T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAŞ-BOYUN SKUAMÖZ HÜCRE KARSİNOMLARINDA SİTOKİNLER VE İLGİLİ YOLAKTA ROL ALAN BAZI GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Aysel KALAYCI YİĞİN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülin ÇORA

KONYA – 2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAŞ-BOYUN SKUAMÖZ HÜCRE KARSİNOMLARINDA SİTOKİNLER VE İLGİLİ YOLAKTA ROL ALAN BAZI GENLERİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

Aysel KALAYCI YİĞİN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülin ÇORA

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11102030 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2015

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince engin bilgilerinden faydalandığım başta danışmanım Prof. Dr. Tülin Çora olmak üzere, Prof. Dr. Hasan Acar, Prof. Dr. Aydın Güzeloğlu, Doç. Dr. Ercan Kurar ve Yrd. Doç. Dr. Nadir Koçak hocalarıma, çalışmamızda kullanılan dokuların temini için her ameliyatta bizi unutmadan bilfiil haberdar eden Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Kayhan Öztürk ve Doç. Dr. Bahar Çolpan hocalarıma; bu tezin hazırlanmasında bize farklı bir bakış açısı getiren Georgia Regents Üniversitesi Kanser Merkezi'nden Doç. Dr. Hasan Korkaya hocama; baş-boyun kanseri hücrelerinin temininde Southern California Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Prof. Dr. Alan Eppstein'e; istatistiksel analizlerdeki yardımlarından dolayı Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Doç. Dr. Seyit Ali Kayış hocama; Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D.'da çalışan tüm arkadaşlarıma; hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmadan desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli annem, babam ve kardeşime ve tanıştığım günden itibaren bana her konuda destek olan sevgili eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

Bu tezin hiçbir bölümünde, kaynak gösterilmeden başka bir çalışmadan tamamen veya kısmen alıntı yapılmadığını, alınan bilgilerin ise kaynaklarının referans olarak gösterildiğini beyan ederim.

Aysel KALAYCI YİĞİN

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR v

1. GİRİŞ 1

1.1.Karsinogenez 2

1.2.Hücre Sinyal İletimi 3

1.2.1 Sitokinler ve Sitokinler Aracılığıyla Hücre Sinyal İletimi 4

1.2.2. PI3K/AKT Sinyal Yolağı 10

1.3. Baş-Boyun Kanserleri 11

1.3.1. Baş-Boyun Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri 12

1.3.2. Baş-Boyun Kanserlerinin Patogenezi 13

1.3.3. Baş-Boyun Kanserlerinde Alan Kanserizasyonu (Field cancerization) 14

1.3.4. Baş-Boyun Kanserlerinde Sinyal Yolaklarındaki Değişiklikler 16

1.3.5. Baş-Boyun Kanserlerinin Tedavisi 17

1.4. Projenin Amacı 18

2. GEREÇ VE YÖNTEM 20

2.1. Antikor Sıra Analizi 20

2.2. SCCL-MT1 ve HEK-293 Hücrelerinin Kültürü ve Dondurulması 21

2.3. Gen ekspresyon analizleri 21

2.3.1. mRNA ekspresyon analizleri 22

2.3.2. Protein Ekspresyon Analizi 25

2.4. İstatistiksel Analizler 30

3. BULGULAR 31

3.1. Antikor Sıra Analizi 31

3.2. SCCL-MT1 ve HEK-293 Hücrelerinin Kültürü ve Dondurulması 34

3.3. Gen ekspresyon analizleri 34

3.3.1. mRNA ekspresyon analizleri 35

3.3.2. Protein ekspresyon analizi 40

4. TARTIŞMA 46

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 56

6. KAYNAKLAR 57

7. EKLER 65

EK-A: Etik Kurul Onay Belgesi 65

EK-B: Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Formu 66

EK-C: Antikor sıra analizi sonucu çıkan ortalama değerler, kat artışları ve standart sapmaları..... 67

EK-D: Erken ve ileri evre hastaların serumlarında artış gösteren sitokinlerin oranları... 69

EK-E: qRT-PZR analizinde kullanılan standartların amplifikasyon eğrisi (A) ve dilusyon eğrisi (B)..... 70

EK-F: EGFR (A), IGFBP1 (B), PDGFBB (C), PTEN (D) ve AKT (E) genlerinin qRT-PZR amplifikasyon eğrileri. 71

8. ÖZGEÇMİŞ 72

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTB	Actin Beta
AKT1	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
AKT2	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2
AKT3	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 3
APS	Amonyum Persülfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BBK	Baş-Boyun Kanseri
BBSHK	Baş-Boyun Skuamöz Hücre Karsinoma
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CSF	Koloni Uyarıcı Faktörleri
DAG	Diaçilgliserol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPH	Efrin
ErbB	v-erb-b2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog
EtBr	Ethidiumbromide
FBS	Fetal Dana Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GF	Growth Factor
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
Her1	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 1
Her2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
Her3	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 3
Her4	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 4
HPV	Human Papilloma Virus

IFN	İnterferon
IGF-1	İnsülin ve İnsülin-like GF Reseptör- 1
IGFBP-1	İnsulin-like Growth Factor Binding Protein- 1
IGFBP-1-6	IGF Bağlayıcı Protein-1- 6
IL-1	İnterlökin-1
IL-12	İnterlökin-12
IL-6	İnterlökin-6
JAK	Janus kinase
MAP	Mitojen-Aktive Protein
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NT-3	Neurotrophin-3
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDK1	Phosphatidylinositol-dependent Kinase-1
PH	Plekstrin Homoloji
PI3K	Fosfoinositol-3-kinaz
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3 kinases/AKT
PIP-2	Phosphatidylinositol 4,5 Biphosphate
PIP-3	Phosphatidylinositol 3,4,5 Triphosphate
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PLC	PIP2'nin Fosfolipaz C
pRB	Retinoblastoma
PTB	Fosfotirozin Bağlanma Bölgesi
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTK	Reseptör Tirozin Kinazlar
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex Subunit A
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SH2	Src Homoloji-2
TBS-T	Tris Buffered Saline - Twen20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörleri

TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TUBA1	Tubulin Alpha 1
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase Activation Protein

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Baş-boyun Skuamöz Hücre Karsinomlarında Sitokinler ve İlgili Yolakta Rol Alan Bazı Genlerin Ekspresyonlarının Araştırılması

Aysel Kalaycı Yiğin

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2015

Baş-boyun skuamöz hücre karsinomaları (BBSHK) baş-boyun kanserleri içinde en sık rastlanılan, agresif seyirli, erken tekrarlama (rekürrens) ve metastaz ile karakterize bir tümör tipidir. Hastalığın oluşumunda sigara ve alkol kullanımı önemli rol alırken bazı sinyal iletim yolaklarının ve bu yolaklarla bağlantılı genlerin regülasyonlarının bozulmasının BBSHK'lerinin gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle mevcut çalışmada öncelikle hücre sinyal iletiminin ilk basamağında yer alan sitokinlerin belirlenmesi ve bu sitokinlerle ilgili yolakta yer alan genlerin ekspresyonlarının mRNA ve protein seviyesinde ortaya konarak sitokin temelli sinyal yolağının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada BBSHK'li hastaların ve sağlıklı kontrollerin serum örneklerinde, sitokin seviyelerini belirlemek için ilk olarak antikor sıra analizi yapıldı. Antikor sıra analizi sonucunda, EGF, IGF-1, PDGFBB ve IGFBP-1 sitokin seviyelerinin kontrollere göre arttığı belirlendi. Daha sonra sitokinlerin ve ilişkili olduğu düşünülen genlerin mRNA gen ekpresyon seviyeleri, qRT-PZR ile incelendi. mRNA gen ekspreyon analizleri; BBSHK'li 16 hastanın tümörlü-normal dokuları, larinkse ait tümörlü-normal dokuları, dile ait tümörlü-normal dokuları, yine bu grupların erken evre ile ileri evreleri ve cinsiyet parametreleri arasında karşılaştırıldı. Ayrıca BBSHK tümör hücre hattı olan SCCL-MT1 ile normal dokular; normal hücre hattı olan HEK-293 ile tümörlü dokular gen ekspresyonlarındaki kat artışları yönünden değerlendirildi. mRNA gen ekspresyon sonuçları, BBSHK'lerinde tümörlü dokularla normal dokular karşılaştırıldığında, tümör dokularında PDGFBB gen ekspresyonlarının arttığını, PTEN ekspresyonlarının ise azaldığını gösterdi (sırasıyla p=0,006, p>0,001,). Larinks ve dil dokuları ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise, PDGFBB gen ekspresyonu sadece larinks dokularında (p=0,002); PTEN gen ekspresyonu her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ((larinks dokuları p değeri=0,041; dil dokuları p değeri= 0,006). Hücre hatları ve dokular karşılaştırıldığında en anlamlı değişiklik tümör dokularında 15 kat azalma ile PTEN geninde oldu. Tümörlü grubun erken evre ile ileri evreleri arasındaki karşılaştırmasında, IGFBP-1'in mRNA gen ekspresyonu, istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,010). BBSHK'li hastaların cinsiyetleri ile mRNA gen ekspresyonları arasındaki ilişki araştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunmadı. mRNA gen ekspresyon analizlerini protein düzeyinde konfirme etmek amacıyla, protein düzeyleri ve en sık fosforillenen bölgelerinin fosfo-protein ekspresyon düzeyleri western blot yöntemiyle incelendi. Western blot analizleri sonucunda, BBSHK'lerinin tümörlü dokularda aşırı eksprese olan hücre yüzey reseptörleri EGFR, PDGFRB ve IGF-1R olarak belirlendi.

Çalışmanın bulguları, BBSHK'lerinde EGFR dışında, diğer hücre yüzey reseptörlerinin aşırı ifadesini göstermiştir. Böylece, BBSHK'lerinde aşırı eksprese hücre yüzey reseptörleri belirlenerek potansiyel sinyal yolağ(lar)ı tanımlanmıştır. Bu veriler birbirlerini destekleyici nitelikte olup, BBSHK'lerinin patogenezinde önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Baş-boyun skuamöz hücre karsinomaları; hücre yüzey reseptörleri; sinyal yolakları; sitokinler.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Evaluation of Cytokines and Certain Genes Take Part in Related Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Aysel Kalaycı Yiğin

Department of Medical Genetics

PhD THESIS / KONYA-2015

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a primer tumor type in head and neck cancers, characterized by aggressiveness, early recurrence and metastasis. While alcohol and smoking play an important role at pathogenesis of disease, deregulation of some signaling pathways and genes related to these pathways are considered as important at contribution of development of HNSCC. For this reason, the aim of the present work is to evaluate the cytokine based signalling pathways by defining the cytokines take part in the starting step of cell signal transduction and revealing mRNA and protein expression levels of the genes at pathway related to this cytokines.

In this study, an antibody array analysis was performed primarily to define the cytokine levels at serum samples in patients with HNSCC and healthy controls. As a result of antibody array analysis, an increase was observed at EGF, IGF-1, PDGFBB and IGFBP-1 cytokines compared to controls. Then, mRNA gene expression levels of cytokines and genes that were considered related to these cytokines have been examined with qRT-PCR. mRNA gene expression analysis of tumor-adjacent normal tissues, laryngeal tumor-adjacent normal tissues, tongue tumor-adjacent normal tissues have been compared in 16 HNSCC patients. Moreover, advance and early stages of these groups and gender parameters were compared. Additionally, normal tissues and SCCL-MT1that is a HNSCC tumor cell line and tumor tissues and HEK-293 that is a normal cell line were evaluated in terms of gene expression level increase. mRNA gene expression results demonstrated that PDGFBB expressions had been increased and PTEN expression levels had been decreased at HNSCC tumor tissues compared to normal tissues (respectively p=0,006, p>0,001). When laryngeal and tongue tissues were compared statistically as separate, only PTEN gene expression was found statistically significant at the both groups (laryngeal tissue p value = 0,041; tongue tissue p value = 0,006). PDGFBB gene expression was only found significant at laryngeal tissue group (p=0,002). In cell lines and tissue comparisons, most significant difference found at PTEN gene as 15 times decrease in tumor tissues. mRNA gene expression of IGFBP-1 was found statistically significant when compared the early stage to advanced stage tumor group (p=0,010). However, no significant difference was found statistically when the relationship between gender of HNSCC patients and mRNA gene expressions was investigated. Protein and phospho-protein expression levels of the frequently phosphorylated sites were investigated by using a western blot to confirm the expression of mRNA in the context of protein levels. As a result of western blot analysis; EGFR, PDGFRB and IGF-1R were detected as highly overexpressed cell surface receptors in tumor tissues of HNSCC.

The findings of this study revealed the overexpression of other cell surface receptors as well as EGFR in HNSCC. Thereby, potential pathways were identified by determining the cell surface receptors overexpressed in HNSCC. These data support each other and may be important in pathogenesis of HNSCC.

Key Words: Cell surface receptors; cytokines; head and neck squamose cell carcinoma; signal pathways.

1. GİRİŞ

Kanser, tüm Dünya'da çok sık görülen ve ölüm oranı oldukça yüksek bir hastalıktır. Dünya genelindeki ölümlerin sekizde birinden sorumludur (Garcia ve ark 2007). Tüm kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluşturan baş-boyun kanserleri (BBK) Dünya'da en yaygın görülen kanserler arasında altıncı sırada yer almaktadır. Baş-boyun kanserlerinin yaklaşık %90'ını baş-boyun skuamöz hücre karsinomaları (BBSHK) oluşturur ve en sık görüldüğü bölgeler oral kavite ve larinkstir. BBSHK'lerinden yılda yaklaşık olarak 600.000 kişi etkilenmekte ve bu hastaların 5 yıllık ortalama yaşam süreleri %40-50 arasında değişmektedir (Brockstein ve Masters 2003, Lefebvre 2005, Kamangar ve ark 2006, Jemal ve ark 2009).

BBSHK'leri için tanımlanmış risk faktörleri arasında gösterilen sigara, aşırı alkol kullanımı ve premalign lezyonlar tümör gelişimini arttırmaktadır. Bu risk faktörlerine ilaveten bazı virüslerle (Human Papilloma Virüs, Epstein–Barr Virüs gibi) infeksiyon ve genetik faktörlerin de hastalığın etiyolojisinde büyük önemi vardır (Kim ve ark 2007).

Genetik faktörler diğer epitel kaynaklı kanserlerde olduğu gibi BBSHK'lerinin patogenezinde de rol oynar. Bazı genomik değişikliklerin (p16, p53 ve Siklin D1 gibi gen değişiklikleri) BBSHK'lerinin patogenezinde önemli oldukları bilinse de, pek çok genin, bu genlerin bağlantılı olduğu sinyal yolaklarının ve ilgili sitokinlerin fonksiyonları halen bilinmemektedir. Sitokinler düşük moleküler ağırlıklı, immün sistemi düzenleyici proteinlerdir. Tek başlarına ya da birbirleriyle koordineli olarak sinyal yolaklarını tetikleyebilirler. Bu sinyal iletim yolaklarını tetiklemek için, hedef hücre membranları üzerinde özel reseptörlere bağlanırlar ve hedef hücrelerde gen ekspresyonlarına neden olurlar. Hücrelerin yaşam süreleri, çoğalmaları ve farklılaşmaları gibi pek çok hücresel aktivite, hücre-içi sinyal iletim yolaklarının kontrolünde sağlanmaktadır. Bu nedenle, hem sinyal iletim yolaklarını tetikleyen sitokinlerin hem de bunlarla ilişkili sinyal yolaklarının belirlenmesi BBSHK'lerinin moleküler patogenezinin belirlenmesinde önemli olacaktır.

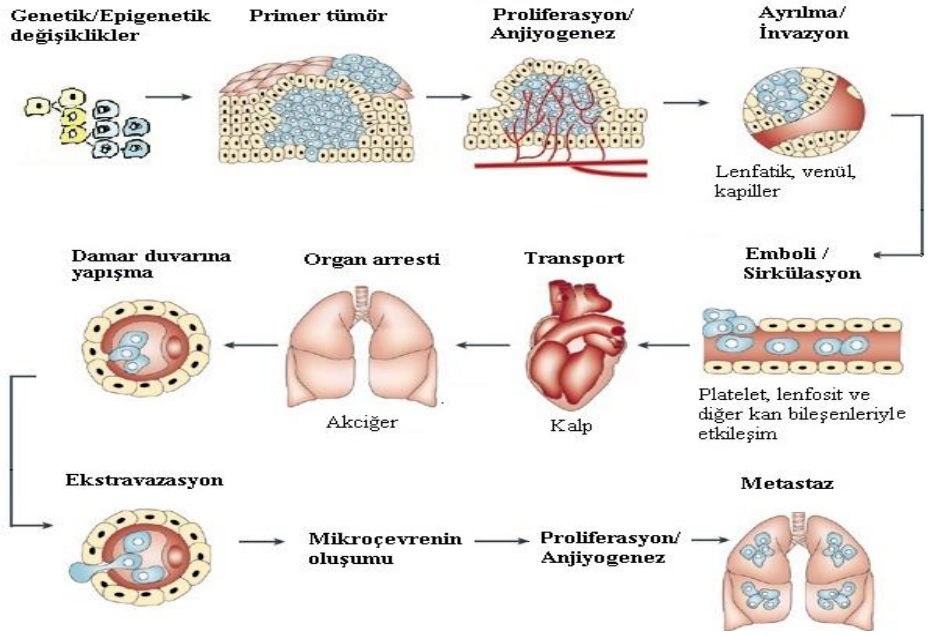
1.1. Karsinogenez

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve normal doku sınırlarını aşarak uzak organlara metastaz özelliği ile karakterize bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin çoğu, tek bir kök hücrenin anormal büyümesinden, birkaç tümör başlatıcı hücrenin kendini yenileme kapasitesi kazanmasından ya da klonal yayılımdan köken alır (Lobo ve ark 2007). Normal hücreler ise, sadece ihtiyaç duydukları zaman çoğalırlar. Normal hücrelerin bu ihtiyaçları büyümeyi tetikleyici ve inhibe edici faktörlerin hassas dengesinin sonucunda gerçekleşir.

Kanser hücreleri, kontrol mekanizmalarını geçersiz kılarlar ve hücrede çoğalma zamanlamaları için kendi belirledikleri programlarını izlerler. Bu hücreler, genellikle zaman içerisinde hücre ölümünden kaçarak sınırsız bir şekilde büyümeye devam ederler. Ölüm programları böylece ölümsüz hale gelir. Ayrıca yeni kan damarı oluşumunu güçlendirerek oksijen ve besin stoklarını artırırlar. Böylece bulundukları bölgeden göç yeteneği sayesinde komşu dokulara invazyon ve uzak bölgelere metastaz yaparlar. Hücresel davranışta kuralsız çoğalımdan tam kanserleşmeye doğru ilerleyen bu karsinogenez sürecindeki değişiklikler, genlerin genetik ve epigenetik değişikliklerinin birikiminin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Şekil 1.1).

Genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sürecinde kanser hücrelerinde meydana gelen genetik bozukluklar arasında nokta mutasyonları, gen delesyonları, amplifikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar ve tüm kromozom kayıpları vardır. Ayrıca, hipermetilasyon, asetilasyon ve genomik baskılanma (imprinting) gibi epigenetik mekanizmalarda kanserin gelişmesi ve ilerleyişinde merkezi rol oynar. Genellikle bu genetik değişikliklerin tümü onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri tarafından düzenlenir. Aktifleşen proto-onkogenler onkogenlere dönüşerek, çoğalmayı ve invazyonu ilerletirken; tümör baskılayıcı genler bu işlemleri çoğalmayı ve invazyonu baskılayarak negatif olarak düzenler. DNA tamir ya da stabilite genleri ise kanser hücresindeki genetik değişiklikleri minimuma indirerek hücrenin korunmasını ve genom bütünlüğünü sağlarlar (Friedberg 2003, Kinzler 2004). Karsinogenez sürecinde bu genlerin mutasyonlarla ve epigenetik

değişikliklerle aktivitelerini kaybetmeleri sonucu genellikle hücre döngüsünün kontrolü ve hücre sinyal iletimi bozulur (Esteller 2008).



Şekil 1.1 Karsinogenez sürecinde hücresel transformasyon (Fidler 2003).

Hücre döngüsünün kontrolünün ve hücre sinyal iletiminin bozulması sonucunda, kanser hücreleri normal hücrelere göre daha fazla bölünmeye başlar. Sonrasında hücre, sinyaller ve kontrol noktalarından bağımsız bir şekilde bölünmeye devam eder. Normal hücre bölünmesinde ise; mitozun sayısı, zamanlaması ve oranı hücre dışından gelen sinyal moleküllerine ve hücre içindeki transkripsiyon faktörlerine bağlı olarak belirlenir (Lewis 2012).

1.2. Hücre Sinyal İletimi

Hücrelerin kendi içinde ve hücreler arası iletişimde temel prensip, çevreden veya diğer bir hücreden alınan uyarının, özgül bir cevabı oluşturmak üzere hücre içi bileşenlere iletilmesidir. Bu olaylar sürecine sinyal iletimi denir. Sinyal iletimi oluşumunda meydana gelen aşamalar temelde şu şekilde sıralanmaktadır:

* Sinyal üreten hücre tarafından sinyal molekülünün sentezlenmesi,
* Sinyal üreten hücre tarafından sinyal molekülünün salınması,
* Sinyal molekülünün hedef hücreye taşınması,

* Sinyalin hedef hücrede özgül reseptör protein tarafından tutulması,
* Hücre içi sinyal transdüksiyon yolunu tetiklemesi,
* Hücre metabolizmasında veya gen ekspresyonunda değişiklikler (hücresel yanıt),
* Sinyalin durması, çoğunlukla hücresel yanıtın sonlandırılması

Çok hücreli organizmalarda, bilgi alış-verişini sağlayan yüzlerce farklı sinyal molekülü vardır. Bu moleküllerden bazıları hormonlar, proteinler, küçük peptidler, amino asitler, nükleotidler, bazı gazlar (NO, CO), lipit türevleri ve sitokinlerdir. Hedef hücreye ulaşan bu sinyal molekülleri bağlandığı reseptörlere göre iki yol izlerler. Birinci yol, direk hücreye giremeyen sinyal moleküllerinin hücrenin yüzey reseptörlerine bağlanması, ikinci yol ise sinyal molekülleri direk hücre içine girerek hücre içi reseptörlere bağlanmasıdır (Berg ve ark 2002).

1.2.1. Sitokinler ve Sitokinler Aracılığıyla Hücre Sinyal İletimi

Hücre sinyal iletimi genellikle sinyal moleküllerinin hücre yüzey reseptörlerine bağlanması yoluyla sağlanır. Sinyal moleküllerinden sitokinler hücreler arası iletişim yoluyla hücrelerin faaliyetlerini kontrol eden sinyal molekülleridir. Hücre yüzeyinde, özel reseptörlerine bağlanma ve hücre içi sinyal iletim yolaklarını tetikleme yoluyla birçok biyolojik fonksiyon gösterirler (Atanasova ve Whitty 2012).

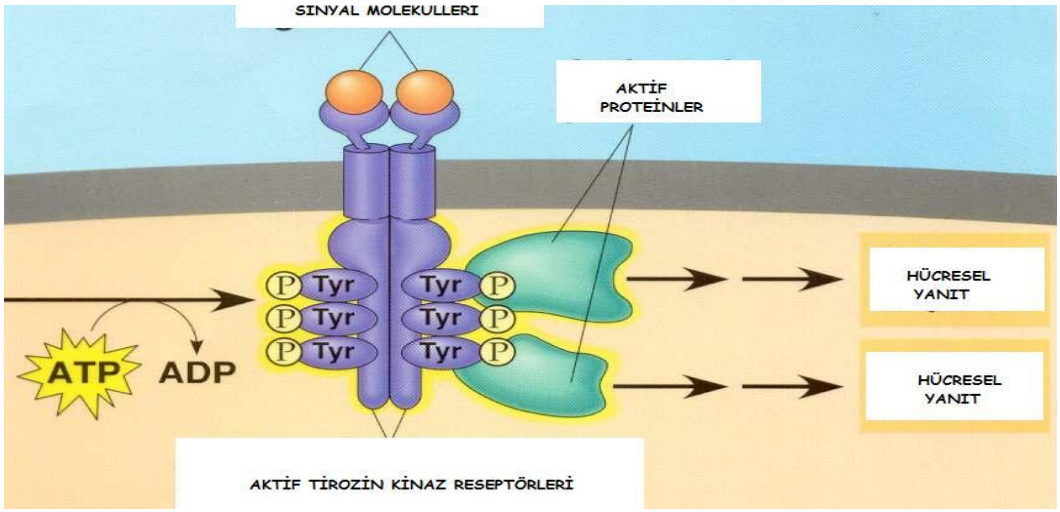
Sitokinler, çözünür protein ve glikoprotein yapısında olan, bağışıklık sisteminin önemli düzenleyicileri olarak görev yapan moleküllerdir. Sitokinler interlökinleri (IL), interferonları (IFN), büyüme faktörlerini (GF), koloni uyarıcı faktörleri (CSF), tümör nekrozis faktör ailesini (TNF) ve kemokinleri içeren geniş bir aileyi kapsar. Bu küçük sinyal molekülleri (<30 kDa), başta lökositler olmak üzere pek çok hücre tipi (örneğin, endotel hücreleri, epitel hücreleri, fibroblastlar) tarafından salgılanırlar. Yaralanma, infeksiyon, inflamasyon ve tümör gelişimi gibi durumlarda geçici olarak üretilirler. Otokrin, parakrin veya endokrin şekilde işlev görebilirler. Etkileri sistemik veya lokal olabilir.

Sitokinler hücre sinyal iletiminde görevli düzenleyici proteinler olduklarından, sitokinler tarafından iletilen sinyaller, üreme, hayatta kalma, immün sistem hücrelerinin homeostazı ve dış uyaranlara karşı immun yanıtın oluşturulması için gereklidir. İmmun sistem düzenleyicileri olarak doğal rollerinden dolayı sitokinlerin birçoğu infeksiyoz, inflamatuvar, otoimmün ve malign hastalıkların tedavisinde aday moleküller olarak tanımlanmıştır (Heldin 1995, Tonks ve Neel 1996, Hunter 2000, Vazquez-Lombardi ve ark 2013). Sitokinler, gelen uyarılara karşı cevap olarak çeşitli hücreler tarafından salgılanırlar ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Sitokinlerin reseptörleri iki ya da daha fazla tek geçişli transmembran proteinlerinden oluşur. Her bir sitokin reseptörü hücre dışında tek zar geçişli bir alan içerir. Bu alanda hücre yüzeyindeki sinyal molekülleri ile reseptörün aktivasyonu sitoplazmik bölümde biyolojik tepkimelerin olmasına neden olur. Sitokin reseptörlerinin sitoplazmik kısmı, hücre içi protein tirozin kinazlar ile kovalent olmayan bağla bağlantılıdırlar ve sitoplazmik bölgelerinin herhangi bir katalitik aktiviteleri yoktur. Bunun yerine, sinyal molekülleri bağlanması sonucunda aktive olan reseptör olmayan protein tirozin kinazlar ile etkileşime girerler. Sinyal moleküllerinin bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarır ve karşılıklı fosforillenme sonucunda, bağlantılı bulunduğu reseptör olmayan tirozin kinazların aktivasyonunu sağlar. Böylece aktif olan kinazlar reseptörü tirozin kalıntılarından fosforilleyerek, aşağı yöndeki sinyal iletimi molekülleri için fosfotirozin bağlanma bölgeleri oluştururlar (Stroud ve Wells 2004, Whitty ve Riera 2008, Posner ve Laporte 2010).

Büyüme faktörleri, biyolojik rolleri bakımından birbirlerine benzeseler de reseptörleri bakımından bazı farklılıklara sahiptir. Bu nedenle bazı literatürler ayrı bir grup olarak ele alırken, bazılarında ise sitokinler grubuna dahil edilen sinyal moleküllerindendir. Büyüme faktörü reseptörleri sitoplazmik kısımlarında kinaz bölgesine sahiptirler (Posner ve Laporte 2010). Bu reseptör kinaz bölgeleri tirozin bölgelerinde fosforilasyonda substrat yerleri için özeldir ve reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar) olarak adlandırılır. Eğer bu fosforilasyon bölgeleri tirozin yerine serin ya da treonin bölgeleri içeriyorsa bu durumda reseptör serin/treonin kinazlar olarak adlandırılır (Schlessinger ve Ullrich 1992, Graham ve Peng 2006, Lemmon ve Schlessinger 2010).

Reseptörler aracılığıyla moleküllere fosfat bağlanması veya koparılması sonucu oluşan fosforilasyon-defosforilasyon olayları, protein fosforilasyonu, protein kinaz ve protein fosfataz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu olaylar hücre içi sinyal iletiminde rol alan temel biyokimyasal olaylardır. Fosforillenmiş sitoplazmik tirozin kalıntıları aşağı yönde sinyal iletim molekülleri için yerleşme bölgeleri olarak hizmet verir. Tetiklenen sinyal yolakları siklin D1'in ekpresyonunu teşvik ederek hücre çoğalmasını ve yaşam süresini düzenler (Pawson ve ark 2002).

Fosforilasyon olaylarında görev alan RTK'lar (reseptör tirozin kinaz) pek çok polipeptid için yüksek afiniteli hücre yüzey reseptörleridir (Robinson ve ark 2000). Hücre membranına bağlı olarak bulunan RTK'lar; ekstraselüler sinyal molekülü bağlayıcı, transmembran ve intraselüler kısımlarından oluşur. Hücre dışındaki kısma sinyal moleküllerinin bağlanması, sitozoldeki kinaz bölgesini aktive eder. Aktivasyon sonucunda, sinyal molekülü bağlanmasıyla başlatılan sinyaller substrat proteinleri tirozin kalıntılarından fosforiller. Sinyal molekülü tarafından uyarılan reseptör dimerizasyona uğrar. Reseptörün dimerizasyonu dimerize polipeptid zincirlerinin birbirlerini karşılıklı fosforillemesi ile reseptörün otofosforilasyonuna yol açar. Bu otofosforilasyon ilk olarak, katalitik bölgedeki tirozinlerin fosforillenmesiyle protein kinaz aktivitesini artırır. Sonrasında ise, katalitik bölge dışındaki tirozin kalıntılarının fosforilasyonu, hücre dışı sinyalleri aktif reseptörden, aşağı yöndeki moleküllere iletecek ek proteinler için özgün bağlanma bölgeleri (domeyn) oluşturur. Bu bölgelerden sinyal moleküllerinin akışı, Src homoloji-2 (SH2) domeynleri ve fosfotirozin bağlanma bölgesi (PTB) boyunca gerçeklesir (Yarden ve Ullrich 1988, Ullrich ve Schlessinger 1990, Cooper ve Hausman 2006) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Reseptör tirozin kinaz yapısı. http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2002/tk02.jpg'ten uyarlanmıştır.

Kanser hücrelerinde tirozin kinaz aktivitesi sadece reseptör aktifleştiğinde meydana gelmez. Sinyal molekülü yokluğuna rağmen bir protein tarafından otofosforilasyon meydana gelebilir. Bu durumda, RTK aşırı eksprese olur ve hücre sinyalizasyonunun düzenlenmesi bozulur (Derynck ve ark 1987, Kaleko ve ark 1990).

Reseptör protein tirozin kinaz süper ailesinde 58 çeşit transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), fibroblast growth factor receptor (FGFR), nerve growth factor receptor (NGFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), insülin ve insülin-like GF reseptör (IGF-1) ve efrinler (EPH) en önemli transmembran proteinlerdir.

EGFR, v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog (ErbB) hücre reseptör ailesinin bir üyesidir. EGFR geni kromozom 7p12'de lokalizedir ve 170 kDa ağırlığında EGFR transmembran proteinini kodlar. ErbB reseptör ailesi EGFR'de Her-1, Her-2, Her-3 ve Her-4 reseptörleri bulunur. Bu reseptörler, intraselüler tirozin kinaz domeyni, hidrofobik transmembran segmenti ve ekstraselüler sinyal molekülü bağlama bölgesinden oluşur (Davies ve ark 1980). EGFR'nin sinyal molekülleriyle uyarılması sonucu reseptör dimerizasyonu, tirozin kinaz bölgesinin aktivasyonu ve sitoplazmik uçta tirozin kalıntılarının fosforilasyonu

meydana gelir. EGFR, epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)-alpha ve diğer düzenleyici proteinleri bağlar. EGFR'nin aktivasyonu birçok sinyal yolağını tetikleyerek güçlü mitojenik aktiviteye neden olurlar. Böylece normal hücre çoğalması ve farklılaşması sağlanır. EGFR ile ilişkili karsinogenez sürecinde ise EGFR'nin aşırı ekspresyonu ve tirozin kinaz reseptörünün sürekli aktive olması kanser hücrelerinin çoğalmasına ve metastaz yeteneği kazanmasına neden olur.

EGFR'nin aşırı aktivasyonu bazı kanserlerde kötü prognoz ve radyasyon terapisine direnç ile ilişkilidir. EGFR'yi bloklamak için kullanılan monoklonal antikorlar, ATP bağlayan yarığa girmek için ATP ile yarışan küçük moleküllerdir. Bunlar "tirozin kinaz inhibitörleri" (TKI) olarak adlandırılan reseptörün kinaz aktivitesini bloke edici ajanlardır. EGFR'nin bir monoklonal antikor ile bloke edilmesi, reseptördeki uyarının inhibe edilmesi anlamına gelir. Böylece, hücre çoğalması, anjiyogenez, invazyon ve metastazda azalma, apoptoziste ise artış görülür (Roskoski 2004).

VEGFR ailesi damar endotel hücrelerinin çoğalmasında görev yapan protein ailesidir. VEGF sinyalleri fizyolojik ve patolojik anjiyogenez ve lenfanjiyogenezde ve anti-kanser tedavilerin gelişmesinde hedef seçilen anahtar moleküllerdendir. Bu aileden VEGF-A ise solid tümör gelişmesinde yeni damarlanma için gerekli en önemli proteindir (Ferrara 2002).

FGFR ailesi FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4 olmak üzere dört üyeden oluşur. FGF'lerinde hücre çoğalması, göçü, farklılaşması ve düzenlenmesi gibi birçok değişik rolleri vardır. Özellikle doku onarımı ve yara iyileşmesinde görevli homeostatik faktörlerdir. FGFR'lerinde anormal ekspresyonlarının kanser patogenezinde önemi büyüktür (Ornitz ve Itoh 2001).

NGFR, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) ve NT-4/5 i kapsayan nörotropin ailesinin bir üyesidir. NGF'ler nöronların farklılaşma ve yaşam sürelerinin belirlenmesinde düzenleyici rol oynarlar. Nörotropin sinyal yolaklarının aktivitesinin bozulması pek çok kanser patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Huang ve Reichardt 2001, Kruttgen ve ark 2006).

PDGFR gen ailesinin üyeleri konnektif doku hücrelerinin çoğalmasını, yaşam süresini ve hareketini düzenler (Heldin ve Westermark 1999). PDGFR'nin aşırı ekspresyonu hücre çoğalmasının artışına neden olarak kanserleşme süreciyle bağlantı gösterir. Bu durum ya PDGFR'de oluşan bir mutasyona ya da otokrin PDGFR aktivasyonuna bağlı olarak gelişebilir (Pietras ve ark 2003).

IGF diğer adıyla somadomedin sistemi; 2 tane sinyal molekülü (IGF-I ve IGF-II), 6 tane yüksek afiniteli IGF bağlayıcı protein (IGFBP-1-6) ve 2 tane hücre yüzey reseptörlerinden (IGF-IR ve IGF-IIR reseptörleri) oluşur. IGF'ler karaciğerde üretilen ve büyüme hormonunun mitojenik etkilerinin ortaya çıkmasına aracı olan küçük peptidlerdir (Jones ve Clemmons 1995). İnsanlarda IGF mutasyonlarının büyüme geriliği, mikrosefali ve nöral gelişim bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir (Miller ve Yee 2005). Ayrıca yapılan çalışmalar onkojenik sinyal iletiminde IGFR' nin aşırı aktivasyonunun rol oynadığını göstermiştir. Bu hücre yüzey reseptörlerinin fosforillenmesi sonucunda aktif hale gelmesi bunların aşağı yönünde yer alan birçok sinyal yolağının da aktifleşmesine neden olur (Zhang ve ark 1997, Kaneda ve ark 2007).

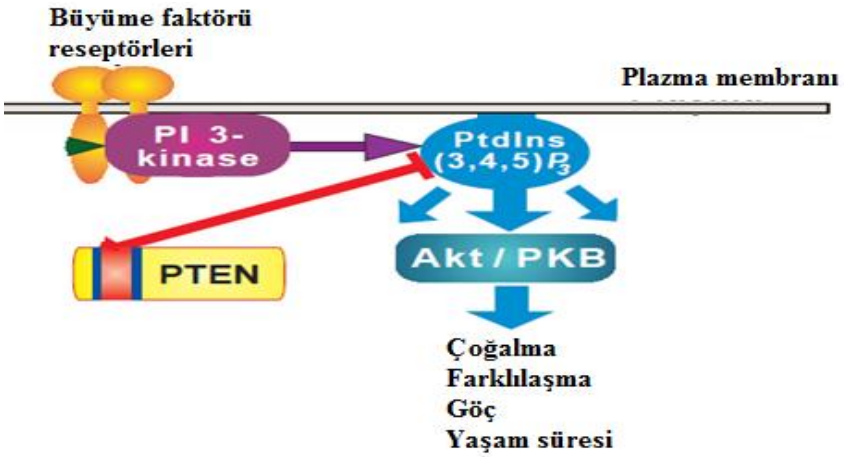
Hücre içinde hedef sinyal yolaklarını uyaran çoğu hücre yüzey reseptörü, aldıkları sinyalleri hücre yüzeyinden çok çeşitli hücre içi hedeflere iletir. Bu hedefler arasında cAMP ve cGMP yolakları, fosfolipaz C-Ca+2 yolağı, Ras, Raf ve MAP Kinaz yolağı, NF-kB transkripsiyon yolağını, Ca+2- kalmodülin, JAK-STAT yolağını ve PI3K/AKT yolakları yer alır (Cooper ve Hausman 2005, Kierszenbaum 2007).

Karsinogenez sürecinde hücrenin çoğalması, farklılaşması, büyümenin kontrolü ve yaşam süresi gibi biyolojik olayların normal fonksiyonlarını gösterememesi yer almaktadır. Bu nedenle kanserlerde ilk etkilenen mekanizma genellikle hücre içi sinyal iletim yolakları olmaktadır. Hücre içi sinyal yolaklarına gelen aşırı sinyal iletimi, uyarıya yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenlemek amacıyla nükleusu uyarabilir. Hücre içi sinyal iletimindeki merkezi rolünden dolayı Phosphatidylinositol-3 kinases/AKT (PI3K/AKT) yolağının pek çok kanser türüyle

ilişkili olduğu ve regülasyonunun bozulduğu bildirilmektedir (Malinowsky ve ark 2014, Fruman ve Rommel 2014).

1.2.2. PI3K/AKT Sinyal Yolağı

Hücre içi sinyal iletiminde, sinyalin iletimi genellikle sitoplazmik kinazları (serin, treonin kinazlar) tetikleyen RTK'lar tarafından yapılmaktadır. *PI3K/AKT* sinyal yolağı RTK aktivitesi gösteren, hücre içi sinyal yolaklarının merkezinde yer alan ve düzensizliği birçok kanser patogenezinde önemli olan bir yolaktır. *PI3K/AKT* yolağının yukarı ve aşağı yönünde rol alan genlerin pek çoğunun insan kanserlerinde yaygın olarak mutasyona uğradığı gösterilmiştir (Testa ve Bellacosa 2001, Kandasamy ve Srivastava 2002). Bu nedenle bu yolağın ve etkisinde olan genlerin inhibisyonu, potansiyel olarak tedavide önemli bir hedef haline gelmiştir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 PI3K/AKT sinyal yolağı (Yamada ve Araki 2001).

PI3K, bir düzenleyici (p85) ve bir katalitik (p110) olmak üzere iki alt üniteden oluşur (Luo ve ark 2003). PI3K tirozin kinaz reseptörlerinin hücre içi domeyndeki fosfotirozin kalıntılarına p85 ünitesinde bulunan SH2 domeynleri aracılığıyla bağlanır. PI3K ayrıca fosforilenmiş RTK'ların SH2 domeynlerindeki adaptör proteinler ya da direk Ras aracılığıyla p110 alt ünitenin aktivasyonuyla aktive olabilir.

Hücre membranında PI3K, lipid molekülü olan PIP-2 (phosphatidylinositol 4,5 biphosphate)'yi fosforilleyerek PIP-3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate)'e

dönüşmesini sağlar ve PDK1 (phosphatidylinositol-dependent kinase-1)'i harekete geçirir. PIP3, PDK1 ve AKT gibi plekstrin homoloji (PH) bölgesi ile proteinler için membrana yerleşmiş olarak fonksiyon görür. AKT bir serin/treonin kinazdır ve 3 formu (AKT1, AKT2 ve AKT3) vardır. PDK1, Ser473'ün otofosforilasyonuna neden olan Thr308 üzerindeki AKT'yi aktive eder. Sonra AKT hücre çoğalması ve yaşam süresi gibi hücresel süreçlerde görevli pek çok proteini fosforile eder (Luo ve ark 2003). PTEN (phosphatase and tensin homologue) ise PI3K/AKT yolağında AKT'nin aktivasyonunu fosforile olmasını engelleyerek negatif yönde düzenler. PIP3'ü defosforilasyon yoluyla PIP2'ye dönüştürür ve böylece PDK1'in hareketini dolayısıyla AKT'nin aktivasyonunu da engellemiş olur (Sun ve ark 1999, Cristofano ve Pandolfi 2000). Fosfolipid fosfataz aktivitesi sergileyen PTEN hücre büyümesi, yaşam süresi ve hareketi için önemli hücresel fonksiyonları düzenleme potansiyeline sahiptir (Myers ve ark 1998, Wu ve ark 1998). Bu nedenle kanser oluşum mekanizmasında *PI3K/PTEN/AKT* yolağı ile ilgili bilgilerin artması kanserin moleküler temelinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavilerin keşfine yardımcı olacaktır.

1.3. Baş-Boyun Kanserleri

Baş-Boyun Kanserleri (BBK), paranazal sinüsler, nasal kavite, farenks, nazofarenks, orofarenks, hipofarenks, oral kavite, dil, tükrük bezleri, larinks ve boynun üst kısımlarındaki lenf nodüllerinde oluşan kanserlerin tümüne verilen isimdir (Şekil 1.4). Baş-boyun malign tümörlerinin en sık görülen histolojik tipi skuamöz hücre karsinomalarıdır (BBSHK). Bu tümörler tüm malignant baş-boyun tümörlerinin %90'ından fazlasını oluşturur (Cann ve ark 1985).



Şekil 1.4 Baş-boyun kanseri bölgeleri. www.cancer.gov'dan uyarlanmıştır.

1.3.1. Baş-Boyun Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Baş-boyun kanserleri tüm kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluşturan ve Dünya'da en yaygın görülen kanserler arasında altıncı sırada yer alan kanser türüdür. Dünya'da her yıl 600 binden fazla yeni vaka teşhis edilmektedir (Parkin ve ark 2002, Jemal ve ark 2008). Yeni teşhis edilen vakaların %50'sinden fazlasında tam remisyon elde edilemediği ve yaklaşık %10'unda ise uzak organlara metastaz olduğu rapor edilmektedir (Brockstein ve Masters 2003, Ferlay ve ark 2010). Erken evre görülen vakalarda (evre I-II) cerrahi ve radyoterapi sonrasında genellikle iyi prognoz olmasına rağmen ileri evredeki (evre III-IV) vakaların üçte ikisi daha kötü prognozla ve ölümle sonuçlanmaktadır (Van Houtenve ark 2000).

Baş-boyun kanserleri genellikle ileri yaşlarda (50-70 yaş) görülür, ancak nadir de olsa çocuklarda da görülebilmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenir. Bazı BBK tipleri bölgesel farklılıklar gösterir. Örneğin; nazofarengeal kanserler, Uzak Doğu ülkelerinde diğer bölgelere oranla daha sık gözlenmektedir (Wannenmacher ve ark 2006).

BBK'lerinin gelişiminde temel risk faktörlerinden biri sigara kullanımıdır. Bu risk, sigara kullanımının fazlalığına bağlı olarak artmaktadır. Kişi sigara kullanımını

bıraktığı anda kanser gelişme riskini de azaltmış olur (Schlecht ve ark 1999). Tütün dumanına çevresel maruz kalan kişilerde aktif olarak hiç sigara içmemiş olsalar dahi, BBK gelişme riskinin arttığı gösterilmektedir (Zhang ve ark 2000). Bu artan risk nitrosamin ve polisiklik hidrokarbonlar gibi karsinojenlerin genotoksik etkilerine bağlı olarak ortaya çıkar. BBK'lerinde sigara içen kişilerde TP53 mutasyonları da sigara içmeyenlere göre daha sıklıkla görülmektedir (Ronchetti ve ark 2004).

Ağır alkol kullanımı da BBK'lerinin etiyolojisinde rol alır. Alkol doğrudan bir kanserojen değildir ancak DNA sentezinde ve onarımında DNA'ya katılan asetaldehit formu etkilidir (Pai ve Westra 2009).

Asya ülkelerinde bölgeye özgü olan fındık benzeri bir yemişin (betel nut) çiğnenmesi özellikle oral kanserlerin etiyolojisinde yer alır. Betel nut çiğnemenin bağımlılık yapıcı etkisi bulunmaktadır. Bunun yanısıra bileşiminde kanserojen maddeler bulunduğu için oral kanserlerde risk oluşturduğu bildirilmektedir (Yen ve ark 2008).

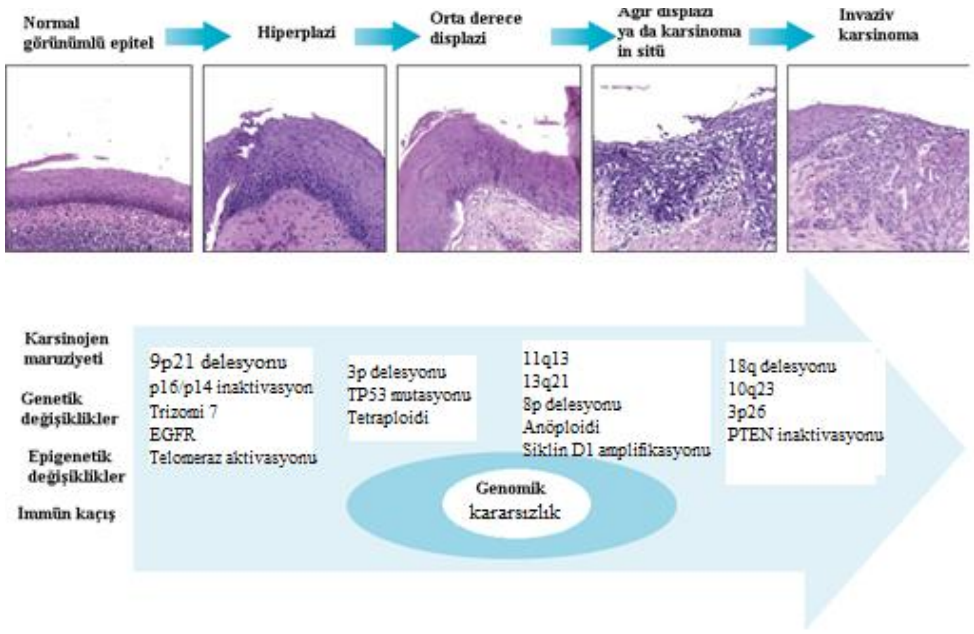
BBK'lerinin özellikle orofarenks ve oral kavite kanserlerinin etiyolojisinde yaygın olan bir diğer risk faktörü de human papillomavirustür (HPV, özellikle HPV-16 ve 18). HPV-pozitif BBK'lerinin büyük çoğunluğu lingual tonsillerin kriptalarında ve palatin tonsillerinde lokalize olmuştur (Smith ve ark 2004).

BBK' lerinin gelişiminde alkol, sigara kullanımı, betel nut çiğnemek ve HPV ile infeksiyonların rol oynadığı bilinmesine rağmen; hala bu kanser tipinin malign ilerleyişinin altında yatan moleküler mekanizma hakkında bilgiler yetersizdir (Forastiere ve ark 2001, Bagan ve Scully 2008).

1.3.2. Baş-Boyun Kanserlerinin Patogenezi

BBK'lerinin gelişimini kontrol eden olaylar onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ya da her ikisinin birlikte bozulduğu genetik ve epigenetik olaylardır. BBK'leri için belirlenen kanserin ilerleme modeli Şekil 1.5'te gösterilmiştir. Modele göre premalign lezyonlardan karsinoma insitüye kadar geçen

sürede meydana gelen değişiklikler şu şekilde olmaktadır. Premalign lezyonların yaklaşık %90'ında genomda inaktif olan telomeraz enziminin yeniden aktivasyonu ve %70-80'inde kromozom 9p21'in kaybı görülmektedir (Mao ve ark 1996, McCaul ve ark 2002). Ayrıca *p16* geninde homozigot delesyon, nokta mutasyonu ya da promotör hipermetilasyonundan kaynaklanan inaktivasyon, kromozom 17p'de heterozigozite kaybı ve *TP53* nokta mutasyonları da yine BBK'lerinin erken döneminde görülen değişikliklerdir (Rocco ve ark 2001, Balz 2003).



Şekil 1.5 Baş-boyun karsinogenezinde moleküler değişikliklerin birikimi ve fenotipik ilerleme modeli (Argiris ve ark 2008).

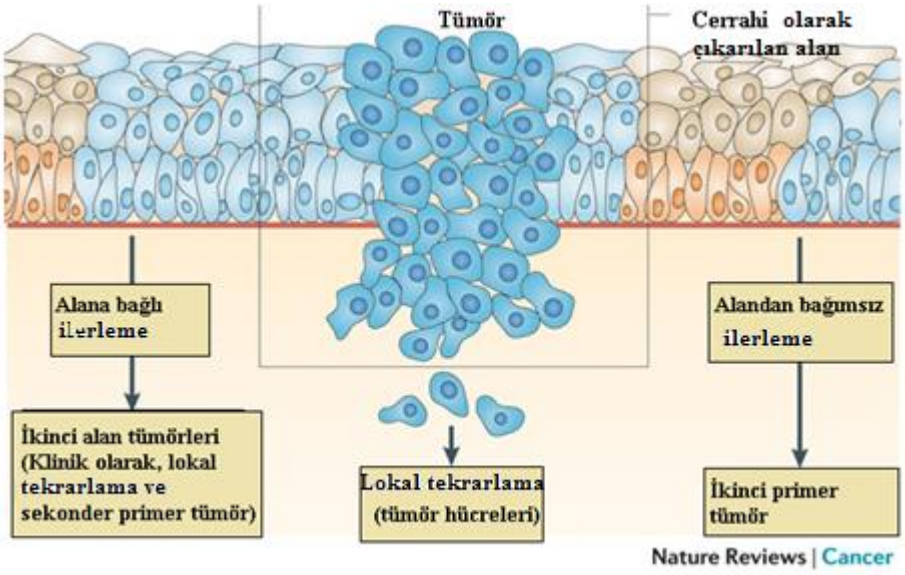
BBK'lerinin ağır displazi ve invaziv karsinoma aşamalarında ise kromozom 11q13 amplifikasyonu, siklin D1'in aşırı ekspresyonu, kromozom 8p ve kromozom 18q delesyonu, *EGFR* aşırı ekspresyonu ve kromozom 10q23'te bulunan *PTEN* geni delesyonu ve mutasyonları agresif tümör davranışıyla korele gelişir (Pignataro ve ark 1998, Squarize ve ark 2013).

1.3.3. Baş-Boyun Kanserlerinde Alan Kanserizasyonu (Field cancerization)

Baş-boyun kanserlerinin patogenezinin anlaşılmasında ve tanı-tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde "alan kanserizasyonu" (field cancerization) önemli bir kavramdır. Bu kavram 1953 yılında Slaugher ve ark (1953) tarafından önerilmiştir. Alan kanserizasyonu kavramına göre BBK'lerinin tedavisinden sonra

büyük olasılıkla lokal tekrarlama ve baş-boyun mukozasında pek çok bağımsız tümör gelişebilmektedir. Slaughter ve arkadaşlarının (1953) oral kanserlerde yaptıkları çalışma sonucunda, lokal olarak tekrar eden ve çoklu primer gelişen tümörleri çevreleyen dokuların çevresindeki displastik değişikliklerin birbirleriyle bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir.

BBK'leri için skuamöz epitelin morfolojik değişikliklerinin incelenmesi sonucunda 1996 yılında ilk genetik çok aşamalı ilerleme (multi-step ilerleme) modeli ortaya atılmıştır (Califano ve ark 1996). Bu modele göre displazi aşamasında kromozom 3p, 9p ve 17p' de heterozigozite kaybı görülmektedir. Kromozom 3p, 9p ve 17p'de görülen heterozigozite kaybı ise erken karsinogenez anlamına gelmektedir. Tipik karsinomalarda ise kromozom 4q, 11q ve kromozom 8'de çeşitli kromozomal değişiklikler gözlenmektedir. Bu durum ise muhtemelen karsinogenezin son evrelerine karşılık gelmektedir. *TP53* mutasyonları ile birlikte bu genetik belirteçler kullanılarak yapılan analizde ise oral ve orofaringeal tümörlerinin en az %35'inde, karsinoma genetik değişiklikler içeren mukozal epitel ile çevrili olduğu bildirilmiştir (Tabor ve ark 2001). Tabor ve arkadaşları (2001) gözlemledikleri epitellerin makroskopik olarak normal görünümde ancak histolojik olarak displazik olabileceğini belirtmişlerdir. Genetik değişikliklerle karakterize bu tümöre komşu mukozal epitel dokular ilk çalışmalarda ''alan (field)'' olarak isimlendirilmiştir (Slaugher ve ark 1953, Hittelman 2001). Bu alanlar genellikle hastalardan tümör çıkarıldığında cerrahi sınırlarında kalan kısımlardır (Tabor ve ark 2001). Retrospektif çalışmalar göstermektedir ki; BBK'li hastaların tedavisinde çıkarılamayan bu alanlar lokal tekrarların ve ikincil primer tümörlerin gelişmesinde önemli bir kaynaktır (Tabor ve ark 2004). BBK'nin patogenezinde rol alan alan kanserizasyonu şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6 Alan kanserizasyonu ve nüksetme türleri arasındaki ilişki. www.nature.com/nrc/journal/v11/n1/fig_tab/nrc2982_F3.html'den uyarlanmıştır.

1.3.4. Baş-Boyun Kanserlerinde Sinyal Yolaklarındaki Değişiklikler

BBK'lerinde en çok çalışılan sinyal yolaklarından biri Erbb ailesi reseptör tirozin kinazlardır. EGFR, skuamöz hücrelerde ve Ras/MAPK, PI3K/PTEN/AKT ve fosfolipaz C yolaklarında kritik öneme sahiptir (Hynes ve Lane 2005). EGF-bağlı EGFR çekirdeğe transloke olur ve fonksiyonlarını bir transkripsiyon faktörü ya da diğer transkripsiyon faktörleriyle onların ko-aktivatörü olarak gösterir (Lin ve ark 2001).

BBK'lerinde EGFR'nin artmış ekspresyonu ilk kez 1986 yılında Ozanne ve arkadaşları tarafından bildirildi (Ozanne ve ark 1986). Daha sonraki yıllarda yapılan EGFR ekspresyon çalışmaları genellikle geniş varyasyonlara sahip antikor ve antijen-geri alma protokollerine dayanan -bazen kontrolleri olmayan- immuno boyama çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu nedenle rapor edilen aşırı ekspresyon aralıkları oldukça büyük varyasyonlar göstermektedir. Ayrıca EGFR aşırı ekspresyonuna sahip BBK'lerinin küçük bir kısmında aktif bir otokrin döngüsü sonucu EGFR reseptörünün çapraz-fosforilasyonu da meydana gelmektedir (Grandis ve Tweardy 1993, Hama ve ark 2009). EGFR'de farklı proteinlerle etkileşen ve aşağı yönde etkilediği pek çok tirozin fosforilasyon bölgesi vardır (Morandell ve ark

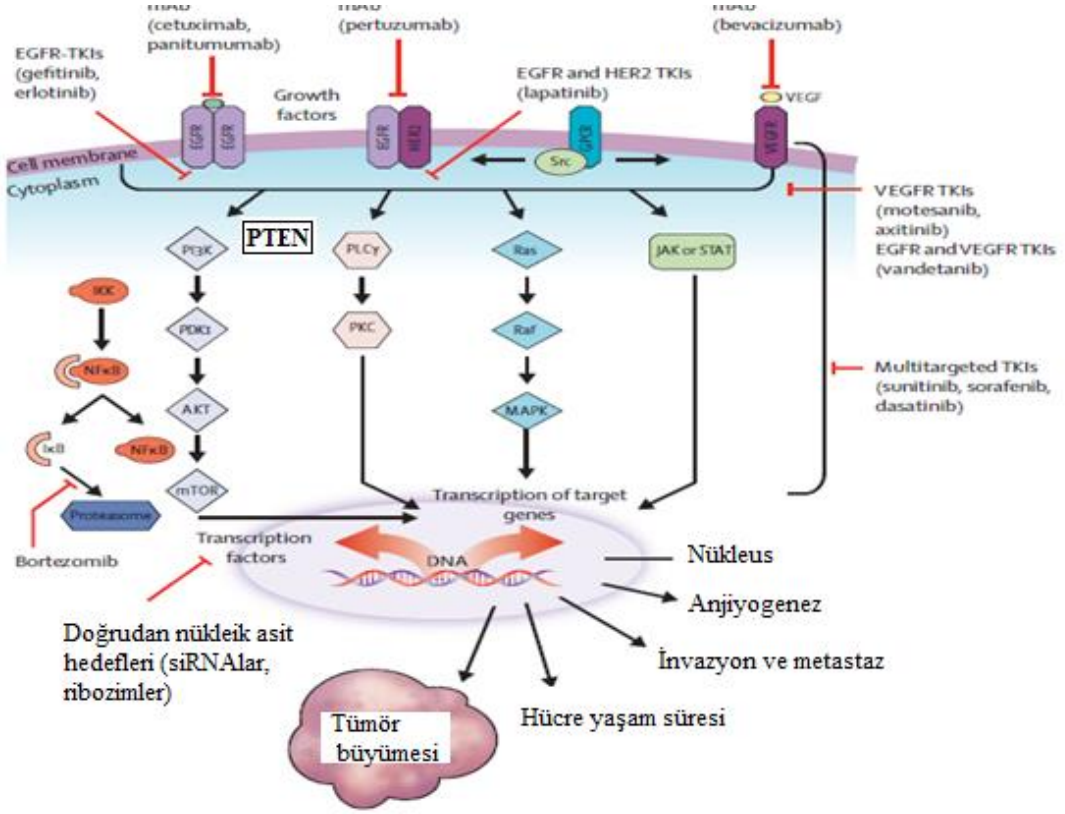
2006). Bu nedenle, BBK'lerinde, EGFR'nin diğer hücre yüzey reseptörleriyle olan etkileşimleri ve onların aşağı yönünde bulunan sinyal yolaklarındaki rolleri hàla tam olarak bilinmemektedir.

1.3.5. Baş-Boyun Kanserlerinin Tedavisi

Kolorektal, serviks ve meme gibi birçok kanser türünün önlenmesi ve tedavisinde gelişmeler olmasına rağmen BBK'leri için teşhisten sonra sağkalım oranı düşük kalmaktadır (Jemal ve ark 2008). BBK'lerinin sağkalım oranındaki düşüklük genellikle hastaların ileri evrede teşhis edilmesinden kaynaklanmaktadır. Erken evrede (Evre I, II) teşhis edilen BBK'li hastalar primer tümörün bulunduğu bölgeye göre cerrahi ya da radyoterapi ile tedavi edilirler. Erken evre teşhis edilen bu hastalar için cerrahi ya da radyoterapi ile tedavi sonrası %90'a kadar olumlu sonuçlar rapor edilmektedir (Le ve ark 1997, Ataman ve ark 2006). Ancak BBK'li hastaların üçte ikisi lokal ileri evredeyken (evre III-IV) teşhis edilirler ve bu hastaların yaşam süreleri erken evreye göre önemli ölçüde daha düşüktür. İleri evre hastalarda tedavi seçenekleri cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ya da eşzamanlı kemoradyoterapidir.

Hedef tedaviler kanser tedavilerinde ilgi çekici ve gelecek vaat eden yeni bir alandır. İlaç endüstrisi, sitokin reseptörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve onların aşağı yönünde etkilediği molekülleri hedef alan tedavi edici ajanlar üretmeye başlamıştır. Şekil 1.7'de hedef alınan bu yolaklar ve bileşenleri gösterilmiştir.

BBK'lerinde klinik olarak onaylanan bir monoklonal antikor olan Cetuximab (C225, Erbitux®), EGFR'nin sinyal molekülü bağlanma yerine bağlanarak aşağı yöndeki sinyalleri inhibe eder. Yapılan çok merkezli bir çalışmada radyoterapiyle birlikte yapılan Cetuximab kombine tedavilerin tek başına radyoterapi uygulamasına göre yaşam süresini arttığı gösterilmiştir (Bonner ve ark 2006).



Şekil 1.7. BBK'lerinin tedavisi için moleküler sinyal yolakları ve yeni hedef ajanlar (Argiris ve ark 2008'den uyarlanmıştır).

1.4. Projenin Amacı

BBK'li hastalarda, farklı tedavi seçenekleri mevcut olmasına rağmen hastaların yaklaşık %50'sinde lokal ya da uzak bölgede tümör tekrar gelişebilmektedir. Geçtiğimiz on yıl boyunca bu rakamlar değişmeden kalmıştır (Tabor ve ark 2004, Murar ve ark 2008). Bu sebeple, hastalığın altında yatan patolojik değişimler ve uygulanan Cetuximab gibi ilaçlara karşı direnç tam olarak çözümlenememiştir. Tedavi sürecinde karşılaşılan zorluklar arasında, EGFR'nin tam olarak bloke edilememesi yer alır. Ayrıca PTEN/PI3K/AKT yolağı da pek çok tümör tipinde geleneksel tedavilere direnç gösteren önemli bir sinyal yolağıdır (Berns ve ark 2007, Han ve ark 2007). Bu durumda, EGFR dışındaki diğer hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ile başlayan ve bunların hücre içi sinyal yolaklarını aktifleştirmesiyle devam eden süreçler rol oynayabileceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle bu yolaklara ilave olarak;

1) Öncelikle BBK'lerine ait tümörlü ve normal dokularda ve pozitif kontrol tümör (SCCL-MT1) ve kontrol HEK-293 hatlarında hücre sinyal iletiminin ilk basamağında yer alan sitokinlerin belirlenmesi,

2) Bu sitokinlerle ilgili yolakta yer alan genlerin ekspresyonlarının mRNA ve protein seviyesinde ortaya konarak sitokin temelli sinyal yolağının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınmıştır (Ek-A). Çalışmada kullanılan hasta örnekleri ise Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalından temin edilmiş ve hastaların bilgilendirilmiş onamları alınmıştır (Ek-B).

Çalışma kapsamına baş-boyun skuamöz hücre karsinoması tanısı alan 16 hasta ve herhangi bir hastalık öyküsü olmayan 4 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Baş-boyun skuamöz hücre kanserli (BBSHK) hastaların tümörlü, normal ve ayrıca kan dokusu kullanılmıştır. Baş-boyun skuamöz hücre karsinomlarındaki mRNA ekspresyonunun tespiti için cerrahi müdahale sonrası temin edilen larinks ve dil dokuları RNA ve protein izolasyonu için ikiye ayrıldı ve çalışma zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak skuamöz hücre hattı olan SCCL-MT1, negatif kontrol ise HEK-293 hücre hattı kullanılmıştır. Pozitif kontrol skuamöz hücre hattı olan SCCL-MT1, University of Southern California (Los Angeles, CA, USA)'dan ve negatif kontrol insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK-293 ise American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiştir.

2.1. Antikor Sıra Analizi

Baş-boyun skuamöz hücre kanserlerinde, hücre sinyal iletiminde düzenleyici moleküller olan sitokinlerinden etkili sitokinleri ortaya koymak için antikor sıra analizi yapıldı. Antikor sıra analizi için Ray-Biotech (Human Cytokine Array C5) ticari kiti kullanıldı. Sitokin seviyelerinin genel bir değerlendirmesini yapmak amacıyla baş-boyun skuamöz hücre karsinoma tanısı almış 12 hastadan (6 erken evre, 6 ileri evre) ve 4 kontrol bireyden ayırıcı jel içeren tüplere 5'er cc venöz kan alındı. Kan örnekleri 3000 rpm de 10 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Kit içerisinden sağlanan kasetteki sekiz adet bölmeye her bir membran '_' işareti köşeye gelecek şekilde yerleştirildi. Kaset kenarından 2'şer ml bloklama tamponu eklendi ve oda ısısında 30 dk. karıştırıcı da inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bloklama tamponu döküldü ve yerine serum örneklerinden 1'er ml eklendi. +4°C de karıştırıcıda 1 gece inkübe edildi. Süre sonunda serum örnekleri dökülerek 2'şer ml

yıkama tamponu I eklendi ve 5 dk. karıştırıcı da çalkalandı. Süre sonunda yine aynı şekilde döküldü ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Aynı işlem 2'şer ml yıkama tamponu II eklenerek 2 kez tekrarlandı. Her bir membrana biotin-konjuge edilmiş antikorlardan 1'er ml eklendi ve karıştırıcıda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası antikorlar döküldü ve yıkama tamponlarıyla uygulanan işlemler tekrarlandı. Temiz bir tüp içerisine 1998 µl 1x bloklama tamponu ve 2 µl HRP (Horseradish peroxidase) -konjuge streptavidin eklendi (1/1000 HRP- konjuge streptavidin karışımı). Bu karışımdan her bir membrana 2'şer ml ilave edildi ve 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışım döküldü ve yıkama tamponlarıyla uygulanan işlemler tekrarlandı. Temiz bir tüp içerisinde 250 µl geliştirme tamponu C ve 250 µl geliştirme tampon D karışımı hazırlandı. Membranların üzeri geliştirme tamponu ile kaplandı ve oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildi. Süre sonunda geliştirme karışımı, kenarlarından kurutma kâğıdı yardımıyla alındı. Kemoluminesans görüntüleme sistemi (Kodak X-Omat AR film) ile görüntüleme yapıldı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.2. SCCL-MT1 ve HEK-293 Hücrelerinin Kültürü ve Dondurulması

Çalışmaya dâhil edilen baş-boyun skuamöz kanserine ait hücre hattı SCCL-MT1 ve kontrol olarak seçilen HEK-293 hücre hattının kültürleri literatürde (Liebertz ve ark 2010) belirtilen şekilde yapıldı. Kültüre edilen hücreler hücre flask yoğunluğu %80-90'a ulaştığında tripsin-EDTA ile kaldırılarak 10ml'lik tüplere (Cellstar) kondu. 1500 RPM'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst faz atıldı. Kalan hücre pelleti üzerine 1 ml hücre dondurma besiyeri eklendi ve yaklaşık 5 x 10^6/ml hücre, 3 kriyo tüpe (Thermo, USA) aktarıldı. Daha sonra kriyo tüpler -80°C'ye kaldırıldı. -80°C'ye konulduktan 48 saat sonra sıvı azota aktarıldı. Dondurma besiyeri: 13 ml besiyeri içerisine 5 ml fetal calf serumu ve %10 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) eklenerek hazırlandı.

2.3. Gen ekspresyon analizleri

Gen ekspresyon analizleri mRNA ve protein seviyesinde gerçekleştirildi.

2.3.1. mRNA ekspresyon analizleri

Sitokin ile uyarıldığı düşünülen hedeflenen genlerin ekspresyon seviyelerini ortaya koymak icin hasta materyalinden ve kontrol hücre hatlarından total RNA'lar izole edildi ve deneylere geçmeden önce housekeeping gen tespit çalışması yapıldı. Bunun için her deney basamağı optimize edildi.

Doku ve Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu: Baş-boyun skuamöz hücre karsinoması tanısı almış 16 hastanın tümörlü dokuları ve komşu normal dokuları; ayrıca BBSHK pozitif kontrol hücre hattı SCCL-MT1 ve negatif kontrol hücre hattı olan HEK-293'den total RNA eldesi için ayrıldı. Total RNA eldesi için ayrılan dokuların izolasyonları Trizol (Ambion, ABD) yöntemi ile yapıldı. 50 mg ağırlığındaki doku örnekleri üzerine 1 er ml Trizol eklendi ve hücreler sonikasyon ile homojenize edildi. Hücre kültürleri için ise; T25 hücre flaskı %80-90 yoğunluğa geldiğinde (yaklaşık olarak $1x10^6$ hücre) hücre pelleti üzeri 3 ml HBSS (Gibco) karışımı eklenerek hücreler yıkandı. Bu aşamadan sonra sonra üst faz atılarak flaska 1 ml Trizol eklenerek hücreler kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 1,5 ml'lik tüplere aktarılarılarak 1 dk. boyunca vortekslendi. Daha sonra 10 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamadan sonra solid doku ve hücre kültürü örneklerine üretici firmanın protokolü kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için, her bir örneğe 200 µl kloroform (Sigma) eklendi ve 30-45 sn vorteks veya pipetaj yapıldı. Hücreler 5 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra daha önceden +4° C'ye kadar soğutulmuş 12.000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan temiz sıvı kısım yeni bir tüpe alındı ve üzerine 0,5 ml 2-propanol (Sigma) eklendi. Bu aşamadan sonra örnekler 20 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra yine +4° C'ye soğultulmuş santrifüjde 12.000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Pellet %75'lik etanol (Sigma) ile yıkandı ve tekrar soğutulmuş santrifüjde 5 dk. santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra pellet kurumaya bırakıldı. Pellet kuruduktan sonra distile suyla pelletin büyüklüğüne bağlı olarak distile suyla sulandırıldı. Elde edilen tüm RNA örnekleri, olası genomik DNA kontaminasyondan temizlemek için, RNAse-olmayan DNAse I enzimi (Fermentas) ile 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Sonrasında metal bağımlı enzimatik reaksiyonların sona ermesi için yine her bir tüpe 1'er µl 0,5 M EDTA (Fermentas) ilave edildi. 65°C'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı. RNA izolasyonundan sonra her bir örnek için 260 ve

280 nm UV. Spektrofotometre (NanoDrop, Thermo Scientific) ile RNA miktarı ve kalitesi ölçüldü. Miktar tayini yapılan RNA'lar agaroz jelde (%1) elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak UV kaynağı altında gözlemlendi. Elde edilen tüm RNA örnekleri 6X loading dye ile birlikte %1 agarose jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak UV altında gözlemlendi.

cDNA Eldesi ve Optimizasyonu: Elde edilen tüm RNA örneklerinin cDNA (komplementer DNA) sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (Roche) ve üretici firmanın protokolü kullanıldı. Sentezlenen cDNA örnekleri ile Çizelge 2.1'de verilen primerlerin kontrolleri polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) ile test edildi. PZR protokolü olarak bir reaksiyonunda 1x Mg^{++} olmayan PCR tamponu (Fermentas), 200 µM dNTP (Fermentas), 1,5 mM $MgCl^{++}$, 0,375 ünite *Taq* polimeraz (Fermentas), 5 pmol her bir primer çifti ve 2 µl cDNAtemplate olarak kullanıldı. Her bir PZR reaksiyonu toplam 15 µl hacimde hazırlandı. Polimeraz zincir reaksiyonları, thermal cycler cihazında (BioRad, MyCycler) touchdown PZR profili (Don ve ark 1991) kullanılarak iki aşamada gerçekleştirildi. 95°C'de 4 dakika ile tam bir denatürasyon sağlandıktan sonra I. aşamada 16 döngü için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, primerlerin ideal bağlanma noktasının sağlanması için 60°C'den başlayarak her bir döngüde 0,5 °C düşürülen ve 30 saniye süren bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama sağlandı. II. aşamada 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzama olacak şekilde toplam 25 döngü kullanıldı. Son olarak örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak tam bir adenilizasyona olanak sağlandı. PZR ürünleri 6X loading dye ile birlikte %2 Agaroz jelde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp EtBr ile boyanarak UV kaynağı altında gözlemlendi.

Housekeeping Gen Seçimi ve Optimizasyonu: Baş-boyun kanserlerinde hedeflenen genlerin ekspresyon seviyelerinin ölçümünde kullanılacak uygun housekeeping geni seçmek için, en sık tercih edilen 7 ayrı housekeeping genin tümör ve normal dokularda ve hücre hatlarında ekspresyon düzeylerine kantitatif olarak (qRT-PZR) bakıldı. Çalışmada, housekeeping gen olarak 18S rRNA (18S), 28S rRNA (28S), actin beta (ACTB), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH), tubulin alpha 1 (TUBA1), tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (YWHAZ) ve succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA) kullanıldı. Kullanılan primer dizilerine ait bilgiler Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Housekeeping gen çalışması yapılırken öncelikle elde edilen tüm cDNA'lardan 5'er µl alınarak bir cDNA havuzu oluşturuldu. Daha sonra 1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranlarında seri dilusyonlar hazırlanarak tüm genlerin primer etkinliği belirlendi. Kullanılan qRT-PZR protokolü; 2XSYBR yeşili reaksiyon tamponu 7,5 µl, primer karışımı 0,15 µl (5pmol), cDNA (1/100 sulandırılmış) 3 µl ve dH_2O 4,35 µl'den toplam 15 µl olacak şekilde oluşturuldu. qRT-PZR reaksiyonları, real time-PZR cihazı (Roche 480 II) kullanılarak gerçekleştirildi. 95 °C'de 10 dakika ile tam bir denatürasyon sağlandıktan sonra her döngüde optikal okuma yapılan 45 döngü için 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, primerlerin ideal bağlanma noktasının sağlanması için 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 60 saniye uzama sağlandı. Sonrasında 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye bağlanma ve 72 °C'de 30 saniye uzama sağlandı. Son olarak örnekler 60°C'den 95°C'ye her 0,2°C'de optikal okuma yapan 1 erime ısısı döngüsü şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler uygun housekeeping gen seçimine bağlı şekilde, normalizasyonları yapılarak $2^{-\Delta Ct}$ metodu (Livak ve Schmittgen 2001) kullanılarak analiz edildi.

Hedef Genlerin mRNA Ekspresyonun Optimizasyonu ve Analizi: Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, antikor sıra analizi sonrasında 2 kat ve üzeri çıkan sitokinlerle, ilgili yolaklarda rol alan bazı genlerin (EGFR, PDGFBB, IGFBP1, PTEN ve AKT) tümör dokuları ile normal dokuları arasındaki mRNA ekspresyon seviyeleri, kontrol hücre hatları da dahil edilerek araştırıldı. Housekeeping gen çalışmasında olduğu gibi yine oluşturulan cDNA havuzundan 1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranlarında seri dilusyonlar hazırlandı ve genlerin primer etkinliği belirlendi. Aynı qRT-PZR protokolü uygulanarak primer bilgileri Çizelge 2.1'de verilen EGFR, PDGFBB, IGFBP1, PTEN ve AKT genlerinin mRNA ekspresyonlarının optimizasyonları yapıldı. Elde edilen veriler GAPDH housekeeping geni ile normalize edilerek $2^{-\Delta Ct}$ metodu ile analiz edildi.

Çizelge 2.1 qRT-PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler.

Lokus	Dizi	PZR Ürün (bp)	Referans
18S	F: 5'- ATGCGGCGGCGTTATTCC-3'	204	Zhang ve ark 2009
	R: 5'- GCTATCAATCTGTCAATCCTGTCC-3'		
28S	F: 5'- CGGGTAAACGGCGGGAGTAAC-3'	109	Zhang ve ark 2009
	R: 5'- TAGGTAGGGACAGTGGGAATCTCG-3'		
ACTB	F: 5'- TGGCTGGGGTGTTGAAGGTCT -3'	238	Lallemant ve ark 2009
	R: 5'-AGCACGGCATCGTCACCAACT-3'		
GAPDH	F: 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3'	341	Boerboom ve ark 2004
	R: 5'- GTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3'		
TUBA1	F: 5'- GCCCTACAACTCCATCCTGA-3'	78	Bogaert ve ark 2006
	R: 5'- ATGGCTTCATTGTCCACCA-3'		
YWHAZ	F: 5'-ATGCAACCAACACATCCTATC -3'	178	Erkens ve ark 2006
	R: 5'- GCATTATTAGCGTGCTGTCTT-3'		
SDHA	F: 5'- AACCGAAGATGGCAAGA -3'	191	Lallemant ve ark 2009
	R: 5'- CAGGAGATCCAAGGCAAA-3'		
EGFR	F: 5'- AGGAAGAAGCTTGCTGGTAGC-3'	88	Comincini ve ark 2009
	R: 5'- CTCTGGAAGACTTGTGGCTTG-3'		
PDGFBB	R: 5'- CGACGATCGAGTCCAATGCTG-3'	78	Ticari prob (Roche)
	F: 5'- AGGCTACCATGCATCCCTGCTG -3'		
PTEN	F: 5'- GGGGAAGTAAGGACCAGAGAC-3'	95	Ticari prob (Roche)
	R: 5'- TCCAGATGATTCTTTAACAGGTAGC-3'		
IGFBP1	F: 5'- GGGACGCCATCAGTACC -3'	62	Lu ve ark 2013
	R: 5'- CCATTTTTTGATGTTGGTGAC-3		
AKT	F: 5'-TCTATGGCGCTGAGATTGTG-3'	116	Lembo ve ark 2011
	R: 5'-CTTAATGTGCCCGTCCTTGT-3'		

2.3.2. Protein Ekspresyon Analizi

mRNA seviyesinde gözlenen değişikleri doğrulamak için western blot yöntemi ile hedef genlerin protein analizi gerçeklestirildi. Bunun için öncelikle protein izolasyonu ve western blot tekniğinin optimizasyonu gerçekleştirildi.

Protein İzolasyonu: Antikor sıra analizi sonucunda 2 kat ve üzeri bulunan sitokinlerin hücre yüzey reseptörlerinin ve ilgili yolaktaki PTEN ve AKT proteinlerinin, protein ve fosfo-protein seviyelerini tespit etmek için western blot analizi yapıldı. Bunun için öncelikle hastalardan alınan dokuların ve pozitif ve negatif kontrolleri oluşturacak hücre hatlarınının protein izolasyonları ticari kit (Abcam) kullanılarak izole edildi. Protein izolasyonları için örnekler buz üzerine alındı. 100 mg ağırlığındaki doku örnekleri üzerine kit içerisinden temin edilen 1 ml ekstraksiyon tamponu, 2 µl Proteaz/Fosfataz inhibitörü ve 2 µl 1 M DTT (Dithiothreitol)' den hazırlanan izolasyon karışımından 100'er µl eklendi ve bistüri ile dokular küçük parçalara ayrıldı. Hücre kültürlerinden protein izolasyonu için; T25

hücre flaskı %80-90 yoğunluğa geldiğinde (yaklaşık olarak $1x10^6$ hücre) hücre pelleti üzeri 2 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco) karışımı eklenerek hücreler flasktan kazındı. Bu aşamadan sonra hücreler 15.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Üst fazları atıldı ve üzerine 100 µl dokularda kullanılan izolasyon karışımından eklendi. Bu aşamadan sonra hem hücre kültürleri hem de doku örneklerinin protein izolasyonunda aynı protokol birlikte uygulandı. İzolasyon karışımı eklenen hücreler 10 dk. buz üzerinde bekletildi. Sonrasında kısa vortekslemenin (5 sn.) ardından maksimum devirde 3 dk. santrifüj edildi. Üst faz alınarak bir başka 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. Protein izolasyonundan sonra her bir örneğin total miktar tayini boya bağlama esasına dayanan Bradford yöntemi ile ticari kit (Abcam) kullanılarak yapıldı. Bu yöntem için gerekli kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için standart olarak saf BSA (Bovine Serum Albumin) kullanıldı. Ölçümü yapılacak tüm standartlar ve örnekler iki seri halinde hazırlandı. Protein standartları Çizelge 2.2'deki gibi dilusyonlar şeklinde hazırlandı. Bu dilue edilmiş standartlardan 10'ar µl dublike olacak şekilde 96'lık okuma kuyularına yüklendi. Örnekler ise 1/30, 1/50 ve 1/100 şeklinde dilue edildi ve yine aynı şekilde 10'ar µl 96'lık kuyulara yüklendi. Kit içerisinden temin edilen ve Comassie blue-G boyası içeren protein analiz karışımından, protein standartları ve örnekler bulunan kuyucuklara 100'er µl ilave edildi. 5 dk. oda ısısında inkübe edildi. Ölçümler spektrofotometre cihazı (Biotek, PowerWave HT) ile OD 595±20 nm' de yapıldı.

Çizelge 2.2 Protein konsantrasyonlarının seri dilüsyonları.

No	Standart (µl)	H_2O (µl)	BSA (µg/10µl)
0	0	50	0
1	5	45	1
2	10	40	2
3	15	35	3
4	20	30	4
5	25	25	5

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Optimizasyonu: Protein ve fosfo-protein seviyelerinin belirlenmesinden önce SDS-PAGE ve western blot'ın diğer aşamaları adım adım optimize edildi. Bunun icin öncelikle SDS-PAGE optimize edildi. Protein izolasyonundan elde edilen proteinler, protein yükleme tamponu üretici firmanın (Abcam) protokolüne göre hazırlandı ve ilave edildiğinde son konsantrasyonları 50 µg olacak şekilde ayarlandı. 5 dk. 90^{o}C'de inkübe edildi. Separating (ayırma) ve stacking (yükleme) olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlandı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre yüzdeleri ayarlanan ayırma jelinin miktarları Çizelge 2.3'te; yükleme jelinin miktarları ise Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Ayırma jeli miktarları.

Ayırma jeli			
Karışım	Farklı (%) akrilamid jeller için miktarlar (ml)		
	%8.5	%10.0	%12.5
H_2O	3,50	3,10	2,50
%30'luk akrilamid karışımı	2,00	2,4	3,00
Ayırıcı jel tamponu (4x)	1,90	1,90	1,90
%10 Amonyum persülfat (APS)	112 µl	112 µl	112 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Çizelge 2.4. Yükleme jeli miktarları.

%5'lik Yükleme jeli	
Karışım	Miktar (µl)
H_2O	1000
%30'luk akrilamid karışımı	300
Yükleme jeli tamponu (4x)	444
%10 APS	28
TEMED	5

Öncelikle ayırıcı jel bileşenleri TEMED (Tetramethylethylenediamine) ve APS (Amonyum persülfat) hariç sırasıyla eklendi. Manyetik karıştırıcıda 2 dk. karıştırıldı. TEMED ve APS akrilamid ve bisakrilamid arasında polimerizasyonu başlattığı için jel dökülmeden hemen önce eklenerek jelin 3/4'lük kısmına hızlı bir şekilde döküldü. Ardından üst kısımda oluşan hava kabarcıklarını düzleştirmek amacıyla isopropil alkol eklendi. 5 dk. beklendi ve sonrasında kurutma kağıdı ile üst

kısımdaki alkol geri alındı. Daha sonra yürütme jeli yine aynı şekilde TEMED ve APS hariç sırasıyla eklendi. TEMED ve APS de eklenerek jel karışımı kasetin üst kısmında kalan 1/4'lük bölüme döküldü. Taraklar takılarak kuyucukların oluşması sağlandı. Yürütme jelin polimerize olduğu gözlendikten sonra kullanılmak üzere hava almayacak şekilde sarılarak +4°C'ye kaldırıldı. Her örnekten 50 µg total protein %4-12 oranları arasında değişen SDS-PAGE mini jeline (10X10 cm) yüklendi. 5 µl protein belirteci (Abcam) yüklenerek 80 volt sabit hızda elektroforez buffer içinde (3 gr Tris-Base, 14.4 g Glisin, 1 gr SDS, 1 L dH_2O) yürütüldü. SDS-PAGE jeli boyanması için; dH_2O içinde 5 dk süre bekletildi ve dH_2O dökülerek 100 ml fiksatif karışımı içerisinde (metanol-glasiyal asetik asit-dH_2O 5:1:4) 1 saat boyunca çalkalayıcıda fikse edildi. dH_2O içinde 5 dk. tekrar bekletildi ve 1x Coomassie Brilliant Blue karışımında 1 saat boyunca boyandı. Tekrar dH_2O'da 5 dakika bekletildi ve ardından yıkama karışımında (metanol-glasiyal asetik asit-dH_2O 4:1:5) bantlar net görülünceye kadar yıkama yapıldı. SDS-PAGE jeli uzun süre saklamak için %5 glasiyal asetik asit karışımında bekletildikten sonra +4^oC' ye kaldırıldı.

Hedef Proteinlerin Western Blot ile Analizi: Yürütme işlemi sonrası nitroselüloz membran transfer tamponu (Thermo, USA) içerisine alındı. Blotlamada kullanılan filtre kağıtları (Bio-Rad) transfer tamponu içerisinde ıslatıldı. Blotlama cihazına (Bio-Rad Trans Turbo, 170-4155) yerleştirildi ve protein büyüklüğüne göre değişen akım (1,3-2,5 A) ve sürede (7-15 dk.) blotlamaya tabi tutuldu. Süre sonunda membran TBS (Tris Buffered Saline) tamponu (50 mMol Tris-HCl, 150 mMol NaCl pH 7,6) içerisine alındı ve karıştırıcıda 10 dk. çalkalandı. TBS tamponu dökülerek yerine bloklama tamponu (1XTBS 10 ml, %0,1 Tween-20, %5 yağsız süt tozu) eklendi ve 1 saat süreyle karıştırıcıda çalkalandı. Süre sonunda bloklama tamponu döküldü ve TBS/Tween-20 tamponunda 3 kez 5'er dk. yıkandı. Birincil antikor (Cell signaling), dilusyon tamponu (1XTBS 10 ml, %0,1 Tween-20, %5 BSA ve birincil antikor içinde 1/1000 konsantrasyonda hazırlandı ve bir gece süreyle +4ºC'de karıştırıcıda bekletildi. Süre sonunda birincil antikorlar alınarak membran üzerine TBS/T tamponu eklendi. TBS/T tamponunda 3 kez 5'er dk. karıştırıcıda çalkalandı ve yıkandı. Bu süre zarfında ikincil antikor (Cell signaling) dilüsyon tamponu (1XTBS) 10 ml, % 0,1 Tween-20, %5 BSA gr, 1/500 konsantrasyonda ikincil antikor

hazırlandı ve membran üzerine eklenerek 1 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ikincil tamponda alınarak yine aynı şekilde membran 3 kez TBS/T tamponunda yıkandı. Proteinlerin belirlenmesi için geliştirme tamponu (20X LumiGLO ve 20X Peroxide) hazırlandı ve 1dk. süreyle membrana muamele edildi.

Süre sonunda membran kemiluminesans görüntüleme sistemi (Fusion FX Vilber Lourmat) ile görüntülendi. Dataların kantitatif analizleri Bio-1D++ (Ver.11.11) programı ile yapıldı.

Protein fosforilasyonu sinyal iletiminde en yaygın olan post-translasyonel modifikasyon işlemidir. Her protein en az bir olmak üzere birden çok bölgeden fosforillenir. Bu nedenle çalışmada seçilen proteinlerin en çok fosforillenen bölgeleri olan Thr, Ser ve Tyr bölgelerinin fosforilasyon durumları incelendi. Kullanılan birincil ve ikincil antikorlar Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. Western blot çalışmalarında kullanılan antikorlar.
İkincil antikor olarak kullanılan anti-rabbit antikorları, birincil antikor kitleri içerisinden temin edilmiştir.

Birincil Antikorlar	Firma	Katalog no	Moleküler ağırlık
EGF Reseptör	Cell Signaling	#9922	175
Fosfo-EGF Reseptör (Tyr992)	Cell Signaling	#9922	175
Fosfo-EGF Reseptör (Tyr1068)	Cell Signaling	#9922	175
Fosfo-EGF Reseptör (Tyr1045)	Cell Signaling	#9922	175
İnsülin Reseptör β	Cell Signaling	#8338	95
IGF-1 Reseptör β	Cell Signaling	#8338	95
Fosfo IGF-1 Reseptör β (Tyr1135	Cell Signaling	#8338	95
Fosfo IGF-1 Reseptör β (Tyr1131	Cell Signaling	#8338	95
Fosfo IGF-1 Reseptör β (Tyr980)	Cell Signaling	#8338	95
Fosfo IGF-1 Reseptör β (Tyr1135 /1136) /İnsülin Reseptor β (Tyr1150/1151)	Cell Signaling	#8338	95
PDGF Reseptör β	Cell Signaling	#9970	190
Fosfo PDGF Receptor β (Tyr740)	Cell Signaling	#9970	190
Fosfo PDGF Receptor β (Tyr751)	Cell Signaling	#9970	190
Fosfo PDGF Receptor β (Tyr771)	Cell Signaling	#9970	190
Fosfo PDGF Receptor β (Tyr1009	Cell Signaling	#9970	190
Fosfo PDGF Receptor β (Tyr1021	Cell Signaling	#9970	190
PTEN	Cell Signaling	#9188	54
Fosfo PTEN (Ser380/Thr382/383)	Cell Signaling	#9549	54
AKT	Cell Signaling	#4685	60
Fosfo AKT (Ser473)	Cell Signaling	#4060	60
GAPDH	Cell Signaling	#5174	37
İkincil Antikorlar			
Anti-rabbit	Cell Signaling	-	-

2.4. İstatistiksel Analizler

Antikor sıra analizinde, analiz sonrası elde edilen spotların görüntülerinin analizi bilgisayar destekli (Koadaarray® 2.6 yazılımı) bir sistem kullanılarak ölçüldü. Her bir sitokinin rölatif ekspresyon düzeyi, hem spottaki pikselin ortalama değeri±SD hem de programın (Koadarray) algoritması tarafından her noktaya 0 ile 100 arasında verilen güven aralığı ile hesaplandı. Güven aralığı, spotun keskinliği, yoğunluğu ve homojenliği gibi çeşitli parametrelere dayandı. 50 ± (SD) ve üzeri olanlar güvenilir kabul edildi. Kat artışı 2 ve üzeri olanlar anlamlı olarak alındı.

qRT-PZR analizinde, housekeeping gen seçiminde GeNorm (Vandesompele ve ark. 2002) ve NormFinder (Andersen ve ark 2004) metodları uygulandı. Bu metodlar belirli bir örnek panelinde aday housekeeping genlerin en kararlı olanını belirlemek için en sık kullanılan 2 metoddur. Normalizasyon amacıyla, çeşitli doku ve hücre tiplerinde ekspresyon düzeyi en az değişim gösteren housekeeping genler kullanılmaktadır. Analizde GAPDH değerleri normalizasyon amacı ile kullanıldı. Tümörlü, normal ve hücre hatlarından elde edilen veriler Minitab.v14.13 programında Kruskal-Wallis ve ANOVA testlerinin yardımıyla yapıldı. P değeri %5'in altında olan farklılıklar istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Western blot analiz sonuçlarının analizinde ise protein ve fosfo-protein düzeyleri GAPDH antikoru düzeyine göre Bio-1D++ (Ver.11.11) programı ile normalize edildi. Çıkan değerlerin grafikleri GraphPad Prism® V.5.00 (GraphPad software, deneme sürümü) programı kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri %5'in altında olan farklılıklar istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmaya baş boyun skuamöz hücre karsinoma tanısı alan yaşları 34-83 (63,15±1,2) arasında değişen 12 erkek ve 4 bayan hasta dâhil edilmiştir. Hastalara ve kontrollere ait klinik bilgiler Çizelge 3.1'de verilmektedir.

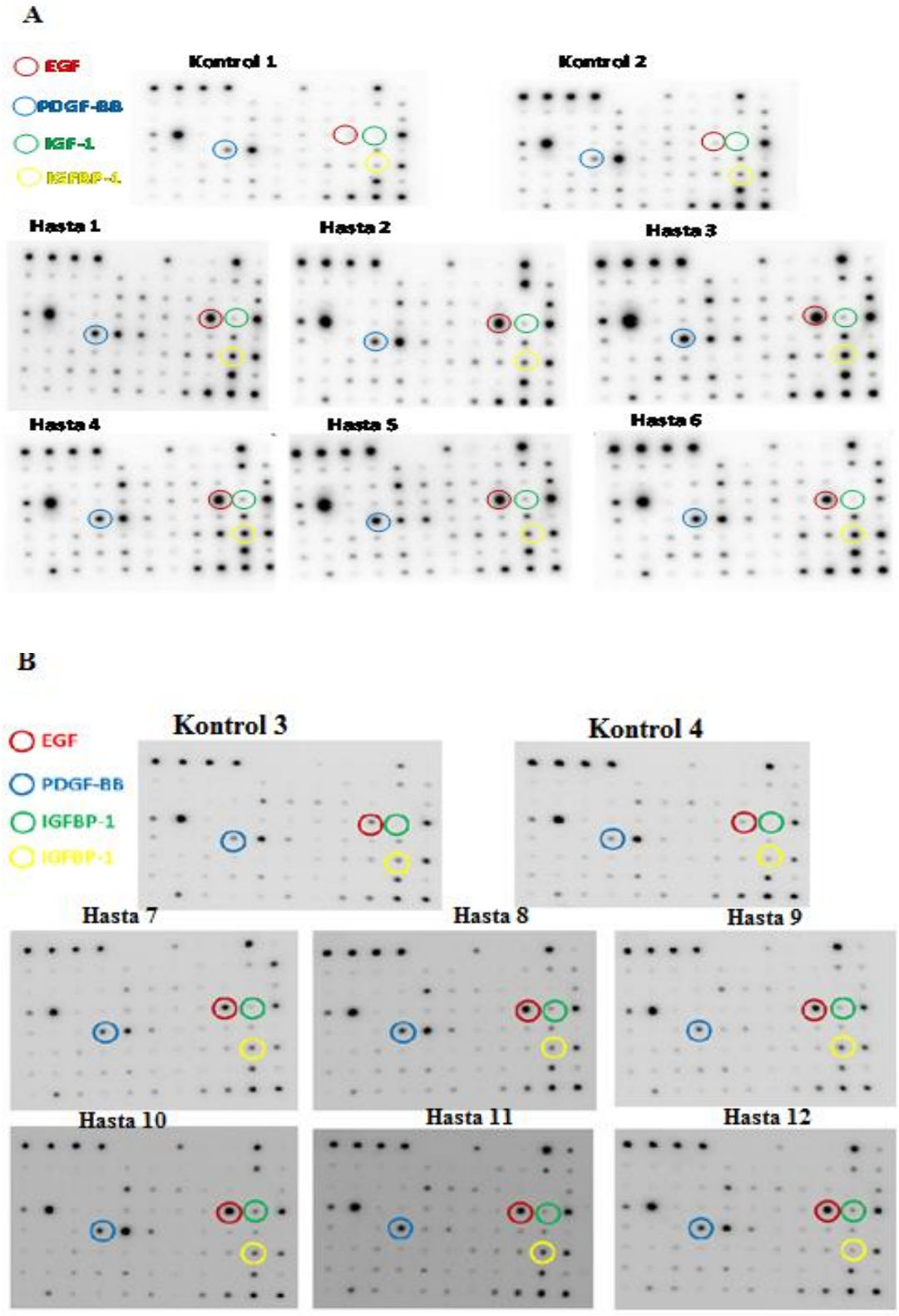
Çizelge 3.1 Baş-boyun skuamöz hücre kanserli hastalara ait klinik ve sağlıklı kontrollere ait yaş/cinsiyet bilgileri.

No	Grup	Yaş / Cinsiyet	Tümör Lokalizasyonu	TNM	Tümör Evresi
1	Hasta	67/E	Larinks	T2N0M0	2
2	Hasta	57/E	Larinks	T2N0M0	2
3	Hasta	66/E	Larinks	T3N0M0	3
4	Hasta	56/E	Larinks	T2N1M0	3
5	Hasta	59/E	Larinks	T4N1M0	4
6	Hasta	83/E	Larinks	T4N0M0	4
7	Hasta	62/E	Larinks	T4N2M0	4
8	Hasta	49/E	Larinks	T4N0M0	4
9	Hasta	44/E	Larinks	T4N2M0	4
10	Hasta	82/K	Larinks	T2N1M0	4
11	Hasta	34/E	Dil	T2N0M0	2
12	Hasta	52/K	Dil	T2N0M0	2
13	Hasta	60/E	Dil	T2N0M0	2
14	Hasta	59/K	Dil	T2N0M0	2
15	Hasta	73/E	Dil	T4N0M0	4
16	Hasta	67/K	Dil	T3N2M0	4
17	Kontrol	53/E	-	-	-
18	Kontrol	58/E	-	-	-
19	Kontrol	61/K	-	-	-
20	Kontrol	55/K	-	-	-

3.1. Antikor Sıra Analizi

Antikor sıra analizi sonucunda membrandaki spot görüntüleri kemoluminesans görüntüleme sistemi ile görüntülendi (Şekil 3.1). Membran spot görüntülerinde bulunan sitokinlerin yer tayini Ray-Bio insan sitokin antikor sıra analizi 5 haritasına göre yapıldı (Şekil 3.2). Bu görüntüler Koadarray (Koada technology 2.7.9, UK) otomatize mikrosıra ve kantitasyon analiz sistemi ile istatiktiksel olarak değerlendirildi. Kat artışı 2 ve üzeri olanlar anlamlı olarak kabul

edildi. Koadarray sonucu hasta ve kontrollerin ortalama değerleri ve kat artış oranları Ek-C'de, bu oranların veri grafiği ise Şekil 3.3'te verildi.

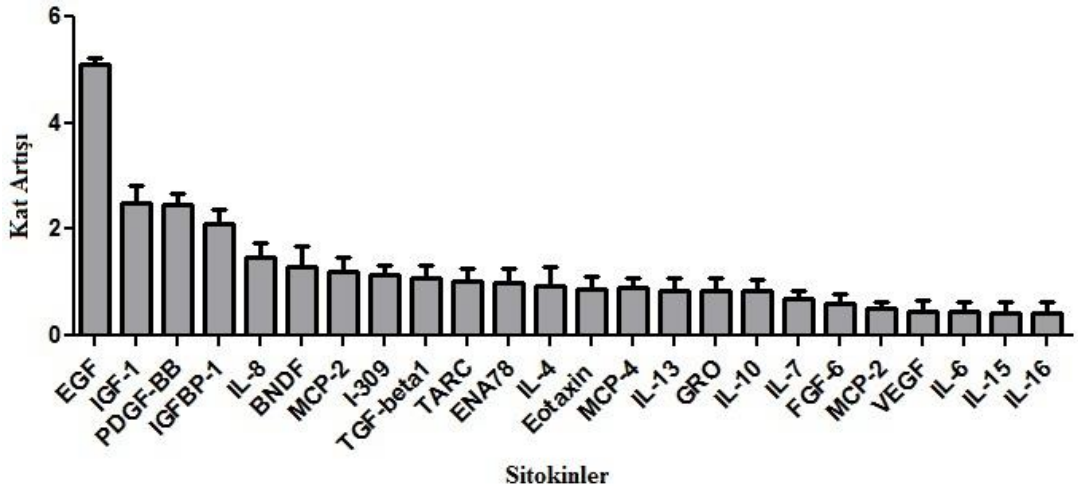


Şekil 3.1 Birinci (A) ve ikinci (B) grup antikor sıra analizi sonuçları.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α
2	I-309	IL-1α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
3	IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1β
4	MIP-1δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	EGF	IGF-I	Angiogenin
5	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC	Ck β 8-1	Eotaxin	Eotaxin-2	Eotaxin-3
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2	NT-3
8	NT-4	Osteopontin	Osteoprotegerin	PARC	PIGF	TGF- β 2	TGF- β 3	TIMP-1	TIMP-2	Pos	Pos

Şekil 3.2 Membranda bulunan insan sitokin antikor sıra analizi haritası.

Not 1: GRO; CXCL1, CXCL2 ve CXCL3'ü; GRO-α ise sadece CXCL1 tespit eder.
Not 2: IL-12 p40p70; hem IL-12 p40 hem de IL-12 p70' i tespit eder.
Not 3: TGF-β1 sadece aktif formudur.
Not 4: VEGF; VEGF-165 ve VEGF-121'i de tespit eder.



Şekil 3.3 Antikor sıra analizi sonucu.

Ek-C' te verilen sonuçlara göre evrelemeler dikkate alınmadan yapılan analiz sonucunda 2 kat ve üzeri artış gösteren sitokinlerin kat artışları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

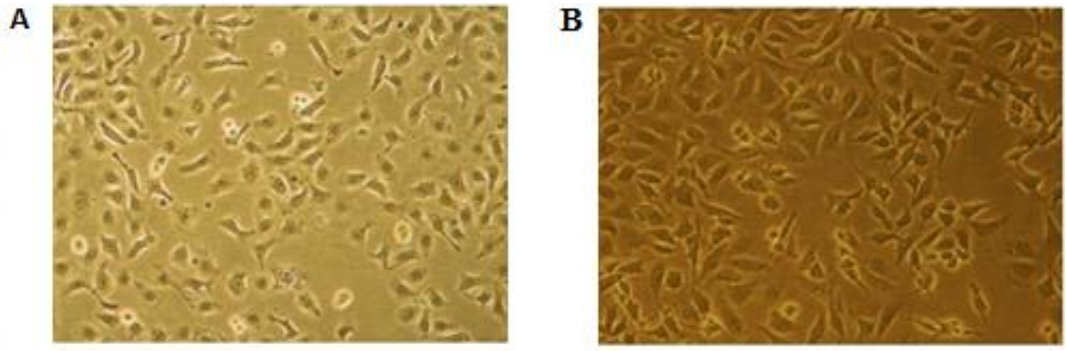
Çizelge 3.2 Antikor sıra analizi sonrası anlamlı bulunan sitokinler ve kat artış miktarları.

Sitokin	Artış Miktarı
EGF	5,04
IGF-1	2,72
PDGF-BB	2,61
IGFBP-1	2,30

Erken evre ve ileri evre kanserli hasta grupları ayrı ayrı ele alınarak yapılan analiz sonucu ek-D'de verildi. Ek-D'ye göre ileri evre hastalarda EGF (5,04), IGF-1 (2,72), PDGF-BB (2,61) ve IGFBP-1 (2,30)'e ilaveten bazı interlökin ve diğer sitokinlerin artış gösterdiği görüldü. Artış gösteren bu sitokinler ise; I-309, IL-4, IL-7, IL-8, IL-13, IL-15, MCP-1, MCP-2, MDC, TARC, TGF-beta 1 ve FGF-6 oldu.

3.2. SCCL-MT1 ve HEK-293 Hücrelerinin Kültürü ve Dondurulması

Baş-boyun skuamöz kanserine ait hücre hattı SCCL-MT1 ve kontrol hücre hattı HEK-293'ün kültürleri (Şekil 3.4) yapıldı. Kültüre edilen hücreler total RNA ve protein izolasyonları için optimize edildikten sonra -80°C'ye kaldırıldı. Daha uzun süreli muhafaza etmek amacıyla -80°C'ye konulduktan 48 saat sonra sıvı azota aktarıldı.



Şekil 3.4 SCCL-MT1 (A) ve HEK-293 (B) hücre hatlarına ait hücre kültürlerinin görüntüsü (20X).

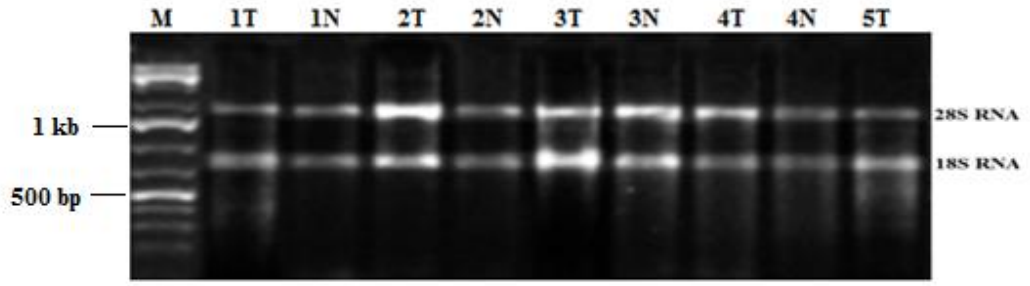
3.3. Gen ekspresyon analizleri

Gen ekspresyon analizlerinin optimizasyonları önce izole edilen RNA'lardan mRNA seviyesinde, sonrasında ise protein izolasyonları yapılarak protein seviyesinde gerçekleştirildi.

3.3.1. mRNA ekspresyon analizleri

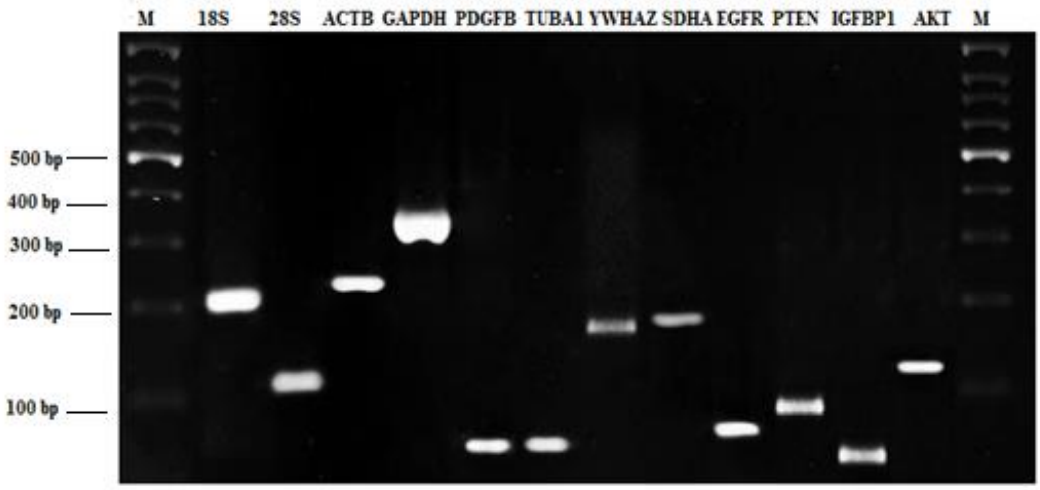
mRNA ekspresyon analizleri, örneklerin RNA izolasyonları ve cDNA eldeleri yapıldıktan sonra housekeeping gen seçimi ve hedef genlerin ekspresyon analizleri olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi.

Doku ve Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu: Doku örneklerinden ve hücre kültürlerinden trizol yöntemi ile araştırmada kullanılabilecek kalitede tüm RNA'lar elde edildi. Dolayısıyla beklenen 18S ve 28S ribosomal RNA bantları gözlendi ve herhangi bir degredasyona rastlanmadı (Şekil 3.5). Ancak RNA örneklerinde az miktarda da olsa genomik DNA kontaminasyonu olabileceğinden; bu problemin önüne geçmek amacıyla RNA örnekleri DNAse-I enzimi (Fermentas) ile muamele edilerek genomik DNA'nın eliminasyonu sağlandı.



Şekil 3.5 %1 lik agaroz jelde yürütülmüş RNA örnekleri (M: DNA Marker, T: Tümör, N: Normal, kb: Kilobaz, bp: Baz pair).

cDNA eldesi ve optimizasyonu: Sentezlenen cDNA örneklerinin kalitesi çalışmada kullanılan tüm genler (18S, 28S, ACTB, GAPDH, PDGFRB, TUBA1, YWHAZ, SDHA, EGFR, PTEN ve IGFBP1) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile test edildi. Gen ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak UV altında değerlendirildi (Şekil 3.6).

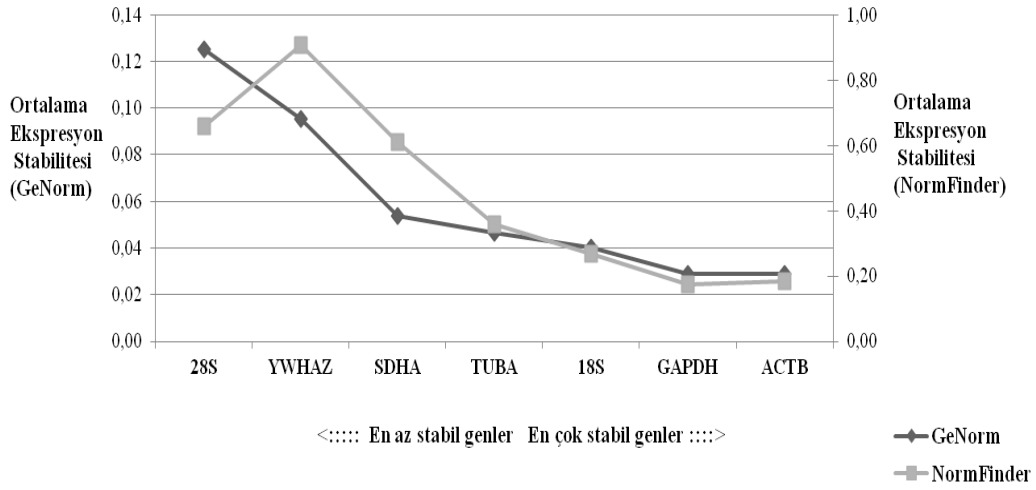


Şekil 3.6 Klasik PZR bulgularının %2'lik agaroz jel görüntüsü (M: DNA Marker).

Housekeeping gen seçimi ve optimizasyonu: Uygun housekeeping gen seçiminde ve devamındaki gen ekspresyon çalışmasında kullanılan amplifikasyon eğrileri ve bu eğriler kullanılarak çizilen standart eğri Ek-E'de verilmiştir.

Housekeeping gen çalışması istatistikleri yapılırken GeNorm ve NormFinder metodları kullanıldı. GeNorm sonuçlarına göre; kullanılan housekeeping genlerin tümünün ekspresyon düzeyleri stabildi. En stabil genler; GAPDH (M=0,028) ve ACTB (M=0,028). En az stabil genler; 28S (M= 0,125) ve YWHAZ (M=0,095) olarak gözlendi. NormFinder sonuçlarına gore ise; yine bu kullanılan housekeeping genlerin tümünün ekspresyon düzeyleri stabildi. En stabil genler; GAPDH (M= 0,176) ve ACTB (M= 0,184), en az stabil genler; YWHAZ (M= 0,908) ve 28S (M= 0,658) olarak tespit edilmiştir. En iyi iki gen kombinasyonu ise GAPDH ve ACTB'ydi ve onların stabilite değerleri 0,127 olarak tespit edildi.

En stabil housekeeping gen seçiminde kullanılan GeNorm ve NormFinder metodları sonucu elde edilen veriler koreledir. Her iki analizde de çıkan sonuçlara göre GAPDH ve ACTB normalizasyonda kullanmaya uygun iki housekeeping gen olarak tespit edildi. Aday housekeeping genlerin ortalama ekspresyon stabilite değerleri Şekil 3.7'de sunulmuştur.



Şekil 3.7 GeNorm and NormFinder metodlarına göre aday housekeeping genlerin ortalama ekspresyon stabilite değerleri.

Hedef Genlerin mRNA Ekspresyounun Optimizasyonu ve Analizi: Uygun housekeeping gen seçimi yapıldıktan sonra antikor sıra analizi sonucunda anlamlı bulunan ve ilgili yolaklarda rol alan bazı genlerin (EGFR, PDGFRB, IGFBP1, PTEN ve AKT) qRT-PZR ile tümör-normal dokularda ve hücre hatlarında ekspresyon düzeylerine bakıldı. Ekspresyon düzeyleri incelen bu genlerin qRT-PZR amplifikasyon eğrileri Ek-F'de, bakılan parametreler ve p değerleri ise Çizelge 3.3 'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Solid dokulardaki gen ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki istatistik analizleri.
Kıyaslama yapılması için gruplar şu şekilde oluşturuldu; tümör lokalizasyonu (larinks, dil, larinks+dil), cinsiyet ve tümörün evresi (-:Çalışmaya alınan larinksli bireylerin hepsi aynı cinsiyete sahip olduğundan analiz yapılmadı. EE: Erken Evre, İE: İleri Evre)

Gen	Tümör Lokalizasyonu	Doku Türü (Tümör/Normal)	Cinsiyet (Kadın/Erkek)	Tümör Evresi (EE/İE)
EGFR	Larinks	p=0,102	-	p=0,647
	Dil	p=0,715	p=0,773	p=0,252
	Larinks + Dil	p=0,330	-	p=0,254
PDGFBB	Larinks	**p=0,002**	-	p=0,259
	Dil	p=0,361	p=0,909	p=0,071
	Larinks + Dil	**p=0,006**	-	p=0,825
IGFBP1	Larinks	p=0,624	-	**p=0,048**
	Dil	p=1,000	p=0,472	p=0,207
	Larinks + Dil	p=0,576	-	**p=0,010**
PTEN	Larinks	**p=0,041**	-	p=0,709
	Dil	**p=0,006**	p=0,080	p=0,178
	Larinks + Dil	**p>0,001**	-	p=0,085
AKT	Larinks	p=0,524	-	p=0,368
	Dil	p=0,503	p=0,204	p=0,174
	Larinks + Dil	p=0,512	-	p=0,481

Çizelge 3.3 'teki bulgulara göre; tüm tümör ve normal dokular (larinks+dil) ile gen ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğine PDGFBB (p=0,006) ve PTEN (p>0,001) gen ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tümör lokalizasyonuna göre sadece larinkse ait tümör ve normal dokulardaki gen ekspresyonları incelendiğinde; yine PDGFBB (p=0,002) ve PTEN (p=0,041) gen ekpresyonları istatistiksel olarak anlamlı iken, sadece dile ait tümör ve normal dokular karşılaştırıldığında ise sadece PTEN (p=0,006) gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlıydı. İncelenen genler ve cinsiyetler arasındaki farklılıklar istaistiksel olarak anlamlı değildi. Tümörlerin evresi ile gen ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde IGFBP1 (p=0,048) geni ile larinks kanseri evreleri ve tüm tümör dokuları (larinks+dil) (p=0,010) evreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

Çizelge 3.4 Kanser hücre kültürü ile normal dokular ve tümörlü dokular ile normal hücre kültürü arasındaki gen ekspresyon seviyelerinin kat artışı ve azalışı yönünden karşılaştırılması.

Gen	SCCL-MT1/ Normal Dokular	Tümörlü Dokular / HEK-293
EGFR	2,7 kat artma	3,3 kat artma
PDGFBB	1,6 kat artma	0,8 kat artma
IGFBP	1,7 kat artma	3,3 kat artma
PTEN	3,75 kat azalma	15 kat azalma
AKT	1,2 kat artma	1,4 kat artma

Çizelge 3.4. 'deki bulgulara göre; tümör hücre hattı (SCCL-MT1) ve normal dokular arasındaki gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, tümör hücre hattında normal dokulara göre EGFR (2,7 kat artma), PDGFBB (1,6 kat artma), IGFBP (1,7 kat artma) ve AKT (1,2 kat artma) gen ekspresyonlarında artış görüldü. PTEN geninde ise 3,75 kat bir azalma olduğu görüldü. Aynı şekilde tümörlü dokuların normal hücre hattı (HEK-293) ile gen ekspresyonları arasındaki değişimler incelendiğinde ise; EGFR (3,3 kat artma), PDGFBB (0,8 kat artma), IGFBP (3,3 kat artma) ve AKT (1,4 kat artma) gen ekspresyonlarında artış görüldü. PTEN geninde ise 15 kat azalma olduğu görüldü. Bu sonuçlara göre en fazla gen ekspresyon değişimlerinin EGFR, PTEN ve IGFBP1 genlerinde olduğu belirlendi.

Çizelge 3.5 BBSHK'li hastaların dokularındaki gen ekspresyon seviyelerinin kat artışı ve azalışı yönünden karşılaştırılması.

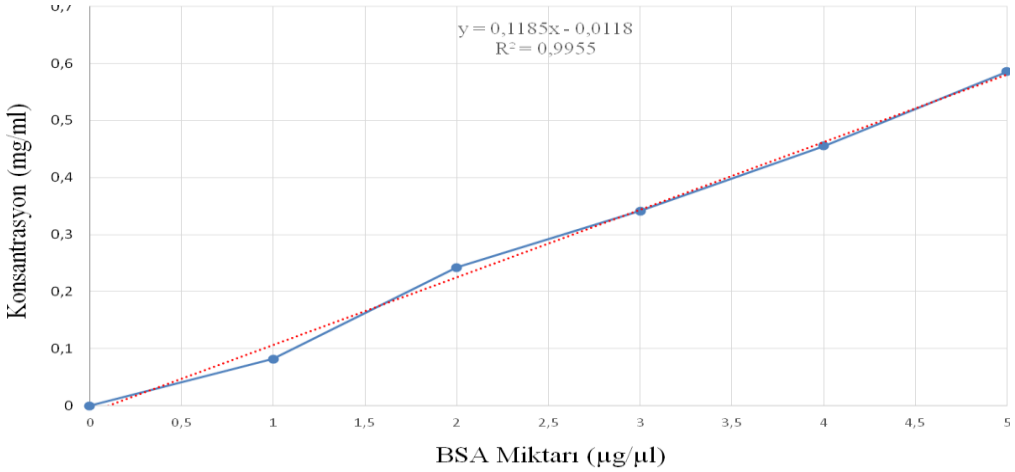
Gen	Tümör Lokalizasyonu	Doku Türü (Tümör/Normal)	Tümör Evresi (İE/EE)
EGFR	Larinks	1,07 kat artma	0,92 kat artma
	Dil	1,22 kat artma	0,61 kat artma
	Larinks + Dil	1,13 kat artma	0,79 kat artma
PDGFBB	Larinks	3,21 kat artma	0,51 kat artma
	Dil	2,83 kat artma	2,89 kat artma
	Larinks + Dil	3,09 kat artma	1,18 kat artma
IGFBP1	Larinks	3,81 kat artma	2,17 kat artma
	Dil	0,14 kat artma	3,01 kat artma
	Larinks + Dil	1,68 kat artma	3,63 kat artma
PTEN	Larinks	4,8 kat azalma	1,91 kat azalma
	Dil	3,4 kat azalma	1,62 kat azalma
	Larinks + Dil	4 kat azalma	1,84 kat azalma
AKT	Larinks	0,5 kat artma	0,2 kat artma
	Dil	0,34 kat artma	0,4 kat artma
	Larinks + Dil	0,43 kat artma	0,34 kat artma

Çizelge 3.5 'teki bulgulara göre; en fazla gen ekspresyon değişimlerinin PDGFBB, IGFBP1 ve PTEN genlerinde olduğu belirlendi.

3.3.2. Protein ekspresyon analizi

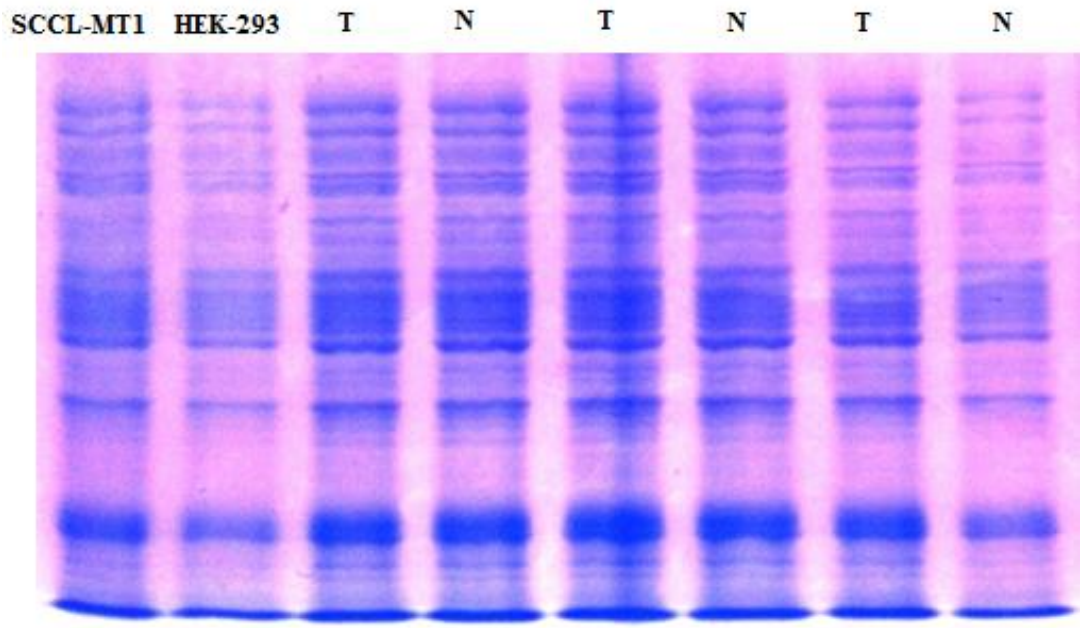
Hedef proteinlerin ve bu proteinlere ait farklı bölgelerin fosfo-protein düzeylerinin analizinde ilk olarak örneklerden protein izolasyonları, sonrasında SDS-PAGE ile jelde yürütme ve western blot analizleri yapıldı.

Protein izolasyonu: Western blot çalışmasında kullanılacak olan proteinlerin izolasyonları yapıldı. Bradford yöntemi ile 5 mg/ml BSA'dan seri dilusyonlar hazırlanarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 BSA dilüsyonları.

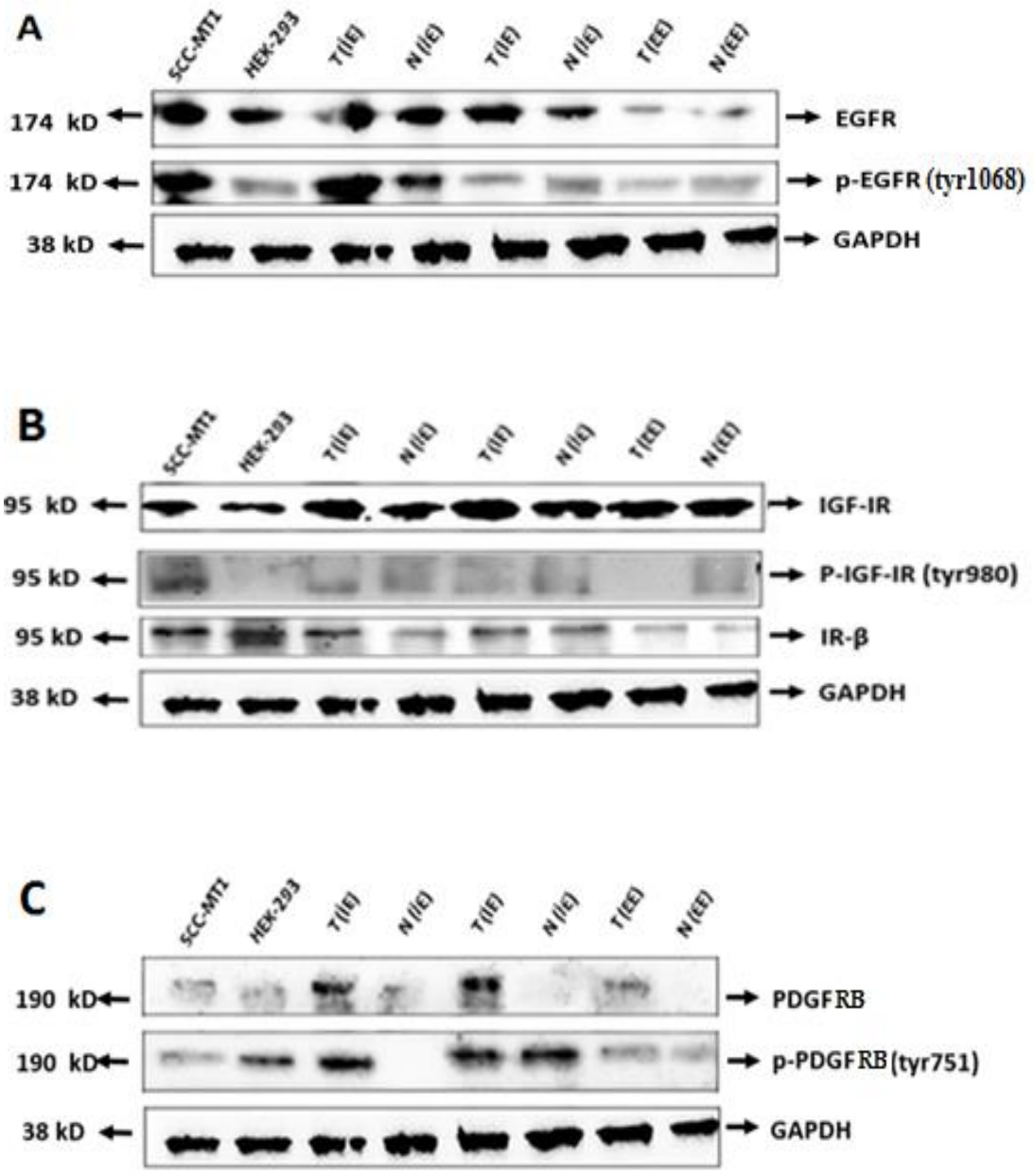
Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot optimizasyonu: Solid doku ve hücre kültürü örneklerinden izole edilen proteinler çalışmada kullanılmak üzere 50 µg olacak şekilde eşitlendi ve SDS-PAGE yüklendi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel comassie brilliant blue ile boyandı ve görüntülendi (Şekil 3.9).

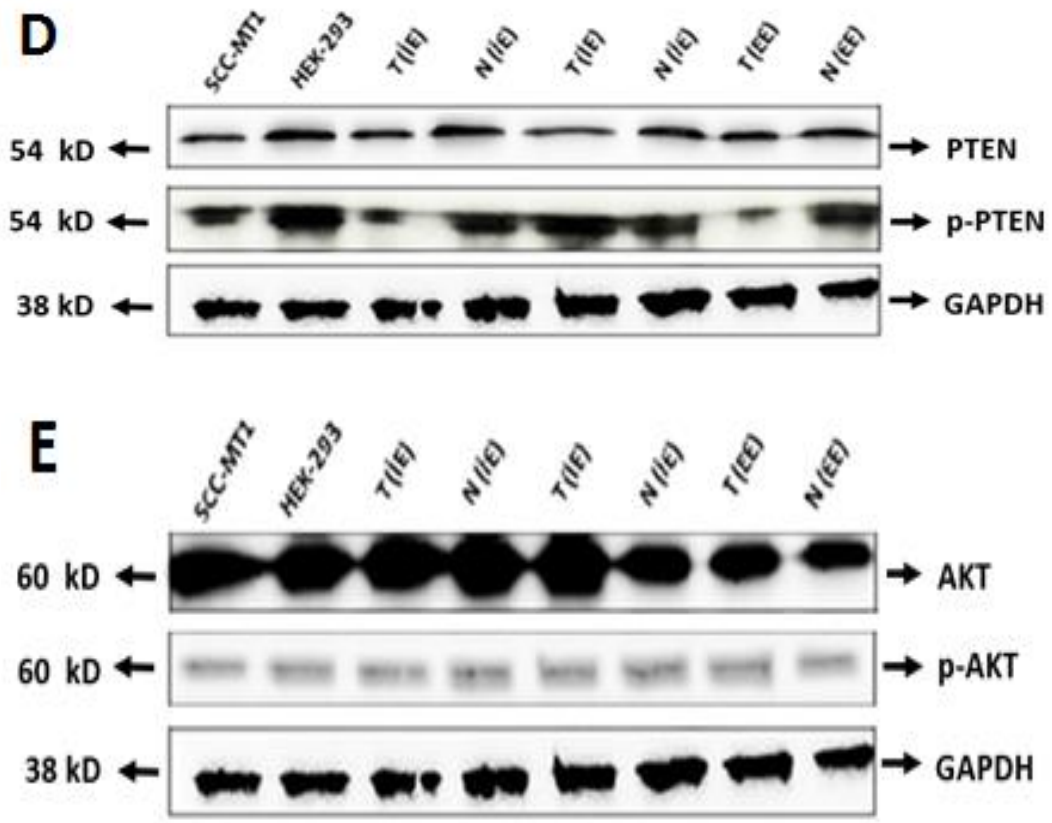


Şekil 3.9 SDS-PAGE jel görüntüsü.

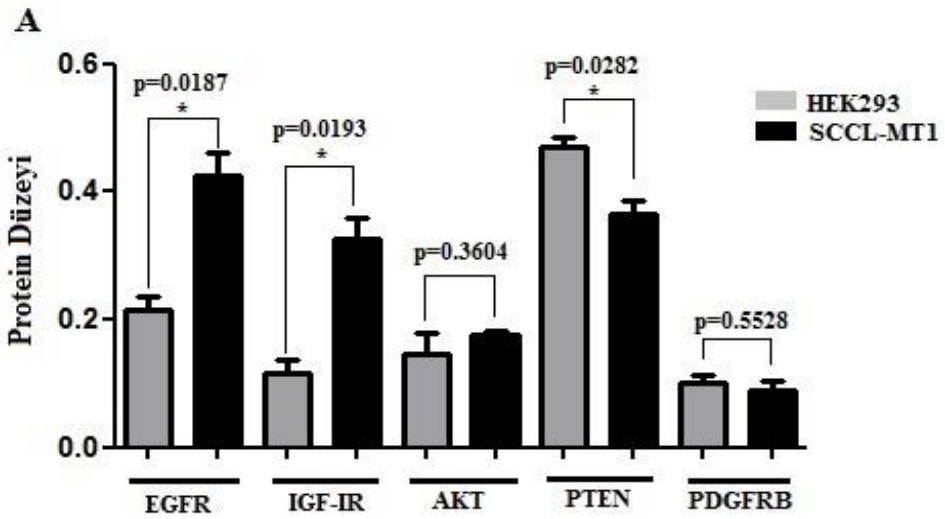
Hedef Proteinlerin Western Blot ile Analizi: Antikor sıra analizi sonucunda anlamlı çıkan sitokinlerin hücre yüzey reseptörlerinin ve bu sitokinlerle etkileşimde olduğu düşünülen bazı proteinlerin western blot tekniği ile hem protein hem de fosfo

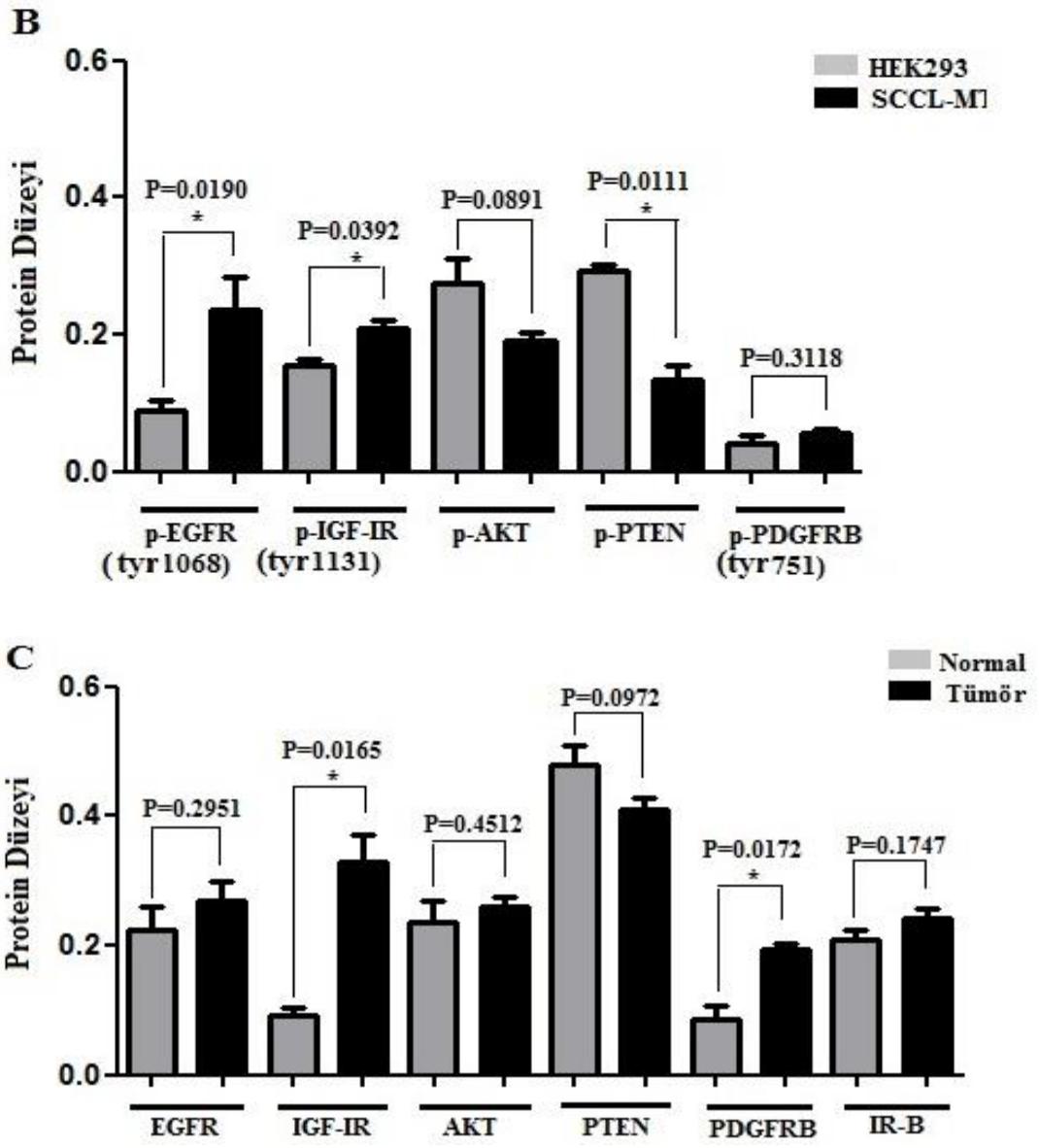
protein seviyeleri incelendi. Hedeflenen proteinlerin en fazla fosforillendiği bölgeler seçildi ve analiz edildi. Analiz sonucunda bazı fosfo-proteinlerde (Fosfo-EGF Reseptör (Tyr992), Fosfo-EGF Reseptör (Tyr1045), Fosfo IGF-1 Reseptör β (Tyr1135), Fosfo IGF-1 Reseptör β (Tyr1131), Fosfo IGF-1 Reseptör β (Tyr1135 /1136) /İnsülin Reseptor β (Tyr1150/1151), Fosfo PDGF Receptor β (Tyr740), Fosfo PDGF Receptor β (Tyr771), Fosfo PDGF Receptor β (Tyr1009), Fosfo PDGF Receptor β (Tyr1021) bant gözlenmemiştir. Bant gözlenen protein ve fosfo-proteinler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.10– Şekil 3.11).

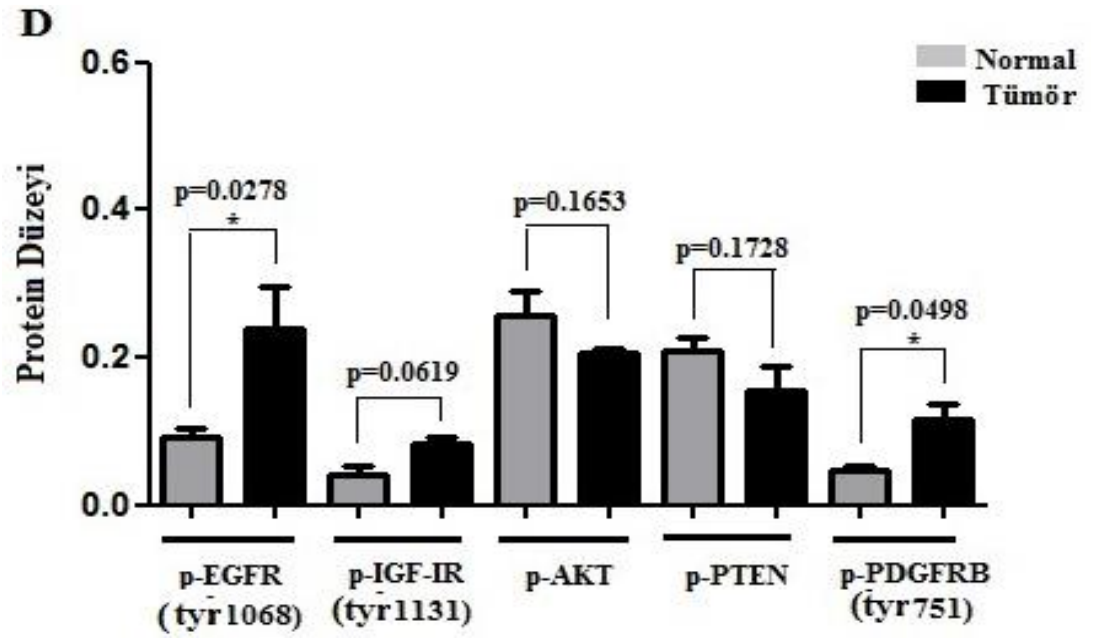




Şekil 3.10 EGFR – pEGFR (A), IGF-IR – pIGF-IR (B), PDGFRB – pPGDFRB (C), PTEN – pPTEN (D), AKT – pAKT (E) western-blot analizi sonuçları. (İE: İleri evre, EE: Erken evre, N: Normal, T: Tümör, kD: kilodalton).




B
HEK293
SCCL-M1
Protein Düzeyi
0.6
0.4
0.2
0.0
P=0.0190
*
P=0.0392
*
P=0.0891
P=0.0111
*
P=0.3118
p-EGFR (tyr1068)
p-IGF-IR (tyr1131)
p-AKT
p-PTEN
p-PDGFRB (tyr751)
C
Normal
Tümör
Protein Düzeyi
0.6
0.4
0.2
0.0
P=0.2951
P=0.0165
*
P=0.4512
P=0.0972
P=0.0172
*
P=0.1747
EGFR
IGF-IR
AKT
PTEN
PDGFRB
IR-B



Şekil 3.11 HEK-293, SCCL-MT1 hücre hatları ve normal-tümör dokularına ait fosforile olmayan (A, C) ve fosforile (B, D) proteinlerinin western blot protein düzeyi sonuçları. Grafik 3.2'de verilen protein analizi sonuçlarına göre; Baş-boyun kanseri hücre hattı SCCL-MT1'de EGFR, IGF-IR ve AKT protein düzeyleri kontrol olarak kullandığımız hücre hattı olan HEK-293'e göre daha fazladır. EGFR (p=0,018) ve IGF-IR'de (p=0,019) bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır. PTEN protein düzeyi ise kontrol hücre hattı olan HEK-293'te SCCL-MT1'e göre daha fazladır ve bu düzey istatistiksel olarak anlamlıdır (p= 0,028). (A). Bu proteinlerin fosforile durumundaki düzeyleri ise SCCL-MT1'de pEGFR, pIGF-IR ve pPDGFRB protein düzeyleri HEK-293'e göre daha fazladır. pEGFR (p=0,019) ve IGF-IR'de (p=0,039) bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır. Aynı şekilde pPTEN düzeyi de HEK-293'te daha fazladır ve bu düzey istatistiksel olarak anlamlıdır (p= 0,011) (B). Tümörlü dokulardaki EGFR, IGF-IR, IR-β, PDGFRB ve AKT protein düzeyleri normal dokulardaki protein düzeylerinden daha fazla iken, sadece IGF-IR ve PDGFRB'de istatistiksel olarak anlamlıdır. PTEN protein seviyesi ise tümörlü dokularda normal dokulara göre azalmıştır (C). Fosforillenmiş protein seviyeleri ise tümör dokularında pEGFR, pIGF-IR/IRβ ve pPDGFRB reseptörlerinde daha fazladır. Bu farklılık pEGFR (p=0,027) ve pPDGFRB'de (p=0,049) istatistiksel olarak anlamlıdır. Aynı şekilde pPTEN'de normal dokularda daha fazladır (D).

4. TARTIŞMA

Baş-boyun kanserleri (BBK), genel olarak heterojen bir yapı gösteren agresif bir tümör grubudur. Bu kanserlerin yaklaşık %90'ından fazlasını skuamöz epitelden köken alan baş-boyun skuamöz hücre karsinomaları (BBSHK) oluşturur. Sigara ve aşırı alkol kullanımı BBSHK'lerinin primer risk faktörleri arasında gösterilmektedir. Bunlara ilaveten HPV ile infeksiyon, genetik ve epigenetik değişikliklerin de BBSHK'lerinin etiyolojisinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Worsham ve ark 2006, Chaturvedi ve ark 2008, Chaturvedi ve ark 2013).

BBSHK'lerinin heterojen oluşu ve oluşumunda birçok faktörün birden yer alması hastalığın teşhis ve tedavisinde güçlüklere neden olmaktadır. Bu nedenle BBSHK'li hastaların yalnızca üçte biri erken evrede teşhis edilebilmektedir. BBSHK'li hastaların primer tümör bölgesine bağlı olarak cerrahi yoldan veya radyoterapi uygulandıktan sonra tedavi oranları %70-90 arasında değişmektedir (Argiris ve ark 2008). Hastaların üçte ikisi ise ileri evrede teşhis edilmekte ve tedavileri cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, eşzamanlı kemoradyoterapi ya da hedefe yönelik tedaviler olarak (anti-EGFR'ye yönelik) tercih edilmektedir. Tüm bu yöntemlere rağmen lokal ileri evre hastaların %50'sinden fazlasında tedaviden yaklaşık 2 yıl sonra tümörün tekrar oluştuğu görülmektedir (Pignon ve ark 2009, Brockstein ve ark 2011).

BBSHK'lerinin karsinogenezi ve altında yatan moleküler mekanizma hala net olarak ortaya konulamamıştır. BBSHK'lerinin karsinogenezinde en çok bilinen genetik değişiklikler arasında p53 ve retinoblastoma (pRB) yolaklarının inhibisyonu sonucu kontrol edilemeyen hücre çoğalması ve EGFR gibi farklı sinyal yolaklarında meydana gelen değişiklikler yer alır. Bu değişiklikler sonucunda hücreye normal olmayan mitojenik sinyaller gönderirilir ve hücre membranının aşağı yönündeki sinyal yolakları aktive olur (Qiu ve ark 2006, Poeta ve ark. 2007, Agrawal ve ark 2011, Janku ve ark 2013). BBSHK'lerinin hücresel çoğalması, skuamöz epitel farklılaşması, hücrelerin yaşam süresi, invazyonu ve metaztazı gibi fonksiyonel olaylarda, p53 ve pRB gibi genler dışında, BBSHK'leriyle bağlantılı diğer kanser genlerinin, sitokinlerin ve birden fazla sinyal yolağının etkin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, büyüme faktörleri ve sitokin sinyal

ağlarının kanser hücrelerinde ve çevresindeki dokularda, tümör ilerlemesinde, metastaz ve tedaviye dirençte çift yönlü olarak görev aldığını göstermektedir (Feurino ve ark 2006, Ara ve DeClerck 2010). Tümör hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin seviyesinin artması, hücre çoğalmasını artırır, anjiyogenezi ilerletir ve tümörle bağlantılı makrofajları, nötrofilleri ve mast hücrelerini işe karıştırır. Bu durumda ilave büyüme faktörleri salgılanır. Tümör hücre istilasını ve metastazı teşvik eden bir pozitif geri besleme döngüsü oluşur (Korkaya ve ark 2011). BBSHK'lerinde sitokinler ve bu sitokinlerle ilişkili olan sinyal yolakları hakkında detaylı çalışmalar bulunmamaktadır.

Mevcut çalışmada ilk olarak genel bir değerlendirme yapabilmek için, BBSHK'li hastaların ve sağlıklı kontrollerin serum örneklerinde, çeşitli hedef hücrelerde aktivasyonu, büyümeyi ve farklılaşmayı etkileyen moleküller olan sitokinlerin düzeyi belirlendi. Bunun için serum örneklerine antikor sıra analizi uygulandı. Antikor sıra analizi sonucunda kontrollere göre yüksek bulunan sitokinlerin ve bu sitokinlerle ilişkili olduğu düşünülen bazı genlerin (PTEN ve AKT) gen ekspresyon seviyeleri incelendi. Bu çalışma öncesinde gen ekspresyon çalışmalarının normalizasyonunda kullanılacak olan BBSHK'lerine ait housekeeping gen seçimi yapıldı ve en uygun housekeeping genler belirlendi. Uygun housekeeping gen seçiminin ardından antikor sıra analizinde yüksek bulunan sitokinlerin ve çalışmaya alınan diğer genlerin (EGFR, PDGFBB, IGFBP1, PTEN ve AKT) mRNA gen ekspresyon seviyeleri incelendi. mRNA gen ekspreyon analizleri; BBSHK'li 16 hastanın tümörlü-normal dokuları, larinkse ait tümörlü-normal dokuları, dile ait tümörlü-normal dokuları, yine bu grupların erken evre-ileri evreleri ve cinsiyet parametreleri arasında karşılaştırıldı. Ayrıca çalışmaya dâhil edilen BBSHK tümör hücre hattı olan SCCL-MT1 ile normal dokular; normal hücre hattı olan HEK-293 ile tümörlü dokular gen ekspresyonlarındaki kat artışları yönünden değerlendirildi. mRNA gen ekspresyon analizleri tamamlandıktan sonra bu sonuçları protein düzeyinde konfirme etmek amacıyla protein düzeyleri ve en sık fosforillenen bölgelerininin fosfo-protein ekspresyon düzeyleri incelendi.

Çalışmada ilk olarak değerlendirilen antikor sıra analizinde, sitokin ve büyüme faktörü panelinden seçilen 80 adet molekülden 4 tanesinin (EGF, IGF-1,

PDGFBB ve IGFBP-1) hasta serumlarındaki rölatif spot piksel düzeyleri, kontrollerdeki düzeylerine göre 2 kat ve üzerinde artmış olarak gözlendi. 2 kat ve üzeri azalış gösteren sitokin düzeyi gözlenmedi. Literatürde Chen ve ark. (1999) BBK'li hasta grubunun serum örneklerini kontrollerle kıyasladıklarında IL-6, IL-8 ve VEGF düzeylerini anlamlı bulmuşlardır. Diğer bir çalışmada Green ve ark (2012) BBK'li hastaların serum örneklerinde IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin düzeylerinin tedavi öncesinde, tedavi sonrasına göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki çalışmanın da sonucunda sitokinlerin yüksek seviyesinin BBK'lerinin patojenitesini artırabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin sinyal yolaklarını aktive ederek malign fenotipi ilerlettiği de bildirilmektedir (Yadav ve ark 2012). Literatürde BBK'lerinde yüksek olarak bildirilen sitokinlerden IL-8, IL-4 ve IL-6 mevcut çalışmada kullanılan sitokinlerden olup kontrollere göre daha yüksek seviyededir. Ancak bu çalışmada kontrollere göre sadece 2 kat ve üzeri artmış ve azalmış olanlar anlamlı kabul edildiğinden bu sitokinler değerlendirmeye alınmamıştır.

Antikor sıra analizinden sonra mRNA gen ekspresyon çalışmalarında kullanılacak uygun housekeeping genler ACTB ve GAPDH olarak belirlendi. Literatürde Lallemant ve ark (2009) BBSHK'lerinde yaptıkları housekeeping gen çalışmasında GAPDH ve SHAD genlerini en uygun housekeeping genler olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada Lallemant ve ark (2009) nın inceledikleri aday housekeeping genlerin dışında farklı genlerin incelenmesi ve ACTB'nin de BBSHK çalışmalarında kullanılabilir olması açısından literatüre yeni bir katkı sağlamıştır. Mevcut çalışmanın gen ekspresyon analizlerinde housekeeping gen olarak belirlenen genlerden GAPDH normalizasyon aşamalarında kullanılmıştır.

Antikor sıra analizi sonucu yüksek bulunan sitokinlerin ve incelenen diğer genlerin, mRNA gen ekspresyon analizlerinin değerlendirmeleri sonucunda; PTEN ve PDGFBB genleri mRNA gen ekspresyonları bakımından BBSHK'i tümörlü ve normal dokularının (n=16) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla >, p=0,006). Hem larinksin tümörlü ve normal dokuları hem de dilin tümörlü ve normal dokuları ayrı ayrı değerlendirildiğinde; sadece larinks doku grubunda PDGFBB geni istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,002). PTEN gen ekspresyonu ise her iki doku

grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bulundu (larinks dokuları p değeri=0,041; dil dokuları p değeri= 0,006). Çalışmadaki aynı hasta grubu aynı şekilde tümörün ileri evresi ve erken evresi arasında karşılaştırıldığında; sadece IGFBP1 gen ekspresyonu hem larinks kanserinin erken ve ileri evresi arasında (p=0,048) hem de larinks ve dilin birlikte olduğu tümör doku grubunun ileri ve erken evresi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,010).

BBSHK'li hastaların cinsiyetleri ile gen ekspresyonları arasındaki ilişki araştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunmadı.

Çalışmaya dâhil edilen SCCL-MT1 ile normal dokular arasındaki gen ekspresyonları arasındaki karşılaştırmada kat artışları ise EGFR geninde 2,7 kat artma, PDGFBB geninde 1,6 kat artma, IGFBP1 geninde 1,7 kat artma, AKT geninde 1,2 kat artma ve PTEN geninde 3,75 kat azalma şeklinde oldu. Tümörlü dokularla HEK-293 arasındaki gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında EGFR geninde 3,3 kat artma, PDGFBB geninde 0,8 kat artma, IGFBP1 geninde 3,3 kat artma, AKT geninde 1,4 kat artma ve PTEN geninde 15 kat azalma belirlendi. Tümörlü dokularda PTEN gen ekspresyonu normal dokulara göre 15 kat azaldı.

Gen ekspresyon sonuçlarına göre; incelenen genlerde dokular arasında anlamlı bulunan gen ekspresyon değişimlerinin sırasıyla PTEN geni, PDGFBB geni ve IGFBP1 genlerinde olduğu belirlendi.

Literatürde Kurasawa ve ark 2008 oral skuamöz hücre karsinomalarında yaptıkları çalışmada PTEN mRNA düzeyini tümörlü ve normal dokular ile kıyasladıklarında tümör dokularında mRNA düzeyinin azaldığını rapor etmişlerdir. Burgucu ve ark. (2012) BBSHK'li tümör ve normal doku örneklerinde PTEN geni ekspresyonlarını incelediklerinde tümör dokularında gen ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada hem larinks hem dil dokuları ayrı ayrı incelendiğinde gen ekspresyon düzeyi açısından araştırılan genler arasında PTEN geni, tümör ve normal dokular karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak en anlamlı düzeyde farklılık gösteren gen oldu. PTEN, PIP3'ü defosforile ederek PI3K ürününü degrade eder. PTEN'in azalan ekspresyonu ya da fonksiyonunun kaybı, önemli mesajcı lipidlerin

birikimine ve AKT'nin fosforilasyonuna yol açabilir. PTEN'in azalan ekpresyonu dolayısıyla apoptozisten kaçışa ve mitotik sinyallerin artmasına neden olur. Bu nedenle incelenen genler arasında PTEN geni, BBSHK'lerinde genomik kararsızlığa en fazla neden olan gen olabilir. Ayrıca literatürde gen ekspresyonu bakımından hem larinks hem de dil dokusunun birden incelendiği ilk çalışmadır. Tümörlerin lokalizasyonları farklı olsada skuamöz epitelden köken almaları aynı genomik değişikliklerin olabileceğini göstermektedir. Dil ve larinks tümörlerine ait örnek sayıları artırılarak bu değişimler daha geniş populasyonlarda değerlendirilebilir. PTEN gen ekspresyonunun azalması larinks ve dil dokularının karsinogenezinde önemli rol oynamaktadır.

Gen ekspresyon sonuçlarında diğer anlamlı çıkan genlerden biri olan PDGFBB, PDGFR-beta için en yüksek afiniteli moleküldür. PDGF'nin aşırı ekpresyonunun tümörün büyümesini ve tümörün çevresindeki stromanın anjiyogenezini düzenlediği pek çok insan tümörlerinde bildirilmiştir (Henriksen ve ark 1993, Kawai ve ark 1997). Mevcut çalışma PDGFBB geni için larinkse ve dile ait tümörlü ve normal dokuları hem ayrı ayrı ve hem de ikisi birlikte olarak gen ekpresyonu düzeyinde araştıran bir çalışma olmuştur. Çalışma sonuçlarında larinkse ait tümör ve normal dokular arasındaki PDGFBB gen ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,002$). Larinks ve dile ait tüm tümör dokuları ile normal dokuları karşılaştırıldığında da PDGFBB gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,006$). Daha önce farklı dokularda yapılan çalışmalar (Nissen ve ark 2007, Xue ve ark 2011) anjiyojenik faktörlerden olan PDGFBB'nin tümörün büyümesine otokrin bir şekilde ya da tümör çevresindeki stromayı değiştirerek katkı sağladığını göstermektedir. Bu durumun PDGFBB'nin hem yeni damar oluşumunu hem de metastazını artırdığı bildirilmektedir (Nissen ve ark 2007, Xue ve ark 2011). PDGF'nin sentezi genellikle, düşük oksijen, trombin ve sitokinler gibi dış uyaranların uyarmasıyla artar (Betsholtz 1993). Böylece hücre içi sinyal yolakları aktive olarak aşağı yönde sinyal iletimini sağlar. Mevcut çalışma hem antikor sıra analizi hem de gen ekspresyon sonuçlarının birbirleriyle benzer olarak PDGFBB'nin artan düzeyini göstermektedir.

Çalışmadaki mRNA gen ekspresyon sonuçlarına göre ileri ve erken evre karşılaştırmasında; larinksin ileri evre ve erken evresinde IGFBP1 gen ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,04). Larinks ve dil dokularının birlikte olduğu ileri evre erken evre karşılaştırmada da yine farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,01). Bu durum IGFBP1'in aşırı gen ekspresyonunun larinks tümörlerinin ve BBSHK'leri karsinogenezinin ileri evrelerinde görülen moleküler olaylardan biri olduğunu göstermektedir.

mRNA gen ekspresyonu bakımından incelenen diğer genlerden birisi de EGFR genidir. EGFR, BBSHK'lerinin patogenezinde genellikle ilk sorumlu tutulan gendir ve monoklonal antikor temelli tedavileri genel olarak anti-EGFR'ye yöneliktir. Mevcut çalışmada, antikor sıra analizinde EGF'nin sitokin olarak değeri en yüksek seviyede olmasına rağmen; gen ekspresyon seviyeleri açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,33). Bu durum, EGF'nin serum sitokin seviyesindeki artışının diğer dokulardan kaynaklanabilecegini düşündürmektedir.

mRNA gen ekspresyon analizlerinde değerlendirilen son gen ise pek çok reseptör tirozin kinaz sinyallerinin iletildiği PTEN/AKT yolağındaki AKT genidir. AKT geninin ekpresyon düzeyi BBSHK'lerine ait hem tümörlü ve normal dokularda hem de larinks ve dil tümörleri ayrı ayrı karşılaştırıldı. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

mRNA gen ekspresyonu bulgularından sonra yapılan western blot analizlerinde PTEN'in protein ve fosfo-protein düzeyleri kanserli (SCCL-MT1) ve normal (HEK-293) hücre hatlarında karşılaştırıldı. PTEN protein (p=0,02) ve fosfo-protein düzeyleri (p= 0,01) her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Aynı şekilde tümör dokular normal dokular karşılaştırıldığında ise BBSHK tümörlü dokularda normal dokulara göre azaldığı gözlendi. Ancak bu farklılık PTEN proteini ve fosfo-proteininde istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla p=0,09, p=0,17). Tümörlü hücre hattındaki ve tümörlü dokulardaki PTEN proteininin fosforilasyonu (Ser380, Thr382, Thr383) PTEN'in tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybına neden olmasıyla açıklanabilir. PTEN geni PI3K/AKT yolağında merkezi rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir. PTEN geninin birçok kanserde regülasyonunun bozulduğu

bildirilmektedir (Whang ve ark. 1998, Cristofano ve ark 2000). Çalışmada elde edilen bulgulara göre hem BBK'li hücre hattında hem de tümör dokularında PTEN protein ve fosfo protein düzeyi önemli ölçüde azalmıştır. BBSHK'lerinde PTEN geni mRNA seviyesinin ve protein düzeyinin tümörlü dokularda diğer incelenen genlere göre seviyesinin en düşük olması bu genin BBSHK'lerindeki önemini ortaya koymaktadır. Bu nedenle hastalığın patogenezinin aydınlatılmasında ve hedefe yönelik tedavilerde PTEN geni üzerinden yapılacak çalışmalar daha anlamlı olacaktır.

Çalışmada PDGFRB ve pPDGFRB (tyr751)'e ait protein ve fosfoprotein düzeylerinin tümör ve normal dokularda kıyaslandığında tümör dokularındaki düzeylerinin normal dokulara göre daha fazla olduğu belirlendi. Bu farklılık hem protein hem fosfo-protein düzeyde istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla p= 0,01, p=0,04). Literatürde Ongkeko ve ark (2005)'nın immunhistokimyasal olarak yaptıkları çalışmalarında PDGFRB'nin protein düzeyinin tümör örneklerinde bening örneklerden daha yüksek seviyede olduğunu bildirmişlerdir. PDGFRB'nin protein düzeyinin tümör dokularda yüksek olmasına dayanarak kinazların ekpresyonunun tirozin ve serin-treonin kinaz inhibitörleri ile BBSHK'lerinin tedavi olasılığını yükselteceğini belirtmişlerdir. PDGF/PDGFRB yara iyileşmesi, inflamasyon ve anjiyogenezde önemli tirozin kinazlardır. PDGFRB'ler menenjioma, prostat kanseri, akciğer kanseri ve miyeolid malignensilerde onkojenik rol oynarlar (Guha ve ark 1995, Fudge ve ark 1995, Schwaller ve ark 2001). Mevcut çalışmada da PDGFRB'nin BBSHK'lerinde onkojenik rol oynayabileceği ve ileri çalışmalarda hücre yüzey reseptörü olarak inhibisyonunun hastalığın tedavisi üzerinde etkili olabileceği düşünülebilir.

Protein ekpresyon analizlerinde hücre yüzey reseptörlerinden IGF-1R, IRβ, pIGF-1R(Tyr/1131)/IRβ(Tyr1146) ve pIGF-1R(Tyr/980)'nin protein ve fosfo-protein seviyeleri western blot analizi ile incelendi. Ancak sadece IGF-1R'nin tümörlü ve normal dokularda protein seviyesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,01). pIGF-1R (tyr1131) fosfo-protein düzeyi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da tümör dokulardaki seviyesi daha yüksekti. Ayrıca BBSHK'li hücre hattıyla normal hücre hattı (HEK-293) karşılaştırıldığında hem IGF-1R protein

düzeyi (p=0,01) hem de fosfo-protein IGF-1R düzeyi (p=0,01) istatistiksel olarak anlamlıydı. Mevcut çalışma BBSHK'lerinde IGF-1R, IRβ, pIGF-1R(Tyr/1131)/IRβ(Tyr1146) ve pIGF-1R(Tyr/980) bölgelerinin tümünün çalışıldığı ilk çalışmadır. IGF-1R epitelyal kanserlerde hücre gelişimi, proliferasyon, motilite ve survide kritik rol oynar. Ayrıca son dönem yeni terapötik ajanların hedefinde gösterilen moleküllerden biridir (Barnes ve ark 2007). Barnes ve ark. (2007) baş boyun kanserlerinde yaptıkları çalışmalarında IGF-1R ekspresyonunun tümörlerde arttığını ve baş-boyun kanseri hücre hattında IGF-1R sinyalinin tümörjeniteyi önemli bir şekilde arttırdığını ilk kez göstermişlerdir. Ayrıca EGFR ve IGF-1R'nin heterodimerizasyon yaptığını ve baş-boyun kanserleri için kombine anti-reseptör tirozin kinaz terapi olabileceğini bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada fosfo protein düzeyi yüksek bulunan pIGF-1R (Tyr 980) bölgesi de diğer fosfo-protein düzeyleri yüksek bulunan pEGFR ve pPDGFBB hücre yüzey reseptörleriyle heterodimerizasyon yaparak baş-boyun kanseri gelişmesine neden olabilir. Bu konuda yapılacak çalışmaların mekanizmanın aydınlatılmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Protein ekspresyon analizlerinde hücre yüzey reseptörü olarak EGFR protein ve fosfo protein düzeyleri incelendi. Western blot sonuçlarına göre BBSHK'li hücre hattıyla normal hücre hattı (HEK-293) karşılaştırıldığında hem EGFR protein düzeyi (p=0,01) hem de fosfo-protein EGFR (tyr1068) düzeyi (p=0,01) istatistiksel olarak anlamlıydı. Tümörlü ve normal dokular karşılaştırıldığında ise fosfo-EGFR (tyr1068) protein düzeyi tümörlü dokularda daha fazlaydı (p=0,02). Ancak EGFR protein düzeyi tümörlü dokularda fazla olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi (p= 0,29). Bu sonuç yüksek EGFR protein düzeyinin mRNA ekspresyonu ile ilişkili olmadığını gösterdi. Maiti ve ark (2013) BBSHK'li hastalara ait tümörlü ve normal dokularda ve hücre hatlarında EGFR protein ve gen düzeyinde incelediklerinde protein aşırı ekspresyonu ve mRNA ekspresyonu/gen amplifikasyonu arasında bir korelasyon olmadığını rapor etmiştir. Bu sonuçlar gen ekspresyonlarının yalnızca transkripsiyonel olarak düzenlenmediğini, transkripsiyon ve translasyon arasında pek çok posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel işlem olduğunu göstermektedir. Özellikle transkripsiyon faktörleri, kromatin modifiye genler ve sinyal yolağı genleri stabil olmayan mRNA ve protein ekpresyon seviyelerine sahiptir (Schwanhausser ve

ark 2011). Mevcut çalışma sonuçlarında EGFR geninin mRNA ekspresyon ve protein düzeyi arasında korelasyon bulunmaması EGFR' nin sinyal yolağı genlerine dahil olmasıyla açıklanabilir. Literatürde BBK'li hastaların tümörlü dokularında EGFR (tyr1068)'in hem protein düzeyi hem de fosfo protein düzeyinin artmış olduğu gösterilmektedir (Wheeler ve ark 2012). Bu durum ileri evre tümör düzeyi ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca EGFR (tyr1068) düzeyinin total EGFR'den bağımsız bir prognostik bilgi sağladığı belirtilmektedir.

Protein ekspresyonu analizlerinde BBSHK'lerine ait tümörlü ve normal dokularda AKT protein ve fosfo-AKT protein düzeylerine bakıldığında da istatistiksel bir fark gözlenmedi (sırasıyla p=0,45, p=0,16). BBSHK'li hücre hattıyla normal hücre hattı (HEK-293) karşılaştırıldığında AKT protein düzeyi (p=0,36) fosfo- AKT protein düzeyinin (p=0,08) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Fosforile AKT, PI3K/AKT yolağının aktif bir parçasıdır. Fosforilasyon ile proapoptotik genlerin inaktivasyonu boyunca hücresel survinin desteklenmesiyle sonuçlanması gibi pek çok etkiye sahiptir. Bu çalışmadaki AKT protein bulgularına göre tümörlü dokularda AKT proteini normal dokulara kıyasla daha yüksekti. Clark ve ark (2010) yaptıkları çalışmada BBSHK'li hastaların tümör dokuları ve kanser olmayan kişilerin oral mukoza örneklerini kıyasladıklarında fosforile AKT protein düzeyinin önemli ölçüde tümör dokularında oral mukoza hücrelerinden yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Hem mevcut çalışma bulguları hem de literatürde belirtilen çalışmalar tümör dokularında AKT gen ekspresyonu ve protein seviyesinin normal dokulara oranla daha fazla düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu da AKT'nin pek çok hücresel olayda aktif rol oynamasından dolayı BBSHK'lerinin tümörgenezinde de önemini göstermektedir. Bu çalışmadaki bulgular örnek sayılarının artırılmasıyla yeniden değerlendirilebilir.

BBSHK'lerinin patogenezi çok çalışılmış olmasına rağmen, hastalığın moleküler mekanizması tam olarak çözülememiştir. Bu nedenle hastalığın tedavisinde mevcut uygulamalar yetersiz kalabilmektedir. Bu çalışmada, BBSHK'lerinde bazı genlerin mRNA ve protein seviyesinde ifadeleri incelenerek, sitokin temelli sinyal yolağı belirlenmeye çalışıldı. EGF, IGF-1, PDGFBB ve IGFBP-1 sitokinlerinin seviyelerinin arttığı gösterildi. Sitokinlerin ve ilişkili olduğu

düşünülen bazı genlerin mRNA gen ekpresyon seviyeleri incelendi. Bu çalışma öncesinde mRNA gen ekpresyon seviyelerinin normalizasyonunda kullanılacak GAPDH ve ACTB uygun housekeeping genler olarak belirlendi. Bu genler BBSHK'lerinde yapılacak diğer gen ekspresyon çalışmalarında da kullanılabilir. PTEN ve PDGFBB'nin mRNA düzeyinde gen ekspresyonları tümörlü dokularda normal dokulara göre artmış olduğu gösterildi. Ayrıca IGFBP-1'in erken ve ileri evre tümörlü gruplar arasında gen ekspresyonlarının farklı olduğu gösterildi. Bu genlerin hücre yüzey reseptörlerinin protein ve fosfo-protein ekspresyon seviyeleri belirlendi. BBSHK'lerinin tümörlü dokularda aşırı eksprese olan hücre yüzey reseptörleri EGFR, PDGFRB ve IGF-1R olarak belirlendi. Hücre yüzey reseptörleri, sitokinler ve membranla bağlantılı proteinlerin ekspresyonları genellikle tümörlü dokularda aşırı miktarda artmaktadır. Bu durum hastalıkların patogenezinin belirlenmesinde önemli belirteç olarak kullanılabilmektedir. Hücre yüzey reseptörleri hücre dışından gelen sinyallerle fosforillenmesi sonucunda aktif duruma geçerler. Böylece sitoplazmadaki hedef proteinleri ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. Bu çalışmada, BBSHK'lerinde aşırı eksprese hücre yüzey reseptörlerini belirleyerek potansiyel sinyal yolağ(lar)ı tanımlanmıştır. Hücre yüzey reseptörlerinin fosforillenmesi sonucu bu proteinler genellikle hücre içi sinyal yolaklarının aktivitelerinin belirlenmesinde ve bu yolakları baskılayarak potansiyel yeni tümör markerlarının ve ilaç tasarımlarında kullanılabilir. Bu çalışmanın bulguları, BBSHK'lerinde EGFR dışında, diğer hücre yüzey reseptörlerinin de aşırı ifadesini göstermiştir. Bu veriler birbirlerini destekleyici nitelikte olup, BBSHK'lerinin patogenezinde önemli olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, BBSHK'lerinde hücre sinyal iletiminin ilk basamağında yeralan sitokinlerin belirlenmesi ve bu sitokinlerle ilgili yolakta yer alan genlerin ekspresyonlarının mRNA ve protein seviyesinde belirlenerek sitokin temelli sinyal yolağının ortaya konması amaçlanmıştır.

Bunun için BBSHK'li hastaların tümör ve normal dokularından RNA ve protein izolasyonları, iki ayrı hücre hattından kültür, bu kültürlerden RNA ve protein izolasyonu, antikor sıra analizleri, qRT-PZR ve western blot analizleri yapıldı.

Araştırma sonucunda BBSHK'lerinde EGF, IGF-1, PDGFBB ve IGFBP-1 sitokin seviyelerinin artmış olduğu belirlendi. Bu sitokinlerin ve etkilediği düşünülen bazı genlerin mRNA gen ekpresyon seviyeleri incelendi. Öncesinde mRNA gen ekpresyon çalışmalarının normalizasyonunda kullanılacak olan uygun housekeeping genler belirlendi. Bu çalışmada belirlenen uygun housekeeping genler BBSHK'leri için bundan sonra yapılacak gen ekspresyon çalışmalarında kullanılabilecektir. mRNA gen ekspresyon çalışmalarında PTEN ve PDGFBB genlerinin tümör ve normal dokularda gen ekspresyon değişimlerinin anlamlı olduğu ve PTEN mRNA gen ekpresyon seviyesinin BBSHK'lerinin tümörlü grubunda önemli ölçüde azaldığı gösterildi. Tümörlü dokularda hücre yüzey reseptörlerinden PDGFRB ve IGFR-1R'nin protein seviyelerinin; EGFR ve PDGFRB'nin ise fosfo protein seviyelerinin artmış olduğu belirlendi. Yine PTEN tümör baskılayıcı geninin tümörlü dokularda seviyesinin azaldığı hem protein seviyesinde hem de mRNA seviyesinde tespit edildi.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda EGFR, PDGFRB ve IGF-1R hücre yüzey reseptörleri baskılanarak bu yolağın BBSHK'lerinin ana yolağı mı yoksa alternatif bir yolak olup olmadığı belirlenebilir. Eğer bu yolak hastalıkta etkili olan ana yolak ise; hastalığın patogenezi ve tedavisi üzerine etkileri araştırılabilir. Böylelikle BBSHK'lerinin sinyal yolağı ve hastalığın patogenezi hakkında daha özgül bilgiler elde edilebilir.

6. KAYNAKLAR

Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Treviño L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN, 2011. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. Science, 333, 1154–1157.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF, 2004. Normalization of realtime quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res, 64, 5245–5250.

Ara T, DeClerck YA, 2010. Interleukin-6 in Bone Metastasis and Cancer Progression Eur J Cancer. 46, 1223–1231.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL, 2008. Head and neck cancer. Lancet, 371, 1695-709.

Ataman ÖU, Akman F, Dağ N, İkiz AÖ, Şen M, Sarıoğlu S, Kınay M, Ceryan K, 2006. Erken evre larenks karsinomlu 144 hastada radikal radyoterapi sonuçlarımız. Türk Onkoloji Dergisi, 21, 143-150.

Atanasova M, Whitty A, 2012. Understanding cytokine and growth factor receptor activation mechanisms. Crit Rev Biochem Mol Biol, 47, 502-30.

Bagan JV, Scully C, 2008. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. Oral Oncol, 44, 103-8.

Balz V, 2003. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2–11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. Cancer Res, 63, 1188–1191.

Barnes CJ, Ohshiro K, Rayala SK, El-Naggar AK, Kumar R, 2007. Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. Clin Cancer Res, 4291, 13-14.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2002. Biochemistry. In: Signal-Transduction Pathways: An Introduction to Information Metabolism. 5th ed. New York: Palgrave MacMillan, p.1100.

Berns K,Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R, 2007. A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. Cancer Cell, 12, 395–402.

Betsholtz C, 1993. The PDGF genes and their regulation. In: Biology of platelet-derived growth factor 5th ed. Switzerland: Karger, p.11-30.

Bonner JA, 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, 35, 567–578.

Boerboom D, Brown KA, Vaillancount D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, Dore M, Sirois J, 2004. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometriumduring late diestrus and early pregnancy. Biol Reprod, 70, 391–399.

Bogaert L, Van Poucke M, De Baere C, Peelman L, Gasthuys F, Martens A, 2006. Selection of a set of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in normal equine skin and in equine sarcoids. BMC Biotechnol, 6-24.

Brockstein B, Masters G, 2003. Head and neck cancer. Switzerland: Springer, p.1–3.

Brockstein BE, 2011. Management of recurrent head and neck cancer: recent progress and future directions. Drugs, 71, 1551–1559.

Burgucu D, Guney K, Sahinturk D, Ozbudak IH, Ozel D, Ozbilim G, Yavuzer U, 2012. Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. BMC Cancer, 12-481.

Califano J, Riet P, Westra W, 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res, 56, 2488–2492.

Cann CI, Fried MP, Rothman KJ, 1985. Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck.Otolaryngol Clin North Am, 18, 367-88.

Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML, 2013. Worldwide Trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. J Clin Oncol, 31, 4550–4559.

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML, 2008. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. J Clin Oncol, 26, 612–619.

Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C, 1999. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. , 5, 1369-79.

Clark C, Shah S, Herman-Ferdinandez L, Ekshyyan O, Abreo F, Rong X, McLarty J, Lurie A, Milligan EJ, Nathan CO, 2010. Teasing out the best molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. Laryngoscope, 120, 1159-65.

Cooper GM, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım. Üçüncü baskı. İzmir. Brc Ofset. 2006.

Cristofano AD, Pandolfi PP, 2000. The multiple roles of PTEN in tumor suppressor. Cell, 100, 387-390.

Davies RL, Grosse VA, Kucherlapati R, Bothwell M, 1980. Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. Proc Natl Acad Sci, 77, 4188-4192.

Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH, 1987. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors α and β and the epidermal growth factor by human tumors. Cancer Res, 47, 707–712.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS, 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res, 19, 4008.

Erkens T, Poucke MV, Vandesompele J, Goossens K, Zeveren AV, Peelman LJ, 2006. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. BMC Biotech, 6-41.

Esteller M, 2008. Epigenetics in cancer. N Engl J Med, 358, 1148–59.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM, 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in. Int J Cancer, 127, 2893–2917.

Ferrara N, 2002. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. Nat Rev Cancer, 2, 795–803.

Feurino LW, Fisher WE, Bharadwaj U, Yao Q, Chen C, Li M, 2006. Current update of cytokines in pancreatic cancer: pathogenic mechanisms, clinical indication, and therapeutic values. Cancer Invest, 24, 696-703.

Fidler IJ, 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer, 3, 453-458.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D, 2001. Head and neck cancer. N Engl J Med, 27, 1890-900.

Friedberg EC, 2003. DNA damage and repair. Nature, 23, 436-440.

Fruman DA, Rommel C, 2014. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. Nature Reviews Drug Discovery, 13, 140–156.

Fudge K, Bostwick DG, Stearns ME, 1996. Platelet derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasia. Prostate, 29, 282–286.

Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ, 2007. Global Cancer Facts & Figures. American Cancer Society. 2nd ed. Atlanta, p.1-35.

Graham H, Peng, C, 2006. Activin receptor-like kinases: Structure, function and clinical implications. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 6, 45–58.

Grandis JR, Tweardy DJ, 1993. Elevated levels of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res, 53, 3579–3584.

Green VL, Michno A, Greenman J, Stafford ND, 2012.Effect of treatment on systemic cytokines in head and neck squamous cell carcinoma patients. Results Immunol, 2, 1–6.

Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD, 1995. Expression of PDGF and PDGF Receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. Int J Cancer, 60, 168–173.

Hama T, Yuza Y, Saito Y, Ouchi J, Kondo S, Okabe M, Yamada H, Kato T, Moriyama H, Kurihara S, Urashima M, 2009. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. Oncologist, 14, 900–908.

Han Z, Hong L, Han Y, Wu K, Han S, Shen H, Li C, Yao L, Qiao T, Fan D, 2007. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax. J Exp Clin Cancer Res, 26, 261-268.

Heldin, CH, Westermark B, 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor. Physiol Rev, 79, 1283–1316.

Henriksen R, Funa K, Wilander E, Backstrom T, Ridderheim M, Oberg K, 1993. Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasms. Cancer Res, 53, 4550 –4554.

Hittelman WN, 2001. Genetic instability in epithelial tissues at risk for cancer. Ann NY Acad Sci, 952, 1–12.

Huang, EJ, Reichardt LF, 2001. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci, 24, 677-736.

Hunter T, 2000. Signaling and beyond. Cell, 100, 113-127.

Hynes NE, Lane HA, 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. Nat Rev Cancer, 5, 341-354.

Janku F, Wheler JJ, Naing A, Falchook GS, Hong DS, Stepanek VM, Fu S, Piha-Paul SA, Lee JJ, Luthra R, Tsimberidou AM, Kurzrock R, 2013. PIK3CA mutation H1047R is associated with

response to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in early-phase clinical trials. Cancer Res, 73, 276–284.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ, 2008. Cancer statistics. CA Cancer J Clin, 58, 71–96.

Jones JI, Clemmons DR, 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev, 16, 3-34.

Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD, 1990. Overexpression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. Molecular and Cellular Biology, 10, 464–473.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF, 2006. Patterns of cancer incidence, mortality, andprevalence across five continents: defining prioritiesto reduce cancer disparities in different geographicregions of the world. J Clin Oncol, 24, 2137–2150.

Kandasamy K, Srivastava RK, 2002. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. Cancer Res, 62, 4929-4937.

Kaneda A, Wang CJ, Cheong R, Timp W, Onyango P, Wen B, Iacobuzio-Donahue CA, Ohlsson R, Andraos R, Pearson MA, Sharov AA, Longo DL, Ko MS, Levchenko A, Feinberg AP, 2007. Enhanced sensitivity to IGF-II signaling links loss of imprinting of IGF2 to increased cell proliferation and tumor risk. Proc Natl Acad Sci, 26, 20926-20931.

Kawai T, Hiroi S, Torikata C, 1997 . Expression in lung carcinomas of platelet-derived growth factor and its receptors. Lab Invest, 77, 431–436.

Kierszenbaum AL, 2007. Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. 2nd ed. Canada: Elsevier; p. 85-104.

Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, 2007. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. Int J Cancer, 120, 1418-1425.

Korkaya H, LiuS, Wicha MS, 2011. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. J Clin Invest, 121, 3804–3809.

Kruttgen A, Schneider I, Weis J, 2006. The dark side of the NGF family: Neurotrophins in neoplasias. Brain Pathol, 16, 304-310.

Lallemant B, Evrard A, Combescure C, Chapuis H, Chambon G, Raynal C, Reynaud C, Sabra O, Joubert D, Hollande F, Lallemant JG, Lumbroso S, Brouillet JP, 2009. Reference gene selection for head and neck squamous cell carcinoma gene expression studies. BMC Mol Biol, 78, 1-10.

Le QT, Fu KK, Kroll S, Ryu JK, Quivey JM, Meyler TS, Krieg RM, Phillips TL, 1997. Influence of fraction size, total dose, and overall time on local control of T1-T2 glottic carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 39, 115–126.

Lefebvre JL, 2005. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. Annal Oncol, 16, 7-12.

Lembo-Fazio L, Nigro G, Noe G, Rossi G, Chiara F, Tsilingiri K, Rescigno M, Rasola A, Bernardini ML, 2011. Gadd45a activity is the principal effector of Shigella mitochondria-dependent epithelial cell death in vitro and ex vivo. Cell Death Dis, 2, 1-12.

Lemmon MA, Schlessinger J, 2010. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Cell, 141, 1117-1134.

Lewis R, 2012. Human Genetics: Concepts and Applications. 10th ed. Boston: McGraw-Hill, p.353.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC, 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. Nature Cell Biol, 3, 802–808.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25, 402-408.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF, 2007. The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol, 23, 675–699.

Luo J, Manning BD, Cantley LC, 2003. Targeting the PI3K–AKT pathway in human cancer: rationale and promise. Cancer Cell, 4, 257–262.

Maiti GP, Mondal P, Mukherjee N, Ghosh A, Ghosh S, Dey S, Chakrabarty J, Roy A, Biswas J, Roychoudhury S, Panda CK, 2013. Overexpression of EGFR in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Inactivation of SH3GL2 and CDC25A Genes. PLoS One, 10, 1-14.

Malinowsky K, Nitsche U, Janssen KP, Bader FG, Späth C, Drecoll E, Keller G, Höfler H, Slotta-Huspenina J, Becker KF, 2014. Activation of the PI3K/AKT pathway correlates with prognosis in stage II colon cancer. British Journal of Cancer. 110, 2081-2089.

Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S, Lotan R, Hong WK, 1996. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. Cancer Res,15, 5600-5604.

McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK, 2002. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. Lancet Oncol, 3, 280-288.

Miller BS, Yee D, 2005. Type I insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in cancer. Cancer Res, 65, 10123-10127.

Morandell S. Phosphoproteomics strategies for the functional analysis of signal transduction. Proteomics. 2006; 6: 4047–4056.

Murar S, Forastiere AA, 2008. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc, 83, 489–501.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK, 1998. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. Proc Natl Acad Sci, 95, 13513-13518.

Nell BG, Tonks NK, 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. Curr Opin Cell Biol, 9, 193-204.

Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, Wang Z, Zhao X, Wetterskog D, Funa K, Bråkenhielm E, Cao Y, 2007. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. J Clin Invest, 117, 2766-2777.

Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez J, 2005. Expression of Protein Tyrosine Kinases in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Am J Clin Pathol, 124, 71-76.

Ornitz DM, Itoh N, 2001. Fibroblast growth factors. Genome Biol, 2, 3005.

Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B, 1986. Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. J Pathol, 149, 9–14.

Pai SI, Westra WH, 2009. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. Annu Rev Pathol, 4, 49-70.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P, 2005. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 55, 74–108.

Pawson T, Raina M, Nash P, 2002. Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. FEBS Lett, 513, 2–10.

Pawson T. Protein modules and signalling networks. Nature. 1995; 373: 573–580.

Pietras K, Sjoblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A, 2003. PDGF Receptors as cancer drug targets. Cancer Cell, 3, 439–443.

Pignataro L, Capaccio P, Carboni N, Pruneri G, Ottaviani A, Buffa R, Broich G, 1998. p53 and cyclin X D1 protein expression in carcinomas of the parotid gland. Anticancer Res, 18, 1287-1290.

Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Group M-NC, 2009. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. Radiother Oncol, 92, 4–14.

Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM, 2007. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, 357, 2552–2561.

Posner BI, Laporte SA, 2010. Cellular signalling: Peptide hormones and growth factors. Prog Brain Res, 181, 1–16.

QiuW, Schonleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, Bennett BP, Su GH, 2006. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 12, 1441–1446.

Robinson DR, Wu YM, Lin SF, 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene, 19, 5548–5557.

Rocco JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW, 2006. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. Cancer Cell, 9, 45–56.

Ronchetti D, Neglia CB, Cesana BM, Carboni N, Neri A, Pruneri G, Pignataro L, 2004 . Association between p53 Gene Mutations and Tobacco and Alcohol Exposure in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 3, 303-306

Roskoski R Jr, 2004. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. Biochem Biophys Res Commun, 319, 1-11.

Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Kowalski LP, 1999. Effect of Smoking Cessation and Tobacco Type on the Risk of Cancers of the Upper Aero-Digestive Tract in Brazil. Epidemiology, 4, 412-418.

Schlessinger J, Ullrich A, 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. Neuron, 9, 383-391.

Schwaller J, Anastasiadou E, Cain D, Kutok J, Wojiski S, Williams IR, LaStarza R, Crescenzi B, Sternberg DW, Andreasson P, Schiavo R, Siena S, Mecucci C, Gilliland DG, 2001. H4(D10S170) a gene frequently rearranged in papillary thyroid carcinoma, is fused to the chronic myeloid leukemia with t(5;10)(q33;q22). Blood, 97, 3910–3918.

Schwanhausser, B., D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, M. Selbach, 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. Nature, 473, 337-342.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W, 1953. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. Cancer, 6, 963-968.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Hauge, TH, Turek LP, 2004. Age, Sexual Behavior and Human Papillomavirus Infection in Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. Int J Cancer, 5, 766-772.

Squarize CH, Castilho RM, Abrahao AC, Molinolo, Lingen MW, Silvio SJ, 2013.PTEN Deficiency Contributes to the Development and Progression of Head and Neck Cancer. Neoplasia, 15, 461–471.

Stroud RM, Wells JA, 2008. Mechanistic diversity of cytokine receptor signaling across cell membranes. Curr Opin Chem Biol, 12, 427–433.

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H, 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,- triphosphate and AKT/protein kinase B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci, 96, 6199-6204.

Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ, 2001. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. Clin Cancer Res,7, 1523-1532.

Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJ, 2004. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. Clin. Cancer Res, 10, 3607–3613.

Testa JR, Bellacosa A, 2001. AKT plays a central role in tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci, 98, 10983–10985.

Tonks NK, Nell BG, 1996. From Form to Function: Signaling by Protein Tyrosine Phosphatases. Cell, 87, 365-368.

Ullrich A, Schlessinger J, 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell, 61, 203-212.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal controlgenes. Genome. Biol, 3, 1-12.

Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA, Snow GB, Brakenhoff RH, 2000. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. Clin Cancer Res, 6, 3803-3816.

Vazquez-Lombardi R, Roome B, Christ D, 2013. Molecular engineering of therapeutic cytokines. Antibodies, 2, 426-451.

Vogelstein B, Kinzler V, 2004. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med, 10, 789-799.

Wannenmacher M, Debus J, Wenz F, 2006. Strahlentherapie. Springer, p. 344-345.

Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter R, Tran C, Vessella RL, Saidi JW, Isaacs WB, Sawyers CL, 1998. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. Proc Natl Acad Sci, 95, 5246–5250.

Wheeler S, Siwak DR, Chai R, LaValle C, Seethala RR, Wang L, Cieply K, Sherer C, Joy C, Mills GB, Argiris A, Siegfried JM, Grandis JR, Egloff AM, 2012. Tumor Epidermal Growth Factor Receptor and EGFR PY1068 Are Independent Prognostic Indicators for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Clin Cancer Res, 18, 1–12.

Whitty A, Riera TV, 2008. New ways to target old receptors. Curr Opin Chem Biol, 12, 427-433.

Worsham MJ, ChenKM, Meduri V, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, Benninger MS, 2006. Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 132, 668–677.

Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL, 1998. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3- kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci, 95, 15587-15591.

Xue Y, Lim S,Yang Y, Wang Z, Jensen LDE, Hedlund EM, Andersson P, Sasahara M, Larsson O, Galter D, Cao R, Hosaka K, Cao Y, 2012. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. Nature Medicine, 18, 100–110.

Yadav NK, Shukla P, Singh P, Bansode FW, Singh RK, 2012. Role of Cytokine Signalling in head and neck cancers. Int J App Basic Med Res, 2, 102-107.

Yamada KM, Araki M, 2001. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. Journal of Cell Sci, 114, 2375-2382.

Yarden Y, Ullrich A, 1988. Growth factor receptor tyrosine kinases. Ann Rev Biochem, 57, 443–478.

Yen TT, Lin WD, Wang CP, Wang CC, Liu SA, 2008. The association of smoking, alcoholic consumption, betel quid chewing and oral cavity cancer: a cohort study. Eur Arch Oto-Rhino-L, 265, 1403-1407.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, 1997. Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science, 276, 1268-1272.

Zhang, YW, Davis EG, Bai J, 2009. Determination of internal control for gene expression studies in equine tissues and cell culture using quantitative RT-PCR. Vet. Immunol. Immunopathol, 130, 114–119.

7. EKLER

EK-A. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SELÇUKLU TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARLARI

Toplantı Sayısı: 02 Toplantı Tarihi : 29.03.2011

Karar Sayısı 2011-08 Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Tülün ÇORA'nın, proje yürütücülüğünü yaptığı "Baş-Boyun Kanserlerinde PTEN Genini İçeren Hücre Sinyal İletim Yolaklarının Araştırılması" başlıklı doktora tezi araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 25.03.2011 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.Tülün ÇORA'nın, proje yürütücülüğünü yaptığı doktora öğrencisi Aysel KALAYCI'nın, 'Baş-Boyun kanserlerinde PTEN geninin ve genin etkileşimde olduğu diğer hedef genlerin sinyal iletim yolaklarındaki rolünü belirlemek" temel amaçlı olan "Baş-Boyun Kanserlerinde PTEN Genini İçeren Hücre Sinyal İletim Yolaklarının Araştırılması" başlıklı araştırma projesinin (Doktora tezi) kabulüne oy birliği karar verildi.

ASLI GİBİDİR
29.03.201
Zeynep ARUN ÖNDER
Raportör

EK-B. Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU	**Adı,Soyadı:** **Yaşı:** **Cinsiyeti:** **Dosya no:** **Telefon no:**

Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nın ortak katılımı ile baş-boyun kanserlerinin genetik yönden incelenmesini öngören bir çalışma planlanmaktadır. Araştırmamızın adı ''**Baş-boyun Skuamöz Hücre Karsinomlarında Sitokinler ve İlgili Yolakta Rol Alan Bazı Genlerin Ekspresyonlarının Araştırılması**'' dır.

Araştırmaya dahil edilmenizi istememizin nedeni sizin/yakınızın baş-boyun kanseri şikayetinin bulunmasıdır.

Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır. Katılmak istiyorsanız aşağıdaki araştırma hakkındaki bilgileri okuyup, formu imzalayınız.

Araştırmayı kabul ederseniz Yrd. Doç.Dr. Bahar KELEŞ veya onun görevlendireceği hekim tarafından ameliyat esnasında tıbbi testler (patoloji, biyokimya) için alınan dokunun geriye kalan kısmı genetik araştırmalarda kullanılmak üzere saklanacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Çalışmaya katılmayı onaylıyorum.

Hastanın kendisi/yakını

Adı, Soyadı :

Tarih: İmza:

EK-C. Antikor sıra analizi sonucu çıkan ortalama değerler, kat artışları ve standart sapmaları.

	Erken evre tümor			İleri evre tümor		
Sitokinler	Hastaların ortalama değerleri±SD	Kontrollerin ortalama değerleri±SD	Kat artışı ortalaması	Hastaların ortalama değerleri±SD	Kontrollerin ortalama değerleri±SD	Kat artışı ortalaması
Pos	130,58±20,72	139,55±39,56	0,94	127,07±13,59	141,05±8,83	0,92
Pos	115,83±31,59	139,85±5,51	0,83	110,92±22,82	114,00±0,49	0,9
Pos	111,15±6,99	140,10±13,15	0,79	105,67±48,01	82,30±7,49	1,04
Pos	128,32±26,58	121,75±4,13	1,05	119,28±20,84	118,05±8,13	1,03
Neg	0,68±0,95	0,85±0,84	0,8	0,67±0,93	0,70±0,21	0,88
Neg	0,30±0,55	0,80±0,70	0,38	0,93±0,79	1,00±0,14	0,65
ENA78	42,75±22,00	22,80±0,95	1,88	56,20±16,72	35,25±2,40	1,73
GCSF	2,08±1,87	2,60±0,95	0,8	8,03±4,62	5,55±0,14	1,12
GM-CSF	4,35±1,53	3,55±0,17	1,23	10,22±3,02	6,25±0,35	1,43
GRO	224,87±20,61	145,90±17,18	1,54	139,30±66,56	81,20±36,76	1,63
GRO-alfa	24,62±2,39	23,50±2,43	1,05	12,48±20,06	8,95±2,68	1,22
I-309	16,83±8,90	12,80±3,39	1,32	35,52±9,59	15,40±0,98	1,81
IL-1-alfa	12,77±8,17	11,80±3,39	1,08	29,88±6,97	20,10±0,28	1,28
IL-1-beta	7,60±6,24	5,55±1,41	1,37	21,15±5,65	15,10±0,77	1,39
IL2	5,25±4,55	3,95±1,97	1,33	11,00±2,72	8,90±0,77	1,28
IL3	18,35±10,81	14,80±6,11	1,24	43,78±12,08	25,95±0,14	1,46
IL4	6,55±2,50	4,85±0,07	1,35	11,17±4,28	5,50±0,35	1,69
IL5	3,53±2,77	4,80±0,35	0,74	10,38±3,13	7,20±0,56	1,09
IL6	4,95±2,92	3,10±1,23	1,6	8,72±6,93	5,85±0,28	1,54
IL7	10,98±11,08	9,60±1,13	1,14	16,43±6,30	7,90±1,27	1,61
IL8	51,48±21,71	43,65±3,85	1,18	71,15±21,6	26,55±12,23	1,93
IL10	36,15±11,67	20,20±5,83	1,79	56,70±24,35	39,25±0,28	1,62
IL12-p40p70	6,18±5,20	6,40±0,28	0,97	12,93±2,00	7,60±0	1,33
IL13	4,75±3,37	4,65±0,91	1,02	22,03±4,58	9,70±0,77	1,65
IL15	5,93±6,48	7,10±0,70	0,84	12,47±2,71	5,60±0,42	1,53
IFN-gama	11,22±9,78	10,10±1,80	1,11	26,75±7,36	14,95±1,13	1,45
MCP-1	74,30±41,12	48,50±2,05	1,53	65,55±28,34	30,30±11,17	1,85
MCP-2	28,15±7,45	24,65±0,49	1,14	26,25±12,32	13,00±2,75	1,58
MCP-3	33,40±7,30	36,45±5,37	0,92	33,72±7,13	22,00±0,77	1,22
MCSF	15,23±9,83	19,80±6,54	0,77	29,10±11,52	21,95±0,28	1,05
MDC	8,17±10,26	11,90±1,80	0,69	27,32±7,84	12,85±1,55	1,41
MIG	2,90±6,29	2,60±1,87	1,12	9,85±4,47	5,75±0,70	1,41
MIP1-beta	34,45±16,22	39,50±11,20	0,87	72,88±16,22	53,15±7,91	1,12
MIP1-sigma	59,97±18,95	66,70±2,19	0,9	101,05±15,80	60,70±3,25	1,28
RANTES	255,23±47,85	208,80±8,09	1,22	191,78±77,09	272,05±39,59	0,96
SCF	10,87±4,20	12,80±1,27	0,85	14,10±2,85	11,80±0,28	1,02
SDF-1	8,22±8,83	6,90±0,60	1,19	19,70±4,82	11,25±0,14	1,47
TARC	19,22±11,28	14,50±2,22	1,33	49,75±15,84	22,75±1,41	1,76
TGF-beta1	10,77±13,46	6,70±1,23	1,61	23,75±7,03	11,85±1,13	1,81
TNF-alfa	13,33±7,68	15,20±4,98	0,88	41,77±15,23	27,75±0,98	1,19
TNF-beta	14,52±8,92	16,30±2,15	0,89	21,03±5,69	13,55±0,28	1,22

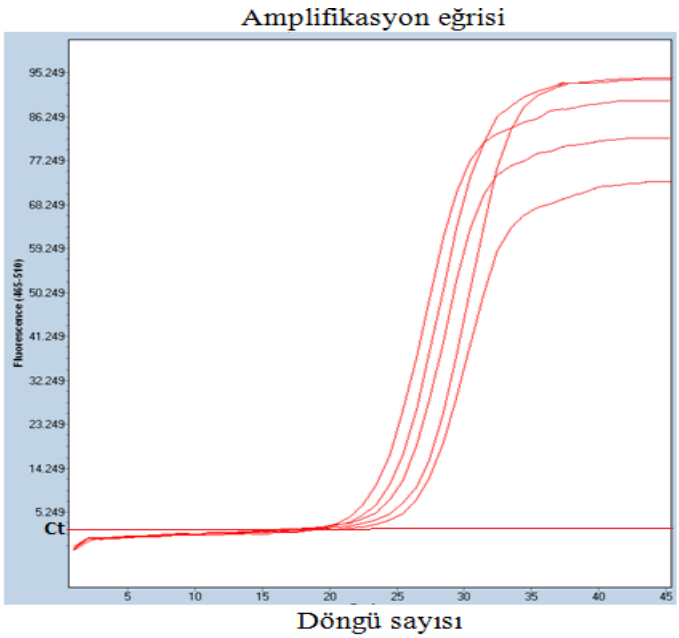
EGF	198,90±74,03	87,00±3,88	2,29	172,43±61,09	22,10±63,07	5,04
IGF-1	32,57±6,30	14,70±1,48	2,22	21,67±15,31	6,70±11,31	2,72
Angiogenin	131,58±57,94	137,60±2,43	0,96	131,55±23,09	95,15±17,81	1,17
Oncostatin M	18,57±10,75	21,00±1,23	0,88	46,63±12,31	30,55±1,55	1,21
Trombopoietin	3,67±7,01	2,30±0,95	1,59	16,08±6,80	16,15±0,42	1,3
VEGF	11,42±1,35	12,05±0,24	0,95	11,28±1,77	5,15±0,63	1,57
PDGF-BB	143,72±36,81	70,20±0,77	2,05	170,55±23,56	53,60±4,8	2,61
Leptin	116,72±28,61	159,80±11,70	0,73	121,02±72,24	194,15±7,07	0,68
BNDF	46,68±27,67	37,55±4,27	1,24	48,73±12,09	19,45±3,6	1,87
BLC	8,45±6,24	6,05±4,98	1,4	18,70±4,29	21,55±0,35	1,13
Ck-beta 8-1	16,10±4,31	17,90±4,80	0,9	20,02±3,87	14,80±0,56	1,13
Eotaxin	22,10±3,32	15,85±6,08	1,39	32,53±9,21	16,40±3,46	1,69
Eotaxin-2	37,65±18,44	28,80±9,36	1,31	74,90±18,66	49,25±8,34	1,41
Eotaxin-3	4,17±1,81	3,35±4,06	1,24	25,80±15,91	24,15±0,63	1,16
FGF-4	10,45±4,30	13,95±0,56	0,75	13,20±2,50	7,60±1,2	1,24
FGF-6	12,63±5,23	13,15±1,37	0,96	19,15±3,42	8,55±1,34	1,6
FGF-7	26,77±11,80	27,10±5,72	0,99	36,62±3,38	22,60±0,7	1,3
FGF-9	11,92±2,15	14,80±1,41	0,81	29,48±9,69	13,60±1,69	1,49
Flt-3 Ligand	9,75±2,49	9,20±2,05	1,06	14,13±4,46	14,50±0,28	1,02
Fractalkine	8,55±2,08	8,55±1,13	1	12,17±3,65	10,20±0,63	1,1
GCP-2	16,63±6,032	14,45±3,18	1,15	33,00±8,94	19,60±0,77	1,42
GNDF	23,55±15,97	31,00±5,55	0,76	60,92±14,45	34,35±2,82	1,27
HGF	30,85±6,81	29,35±5,19	1,05	62,63±35,85	34,15±1,06	1,44
IGFBP-1	58,70±22,02	27,35±6,11	2,15	102,42±33,37	41,65±0,77	2,3
IGFBP-2	79,80±22,78	73,90±14,0	1,08	127,67±28,07	79,80±4,24	1,34
IGFBP-3	21,58±6,74	28,70±4,38	0,75	32,78±7,09	21,40±4,24	1,14
IGFBP-4	12,42±1,59	13,80±2,40	0,9	16,72±3,97	9,40±1,97	1,34
IL16	29,17±11,77	20,25±6,5	1,44	45,63±9,56	28,50±5,3	1,52
IP-10	30,48±2,83	28,45±5,48	1,07	45,15±9,41	25,55±1,9	1,42
LIF	40,42±11,05	52,05±5,48	0,78	61,60±10,46	43,65±8,69	1,09
LIGHT	15,22±5,80	18,25±1,37	0,83	15,68±3,14	9,15±2,19	1,27
MCP-4	9,53±6,69	6,15±1,37	1,55	16,40±5,71	9,25±0,07	1,66
MIF	9,70±11,85	11,80±2,26	0,82	26,43±8,38	13,50±0,28	1,39
MIP-3-alfa	2,82±3,39	2,70±1,83	1,04	9,83±2,88	5,70±0,56	1,38
NAP-2	75,00±23,42	91,95±18,24	0,82	140,28±37,07	107,40±4,45	1,06
NT-3	18,47±6,26	18,60±5,19	0,99	40,37±13,21	39,85±0,28	1
NT-4	5,77±1,64	9,50±0,67	0,61	11,23±4,21	9,35±1,41	0,9
Osteopontin	58,38±16,92	47,45±17,0	1,23	56,00±20,71	38,75±5,58	1,34
Osteoprotegerin	25,00±3,12	29,75±3,04	0,84	17,60±7,09	11,30±1,62	1,2
PARC	10,25±2,27	11,40±1,44	0,9	14,72±5,29	9,55±0,14	1,22
PIGF	24,17±6,01	27,35±6,04	0,88	45,23±12,78	34,35±3,04	1,1
TGF-beta2	32,58±8,23	42,95±8,94	0,76	37,42±7,94	47,15±5,02	0,78
TGF-beta3	5,63±2,34	6,20±2,54	0,91	12,02±5,27	9,60±0,28	1,08
TIMP-1	49,17±11,02	50,45±7,42	0,97	73,67±13,29	67,80±2,19	1,03

EK-D. Erken ve ileri evre hastaların serumlarında artış gösteren sitokinlerin oranları.

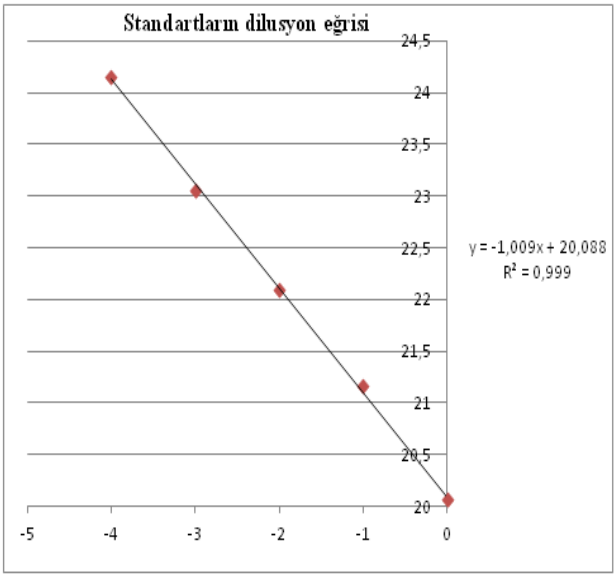
Sitokinler	Erken evre hastalarda kat artışı (n=6)	İleri evre hastalarda kat artışı (n=10)
EGF	2,29	7,8
IGF-1	2,22	3,23
PDGF-BB	2,05	3,18
IGFBP-1	2,15	2,46
IL4	1,35	2,03
IL7	1,14	2,08
IL8	1,18	2,68
IL13	1,02	2,27
IL15	0,84	2,23
MCP-1	1,53	2,16
MCP-2	1,14	2,02
MDC	0,69	2,13
TARC	1,33	2,19
TGF-beta1	1,61	2
FGF-6	0,96	2,24

EK-E. qRT-PZR analizinde kullanılan standartların amplifikasyon eğrisi (A) ve dilusyon eğrisi (B).

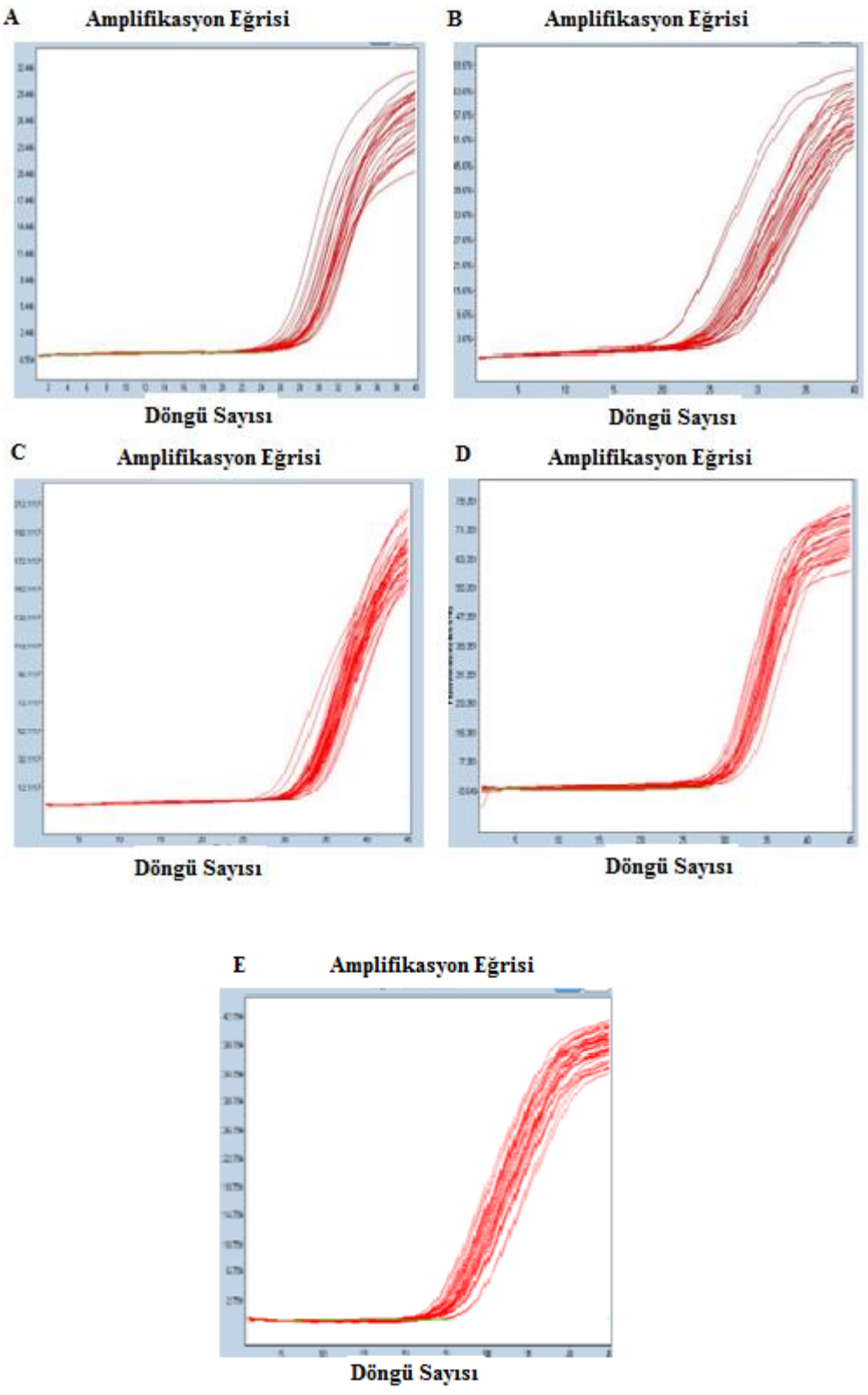
A



B



EK-F. EGFR (A), IGFBP1 (B), PDGFBB (C), PTEN (D) ve AKT (E) genlerinin qRT-PZR amplifikasyon eğrileri.



8. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD' da yüksek lisans eğitimine başladı ve 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılından itibaren Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD'da doktora eğitimine devam ediyor.