

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HEPATOSELÜLER KARSİNOMDA
MDM2 GEN POLİMORFİZMLERİ**

Efsun EREN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

ANKARA

2006

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hepataselüler Karsinom.....	1
1.1.1. Epidemiyoloji ve Etyoloji.....	1
1.1.2. Metabolik Hastalıklar ve HCC.....	3
1.1.3. Viral Hepatitler ve HCC.....	4
1.1.4. HCC'nin Oluşumu ve Genetiği.....	8
1.1.5. HCC'nin Oluşumu Sırasında Aktif Hale Gelebilen İletişim Yolakları.....	10
1.2. MDM2 Geni.....	15
1.2.1. MDM2 Gen Yapısı ve Protein Bölgeleri.....	16
1.2.2. MDM2 ve P53 İlişkisi.....	18
1.2.2.1. MDM2 ve p53 İlişkisinin İnhibisyonu.....	19
1.2.2.2. MDM2' nin P53 Fonksiyonlarını İnhibe Etmesi.....	20
1.2.3. MDM2' nin P53'ten Bağımsız Fonksiyonları.....	22
1.4. MDM2 Genindeki MboII ve NlaIV Polimorfizmleri ve Fonksiyonel Önemleri.....	24
1.5. Çalışmanın Amacı.....	25
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
2.1. Materyal.....	26
2.1.1. Hastalar.....	26
2.1.2. Primerler.....	26
2.1.3. Kimyasallar.....	27
2.1.4. Restriksiyon Enzimi.....	28
2.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler.....	28
2.1.6. Kullanılan Standart Çözeltiler ve Tamponlar.....	28
2.2. Yöntem.....	29
2.2.1. DNA İzolasyonu.....	29
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	30

2.2.3. Restriksiyon Enzim Analizi.....	30
2.2.4. Agoroz Jel Elektroforezi.....	31
2.2.5. DNA Dizi Analizi.....	31
2.6. İstatistiksel Analizler.....	33
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	34
3.1. Hastalar.....	34
3.2. MDM2 Geni <i>MboII</i> Polimorfizm Bölgesi.....	34
3.3. MDM2 Geni <i>NlaIV</i> Polimorfizm Bölgesi.....	35
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	38
KAYNAKLAR.....	40
.	
ÖZGEÇMİŞ.....	48
.	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünyadaki Hepatoselüler Karsinoma İnsidansı.	2
Şekil 1.2. HCC'nin çok basamaklı oluşum süreci.	10
Şekil 1.3. Retinoblastoma yolağı.	12
Şekil 1.4. P53 yolağı.	13
Şekil 1.5. Wnt yolağı.	14
Şekil 1.6. MDM2 protein yapısı.	17
Şekil 1.7. MDM2 ve p53 proteini ilişkisi.	21
Şekil 3.2. MDM2 geni MboII polimorfizm bölgesinin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.	34
Şekil 3.3. MDM2 geni NlaIV polimorfizm bölgesinin genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi.	35
Şekil 3.4. ΦX174/BsuRI (HaeIII)1.0 moleküler ağırlık belirleyicisinin bant açılımı.	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. HCC gelişiminde rol oynayan etkenler.	3
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri.	26
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimi.	28
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan çözeltilerin ve tamponların içerikleri.	28
Çizelge 2.4. Uygulanan PZR içeriği ve koşulları.	30
Çizelge 2.5. DNA dizi analizi PZR'si içeriği.	32
Çizelge 2.6. DNA dizi analizi PZR'si sonrası temizleme yöntemi.	32
Çizelge 3.2. MDM2 geni MboII bölgesi için genotip dağılımı.	34
Çizelge 3.3. MDM2 geni NlaIV bölgesi için genotip dağılımı.	36

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin Nükleotiti
aa	Amino Asit
APC	Adenomatöz Polipozis Koli (Adenomatous polyposis coli)
bç	Baz Çifti
C	Sitozin Nükleotiti
C	Karboksil Ucu
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
ddH ₂ O	Çift Distile Su (double distilled water)
dH ₂ O	Distile Su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNA-PK	DNA Bağımlı Protein Kinaz
dNTP	Deoksi Nükleotid tri Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
g	Gram
G	Guanin Nükleotiti
GSHV	Yer Sincabı Hepatit Virüsü
GSK	Glikojen Sentetaz Kinaz
HBsAg	Hepatit B Yüzey Antijeni
HBV	Hepatit B Virüsü
HBx	Hepatit B Virüsü X Proteini
HCl	Hidroklorik Asit
HCV	Hepatit C Virüsü
kb	Kilo Baz
kDa	Kilo Dalton
LEF	Lenfoid Arttırıcı Reseptor
LHB	Büyük Yüzey Proteini
M	Molar
MgCl	Magnezyum Klorür
MHB	Orta Yüzey Proteini
mM	Milimolar

mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NFKB	Nükleer Faktör Kappa B
ng	Nanogram
NLS	Çekirdek Yerleşme Bölgesi (Nuclear Localization Sequence)
nt	Nükleotid
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	Retinoblastoma
RE	Restriksiyon Enzimi
REF	Rat Embriyo Fibroblastı
RFLP	Restriksiyon Parçacığı Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikadaki Döngü Sayısı (Revolutions Per Minute)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
s	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
T	Timin Nükleotiti
TCF	T Hücre Faktörü
TBE	Tris Borik Asit EDTA
U	Ünite
HCC	Hepatoselüler Karsinoma
UV	Ultraviole
WD	Wilson Hastalığı (Wilson Disease)
WHV	Woodchuck Hepatit Virüsü
µg	Mikro Gram
µl	Mikro Litre

1. GİRİŞ

1.1. Hepataselüler Karsinom

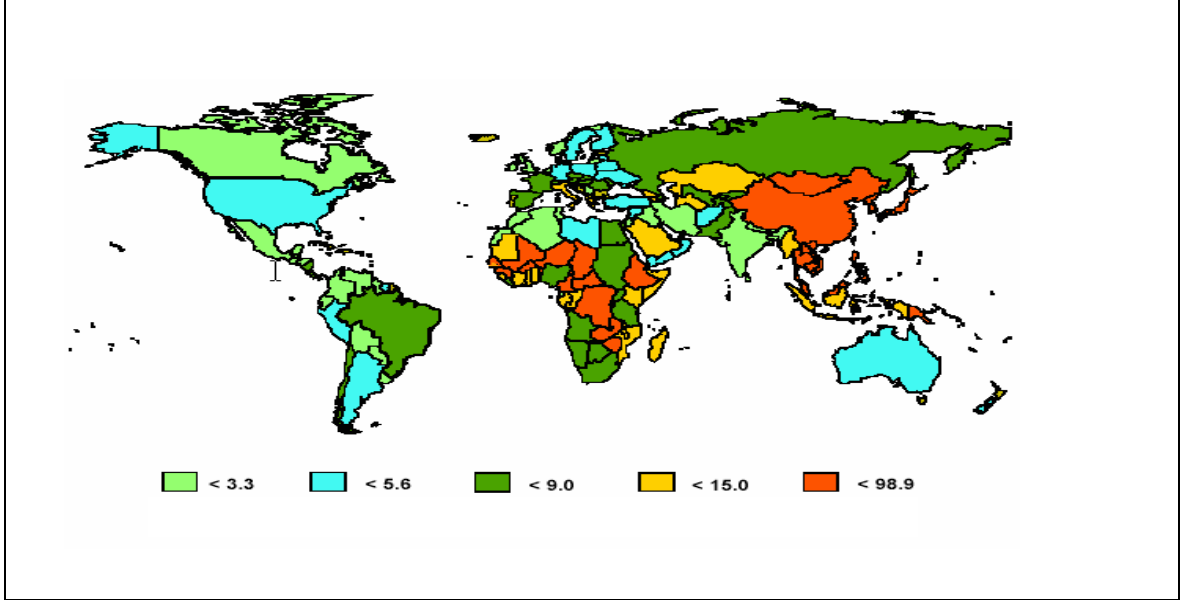
Hepatoselüler Karsinom (HCC), primer karaciğer kanserlerinin en yaygın histolojik formudur. Karaciğer hücrelerinin malign transformasyonu sonucu gelişen nodül ya da kitle olarak tanımlanmaktadır. Belirti ve bulguları, daha çok temelinde yatan kronik karaciğer hastalığına aittir. Belirtileri ülkeden ülkeye farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin Kuzey Afrika Bandilerinde zayıflık, büyük bir kitle ve buna ait belirtiler hâkimdir (Berman 1951). Diğer yandan Japonya ve ülkemizde hastalar daha çok siroza bağlı olarak ortaya çıkan belirtilerden yakınır. Buradaki hastalar tümör ileri boyutlara ulaşmadan sirozun komplikasyonlarından ölebilirler (Tekali ve Balık 2003).

Hepatoselüler Karsinom, her yıl yaklaşık 435.000 yeni vakanın teşhis edildiği en sık rastlanan beşinci kanser türüdür. Bu veriler tüm kanser vakalarının %5.4'ünü oluşturmaktadır (Wang *et al.* 2002). Kanser türleri içerisinde ölüme sebep olmada dördüncüdür (Parkin *et al.* 1999; Pisani *et al.* 1999). Asya ve Afrika'da ise yetişkinlerde kanser türünden ölümlerde birinci sırada yer almaktadır (Di Bisceglie *et al.* 1988). HCC, viral enfeksiyon ve aflatoksin gibi dış faktörlerin en çok rol oynadığı kanser türlerindedir. Dolayısıyla, HCC'nin dağılımı bu etkenlerin dağılımına göre değişebilir. Bu yüzden de önlenebilir kanserlerin başında gelmektedir.

1.1.1. Epidemiyoloji ve Etyoloji

Tüm dünyada yılda yaklaşık bir milyona yakın sayıda yeni HCC vakasına rastlanmakta, hemen hemen aynı sayıdaki hasta bu nedenle hayatını kaybetmektedir. HCC, erkeklerde kadınlara oranında dört kat daha fazla görülmektedir. Yıllık insidans ve mortalitenin neredeyse eşit oluşu tümörün kötü gidişi yönünden ipucu vermektedir. HCC'nin ortalama görülme yaşı 55 olmakla birlikte, özellikle Mozambik ve Çin gibi vertikal hepatit B virüsü (HBV) geçişinin baskın olduğu yerlerde HCC gelişimi çok daha erken yaşlarda ortaya çıkabilmektedir (Fong *et al.* 2001; Akriviadis *et al.* 1998). Tümörün rastlanma sıklığı

belirli coğrafi bölgelerde artmaktadır. Bu açıdan en dikkat çekici bölgeler Doğu/Güney Doğu Asya, bazı Pasifik adaları ve Afrika'nın bazı bölgeleridir (Kew *et al.* 2002).



Şekil 1.1. Dünyadaki Hepatoselüler Karsinom İnsidansı. (100.000 popülasyonda)

HCC gelişiminde birden fazla sebep söz konusudur. Gelişmekte olan ülkelerde kronik HBV enfeksiyonu önde gelen nedendir. Endüstrileşmiş bir toplum olmasına rağmen yüksek insidansın görüldüğü Japonya ile İtalya ve İspanya gibi Güney Avrupa ülkelerinde Hepatit C virüsü (HCV) daha ön plana çıkmaktadır. Yine diğer orta-düşük riskli ülkelerde alkolik karaciğer hastalığı, kronik HCV enfeksiyonu ya da alkol ve HCV enfeksiyonu birlikteliği HCC gelişimi için önde gelen nedenlerdendir (Kew *et al.* 2002). Ayrıca HBV ve HCV enfeksiyonlarının sinerjik etki gösterdiği bilinmektedir (Akriviadis *et al.* 1998). Siroz da HCC gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerden biridir. Ülkemizdeki HCC'lerin %90'ının zemininde siroza rastlanmaktadır (Bayraktar *et al.* 1996).

HCC vakalarının %80'inden fazlasının sebebi HBV ve HCV virüsleridir. Bu virüsler, Hepatoselüler Karsinom için başlıca çevresel faktör olarak tanımlanırlar. HCC gelişiminde rol oynayan diğer çevresel ajanlar ya tek başlarına ya da viral enfeksiyon ile sinerjik etki gösterirler. HCC gelişiminde rol oynayan diğer çevresel ajanlar, aflatoksin B1'e maruz kalma, sigara içimi, yoğun alkol kullanımı vb. olarak söylenebilir. Bir çeşit mantar toksini olan aflatoksin B1 özellikle Çin gibi coğrafik bölgelerde HCC oluşumuna neden olan en önemli faktörlerden biridir (Chen *et al.* 1997). Alkol ve sigara kullanımı batı ülkelerinde

aflatoksin B1'den daha önemlidir. Çünkü bu bölgelerde aflatoksin B1'e maruz kalma daha az olmaktadır (Wang *et al.* 2002).

HCC'nin aynı zamanda, Hemakromatoz (Powell *et al.* 1996), Wilson hastalığı (Berman *et al.* 1988), Porfiriya (Huang *et al.* 1999), α -Antitripsin eksikliği vb. metabolik bozukluklarda da (Elzouki ve Eriksson 1996) görülme sıklığı yüksektir. HCC gelişiminde rol oynayan etkenler Çizelge1.1. de belirtilmiştir.

Çizelge1.1. HCC gelişiminde rol oynayan etkenler.

ENFEKSİYONLAR	HBV HCV
SİROZ	Alkol Otoimmün hepatit Primer biliyer siroz Kriptojenik siroz
ÇEVRESEL	Aflatoksinler Tütün N-Nitrozo bileşikler Pirrolizidin alkaloidleri Torotrast Androjenik steroidler
METABOLİK HASTALIKLAR	Hemakromatoz α 1-antitripsin eksikliği Wilson hastalığı Porfiriler Tip1 ve 3 glikojen depo hastalığı Galaktozemi Hereditör trozinemi Familiyal kolestatik siroz

1.1.2. Metabolik Hastalıklar ve HCC

Yapılan çalışmalar, oksidatif stres ve kronik iltihabı kanser oluşumundaki risk artışı ile ilişkilendirmişlerdir (Christen *et al.* 1999). Ülseratif kolit, Viral hepatit, Pankreatit, Hemokromatoz ve Wilson hastalığı (WD) gibi oksiradikallerin aşırı birikmesi sonucunda oluşmuş hastalıklar, kanser oluşumunda risk artışına sebep olabilmektedirler (Wang *et al.* 2002). Hemakromatoz hastalığı demirin, Wilson hastalığı ise bakırın karaciğerde aşırı birikmesi sonucu oluşan genetik değişikliklerdir. Yapılan araştırmalarda, Siroz ve karaciğer hasarına ek olarak HCC oluşma riskinin Hemakromatoz hastalarında 200 kat daha fazla

olduğu (Niederau *et al.* 1985), Wilson hastalığında ise Hemakromatoz hastalığına göre HCC oluşma riskinin daha az olduğu görülmüştür (Cheng *et al.* 1992). Bu durum belki de karaciğer hasarı ve kalp komplikasyonlarının yaşam ömrünü azaltmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, Hemakromatoz ve Wilson hastalıklarında eşey hattında oluşan mutasyonların da kanser oluşumundan sorumlu olduğu bulunmuştur (Bull *et al.* 1993; Feder *et al.* 1996). Hemakromatoz ve Wilson hastalıklarında oksidatif stres ve bunun sonucunda oluşan reaktif türlerin, kanser ile ilişkili genlerde mutasyona sebep olabileceği ve dolayısıyla DNA tamiri, hücre döngüsü ve apoptozu düzenleyen önemli genlerin fonksiyonunu değiştirebileceği belirtilmiştir (Wang *et al.* 2002).

1.1.3. Viral Hepatitler ve HCC

Hepatit B virüsü ve Hepatit C virüsü HCC gelişimine neden olan başlıca virüslerdir. HBV kronik taşıyıcılarının %25'inde tümör gelişimi gözlenmektedir. HBsAg seropozitif kronik enfeksiyonlu hastalarda, seronegatif hastalarla karşılaştırıldığında HCC gelişiminin 70 kat fazla olduğu görülmüştür. Hayvanlarda hepatit virüsleriyle ilgili çalışmalarda da Hepatit B virüsü ile HCC gelişimi arasındaki ilişkiye benzer bir ilişki bulunmuştur. WHV (woodchuck hepatitis virus) ve GSHV'nin (ground squirrel hepatitis virus), yerleştikleri türlerde HCC gelişimine sebep oldukları saptanmıştır (Gerin *et al.* 1990; Hansen *et al.* 1993).

İnsan tümörlerinin genomunda Hepatit B virüsü DNA'sına rastlanması, HBV ile ilişkili kanser oluşumu için önemli bir ipucu niteliğindedir. Birçok HCC'li vakada HBV DNA dizileri hücre genomuna entegre olmuş bir şekilde bulunabilir ve viral proteinler bu entegrasyon boyunca sentezlenebilir (Matsubara *et al.* 1990; Su *et al.* 1998). HBV'nin bazı entegrasyonlarının tümör oluşumu için aday olan siklin A (Wang *et al.* 1992), epidermal büyüme faktörü kinaz (Zhang *et al.* 1992), mevalonat kinaz (Graef *et al.* 1994), karboksipeptidaz N (Pineau *et al.* 1996) gibi hücresel genlerin içinde ya da civarında meydana gelmesine rağmen, insan genomunda HBV için karakteristik bir entegrasyon yeri bulunmamaktadır (Rabe *et al.* 2001).

HBV'nin konakçı hücre genomuna entegrasyonu, konakçı hücrenin gen ekspresyonunu direkt ya da indirekt yollarla düzenleyebilir. Entegrasyonun meydana gelmesi, kromozomal

instabilite, viral proteinlerin sentezinin tamamlanmaması, HBx proteininin sentezinin artması, hücresel gen ve protoonkogenlerde değişiklikler ve insersiyonal mutagenез (*cis* aktivasyonu) ile sonuçlanabilmektedir (Wang *et al.* 1991).

HBV farklı mekanizmalar ile HCC oluşumuna yol açabilir. HBV:

- Tümör supressör proteinlerinin fonksiyonunu kaybetmesi ve onkogenlerin ya da faaliyette olmayan genlerin aktif hale gelmesi ile hepatositlerin büyüme kontrolünü kaybetmesine neden olan direkt bir viral etki yolu ile,
- HBV DNA dizilerinin hücre genomuna entegre olması ile hücresel genlerin transkripsiyonunu etkileyerek, kromozomda delesyon translokasyon vb. meydana gelerek hücre bölünmesi ve farklılaşmasını kötü yönde etkileme yolu ile,
- Büyüme faktörü ve sitokin aktivasyonu yaparak direkt rejenerasyona yol açması yolu ile,
- Sirozun temeli olarak inflamasyon-nekroz-rejenerasyon dizisi boyunca proliferasyon oluşturması yolu ile HCC'ye neden olabilir.

HBV ve HCC ilişkisini araştıran çalışmalar, HBV'nin kor bölgesi proteinlerinden olan HBx proteininin HCC oluşumuna direkt etkisi üzerinde yoğunlaşmaktadır. HBx proteini hücresel genler ve viral düzenleyici elementlerin transkripsiyonunu aktive edebilmektedir. HBx proteininin, transkripsiyonunu aktive ettiği hücresel genler IL-6, c-myc, c-jun, c-fos vb. olarak verilebilir. Bu transaktivasyonun gerçekleşmesi için HBx proteini Ap-1, NFkB, Sp 1 vb. transaktivasyon faktörü bağlanma bölgelerine ihtiyaç duyar. Ayrıca HBx bazı nükleer ve sitoplazmik transdüksiyon kaskadını aktive etmenin yanı sıra p53 ve Rb tümör supressör genlerini de inaktive etmektedir. HBx, p53 aracılı apoptozu, p53 bağımlı ya da bağımsız nükleotid eksizyon onarımını da inhibe edebilmektedir (Öztürk *et al.* 2003). *In vitro* çalışmalarda, hücre proliferasyonu HBx proteininin aşırı sentezi ile birlikte bulunmuştur. Ayrıca, HBx proteininin transgenik farelerde HCC'ye neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, HBx proteini transgenik farelerde c-myc proteini tarafından indüklenen HCC gelişimini hızlandırmaktadır. Bu veriler, HBx proteininin hepatokarsinogenezde bir tümör promotor'u gibi davrandığını göstermektedir (Su *et al.* 1998; Takada *et al.* 1997).

Hepatit B virüsünün MHBs ve LHBs yüzey proteinleri de, transkripsiyonu aktive edebilmektedir. Orta büyüklükte olan yüzey proteini (MHBs) herhangi bir eksilmeye

uğramadan yani eksiksiz halde iken transkripsiyonu aktive edici yeteneğe sahip değildir. Fakat karboksil ucu kesilmiş varyantlar (MHBS^t) çeşitli viral ve hücrel genlerin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğindedir (Casselman *et al.* 1997). MHBS^t varyantları hem HBV içeren hücre hatlarından (Kekule *et al.* 1990) hem de HCC'li hasta örneklerinden izole edilmiştir (Casselman *et al.* 1990). MHBS^t varyantları transaktivasyonu gerçekleştirirken, NF-kB, AP-1, AP-2, ya da SP1 gibi transaktivasyon bağlama bölgelerine ihtiyaç duymaktadır (Schlüter *et al.* 1994; Meyer *et al.* 1992; Alka *et al.* 2000). HBV'nin büyük yüzey proteini (LHBs) de MHBS yüzey proteini gibi transkripsiyonu aktive edici olarak görev yapabilmektedir (Hildt *et al.* 1996). Yapılan araştırmalarda, LHBs'nin aşırı miktarda eksprese edilmesinin farelerde tümör gelişimine neden olduğu anlaşılmıştır (Chisari *et al.* 1989).

HCV ile enfekte olmuş kişilerde yüksek oranda HCC görülmesi, dikkatlerin HCV üzerinde toplanmasını sağlamıştır. HCV virüsünün HCC'ye nasıl neden olduğu konusunda henüz yeterli bilgi elde edilememiştir. Fakat HCV'nin tanımlanmasında kullanılan tekniklerin daha duyarlı sonuç vermesiyle önceki istatistikî bilgilerde değişiklikler olmuştur. HCV antikör pozitifliği, HCC oluşmasında HBsAg (hepatit B yüzey antijeni) nin varlığından daha önemli gözükmektedir. Anti HCV(+) ve HBsAg(+) sağlıklı taşıyıcılar karşılaştırıldığında, HCC'nin anti HCV(+) grupta dört kat daha fazla görüldüğü saptanmıştır (Takano *et al.* 1995). Ülkemizde HBV enfeksiyonu daha sık olduğundan vakaların çoğunda HBV belirteçleri pozitif bulunmuştur (Bayraktar *et al.* 1996).

HCV bir RNA virüsü olduğu için, konakçı hücre kromozomuyla entegrasyonu gösterilememiştir (Anzola 2004). HCV enfeksiyonunun karsinogenezdeki etkisi tam olarak anlaşılmamasına rağmen HCC'nin kronik inflamasyon neticesinde oluştuğu düşünülmektedir. Kronik inflamasyonun hepatosit nekrozuna sebep olduğu ve yeniden yapılanma meydana gelmesinin konakçı hücrede mutasyon artışına sebep olabileceği ve bu mutasyon birikimlerinin HCC ile sonuçlanabileceği belirtilmektedir. Fakat bu teori hepatik inflamasyon yolu ile olan HCC'de hepatit virüslerinin dolaylı ilişkisi olduğunu varsaymaktadır. Bu noktada, inflamasyonun tek başına yüksek HCC oluşumuna neden olup olamayacağı konusunda soru işaretleri bulunmaktadır. HCV enfeksiyonu ile HCC oluşumunda viral proteinlerin direkt etkiye sahip olduğu düşünülerek hücre kültürü ortamında, hepatositlerin HCV ile enfeksiyonu sağlanmış ancak virüsün etkisini göstermesi

uzun zaman aldığından çok az başarı elde edilmiştir. Transgenik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise HCV'nin kor genini içeren transgenik farelerde erken steatoz gelişimi saptanmış, ileri safhalarda ise bu farelerde HCC gelişimi gözlenmiştir (Koike *et al.* 2002).

Yapılan çalışmalarda, HCC oluşumuna katılan farklı HCV proteinleri rapor edilmiştir. Örneğin HCV'nin kor proteini, NS4A ve NS4B proteinlerinin p21^{WAF1} siklin bağımlı kinaz inhibitörünün ekspresyonunu posttranskripsiyonel olarak engellediği, NS4A ve NS4B proteinlerinin her birinin translasyonel inhibisyonda görev aldığı ve belli bazı hücre proteinlerinin yıkımını arttırdığı rapor edilmiştir (Florese *et al.* 2002; Qadri *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002; Lan *et al.* 2002). Şimdiye kadar kanser oluşumunda temel role sahip 3 HCV proteini bildirilmiştir. Bu proteinler kor proteini, NS3 proteini ve NS5A proteini (Anzola 2004).

HCV'nin kor proteini, viral genomik RNA'nın paketlenmesinde görev alan yapısal bir protein olmasının yanı sıra, pek çok düzenleyici fonksiyona sahiptir. HCV kor proteininin, p53 tümör supressör proteini ile etkileşime girerek, bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21^{WAF1}'in ekspresyonunu düzenlediği, apoptoz ve hücre proliferasyonunu ilerlettiği bulunmuştur (Lee *et al.* 2002; Kwun *et al.* 2003; Yamanaka *et al.* 2002). Ayrıca, HCV kor proteini, p53 tümör supressör proteini ailesinden olan p73 proteininin fonksiyonlarını düzenlemede görev almaktadır. HCV kor proteini ve p53 proteininin etkileşime girmesi ile HCV kor proteini, çekirdek translokasyonu yapar. Buna ek olarak HCV kor proteini, p73 α bağımlı hücre büyümesini durdurma görevini p53 tümör supressör proteinine bağlı bir yol kullanarak yapar. HCV kor proteininin bu şekilde, p73'ün çeşitli fonksiyonlarını direkt olarak etkileyerek, HCV patogenezinde rol oynama ihtimali vardır. (Alisi *et al.* 2003).

HCV'nin NS3 proteini, hepatokarsinogezdeki etkisini hepatositlerde transformasyona sebep olarak meydana getirir. Bunun yanında, NS3 proteini p21^{WAF1}'in promotor aktivitesini baskılar. Bu etki hücre tipine özel olmamakla birlikte HCV kor proteini ile sinerjik etki gösterir. Yapılan çalışmalarda, NS3 proteininin, p53 proteininin aktivitesini düzenleme yolu ile p21^{WAF1} siklin bağımlı kinaz inhibitörünün transkripsiyonunu baskıladığı da rapor edilmiştir (Kwun *et al.* 2001).

HCV'nin NS5A proteininin, hepatokarsinogenez oluşumundaki anahtar rolü konusunda henüz tatmin edici bilgiler elde edilmese de, HCV ile enfekte olan hücrelerin bu enfeksiyona cevap olarak oluşturulan apoptozu baskıladığı bilinmektedir. Ayrıca, p53'e bağlı apoptozu ve p53 tümör supressör proteininin bağlanması gereken spesifik DNA dizisine bağlanmasını engellediği, aynı zamanda p53 proteininin p21^{WAF1} siklin bağımlı kinaz inhibitörü üzerindeki transaktive edici özelliği engellediği rapor edilmiştir (Majumder *et al.* 2001).

1.1.4. HCC'nin Oluşumu ve Genetiği

Kanser oluşumu, çok basamaklı bir süreçte, değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel, viral) etkisiyle oluşan genetik ve epigenetik hasarlanmalarla gerçekleşmektedir. Kanserlerde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom kayıpları) ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tekli ya da çoklu baz değişiklikleri ya da DNA promotör bölgesinin metilasyonu) olabilir. Kanser oluşumunun çoklu basamakları boyunca tümör supressör genlerde delesyon ya da inaktivasyon ve protoonkogenlerde aşırı miktarda ekspresyon ve/veya aktivasyon meydana gelmektedir. Bu değişiklikler, nokta mutasyonları, gen amplifikasyonu, genin yeniden düzenlenmesi, gen metilasyonundaki değişimler ya da transkripsiyonel düzenlemedeki değişiklikler ile de oluşabilir. Bu genler, gen ekspresyonunu düzenleme, hücresel büyüme ve farklılaşmayı düzenlemekle görevli olan, hücresel transdüksiyon sistemlerinin proteinlerini kodlar (Alberts *et al.* 1994).

HCC'nin etyolojisi ve karsinogenezi diğer kanser türlerinde olduğu gibi çok yönlü ve çok basamaklıdır. HCC'nin çok basamaklı oluşum süreci inflamasyona sebep olan hepatosit tahribatı, hücre ölümü, siroz ve rejenerasyon, displazi ve son olarak HCC olarak ayrılabilir (Tannapfel ve Wittekind 2002).

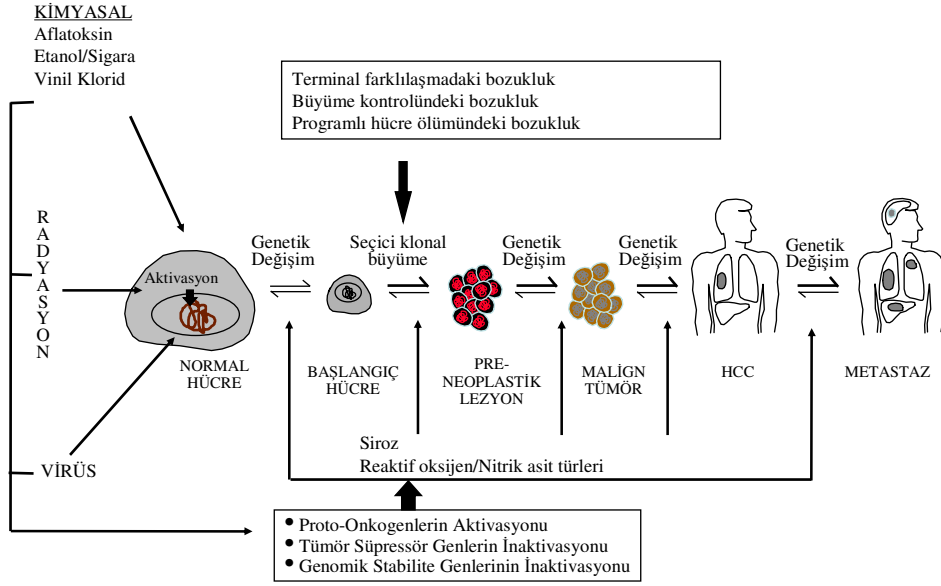
Hepatosit tahribatı, kronik HBV ve HCV enfeksiyonları boyunca en sık meydana gelmektedir. Bu enfeksiyonlar fibrozla sonuçlanan onlarca inflamasyona neden olurlar. Hepatik fibroz, stellat hücrelerin aktivasyonu ve sitokinlerin salınımı ile oluşur. İnflamatuar hücrelerin de dahil olduğu, karaciğer tahribatına karşı verilen bir yanıttır. Hepatik fibrozun önemli bir özelliği ekstraselüler matriksin birikiminin geri dönüşlü olması ve nodüllerin yeterince gelişmediği bir durum olmasıdır. Oysa siroz, rejenerasyon nodüllerinin oluştuğu,

parankimanın etrafının kalın koyu bir şerit ile çevrildiği, geri dönüşsüz bir oluşumdur (Burt 1993). Siroz, HCC oluşumu için önemli bir risk artışına sebep olmaktadır. Fakat siroz olmadan da HCC gelişebilmektedir (Craig *et al.* 1990).

Hepatokarsinogenez, hepatositlerin fenotipini değiştiren genetik değişiklikler boyunca yavaş ilerleyen bir süreçtir. Uzun preneoplastik süreç boyunca mitojenik yolların değişmesi ile hepatosit döngüsü hızlanır. Bu kronik rejenerasyon süreci displazik hepatositlerin oluşmasına yol açar. Bu hepatositlerin özelliği, genlerinde ve kromozomlarında yapısal değişikliklerinin olmasıdır. Displazik nodüllerin ve HCC'nin gelişimi, genlerde ve kromozomlarda geri dönüşsüz yapısal değişikliklerin birikimi ile oluşur. Malign hepatosit fenotipi, farklı düzenleyici yollarda görev yapan genlerin fonksiyonlarını engelleme ile oluşabilir (Thorgeirsson ve Grisham 2002).

Karaciğerde normal hücre fizyolojisinde tümörleşmeye doğru ilerleme olurken 6 temel değişiklik olduğu belirlenmiştir. Bu değişiklikler;

- Büyüme sinyalinden kurtulma ve kendi kendine üretim
- Anti büyüme sinyallerine karşı duyarlılık kaybı
- Apoptozdan (programlı hücre ölümü) kaçma
- Daha fazla beslenebilmek için damar oluşturma (anjiyogenez)
- Doku invazyonu ve metastaz yapma
- Sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olma olarak söylenebilir (Hanahan ve Weinberg 2000).



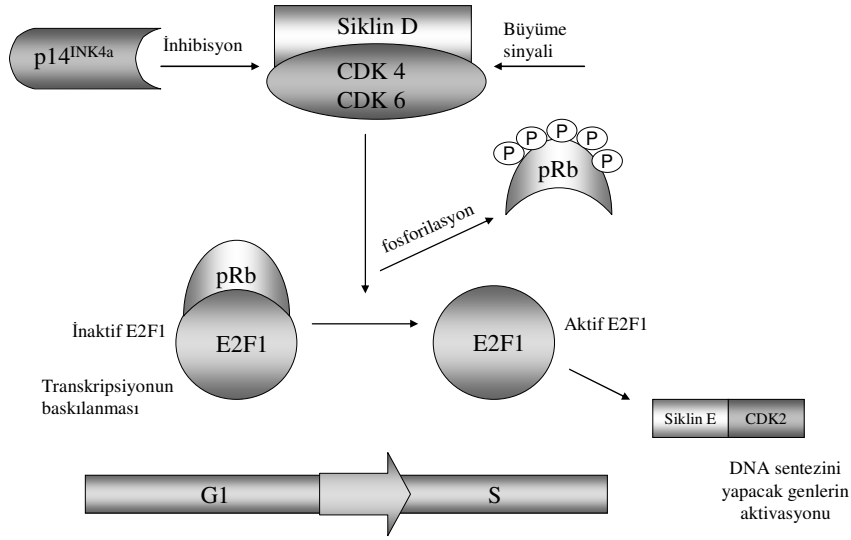
Şekil 1.2. HCC'nin çok basamaklı oluşum süreci.

HCC'de yapılan farklı LOH (Loss of heterozygosity: Heterozigote kaybı, allel kaybı) çalışmaları silinen belli bazı kromozom bölgelerinin olduğunu göstermiştir. Bu bölgeler bir ya da daha fazla tümör supressör genin yerleşmiş olduğu bölgeler olabilmektedir. Genomik hibridizasyon karşılaştırmaları ile kromozomun 1q, 8q ve 17q bölgelerinde gen miktarında artışa rastlanırken; 1p, 4q, 8q, 9p, 13q, 16p, 16q ve 17p bölgelerinde gen miktarında azalmaya rastlanmıştır. Gen miktarında artış olan bölgelerde kritik onkogenler, gen miktarında azalma olan bölgelerde ise tümör supressör genler bulunabilir. Bütün genomda allotipleme çalışmaları yapıldığında, kromozomun 1p, 4q, 6p, 8p, 13q, 16q ve 17p bölgelerinde LOH sık görülmüştür (Tannapfel ve Wittekind 2002). Displazik nodüllerde ise LOH %50-80 sıklıkta görülmüştür (Thorgeirsson ve Grisham 2002).

1.1.5. HCC'nin Oluşumu Sırasında Aktif Hale Gelebilen İletişim Yolakları

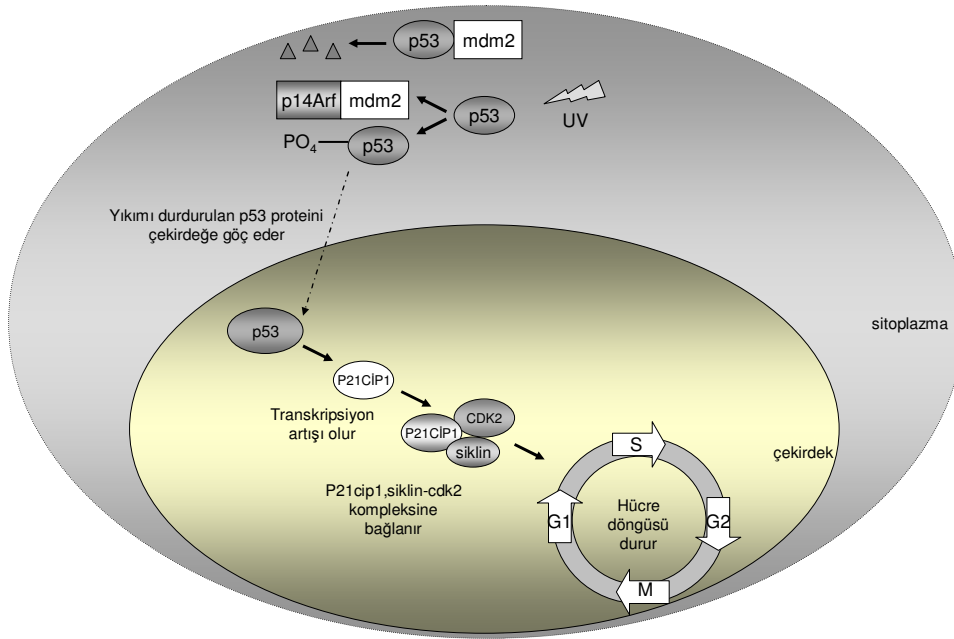
HCC'nin oluşumu sırasında aktif hale gelebilen üç önemli iletişim yolağı bulunmaktadır. Bunlar: Retinoblastoma (Rb) yolağı, p53 yolağı ve Wnt yolağıdır.

Retinoblastoma yolağı: Rb geninin ürünü olan retinoblastoma proteini (pRb), G1 fazından S fazına geçiş sırasında hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan bir tümör supressör proteinidir (Chellappan *et al.* 1991). pRb proteininin fonksiyonu bu proteine fosfat gruplarının eklenmesi ya da çıkarılması ile düzenlenmektedir. pRb, G1 fazından S fazına geçiş sırasında hücre döngüsünün kontrolünü, E2F1 transkripsiyon faktörüne bağlanıp, onu inaktif hale getirerek gerçekleştirmektedir. G1 fazı boyunca E2F1 pRb'ye bağlı olduğu için E2F1 molekülü inaktiftir. Böylece E2F1, hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan DNA sentezini başlatacak olan genlerin transkripsiyonunu arttıramaz ve hücre döngüsü G1/S kontrol noktasında durur. Hücreye dışardan "büyüme faktörü " uyarısı geldiği zaman bu faktörlerin hücre zarında bulunan reseptörleri uyarılır. Oluřan sinyal hücre çekirdeğine taşınır ve siklin D gibi hücre döngüsünü başlatan genlerin transkripsiyonu artar. Siklin D, CDK4 siklin bağımlı kinaza bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu şekilde aktif hale gečen kinaz, pRb'yi fosforlayarak inaktif hale getirir. Rb proteini inaktif hale geçtiğinde E2F1 serbest hale gelerek DNA sentezini başlatacak genlerin ifadesini arttırır (Klug ve Cumming 2003). İfadesi artan bu genlerden biri de siklin E'dir. Kodladığı siklin E proteini CDK2 siklin bağımlı kinaza bağlanarak bu enzimi aktif hale getirir. Hücre G1 fazından S fazına yani DNA sentezinin yapıldığı aşamaya geçmiş olur. Fakat gerekli olduğu takdirde hücre döngüsünü başlatan çoğalma uyarısı p16INK4a ve p21cip1 gibi siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından engellenebilir. HCC hücreleri, Retinablastoma yolağında yer alan siklin D geninde amplifikasyon yolu ile ya da p16INK4a ve retinablastoma gibi genlerin inaktif hale gelmesi ile hücre döngüsünü baskılayan sistemi devre dışı bırakabilirler (Yamamoto *et al.* 1999).



Şekil 1.3. Retinoblastoma yolağı.

P53 yolağı: P53 proteini hücre döngüsünü düzenleyen bir tümör supressör proteini olmanın yanı sıra, DNA zararına karşı apoptoz'u (programlı hücre ölümü) indükleyen önemli bir role sahiptir (Clarke *et al.* 1993; Lowe *et al.* 1993). P53, normal bir şekilde çoğalan hücrelerde aktif olarak sentezlenir. Fakat MDM2 proteini p53 proteini ile kompleks oluşturarak onu hızla yok eder. DNA'da hasar olduğu zaman p53 proteininin yıkımı durdurulur. P53 proteininin yıkımının durdurulması için, ya p14ARF proteini MDM2 proteinine bağlanarak, MDM2'nin p53 ile bir kompleks oluşturmasını engeller ya da p53 proteini DNA hasarı sonucunda aktif hale gelen enzimler tarafından fosforlanarak aktivitesi durdurulur. Yıkımı durdurulan p53 proteini çekirdeğe göç ederek siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21CİP1 proteinini kodlayan genin transkripsiyonunu artırır. P21CİP1 siklin bağımlı kinaz inhibitörü, hücre döngüsünün ilerlemesi boyunca oluşmuş olan siklin/CDK2 kompleksine bağlanır ve bu kompleksin işlevini engeller (Klug ve Cumming 2003). Hücre döngüsü, p53 proteini ile bu şekilde durdurularak hücrelerin daha fazla mutasyona uğraması engellenmektedir (Stagle *et al.* 1991; Tokino *et al.* 1991). HCC hücreleri, p53 ve p14ARF gibi genlerde bu genlerin fonksiyonunu engelleyici mutasyonlar oluşturarak p53 yolağını devreden çıkarabilirler.



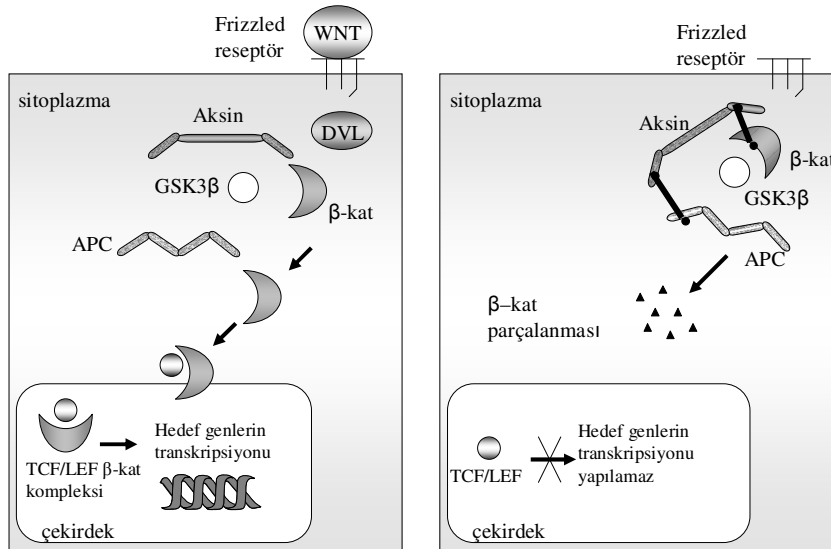
Şekil 1.4. P53 yolağı.

Wnt yolağı: Normal hücrede aktif ya da inaktif olabilen bir yolağıdır. Aksin, wnt sinyali yolağında negatif düzenleyici olarak görev yapan, APC ve β -kateninin GSK3 β tarafından fosforile edilmesini kolaylaştıran bir iskelet yapı proteindir. Ayrıca, transkripsiyonel aktivasyon için gerekli olan β -katenin miktarının azaltılmasında etkilidir. Wnt sinyalinin yokluğu aksinin GSK3 β aracılı fosforilasyonuna izin verir ve onun APC ve β -katenine bağlanmasında etkili olur. Aksin fosforile olduktan sonra APC ve β -katenin ile kompleks oluşturur. APC'nin GSK3 β ile fosforilasyonu ise APC aracılı GSK3 β fosforilasyonunun artışının bir sonucu olarak, GSK3 β 'nin β -katenine bağlanmasını ve β -katenini fosforile etmesini sağlar. Fosforile edilen β -katenin proteozomlarca parçalanır. Böylece β -katenin hücrenin çekirdeğine geçerek, TCF'yi (T hücre faktörü) aktif hale getiremez ve hedef genlerin transkripsiyonu sağlanamaz (Fearnhead *et al.* 2001).

Hücre wnt ligandı ile uyarıldığı zaman, hücre zarında bulunan "frizzled" gen ailesinin bir üyesi olan wnt reseptörü aktif hale gelir ve sitoplazmik bir protein olan "Dishevelled" (Dvl) transdüksiyona uğrar. Dvl proteini, aksin proteini ile bir kompleks oluşturur ve onun defosforilasyonunu indükler. Bu durum, aksin proteininin APC ve β -katenin proteinleriyle kompleks oluşturma kapasitesinde bir azalmaya yol açar. β -katenin proteininin GSK3 β tarafından fosforlanması durur ve β -katenin hücre sitoplazmasında birikmeye başlar.

Biriken β -katenin proteinleri, hücrenin çekirdeğine geçerek LEF (Lenfoid arttırıcı reseptör) ve TCF (T hücre faktörü) ile bir kompleks oluşturarak hücre döngüsünün ilerlemesini düzenleyen siklin D ve c-myc gibi hedef genlerin transkripsiyonunu arttırır. Bu şekilde hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol eden pek çok genin transkripsiyonu arttırılmış olur (Fearnhead *et al.* 2001).

Kanser oluşumunda, wnt yolağında meydana gelen mutasyonlar β -katenin proteininin aksin ve APC proteinleriyle kompleks oluşturmasını engellemekte ve β -kateninin proteininin degradasyonuna engel olmaktadır. β -kateninde oluşan somatik mutasyonlar HCC vakalarının %19-26'sında gözlenmektedir. Bu mutasyonlar daha çok yanlış anlamlı mutasyonlardır (Tannopfel ve Wittekind 2002). Mutasyonlar, β -katenin proteininin nükleusta birikmesine neden olmakta ve kolon kanserinde gösterildiği gibi siklin, myc gibi hücre döngüsünün ilerlemesinde görevli bir seri genin transaktivasyonunu sağlayan LEF-TCF transkripsiyon faktörü ailesinin aktivitesini sağlamaktadır (Calvisi *et al.* 2001). Aksin de önemli bir β -katenin düzenleyicisidir. HCC vakalarının %10'unda mutasyona uğramıştır. Somatik APC mutasyonları HCC'de nadir olarak görülmektedir. Fakat APC geninin biallelik inaktivasyonunun FAP'lı (familial adenomatoz poliposis koli) hastalarda HCC gelişimi oluşturabileceği ve APC geninin 208. kodonunda eşey hattı mutasyonları oluşturabileceği rapor edilmiştir (Su *et al.* 2001).



. Şekil 1.5. Wnt yolağı

HCC oluşumunda; bu yolaklardan başka TGF β , Jak-Stat, Ras, HNF1a gibi iletişim yolaklarında da değişimler olabilmektedir.

1.2. MDM2 Geni

MDM2 (mouse double minute 2) geni, ilk olarak kendiliğinden transforme olmuş fare hücre hatlarındaki “double minute” (sentromeri olmayan küçük kromatin parçacıkları) kromozomlarından elde edilmiştir. 1–2 megabaz (Mb) büyüklüğündeki bu yapılar üç adet gen içermektedir. Bu genlerden ikincisine MDM2 adı verilmiştir (Freedman *et al.* 1999). MDM2 geni, fare hücrelerine aktarıldığında tümör oluşumuna neden olduğundan 1991 yılında bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yürütülen çalışmalarda, p53 tümör supressör proteini ile kompleks oluşturabilen 90 kilodalton (kD) büyüklüğünde bir protein gözlenmiştir. Bu proteinin dizisi çıkarıldığında, MDM2 geninin ürünü olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca MDM2'nin aşırı miktardaki ekspresyonunun p53 aracılı aktivasyonu engellediği saptanmıştır. 1992 yılında ise MDM2'nin insandaki homoloğu olan HDM2 (Human double minute 2), kromozomun 12q13/14 bölgesinde haritalanmıştır (Schlott *et al.* 1997). MDM2 geninin bilinen en önemli görevi p53'ü bağlayarak onun fonksiyonlarını engellemektir. Fakat MDM2'nin p53'ten bağımsız olarak da gerçekleştirdiği pek çok fonksiyonu vardır (Ganguli ve Waslyk 2003).

MDM2'nin bir onkogen olarak iş gördüğünü kanıtlayan ek bilgiler, farelerde laktasyon sırasındaki meme epitellerinin MDM2'yi aşırı eksprese etmesinin gözlenmesiyle elde edilmiştir (Lundgren *et al.* 1997). Farelerde, meme bezlerindeki normal gelişim ve terminal farklılaşma MDM2'nin yüksek miktarlarda oluşumu ile engellenmektedir. Böylece pek çok hücre, kusurlu bir p53 geni içeren hücrelerin fenotiplerinde olduğu gibi, çok çekirdekli ve poliploid olmaktadır (Freedman *et al.* 1999). Ayrıca, doku kültüründe yapılan çalışmalarda, MDM2 klonlarının aktif hale getirilmiş Ras (Rat sarkoma) geni ile işbirliği içinde bulunarak, rat embriyolarındaki fibroblastların (REF) ölümsüzleşmesine ve transformasyonuna aracılık ettikleri belirlenmiştir (Finlay *et al.* 1993). MDM2 geni, insan tümörlerindeki fonksiyonlarına bakılarak da bir onkogen olarak sınıflandırılabilir. MDM2'nin tümör oluşturma potansiyeli, insan tümörlerinde aşırı miktarda eksprese edilmesi ile belirlenmiştir. Bu aşırı ekspresyon; gen amplifikasyonu (Oliner *et al.* 1992) transkripsiyon artışı ya da translasyon artışı sebebi ile olabilir (Landers *et al.* 1994).

Yumuşak Doku Sarkoması, Osteosarkoma, Rhabdomyosarkoma (Meddeb *et al.* 1996), Glioblastoma, Astrocytoma (Reifenberger *et al.* 1993), B Hücreli Kronik Lenfositik Lösemi, Akut Myeloid Lösemi, Akut Lenfoblastik Lösemi, Non-Hodgkin Lenfoması (Watanabe *et al.* 1994), Oral Skuamoz Hücre Karsinoması, Meme Karsinoması (Matsumura *et al.* 1996) ve Malign Melanoma (Poremba *et al.* 1995) MDM2'nin aşırı miktarda eksprese edildiği tümör tipleridir. İnsan tümörü türevi olan hücre hatları da, MDM2'yi aşırı miktarda eksprese etmektedir ve bu hücre hatları MDM2'nin aşırı miktarda ekspresyonunun kültürdeki hücreler üzerinde etkilerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu amaçla kullanılan hücre hatları Osteosarkoma (Gracia *et al.* 1996), Rhabdomyosarkoma (Keleti *et al.* 1996), Nöroblastoma, Glioblastoma (Corvi *et al.* 1995), Meme Karsinoması (Sheikh *et al.* 1993), Melanoma ve Choriokarsinoma'dan (Landers *et al.* 1994) elde edilmektedir.

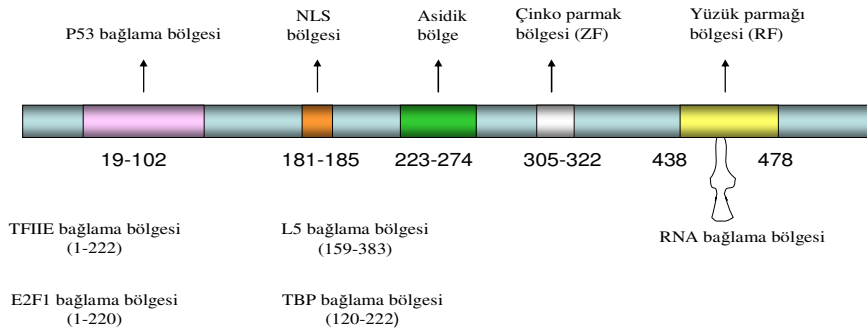
MDM2 ve kanser arasında belirlenen ilişkilere ilave bilgiler, normal dokularının MDM2'yi aşırı miktarda eksprese ettiği kansere eğilimli olan "Li-Fraumeni" sendromunun tanımlanmasıyla elde edilmiştir. Bu bireyler iki yaban tip p53 alleleline sahiptirler ve p53 ile indüklenen bir gen olan p21 genini aşırı miktarda eksprese etmezler. Bu durum MDM2'nin aşırı ekspresyonunun p53'ten bağımsız olduğunu göstermektedir (Picksley *et al.* 1996). "Li-Fraumeni" sendromlu bireylerin normal dokularında MDM2'nin aşırı miktarda ekspresyonu, MDM2'nin bu bireylerde yüksek miktarda olan tümör insidansına direkt olarak etki edebileceğini düşündürmektedir (Freedman *et al.* 1999).

1.2.1. MDM2 Gen Yapısı ve Protein Bölgeleri

MDM2 geni, yaklaşık 25 kb büyüklüğündedir ve en az 12 ekzon içermektedir (Montes de Oca Luna *et al.* 1996). P1 ve P2 olmak üzere iki promotörü bulunur. P1 promotörü birinci ekzonun önünde bulunur ve p53'ün bağlanabileceği bir dizi içermez. P2 promotörü ise birinci intronun içindedir ve p53'ün bağlanabileceği diziyi içerir. Her iki promotor da guanin (G) ve sitozin (C) nükleotitleri sayısı bakımından zengindir ve G ve C'den zengin promotorlarda gözlenen çoklu başlama bölgeleri her iki promotorda da bulunmaktadır (Jones ve *et al.* 1996). Pek çok hücre hattında, MDM2 mRNA'sının ve proteinlerinin izoformlarına rastlanmaktadır. Örneğin, MDM2'nin orijinal olarak klonlandığı 3T3-DM (3T3 double minute) hücrelerinde büyüklükleri 57-90 kilodalton (kDa) arasında değişen

beş farklı MDM2 polipeptidi bulunmaktadır (Olson 1993). Ayrıca, insan ve fare hücrelerinde en az yedi MDM2 transkripti tanımlanmıştır (Fakharzadeh *et al.* 1991; Oliner *et al.* 1992). Bu transkriptler, MDM2'nin iç kısımlarındaki “splays” (splays: intronların RNA'dan kesilip çıkarılarak ekzonların birleştirilmesi işlemi) bölgelerinin kullanılmasıyla ortaya çıkmaktadır.

MDM2 proteini ortalama 491 amino asitten oluşmaktadır. MDM2 proteini Zebra balığından insana kadar bir çok türde korunmuş olan çeşitli bölgeler içerir (Marechal *et al.* 1994). İlk korunmuş bölge 19-102 amino asitleri arasında yer alan p53 bağlanma (“p53 binding”) bölgesidir. Bu bölge, MDM2'nin, p53 proteininin transkripsiyonunu aktive etme görevini etkisiz hale getirmesi için gereklidir (Chen *et al.* 1995). 181-185 amino asitleri arasında yer alan “çekirdeğe yerleşme dizisi”(NLS: nuclear localization sequence) bölgesi, MDM2'nin çekirdek ve sitoplazma arasında aracılık etmesi için gereklidir. Bir sonraki korunmuş bölge, 221-272 amino asitleri arasında yerleşmiş olan, %40 glutamik asit ve aspartik asit rezidüleri içeren “asidik” bölgedir. Bu bölge MDM2'nin ribozomal protein L5 ve 5S ribozomal RNA (rRNA) ile etkileşimde bulunmasına aracılık eder (Marechal *et al.* 1994). Bu asidik bölgeyi 305-322 amino asitleri arasında yer alan “çinko parmak” (zinc finger) bölgesi takip eder. MDM2 proteininin son korunmuş bölgesi, karboksil ucunda 438-478 amino asitleri arasında yer alan “yüzük parmak” (ring finger) bölgesidir. Bu bölge ise iki adet “çinko parmak” (zinc finger) yapısı içermekte ve MDM2'nin *in vitro* daki yapılarla ve spesifik RNA dizilerine bağlanmasını sağlamaktadır (Elenbaas *et al.* 1996).



Şekil 1.6. MDM2 protein yapısı.

1.2.2. MDM2 ve P53 İlişkisi

MDM2 proteini, p53 proteininin fonksiyonlarını düzenleme konusunda temel bir rol oynar. P53, hücre bölünmesini inhibe eden, hücrenin normal büyümesi için gerekli olan bir hücre döngüsü kontrol elemanıdır. P53 geninin ürünü olan p53 proteini, DNA'da hasar olduğunda hücre bölünmesini durdurur ve hasarın tamiri için hücreye zaman kazandırır. Eğer bu hasar çok büyükse, hücreyi apoptoz yani programlı hücre ölümüne götürür (Lowe *et al.* 1994). Normal hücrelerde p53 ve MDM2 bir denge içinde sentezlenmektedir. P53, kendi inhibitörü olan MDM2'nin ekspresyonunu artırarak hücredeki bu dengenin korunmasını sağlamaktadır. Hücrede bir hasar meydana geldiğinde ya da hücre, bölünmemesi yolunda bir sinyal aldığında p53 ve MDM2'de meydana gelen bazı modifikasyonlar, bu iki protein arasındaki etkileşimi inhibe ederek, p53'ün aktif kalmasını sağlar. Fakat MDM2 geni aşırı eksprese olduğu zaman, p53 proteininin yıkımı fazla olur ve p53 fonksiyon göremez (Roth *et al.* 1998; Freedman *et al.* 1998). MDM2 proteini, p53 proteininin fonksiyonlarını negatif olarak düzenlerken her iki protein “otodüzenleyici geribildirim döngüsü” (autoregulatory feedback loop) adı verilen bir yolakla hareket eder. Bu yolakta, önce p53 proteininin MDM2 genine bağlanıp onu aktif hale getirmesi, daha sonra aktif hale geçen MDM2 proteininin p53 proteinini inhibe etmesi söz konusudur (Piette *et al.* 1997).

MDM2'nin p53 tarafından aktif hale getirildiği ilk olarak, yapılan bir çalışmada p53'ün ısıya duyarlı formunun kullanılmasıyla anlaşılmıştır. MDM2'nin ekspresyonu, p53'ün fonksiyon görebilmesi için uygun olan bir sıcaklıkta artmıştır. P53, MDM2'nin p53 bağlama bölgesine bağlanarak bu ekspresyon artışını direkt olarak gerçekleştirmektedir. MDM2'nin p53 ile aktif hale getirildiği, hücre hattında yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır. Hücrelerin ultraviyole (UV) radyasyonuna maruz kalmasından sonra, MDM2 transkriptlerindeki ve protein seviyelerindeki artışların, hücrelerdeki p53 proteininin varlığına bağlı olduğu görülmüştür (Reinke *et al.* 1997). Bütün bu çalışmalar p53'ün doğru fizyolojik koşullar altında DNA hasarına cevap olarak, MDM2 geninin ekspresyonunu aktif hale getirdiğini göstermektedir.

MDM2'nin, p53'ün hücre döngüsünü G1 fazında durdurma ve apoptozu indükleme fonksiyonlarını inhibe etme yeteneğinde olduğu, memeli hücre kültüründe yapılan

transfeksiyon çalışmalarında ve farelerde yapılan çalışmalarda da kanıtlanmıştır (Chen *et al.* 1996). Fare embriyolarında yapılan çalışmalarda, MDM2 gen aktivitesi bulunmayan embriyoların, gelişimlerinin erken aşamasında öldükleri gözlenmiştir (Momand *et al.* 2000). P53 fonksiyonların, MDM2 tarafından inhibe edilmesi farelerde embriyonik oluşumun erken safhalarında gerekli bir olaydır. Bu sonuç, hücrelerin normal gelişimlerini sağlamak için, p53 ve MDM2'nin dengeli ekspresyonuna gereksinim duyduklarını göstermektedir.

1.2.2.1. MDM2 ve P53 İlişkisinin İnhibisyonu

Hücrede bir hasar meydana geldiğinde ya da hücre bölünmemesi yolunda bir sinyal aldığında, p53 ve MDM2 arasındaki etkileşimi inhibe eden modifikasyonlar; P53'ün fosforilasyonu, MDM2'nin fosforilasyonu ve MDM2 fonksiyonunun p14ARF proteini ile engellenmesidir.

P53'ün fosforilasyonu: Yapılan çalışmalarda DNA hasarı sonucu, p53'ün DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) tarafından 15. serin amino asitinden fosforile edildiği ve bu nedenle MDM2'nin p53'e bağlanamadığı ve p53'ün aktifleştiği gözlenmiştir (Shieh *et al.* 1997). Ayrıca DNA hasarı ve iyonize edici radyasyon sonucunda p53'ün ATM proteini (Genetik bir hastalık olan Ataksia telangiectasia'den sorumlu olan genin ürünü) tarafından 15. serin amino asitinden fosforile edildiği ve böylece aktifleştiği gözlenmiştir (Banin *et al.* 1998; Canman *et al.* 1998). ATM, DNA kırıklarında oluşan hücrel cevabı düzenleyen bir proteindir. Bu proteinin hücrel hasar durumunda p53'ü fosforile ederek, P53-MDM2 ilişkisini bozduğu ve böylece hasarın tamiri için hücreye zaman kazandırılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Canman *et al.* 1998). Ayrıca yapılan bir çalışmada, p53'ün iyonize radyasyon sonucu 15. serin amino asitinden fosforile edilmesi CK1 (Caseine Kinase 1: Kazein kinaz 1) ya da CK1 benzeri enzimlerin p53'ün 18. treonin (Thr) amino asitinden fosforile edilmesini sağladığı ve p53'ün MDM2'ye bağlanmayıp aktif kaldığı söylenmektedir (Sakaguchi *et al.* 2000).

MDM2'nin fosforilasyonu: MDM2'nin iki önemli fonksiyonel bölgesi olan p53 bağlanma ve ubikütinasyondan sorumlu bölgelerinde, MDM2'nin fosforilasyonu için bölgeler bulunmaktadır (Hay *et al.* 2000). MDM2'nin çift zincirli DNA kırıklarında aktive olan

DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) tarafından 17. serin amino asitinden fosforile edilmesi, MDM2'nin p53 ile kompleks oluşturmasını engellemekte ve böylece p53'ün aktifleşmesi sağlanmaktadır (Mayo *et al.* 1997).

MDM2 fonksiyonunun p14ARF proteini ile engellenmesi: p14ARF, p14INK4a geninden alternatif okuma çerçevesi ile sentezlenen bir proteindir (Chin *et al.* 1998). P14ARF geninin ürünü, MDM2'ye bağlanarak MDM2'yi inhibe eder ve p53'ün aktifleşmesinde rol alır. P14ARF'nin MDM2'ye bağlanması, MDM2'nin p53 ile ilişki kurmasını engellediği gibi MDM2'nin parçalanmasını da uyarmaktadır (Pomerantz *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998).

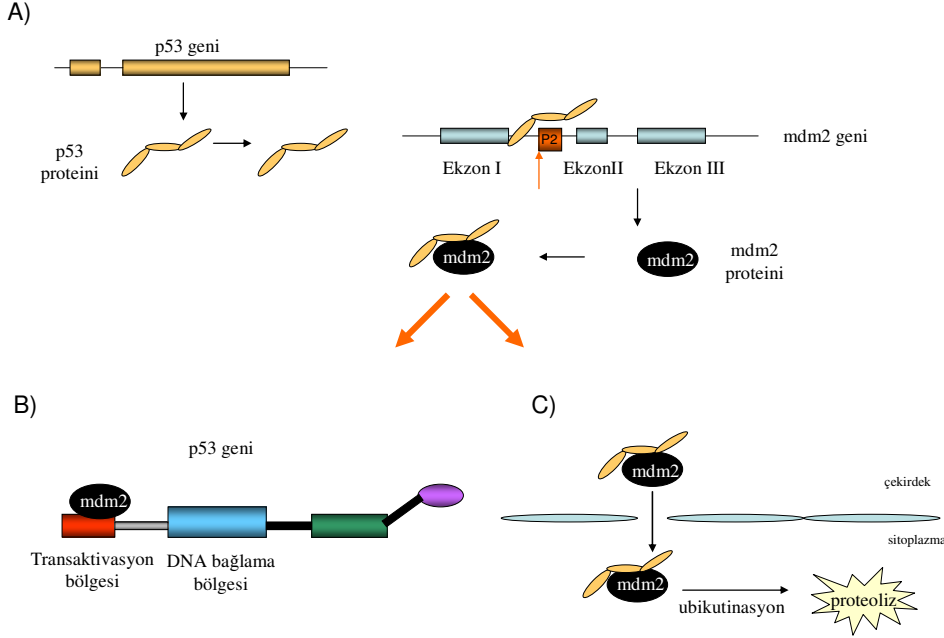
1.2.2.2. MDM2'nin P53 Fonksiyonlarını İnhibe Etmesi

Yapılan araştırmalarda, MDM2 proteininin p53 proteininin tümör supressör olarak gerçekleştirdiği fonksiyonunu bir kaç farklı mekanizma ile engellediği belirlenmiştir. Birinci mekanizmada, MDM2, p53'ün fonksiyonlarını p53'ün transkripsiyonu aktive edici olarak kullandığı bölgeye bağlanarak engeller (Lin *et al.* 1994; Lu *et al.* 1995). MDM2 bu bölgeye bağlanabilmek için transkripsiyon faktörü kompleksi TFIID ile rekabet etmektedir. Bu şekilde p53'ün transkripsiyonu aktive etmek için kullandığı bölgeyi maskeler ve p53'ün fonksiyonunu inhibe eder (Thut *et al.* 1997).

MDM2'nin p53 aktivitesini engellediği diğer bir mekanizma, p53 protein seviyesini negatif olarak düzenlemektir. Çeşitli hücre hatlarında, P53 ve MDM2 birlikte transfekte edildiğinde, p53 proteini miktarında, p53'ün tek başına transfeksiyonuna göre azalma görülmüştür. P53 proteininin seviyesindeki bu azalma, MDM2'nin p53'ün yarı ömrünü azaltarak p53'ü inhibe etme yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Kubbuhat *et al.* 1997; Haupt *et al.* 1997). MDM2, p53'ü hücrenin çekirdeğinde bağlamakta ve p53 ile birlikte sitoplazmaya göç ederek, p53'ün proteozomlar tarafından parçalanmasını indüklemektedir (Roth *et al.* 1998) ya da MDM2 proteini karboksil ucundaki “çinko panmak” bölgesini kullanarak “E3 ubiquitin ligaz” (E3 ubiquitin ligase) aktivitesi yapar ve p53 proteininin inhibisyonuna direkt olarak etki etmektedir (Honda *et al.* 1997).

MDM2'nin p53'ün fonksiyonunu, p53'ün protein seviyesini düşürerek engellemesi, p53'ün transkripsiyonu aktive etmek için kullandığı bölgeyi direkt baskılamasından daha etkili bir mekanizmadır. MDM2'nin p53'ün fonksiyonlarını, transkripsiyon aktivasyonuna aracılık etme yöntemi ile engellemesi, p53'ün apoptozu indüklemeye ve DNA tamirinin artmasını sağlama gibi diğer fonksiyonlarını yapmasına engel olmaz. Fakat p53 proteinini parçalamak için hedeflemek, p53'ün transkripsiyonel aktivasyona ek olarak gerçekleştirdiği bütün aktivitelerini de engellemektedir (Freedman et al. 1999).

MDM2'ün p53 fonksiyonunu engellediği son mekanizma, p53'ün asetilasyonunu inhibe etmektir. P300 gibi koaktivatörler p53'ün amino ucuna bağlanır ve karboksil ucundaki lizin amino asitinden asetile olmasını sağlar. Bu asetilasyon, p53'ün DNA'ya diziye özel bir şekilde bağlanmasını hızlandırır. MDM2, p53'ün p300 aracılı asetilasyonunu inhibe ederek p53'ün transkripsiyonu aktive etme fonksiyonunu inhibe etmektedir (Ito et al. 2001). Ayrıca MDM2-p300 kompleksi p53'ün MDM2 aracılı parçalanmasında da rol almaktadır (Grossman et al. 1998).



Şekil 1.7. MDM2 ve p53 proteini ilişkisi. A) MDM2'nin p53 ile aktif hale getirilmesi. B) p53'ün transaktivasyon bölgesinin MDM2 ile baskılanarak p53 fonksiyonunun engellenmesi. C) p53'ün MDM2 proteini ile parçalanması.

1.2.3. MDM2'nin P53'ten Bağımsız Fonksiyonları

MDM2, p53'e bağlanarak onun bir tümör supressör proteini olarak gerçekleştirdiği fonksiyonlarını engellediği gibi, p53'ten bağımsız fonksiyonlarda da bulunarak tümör oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, hem MDM2 geninin aşırı eksprese olduğu, hem de p53 geninde mutasyon taşıyan tümörlere sahip bireylerin, bu iki değişimden yalnızca birini taşıyan bireylere göre daha kötü bir prognoza sahip oldukları anlaşılmıştır (Cordon-Cardo *et al.* 1994). MDM2 geninin onkogen aktivitesinin yalnızca p53 proteininin fonksiyonlarını inhibe etmek olmadığı, tümör gelişimine avantaj sağlayacak diğer fonksiyonlara da sahip olduğu bu gözlemlerle elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda laktasyon sırasında meme epitel hücrelerinde MDM2 genini aşırı miktarda eksprese eden transgenik farelerde meydana gelen azalmış beze gelişimi, terminal farklılaşma yokluğu ve poliploidi gibi fenotipler bu farelerde p53 geninin bulunmamasına rağmen görülmüştür (Lundgren *et al.* 1997). Böylece, MDM2'nin p53 yokluğunda meydana getirdiği tümör benzeri özelliklerin, MDM2'nin p53'ün fonksiyonlarını engelleme fonksiyonundan bağımsız olduğu görülmektedir.

MDM2'nin etkileşimde bulunduğu diğer proteinler arasında E2F1, Rb, p73, MTBP, TAFII250 ve Numb sayılabilir:

MDM2 ve E2F1: E2F1 hücre döngüsünün kontrolünde görev alan, hücrenin bölünmesini ya da apoptoza gitmesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. E2F1 hücre durağan evredeyken Retinoblastoma (Rb) tümör supressör proteinine bağlıdır. Hücre bölünme yönünde uyarıldığında Rb hiperfosforile duruma geçer ve E2F1'den ayrılır. Serbest E2F1 hücre döngüsünde ve DNA sentezinde görev alan proteinlerin sentezini sağlar ve hücrenin G1 fazından S fazına geçmesine yardımcı olur. E2F1'in düzenleyici proteini olan Rb'nin ve E2F1'in promotorlarında E2F1 bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Ayrıca, E2F1'nin fazla sentezlenmesi hücreyi apoptoza götürebilmektedir. E2F1 hücreyi p53'ten bağımsız bir yolla apoptoza götürürken bu fonksiyonu p53 tarafından hızlandırılmaktadır (Black *et al.* 1999). E2F1, DP1 ile heterodimer oluşturarak DNA'ya bağlanmakta ve transkripsiyonu aktive edici fonksiyon göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, MDM2'nin E2F1/DP1 kompleksinin transkripsiyonel aktivasyonunu arttırdığı gözlenmiştir (Martin *et al.* 1995).

Ayrıca MDM2 E2F1'in apoptozun meydana gelmesi sırasındaki fonksiyonunu inhibe etmektedir (Loughran *et al.* 2000).

MDM2 ve Rb: Rb, kromozomun 13q14 bölgesinde yerleşmiş olan bir tümör supressör proteindir. Hipofosforile durumdayken E2F1 ile etkileşime girerek hücrenin G1 fazından S fazına geçişini engeller. MDM2 fiziksel ve fonksiyonel olarak Rb ile etkileşime girmekte ve Rb'nin büyümeyi düzenleyen fonksiyonunu engellemektedir (Xiao *et al.* 1995). MDM2'nin Rb'ye bağlanması p53 aracılı transaktivasyonu engellerken, p53 aracılı apoptoza izin vermektedir. Bunlara ilaveten Rb MDM2'ye, E2F1/DP1'e bağlandığı kısmı ile bağlanmaktadır. MDM2'nin Rb'ye bağlanması, Rb'nin E2F1'e bağlanmasını engellemekte ve böylece E2F1 serbest kalarak hücrenin S fazına geçişini sağlamaktadır (Momand *et al.* 2000). MDM2 bu şekilde hem direkt hem de indirekt olarak E2F1'i aktifleştirmektedir.

MDM2 ve p73: P73, p53 ile önemli miktarda benzer dizileri taşıyan, p53 proteini ailesinden bir proteindir. P53 bağımlı genlerin düzenlenmesinde ve apoptozda görev almaktadır (Momand *et al.* 2000). MDM2 p53'e bağlandığı gibi p73'e de bağlanabilmekte ve p73'ün transaktivasyon ve apoptoz özelliğini engellemektedir (Dobbelstein *et al.* 1999). Fakat p53'te olduğu gibi p73'ün parçalanmasına aracılık etmemektedir (Zeng *et al.* 1999).

MDM2 ve MTBP: MTBP, Mark T. Boyd ve arkadaşları tarafından izole edilen ve MDM2'ye bağlandığı gösterilen yeni proteinlerden biridir. Bu protein, hücre büyümesini negatif olarak düzenler ve p53'den bağımsız bir yolla G1 fazının durdurulmasını artırır. Yüksek oranda ifade bulunduğunda MDM2'ye bağlanmakta ve G1 fazının durdurulmasını indüklemektedir (Boyd *et al.* 2000).

MDM2 ve TAFII250: MDM2'nin bir transkripsiyon faktörü olan TAFII250 ile etkileşime girmesi siklin A geninin promotorunu uyarır ve siklin A proteininin sentezinin artmasına yardımcı olur. Siklin A, S fazından G2 fazına geçmek için gerekli bir proteindir. Siklin A'nın sentezlenmesi hücrenin S fazına geçmesini hızlandırır ve hücrenin büyümesi için gerekli olan tutunma gereksimini ortadan kaldırır. MDM2-TAFII250 kompleksi direkt ya da indirekt olarak siklin A geninin promotorunu uyarır ve siklin A sentezinin artışına neden olarak hücreyi S fazına geçme yönünde uyarır. (Leveillard *et al.* 1997).

MDM2 ve Numb: Numb, hücre farklılaşmasında ve bölünmesinde görev alan ve hücrenin kaderini belirleyen bir proteindir. Numb'un bazı izoformları hücre bölünmesi ile ilişkili iken bazı izoformları da hücre farklılaşmasında görevlidir. MDM2 aşırı sentezlenmiş Numb ile etkileşime girerek onun çekirdekte kalmasını sağlar ve bu da hücredeki genel Numb miktarının azalmasına neden olur. MDM2 bu şekilde hücrenin farklılaşma ve hayatta kalma sürecini etkileyebilmektedir (Juven-Gershon *et al.* 1998).

Ayrıca MDM2 proteini, merkez bölgesinde bulunan asidik bölge yardımı ile ribozomal bir protein olan L5 ve onunla ilişkili olan 5S rRNA ile etkileşimde bulunmaktadır. Yine, "çinko parmak" bölgesini kullanarak spesifik RNA dizilerine bağlanmaktadır (Elenbaas *et al.* 1996). Yapılan çalışmalar, bu etkileşimlerin MDM2'nin translasyon kontrolünde ya da ribozom biyogenezinde bir rol üstlenebildiğini göstermektedir. Fakat bu konuda henüz yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır (Freedman *et al.* 1999).

1.4. MDM2 Genindeki *MboII* ve *NlaIV* Polimorfizmleri ve Fonksiyonel Önemleri

Kanser çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan kalıtsal bir hastalıktır. Günümüzde çevresel faktörlerin rolü ile ilgili yapılan çalışmaların yanısıra bireylerin kansere hassasiyeti artırdığı düşünülen polimorfizmlerle ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Fakat Karaciğer Kanseriinde hassasiyet artışına neden olan polimorfizmlerle ilgili çalışma bulunmamaktadır.

2000 yılında Taubert ve arkadaşları tarafından insan MDM2 onkogeninin 354.kodonunda bir polimorfizm tanımlanmıştır. Bu polimorfizm, MDM2 geninin 11. ekzonuna yerleşmiş olan 548 baz çiftlik bir parça içinde yer almaktadır. Polimorfizme sahip olan bireylerde Adenin nükleotitinden Guanin nükleotitine bir değişim olmakta fakat polimorfizm kodlanan aminoasiti değiştirmemektedir. Yumuşak doku Sarkomasında yapılan bu polimorfizm çalışmasında sağlıklı kan vericiler ve Yumuşak Doku Sarkomalı hastalar karşılaştırıldığında polimorfizimli hastalar ortalama 38 ay hayatta kalırken, polimorfizmsiz hastaların ortalama 57 ay hayatta kaldıkları belirlenmiştir.Fakat bu çalışma dünyada bu polimorfizmle ilgili yapılmış tek çalışma durumundadır.

1993 yılında Heigway ve arkadaşları tarafından insan MDM2 geninde Meme kanserinde allelik imbalansı belirlemede kullanılabileceği düşünölen bir polimorfizm çalışması yapılmıştır. Bu polimorfizm MDM2 geninin 5'ucunda translasyona uğramayan bir bölgesinde tanımlanmıştır. Bu çalışma da dünyada bu polimorfizmle ilgili yapılmış tek çalışma durumundadır.

1.5. Çalışmanın Amacı

Nedeni tam olarak bilinmeyen genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu kanser çok faktörlü bir hastalıktır. Genetik bir yatkınlığın kansere duyarlılığı artıracağı görüşü hakimdir. Karaciğer Kanseri dünyanın pek çok yerinde milyonlarca insanın ölümüne sebep olan kanserlerin başında gelmektedir. MDM2 geninde MboII polimorfizmi ile ilgili yapılan çalışma Karaciğer Kanseri oluşumunda bireysel duyarlılığın belirlenmesinde etkili olabilir. Ayrıca MDM2 geninde yapılan bir başka polimorfizm çalışması olan NlaIV polimorfizmi de karaceğir kanserinde allelik imbalansı belirlemede bir belirteç olarak kullanılabilir. Bu çalışmanın amacı, Türk popölasyonunda hasta ve kontrol grubunda bu polimorfizmlerin incelenmesidir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Hastalar

Çalışmamıza Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran kişilerden histopatolojik olarak Hepatoselüler Karsinom tanısı almış 55 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise 104 sağlıklı kişi alınmıştır.

Hastalardan ve kontrol grubunu oluşturan kişilerden DNA izolasyonları yapılmak üzere EDTA'lı tüplere kan alınmış ve DNA izolasyonları bekletilmeden yapılmıştır.

2.1.2. Primerler

Yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR) kullanılan primerlerin tümü MWG Biyoteknoloji şirketi (MWG Oligo Syntheselabor, Almanya) tarafından sentezlenmiş ve bu primer dizileri Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri.

Primer No	Primer Dizisi (5'→3' yönünde)	Kaynak
P1	GCT GAC TAT TGG AAA TGC AC	Schlott ve ark., 1997
P2	ATT GGT TGT CTA CAT ACT GG	Schlott ve ark., 1997
P3	GCG CGA GCT TGG CTG CTT CT	Heighway ve ark.,1994
P4	TCC CTC AAG ACT CCC CAG TTT	Heighway ve ark.,1994

2.1.3. Kimyasallar

Agaroz	Quantum Biotechnologies
Amonyum Asetat	Sigma, Almanya
Borik Asit	Merck, Frankfurt, Almanya
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Etidyum Bromid	Sigma, Almanya
Fikol	Biochrom, Almanya
Mutlak Etanol	Kimetsan, Türkiye
NaCl	Sigma, Almanya
Na ₂ EDTA	Sigma, Almanya
Proteinaz K	Sigma, Almanya
SDS	Sigma, Almanya
Tris HCl	Sigma, Almanya
Ksilen Siyanol	Sigma, Almanya
Φ X174/ <i>Bsu</i> RI (<i>Hae</i> III)	MBI Fermentas, Litvanya

2.1.4. Restriksiyon Enzimi

Restriksiyon parçacığı uzunluk polimorfizmi (RFLP) reaksiyonunda gerekli enzim, tanıma dizisi ve kesim bölgesi, bu enzim için gerekli tampon çözelti, enzimi sağlayan firmalar ve enzimin çalışması için önerilen uygun sıcaklık Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimi.

Restriksiyon Endonükleaz	Kesim Bölgesi	Tampon Çözelti(1X)	Uygun Sıcaklık	Üretici Firma
<i>NlaIV</i>	5'.GGN↓NCC.3' 3'.CCN↓NGG.5'	<u>NEBuffer2</u> 50 mM potasyum asetat, 20 mM Tris-asetat, 10 mM magnezyum asetat, 1 mM Dithiotreitol pH 7,9 (25°C'de)	37	BioLabs, Beverly, MA, USA

2.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler

PZR için 5U/µl *Thermus aquaticus* DNA Polimeraz enzimi, 10X PZR tamponu (750 mM Tris-HCL (25°C'de pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, %0,1 (Tween 20), 25 mM MgCl₂) içeren Taq DNA Polimeraz (MBI Fermantas, Litvanya) seti kullanıldı. Set ayrıca her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dGTP, dCTP (QBiogen, Almanya) içermektedir. PZR reaksiyonları, 0,2 ml'lik tüpler (Greiner Bioone, Avusturya) içerisinde "Eppendorf Mastercycler Personal" kullanılarak yapıldı.

2.1.6. Standart Çözeltiler ve Tamponlar

Çalışmada kullanılan standart çözelti ve tamponların içerikleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan çözeltilerin ve tamponların içerikleri.

Standart Çözelti ve Tampon	İçerik
Tris-borik asit- EDTA tamponu (TBE) (10X) (11)	108 g Tris HCl (0,9 M), 55 g borik asit (0,9 M), 20 ml 0,5 M EDTA, ddH ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Çizelge 2.3. Devam Çalışmada kullanılan çözeltilerin ve tamponların içerikleri.

Nükleoliz tamponu	10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na ₂ EDTA
Doymuş amonyum asetat çözeltisi	148 g (9,6 M) amonyum asetat, su ile 200 ml'ye tamamlandı.
SDS (sodyum dodesil sülfat) (%10)	10 g SDS (AppliChem GmbH, Darmstadt), 100 ml'ye ddH ₂ O ile tamamlandı.
Agaroz jel yükleme tamponu (6X)	% 15 fikol, % 0,05 bromofenol mavisi, 0,05 ksilen siyanol

2.2. Yöntem

2.2.1. DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpler içerisindeki 15 ml'lik kan örneği, +4°C sıcaklığındaki 35 ml distile su ile 5 dakika hızlıca çalkalandı. Daha sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süzüntünün üstünde kalan sıvı atıldı ve geriye kalan süzüntü üzerine +4°C sıcaklığındaki distile sudan 25ml eklenerek kuvvetlice çalkalandı ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süzüntünün üstünde kalan sıvı atıldı ve geriye kalan süzüntü 3ml Nükleoliz tamponu, 200 µl %10'luk SDS ve 150 µl proteinaz K (10mg/ml) içinde vorteks yardımı ile çözüldü. 37°C'de bir gece bekletildi. Daha sonra bu çözeltinin üzerine 2 ml amonyum asetat eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süzüntünün üzerinde kalan sıvı başka bir tüpe alınarak üzerine hacminin 2 katı kadar mutlak etanol eklendi. Kısa bir süre bekletildikten sonra, tüp yavaşça çevrilerek genomik DNA'nın toplanması sağlandı. Genomik DNA, daha önce içine 1ml distile su konulmuş olan steril tüpe bir pipet ucu yardımıyla aktarıldı ve su içinde çözünmesi sağlandı. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı RNA/DNA metre (Pharmacia Biotech, GeneQuant, İngiltere) kullanılarak ölçüldü.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kandan elde edilen genomik DNA'nın çoğaltılması için PZR tekniği kullanıldı. PZR, hacmi 0,2ml olan steril reaksiyon tüplerinde (Greiner Bioone, Avusturya) gerçekleştirildi. Her bir reaksiyon için hazırlanan PZR karışımının son hacmi, ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltılan tüm hedef gen bölgesi için hazırlanan PZR karışımında, 100ng genomik DNA, 1,25 ünite (U) Taq polimeraz enzimi, 5 µl, 2 mM dNTP (her birinden 0.5 mM), her biri 20 pmol/µl olmak üzere "forward ve reverse" primerler kullanıldı. Çoğaltılan hedef bölgelere özgül olarak eklenen MgCl₂ miktarı, primerler, PZR bağlanma ve uzama sıcaklıkları ile döngü sayıları Çizelge 2.4'te verilmiştir. *MboII* bölgesi PZR'si için 5 dakika 95°C ve *NlaIV* bölgesi PZR'si için 2 dakika 94°C başlangıç denatürasyon sıcaklığı ve tüm PCR için 7 dakika 72°C son uzama sıcaklığı kullanılmıştır.

Çizelge 2.4 Uygulanan PZR içeriği ve koşulları.

Hedef Bölge	Primerler	MgCl ₂ Konsantrasyonu	Reaksiyon Koşulları	Döngü Sayısı
MDM2/MboII	P1 P2	0,5 mM	95°C 45 sn 53°C 60 sn	40
MDM2/NlaIV	P3 P4	1,5 mM	94°C 60 sn 54°C 60 sn 74°C 60 sn	35

2.2.3. Restriksiyon Enzim Analizi

Restriksiyon enzim (RE) analizi üretici firmanın önerilerine uygun olarak kullanıldı. Reaksiyon toplam 20µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Restriksiyon enzim kesimi için Çizelge 2.2'de verilen uygun tampon (son konsantrasyonu 1X) ve 5 ünite (U) restriksiyon enzimi kullanıldı. MDM2 geninin *NlaIV* bölgesi için kullanılan enzim *NlaIV* dir. Enzim kesimi reaksiyonu 37°C'de 16 saat içinde gerçekleştirildi. Restriksiyon enzim analizi sonrasında reaksiyon ürünlerini incelemek için agaroz jel elektroforezi kullanıldı.

2.2.4. Agaroz Jel Elektrofözezi

PZR ve restriksiyon enzim analizleri sonrasında reaksiyon ürünlerini incelemek için agaroz jel elektrofözezi kullanıldı. Tüm PZR ürünleri için %2 konsantrasyonda jel (0,50 g agaroz, 25 ml 0,5X TBE) kullanılırken, restriksiyon enzimi analizinde %3 konsantrasyonda (0,75 g agaroz, 25 ml 0,5X TBE) agaroz jel kullanıldı. Jel tankı dH₂O ile temizlenip, taraklar konularak hazırlandı. Agaroz hassas tartıda ölçüldü ve uygun konsantrasyon için gereken miktarda TBE eklenerek çözüldü. Jel mikrodalga fırında eritildi ve soğuyan jele 1µg/ml Etidyum Bromür eklenerek jel tankına döküldü. PZR ya da restriksiyon enzimi ürünleri yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Her agaroz jel elektrofözünde, Φ X174/*BsuRI* (*HaeIII*) işaretleyicisi jele yüklendi. Enzim kesimi reaksiyonlarında ise işaretleyiciye ek olarak kesim reaksiyonuna uğramamış PZR ürünü jele yüklendi. Örnekler, 5V/cm oranında bir elektrik geriliminde 15–30 dakika yürütüldü. Jeldeki bantların görüntülenmesi için “UVP jel dökümantasyon sistemleri” ve “Olympos 40X” kamerası kullanıldı.

2.2.5. DNA Dizi Analizi

Çalışmamızda MDM2 geni *MboII* bölgesindeki SNP'yi belirlemek amacıyla DNA dizi analizi yöntemi kullanıldı. Uygun koşullar sağlanarak gerçekleştirilen PZR sonrası elde edilen PZR ürünü, DNA dizi analizi öncesi temizlendi. PZR ürününün temizlenmesi Nucleospin® Extract (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Almanya) kitinde belirtilen protokole uygun olarak yapılmıştır.

Elde edilen temizlenmiş PZR ürünü kalıp olarak kullanıldı ve DNA dizi analizi PZR'si yapıldı. Tek primer ve “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, ABD) kiti kullanılarak yapılan PZR içeriği Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. DNA dizi analizi PZR'si içeriği.

Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar
Zincir sonlandırma hazır reaksiyon karışımı (BigDye)	8,0 µl
Kalıp DNA (200 ng)	3–6 µl
Primer (1 pmol)	4 µl
ddH ₂ O	5–2 µl
Toplam hacim	20 µl

PZR işlemi, 0,2 ml'lik tüpler (Greiner Bioone, Avusturya) içerisinde "Perkin Elmer GeneAmp® PCR System 9700" (ABD) kullanılarak yapıldı. Reaksiyonda uygulanan sıcaklık ve süreleri sırasıyla; 98°C'de 10 sn, 50°C'de 5 sn, 60°C'de 4 dakika'dır ve bu program için döngü sayısı 30 olup en son bekleme sıcaklığı 4°C'dir.

DNA dizi analizi PZR'si sonrasında uygulanan temizleme sodyum asetat-etanol yöntemi kullanılarak yapıldı. Farklı basamaklarda uygulanan işlemler Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. DNA dizi analizi PZR'si sonrası temizleme yöntemi.

Basamak No	Uygulanan İşlem
1	3M'lık sodyum asetat (pH: 4,6) 3,0 µl, % 95'lik etanolden 62,5 µl ve 14,5 µl ddH ₂ O 1,5 ml'lik tüplere konuldu.
2	80 µl'lik sodyum asetat-etanol çözeltisine 20 µl PZR ürünü eklendi.
3	Tüplerin ağzı kapatılıp kısaca karıştırıldı.
4	Tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
5	Tüpler 14000 rpm'de Sanyo Hawk 15/05 (İngiltere)'de 15 dakika santrifüj edildi.

Çizelge 2.6. Devam DNA dizi analizi PZR'si sonrası temizleme yöntemi.

6	Süpernatant pipetle atıldı
7	Pelet üzerine 150 µl %70'lik etanol eklendi ve kısaca karıştırıldı.
8	Tüpler 14000 rpm'de Sanyo Hawk 15/05 (İngiltere) cihazında 5 dakika santrifüj edildi.
9	Süpernatant pipetle atıldı.
10	Örnekler 90°C'de 1 dakika bekletilerek kurutuldu.
11	Örneklerin üzerine 15µl "Formabit"(Perkin Elmer, Foster City, CA) eklendi ve vorteks yapıldı.
12	Örnekler 95°C'de 3 dakika bekletildi.

Temizleme sonrası elde edilen PZR ürünleri, "ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, Foster City, CA" dizi analizi cihazına yüklendi.

2.2.6. İstatistiksel Analizler

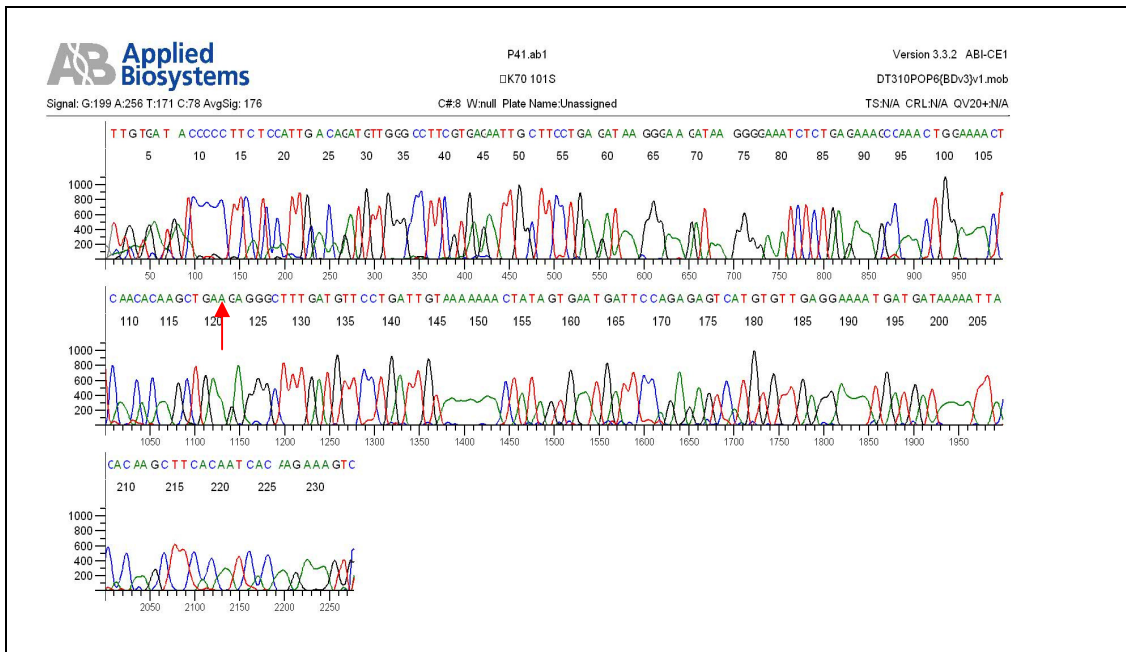
Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde "Fisher exact" veya Ki-kare testleri kullanıldı. Hastaların yaşam sürelerini belirlemek amacıyla, Kaplan-Meier sağ kalım analizi kullanıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Hastalar

Çalışmaya alınan 55 Hepatoselüler Karsinoma hastasının 10'u kadın, 45'i erkekti ve yaş ortalamaları $60.3 \pm 1,5$ idi. Çalışmada kullanılan sağlıklı kontrol grubu ise 104 kişi (41 erkek, 63 kadın) den oluşmaktaydı ve yaş ortalaması $40.5 \pm 1,4$ idi.

3.2. MDM2 Geni *MboII* Polimorfizm Bölgesi



Şekil 3.2. MDM2 geni *MboII* polimorfizm bölgesinin DNA dizi analizi ile gösterilmesi. Kırmızı ok 354. kodondaki polimorfik nükleotiti göstermektedir.

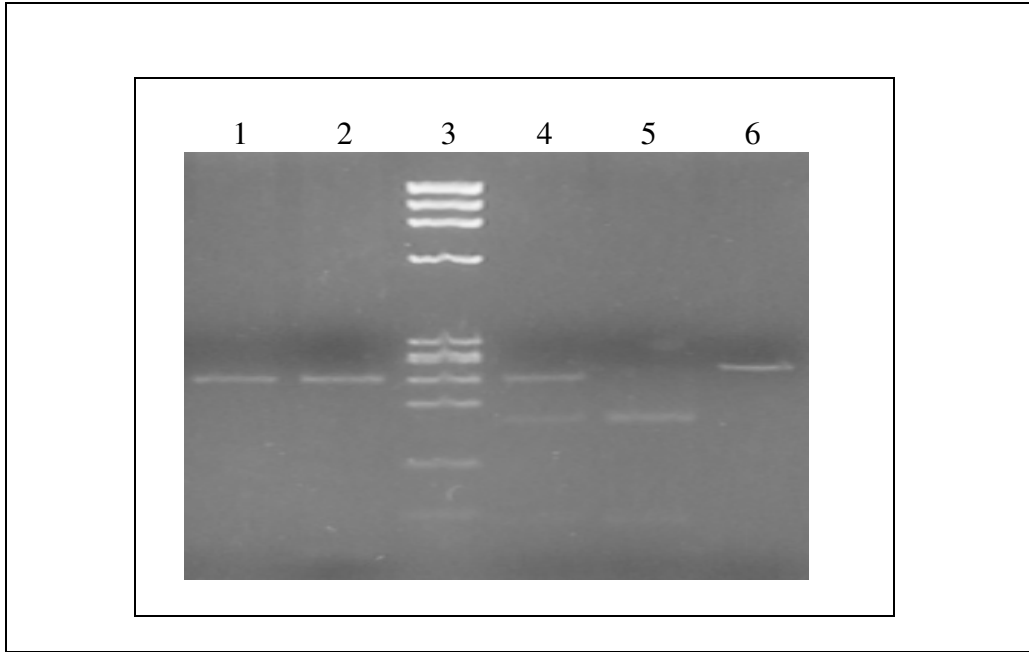
MDM2 geninin 354. kodonunda tanımlanan ve aynı zamanda *MboII* enziminin kesim bölgesi olan polimorfizmi belirlemek için her bireyin genomik DNA'sı ile PZR yapılarak 548 b.ç.'lik ürünler elde edildi. Dizi analizi yapmak üzere elde edilen PZR ürünleri sodyum-asetat yöntemi ile temizlendi ve DNA dizi analizi PZR'si yapıldı. DNA dizi analizi sonucunda 354. kodonda A → G tek nokta polimorfizmleri incelendi Genotipler dizide belirlenen polimorfik nükleotide göre adlandırıldı (A ya da G). Şekil 3.2' te DNA dizi analizi yapılmış MDM2 geni örneği gösterilmiştir. DNA dizi analizi sonucu belirlenen her bir genotipi taşıyan kişi sayısı, genotip sayısı ve hasta kontrol gruplarına göre genotip yüzdesi Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. MDM2 geni MboII bölgesi için genotip dağılımı.

MboII Polimorfizmi	Toplam Kişi Sayısı	Genotip AA		Genotip AG		Genotip GG	
		Sayısı	%	Sayısı	%	Sayısı	%
HCC	55	51	69.1	0	-	4	7.3
KONTROL	104	104	100,0	0	-	0	-

MDM2 geninin 354. kodonunda tanımlanan bu polimorfizm için hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, allelik varyantlar için istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Hasta ve kontrol grubunda AG genotipine ve kontrol grubunda GG genotipine rastlanmadı.

3.3. MDM2 Geni NlaIV Polimorfizm Bölgesi



Şekil 3.3. MDM2 geni NlaIV polimorfizm bölgesinin genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi. Genotipler: kuyu 1,2; AA, kuyu 3; moleküler ağırlık belirleyici (Hae III), kuyu 4; AG, kuyu 5; GG, kuyu 6; kesim yapılmamış PZR ürünü (%3'lik agaroz jel).

MDM2 geninin 5' translyasyona uğramayan bölgesinde tanımlanan ve aynı zamanda NlaIV enziminin kesim bölgesi olan polimorfizmi hasta ve kontrol gruplarında belirlemek

amacıyla her bir bireyin genomik DNA'sıyla yapılan PZR sonucu 260 b.ç.'lik ürün elde edildi. *NlaIV* enzimi ile yapılan kesim sonucunda 20 ve 240 b.ç.'lik bant modeli gösteren alleller A, 20, 60 ve 180 b.ç.'lik bant modeli gösteren alleller ise G olarak adlandırıldı. (Şekil 4.3.).

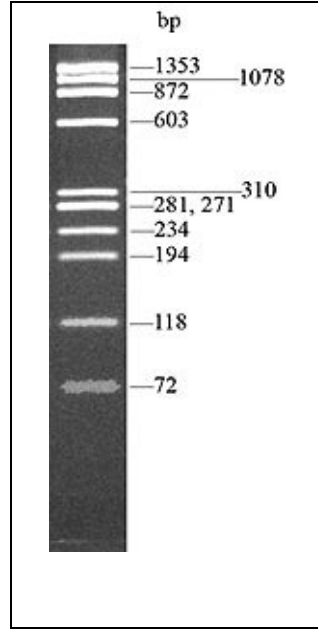
Enzim kesimleri sonucu belirlenen her bir genotipi taşıyan kişi sayısı, genotip sayısı ve hasta kontrol gruplarına göre genotip yüzdesi Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 *MDM2* geni *NlaIV* bölgesi için genotip dağılımı.

<i>NlaIV</i> Polimorfizmi	Toplam Kişi Sayısı	Genotip AA		Genotip AG		Genotip GG	
		Sayısı	%	Sayısı	%	Sayısı	%
HCC	55	38	69.1	15	27.3	2	3.6
KONTROL	104	81	77.9	23	22.1	0	-

MDM2 geninin 5' translyasyona uğramayan bölgesinde tanımlanan bu polimorfizm için yapılan karşılaştırma sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Kontrol grubunda GG genotipine rastlanmadı.

Φ X174/*BsuRI* (*HaeIII*) 1.0 moleküler ağırlık belirleyicisi referans dizisi olarak kullanılmış ve bant açılımı Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. *ΦX174/BsuRI (HaeIII)1.0* moleküler ağırlık belirleyicisinin bant açılımı.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada 55 Hepatoselüler Karsinomlu hasta ve 104 sağlıklı bireyde MDM2 geni üzerinde 2 farklı polimorfik bölge incelenmiştir.

MDM2 onkogeni tümör oluşumunda merkezi role sahip bir onkogendir. Tümör süpressör proteini p53'ü, onun transaktivasyon bölgesini maskeleyerek yolu ile ya da onun proteozomla parçalanması sağlayarak inhibe eder. P53'ün fonksiyonlarını engelleyici bir protein olarak bilinmesinin yanı sıra p53'ten bağımsız olarak da gerçekleştirdiği pek çok fonksiyonu vardır. MDM2 hücre döngüsünde ve yaşamsal faaliyetlerde bu kadar önemli bir rol oynamasına rağmen, MDM2 geni ile ilgili çok az polimorfizm ve mutasyon çalışması bulunmaktadır. 1993 yılında Heigway ve arkadaşları tarafından MDM2 ile ilgili yapılmış ilk polimorfizm çalışması olan ve MDM2 geninin translasyona uğramayan bölgesinde tanımlanan *NlaIV* polimorfizmi ve 2000 yılında Taubert ve arkadaşları tarafından MDM2 geninin 11. ekzonunda ve 354. kodonunda yer alan *MboII* polimorfizmi bu çalışmada Karaciğer Kanseri hastalarda çalışılmıştır.

Taubert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gen değişimi kontrol grubundaki bireylerin %8'inde ve Yumuşak Doku Sarkomalı hastalarının %13'ünde bulunmuştur. Fakat bu çalışmada şaşırtıcı olarak bulunantımlanan gen değişiminin iki Yumuşak Doku Sarkoma hastasının tümör dokusunda bulunması fakat normal dokularında bulunmamasıdır. Bu bulunan sonuç gen değişimlerinin aynı zamanda somatik olarak meydana gelebileceğini göstermektedir. Kaplan–Meier analizlerinde gen değişimine sahip Yumuşak doku Sarkoma hastalarında ortalama hayatta kalma süresi 38 ay iken gen değişimine sahip olmayan hastalarda ortalama hayatta kalma süresi 57 ay olarak bulunmuştur (Taubert *et.al.* 2000).

Bazı genler üzerinde polimorfik varyantların birlikte kalıtımı söz konusu olabilir. Bu şekilde bakıldığında bu hipotez için p53 geni ilginç bir örnektir. P53 polimorfizmi ile tümör oluşumunda duyarlılık olup olmadığı hala tartışmalı bir konudur. Bu konuda yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar yumurtalık kanseri, meme kanseri, kolon kanseri ve akciğer kanserinde duyarlılık artışını sağlayan özel haplotiplerin kodon 72 polimorfizminde fazla bulunmasını tanımlamışlardır (Kawajiri *et.al.* 1993; Jin *et.al.* 1995; Wang *et al.* 1999). Buna karşın bu durum servikal kanser, meme kanseri, ve

akciğer kanseri için diğer araştırmacılar tarafından bulunmamıştır (Birgander *et.al.* 1995; Weston *et al.* 1997).

Çalışmamız sonucunda, MboII polinorfizminde hasta ve kontroller arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak önemli bir fark saptanamamıştır. Yapılan Kaplan-Meier analizlerinde, polimorfizimli ve polimorfizmsiz hastalar arasında yaşam süresi bakımından önemli bir fark saptanamamıştır. Sonuçlar daha önce bu polimorfizmle ilgili yapılan çalışmayla uyumlu gözükmemektedir. Sonuçların birbiriyle tutarlı olmamasının sebebi hasta sayısının azlığından ve çalışılan popülasyonlar arası farklılıktan kaynaklanabilir. Popülasyonlarda görülen farklılıklar nedeniyle bu polimorfizmlerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmalı ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşmak için çalışmaya alınan kişi sayısı fazla olmalıdır. Genetik heterojenitenin etkisini indirgemek amacıyla daha homojen popülasyonlar tercih edilmelidir.

Heigway ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma, meme kanserinde allelik imbalansı belirlemede NlaIV polimorfizminin kullanılabileceğini göstermiştir. 53 meme kanserli bireyde allelik imbalans 25 bilgi verici vakanın 5'inde bulunmuştur (Heigway *et.al.* 1993). Fakat bizim çalışmamızda bu çalışmada bulunun sonuçları destekleyici bir sonuç elde edilmemiştir. Bu da bu polimorfizmin Hepatoselüler Karsinomlu Türk hastalarda bir allelik imbalans belirleyici olarak kullanılamayacağını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- AKRİVİADİS, E., A., LİOVET, J., M., EFREMİDİS, S., C. 1998. Hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.*, 85; 1319-1331.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J., D. (1994). Ch. 24 in *molecular biology of the cell*. Garland Publishing, INC.
- ALİSİ, A., GİAMBARTOLOMEİ, S., CUPELLİ, F. 2003. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene*, 22(179); 2573-2580.
- ALKA, S., HEMLATA, D., VAİSHALİ, C., SHAHİD, J., KUMAR, P., S. 2000. Hepatitis B virus surface (S) transactivator with DNA binding properties. *J Med Virol*, 61; 1-10.
- ANZOLA, M. 2004. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat.*, 11; 383-393.
- BANİN , S., MOYAL, L., 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281; 1674-1676.
- BAYRAKTAR, Y., BALKANCI, F., KAYHAN, B. 1996. A comparison of chemoembolization with conventional chemotherapy and symptomatic treatment in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterol.*, 43; 681-687.
- BERMAN, J., J. 1988. Cell proliferation and the aetiology of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.*, 7; 305-309.
- BLACK, A., R., AZİZKHAN-CLİFFORD, J. 1999. Regulation of E2F: A family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene*, 237; 281-302.
- BOYD, M., T., VLATKOVİC, N., HAİNES, D., S. 2000. A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2. *The J Bio Chem.*, 275(41); 31883-31890.
- BULL, P., C., THOMAS, G., R., ROMMENS, J., M., FORBES, J., R., COX, D., W. 1993. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet.*, 5; 327-337.
- BURT, A., D. 1993. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol*, 170: 105-114.
- CALVİSİ, D., F., FACTOR, V., M., LOİ, R., THORGEİRSSON, S., S. 2001. Activation of beta catenin during hepatocarcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res.*, 61; 2085-2091.
- CANMAN, C., E., LİM, D., S. 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281; 1667-1679.
- CASELMANN, W., H., RENNER, M., SCHLÜTER, V., HOFSCHEİNER, P., H., KOSBY, R., MEYER, M. 1997. The hepatitis B virus MHBst 67 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors. *J Gen Virol.*, 78; 1487-1495.

- CASELMANN, W., H., MEYER, M., KEKULE, A., S., LAUER, U., HOFSCHEIDER, P., H., KOSBY, R. 1990. A transactivator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2970-2974.
- CHELLAPPAN, S., P., HIEBERT, S., MUDRYJ, M., HOROWITZ, J., M., NEVINS, J., R. 1991. *Cell*, 65; 1053-1061.
- CHEN, C., J., YU, M., W., LIAW, Y., F. 1997. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.*, 12; 294-308.
- CHEN, J., LIN, J., LEVINE, A., J. 1995. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the MDM2 oncogene. *Mol. Med.*, 1; 142-152.
- CHEN, J., WU, X., LIN, J., LEVINE, A., J. 1996. MDM2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol.*, 16; 2445-2452.
- CHENG, W., S., GOVINDARAJAN, S., REDEKER, A., G. 1992. Hepatocellular carcinoma in a case of Wilson's disease. *Liver*, 12; 42-45.
- CHIN, L., POMERANTZ, J. 1998. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products-two pathways. *TIBS*, 23.
- CHISARI, F., V., KLOPCHIN, K., MORIYAMA, T., PASQUINELLI, C., DUNSFORD, H., A., SELL, S., PINKERT, C., A., BRINSTER, R., L., PALMITER, R., D. 1989. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell*, 59; 1145-1156.
- CLARKE, A., R., PURDIE, C., A., HARRISON, D., J., MORRIS, R., G., BIRD, C., C., HOOPER, M., L., WYLLIE, A., H. (1993). *Nature*, 362: 849-852.
- CORDON-CARDO, C., LATRES, E., DROBNJAK, M., OLIVA, M., R., POLLACK, D., WOODRUFF, J., M., MARECHAL, V., CHEN, J., BRENNAN, M., F., LEVINE, A., J. 1994. Molecular abnormalities of MDM2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res.*, 54; 794-799.
- CORVI, R., SAVELYEVA, L., BREIT, S., WENZEL, A., HANDGRETINGER, R., BARAK, J. 1995. Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene*, 10; 1081-1086.
- DI BISCEGLIE, A., M., RUSTGI, V., K., HOOFNAGLE, J., H., DUSHEIKO, G., M., LOTZE, M., T. 1988. Hepatocellular carcinoma. *Ann Intern Med.*, 108; 390-401.
- DOBBELSTEIN, M., WIENZEK, S. 1999. Inactivation of the p53 homologue p73 by the MDM2 oncoprotein. *Oncogene*, 18; 2101-2106.
- ELENBAAS, B., DOBBELSTEIN, M., ROTH, J., SHENK, T., LEVINE, A., J. 1996. The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its ring finger domain. *Mol. Med.*, 2; 439-451.
- ELZOUKI, A., N., ERIKSSON, S. 1996. Risk of hepatobiliary disease in adults with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PIZZ); is chronic viral hepatitis B or C an additional risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma? *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 8; 989-994.
- FAKHARZADEH, S., S. TRUSKO, S., P., GEORGE, D., L. 1991. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.*, 10; 1565-1569.

- FEARNHEAD, N., S., BRITTON, M., P., BODMER, W., F. 2001. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 10(7); 721-733.
- FEDER, J., N. 1996. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.*, 13; 399-408.
- FINLAY, C., A. 1993. The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol Cell Biol.*, 13; 301-306.
- FLORESE, R., H., NAGANO-FUJII, M., IWANAGA, Y., HIDAJAT, R., HOTTA, H. 2002. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res.*, 90(1-2); 119-131.
- FREEDMAN, D., A., WU, L., LEVINE, J. 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *CMLS*, 55; 96-107.
- FREEDMAN, D., A., LEVINE, A., J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell Biol.*, 18; 7288-7293.
- GANGULI, G., WASYLYK, B. 2003. P53 independent functions of MDM2. *Mol Cancer Res.*, 1; 1027-1035.
- GERIN, J., L. 1990. Experimental WHV infection of woodchucks: An animal model of hepadnavirus-induced liver cancer. *Gastroenterol Jpn.*, 25(suppl 2); 38-42.
- GRACIA, E., FISCHER, U., ELKAHLOUN, A., TRENT, J., M., MEESE, E., MELTZER, P., S. 1996. Isolation of genes amplified in human cancers by microdissection mediated cDNA capture. *Hum Mol Gen.*, 5; 595-600.
- GRAEF, E., CASSELMAN, W., H., WELLS, J., KOSHY, R. 1994. Insertional activation of mevalonate kinase by hepatitis B virus DNA in a human hepatoma cell line. *Oncogene*, 9; 81-87.
- GROSSMAN, S., R., PEREZ, M., KUNG, A., L. 1998. P300/MDM2 complexes participate in MDM2 mediated p53 degradation. *Mol. Cell*, 2; 405-415.
- HANSEN, L., J., TENNANT, B., C., SEEGER, C., GANEM, D. 1993. Differential activation of myc gene family members in hepatic carcinogenesis by closely related hepatitis B virus. *Mol Cell Biol.*, 13; 659-667.
- HAUPT, Y., MAYA, R., KAZAZ, A., OREN, M. 1997. MDM2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387; 299-303.
- HAY, T., J., MEEK, D., V. 2000. Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett.*, 478; 183-186.
- HEIGHWAY, J., MITCHELL, E., L., D., JONES, D., WHITE, G., R., M., SANTIBANEZ, M., F. 1994. A transcribed polymorphism and sub-localisation of MDM2. *Hum Genet.*, 93; 611-612.
- HIELDT, E., SAHER, G., BRUSS, V., HOFSCHEIDER, P., H. (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology*, 225; 235-239.
- HONDA, R., TANAKA, H., YASUDA, H. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.*, 420; 25-27.

- HUANG, W., S., LIAO, L., Y., WANG, C., S., CHEN, P., H. 1999. Hepatocellular carcinoma presenting with acquired porphyria: a case report and review of the literature. *Chang Keng I. Hsueh Tsa Chih.*, 22; 111-116.
- ITO, A., LAI, C., H., ZHAO, X. 2001. P300/CBP mediated p53 acetylation is commonly induced by p53 activating agents and inhibited by MDM2. *The EMBO J*, 20(6); 1331-1340.
- JONES, N., S., ANSARI-LARI, M., A. 1996. Genomic organization of the mouse double minute 2 gene. *Gene*, 175; 209-213.
- JUVEN-GERSHON, T., SHIFMAN, O. 1998. The MDM2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb. *Mol Cell Biol.*, 18; 3974-3982.
- KEKULE, A., S., LAUER, U., MEYER, M., CASELMANN, W., H. HOFSCHEIDER, P., H., KOSBY, R. 1990. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature*, 343; 457-461.
- KOIKE, K., MORIYA, K., KIMURA, S. 2002. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterology and Hepatology*, 17; 394-400.
- KUBBUHAT, M., H., G., JONES, S., N., VOUSDEN, K., H. 1997. Regulation of p53 stability by MDM2. *Nature*, 387; 299-303.
- KWUN, H., J., JANG, K., L. 2003. Dual effects of hepatitis C virus core protein on the transcription of cyclin dependent kinase inhibitor p21 gene. *J Viral Hepat.*, 10(4); 249-255.
- KWUN, H., J., JUNG, E., Y., AHN, J., Y., LEE, M., N., JUNG, K., L. 2001. P53 dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol.*, 82; 2235-2241.
- LAN, K., H., SHEU, M., L., HWANG, S., J. 2002. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53 mediated apoptosis. *Oncogene*, 21(31); 4801-4811.
- LANDERS, J., E., HAÏNES, D., S., STRAUSS, J., F., GEORGE, D., L. 1994. Enhanced translation: A novel mechanism of mdm-2 oncogene overexpression identified in human tumour cells. *Oncogene*, 9; 2745-2750.
- LEE, M., N., JUNG, E., Y., KWUN, H., J. 2002. Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway. *J Gen Virol.*, 83; 2145-2151.
- LEVEILLARD, T., WASYLYK, B. 1997. The MDM2 C terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter. *The J Bio Chem.*, 272(49); 30651-30661.
- LIN, J., CHEN, J., ELENBAAS, B., LEVINE, A., J. 1994. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to MDM2 and the adenovirus 5 E1B 55kD protein. *Genes Dev.*, 8; 1235-1246.
- LOUGHRAN, O., THANGUE, N., B. 2000. Apoptotic and growth promoting activity of E2F modulated by MDM2. *Mol Cell Biol.*, 20(6); 2186-2197.
- LOWE, S., W., JACKS, T., HOUSMAN, D., E., RULEY, H., E. 1994. Abrogation of oncogene associated apoptosis allows transformation of p53 deficient cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 91; 2026-2030.
- LOWE, S., W., SCHMITT, E., M., OSBORNE, B., A., JACKS, T. (1993). *Nature*, 362; 847-852.

- LU, H., LEVINE, A., J. 1995. Human TAFII 31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad. Sci., USA* 92; 5154-5158.
- LUNDGREN, K., MONTES DE OCA LUNA, R., MCNEIL, Y., B., EMERICK, E., P., SPENCER, B., BARFIELD, C., R. 1997. Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev.*, 11; 714-725.
- LUNDGREN, K., MONTES DE OCA LUNA, R., MCNEILL, Y., B., EMERICK, E., P., SPENCER, B., BARFIELD, C., R. 1997. Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev.*, 11; 714-725.
- MAJUMDER, M., GHOSH, A., K., STEELE, R., RAY, R., RAY, R., B. 2001. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53 dependent manner. *J Virol.*, 75(3); 1401-1407.
- MARECHAL, V., ELENBAS, B., PIETTE, J., NICOLAS, J., C., LEVINE, A., J. 1994. The ribosomal L5 protein is associated with MDM2 and MDM2 p53 complexes. *Mol Cell Biol.*, 14; 7414-7420.
- MARTIN, K., TROUCHE, D. 1995. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature*, 375; 691-694.
- MATSUBARA, K., TOKINO, T. 1990. Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol Biol. Med.*, 7; 243-260.
- MATSUMURA, T., YOSHIHAMA, Y., KIMURA, T., SHINTANI, S., ALCALDE, R., E. 1996. P53 and MDM2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncology*, 53: 308-312.
- MAYO, L., D., TURCHI, J., J., BERBERICH, S., J. 1997. MDM2 phosphorylation by DNA dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Can Res.*, 57; 5013-5016.
- MEDDEB, M., VALENT, A., DANGLLOT, G., NGUYEN, V., C., DUVERGER, A., FOUQUET, F. 1996. MDM2 amplification in a primary alveolar rhabdomyosarcoma displaying a t(2;13)(q35;q14). *Cytogenet Cell Genet.*, 73; 325-330.
- MEYER, M., CASELMANN, W., H., SCHLÜTER, V., SCHRECK, R., HOFSCHEIDER, P., H., BAEUERLE, P., A. 1992. Hepatitis B virus transactivator MHBst: Activation of NF kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *EMBO J.*, 11; 2991-3001.
- MOMAND, J., WU, H., H., DASGUBTA, G. 2000. MDM2 master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *British J Cancer*, 85(12); 1813-1823.
- MONTES DE OCA LUNA, R., TABOR, A., D., EBERSPAECHER, H., HULBOY, D., L., WORTH, L., L., COLMAN, M., S. 1996. The organization and expression of the MDM2 gene. *Genomics*, 39; 352-357.
- NIEDERAU, C., FISCHER, R., SONNENBERG, A., STREMMEL, W., TRAMPISCH, H., J., STROHMEYER, G. 1985. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med.*, 313; 1256-1262.
- OLINER, J., D., KINZLER, K., W., MELTZER, P., S., GEORGE, D., L., VOGELSTEIN, B. 1992. Amplification of a gene encoding a p53 associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358; 80-83.
- OZTÜRK, M., ATALAY-CETIN, R. 2003. Biology of hepatocellular carcinoma *Gastrointestinal cancers*, 575-591.

- PARKIN, D., M., PISANI, P., FERLAY, J. 1999. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 49(2); 33-64.
- PICKSLEY, S., M., SPICER, J., F., BARNES, D., M., LANE, D., P. 1996. The p53-MDM2 interaction in a cancer prone family and the identification of a novel therapeutic target. *Acta Onc.*, 35; 429-434.
- PIETTE, J., NEEL, H., MARECHAL, V. 1997. Mdm2: Keeping p53 under control. *Oncogene*, 15; 1001-1010.
- PINEAU, P., MARCHIO, A., TERRIS, B., MATTEI, M., G., TU, Z., X., TIOLLAIS, P., DEJEAN, A. 1996. A t (3;8) chromosomal translocation associated with hepatitis B virus integration involves the carboxypeptidase N locus. *J Virol.*, 70; 7280-7284.
- PISANI, P., PARKIN, D., M., BRAY, F., FERLAY, J. 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83; 18-29.
- POMERANTZ, J., SCHREIBER-AGUS, N. 1998. The INK4a tumor suppressor gene product, P19ARF, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92; 713-723.
- POREMBIA, C., YANDELL, D., W., METZE, D., KAMANABROU, D., BOCKER, W., DOCKHORN-DWORNICZAK, B. 1995. Immunohistochemical detection of p53 in melanomas with rare p53 gene mutations is associated with mdm-2 overexpression. *Oncol Res.*, 7; 331-339.
- POWELL, L., W., BURT, M., J., HALLIDAY, J., W. JAZWINSKA, E., C. 1996. *Liver Dis.*, 16; 55-63.
- QADRI, I., IWAHASHI, M., SIMON, F. 2002. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochem Biophys Acta.*, 1592(2); 193-204.
- RABE, C., PILZ, T., KLOSTERMANN, C., BERNA, M., SCHILD, H., H., SAUERBRUCH, T., CASSELMAN, W., H. 2001. Clinical characteristics and outcome of cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, 7; 208-215.
- REIFENBERGER, G., LIU, L., ICHIMURA, K., SCHMIDT, E., E., COLLINS, V., P. 1993. Amplification and overexpression of the mdm2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.*, 53; 2736-2739.
- REINKE, V., LOZANO, G. 1997. The p53 targets MDM2 and FAS are not required as mediated of apoptosis in vivo. *Oncogene*, 15; 1527-1534.
- ROTH, J., DOBBELSTEIN, M., FREEDMAN, D., A., SHENK, T., LEVINE, A., J. 1998. Nucleocytoplasmic shuttling of the HMD2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.*, 17; 554-564.
- ROTH, J., DOBBELSTEIN, M., FREEDMAN, D., A., SHENK, T., LEVINE, A., J. 1998. Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.*, 17; 554-564.
- SAKAGUCHI, S., SAITO, S. 2000. Damage mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1 like kinase effect on MDM2 binding. *The J Bio Chem.*, 275(13); 9278-9283.
- SCHLOTT, T., REIMER, S., JAHNS, A., OHLENBUSCH, A., RUSCHENBURG, I., NAGEL, H., DROESE, M. 1997. Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumors. *J Pathol.*, 182; 54-61.

- SCHLÜTER, V., MEYER, M., HOFSCHEIDER, P., H., KOSBY, R., CASELMANN, W., H. 1994. Integrated hepatitis B virus X and 3' truncated preS/S sequences derived from human hepatomas encode functionally active transactivators. *Oncogene*, 9; 3335-3344.
- SHEIKH, M., S., SHAO, Z., M., HUSSAIN, A., FONTANA, J., A. 1993. The p53 binding protein MDM2 gene is differentially expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res.*, 53; 3226-3228.
- SHIEH, S., Y., IKEDA, M. 1997. DNA damage induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91; 325-334.
- STAGLE, B., L., ZHOU, Y., Z., BUTEL, J., S. 1991. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly deleted in virus positive hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.*, 51; 49-54.
- SU, L., K., ABDALLA, E., K., LAW, C., H., KOHLMANN, W., RASHID, A., VAUTHEY, J., N. 2001. Biallelic inactivation of the APC gene is associated with hepatocellular carcinoma in familial adenomatous polyposis coli. *Cancer*, 92; 332-339.
- SU, Q., SCHRÖDER, C., H., HOFMANN, W. 1998. Expression of hepatitis B virus protein in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 27; 1109-1120.
- SU, Q., SCHRÖDER, C., H., HOFMANN, W., J., OTTO, G., PICHLMAYR, R., BANNASCH, P. 1998. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 27; 1109-1120.
- TAKADA, S., KANENIWA, N., TSUCHIDA, N. 1997. Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene transfected cells. *Oncogene*, 15; 1895-1901.
- TAKANO, S., YOKOSUKO, O., IMAZEKI, F. 1995. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: A prospective study of 251 patients. *Hepatology*, 21; 650.
- TANNAPFEL, A., WITTEKIND, C. 2002. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchow Arch.*, 440; 345-352.
- TAUBERT, H., KAPPLER, M., MEYE, A., BARTEL, F., SCHLOTT, T., LAUTENSCHLAGER, C., BACHE, M., SCHMIDT, H., WÜRL, P. 2002. A MBOII polymorphism in exon 11 of the human MDM2 gene occurring in normal blood donors and soft tissue sarcoma patients: an indication for an increased cancer susceptibility? *Mutat Res.*, 456; 39-44.
- THORGEIRSSON, S., S., GRISHAM, J., W. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.*, 31; 339-346.
- THUT, C., J., GOODRICH, J., A., TIJAN, R. 1997. Repression of p53 mediated transcription by MDM2: A dual mechanism. *Genes Dev.*, 11; 1974-1986.
- TOKINO, T., MATSUBARA, K. 1991. Chromosomal sites for hepatitis B virus integration in human hepatocellular carcinoma. *J Virol.*, 65; 6761-6764.
- WANG, W., LONDON, T., FEITELSON, M., A. 1991. Hepatitis B X antigen in hepatitis virus carrier patients with liver cancer. *Cancer Res.*, 51; 4971-4977.

WANG, X., W., HUSSAIN, S., P., HUO, T., WU, C., FORGUEZ, M., HOFSETH, L., J., BRECHOT, C., HARRIS, C., C. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 181-182; 43-47.

WATANABE, T., HOTTA, T., ICHIKAWA, A., KINOSHITA, T., NAGAI, H., UCHIDA, T. 1994. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B cell origin. *Blood*, 84; 3158-3165.

XIAO, Z., X., CHEN, J. 1995. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*, 375; 694-697.

YAMAMOTO, T., KAJINO, K., KUDO, M. 1999. Determination of the clonal origin of multiple human hepatocellular carcinomas by clonin and polymerase chain reaction of the integrated hepatitis B virus DNA. *Hepatology*, 29; 1446-1452.

YAMANAKA, T., UCHIDA, M., DOI, T. 2002. Innate form of HCV core protein plays an important role in the localization and the function of HCV core protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 294(3); 521-527.

ZENG, X., CHEN, L. 1999. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol.*, 19; 3257-3266.

ZHANG, X., K., EGAN, J., O., HUANG, D., SUN, Z., L., CHIEN, V., K., CHIU, J., F. 1992. Hepatitis B virus DNA integration and expression of an erb B-like gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.*, 188; 344-351.

ZHANG, Y., XIONG, Y., YARBROUGH, W., G. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92; 725-734.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Efsun EREN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 17.09.1979

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : 1993-1997, İzmit Süper Lisesi

Lisans : 1998-2002, Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: 2003-2006, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü