

**TİROİT KANSERLİ VE TİROİT BOZUKLUĞU OLAN HASTALARDA RAS
ONKOGEN MUTASYONLARININ YUVALANMIŞ POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU VE RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Bekir Cihan DALOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2008

ANKARA

Bekir Cihan DALOĞLU tarafından hazırlanan TİROİT KANSERLİ VE TİROİT BOZUKLUĞU OLAN HASTALARDA RAS ONKOGEN MUTASYONLARININ YUVALANMIŞ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ İLE ARAŞTIRILMASI adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel SÜMER.....

Biyoloji, Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Leyla AÇIK.....

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Nursel GÜL.....

Biyoloji, Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Sümer ARAS.....

Biyoloji, Ankara Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Barbaros K. BALABANLI.....

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Tarih : 13/02/2008

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bekir Cihan DALOĞLU

**TİROİT KANSERLİ VE TİROİT BOZUKLUĞU OLAN HASTALARDA RAS
ONKOGEN MUTASYONLARININ YUVALANMIŞ POLİMERZ ZİNCİR
REAKSİYONU VE RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ İLE ARAŞTIRILMASI**
(Yüksek Lisans Tezi)

Bekir Cihan DALOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2008

ÖZET

Yirmi yıl önce, onkogenlerin bulunması ile kanser araştırmalarında dramatik bir değişim olmuş ve araştırmalar, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlere yoğunlaşmıştır. Gerek onkogen aktivasyonu gerekse tümör baskılayıcı genlerin aktifliğini kaybetmesi sonucunda hücre döngüsünde sapmalar sonucu tümör gelişebilmektedir. Son yıllarda özellikle endokrin tümörlerde değişik onkogen ve tümör baskılayıcı genler tanımlanmıştır. Pek çok onkogen ve tümör baskılayıcı gen çeşitli tipteki tiroit kanserlerinde değişik oranlarda bulunmaktadır. Tiroit tümörlerinde *ras*, *gsp*, *ret* veya *trk* onkogenleri bulunmaktadır. Bu genler beraber bulunduklarında ise tümör oluşturuıcı etkileri artmaktadır. *ras* geninin mutasyonları ile hızlı bölünen ve fonksiyonunu kaybeden hücreler diğer mutasyonlara açık hale gelirler. RAS familyasının üyeleri G-proteinleriyle aynı özellikleri taşıyan sinyal-dönüştürücü proteinlerdir. *Ras* ailesi genleri (*H-ras*, *K-ras*, ve *N-ras*) GDP'ye bağlı aktif olmayan formu ve GTP'ye bağlı aktif formu arasında

dönüşen 21 kD'luk GTP bağlayıcı proteinleri kodlar. Bu çalışma kapsamında 24 tiroit kanserli, 9 guatr, 1 hipertiroidi hastası ve 77 kontrol grubuna ait olmak üzere 111 periferik kan örneğinde *Ras* genine ait 12, 13 ve 61. kodon bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılmış ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yapılarak kanserli olgularda mutasyon varlığı araştırılmıştır ve mutasyona rastlanamamıştır.

Bilim Kodu : 203.1.105

Anahtar Kelimeler : Tiroit kanseri, Ras, PZR

Sayfa Adedi : 61

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**RAS ONCOGENE MUTATION DETECTION IN THYROID TUMORS AND
THYROID DEFLECTIONS PATIENTS WITH NESTED PCR AND RFLP**

(M.Sc. Thesis)

Bekir Cihan DALOĞLU

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

February 2008

ABSTRACT

With the discovery of oncogenes two decades ago, a dramatic change took place in cancer research, and the direction of cancer research switched from carcinogens and mutagens to oncogenes and tumor suppressing genes. As a result of both oncogene activation and tumor suppressing gene activation deviations take place in cell circle and tumor may develop. In recent years, especially in endocrine tumors, different oncogene and tumor suppressing genes have been identified. Many oncogene and tumor suppressing genes exist in varying percentages in various types of thyroid cancers. In thyroid tumors exist *Ras*, *Gsp*, *Ret* or *Trk* oncogenes. When these genes are found together, their tumor forming effects increase. Cells dividing fast with *Ras* mutation and losing their function become susceptible to other mutations. Members of the *Ras* gene family are signal transferring proteins which carry the same characteristics with G-proteins. *Ras* family genes (*H-Ras*, *K-Ras*, and *N-Ras*) codes 21 kDa GTP binding proteins which transform between inactive form attached to GDP and active form attached to GTP. Within the

content of this study 24 thyroid cancer, 9 goiter, and 1 hyperthyroid patients and in 111 peripheral blood samples belonging to 77 control groups, 12, 13, and 61 codon areas were proliferated through Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) procedure their mutations were tried to be identified and we weren't detected any mutation in tumor samples.

Science Code : 203.1.105

Key Words : Thyroid cancer, Ras mutations, PCR

Page Number : 61

Adviser : Prof. Dr. Leyla ACIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla ben yönlendiren danışmanım Prof. Dr. Leyla AÇIK 'a, materyallerin temini konusunda yardımlarını esirgemeyen Numune Hastanesi Cerrahi Kliniği' nden Dr. Mahmut KOÇ 'a, Numune Hastanesi Başhekimi Doç. Dr. Mehmet KILIÇ 'a yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Dr. Fatma ÖZTÜRK 'e, Yard. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ'ye, Araş. Gör. Selcen AYDAŞ'a, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme ve mesai arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.2. Hücre döngüsü	6
2.1.3. Protoonkogenler	7
2.1.4. Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü	8
2.1.5. Onkogenler	10
2.1.6. Kansere neden olan genlerin işlevleri	12
2.1.7. <i>ras</i> onkogeni, ürünü P21 ^{ras} ve kanser oluşumundaki yeri	13
2.1.8. P21 ^{ras} proteini ve sinyal iletimi	18
2.1.9. Tiroit kanserlerinde <i>ras</i> onkogen mutasyonları	20
2.2. Tiroit Bezinin Yapısı.....	22
2.2.1. Tiroit embriyolojisi	23
2.2.2. Tiroit histolojisi.....	24

Sayfa

2.3. Tiroit Kanseri Tipleri	27
2.3.1. Papiller tip tiroit kanseri (PTC).....	29
2.3.2. Folikület tip tiroit kanseri.....	30
2.3.3. Onkokistik tip (Hürtle Hücre) tip tiroit kanseri.....	31
2.3.4. Yetersiz farklılaşmış tip tiroit kanseri	32
2.3.5. Medüller tip tiroit kanseri.....	33
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	34
2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi.....	37
3. MATERYAL METOT.....	38
3.1. Materyal	38
3.2. Metot	41
3.2.1. Kan örneklerinin alınması	41
3.2.2. Kan örneklerinden DNA izolasyonu	41
3.2.3. K-Ras, N-Ras ve H-Ras genlerindeki mutasyonların polimeraz zincir reaksiyonu	42
3.2.4. K-Ras, N-Ras ve H-Ras genlerindeki mutasyonların restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi	44
3.2.5. Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen DNA'ların poliakrilamid jel elektroforezi.....	44
3.2.6. Poliakrilamid jel elektroforezi.....	44
3.2.7. Agaroj jel elektroforezi.....	45
3.2.8. Konsantrasyon ve saflık tayini	45

Sayfa

3.2.9. Sterilizasyon	45
4. DENEYSEL BULGULAR	46
4.1. K- <i>ras</i> geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması	46
4.2. N- <i>ras</i> geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması	47
4.3. H- <i>ras</i> geninin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması	49
5. TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	61

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Onkogenler.....	11
Çizelge 2.2. İnsan kanserlerinde <i>ras</i> onkogen mutasyonları.....	15
Çizelge 2.3. Tiroit kanserinin sınıflandırılması.....	28
Çizelge 3.1. PZR’ da kullanılan primerler ve nükleotid dizileri.....	40
Çizelge 5.1. İyi huylu ve kötü huylu tiroit örneklerinde <i>ras</i> gen ailesi mutasyonlarının karşılaştırılması	52
Çizelge 5.2. <i>ras</i> gen ailesi mutasyonları ile ilgili yapılan çalışmalar ve sonuçları	52

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser oluşumunun basit mekanizması.....	5
Şekil 2.2. Hücre döngüsünün kısımları	7
Şekil 2.3. p21 ^{ras} proteininin aktifleşmesi.....	16
Şekil 2.4. p21 ^{ras} Proteininin 3 boyutlu yapısı.....	18
Şekil 2.5. p21 ^{ras} Proteini ve sinyal iletimi	20
Şekil 2.6. Tiroit bezi.....	23
Şekil 2.7. Tiroisit yapısı	25
Şekil 2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları	36
Şekil 2.9. Polimeraz zincir reaksiyonu cihazı	37
Şekil 4.1. K- <i>ras</i> geninin 1. ekzonunun PZR sonucu.....	46
Şekil 4.2. K- <i>ras</i> geninin PZR ürününün <i>Hph</i> 1 enzimi elektroforezi	47
Şekil 4.3. N- <i>ras</i> geninin 2. ekzonunun PZR sonucu.....	48
Şekil 4.4. N- <i>ras</i> geninin PZR ürününün <i>Bst</i> 1 enzimi elektroforezi	49
Şekil 4.5. H- <i>ras</i> geninin polimeraz zincir reaksiyonu ürünü	50

1. GİRİŞ

Dünya’da kansere bağlı ölümler kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır. Basit olarak kanser kontrolsüz hücre bölünmesi olarak adlandırılır. Kanser oluşumu, genetik veya epigenetik nedenlerle protoonkogenlerin işlevsellik kazanması ve tümör baskılayıcı genlerin işlevselliğini yitirmesi ile gerçekleşmektedir. Her iki grup gen, hücrenin doğal yapısında mevcut olup hücrenin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve kendi iç dengesini (homeostasi) kontrol eden proteinleri kodlar. Protoonkogenlerin mutasyonlar, yeniden düzenlenme ve ifade artışları gibi değişime uğramaları sonucu dominant davranış gösteren işlevsellik kazanmış onkogenler meydana gelir ki bu onkogen ürünleri kanser fenotipini başlatmak veya sürdürmek için gereklidir. Tümör baskılayıcı gen değişikliklerinin kanser oluşumundaki rolü ise normal gen işlevinin kaybı şeklindedir. Bu işlev kaybı, mutasyonlar, delesyonlar, gen gen ifadesinin artışı veya yeniden düzenlenme ile oluşabileceği gibi yapısal bozukluk olmaksızın genetik materyalin anneden veya babadan kalıtılmış olmasına bağlı olarak, farklı ifadelenmesi veya diğer hücrel ve viral onkogenlerle etkileşim sonucu da gelişebilir [1]. Tiroit kanseri en sık görülen endokrin kanseridir ve tüm endokrin kanserlerin %90’ ını oluşturduğu gözlenmiştir. Tiroit kanserleri, tüm kanser ölümlerinin %0,4 ünü oluşturduğu Özata (2005) tarafından belirtilmiştir [2]. İstatistiksel olarak küçük bir sağlık problemi gibi görünse de, otopsi verilerine göre tiroit bezinde % 0,1–2,7 oranında kansere rastlanmış olması ve erişkinlerde genellikle iyi huylu davranmasına karşın şüphelenilmeyen mikrokarsinomaların (çapı 0,5 cm den az) % 5,7 gibi yüksek oranda bulunması tiroit kanserlerinin ne kadar yaygın olduğunu göstermek için yeterli olduğu aynı araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Ancak küçük çaplı tiroit tümörlerinin de organizmada bir yerden bir yere hareket edebileceği ve nadir de olsa ölümcül olduğu bilinilmektedir. Yine önemli oranda tiroit kanserli olguya yaşam süresince tanı konmadığı ve bu hastaların ölüm nedeni olmadığı da açıktır [2].

Kansere neden olan genlere onkogenler denir. Onkogenler, protoonkogenlerin değişimi sonucu ortaya çıkar. Protoonkogenler mutasyon, kromozomal yer değiştirmeler ve gen

ifadesi artışı sonucu aktive olur ve onkogen haline geçerler. Kanserle neden olan genler, iki gruba ayrılır: onkogenler: *c-myc*, *L-myc*, *N-myc*, *ras*, *erbB-1*, *erbB-2* ve tümör baskılayıcı genler: *p53*, *Rb*, *p16*, *FHIT*, *bcl-2* olarak sınıflandırılırlar [3].

Hücre bölünmesini kontrol eden, tümöre yol açabilecek onkogenler ile tümör gelişmesini önleyen tümör baskılayıcı genler arasındaki denge önemlidir. Şimdiye kadar yaklaşık 50 tümör baskılayıcı gen ve 100'ün üzerinde onkogen tanımlanmıştır. Hücre büyümesi ve bölünmesinde tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerin rol alması nedeniyle, kanser, hücre döngüsünün bozulduğu bir hastalık olarak kabul edilebilir [3].

Tiroit kanser oranı nodüller guatrı olgular ele alındığında erkeklerde kadınlara göre 2 kat daha fazladır. Erkekler arasında da kanser oranı 60 yaşın üzerindekielerde daha fazladır. Ancak normal popülasyonda kadın/erkek oranı 2-3:1 'dir [2]. Ülkemizde yarım milyondan fazla insanda endemik guatr nodülü olduğu tahmin edilmektedir [4]. İzmir ve İstanbul 'da yapılan bir çalışmada İzmir için % 7-8, İstanbul için % 13 oranında tiroit nodüllerinin kansere dönüşme sıklığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, bölgesel olarak incelendiğinde tiroit kanseri açısından Doğu Karadeniz, Batı Karadeniz, Akdeniz, Orta Anadolu ve Doğu Anadolu bölgeleri ön sıralarda gelmektedir [4].

ABD'de ise her yıl her 1 milyon kişiden 40' ında tiroit kanseri tanısı konmaktadır. 10 yıllık bir izlemede kanser nedeniyle ölüm oranı ABD'de papiller-kanser için % 7, foliküler kanser için % 15 ve Hurthle hücreli kanser için % 25 olarak bulunmuştur. Tiroit kanser görülme sıklığı ABD'de 1973 ten bu yana % 50 artmıştır ve diğer ülkelerde de görülme sıklığında artış vardır. Tiroit kanseri ile ilgili ülkemizde belirgin bir istatistik olmasa da tiroit kanser olguları daha fazlaca saptanmaktadır. Bu artışın nedeninin ince iğne aspirasyon (İİA) biyopsisinin daha sık kullanılmaya başlanması olduğu düşünülmektedir [2].

İlk tedaviye rağmen devam eden kanserlerin 2/3' si ilk 10 yılda, geri kalanı daha sonra saptanmaktadır. Kanser tekrarları 20 yaştan küçük veya 60 yaştan büyük hastalarda daha

yaygındır. Bir çalışmada 30 yıllık ölüm oranı tekrar sonrası % 12, uzak metastaz sonrası ise % 43 bulunmuştur [2].

Halen Dünya'da 17,5 milyon insanın kanser hastası olduğu ve bu sayının 2015 yılında 30 milyonun üzerine çıkacağı tahmin edilmektedir. Önümüzdeki 25 yıl boyunca, vakaların 2/3'ü Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere, dünya'da 300 milyon yeni kanser vakası ve 200 milyon kansere bağlı ölümün olacağı tahmin edilmektedir [1].

Bu çalışmamın amacı insan kanserlerinin büyük bir çoğunluğunda görülen *ras* protoonkogen mutasyonlarının Türk tiroit kanserli vakalardaki durumunun araştırılmasıdır. Bu araştırmanın sonuçlarının gelecek çalışmalara ışık tutması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Vücudu oluşturan hücreler birleşerek dokuları, dokular birleşerek organları oluşturmaktadır. Organ ve dokular oluşurken hücreler belirli bir düzen içinde, çeşitli görev paylaşımları yaparak organizmayı meydana getirirler. Organizmanın temel birimi olan bu hücreler belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Diğer taraftan yaşlanan hücreler de yıkılır [5].

Kanser, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması anlamına gelmektedir. Bu çoğalma sırasında kanser hücreleri, normal hücrelerden yapısal farklılıklar ve işlevsel farklılıklar ile ayrılır. Hücre normalde yaptığı işlevleri yapmazken, bazen de normalde olmayan bazı işlevleri yapmaya başlayabilir [5].

Kanser, insan sağlığı açısından en çok görülen ve en çok ölüme neden olan önemli hastalıklardan biridir. Bu açıdan incelendiğinde tanı imkânlarının artması, insanlara daha yaygın sağlık hizmeti sunulması nedeni ile her gün daha çok sayıdaki kanserli hastaya tanı koymak tıbbi açıdan mümkün olabilmektedir [5].

Kanserde ölüm oranlarının yüksek olması konunun önemini daha da artırmaktadır. Günümüzde kanser, ölüm nedenleri arasında birçok gelişmiş ülkede kalp-damar hastalıklardan sonra ikinci sırayı almaktadır. Ülkemizde de 0–1 yaş grubu hariç tutulursa ölüm nedenleri arasında ikinci sırada gelmektedir. Ülkemizdeki her 10 ölümden birisi kanser nedeni ile olmaktadır [5].

Milattan 50 milyon yıl öncesine dayanan dinazor fosillerinde kemik tümörüne benzer bulgulara rastlanılmıştır [6].

Kansere ait ilk bilgiler Hipokrat tarafından açıklanmıştır. Hipokrat, Latince “yengeç” anlamına gelen “carcinus” kelimesini ülser benzeri bir kanserin tanısında kullanmıştır.

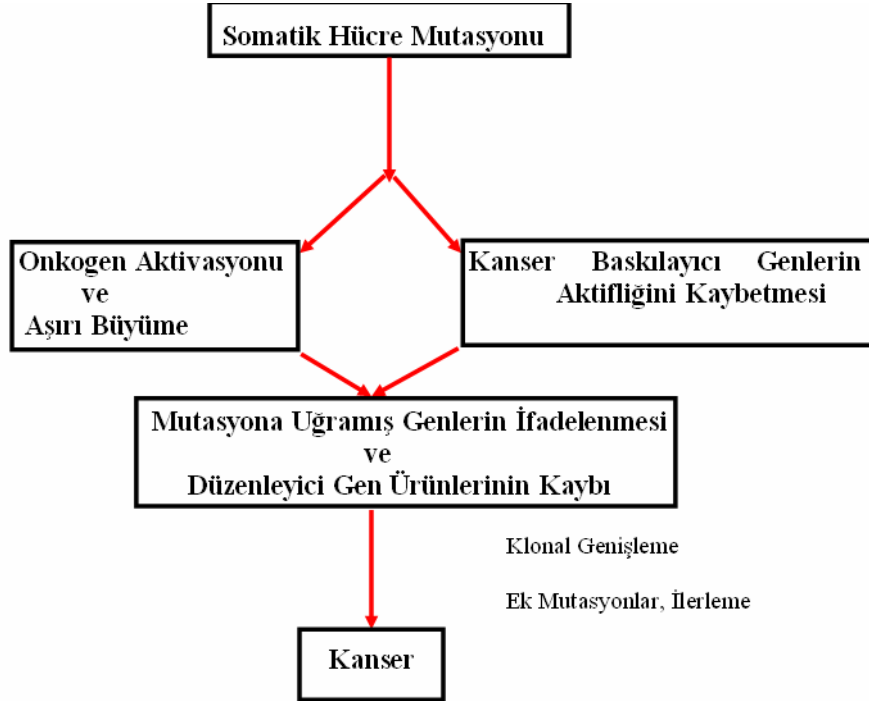
Bu kanserin kötü huylu olanlarını da “carcinomas” terimini kullanarak adlandırmıştır [6].

Romalı hekim Celcus, göğüs kanserinde cerrahi tedavi uygulamış ve kötü huylu kanserleri diğer kanserlerden ayırmıştır [6].

Günümüzde yapılan elektron mikroskobu çalışmaları ile histolojik, immünolojik, genetik ve moleküler düzeydeki çalışmalar kanser hakkındaki bilgilerin giderek artmasına yol açmaktadır [6]. Kanser oluşum sürecinde kanserli hücrenin fenotipik özelliklerini kardeş hücrelere aktardığı gözlemlenmiştir [7].

Mutajen adı verilen ve DNA’ yı hedef alan pek çok kimyasal bileşiğin de kanserojen olduğu açıklanmıştır [7].

Kanser oluşumu fenotipik ve genotipik düzeyde çok basamaklı bir işlemdir. Kötü huylu bir kanser aşırı büyüme, bölgesel dokulara taşınım (invazyon), uzak dokulara taşınma (uzak metastaz) gibi fenotipik özelliklere sahiptir (Şekil 2.1). Bu olayların tümüne tümör ilerleyişi adı verilmektedir [8].



Şekil 2.1. Kanser oluşumunun basit mekanizması [8]

Virüslerin bulaştıkları hücrede, kendi yaşam döngülerini devam ettirmek için gerekli genler yanında normal biyokimyasal değişiklikleri kodlayan genler de bulunmaktadır. Bu genlere onkogen adı verilmektedir. Araştırmalar, benzer yapıda genlerin ökaryotik hücrelerde de bulunduğunu göstermiştir. Ökaryot hücrelerde bulunan ve normal hücresel faaliyetleri düzenleyen bu genlere protoonkogen adı verilmiştir. Bu genler, hücrede büyüme ve farklılaşmanın belirli zamanlarında görev yaparlar; diğer zamanlarda etkisizdirler. Böylece devamlı büyüme ve bölünme engellenmiş olur [9].

Virüsler de, bulaştıkları hücrelere girerek DNA veya hücredeki protoonkogenleri işlevsel duruma getirerek kanser oluştururlar [9].

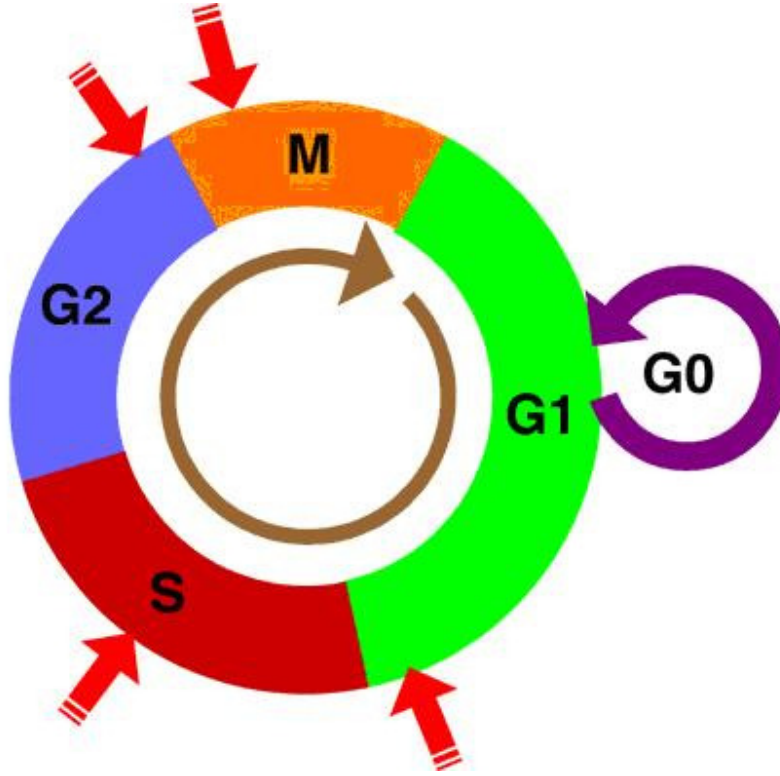
2.1.2. Hücre döngüsü

Hücreler, genetik hataları önlemede iki farklı mekanizmaya sahiptir. Genotoksik etkiye maruz kalan hücrelerde yaygın olarak DNA hasarı, farklı hücre-döngüsü kontrol

noktalarında hücreye DNA tamirini tamamlayabilmesi için zaman kazandıracak replikatif durdurmaya yol açmaktadır. Alternatif olarak, tamir edilemeyecek DNA hatalarının olumsuz etkileri olacağı için; kontrollü hücre ölümü (apoptosis) genetik olarak hasarlı bölgenin yok edilmesidir. Apoptosis olmaması durumunda, hücrede genetik dengesizlik ya da kanser oluşabilir [10].

Bir hücre, büyüme kontrolü kaybını engellemek için çeşitli uyarıcı kapasitelerine sahip olmasına rağmen, bunların bazılarında başarısızlıklar olabilmektedir. G1 ilerlemesi ve G1-S geçişini yöneten hücre döngüsü düzenleyicilerinin değişimi sonucunda kanserler meydana gelmektedir [11].

Normal hücre döngüsü, dört aşamadan oluşur; DNA sentezi (S) evresi ve iki ara evre (G1 ve G2) ile ayrılmış hücre bölünme evresidir (M) (Şekil 2.2). Bölünmeyen hücreler, G0 evresinde dinlenme konumundadır ve ihtiyaç durumunda ortam şartlarına bağlı olarak bölünme evresine geçerler [12].



Şekil 2.2. Hücre döngüsünün kısımları [16]

Hücresinin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri evrelerden oluşur ve hem dış hem de iç büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Bazı onkogenler ve hücre döngüsüne özgü proteinler hücre döngüsü boyunca eşzamanlı bir şekilde etkili hale getirilirler ve görevleri bittikten sonra etkisizleştirilirler [13].

2.1.3. Protoonkogenler

Protoonkogenler, normal hücrelerde hücrenin büyümesi, farklılaşması için gerekli olan ve onkogenlerin kökenini oluşturan genlerdir [14–16, 22–24]. Protoonkogen adı verilen normal genler, çeşitli faktörlerle aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına sebep olmaktadır. Aktive olan protoonkogenlere onkogen, kodladıkları proteinlere de onkoprotein adı verilmektedir. Protoonkogenler tarafından kodlanan

proteinler genel olarak hücre sinyal iletim yolunda ve hücre büyümesinin düzenlenmesi gibi önemli hücresel faaliyetlerde yer almaktadırlar [16, 17, 24–26].

Evrin süreci içerisinde protoonkogenler türler arasında en iyi korunmuş genlerdir [23]. Birçok aynı onkogen insanlardan mayalara kadar çok çeşitli canlılarda bulunabilmektedir [13–15]. Bunun sebebi protoonkogenlerin hücrenin hayatsal faaliyetlerini düzenleyen genlerden olmasıdır. Protoonkogenlerin ürünleri büyüme faktörleri (EGF, IGF gibi), büyüme faktörü reseptörleri, sinyal ileticiler (*ras* geni ürünü P21^{ras} gibi), transkripsiyon faktörleri gibi görevlerde yer alırlar [23]. Her bir protoonkogen, hücre döngüsü süresince veya belli bir dokunun gelişiminin çok özel bir döneminde farklı olarak ifade edilen protein ürünlerini yaparlar [13].

2.1.4. Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü

Normal hücre büyümesi ve farklılaşmasında görev alan protoonkogenlerin, onkogenlere dönüşümü ile kanser ortaya çıkabilir [6]. Protoonkogenlerin ifadesini ve yapısını değiştirerek aktifleştiren, protoonkogenleri onkogene dönüştüren mutasyonlar [27]:

➤ Nokta mutasyonları

Protoonkogenler meydana gelen nokta mutasyonları ile tek bir aminoasit değişimi sonucunda onkogenik aktivite kazanabilirler [6, 26, 28,]. Nokta mutasyonları sonucu bazen tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonları ortadan kalkabilir [29]. Protoonkogen aktivasyonunda en yaygın görülen nokta mutasyonu transisyonudur, daha az yaygın görüleni ise transversiyondur [6, 26]. Nokta mutasyonları ile hücre dışı sinyallerle düzenlenme yeteneğini kaybetmiş bir protein oluşur [23]. *ras* protoonkogen mutasyonu buna en iyi örnektir. *ras* normalde sinyal iletimini açıp-kapan bir moleküldür, ancak geçirdiği nokta mutasyonu sonucu hücreyi kontrolsüz bölünmeye doğru götüren sinyal yolunun sürekli açık kalmasını sağlar. Akciğer, tiroit, kalın barsak ve pankreas kanserlerinin 1/3 kadarında *ras* mutasyonları gözlenmiştir [23].

➤ Promotor ilavesi ve gen ifadesinin artması

Protoonkogen aktivasyonlarının bir kısmı bu genlerin ifadelerinin fazla miktarda artması ile de ilgilidir [6]. Kemirgenlerde *myc* protoonkogen promotoruna retrovirüs eklenmesi ile ilgili yapılan çalışmada, *myc* protoonkogeni aktivasyonu ile sonuçlanmış ve kemirgende T hücre lösemisi gerçekleşmiştir [30, 31]. Birçok onkogenin ifade artışı ile, gen kopya sayısında ya da gen ifadeleme seviyesindeki artışla işlevsel hale gelip kansere sebep olduğu gösterilmiştir [24, 30]. Fare osteosarkoma hücrelerinde, meme kanseri ve meme kanserli hücre hatlarında *myc* ifade artışı ve kanserleşme arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir [30]. İnsan glioma ve sarkoma kanserlerinde amplifikasyona uğrayan genlerden bir diğeri de 12. kromozomda bulunan *MDM2* (mouse double minute) genine homolog olan gen olup bazen aynı kromozomda yer alan *CDK4* geni ile birlikte amplifikasyona uğradığı tespit edilmiştir [28, 30, 32].

➤ Kromozomal translokasyonlar

Birçok tümör hücresinde, onkogen bölgesinde geniş çaplı translokasyonlar ve diğer kromozom anormallikleri meydana gelmektedir [24]. Kromozom translokasyonlarında, kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir [24]. Protoonkogen içeren iki kromozom parçasının translokasyon sonucunda birleşmesi, onkogen oluşumuna neden olabilir [6]. Gen ifadenmesi değişimine en iyi örnek olarak Burkitt Lenfoması ve fare *c-myc* geninin translokasyonlarla immünglobulin genlere eklenmesi verilebilir [6]. Translokasyonların protoonkogenlerin biyokimyasal faaliyetlerini etkileyen değişimine verilecek en önemli örnek, kronik miyelositik lösemi hücrelerini belirleyen filadelfiya kromozomudur [6]. Translokasyon sonucu genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin düzenleyici bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır [24]. *myc* geni lokusunun yakınında veya içinde yaygın olarak bulunan translokasyonlar *Ig* geninin transkripsiyonuna neden olmaktadır [24, 30]. Lösemi, lenfoma ve tümörlerde belirlenmiş olan translokasyonlar, promotor bölgeleriyle çok yakın olan protoonkogenlerin aktivasyonuna neden olmaktadır [6, 24, 30].

2.1.5. Onkogenler

1911 yılında Peyton Rous isimli bilim adamı, tümör tipi bilinen civcivden sağlıklı civcive aktarıldığında benzer tümörün gelişimine neden olan bir etkeni açıklamıştır [6, 33]. Daha sonraki çalışmalar bu etkenin bir retrovirus olduğunu ve *v-src* olarak adlandırılan bu genin tümöre özgü olduğu ve tümörün oluşumundan sorumlu olduğunu göstermiştir [33]. Retrovirüslerde bulunan ve normal hücreleri kanser hücrelerine dönüştürme yeteneğine sahip olan bu genler “onkogen” olarak adlandırılmıştır [6].

Onkogenler, doğal veya deneysel şartlar altında normal hücreleri kanser hücresine dönüştürebilme özelliğine sahip olan genlerdir [27, 33]. Onkogenler bugüne kadar çalışılan bütün omurgalı türlerde bulunmuştur [13, 34]. Onkogenler bütün çok hücreli hayvanlarda bulunmakta, fakat bitkilerde veya protozoonlarda bulunmamaktadır [13]. Hücrel onkogenlere *c-onc* genler, viral karşılıklarına *v-onc* genler adı verilmektedir [13, 35, 36].

İnsan kanser hücrelerinde onkogenlerin gösterimi ilk kez DNA-aracı olunan gen aktarımı tekniği ile gösterilmiştir. Bu teknik, bir kanser hücresinden verici DNA’ nın, NIH73T3 olarak isimlendirilen ölümsüzleştirilmiş bir hücre soyu olan kemirgen hücrelerinin alıcı bir türünü transforme edebilme yeteneğini doğrulamıştır. Tümör örneklerinde onkogenlerin varlığını belirleyen bu analiz, moleküller kopyalama teknikleri ile onkogenlerin izolasyonunu da mümkün kılmıştır. Kanserli hücrelerden elde edilen DNA, NIH/3T3 fibroblast veya C2 Miyoblast hücreleri gibi kültür hücrelerine aktararak genin transformasyon mekanizması tanımlanmıştır. Gen transfer tekniği ile izole edilmiş ilk insan onkogeni idrar kesesi kanseridir [31, 32, 36–40].

Gen transfer çalışmaları ile tanımlanmış çoğu onkogen, retrovirüsler tarafından transforme edici onkogenlere oldukça benzerdir. Bunlar arasında en göze çarpan veya önemli olan, gen transfer analizi ile çeşitli insan tümörlerinden izole edilmiş olan *ras* onkogen ailesinin üyeleridir [31, 32, 36–40].

İnsan onkogenlerinin nükleotid dizilerinin tamamına yakını tanımlanmıştır (Çizelge 2.1) [13]. Bunlar arasında *c-mos*, *H-ras*, *K-ras*, *N-ras*, *c-sis*, ve *c-myc* onkogenleri sayılabilir [41, 42]. Hücresel onkogen yapıları viral benzerlerine oldukça fazla benzerlik göstermektedir.

Onkogenler dominant etkilidir [23]. Protoonkogen alellerden birinin mutasyonu, hücre döngüsü için önemli gerekliliğe sahip işlevsel bir sinyal molekülü veya anti-apoptotik bir işlev kazanması için yeterlidir [23].

Çizelge 2.1. Onkogenler [33]

		Tanımlama		Aktivasyon		Protein	
Onkogenler	Kromozom			Kanser			
		Metodu			Mekanizması	Fonksiyonu	
Büyüme Faktörleri							
<i>v-sis</i>	22q12.3–13.1	Dizi homolojisi		Glioma-	Devamlı üretim	PDGF- B zinciri	
<i>int2</i>	11q13	Proviral entegrasyon		Fibrosarkoma Meme kanseri	Devamlı üretim	FGF üyesi	ailesinin
<i>KS3</i>	11q13.3	DNA transfeksiyon		Kaposi'nin sarkoması	Devamlı üretim	FGF üyesi	ailesinin
<i>HST</i>	11q13.3	DNA transfeksiyon		Mide karsinoması	Devamlı üretim	FGF üyesi	ailesinin
Büyüme Reseptörleri		Faktör					
<i>Tirozin kinazlar: integral membran proteinleri</i>							
EGFR	7p11–1.3	DNA	İfade Artışı	Squamus hücre	Gen İfade Artışı	EGF reseptör	
<i>v-fms</i>	5q33–34 (FMS)	Viral homoloji		Kanseri	Devamlı aktivasyon	CSF1 reseptörü	
<i>v-kit</i>	4q11–21 (KIT)	Viral homoloji		Sarkoma	Devamlı	Kök hücre Faktörü reseptörü	
<i>v-ros</i>	6q22 (ROS)	Viral homoloji		Sarkoma	aktivasyon Devamlı	?	
<i>MET</i>	7p31	DNA transfeksiyon		MNNG-muamele edilmiş İnsan osteokarsinoma hücre soyu	aktivasyon DNA yeniden- düzenlenme/ bağımsız aktivasyon proteinler)	yeniden- ligand- Devamlı (füzyon	HGF/SF reseptörü
<i>TRK</i>	1q32-41	DNA transfeksiyon		Kolon/tiroit karsinomala	DNA yeniden- düzenlenmeleri; ligand- bağımsız aktivasyon proteinler)	yeniden- Devamlı (füzyon	NGF reseptörü
<i>NEU</i>	17q 11.2—12	Nokta mutasyonu/ İfade Artışı		Nöroblastoma	Gen ifade artışı	?	
<i>RET</i>	10q11.2	DNA transfeksiyon		Göğüs karsinoma Tiroit karsinomaları	DNA yeniden- düzenlenmeleri	yeniden-	
<i>Membran ile ilişkili olan G proteinleri</i>							
<i>H-RAS</i>	11p15.5	Viral homoloji/ DNA transfeksiyon		Kolon, akciğer, pankreas karsinomaları	Nokta mutasyonu	GTPaz	
<i>K-RAS</i>	12p11–12.1	Viral homoloji/ DNA transfeksiyon		AML, tiroit karsinoma, melanoma	Nokta mutasyonu	GTPaz	
<i>N-RAS</i>	1p11–13	Transfeksiyon		Karsinoma, melanoma	Nokta mutasyonu	GTPaz	
<i>gsp</i>	20	DNA sekanslama		Tiroit adenomaları	Nokta mutasyonu	Gsalfa	

<i>gip</i>	3	DNA sekanslama	Ovaryum, adrenal	Nokta mutasyonu	Gi alfa
			karsinoma		
<i>Guanin</i>	<i>nukleotit</i>	<i>değiştiren</i>	<i>(=exchange)</i>		
<i>faktör (GEF)</i>					

2.1.6. Kansere neden olan genlerin işlevleri

Onkogenlerin işlevleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en az 100 kadar onkogen tespit edilmiştir ve bu onkogenleri işlevlerine göre dört grupta toplanmaktadır [25, 26].

➤ Büyüme faktörü ve reseptörlerini kodlayan onkogenler

Büyüme faktörleri ve onkogenler arasındaki ilişki ilk kez Simian Sarcoma Virüs (SSV) ün bir büyüme faktörü olan PDGF (Platlet Derived-Growth Factor)'i uyaran bir onkogen taşıdığı (*sis* onkogeni) tespit edildiğinde belirlenmiştir. PDGF' in beta zinciri ile ilgili olarak *v-sis* ve *int-z* genleri, EGF (Epidermal Growth Faktör) ile ilgili olarak *erb-B* onkogeni ve FGF (Fibroblast Growth Faktör) ile ilgili *k-fgf-hst* onkogenleri bu gruba örnek verilebilir [25, 44].

➤ Sitoplazmik protein kinazları kodlayan onkogenler

Serin-treonin kinazlar ve tirozin kinazları kapsayan sitoplazmik protein kinazlar, onkogenler tarafından kodlanmaktadır [25]. *raf* onkogeni MAP kinaz yolunu başlatarak hücreye ilk bölünme sinyalini vermektedir [24, 25, 44, 45]. *src* onkogeni ise aynı zamanda bir protein kinazdır ve serin treonin yerine proteindeki tirozini fosforile etmektedir, *src*-protein kinaz, sinyal iletiminde, hücre iskelet sistemi gelişiminde ve hücrelerin birbirine tutunmasında (adezyon kuvvet) görev almaktadır. Diğer bilinen onkogenlere, *c-erb B-1*, *c-erb b-2*, *c-fms*, *c-met*, örnek verilebilir [24, 25, 36, 37].

➤ Nükleer transkripsiyon faktörleri kodlayan onkogenler

myc, *myb*, *fos*, *jun*, *rel*, *erbA* gibi onkogenler transkripsiyon faktörleri olan proteinleri kodlarlar. *myc* geni DNA ya bağlanan üç çekirdek fosfoproteinini kodlar, bu fosfoproteinler DNA sentezinde, hücre çoğalması ve farklılaşmasında görev almaktadırlar [24]. *myc* geni genellikle amplifikasyon ve transkripsiyondaki düzensizliklerle onkogen haline dönüşmektedir ve küçük hücreli akciğer kanserlerinin %18–31 inde *myc* onkogen aktivasyonuna rastlanmıştır [30, 31, 32].

Tümör baskılayıcı genlerin işlevleri

Programlanmış hücre ölümü ile ilgili en iyi bilinen onkogen *bcl-2* onkogenidir. *bcl-2* onkogeni, hücre membranına bağlı bir protein kodlamakta ve bu protein hücreyi apoptosisten korumaktadır [44]. *bcl-2* onkogeni kromozom üzerinde anormal bir bölgeye taşındığında normalden fazla ifade edilmekte ve tümör gelişimine neden olmaktadır [44]. Apoptozisi dolaylı olarak engelleyen bir gen de *mdm2* genidir. *p53* tümör baskılayıcı geninin negatif düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır ve apoptosisi engellemektedir [46].

2.1.7. *ras* protoonkogeni, ürünü P21^{ras} ve kanser oluşumundaki yeri

ras onkogenleri, G proteininin alt ünitelerini kodlayan onkogenlerdir. Sitoplazmik protein kinazları kopyalayan onkogen grubunun alt grubunda yer alırlar ve sinyal iletim yolunda önemli görevlere sahiptirler [47, 48].

ras geni, hücre-yüzey reseptörlerinden hücre içi hedeflere sinyallerin geçişini kontrol eden anahtar moleküldür (Şekil 2.4). Tüm GTPaz işlevine sahip gen ürünlerindeki mekanizma şöyledir; gen ürünü, bağlı GDP' nin GTP ile yer değiştirmesi ile işlevsel hale geçer ve GTP' nin GDP' ye hidroliz edilmesi ile işlevsel olmayan hale dönüşür [40]. 1980'li yıllarda tüm insan tümörlerinin %15' inde üç *ras* geninin birinde, bir nokta mutasyonunun varlığının keşfedilmesi sonrasında *ras* geninin önemi daha da artmıştır. Mutasyon sonucu oluşan yabancı protein, bağlı bulunan GTP' yi hidroliz edememekte ve dolayısıyla molekülün işlevsel şeklini korumasını sağlamaktadır. Sonuç olarak hücreler,

hücre-dışı iletiler olmasa da sürekli bölünmekte ve büyüme-ilerletici iletilere maruz kalmaktadır [40]. Çoğu hücrelerde *Ras* onkogeni, doğrudan ya da dolaylı olarak tirozin kinazları uyaran çeşitli hücre-dışı sinyallere cevap olarak aktif olmaktadır. GTP-bağlı durumda aktif olan $P21^{ras}$ proteini, birkaç yardımcı molekülden biri ile ilişki kurmaktadır. Bu etkileşimlerin biyolojik sonuçları, hücre tipine, sinyal ileti durumlarının oluşturduğu şartlara ve çevreye bağlıdır. Ayrıca zamanlama ve sinyalin şiddeti şeklindeki değişkenler de esas cevabı belirleyebilmektedir. *Ras* onkogeninin yapısal ve işlevsel yönden evrim boyunca yüksek derecede korunmuş olduğu görünmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* mayasında *ras* onkogeni, besine tepki ile ilişkiliyken, *Schizosaccharomyces pombe* mayasında *ras* onkogeni, üremede eşeyin salgıladığı feromene cevabı düzenlemektedir. Yine bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* 'da ve meyve sineği *Drosophila* 'da $P21^{ras}$ proteininin gelişimde önemli rolü olan bir molekül görevi görmektedir [49].

ras gen ailesi *H-ras* (Harvey *ras*), *K-ras* (Kirsten *ras*), ve *N-ras* (Neuroblastoma *ras*) olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır. Bu onkogenler hücrelerin kendinde doğal olarak bulunan onkogenler olup, virüslerde yalnızca *H-ras* ve *K-ras* onkogenlerinin karşılığı bulunmuştur [28, 50, 51].

İnsan kanserlerinin %30' unda *ras* onkogeninin nokta mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.2) [24, 52, 53, 54]. Pankreas kanserlerinde %90, kalın barsak kanserlerinde %50, testis kanserlerinde %40, akciğer kanserlerinde %30 oranında *K-ras* onkogeninde nokta mutasyonu olduğu bilinmektedir. Ayrıca, akut miyeloid lösemi kanserinde %30, testis kanserinde %40 ve melanomalarda %20 oranında *N-ras* onkogeninde nokta mutasyonları tespit edilmiştir [24, 40, 52, 54].

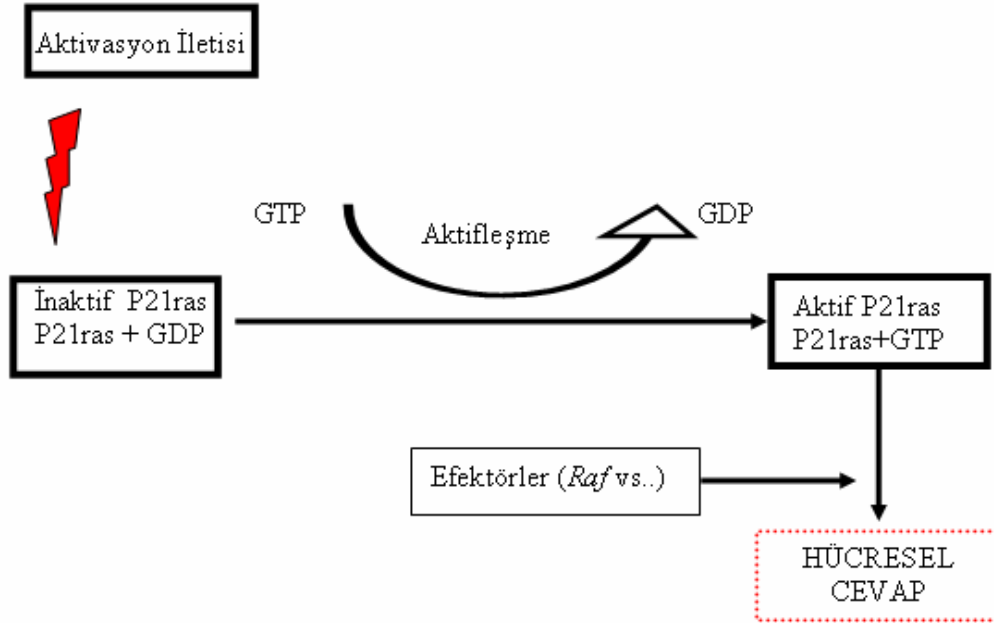
N-ras onkogeni nokta mutasyonları, 2. ekzonda 61. kodonda, *K-ras* onkogeni 1. ekzonda 12. kodonda, *H-ras* onkogeni 1. ekzonda 13. kodonda bulunmaktadır. *Ras* onkogen ailesi üyeleri *N-ras*, *H-ras* ve *K-ras* sırasıyla 1., 11., ve 12. kromozomda bulunurlar, 2 ekzon bölgesine sahiptir ve 6992 baz çiftinden oluşmuştur [40, 53, 64].

Çizelge 2.2. İnsan kanserlerinde *ras* onkogen mutasyonları [55]

Kanser Tipi	ras mutasyonu	Sıklık (%)
Akciğer	K	33
Kolon	K	44
İnce barsak	H	31
Pankreas	K	90
Karaciğer	N	30
Miyelodisplastik	N, K	40
Akut miyelogenik lösemi	N	30
Deri	H,K,N	46
Yumurtalık Kanseri	K	48
Serviks	K	20
Endometrium	K	10–40
Tiroit Kanseri		
Foliküler Tiroit Kanseri	H, K, N	53
Farklılaşmamış Tiroit Kanseri	H, K, N	60
Baş ve Boyun Bölgesi Kanseri	H, K	30
İdrar kesesi	H	10
Göğüs Kanseri	K	12
Beyin	N,H	13
Böbrek	H	10

Normalde hücre zarına bağımlı bir G proteini olan P21^{ras}, guanozin trifosfat (GTP) ile

bağlanarak biyolojik olarak işlevsellik kazanır, daha sonra kendine özgü olan GTPaz işlevi ile GTP' yi parçalayarak (hidroliz ederek) guanozin difosfat (GDP) a çevirir ve tekrar işlevsel olmayan şekline dönmektedir (Şekil 2.3) [57].



Şekil 2.3. P21^{ras} proteininin aktivasyonu

ras geni 21 kDa ağırlığında hücre zarının iç yüzeyine tutunmuş, hücre zarına bağımlı olan P21^{ras} adı verilen protein kodlamaktadır (Şekil 2.4) [40]. Bu protein geniş bir sinyal iletim ağında sinyal başlatıcı molekül olarak işlev yapmaktadır. Hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol etmektedir [40, 55]. P21^{ras} proteini yaklaşık 190 amino asit uzunluğunda olan GTP/GDP bağımlı bir G proteindir, G proteinleri ailesine ait alfa alt üniteye benzer olan küçük bir proteindir ve karboksil kuyruğu ile hücre zarının sitoplazmik bölgesine bağlanmaktadır. Bütün G proteinleri heteromerik yapıda olmasına karşın P21^{ras} monomerik yapıdadır [27, 40, 52, 56].

P21^{ras} proteini, *ras* onkogen ailesinin (*H-ras*, *K-Ras*, *N-ras*) bütün üyelerinde görülmektedir ve %85 benzerlik göstermektedir [54].

P21^{ras} proteininin biyolojik işlevselliği GDP/GTP döngüsünün düzenlenmesi ile kontrol edilir ve hücrede normal olarak GDP proteinlerine bağlı olarak bulunur [28].

P21^{ras} proteinleri ile G proteinleri arasında yapısal ve biyokimyasal benzerlikler bulunmaktadır. G proteinleri hücre içinde, AMP 'den ikinci haberci olarak iş gören cAMP' nin oluşmasını sağlayan adenilat siklaz enzimini işlevsel hale getirir veya etkisiz hale getirir. G proteinleri, alfa-alt birimleri üzerinde GTP' nin bağlanması ile işlevsel hale geçerler ve GTP' nin aynı alt-birimi sayesinde yavaş parçalanması ile (GTPaz aktivitesi) etkisiz hale gelirler. P21^{ras} proteinleri de, G proteinleri gibi hücrede aktif ve aktif olmayan durumda bulunurlar. Normal olarak P21^{ras} proteinleri aktif olmayan (GDP bağlı) durumda iken, dışarıdan gelen bir sinyal ile aktif (GTP bağlı) duruma geçerler. Proteinde meydana gelen değişiklik ile aktif proteinler, sinyali hücre içindeki ikinci habercilere iletirler. Bundan sonra P21^{ras} proteinleri, yine kendilerinin üstlendiği GTPaz aktivitesi ile GTP--GDP dönüşümü sonucu aktifliğini kaybeder [9].

ras protoonkogenlerindeki mutasyonlar sonucu proteinlerin aktif-aktif olmayan durumları arasındaki denge bozulmakta ve hücrelerde değişikliklere sebep olmaktadır. Yani *ras* protoonkogenleri “onkogen” haline geçer, mutasyon sonucu GTPaz aktivitesinin ortadan kalkması veya guanin nükleotidlerinin ayrılma hızlarının artması, proteinleri hep aktif durumda tutar; bu da devamlı sinyal iletimine ve sürekli bölünmeye sebep olur [9, 53].



Şekil 2.4. P21^{ras} proteininin 3 boyutlu yapısı [93]

2.1.8. P21^{ras} proteini ve sinyal iletimi

Kanser, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen birçok mutasyonun aşamalı olarak bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Kanser gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok farklı fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, kanser hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevreye yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün, çevreden bağımsız olarak yaşamını devam

ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla kötü huylu fenotipin oluşumuna neden olur [90].

İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır [89].

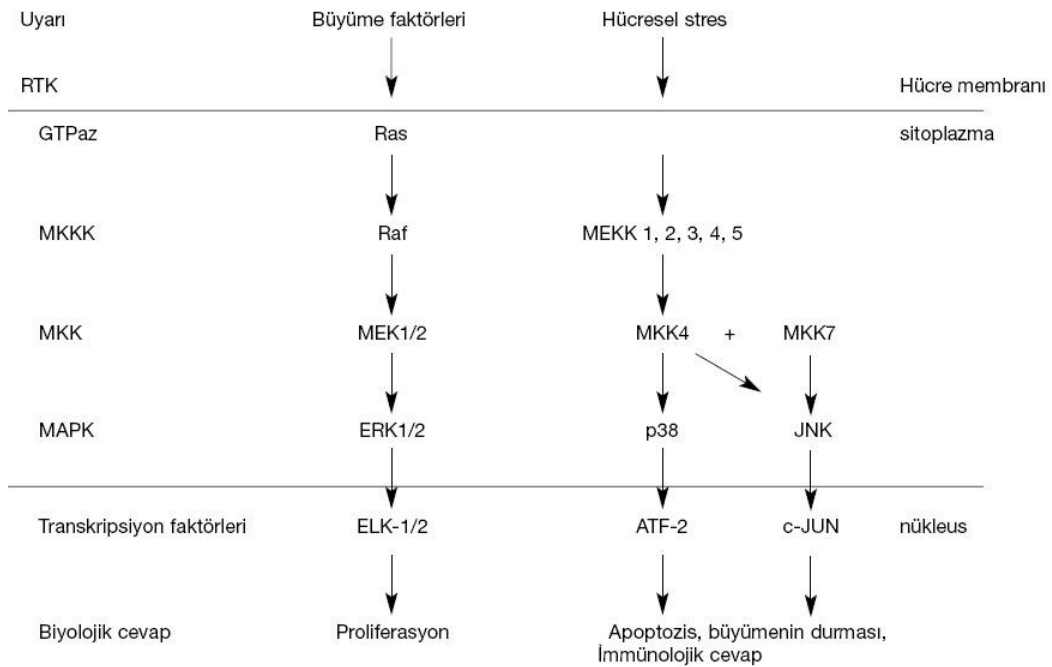
$P21^{ras}$ proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası değişimlerden (farnesilasyon) sonra hücre zarına yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde $P21^{ras}$ proteinleri aktif olmayan ($P21^{ras}$ -GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak işlevsel şekle dönüşüm ($P21^{ras}$ -GTP) tetiklenir. $P21^{ras}$ proteininin aktivasyonu geri dönüşebilen bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (son of sevenless) ve GRB-2 (growth factor receptor bound protein-2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun tepki veren (efektör) molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile $P21^{ras}$ aktivasyonunu sonlandırmaktadır (Şekil 2.5) [58, 59, 60].

Aktive olan $P21^{ras}$ proteinleri Raf kinazlara yüksek çekim gücü ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre zarına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar [58, 59, 60].

İnsan tümörlerinin %30'unda *ras/Raf/MEK/ERK* yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur [58, 59]. Bu oran tümörlerdeki *Ras* protoonkogen mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Yabani $P21^{ras}$ proteinleri, aktif $P21^{ras}$ -GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadırlar. Diğer yandan, farnesil transferaz inhibitörleri $P21^{ras}$ aktivasyonunu önlerler. Klinik çalışmalar, bu ajanların antitümöral etkilerinden tedavide yararlanılabilme olasılığını güçlendirmektedir [58, 61, 89].

$P21^{ras}$ sinyal iletim yolu ile tetiklenen hücrelerin değişim sürecinde karşılıklı etkileşim

de önem taşır. Normalde, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinozitid-3 kinaz (PI-3K) yolunu uyarmalarında P21^{ras} proteininin etkisi çok düşük düzeydedir. Buna karşılık mutasyona uğramış P21^{ras}, PI-3K yolunun önemli ve güçlü bir tetikleyicisidir. Mutasyona uğramış onkogenik P21^{ras} proteini bu yolu aktive ederek apoptozisi baskılar [58, 62]. İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü epitel hücrelerinden köken alır. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozisin baskılanması kanser oluşumu sürecinde kritik etkenlerden birini oluşturur [58, 90].



Şekil 2.5. P21^{ras} proteini ve sinyal iletimi [91]

2.1.9. Tiroit kanserlerinde *ras* protoonkogen mutasyonları

Tiroit tümörlerindeki üç *ras* (*H-Ras*, *K-Ras* ve *N-Ras*) onkogenlerinin aktive edici değişimi ilk olarak 1988 yılında bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre, *ras* onkogenlerinin değişimleri, foliküler tümörlerde papiller tümörlerden daha sık olarak görülmekte ve bu iki tip kanser, farklı değişim modelleri içermektedir. Mikrofoliküller kanserlerdeki değişimlerin %50'sine kadarki kısmının varlığı *ras* onkogenlerinin aktivasyonunun,

foliküler tiroit kanserinin oluşumunda erken bir safha olduğu fikrini desteklemektedir [64].

Tiroit kanserlerinin oluşumunda rol alan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Buna rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarla göre, mutasyonlar ve genlerin yeniden düzenlemeleri ile ilgili yapılan çalışmalarla tiroit kanserinin oluşum basamaklarını ve biyolojik davranışını anlamaya yardımcı olacak biyolojik belirteçler bulunması amaçlanmaktadır. Örneğin, insan tiroit papiller kanserlerinde yeni bir onkogen tanımlanmıştır. Bu genlere papiller tiroit kanserinin İngilizce baş harflerine göre *PTC* onkogeni adı verilmiştir; fakat çoğu tiroit kanserinde *PTC* onkogen düzenlemesi yoktur ve bunların oluşumunun moleküler mekanizması bilinmemektedir. Diğer insan kanserleri göz önüne alındığında (kalın barsak kanseri ve akciğer kanseri), tiroit kanserinde de mutasyonları da kapsayan çok aşamalı genetik bozukluklar kanser oluşumunda rol oynamaktadır [63].

Ras protoonkogeninin aktivasyonuna yol açan mutasyonlar iyi tanımlanmıştır ve tiroit kanserlerinde değişik mutasyonların yeri birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmaların karşılaştırılması fikir birlikteliklerinin yanında fikir ayrılıklarının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Daha önceden yapılan çalışmada, makrofoliküler adenomlarda hiçbir *ras* mutasyonu bulamamıştır; fakat hem mikrofoliküler adenomlarda hem de foliküler kanserde değişik *ras* mutasyonlarına rastlamıştır [63, 65]. Aynı çalışmada ayrıca papiller kanserde de mutasyonlar tanımlamıştır [63, 65]. Farklı bir çalışmada, hem iyi huylu hem de kötü huylu tiroit tümörlerinde yüksek oranda *ras* protoonkogen mutasyonlarına rastlamışlardır [88]. Başka bir çalışmada bilim adamları, çalıştıkları 24 mikrofoliküler kanserin 6'sında ve 14 papiller kanserin 3'ünde protoonkogen mutasyonu bulmuş; fakat 3 papiller kanserin hiçbirinde mutasyon bulamamıştır [84, 86, 87]. Parafine gömülmüş tiroit kanserli örneklerle yapılan farklı bir çalışmada, P21^{ras} immünolojik işlevselliği açısından değerlendirmiştir. Normal tiroit dokuları en az aktivite gösterirken; papiller, foliküler ve Hürthle hücreli kanserler daha yoğun boyanmıştır [64].

Bu çalışmalardaki veriler bir araya getirildiğinde, tiroit kanserlerinin %20–50 sinde *ras* protoonkogen mutasyonlarının etkisi olduğunu göstermektedir. Buna rağmen, özgün histolojik sınıflardaki mutasyonların sıklığı çok değişkendir ve mutasyonlar ve tümörlerin klinik özellikleri ile ilişkisini açıklayacak çok az bilgi vardır. En büyük fark, görülme sıklığı %0–100 arası değişen makrofoliküler adenomlarda ve görülme sıklığı %21–62 arasında değişen papiller kanserlerde görülmüştür [63].

Yeniden düzenlenmeleri ve nokta mutasyonlarını içeren çeşitli farklı genetik değişimler tiroit kanserinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu genetik olayların hedefleri arasında *RET*, *TRK* yeniden düzenlemeleri ve *BRAF*, *RAS* nokta mutasyonları şeklinde olur. Genel olarak, yeniden düzenlemeler radyasyona maruz kalma ile ilişkilendirilirken, nokta mutasyonlarının kökeni bilinmemektedir. *RET*, *TRK*, *BRAF* ve *RAS* değişimlerinin ortak bir özelliği, hepsi çeşitli büyüme faktörlerinin ve hücre yüzeyi algılayıcılarının işaretlerinin olduğu mitojen etkili protein kinaz yolu boyunca işaret verirler. Bu genlerin mutasyonları veya yeniden düzenlenmeleri papiller tip tiroit kanserlerinin yaklaşık %70’inde mevcuttur ve nadiren aynı tümörde bulunurlar [66].

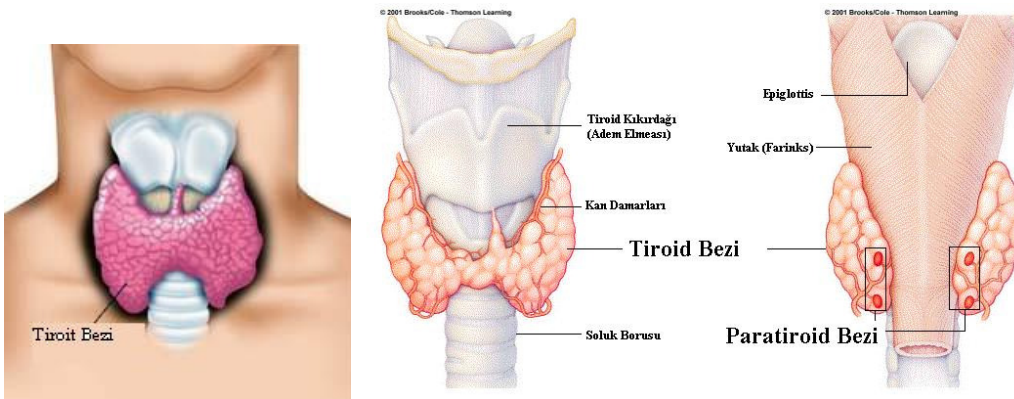
İnsan kanserlerinde bulunan *ras* protoonkogen mutasyonlarının dağılımının değişkenliği, karsinojenlerin neden olduğu değişimler yorumuyla ilgili değildir. Bu durumun asıl sebeplerinin çoklu veya çeşitli mutasyon yapıcı ajanların oluşu veya DNA kopyalanması sırasındaki anlık hatalarla karşılaşılması veya bu sebeplerin ikisinin birden olduğu düşünülmektedir. Farklı insan kanserlerindeki *ras* protoonkogen değişim dağılımlarının karakterize edilmesi, diğer etiyolojileri daha iyi anlamamızı engelleyen, moleküler bir yaklaşım sağlar. Örneğin, araştırmayı beslenme veya sigara içimi gibi bozukluklar yönlendirebilir. Akciğer tümörlerinde görülen, benzopiren gibi aromatik hidrokarbonların neden olduğu *ras* protoonkogen değişimleri ile, gastrointetinal tümörlerde görülen metilnitrore gibi alkali ajanların neden olduğu *ras* protoonkogen mutasyonlarının değişimlerinin dağılımları arasındaki benzerlikler fikir verme açısından çok faydalıdır [67].

2.2. Tiroit Bezinin Yapısı

Daha öncelerde “laringeal gland” olarak kabul edilen tiroit bezi, 1646 da Wharton kendi şekli veya yakın ilişkide bulunduğu tiroit kıkırdağının şeklinden dolayı tiroit bezi olarak isimlendirmiştir (Şekil 2.6) [70].

Tiroit bezi, boynun ön kısmında soluk borusunun önünde yer alan, iki bölmeli ve oldukça damarlı bir organdır. Vücuttaki en büyük salgı bezidir ve tiroit hormonu salgılamakla görevlidir [71].

Tiroit bezi yeni doğanda 1,5 gr, yetişkinlerde 15–20 gr. ağırlığında koni şeklinde iki bölme ve bu bölgeleri birleştiren isthmusdan oluşur. Berry ligamanı ile soluk borusunun (trake) birinci ve ikinci halkasına tutunmuştur. Tiroit bezi pretrakeal fasiadan oluşan yalancı bir kapsül ile örtülüdür. Bunun altında tiroit bezinin gerçek kapsülü bulunur [70].



Şekil 2.6. Tiroit bezi [92]

2.2.1. Tiroit embriyolojisi

Tiroit bezi embriyonik gelişimde görülen ilk salgı bezidir. Zigot oluşumundan sonraki 24. günde primitif yutağın tabanında endoderm tabakasının kalınlaşması şeklinde belirir [72]. İleriki gelişim evresinde baş barsak önünde ventralden kaudale doğru inerek tiroit

divertikulumunu (cep) oluşturur [72].

Kısa bir süre boyunca tiroit bezi, tiroglossal kanal vasıtasıyla dil kökü ile irtibat halindedir, sonrasında tiroglossal kanal normal olarak kaybolur. Piramidal lob tiroglossal kanalın persistan alt ucunu temsil eder [71].

Gelişimin daha ileri dönemlerinde tiroit cebi apoptozise uğrayarak ortası boşalır ve tiroit cebi iki kola ayrılır. Bu kollara giden hücreler farklılaşarak olarak sağ ve sol bölmeleri oluşturur. Sağ ve sol bölmeler istmus adı verilen bir parça ile birbirlerine bağlanırlar. Istmus, gelişen 2.ve 3. soluk borusu halkalarının önüne yerleşir. 5. haftanın sonunda, dil kanalının yozlaşması sonucu, gelişen tiroidin dil ile olan bağlantısı kesilir, 7. haftanın sonunda izole tiroit bezi krioid kıkırdağın önündeki son yerleşim yerine gelir [72, 73]. İnsanların %50' sinde primordial bölme olarak isimlendirilen bir bölme daha vardır ki bu lob triglossal kanalın kaudal bölümünün yozlaşmaması sonucu gözlenir [72, 73].

Tiroit primordiumu, endodermal kökenli hücrelerin gruplar halinde birleşmesinden oluşur. 10. haftada, vasküler mezenşimin folikül hücrelerini sarması sonucunda, küçük hücre grupları oluşur. Bu hücrelerin iç kısmında lümen meydana gelir ve tek katlı epitel hücrelerin iç boşluğunu çevreler. 11. haftada hücre iç boşluğunda kolloit oluşumu gözlenir. Bu yapının tamamına tiroit folikülü denir. 3. ayın sonunda tiroit bezi işlevine başlar [72, 73].

5. faringeal cepten ultimobronkiyal cisim oluşur. Ultimobronkiyal cisimden farklılaşarak hücrelerde, kandaki kalsiyumu düzenlemekle görevli olan kalsitonin hormonunu salgılayan, tiroidin parafoliküler hücrelerini oluşturur [72, 73].

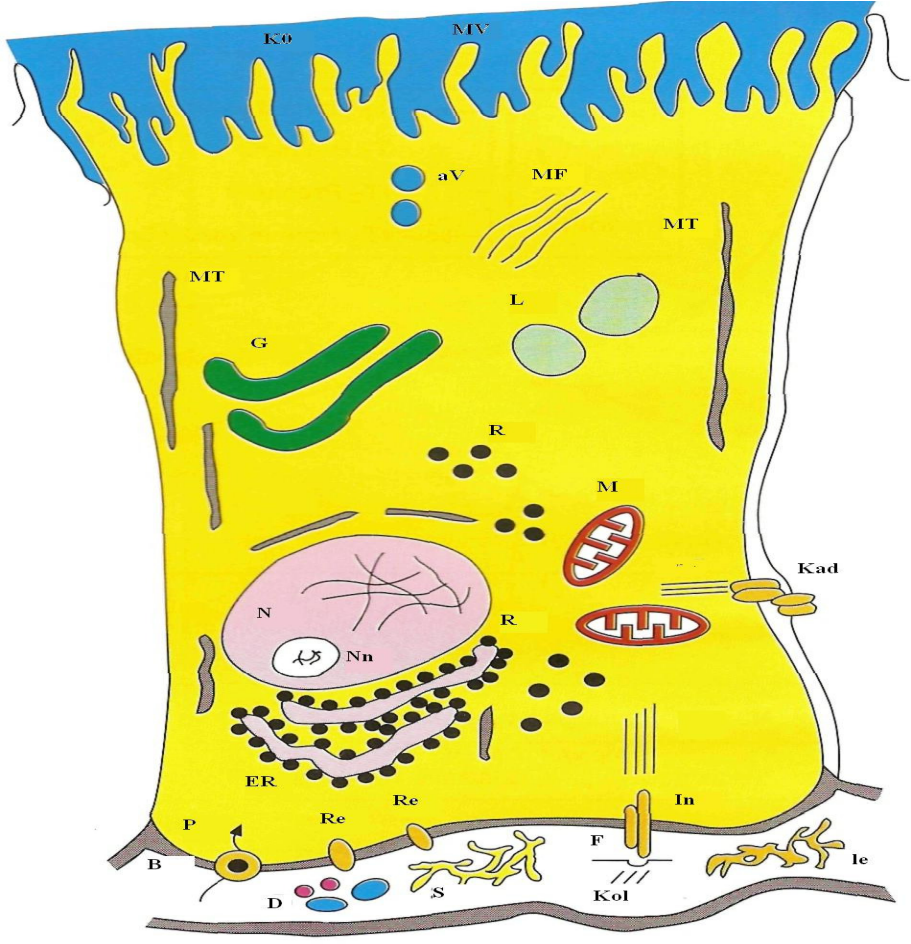
2.2.2. Tiroit histolojisi

Gebeliğin 9. haftasında tiroidin birleşmesi tamamlanır ve tiroit son şeklini alır (Şekil 2.7). Ancak tiroidin histolojik gelişimi 16. haftaya kadar, fonksiyonel gelişimi ise tüm

gebelik boyunca devam eder [73].

Foliküler yapı ve fonksiyonlarının gelişimi gebeliğin 5. haftasında tiroidin morfolojik gelişimi devam ederken, tiroitte tiroglobulin (Tg) sentezi de başlar. Olgun Tg, her biri 12S olan alt birimlerin birleşmesi ve iyodinasyona uğraması sonucu oluşan 19S yapısındaki bir glikoproteindir. Beşinci haftadan itibaren tiroitte saptanan Tg, 12S yapısındaki Tg'dir. 19S yapısındaki olgun Tg ancak 28.haftadan sonra, diğer bir deyişle doğumdan hemen önceki devrelerde ortaya çıkar [73].

Gebeliğin 7. haftasından itibaren, median tiroitte bulunan endoderm kökenli epitelyal hücreler çoğalırken, bu hücrelerin düz endoplazmik retikulumları genişleyerek sitoplazma içi kanalcıkları oluşur. Prekolloidal evre olarak adlandırılan bu evre 7–13 haftaları kapsar. Bu devrede tiroitte az da olsa iyot tutulumunun (uptake) ve tiroksin (T4) sentezinin başladığı kabul edilir [76]. 13–14. haftalarda, her hücrede oluşan kanalların genişlemesi ve içlerinin kolloidle dolması sonucunda sitoplazma içi boşluklar belirir ve biriken kolloid hücre dışı alana salınmaya başlanır. Kolloid salan ve yan yana duran hücreler, birbirlerine desmozomlar aracılığıyla tutunarak hücre dışına saldıkları kolloidin kendi aralarında kalmasını sağlarlar. Bir anlamda primitif folikül lümeni olan bu alan daha sonra folikül lümeni haline dönecektir. Bu devrede tiroitte iyot tutulumunda ve T4 dâhil iyodotirozinlerin sentezinde artış olur ve az miktardaki tiroksin dolaşıma geçer. Yine karaciğerde sentezlenen ve iyodotirozinleri bağlayacak olan proteinler de dolaşıma katılmaya başlar [73].



Şekil 2.7. Tirosit yapısı ko: kolloid, mv: mikrovillüs, av: apikal vezikül mf: mikrofilament, mt: mikrotübül, g: golgi, l: lizozom, r: ribozom, m: mitokondri, kad: kadherin, n: çekirdek, er: endoplazmik retikulum, b: bazal membran, p: iyon pompası, re: reseptörler, in: integrin, f: fibronektin, kol: kollojen, d: damarlar, s: sinirler, le: lenf kanalları [73]

Tiroidin temel yapısını oluşturan her bir folikül içi kolloidle dolu bir lümeni çepeçevre saran tek sıralı küboidal silindirik epitel ve bu epiteli çevreleyen bazal membrandan oluşur, ancak normal bir folikülün çoğunu kübik hücreler yapar. Folikül hücresine tirosit adı da verilir [73].

Folikül yapısında bulunabilen diğer bir hücre Hürthle hücresi olup kolloid lümenle ilişkidir, ancak fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Foliküler hücrenin polaritesi

lümene doğru iken parafoliküler hücrenin polaritesi interfoliküler kılcal damarlara doğrudur. Tirositlerde T3 ve T4 hormonları, parafoliküler hücrelerde tirokalsitonin hormonu sentezlenir. Bu hormonlar stromadaki kılcal damarlar aracılığıyla sistemik dolaşıma geçerler [73].

Tirositlerin apikal yüzünde çok sayıda mikrovillüsler vardır. Böylece hücrenin kolloidle daha fazla temas etmesi sağlanır. Kolloid tiroit hormonlarının depo edildiği ortam olup her biri 20–120 µm çaplı lobüllerden oluşur ve protein yoğunluğu 100–400 mg/ml’ dir. Folikül hücrelerinin sitoplazmasında çok fazla miktarda kıvrımlı endoplazmik retikulum, ribozom, golgi cisimciği, lizozom ve mitokondri vardır. Bazal membranda ise birçok uyarının bağlanacağı reseptörler ve bazolateral kısımda iyodun aktif transportunu sağlayan pompa yer alır [73].

Tiroitin histolojik yapısı TSH hormonunun kontrolündedir. TSH uyarısı arttığında folikül hücreleri silindirik hale gelirken kolloid endositozunun artması sonucu tiroit folikülü küçülür. İyot eksikliğinde olduğu gibi, TSH uyarısı devam ederse foliküler hücreler çoğalmaya ve farklılaşmaya uğrar. Amaç gerekli dokulara yeteri kadar hormon verebilmektir. Mikrovillüsler papiller yapılara dönüşmeye başlar. Endositoz, kolloid yapımından fazla olduğu için lümendeki kolloid miktarı daha da azalır. TSH’ nın etkisine bağlı olarak foliküler arası damar ağı belirginleşir. Bu olayların tersi, dolaşımdaki TSH’ nın düşük olduğu durumlarda ortaya çıkar. Bu durumda ya dolaşımda yüksek miktarda tiroit hormonu vardır ya da hipofiz yeteri kadar TSH üretememektedir. Sonuçta folikül hücreleri kübik hale gelir, lümen düzleşir. Endositoz çok azaldığı için aşırı kolloid birikimine bağlı kolloid lümen gerginleşir. Kandaki kalsiyum seviyesi yükseldiğinde parafoliküler hücrelerde aşırı büyüme (hipertrofi) ve kalsitonin içeren granüllerde artma olurken depo edilmiş hormon, foliküler arasındaki kan damarlarına bırakılır. Kandaki kalsiyum miktarı azaldığında ise hormon salınması için gerekli uyarı azalacağı için hücre sitoplâzmasındaki salgısal granüllerin sayısı artar ve hormon salınmasında azalma olur [73].

Bir tiroit folikülünde esas olarak üç tip hücre vardır. Bunlar; hem foliküler lümen hem de bazal membranla ilişkide olan normal folikül hücresi ve oksifilik (Hürthle) hücreler ve lümenle ilişkide olmayan ancak bazal membranla ilişkide olan parafoliküler hücrelerdir. Bu hücrelere aynı zamanda sırasıyla A, B ve C hücreleri adı da verilmektedir. A ve B hücreleri tiroidin her bölgesinde yaygın olarak bulunurken C hücreleri en fazla tiroitin üst ve alt kesimlerinin birleştiği bölgede bulunurlar [73].

A hücresi normal folikül hücresi olup tiroit hormonlarının (T3-T4) yapım ve salınmasından sorumludur ve TSH hormonunun etkisi altındadır. Histolojik olarak sitoplâzması soluk asidik boyanma özelliği gösterir. Fazla miktarda granüller endoplazmik retikulum içerir. Özellikle salgısal (sekretuar) dönemde, iyi gelişmiş golgi cisimleri ve çok sayıda lizozom vardır. Mitokondri sayısı B hücrelerine göre daha azdır [73].

B Hücreleri, A hücrelerine göre yoğun granüller asidik sitoplazma içerir. Bu nedenle oksifilik hücre adını alır. Bu hücreye Askanazy hücresi, onkokist veya Hürthle hücresi adları da verilmektedir. Bu hücre daha büyüktür ve çok sayıda mitokondri içermektedirler. Bu nedenle sitoplâzma yoğun granüller görünür. Diğer organellerin sayısı daha azdır [73].

C Hücreleri, diğer adı parafoliküler olan bu hücre tirokalsitonin (TC) hormonunun yapım ve salınmasından sorumludur ve TSH 'ın kontrolünde değildir. Diğer tiroit hücrelerden en önemli farkı sitoplâzmasında amiloid iplikçiklerin bulunmasıdır. Bu nedenle amiloid boyası ile boyanırlar [73].

2.3. Tiroit Kanseri Tipleri

Tiroit kanserleri; papiller, foliküler (Hürthle hücreli olanlar dâhil), medüller ve anaplastik kanserler şeklinde görülür. Okült papiller kanserler sıklıkla iyi huylu davranışlıdır. Ancak anaplastik kanserler çok saldırgandır ve hastaların çoğu 6 ay içinde ölür. Tiroit kanserleri iki ana epitel hücreden kaynaklanır. Papiller, foliküler ve Hürthle

hücreli kanserler primitif ön bağırsaktan kaynaklı hücrelerden gelişirler. Bu hücreler tiroksin ve triiyodotironin yapımından sorumludur. Medüller tiroit kanseri (MTC) nöral krestten (ultimobrankial) kaynaklanan C hücrelerinden gelişir. Foliküler hücre kaynaklı tiroit kanserleri diferansiye (DTC) ve anaplastik tiroit kanseri (ATC) gibi iki ana grubu içerir. Karışık tip papiller-foliküler karsinom ve papiller karsinomun foliküler varyantı papiller karsinom sınıfına girer. Çünkü davranışları aynıdır. Tiroit kanserlerinin sınıflaması Çizelge 2.3 'de belirtilmiştir [2, 19, 73].

Çizelge 2.3. Tiroit kanserinin sınıflandırılması [73, 75]

EPİTELYAL TÜMÖRLER	NON-EPİTELYAL TÜMÖRLER
İyi Huylu	Kötü huylu
Foliküler adenom	Kötü huylu
Diğerleri	Fibrosarkoma
Kötü Huylu	Diğerleri
Foliküler karsinom	ENDER GÖRÜLENLER
Papiller karsinom	Karsinosarkom
Skuamöz hücreli karsinom	hemangioma
Anaplastik karsinom	Lenfoma
İg hücreli	Teratomlar
Dev hücreli	SEKONDER TÜMÖRLER
Küçük hücreli	SINIFLANDIRILAMAYANLAR

İnce iğne aspirasyonu (İİA) ile yapılan sitolojik incelemeler papiller, medüller, anaplastik karsinomlar ve tiroit lenfomalarının tanısı için iyi bir yöntemdir. Ancak foliküler adenomla karsinomu, Hürthle hücreli adenomla karsinomunu ayıramaz. Yine ailevi tiroit kanserleri ve boyuna terapötik düşük doz radyasyon öyküsü olan tiroit nodüllü hastalarda yüksek yanlış negatif sonuç alınabilir. Çünkü bu olgularda multifokal iyi huylu ve kötü huylu tiroit kanseri görülme sıklığı yüksektir ve tekrarlama oranı

fazladır [73].

2.3.1. Papiller tip tiroit kanseri (PTC)

Papiller tiroit karsinom (PTC), foliküler hücre farklılaşması gösteren kötü huylu epitel kökenli tiroit tümörüdür [75]. Papiller tümörler bütün tiroit kanserlerinin yaklaşık %90'ını kapsamaktadır. Tiroit tümörlerinin çocuklukta yaygın olmamasına rağmen PTC' ler pediatrik tiroit kanserlerinin en yaygın olanıdır. Yetişkinlerde PTC' lerin çoğunluğu 20 ile 50 yaş arasında, kadın erkek oranı 4–5: 1 olarak gerçekleşir. Tiroit kanseri vakası 1973 – 2000 yılları arasında papiller karsinomun saptanmasına bağlı olarak yüzbinde 3,6'dan 8,7'ye yükselmiştir [75].

PTC' nin tanısal özellikleri arasında çekirdeksel genişleme ve düzensizlik, üst üste gelmek, temizleme (çim veya Orphan Annie görünümü) yer alır. Geleneksel PTC' ler karmaşık dallanmış bir yapıda, papiller çekirdeklerin yüzeyleri neoplastik hücrelerle kaplanmış özelliktedir. Psammom yapılar vakaların %50'sinde görülmüştür ve tipik olarak stroma veya lenfatik kanallarda meydana gelmiştir. İntratümöral fibröz ve lenfositik sızmalar bu tümörlerin diğer ortak özelliklerindendir [66].

PTC' nin çok sayıda değişkeni görülebilir. En yaygını ve tanısal olarak en uğraştırıcısı foliküler değişkesidir. Bu tümörler küçültülmüş veya küçültülmemiş olabilirler ve PTC' nin karakteristik çekirdeksel özelliklerini taşıyan folikülerden oluşmuştur. Bu tümörlerin tanısındaki gözlem varyasyonu (özellikle de küçültülmüş tipte), çekirdeksel özellikler az gelişmiş olduğu üzere yüksek olmuştur. Foliküler değişkedeki lenf boğumu metastazları klasik PTC' dekinden daha az yaygındır [73].

PTC, radyasyona maruz kalmış çocuklarda göreceli olarak yaygındır. Yayılmış sertleşme, toplam hayatta kalma süresi pek fark göstermese bile klasik PTC' den daha yüksek pulmoner metastaz sıklığı ile erişkinlere göre çocuklarda daha yaygındır. Uzun hücre ve silindirik hücrelerinin klasik PTC' lere göre daha kötü olduğu varsayılmaktadır. Fakat tümör safhası ve derecesi histolojik alt-tiplerden daha önemli olabilir. Yetersiz

farklılaşmış, farklılaşmamış veya pullu karsinom bileşenleri olan PTC' lerin tedavisi, PTC olamayan bileşenin oranına bağlıdır [73, 76, 77].

Çapı 1 cm den daha az olan tümörler için papiller mikrokarsinom terimi kullanılmıştır. Bu tümörlerin çoğunda foliküler veya papiller özellikler olmasına rağmen, uzunlukları 1 cm' nin altındadır. Papiller mikrokarsinomlar oldukça yaygındır. Otopsilerin %30'unda ve PTC' yle ilgili olmayan düzensizlikler için yapılan cerrahi tiroitektomilerin % 24'ünde çıkar [73].

Yeniden düzenlemeleri ve nokta mutasyonlarını içeren çeşitli farklı genetik değişimler PTC' nin gelişmesi içerisinde yer almıştır. Bu genetik olayların hedefleri arasında *Ret*, *Trk* (rearanjman) ve *Braf* ve *Ras* (nokta mutasyonları) yer alır. Genel olarak, rearanjmanlar radyasyona maruz kalma ile ilişkilendirilirken, nokta mutasyonlarının orijini bilinmemektedir. *Ret*, *Trk*, *Braf* ve *Ras* değişimlerinin ortak bir özelliği, hepsi çeşitli büyüme faktörlerinin ve hücre yüzeyi algılayıcılarının işaretlerinin olduğu mitojen etkili protein kinaz yolu boyunca işaret verirler. Bu genlerin mutasyonları veya rearanjmanları PTC lerin yaklaşık %70'inde mevcuttur ve nadiren aynı tümörü sararlar [66].

2.3.2. Foliküler tip tiroit kanseri

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre foliküler karsinomlar foliküler farklılaşma göstermiş fakat PTC' nin tanısal çekirdek özellikleri az olan kötü huylu epitel tümörler olarak tanımlanmıştır [75]. Bu tümörler Tiroit kanserlerinin %10 – 15'ini kapsarlar ve 3–4: 1 kadın-erkek oranıyla görülmektedirler. Çocuklarda nadir olarak görülür. Tümörlerin çoğunluğu kapsüllenmiş ve foliküler, katı veya trabeküler numunelerde oluşmuş foliküler hücrelerden meydana gelmiştir. Tümörler yayılımın kapsamına göre iki ana gruba ayrılırlar. Transkapsüler veya sınırlı vasküler yayılım gösterenler, minimal yayımlı kanserler olarak sınıflandırılır. Geniş çaplı kapsüler ve vasküler varlığı gösteren tümörler geniş yayımlı foliküler karsinomlar olarak sınıflandırılırlar. Minimal

kapsüler yayılımı olan tümörlerin yeniden tekrar etme veya metastaz riskleri çok az olmasına rağmen, aşamalı hastalık riski minimal vasküler yayılımı olan tümörlerde yükselmiştir. Geniş çaplı yayılımı olan foliküler karsinomlar önemli derecede hastalık ve ölüm ile sonuçlanırlar [66].

Onkokistik (Hurthle hücresi) tümörlerinin sınıflandırılması ciddi bir tartışmayı doğurmuştur. Bu tümörler bazı sistemlerde ayrı bir çeşit olarak sınıflandırılmış iken, 2004 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması foliküler kanserin bir değişkesi gibi sınıflandırmıştır. Klasik foliküler kanserler gibi onlar da en az ölçüde ve geniş yayılan alt-tiplere bölünmüştür. Tanım itibarıyla en az %75 oranında bol granül eozinofilik sitoplazma (onkokistler) içermektedir [73].

H-ras, *K-ras* ve *N-ras*’ taki mutasyonlar foliküler adenom ve karsinomların en fazla %50’sinde bulunmuştur. *ras* mutasyonu içeren karsinomlar arasından, 14/17’sinde (%82) *N-ras* kodon 61 mutasyonları ve 3/17’sinde (%18) *H-ras* kodon 61 mutasyonları kaydetmişlerdir. Foliküler adenomda aynı mutasyonlar sırasıyla 7/11’inde (%64) ve 4/11’inde (%36) mevcuttur. Diğer çalışmalarda kaydedilmiş olmasına rağmen *K-ras* kodon 12 mutasyonlarının hem karsinomlarda hem de adenomlarda bir örneği yoktur. Bu bulgular *ras* geninin mutasyon durumunun iyi huylu ve kötü huylu foliküler hücre tümörlerini birbirinden ayırmada kullanılamayacağını altını çizmektedir [66].

İyi huylu ve kötü huylu tiroit tümörlerinin sitogenetik çalışmaları, bazı vakalarda tekrarlayan yer değiştirmenin (t2:3)(q12–13;p24–25) mevcut olduğunu ortaya koymuştur [66]. Adenomların 2/16’sında (%13) ve 6/11’inde (%55) *PAX8-PPAR* yeniden düzenlemelerini kaydetmiştir. Geçmişte radyasyona maruz kalmış hastalarda yeniden düzenlemelerin yaygın olduğunu belirtmişlerdir [66]. *PAX8-PPAR* pozitif sporadik foliküler karsinomları açıkça saldırgan iken, *PAX8-PPAR* negatif tümörleri asgari saldırgandırlar. Adenomları ve karsinomları kapsayan onkokistik foliküler tümörler negatiftir [66].

Ras mutasyonlarını *PPAR* yeniden düzenlemeleri ile karşılaştıran bir çalışmada, klasik foliküler karsinomların %49'unda *ras* mutasyonları, %35'inde *PAX8-PPAR* yeniden düzenlemeleri ve %3'ünde de her iki anormallik görülmüştür [66, 78]. Bu bulgular klasik foliküler tip kanserin, *ras* veya *PPAR* genlerinin de içinde bulunduğu en az iki farklı yoldan geliştiğini öne sürmektedir [66, 78].

2.3.3. Onkokistik tip (hürtle hücre) tiroit kanseri

Mitokondri zengini onkokistik hücreleri tiroit bezinin; papiller, foliküler, yetersiz farklılaşmış, farklılaşmamış ve medüler histotiplerinin yer aldığı iyi huylu ve neoplastik koşullarında geniş bir çeşitlilikle bulunurlar. Bazı yazarların foliküler onkokistik tümörleri başka bir varlık olarak sınıflandırmalarına karşın, en son çıkan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması onları foliküler karsinomların bir şekli olarak kabul etmiştir. Foliküler karsinomun onkokistik değişkesi maun ağacı kahverengisi rengiyle ayırt edilmektedir [73]. İyi huylu ve kötü huylu onkokistik foliküler karsinomlarını birbirinden ayırt etmek için kullanılan tanı yöntemleri klasik foliküler karsinomdakilerle aynıdır. Yumuşak doku yayılımı ve uzak metastaz, onkokistiklerde klasik foliküler karsinoma göre daha yaygındır. Bu tümörler servikal lenf boğumlarına metastaz yapmada klasik foliküler karsinoma göre daha fazla yeteneklidir. Onkokistik ve klasik papiller karsinomları *braf* mutasyonlarıyla ve *ret/ptc* yeniden düzenlemeleri ile benzer görülme sıklığına sahip iken, klasik foliküler karsinomların tersine onkokistik foliküler tümörlerinin *ras* mutasyon veya *PAX8-PPAR* rearanjman frekansları oldukça düşüktür. Bu bulgular onkokistik karsinomların farklı başka bir moleküler yolda geliştiklerini göstermektedir. Mitokondriyal DNA'nın silinmesi ve nokta mutasyonları neoplastik ve normal onkokistik foliküler hücrelerde yaygındır fakat bu anormalliklerin onkokistik tümörün gelişimindeki rolü bilinmemektedir. Mitokondriyal solunum zincirinde ve apoptoziste yer alan *GRIM-1* geni onkokistik tiroit tümörlerinin patojeninde bulunmaktadır [75].

2.3.4. Yetersiz farklılaşmış tip tiroit kanseri

Yetersiz farklılaşmış tiroit karsinomları, sınırlı olarak foliküler hücre farklılaşması göstermiş foliküler hücre neoplazmaları şeklinde tanımlanır [66, 79].

Morfolojik ve tanısal olarak, farklılaşmış (foliküler ve papiller) ve farklılaşmamış tiroit karsinomları arasında ortada bir noktadadır. Bu grup tümörlerin oluşturduğu rahatsızlıkların sınıflandırılması ciddi oranda tartışmalara yol açmaktadır ve yaygınlığını kesinlik ile kanıtlayan delilleri elde etmek zordur. Farklılaşmamış karsinomlara benzer biçimde, önceden var olan farklılaşmış karsinomlarla yeni baştan başlayarak doğabilirler. Nodal metastaza ek olarak, hastalar uzak metastaza da yakalanabilirler. Tümörler mitotik aktivite, nekroz ve vasküler yayılma göstergeleri ile insular, trabeküler veya katı büyüme yoluna sahip olabilmektedirler [66, 80].

Farklılaşmamış karsinomlar pek yaygın olmayan, genellikle 60 yaş ve üzerindeki kişilerde görülen, kadın-erkek oranı yaklaşık 1,5:1 olan tümörlerdir [66, 81]. Bütünüyle veya kısmen immunohistokimya (keratin pozitifliği) veya elektron mikroskopi (dezmozomlar, monofilamentler) ile epitelyal farklılaşma sergileyen farklılaşmamış hücrelerden oluşan yüksek derecede kötü huylu tümörler olarak tanımlanmışlardır. Tümörün tanısının ardından ölüm olayı, çok yüksektir. Tümörler geniş ölçüde yayılmacıdır ve iğ, epitelioid, pullu dev veya osteoklast benzeri dev hücrelerin varlığı ve bu hücre tiplerinin tek tek tümörlerin sıklıkla birbirlerine ilaveleri ile nitelendirilirler. Farklılaşmamış karsinomun lenfoepitelyoma benzeri paucicellular değişkeleri tanımlanmıştır. Bazı vakalarda farklılaşmamış karsinomun yeni baştan ortaya çıktığı görülmekteyken, diğerlerinde papiller foliküler karsinom veya yetersiz farklılaşmış karsinom ile birliktelik kurduğu görülmüştür [66].

Braf ve *ras* mutasyonları, yetersiz farklılaşmış ve farklılaşmamış karsinomların gelişimine yatkınlık kazandırdıkları görülmüştür. *p53* ve *CTNNB1* mutasyonları bu tümörlerin gelişimlerinin içinde yer almışlardır. *p53* geni; hücre dönüşüm

düzenlemesinde, DNA onarımında ve apoptosiste çok önemli rol oynayan çekirdek kopyalama faktörünü kodlar. *p53* geninin mutasyonları, yetersiz farklılaşmış karsinomlarda %25 ve farklılaşmamış karsinomlarda %60 oranında meydana gelir [66]. *ret/ptc* faresinde fonksiyonel *p53* eksikliğinin tiroit karsinomunun saldırganlığını yükselttiğini göstermiştir [66, 82].

2.3.5. Medüller tip tiroit kanseri

Medüler tiroit karsinomu C hücresi farklılaşması gösteren kötü huylu tiroit tümörlerindendir. Bu tümörler pek yaygın değildir ve tüm tiroit kanserlerinin %10-15'ini kapsarlar [66]. Vakaların %25'e varan bir kısmı kalıtsal olarak geçer ve çoklu endokrin neoplazya (MEN2A) ve MEN2B ile veya medüler tiroit karsinomun (MTC) hastalık tablosundaki izole edilmiş kalıtsal tümörler ile birliktelik gösterirler. MEN2A birleşmiş tümörleri çoğunlukla geç ergenlik ve erken çocukluk dönemlerinde görülmektedir [66].

Bazı hastaların tümörleri boyut bakımından çeşitlilik gösterirler fakat çoğunlukla tek taraflıdır. MEN2A birleşmiş tümörleri ise çoğunlukla iki taraflı ve çok merkezlidir. Tümör hücreleri sıklıkla yayılmacı veya yuvalanmacı bir büyüme şekli gösterirler ve kalsitonin için pozitif poligonal yuvarlak veya uzun hücrelerden meydana gelirler. Tümörlerin münferit ve kalıtsal formları genellikle birbirinden ayırt edilemez; ne var ki, kalıtsal formlar tipik olarak C-hücresi aşırı büyümesi ile birliktelik içindedir [66].

ret 'in nokta mutasyonları MEN2A, MEN2B ve FMTC hastalarının %95'inden fazlasında mevcuttur [66]. Çoğu MEN2A mutasyonları kodon 634'ü (sistin zengini alan) etkiler iken, FMTC' de bunlar sistin zengini bölge boyunca daha eşit dağılmışlardır [66]. Diğer taraftan MEN2B mutasyonları esasen interselular tirozin kinaz alanındaki kodon 918'i etkilerler. Münferit MTC' de somatik mutasyonlar vakaların %70'ine ulaşan bir oranda görülmektedir ve diğer bölgelerde de ortaya çıkmalarına rağmen çoğunlukla kodon 918'i etkilemektedir. *ret* mutasyonları *ret* alıcısının aktive edilmesine yol açar.

Mutant *ret*'in kanser oluşumundaki rolü transgenik farede kodon 634 ile gösterilmiştir [66, 83].

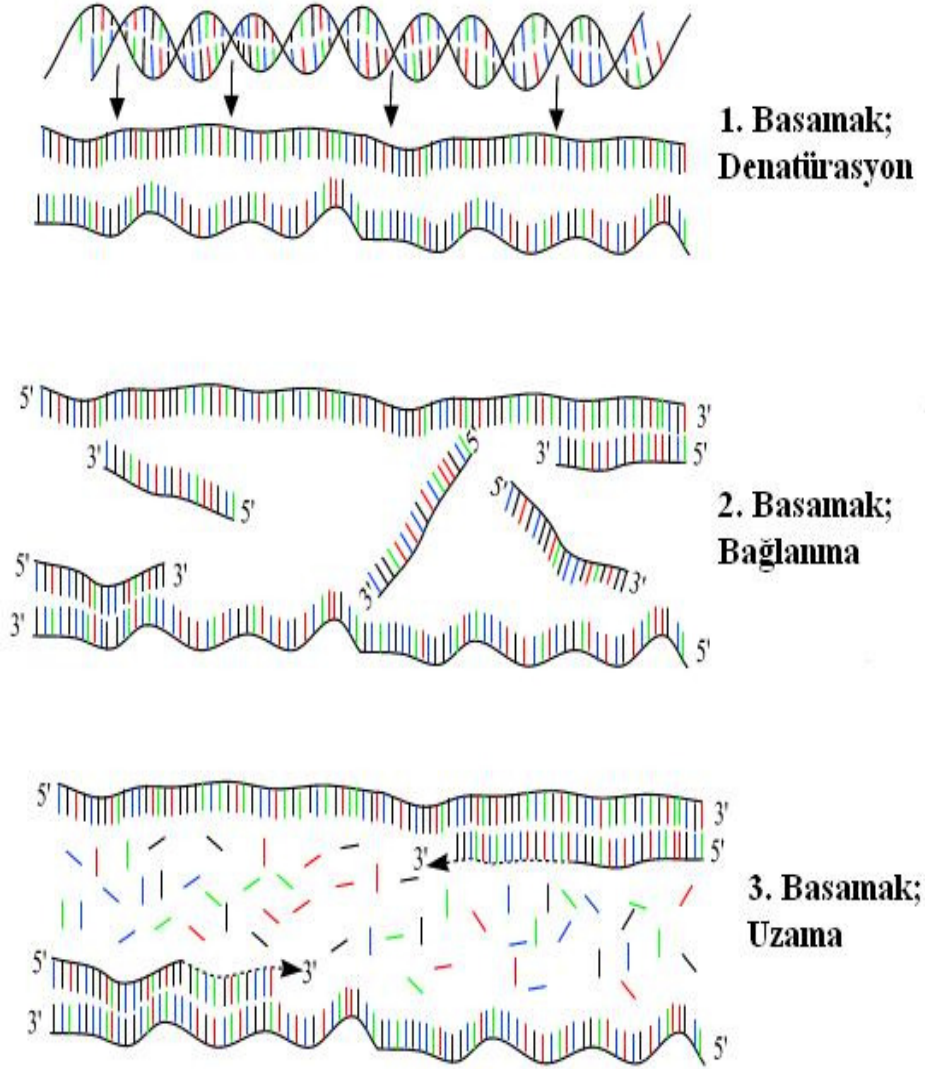
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, DNA molekülleri arasında, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntemin uygulanabilmesi için çok az miktardaki DNA bile yeterlidir. PZR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı diziler ile hibridize olur. Sıcaklığa dayanıklı bir polimeraz, deoksinükleotid trifosfat karışımını (dNTP; A, C, T, G) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl), ayrıca önemli olan bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları gereklidir [68].

PZR, DNA ipliklerinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), daha sonra da zincir uzamasını (polimerizasyon), ve bu döngülerin istenilen belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PZR döngüsünü oluşturur. Elde edilecek ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrar sayısına bağlıdır. Oluşturulan DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. İşlem sıcaklık döngü cihazı (thermocycler) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir (Şekil 2.9). Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir [68, 69].

İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincir haline getirilir. Bu genomik DNA; kurumuş kan ya da semen gibi adli tıp örnekleri, uzun süre saklanmış tıbbi

örnekler ve tek bir saç teli gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar $90-95^{\circ}\text{C}$ ' de belirli bir süre ısıtılır. Sıcaklık $50-70^{\circ}\text{C}$ arasında bir değere düşürülerek primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler 15–30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA'nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Reaksiyon karışımına DNA polimeraz enziminin eklenmesiyle $70-75^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkları arasında DNA sentezi gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Şekil 2.8) [68].



Şekil 2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları [93]

PZR'den iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerdendir. Bu amaçla genellikle Tris-HCl pH: 8,4 tepkime karışımında son değişimi 10mM olacak şekilde kullanılır. PZR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50–60 mM düzeyinde K^+ bulunmasının, çoğaltılmayı önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Yine karışımında 100µg/ml jelatin bulunmasının da benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, magnezyum klorür ($MgCl_2$) yoğunluğunun azaltılması ile Taq

polimeraz doğruluğu artırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg^{+2} iyonuna bağlandıkları için her PZR protokolünde Mg^{+2} yoğunluğunu deneye dayalı olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg^{+2} , enzimin özgüllüğünü azaltır, azı ise; enzimin etkisiz olmasına yol açar [69].



Şekil 2.9. PZR cihazı

2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin incelenmesinde değişik moleküler teknikler bulunmaktadır. Bu tekniklerden biri, PZR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri ile kesilerek incelenmesidir. Restriksiyon enzimleri, DNA çift sarmalında kendilerine özgü tanıma dizilimini şeker ve fosfat omurgasından keser ve bu şekilde DNA'yı değiştirmeyi mümkün kılarlar. Tanıma dizileri çoğu restriksiyon enzimi için DNA zincirinin her iki iplikçiğinde de aynıdır, bunlar “palindromik diziler” olarak adlandırılır. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezler. Esas görevleri; dışarıdan bakteriye giren bazı genleri parçalayarak mutasyonlara engel olmak ve genetik yönden kararlılığı korumaktır. Bu mekanizma, savunma mekanizmasıdır. Bakteriye özgü bu enzimler, çift sarmallı DNA üzerinde özgün bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağını keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar [69].

Restriksiyon endonükleaz enzimleri adlandırılırken izole edilen prokaryotun cins isminin ilk harfi ve tür isminin ilk iki harfi kullanılır. İzozizomerler ise; farklı

mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziye tanıyıp kesim yapan RE'lerdir [69].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak 24 tiroit kanseri, 9 guatr ve 1 hipertiroidi hastası olan 34 adet deney grubu ve 77 adet kontrol olmak üzere toplam 111 kan örneği kullanılmıştır. Kullanılan kan örnekleri Ankara Numune Hastanesi Genel Cerrahi bölümünden temin edilmiştir. Çalışma öncesi bireylerden çalışmaya dair onay formları doldurularak izinleri alınmıştır.

Tamponlar ve kimyasal çözeltiler

DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

—Kırmızı Kan Hücreleri Lizis çözeltisi (RBC Lizis çözeltisi): 15 mM amonyum klorür (NH_4Cl), 10mM sodyum bikarbonat (NaHCO_3), 0,5 M etilendiamid tetra asetik asit (EDTA)

—STE çözeltisi: 10mM Tris- hidrojen klorür (Tris-HCl), 400mM sodyum klorür (NaCl), 2mM EDTA

—Proteinaz K Çözeltisi (20 $\mu\text{g/ml}$)

-%10' luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi: 10 gr SDS 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

—Fenol: Kloroform: İzooamilalkol Çözeltisi (25:24:1): Fenol 65°C su banyosunda sıvı hale gelinceye kadar beklendikten sonra 500 ml fenol, 480 ml kloroform, 20 ml izoamilalkol karışımı üzerine 1:1 oranında 100mM Tris-HCl pH:7.4 (1000 ml) ilave edilerek iyice çalkalanır. +4°C' de bir gece bekletildikten sonra kullanılır.

—2M Sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) Çözeltisi:

—Stok EDTA 29,2 gr, 160 ml saf su içerisine manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülür, hacim 200 ml tamamlanır. pH 8,0 olması için NaOH eklenir, sterilize edilip kullanılır.

—TE Çözeltisi: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA

-%95' lik ve %70' lik etil alkol çözeltileri

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

—Taq polimeraz tamponu 10x: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/ml jelatin.

—Magnezyum Klorür ($MgCl_2$): 25 mM

—Nükleotit Karışımı: 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

—Taq polimeraz: 5 u/ μ l

—Primerler: Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR’ da kullanılan primerler ve nükleotid dizileri

Primer	Nükleotid dizisi 5’-3’
K-ras (1. basamak)	GAAGCTTATGTGTGACATGTCTA GAAGGATCCTGCACCAGTAATATGCA
K-ras 12. Kodon (<i>Hph</i>I)	CCTGGTGAAAATGACTGAAT AGGCACTCTTGCCTACGTCA
N-ras (1. basamak)	TAAAGTACTGTAGATGTGGCT TCACCTCTATGGTGGGATCAT
N-ras 61. Kodon (<i>Bst</i>nI)	CAAAGTGGTGGTGGTTGGACCA AGTGGTCCTGGATTAGCTGGAT
H-ras (1. basamak)	GCTGTGGGTTTGCCCTTCAGAT CTCCAGAGGAAGCAGGAGACA
H-ras 13. Kodon (<i>Hae</i>III)	GCCTGCTGAAAATGACTGAA CGTCAAGGCATCTTGCCTAGG
H-ras 13. Kodon (<i>Hph</i>I)	TGAGGTTCTTGCAGGTGAGAAA TGTCAGTGCGCTTTTCCCATCA

Poliakrilamit jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler

—Akrilamid Çözeltisi (% 30): 29,0 gr akrilamid, 1 gr N, N’ metilen-bis-akrilamid 100 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüş ve 4°C’ de muhafaza edilmiştir.

-Tris- Borik asit- EDTA (TBE)Tamponu (5X): 54 gr Tris Base, 27,5 gr borik asit, 20 ml 0.5M EDTA (pH 8.0) maddeleri 1000 ml distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

—Amonyum persülfat (AP) (%10’ luk): 10 gr AP 100 ml saf su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

— Tetramethylethylenediamine (TEMED)

—Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler

% 1,5 luk 25 ml agaroz jel için

—0,375 gr Agaroz,

—1 x TAE

3.2. Metot

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

Hasta ve kontrol grubuna ait olan 9 ml kan örneği 1 ml 0.5M EDTA bulunan tüplere alınmıştır.

3.2.2. Kan örneklerinden DNA izolasyonu

İçerisinde 1 ml 0.5 M EDTA bulunan tüplere alınan 9 ml kan örneği iyice karıştırılmış ve 50 ml' lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 25 ml RBC lizis çözeltisi (1: 2,5 oranında) ilave edilmiş ve yaklaşık 15 dakika buz içerisinde renk iyice koyulaşmaya kadar bekletilmiştir. Örnekler daha sonra +4°C, 4000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı kısım atılmış ve bu işleme tüm kırmızı kan hücreleri parçalanana kadar devam edilmiştir. Kırmızı kan hücreleri parçalandıktan sonra kalan beyaz kan hücreleri üzerine 20 µl Proteinaz K, son hacmi %0,5 olacak şekilde %10' luk SDS ve toplam hacmin 2,5 katı olacak şekilde STE çözeltisi ilave edilmiş ve bir gece 56°C sıcaklığındaki su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine 1/1 oranında fenol: kloroform: izoamilalkol karışımından ilave edilerek 10 dakika iyice karıştırılmıştır. Örnekler 15 dakika buza gömülerek bekletilmiştir. Daha sonra örnekler +4°C, 4000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki sıvı kısım başka bir tüpe aktarılmıştır. Sıvı kısmın üzerine hacmin 1/10'u kadar 2M sodyum asetat ve toplam hacmin 2 katı kadar da %95' lik etanol ilave edilmiştir. Tüpler hafif bir şekilde alt üst edilerek karıştırılmış ve DNA görünür hale getirilmiştir.

Daha sonraki aşamada DNA örnekleri -20°C ' de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 4000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılmıştır. DNA dip kısmında çöküntü halinde elde edilmiştir. Çöküntü halindeki DNA üzerine 20 ml %70' lik etil alkol ilave edilerek $+4^{\circ}\text{C}$, 4000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılmış ve DNA üzerine 20 ml %95' lik etanol konularak $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 4000 rpm' de 15 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Daha sonra ise alkolün uzaklaşması için örnekler kurutulmuştur. Kurutulan DNA örnekleri üzerine 300 μl TE çözeltisi ilave edilmiş ve bir gece 37°C ' deki su banyosunda bekletilerek DNA' nın çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.3. K-ras, N-ras ve H-ras genlerindeki mutasyonların polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile analizi

K-ras geninin 1. ekzonunun çoğaltılması için PZR programı

1. Aşama

92°C 'de 1 dk 4 sn	}	15 döngü
50°C 'de 35 sn		
72°C 'de 1 dk 25 sn		

2. Aşama

92°C' de 15 sn	}	30 döngü
50°C' de 15 sn		
72°C' de 30 sn		

N-ras geninin 2. ekzonunun çoğaltılması için PZR programı

1. Aşama

92°C 'de 1 dk 4 sn	}	15 döngü
50°C 'de 35 sn		
72°C 'de 1 dk 25 sn		

2. Aşama

92°C' de 15 sn	}	30 döngü
50°C' de 15 sn		
72°C' de 30 sn		

H-ras geninin 1. ekzonunun çoğaltılması için PZR programı

1. Aşama

92°C 'de 1 dk 4 sn	}	15 döngü
55°C 'de 35 sn		
72°C 'de 1 dk 25 sn		

2. Aşama

92°C' de 15 sn	}	30 döngü
55°C' de 15 sn		
72°C' de 30 sn		

PZR işlemi için 5 µL Taq tamponu (10x), 4 µL MgCl₂, 1 µL dNTP, 0,5 µL primer, 1 µL DNA örneği ve 0,1 µL Taq enzimi ilave edilmiş ve reaksiyon hacmi distile su ile 50 µL' ye tamamlanarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım PZR cihazına (Biometra) yerleştirilerek analiz yapılmıştır.

3.2.4. K-ras, N-ras ve H-ras genlerindeki mutasyonların restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi

10µL PZR ürünü, 10 Unit restriksiyon endonükleaz enzimi ve enzim tamponu ile karıştırılmış ve 37°C' de bir saat bekletilerek kesim yapılmıştır.

3.2.5. Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen DNA'ların poliakrilamid jel elektroforezi

Enzim kesim ürünleri %10'luk poliakrilamid jelde 150 V da dikey elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda jel etidyum bromitle (10 mg/ml) boyanmış ve UV ışık altında DNA görüntüleme cihazında görüntülenmiştir [84]

3.2.6. Poliakrilamid jel elektroforezi

PZR işlemi ve restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi sonucunda elde edilen ürünlerin analizleri %10' luk poliakrilamid jel kullanılarak yapılmıştır.

Elektroforez camlarının hazırlanması

Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra distile su ile durulanmıştır. %70'lik alkolle temizlenmiş ve kurulanmıştır. Daha sonra 1 mm' lik spacerlar yardımıyla arada 1 mm boşluk bırakılması sağlanmış ve kısıkaçlarla sabitlenmiştir.

%10'luk poliakrilamid jelin hazırlanması

Stok olarak hazırlanan %30'luk akrilamid, Bis-akrilamid solüsyonundan 20 ml, 5X TBE tamponundan 10 ml, 500µL %10'luk Amonyum Persulfat (Sigma, ABD) ve 20 ml distile su bir beherde manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldıktan sonra üzerine, 20 µl TEMED ilave edilmiş ve hazırlanan camların arasına dökülmüştür. Yükleme yapılacak hazneleri oluşturmak üzere uygun taraklar takılarak donması beklenmiştir. Jelin polimerleşmesinden ve tarakların çıkarılmasından sonra camlar dikey jel elektrofezine yerleştirilmiş (Scie-Plus Vertical Electrophoresis) ve üzeri 1x TBE tamponuyla doldurulmuştur. Örneklerden 15 µl kuyucuklara yüklenerek 150 V, 15 mA' de, soğutma yapılmaksızın 4 saat akıma tabi tutulmuştur [85].

Elektroforez işlemi sonucunda jeller etidyum bromitle (10 mg/ml) boyanmış ve UV ışık altında DNA görüntüleme cihazında (Biometra, Germany) görüntülenmiştir [85].

3.2.7. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin yürütülmesinde % 1,5 'luk agaroz jel kullanılmıştır. 0,375 gr tartılan agaroz, 25 mL 1xTAE içerisinde, mikrodalga fırın içerisinde, kaynatılarak, 4µL etidyumbromit eklenerek karıştırıldıktan sonra hazırlanan jel, agaroz jel elektroforez tankına (BIOMETRA) dökülerek soğumaya bırakılmıştır, soğuduktan sonra 1xTAE tamponu içerisinde, 10 µL PZR ürünü yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jele yüklenmiştir. 80 V da 15 dakika yürütülmüştür. Yürütülen DNA'ların görüntülenmesi, DNA görüntüleme cihazında (Biometra BioDoc Analyze) UV ışık altında yapılmıştır.

3.2.8. Konsantrasyon ve saflık tayini

NanoDrop spektrofotometresi ile 260 nm de ölçümler yapılmıştır. Buna göre A_{260} : 1 olduğunda DNA miktarı 50 µg/ml 'dir. DNA saflığı $A_{260} / A_{280} =$ formülü ile

hesaplanmıştır. Elde edilen değer 1,8'e eşitse saf DNA elde edildiğine karar verilmiştir [85].

3.2.9. Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler 121°C' de 1 atm basınçta 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur.

4. DENEYSEL BULGULAR

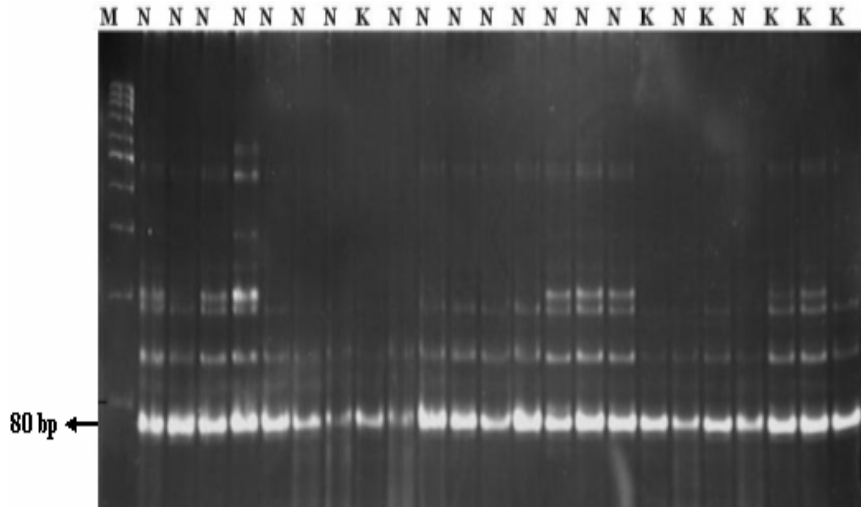
4.1. *K-ras* Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile oğaltılması

Kontrol ve hasta gruplarına ait kan örneklerinden DNA'lar izole edilmiştir. Elde edilen DNA 'ların saflıkları ve yoğunlukları spektrofotometre de materyal ve metot bölümünde belirtildiği şekilde ölçülmüştür.

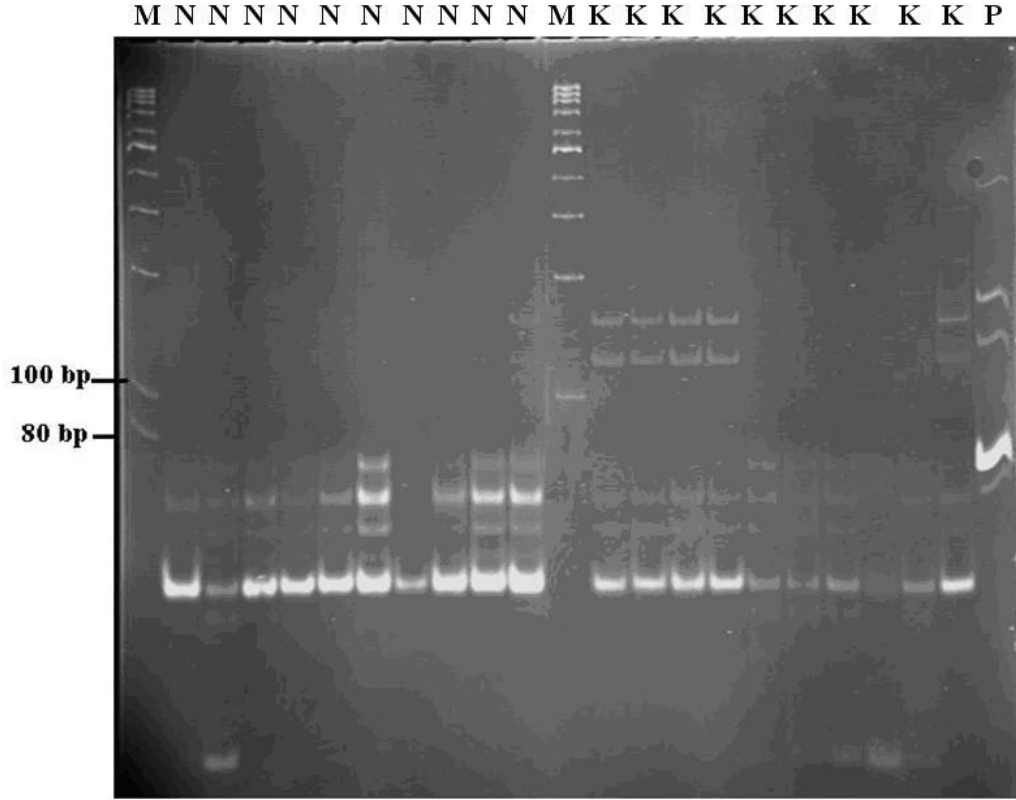
Konsantrasyonları belirlendikten sonra herbir örneğe *K-ras* primerleri ile 1. ekzonunda 12. kodona polimeraz zincir reaksiyonu yapılmıştır. Daha sonra herbir polimeraz zincir reaksiyonu ürününden 1 µL alınarak ikinci grup primerler ile ikinci aşama polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında elde edilen ürünler poliakrilamid jel elektroz cihazında (BIOMETRA) yürütülmüştür. Jeller etidyumbromür ile boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 4.1).

Çoğaltılan bölgelerdeki mutasyonlar belirlenmek için elde edilen 80 bp lik *K-ras* polimeraz zincir reaksiyonu ürünü *Hph1* enzimi ile kesilmiştir. Kanserli ve kontrol örneklerin her birinin enzim tarafından kesildiği gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. *K-ras* geninin 1. ekzonunun PZR sonucu, k: kanserli örnek, n: normal örnek, m: marker



Şekil 4.2. *K-ras* geninin PZR ürününün *HphI* enzimi elektroforezi, k: kanserli örnek n: normal örnek, m: marker, p: pqr ürünü kesim enzimi eklenmemiş

4.2. *N-ras* Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

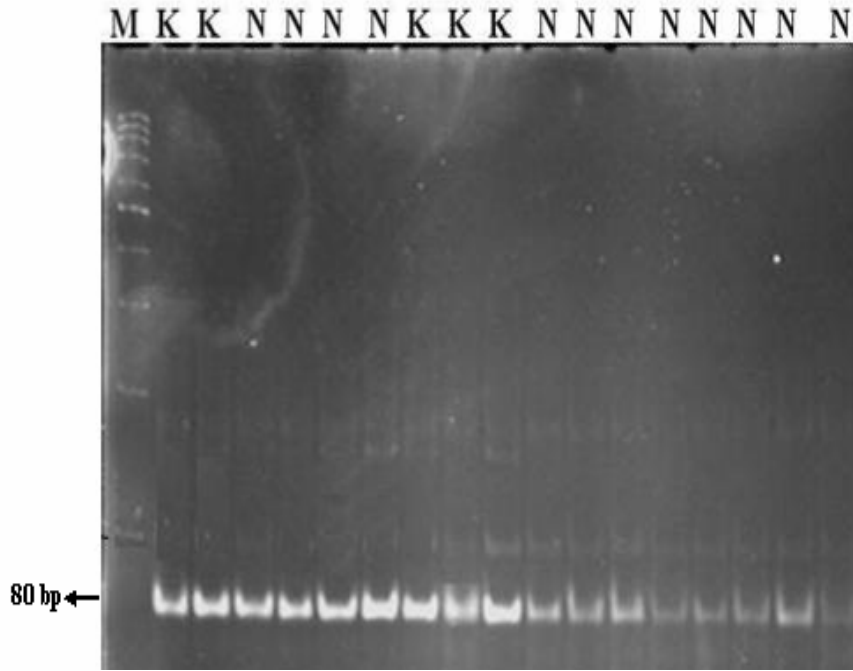
Kontrol ve hasta gruplarına ait kan örneklerinden DNA 'lar izole edilmiştir. Elde edilen DNA 'ların saflıklar ve yoğunlukları spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Konsantrasyonları belirlendikten sonra her bir örneğe *N-ras* geninin 2. ekzonunda 61. kodona *N-ras* primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu yapılmıştır. Daha sonra her bir polimeraz zincir reaksiyonu ürününden 1 µL alınarak ikinci grup primerler ile ikinci aşama polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

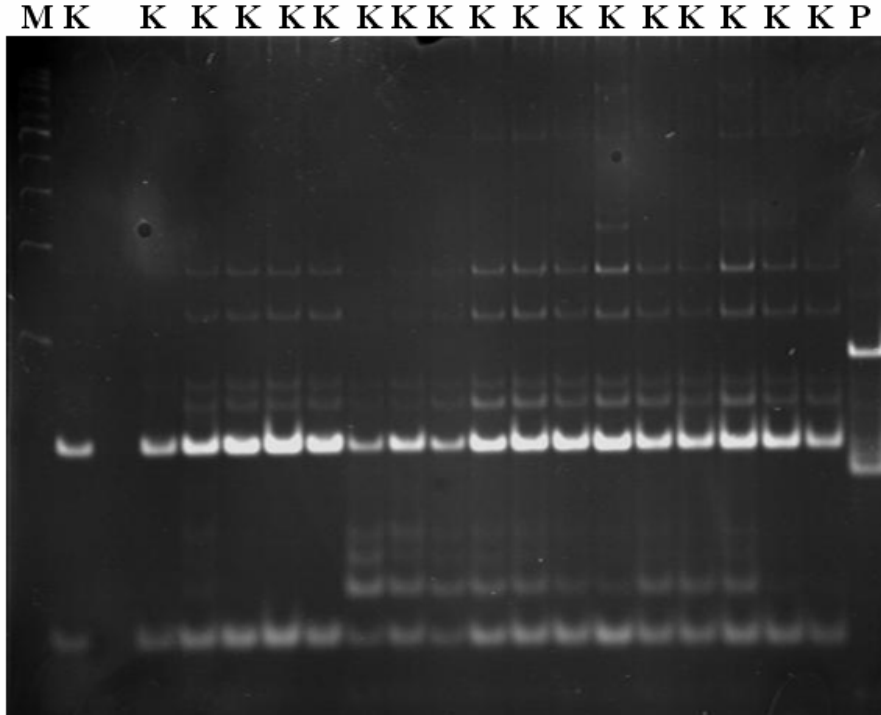
Polimeraz zincir reaksiyonları sonrasında elde edilen ürünler poliakrilamid jel elektroz cihazında (BIOMETRA) yürütülmüştür. Jeller boyandıktan sonra UV ışık altında

görüntülenmiştir (Şekil 4.3).

Çoğaltılan bölgelerdeki mutasyonlar belirlenmek için *N-ras* geninin elde edilen 80 bp polimeraz zincir reaksiyonu ürünü *Bst*1 enzimi ile kesilmiştir. Örneklerin herbirinin enzim tarafından kesildiği gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. *N-ras* geninin 2. ekzonunun PZR sonucu, k: kanserli örnek, n: normal örnek, m: marker



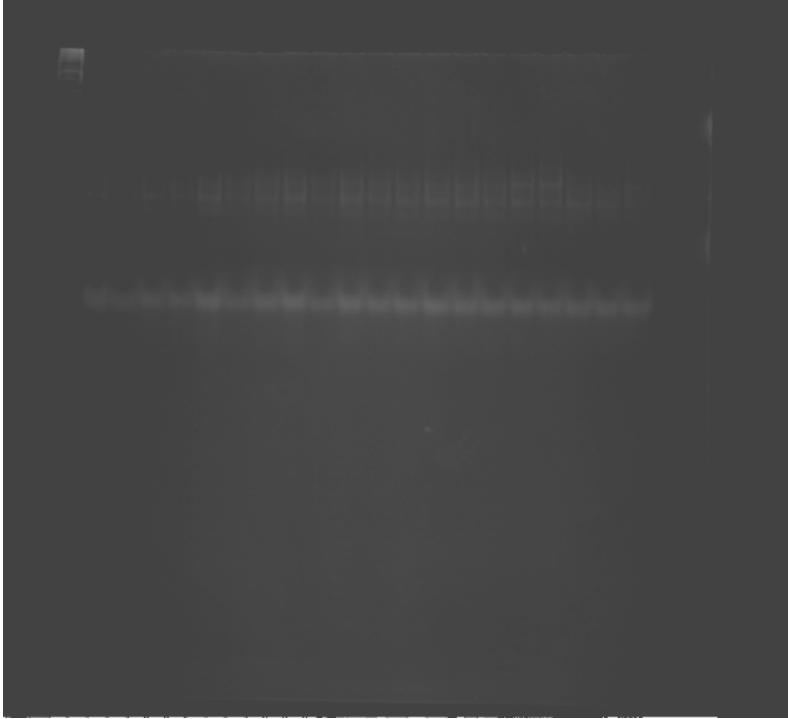
Şekil 4.4. N-*ras* geninin PZR ürününün *Bst*1 enzimi elektroforezi, k: kanserli örnek m: marker, p: PZR ürünü kesim enzimi eklenmemiş

4.3. H-*ras* Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

Kontrol ve hasta gruplarına ait kan örneklerinden DNA lar izole edilmiştir. Elde edilen DNA 'ların saflıklar ve yoğunlukları spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Konsantrasyonları belirlendikten sonra herbir örneğe H-*ras* geninin 1. ekzonunun 13. kodonundaki mutasyonları araştırmak için H-*ras* primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu yapılmıştır. Daha sonra herbir PZR ürününden 1 µL alınarak ikinci grup primerler ile ikinci aşama PZR ler gerçekleştirilmiştir.

PZR sonrasında elde edilen ürünler poliakrilamid jel elektrorez cihazında yürütülmüştür. Jeller boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenmiştir. Şartlar çok farklı şekilde optimize edilmesine rağmen amplifikasyon gerçekleşmediği görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *H-ras* geninin 1. ekzonunun PZR sonucu

Bu çalışmanın amacı, toplam 111 örnekteki *ras*-onkogen geninin çoğaltılarak 1. ve 2. ekzonlarda 12, 13 ve 61 kodonlarda oluşabilecek muhtemel mutasyonların Türk tiroit kanserli hastalarda varlığın polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi ile incelenmesidir. İncelenen kontrol ve hastaların DNA'ları çoğaltılarak bu kodonlara özgü restriksiyon enzimleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri kesilmiştir. Mutasyon varlığı DNA'lardaki kesim yerlerinde mutasyon kesimin engellenmesine neden olarak gözlenebilmektedir. Fakat bizim bütün örneklerimizin Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri enzimlerle kesilmiştir.

Tiroit tümörlerdeki *H-Ras*, *K-Ras* ve *N-Ras* yaygın gen değişimleri, kanserleşme ve histoloji açısından halen tartışma konusudur. Metodoloji ve histolojik sınıflandırmadaki farklılıklar, farklı sonuçlara öncülük etmektedir.

Elde edilen DNA örneklerine uygulanan PZR sonucunda 24 kanserli örneğin hiç birinde

Ras onkogen mutasyonuna rastlanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Ras ailesi genleri (*H-ras*, *K-ras*, ve *N-ras*) GDP' ye bağlı aktif olmayan formu ve GTP' ye bağlı aktif formu arasında dönüşen 21 kDa' luk GTP bağlayıcı proteinleri kodlar. P21^{ras} proteinleri hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden sinyal iletiminde önemli bir role sahiptir. *Ras* genleri genellikle, GTPaz bölgesini içeren 12. ve 13. kodon ve GTPaz bölgesini etkileyen 61. kodonda ki kritik pozisyonlardaki amino asitleri etkileyen nokta mutasyonları ile aktive olur. Çeşitli amino asit değişimleri mutant proteinin özellikle GTP bağlama gücünü ve GTPaz aktivitesini etkileyebilir. Buna rağmen, bu değişkenlerle yapılan fare deneylerinde ölçülen protein onkogenitesinin kanserle doğrudan bir ilişkisinin olmadığı gözlenmiştir [84].

ras onkogenleri, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve farklılaşmasında anahtar bileşenlerdendir. İnsan tümörlerinin %35'e yakınında, kurucu olarak aktive olmuş, değişime uğramış *Ras* onkogenleri, doku tiplerine bağlı olmak kaydıyla değişik formlarda (*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*) görülmüşlerdir. Birçok çalışma, insan tiroit tümörlerindeki *ras* değişimlerini göstermiş ve aktive olmuş *ras*' ın tiroit kanserlerindeki yeri *in vivo* ve *in vitro* deneylerde gösterilmiştir. Ancak, değişik tiroit tümörlerindeki değişime uğramış *ras* formları ve değişimin histoloji, epidemoloji ve habisleşmeyle bağlı konusunda birçok farklı bulgu rapor edilmiştir [88].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, bir seri iyi huylu ve kötü huylu tiroit örneğinden *K-ras*, *H-ras* ve *N-ras*' ın 12. ve 13. kodonlarının GTP bağlanma bölgelerindeki *ras* mutasyonlarının varlığını göstermek için yapay RFLP-PZR yaklaşımı kullanılmıştır. Bu teknikte, radyoaktif materyal kullanımı gerektirmeksizin analiz edilen gen kopyalarının %5'inde mutant allel hızlı bir şekilde tespit edilir. Bu hassas yöntemle iyi huylu tiroit örneklerinde, (nodüler guatr ve foliküler adenomlar) kötü huylu tümörlerle (foliküler, papiller ve özellikle anaplastik karsinomlar) kıyaslandığında nokta mutasyonu sıklığının daha az olduğu görülmüştür (Çizelge 5.1). Hiperplastik guatrların taranmasıyla 10 örneğin birinde 13. kodonda aktive olan *K-ras* onkogenine rastlanmıştır [84]. Namba ve

arkadaşları yaptıkları çalışmada, 19 multinodüler guatrın 4 'ünde H-*ras* geninin 12. kodonunda mutasyon olduğunu rapor etmiştir [84].

Çizelge 5.1. İyi huylu ve kötü huylu tiroit örneklerinde *ras* mutasyonlarının karşılaştırılması [84]

Örnekler	Sıklık	<i>Ras</i> geni	Kodon
Multinodüler Guatr	1/10	K- <i>ras</i>	13
Foliküler Adenom	0/10		
Foliküler Karsinom	2/10	N- <i>ras</i>	12
Papiller Karsinom	4/15	N- <i>ras</i>	12
			13
Anaplastik Karsinom	8/13	K- <i>ras</i>	12
		K- <i>ras</i>	13
		N- <i>ras</i>	12

Daha önceden yapılan çalışmalarda 10 foliküler adenomdan hiçbirinde aktive olmuş *ras* onkogenine rastlanmamıştır [67, 84]. Benzer olarak başka bir çalışmada *Ras* mutasyonuna rastlanmamışlardır [63, 84].

Bu olumsuz sonuçların tersine, araştırmacılar tiroit tümörlerinde anlamlı *ras* mutasyonları görmektedir. 8 makrofoliküler adenomda yapılmış bir çalışmada, hiçbir mutasyon bulamamıştır; fakat 16 mikroadenomun 8'inde (çoğu H-*ras* ve N-*ras* geninin 61. kodonunda olmak üzere) çeşitli *ras* mutasyonları bulmuştur [65]. Yapılan farklı bir çalışmada 24 mikrofoliküler adenomun 6'sında mutasyonlara rastlamıştır; fakat bunların çoğu H-*ras* geninin 12. kodonunda Valin değişimi şeklindedir [84, 86, 87]. Buna karşın, farklı bir çalışmada taranan mutasyonların çoğunun K-*ras* ve N-*ras* geninin 12. kodonunda olduğu tespit edilmiştir [84, 88].

Son yıllarda *ras* mutasyonları ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar Çizelge 5.2 'de toplanmıştır.

Çizelge 5.2. *ras* mutasyonları ile ilgili yapılan çalışmalar ve sonuçları [63, 65, 84, 86, 88]

	Mutasyon Sayısı	Çalışılan Örnek Sayısı	12. Kodon	13. Kodon	61. Kodon
Karga ve arkadaşları	3	37	2	-----	1
Namba ve arkadaşları	13	60	11	-----	2
Lemoine ve arkadaşları	25	66	10	1	14
Suarez ve arkadaşları	16	28	11	2	3

Özetle, bu sonuçlar *ras* geninin tiroit tümörü oluşumunda muhtemelen erken bir evrede rol oynadığını desteklemektedir. Bizim çalışmamızda, diğer araştırmacıların aksine, *ras* protoonkogeninin 12., 13., ve 61. kodonlarındaki mutasyonlara rastlanmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Ecirli, Ş., Borazan, A., Tek, B., Deveci, A., Polat, H., “Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine 1993-1999 Yılları Arasında Kabul Edilen Hastalar Arasında Erişkin Kanser Vakalarının Değerlendirilmesi”, *Türk Tıp Klinik Bilimleri Dergisi*, 22: 349-352 (2002).
2. Özata, M., “Tiroit Hastalarına Güncel Yaklaşım”, *Epsilon Yayınları*, Ankara, 241-244 (2005).
3. Yiğitbaş, B., “Primer Akciğer Karsinomu Nedeniyle Opere Edilecek Hastalarda Otofloresan ve Senkron Tümörlerin Sıklığının Araştırılması”, Doktora Tezi, *Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi*, İstanbul, 8-65 (2005).
4. Koloğlu, S., Koloğlu, B., “Türkiye De Endemik Guvatrın Etiyopatogenezi”, Tiroit Hastalıkları, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*, Ankara, 67-75 (1972).
5. Kutluk, T., Kars, A., “Kanserin Tanımı ve Önemi”, Kanser Konusunda Genel Bilgiler, *TKAV*, 13-15 (1996).
6. Ekmekçi, A., Erbaş, D., “Kanser ve Onkogenler”, Kanserin Moleküler Mekanizması Onkogenler ve Büyüme Faktörleri, *72 TDFO Tesisleri*, Ankara, 1-19, 44-104 (1991).
7. Levine, A.J., “P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division”, *Cell*, 88: 323-331 (1997).
8. Robbins, C.K., “Neoplasia”, the Basic Pathology, Uğur Çevikbaş (Editör), *Nobel Tıp Kitapevi*, Ankara, 185-191 (2002).
9. Demirağ, F., “Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Tümörlerinde K Ras Onkogeni 12. Kodon Mutasyonlarının Taranması”, Doktora Tezi, *Hacettepe Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2-4 (1997).
10. Pitkanen, K., Haapavarji, T., Laiho, M., “UVC-Induction of P53 Activation and Accumulation is Depend on Cell Cycle and Pathways involving Protein Synthesis and Phosphorrrylation”, *Oncogene*, 16: 459-469 (1998).
11. Pardee, A.B., “G1 Events and Regulation of Cell Proliferation”, *Science*, 246: 603-608 (1989).

12. Hamel, P.A., Hanley-Hyde, J., “G1 Cyclins and Control of the Cell Division Cycle in Normal and Transformed Cells”, *Cancer Investigation*, 15 (2): 143–152 (1997).
13. Lowitz, B.B., Casciato, D.A., “Principles of Oncology”, Manual of Oncology, *Lippincott Williams & Wilkins*, Washington, 3-28 (2004).
14. Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., Kato, J., “D-type Cyclin Depend Kinase Activity in Mammalian Cells”, *Molecular and Cellular Biology*, 14 (3): 2066-2076 (1994).
15. Cairnis, J., “Mutation Selection and Natural History of Cancer”, *Nature*, 255: 197-201 (1975).
16. Cooper, G.M., “Cancer”, Cell a Molecular Approach 3th Edition, *ASM Pres*, Washington, 566-656 (2004).
17. Garrett, M.D., “Cell Cycle Control and Cancer”, *Current Science*, 81 (5): 515-523 (2001).
18. Heck, M., “Cell Cycle Control System”, Cell Cycle Control and Cell Death, *University of Edinburg*, 611-632 (2002).
19. Kabalak, T., “Tiroit Kanserleri”, *Ege Üniversitesi Tıp Yayınları*, İzmir, 1-5 (1982).
20. Moroy, T., Geisen, C., “Cyclin E”, *Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 26 (2004): 1424-1439 (2003).
21. Yang, J., Bardes, S.G., Moore, J.D., Brenan, J., Powers, M.A., Kornbluth, S., “Control of Cyclin B1 Localization Through Regulated Binding of the Nuclear Export Factor CRM1”, *Genes & Development*, 12: 2131-2143 (1988).
22. Öztürk, M., “Kötü Haber Genlerde Saklı: Kanser”, *TUBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi*, 352: 32 (1997).
23. Ekmekçi, A., “Gen Genetik Değişim ve Hastalıklar”, *Gazi Kitabevi*, 217-241 (2006).
24. Köktürk, N., Kırışlıoğlu, C., Öztürk, C., “Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi”, *Solunum*, 5 (3): 127-138 (2003).
25. Karp, G., “Cancer”, Cell and Molecular Biology 2th Edition, *John Wiley and Song Inc.*, Washington, 700-730 (1999).

26. Levin, B., "Oncogenes and Cancer", Genes-VI, *Oxford Univ. Pres*, London, 1131-1144 (1997).
27. Sherman, C.D., Camlan, C.D., Salvadori, B., "Clinical Oncology", 4th Edition, *UICC*, Lyon, 255-257 (1990).
28. Adjei, A.A., "Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy", *Journal of International Cancer Institue*, 93 (14): 1062-1075 (2001).
29. Oren, M., "Regulation of the P53 Tumor Suppressor Protein", *Journal of Biological Chemistry*, 274 (51): 36031-36034 (1999).
30. Popescu, N., Zimonic, D., "Chromosome-Mediated Alterations of the *myc* Gene in Human Cancer", *Journal of Cell Molecular Medicine*, 6 (2): 151-159 (2002).
31. Felsher, D., Zetterberg, A., Zhu, J., Tishy, T., Bishop, J.M., "Overexpression *myc* causes p53-dependent G2 Arrest of Normal Fibroblast", *PNAS*, 97 (19): 10544-10548 (2000).
32. Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Cleveland, J.L., "Distruption of the afr-mdm2-p53 Tumor Suppressor Pathway in *myc*-induced Lymphomagenesis", *Genes and Developments*, 13: 2658-2669 (1999).
33. Bishop, J.M., "Cellular Oncogenes, Retroviruses", *Annual Rewiev Biochemistry*, 52: 310-354 (1983).
34. Spector, D.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., "Nucleotide related transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates", *PNAS*, 75 (9): 4102-4106 (1978).
35. Bishop, J.M., "Molecular themes in ocnogene", *Cell*, 64: 235-248 (1994).
36. Varnus, H.E., "The Molecular Genetics of Cellular Oncogenes", *Annual Review of Genetic*, 18: 553-612 (1984).
37. Perucho, M., Goldfarb, M., Shimizu, K., "Human Tumor Derived Cell Lines Contain Common and Different Transforming Genes", *Cell*, 27: 476-476 (1986).
38. Gosset, L.A., Zhang, W., Olson, N.E., "Dexamethasone-dependent Inhibition of Differentiation of C2 Myoblast Bearing Steroid-inducible *N-ras* Oncogene", *Journal of Cell Biology*, 106: 2127-2137 (1988).

39. Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., "Tree Human Trasforming Genes are Related to the Viral *ras* Oncogene", *PNAS*, 80: 2112-2116 (1983).
40. Bos, J.L., "*ras* Oncogenes in Human Cancer: A review", *Cancer Research*, 49: 4682-4689 (1989).
41. Watson, R., Oskarsson, M., Vande, G.F., "Human DNA Sequence Homologous to the Transforming Gene (*mos*) of Moloney Murine Sarkoma Virus", *PNAS*, 79: 4078-4082 (1982).
42. Watt, R., Nishikura, K., Sorrentino, J., Ar-Rushdi, A., Croce, C.M., Rovera, G., "The Sucructure and Nucleotide Sequence of the 5' end of the Human c-myc Oncogene", *PNAS*, 80: 6307-6311 (1983).
43. Valgeirsdottir, S., Erikson, A., Nisters, M., Heldin, H., Westermark, B., "Compartmentalization of Autocrine Signal Transduction Pathways in sis-transformed NIH 3T3 Cells", *Journal of Biological Chemistry*, 270 (17): 10161-10170 (1995).
44. Lin, W.A., Lowe, S.W., "Apoptosis in Cancer", *Carcinogenesis*, 21 (3): 485-495 (2000).
45. Kovacina, S.K., Yonezawa, K., Brautigant, D.L., Tonks, N., Rapp, R.U., Roth, A.R., "Insulin Activates the Kinase Activity of the raf-1 Proto-oncogene by Increasing Its Serine Phosphorylation", *Journal of Biological Chemistry*, 265(21): 12115-12118 (1990).
46. Stad, R., Little, N.A., Xirodima, D.P., Plane, D.P., Saville, M.K., Jochemsen, A.G., Frenk, R., Van der E.B., "mdmx Stabilizes *p53*, and *mdm2* via two Distinct Mechanism", *EMBO Report*, 21(11): 1029-1034 (2001).
47. Semmes, O.J., Barrett, J.F., Dang, C.V., Jeang, K., "Human T-cell Leukimia Virus Type 1 Tax Masks c-myc Function Through a cAMP-dependent Pahtway", *Journal of Biological Chemistry*, 271 (16): 9730-9738 (1996).
48. Motokura, T., Endo, K., Kumaki, K., Ikeda, K., "Neoplastic Transformation of Normal Rat Embryo Fibroblasts by a Mutated *p53* and an Activated *ras* Oncogene Induces Parathyroid Hormone-related Peptide Gene Expression and Causes Hypercalcemia in Nude Mice", *Journal of Biological Chemistry*, 270 (52): 30857-30861 (1995).

49. Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazen, V., Gebbia, N., Russo, A., "ras Family Genes: An Interesting Link between Cell Cycle and Cancer", *Journal of Cellular Physiology*, 192: 125-130 (2002).
50. Shields, J.M., Pruitt, K., Mcfall, A., Shaub, A., Der, C.J., "Understanding the Ras", *Trends in Cell Biology*, 10: 147-153 (2000).
51. Marshall, C.J., "Ras Effectors", *Current Opinion in Cell Biology*, 8 (2): 197-204 (1996).
52. Campbell, P.M., Channing, J.D., "Oncogenic ras and Its Role in Tumor Cell Invasion and Metastasis", *Seminars in Cancer Biology*, 14: 105-114 (2004).
53. Barbacid, M., "ras Genes", *Annual Review Biochemistry*, 56: 779-827 (1987).
54. Eugeneio, S., Nebreda, A.R., "Structural and Functional Properties ras Proteins", *The FASEB Journal*, 3: 2151-2164 (1989).
55. Przybojewska, B., Jagiello, A., Jalmuzna, P., "*H-ras*, *K-ras*, *N-ras* activation in Human Bladder Cancer", *Cancer, Genetic, Cytogenetic*, 121: 73-77 (2000).
56. Kranenburg, O., Martin, F.G., Voest, E.E., "Stimulation of Angiogenesis by ras Proteins", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1654: 23-37 (2004).
57. Waddick, K.G., Uckun, F.M., "Innovate Treatment Programs against Cancer", *Biochemical Pharmacology*, 56: 1411-1426 (1998).
58. Doğan, L., Güç, D., "Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser", *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35: 34-42 (2004).
59. Kolch, W., "Meaningful Relationships: The regulation of the ras-raf-MEK-ERK Pathway by Protein", *Journal of Biochemistry*, 351: 289-305 (2000).
60. Lee, J.T., McCubrey, J.A., "The raf-MEK-ERK Signal Transduction Cascade as a Target for Chemotherapeutic Intervention in Leukemia", *Leukemia*, 16: 486-507 (2002).
61. Judith, E.K., Jeffrey, E.L., Scott, H.K., David, W.E., John, J.W., Kees, B., Ivan, H., Michael, L., Tidwell, J.L., Timothy, J.K., Dawn, A.L.B., Ivana, G., Edward, W., Highsmith, R.T., Belly, R.J., Hohl, M.E., Alain, T., Joseph, R., "Clinical And Biologic Activity of the Farnesyltransferase Inhibitor R115777 in Adults with Refractory and Relapsed Acute Leukemias: A Phase 1 Clinical-Laboratory Correlative Trial", *Blood*, 97 (11): 3350-3360 (2001).

62. Blalock, W.L., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Moye, P.W., Lee, J.T., Franklin, R.A., Mirza, A., McMahon, M., "Requirement for the PI3K/AKT pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: identification of an Achilles heel in leukemia", *Leukemia*, 17: 1058-1067 (2003).
63. Karga, H., "Ras Oncogene Mutation in Benign and Malign Thyroid Neoplasm", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73 (4): 832-836 (1991).
64. Vasko, V., Ferrand, M., Di-Cristofaro, J., Carayon, P., Henry, J.F., Micco, C., "Specific Pattern of *ras* Oncogene Mutations in Follicular Thyroid Tumors", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88 (6): 2745-2752 (2003).
65. Lemonie, N., Mayall, E.S., Wyllie, S.F., Farr, C.J., Hughes, D., Padua, A.R., Thurston, V., Dilwyn, E., Thomas, D., "Activated *ras* Oncogene in Human Thyroid Cancers", *Cancer Research*, 48: 4459-4463 (1988).
66. Delellis, R.A., "Pathology and Genetic of Thyroid Carcinoma", *Journal of Surgical Oncology*, 94: 662-669 (2006).
67. Capella, G., Mitra, S., Peinado, M., Perucho, M., "Frequency and Spectrum of Mutations at Codons 12 and 13 of the *c-k-ras* Gene in Human Tumors", *Environmental Health Perspective*, 93: 125-131 (1991).
68. Klug, W.S., Cummings, M.R., "Genetik Kavramlar", 6. Baskı, Çeviri: Prof. Dr. Cihan Öner, *Prentice Hall*, Ankara, 530-535 (2000).
69. Akar, N., "Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An-Tıp A.Ş Yayınları*, Ankara, 60-75 (1999).
70. Tek, S., "Nodüller Guatrda Tiroit Kanseri İnsidensi, Cerrahi Tedavi Yöntemleri", Doktora Tezi, *GATA*, Ankara, 10-15 (1994).
71. Çarıkçı, Ş., "Diferansiye Tiroit Kanserlerinde I-135 Etkisinin Değerlendirilmesi", *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 10-27 (2004).
72. Eryılmaz, A., "Epidermal Büyüme Faktörlerinin Patolojik Tiroit Dokusunda Dağılımlarının İmmunhistokimyasal Olarak Gösterilmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 10-20 (1999).
73. İşgör, A., "Tiroit Hastalıkları ve Cerrahisi", *Avrupa Tıp*, 365-459 (2000).

74. Rodriguez, M., Santisteban P., Acebrgn, A., Hernandez, L.C., Del Valle, M., Jolin, T., "Expression of Thyroglobulin Gene in Maternal and Fetal Thyroid in Rats", *Endocrinology*, 131: 415-423 (1992).
75. Davies, L., Weleh, G., "Increasing Incidence of Thyroid Cancer in the United States, 1973-2002", *American Medicinal Association*, 295: 2164-2168 (2006).
76. Nikiforov, Y., Gnepp D.R., "Pediatric Thyroid Cancer after Chernobyl Disaster", *Cancer*, 74: 747-769 (1994).
77. Akslen, L.A., Livolsi, A.V., "Prognostic Significance of Histological Grading Compared with Subclassification of Papillary Thyroid Carcinoma", *Cancer*, 88:1902-1909 (2000).
78. Marina, N., Nikiforova, R.A., Lynch, P.W., Biddinger, E.K., Alexander, G.W., Dorn, I., Giovanni, T., Todd, G.K., Yuri, E.N., "RAS Point Mutations and PAX8-PPAR Rearrangement in Thyroid Tumors: Evidence for Distinct Molecular Pathways in Thyroid Follicular Carcinoma", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88: 2318-2326 (2003).
79. Sobrinho, M., Albores, J., Tallini, G., "Poorly Differentiated Carcinoma", in: Delellis, R.A, Lloyd, R.V., Heitz, P.U., Eng, C., (Editör), "Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs", *IARC Press*, Lyon, 73-76 (2004).
80. Raheela, A., Frank, V., Ricardo, D., Albores, M., "Papillary Follicular Thyroid Carcinomas with an Insular Component", *Cancer*, 73: 415-423 (1994).
81. Ordonez, N., Baloch, Z., Matias-Guiu, X., "Anaplastic Carcinoma", in: Delellis, R.A., Lloyd, R.V., Heitz, P.U., (Editör). "Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs", *Lyon: IRAC Press* 77-80 (2004).
82. Perle, K., Jhiang, S., Capen, C., "Loss of p53 Promotes Anaplasia and Local Invasion in *ret*/PTC1-Induced Thyroid Carcinomas", *American Journal of Pathology*, 157: 671-67 (2000).
83. Wohlk, N., Cote, G., "Relevance of RET Proto-Oncogene Mutations in Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81: 3740-3750 (1996).
84. Capella, G., Matias-Guiu, X., Ampudia, X., Leiva, A., Perucho, M., Prat, J., "*ras* Oncogene Mutation in Thyroid Tumors", *Diagnostic Molecular Pathology*, 5 (1): 45-52 (1996).

85. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., "In Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor*, New York, 1-25 (1989).
86. Namba, H., "H-ras Protooncogene Mutation in Human Thyroid Neoplasms", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 71: 223-229 (1990).
87. Namba, H., "Point Mutations of *ras* Oncogene are an Early Event in Thyroid Tumors", *Molecular Endocrinology*, 4: 1474-1479 (1990).
88. Suarez, H.G., Villard, J.A., "Presence of Mutations in all Three of *ras* Genes in Human Thyroid Tumors", *Oncogene*, 5: 565-570 (1990).
89. Blume-Jensen, P., Hunter, T., "Oncogenic kinase signaling", *Nature*, 411:355-364 (2001).
90. McCormick, F., "Signalling Networks That Cause Cancer", *Trends Cell Biology*, 12: 53-56 (1999).
91. Liem, A.A., Chamberlain, M.P., Wolf, C.R., Thompson, A.M., "Role of Signal Transduction in Cancer Treatment and Drug Resistance", *European Journal of Surgical Oncology*; 28: 679-684 (2002).
92. Internet: "Thyroid Gland", <http://trc.ucdavis.edu/gland.gif> (2007).
93. Internet: "The Principle of PCR", <http://users.urgent.edu/pcrsteps.gif> (2008).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : DALOĞLU, Bekir Cihan
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 23.02.1983 Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 362 35 00
 E-posta : bekir.cihan.daloglu@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2004
Lise	Çankaya Kurtuluş Lisesi	2000

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2004-...	Anamed & Analitik Grup	Satış Temsilcisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Serdar ÜLKER, Şengül ALPAY KARAOĞLU, Bekir Cihan DALOĞLU, “Çay Topraklarından İzole Edilen Mikrofunguslarda Proteolitik Aktivitenin İncelenmesi”, *XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Aydın, 2006

Hobiler

Folklor (Ankara Yöresi), Bilgisayar teknolojileri, Futbol