanlığı, Epidemiyoloji ve Koruma şube M¼d¼rl¼ę¼, N¼fus Tabanlı Kanser Kayıt Merkezleri Veri Havuzu: Sekiz İl, 2004-2006 Deęerlendirmesi, <http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf>, Eriřim tarihi: 15 Mayıs 2010.
4. National Institutes of Health, National Cancer Institute. What you need to know about bladder cancer. <http://www.cancer.gov/cancerinfo/wyntk/bladder>. Eriřim tarihi: 22 Nisan 2010
5. Hossler FE, Monson FC. Microvasculature of the rabbit urinary bladder. *Anat Rec* 1995;243: 438–448.
6. Parsons CL, Lilly JD, and Stein P. Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). *J Urol*. 1991;145: 732–735.
7. Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask, *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278:F867–F874.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.

9. Volanisa D, Kadiyskaa T, Galanisb A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer, *Toxicol Let* 2010;193:131–137
10. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, Prystowsky MB, Ortiz AR, Childs G, Cordon-Cardo C. Gene Discovery in Bladder Cancer Progression using cDNA Microarrays. *Am J Pathol.*2003;163.
11. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1971; 68:820-823.
12. Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Hanafusa H, Etani T, Nishioka S, Nishizaki K, Shimizu K. Genomic Structure of the Human ING1 Gene and Tumor-specific Mutations Detected in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 2000;60:3143–3146.
13. Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Ito S, Jitsumori Y, Nakashima T, Nagai N, Nishizaki K, Shimizu K. Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene.* 2002;21:4462-4470.
14. Gunduz M, Nagatsuka H, Demircan K, Gunduz E, Cengiz B, Ouchida M, Tsujigiwa H, Yamachika E, Fukushim K, Beder L, Hirohata S, Ninomiya Y, Nishizaki K, Shimizu K, Nagai N. Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas. *Gene.* 2005;356:109–117.
15. Cengiz B, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder L, Gunduz E, Tamamura R, Mahmut N, Fukushima K, Ali MA, Naomoto Y, Shimizu K, Nagai N. Fine deletion mapping of chromosome 2q21-37 shows three preferentially deleted regions in oral cancer. *Oral Oncology.* 2007;43:241–247.

16. Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, Ali MA, Rodriguez AP, Cilek MZ, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N. Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135:703-13.
17. Cheung KJ, Li G. The Tumor Suppressor ING1: Structure and Function, *Exp Cell Res*. 2001;268:1–6.
18. Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet*. 1996;14:415-20. Erratum in: *Nat Genet* 1999;23:373.
19. Garkavtsev, I., Kazarov, A., Gudkov, A., and Riabowol, K. Correction. *Nat. Genet* 1999;23:373.
20. Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov MV, Chumakov PM, Gudkov AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature*. 1998;391:295–8.
21. Hollstein, M, Sidransky, D, Vogelstein, B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49–53.
22. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell. Mol Life Sci*. 1999;55:64–75.
23. Somasundaram K. Tumor suppressor p53: Regulation and function. *Front Biosci*. 2000;5:424–437.
24. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: Emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*. 1998;12:2973–2983.

25. May P, May E. Twenty years of p53 research: Structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18:7621–7636.
26. Li G, Mitchell DL, Ho VC, Reed JC, Tron VA. Decreased DNA repair but normal apoptosis in UV exposed keratinocytes of p53 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 1996;148:1113–1123.
27. Li G, Ho VC, Mitchell DL, Trotter MJ, Tron VA. Differentiation-dependent p53 regulation of nucleotide excision repair in keratinocytes. *Am. J. Pathol.* 1997;150:1457–1464.
28. Tron VA, Trotter MJ, Tang L, Krajewska M, Reed JC, Ho VC, Li G. (). p53-regulated apoptosis is differentiation-dependent in UVB irradiated mouse keratinocytes. *Am. J. Pathol.* 1998;153:579–585.
29. Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:2014–2019.
30. Helbing CC, Veillette C, Riabowol K, Johnston R, Garkavtsev I. A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis. *Cancer Res.* 1997;57:1255–1258.
31. Shinoura N, Muramatsu Y, Nishimura M, Yoshida Y, Saito A, Yokoyama T, Furukawa T, Horii A, Hashimoto M, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirusmediated transfer of p33ING1 with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res.* 1999;59:5521–5528.
32. Skowrya D, Zeremski M, Neznanov N, Li M, Choi Y, Uesug, M, Hauser C, Gu W, Gudkov A, Qin J. Differential association of products of alternativ transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J. Biol. Chem.* 2001;276:734–8739.

33. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nat Rev.* 2009;458:719-24.
34. von Hanseemann D. Ueber asymmetrische Zelltheilung in epithel Krebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch. Path. Anat.* 1890;119:299.
35. Boveri T. Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren. Gustav Fischer, 1914;1–64.
36. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* 1944;79:137–158.
37. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953;171:737–738.
38. Cooper GM, Hausman RE, 2006, *The cell: Molecular Approach*. Hücre: Moleküler Yaklaşım, 3. Baskı, Meral Sakızlı, Neşe Atabey, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 2006: 631-663.
39. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 1986;46:2203-7.
40. Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature.* 1985;313:745-7
41. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999;24:73-6.
42. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-64.

43. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267(5203):1456-62.
44. Parkin DM. The global burden of urinary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol* 2008; 218 Suppl:12–20.
45. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003; 21:1315–1330.
46. Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney International*. 2009;75:1153–1165.
47. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, 2007, Robbins Basic Pathology, Robins Temel Patoloji, 8. Baskı. Uğur Çevikbaş, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008:575-577.
48. Knowles MA. Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Jekyll and Hyde or Chalk and Cheese. *Carcinogenesis*. 2006;371:l.
49. Evans HJ Prosser J. Tumor-Suppressor Genes: Cardinal Factors in Inherited Predisposition to Human Cancers. *Environ Health Perspect*. 1992;98:25-37.
50. Martin GS. Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature*. 1970;227(5262):1021-3.
51. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(11):3637-40.
52. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science*. 1991;254(5035):1146-53.

53. Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*. 1969;223(5204):363-8.
54. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*. 1987;235(4794):1394-9.
55. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998;280:1036–7.
56. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (Eds.), *Molecular Biology of The Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002: p. 1313-1361.
57. Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedoux R. The new tumor suppressor genes ING: Genomic structure and status in cancer, *Int. J. Cancer*. 2008;123:1483–1490.
58. Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S, Onogi H, Higashimoto Y, Appella E, Yokota J, Harris CC. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* 2003;63:2373–8.
59. Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, Wang XW, Yokota J, Riabowol K, Harris CC. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9671–6.
60. Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Yokota J, Harris CC. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* 2003;22:343–50.
61. He GH, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol biol evol* 2005;22:104–16.

62. Kichina JV, Zeremski M, Aris L, Gurova KV, Walker E, Franks R, Nikitin AY, Kiyokawa H, Gudkov AV. Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene* 2006; 25:857–66.
63. Coles AH, Liang H, Zhu Z, Marfella CG, Kang J, Imbalzano AN, Jones SN. Deletion of *p37Ing1* in mice reveals a p53-independent role for *Ing1* in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:2054–61.
64. Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci* 2006;31:35–40.
65. Mellor J. It takes a PHD to read the histone code. *Cell*. 2006;126: 22–4.
66. Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:1054–65.
67. Russell M, Berardi P, Gong W, Riabowol K. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Exp Cell Res*. 2006;312:951–61.
68. Pedoux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, Kumamoto K, Wincovitch S, Garfield SH, McMenamin M, Nagashima M, Grossman SR, et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol*. 2005;25:6639–48.
69. Loewith R, Meijer M, Lees-Miller SP, Riabowol K, Young D. Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol*. 2000;20:3807–16.
70. Soliman MA, Riabowol K. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32(11):509-19.

71. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell*. 2006;21:51–64.
72. Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, et al. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell*. 2003;114: 99–111.
73. Kaadige MR, Ayer DE. The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of Pf1 is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. *J Biol Chem*. 2006;281:28831–6.
74. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. 2006;442:96–9.
75. Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature*. 2006;442:100– 3.
76. Shen JC, Unoki M, Ythier D, Duperray A, Varticovski L, Kumamoto K, Pedoux R, Harris CC. Inhibitor of growth 4 suppresses cell spreading and cell migration by interacting with a novel binding partner, liprin alpha1. *Cancer Res*. 2007;67:2552–8.
77. Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E, Barnett GH, Jain RK. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature*. 2004;428: 328–32.
78. Kim S, Chin K, Gray JW, Bishop JM. A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:16251–6.

79. Unoki M, Shen JC, Zheng ZM, Harris CC. Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem.* 2006;281:34677–86.
80. Vieyra D, Loewith R, Scott M, Bonnefin P, Boisvert FM, Cheema P, Pastryeva S, Meijer M, Johnston RN, Bazett-Jones DP, McMahon S, Cole MD, et al. Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem.* 2002;277:29832–9.
81. Vieyra D, Toyama T, Hara Y, Boland D, Johnston R, Riabowol K. ING1 isoforms differentially affect apoptosis in a cell age-dependent manner. *Cancer Res.* 2002;62:4445–52.
82. Cheung KJ, Jr, Mitchell D, Lin P, Li G. The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res.* 2001;61:4974–7.
83. Kuo WH, Wang Y, Wong RP, Campos EI, Li G. The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA. *Exp Cell Res.* 2007;313:1628–38.
84. Wang Y, Wang J, Li G. Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. *FEBS lett.* 2006;580:3787–93.
85. Wang J, Chin MY, Li G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res.* 2006;66:1906–11.
86. Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert FM, Young D, Bazett-Jones DP, Riabowol K. UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci.* 2001;114:3455–62.

87. Yoo GH, Xu HJ, Brennan JA, Westra W, Hruban RH, Koch W, Benedict WF, Sidransky D. 1994. Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 54:4603– 4606.
88. Maestro R, Piccinin S, Doglioni C, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Sulfaro S, Barzan L, Boiocchi M. 1996. Chromosome 13q deletion mapping in head and neck squamous cell carcinomas: identification of two distinct regions of preferential loss. *Cancer Res.* 56:1146–1150.
89. Zeremski M, Horrigan S, Grigorian IA, Westbrook C, Gudkov AV. Localization of the candidate tumor suppressor gene ING1 to human chromosome 13q34. *Somatic Cell Mol Genet.* 1997;23:233– 236.
90. Huang Y, Meltzer SJ, Yin J, Tong Y, Chang EH, Srirastava S, McDaniel T, Boynton RF, Zou ZQ. Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and Rb in human esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 1993;53:1889–1894.
91. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes EC, Piantadosi S, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene.* 1993;8:1913–1919.
92. Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene.* 1991;6:2305–2309.
93. Dobson MK, Cibly WA, Xu HJ, DeLacey KA, Hu SX, Keeney GL, Li J, Prodratz KC, Jenkins RB, Benedict WI. Evidence of functional RB protein in epithelial ovarian carcinomas despite loss of heterozygosity at the RB locus. *Cancer Res.* 1994;54:610–613.

94. Anglard P, Tory K, Brauch H, Weiss GH, Latif F, Merino MJ, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM. Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinomas. *Cancer Res.* 1991;51:1071–1077.
95. Borg A, Zhang QX, Alm P, Olsson H, Sellberg G. The retinoblastoma gene in breast cancer: allele loss is not correlated with loss of the gene protein expression. *Cancer Res.* 1992;52:2991–2994.
96. Nawroz H, van der Riet P, Hruban RH, Koch W, Ruppert JM, Sidransky D. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1994;54:1152–1155.
97. Hara Y, Ma D, Riabowol K. Genomic organization and biological functions of the ING1 gene family. *J Biol. Chem.* 2002.
98. Jager D, Stockert E, Scanlan MJ, Gure AO, Jager E, Knuth A, Old L, Chen YT. Cancer-Testis Antigens and ING1 Tumor Suppressor Gene Product Are Breast Cancer Antigens: Characterization of Tissue-specific ING1 Transcripts and a Homologue Gene. *Cancer Res.* 1999;59:6197–6204.
99. Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 May;37(5):1054-65.
100. Oki E, Maehara Y, Tokunaga E, Kakeji Y, Sugimachi K. Reduced expression of p33(ING1) and the relationship with p53 expression in human gastric cancer. *Cancer Lett.* 1999;147:157–62.
101. Kameyama K, Huang CL, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Sumitomo S, Takami Y, Kinoshita M, Yokomise H. Reduced ING1b gene expression plays an important role in carcinogenesis of non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9:4926–34.

102. Nouman GS, Anderson JJ, Crosier S, Shrimankar J, Lunec J, Angus B. Downregulation of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol*. 2003;56:507–11.
103. Tokunaga E, Maehara Y, Oki E, Kitamura K, Kakeji Y, Ohno S, Sugimachi K. Diminished expression of ING1 mRNA and the correlation with p53 expression in breast cancers. *Cancer Lett*. 2000;152:15–22.
104. Hara Y, Zheng Z, Evans SC, Malatjalian D, Riddell DC, Guernsey DL, Wang LD, Riabowol K, Casson AG. ING1 and p53 tumor suppressor gene alterations in adenocarcinomas of the esophagogastric junction. *Cancer Lett*. 2003;192:109–16.
105. Sambrook J, Russel D. Eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed. CSHL Press, 2001: p. 12.74-75.
106. <http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector>. Eriřim Tarihi: 20 Mayıs 2010.
107. <http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>. Eriřim Tarihi: 20 Mayıs 2010.
108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3621>. Eriřim Tarihi: 15 Eylül 2009.
109. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&query=ING1&qchr=&strain=All. Eriřim Tarihi: 10 Mayıs 2010.
110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Eriřim Tarihi: 22 Mayıs 2010.
111. Toyama T, Iwase H, Watson P, Muzik H, Saettler E, Magliocco A, DiFrancesco L, Forsyth P, Garkavtsev I, Kobayashi S, Riabowol K. Suppression of ING1 expression in sporadic breast cancer. *Oncogene*. 1999 Sep 16;18(37):5187-93.

112. Nouman GS, Anderson JJ, Wood KM, Lunec J, Hall AG, Reid MM, Angus B. Loss of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2002;55:596–601.
113. Vieyra D, Senger DL, Toyama T, Muzik H, Brasher PM, Johnston RN, Riabowol K, Forsyth PA. Altered subcellular localization and low frequency of mutations of ING1 in human brain tumors. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5952–61.
114. Nouman GS, Angus B, Lunec J, Crosier S, Lodge A, Anderson JJ. Comparative assessment expression of the inhibitor of growth 1 gene (ING1) in normal and neoplastic tissues. *Hybrid Hybridomics*. 2002;21:1–10.
115. Gong W, Russell M, Suzuki K, Riabowol K. Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression. *Mol Cell Biol*. 2006;26:2947–54.
116. Chen L, Matsubara N, Yoshino T, Nagasaka T, Hoshizima N, Shirakawa Y, Naomoto Y, Isozaki H, Riabowol K, Tanaka N. Genetic alterations of candidate tumor suppressor ING1 in human esophageal squamous cell cancer. *Cancer Res*. 2001;61:4345–9.
117. Shen DH, Chan KY, Khoo US, Ngan HY, Xue WC, Chiu PM, Ip P, Cheung AN. Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer. *Carcinogenesis*. 2005 Apr;26(4):855-63.
118. Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg*. 2001 Jul;234(1):10-20.
119. Ahluwalia A, Yan P, Hurteau JA, Bigsby RM, Jung SH, Huang TH, Nephew KP. DNA methylation and ovarian cancer. I. Analysis of CpG island hypermethylation in human ovarian cancer using differential methylation hybridization. *Gynecol Oncol*. 2001 Aug;82(2):261-8.

120. Strathdee G, Appleton K, Illand M, Millan DW, Sargent J, Paul J, Brown R. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):1121-7. 122.
121. Bianco T, Chenevix-Trench G, Walsh DC, Cooper JE, Dobrovic A. Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer. *Carcinogenesis*. 2000 Feb;21(2):147-51.
122. Tang B, Böttinger EP, Jakowlew SB, Bagnall KM, Mariano J, Anver MR, Letterio JJ, Wakefield LM. Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):802-7.
123. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*. 1998 Nov 12;396(6707):177-80.
124. Barilá D, Superti-Furga G. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat Genet*. 1998 Mar;18(3):280-2.
125. Kipreos ET, Wang JY. Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science*. 1990 Apr 13;248(4952):217-20.
126. Welch PJ, Wang JY. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):779-90.
127. Moran LA (Ed.), Rawn JD. *Biochemistry*. 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall; 1994.

128. Helin K, Lees JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, Fattaey A. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell*. 1992;70(2):337-50.
129. Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farnham PJ, Blunar MA. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell*. 1992;70(2):351-64.
130. Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Molec. Genet*. 2001;10: 699-703.
131. Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH. E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Molec. Cell*. 1999;4:771-781.
132. Steinhoff C, Prior A, Reichmann G, Seifert HH, Schulz WA. Activity of E2F-dependent promoters in bladder carcinoma cells and their use for tumour-specific targeting of p53-induced apoptosis. *Int J Oncol*. 2002;21(5):1033-40.
133. Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badg R. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and 2 related genes: Sox-1 and Sox-2. *Development*. 1996;122: 509-520.
134. Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*. 2006;442: 91-95.
135. Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. 2006;442: 86-90.

136. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O(2) tension. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995;92: 5510-5514.
137. Ozer A, Wu C, Bruick RK. The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2005;102: 7481-7486.
138. Dwyer J, Li H, Xu D, Liu JP. Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the the (sic) Ets transcription factor family. *Ann. New York Acad. Sci.* 2007;1114: 36-47.
139. Belguise K, Sonenshein GE. PKC-theta promotes c-Rel-driven mammary tumorigenesis in mice and humans by repressing estrogen receptor-alpha synthesis. *J. Clin. Invest.* 2007;117: 4009-4021.
140. Romieu-Mourez R, Kim DW, Shin SM, Demicco EG, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Cardiff RD, Sonenshein GE. Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Molec. Cell. Biol.* 2003;23: 5738-5754.
141. Ooi L, Wood IC. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nature Rev. Genet.* 2007;8: 544-554.
142. Redon J. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006; 444 (7118): 444–454.
143. Cook EH, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature.* 2008;455(7215): 919–23.
144. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet.* 2009;10:551–564.

145. Collins A. Allelic association: linkage disequilibrium structure and gene mapping. *Mol Biotechnol.* 2009;41(1):83-9.
146. Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R, Watson JD. *Molecular Biology of the Gene.* 2nd Ed. CSHL Press, 2004:5-17.
147. Timpl R. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996;8: 618–624.
148. Paulsson M. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1992;27:93–127.
149. Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kallurii R. Distinct Antitumor Properties of a Type IV Collagen Domain Derived from Basement Membrane. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21340–21348,
150. Madri JA. *Transplant Immunol.* 1997;5:179–183
151. Prockop DJ, Kivirikko KI. *Annu. Rev. Biochem.* 1995;64: 403–434
152. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kuhn K. *Eur. J. Biochem.* 1981;120: 203–211.
153. Petitclerc E. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J. Biol. Chem.* 2000;275:8051–8061.
154. Colorado PC. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* 2000;60:2520–2526.
155. Ekonomou A, Kazanis I, Malas S, Wood H, Alifragis P, Denaxa M, Karagogeos D, Constanti A, Lovell-Badge R, Episkopou V. Neuronal migration and ventral subtype identity in the telencephalon depend on SOX1. *PLoS Biol.* 2005;3:e186.

156. Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, Hayashi H, Morizane A, Koyanagi M, Sasai Y, Hashimoto N. Fluorescence-activated cell sorting based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells*. 2006;24: 763–71.
157. Toujani S, Dessen P, Ithzar N, Danglot G, Richon C, Vassetzky Y, Robert T, Lazar V, Bosq J, Da Costa L, Perot C, Ribrag V, Patte C, Wiels J, Bernheim A. High Resolution Genome-Wide Analysis of Chromosomal Alterations in Burkitt's Lymphoma. *PLoS One*. 2009;4:e7089.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kilis’te doğdu. Ortaöğrenimini Gaziantep Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimini Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde 2002 yılında, Ankara Üniversitesi Eğitim Fakültesi’nde Ortaöğretim Alan Öğretmenliği tezsiz yüksek lisans programını 2003 yılında tamamladı. Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında 2003-2005 yılları arasında yüksek lisans eğitimini tamamlayan Mehri İğci 2005 yılında doktora eğitimine başlamıştır. İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.