



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS KANSER DOKULARINDA ING4 GEN İFADE SEVİYESİNİN
ve p53 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

İbrahim Halil YILDIRIM
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Prof. Dr. Celalettin CAMCI

GAZİANTEP

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 olmadığını beyan ederim.

10.05.2010

İbrahim Halil YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar LİSTESİ.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Pankreas	8
2.1.1 Pankreas anatomi ve fizyolojisi	8
2.1.2 Pankreas organ gelişimi	10
2.2. Kanser	11
2.2.1 Kanser hücrelerinin özellikleri	12
2.2.2. Hücre döngüsü	15
2.2.2.1. Hücre döngüsünün kontrolü	15
2.2.3. Programlı hücre ölümü	18
2.2.4. p53 proteini.....	22
2.2.5. Kaynaşım mekanizması	26
2.2.6. Kanser gelişiminde genetik rol	29
2.2.6.1. Onkogenler	31
2.2.6.2. Tümör baskılayıcı genler	31
2.3. Pankreas Kanseri	32
2.3.1. Pankreas kanserinde rol alan genler	32
2.3.2. ING Gen Ailesi	33
2.3.2.1. ING proteinlerinin yapısı	34
2.3.2.2. Bitki ilintili bölge, PHD (Plant Homeodomain) bölgesi	37
2.3.2.3. NLS (Nuclear Localization Sequence) bölgesi	38
2.3.2.4. NCR-LZL-PBD-PBR-PIP Bölgeleri	39
2.3.3. ING Proteinlerinin hücresel işlevleri	40
2.3.3.1. ING proteinleri ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi	41
2.3.3.2. ING proteinleri ve programlı hücre ölümü	41
2.3.3.3. ING proteinleri ve kromozom düzenlenmesi	42
2.3.3.4. ING proteinleri ve DNA tamiri	42
2.3.4. Büyümeyi baskılayıcı 4 proteini; ING4 (Inhibitor of growth 4)	44
2.3.4.1. ING4'ün hücresel işlevleri	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	54
3.1. Hasta Gruplarının Oluşturulması ve Çalışmanın Yapısı	54
3.1.1. Dokuların temini	54
3.2. Araştırma Yöntemleri	54
3.2.1. DNA ve RNA'ların elde edilmesi	54
3.2.1.1. Dokudan DNA elde edilmesi	55
3.2.1.2. Dokudan RNA elde edilmesi	55
3.2.2. cDNA sentezi	56
3.2.3. Primerlerin ve uygun çalışma şartlarının belirlenmesi	57
3.2.3.1. p53 geni primerleri	57
3.2.3.2. ING4 geni primerleri ve çalışma koşulları	58
3.2.4. PCR ile DNA ve cDNA'ların çoğaltılması	59
3.2.5. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	60
3.3. p53 Ekzonlarının SSCP Yöntemiyle İncelenmesi	61
3.4. p53 Ekzonları ve ING4 cDNA Dizi Analizleri	62

3.5.	ING4 Gen İfade Düzeylerinin İncelenmesi	63
4.	BULGULAR	64
4.1.	p53 Geni Bulguları	64
4.1.1.	p53 geni ekzonlarının SSCP incelemeleri	64
4.1.2.	p53 geni DNA dizi analizi sonuçları	66
4.2.	ING4 Geni Bulguları	67
4.2.1.	ING4 gen ifade düzeyi sonuçları	67
4.2.2.	ING4 geni cDNA dizi analizi	68
4.3.	β -aktin Geni Bulguları	72
5.	TARTIŞMA	73
6.	KAYNAKLAR	94
	ÖZGEÇMİŞ	107

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	cDNA eldesindeki PCR karışım oranları ve PCR koşulları	56
Tablo 3.2.	p53 geni ekzonlarını çoğaltmak için kullanılan primer çiftleri ve aşamalı sıcaklık değişimi sonucunda belirlenen uygun çalışma sıcaklıkları	57
Tablo 3.3.	ING4 cDNA'sının çoğaltılması için kullanılan primer çiftleri ve uygun PCR sıcaklıkları	58
Tablo 3.4.	p53 geni DNA'sı ve ING4 cDNA'sı için PCR karışım oranları	60
Tablo 3.5.	Otomatik DNA dizileme için hazırlanan PCR karışımı oranları	63
Tablo 4.1.	p53 ekzonlarının SSCP sonuçları	66
Tablo 4.2.	Çalışılan hastalarda ING4 ve β -aktin gen ifade düzeyleri	68
Tablo 4.3.	Çalışılan örneklerde tespit edilen ING4 farklı kaynaşım yapıları	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Pankreasın yerleşimi ve yapısı	8
Şekil 2.2.	Pankreasın anatomisi	9
Şekil 2.3.	Hücre döngüsü ve kontrol noktaları şeması	15
Şekil 2.4.	Hücre döngüsünün düzenlenmesinde siklinler rol almaktadırlar	16
Şekil 2.5.	p53'ün hücre döngüsünde rolü	24
Şekil 2.6.	p53 proteinin bölgesel yapısı	25
Şekil 2.7.	Kaynaşım mekanizmasında intronların uçlarında bulunan GU ve AG dizileri	27
Şekil 2.8.	Kaynaşım mekanizması	29
Şekil 2.9.	Knudson'un "Two hit" hipotezi	31
Şekil 2.10.	İnsan ING genlerinin yerleştikleri kromozom bölgeleri	34
Şekil 2.11.	ING proteinlerinin bölge yapıları	35
Şekil 2.12.	ING1 protein bölgeleri ve etkileştikleri diğer proteinler	36
Şekil 2.13.	PHD (Plant Homo Domain) bölgesi amino asit dizisi	37
Şekil 2.14.	NLS (Nuclear Localization Sequence) bölgesi amino asit dizisi	38
Şekil 2.15.	Hücre döngüsü sırasında ING protein etkileşimi	40
Şekil 2.16.	ING proteinlerinin kromatin yapıya etki mekanizmaları	43
Şekil 2.17.	ING4 geninin yapısı	44
Şekil 2.18.	ING4 proteininin bölümleri ve farklı kaynaşım yapıları	45
Şekil 3.1.	ING4 cDNA dizisi	59
Şekil 4.1.	p53 geni 5. ekzonunun SSCP jel görüntüsü	65
Şekil 4.2.	p53 geni 6. ekzonu SSCP jel görüntüsü	65
Şekil 4.3.	ING4 ve β -aktin agaroz jel görüntüsü	67
Şekil 4.4.	Dizi analizi için gerçekleştirilen PCR'ların agaroz jel görüntüleri	68
Şekil 4.5.	ING4 farklı kaynaşım yapıları ve bulunma yüzdeleri	69
Şekil 4.6.	63 numaralı örnekte belirlenen ING4 cDNA dizisi	71
Şekil 4.7.	137 numaralı örneğin geri primer ile dizilenmesi	71
Şekil 4.8.	137 numaralı örneğin ileri primer ile dizilenmesi	71
Şekil 4.9.	β -aktin geni agaroz jel elektroforez görüntüsü	72

ÖZET

PANKREAS KANSER DOKULARINDA ING4 GEN İFADE SEVİYESİNİN ve p53 GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

İbrahim Halil YILDIRIM

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK ve Prof Dr. Celalettin CAMCI

Mayıs 2010, 111 sayfa

Giriş: Pankreas kanseri 5 yıllık sağ kalım süresi %1'in altında olan çok hızlı metastaz gelişmesi ve tıbbi tedavi ve uygulamalara dirençle karakterize oldukça kötü huylu bir kanser türüdür. Bu kanser tipinde tümör baskılayıcı genlerden p53'ün %50'den fazla mutasyona uğradığı sıkça rapor edilmiştir. ING4 ve ING tümör baskılayıcı genler MDM2'ye bağlanarak p53'ün ubiquitinasyon yoluyla parçalanmasını önler ve p21'in özendirici bölgesine bağlanarak gen ifadesini düzenlerler. Ayrıca, ING4 Lys-382 asetilasyonunu tetikleyerek p53'ün oligomerizasyonunu sağlar. ING ailesi tümör baskılayıcı genler p53'ün bu yolla kararlılığını sağlayarak hücre döngüsünü ve hücrel çoğalmanın kontrolüne yardımcı olmakla birlikte, ayrıca, liprin $\alpha 1$ yoluyla hücrel göçü ve NF- κ B yoluyla anjiyogenesi kontrol etmektedir. ING ailesi PHD bölgesi aracılığı ile de kromatin yapısı kararlılığının düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu sebeple pankreatik kanserlerde p53 mutasyonları ve ING4 gen ifadesi ve mutasyonları çalışıldı. **Materyal ve yöntemler:** Pankreas dokularından elde edilen genomik DNA'larda p53 mutasyonları tanımlanmış primerler kullanılarak, elde edilen mRNA kümesinden sağlanan cDNA'lar üzerinde tanımlanmış ING4 primerleri ile β -aktin gen ifadesine göre ING4 gen ifade seviyesi ve dizin analizleri çalışıldı. **Sonuçlar:** p53 mutasyonları örneklerimizde gözlenmedi fakat p53 de görülen farklı bantların mutasyon taşımadıkları nukleotid dizin analizlerinde görülmüştür. Örneklerde β -aktin gen mutasyonları gözlemlenmiştir. ING4 çeşitlerinden V1, V2 ve V4 çeşitlerinin hakim olduğu ve gen ifade seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. **Tartışma:** Jel yürütmelerinde bulunan farklı p53 bantlarının GC'ce zengin tekrar dizilerinden kaynaklanan saç tokası yapısı oluşturması sebebiyle eksik yapıli işlevsiz p53 proteininin sentezlenmesine yol açmıştır. β -aktin geninde bulunan mutasyonlar hücre iskeletinde bozulmalara ve bazı pankreatik kanser dokularının metastatik özelliği ile ilişkilendirilebilir. ING4 gen ifade seviyesinin düşüklüğü ile birlikte işlevsiz p53 sebebiyle pankreatik kanser dokularında hücre döngüsü ve çoğalma kontrolünün bozulmasıyla ve neticede apoptozisin çalışmaması ve metastazisin gelişimini engellemeyen hücrel ortam ile kanser gelişiminin ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu arada sitoplazmada biriken ING4 çeşitleride ubiquinasyon yoluyla parçalanmaya giderek nisbi derişiklikleri de düşmektedir. Pankreatik kanser hastaları öykülerinde 1-2 yıl önce tip2 şeker hastası olduklarını dolayısı ile histon asetilaz ve histon deasetilaz ve IGF, MAPK ve p38 yoluyla cAMP ve PI-3K yolaklarının etkinliği anlaşılmaktadır. Her tip2 şeker hastası pankreatik kansere yakalanmadığına göre bu hastalarda yatkınlığın genetik ve çevresel alışkanlıkların etkinliği de dikkate alınarak, ING4 çeşitlerinin hücre içi dağılımları ve

pankreatik kanserlerde bu çeşitlerin işlevleri hakkındaki bilgilerin ortaya çıkarılması ING4'ün pankreas kanseri gelişimindeki rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: mRNA farklı kaynaşımı, Gen ifadesi, ING4 çeşitleri, p53, pankreatik kanser

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF ING4 GENE EXPRESSION LEVEL AND p53 GENE MUTATIONS IN PANCREATIC CANCER TISSUES

İbrahim Halil YILDIRIM

Doctoral Thesis, Department of Medical Biology

Supervisors: Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK and Prof. Dr. Celalettin CAMCI

May 2010, 111 pages

Preamble: Pancreatic cancer is one of the intractable malignant tumors with a 5-year survival rate is under 1% and characterized by rapid metastatic progression and resistant to medical treatments and management. p53 is a tumor suppressor gene and mutated in more than 50% of pancreatic cancers. p53 protein is involved in several central cellular processes and ING family proteins are the proteins involved in the regulation of p53 activity such as the cell cycle control, DNA repair mechanism and programmed cell death. ING proteins sustain the stability by extending the half-life of p53 protein by competing with MDM2 for the same binding site on p53. It also enhance p53 acetylation at Lys-382 is an important processes in p53 protein oligomerization. The ING family proteins stimulates the expression of p21 by binding to p21 promoter. Like other ING family members, ING4 is involved in suppression of cell proliferation and chromosome stability by means of their PHD binding domains and also involved in cell migration through liprin $\alpha 1$ and angiogenesis by way of NF- κ B. Because of high mutation rate of p53 in pancreatic cancers and the role of ING4 on p53 stability and importance of cell migration and angiogenesis in metastasis of pancreatic cancer, p53 mutations and ING4 gene expressions and mutations have been studied. **Material and methods:** The pancreatic cancer tissues obtained were used for DNA and mRNA population extraction. p53 genomic DNA was analysed using appropriate primers for known mutations on the DNA fraction. The mRNA population obtained was converted to cDNA to study for ING4 variants again using appropriate primers. All PCR products were analyzed using agarose and acrylamide gel electrophoresis followed by nucleotide sequence analysis. **Results and Discussion:** Our study has shown a decrease in gene expression of ING4 and its three splice variants of ING4 cDNA samples. Expected p53 gene mutations have not been observed as assessed by DNA sequencing analysis. Differing mobilities of p53 banding pattern were attributed to secondary structures that may cause to truncated mRNA synthesis which may results in dysregulation of cell cycle and proliferation. Mutation in β -actin gene may cause the cell cytoskeleton disruption and enhanced mobility in some pancreatic cancer tissues. Decreased expression of ING4 mRNA variants which were resulted due to alternative splicings (*_v2 and _v4*) involved in limited NLS regions of the gene that which restricts nuclear migration and cytoplasmic accumulation of ING4 proteins without triggering p53 and p21, in turn, dysfunction of apoptosis and enhancing metastasis in addition to the loss of NLS accelerates the ubiquitination of ING4 in the cytosol and again uninduction of p53 translation. An initial onset of type2 diabetes mellitus in pancreatic cancer patients suggests the importance of cAMP and PI-3K pathways through histone acetylase, histone deacetylase and IGF, MAPK and p38. Thus, not all type2 diabetes susceptible to pancreatic cancer and along with genetic predisposition and habitual environment, studying the cellular locations and functions of ING4 splicing variants in pancreatic

cancer due to different cellular functions of ING4 splicing variants, will explain better the role of ING4 in pancreatic cancer.

Key words: Alternative splicing of mRNA, Gene expression, ING4 variants, p53, Pancreatic cancer

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Pankreas kanseri, 5 yıllık yaşam süresi %1'in altında olan oldukça kötü huylu bir kanser türüdür (1). Gelişmiş ülkelerdeki kansere bağlı ölüm nedenlerinde ilk sıralarda yer alan pankreas kanseri, çok hızlı sistemik yayılması ve olağanüstü bölgesel tümör gelişimiyle diğer kanserlerden ayrılır (1). Bu özellikleri nedeniyle tedavi gören hastaların %75'inden fazlası tedavi aşamasına yönlendirilemeden yaşamını kaybeder (1). Pankreas kanseri, ileri evreye kadar belirti vermemesi nedeniyle "sessiz katil" olarak da isimlendirilmektedir (2). Pankreasta kanser oluşumunun hemen sonrasında gelişen metastaz, pankreas kanseri kaynaklı gerçekleşen ölümlerin yaklaşık %90'nının nedenidir (1). Pankreas kanserinde tıbbi tedaviye yanıt da oldukça düşük olup, cerrahi tedaviyle tümörün çıkarılması en çok tercih edilen yöntemdir (3). Buna rağmen, pankreas kanserine yakalanmış bir hastanın tedavi sonrasındaki 5 yıllık yaşam süresi oldukça düşüktür (1,3). Pankreas kanserinin gerek sessiz gelişmesi ve ilerlemesi ve gerekse tıbbi tedaviye direnç göstermesi nedeniyle, moleküler mekanizmalarının ortaya konulmasına yönelik yoğun çalışmalar gerçekleştirilmektedir (1). Pankreas kanseri nedenli ölüm oranlarının düşürülmesi ve kanser oluşumunun önlenmesi düşüncesiyle NCI (National Cancer Institute) tarafından da pankreas kanserinin moleküler biyolojisi ve genetiğinin daha ileri seviyede anlaşılması gerektiği vurgulanmıştır (3).

Diğer kanserlerde olduğu gibi, pankreas kanserinin de oluşum ve ilerleme mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (4). Klinik örneklerin de kullanıldığı moleküler analizler, pankreas kanserine eşlik eden moleküler ve genetik değişiklikler hakkındaki bilgilere katkı sağlamaktadır (3,5). Kötü huylu dönüşüm, hücre döngüsüne katılan genlerde gerçekleşen mutasyonların birikmesi ve hücre döngüsü kontrolünün kesintiye uğraması sonucunda ortaya çıkmaktadır (3). Pankreatik kanserlerde gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda, p53, p16 ve SMAD4 gibi hücre döngüsü kontrolünde rol alan tümör baskılayıcı genlerin yüksek sıklıkta mutasyona uğramış oldukları rapor edilmiştir (6,7). Pankreatik kanserlerin %50'sinden fazlasında p53 geninin işlev kaybı yada mutasyonlarına bağlı olarak hücre döngüsü kontrol mekanizmalarında hatalar vardır (6,7). Pankreatik kanserlerde gen ifade düzeyinin

değiştirdiği rapor edilen genlerden biri de ING1b genidir (8). ING (INhibitor of Growth) genleri, melezleme çalışmaları sırasında tanımlanmış ve genetik baskılayıcı elemanlar (Genetic Suppressor Elements; GSE) olarak isimlendirilmişlerdir (9). ING genlerinin ters-duyarlılık (antisens) dizileri ile bulaştırılan (transfekte edilen) hücrelerde büyüme ve çoğalma teşvik edilirken, ING genlerinin duyarlı (sens) dizileri ile bulaştırma hücre büyümesini baskılamaktadır (9). ING proteinleri p53 proteini ile de etkileşerek MDM2 (Murine Double Minute 2)'nin p53'e bağlanmasını engellemekte ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde veya programlı hücre ölümünün tetiklenmesinde rol almaktadırlar (10). ING proteinleri ayrıca NF- κ B protein bileşeni ile de etkileşerek, NF- κ B yolağına etki etmektedirler (11). ING proteinleri ayrıca, PHD (Plant Homodomain) bölgeleri aracılığıyla fosfoinositol yolağındaki uyarı iletiminde, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin yapılarına katılarak kromozom yapılarının gen transkripsiyonlarına göre değişimini etkilemektedirler (11). ING gen ailesinden ING4, ailenin diğer üyeleri gibi hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünde rol almaktadır (11). ING4 ailenin diğer üyelerinden farklı olarak anjiyogenez ve hücre göçü üzerinde de etkilidir (11). Multiple miyelom hücrelerinde ING4 geninin gen ifadesinin azalmasına bağlı olarak öncü-anjiyojenik faktörlerden interlökin-8 ve osteopontin molekülerinin gen ifade seviyelerinin arttığı belirlenmiştir (12). ING4 geni aynı zamanda hücre göçü, hücre yayılması ve dokunma engellenmesiyle (contact inhibition) de ilişkilidir (11). ING4'ün hücre hatlarındaki ektopik ifadesi (ekspresyonu) hücre yayılması ve hücre göçünü azaltmaktadır (13). ING4'ün bölgesel bağlayıcı (focal adhesion) moleküllerin ayrılmasında rol alan Liprin α 1 ile hücrelerin lamellipodlarında birlikte yer alıyor olması, hücre göçü ve hücre yayılmasında rol almasına işaret etmektedir (14).

Pankreas kanserinde gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada, ING4 geninin de yerleşik bulunduğu, kromozom 12p'de heterozigosite kaybı olduğu rapor edilmiştir (15). Baş boyun kanserlerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada da aynı kromozom bölgesinde heterozigosite kaybının sıklığı rapor edilmiştir (16). Yaptığımız çalışma ile, pankreas kanserinde heterozigosite kaybı rapor edilen 12p kromozom bölgesinde bulunan ING4'ün mRNA gen ifadesi ve mutasyonları çalışılmıştır. Ayrıca hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde rol alan p53 geninin mutasyonları da taranarak, p53 mutasyonları ve ING4 gen ifadesi arasında bir ilişkinin olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Damar dokusuna zengin olan ve dokunma engellemesi kaybı

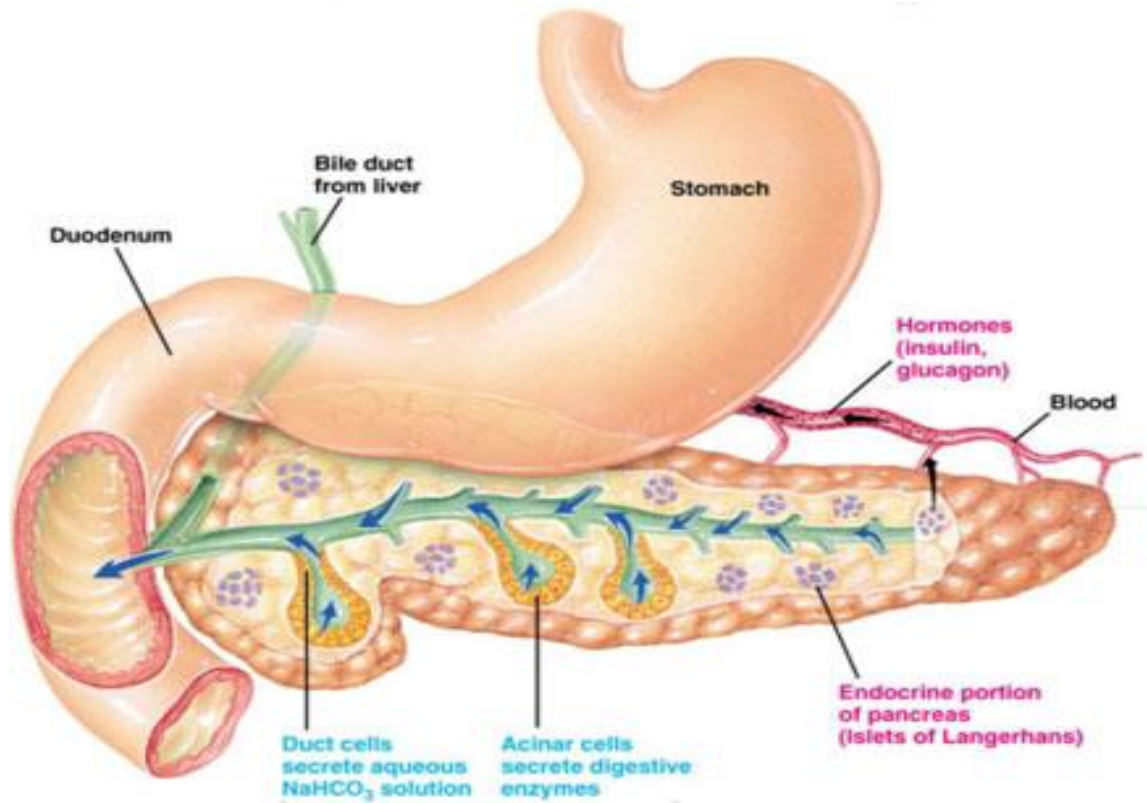
nedeniyle bölgesel yayılımın hızla ortaya çıktığı pankreas kanserlerinde ING4 ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Gerek anjiyogenez açısından, gerekse yayılım ve metastaz açısından pankreas kanserlerinde ING4 gen ifadesinin ve muhtemel genomik mutasyonlarının ortaya konulması, pankreas kanserinde ING4'ün aldığı rolleri açıklamakta yararlı olacaktır. Bu çalışmada, ING genlerinin p53 yolağı üzerinde hücre çoğalmasını baskıladıklarından hareketle, pankreas kanserinde ING4 gen ifadesi ve mutasyonları ile p53 gen ifadesi ve mutasyonları da incelenerek, pankreatik tümör gelişiminin seyri ile iki gen arasındaki değişimlerle ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas

2.1.1. Pankreas anatomi ve fizyolojisi

Pankreas, karın boşluğunda mide ile onikiparmak bağırsağı arasında yerleşik, 12-20 cm uzunluğunda, 3-4 cm genişliğinde ve 70-120 gram ağırlığında bir organ olup; vücuttaki iki ana fizyolojik işlemi düzenler (17,18). Pankreas ekzokrin ve endokrin salgı işlevlerini gerçekleştirerek hem sindirim hem de glukoz metabolizmasında rol alır (18). Yapısal olarak incelendiğinde pankreasın büyük bölümünün dış salgı işlevini gerçekleştiren hücreler tarafından oluşturulduğu görülür, iç salgı işlevi gören hücreler ekzokrin doku içerisine dağılmış olarak bulunurlar (Şekil 2.1) (18).

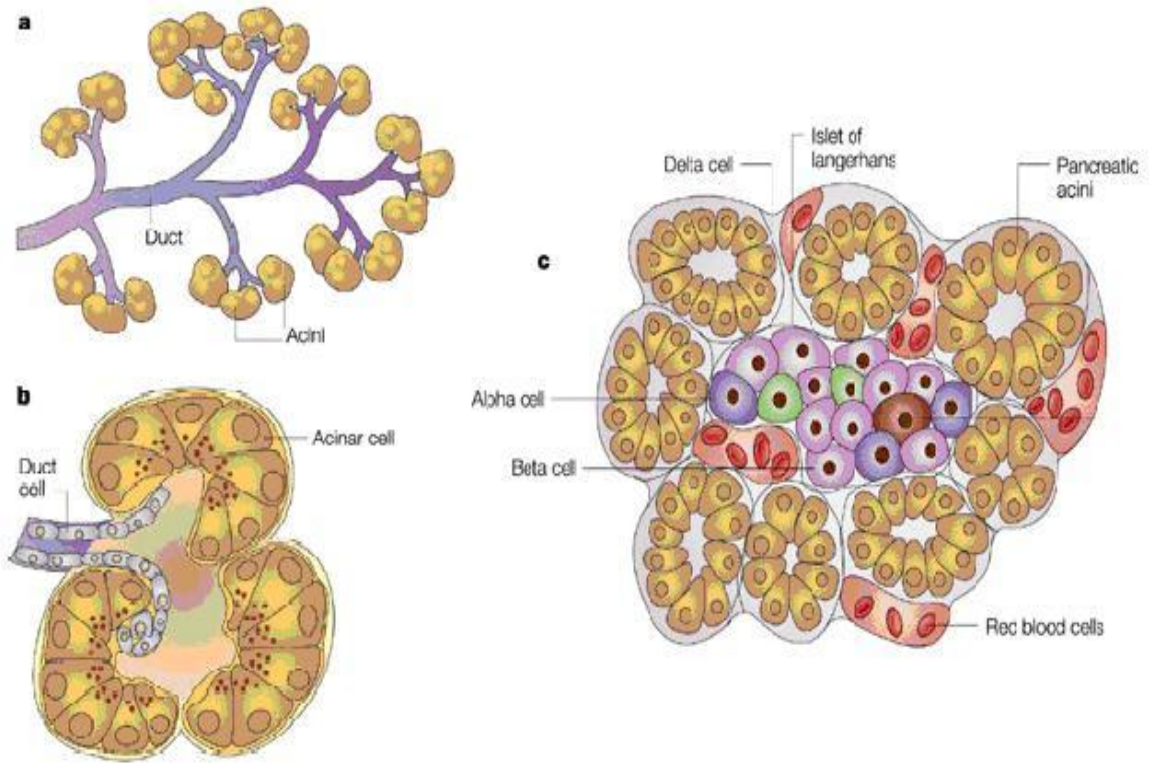


Şekil 2.1. Pankreasın yerleşimi ve yapısı. Pankreas karın boşluğunda onikiparmak bağırsağı ile mide arasında yerleşik endokrin ve ekzokrin işlevlere sahip bir organdır. Endokrin bölüm Langerhans adacıkları şeklinde kümelenmiş olup pankreas dokusu içine dağılmış haldedir. Ekzokrin bölüm, asinar ve kanal yapıları oluşturan hücrelerden oluşur (18).

Pankreasın ekzokrin işlevini gören kısmı; asinar ve kanal (duct) hücrelerinden oluşur (17,18). Asinar hücreler, sindirim enzimlerini üretmekte olan hücreler olup dallanmış

kanal sisteminin uçlarında üzümlük şeklinde kümeleşmişlerdir ve pankreatik dokunun büyük bir bölümünü teşkil etmektedirler (Şekil 2.2a,b) (17,18). Asinüsler içine biriken salgı lobcuklar içi kanalcıklar aracılığı ile “Lobcuklar arası kanallara” boşaltılır (18). Lobcuklar ve asinüsler arasında bağ dokusu bulunmaktadır (17).

Pankreasın iç salgı bölümü “Langerhans adacıkları” denilen özel hücre ve damar kümeleri tarafından oluşturulmuştur (19). İnsan pankreasında bir milyondan fazla “Langerhans adacığı” bulunmaktadır (19). Langerhans adacıkları pankreasın dış salgı yapısının içinde adacıklar oluşturacak bir biçimde dağılmışlardır (Şekil 2.1) (18,19). Langerhans adacıklarında α , β ve δ olmak üzere üç ana tipte endokrin hücre bulunmaktadır (19). β -hücreleri Langerhans adacıklarındaki hücrelerin %80’ini oluşturur ve insülin hormonunu salgırlar. α -hücreleri glukagon salgırlarken, δ -hücreleri de somatostatin salgılamaktadır (Şekil 2.2c) (18,19).



Şekil 2.2. Pankreasın anatomisi. Pankreas hem endokrin hem de ekzokrin salgı işlevlerine sahip olan bir organdır. Ekzokrin işlevler asinar ve kanal yapılarını oluşturan hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Endokrin işlevler ise, pankreas dokusu içerisine dağılmış olan Langerhans adacıkları tarafından gerçekleştirilmektedir. Langerhans adacıklarında farklı salgı işlevlerine sahip, alfa, beta ve delta hücreleri bulunmaktadır. **a)** Pankreatik asinüslerin dağılımı, **b)** Asinüs yapısı, **c)** Pankreatik hücrelerin dağılımı (18).

2.1.2. Pankreas organ gelişimi

Morfolojik ve işlevsel farklarına rağmen pankreasın hem endokrin hem de ekzokrin hücreleri aynı embriyonik kökenden gelmektedirler (20). Gastrulasyon sırasında endoderm tabakasından gelişen çok katlı epitel hücrelerinin hemen hepsi hem endokrin hem de ekzokrin hücre potansiyeline sahiptirler (20). Farklılaşma sırasında, uyarı sağlayan birçok molekül görev alır ve uyarı ağının her bir elemanı hücre tipine ve farklılaşma zamanına bağlı olarak işlev kazanır (20). Pankreas gelişiminde genetik program, transkripsiyon faktörlerinin ve çevre dokulardan gelen sinyallerin belli bir hiyerarşiye göre işlemesiyle gelişmektedir (20). Endoderm tabakasından pankreasa dönüşecek bölge sonic hedgehog (SHH) uyarısının olmamasıyla belirlenir (20,21). Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox gene 1) transkripsiyon faktörü pankreatik hücrelere kaynaklık eden erken pankreatik projenitör hücrelerin çoğalması ve dallanması için gereklidir (20,21). Pdx1 anne karın evresi (fetal) gelişimi sırasında da beta hücre hatlarında fazlaca ifade edilmekte olup, beta hücrelerinin farklılaşmasında ana rol oynar (20,21). Pdx1 erişkin pankreasında da beta hücrelerinin işlevleri için zorunludur, insülin, glukokinaz ve GLUT2 gibi glukoz homeostasisinde rol alan genlerin transkripsiyonunda rol alır (20,21). Farelerde pdx1 geninin mutasyona uğratılması, pankreatik gelişimi durdurur (20,21). Pdx1 geni taşımayan fareler, pankreasdan yoksun olarak doğmuşlardır ve doğumdan birkaç gün sonra ölmüşlerdir (20,21).

Neurogenin 3 (Ngn3), birçok hücre tipinde hücrenin hangi hücre olacağını belirlediği mekanizmalarda rol alan transkripsiyon faktörlerinin dahil olduğu “basic helix loop helix” ailesinin bir üyesidir (20). Memelilerde Ngn3, nöral öncül hücrelerin ve bütün pankreatik endokrin hücrelerin belirlenmesinde görev alır (20). Ngn3 geninden yoksun farelerde Langerhans adacıkları gelişmez ve bu fareler doğumdan kısa süre sonra ölürlere ancak, ekzokrin dokuları ve pankreas kanalları normaldir (20).

Ngn3 beyin gelişimi sırasında nöroblastların gelişmesinde de rol alır (22). Ngn3 ifade edilen hücrelerde δ , Serr ve Jag olarak adlandırılan hücre dışı almaç molekülleri ifade edilir (22). Bu almaçlar aracılığıyla Ngn3 ifade edilmiş olan hücrelere komşu olan diğer hücrelerde Ngn3 gen ifadesi engellenir, bu durum “yan engelleme” (lateral inhibition) olarak adlandırılır (22). Pankreas gelişiminde de, Ngn3 endokrin hücre öncüllerinin gelişiminde rol alır ve çevredeki diğer hücrelerin endokrin hücrelere dönüşmemesi yan engelleme ile sağlanmış olur (22).

2.2. Kanser

Kanser, bastırılmamış hücre çoğalmasıyla karakterize, birçok hücre tipinde ve organda gelişebilen 100'den fazla çeşitteki hastalığın ortak adıdır (23). Kanser gelişimi genellikle erişkinlerde sonradan kazanılmış bir genetik hastalıktır (23). Kanser gelişiminde genomik rol, 19. yüzyılın sonu ile 20. yüzyılın başında David von Hansemann ve Theodor Boveri'nin çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (24). Bu araştırmacılar kanser hücrelerini mikroskop altında incelerken, normal olmayan kromozom yapılarını görmüşlerdir (24). Bu sonuçlar, kanserin kalıtsal materyaldeki değişimlerden kaynaklanan anormal klonlardan köken aldığına yönelik düşüncelere yol açmıştır (24). Bu düşünce, DNA'nın kalıtsal materyal olduğunun ve yapı ve işlevlerinin aydınlatılması sonrasında, DNA hasarına neden olan kimyasal etkenlerin aynı zamanda kansere neden olduğunun ortaya konulmasıyla da desteklenmiştir (25). Bu çalışmalardan sonra, kanser hücrelerindeki genetik değişimler yoğun olarak çalışılmış ve kronik miyeloid lösemide 9 ve 22'nci kromozomlar arasındaki translokasyon ortaya konulmuştur (24). Daha sonra kanser hücrelerinden alınan total genomik DNA, normal NIH3T3 hücre hatlarına aktarılmış ve normal olan bu hücrelerde kanser geliştiği ortaya konulmuştur (24,26,27). Kanser dönüşümüne neden olan özgün DNA bölgesinin ayrıştırılması sonrasında HRAS geninin 12. kodonunda bulunan glisin amino asitinin valin amino asidine dönüşümüne neden olan G>T mutasyonu ortaya konulmuştur (24,28,29). 1982'de gerçekleştirilmiş bu çalışma ile kanser gelişiminde rol alan anormal genlerin ortaya konulmasına yönelik çalışmalar için de bir çıkış açılmıştır (24).

Vücutta bulunan diğer bütün hücreler gibi kanser hücreleri de döllenmiş yumurtadan gelişen, aynı diploid genoma sahip tek hücreden köken almaktadırlar (23). Döllenmiş yumurtayla kıyaslandığında kanser hücrelerinde; kromatin yapısal değişimleri ve gen ifade seviyelerinin değişmesine neden olan epigenetik değişimlerin de gerçekleşmekte olduğu görülür, ayrıca sitozinlerden metillenme gibi epigenetik etmenler kalıtsaldır ve anne hücreden yavru hücrelere aktarılmaktadırlar (30,31). Kanser hücrelerinin gen ifadelerinin değişmesine neden olan epigenetik etmenler tek başlarına kanser gelişimini başlatamayabilirler ancak, mevcut mutasyonların etkilerini güçlendirerek onkogenik dönüşümün gerçekleşmesine katkıda bulunurlar (30). Epigenetik düzenlenmelerdeki kontrol kayıpları neoplastik hastalıkların oluşması yönünde genetik mutasyonlara katkıda bulunmaktadırlar (30). Epigenetik etmenlerdeki değişimler karmaşık ve dinamik olan değişimlerdir (30). Bunlar; DNA metilasyonu, nükleozom yeniden şekillenmesi,

translasyon sonrası histon işlenmeleri, histon çeşitlerinin (varyant) oluşturulması ve kodlamayan RNA etkileri olarak adlandırılabilirler (30). Değişik histon çeşitlerinin oluşturulması gibi, kanser gelişiminde önemli roller oynayan bazı proteinlerin farklı (alternatifli) kesilip-eklenmiş bazı çeşitlerinin belli kanserlerde daha fazla ifade edildiği de görülmüştür (32,33). Bu durum, farklı kesip-eklenme (alternative splicing) mekanizmasının da kanser gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir ve bazı kanserlerde bu farklı kesilip-eklenmiş yapılar, ilgili kanser tipi için belirteç olarak değerlendirilmektedir (33). Hücre nükleer genomundaki değişimlere ek olarak yaklaşık 17 kb büyüklüğündeki mitokondri genomunda da mutasyonlar gerçekleşebilir (34). Kanser hücrelerindeki mitokondrilerde gerçekleşen somatik mutasyonlar rapor edilmiştir ancak, kanser gelişimindeki rolleri açık değildir (34).

2.2.1 Kanser hücrelerinin özellikleri

Kanser hücreleri, gerek hücresel düzeyde gerçekleşen değişimler gerekse çevre ve bulundukları sistem içerisinde gerçekleşen değişimlerden kaynaklı olarak normal eşdeğer hücrelerden farklı özelliklere sahiptirler (35). Kanser hücrelerinde hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülür (35,36). Bu normal olmayan durumlar kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinin ortaya çıkma nedenidir (35,36).

Normal hücreler, büyüme faktörlerine bağlı olarak büyüme ve çoğalma faaliyetlerini gerçekleştirirken ortamda bulunan büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalırlar ve daha sonra hücre döngüsünün G_0 evresine girerler (35). Kanser hücrelerinin çoğalması, yoğunluğa bağlı engellemeden etkilenmez, normal hücreler gibi hücre döngüsünün G_0 evresinde durmak yerine kontrolsüz *in vivo* çoğalma davranışlarını sürdürmeye devam ederler (35).

Kanser hücreleri, vücuttaki diğer normal hücrelere göre, hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar (37). Bu özellikleri, tümör hücrelerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda kontrolsüz çoğalmalarını kolaylaştırmaktadır (30,35). Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağımlı olmaması, bazı durumlarda hücre içi uyarı sistemlerinde gerçekleşen anormalliklerden ve hücre çoğalmasını sağlayan uyarı yollarında görev yapan büyüme faktörü almaçlarının ya da Ras proteini veya protein kinazlar gibi başka proteinlerin kontrolsüz işlevlerinden kaynaklanmaktadır (30,35,38).

Kanser hücrelerindeki hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimleri de daha düzensizdir (35,37,39). Yüzey yapışma/tutunma (adezyon) moleküllerinin ifadesindeki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği, normal hücrelere kıyasla daha düşüktür (35,37,39). Karsinomların gelişmesinde, epitel hücrelerindeki başlıca tutunma molekülü olan E-kadherin'in ortadan kalkması büyük önem taşımaktadır (35,39). Tutunma molekülerinde gerçekleşen azalmaya bağlı olarak, diğer çevre hücreler ve doku bileşenleri tarafından hücreler üzerinde gerçekleşen sınırlama kalkmakta ve bu durum kanser hücrelerinin yayılma ve metastaz yapma yeteneklerini arttırmaktadır (35). Kanser hücrelerinin tutunma yeteneklerinin azalması, morfolojilerinin ve hücre iskeletlerinin de değişmesine yol açmaktadır (35). Tümör hücrelerinin çoğu, hücre dışı matrikse veya komşu hücrelere tutunamadıkları için normal hücrelerden daha yuvarlaktırlar (35).

Hücre-hücre etkileşimleri açısından normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki en önemli farklardan biri dokunma engellemesi (kontakt inhibisyon) kaybıdır (37,40). Hücre kültürü sırasında, normal fibroblastlar, kültür kabı üzerinde komşu hücrelerden biri ile temas edinceye kadar ilerler ve bu temasın etkisiyle hareketlerine son verirler ve ayrıca hücreler birbirlerine tutunarak kültür kabı yüzeyinde düzenli olarak sıralanırlar (37,40). Tümör hücreleri ise, komşu hücrelerle temas ettikten sonra da hareketlerine devam ederler (37,40). Çoğalmalarına, yanlarındaki hücrenin üzerine çıkarak düzensiz, çok katlı kümeler oluşturacak şekilde devam ederler (37,40). Normal hücreler, hücre-hücre teması sonucunda sadece hareket etmeye değil, çoğalmaya da son verirken, kanser hücreleri çoğalmayı engelleyen bu etkileşime duyarsızdırlar (37).

Kanser hücreleri, hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücrelerinin normal doku içine girmesine olanak veren proteazlar salgırlar (41). Hücrelerden salgılanan kollojenaz, karsinomların bazal laminayı parçalayıp aşarak altındaki bağ dokusuna girebilmesi açısından önem taşır (41). Ayrıca, kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) hızlandıran büyüme faktörleri de salgırlar (42). Tümör kitlesinde hücre sayısı 1 milyonu aştığında hücrelere oksijen ve besin maddelerinin ulaşması ve tümörün büyümeye devam edebilmesi için yeni damarların oluşması gereklidir (35). Bu damarlar tümör hücresi tarafından salgılanan ve çevre doku kılcal damarlarının duvarlarındaki endotel hücrelerinin çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkar ve sonuçta tümörün içine doğru uzanan

yeni kılcal damarlar oluşur (42). Yeni damarların oluşumu sadece tümörün büyümesi açısından değil, bazı tümör hücrelerinin tümör kitlesinden ayrılarak anjiyojenik uyarı sonucunda gelişen yeni kılcallara kolayca girebileceğinden, bu durum metastatik yayılım açısından da önemlidir (42).

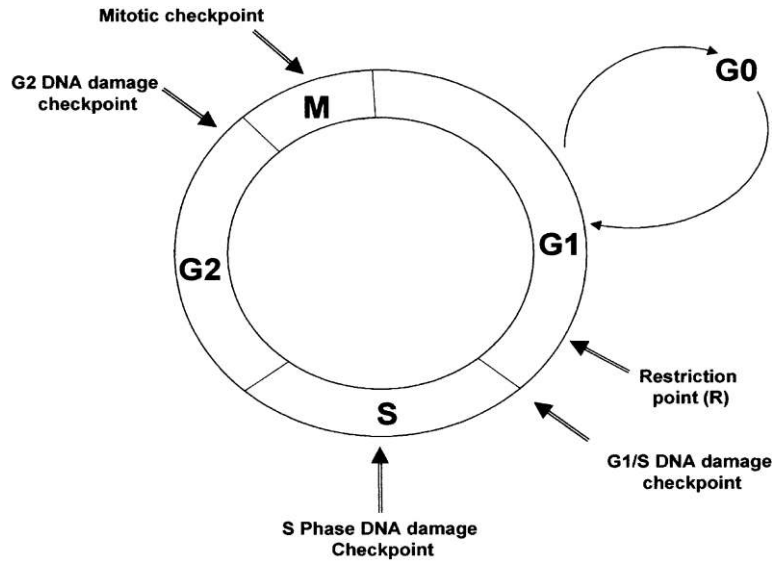
Kanser hücreleri, normal hücreler gibi farklılaşmayıp, kontrolsüz çoğalmaları ile uyumlu olarak farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar (43). Kandaki farklı hücrelerin tümü kemik iliğindeki ortak bir kök hücreden köken alarak eritrosit, lenfosit, granülosit, ve makrofajlara farklılaşırlar (43). Lösemi hücreleri ise, farklılaşmayıp, olgunlaşmanın erken evrelerinden birindeki durumlarını koruyarak, bölünme ve çoğalma yeteneklerini sürdürürler (43).

Programlı hücre ölümü, birçok hücre türünde farklılaşmanın temel öğelerindendir (43). Kanser hücrelerinin çoğunda programlı hücre ölümü görülmediğinden bu hücreler normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar (43). Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden etkilenmemesi, tümör gelişimini önemli ölçüde hızlandırır (43). Normal hücrelerde DNA hasarı gerçekleştiğinde programlı hücre ölümü başlatılmasına rağmen, kanser hücrelerinde bu durum gerçekleşmez (43). Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümüne gidememesi, radyasyona ve DNA hasarına yol açarak etki eden kemoterapotik ilaçlara karşı direnç göstermelerine yol açar (43). Kanser hücreleri, programlı hücre ölümünden kaçışlarına ek olarak, ökaryotik kromozomların uçlarını kısaltmaktan koruyan telomeraz enziminin ifade edilmesi nedeniyle sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptirler (43).

Kanser gelişimine neden olan temel değişiklik, kanser hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalma isteğidir (35). Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden uyarılara normal tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalır ve büyümeyi sürdürürler (35). Bu çoğalmaya bağlı olarak normal doku ve organları da istila ederek sonunda tüm vücuda yayılırlar (35). Kanser hücrelerinde ortak olan özellik; çoğalmayı denetleyen mekanizmaların yani hücre döngüsünün kontrolünün ortadan kalkmasıdır ve bu durumun gelişmesinde çok hücreli sistemlerde biriken anomaliler önemli rol oynamaktadırlar (35).

2.2.2. Hücre döngüsü

Kanser hastalığının tanımlanmasındaki en temel açıklama, hücrelerin normal büyüme/çoğalma kontrolü olmaksızın çoğalmalarıdır (44). Bölünen ve çoğalan bu hücreler ya köken aldıkları noktada yada yayılarak ulaştıkları diğer noktalarda vücudun normal işlevlerini engellerler (44). Kanser hücrelerinin yeni damar oluşturma, metastaz yapma ve programlı hücre ölümünden kaçma gibi özellikleri de olmakla birlikte kanser hastalığının temelinde sınırlandırılmayan hücre çoğalması yatmaktadır (44). Hücre çoğalması, hücrelerin hacim ve içerik olarak büyümeleri, DNA'larını iki katına çıkarmaları ve iki yavru hücre oluşturmaları şeklindeki döngüsel bir işlemdir (44). Bu döngü, hücrenin bölünme için gerekli hazırlığı yaptığı G₁ evresi, DNA'sını iki katına çıkardığı S evresi, bölünmeye hazırlandığı G₂ evresi ve genetik materyalin eşit şekilde dağıtılarak iki yavru hücrenin oluşturulduğu M evresinden oluşur (44). Hücresel çoğalmanın karmaşıklığı ve geri dönüşümsüz olması nedeniyle, hücre döngüsündeki evreler arasında kontrol noktaları vardır (Şekil 2.3) (44). Kontrol noktalarındaki en önemli özellik, bir evre bitmeden diğer evrenin başlatılmamasıdır (44).



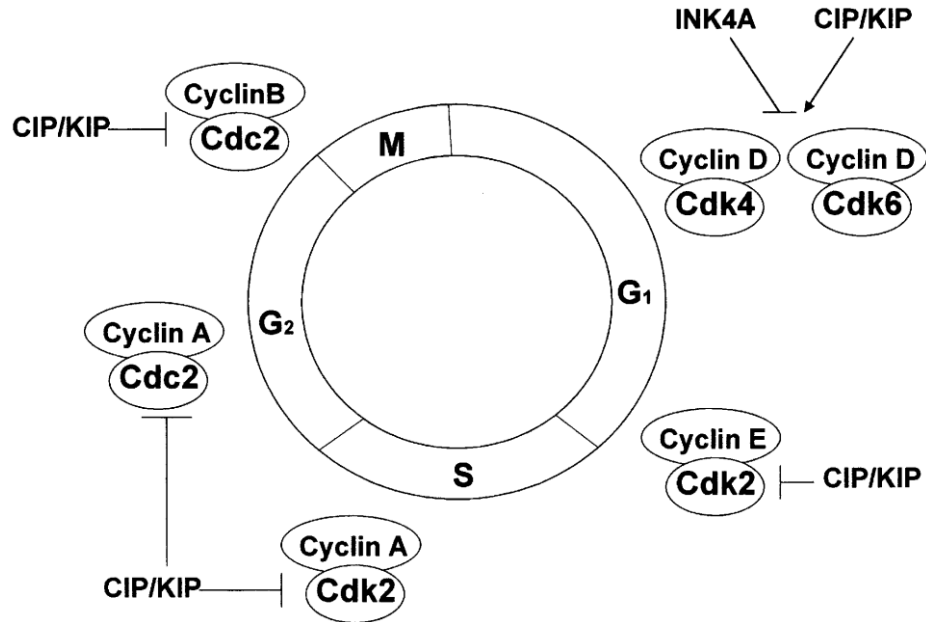
Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları şeması. Hücre döngüsü, DNA sentezinden önceki bir ara olan G₁ (gap), DNA'nın sentezlendiği S evresi, sentez sonrası ara; G₂ ve mitoz evrelerinden oluşmaktadır. Geç G₁, G₁-S geçişi, S, Geç G₂ ve mitozda hücre döngüsünün ilerlemesinin durdurulabildiği kontrol noktaları vardır. (44).

2.2.2.1. Hücre döngüsünün kontrolü

Hücre döngüsü, döngüye özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağılı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilmektedir (44,45,46). Siklin, CDK ve CDI'ların düzeyleri hücre

döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılıklar gösterir ve karmaşık bir düzen içerisinde döngünün ilerlemesi sağlanır (44,45). CDK'lar kendi başlarına bulunduklarında işlevsel değildirler, ancak siklin proteinleri ile birleşerek siklin-CDK kompleksleri oluşturarak işlev kazanırlar (44,45). Siklinler bu komplekslerin düzenleyici alt üniteleri, CDK'lar ise katalitik alt üniteleridir (45). Siklinler (A, B1, D ve E), hücre döngüsünün çeşitli evrelerinde döngüsel olarak bir taraftan sentezlenirken diğer taraftan da yıkılırlar, bu proteinlerin yapım ve yıkım döngülerini vurgulamak amacıyla siklinler olarak adlandırılmışlardır (Şekil 2.4) (44,45).

Siklinler periyodik yapım ve yıkımları ile ilişkili bulundukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların işlevlerinin düzenlenmesini sağlarlar (45). CDK'ların işlevleri yalnızca siklinlerle düzenlenmemektedir, ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenmektedir (45). CDI (p15, p18, p19 ve p27)'lar ise ya siklinlere ya CDK'lara ya da siklin-CDK bileşimlerine (komplekslerine) bağlanarak CDK'ların işlevlerini engellerler (45). Siklinlerin hücrel değişimleri transkripsiyon seviyesinde düzenlenmektedir (45). Yıkımları ise "ubiquitin" metabolik yoluyla sağlanır (45).



Şekil 2.4. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde siklinler rol almaktadırlar. Siklinler hücre döngüsünün düzenlenmesinde farklı etkenlere bağlı olarak farklı zamanlarda ifade edilmektedirler. D tipi siklinler mitoz bölünmeyi uyaran etkenlere bağlı olarak sentezlenen başlatıcı siklinlerdir ve G₁ evresinde CDK4 ve CDK6'nın işlev kazanmasında rol alırlar. Siklin E hücre döngüsünün G₁/S geçişi sırasında sentezlenir ve hızlıca yıkılır. Siklin A DNA sentezinin gerçekleştirildiği S evresi boyunca sentezlenir, S evresinin sonunda yıkılır. Siklin B1 S evresinin sonlarında sentezlenir ve mitoz bölünmenin anafaz evresinde yıkılır (44).

D tipi siklinler (D1, D2 ve D3) başlama siklinleri olarak adlandırılır ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak ifade edilirler (45). Mitojenler ortamdan uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar (45). Hangi tip siklin D'nin ifade edileceği doku tipine özgüdür (45). Örneğin, T lenfositlerde D3 tipi siklin ifade edilmektedir (45). D tipi siklinler CDK4 ve CDK6'nın düzenlenmesinde rol alırlar (45). Siklin E, CDK2'nin düzenlenmesinde rol alır ve G₁/S fazlarının sınırında geçici olarak sentezlenir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır (45). Siklin A ve B1 mitotik siklinlerdir (45). Siklin A, S fazı boyunca sentezlenir ve anafaz sırasında da yıkılır (45). Siklin A, CDK2 ile bileşim yapar ve bu bileşimin DNA replikasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (45). Siklin B1 ise S evresinin geç döneminde sentezlenir ve G₂ fazından M fazına geçerken sentezi en üst seviyeye erişir, anafazda da yıkılır (45). Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve oluşturdukları bileşim MPF (M-phase/maturation promoting factor) olarak da bilinir (45). Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozdan çıkar ve G₁'e tekrar geri döner (45).

Hücre döngüsünde rol alan proteinler, protein protein etkileşimleriyle birbirlerinin işlevlerini düzenlemektedirler (44,45,46). CDK'lar siklinlerle etkileşerek işlev kazanırken, CDI'lar CDK'ların işlevlerini engellerler (44,45,46). İşlev kazanan CDK'lar substratları fosforilleyerek işlevsel hale getirirler (44,45). Etkilenen substratın durumuna göre hücre döngüsü ya durur yada bir sonraki aşamaya geçer (44,45). Örneğin, pRb hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolünde anahtar bir rol oynamaktadır (44,45,46). Farklılaşmasını tamamlamış dinlenme durumundaki veya yaşlı "senesence" hücrelerde pRb ifade edilir ve defosforile halde bulunur (44,45). pRb, normal işlevi gereği hücre döngüsünü G₁ fazının sonunda bulunan bir kontrol noktasında (G₁/S kontrol noktası) durdurur (44,45,46). pRb hücre döngüsü üzerindeki bu engelleyici etkisini bir transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F ailesini bağlayarak gerçekleştirir (44,45,46). E2F ailesinin engellenmesiyle hücre bir sonraki faz olan S fazına geçemeyeceğinden, döngü durur (44,45,46). G₀ evresindeki bir hücre bölünme uyarısı aldığı anda ise, hipofosforile durumda olan pRb CDK'ların etkisiyle fosforillenir ve M evresine kadar fosforile durumda kalır (44,45,46). Fosforile durumdaki pRb, E2F ailesini bağlayamayacağından E2F serbest kalır ve hücre G₁'den S evresine geçer (44,45). E2F ailesi, S evresine girişi sağlayan DNA polimeraz α , myc ve timidin kinaz gibi bir takım düzenleyici proteinlerin gen ifadelerini olumlu yönde etkiler (45).

Sonuçta CDK'ların işlev kazanmaları yada engellenmeleri pRb ve E2F üzerinden hücre döngüsünün ilerlemesine yada durmasına neden olmaktadır (44,45).

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde p53 tümör baskılayıcı geni de oldukça önemli bir role sahiptir (44,47). p53'ün birçok insan kanserinde ve Li Fraumeni Ailesel Kanser Sendromunda da mutasyona uğramış olduğu ortaya konulmuştur (44,46,47). p53 geninin kaybına (delesyon) bağlı olarak kanser gelişiminde iki olası yoldan bahsedilebilir (44). İlki, DNA hasarı p53 proteini seviyesini ve işlevini ve ikincil olarak da p21 seviyesini artırır (44). Artmış p21, hücrelerin G₁'den S'ye gidişini sağlayan siklin/cdk bileşiminin işlevini engelleyerek retinablastom proteininin hiperfosforilasyonuna engel olur ve hücre döngüsü durdurulur (44,47). p21 geninde hata olan hücreler, DNA hasarına bağlı olarak G₁/S geçişini durdurumaktan yoksundurlar (44). p53, G₁/S geçişini düzenlediği gibi ikinci etkisini DNA hasarı sonrasında programlı hücre ölümü olan apoptozu da başlatarak gerçekleştirir (44).

2.2.3. Programlı hücre ölümü

Programlı hücre ölümü, erişkin dokularının korunmasında ve embriyo gelişiminde anahtar rol oynayan normal bir fizyolojik olaydır (48). Erişkinlerde programlanmış hücre ölümü, hücre çoğalmasının dengelenmesi ve dokulardaki hücre sayısının korunmasında önemlidir (48). Gelişim sırasında birçok dokudaki istenmeyen hücrelerin elenmesinde programlı hücre ölümü anahtar rol oynamaktadır (48). Programlı hücre ölümü, hasarlı veya tehlike oluşturabilecek olan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak bir savunma sistemi de oluşturur (48). Örneğin, virüsle bulaşmış (enfekte olmuş) hücreler sıklıkla programlı hücre ölümüne girerler ve böylece yeni virüs taneciklerinin oluşumu engellenir ve virüsün konak organizma içinde yayılımı sınırlandırılır (48). DNA hasarı gibi durumlar da programlı hücre ölümünü uyarır (48). Örneğin kanser gelişimine yol açabilecek hasarlı DNA'ları taşıyan hücreler programlı hücre ölümüyle ortadan kaldırılırlar (48).

Programlı hücre ölümü "apoptozis" olarak ilk defa 1972 yılında kullanılmış olup, dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan ve yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (45). Programlı hücre ölümü, dokularda gelişen bir diğer hücre ölüm şekli olan nekrozisten birçok özelliği açısından farklı olan bir hücre ölüm şeklidir (45). Programlı hücre ölümünün özgün bir durum olduğu, nekrozisle

karşılaştırılarak daha iyi vurgulanabilir (45). Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücreler şişerken, programlı hücre ölümünde hücreler tam tersine küçülür (45). Nekrozda kromatin yapısı hemen hemen normal hücredekine benzer görünürken programlı hücre ölümünde kromatin yapı çekirdek zarının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır (45). Nekrotik hücrelerde plazma zarı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içeriği dışarı çıkarak enflamasyona neden olur (45). Programlı hücre ölümünde ise hücre zarı bütündür ve hücre zarında küçük cepçikler oluşur, daha sonra bu yapılardan “apoptotik cisimcikler” denilen değişen miktarlarda hücre içeriği ihtiva eden yapılar gelişir ve bu yapılar makrofajlar yada komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (45). Programlı hücre ölümünde görülen bir diğer değişiklik de plazma zarının iç yüzünde bulunan fosfatidil serin molekülünün erken evrede zarın dış yüzüne geçerek komşu hücre ve makrofajlar tarafından bu hücrelerin tanınmasında rol oynamasıdır (45). Programlı hücre ölümünün en özgün yönlerinden biri DNA’nın, DNaz tarafından nükleozomlar arasından kesilmesiyle 170-200 baz çiftlik yada katları şeklinde DNA parçacıklarının oluşturulmasıdır (45). Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü oluşmasına neden olur (45).

Programlı hücre ölüm mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalar *C. Elegans*’ın gelişimi sırasında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilmiştir (48). Normal nematod gelişimi sırasında, toplam 1090 vücut hücresinin 131’i programlı hücre ölümüyle ortadan kaldırılır (48). Programlı hücre ölümünde *ced-3* ve *ced-4* olarak adlandırılan iki gen gereklidir ve bu genlerden herhangi birisinin işlevi engellenecek olursa normal programlı hücre ölümü gerçekleşmez (48). Diğer bir gen olan *ced-9* ise programlı hücre ölümünü engellemektedir ve bu gende gerçekleşecek olan bir işlev kaybı, normalde sağ kalacak olan hücrelerin de ölmesine neden olur (48). Memelilerde de *ced-3*, *ced-4* ve *ced-9* ile ilişkili genler tanımlanmıştır (48). Bu genlerin kodladığı proteazlar aktif bölgelerinde sistenin (C) içerdikleri ve substratlarını aspartik asitten (Asp) sonra kestikleri için “kaspaz”lar olarak tanımlanmışlardır (48,49). Kaspazlar işlevsiz öncüller olarak sentezlenirler ve genellikle diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteolitik kesim ile işlev kazandırılırlar (48,50). Başlatıcı kaspazın işlev kazanmasıyla aşağı yöndeki diğer kaspazlarda işlev kazanırlar ve böylece hücre ölümünü sağlayan bir zincirleme tepkime başlatılmış olur (45,50).

Nematodlardaki *ced-4*'ün memelilerdeki eş yapısı Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) olarak adlandırılan bir protein kodlamaktadır ve bu protein kaspazlara bağlanarak kaspazların işlev kazanmalarına neden olur (45,48,50). *ced -9*, nematodlarda kaspazların işlevlerini engelleyen bir protein kodlar, memelilerde ise bu durum Bcl-2 ailesi olarak adlandırılan bir protein ailesi tarafından düzenlenmektedir (49,50). Bcl-2 ailesi, geniş bir aile olup Bax, Bad, Bid, Bcl-X₅ gibi bir kısım üyelerinin programlı hücre ölümünü olumlu etkilediği, Bcl-2, Bcl-X₁ gibi bazı üyelerinin de programlı hücre ölümünü olumsuz etkilediği bir ailedir (50). Bcl-2 ailesinin üyeleri kendi aralarında eş-ikili yada farklı-ikili yapılar oluştururlar (48,50). Bir hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin programlı hücre ölümünü özendiren üyeleri ile programlı hücre ölümünü engelleyen üyelerinin nisbi oranına bağlıdır (45,48). Bcl-2/Bax oranı, bazı hematolojik kanserlerde belirteç olarak değerlendirilmektedir (45). Bcl-2 proteini özellikle mitokondri dış zarında bulunmaktadır ve mitokondriye iyon giriş çıkışının düzenlenmesinde rol almaktadır (48,49). Bax proteini ise sitoplazmada bulunmakta ve programlı hücre ölümü uyarısı oluşmasında önemli rol oynamaktadır (45,50). Programlı hücre ölümü, başlangıç noktaları değerlendirmede esas alınarak iki farklı yolak olarak incelenebilir (49).

Bu yolaklardan ilki “intrinsic” yada mitokondriyal yolak olarak adlandırılır ve bu yolakta mitokondri anahtar bir rol oynar (49). Bu yolaktaki başlangıç uyarılar henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, Bcl-2 protein ailesinin öncü- ve ters-apoptotik üyeleri arasındaki dengenin bozulması bu yolağın başlamasında rol oynamaktadır (45,49). Örneğin, DNA’da gerçekleşen tek yada çift zincir kırılması, nükleotid eksikliği gibi hasarlarda p53 proteininin fosforilasyonu artar (49). Fosforilasyonu artan p53 proteini etkisini iki şekilde gösterebilir; eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre döngüsü durdurulur ve DNA’nın tamir edilmesi sağlanır, DNA’da gerçekleşen hasar büyükse ve tamir edilemiyorsa p53 proteini Bax gen ifadesini uyararak Bcl-2/Bax oranını değiştirir ve programlı hücre ölümünü başlatır (45). Bax mitokondri zarına bağlanarak zarı gözenekler açılmasına neden olur (45,50). Geçirgenliği bozulan mitokondri membranından, mitokondri iç membranında elektron taşıma zincirinde rol alan sitokrom-c ve ayrıca apoptozis-indükleyici faktör (AIF; Apoptosis-inducing Factor) sitoplazmaya salınarak programlı hücre ölümünü geri dönüşümsüz olarak başlatırlar (45,49). Sitokrom c, sitoplazmik bir protein olan Apaf-1’e bağlanır ve Apaf-1’i işlevsel hale getirir, daha sonra ATP’nin de katılımıyla

“apoptozom” olarak adlandırılan bileşim oluşur (45). Bu bileşim, işlevsel olmayan kaspaz-9’u işlevsel kaspaz-9 haline çevirir (48,49). İşlevsellik kazanan kaspaz-9, kaspaz-3’ü işlevsel hale getirir ve kaspaz-3’de deoksiribonükleaz engelleyicisi proteinin (ICAD; Inhibitor of Caspase-activated Deoxyribonuclease) işlevini engelleyerek “kaspazla işlev kazanan deoksiribonükleaz” (CAD; Caspase-activated Deoxyribonuclease)’ın serbestleşmesini sağlar, bu da programlı hücre ölümüne has özellikler olan kromozom yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur (45). Kaspaz 3 aynı zamanda diğer kaspazlarında kesilerek işlev kazanmasında rol alır (49). İşlev kazanan kaspazlar, nükleer lamin, DNase engelleyicileri ve hücre iskeleti proteinleri gibi birçok substratı keserler (49).

Programlı hücre ölümündeki yollardan ikincisi ise “extrinsic” yolak olarak adlandırılır ve hücre yüzeyinde bulunan farklı ölüm almaçları aracılığıyla düzenlenir (49). Bu almaçlar, TNF-, FAS- ve TRAIL-(TNF-related apoptosis inducing ligand) gibi Tümör Nekrozis Faktör (TNF) süper ailesinin üyeleridirler (50). Bu almaçların hepsinde, hücre içinde yerleşik olan ve “death domain” olarak adlandırılan ortak bir yapı bulunmaktadır (50). TNF- α , FAS-L veya TRAIL gibi bir uyarının hücre dışından ilgili almaçlara bağlanması, DISC (Death-Inducing Signaling Complex) olarak adlandırılan ve bu almaçlardaki death domainlerin çevresinde FADD (FAS-associated death domain protein), pro-kaspaz-8 ve pro-kaspaz-10’un birleşerek oluşturduğu yapının oluşumuna neden olur (50). Tip 1 olarak adlandırılan hücrelerde işlev kazanan kaspaz doğrudan diğer kaspazları etkilemekte ve programlı hücre ölümü böylece gelişmektedir, tip 2 olarak adlandırılan hücrelerde ise mitokondrinin etkisi gereklidir (49,50). Tip 2 hücrelerde, işlev kazanan kaspaz-8 Bcl-2 ailesinden Bid proteinin yalnızca BH3 bölgesini keser ve işlev kazanan Bid de mitokondri içine girerek programlı hücre ölümünün diğer bileşenlerinin salınımını uyarır ve programlı hücre ölümü dışarıdan gelen uyarı ile başlayarak mitokondrinin de etkisiyle gerçekleştirilmiş olur (49,50).

Programlı hücre ölümü ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi birlikte ele alındığında, hücre için ölüm yada yaşam kararının belirlenmesinde p53 proteininin önemli rol oynadığı görülmektedir. p53 proteini, hücre çoğalmasıyla ilişkili birçok yolda merkezi bir konumda bulunmaktadır (51). Birçok kanser tipinde p53 geni mutasyonlarının olması ve p53 proteininin hem DNA zincir kırılması ve hem de tek nükleotid

değişimlerine bağlı gelişen kromozom düzensizliğinde rol alması “genomun koruyucusu” olarak adlandırılmasını sağlamıştır (52).

2.2.4. p53 proteini

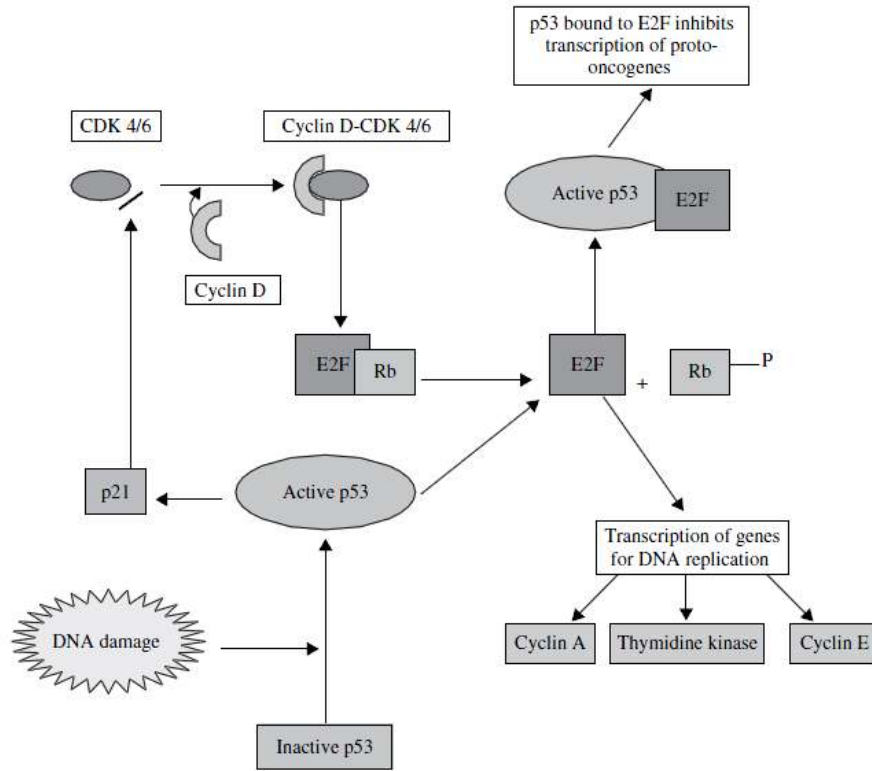
P53 proteini 1979 yılında tanımlanmıştır (53,54). Tanımlandığı ilk zamanlarda, tümör gelişimi lehine rol alan bir onkogen olduğuna inanılmıştır (47,54). Daha sonraki çalışmalar, kanser gelişiminde rol alan p53 proteinin normal p53 proteini olmadığını, p53 proteinin mutasyona uğramış olan yapısı olduğunu ortaya koymuştur (47,55). Bu bilgiler, dönüşüme uğramış olan fare fibroblastlarının yabani tip p53 bulaştırılması sonrasında dönüşüm etkinliklerinin azalması ve p53’ün mutasyona uğramış olan yapısının ise dönüşüme katkıda bulunmasının gösterilmesiyle de desteklenmiştir (47,55). Bu bulgular sonrasında p53 proteini tümör baskılayıcı bir protein olarak değerlendirilmiştir (47). p53 proteinin çekinik durumda etkisini değerlendirmek amacıyla, her iki p53 allelinde delesyon olan Saos-2 osteosarkoma hücrelerine p53 proteininin hem normal hem de mutasyon içeren yapıları verilmiştir (47). Hücre içerisinde normal yapıdaki p53 proteininin bulunması, Saos-2 hücrelerindeki neoplastik oluşumu baskılamıştır (47). Bu bulgu, tümör gelişiminde retinablastom geninde olduğu gibi p53 geninin de her iki kopyasının mutasyona uğraması gerekliliğini ortaya koymuştur (47). İleriki araştırmalar p53 geninin birçok insan tümöründe mutasyona uğramış olduğunu göstermiştir (47,51).

p53 proteini, DNA tamiri, hücre döngüsü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücresel olayda rol almaktadır (52). Hücredeki bu karmaşık biyokimyasal olaylar, birçok proteinin birlikte oluşturduğu protein yapılar tarafından gerçekleştirilmektedir ve p53’de bu yapılarda rol almaktadır (52). Normal durumda MDM2 proteini p53 proteinin N-ucuna bağlanarak, p53’ün fosforillenmesine engel olur ve p53 proteini MDM2 proteininin etkisiyle “kapalı” konumda tutulur (54). Bu durum, hücre stresi yada hücre hasarı sonrasında, ATM proteini, Chk2 (Human homologue of Rad53) proteini yada INK4 geninin alternatif ürünü olan p14^{ARF} proteini tarafından MDM2’nin proteolitik parçalanmasının sağlanmasıyla değişir ve p53 proteini N-ucundan fosforillenerek kararlılığı sağlanır ve işlevsel hale getirilir (54). Normal zamanlarda hücrelerdeki p53 molekülü sayısı hücre başına 10^3 - 10^4 dolaylarındadır

ancak, ihtiyaç duyulması durumunda p53 protein yapımı artmakta ve ubiquitin yolağıyla parçalanma hızı da azalarak hücre içerisinde p53 birikimi gerçekleşmektedir (52).

DNA hasarı yada hücresel stres sonucunda işlevsel hale gelen p53 proteini, hücre döngüsünün gelişimini gerçekleştiren genleri transkripsiyonel düzeyde etkileyerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alır (52). p53 proteini, birçok siklin bağımlı kinazı engelleyerek hücre döngüsünü etkileyen p21 proteininin sentezlenmesini sağlar ve p21 proteini de CDK'lar ile etkileşerek hücre döngüsünün G₁ evresinde durdurulmasına neden olur (52,56). Hücre bölünmesinde DNA sentezi sırasında gerçekleşen hatalar durumunda p53 proteini doğrudan E2F ile de etkileşerek E2F'nin mitozun ilerlemesi için gerekli olan c-myc ve c-fos genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirmesine engel olarak hücre döngüsünün G₂ evresinde durdurulmasında da rol alır (Şekil 2.5) (56). p53 proteini DNA tamirinde ve sentez mekanizmasında rol alan PCNA, GADD45 (Growth Arrest after DNA Damage 45) proteinlerini ve programlı hücre ölümünde rol alan Bax ve Fas gibi proteinlerin düzenlenmesini de sağlamaktadır (52). p53, TBP (TATA Binding Protein)'ye bağlanarak özendirici bölgesinde TATA dizisini bulunduran *Bcl-2* gibi birçok genin transkripsiyonunu da baskılamaktadır (52). p53 ayrıca DNA replikasyonu sırasında replikasyonun başlamasıyla ilgili bölgelere bağlanarak replikasyon çatalının oluşumunu engellemekte ve böylece transkripsiyondan bağımsız bir mekanizma ile replikasyonu baskılamaktadır (52). p53 proteini, RPA (Replicating Protein Antigen) gibi DNA sentezinde rol alan proteinler ve XPB (Xeroderma Pigmentosum Group B DNA helicase), XPD (Xeroderma Pigmentosum Group D DNA helicase), p62 ve topoizomeraz gibi DNA tamirinde rol alan proteinler ile de fiziksel olarak etkileşmektedir (52).

p53 proteini, DNA çift zincir kırılmalarında DNA'ya bağlanarak DNA'nın çözülmesine engel olmaktadır (52). DNA'da gelişen nükleotid eklenmesi, nükleotid silinmesi gibi durumlarda DNA heliks yapısında oluşan bozulmaları da tanımakta ve bu bölgelere de bağlanmaktadır (52). P53 proteini eş-dörtlü yapılar halinde DNA'ya bağlanmaktadır (57). Proteinin DNA'ya bağlandığı bölge, proteinin orta kısmında yer almakta ve "DNA'ya bağlanan bölge" olarak adlandırılmaktadır (57,58). İnsan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde *p53* geni mutasyonları olduğu rapor edilmiştir ve bu mutasyonların %95'i proteinin DNA-bağlanma bölgesinde gerçekleşmektedir (57,58). DNA-bağlanma bölgesinde gerçekleşen mutasyonların yaklaşık %75'i tek nükleotid değişimleridir (57).



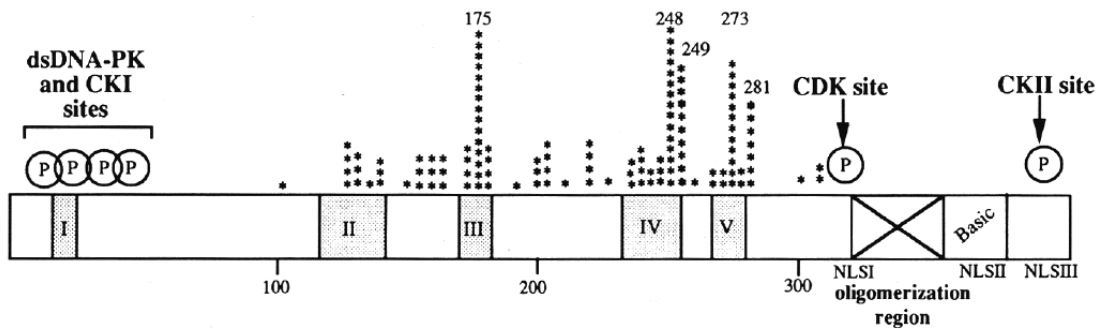
Şekil 2.5. p53'ün hücre döngüsünde rolü. Hücre döngüsünün G1 kontrol noktasında herhangi bir hasar belirlenmemişse, siklin D CDK4/6 ile bileşim yaparak siklin-CDK bileşimini oluşturur. Bu bileşim Rb proteinini fosforiller ve bunun sonucunda E2F serbest kalarak işlev kazanır. İşlev kazanan E2F, E2F duyarlı genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar. Hücre döngüsünün G₁ kontrol noktasında hasar varlığı belirlenmiş ise, p53 kapalı durumundan işlevsel durumuna geçer ve CDK'ların siklinlerle bağlanmasını engelleyen p21 proteininin transkripsiyonu gerçekleştirilerek hücre döngüsünün durdurulmasında rol alır (56).

p53 proteinini kodlamakta olan gen *TP53* olarak adlandırılmaktadır (53). *TP53*, 11 ekzondan oluşmaktadır ve 17p13.1'de yaklaşık 20 kb'lık bir alana yayılmıştır (53). *Tp53* geninin 2 ile 11. ekzonları arasındaki bölge proteine çevrilmiştir ve bu bölgelerden 4. ekzondan 8. ekzona kadarki bölge proteinin “çekirdek kısmı” olarak adlandırılmakta ve bu bölge p53 proteininin DNA'ya bağlandığı bölgeye tekabül etmektedir (53). Tümörlerde gerçekleştirilen p53 mutasyon incelemeleri, p53 geni üzerinde kanser türüne özgü “sıcak bölgeler” olduğunu göstermiştir (Şekil 2.6) (53). Kodon 175, 248, 273 ve 282'de gerçekleşen mutasyonlar sıklıkla kolon kanserinde görülmekteyken, 273. kodonda gerçekleşen mutasyonlar beyin tümörlerinde, kodon 249'da gerçekleşen mutasyonlar karaciğer kanserlerinde ve 242 ve 273. kodonlardaki mutasyonlar ise akciğer kanserlerinde görülmektedir (51). Kodon 172, 213 ve 248'de gerçekleşen mutasyonlar da Burkitt's Lenfoma'da sıklıkla görülmektedir (51). Pankreas kanserinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise her biri farklı hastalarda olmak üzere, kodon 144, kodon 156 ve kodon 248'de mutasyonlar olduğu belirlenmiştir, bu

kodonlardan 144 ve 156 5. ekzon tarafından, kodon 248 ise 7. ekzon tarafından kodlanmaktadır (59).

p53 proteini işlevsel rollerine bağlı olarak 3 bölgeye ayrılarak incelenebilir (51). Proteinin N-ucu, bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteinin, DNA'ya bağlandıktan sonra transkripsiyonu başlatmasında rol almaktadır (51). Bu bölge aynı zamanda MDM2 proteini için bağlanma bölgesi olup, MDM2'nin ayrılması sonrasında fosforillenmekte ve bu da p53 proteinin kararlı hale gelmesini sağlamaktadır (51). Proteinin N-ucu ile C-ucu arasındaki bölge onkogenik mutasyonların sıklıkla görüldüğü bölge olup, proteinin DNA'ya bağlanmasından sorumludur (51,54,57). p53 proteinin C-ucu ise lizin asetilasyonu yada serin fosforillenmesi ile düzenlenmekte ve proteini DNA'ya bağlanmaya yönlendirmektedir (54). C-ucu aynı zamanda sarmal yapıdaki kırık bölgelere bağlanarak sarmalın açılmasına da engel olmaktadır (52).

p53 proteinin amino ucunda, Double-stranded DNA protein kinaz ve Kazein kinaz I tarafından fosforillenmekte olan 4 fosforillenme bölgesi bulunmaktadır, bu bölgelerin fosforillenmesi p53 proteininin kararlılığını belirlemektedir (51). Proteinin C-ucunda cdc2 ve cdk2 kinaz veya kazein kinaz II tarafından fosforillenmekte olan 2 bölge bulunmaktadır, bu bölgelerin fosforillenmesi proteinin DNA'ya bağlanmasının belirlenmesinde önemlidir (51). p53 proteininin C-ucunda, proteinin hücre çekirdeğine yönlendirilmesini sağlayan 3 tane Nuclear Localization Sequence (NLS) bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.6) (51).



Şekil 2.6. p53 proteinin bölgesel yapısı. p53 proteininin N-ucunda double stranded DNA protein kinaz (dsDNA-PK) ve casein kinase I (CKI) tarafından fosforillenmekte olan 4 fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Proteinin C-ucunda cdc2 ve cdk2 veya (CDK bölgesi) casein kinase II tarafından fosforillenmekte olan 2 fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Yıldızlar, insan tümörlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan bölgeleri göstermektedir. En sık mutasyonu tanımlanan “sıcak bölgeler” amino asit numarasıyla belirtilmişlerdir. p53 proteininde, proteini çekirdek içerisine yönlendiren 3 tane NLS bölgesi bulunmaktadır (51).

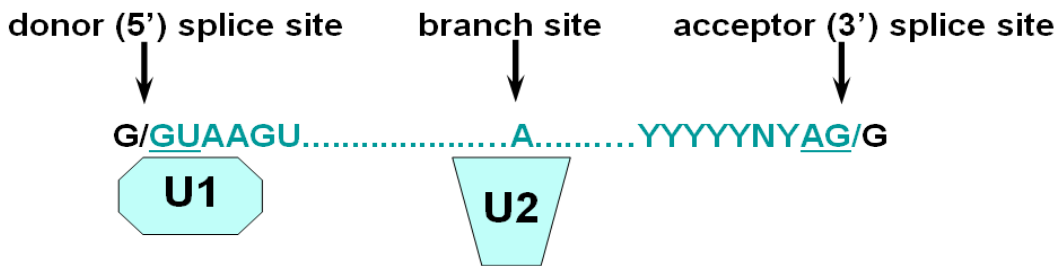
p53 geninde gerçekleşen mutasyonların çoğunluğu single missens mutasyonlar olarak tanımlanmaktadır (57). Li-Fraumeni Sendrom (LFS)'lu 40 ailede gerçekleştirilen bir çalışmada bu ailelerin 7'sinde ailesel geçişli farklı *p53* kaynaşım mutasyonu olduğu belirlenmiştir (60). Bu ailelerde gerçekleştirilen RNA değerlendirmeleri, bu mutasyonların hatalı *p53* transkriptlerinin sentezine neden olduğunu ortaya koymuştur (60). Veritabanlarının değerlendirmelerine göre, *p53* geninde gerçekleşebilecek farklı kaynaşım mutasyonları nadirdir ve oluşum oranı %2'nin altındadır (60). Ancak LFS'li hasalarda gerçekleştirilen çalışmada bu oranın %18 (40 ailede 7 aile) olarak belirlendiği ifade edilmektedir (60). Bu bulguların belirlenmesi sonrasında, 2002 yılı itibarıyla UMD-*p53* veritabanına eklenen *p53* mutasyonlarının olası farklı kesim noktaları oluşturup oluşturmadıkları değerlendirilmeye başlanmış ve eklenmiş olan 652 silent mutasyonun 7'sinde olası farklı kaynaşım bölgeleri olduğu belirlenmiştir (60). Veritabanlarına eklenmiş olan diğer 14,118 mutasyon da değerlendirilmeye alınmış ve bunların 753'ünün olası alternatif kaynaşım bölgesi oluşturduğu görülmüştür (60). İfade edilen bu bölgeler DNA dizi analizleri ile belirlenmiş olup, RNA düzeyinde bu mutasyonlar çalışılarak hatalı transkript oluşumuna neden olup olmadıkları test edilmemiştir (60). Li-Fraumeni Sendrom'lu ailelerin de değerlendirildiği bir çalışmada alternatif kaynaşım noktası oluşturan 582G>A mutasyonu belirlenmiştir (60). Bu mutasyon 4. ekzonun sonunda bulunan 125. kodona denk gelmekte olup amino asit değişimine neden olmamaktadır (60). *p53* genine yönelik gerçekleştirilen birçok çalışmada *TP53* geni DNA düzeyinde çalışılmakta ve DNA dizilemesi de doğrudan farklı kaynaşım yapılarına yönelik bilgi vermediğinden, *p53* proteininin farklı kaynaşım yapıları ve bu farklı kaynaşımlara yol açan mutasyonlar da tam olarak ortaya çıkarılamamaktadır (60).

2.2.5.Kaynaşım mekanizması

Biyoenformatik çalışmalar, insan genlerinden sentezlenen öncü-mRNA'ların yaklaşık olarak %90'nının kesilip-eklenme mekanizmasıyla uzaklaştırıldığını ve geriye yaklaşık olarak %10 kadarının kaldığını göstermiştir (61). DNA mikrodizi çalışmaları da bütün insan genlerinin %74'ünün farklı olarak kesilip-eklendiğini ortaya koymuştur (61). Örneğin, 22. kromozom üzerinde bulunan 245 geninin %59'u farklı olarak kesilip-eklenmektedir (61). Öncü-mRNA'ların farklı kesilip eklenmesiyle bir tek genden kodlanan bir öncü-mRNA'dan birçok olgun mRNA oluşturulmaktadır ve bu da mevcut gen sayısından çok daha fazla sayıda proteinin oluşturulmasına imkan vermektedir (33).

Kesilip-eklenme mekanizması ile oluşturulan mRNA'lardan, yabancı tipteki proteinden farklı yapıda proteinler oluşturulmakta ve bu proteinlerin işlevleri de yabancı tipteki proteinlerden tamamen farklı olabilmektedir (33). Örneğin, programlı hücre ölümünde rol alan proteinler olan Bcl-x, kaspaz-9, kaspaz-2, ced-4 gibi proteinler farklı kesilip-eklenme mekanizmasıyla oluşturulan yapılara sahiptirler ve bu yapıların bir kısmı programlı hücre ölümü lehine işlev gösterirken bir kısmı da programlı hücre ölümünü baskılamaktadır (33).

mRNA kesilip-eklenmesinden kaynaklanan hatalar hastalık gelişmesinin önemli nedenlerinden biridir (32). Kesilip-eklenme mekanizmalarındaki hatalarda en sık karşılaşılan durum, kesilme bölgelerinde gerçekleşen nokta mutasyonlarıdır (32). Bütün ekzonların yaklaşık %99'u intronların sırasıyla 5'- ve 3'- uçlarında bulunan GU ve AG dinükleotidleriyle intronlardan ayrılmışlardır (Şekil 2.7) (32). Bu bölgelerde gelişen mutasyonlar sıklıkla bağlı oldukları ekzonun olgun mRNA'da yer almamasına neden olurlar, hatta bazen iki ekzonun da aradan çıkmasına neden olabilirler, bu durum ailesel non-polipozis kolorektal kanser gelişiminde *MLH1* geninde görülmektedir (32). 5'-ucundaki GT dinükleotidlerinin AT şeklindeki mutasyonu *hSNF5* geninin 7. ekzonunun olgun mRNA'da bulunmamasına neden olur ve daha sonra diğer allelin de silinmesiyle "ikinci vuruş" gerçekleşir ve çok erken yaşta beyin tümörü gelişir (32). 3'-ucundaki AG nükleotidinin AT'ye dönüşümü *APC* geninin 4. ekzonunun kaybıyla sonuçlanır ve kolorektal kanser gelişimine yatkınlık gelişir (32). Kesilip-eklenme mekanizmasında gelişen mutasyonlardan bir kısmı da normalde olmayan kesim bölgelerinin oluşmasına neden olanlardır (32). *BRCA1* geninde gerçekleşen bir AA-AG dönüşümü *BRCA1* geninin mRNA'sına 11 nükleotidlik bir eklenmenin gerçekleşmesine ve dolayısıyla bu proteinin işlevinin değişmesine neden olur (32).



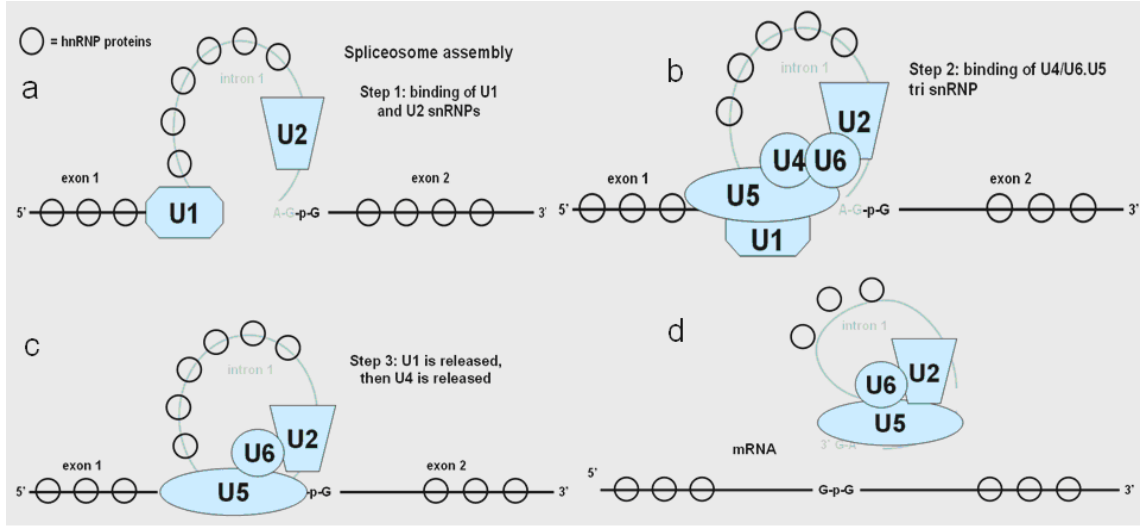
Şekil 2.7. Kaynaşım mekanizmasında intronların uçlarında bulunan GU ve AG dizileri. İnsan genomunda intronların ekzonlarla 5'-uçlarında GU dizileri ve 3'-uçlarında AG dizileriyle birleşmeleri yaklaşık %99 oranında görülmektedir. Bu diziler kaynaşım mekanizmasının gerçekleştirilmesinde önemlidir (65).

Kanserle ilişkili diğer birçok genin de alternatifli olarak kesilip-eklendiği tanımlanmıştır (33). *CD44*, *WT1*, *BRCA1*, *MDM2*, *FGFR* ve *p53* gibi kanser gelişiminde önemli olan birçok genin alternatifli olarak kesilip-eklendiği gösterilmiştir (33,62). Örneğin, p53 proteininin işlevini engellemekte olan *MDM2* geninin tümörlerde tanımlanmış olan yaklaşık 40 değişik alternatifli kesilip-eklenmiş yapısı bulunmaktadır ve bu yapıların birçoğunda *MDM2* proteininin p53'e bağlandığı bölge yada p300'e bağlandığı bölge eksiktir (33). Kesilip-eklenme mekanizmasıyla oluşan bu yapılar, hastalığın oluşması yada gelişmesinde önemli olabilmektedirler ve son dönemde bu yapıların kanser tedavisinde hedef olarak yada belirteç olarak değerlendirilebilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (33,63).

Kesilip-eklenme mekanizmasının anlaşılmasına yönelik çalışmalar bakteriyofaj ve plazmitlerin ortak kullanılmasıyla elde edilen yapılarda gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konulmuştur (48). Bu çalışmalarda öncü-mRNA kesilip-eklenme işleminin iki basamakta gerçekleştirildiği görülmüştür (48). Önce öncü-mRNA 5'-ucundan kesilmekte ve geriye kalan intronun 5'-ucu intronun içindeki 3'-ucuna yakın olan bir adenin nükleotidine bağlanmaktadır (Şekil 2.8a) (48,64). Bu basamakta, intronun 5'-ucu ile adenin nükleotidinin 2' hidroksil grubu arasında sıra dışı bir bağ oluşur (Şekil 2.8b) (48,64). Meydana gelen ara ürün, intronun ilmi oluşturduğu kement benzeri bir yapıdır (Şekil 2.8c) (48,64). Kesip-ekleme işleminde ikinci basamak, eş zamanlı olarak, 3'-kesim noktasından kesilimi ve iki ekzonun bağlanması ile devam eder (Şekil 2.8d) (48,64).

Kesip-eklenme işlemi, "splisozomlar" olarak adlandırılan protein ve RNA'lardan oluşan büyük karmaşık yapılar aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (64). Splisozomun RNA bileşenleri U1, U2, U4, U5 ve U6 adı verilen beş tip küçük nükleer RNA'lardır (snRNA) (64). Yaklaşık olarak 50 ila 200 nükleotidden oluşan snRNA'lar, altı ile on protein molekülü ile bileşimler yaparak, kesip-ekleme işleminde merkezi rol oynayan küçük nükleer ribonükleoprotein taneciklerini (snRNP) meydana getirir (48). snRNA'lar, sadece öncü-RNA'ların kesim bölgelerini ve dallanma noktalarındaki ortak dizileri tanımakla kalmaz, kesip-ekleme tepkimelerini doğrudan katalizlerler (64). Kesip-ekleme işleminde RNA'ların katalitik rolü, bazı RNA'ların kendi-kesip-ekleme; yani diğer protein veya RNA bileşenleri olmadan, kendi intronlarının çıkarılmasını katalizleyebilme kapasitelerinin keşfiyle de gösterilmiştir (48,64).

“Kendi-kesip-ekleme” işlemi ilk defa bir protozoa olan *Tetrahymena*’nın 28S rRNA’sının incelenmesi sırasında tanımlanmıştır (48). Bu RNA, proteinlerin olmadığı bir ortamda öncü-rRNA’sından kendiliğinden çıkan yaklaşık 400 bazlık bir intron içermektedir (48). Daha sonra gerçekleştirilen çalışmalarla, kendi-kesilip-çıkarılma işleminin ribozim olarak davranan bir intron tarafından katalizlendiği gösterilmiştir (48). Ek çalışmalar, mitokondri, kloroplast ve bakterilerde kendi-kesip-ekleyen RNA’ların varlığını ortaya koymuştur (48).



Şekil 2.8. Kaynaşım mekanizması. a) Splisozom yapılanmasındaki ilk basamak, U1 snRNP’nin pre-mRNA’nın 5’- kesim bölgesine bağlanmasıdır. 5’- kesim noktasının tanınması, 5’- kesim bölgesi uyuşum dizini ile U1 snRNA’nın 5’- ucundaki tamamlayıcı dizi arasında baz eşleşmesiyle gerçekleştirilir. Daha sonra U2 snRNP, dallanma noktası dizisi ile U2 snRNA arasında benzer şekilde baz eşleşmesi yoluyla dallanma noktasına bağlanır. b) U4/U6 ve U5 snRNP’lerden meydana gelen, daha önceden oluşmuş bir bileşim splisozomlara katılır ve U5, 5’- kesim bölgesinin yukarıdaki bir diziye bağlanır. Kesip-ekleme tepkimesine, snRNA’ların yeniden düzenlenmeleri eşlik eder. c) İlk tepkime basamağından (kement benzeri ara ürünün oluşumu) önce, U6 U4’den ayrılır ve 5’- kesim bölgesinde U1’le yer değiştirir. d) Daha sonra U5, 3’- kesim noktasındaki diziye bağlanır ve bunu intornun çıkarılması ile ekzonların bağlanması izler.

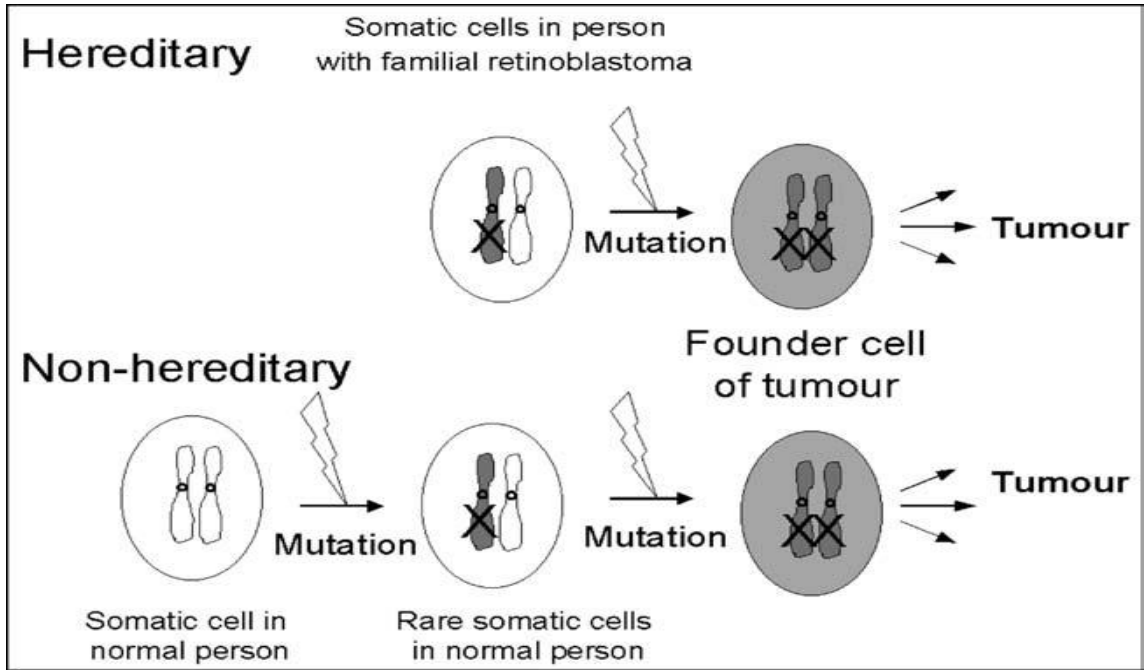
2.2.6. Kanseri gelişiminde genetik rol

Kanseri genleri ilk olarak kansere neden olan virüslerden türeyen genlerin tanımlanmasıyla ortaya konulmuştur ve bu genlerin hücre dönüşümünü baskın (dominant) bir tarzda gerçekleştirdikleri bulunmuştur (66). Bu genler, tümör gelişimine yol açtıkları için “Onkogen”ler olarak isimlendirilmişlerdir (66). Kansere neden olan genlerin bulunması, kanseri engelleyen genlerin olabilirliğini de düşündürmüştür (66). Somatik hücre melezleme çalışmaları, tümör baskılayıcı genlerin varlığını ortaya koymuştur (66). Aynı çalışmalar tümör baskılayıcı genlerin çekinik genler olduklarını ve kötü huylu oluşum için hücredeki işlevlerinin tamamen ortadan kalkmasının

gerektiğini düşündürmüştür (66). 1969 yılında gerçekleştirilen bir seri somatik hücre melezleme (hibrid) çalışması, A9 hücrelerinin kötü huylu dönüşümü gerçekleşmiş olan hücrelerdeki tümör gelişimini baskıladıklarını göstermiştir (66,67). Knudson, gerçekleştirdiği çalışmalar ile insan tümör baskılayıcı genlerin varlığını doğrulamış ve tümör gelişimi için “two hit” olarak adlandırılan bir model önermiştir (66,68,69).

Knudson, tek taraflı (unilateral) ve çift taraflı (bilateral) retinablastom hastalarında gerçekleştirdiği karşılaştırma çalışmaları sonucunda, baskın olan kalıtsal retinablastom ile kalıtsal olmayan retinablastom arasında mekanik bir ilişkinin olduğu şeklindeki ilk hipotezini öne sürmüştür (66). Kalıtsal formda, ilk mutasyonun kalıtsal olarak aktarıldığını ve diğer mutasyonunda somatik hücrelerde oluşarak, genellikle çift taraflı retinablastom gelişimini başlattığını öne sürmüştür (66). Kalıtsal olmayan ve genellikle tek taraflı olan formda ise, retinablastom gelişmeden önce somatik hücrelerde iki mutasyonun gerçekleşmesi gerektiğini ifade etmiştir (Şekil 2.9) (66). 1986 yılında *Rb* geninin klonlanması, Knudson’un bu hipotezini doğrulamıştır (66). Heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity; LOH) çalışmaları, *Rb* geninin hem kalıtsal hem de kalıtsal olmayan retinablastomlarda ve diğer tümörlerde her iki allele de mutasyon taşıdıklarını ortaya koymuştur (66). Bu bulgu, tümör baskılayıcı genlerin kanser gelişiminde çekinik genler olduklarının ve iki allelinde mutasyona uğraması durumunda kanser geliştiği inancını pekiştirmiştir (66).

Li ve Fraumeni 1969 yılında rabdomiyosarkom, osteosarkom ve meme kanserinin kadınlarda ailesel olarak kalıtıldığını tanımlamışlardır (66). Yapılan çalışmalarla, Li-Fraumeni Sendromunun *TP53* genin mutasyonu sonucunda oluştuğu ortaya konulmuştur (47,66). Birçok tümörde de *TP53* geninin iki kopyasının mutasyona uğramış olduğunun belirlenmesinden sonra, tümör baskılayıcı genlerin “two hit” modeliyle işlevlerini kaybettikleri, kanser biyolojisinde, temel bir inanç olmuştur (66).



Şekil 2.9. Knudson'un “Two hit” hipotezi. Kalıtsal retinoblastomda bir allel mutasyona uğramıştır ve diğer allelin de mutasyona uğraması tümör gelişimiyle sonuçlanır. Kalıtsal olmayan retinoblastomda ise bir allelinde mutasyon gelişen klon tümör gelişimine yatkınlık kazanmıştır (57).

2.2.6.1. Onkogenler

Onkogenler, protoonkogenlerden köken almaktadırlar ve hücrelerin büyümesi lehine faaliyet gösterirler (3). Bu genlerde gerçekleşen nokta mutasyonu, translokasyon ve gen çoğalması (amplifikasyonu) hücre replikasyonunun sürekli hale dönmesine neden olur (3). Onkogen aracılı hücre çoğalması olabilmesi için allelerden yalnızca bir kopyasının mutasyona uğramış olması yeterlidir (3). Örneğin, *Ras* geninin 12, 13 ve 61. kodonlarında gerçekleşen mutasyonlar Ras protein ürününün sürekli olarak çoğalma uyarısı oluşturmaya neden olur ve böylece hücre dönüşüm özelliği kazanır (70).

2.2.6.2. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre yaşlanması, DNA tamir mekanizması, uyarı-iletimi ve programlı hücre ölümü gibi hücresel faaliyetleri düzenleyen genleri kodlamaktadırlar (30,71,72). Ayrıca tümör baskılayıcı proteinler, dışarıdan gelen sinyallerin hücre içine taşınmasında, genetik ve metabolik hasarlarda duyarlılık oluşturma yada cevap vermede, düzenleyici diğer proteinlerin hücre içindeki yerlerinin belirlenmesinde, nükleus veya sitoplazmadaki diğer enzimlerin faaliyetlerini düzenlemek için kinaz işlevi göstermede ve hücre yaşaması ve büyümesini kontrol eden genlerin düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde de rol almaktadırlar (24,30,72). Tümör baskılayıcı genler; *Tp53* ve *p16* gibi karsinogenezin

erken döneminde mutasyona uğrayanlar, *BRCA2* gibi hücrenin genomik bütünlüğünün sağlanmasında görev alan ve *LOX* geni gibi tümörle doğrudan ilişkili olmayıp tümörün içinde bulunduğu mikro çevre üzerine etkili olan genlerde olduğu gibi üç sınıfa ayrılabilir (3,73).

2.3. Pankreas Kanseri

Pankreatik kanser hücreleriyle gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmasında, kanser hücrelerinin pankreatik kanal hücrelerinde olduğu gibi kübik şekilli, kanal antijeni ifadesine sahip ve tübüler yapılar şeklinde çoğaldıkları belirlenmiştir (18). Pankreasdaki yeni oluşumlarda kanal hücrelerinin ana kaynak olduğu düşünülmektedir (18). Pankreasdaki her bir bölüm multipotent farklılaşma kapasitesindeki kanal benzeri fenotipe sahip hücrelere farklılaşabilmektedir (18). Kültüre edilen asinar hücreler kanal hücrelerine dönüşmekte ve bu kanal hücreleri kök-hücre özelliği ile uyumlu olan hem ekzokrin hem de endokrin hücrelere farklılaşabilmektedirler (18).

Kanser gelişimindeki öncül lezyonlar olan metaplazi, displazi ve hiperplazi ile pankreas kanseri arasındaki ilişki ilk olarak Sommers adlı araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (74). Sommers yaptığı çalışmada, pankreas kanserli olmayan hastalarda kanal hiperplazisinin %9 olduğunu ve pankreas kanserli hastalarda da aynı lezyonun %33'den daha fazla olduğunu bulmuştur (74). Bu bulgular eşliğinde, pankreas kanserinin gelişimi pankreatik kanallardaki değişimlerin 1'den 3'e kadar derecelendirildiği ve PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) olarak adlandırılan bir modelle tanımlanmıştır (18). Hücrelerin çoğalma oranlarının PanIN derecesiyle artması bu hipotezi desteklemektedir (18).

2.3.1. Pankreas kanserinde rol alan genler

Pankreas kanserindeki öncül lezyonlarda gerçekleşen mutasyonlar, "kapı kontrol" genlerin tümör oluşumunu başlattığı ve gerçekleşen diğer mutasyonların da tümör büyümesi ve metastaz gelişimini sağladıkları hipoteziyle uyumlu olarak bir düzen içerisinde gerçekleşmektedir (18). Gerçekleşen ilk mutasyonun *K-ras* geni olması, bu genin "kapı kontrol" bir gen olduğunu göstermektedir (1,4,18). Pankreas kanserinde *H-ras* ve *N-ras* etkilenmemekte yalnızca *K-ras* etkilenmektedir (4). *K-ras* mutasyonları normal pankreas hücrelerinde de görülebilmekte ve PanIN derecelenmesinde PanIN-3'e doğru mutasyon oranı %100'e doğru artmaktadır (18). *p21^{WAF/CIP1}* geninin, normal

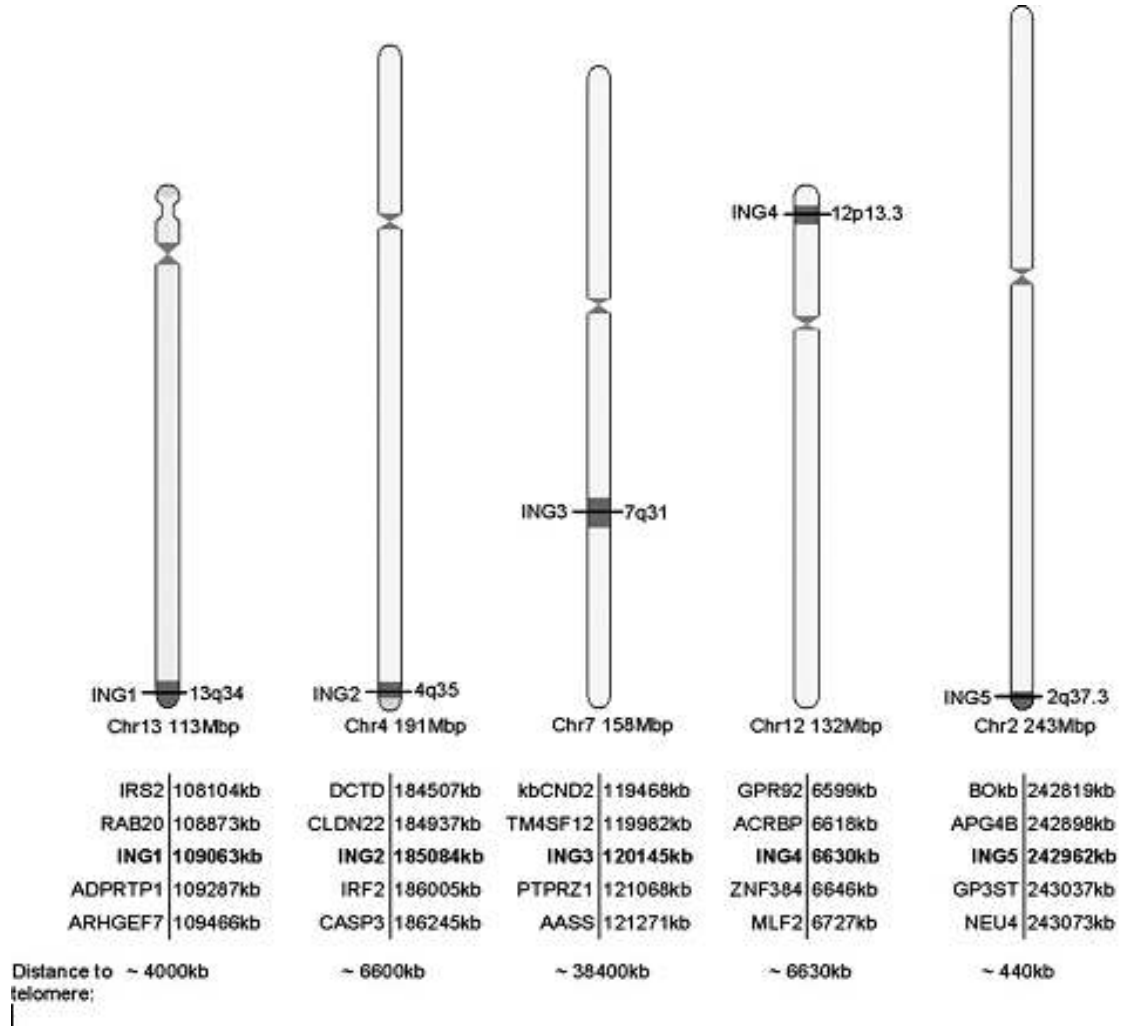
kanal hücrelerinde %9 ve invaziv karsinomda %85 olarak PanIN'in ilk gelişimi sırasında fazla ifade edildiği gösterilmiştir (4,18). *P16^{INK4A}* kaybı *K-ras*'dan hemen sonra gelişmekte olan ikinci aşamadır (4,18). *P16*'nın allelik kaybı PanIN-1 aşamasında belirlenebilir ve hücre yayılması artışına bağlı olarak %100'e kadar çıkar (18). *p53*'ün fazla ifade edilmesi nispeten geç gelişen bir durumdur, PanIN-2 ve PanIN-3 aşamalarında oluşur (18). SMAD4 protein ifadesi kaybı, PanIN-3 aşamasında %50 oranında görülür ve çok zayıf bir hastalık seyrine (prognoz) işaret eder (18). PanIN derecelendirmeden farklı olarak, PanIN lezyonlarda %96 oranında telomer kısalması da gerçekleşmektedir (18,75).

Pankreas kanserinin moleküler biyolojisinin anlaşılması ve rol alan diğer genlerin ortaya konulması amacıyla Pourani ve arkadaşları tarafından pankreas tümör dokularında heterozigosite kaybı (LOH) araştırılmıştır (15). Yaptıkları çalışmada pankreatik kanserlerde 12p13 bölgesinde heterozigosite kaybı olduğunu rapor etmişlerdir (15). 12p13 kromozom bölgesinde ING gen ailesi üyesi olan ING4 geni de bulunmaktadır (16). Pankreas kanserindeki bir diğer çalışmada da ING gen ailesinden ING1'in insan ekzokrin pankreas kanserlerinde gen ifade seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir (8). ING (INhibitor of Growth) genleri, DNA tamir mekanizması, hücre büyümesi ve yaşaması, enflamasyon ve tümör baskılanması gibi birçok hücresel olayda rol almaktadırlar (11).

2.3.2. ING gen ailesi

ING gen ailesinin ilk üyesi normal meme epitel hücreleriyle 7 farklı meme kanseri hücre hattındaki melezleme çalışmalarında tespit edilmiştir (9,76). Bu çalışmalarda tanımlanmış olan kısa cDNA dizileri Genetik Baskılayıcı Elemanlar (Genetic Suppressor Elements; GSE) olarak adlandırılmışlardır ve bu GSE dizilerinin ters-duyarlı dizileri ile bulaştırılmasıyla elde edilen hücrelerde hücre çoğalması ve kötü huylu dönüşüm teşvik edilirken, duyarlı dizileri ile bulaştırmanın hücre çoğalmasını ve kötü huylu dönüşümü baskıladığı görülmüştür (9). GSE'yi kodlayan genin dizi analizi yapılmış ve Inhibitor of growth1 (ING1) olarak isimlendirilmiştir (11). EST (Expressed Sequence Tags) veritabanında yapılan taramalar ile %32 ile %76 arasında dizi benzerlikleri olan ailenin diğer üyeleri; ING2, ING3, ING4 ve ING5'de tanımlanmıştır (11,76). ING genlerinin genomdaki yerleşimleri de daha sonra belirlenmiş olup ING1 geni kromozom 13'ün uzun kolunda telomer bölgesine yaklaşık olarak 4000 kb uzaklıkta

bulunmaktadır (77). ING2, 4. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır ve telomer bölgesine 660 kb mesafededir (77). ING3, kromozom 7'nin uzun kolunda bulunmaktadır (77). ING4, 12. kromozomun kısa kolunda telomere 6630 kb mesafede bulunmaktadır (77). ING 5 ise kromozom 2'nin uzun kolunda telomere 440 kb mesafededir (Şekil 2.10) (77). ING genlerinin genomik yapı incelemeleri, ING2 ve ING5 dışındaki diğer üyelerinin alternatif kaynaşıma uğradıklarını göstermiştir (11). Bütün ING proteinleri anne karnı (fetal) ve erişkin bireylerde ifade edilmekte olup, gen ifade seviyeleri organ ve gelişim aşamasına bağlı olarak değişmektedir (11).

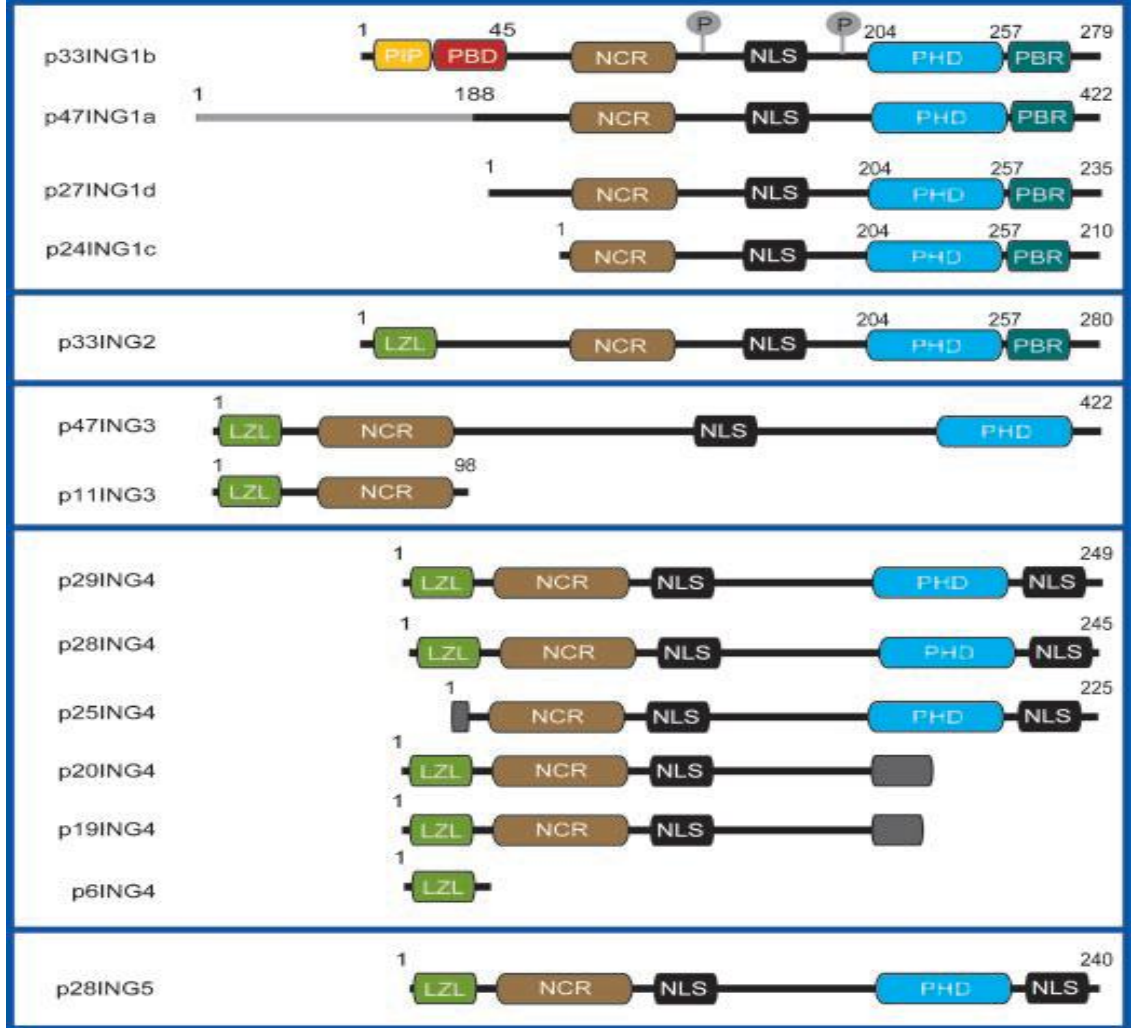


Şekil 2.10. İnsan ING genlerinin yerleştikleri kromozom bölgeleri. ING genlerinin yerleştikleri kromozomlar, bulundukları bölgelerde bulunan diğer genler ve ING genlerinin telomer bölgelerine uzaklıkları kilobaz olarak görülmektedir (77).

2.3.2.1. ING proteinlerinin yapısı

Bütün ING proteinlerinde üç ortak bölge bulunmaktadır; bu bölgeler PHD (Plant Homeodomain), NLS (Nuclear Localization Sequence) ve henüz işlevi tam olarak

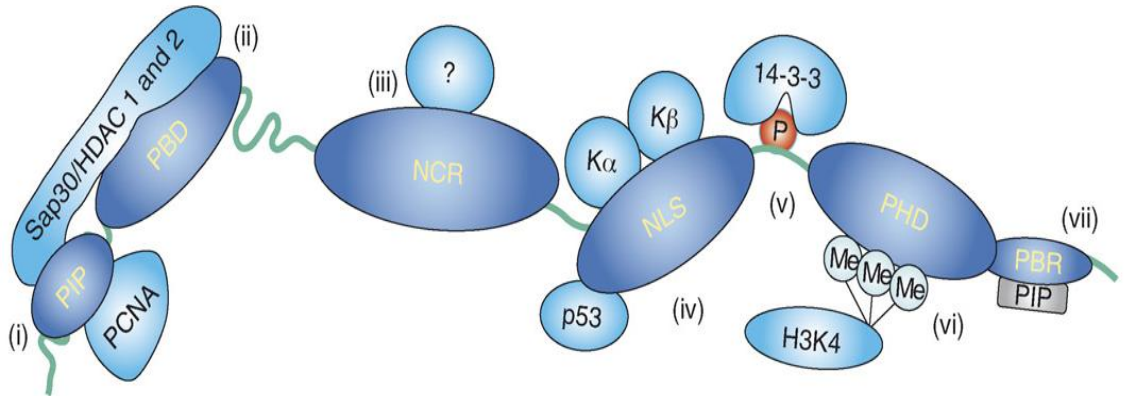
kesinleşmemiş olan NCR (Novel Conserved Region) bölgeleridir (11,78). ING1 dışındaki diğer dört ING proteininde LZL (Leucine Zipper-Like) bölgesi bulunmaktadır (11,78). ING1 proteininde ayrıca PBD (Partial Bromodomain) ve PIP (PCNA-Interacting Protein Motif) bölgeleri bulunmaktadır (11,78). ING1 ve ING2’de fosfoinositidin bağlandığı düşünülen bir PBR (Poly Basic Region) bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.11) (11,78).



Şekil 2.11. ING proteinlerinin bölge yapıları. ING proteinlerinin bölgeleri ve farklı kaynaşım yapılarındaki bölgesel durumları şekilde görülmektedir. ING1’de bilinen iki fosforilasyon bölgesi, 126 ve 129. kodonlar görülmektedir. Protein 14-3-3 fosforile 199. serin amino asitine bağlanır ve proteinin çekirdekten sitoplazmaya geçişini sağlar. Serin 126 stres koşulları olmaması durumunda CDKI tarafından, DNA-hasarı durumunda ise CHKI tarafından fosforillenir. Serin 126 fosforilasyon bölgesi, ING1 proteinin yarı ömrünü belirlediği gibi silkin B1’in baskılanmasında da rol alır. Bütün ING proteinlerinde korunmuş üç bölge bulunmaktadır; PHD (Plant Homeo Domain), NCR (Novel Conserved Region) ve NLS (Nuclear Localization Sequence) bölgeleri. NLS bölgesinin p53 proteini için bağlanma bölgesi olduğu rapor edilmiştir. LZL (Leucine Zipper-Like) bölgesi ING2-5’de bulunmaktadır. LZL bölgesi hakkında bilgiler az olmakla birlikte ING2’nin DNA tamiri ve programlı hücre ölümünde aldığı rolleri etkilediği rapor edilmiştir. ING1 PBD (Partial Bromodomain) ve PIP (PCNA-Interacting Protein Motif) bölgeleri de içermektedir. PBD bölgesinin mSin3-HDAC karmaşımının alt birimi olan SAP30’a bağlandığı düşünülmektedir. ING1 ve ING2’nin ikisinde de PBR (Poly Basic Region) bölgeleri bulunmaktadır, PBR bölgelerinin fosfoinositod ile bağ yaptığı düşünülmektedir (11).

ING1 için bilinen iki fosforilasyon bölgesinden biri 126. ve diğeri 199. pozisyonundaki serin aminoasitleridir (11,578). Protein 14-3-3, fosforile durumdaki serin 199'a bağlanır ve ING1 proteinin çekirdek içerisinde sitoplazmaya çıkışını sağlar (11,78). Serin 126 ise DNA hasarının varlığı durumunda Chk1 tarafından ve stres koşulu olmadığı zamanda CDKI tarafından fosforillenir ve bu bölge hem ING1 proteinin yarı ömrünü belirler hem de Siklin B1 ifadesinin baskılanmasında önemlidir (Şekil 2.12) (11,78).

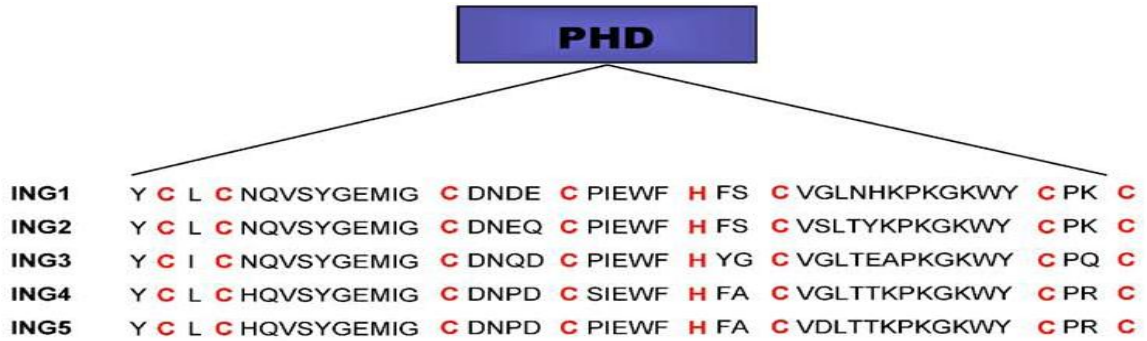
PHD bölgeleri kromozom yeniden düzenlenmesinde rol almaktayken, NLS bölgeleri proteinin çekirdek içerisine yönlendirilmesinden sorumludur (11,78). Bir ING proteininde birden fazla NLS bölgesi bulunabilmektedir ve ayrıca NLS bölgesi ING proteinin p53'e bağlanmasında da rol almaktadır (11,78). LZL bölgesiyle ilgili çok fazla bilgi olmamakla birlikte, ING2 ile gerçekleştirilen çalışmalarda LZL bölgesindeki mutasyonların, ING2'nin DNA tamiri ve programlı hücre ölümü üzerine olan etkisini değiştirdiği belirlenmiştir (11,78). PBD bölgesinin de mSin3-HDAC kompleksinin alt ünitesi olan SAP10'a bağlanmada rol aldığı düşünülmektedir (Şekil 12) (11,78).



Şekil 2.12. ING1 protein bölgeleri ve etkileştikleri diğer proteinler. (i) ING1'in "PCNA-interacting protein motif" bölgesi, GADD45 ve UV ile işlev kazanan diğer proteinlerle yarışmalı olarak PCNA'ya bağlanır ve ING1b-aracılı programlı hücre ölümünü yönlendirir. (ii) PBD bölgesi SAP 30 aracılığıyla HDAC'nin ve büyük olasılıkla HAT bileşiminin de işlevlerinde rol alır. (iii) Biyoenformatik çalışmalarıyla bütün ING'lerde korunmuş olduğu ortaya konulmuş ancak henüz işlevi tam olarak analiz edilememiştir, kromozom yeniden düzenlenmesinde HDAC ve HAT bileşikleriyle etkileştiği düşünülmektedir. (iv) NLS bölgesi, ING proteinlerinin karyopherin- α ve karyopherin- β taşıyıcı proteinlerine bağlanarak nükleus içerisine taşınmasında rol almaktadırlar. NLS bölgelerinin p53 ile bağlanmada rol aldığı da rapor edilmiştir. NLS bölgeleri içinde, stres koşullarında proteinin nükleolusa yönlendirilmesini sağlayan NTS bölgeleri de bulunmaktadır. (v) ING1 proteinleri 14-3-3 proteini tarafından tanınan bir motife sahiptirler. ING1 proteini serin 199'dan fosforillenince 14-3-3 proteini bu bölgeye bağlanır ve proteinin nükleus içinden sitoplazmaya taşınmasını sağlar. (vi) PHD bölgesi ING proteinlerinin tamamında en fazla korunmuş olan bölgedir ve metilasyona duyarlı olarak histon H3K4 çekirdeğine bağlanır. H3K4'e bağlandıktan sonra yakındaki lizinlerin asetilasyonlarını gerçekleştirerek HAT ve HDAC bileşiklerinin işlevlerinin düzenlenmesini gerçekleştirerek ilgili lokusların transkripsiyonlarını değiştirir. (vii) PBR bölgesi fosfoinositidin işlev kazandırılmasında rol alır (78).

2.3.2.2. Bitki ilintili bölge, PHD (Plant Homeodomain) bölgesi

Plant homeodomain (PHD) yapısı, yaklaşık olarak 60 amino asitten oluşan ve çinko iyonlarını bağlayan Cys4-His-Cys3 yapısını içermekte olup nükleer proteinlerde bulunmakta olan bir yapıdır (Şekil 2.13) (11,78,79). İnsanlarda yaklaşık olarak 150 kadar PHD bölgesi içeren protein belirlenmiştir (11). PHD bölgeleri, kromozom yeniden düzenlenmesinde rol oynayan büyük bileşimlerdeki proteinlerin yapılarına katılmaktadırlar (11). Bu işlevlerini, dahil oldukları proteinin yada bu proteinin ilişkili olduğu başka protein/proteinlerin kromotome bağlanmasına aracılık ederek gösterirler (11). PHD bölgeleri, kromozomların yeniden yapılanmasında faaliyet gösteren histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin işlevlerini gerçekleştirmelerinde bileşen olarak rol almaktadırlar (80,81). ING gen ailesi üyelerinin tamamında PHD bölgesi korunmuştur ve gözlemler ING proteinlerinin DNA'daki belirli bölgelere bağlanarak HAT ve HDAC proteinlerinin kromatin yapıya bağlanmasında köprü görevi gördüklerini önermektedir (76). ING proteinleri böylece, PHD bölgeleri aracılığıyla, kromozomların yeniden düzenlenmesinde ve transkripsiyonda düzenleyici olarak işlev görmektedirler (81).



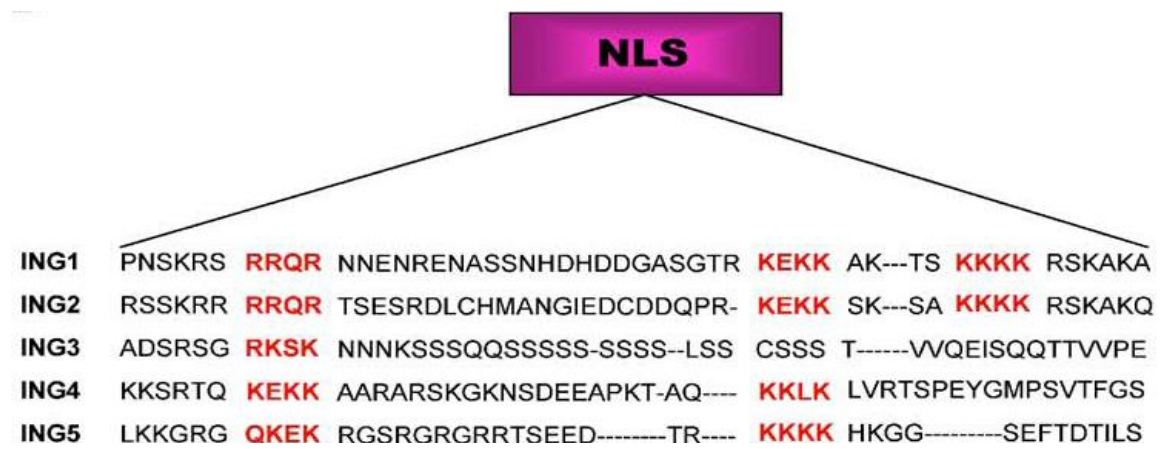
Şekil 2.13. PHD (Plant Home Domain) bölgesi amino asit dizisi. PHD yapısı Cys4-His-Cys3 korunmuş amino asit dizilerine sahiptir. Bu yapı çinko iyonlarını bağlamaktadır ve nükleer proteinlerde bulunur. PHD bölgesi, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin kromozomları yeniden yapılandırmalarında işlev gösterir (76).

Histonların kovalent işlenmeleri ve DNA'nın metillenmesi epigenetik kalıtımın bir şekli olup, genetik bilginin güvenli depolanması, düzenlenmesi ve doku gelişimi sırasındaki uygulanabilirliği ile ilişkilidir (79,80). Histonların translasyon sonrasındaki işlenmeleri geri dönüşümlü bir olay olup gerçekleştirilecek değişimleri histonlara takan yada uzaklaştıran bir set enzim tarafından gerçekleştirilmektedir (79,80). Histon asetiltransferaz (HAT) ve Histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin işlevleriyle kromatin yapının “açılması” yada “kapatılması” gerçekleşmekte ve böylece nükleozom yapısının

kararlılığı ve gen işleyişi düzenlenmektedir (78). Örneğin histon H3'ün 4 ve 36'ncı konumlardaki (H3K4 ve H3K36) lizinlerinin metillenmesi genellikle “açık” durumdaki ökromatin ve transkripsiyonel işlevle ilişkilidir, yine H3'deki lizin 9 ve 27'nin (H3K9 ve H3K27) metillenmesi “kapalı” heterokromatin yapı ve “gen susturma” ile ilişkilidir (79,80). ING protein ailesi üyelerinin PHD bölgeleri, histonlardaki lizinleri metilenmiş yada metillenmemiş durumlarına bağlı olarak tanımaktadır ve H3K4Me3'e bağlanma özelliğindedirler (78). ING proteinlerinin H3K4Me3 bölgelerini tanımları ve HAT ve HDAC enzimleriyle etkileşiyor olmaları, ING proteinlerinin asetilasyon ve deasetilasyon enzimlerini, metillenerek işaretlenmiş olan bu bölgelere, yönlendirdiğine işaret etmektedir (78).

2.3.2.3. NLS (Nuclear Localization Sequence) bölgesi

Bütün ING proteinleri NLS bölgesi içermektedirler ve bazı ING'lerde birden fazla sayıda NLS olabilmektedir (11,76). NLS bölgesine yönelik çalışmalar çoğunlukla ING1 proteini ile yapılmıştır ve ING1 proteinindeki NLS mutasyonlarının, proteinin sitoplazmada birikmesine yol açtığı belirlenmiştir (11,76) Birçok kanser tipinde çekirdekteki ING protein ifadesinin olmadığı belirlenmiştir, bu bulgu ING proteinlerinin işlevlerinin kaybolmasının kanser gelişiminde önemli olduğunu ve işlev kaybına NLS aracılığıyla çekirdek içine geçememenin neden olduğuna işaret etmektedir (11,76,82). ING1'in NLS bölgesi içerisinde iki kopya “nucleolar translocation signal” (NTS) bölgesi bulunmaktadır, bu bölgeler proteinin nükleolusa yönlendirilmesinde rol almaktadır (Şekil 2.14) (11,76).



Şekil 2.14. NLS (Nuclear Localization Sequence) bölgesi amino asit dizisi. ING proteinleri, nükleus içerisine girişlerini yönlendiren NLS bölgeleri içermektedirler. NLS bölgeleri içerisinde, proteinin nükleus içerisine geçişini ve nükleus içinde konumunu belirleyen NTS (Nucleolar Translocation Signal) dizileri de bulunmaktadır (78).

Fibroblastlarda gerçekleştirilen bir çalışmayla UV'ye bağlı programlı hücre ölümünün gerçekleşmesinde ING1'in nükleolusa yönlendirilmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir (11,76). Ayrıca, ING1 geninin NLS yada NTS bölgelerindeki mutasyonların, fibroblastların UV'ye bağlı gelişen DNA hasarında programlı hücre ölümünü gerçekleştiremedikleri gösterilmiş ve bu durumun ING1'in çekirdek içerisindeki yerleşiminin de programlı hücre ölümünde önemli olduğunu işaret ettiği ifade edilmiştir (11,76). ING4 ile gerçekleştirilmiş bir çalışmada, NLS bölgesinin yalnızca ING proteinlerinin çekirdek içerisine yönlendirilmesi ve hücre içindeki konumunun belirlenmesinde değil ayrıca ING4'ün p53 proteinine bağlanmasında da rol aldığı rapor edilmiştir (83). ING4 proteininde NLS bölgesinin tamamen silinmesi, bu proteinin p53'e bağlanma durumunu değiştirmektedir (83).

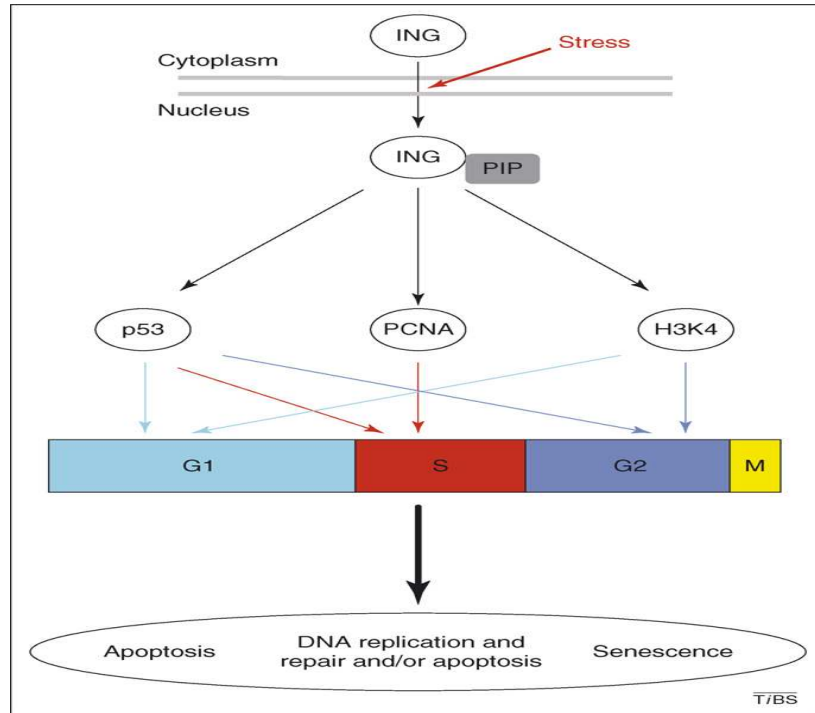
2.3.2.4. NCR-LZL-PBD-PBR-PIP bölgeleri

Bütün ING proteinlerinde PHD bölgesi gibi korunmuş olan diğer bölge de “novel conserved region” (NCR) bölgesidir ve bu bölgenin ING proteinlerinin histon işlenmesinde rol alan enzimlerle etkileşmelerinde rol aldığı düşünülmektedir (78). ING1 dışındaki diğer dört ING üyesinde “leucine zipper-like” (LZL) bölgeleri bulunmaktadır (11,78,84). LZL bölgeleri, 4 yada 5 lösin yada izolösinden oluşan yapılar olup ING proteinlerinde N-uca yakın hidrofobik bir bölge oluştururlar (11). ING2 ile gerçekleştirilmiş bir çalışmada LZL bölgesinin DNA'da nükleotid kesip çıkarma mekanizması ve programlı hücre ölümünde rol aldığı rapor edilmiştir (85).

ING1 proteininde “partial bromodomain” (PBD) bölgesi bulunmaktadır, bu bölge histon işlenmesinde rol alan HDAC kompleksinin alt ünitesi ile etkileşen SAP30'a bağlanmakta ve kromozom yeniden düzenlenmesinde rol almaktadır (11,78). “PCNA-interacting protein” (PIP) motifi, yalnızca ING1'de bulunmakta olup UV'ye cevap olarak işlev kazanan p21 gibi proteinlerle yarışmalı olarak PCNA'ya bağlanmaktadır ve ING1b'nin programlı hücre ölümü işlevinde rol alır (78). “Poly basic region” (PBR) bölgesi, ING1 ve ING2'nin yapısında PHD bölgesine bitişik olarak bulunmakta ve fosfoinositid ile etkileşerek bu proteinlerin hücre içindeki yerleşimlerinde ve diğer proteinlerle etkileşimlerini yönlendirmede rol almaktadır (78).

2.3.3. ING proteinlerinin hücresel işlevleri

ING proteinleri, hücre büyümesi, programlı hücre ölümü, DNA tamiri, yaşlanma ve anjiyogenez gibi birçok hücresel olayda rol almaktadırlar (11). ING proteinlerinin hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre döngüsünün kontrol noktalarında etki gösterdiklerine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Şekil 2.15) (78,85). ING proteinlerinin baskılanması hücre yayılması ve hücre göçünü arttırmakta, dokunma engellenmesini de kolaylaştırmaktadır (9,11,13,14,86). Bulaştırma (transfeksiyon) çalışmaları, ING proteinlerinin p53'ün işlevleri için gerekli olduğunu göstermiştir (78,85). Ayrıca p53'den bağımsız olarak NF- κ B ve "hypoxia inducible factor" (HIF) yollarının düzenlenmesinde rol aldıklarını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (87,88). ING proteinleri, kromozom yeniden düzenleme komplekslerinin alt bölümleri olarak çekirdek içerisinde transkripsiyonun düzenlenmesinde de rol almaktadırlar (89). ING proteinlerinin işlevlerini tanımlayan çalışmalar ağırlıklı olarak ING1'de gerçekleştirilmiştir ancak diğer ING'lerle yapılan çalışmalar da aynı bulguları desteklemektedir (11).



Şekil 2.15. Hücre döngüsü sırasında ING protein etkileşimi. ING proteinin fosfoinositid yada fosfoinositol gibi bir uyarıcı tarafından etkilenmesi sonrasında ING proteinleri 3 farklı biyolojik yolda proteinin farklı bölgeleri aracılığıyla etki ederler. (i) PCNA, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve programlı hücre ölümünde, (ii) p53, programlı hücre ölümü ve yaşlanma, (iii) histon h3'ün lizin (K) 4 (H3K4)'de metillenmesi ve buna bağlı olarak gen ifadesinin etkilenecek yaşlanma ve programlı hücre ölümünde rol alma. PCNA ve histon H3 üzerinden ING'lerin doğrudan etkili oldukları kristal yapıları ve nokta mutasyonlarıyla gösterilmiştir. P53 yolağı ARF yada MDM2 gibi proteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir (78).

2.3.3.1. ING proteinleri ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi

ING1'in hücre çoğalması üzerine olan etkileri proteinin fazla ifadesi yada genin ters-duyarlı diziler ile kapatılması çalışmalarından elde edilmiştir (9). ING1'in fibroblastlarda fazla ifade edilmesi, hücre döngüsünün G₀/G₁ evresindeki hücrelerin sayısını %50 oranında arttırmıştır ve bu durum G₁-S geçişinde ING1'in rol aldığını göstermektedir (9). ING1, siklin B1'i negatif olarak düzenlemekte olduğundan G₂/M kontrol noktasında da etkili olmaktadır (90). ING1 gen ifadesi, G₀'dan G₁'e doğru giderken azalmakta, geç G₁'de artmakta, S evresinde maksimuma ulaşmakta ve G₂ evresinde tekrar azalmaktadır (91). ING2'nin RKO hücrelerindeki ektopik ifadesi koloni oluşumunu engellediği gibi hücre döngüsünü G₁ aşamasında durdurmaktadır (92). ING3'ünde RKO hücrelerindeki ektopik ifadesi koloni oluşumunu azalttığı gibi S evresindeki hücre sayısını da azaltmıştır (93). ING4 ve ING5'de hücre çoğalması üzerine ING3 gibi etki göstermektedirler (11).

2.3.3.2. ING proteinleri ve programlı hücre ölümü

ING1 geni susturulmuş olan hücreler programlı hücre ölümünden korunmaktadırlar (94). Bu bulguyla uyumlu olarak, P19 hücre hattında ve fibroblastlarda gerçekleştirilen ektopik ING1 ifadesi programlı hücre ölümünü uyarmıştır (94). ING1'in hücre ölümü üzerine etkisi UV radyasyonunu takiben PCNA ile etkileşimine bağlıdır (95). ING1'in eş-yapılarından yalnızca p33ING1b'nin ektopik ifadesi hücreleri UV ve hidrojen peroksit aracılı programlı hücre ölümüne duyarlı hale getirmiştir, p47ING1a'nın böyle bir etkisi olmamıştır (96). P33ING1b'nin ektopik ifadesi hücreleri, kemoterapötik olarak kullanılan, etoposid, taxol ve doxorubicin aracılı programlı hücre ölümüne duyarlı hale getirmiştir (90,96). UV ile muamele edilen hücrelerde ING2'nin de ifadesi artmaktadır (11). Melanom hücre hatlarında UVB muamelesini takiben ING2 ifadesi ve Bcl-2 ifadesi artmıştır, Bax proteininin mitokondri içine girişi yönlendirilmiş ve ek olarak mitokondri membran potansiyelinde değişimler gerçekleşmiştir (97). ING2 Fas ifadesini düzenleyerek programlı hücre ölümünde rol almaktadır (97). LZL bölgesinde mutasyon olan ING2 proteinleri UV muamelesi sonrasında programlı hücre ölümüne gitmemişlerdir, bu bulgu LZL bölgesinin programlı hücre ölümünde önemli olduğunu göstermektedir (84). UV uygulanan hücrelerde ING3 fazla ifade edilerek Fas ifadesini de arttırmakta ve Bid, kaspaz-8, -9 ve -3'ün ayrılmalarını sağlayarak programlı hücre ölümünde rol almaktadır (98).

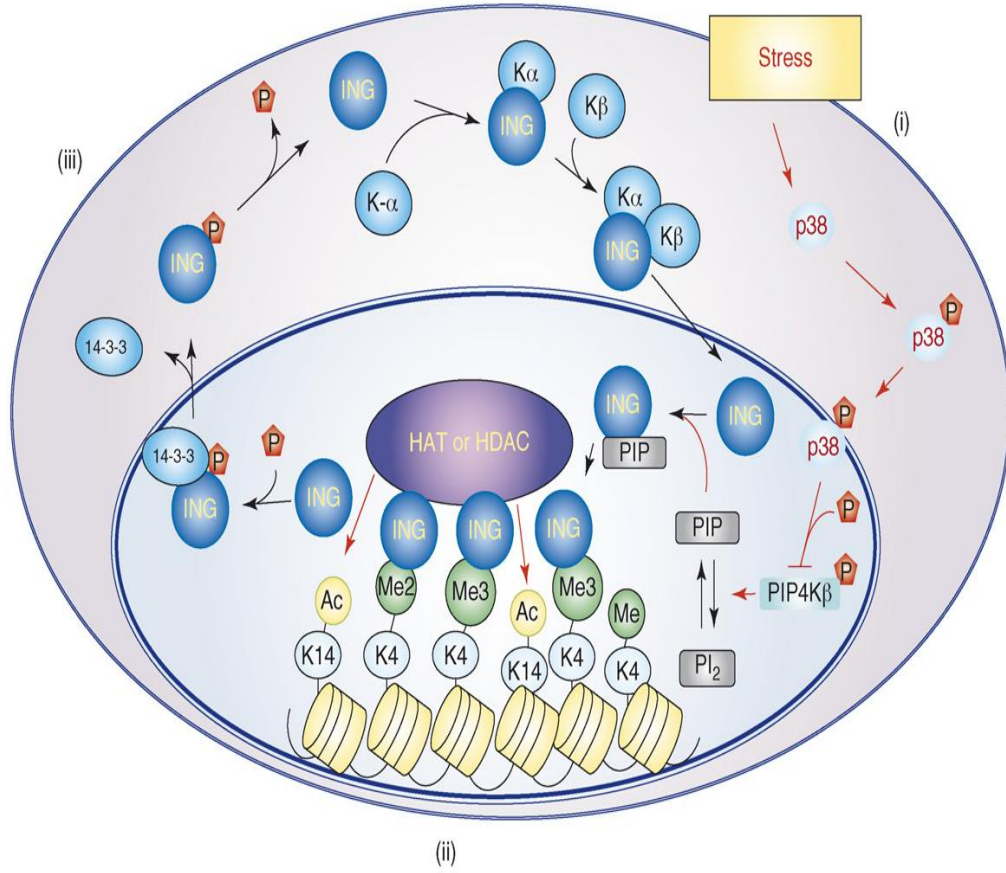
2.3.3.3. ING proteinleri ve kromozom düzenlenmesi

ING1'in birçok eş-yapısının HAT ve HDAC ile ilişkili olduğu bulunmuştur (11). P33ING1'nin fazla ifade edilmesi, histon H3 ve H4'ün hiperasetilasyonuna neden olmuştur ve bu durum ING proteinlerinin, HAT işlevlerini düzenlediğini göstermektedir (99). P47ING1a'nın fazla ifadesi de histon deasetilasyonunu gerçekleştirmekte olup, HDAC işlevinin de ING proteinleri aracılığıyla düzenlendiğini göstermektedir (99). ING proteinlerinin bu etkileri histon-DNA etkileşimini değiştirip genlerin özendirici bölgelerinin DNA etkileşimini değiştirebileceği gibi transkripsiyon düzenleyici proteinlerin bağlanmalarını da etiler (11). P33ING1b'nin "DNA metil transferaz associated protein 1" (DMAP1) ile fiziksel olarak etkileştiği ve bu nedenle DNA metilasyonunda da rol alıyor olabileceği düşünülmektedir (11).

ING proteinlerinin tamamında korunmuş olan PHD bölgeleri H3K4'ün 2 ve 3 metil formuna bağlanabilmekte ve böylece transkripsiyonu baskılayabilmektedirler (11). ING1'in PHD bölgesinde gerçekleşen mutasyonlar H3K4'e bağlanmasını etkilemekte ve UV'ye bağlı gelişen programlı hücre ölümündeki etkisini engellemektedir, bu durum ING proteinlerinin gen ifadesinin epigenetik düzenlenmesinde de rol aldıkları tezini desteklemektedir (Şekil 2.16) (11).

2.3.3.4. ING proteinleri ve DNA tamiri

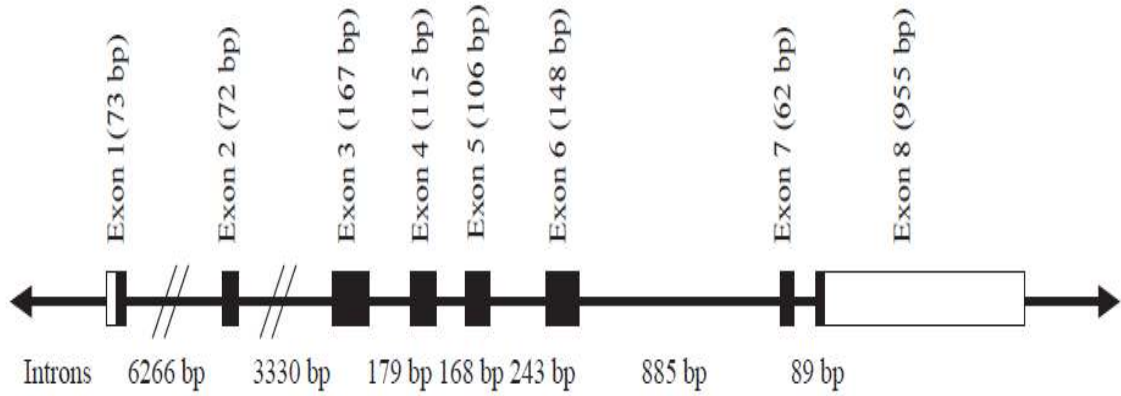
UV maruziyeti sonrasındaki nükleotid kesip çıkarma (Nucleotid Excision Repair; NER) mekanizmasının düzenlenmesinde ING1 proteini rol almaktadır (100). P33ING1b'nin fazla ifadesi, konakçı hücreye dışarıdan eklenen plazmitteki NER işlemini arttırmaktadır (100). "Growth Arrest after DNA Damage 45" (GADD45) ile p33ING1b arasında bir ilişki olduğu belirlenmiş olup bu da ING1'in NER mekanizmasında rol aldığını desteklemektedir (100). PHD bölgesinin SAP30 ile etkileşen kısmında gerçekleşen mutasyonlar, NER işlemine engel olmaktadır (101). Bu bulgu ING1'in NER bileşenlerini kromatin yapı ile ilişkilendirdiğini ve bu nedenle NER mekanizması için gerekli olduğunu düşündürmektedir (101). ING2 ile gerçekleştirilen çalışmalarda, ING2'nde kromatin yapının gevşetilmesi işleviyle NER mekanizmasında rol aldığını göstermiştir (84). ING2'nin NER mekanizması için LZL bölgesinin gerekli olduğu da aynı çalışmada ifade edilmiştir ve LZL bölgesi ING1'de bulunmamaktadır (84).



Şekil 2.16. ING proteinlerinin kromatin yapıya etki mekanizmaları; işlev kazanmaları, faaliyet göstermeleri ve döngüleri. (i) ING proteinlerinin işlev kazanmaları; hücrenin içsel yada dışsal etkenler tarafından strese maruz kalmasıyla p38MAPK daha üstteki kinazlar tarafından fosforillenir ve buna bağlı olarak nükleus içine geçer. Nükleus içine geçen p38MAPK, PIP4K β 'yı fosforilleyerek bu molekülün kinaz işlevini engeller ve nükleus içinde birikmesine neden olur. Nükleus içinde biriken PIP, ING1 ve ING2 ile bağlanır ve ING proteinlerinin bağlı bulunduğu HAT ve HDAC bileşikleriyle birlikte ING proteinlerini kromatin yapıya yönlendirir. ING3-5 moleküllerinin nasıl işlev kazandıkları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. **(ii) ING proteinlerinin faaliyet göstermeleri;** ING proteinleri H3K4me2/3 bölgelerine özel olarak bağlanarak, bağlı bulundukları bileşiklerin (HAT ve HDAC) ilgili bölgelerde asetilasyon ve deasetilasyon gibi faaliyetler gerçekleştirmelerine imkan sağlarlar ve böylece programlı hücre ölümü, DNA tamiri ve hücre döngüsünün düzenlenmesi ile ilişkili genlere etkili olurlar. **(iii) ING proteinlerinin döngüleri;** ING-aracılı kromozom yeniden düzenlenmesi ve transkripsiyonel işlevler gerçekleştirildikten sonra ING proteinlerinin ayrıldıkları yada işlevlerinin engellendiği düşünülmektedir. ING proteinlerinin yönlendirilmesiyle ilişkili bir mekanizma, 14-3-3 proteinin fosforilasyon bağımlı olarak ING proteinlerine bağlanması ve ING proteinlerinin nükleus içerisinden sitoplazmaya geçişinin sağlanmasıdır. Sitoplazmada ING proteinlerinin defosforile edilmesi 14-3-3 proteininin ING proteinlerinden ayrılmasına neden olmakta ve daha sonra ING proteinleri karyopherin α ve β 'ya bağlanarak nükleus içerisine taşınmaktadır. ING proteinlerinin sitoplazmada işlev göstermeleri de ING4 proteinin sitoplazmik bir protein olan liprin ile etkileşimiyle de uyumludur (78).

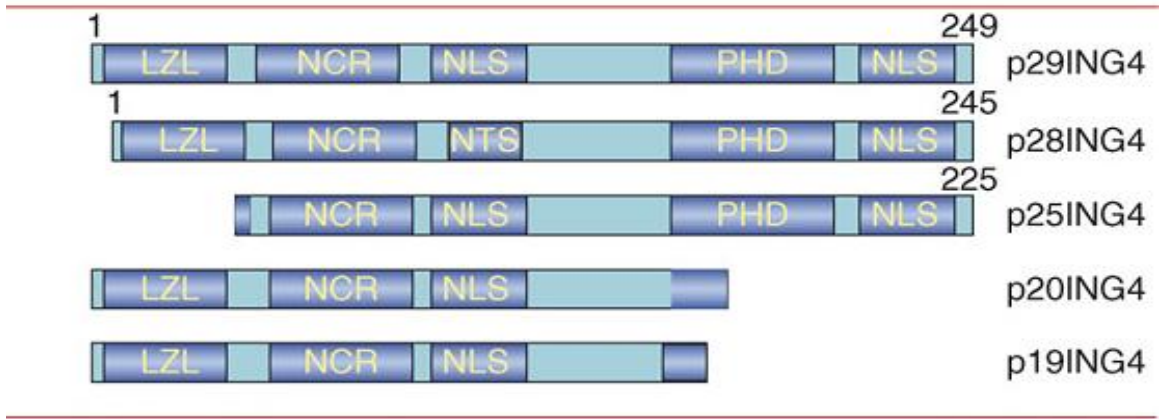
2.3.4. Büyüme baskılayıcı 4 proteini; ING4 (Inhibitor of growth 4)

ING4 geni, ING1 geninin bulunmasından sonra gerçekleştirilen homoloji çalışmaları sonucunda tespit edilmiştir (77,102). ING4 geni 12. kromozomun kısa kolu üzerinde, telomer bölgesine 660 kb mesafede 12p13.32 bölgesinde yerleşmiştir (77). 132 Mbp'den oluşan ING4 geni 8 ekzon ve 7 introndan oluşmaktadır (77). Bu 8 ekzon farklı kaynaşım mekanizmasıyla ING4'ün eş yapılarını oluştururlar (Şekil 2.17) (16,77). 248 amino asitten oluşan ING4 proteini normal insan dokularında bir nükleer faktör olarak ifade edilmektedir ve glioma, meme kanseri, akciğer kanseri, melanoma ve squamos hücre karsinomlarında normal olmayan yapılarda ifade edildiği belirlenmiştir (16,86,87,103,104,105).



Şekil 2.17. ING4 geninin yapısı. ING4 geni 13 kb büyüklüğünde ve 8 ekzondan oluşmaktadır (16).

ING4'ün tanımlanmış 5 farklı kaynaşım yapısı bulunmaktadır ve diğer ING proteinlerinde korunmuş olduğu gibi bu eş yapılarda da PHD, NCR gibi korunmuş bölgeler bulunur (Şekil 2.18) (11). ING4 proteinlerinin hücredeki konumları ve hücresel işlevleri içerdikleri protein “domain”leri tarafından belirlenir (102). Ayrıca bu “domain” yapılar hücrede bulunan p53, p300 gibi diğer proteinler ve HAT, HDAC gibi bileşiklerle etkileşimlerini de belirlerler (11,81). ING4 proteinleri diğer ING proteinleri gibi programlı hücre ölümü, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kromozom yapılanmasında rol aldıkları gibi diğer ING proteinlerinden farklı olarak tümör gelişiminde özellikle önemli olan hücre göçü, dokunma engellenmesi ve anjiyogenez işlemlerinde de rol almaktadırlar (11,86,106). ING4 proteinleri ayrıca DNA’da hasar oluşturarak etkisini gösteren ve kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlara karşı hücrelerin duyarlılıklarını da arttırmaktadırlar (107).



Şekil 2.18. ING4 proteininin bölümleri ve farklı kaynaşım yapıları. ING4_v1, ilk olarak ING4 olarak adlandırılmış daha sonra farklı kaynaşım yapısı olarak değerlendirilmiş olan en uzun kaynaşım yapısıdır. ING4_v1 tam NLS yapısına sahiptir. ING4_v2, ING4_v3 ve ING4_v4'ün NLS bölgelerinde silinmeler olduğundan bu kaynaşım yapılarının sitoplazmada birikimi gerçekleşir. Kısmi NLS bölgesine sahip olan ING4_v2 ve ING4_v4'ün büyüme baskılanmasında zayıf etkiye sahip oldukları değerlendirilmiştir (41).

2.3.4.1. ING4'ün hücresel işlevleri

ING4'ün hücre çoğalması üzerin etkisi RKO hücre hatlarında, hücre kültürünün yapıldığı ortama dışarıdan ING4 proteini verilerek gerçekleştirilen çalışmalarla, ortaya konulmaya çalışılmıştır (81). Bu çalışmalar sırasında ING4 ve p53'ün hücre çoğalması üzerine birlikteki etkisini değerlendirmek amacıyla da ayrıca, “insan papilloma virus onkoproteini E6” ile p53 geni kapatılmış olan RKO-E6 hücre hatları kullanılmıştır (81). Bu çalışmalarda, ING4'ün verildiği RKO hücrelerinde koloni oluşumunun belirgin derecede azaldığı belirlenmiştir (81). RKO-E6 hücrelerinde ise ING4 asgari düzeyde koloni oluşumunu engellemiştir (81). Bu çalışma, yabancı tip p53 içeren OsA-CL hücre hatlarında ve mutant p53 içeren AsPC-1 hücre hatlarında da gerçekleştirilmiş ve OsA-CL hücre hattında koloni oluşumunun azaldığı ancak AsPC-1 hücre hattında koloni oluşumunun ING4 ile etkilenmediği belirlenmiştir (81). Mutant p53 geni içeren AsPC-1 hücrelerine *ING4* ve *p53* genlerini içeren vektör bulaştırılmış (transfeksiyon) ve bu durumda AsPC-1 hücrelerinde de koloni oluşumunun belirgin olarak azaldığı belirlenmiştir (81). RKO hücrelerinde ING4'ün fazla ifadesinin p53'ün transkripsiyonel işlevini etkileyerek p53'ü *waf1* genlerinin özendirici bölgelerine yönlendirdiğini göstermiştir ve bu durum RKO-E6 hücre hatlarında gözlenmemiştir (81).

ING4'ün hücre döngüsü üzerine etkisi RKO hücrelerinin ve RKO-E6 hücrelerinin ING4 ile bulaştırılması çalışmalarında değerlendirilmiştir (81). Bu çalışmalarda RKO-E6 hücrelerinde bir değişiklik belirlenmemiş ancak, RKO hücrelerinde S evresine geçen hücrelerin sayısında azalma olduğu ve G₁/S ve G₂/M aşamasındaki hücrelerin

sayılarında da artış olduğu gözlenmiştir (81). Bu çalışmada ayrıca ING4 bulaştırılan RKO hücrelerinden programlı hücre ölümüne giden hücre sayısında belirgin artış olduğu da belirlenmiştir (81).

HepG2 hücre hattında gerçekleştirilen bir çalışmada ING4'ün hücre çoğalması üzerine etkisi araştırılmıştır (106). ING4 bulaştırılan HepG2 hücre kültüründe G₂/M aşamasındaki hücre sayısında artış ve G₁ aşamasındaki hücre sayısında çok belirgin azalma olmuştur (106). G₂/M aşamasındaki hücre sayısı, dışarıdan bu hücrelere bulaştırılan ING4 dozunun artışıyla birlikte artmıştır (106). Hücre döngüsünde p53'ün merkezi rol oynaması nedeniyle ING4 ile p53'ün fiziksel olarak etkileştikleri de immün-çöktürme tekniği ile ortaya konulmuştur (106). p53'ün transkripsiyonunda rol aldığı p21, GADD45 ve Bax proteinleri de çalışmaya dahil edilmiştir (106). Northern Blot analizleri *p21* ve *Bax* gen transkripsiyonlarının belirgin derecede arttığını ancak G₂/M kontrol noktasında UV maruziyeti sonrasında hücre döngüsünün durdurulmasında önemli rol oynayan *GADD45*'in artmadığını ortaya koymuştur (106). Western Blot analizleri ise, p21'in dışarıdan verilen ING4 ile arttığı ancak yine dışarıdan verilen p53 ile artmadığını göstermiştir (106). Aynı çalışmada Cip/Kip aile üyesi olan ve p53 tarafından düzenlenmeyen siklin kinaz engelleyicisi p27'nin seviyesi ING4 uygulamasıyla değişmemiştir (106). Bu bulgu, ING4'ün *p21* ve *Bax* gibi p53 tarafından düzenlenen genleri p53-bağımlı olarak etkilediğini ancak yine p53 tarafından düzenlenen *GADD45*'i etkilemediğini işaret etmektedir (106). ING4'ün p21'i, p53'e bağımlı olarak düzenlediği hipotezini güçlendirmek amacıyla, *p53* geninden yoksun olan Saos-2 hücrelerine ING4 bulaştırılmıştır ve bu hücrelerde p21 seviyesinin değişmediği görülmüştür (106). Bu bulgu, p21'in ING4 tarafından p53 aracılığıyla düzenlendiğini göstermiştir (106). Bu çalışmada dikkat çekilen bir diğer konu da, p21'in p53'den bağımsız başka yollar tarafından da düzenlenebileceği ve ING4'ün hücredeki bir kısım diğer proteinlerle de etkileştiğidir (106).

ING4'ün G₂/M kontrol noktasında hücre döngüsünün durdurulması üzerine olan etkisinin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için, G₂/M kontrol noktasının düzenleyicilerinden olan siklin B1/CDC2'de çalışmaya dahil edilmiş ve siklin B1 ve CDC2'nin ING4'e bağlı değişimleri de çalışılmıştır (106). ING4'ün, HepG2 hücre hattında, siklin B1 ve CDC2'nin düzenlenmesinde etkili olmadığı belirlenmiştir (106). Bu bulgu G₂/M kontrol noktasında ING4'e bağlı hücre döngüsü

durdurulmasında siklin B1 ve CDC2'nin ING4'ten etkilenmediğini göstermektedir (106). Ancak daha önce gerçekleştirilmiş çalışmalar p21'in siklinB1/CDC2 bileşenine bağlanarak CDC2 işlevini engellediğini gösterdiğinden bu çalışmada da p21 ve siklin B1 immün-çöktürme yöntemiyle çalışılmış ve bu iki proteinin fiziksel ilişkisi ortaya konulmuştur (106). Bu bulgu, HepG2 hücrelerinde ING4'e bağlı olarak p21 seviyesinin arttığını ve p21'in de siklin B1 ile etkileşerek G₂/M kontrol noktasında hücre döngüsünü durdurduğuna işaret etmektedir (106). Bu çalışmada ayrıca ING4'ün HepG2 hücrelerindeki programlı hücre ölümüne etkisi ve HepG2 hücrelerinin DNA hasarına neden olan Etoposid ve Doxorubicin'e karşı duyarlılıkları da çalışılmıştır (106). ING4'ün hücre kültürünün 4. gününde HepG2 hücrelerinde, programlı hücre ölümünü %20 oranında arttırdığı belirlenmiştir (106). Etoposid ve Doxorubicin HepG2 hücrelerinde p53'ün gen ifadesini arttırmakta ancak ING4'ün gen ifadesini değiştirmemektedir (106). ING4 bulaştırılan HepG2 hücrelerinin Etoposid ve Doxorubicin ile muamele sonrasında ölüm oranlarında artış olduğu belirlenmiştir (106).

ING4'ün melanoma dokularında gen ifade seviyesinin azaldığının belirlenmesi sonrasında, ING4'ün melanoma gelişimi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla melanoma hücre hattı olan M14 hücre hattında ING4 bulaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir (108). Bu amaçla, hücre çoğalması ve programlı hücre ölümünde rol alan proteinler; p27, SKP2, siklin D1, Bcl-2, Bax, Cyt-c ve kaspaz-3 proteinlerinin seviyeleri çalışılmıştır ve ING4'ün hücre çoğalması ve programlı hücre ölümü üzerine etkileri değerlendirilmiştir (108). p21 ve Bax seviyelerinin artması, p53 bağımlı olarak hücre döngüsünü durdurmaktadır (106,108). Siklin D1, pRb'nin işlev kaybetmesine neden olarak hücre döngüsünün G₁'den S fazına geçmesini sağlamaktadır ve p27 proteini de siklin-CDK işlevlerini engelleyerek hücre döngüsünü G₁ aşamasında durdurmaktadır (108). SKP2 proteini, p27'nin ubiquitinlenerek parçalanmasına neden olmakta ve hücre döngüsünün devamlılığını sağlamaktadır (108). ING4 bulaştırılan M14 hücrelerinde Western Blot analizleri yapılmış ve p27 seviyesinin arttığı, siklin D1 ve SKP2 seviyelerinin de azaldığı belirlenmiştir (108). Bu bulgular, ING4'ün, hücre döngüsü düzenleyicileri olan p27, siklin D1 ve SKP2'nin gen ifadelerini düzenleyerek hücre döngüsünü engellediğine işaret etmektedir (108).

Bcl-2 protein ailesi, Bcl-2, Bcl-xL gibi ters-apoptotik proteinler ve öncü-apoptotik proteinler olan Bax, Bak ve Bid gibi programlı hücre ölümünün ana düzenleyicisi olan

proteinleri içermektedir (108). Bu iki grup proteinin birbirlerine oranları hücrenin yaşamının devamlılığı yada programlı hücre ölümünün gerçekleşmesinde önemlidir (108). Bcl-2'nin fazla ifadesi ve Bax'ın ifadesinin azalması programlı hücre ölümünü engellemekte ve tümör gelişimine de neden olabilmektedir (108). Bcl-2'nin ifadesinin azalması ve Bax'ın ifadesinin artması ise mitokondrilere bağlı programlı hücre ölümünün gelişmesini, Cyt-c'nin salınmasını, Caspas-3'ün ayrılmasını ve apoptozomun oluşmasını sağlamaktadır (108,44). M14 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmada ING4 bulaştırılması sonrasında gerçekleştirilen Western Blot incelemeleri, Bcl-2 ve kaspas-3 seviyelerinin azaldığını, Bax ve Cyt-c seviyelerinin arttığını göstermiştir (108). Bu bulgular ING4'ün, M14 hücrelerinde mitokondrilere Cyt-c'nin salınmasını sağlayarak kaspazların ayrılmasına neden olan Bcl-2'nin ifadesini azalttığını ve Bax'ın ifadesini arttırdığına işaret etmektedir (108). Bu çalışmada ING4 bulaştırılan hücrelerin çoğalma hızlarının azaldığı ve programlı hücre ölüm oranının arttığı belirlenmiştir (108).

ING4 proteininin akciğer karsinomundaki gen ifade seviyesi ile normal akciğer dokusundaki gen ifade seviyeleri karşılaştırılmış ve ING4'ün gen ifade seviyesinin akciğer adenokarsinomunda azaldığı görülmüştür (109). Bununla birlikte, kötü farklılaşmış olan hücrelerdeki *ING4* gen ifade seviyesi iyi farklılaşmamış olan hücrelerden daha düşük bulunmuştur (109). Bu bulgulara bağlı olarak, ING4'ün akciğer adenokarsinomunun gelişiminde ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde aldığı rolleri ortaya koyabilmek için akciğer adenokarsinom hücre hattı olan A549 hücrelerinde ING4 bulaştırma çalışması yapılmıştır (109). Öncelikle ING4'ün A549 hücrelerinde hücre çoğalması üzerine etkisi değerlendirilmiştir ve ING4 uygulanmasının bu hücrelerde koloni oluşumunu ve hücre çoğalmasını olumsuz olarak etkilediği görülmüştür (109). Daha sonra ING4 uygulanmış ve uygulanmamış olan hücreler farelere verilmiş ve ING4 uygulanmış olan hücrelerden gelişen tümörlerin, uygulanmayan hücrelerden gelişen tümörlere oranla çok daha küçük kaldıkları görülmüştür (109). Bu bulgular, ING4'ün hem *in vitro* hem *in vivo* olarak hücre çoğalmasını baskıladığını göstermektedir (109). ING4'ün hücre çoğalmasına olumsuz etkisini ortaya koymak için, hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol alan siklin D1, p27, SKP2 ve Cox2 proteinlerinin seviyelerine bakılmıştır (109). Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak ING4'ün p27 seviyesini arttırdığı ve siklin D1 ve SKP2 seviyelerini azaltarak hücre döngüsünü G1 aşamasında, pRb henüz

fosforillenmeden, durdurduğunu ortaya koymuştur (109). Bu çalışmada ayrıca, karsinogenezin erken döneminde hücre çoğalmasının uyarılmasında, hücrelerin programlı hücre ölümüne karşı direnç geliştirmesinde, anjiyogenez, hücre yayılması ve metastazda merkezi rol oynayan Cox2 enziminin gen ifade seviyesine ING4 uygulaması sonrasında bakılmıştır (109). Sonuçlar Cox2 proteinin seviyesinin belirgin şekilde azaldığını göstermiştir ve A549 hücrelerinin hücre çoğalma mekanizmalarında ve tümör gelişimlerinde ING4'ün engellediği bir yolak olasılığını düşündürmüştür (109).

Karsinogenezde önemli bir yolak olan Wnt sinyal ileti yolağında siklin D1, Cox2 ve c-Myc proteinleri rol almaktadırlar (109). Siklin D1 ve Cox2'nin ING4 bulaştırılmasıyla protein seviyelerinin değişmesi, ING4'ün Wnt uyarı ileti yolağının bir parçası olduğunu düşündürmüştür (109). Wnt uyarı ileti yolağında β -catenin/TCF (T-cell factor) bileşiğinin işlev kazanması birçok tümörün gelişmesinde anahtar rol oynamaktadır (109). Wnt-1'in uyarılması, sitozoldeki β -catenin kararlılığına yol açmakta ve sitoplazmada biriken β -catenin çekirdeğe girerek TCF transkripsiyon faktörleriyle etkileşip, transkripsiyonlarını uyarmaktadır (109). ING4'ün, Wnt-1/ β -catenin uyarı ileti yolağına ve akciğer kanseri gelişimine etkisini değerlendirmek amacıyla A549 hücrelerinde ING4 bulaştırma çalışması gerçekleştirilmiş ve Wnt-1 ve β -catenin'in protein seviyelerinin ING4 bulaştırılması sonrasında belirgin derecede azaldığı belirlenmiştir (109). Bu bulgu ING4'ün Wnt-1/ β -catenin uyarı ileti yolağında Wnt-1'i etkileyerek bu yolağın gelişimini engellediğini ve β -catenin'in sitoplazmadaki birikimini bu şekilde düzenlediğini düşündürmüştür (109). Siklin D1, p27 ve Cox2 Wnt-1/ β -catenin uyarı ileti yolağı tarafından düzenlenmektedirler ve birçok tümörde p27'nin gen ifade seviyesinin azalmasının, siklin D1 ve Cox2'nin gen ifade seviyesinin artmasının Wnt-1/ β -catenin yolağına cevap olarak geliştiği rapor edilmiştir (109). Bu çalışma, ING4'ün Wnt-1/ β -catenin yolağı aracılığıyla p27'nin gen ifadesini arttırdığını ve siklin D1, SKP2 ve Cox2 gen ifade seviyelerini azalttığını önermektedir (109).

ING4'ün tümör gelişimi ve anjiyogenez üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla, patofizyolojisinde damar gelişiminin özellikle önem arz ettiği hepatocellular karsinoma (HCC)'li hastalarda bir çalışma tasarlanmıştır ve HCC'li hastalardan elde edilen bulgular paracarcinomatouslu (PCLT) hastalar ve kanserli olmayan hastalardan elde edilen bulgularla karşılaştırılmıştır (110). Bu amaçla, hepatocellüler karsinomalı, paracarcinomatous'lu (PCTL) ve kanserli olmayan hastaların karaciğerlerinden alınmış

olan dokularda RT-PCR ile ING4'ün mRNA seviyeleri, immün-histomkimyasal boyama ile de ING4'ün ifade edilen protein seviyelerine bakılmıştır. Ayrıca anti-CD34 antibodi ile de mikrodamar yoğunluğu (Microvessel Density; MVD) araştırılmıştır (110). Bulgular, PCLT'li hastalarla karşılaştırıldığında HCC'li hastalarda ING4 mRNA seviyelerinin belirgin derecede azalmış olduğunu ortaya koymuştur (110). PCLT'li hastalardaki azalmış mRNA seviyeleriyle uyumlu olarak HCC'li hastalarda da ING4'ün protein seviyeleri azalmıştır (110). Bu bulgular, glioma ve melanomalarda gerçekleştirilen tümörlü dokuda ING4'ün hem mRNA hem de protein seviyesinin azaldığını gösteren çalışmalardaki bulgularla uyumludur (110). Bu çalışmada ayrıca, ING4'ün yeni damar gelişimi üzerine etkisini değerlendirmek amaçlı damar endotel hücrelerinde fazlaca ifade edilen CD34 antibadilerine de bakılmıştır ve HCC dokularında MVD ile ING4 seviyesi arasında istatistiksel bir ilişki olduğu belirlenmiştir (110). MVD ile azalmış ING4 seviyesi arasındaki ilişki, HCC'li hastalarda ING4'ün hem tümör baskılama hem de anjiyogenez ile ilişkili olduğunu önermektedir (110). Bu çalışmada elde edilen diğer bulgularla uyumlu olarak, ING4 seviyelerinin HCC'nin ilerlemesi ve metastaz yapmasıyla da uyum gösterdiği belirlenmiştir (110). Bu çalışma, ING4'ün HCC'nin karsinogenezi ve gelişiminde önemli rol oynadığını önermektedir (110).

Diğer bir çalışmada ING1'in tümör gelişimindeki rolünün ortaya konulması sonrasında ING1'in NLS bölgesindeki uyarıları oluşturan DNA dizileri GenBank'ta taranmış ve ING4 tanımlanmıştır (87). ING4'ün protein düzeyinde NLS bölgesi ihtiva ettiği de İmmünfloresan yöntemiyle teyit edilmiş ve birçok insan dokusunda ING4'ün gen ifadesi araştırılarak, ING4'ün bu dokulardaki varlığı belirlenmiştir (87). ING1'in tümör dokularında gen ifadesinin baskılandığı bilgisinden yola çıkılarak, ING4'ün de tümör gelişiminde rol alabileceği düşünülmüş ve bir çalışma tasarlanmıştır (87). Gliomalar, grade II (düşük derece), grade III (anaplastik) ve astrositik fenotipli çok kötü huylu Glioblastoma Multiforme'nin dahil olduğu grade IV olarak gruplandırılmıştır (87). ING4'ün beyin tümörü gelişiminde rol alıp almadığını değerlendirmek amacıyla RT-PCR ile ING4'ün mRNA düzeyleri araştırılmış ve normal beyin dokusundakine göre grade II ve III'te 2-3 kat, grade IV'de ise 6 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir (87). Bu bulgular, beyin tümörlerinde ING4'ün belirgin şekilde baskılandığına ve ING4'ün gen ifadesinin azalmasının tümörün derecesiyle ilişkili olduğuna işaret etmektedir (87). ING4 gen ifade seviyesinin beyin tümörlerinde azaldığını teyit etmek amacıyla,

ameliyat sırasında çıkarılmış olan tümör dokuları ve bu dokulara bitişik olan normal dokular immünohistokimyasal olarak boyanmış ve ING4 protein düzeylerine bakılmıştır (87). Normal beyin dokularında ING4'ün NLS bölgelerine yönelik gerçekleştirilen boyamada ING4'ün çekirdek içindeki yerleşimi güçlü uyarı verecek şekilde görülmüştür, bitişik tümör dokularında ise, RT-PCR sonuçlarıyla uyumlu olacak şekilde çok zayıf nükleer boyanma izlenmiştir (87).

Glioblastoma Multiforme'de mikrovasküler gelişim belirgin bir ayıraç olduğundan, ING4 gen ifadesindeki değişimlerin damar oluşumu üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışma tasarlanmıştır (87). Bu amaçla ING4'ün fazla ifade edilmesini sağlayacak plazmidler ve normalde hücrede halihazırda sentezlenen ING4'ü de baskılayacak plazmidler hazırlanmış ve bu plazmidler ayrı ayrı olarak glioblastoma hücre hattı olan U87MG hücrelerine aktarılmışlardır (87). Bu hücrelerdeki ING4 protein seviyeleri de ayrıca Western Blot ile teyit edilmiştir (87). Hazırlanan bu hücreler ve işlem görmemiş normal hücreler, damar gelişimi ve tümör büyümesinin takip edilmesi amacıyla "cranial window"a yerleştirilerek çoğaltılmış ve *in vivo* etikleri değerlendirilmiştir (87). ING4'ün baskılandığı hücreler normal hücreler ve ING4 ifadesini arttıracak plazmid taşıyan hücrelere göre çok daha hızlı büyümüşlerdir (87). 12. gün sonunda işlem görmüş hücreler ve normal hücrelerin oluşturduğu doku içindeki alanlar kıyaslanmış ve ING4'ün fazla ifade edildiği hücrelerin, ING4'ün baskılandığı ve işlem görmeyen normal hücrelere göre daha az bir alan kapladıkları belirlenmiştir (87). Bu üç grup hücreden gelişen dokudaki damarlanma düzeyleri de değerlendirilmiş ve ING4'ün baskılandığı hücre grubundan gelişen tümör dokusundaki damarlanmanın kontrol gruplarına göre çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (87). Buna karşılık, ING4'ün fazla ifade edildiği hücrelerden gelişen tümör dokusunda gelişmiş olan damar ağı ise kontrol gruplarına göre daha düşük belirlenmiştir (87). Oluşan damarların çapları da karşılaştırılmış ve ING4'ün baskılandığı tümör dokusundan gelişen damarların çaplarının işlem görmeyen ve ING4'ün fazla ifade edildiği hücrelerden gelişen dokulardakine göre istatistiksel olarak belirgin şekilde fazla olduğu görülmüştür (87). Damarlanma yoğunluğu ve damar çaplarından elde edilen sonuçlar tümör gelişimi sırasında ING4'ün damar gelişimini olumsuz etkilediğini işaret etmektedir (87). ING4'ün damar gelişimindeki etkisini ve moleküler mekanizmalarını anlamak için araştırma devam ettirilmiştir (87).

Daha önceki çalışmada ING4 ile işlenmiş olan U87MG hücrelerinde anjiyogenez ile ilişkili olan 288 gen DNA mikroarray yöntemiyle çalışılmıştır (87). ING4'ün baskılandığı hücrelerde interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), prostaglandin-endoperoksid sentaz 2 (Cox-2) ve koloni stimüle edici faktör 3'ün gen ifadelerinin arttığı belirlenmiştir (87). Bu genler bir transkripsiyon faktörü olan ve kanser gelişiminde gen ifade seviyesi sıklıkla değişen NF- κ B tarafından düzenlenmektedirler (87). NF- κ B ve ING4 arasındaki olası ilişkiyi ortaya koymak için NF- κ B ilişkili genlerin ifade seviyeleri, ING4 gen ifadesi baskılanmış olan hücrelerde Western Blot ile tayin edilmiş ve ING4'ün baskılanmasıyla NF- κ B ile düzenlenen genlerin ifadelerinde artış olduğu belirlenmiştir (87). IL-8 endotel hücrelerinin kemotaksisi ve çoğalmalarını uyarmakta ve tümörlerdeki yeni damar oluşumlarına aracılık etmektedir (87). Bu nedenle ING4'ün baskılandığı ve ING4'ün baskılanmamış olduğu hücrelerde ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle IL-8 protein seviyesi belirlenmeye çalışılmış ve ING4 baskılanmış hücrelerde 80 pg/m'den 780 pg/m değerine arttığı belirlenmiştir (87). ING4 ve VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) arasındaki ilişki de araştırılmış ve VEGF ve ING4 arasında doğrudan bir ilişki olmadığı belirlenmiştir (87).

NF- κ B, immün cevap oluşturma, anjiyogenez, tümör gelişimi ve metastaz gibi hücresel olaylarda rol almakta olan bir transkripsiyon faktörüdür (87). ING4 ve NF- κ B arasındaki fiziksel etkileşimi ortaya koymak için “birlikte-çöktürme” yöntemi kullanılmıştır (87). Bu amaçla ING4'e “Flag” eklenmiş ve hücreler Flag-ING4 ve sadece Flag ile muamele edilmişlerdir (87). Daha sonrada Flag dizisine karşı olan antiserumlar ile Flag içeren protein çöktürülmüşlerdir (87). Çöktürülmüş proteinler NF- κ B'nin varlığını belirlemek için NF- κ B'nin alt birimi olan p65 proteinine yönelik antiserumlar ile tekrar immüno-blot yöntemiyle çöktürülmüşlerdir (87). Bu çalışmada NF- κ B'nin alt birimi olan p65 ile ING4 birlikte çökmüşlerdir ve bu durum p65 ile ING4 arasındaki fiziksel ilişkiyi ortaya koymaktadır (87). Bu çalışmayı teyit etmek amacıyla GAL4-ING4 v VP16-p65 füzyon proteinlerinin kullanıldığı diğer bir çalışma tasarlanmış ve bu çalışmada da ING4 ile p65 arasında fiziksel bir ilişki olduğu bulunmuştur (87).

ING4'ün hücre yayılması ve hücre göçündeki rolün ve metastaza katkısını belirlenmeye belirlemek amacıyla sitoplazmada etkileştiği proteinler belirlenmeye çalışılmış ve

ING4'ün Liprin- α 1 ile fiziksel olarak etkileştiği görülmüştür (14). Liprin- α 1, fokal adezyonlarda LAR (Leukocyte Common Antigen-Related) ailesi ile bağlanan bir proteindir ve sinaptik veziküllerin hareketlerinin gerçekleştirilmesinde rol almaktadır (14). Meme kanseri hücrelerinde gerçekleştirilen bu çalışmada ING4'ün hücre göçünde rol aldığı ve bu işlevi gerçekleştirebilmek için Liprin- α 1'e gereksinim duyduğu belirlenmiştir (14). Hücreler birbirleri ile dokunma (contact) halindeyken ING4'ün nükleusta yerleşik olduğu immünofloresan yöntemle belirlenmiştir (14). İlginç olarak, RKO hücrelerinde, hücrelerin birbirleri ile olan dokunmalarının azalmalarına bağlı olarak ING4 sitoplazmada ve özellikle hücre zarının çıkıntı yapmış olan bölgelerinde yoğunlaşmalara neden olmuştur (14). Aynı bölgelerde Liprin- α 1'de birikmiştir ve bu durum, ING4 ve Liprin- α 1'in fokal adezyonlarda birlikte rol aldıklarını göstermektedir (14). Aynı çalışma, HEK-293 ve U-87 MG hücre hatlarında gerçekleştirilmiş ve fokal adezyonlarda yer alan vinculin proteini ile ING4 ve Liprin- α 1'in aynı bölgede yerleştiği tespit edilmiştir (14).

Liprin- α 1, nöronlardaki dentrit uzamasında rol almaktadır. ING4 ve Liprin- α 1'in hücre zarında birlikte bulunması, membran değişimlerine ve hücre yayılması üzerine etkilerinin olabileceğini düşündürmüş ve iki molekülde incelenmiştir (14). Membran yüzeylerinin, ING4 verilen hücrelerde verilemeyenlere göre belirgin derece daha küçük kaldığı görülmüştür (14). Filopod ve/veya lamellipod içeren hücreler ve bunların hücre yayılmasına oranları incelendiğinde, ING4 verilen hücrelerin 1 saat içindeki hücre yayılmasını ING4 verilmeyen hücrelere göre 4 kat azalttığı görülmüştür (14). RKO hücre hatlarında ING4'ün hücre yayılmasını baskılaması, 24 saatlik bir çalışmayla, her 5 dakikada bir hücre kültürünün fotoğraflarının çekilmesiyle de teyit edilmiştir (14). ING4'ün baskılanmasıyla hücre göçünün nasıl etkilendiği de belirlenmeye çalışılmış ve ING4 mRNA'sı siRNA'larla baskılanmıştır (14). ING4 mRNA'sı baskılanan hücrelerde filopod ve lamellipodların fazlaca geliştiği ve hücre göçünün uyarıldığı görülmüştür (14). Bu çalışma, Liprin- α 1'in hücre göçünde önemli rol oynadığını ve ING4'ün Liprin- α 1 ile bağlanıp işlevini engelleyerek hücre göçünü baskıladığını göstermektedir (14).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Gruplarının Oluşturulması ve Çalışmanın Yapısı

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ve Tıbbi Onkoloji Bölümlerine başvurmuş, pankreas kanseri tanısı konulmuş ve ameliyat ile tümörün çıkarılmasına karar verilmiş olan 11 erkek (ortalama yaş $61,18 \pm 14,3$) ve 4 kadın (ortalama yaş $62,75 \pm 11,81$) toplam 15 hastadan alınan örnekler, hastaların onayları ve çalışma için Etik Kurul Onayı (Etik Kurul No: 06-2009/221) alındıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Tümörün çıkarıldığı ameliyatlarda, tümör dokusu çıkarılırken çevredeki tümörlü olmayan doku da çıkarılmaktadır. Pankreas kanseri ameliyatlarında da tümör ile birlikte tümörlü olmayan doku çıkarılmaktadır. Bu çalışmada, tümörlü dokudan elde edilen ING4 ve p53 verileri, tümörlü olmayan normal dokudan elde edilen ING4 ve p53 verileri ile karşılaştırılarak, tümör gelişimi sırasında iki gendeki değişimler ve bu değişimlerin tümör gelişimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla her hastanın normal dokusu, aynı hastanın tümörlü dokusu için kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

3.1.1 Dokuların temini

Pankreas kanseri ameliyatı sırasında çıkarılan ve patoloji laboratuvarına gönderilecek örneklerin bir kısmı dikkatlice ayrılmış ve ivedilikle daha önceden hazır bekletilen azot tankına konularak muhafaza edilmişlerdir. Azot tankında biriktirilen dokular daha sonra laboratuara aktarılmış ve çalışma için gerekli olan DNA ve RNA eldesi gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırma Yöntemleri

3.2.1. DNA ve RNA'ların elde edilmesi

Sıvı azot içerisinde alınan örnekler 40 mg'lık ve 25 mg'lık parçalara ayrılarak püreleyici (homojenizatör) (Kinematica, Gmdh, Switzerland) ile parçalanmışlardır. Homojenizatör her kullanımdan sonra, bulaşmayı önlemek için doku örneği kalmayacak şekilde; %50 seyreltilmiş çamaşır suyu ile 3 defa, saf su ile 1 defa, %96'lık alkol ile 1 defa ve en son tekrar saf su ile yıkanarak temizlenmiştir. Parçalanmış olan tümör

dokuları ve normal dokulardan High Pure Template Preparation Kit (Roche, Cat.No. 11 796 828 001, Mannheim, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yöntemle DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Aynı örneklerden High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Cat. No. 12 033 674 001, Mannheim, Germany) aracılığıyla üretici firmanın önerdiği yöntem ile RNA'lar da elde edilmiştir.

3.2.1.1. Dokudan DNA elde edilmesi

1,5 ml'lik tüpe konulan 40 mg'lık doku püresi (homojenizati) üzerine 200 µl Doku Çözme Tamponu (Tissue Lysis Buffer) (4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7,4) ve 40 µl Proteinaz K eklenerek karıştırıldı. 55 °C'de 1 saat bekletilen çözelti üzerine 200 µl Bağlama Tamponu (Binding Buffer) (6 M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100, pH 4,4) eklendi ve 70 °C'de 10 dakika bekletildi. 10 dakika bekletilen çözelti üzerine 100 µl izopropanol eklenip karıştırıldı. Hazırlanan çözelti filtre tüpü üzerine pipet aracılığıyla dikkatlice konuldu ve 8.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüpü üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer (5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) çözeltisi konuldu ve 1 dakika 8.000xg'de santrifüj edildi. Daha sonra filtre tüpü üzerine 500 µl Yıkama Tamponu (Wash Buffer) (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) eklendi ve tekrar 800xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılması için 8.000xg'de tekrar santrifüj edildi. Daha sonra filtre tüpü temiz bir toplama tüpü ile birleştirildi ve 200 µl daha önceden 70 °C'ye ısıtılmış olan Süzme Tamponu (Elution Buffer) (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eklendi ve 8000xg'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpüne aktarılmış olan DNA'lar bu aşamadan sonra – 20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.1.2. Dokudan RNA elde edilmesi

Dondurulmuş dokudan elde edilen 25 mg'lık doku püresi 1,5 ml'lik bir tüpe alındı ve üzerine 400 µl Çözme/Bağlama Tamponu (Lysis/Binding Buffer) (4,5 M guanidine-HCl, 100 mM sodium phosphate pH 6,6) eklendi ve 2 dakika 13.000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj aşamasından sonra üstteki sıvı alınarak üzerine 200 µl etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Örnekler "filtre tüp" üzerine konuldu ve 30 saniye 13.000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında filtre tüp üzerine 90 µl DNase Incubation Buffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7.0) ve 10 µl DNase I ile hazırlanan çözelti eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 500 µl Yıkama Tamponu I (Wash Buffer I) (5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) filtre tüpü üzerine

konuldu ve 15 saniye 8.000xg’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüpü üzerine 500 µl Yıkama Tamponu II (Wash Buffer II) (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5) eklenerek 15 saniye 8000xg’de santrifüj edildi. Daha sonra 300 µl yıkama Tamponu II (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5)’den eklendi ve 13.000xg’de 2 dakika santrifüj edildi. Filtre tüpü 1,5 ml’lik steril bir tüple birleştirildi ve filtre tüpü üzerine 100 µl Süzme Tamponu (Nuclease-free, sterile, double distilled water) eklendi. 1 dakika 8.000xg’de santrifüjden sonra RNA’lar filtre tüpten alınmış oldu ve -85 C’de saklandı.

3.2.2. cDNA sentezi

Dokulardan elde edilen DNA’lar doğrudan çalışılabilmektedirler. RNA’lar tek zincirli olmaları, yarı ömürlerinin az olması ve kararsız yapıları nedeniyle çift zincirli DNA’lara dönüştürüldükten sonra çalışılabilmektedirler (111). RNA’nın kalıp olarak kullanılmasıyla sentezlenen DNA’ya tamamlayıcı DNA (complementer DNA; cDNA) denilmektedir (111). cDNA sentezi, RNA’dan DNA sentezleyen Revers Transkriptaz enzimi tarafından gerçekleştirilmekte ve yöntem RT-PCR olarak adlandırılmaktadır (111).

Tablo 3.1. cDNA eldesindeki PCR karışım oranları ve PCR koşulları.

Kullanılan Reaktifler	Kullanılan Hacim
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
10x RT Tamponu	1 µl
RNaz’dan ari dH ₂ O	3.75 µl
dNTP Karışımı (10 mM)	1 µl
RNaz Engelleyicisi (40 U/ml)	0.25 µl
AMV Ters Transkriptaz (5 U/ml)	0.5 µl
Oligo dT-primer (20 mM)	0.5 µl
RNA örneği	1 µl
Toplam Hacim	10 µl

Gerçekleştirilen çalışmada cDNA’lar TaKaRa One Step RNA PCR Kit (Cat No; RR024B, Japonya) kullanılarak sentezlenmiştir. Kullanılan Kit *Avian myeloblastosis* Virüs’den elde edilmiş olan AMV Revers Transkriptaz enzimi ve iki çeşit primer ihtiva etmektedir. “Random primer” olarak adlandırılan primerler, RNA’lara rastgele bağlanarak cDNA sentezini gerçekleştirmekteyken, “oligo-dT” olarak adlandırılan

primer mRNA'ların 3'-uçlarındaki çoklu-Adeninlere bağlanarak cDNA sentezini gerçekleştirmektedirler (112). ING4 mRNA'sının bütün halde cDNA'sının sentezlenebilmesi için oligo-dT primerleri kullanılmıştır. PCR koşulları ve PCR karışımı, kullanılan Kit'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. PCR karışımı Tablo 3.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, 30 °C'de 10 dakika, 42 °C'de 30 dakika, 99 °C'de 5 dakika ve 5 °C'de 5 dakika olacak şekilde PCR cihazı ayarlanarak gerçekleştirildi (112).

3.2.3. Primerlerin ve uygun çalışma şartlarının belirlenmesi

3.2.3.1. p53 geni primeleri

p53 geni 13 ekzondan oluşmakta olup 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. ekzonları protein yapıya katılmaktadır (55). Bu çalışmada protein yapıya katılan ekzonların tamamı çalışılmıştır. Bu amaçla her bir ekzon için bir primer çifti kullanılmıştır. Primerler, Gunduz ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmadan alınmıştır (16). Primerlerin çalıştıkları uygun sıcaklıklar, aşamalı sıcaklık değişimi (sıcaklık gradiyenti) yapılarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan primerler ve aşamalı sıcaklık değişiminden elde edilen sıcaklık sonuçları Tablo 3.2'de görülmektedir.

Tablo 3.2. p53 geni ekzonlarını çoğaltmak için kullanılan primer çiftleri ve aşamalı sıcaklık değişimi sonucunda belirlenen uygun çalışma sıcaklıkları.

Ekzon Adı	Duyarlı ve Ters-duyarlı Primerler		Sıcaklık °C
P53 geni için primerler			
Ekzon 4	S	5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG	62
	AS	5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA	
Ekzon 5	S	5'-GACTTTCAACTCTGTCTCCTTC	56
	AS	5'-AACCAGCCCTGTCGTCTCTC	
Ekzon 6	S	5'-ACCATGAGCGCTGCTCAGAT	58
	AS	5'-AGTTGCAAACCAGACCTCAG	
Ekzon 7	S	5'-CTTGGGCCTGTGTTATCTCCT	62
	AS	5'-AGGGTGGCAAGTGGCTCCTG	
Ekzon 8	S	5'-CCTTACTGCCTCTTGCTTCTC	58
	AS	5'-TGAATCTGAGGCATAACTGCAC	
Ekzon 9	S	5'-AGTTATGCCTCAGATTCACTTT	53
	AS	5'-GATAAGAGGTCCCAAGACTTAG	

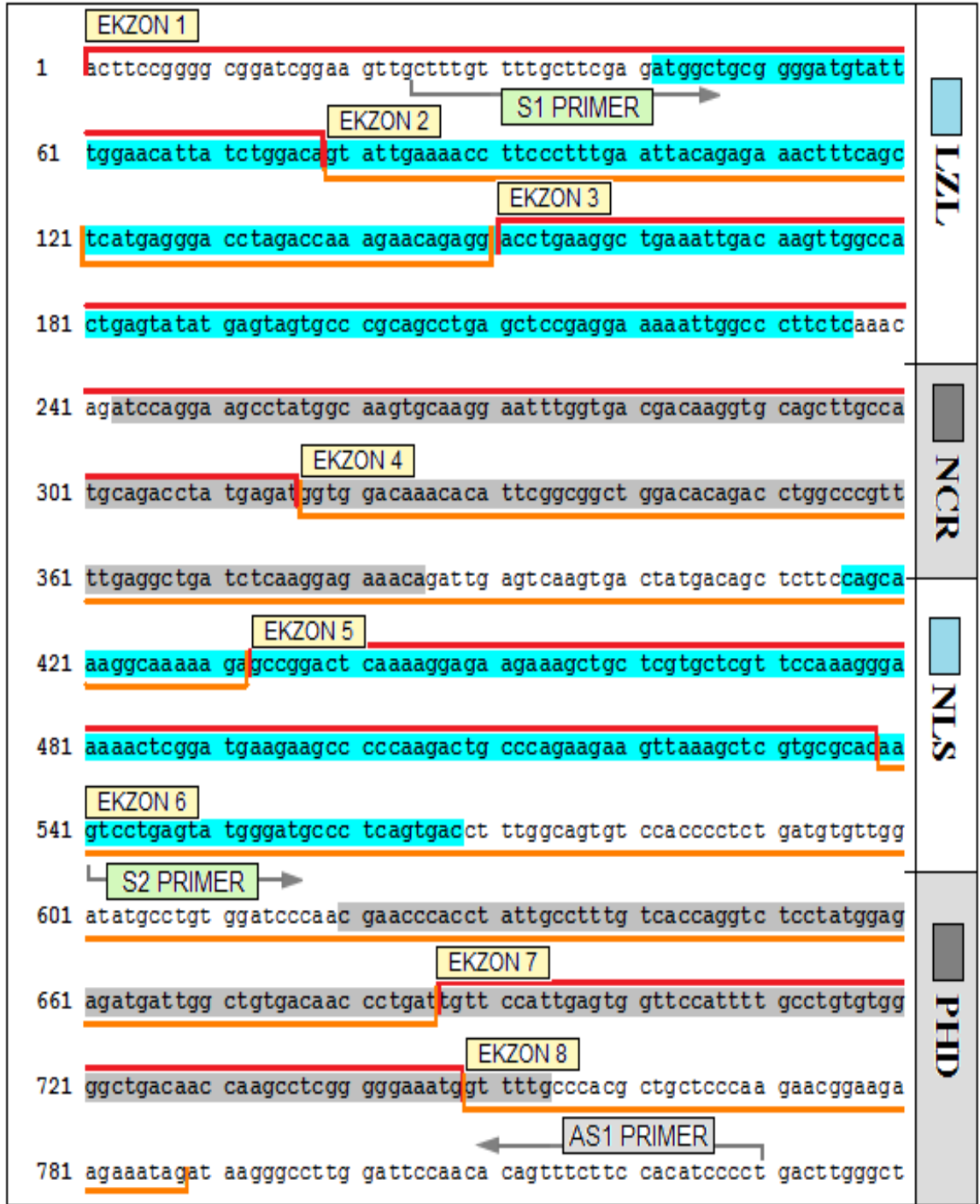
3.2.3.2. ING4 geni primerleri ve çalışma koşulları

ING4 geni 248 amino asitlik bir protein kodlamakta olup 8 ekzon ve 7 introndan oluşmaktadır (77). Bu çalışmada ING4 mRNA'sından sentezlenen cDNA kullanılmış olduğundan, primer çiftleri de cDNA'da çalışacak şekilde hazırlanmıştır. Gündüz ve arkadaşları tarafından ING4 cDNA'sında gerçekleştirilmiş bir çalışma için tasarlanmış olan primeler bu çalışmada da kullanılmışlardır (16). ING4 cDNA dizisi (113) ve çalışmada kullanılan primer çiftlerinin ING4 cDNA'sına bağlanma yerleri ve çoğalttıkları bölgeler Şekil 3.1'de görülmektedir. ING4'ün 8 ekzonunun tamamının çoğaltılabilmesi için S₁-AS₁ primer çifti kullanılmıştır. Gen ifade düzeyinin ortaya konulabilmesi için de 5, 6, 7 ve 8. ekzonların çoğaltıldığı S₂-AS₁ primer çifti kullanılmıştır.

ING4 cDNA primer çiftlerinin uygun çalışma sıcaklıkları, aşamalı sıcaklık değişimi çalışmasıyla belirlenmiştir. Tepkimenin en iyi şekilde gerçekleşmesi için uygun cDNA miktarı ve MgCl₂ değerleri de aşamalı olarak değiştirilerek belirlenmiştir. ING4 cDNA'ları için kullanılan primer çiftleri ve uygun çalışma sıcaklıkları Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. ING4 cDNA'sının çoğaltılması için kullanılan primer çiftleri ve uygun PCR sıcaklıkları

Ekzon Adı	Duyarlı ve Ters-duyarlı Primerler		Sıcaklık °C
ING4 geni için hazırlanan primerler			
ING4 dizi	S1	5'-CTTTGTTTTGCTTCGAGATGG	58
Analizi	AS1	5'-AGGGGATGTGGAAGAAACTGT	
ING4 gen	S2	5'-CACAAGTCCTGAGTATGGGAT	57
İfadesi	AS1	5'-AGGGGATGTGGAAGAAACTGT	



Şekil 3.1. ING4 cDNA dizisi. ING4 mRNA'sından elde edilen cDNA şekilde görülmektedir (113). cDNA üzerinde yer alan ekzonlar çizgiler ile ifade edilmişlerdir. ING4 proteini içersindeki bölgeler farklı renklerle belirtilmiş olup, renklerin hangi bölgelere tekabül ettiği sağ taraftaki kutucuklarda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve bu primer çiftlerinin çoğalttıkları bölgeler de görülmektedir.

3.2.4. PCR ile DNA ve cDNA'ların çoğaltılması

PCR (Polymerase Chain Reaction), moleküler biyolojide kullanılmakta olan temel tekniklerden biri olup, çift zincirli DNA'nın sıcaklık ile açılması, primer çiftlerinin

çoğaltılacak bölgelere bağlanması ve primerlerin uçlarına DNA polimeraz enzimi tarafından nükleotidlerin eklenmesinin ardışık şekilde gerçekleştirildiği bir tepkimeler zinciridir (114). Gerçekleştirilen çalışmada p53 geni ekzonları, her bir ekzon için hazırlanan primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmışlardır. ING4 cDNA'sı S₁-AS₁ ve S₂-AS₁ primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmışlardır. p53 DNA'sı ve ING4 cDNA'sının çoğaltılması amacıyla hazırlanan PCR karışım oranları Tablo 3.4'te görülmektedir. PCR için hazırlanan PCR karışımları ABI 9700 Thermalcycler cihazı ile çalışılmıştır. PCR çalışmasına PCR karışımları 94 °C'de 5 dakika bekletilerek başlandı. Daha sonra 94 °C'de 45 saniye, her primer çifti için belirlenen sıcaklıkta 45 saniye ve 72 °C'de de 45 saniye bekletilen toplam 36 döngü ile çoğaltılmışlardır. 36 döngü sonunda tekrar 72 °C'de 7 dakika bekletildikten sonra PCR ürünleri +4 °C'de bekletilmişlerdir.

3.2.5. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi

p53 geni ekzonlarından ve ING4 cDNA'sından gerçekleştirilen PCR'lar sonucunda elde edilen PCR ürünleri, PCR tepkimesinin çalışmış olduğunun teyit edilmesi amacıyla %2'lik olarak hazırlanan agaroz jelde 80 Volt'ta 15 dakika yürütüldü. Jel görüntüleri daha sonra değerlendirilmek üzere UVP görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı ve arşivlendi.

Tablo 3.4. p53 geni DNA'sı ve ING4 cDNA'sı için PCR karışım oranları

Kullanılan Reaktifler	Kullanılan Hacim
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
10x Tampon	1 µl
Saf su	6.46 µl
dNTP Karışımı (25 mM)	0.8 µl
İleri primeri (20 mM)	0.08 µl
Geri primeri (20 mM)	0.08 µl
Taq Polimeraz (5 U/µl)	0.08 µl
DNA ve cDNA örnekleri	0.5 µl
Toplam Hacim	10 µl

3.3. p53 Ekzonlarının SSCP Yöntemiyle İncelenmesi

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), tek zincirli hale getirilen DNA dizilerinin poliakrilamid jelde yürütülerek, nükleotid dizilimine bağlı olarak gerçekleşen farklı katlanmaların tespit edildiği bir yöntemdir (115). SSCP yöntemi, tek nükleotid değişimlerinin de belirlenebildiği bir yöntem olmasından dolayı, kanser moleküler biyolojisinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (116). SSCP'yi sınırlayan en önemli kısıtlama, yürütülen DNA dizisinin büyüklüğüdür (117). SSCP tekniğinde 150-400 nükleotid büyüklüğündeki bantlar sağlıklı incelemeye imkan vermektedir (117). Bu nedenle gerçekleştirilen çalışmada yalnızca p53 geni ekzonlarının SSCP incelemeleri gerçekleştirilmiş ve bu incelemelerde farklı çıkan bantların dizi analizleri yapılmıştır (117). ING4 geninin bant büyüklükleri 400 nükleotidden büyük olduğu için SSCP çalışması yapılmadan doğrudan DNA dizi analizi yapılmıştır.

SSCP yönteminde, yürütülecek olan DNA dizisinin büyüklüğüne göre iki farklı akrilamid/bisakrilamid oranında jel kullanılmaktadır (117). 300 nükleotidden büyük diziler için 49:1 (49 gr akrilamid, 1 gr bisakrilamid, 50 ml saf su), 300 nükleotidden küçük diziler için 19:1 (47,5 gr akrilamid, 2,5 gr bisakrilamid, 50 ml saf su) oranı tercih edilmektedir (117). p53 ekzon büyüklükleri 155 ile 296 nükleotid arasında olduğundan bu çalışmada 19:1 oranında hazırlanan akrilamid/bisakrilamid jeli kullanıldı. 19:1'lik akrilamid/bisakrilamid çözeltisi hazırlandıktan sonra bu karışımdan 14 ml alındı, 6 ml 10X TBE (108 gr Tris, 55 gr Borik asit, 8,3 gr EDTA) ve 80 ml saf su eklendi. Manyetik karıştırıcı ile karıştırılan çözeltiye %10'luk 450 µl APS (Amonyum persülfat) ve 45 µl TEMED (N,N,N,N-Tetrametil etilen diamin) eklendi. Hazırlanan çözelti zaman kaybedilmeden hızlıca daha önceden hazırlanmış olan camların arasına, hava kabarcığı oluşturmada döküldü (117).

PCR ürünleri formamid içeren çözelti (8 ml formamid, 2 ml saf su, 0.025 gr bromofenol mavisi, 0.025 gr ksilen siyanol) ile denatüre edilerek tek zincirli hale getirildi ve jele her bir örnekten 5 µl yükleme yapılarak +4 °C'de 430 Volt'ta 16,5 saat yürütüldü. Yürütme bittikten sonra bantların görüntülenmesi için gümüş boyama (2 gr gümüş nitrat, 2.5 ml %37'lik formaldehit, 2 litre saf su) yapıldı. Jeller ilk olarak %10'luk asetik asitte 15 dakika bekletildi. Daha sonra 5 dakika saf su içerisinde bekletildi. Gümüş nitrat çözeltisi içinde de 45 dakika bekletilen jeller daha sonra soğuk sodyum karbonat çözeltisi (60 gr sodyum karbonat, 420 µl 10 mg/ml sodyum tiyosülfat, 2 lt saf su)

içerisinde bantlar görününceye kadar bekletildi. Sodyum karbonat aşamasından sonra, %10'luk asetik asit ile 10 dakika tekrar muamele edilen jeller 5 dakika daha saf suda bekletildi ve kurumaya bırakıldı (117).

3.4. p53 Ekzonları ve ING4 cDNA Dizi Analizleri

DNA nükleotid dizileme işlemi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı Moleküler Tanı Birimi'nde ABI 3100 DNA Dizi Analiz Cihazı ile gerçekleştirildi. ABI 3100 DNA Dizi Analiz Sisteminde, "ABI Prism Big Dye" Kiti kullanılmaktadır. Kit içerisinde, AmpliTaq DNA polimeraz enzimi bulunmaktadır (118). AmpliTaq DNA polimeraz enziminin 5'-3' nükleaz işlevi ve fosfotaz işlevi engellenmiştir (118). PCR tepkimesi için gerekli olan kimyasallar kitin içerisinde hazır olarak bulunduğu için, kullanılacak primerlerden sadece birisi ve dizi incelemesi gerçekleştirilecek olan DNA eklenerek, kişisel hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır (118).

Otomatik DNA dizilemesinde, PCR ürünleri Sephadex'ten geçirilip temizlendikten sonra cihaza yüklenmektedir (119). Bu amaçla 1 gr Sephadex 14 ml saf su içerisinde çözülür ve kolonlara 600 µl olacak şekilde dağıtılır. 2000xg'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra Sephadex'li kolonlar başka bir tüpe alınır ve 10 µl PCR ürünü Sephadex üzerine bırakılır. Santrifüj işlemi 2000xg'de 2 dakika olarak gerçekleştirilir. Santrifüj sonrası alttaki tüpe geçen ürünlerin DNA dizilemesi yapılabilir.

Otomatik DNA dizileme sistemi, Sanger'in DNA dizi sonlandırma yöntemine göre çalışmaktadır (120). DNA dizi analizinde kullanılan ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmişlerdir ve çoğaltılan DNA parçacıkları, kılcal borucuklara yüklenen "jel matriks" içerisinden yürütülerek floresan boyaları otomatik olarak algılayan bir algılayıcıya yönlendirilmekte ve burada tanımlanmaktadır (119). DNA dizi analizi için hazırlanan PCR karışımı Tablo 3.5'te verilmiştir. Hazırlanan PCR karışımı, 96 °C'de 1 dakika bekletildi. Daha sonra, 96 °C'de 10 saniye, 50 °C'de 5 saniye ve 60 °C'de 4 dakikadan oluşan 25 döngü ile PCR işlemi gerçekleştirildi ve örnekler cihaza yüklenene kadar +4 °C'de bekletildi.

Tablo 3.5. Otomatik DNA dizileme için hazırlanan PCR karışımı oranları

Kullanılan Reaktifler	Kullanılan Hacim
Big Dye Cyle Sequencing V3.1 Kit	2 µl
5x Dizileme Tamponu	2 µl
İleri yada geri primer (20 mM)	2 µl
Örnek DNA	2 µl
Su	2 µl
Toplam Hacim	10 µl

3.5. ING4 Gen İfade Düzeylerinin İncelenmesi

ING4 gen ifade düzeyi, hamarat gen olan β -aktin geninin gen ifade seviyesi ile karşılaştırılarak belirlenmeye çalışıldı. β -aktin geninin gen ifade seviyesi, gen ifade seviyesi belirleme çalışmalarında “referans değer” olarak kullanılmaktadır (121). Bu çalışmada, β -aktin cDNA’ları ve ING4 cDNA’larının PCR’ları aynı şartlarda gerçekleştirildi. PCR aşamasından sonra, iki genin ürünleri %1,5’luk agaroz ile hazırlanan aynı jelde 80 Volt’ta 15 dakika yürütüldü. Yürütme sonrasında jelin fotoğrafı UVP görüntüleme sistemi ile çekildi. Jeldeki ING4 ve β -aktin genlerinden elde edilen bantlar “Image J” adlı program vasıtasıyla, bant büyüklüğü ve parlaklığına bağlı olarak yarı-nicel değerlendirildi (122).

4. BULGULAR

Gerçekleştirilen bu çalışma, tümör baskılayıcı bir gen olan ING4 geninin gen ifade seviyesi ve mutasyonlarının pankreas kanserinde tanımlanması amacıyla düzenlenmiştir. Tümör baskılanmasında p53 proteinin tümör gelişimi ile ilgili birçok yolda rol alması ve ING proteinlerinin p53 proteinin hem işlevini hem de kararlılığını düzenlemeleri nedeniyle aynı dokularda p53 genindeki değişimler de birlikte değerlendirilmeye çalışılmıştır. Çalışma, pankreas kanseri ameliyatı geçiren 4 kadın ve 11 erkek hastanın, pankreas tümörü dokuları ve normal dokularında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, dokulardan DNA ve RNA eldeleri yapılmıştır. Elde edilen RNA'lerden oluşturulan cDNA'lar, ING4'ün gen ifade düzeyinin belirlenmesinde ve ING4'ün DNA dizi analizi incelemelerinde kullanılmıştır. DNA'lar ise p53 geni mutasyonlarının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

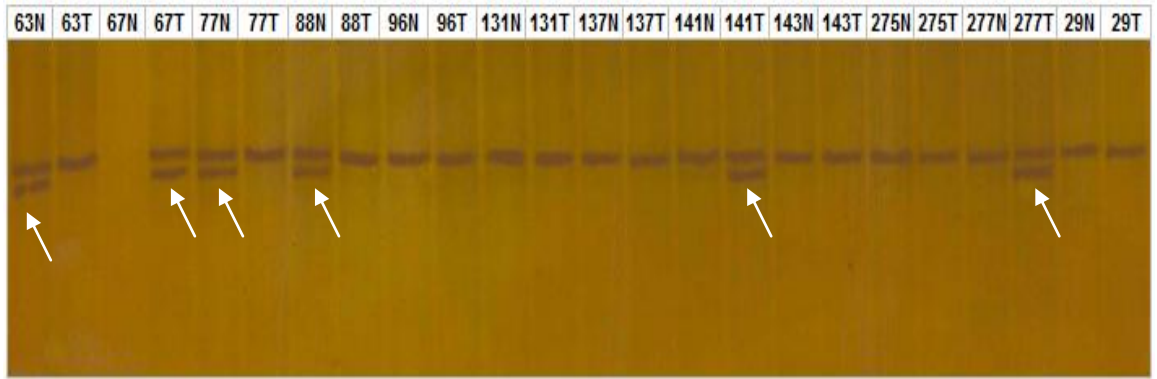
ING4'ün gen ifade düzeyleri β -aktin genine göre cDNA PCR ışık parlaklığının mukayesesi ile yapılmıştır. ING4'ün mutasyonları ise doğrudan DNA dizi analizi yapılarak mRNA düzeyinde ortaya konulmaya çalışılmıştır. p53 genine yönelik mutasyon taramaları, p53 geninin her bir ekzonunun PCR ürünlerinin SSCP koşulundaki davranışlarını takiben belirlenen farklı hareketlilikteki bantların DNA dizi analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen p53 bulguları SSCP bulguları ve DNA dizi analizi bulguları olarak iki başlık altında verilmiştir. ING4 bulguları da gen ifade düzeyi sonuçları ve ING4 DNA dizi analizi sonuçları olarak iki başlık altında sunulmuştur. ING4 gen ifade seviyelerinin belirlenmeye çalışıldığı sırada, ING4 ile karşılaştırılan β -aktin geninde farklı bantlar olduğu gözlemlendi. β -aktin geninden elde edilen bulgular da ayrıca sunulmuştur.

4.1. p53 Geni Bulguları

4.1.1. p53 geni ekzonlarının SSCP incelemeleri

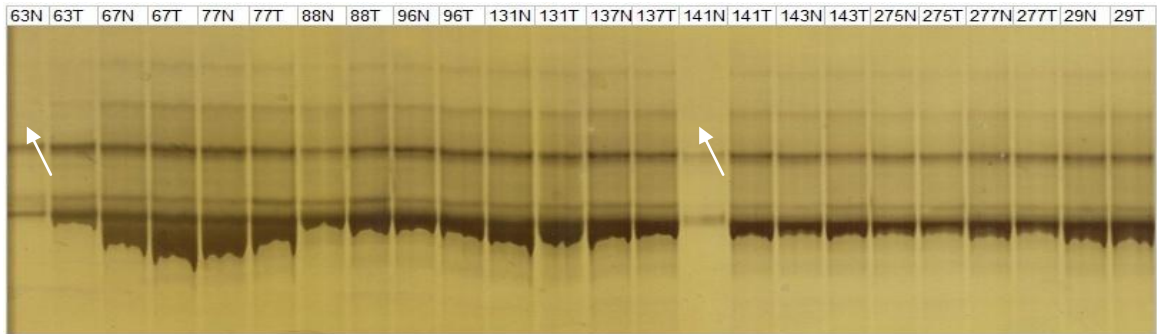
p53 geni ekzonlarının PCR'ları yapıp, PCR ürünleri formamid ile denatüre edildikten sonra 19/1 akrilamid-bisakrilamid oranı ile hazırlanan jelde 16,5 saat 430 Volt'ta yürütülmüştür ve daha sonra gümüş boyama ile boyanarak bantlar incelenmiştir. Bu

incelemeler sonucunda p53 geninin 4, 5 ve 6. ekzonlarıyla gerçekleştirilen SSCP jellerindeki elektroforetik alanlarda farklı hareketlilikler gözlenmiştir. p53 geni 4. ekonun SSCP incelemesinde 63, 143, 275 ve 277 numaralı örneklerin normal dokularında görülmeyen ancak tümörlü dokularında görülen bantlar tespit edildi. p53 geninin 5. ekzonunun SSCP incelemelerinde, 63N, 67T, 77N, 141N, 141T ve 277T örneklerinde farklı hareketlilikte bantlar olduğu gözlemlendi. Beşinci ekzonun SSCP jel görüntüsü Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. p53 geni 5. ekzonu SSCP jel görüntüsü. 63N, 67T, 77N, 88N, 141N 141T VE 277T numaralı örneklerde farklı bantlar tespit edildi.

p53 geni 6. ekzonunun SSCP incelemesi sonucunda 63N ve 141N kuyucuklarında farklı hareketlilikte bantlar olduğu gözlemlendi. p53 geni 6. ekzonunun SSCP jel görüntüsü Şekil 4.2’de sunulmuştur.



Şekil 4.2. p53 geni 6. ekzonun SSCP jel görüntüsü. 63N ve 141N numaralı kuyucuklarda farklı bantlar tespit edildi.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, p53 geninin proteine dönüştürülmekte olan 4, 5, 6, 7, 8 ve 9. ekzonlarının PCR’ları gerçekleştirilmiş ve PCR ürünleri SSCP jel elektroforezinde yürütülmüştür. SSCP incelmesi, 4. ekzonda 4 kuyucukta, 5. ekzonda 7 kuyucukta ve 6. ekzonda 2 kuyucukta farklı hareketlilikte bantlar olduğunu göstermiştir. p53 geni

ekzonlarının SSCP incelemelerinde belirlenen farklı bantların hastalara göre dağılımları Tablo 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.1 p53 ekzonlarının SSCP sonuçları.

NO	LAB NO	EKZON 4	EKZON 5	EKZON 6	EKZON 7	EKZON 8	EKZON 9
1	19	-	-	-	-	-	-
2	20	-	-	-	-	-	-
3	29	-	-	-	-	-	-
4	30	-	-	-	-	-	-
5	33	-	-	-	-	-	-
6	34	-	-	-	-	-	-
7	63	▲	▲	▲	-	-	-
8	64	-	-	-	-	-	-
9	67	-	-	-	-	-	-
10	68	-	▲	-	-	-	-
11	76	-	▲	-	-	-	-
12	77	-	-	-	-	-	-
13	88	-	▲	-	-	-	-
14	89	-	-	-	-	-	-
15	96	-	-	-	-	-	-
16	97	-	-	-	-	-	-
17	137	-	-	-	-	-	-
18	138	-	-	-	-	-	-
19	141	-	▲	▲	-	-	-
20	142	-	▲	-	-	-	-
21	143	▲	-	-	-	-	-
22	144	-	-	-	-	-	-
23	161	-	-	-	-	-	-
24	162	-	-	-	-	-	-
25	189	-	-	-	-	-	-
26	190	-	-	-	-	-	-
27	275	▲	-	-	-	-	-
28	276	-	-	-	-	-	-
29	277	▲	-	-	-	-	-
30	278	-	▲	-	-	-	-

▲ Elektroforetik alanda tespit edilen farklı hareketliliğe sahip bantları işaret etmektedir.

SSCP incelemeleri ile belirlenen farklı hareketliliğe sahip bantların mutasyon taşıyıp taşımadıkları, bantların belirlendiği kuyucukların DNA dizi analizi yapılarak belirlenmeye çalışıldı.

4.1.2. p53 geni DNA dizi analizi sonuçları

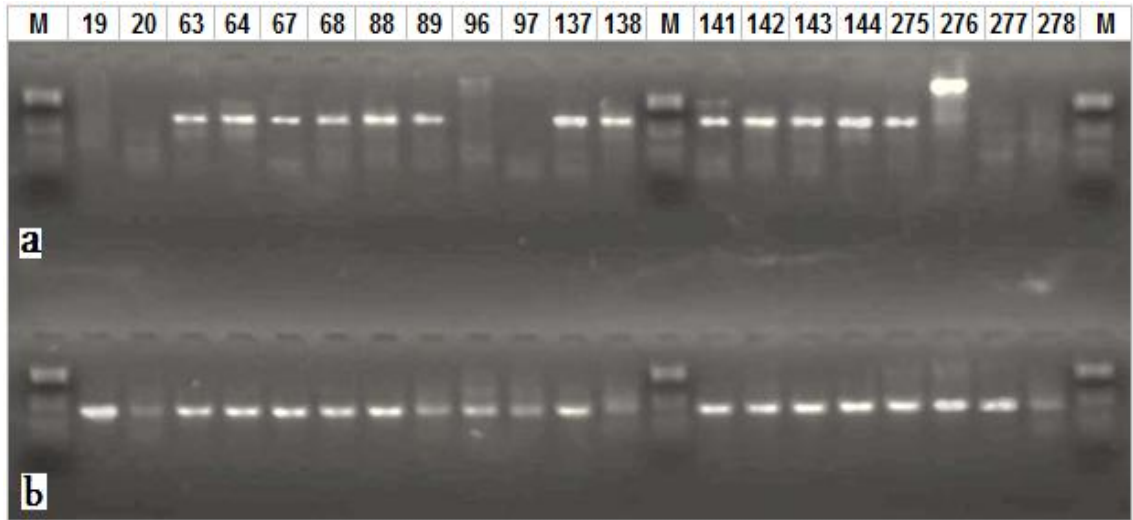
SSCP incelemeleri ile belirlenen farklı hareketliliğe sahip bantların DNA dizi analizleri gerçekleştirildi. Ekzon 4’te belirlenen bantlardan için 63N-63T ve 143N-143T, ekzon 5’te belirlenen bantlar için 63N-63T ve 88N-88T ve ekzon 6’da belirlenen bantlar için 63N-63T ve 141N-141T kuyucuklarına yüklenen PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri gerçekleştirilerek, farklı hareketlilik gözlenen bantların hem tümör ve hem de normal dokuları çalışılmış oldu. DNA dizi analizi sonuçları, normal ve tümörlü dokular

arasında nükleotid farkı olmadığını ve belirlenen DNA dizilerinin NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da ifade edilen p53 geni DNA dizileriyle uyumlu olduğunu göstermiştir (NG_017013).

4.2. ING4 Geni Bulguları

4.2.1. ING4 gen ifade düzeyi sonuçları

ING4 geninin gen ifade düzeyinin belirlenmesi amacıyla, ING4 geninin 5, 6, 7 ve 8. ekzonlarını içeren cDNA bölgeleri çoğaltılmıştır. Aynı koşullarda β -aktin geninin PCR'ları da yapılmış ve aynı agaroz jelde yürütülmüştür. ING4 geninin normal ve tümörlü dokularından elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4.3a'da ve β -aktin geninin normal ve tümörlü dokulardaki agaroz jel görüntüleri Şekil 4.3b'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. ING4 ve β -aktin agaroz jel görüntüsü. ING4'ün (a) ve β -aktin (b) gen ifade düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan agaroz jel yürütme görüntüsü. M; boyut belirtecini ifade etmektedir.

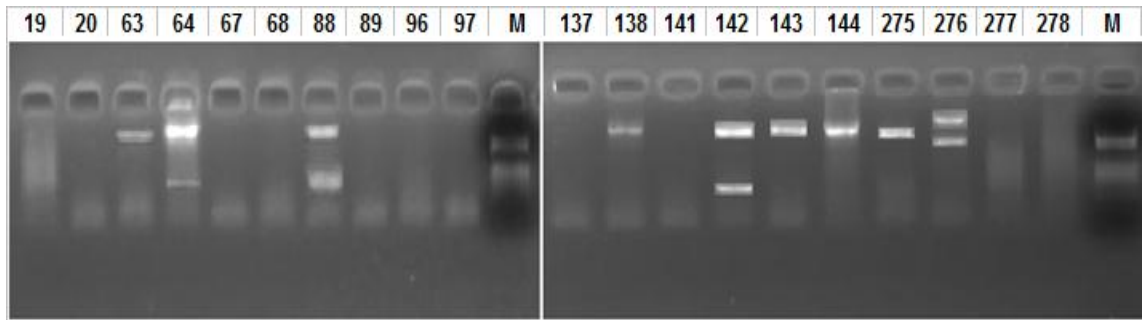
ING4 ve β -aktin genlerinin agaroz jelde belirlenen bantlarının alanları ve bu bantların parlaklıkları Image J adlı program (122) vasıtasıyla değerlendirilmiş ve ING4'den elde edilen veriler β -aktin'den elde edilen veriler ile karşılaştırılmışlardır. Buna göre, pankreatik kanserlerde ING4 geninin gen ifade seviyesinin sonuç değerlerine göre %57 olduğu belirlenmiştir. Karşılaştırma sonuçları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışılan hastalarda ING4 ve β -aktin gen ifade düzeyleri. N; normal, D: düşük, Y; yüksek

No	Örnek No	mRNA gen ifade değeri	Sonuç
1	19	-	-
2	29	-	-
3	33	-	-
4	63	0,87	N
5	67	0,72	D
6	89	1,4	Y
7	97	-	-
8	137	0,47	D
9	141	0,47	D
10	143	1	N
11	161	-	-
12	175	-	-
13	189	-	-
14	275	0,31	D
15	277	-	-

4.2.2. ING4 geni cDNA dizi analizi

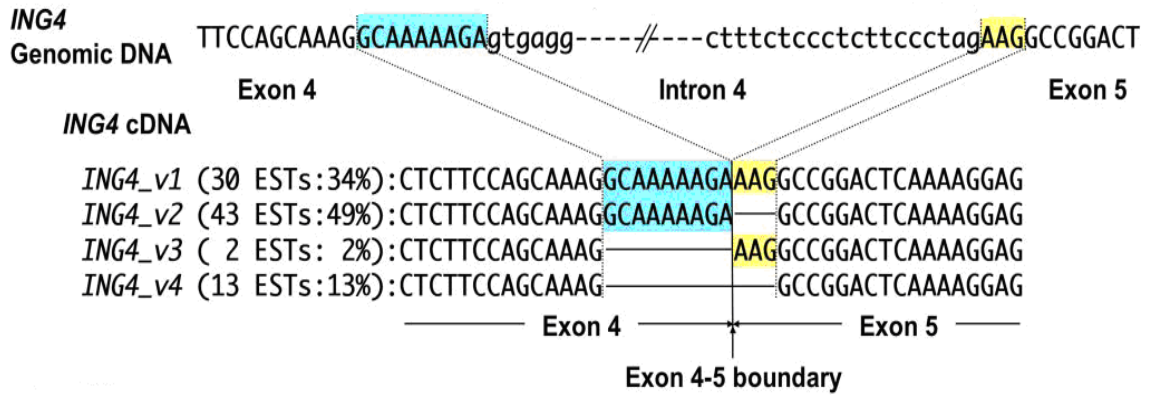
ING4 geni mRNA'sından elde edilen cDNA'ların nükleotid dizileri ortaya konularak, ING4 genindeki muhtemel mutasyonların varlığı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla ING4 geninin bütün ekzonlarını içerecek şekilde (Şekil 3.1) S₁-AS primer çifti kullanılarak, ING4 cDNA'sı PCR ile çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jel elektroforezinde, bazı örneklerin birden fazla sayıda bant verdiği gözlemlendi (Şekil 4.4). DNA dizi analizi için ilgili bantlar agaroz jel elektroforezinden saflaştırılmaya çalışıldı ancak başarılı olunamadı. İki bant içeren kuyucukların DNA dizi analizleri hem ileri hem de geri primerler kullanılarak belirlenmeye çalışıldı.



Şekil 4.4. Dizi analizi için gerçekleştirilen PCR'ların agaroz jel görüntüleri. Bu şekilde tek sayılar normal dokuyu gösterirken, çift sayılar tümörlü dokuyu göstermektedir, M ise boyut belirtecini ifade etmektedir.

İleri primerler ile DNA dizisinin 380. nükleotid hizasına kadar normal okunabildiği ancak sonrasında okunamadığı görüldü. Geri primer ile yapılan dizilemelerde de aynı bölgede dizinin okunamadığı gözlemlendi. İleri ve geri primerler ile elde edilen diziler üst üste karşılaştırılarak ING4'ün tam DNA dizisi oluşturulmaya çalışıldı. Elde edilen DNA dizilerinde ekzon 4 ve ekzon 5 kaynaşım noktasında 9 ve 12 nükleotidlik eksilmeler olduğu belirlendi.

DNA dizi analizinden elde ettiğimiz sonuçlar, değişik doku ve hücre hatlarında ING4 ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarla karşılaştırıldı. Hücre hatlarında gerçekleştirilen iki farklı çalışma ve gastrik adenokarsinom dokularında gerçekleştirilen bir çalışmada, bulgularımızla örtüşecek şekilde, ING4'ün ekzon 4-5 kaynaşım noktasındaki nükleotid değişimlerine bağlı olarak farklı kaynaşım yapılarının olduğu tespit edilmiştir (13). Tespit edilmiş olan en uzun dizi ING4_v1 olarak kabul edilmiş, diğer farklı kaynaşım yapıları da uzunluklarına göre ING4_v2 (v1'den 3 nükleotidlik AAG dizisi eksilmiştir), ING4_v3 (v1'den 9 nükleotidlik GCAAAAAGA dizisi eksilmiştir) ve ING4_v4 (v1'den 12 nükleotidlik GCAAAAAGAAAG dizisi eksilmiştir) olarak değerlendirilmişlerdir. Bu çalışmada, ING4 farklı kaynaşım yapılarının gen ifade seviyeleri de belirlenmiştir (13). Unoki ve arkadaşları tarafından belirlenen ING4 farklı kaynaşım yapıları ve bu kaynaşım yapılarının hücre hatlarındaki gen ifade düzeyleri Şekil 4.5'de görülmektedir.



Şekil 4.5. ING4 farklı kaynaşım yapıları ve bulunma yüzdeleri. ING4'ün 4. ve 5. ekzonlarının farklı kaynaşımına bağlı olarak oluşan dört farklı ING4 farklı kaynaşım yapısı. Belirlenmiş olan en uzun dizi ING4_v1 olarak kabul edilmiştir. ING4_v2'de 3 nükleotidlik AAG dizisi eksilmektedir. ING4_v3'de dokuz nükleotidlik GCAAAAAGA dizisi eksilmektedir. ING4_v4'te, ING4_v1'de bulunan toplam 12 nükleotid eksilmektedir. Bu farklı kaynaşım yapılarından ING4_v1'in toplam ING4'ler arasında %34, ING4_v2'nin %49, ING4_v3'ün %2 ve ING4_v4'ün %13 ifade edildiği belirlenmiştir (13).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, pankreatik kanserlerde ING4'ün farklı kaynaşım yapılarından ING4_v1 6 hastada, ING4_v2 4 hastada ve ING4_v4 2 hastada tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuçlarına göre ING4_v3 tespit edilememiştir. Çalışılan dokularda belirlenen farklı kaynaşım yapılarının dağılımı Tablo 4.3'de verilmiştir.

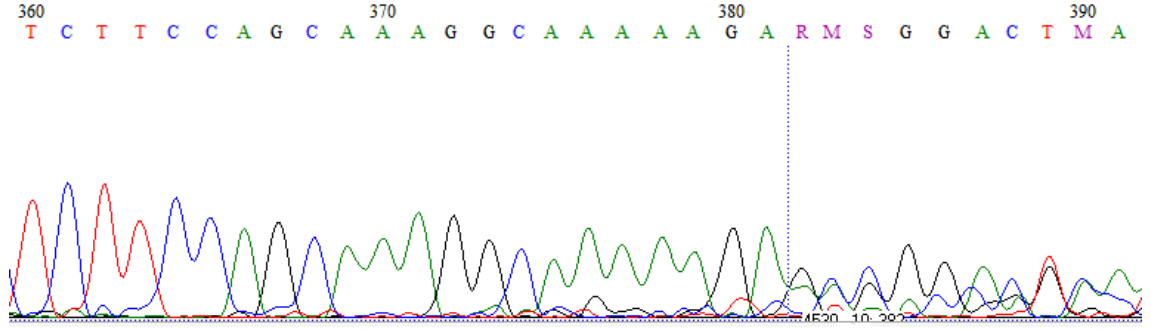
Tablo 4.3. Çalışılan örneklerde DNA dizi analizi ile tespit edilen ING4 alternatif kaynaşım yapıları.

No	Örnek No	ING4 V1	ING4 V2	ING4 V4
1	19	-	-	-
2	29	-	-	-
3	33	-	-	-
4	63	▲	▲	-
5	67	-	-	-
6	89	▲	-	-
7	97	-	-	-
8	137	▲	▲	-
9	141	▲	▲	▲
10	143	▲	▲	-
11	161	-	-	-
12	175	-	-	-
13	189	-	-	-
14	275	▲	-	▲
15	277	-	-	-

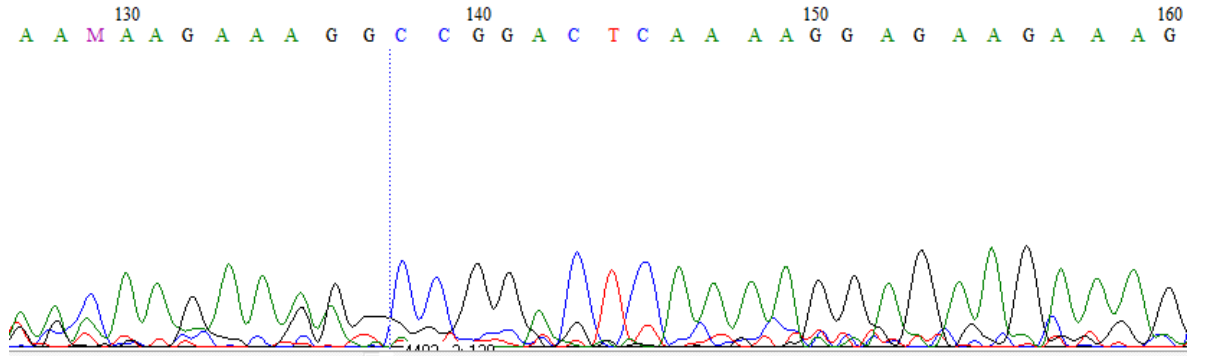
▲ Farklı kaynaşım yapısı varlığını göstermektedir.

Tablo 4.3'e göre ING4'ün farklı kaynaşım çeşitlerinin dağılımı incelendiğinde ING4_v1 çeşidinin daha sıklıkla görüldüğü (%40), bunu %26 ile ING4_v2 ve %13 ile ING4_v4 çeşidi takip eder. Şekiller 4.7 ve 4.8 incelendiğinde çakışan bant bölgeleri de görülmektedir. Bu çakışan bantlar da çözüldüğünde ING4'ün diğer bir çeşidinin varlığının da olabilirliği açıklığa kavuşacaktır. ING4 farklı kaynaşım yapıları arasındaki nükleotid sayısı farkı az olduğundan, agaroz jelden bantlar saflaştırılamamıştır. DNA dizi analizleri ileri ve geri primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İleri primer kullanılarak, farklı kaynaşımın gerçekleştiği kesim noktasından önceki DNA bölgesi dizilenirken, geri primer ile de kesim noktasından sonraki DNA bölgesi dizilenmiş ve böylelikle ING4'ün DNA dizisi bütün olarak ortaya konulmuştur. İleri primer ile dizilenen örneklerden biri Şekil 4.6'da, geri primer ile dizilenmiş olan örneklerden biri de Şekil 4.7'de sunulmuştur. Şekil 4.7'de sunulan örneğin ileri primer ile ortaya konulan DNA dizisi Şekil 4.8'de sunulmuştur. İki DNA dizisinde de kesim noktasına kadar dizi okunabilirken, kesim noktasından sonra, farklı kaynaşım yapılarından kaynaklanan bantların çakışması nedeniyle dizi okunamamaktadır. Bu çakışan

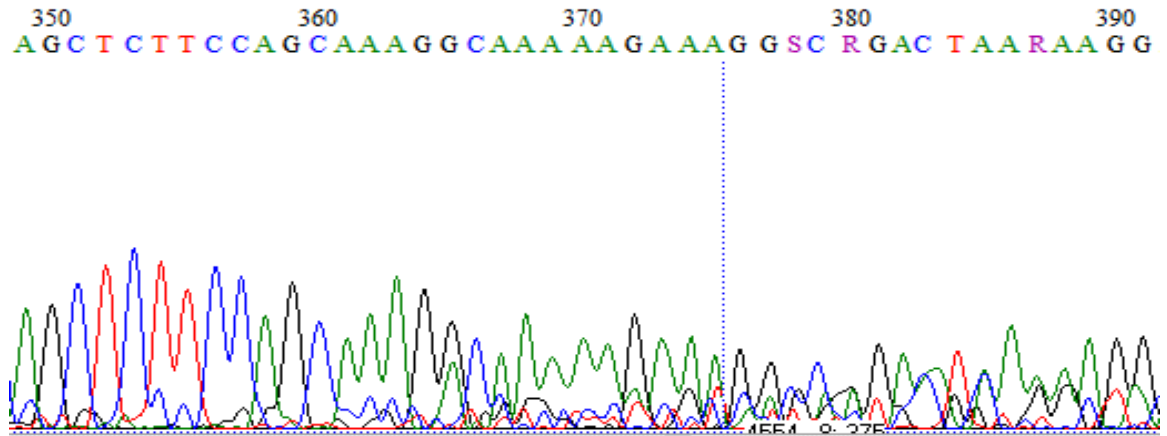
bölgelerin açıklığa kavuşturulması ING4 çeşitlerinin pankreatik kanserli hücrelerinin çoğalması ve büyümesi hakkında bilgi verecektir.



Şekil 4.6. 63 numaralı örnekte belirlenen ING4 cDNA dizisi. DNA dizisi dördüncü ekzonun son nükleotidleri olan GGCAAAAAGA dizisinden sonra, diğer kaynaşım yapısının bulunması nedeniyle okunamamaktadır.



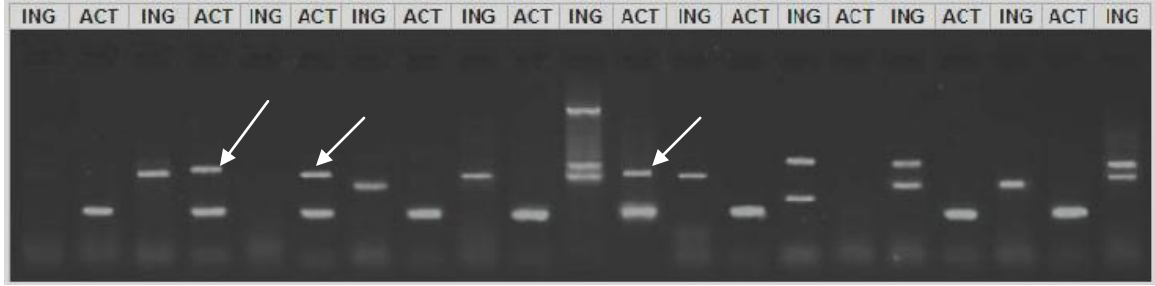
Şekil 4.7. 137 numaralı örneğin geri primer ile dizilenmesi. Ekzon 5. son nükleotidleri olan CCGGACT görülebilmektedir.



Şekil 4.8. 137 numaralı örneğin ileri primer ile dizilenmesi. Dördüncü ekzonun son nükleotidleri GGCAAAAAGA ve beşinci ekzonun AAG nükleotidleri görülmektedir.

4.3. β -aktin Geni Bulguları

ING4 gen ifadeleri, hamarat gen olan β -aktin geni ile karşılaştırılarak belirlenmeye çalışıldı. ING4 ve β -aktin genlerinin PCR'ları aynı agaroz jelde yürütüldü. Jel elektroforezinde β -aktin geninin beklenen bantı dışında bantlar verdiği gözlemlendi. β -aktin geni agaroz jel görüntüsü Şekil 4.9'da sunulmuştur.



Şekil 4.9. β -aktin geni agaroz jel elektroforez görüntüsü. ING4 ve β -aktin genlerinin elektroforezleri biriktirilmiş ve β -aktin'in farklı bantlar verdiği gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri, çok hızlı şekilde metastaz yapması ve pankreasta gelişen tümörlerin çevre organlara süratli bir şekilde yayılması özelliği ile diğer tümörlerden ayrılmaktadır (1). Pankreas kanserine yakalanan hastaların %75'i tedaviye yönlendirilemeden yaşamlarını kaybederken, pankreas kanseri kaynaklı ölümlerin %90'ı da pankreas kanserine bağlı olarak gelişen metastaz nedeniyledir (1). Pankreasın organ olarak zengin lenf ve damar sistemine sahip olması, pankreatik tümörlerin gelişimine katkı sağladığı gibi metastaz gelişimini de etkileyebilmektedir (1,2). Bunun dışında pankreasın meme gibi koruyucu bir kılıf tarafından çevrelenmemiş olması da çevre dokulara gelişen yayılmayı tetikleyebilir (1,2).

Pankreatik kanser gelişimine katkı sağlayan mutasyonlar belli bir sıra ile ve dokudaki histolojik bulgularla uyumlu olarak gelişmektedirler (3). Pankreas kanseri oluşumu ve ilerlemesi ile ilgili önerilen modellerde, pankreastaki kanser gelişimine bağlı olarak pankreatik dokulardaki değişimlerin değerlendirildiği PanIN evrelendirmesi dikkate alınmaktadır (18). PanIN evrelendirmesine göre, pankreatik kanserlerde mutasyona uğrayan ilk genin *K-ras* olduğu ve pankreas kanserinin en ileri evresi olan PanIN-3'e doğru *K-ras* mutasyonlarının arttığı ve PanIN-3'te %100'e ulaştığı rapor edilmektedir (18). *p16* geninde gerçekleşen mutasyonlar, pankreas kanserinde *K-ras*'dan sonra gerçekleşen ikincil mutasyonlar olarak ifade edilmektedir ve PanIN evrelemesinde kanserin ilerlemesine bağlı olarak %100 gibi bir oranda görülebilmektedir (4,18). Pankreatik kanserlerde, *p53* mutasyonları PanIN-2 ve -3 gibi nispeten daha geç evrelerde ortaya çıkmaktadır (18).

Pankreas kanserinde en sık mutasyona uğrayan gen olan *K-ras*, GTP-bağımlı sitoplazmik bir protein kodlamakta olup, hücre yüzeyindeki büyüme faktörü uyarısının hücre içine iletilmesinde rol almaktadır (123). Ras uyarı ileti yolağı aracılığıyla işlev gösteren büyüme faktörleri, hücre zarında bulunan almaçlara bağlanıp aracı proteinler vasıtasıyla plazma zarına bağlı olan Ras proteininin, Ras-GTP bileşeni haline dönüşmesine neden olurlar (123). Ras proteini, GTPaz işlevine sahip bir protein olup, kendisini katalizleyerek Ras-GDP yapısına dönüşebilmektedir (123). Ras'ta gelişen

mutasyonlar sıklıkla 12, 13 ve 61. kodonlarda görülmekte olup, bu mutasyonlar Ras'ın GTPaz işlevini gerçekleştirememesine ve sürekli olarak büyüme uyarısı oluşturmaya neden olurlar (123,124). Bunun sonucu olarak p53, p21 ve p16 gibi hücre döngüsünün durdurulmasında rol alan proteinlerin gen ifade seviyelerinin de artmasına neden olur (24). Bu proteinlerin işlevlerini normal olarak gösterebilmelerine bağlı olarak, hücre döngüsü baskılanarak kanser gelişimi önlenabilir (24). Fakat bu görüş hücresele seviyede moleküller arası ilişkilere dayanılarak yapılan bir yorumdur. Biraz düşünüldüğünde bu yorumun hızlı metastatik gelişimi izah etmekte zorlandığı anlaşılmaktadır. Pankreatik kanser çoğalımında ve yayılımında ilave olarak hipoksiya, damarlaşıma ve özellikle kanserli hücre etrafındaki hücrelerin oluşturduğu mikro çevrede çok önemlidir. Mikro çevreyi oluşturan hücrelerdeki değişimler kanserli hücrenin hızlı yayılması ve tedaviye cevap vermesinin düşüklüğü ile doğrudan doğruya ilintilidir (125).

Hücre döngüsünün durdurulmasında rol alan *p53* ve *p16* genlerinde oluşan mutasyonlar, *K-ras* mutasyonlarından sonra oluşmakta ve pankreas kanseri gelişimine katkı sağlamaktadırlar (6,18). *p53*, *p21* proteinini kodlamakta olan *waf1* geninin transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır (81). *p53* proteini, birçok siklin bağımlı kinazı engelleyerek hücre döngüsünü etkileyen *p21* proteininin sentezlenmesini sağlar ve *p21* proteini de CDK'lar ile etkileşerek hücre döngüsünün G₁ evresinde durdurulmasına neden olur (52,56). *p53* ayrıca, transkripsiyon faktörü olan ve mitozun ilerlemesi için gerekli olan *c-myc* ve *c-fos* gibi onkogenlerin transkripsiyonlarının gerçekleşmesinde rol alan E2F ile bağlanarak, hücre döngüsünün G₂ aşamasında da durdurulmasına neden olur (56). Pankreatik kanserlerde *K-ras*'tan sonra ikinci sırada mutasyona uğrayan *p16* geni, INK4a (Inhibitor of cyclin-dependent Kinase 4) ve ARF (Alternative Reading Frame) proteinlerinin ikisinin de birlikte kodlandığı gendir (126). INK4a, CDK4/6 ile bağlanarak hücre döngüsünün durdurulmasında rol alırken, ARF proteini, *p53*'ün kararlılığını sağlamaktadır (126).

Diğer bütün kanserlerde olduğu gibi pankreatik kanserlerde de hücre döngüsünün normal şekilde düzenlenememesi hücre büyüme ve çoğalma düzeninin bozulmasına neden olmaktadır. Pankreatik kanserlerde gerçekleştirilmiş olan çalışmalar, hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan *p53*, *p16* ve *SMAD4* gibi tümör baskılayıcı genlerin yüksek sıklıkta mutasyona uğramış olduklarını ortaya koymuştur (3,7). *p53* proteini, hücre döngüsünün ilerlemesi ve programlı hücre ölümünün gerçekleştirilmesi

mekanizmalarında önemli roller oynamaktadır ve pankreatik kanserlerde p53 mutasyonlarının %50'den fazla olduğu (3,7) hususunda genel bir kanı mevcuttur. p53 proteini, kromozomların doğru olarak ayrılmasının gerçekleştirilmesi, genomik kararlılığın sağlanması, yaşlanma ve programlı hücre ölümünün gerçekleştirilmesi, DNA tamiri ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi hücre bölünmesi ve çoğalmasıyla ilişkili birçok hücre yolakta tetikleyici işlevi vardır (52). p53, hücredeki bu işlevlerini doğrudan DNA ile bağlanarak veya hücredeki diğer proteinlerle etkileşerek gerçekleştirmektedir (81,83). ING4 proteini, p53'ün işlevlerinin düzenlenmesinde rol alan proteinlerden biridir (11). ING4 proteini, ING gen ailesinin diğer üyeleri gibi hücre döngüsünün kontrol edilmesi, programlı hücre ölümünün düzenlenmesi ve DNA'da gelişen hasarların tamir edilmesinde rol almaktadır (11). Diğer ING proteinlerinden farklı olarak ING4 proteini, tümör gelişiminde özellikle önemli olan yeni damar gelişimi ve dokunum engellemesi (contact inhibition) kaybı mekanizmalarında da rol oynamaktadır (11).

Pankreas kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde, birçok yolda rol alması nedeniyle, p53 aracılı hücre döngüsünün düzenlenmesinin önemli olduğu görülmektedir. Normal şartlarda MDM2 proteini p53 proteininin N-ucuna bağlanarak, p53'ün bu bölgeden fosforillenmesine engel olur ve p53 proteini MDM2 proteininin etkisiyle "kapalı" konumda tutulur (54,127). Kapalı konumdaki p53 daha sonra da ubiquitin yolağıyla proteosomlara yönlendirilerek parçalanır (52,54). Hücre stresi yada hücre hasarı sonrasında p53 proteini, ATM, Chk2 (Human homologue of Rad53) yada *p16* geninin alternatif ürünü olan p16^{ARF} proteini tarafından MDM2'nin proteolitik parçalanmasının sağlanmasıyla açık konuma getirilir (54). Açık konuma gelen p53, p21 proteininin transkripsiyonunu sağlayarak hücre döngüsünü G₁ evresinde durdurabilmektedir (56). Hücre döngüsünün G₂ evresinde mitozun ilerlemesinde rol alan E2F transkripsiyon faktörü de, hücrede fazla ifade edildiğinde MDM2'ye bağlanarak p53 proteininin açık konuma getirilmesini sağlamaktadır (56). ING gen ailesi tarafından kodlanmakta olan proteinler de p53 kararlılığının sağlanmasında rol almaktadırlar (11,76). ING proteinleri doğrudan p53'e bağlanarak MDM2'nin p53'e bağlanmasına ve p53'ün proteosoma yönlendirilmesine engel olurlar (83).

Görüldüğü gibi, p53'ün işlevselliği için p53 proteininin N-ucunun fosforillenmesi ile kararlı hale gelmesi gereklidir. p53'ün N-ucunun fosforillenmemesi, MDM2'nin p53'e

bağlanarak proteosomlara yönlendirmesi ve burada p53 proteinin parçalanmasıyla sonuçlanır. p53 kararlılığı, E2F ve ARF proteinlerinin MDM2'ye bağlanarak MDM2'yi p53'den uzaklaştırmasıyla sağlanabileceği gibi, p53 proteinin N-ucunun ya fosforilasyon yolu ile veya ING4'ün bağlanması ile MDM2'nin p53'ün N-ucuna bağlanması engellenir. Kısaca, ING4 proteininin, p53 proteininin N-ucuna bağlandığı ve proteinin fosforilasyonuna zemin sağlayarak MDM2'nin bağlanmasına engel olduğu düşünülmektedir (83). Kararlılığı sağlanarak yarılanma ömrü değişen p53 proteini de tümör gelişiminin baskılanması işlevlerini gerçekleştirebilmektedir.

Birçok kanserde olduğu gibi, pankreatik kanserlerde de *p53* mutasyonlarının yüksek sıklıkta görüldüğünün rapor edilmesi, p53 yolaklarında ING4 ve p53'ün birlikte işlev göstermeleri ve ING4'ün, pankreas kanseri gelişiminde özellikle önem arz eden hücre yayılması, hücre göçü ve yeni damar oluşumunda rol alması nedeniyle, *p53* ve *ING4* genleri pankreas kanserinde birlikte çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, *p53* geninin 6 ekzonundan çoğaltılan toplam 180 DNA bölgesinin 13'ünde farklı bantlar tespit edilmiştir. Tespit edilen farklı bantlar; dördüncü ekzonda 4, beşinci ekzonda 7 ve altıncı ekzonda 2 şeklindedir. Bahsedilen ekzonların DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiş ve mutasyon taşımadıkları tespit edilmiştir. Şekil 4.1 ve 4.2'de görülen farklı yürümelere sahip bantların oluşumu, p53 geninde tekrar eden nükleotid dizilerinin, SSCP yürütmelerinde p53 geni DNA'sının, çeşitli derecelerdeki ikincil yapı kazanmasına bağlı olarak farklı bantlar oluşumuna neden olduğunu düşündürmektedir. SSCP analizlerinde akrilamid jelde görülen farklı yürümler ilk bakışta PCR reaksiyonlarının kısmen tamamlandığı ve çeşitli aşamalarda tamamlanmadığı, bu yüzden farklı bantların ortaya çıktığını akla getirebildiği gibi yaygın mutasyonların olabileceğini de düşündürür. Yapılan p53 PCR reaksiyonu nükleotid dizin analizinin NCBI'da yayınlanan (NG_017013) dizinle tamamiyle uyuşması ve mutasyon saptanamaması bu genin ifadesinde ikincil yapının sıkça görülebileceğini, bu yüzden gen ürününün de eksik (kriptik) olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle p53 geninde ikincil yapı yatkınlığının kanser gelişimi ile ilişkisinin açıklığa kavuşturulması gerekliliği ve bu yönde çalışmaların yürütülmesinin yararlılığı anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada ayrıca ING4 geninin gen ifade düzeyi ve cDNA'larının DNA dizilemesi yapılarak ING4'ün mRNA düzeyinde mutasyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarımız, pankreatik kanserde ING4 gen ifade seviyesinin azaldığını göstermiştir.

ING4 gen ifade seviyesi, ING4 ile β -aktin cDNA'larından elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Bu karşılaştırmalar sırasında, 3 örnekte β -aktin'in normal bantlarından farklı bantlar verdiği görülmüştür (Şekil 4.9). β -aktin, hücre iskeleti, hücre içi trafiği ve hücrenin hücre dışı matrikse tutunmasında rol alan bir protein kodlamakta olan "hamarat" bir gen dir (128). β -aktin geninde mutasyonlar sık görülmemektedir (129). β -aktin geninde tanımlanmış mutasyonların ifade edildiği iki tane "vaka sunumu" bulunmaktadır (129,130). Bu vakaların birinde 183. konumdaki arjinin amino asitinin triptofana dönüşümüne neden olan mutasyona bağlı olarak işitme bozukluğu ve geç başlangıçlı jeneralize distoni geliştiği rapor edilmektedir (129). Diğer sunumda da 364. konumdaki glutamik asitin lizin amino asidine dönüşümüne neden olan mutasyona bağlı olarak ışık hassasiyeti, tekrarlayan enfeksiyonlara yatkınlık ve zeka geriliği gelişimi rapor edilmiştir (130). Taranan yayınlarda, doğrudan kanserli dokularda tanımlanmış β -aktin geni mutasyonlarına rastlanılmamıştır ancak β -aktin mutasyonlarının etkilerinin değerlendirildiği, hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmalar bulunmaktadır (131,132,133). HuT-14 hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada 36, 83 ve 244. konumlarda amino asitlerin değişimine neden olan mutasyonlar ve 5' bölgede 22 nükleotidlik bir eklenme (insertion) belirlenmiştir (132). Bahsedilen mutasyonları taşıyan hücre hattı HuT-14T olarak adlandırılmıştır ve bu hücrelerin köken aldıkları HuT-14 hücrelerinde göre çok daha tümörojenik oldukları belirlenmiştir (133). Sitozolik β -aktin gen ifade seviyesi ve aktin polimerizasyonu ile insan bağırsak (kolon) adenokarsinoma hücrelerinin metastatik kapasitesi, kanserli hücrenin hareketliliği ve kanserli hücrenin hücre iskelet organizasyonu ile ilişkili olduğu üzerinde de çalışmalar vardır (134). Bu çalışmalardan metastatik tümör gelişiminde β -aktin proteininin arttığı anlaşılmaktadır (135). Bahsedilen çalışmalar hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmalar olup, sitozolik aktin geni mutasyonlarının doğrudan kanser dokularında çalışıldığı yayınlar bulunmamaktadır (133,134,135). Pankreatik kanserlerde tanımladığımız β -aktin geninin farklı bantlarının DNA dizi analizi ile ortaya konulması β -aktin geninin kanser gelişimindeki rolünün belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

ING4 cDNA'larında gerçekleştirilen DNA dizi analizi ile ING4'ün mRNA düzeyindeki mutasyonları belirlenmeye çalışılmıştır. DNA dizi analizi sonuçları, çalışılan örneklerden 6'sında ING4_v1, 5'inde ING4_v2 ve 1'inde ING4_v4 farklı kaynaşım yapısı olduğunu göstermiştir. Bu örnekler arasında 3'ünde ING4_v1 ve ING4_v2

birlikte, 1 hastada ING4_v1 ve ING4_v4 ve 1 hastada da ING4_v1, ING4_v2 ve ING4_v4 birlikte görülmüştür. Tek bir hastada sadece ING4_v1 bulunmuştur. ING4'ün farklı kaynaşım yapıları 4. ekzon ile 5. ekzonun birbirleri ile kaynaştıkları noktaya tekabül etmektedir. ING4_v1'de 3 nükleotidlik AAG dizisi ekzon 4-5 kaynaşım bölgesine girerken, ING4_v4'te ise aynı bölgedeki 9 nükleotidlik GCAAAAAGA dizisi silinmektedir. ING4 farklı kaynaşım yapıları, farklı protein yapısında olduklarından, hücresel işlevleri de farklı olmaktadır.

Tümör baskılayıcı ING4, hücre çoğalmasının baskılanmasında, hücre göçü ve yayılmasının engellenmesinde, dokunmaya bağlı önlem alma mekanizmasının tetiklenmesinde, anjiyogenezin engellenmesinde roller almaktadır (11). ING4, hücresel işlevlerini, farklı kaynaşım yapıları aracılığıyla hücrenin ilgili bölümlerinde bulunarak ve büyük protein bileşimlerinin yapılarına katılarak ya da p53 gibi proteinler ile etkileşerek gerçekleştirmektedir (13). Sunulan bu çalışmada, pankreatik kanserlerde ING4 proteinin farklı kaynaşım yapılarının varlığı, yani, ING4_v1, ING4_v2, ING4_v4 çeşitleri bulunmuş olup ING4_v3 tesbit edilememiştir. Bahsedilen farklı kaynaşım yapıları ING4 proteinin nükleus içerisine taşınmasında rol alan NLS bölgesindeki amino asit dizisinin değişimine neden olmaktadır (13,136). ING4 proteini NLS bölgesi aracılığıyla nükleus içerisine taşındığı gibi, p53 proteini ile de yine NLS bölgesi aracılığıyla ilişki kurmaktadır (13,83,136). Bu nedenle NLS bölgesinde değişimlere neden olan farklı kaynaşım yapıları ING4 proteinin hem p53 proteini ile bağlanabilmesini etkilemekte hem de proteinin hücresel işlevlerini değiştirmektedir (13,136).

Tümör hücre hatlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada da bizim belirlediğimiz farklı kaynaşım yapılarına benzer kaynaşım yapıları tespit edilmiş olup, bu farklı kaynaşım yapılarının hücresel konumları ve işlevleri de çalışılmıştır (13). Gerçekleştirdiğimiz çalışmadan elde ettiğimiz p53 ve ING4 genlerine yönelik bulguların pankreatik kanserde hücre döngüsü, programlı hücre ölümü, yeni damar oluşumu, hücre göçü, hücre yayılması ve bunlara bağlı olarak metastaz gelişimine olan muhtemel katkıları, Unoki ve arkadaşları tarafından (13) gerçekleştirilen çalışmada elde edilen ING4 farklı kaynaşım yapılarının hücresel konumları ve işlevlerine yönelik veriler eşliğinde tartışılmıştır. Pankreatik kanserlerde p53 mutasyonlarının %50'den fazla görüldüğünün rapor edilmesi ve gerçekleştirilen çalışmada çalışılan 180 ekzondan

yalnızca 13'ünde farklı hareketliliğe sahip bantlar tespit edilmiş olması ve bu bantların DNA dizi analizlerinde mutasyon belirlenmemesi nedeniyle p53'ün pankreatik kanserlerde ve diğer kanserlerdeki mutasyonları, bu mutasyonların p53 proteinine etkileri ve ilgili mutasyonların tespitinde kullanılan yöntemler ayrıca tartışılacaktır. Bu çalışmada kullanılan pankreatik doku örneklerinde nukleotid mutasyonları dizin analizlerinde bulunamamıştır. Pankreatik kanser hastalarının yaşam süresinin kısalığı göz önüne alınırsa p53 gen mutasyonundan çok, muhtemelen p53 gen transkripti yani p53 mRNA'sının oluşturduğu saç tokası ikincil yapı sebebiyle gen ürünü kesik kesik üretilmektedir. Şekiller 4.1, 4.2 ve 4.3 birlikte incelendiğinde mutasyon gibi görülen bantlar aynı uzunluklarda olması ekzonlar 4, 5 ve 6'daki bantlar kendi ekzonlarına özgünlük gösterdiği, yani belli bölgelerdeki tekrar dizileriyle ilişkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bunun sonucunda tamamlanmamış, işlevsiz p53 protein ürününün ortaya çıkabileceğini hatırlatmaktadır. Bu belkide sadece mRNA'lardan elde edilen cDNA'larda görülen yöntemsel bir hata olarak da değerlendirilebilir. Gerek eksik p53 sentezi kuramı olsun ve gerekse cDNA yolunun tekniksel hatası olsun her iki halde ilk defa bu çalışmada sunulmaktadır.

ING4 gen ifade seviyesi;

ING4 gen ifade seviyelerinin tümör ve normal dokular arasındaki değişimleri gastrik adenokarsinoma, glioma ve baş-boyun kanserlerinde çalışılmıştır (16,106,136). Bu üç çalışma dışında, tümör hücre hatlarında da ING4 gen ifade seviye değişimleri araştırılmıştır (86). Gliomalarda gerçekleştirilen çalışmada, normal beyin dokusuna göre ING4 gen ifade seviyesinin gliomalarda altı kat daha düşük olduğu ve ING4 gen ifadesinin azlması ile tümör derecesi arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (106). Baş-boyun kanserlerinde gerçekleştirilen çalışmada da ING4 gen ifade seviyesinin %76 oranında olduğu belirlenmiştir (16). Gastrik karsinomada ise normal dokulara kıyasla ING4 gen ifadesinin %75 oranında olduğu ve gen ifadesindeki azalma ile tümör derecesi arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (136). Meme kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmada ING4 gen ifade seviyesinin azaldığı ve ING4'ün bulunduğu gen bölgesinde silinmeler olduğu rapor edilmiştir (86).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, tümörlü dokularda normal dokulara göre ING4 gen ifade seviyesinin %60 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, ING4'ün gen ifadesinin pankreatik kanserlerde %40 kadar azaldığını göstermektedir. ING4 gen bölgesinin

silinmesi yada tümörlü dokularda normal dokulara göre gen ifade seviyesinin azalması, ING4'ün tümör baskılanmasında rol aldığına işaret etmektedir. Tümör baskılanmasında rol alan genler tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılmaktadırlar (3,23,24). Tümör baskılayıcı genlerin mutasyonlarına bağlı olarak her iki kopyalarında gelişen işlev kaybı nedeniyle tümör gelişimine katkı sağladıkları Knudson tarafından belirtilmiştir (57,68). Knudson'un bu hipotezi Rb geni gibi genler için gösterilmiştir (68). Tümör baskılanmasında rol alan TGF- β 1 gibi bir kısım genler, bir kopyalarında gerçekleşen mutasyon yada silinmelere bağlı olarak tümör baskılamasını gerçekleştiremezler ve bu tümör baskılayıcı genler "Tip II Tümör Baskılayıcı Gen"ler olarak adlandırılmaktadırlar (137).

Gerek pankreatik kanserlerdeki ve gerekse çalışılan diğer kanserlerde ING4 gen ifadesinin azalması ve baş-boyun tümörlerinde gösterildiği şekilde heterozigosite kaybı göstermesi, ING4'ün tümör baskılanmasında ikinci tip tümör baskılayıcı gen olduğuna ve gen ifade seviyesinin azalmasının tümör gelişimine katkı sağladığına işaret etmektedir.

Hücre döngüsünün baskılanması; .

Hücre döngüsünün baskılanmasında işlev gösteren proteinlerden biri p53 proteindir (52). ING4, p53 proteininin N-ucu ile fiziksel olarak etkileşerek p53'ün ubiquitin-proteosom yolağıyla yıkılmasına engel olmakta ve p53'ün N-ucundan fosforillenerek kararlılığının sağlanmasında rol almaktadır (13,83). Kararlılığı sağlanan p53 proteini, hücre döngüsünün baskılanmasında rol oynayan proteinlerin transkripsiyonlarının düzenlenmesinde rol alarak hücre döngüsünü baskılamaktadır (52). p53'ün transkripsiyon faktörü olarak işlev gösterebilmesi DNA'ya bağlanabilmesi ile ilişkilidir (51,58). p53'ün DNA'ya bağlanabilmesi C-ucunun asetilasyon ve fosforilasyonlarıyla düzenlenmektedir (51). ING4 proteini, p53 proteinin 382. konumundaki lizin amino asitinden asetilasyonunda rol alarak p53'ün DNA'ya bağlanabilme özelliğinin düzenlenmesinde rol alır (51). N-ucundan fosforillenen ve C-ucunun da işlenmesiyle işlevsel hale gelen p53 proteini, hücre döngüsünün G₁ evresinde durdurulmasında rol alan p21 proteininin kodlanmasını sağlamaktadır (55). p53, her ne kadar E2F transkripsiyon faktörü G₂ evresini tetiklerse de gereğinden fazla sentezlenen E2F MDM2 proteinine bağlanarak p53'ün proteosoma yönlendirilmesine engel olup dolaylı

olarak E2F transkripsiyon faktörü aracılığıyla G₂ evresinde de hücre döngüsünün baskılanmasında rol almaktadır (Şekil 2.5) (56).

ING4'ün hücre döngüsü üzerine etkileri, hücre kültürü çalışmalarıyla ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, hücre döngüsünün baskılanmasında birlikte işlev göstermeleri nedeniyle p53 ve ING4 birlikte değerlendirilmiştir (81). Bu amaçla, p53 geni kapatılmış olan ve p53 geni işlevsel olan hücrelere dışarıdan ING4 verilerek hücre çoğalması değerlendirilmiştir (81). Dışarıdan verilen ING4'ün p53 geni kapatılmış olan hücrelerde etkili olmadığı ancak, p53 geni açık olan hücrelerde G₁/S ve G₂/M aşamasındaki hücre sayılarında artışa neden olduğu belirlenmiştir (81). Bu durum, G₁/S ve G₂/M kontrol noktalarında ING4'ün p53 aracılı olarak işlev gösterdiğini ve hücre döngüsünün baskılanmasında rol aldığını doğrulamaktadır. p53'ün, hücre döngüsünün G₁ evresinde döngüyü p21 aracılı olarak düzenleniyor olması nedeniyle, p53 geni kapatılmış olan hücrelerde ING4 ve p21 birlikte değerlendirilmiş ve hücrelere dışarıdan verilen ING4'ün p21 gen ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (106). Bu durum, ING4'ün p21'i p53'den bağımsız olarak da düzenlediğini gösterdiği gibi, hücre çoğalmasını baskıladığını desteklemektedir.

ING4'ün hücre çoğalmasına etkileri genellikle ING4_v1 ile gerçekleştirilen çalışmalarla değerlendirilmiştir. ING4'ün farklı kaynaşım yapılarının hücre çoğalmasına etkiledikleri, farklı kaynaşım yapılarının her birinin ayrıca değerlendirildiği bir çalışma ile ortaya konulmaya çalışılmıştır (13). Bu çalışmada, ING4_v1'in hücre çoğalmasını etkili olarak baskıladığı ancak, NLS bölgeleri değişmiş olan ING4_v2 ve ING4_v4'ün hücre baskılama etkinliğinin daha az olduğu tespit edilmiştir (13). ING4_v3, mRNA'sının az ve kararsızlığı sebebiyle çok düşük olan yarılanma ömrü nedeniyle çalışılamamıştır (13). Farklı kaynaşım yapıları ile gerçekleştirilen bu çalışmada, hücre çoğalmasının baskılanmasında ING4'ün farklı kaynaşım yapıları ile p53 etkileşimleri, p53 geni kapatılmış ve p53 geni işlevsel olan hücrelerde değerlendirilmiştir (13). Sonuçlar ING4'ün farklı kaynaşım yapılarının hücre çoğalmasının baskılanmasında p53'e belirgin bir bağımlılığı olmadığını göstermiştir (13). Bu çalışmada ING4 farklı kaynaşım yapılarının p21 geni özendirici bölgesini nasıl etkiledikleri de değerlendirilmiş ve ING4_v1'in p21 geni özendirici bölgesini uyardığı belirlenmiştir (13). NLS bölgeleri 3 ve 12 nükleotid eksik olan ING_v2 ve ING4_v4'ün p21 özendirici bölgesine olan etkileri çok zayıf kalmıştır (13). ING4_v4'ün, ING4_v1'in p21

özendirici bölgesine olan etkisini engellediği de bu çalışmada görülmüştür (13). ING4 farklı kaynaşım yapılarının nükleus içerisindeki yerleşimlerinin belirlendiği başka bir çalışmada, ING4_v1'in nükleolusta biriktiği ancak ING4'ün diğer farklı kaynaşım yapılarının nükleusa girdikleri ama nükeolusta birikimlerinin gerçekleşmediğini göstermiştir (13). Nükleolus, nükleus içerisindeki özel bir bölge olup, ING4 burada p53, p21 gibi proteinler ile etkileşerek bu proteinlerin işlevlerinin düzenlenmesinde rol alabilir. Pankreatik kanserlerde ING4 gen ifadesinin azalmış olması, bu genin pankreatik kanserde önemli olabileceğini önermektedir. ING4'ün farklı kaynaşım yapılarının her birinin gen ifade seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışma, ING4'ün pankreatik kanserlerde aldığı rolü ortaya koyabilir. Bu nedenle ING4'ün farklı kaynaşım yapılarının gerek gen ifade seviyeleri ve gerekse hücresel konumlarının ayrıca çalışılması gerekir.

Pankreatik kanserlerde K-ras'tan sonra en sık mutasyona uğrayan gen *p16* genidir ve bu genden INK4a ve ARF proteinleri kodlanmaktadır (126,138). Bu iki protein, *p16* geninin iki farklı transkriptinden sentezlenmektedir (138). *p16* geni, iki farklı yol ile hücre çoğalmasını baskılamaktadır; *p16* geni ürünlerinden INK4a doğrudan siklin/CDK bileşiklerine bağlanarak işlevlerini engellerken, ARF, p53 kararlılığının sağlanmasıyla işlev göstermektedir (138). Bazı kanserlerde *p16* geninin özendirici bölgesinin hipermetilasyona uğradığı da rapor edilmektedir (138). *p16* geni özendirici bölgesinin hipermetilasyonu, bu gen ürünlerinin sentezlenememeleri ve dolayısıyla p16 aracılı hücre çoğalmasının baskılanamaması anlamına gelmektedir (138). *p16* özendirici bölgesinin deasetilasyonu, bir histon deasetilaz olan p300 tarafından gerçekleştirilmektedir (139,140). ING4 proteinin p300 ile fiziksel olarak etkileştiği rapor edilmiştir (81). p16 ve ING4'ün birlikte değerlendirildiği bir çalışma olmadığı gibi, hücre çoğalmasının baskılanmasında p53'ün aldığı roller nedeniyle, ING4 işlevleri genellikle p53 bağlamında tartışılmıştır. ING4'ün *p21*'in özendirici bölgesine doğrudan etkili olduğu ve p53'e bağımlı olmadığı gösterilmiştir. *p16* geni, INK4a ürünü aracılığı ile hücre çoğalmasının baskılanmasında önemli olan siklin/CDK bileşiklerini doğrudan engellemekte, ARF ürünü aracılığıyla da p53 üzerinden p21 aracılığıyla yine siklin/CDK bileşiklerinin engellenmesini gerçekleştirmektedir. ING4 proteini, hücre çoğalmasını baskılama işlevini p53'den daha çok p16 üzerinden, p16'nın deasetilasyonunda işlev göstererek gerçekleştiriyor olabilir. ING4, *p16* geni ürünleri INK4a, ARF ve *p16* geni özendirici bölgesinin deasetilasyonunu gerçekleştiren

p300'ün birlikte değerlendirildiği bir çalışma, ING ailesi ile p16 geni arasındaki ilişkiyi daha doğru şekilde ortaya koyacaktır.

Programlı hücre ölümü;

Programlı hücre ölüm mekanizmasında gerçekleşen bozulmalar, tümör hücrelerinde oluşan hasarların birikimiyle sonuçlanmakta ve hem tümör hücresi ölmekte hem de daha kötü huylu bir özellik kazanmaktadır (48). Programlı hücre ölümü iki yolak üzerinden gerçekleşmektedir (50,141). Bu yollardan ilki, hücrelere dışarıdan gelen programlı hücre ölümü uyarısı ile başlamakta ve ikinci yolda olduğu gibi sonuçta, kaspaz -3, -6 ve -7'nin işlev kazanmasıyla devam etmektedir (50,141). Programlı hücre ölümü uyarısı hücreye, hücre yüzeyinde yerleşik olan almaçlar tarafından iletilir (50). Bu almaçlar Tümör-nekrozis faktör (TNF) ailesi üyesi olan TNF-FAS ve TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) almaçlardır ve ortak olarak “death domain; DD” denilen ölüm bölgeleri içerirler (50). Bu almaçların uyarılması ile, sitoplazmada pro-kaspaz-8 ve -10'un da birleşimiyle DISC (Death Including Signaling Complex) oluşur ve kaspaz-8 bu bileşim tarafından işlevsel hale getirilir (50). Birinci tip programlı hücre ölümüne duyarlı olan hücrelerde kaspaz-8'in işlev kazanması ile apoptotik yol gelişirken, ikinci tip hücrelerde mitokondriden salınan uyarılara da ihtiyaç vardır (50). Pankreatik kanser hücrelerinde protein tirozin fosfotaz-1 (FAP-1; FAS-associated phosphatase-1) fazlaca ifade edilmekte ve pankreatik kanser hücreleri FAS aracılı programlı hücre ölümünden korunmaktadırlar, bu nedenle pankreatik kanser hücreleri ikinci tip programlı hücre ölümüne duyarlıdır (50). İkinci tip programlı hücre ölüm yolağı “intrinsic yolak” olarak adlandırılmaktadır ve bu yolda ölüm uyarısının nasıl başladığı henüz tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, p53'ün fazla ifadesi gerçekleşmektedir (49,50,141). Fazla ifade edilen p53, sitoplazmadaki Bax proteini oranını arttırarak Bcl-2 ile Bax arasındaki dengenin bozulmasına neden olur (49,50). Bax'ın artması mitokondri zar geçirgenliğini değiştirerek sitokrom-c salınımına ve sitoplazmada apoptozom oluşumuna neden olur (49,50). Apoptozom bileşiği, kaspaz yolağını işlevsel hale getirir ve programlı hücre ölümü başlar (49,50).

ING4 proteininin programlı hücre ölümü üzerine etkisi akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücre hatlarında değerlendirilmiştir (142). ING4 ile birleştirilmiş olan vektörler A549 hücrelerine verilmiş ve kontrol grubunda %2 olarak gerçekleşen programlı hücre ölümünün ING4 verilen hücrelerde %39 olduğu belirlenerek, ING4'ün programlı hücre

ölümünde işlev gösterdiği ortaya konulmuştur (142). A549 hücre hatlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada da ING4'ün programlı hücre ölümünde aldığı moleküler roller belirlenmeye çalışılmıştır (142). Hücrelere dışarıdan verilen ING4 ile Bax, Bak ve sitokrom-c oranlarının arttığı, Bcl-2, Bcl-XL, Bid ve Kaspaz-3 oranlarının azaldığı gösterilmiştir (142). Programlı hücre ölümünde gen ifadesi artan Bax'ın gen ifadesi p53 proteini aracılığı ile düzenlenmektedir (142). p53 proteininin karalılığının sağlaması ve transkripsiyon faktörü olarak işlev gösterebilmesi için gerekli olan asetilasyon işleminde de ING4 proteini işlev göstermektedir (142). ING4 proteininin, p53 proteini üzerinden programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde rol aldığı görülmektedir. Programlı hücre ölümünde işlev gösteren Bax ve Bak proteininin gen ifadelerinin artması dışında bu proteinlerin mitokondri zarına yönlendirilmesi ve orada oligomerize olmaları gereklidir (142). Oligomerizasyon işlemi Bid proteininin varlığına bağlıdır (142). A549 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmada kültür ortamına ilave edilen ING4 proteini, programlı hücre ölümünde rol alan ve mitokondriden AIF (apoptosis inducing factor) salınımına neden olan PARP (Poly ADP Ribose Polymerase)'ın ING4 verilmesine bağlı olarak kesilip PAR'a dönüşmesi (143), Bid'in de ING4 tarafından kesilerek işlev kazanıyor olabileceğini düşündürmüştür. Bid, anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-XL tarafından protein etkileşimi ile engelleniyor olabilir ve ING4, Bid'in kaspaz 8 tarafından kesilmesini sağlayarak programlı hücre ölümünde p53 dışında da rol alıyor olabilir (142). Sonuç olarak, ING4 p53 üzerinden Bax gen ifadesini arttırarak ve Bid'in kesilerek işlev kazanmasını sağlayarak programlı hücre ölümünde rol alıyor olabilir.

Yeni damar oluşumu (angiogenesis);

Damar oluşumu, dokuların normal gelişimi için gerekli olan fizyolojik bir olay olup anjiyogenez olarak adlandırılmaktadır (144). Anjiyogenez, hem tümör hücrelerinin beslenme ve oksijenlenmesi hem de vücudun başka bölgelerine taşınmasında rol almasından dolayı tümör gelişiminde oldukça önemli bir yere sahiptir (144). Yeni damar oluşumu, anjiyogenezi uyaran faktörler tarafından düzenlenmektedir (144). Bugüne kadar tanımlanmış birçok anjiyogenik faktör vardır; TGF- α (Transforming Growth Factor- α), TGF- β (Transforming Growth Factor- β), aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), Angiogenin, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ve PD-ECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor) bunlardan bazılarıdır (144,145). Pankreatik kanserlerdeki yeni damar oluşum

mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte anjiyogenin, VEGF ve PD-ECGF gibi büyüme faktörlerinin ve interlökin-8'in pankreatik kanserlerde damar gelişimini uyardığı bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur (145,146). Gerçekleştirilen çalışmalar hem IL-8'in hem de VEGF'nin bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B aracılığıyla düzenlendiğini göstermiştir (146). NF- κ B'nin pankreatik kanser hücrelerinde fazla ifade edildiği ve NF- κ B'nin engellenmesinin VEGF ve IL-8'in gen ifadesini azalttığı ve buna bağlı olarak da damar ve tümör gelişiminin durduğu gösterilmiştir (146).

NF- κ B, p65 (RelA) ve p50 (NF- κ B1) proteinlerinin birleşimiyle (hetero-homodimer) oluşan ve birçok genin transkripsiyonunda rol alan bir transkripsiyon faktörü ailesidir (146). NF- κ B'nin işlev gösterebilmesi iki alt biriminin bir arada tutulmasıyla gerçekleşmektedir (146). ING4 proteininin, NF- κ B'nin alt birimleri olan p65 ve p50 ile bağlandıkları gösterilmiştir (147). Glioma hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada, ING4'ün gen ifadesinin normal hücrelere göre altı kat azaldığı ve dışarıdan verilen ING4'e bağlı olarak damar gelişiminin baskılandığı belirlenmiştir (147). ING4 geni baskılanmış olan hücrelerde, endotel hücrelerinin kemotaksisi ve çoğalmalarını uyaran IL-8'in gen ifade seviyesinin yaklaşık 10 kat kadar arttığı görülmüştür (147). Başka bir çalışmada ING4'ün, NF- κ B tarafından düzenlenen Cox-2 ve MMP-9 (Matrix Metalloproteinase) genleri özendirici bölgelerine bağlanarak, bu genlerin transkripsiyonlarını düzenlediği ve ING4'ün NF- κ B'nin bu özendirici bölgelere bağlanmasına engel olduğu gösterilmiştir (147). Gliomalarda olduğu gibi pankreatik kanserlerde de ING4 gen ifadesi azalmaktadır. ING4'ün NF- κ B üzerinden VEGF ve IL-8'in transkripsiyonlarını önleyememesi, pankreatik kanserlerdeki yeni damar gelişiminin nedenlerinden biri olabilir. ING4'ün hangi bölgesi aracılığı ile ve hangi farklı kaynaşım yapısıyla NF- κ B'nin işlevlerini engellediği henüz bilinmemektedir. NF- κ B'nin transkripsiyon faktörü olarak işlev göstermesinde ING4 gibi işlev gösteren ve p300 proteini ile de bileşik oluşturan Activating Transcription Factor-3 (ATF-3), içerdiği LZL bölgesi aracılığı ile ve sadece bazı farklı kaynaşım yapılarıyla NF- κ B işlevini düzenlemektedir (148). ING4'ün farklı kaynaşım yapıları, proteinin NLS bölgesindeki değişimlerle ilişkili olup ve proteinin p53 proteini ve p21 geni özendirici bölgelerine bağlanıp transkripsiyonu tetiklemede yetersiz kalmaktadırlar (13). ING4'ün hangi farklı kaynaşım yapısının NF- κ B işlevinde rol aldığının daha ayrıntılı olarak çalışılması, ING4'ün yeni damar oluşumu üzerindeki etkisini ortaya çıkaracaktır.

Hücre göçü;

Hücre göçü, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, enflamasyon ve tümör gelişimi gibi olaylarda rol almaktadır (141). Hücre göçü, tümör hücrelerinin hücre göçüne bağlı olarak çevre organlara yada vücudun başka bölgelerindeki organlara taşınmasında yani metastazlarında rol alması nedeniyle özellikle önemlidir (141). Hücre göçü karmaşık bir işlem olup, hücre içi ve dışından gelen uyarılar, hücre iskeleti, hücre yüzeyindeki proteinler ve bu proteinlerin hücrenin bulunduğu dış ortam ile etkileşimleri sonucunda gelişmektedir (149). Bir hücrenin göç edebilmesi öncelikle çevresindeki hücreler ve içinde bulunduğu hücre dışı alan (extracellular matrix) ile olan etkileşimini düzenleyebilmesi ve hareket edebilmesine bağlıdır (149). ING4 proteini, hücrelerin dokunma engellemesini kaybetmelerinde, hücre dışı alanın parçalanmasında rol alan enzim sentezlerinin engellenmesinde ve hücre yayılması için gerekli olan hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol almaktadır (14,86,147).

Melanoma hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada hücrelere dışarıdan verilen ING4'ün koloni oluşumunu azalttığı görülmüştür (105,108) Daha sonra da iki melanoma hücre hattında ING4'ün hücre yayılması üzerine etkileri değerlendirilmiş ve ING4'ün MMRU hücre hatlarında %63 ve SK-MEL-5 hücre hattında %66 oranında hücre göçünü azalttığı ortaya konulmuştur (105). Bu durumun hücre çoğalmasının baskılanması nedeniyle olmadığı da ayrıca gösterilmiştir (105). ING4'ün hücre göçünü, bir GTPaz olan Ras homology gene family member A (RhoA) ve Rho-assosiated kinase (ROCK) aracılı olarak “stress fiber” oluşumunu önleyerek engellediği belirlenmiştir (105). ING4 farklı kaynaşım yapılarının hücre göçüne etkilerinin belirlendiği bir çalışmada da, ING4_v1'in aktin polimerizasyonunda rol aldığı ancak, ING4_v2 ve ING4_v4'ün aktin filamentlerinin polimerizasyonlarını gerçekleştiremediği rapor edilmiştir (13). Aynı çalışma, hücre göçünde önemli olan katmanlı ayak benzeri membran çıkıntılarının (filopodia/lamellipodia) düzenlenmesinde ING4_v1'in rol aldığı ve ING4_v4'ün ING4-v1'in bu etkisini azalttığı gösterilmiştir (13).

Meme kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ING4'ün fazla ifade edilmesine bağlı olarak hücrelerin agar besi ortamında çoğalmalarının zayıfladığı görülmüştür (86). RKO, HEK-293 ve U-87 MG hücre hatlarında gerçekleştirilen moleküler incelemeler, ING4'ün Liprin- α 1 ile fiziksel olarak etkileştiğini göstermiştir (14). Liprin- α 1 hücre yayılmasında da rol alan katmanlı ayak benzeri yapıların hücre

zarında oluşturulmasında rol almaktadır (14). ING4_v1'in Liprin- α 1 ile bağlanarak, Liprin- α 1'in bu işlevini engellediği ve hücre göçünün baskılanmasında rol aldığı, ING4'ün diğer farklı kaynaşım yapılarının Liprin- α 1 ile güçlü şekilde bağlanamadıkları ve dolayısıyla hücre yayılması ve göçünün baskılanmasında etkili olmadıkları gösterilmiştir (14).

ING4'ün farklı kaynaşım yapılarının her birinin hücre göçü üzerine etkinliğinin farklı olduğu görülmektedir. Pankreatik kanserlerde gerçekleştirdiğimiz çalışmada, her bir ING4 farklı kaynaşım yapısının gen ifadesinin belirlenmesi ve protein düzeyinde incelenmesi, ING4'ün pankreatik kanserdeki hücre göçüne etkisini açıklayabilecektir.

ING4 ve metastaz;

Tümör hücrelerinin metastaz yapabilmeleri, hücre iskeletindeki değişimlere bağlı olarak gerçekleşen hücre yayılması yanında, hücrenin içinde bulunduğu ortamdan da etkilenmektedir (141). Tümör hücrelerinin metastaz yapabilmeleri için bazal laminayı geçmeleri gereklidir (141). Bazal lamina, tip IV kollajen, proteoglikan, laminin proteini ve başka proteinler içermektedir (141). Tümör hücreleri, hücre zarlarında fazlaca laminin bağlaçları bulundurlar ve bu bağlaçların laminin ile bağlanmasına bağlı olarak metastaz gelişimi başlar (141). Laminin bağlaçları aracılığı ile hücre dışı alandaki laminin ile ilişki kuran tümör hücreleri, bazal laminayı parçalayacak olan proteazlar salmaya başlarlar (141). Tümör hücreleri ayrıca, çevre hücrelerden uPA (urokinase plasminogen activator) ve öncül-kollajenaz IV salınımını da uyarırlar (141). uPA, hücre dışı alandaki plazminojeni plazmin'e dönüştürür, plazmin hücreler arasındaki bağ doku proteinlerini parçalayan "genel bir proteaz"dır ve aynı zamanda öncül-kollajenaz IV'ün işlev kazanmasında da rol alır (141). Tip IV kollojenazlar "matriks metalloproteinaz; MMP" olarak adlandırılmaktadırlar ve katalitik bölgelerinde Zn atomu içeren, kollojenaz işlevine sahip enzimlerdir (141). İnsanlarda ifade edilmekte olan Tip IV kollojenaz işlevine sahip iki protein, tümör hücrelerince fazla ifade edilmektedir (141). MMP-2 ve MMP-9 olarak da adlandırılan bu proteinler NF- κ B transkripsiyon faktörünün işlevi ile ifade edilmektedirler (141,146,147). MMP-9'un gen ifadesi, özendirici bölgesinin asetilasyon ve deasetilasyonu ile gerçekleştirilmektedir (146). ING4 proteininin, MMP-9 özendirici bölgesine NF- κ B ile birlikte bağlandığı ve burada p300 işlevini engelleyerek HDAC1 işlevine katkı sağladığı gösterilmiştir (146).

Glioma hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmalarda, ING4'ün H3K4me ile bağlanıp NF- κ B transkripsiyon faktörünün DNA ile bağlanmasına engel olarak MMP-9'un gen ifadesini engellediği gösterilmiştir (147). Aynı çalışma U118-MG hücre hattında gerçekleştirilmiş ve ING4 geninin baskılanmasına bağlı olarak MMP-9 gen ifade seviyesinin arttığı görülmüştür (147). MMP-9'un gen ifadesinin düzenlenmesinde NF- κ B'nin işlevini baskılamakta olan ING4'ün gliomalarda gen ifade seviyesinin 6 kat kadar azalmış olduğu gösterildiği gibi, hücre hatlarında gerçekleştirilmiş bir çalışmada da ING4'ün daha çok sitoplazmada bulunan farklı kaynaşım yapısı olan ING4_v2'nin glioma hücre hattında ifade edildiği gösterilmiştir (147).

Hücre dışı alandaki kollojenin parçalanmasında ING4'ün NF- κ B üzerinden işlev gösteriyor olabileceği görülmektedir. Gliomalarda ING4 gen ifadesinin azalmış olması, ING4'ün NF- κ B'nin işlevini engelleyemediğine ve bu nedenle MMP-9'un gen ifadesinin gerçekleştiğine işaret etmektedir. Pankreatik kanserlerde de ING4 gen ifadesinin azalmış olması, ING4'ün NF- κ B üzerinden MMP-9 gen ifadesini baskılayamadığını önermektedir. Ancak, bazı glioma hücre hatlarında sadece ING4'ün daha çok sitoplazmada bulunan ING4_v2 farklı kaynaşım yapısının ifade ediliyor olması, ING4'ün farklı kaynaşım yapılarının NF- κ B'ye etkinlik derecelerinin, p53 proteininde olduğu gibi, farklı olacağını ve NF- κ B ve ING4 farklı kaynaşım yapıları arasındaki etkileşimin ortaya konulmasının pankreatik kanserlerde olduğu gibi diğer kanserlerde de ING4'ün metastazda aldığı rolü aydınlatmaya yardımcı olacağı görülmektedir. Çünkü farklı kaynaşım mekanizması, ökaryotik canlılarda çok farklı mRNA'lar ve bu mRNA'lara bağlı olarak bir proteininin gerektiğinde farklı dokularda farklı isoformlarının ve glikolizasyon ve fosforilasyon gibi türevlerinin etkinliğiyle hücresel faaliyetlerin en ekonomik olarak yerine getirilebilmesi için tercih edilen fizyolojik bir işlemdir. Bir genin özendirici bölgesinin yapısal özelliği ile sentezlenen mRNA seviyesi arasında sıkı bir ilişki vardır (61,150). Farklı kaynaşım mekanizması transkriptin yani mRNA'nın ve kodladığı proteinin yapısını değiştirir (61,150). Kendiliğinden parçalanma [nonsense-mediated decay (NMD)] ile birlikte farklı kaynaşan ekzonların yaklaşık %25'i transkript edilen mRNA bolluğunu düzenler (61). Farklı kaynaşım sentezlenen proteinin bağlanma özelliğini, hücre içi yerleşim özelliğini, enzimatik işlevini, protein yapısının kararlılığını ve translasyon sonrası işleme özelliğini etkiler (61). Ayrıca, proteinin işlevini kaybedebileceği gibi yeni işlev kazanmasına da sebep olur (61). Farklı kaynaşım faktörleri öncül-mRNA'ların biyolojik

işlevi ile uyumlu mRNA'ların sentezini düzenler (61). Yapılan yayınlardan anlaşıldığı gibi farklı kaynaşım mekanizması hücrel faaliyetlerde anlamlı değişimleri protein isoformlarını sentezleyerek ve organ ve doku hücrelerindeki karmaşık preotomik yapılanmayı da sağlar (61). Ekzon kaynaşım mekanizmasını etkileyebilecek mutasyonlar, ekzon-intron kesişim yerleri veya dinukleotid tekrar dizilerinden herhangi birisinde olabilecek mutasyonlar ile yeni kaynaşım yerleri oluşması veya siplizomların oluşumunda kaynaşma faktörlerinin bağlandığı nukleotid dizilerinde olabilecek mutasyonlar, siplizomların oluşumunu engelleyerek veya ekzon veya intron içindeki nukleotid dizilerinde olabilecek mutasyonla yeni siplizom oluşum bölgelerinin ortaya çıkması hücre için gerekli olan proteinin sentezinin hatalı olarak ortaya çıkmasına dolayısıyla fenotipik yansımalarının da genetik hastalık olarak ortaya çıkmasına neden olur (32,61). Kanseri gelişiminde çeşitli karşı tutumlu (trans acting) faktörlerin katkısıyla, özellikle farklı kaynaşım türevlerinin sentezi ile, apoptotik mekanizmanın bozulduğu birçok çalışmada vurgulanmaktadır (32). Bu çalışmada ING proteinlerinde farklı kaynaşım sonucu ortaya çıkan ING türevlerinin normalden farklı olarak kaynaşım mekanizmasını etkileyebilecek farklı mutasyonları gözlenmemiştir. Normal dokularda gözlemlendiği gibi ING4_v1 türevi bu çalışmanın hasta grubunda da benzer çoğullukta gözlenmiştir. ING4 bantlarını parlaklık yoğunluğuna göre gerek ölçülebilir ve gerekse keyfi kıyaslama esasına göre değerlendirildiğinde ING4 türevlerinin gen ifade seviyelerinin normal dokuya göre nisbeten düşük olduğu görülür (Tablo 4.2). Pankreas kanserli dokularda % 43 ile %26 arasında değişen azalmanın (Tablo 4.2) pankreas kanserinin gelişiminde yetersiz ING4_v1 türevi p53 proteininin parçalanmasını nisbi olarak arttırabileceği bu yüzden eklemeli bir etkisi olabileceği düşünülürse de kesin bir katkısı olmadığı bu çalışma ile anlaşılmaktadır. Belkide MDM2'nin farklı kaynaşım türevleri ile birlikte bu çalışmanın devam ettirilmesi düşünülebilir.

Pankreatik kanser ve p53 mutasyonları;

Pankreatik kanserlerde gerçekleştirilen bu çalışmada, p53 geninin proteine dönüştürülen ekzonlarının PCR'ları gerçekleştirilmiş ve elde edilen toplam 180 DNA bölgesinin SSCP jelde yürütülmesi sonrasında elektroforetik alanda farklı hareketliliğe sahip 13 bant tespit edilmiştir. Bu farklı bantların DNA dizi analizleri, mutasyona taşımadıklarını göstermiştir (Tablo 4.1). Çalışılan p53 geni ekzonlarında sitozin nukleotid tekrarları fazla olduğu gibi tekrarlayan üçlü nukleotid dizileri de bulunmaktadır (NG_017013). SSCP incelemelerinde farklı moleküler ağırlıklı olarak gözlenmiş olan bantlar, bu gibi

tekrar dizilerin oluşturabileceği ikincil yapılar sebebiyle jel ortamında elektromanyetik alanda farklı yürüme hızına sahip olmasından kaynaklanabilir. Pankreatik kanserlerde p53 geninin %50'den fazla mutasyona uğramış olduğunun rapor edilmiş olması (6,7), bu çalışmada daha fazla sayıda muhtemel mutasyon içeren bant veya bantlar ve mutasyonların olabileceğini düşündürmüştü. Fakat dizin analizleri GC'ce zengin olan p53 genomik yapısının farklı değerlendirilmesi gerektiği bu çalışmada bulunmuştur. Bu nedenle pankreatik kanserlerde gerçekleştirilmiş p53 mutasyon çalışmaları, bu çalışmalarda tespit edilmiş mutasyonlar (59,151,152,153), bu mutasyonların hangi laboratuvar yöntemleri ile belirlenmiş olduğu (55,151) ve diğer kanserlerde p53 mutasyonlarının durumları araştırılmış ve p53 geni ile ilişkili aşağıdaki tartışma bu çerçevede gerçekleştirilmiştir.

Dondurulmuş pankreas kanserli dokularda immünohistokimyasal (IHC) olarak p53 proteinin varlığı araştırılmıştır (151). Değerlendirilen 22 örneğin 13'ünde (%60) p53 proteinin varlığı gösterilmiştir (151). Parafine gömülü dokularda ise çalışılan 124 örneğin 28'inde, yani örneklerin %23'ünde p53 proteinin varlığı gösterilmiştir (151). Parafine gömülü dokularda p53 proteininin daha az olarak belirlenmesinde, p53 proteinine karşı kullanılan antikorların dondurulmuş dokularda parafine gömülü dokulara göre daha iyi çalışmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (151). Aynı çalışmada, parafine gömülü dokulardan p53 varlığı tespit edilen 8 doku örneği ile p53 varlığı tespit edilemeyen 4 doku örneğinde nükleotid düzeyindeki değişimleri ortaya koymak için dizi analizi yapılmıştır (151). p53 varlığı antikor ile tespit edilmiş olan 8 örneğin 3'ünde ve p53 varlığı aynı antikor ile tespit edilemeyen 4 örneğin 1'inde DNA çoğaltılması gerçekleştirilememiştir (151). Çoğaltılan DNA'larda dizi analizi gerçekleştirilmiş ve kodon 246'da metiyonin amino asitinin izolösin amino asidine dönüşümüne neden olan ATG>ATT mutasyonu, kodon 249'da arjinin amino asitinin lözin amino asidine değişimine neden olan AGG>AAG mutasyonu ve 273. kodonda arjinin amino asitinin histidin amino asidine dönüşümüne neden olan CGT>CAT mutasyonu tanımlanmıştır (151).

Pankreas kanserinde p53 geninin mutasyonlarını ortaya koymaya yönelik yapılmış diğer bir çalışmada, 26 bireyden oluşan bir hasta grubu ile çalışılmıştır (59). Bu çalışmada pankreas kanserli 21 hastanın endoskopi ile alınmış pankreatik sıvılarındaki hücrelerden elde edilen DNA'lar kullanılırken, 5 hastanın ameliyat ile alınan tümörlü pankreas

dokularından elde edilen DNA'lar kullanılmıştır (59). Elde edilen DNA'larda p53 geninin 5, 6, 7 ve 8. ekzonlarının PCR ürünleri SSCP ile incelenmiştir (59). Bu çalışmada, 26 hastanın 3'ünde 5. ekzonda, 2'sinde 6. ekzonda, 3'ünde 7. ekzonda ve 3'ünde de 8. ekzonda farklı bantlar olduğu tespit edilmiştir (59). Yabanıl tipe göre farklı tespit edilen 11 banttan sadece 3'ünde mutasyonlar tespit edilebilmiştir (59). Ekzon 5'e tekabül eden 144. kodonda CAG (Glu)-TAG (stop), 156. kodonda CGC (Arg)-CAC (His) ve ekzon 7'ye tekabül eden 248. kodonda CGG (Arg)-CCG (Pro) mutasyonları olduğu belirlenmiştir (59). Doğrudan pankreas kanserli dokulardan elde edilen 5 örneğin 3'ünün SSCP değerlendirilmesinde hiçbir farklı bant görülmemiştir (59).

Pankreas kanserinde ve kronik pankreatitisde p53 geni değişimlerinin belirlenmeye çalışıldığı bir çalışmada IHC ile nükleus içerisinde p53 varlığı belirlenmeye çalışılmıştır (152). Bu amaçla bakılan 34 kanser örneğinin 16'sında (%47) nükleer p53 boyanması gerçekleşirken, kronik pankreatitisli 24 örneğin hiçbirinde nükleer p53 boyanması gerçekleşmemiştir (152). Ayrıca, 34 kanser örneği içerisinde nokta mutasyonu çalışmaları gerçekleştirilebilen 24 örnekte 8 mutasyon (%33) tespit edilmiştir (152). Nokta mutasyonlarının 35, 105, 133, 213, 213, 258, 259 ve 261. kodonlarda olduğu belirlenmiştir (152). Buna mukabil, pankreatitisli 24 örneğin 8'inde nokta mutasyonu taramaları yapılabilmiş ve hiçbir örnekte mutasyon olmadığı rapor edilmiştir (152). Bu bulgular eşliğinde, kanser gelişiminde p53 mutasyonlarının pankreas kanseri gelişimine katkı sağladığı ve pankreatitisle pankreas kanseri arasındaki genetik değişimlerden birinin de p53 geni mutasyonları olduğu ifade edilmiştir (152).

p53 proteinin pankreas kanserindeki değişimlerini ortaya koymaya yönelik gerçekleştirilmiş olan başka bir çalışmada, her biri farklı hastalarda olmak üzere, kodon 144, kodon 156 ve kodon 248'de mutasyonlar olduğu belirlenmiştir, 144 ve 156. kodon 5. ekzon tarafından, 248. kodon ise 7. ekzon tarafından kodlanmaktadır (59). Pankreas kanserinde gerçekleştirilmiş diğer bir çalışmada da R175H mutasyonu belirlenmiştir (153). Bu mutasyon p53 kararlılığını etkilemekte ancak p53'ün p21 proteinini uyarmasını etkilememekte olduğu da rapor edilmiştir (153). Bu mutasyonun lenf nodlarına metastaz gerçekleşmesinde önemi olabileceği vurgulanmıştır (153).

Pankreatik kanserlerdeki p53 mutasyon incelemelerinde, p53 mutasyonlarının %50 dolaylarında olduğunu rapor eden çalışmaların genellikle immünohistokimyasal (IHC)

alışmalar (151,152) olduğu görülmektedir. DNA dizi analizi ile nükleotid düzeyinde değişimlerin değerlendirildiği çalışmalarda p53 mutasyon oranları çok daha az bildirilmiştir (59,153). p53 geni ile gerçekleştirilmiş olan diğer çalışmalara da bakıldığında 4.000’den fazla mutasyon tanımlanmış olduğu görülmektedir (55). 392 amino aistlik bir proteini kodlamakta olan p53 geni 20 kb’lik bir alana yayılmış olmakla birlikte proteine dönüştürülen ekzonları intronik bölgeler ile birlikte yaklaşık 2.800 nükleotidlik bir uzunluğa tekabül etmektedir (154). p53 geninde gerçekleşen mutasyonlar genellikle proteinin DNA ile bağlandığı bölgelerde gerçekleşmektedir (57,58,127). İstatistiksel olarak ifade edildiğinde; insan kanserlerinin %50’sinde p53 mutasyonları görülmekte ve bu mutasyonların %95’i p53 proteininin DNA’ya bağlandığı “DNA bağlanma bölgesinde” gerçekleşmektedir ve gerçekleşen bu mutasyonların %75’i de tek nükleotid değişimine neden olmaktadır (57,58,127). p53 genindeki mutasyonların yaklaşık yarısının proteinin DNA ile bağlandığı bölgede olduğu ifade edilmekte ve bu da şimdiye kadar tanımlanmış mutasyonların yarısına yani 2.000’e tekabül etmektedir. Ancak, p53 geninin DNA bağlanma bölgesini kodlamakta olan 4 ve 5. ekzonları ve aralarında bulunan intronun kapladığı alan yaklaşık 1.300 nkleotiddir (NG_017013) (154).

İnsan kanserlerinde p53 mutasyonlarının yüksek sıklıkta görülüyor olması, bu genin kanserlerde belirteç olarak değerlendirilebileceğini düşündürmüştür (55). Bu amaçla, kolay ve ekonomik olan IHC ile p53 varlığını belirlemek sıklıkla tercih edilmektedir (55). IHC yöntemi ile p53 varlığı/yokluğunu belirlemek dışında p53, DNA veya RNA’nın PCR ile çoğaltılarak DNA nükleotid dizilemesi ile veya nükleotid değişimleri SSCP yöntemiyle de belirlenebilir (55). Tümör dokularında mutant p53 miktarı artmaktadır ve mutant p53’n IHC ile tespit edilmesi kolay olduğundan IHC tercih edilmektedir (55). Ancak, yabanıl tipteki p53’n yarılanma ömrü birkaç dakika ile sınırlıdır ve IHC ile belirlenmeleri çok zordur (127). Mutant p53 proteinlerinin yarılanma mrlerinin daha uzun olması nedeniyle IHC yöntemi ile yabanıl tipe göre tespitleri daha koyladır (127). IHC ile gerçekleştirilen çalışmalar meme, özafagus, bronş ve larinks displazilerinde de tanımlanmıştır(55). IHC’nin p53 mutasyonlarını belirleyebilmesi ile dizi analizi karşılaştırıldığında IHC nin, dizi analizine göre mutant yapıları belirlemede %75 oranında etkin olduğu belirlenmiştir (55). p53 protenin mutant yapılarının yarılanma mrlerinin, yabanıl tipe göre daha uzun olduğu dikkate

alındığında, IHC yönteminin yabancı p53 proteinini tespit etme oranının çok daha düşük olduğu anlaşılr.

Pankreas kanserinde gerçekleştirilen p53 çalışmaları dikkate alındığında, genellikle sitolojik incelemeler yapıldığı görölmektedir. Bu incelemeler sırasında immünohistokimyasal olarak p53 proteininin varlığı ortaya konulmaya çalışılmaktadır (151,152). p53 proteininin yarı ömrünün dakikalarla sınırlı olması (127), IHC ile p53 proteini varlığını belirlemeyi sınırlandırmaktadır. Bunun dışında, p53 geninde gerçekleşen mutasyonlara bağılı olarak farklı kaynaşım yapıları oluşabilmektedir (60). Örneğin, 125. kodonda gerçekleşen G>A mutasyonu (60), proteinin amino asit dizisini değıştirmemekte (60) ancak, yeni bir kaynaşım bölgesi oluşumuna neden olmaktadır.

Pankreatik kanserlerde gerçekleştirdiğimiz çalışma ve yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, p53 geni ile gerçekleştirilecek olan çalışamaların doğrudan DNA dizi analizi ile gerçekleştirilmesi ve buradan elde edilecek bulguların RNA düzeyinde de teyit edilmesinin daha sağlıklı sonuçlar ortaya koyacağı anlaşılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- 1- Keleg S, Büchler P, Ludwig R, Büchler MW, Friess H, Invasion and metastasis in pancreatic cancer, *Molecular Cancer*, 2003, 2:14, 1-7.
- 2- Pour PM, The silent killer, *Int. J. Pancreatology*, 1991, 10:103-104.
- 3- Vimalachandran D, Genetics and prevention of pancreatic cancer, *Cancer Control*, 2004, 11:1, 6-14.
- 4- Schneider G, Ischmid RM, Genetic alterations in pancreatic carcinoma, *Molecular Cancer*, 2003, 2:15, 1-7.
- 5- Hidalgo MP, Epidemiology and diagnosis of the pancreatic cancer, *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas* 2004, Vol. 96. No: 10, 714-722.
- 6- Pour PM, Pandey KK, Batra SK, What is the origin of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Cancer*, 2003, 2:13.
- 7- Nakamori S, Yashima K, Murakami Y, Association of p53 gene mutations with short survival in pancreatic adenocarcinoma. *Japan J. Cancer Res.*, 1995, 86:174-181.
- 8- Yu GZ, Genetic alterations and reduced expression of tumor suppressor p33 in human exocrine pancreatic carcinoma, *World J. of Gastroenterology*, 2004;10(24), 3597-3601.
- 9- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K, Suppression of novel growth inhibitor p33 (ING1) promotes neoplastic transformation, *Nat. Gen.*, 1996, 14: 415-420.
- 10- Leung KM, Po LS, Tsang FC, Siu WY, Lau A, Ho HT, Poon RY, The candidate tumor suppressor ING1b can stabilize p53 by disrupting the regulation of p53 by MDM2, *Cancer Research*, 2002, 262: 4890-4893.
- 11- Coles AH, Jones SN, The ING family in the regulation of cell growth and tumorigenesis, *J. Cellular Physiology*, 2008, 218:45-57.
- 12- Colla S, Tagliaferri S, Morandi F, Lunghi P, The new tumour suppressor gene inhibitor of growth family member 4 (ING4) regulates the production of proangiogenic molecules by myeloma cells and suppresses hypoxia inducible factor (HIF-1) alpha activity being involved in myeloma-induced angiogenesis, *Blood*, 2007;110, 4464-4475.

- 13- Unoki M, Shen JC, Zheng Z, Haris CC, Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J. Biol. Chem.*, 2006;274, 787-789.
- 14- 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 α 1, *Cancer Res.*, 2007, 67 (6): 2552-2558.
- 15- Pourani J, Kaserer K, Pfragner R, Cytogenetic and molecular analyses of multiple endocrine neoplasias of the MEN1 syndrome, *Int. J. Oncol.*, 2002, 20(5): 971-976.
- 16- Gunduz M, Nagatsuka H, Demircan K, Gunduz E, Cengiz B, Ouchida M, Tsujigiwa H, Yamachika E, Fukushima K, Beder L, Hirohota 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.
- 17- http://www.medscape.com/viewarticle/442814_3 (24.01.2010).
- 18- Bardeesy, N and DePinho RA, Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(12): p. 897-909
- 19- <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/pancreas/index.html> (24.01.2010).
- 20- Korolija M, Hadzija MP, Hadzija M, Molecular mechanism in β -cell development: the role of Pdx1, Ngn3 and Pax4 proteins. *Periodicum Biologorum*, 2009, 111 (1): 59-63.
- 21- Kim SK, Hebrok M, Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes&Development*, 2001, 15: 111-127.
- 22- Habener JF, Kemp DM, Thomas MK, Minireview: Transcriptional Regulation in Pancreatic Development. *Endocrinology*, 2005, 146 (3): 1025-1034.
- 23- Cell Biology and Cancer. Videodiscovery, Inc. Development Team (National Institutes of Health), 1999.
- 24- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA, The Cancer Genome. *Nature*, 2009, 458:9, 719-724.
- 25- Loeb LA, Haris CC, Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Research*, 2008, 68: 6863-6872.

- 26- Krontiris TG, Cooper GM, Transforming activity of human tumor DNAs, Proc. Nat. Acad. Sci., 1981, 78: 1181-1184.
- 27- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA, Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into Mouse fibroblasts, 1981, Nature, 290: 261-264.
- 28- Reddy EP, Reynolds RK., Santos E, Barbacid M, A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. 1982, Nature, 300: 149–152.
- 29- Tabin CJ, Mechanism of activation of a human oncogene. 1982, Nature, 300: 143–149.
- 30- DeVita V., Hellamn S., Rosenberg S. A., Cancer, Lippincot Williams and Wilkins, 2001, 77-119
- 31- Talbot SJ, Crawford DH, Viruses and tumours—an update. Eur. J. Cancer, 2004, 40: 1998–2005.
- 32- Venables JP, Abberant and alternative splicing in cancer. Cancer Research, 2004, 64: 7647-7654.
- 33- Brinkman BMN, Splice variants as cancer biomarkers. Clinical Biochemistry, 2004, 37: 584-594.
- 34- Duccase M, Brown MA, Epigenetic aberrations and cancer. Molecular Cancer, 2006, 5/60: 1-10.
- 35- Kouzarides T, Chromatin modifications and their function. Cell, 2007, 128: 693-705.
- 36- <http://e-articles.info/e/a/title/DEVELOPMENT-OF-CANCER-AND-CHARACTERISTICS-OF-CANCER-CELLS/> (14.11.2009).
- 37- <http://www.microbiologyprocedure.com/viruses-and-cancer/characteristics-of-cancer-cells.htm> (14.11.2009).
- 38- Pedraza-Farina LG, Mechanisms of Oncogenic Cooperation in Cancer Initiation and Metastasis. Yale Journal of Biology and Medicine, 2006, 79, 95-103.
- 39- Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M, E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. Cancer, 77: 8, 1605-1613, 1998.
- 40- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A4313&rendertype=figure&id=A4313> (14.11.2009).
- 41- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Metalloproteinases and cancer invasion. Semin. Cancer Biol. 12, 99-106, 1990.

- 42- Carmeliet P, Jain RK, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-257, 2000.
- 43- Schulz WA, *Molecular Biology of Human Cancers*, Springer, 11-17, 2007.
- 44- Garret MD, Cell Cycle control and cancer. *Current Science*, 2001, 81 (5): 515-522.
- 45- <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf> (29.01.2010).
- 46- Krug U, Ganser A, Koeffler HP, Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*, 2002, 21: 3475-3495.
- 47- Lee HP, Tumor suppressor genes: a new era for molecular genetic studies of cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1991, 19: 3-13.
- 48- Cooper GM, Hausman RE, *Hücre moleküler yaklaşımlar*, 2006, İzmir Tıp Kitap Evi, 579-582.
- 49- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G, Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Molecular Cancer*, 2008, 7(64): 1-10.
- 50- Westphal S, Kalthoff H, Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2003, 2(6): 1-14.
- 51- Prives C, Manfredi JJ, The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes Dev.*, 1993, 7: 529-534.
- 52- Haris CC, Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Nat. Can. Inst.*, 1996, 88: 1442-1455.
- 53- Varley JM, Evans GGR, Birch JM, Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review. *British J. of Cancer*, 1997, 76 (1): 1-14.
- 54- Gasco M, Shami S, Crook T, The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2002, 4:70-76.
- 55- Velculescu VE, El-Deiry WS, Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clinical Chemistry*, 1996, 42 (6): 858-868.
- 56- Gabriel JA, *The Biology of Cancer*, 2007 (Second Ed.), John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England, 37-40.
- 57- Tan Y, Luo R, Structural and functional implications of p53 missens cancer mutations. *PMC Biophysics*, 2009, 2(5): 1-10.
- 58- Ho CW, Fitzgerald MX, Marmorstein R, Structure of the p53 core domain dimer bound to DNA, *J. Biological Chem.*, 2006, 281: 20494-20502.
- 59- Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, Sawabu N, Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and

- its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation, *Clinical Cancer Research*, 1999, 5: 1147-1153.
- 60- Holmila R, Fouquet C, Cadranel J, Zalcman G, Soussi T, Splice mutations in the p53 gene: case report and review of the literature, *Human Mutation*, 2002, 575: 1-7.
 - 61- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H, Function of alrenative splicing, *Gene*, 2005, 1-20.
 - 62- Roberts GC, Smith CWJ, Alternative splicing: combinatorial output from the genome. *Current Oppinion in Chemical Biology*, 2002, 6: 375-383.
 - 63- Zhang T, Huang X, Dong L, Hu D, Ge C, Zhan Y, Xu W, Yu M, Li W, Wang X, Tang L, Li C, Yang X, PCB-1 regulates alternative splicing of the CD44 gene and inhibits invasion in human hepatoma cell line HepG2 cells. *Moleucular Cancer*, 2010, 9:72.
 - 64- Black DL, Mechanism of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Reviews of Biocgmeistry*, 2003, 72: 1-65.
 - 65- <http://www.eurasnet.info/alternative-splicing/what-is-alternative-splicing> (29.03.2010).
 - 66- Payne SR, Kemp CJ, Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis*, 2005, 26 (12):2031-2045.
 - 67- Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T, Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, 1969, 223, 363-368.
 - 68- Knudson AG, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, 68: 820-823.
 - 69- Comings DE, A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 3324-3328.
 - 70- Sers C, Emmenegger U, Husmann K, Bucher K, Andres AC, Schafer R, Growth-inhibitory Activity and Downregulation of the Class II Tumor-suppressor Gene *H-rev107* in Tumor Cell Lines and Experimental Tumors. *The Journal of Cell Biology*, 1997, 136 (4): 935-944.
 - 71- Yeo CJ, Tumor suppressor genes: a short review. *Surgery*, 1999, 125(4):363-366.
 - 72- Doğan AL, Güç D, Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2004, 35, 34-42.

- 73- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JA, Jeffrey SS, Giaccia AJ, Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 2006, 440 (27): 1222-1226.
- 74- Sommers SC, Murphy SA, Warren S, Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterology*, 1954, 27: 629-640.
- 75- Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A, Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2003, 2(7): 1-7.
- 76- Russell M, Berardi P, Gong W, Riabowol K, Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Experimental Cell Research*, 2006, 312: 951-961.
- 77- He GHY, Helbing CC, Wagner JM, Sensen CW, Riabowol K, Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol. Biol. Evol.*, 22 (1): 104-116.
- 78- Soliman MA, Riabowol K., After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32 (11): 509-519.
- 79- Baker LA, Allis CD, Wang GW, PHD fingers in human diseases: Disorders arising from misinterpreting epigenetic marks. *Mutation Research*, 2008, 647:3-12.
- 80- Wang GG, Allis CD, Chi P, Chormatin remodeling and cancer, part I: covalent histone modifications. *Trends in Molecular Medicine*, 2007, 13 (9): 363-372.
- 81- Shiseki M, nagashima M, Pedoux RM, Shiseki MK, Miura K, Okamura S, Onogi H, Higashimoto, Appella E, Yokota J, Harris CC, p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Research*, 2003, 63: 2373-2378.
- 82- Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K, Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Molecular Cell Biology*, 2005, 37: 1054-1065.
- 83- Zhang X, Wang K, Wang Z, Xu L, Wang Q, Chen F, Wei D, Han Z, Nuclear localization signals of ING4 plays a key role in its binding to p53. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2005, 331: 1032-1038.
- 84- Wang Y, Wang J, Li G, Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotid excision repair and apoptosis. *FEBS Letter*, 2006, 580: 3787-3793.
- 85- Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G, Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol. Life Sci.*, 2004, 61: 2597-2613.

- 86- 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: 16251-16256.
- 87- Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E, Barnett GH, Jain RK, The candidate tumor suppressor protein ING4 regulates brain tumor growth and angiogenesis, *Nature*, 2004, 428: 328-332.
- 88- Ozer A, Wu LC, Bruck RK, The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102: 7481-7486.
- 89- Doyon Y, Cayrou C, Ulah 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.
- 90- Takahashi M, Seki N, Ozaki T, Kato M, Kuno T, Nakagawa T, Watanabe K, Miyazaki K, Ohira M, Hayashi S, Hosoda M, Tokita H, Mizuguchi H, Hayakawa T, Todo S, Nakagawa A, Identification of the p33(ING1)-regulated genes that induce cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a Mouse mammary epithelial cell line NMuMG. *Cancer Res.*, 2002, 62: 2203-2209.
- 91- Garkavtsev I, Riabowol K, Extension of the replicative life span of human diploid fibroblast by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol. Cell Biol.*, 1997, 17: 2014-2019.
- 92- Nagashima M, Shieski M, Miura 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. Nat. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 9671-9676.
- 93- Nagashima M, Shieski M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shieski 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: 343-350.
- 94- Helbing CC, Veillette C, Riabowol K, Johnston RN, Garkavtsev I, A novel candidate tumor suppressor ING1 is involved in the regulation of apoptosis. *Cancer Res.*, 1997, 57: 1255-1258.

- 95- 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: 3455-3462.
- 96- Vieyra D, Toyama T, Hara Y, Boland D, Johnston R, Riabowol K, ING1 isoforms differentially effect apoptosis in a cell age-dependent manner. *Cancer Research*, 2002, 62: 4445-4452.
- 97- Chin MY, Ng KC, Li G, The novel tumor suppressor p33ING2 enhances UVB-induced apoptosis in human melanoma cells. *Experimental Cell Research*, 2005, 304: 531-543.
- 98- Wang Y, Li G, ING3 promotes UV-induced apoptosis via Fas/caspase-8 pathway in melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281: 11887-11893.
- 99- Vieyra D., Loewith R., Scott M., Bonnefin P., Boisvert F. M., Cheema P., Pastoryeva S, Meijer M, Johnston RN, Bazett-Jones DP, McMahon S, Cole MD, Young D, Riabowol K, Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J. Biol. Chem*, 2002, 277: 29832-29839.
- 100- Campos EI, Martinka M, Mitchell DL, Dai DL, Li G, Mutations of ING1 tumor suppressor gene detected in human melanoma abrogate nucleotide excision repair. *Int. J. Oncol.*, 2004, 25: 73-80.
- 101- Laherty CD, Bilin AN, Lavinsky RM, Yochum GS, Bush AC, Sun JM, Mullen TM, Davie JR, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, Ayer DE, Eisenman RN, SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR mediated repression by specific transcription factors. *Mol. Cell*, 1998, 2: 33-42.
- 102- Unoki M, Kumamoto K, Takenoshita S, Haris CC, Reviewing the current classification of inhibitor of growth family proteins. *Cancer Sci*, 2009, 7: 1173-1179.
- 103- Xie Y, Zhang H, Sheng W, Xiang J, Ye Z, Yang J, Adenovirus-mediated ING4 expression suppresses lung carcinoma cell growth via induction of cell cycle alteration and apoptosis and inhibition of tumor invasion and angiogenesis. *Cancer Letters*, 2008, 271: 105-116.
- 104- Tzouvelekis A, Aidinis V, Harokpos V, Karameris A, Zacharis G, Mikroulis D, Konstantinou F, Steiropoulos P, Sotiriou I, Froudarakis M, Pneumatikos I, Tringidou R, Boutos D, Down-regulation of the inhibitor of growth family member 4 (ING4) in different forms of pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 2009, 10 (14):1-10.

- 105- Li J, Martinka M, Li G, Role of ING4 in human melanoma cell migration, invasion and patient survival. *Carcinogenesis*, 2008, 29 (7): 1373-1379.
- 106- Zhang X, Xu L-S, Wang Z-Q, Wang K-S, Li N, Cheng Z-H, Huang S-Z, Wei D-Z, Han Z-G, ING4 induces G2/M cell cycle arrest and enhance the chemosensitivity to DNA-damage agents in HepG2 cells. *FEBS Letters*, 2004, 570: 7-12.
- 107- Liu E, Wu J, Cao W, Zhang J, Liu W, Jiang X, Zhang X, Curcumin induces G2/M cell cycle arrest in a p53-dependent manner and upregulates ING4 expression in human glioma. *J. Neurooncol.* 2007, 85: 263-270.
- 108- Cai L, Li X, Zheng S, Wang Y, Wang Y, Li H, Yang J, Sun J, Inhibitor of growth is involved in melanomagenesis and induces growth suppression and apoptosis in melanoma cell line M14. *Melanoma Research*, 2009, 19:1-7.
- 109- Li X, Cai L, Liang M, Wang Y, Wang J, Zhao Y, ING4 induces cell growth inhibition in human lung adenocarcinoma A549 cells by means of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *The Anatomical Record*, 2008, 291: 593-600.
- 110- Fang F, Luo L-B, Tao Y-M, Wu F, Yang L-Y, Decreased expression of inhibitor of growth 4 correlated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009, 18 (2): 409-416.
- 111- <http://www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/method/cDNAproduction.html> (04.05.2010).
- 112- <http://catalog.takarabio.co.jp/en/product/licenseinfo.asp?unitid=U100005356&seihinid=S100031084> (04.05.2010).
- 113- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/66267464> (04.05.2010).
- 114- Mullis K, Gibbs RA, Fere F, *The Polymerase Chain Reaction*, The Maple Press Company, York, PA., 1994, 3-4.
- 115- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K, Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5: 874-879.
- 116- Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE, Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 1999, 20:1177-1185.
- 117- İğci YZ, Gebelikte serum arginaz seviyesi ile arginaz gen çokyapılılığı arasındaki ilişkinin araştırılması. 2004, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, sayfa76, Gaziantep.

- 118- PE Applied Biosystems, ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactin Kit protocol, 1998.
- 119- Perkin Elmer, ABI 310 Genetic Analyzer Manuel, 2000.
- 120- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Porceedings of the National academy of Sciences, 1977, 74:5463-5467.
- 121- Li Z, Yang L, Wang J, Shi W, Pawar RA, Liu Y, Xu C, Cong W, Hu Q, Lu T, Xia F, Guo W, Zhao M, Zhang Y, beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. Fish Shellfish Immunol., 2010-05-04
- 122- <http://rsbweb.nih.gov/ij/> (04.05.2010).
- 123- Santos E, Nebreda AR, Sturctural and functional properties of ras proteins, FASEB J., 1989, 3:2151-2163.
- 124- Ayllon V, Rebollo A, Ras-induced cellular events (review). Mol. Membr Biol., 2000, 17(2):65-73.
- 125- Littlepage LE, Egeblad M, Werb Z. The tumor microenvironment in cancer progression, The Molecular Basis of Cancer 3rd Ed, Chp 17, Saunders Elsevier, Philadelphia PA, 2008, s. 229-239.
- 126- Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT, The INK4A/ARF locus: Role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. Journal of Neuro-Oncology, 2001, 51:219-229.
- 127- Meek DW, Tumour suppression by p53: a role fort he DNA damage response? Nature, 2009, 9:714-723.
- 128- Leclerc GJ, Leclerc GM, Barredo JC, Ral-time RT-PCR analysis of mRNA decay: half-life of Beta-actin mRNA in human leukemia CCRF-CEM and Nalm-6 cell lines. Cancer Cell International, 2002, 2 (1):1-5.
- 129- Procaccio V, Salazar G, Ono S, Styers ML, Gearing M, Davila A, Jimenez R, Juncos J, Gutekunst C, Meroni G, Fontanella B, Sontag E, Sontag JM, Faundez V, Wainer BH, A mutation of β -actin that alters depolymerization Dynamics is associated with autosomal dominant malformations, deafness, and dystonia. The Am. J. Hum. Genet., 2006, 78: 947-960.
- 130- Nunoi H, Yamazaki T, Tsuchiya H, Kato S, Malech HL, Matsuda I, Kanegasaki S, A heterozygous mutation of beta-actin associated with neutrophil dysfunction and recurrent infection. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 20;96(15):8693-8698.

- 131- Le PU, Nguyen TN, Drolet-Savoie P, Leclerc N, Nabi R, Increased β -actin expression in an invasive Moloney Sarcoma Virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia, *Cancer Research*, 1998, 58:1631-1635.
- 132- Lin C-S, Ng S-Y, Gunning P, Kedes L, Leavitt J, Identification and order of sequential mutations in β -actin genes isolated from increasingly tumorigenic human fibroblast strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82: 6995-6999.
- 133- Leavitt J, Goldman D, Merrill C, Kakunaga T, Actin mutations in a human fibroblast model for carcinogenesis. *Clinical Chemistry*, 1982, 28:850-860.
- 134- Nowak D, Krawczyński A, Dus D, Malicka-Błaszczewicz M, Actin in human colon adenocarcinoma cells with different metastatic potential. *Acta Biochimica Polonica*, 2002, 49(4):823-828.
- 135- Nowak D, Skwarek-Maruszewska A, Zemanek-Zboch M, Malicka-Błaszczewicz M, Beta-actin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. *Acta Biochimica Polonica*, 2005, 52(2):461-468.
- 136- Li M., Jin Y., Sun W., Yu Y., Bai J., Tong D., Qi J., Du J., Geng J., Huang Q., Huang X, Huang Y, Han F, Meng X, Rosales JL, Lee K, Reduced expression and novel splice variants of ING4 in human gastric adenocarcinoma. *Journal of Pathology*, 2009, 87-95.
- 137- Herzog CR, Crist KA, Sabourin CLK, Kelloff GJ, Bone CW, Stoner GD, You M, Chromosome 3p tumor-suppressor gene alterations in cervical carcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, 2001, 30(3):159-168.
- 138- Drexler HG, Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia*, 1998, 12:845-859.
- 139- Özkul Y, Jurickova I, Findley HW, Variable expression and hypermethylation of p16 gene in patients with T-ALL and cell lines. *Turk J. Haematol.*, 2002, 19(3):391-397.
- 140- Wang X, Feng Y, Zhao J, Zhang G, Pan H, Huang B, Lu J, The expression of p16 is regulated by the reversible histone acetylation. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2010, 1-9.
- 141- Devlin TM, Textbook of Biochemistry with clinical correlations. 6th ed. USA: Wiley-Liss., 2006.

- 142- Li X, Zhang Q, Cal L, Wang Y, Wang Q, Huang X, Fu S, Bai J, Liu J, Zhang G, Qi J, Inhibitor of growth 4 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549 via Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway. *J. Cancer Clin. Oncol.*, 2009, 135:829-835.
- 143- http://en.wikipedia.org/wiki/Poly_ADP_ribose_polymerase (05.05.2010).
- 144- Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, Beger HG, Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Research*, 1996, 56:2703-2706.
- 145- Ikeda N, Adachi M, Taki T, Huang C, Hashida H, Takabayashi A, Sho M, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M, Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 1999, 79(9/10):1553-1563.
- 146- Xiong HQ, Abbruzzese JL, Lin E, Wang L, Zheng L, Xie K, NF- κ B activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2004, 108:181-188.
- 147- Nozell S, Laver T, Moseley D, Nowoslawski L, DeVos M, Atkinson GP, Harrison K, Nabors LB, Benveniste EN, The ING4 tumor suppressor attenuates NF- κ B activity at the promoters of target genes. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(21):6632-6645.
- 148- Hua B, Tamamori-Adachi M, Luo Y, Tamura K, Morioka M, Fukuda M, Tanaka Y, Kitajima S, A splice variant of stress response gene ATF3 counteracts NF- κ B-dependent anti-apoptosis through inhibiting recruitment of CREB-binding protein/p300 coactivator. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281:1620-1629.
- 149- Itano N, Okamoto S, Zhang D, Lipton SA, Ruoslahti E, Cell spreading controls endoplasmic and nuclear calcium: a physical gene regulation pathway from the cell surface to the nucleus. *PNAS*, 2003, 100(9):5181-5186.
- 150- Caceres JF, Kornblihtt AR, Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 2002, 18(4):186-193.
- 151- Barton CM, Staddon SL, Hughes CM, Hall PA, Sullivan CO, Kloppel G, Theis B, Russell RCG, Neoptolemos J, Williamson RCN, Lane DP, Lemoine NR, Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer, *British Journal of Cancer*, 1991, 64:1076-1082.

- 152- Casey G, Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Lopez ME, Buchler M, Beger HG, Korc M, p53 mutations are common in pancreatic cancer and are absent in chronic pancreatitis. *Cancer Letter*, 1993, 14;69(3):151-160.
- 153- Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doble B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, Frame MC, Evans TR, Sansom OJ, Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107(1):246-251.
- 154- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>(10.05.2010).

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Şanlıurfa'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimlerimi Şanlıurfa'da tamamladım. Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans yaptıktan sonra Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik Doktora programına başladım ve 2010 yılında bitirdim. Evli ve bir kız çocuk babasıyım. İngilizce bilmekteyim.