

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS KANSERİNDE DNA HASAR VE
ONARIMININ İNCELENMESİ**

Feriha Özkaya

**Moleküler Tıp AD.
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2014

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970129

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS KANSERİNDE DNA HASAR VE
ONARIMININ İNCELENMESİ**

**Moleküler Tıp AD.
DOKTORA TEZİ**

Feriha Özkaya

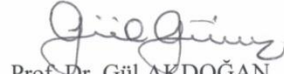
Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Zeynep Sercan

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 99.3456.23 sayı
ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970129


Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Tıp** Anabilim Dalı,
Moleküler Tıp Doktora programı öğrencisi **Feriha ÖZKAYA**, '**Pankreas Kanserinde DNA
Hasar ve Onarımının İncelenmesi**' konulu Doktora tezini 29.12.2014 tarihinde başarılı
olarak tamamlamıştır.



Doç. Dr. Zeynep SERCAN
BAŞKAN

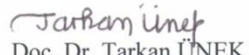

Prof. Dr. Gül AKDOĞAN
ÜYE

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
ÜYE

(Katılmadı)


Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR
ÜYE


Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM
ÜYE


Doç. Dr. Tarkan ÜNEK
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Giray BOZKAYA
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	2
TABLOLAR DİZİNİ.....	6
KISALTMALAR.....	12
TEŞEKKÜR.....	14
ABSTRACT	16
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2. GENEL BİLGİLER	18
2.1 Pankreas Kanseri.....	18
2.1.1 Pankreas Kanserinde Tanı, Evrelendirme ve Tedavi	19
2.1.2 Pankreas Kanserinin Patofizyolojisi.....	22
2.2 DNA Hasarı.....	25
2.2.1 DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları.....	28
2.2.1.1 DNA hasarının doğrudan uzaklaştırılması	29
2.2.1.2 Baz çıkarım tamir (BÇT) mekanizması	30
2.2.1.3 Nukleotid Çıkarım (Excision) Tamir Mekanizması.....	31
2.2.1.4 Hatalı Eşleşme (Mismatch Repair) Tamir Mekanizması	32
2.2.1.5 Tek ve Çift İplik Kırıklarının Tamiri.....	33
2.2.2 8-Oxo-guanin DNA Glikozilaz 1 (OGG1).....	35
2.2.3 Endonükleaz VIII-benzeri 1 (NEIL1).....	36
2.2.4 DNA Hasarı ve Kanser	36
2.3 Doku Transglutaminaz (TG2)	39
2.3.1 Kanserde TG2	41
2.4 NFκB ve Pankreas Kanserindeki Önemi.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	44
3.1 Araştırmanın Tipi.....	44

3.2	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	44
3.3	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	44
3.4	Çalışma Materyali	45
3.5	Araştırmanın Değişkenleri.....	45
3.6	Araştırma Planı ve Takvimi	46
3.7	Verilerin Değerlendirilmesi	46
3.8	Araştırmanın Sınırlılıkları.....	46
3.9	Veri Toplama Araçları.....	47
3.9.1	Demografik veri toplama	47
3.9.2	Örneklerin toplanması ve saklanması	48
3.9.3	Kullanılan Cihazlar	50
3.9.4	DNA Hasar Çalışmaları	51
3.9.4.1	Pankreas Normal ve Tümör Dokularından DNA İzolasyonu	51
3.9.4.2	GC-MS/MS ile DNA Baz Hasarı Ölçümü ³⁶	52
3.9.4.3	LC-MS/MS ile DNA Nükleozid Hasarı Ölçümü	53
3.9.5	mRNA Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları	53
3.9.5.1	Pankreas Normal ve Tümör Dokularından Manuel Fenol Kloroform Yöntemi ile RNA İzolasyonu ⁸⁷	53
3.9.5.2	İzole Edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi ⁸⁸	54
3.9.5.3	cDNA Sentezi	56
3.9.5.4	Gerçek Zamanlı PCR.....	57
3.9.5.5	OGG1 Promotor Bölgesi Klonlanması ⁸⁷	60
3.9.5.6	Dual Luciferaz Reporter Assay.....	71
3.9.6	Biyolojik Verilerin Klinik Evre ile Korelatif Çalışmaları	71
3.9.7	Protein Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları	71
3.9.7.1	Pankreas Normal ve Tümör Dokularından Western Blot	72

3.9.8	Hücre Kültürü Çalışmaları	75
3.9.8.1	Pankreas Hücre Hattında (MiaPaca-2) TG2 siRNA Transfeksiyonu ..	75
3.9.8.1.1	1.Optimizasyon	76
3.9.8.1.1.1	Hücre Ekimi	76
3.9.8.1.1.2	Transfeksiyon	77
3.9.8.1.2	2.Optimizasyon	77
3.9.8.1.2.1	Hücre ekimi	77
3.9.8.1.2.2	Transfeksiyon	77
3.9.8.1.2.3	Gerçek Zamanlı PCR	78
3.9.7.1.3.	Optimizasyon	79
3.9.8.2	Western Blot	79
3.10	Etik Kurul Onayı.....	82
4.	BULGULAR	83
4.1	DNA Hasar Çalışmaları Bulguları.....	83
4.1.1	Pankreas Tümör ve Normal Dokularından DNA İzolasyon Bulguları	83
4.1.2	DNA Hasar Ölçüm Bulguları	84
4.2	mRNA düzeyinde Ekspresyon Çalışma Bulguları.....	89
4.2.1	Pankreas Tümör ve Normal Dokularından RNA İzolasyon Bulguları	89
4.2.2	Gerçek Zamanlı PCR Çalışması Bulguları	91
4.3	DNA Hasarı -Ekspresyon Çalışmaları-Evreler Arasındaki İlişkinin Bulguları 105	
4.4	Protein Düzeyinde Ekspresyon Çalışma Bulguları	109
4.4.1	Pankreas Normal ve Tümör Dokularından Western Blot.....	109
4.5	Hücre Kültürü Çalışma Bulguları	110
4.5.1	Pankreas Hücre Hattında (MiaPaca-2) TG2 siRNA Transfeksiyon Bulguları.....	110
4.5.2	Western Blot Bulguları	114
4.5.2.1	Protein Tayini	114

4.5.2.2	MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanmasının Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.....	115
4.5.2.3	MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanmasının DNA onarım enzimi ile ilişkisinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi	115
4.5.3	OGG1 Bildirici Vektör Deney Bulguları.....	117
5.	TARTIŞMA.....	123
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	128
7.	KAYNAKLAR.....	130

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Pankreas Kanseri Bulguları ve Görülme Sıklığı	20
Tablo 2. Pankreas Kanserinde TNM Evreleme Sistemi (T: Tümör, N:Lenf nodu, M:Metastaz) ²⁰	20
Tablo 3. Pankreas Kanserinde Evrelendirme ve TNM ve Operabilite (Rezektabilite) ²¹	21
Tablo 4. İnvaziv Pankreas Duktal Adenokarsinomdaki Moleküler Değişiklikler ³²	23
Tablo 5. Hastaların Demografik Verileri.....	47
Tablo 6. Kullanılan Cihazlar	50
Tablo 7. % 1,2 Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler.....	55
Tablo 8. OGG1, TG2 ve NEIL1 Primer Dizileri ve PCR Ürün Büyüklüğü	58
Tablo 9. OGG1/TG2 Gerçek Zamanlı PCR Profili.....	58
Tablo 10. NEIL1 Gerçek Zamanlı PCR Profili	59
Tablo 11. OGG1 Geni Promotör Bölgesi Klonlama Primer Dizileri	60
Tablo 12. OGG1 Geni Promotor Bölgesinin Pgl4.12 Vektörüne Klonlama Amacı İle Yapılan PCR İçeriği.....	63
Tablo 13. OGG1 Geni Promotor Bölgesinin Pgl4.12 Vektörüne Klonlama Amacı İle Yapılan PCR Isı Profili.....	63
Tablo 14. KpnI-HindIII Restriksiyon Enzim Kesimi İçin Reaksiyon Karışımın İçeriği	65
Tablo 15. KpnI-HindIII Restriksiyon Enzim Kesimi İçin Isı Profili.....	65
Tablo 16. Pgl4.12 Lineerize Vektörden Fosfat Gruplarının Uzaklaştırılması İçin Kurulan Reaksiyon Profili	65
Tablo 17. pGL4.12 lineerize vektörden fosfat gruplarının uzaklaştırılması için reaksiyon ısı profili	66
Tablo 18. OGG1 PCR Ürününün Pgl4.12vektörüne Ligasyonu İçin Karışım İçeriği	67
Tablo 19. Gerçek Zamanlı PCR Profili.....	78
Tablo 20. DNA Örneklerinin Miktar ve Saflığı	83
Tablo 21. Pankreas Tümör ve Normal Dokularında GC-MS/MS İle Ölçülen Baz Hasarı Değerleri.....	85
Tablo 22. Pankreas Tümör ve Normal Dokularında LC-MS/MS İle Ölçülen Nükleozid Hasarı Değerleri.....	86
Tablo 23. DNA Baz Hasarı Sonuçları İçin Wilcoxon İşaretli Sıralar Testine Göre p Değerleri	87

Tablo 24. DNA Nükleozid Hasar Sonuçları İçin Wilcoxon İşaretili Sıralar Testine Göre p Değerleri.....	88
Tablo 25. RNA Örneklerinin Miktar Ve Saflığı.....	90
Tablo 26. Tümör Dokularında OGG1 Ekspresyon Kat Değişim Değerleri.....	102
Tablo 27. Tümör Dokularında NEIL1 Ekspresyon Kat Değişim Değerleri.....	103
Tablo 28. Tümör Dokularında TG2 Ekspresyon Kat Değişim Değerleri	104
Tablo 29. TG2 Düzeyi ve DNA Hasar İlişkisinin İstatistiksel Analizi	106
Tablo 30. Evrelere Göre DNA Hasar Düzeylerinin İstatistiksel Analizi	107
Tablo 31. Gerçek zamanlı 24, 48, 72 saat 100 nM siRNA kat değişim değerleri	113
Tablo 32. Örneklerdeki Protein Konsantrasyonu ve Yükleme Miktarları.....	114
Tablo 33. OGG1 Promotör Bölgesi İçin Primerlerin Dizileri ve Klonlama İçin Kullanılacak Restriksiyon Enzimleri.....	118
Tablo 34. TG2 OGG1 İlişkisinin Belirlenmesi İçin Kurgulanan Deney Planı (OGG1= OGG1/Pgl4.12 Bildirici Vektörü, Neg=Negatif).....	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pankreasın Hücresel Bileşenleri ¹⁹	19
Şekil 2. Pankreatik Kanser Gelişim Modeli ³¹	23
Şekil 3. Reaktif Oksijen Türleri İle Etkileşim Sonucu Oluşan DNA Bazları ²	27
Şekil 4. DNA Hasar Etmeninin Doğrudan Uzaklaştırılması.....	29
Şekil 5. Baz Çıkarım Mekanizması ⁵²	31
Şekil 6. Nukleotid Çıkarım Tamir Mekanizması ⁵³	32
Şekil 7. Hatalı Eşleşme Tamir Mekanizması.....	33
Şekil 8. DNA Çift İplik Kırıklarının Tamiri ⁵⁴	34
Şekil 9. DNA Hasarı Etmenleri ve Hasara Hücrenin Verdiği Tepkiler ¹	37
Şekil 10. DNA tamirinin hücrenin normal fonksiyonlarını korumadaki etkisi ⁵⁸	38
Şekil 11. TG2 Proteininin Yapısal ve Fonksiyonel Domainleri ⁶¹	39
Şekil 12. TG2 ekspresyonu ve hücre ölümü arasındaki ilişki ⁶¹	40
Şekil 13. Pankreas Tümör ve Normal Dokularındaki Hasar Düzey Grafikleri. A. 8-OHGua Düzeyleri B.FapyGua Düzeyleri C. FapyAde Düzeyleri D. 5-OH-5-MeHyd Düzeyleri E.ThyGly Düzeyleri F. 5-OHCyt Düzeyleri.....	87
Şekil 14. Pankreas Tümör ve Normal Dokularında Nukleozid Hasar Düzey Grafikleri. A. R-cdA Düzeyleri B. S-cdA Düzeyleri C. 8-OH-dG Düzeyleri	88
Şekil 15. Pankreas Tümör ve Normal Dokularındaki Toplam Hasar Düzeyleri	89
Şekil 16. N1, T1,,,, N6, T6 Örneklerinin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 ve β -Aktin Eğrileri	91
Şekil 17. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N4, T4, N6, T6 Örneklerinin OGG1 Ürününün (207 bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü	92
Şekil 18. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N4, T4, N6, T6 Örneklerinin TG2 Ürününün (211 bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü	92
Şekil 19. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N4, T4, N6, T6 Örneklerinin β -Aktin Ürününün (99 Bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü	92
Şekil 20. N1, T1,,,, N11, T11 Örneklerinin Gerçek Zamanlı PCR'da NEIL1ve β -Aktin Eğrileri	93
Şekil 21. N1, T1, N2, T2, N6, T6 Örneklerinin NEIL1 Ürününün (213 bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.....	93

Şekil 22. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N6, T6, N8, T8 Örneklerinin β -Aktin Ürününün (99 Bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü	93
Şekil 23. 26, 28, 29, 30, 31 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 Ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri	94
Şekil 24. 26, 30, 32, 33, 34 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri	95
Şekil 25. 35, 36, 37, 40, 41 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri.....	95
Şekil 26. 31, 35, 36 ve 37 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.....	96
Şekil 27. 40 ve 41 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü	96
Şekil 28. 28, 29, 31, 32 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neill Ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri	97
Şekil 29. 26, 30, 33, 34 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neill ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri	97
Şekil 30. 36, 37, 40, 42 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neill ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri	98
Şekil 31. 26, 28, 29, 31 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü. 98	
Şekil 32. 26, 30, 32, 33 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207 bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.....	98
Şekil 33. 26, 31, 34 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207 Bp), 34 No'lu Örneğin NEILL Ürününün (213bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.....	99
Şekil 34. 26, 29, 31, 32 No'lu Örneklerin Neill Ürününün (213bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.....	99
Şekil 35. 26, 30, 31, 33 No'lu Örneklerin Neill Ürününün (213bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.....	99
Şekil 36. 26, 28, 29, 30 No'lu Örneklerin TG2 Ürününün (211 Bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü.....	99
Şekil 37. 42, 43, 44 ve 45 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri.....	100
Şekil 38. 42, 43, 44 ve 45 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neill ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri.....	101

Şekil 39. 35, 36, 37, 40, 41 ve 42 Örneklerin NEIL1 ve β -Aktin Ürününün (213bp ve 99bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü	101
Şekil 40. Tümör Dokularında Ekspresyon Değişimi (Kat Değişim) Grafiği	105
Şekil 41. TG2 Düzeyinin DNA Hasarı Üzerine Etkisi.....	106
Şekil 42. TG2 Düzeyinin FapyAde ve ThyGly Hasarı Üzerine Etkisi.....	106
Şekil 43. Evrelere Göre DNA Hasar Düzeyleri	108
Şekil 44. Evrelere Göre Toplam Hasar Düzeyi.....	109
Şekil 45. 30 No'lu Dokudaki TG2 (80kDa) ve OGG1(37kDa) Düzeyi.....	109
Şekil 46. 21 No'lu Dokudaki OGG1 (37kDa) Düzeyi.....	110
Şekil 47. Hücrelerin Işık Mikroskobu Görüntüsü	110
Şekil 48. Siglored İle Transfekte Olmuş Hücrelerin Görüntüsü	110
Şekil 49. Farklı Konsantrasyonlarda siRNA Uygulaması Cp Değerleri	111
Şekil 50. Farklı Konsantrasyonlarda siRNA Uygulaması Kat Değişim Değerleri.....	111
Şekil 51. 100nM Konsantrasyonunda siRNA Uygulaması Cp Değerleri.....	112
Şekil 52. 100nM Konsantrasyonunda siRNA Uygulaması Kat Değişim Değerleri	112
Şekil 53. BSA Standart Grafiği	114
Şekil 54. MiaPaCa-2 Hücrelerinde 100 nM TG2 siRNA Baskılanması	115
Şekil 55. MiaPaCa-2 Hücrelerinde 100 nM TG2 siRNA Baskılanmasında NF κ B (P105 ve P50)	116
Şekil 56. MiaPaCa-2 Hücrelerinde 100 nM TG2 SiRNA Baskılanmasında OGG1 (47kDa)	116
Şekil 57. Pgl4.12[Luc2cp](Reporter Vektör).....	117
Şekil 58. Pgl4.74[Hrluc/Tk] (İnternal Kontrol Vektör)	117
Şekil 59. OGG1 Promotor Bölge Pcr Ürünü Agaroz Jel Görüntüleri[%1'lik Agaroz Jel. Marker 1kb Generuler (Fermentas #Sm0311)].....	118
Şekil 60. OGG1 Reporter Vektör Restriksiyon Enzim Analizinin Agaroz Jel Elektroforezi [%0,8'lik Agaroz Jel. Marker 1kb Generuler (Fermentas #Sm0311)]	119
Şekil 61. Pgl4.12/OGG1 Reporter Vektör Haritası	119
Şekil 62. OGG1 İkili Lusiferaz Deneyi.....	121
Şekil 63. NF κ B Aktivatörü Olarak Kullanılan PMA'in Fosfo P65 (cell signalling #3033) Artışına zaman bağımlı etkisinin Gösterilmesi. 1-0 saat, 2-4	121
Şekil 64. Bildirici Vektör Deneyinde, TG2 Baskılama Uygulaması. Numaralandırmaların açıklaması aşağıda verilmiştir. Jel yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır (TG2	

siRNA-100nM, negatif siRNA 100nM, PMA- 50ng/ml konsantrasyonda kullanılmıştır, TG2 antikor #ab2386).122

KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklaması
PDAC	Pankreas duktal adenokarsinom
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif Oksijen türleri
NCI	National Cancer Institute
PanINs	Pankreatik intraepitelyal neoplaziler
TNM	Tümör lenf nodu metastaz
8-oxo-G	8-oxo-guanin
TG2	Doku Transglutaminaz
Endonükleaz III	Nth
Endonükleaz VIII	Nei
Fpg	Formamidopirimidin glikozilaz
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
GC-MS/MS	Gaz Kromatografisi Kütle- kütle spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi Kütle-kütle spektrometresi
.O ₂ -	Süperoksit radikali
.OH	Hidroksil radikali
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
8-OH-Gua	8-hidroksiguanin
FapyAde	4,6-diamino-5-formamidopirimidin
FapyGua	2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
5-OH-Cyt	5-hidroksi-sitozin
5-OH-5-MeHyd	5-hidroksi-5-metilhidantoin
ThyGly	Timin-Glikol
8-OH-dG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
R-cdA	R-siklodeoksiadenozin
S-cdA	S-siklodeoksiadenozin
BER	Baz kesme-çıkarma onarımı
OGG1	8-hidroksiguanin-DNA glikozilaz
NEIL1	Endonükleaz VIII benzeri protein1
NTH1	Endonükleaz III benzeri protein 1
APE1	Apürinik endonükleaz 1

XRCC1	X-ray cross complementing enzyme
EDTA	Etilendiamin tetra asetikasit
PBS	İzotonik fosfat tamponu
NaCl	Sodyum klorür
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Sybr Green I	N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine
CDNA	Komplementer DNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MRNA	Haberci ribonükleik asit
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid
IS	Internal Standard
bp/bç	Base pair/baz çifti
NFκB	Nukleer Faktör kappaB

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince gerek bilimsel, gerekse manevi olarak beni daima destekleyen tez danışmanım Doç. Dr. Zeynep Sercan'a,

Eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan, manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Güldal Kırkalı'ya,

Tez gelişimine bilimsel katkılarından dolayı doktora tez izleme komitesi üyeleri hocalarım Prof. Dr. Gülgün Oktay, Yrd. Doç. Dr. Zahide Çavdar ve Doç. Dr. Tarkan Ünek'e,

Tezime destek olan değerli Cerrah hocalarımız Prof. Dr. İbrahim Astarıcıoğlu, Prof. Dr. Sedat Karademir ve Prof. Dr. Ahmet Çoker'e,

Doktora eğitimim sırasında bana her türlü desteği sağlayan D.E.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gül Akdoğan'a, değerli öğretim üyelerine ve çalışanlarına,

Laboratuvarının tüm olanaklarını paylaşan ve tezime bilimsel katkıda bulunan Prof. Dr. Ogün Sercan'a,

Tezimde DNA hasarı çalışmalarına destek olan Prof. Dr. Miral Dizdaroğlu'na,

Doktora tezim süresince her zaman yanımda olan eşim Ali Burak Özkaya ve dostlarım Ilgın Öztürk, Ela Haddur, Didem Keleş olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Bana gösterdikleri sevgi, anlayış ve her türlü destekleri için aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

PANKREAS KANSERİNDE DNA HASAR VE ONARIMININ İNCELENMESİ
Feriha Özkaya, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 35340,
İnciraltı, İzmir

ÖZET

Amaç: Pankreas adenokarsinomları tüm kanserler içerisinde en ölümcül ve agresif olanlardan biridir. Etkin tedavilerin geliştirilebilmesi için hastalığın temel biyoloji ve patogenezinin ortaya çıkarılması çok önemlidir. Doku Transglutaminaz (TG2) pankreas kanserinde yüksek düzeyde eksprese olan, ilaç direnci, metastaz ve düşük sağkalımıyla ilişkilendirilmiş bir proteindir. Amacımız, pankreas kanserinin oluşum ve gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündüğümüz DNA hasarı onarım enzimlerinin ekspresyonlarını incelemek, DNA hasarı ve TG2 düzeyleri arasındaki olası ilişkiyi araştırmaktır.

Yöntem: Pankreas kanserli hasta tümör ve normal dokularında baz ve nükleozid hasar sırasıyla GC-MS/MS ve LC-MS/MS ile ölçülmüştür. DNA onarım enzimlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmiştir. MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanması siRNA tekniğiyle yapılmıştır. OGG1-NFκB-TG2 arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik çalışmalar kapsamında OGG1 promotörünün bildirici vektöre klonlanarak transfeksiyon sonrası promotör aktivitesinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Protein düzeyindeki ekspresyon değişiklikleri western blotla gösterilmiştir.

Bulgular: DNA hasar sonuçlarına göre tümör dokularında 8-OH-Gua baz hasarı eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Benzer şekilde tümör dokularında 8-OH-dG hasarı da eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksektir ($p<0,05$). Tümörde, normal dokulara göre OGG1 ve NEIL1 ekspresyonu azalırken, TG2 ekspresyonunu artmaktadır. siRNA ile TG2 ekspresyonunun baskılandığı MiaPaCa-2 hücrelerinde NFκB proteininin aktif formunda da azalma izlenmektedir. Buna ek olarak OGG1 promotör aktivasyonunda da azalma gözlenmektedir.

Sonuç: OGG1 ve NEIL1 ekspresyonları ile TG2 ekspresyonu arasında ters yönde bir ilişki olduğu belirlenmiştir. TG2 baskılanması gerçekleştirilen MiaPaCa-2 hücrelerinde NFκB proteininin aktif formunun da baskılandığı, böylece TG2 ile NFκB arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. TG2 baskılanmasıyla, NFκB aktivasyonu baskılanmakta ve dolaylı yoldan OGG1 promotör aktivasyonu azalmaktadır. NFκB uyarılığında, NFκB daha aktif forma geçerek, TG2'nin baskılanmasının olumsuzluğunu kompanse edebilir olmaktadır. Bu nedenle de OGG1 promotör aktivasyonu artmaktadır. Hastalarda TG2 ekspresyon yüksekliğine rağmen OGG1 ve NEIL1 ekspresyonlarındaki düşüklük, epigenetik sessizleşmeyi düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas adenokarsinom, DNA hasarı, DNA onarımı, OGG1, NEIL1, TG2, NFκB, PMA

INVESTIGATION OF DNA DAMAGE AND REPAIR IN PANCREATIC CANCER

Feriha Özkaya, Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Molecular Medicine, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Pancreatic adenocarcinoma is one of the deadliest and most aggressive human cancers. A better understanding of pathogenesis and biology of the disease is required to develop efficient treatments. Tissue transglutaminase (TG2) is a protein overexpressed in pancreas cancer and associated with drug resistance, metastasis and low survival. In this project we aimed to investigate DNA base damage, TG2 and DNA repair enzymes expression levels and the possible link between them, and also to be able to illuminate certain points regarding to the development and treatment of the disease.

In normal and tumor tissues of patients, DNA base damage was measured by GC-MS/MS and LC-MS/MS. Expressions of DNA repair genes were determined by real time PCR. TG2 silencing studies were carried out in MiaPaCa-2 cells by siRNA method. The relationship between OGG1-NFκB -TG2 was demonstrated by reporter vector method. The differences in TG2 expression levels was demonstrated with western blot studies.

8-OH-Gua base damage was found to be significantly higher in tumor tissues when compared to their normal counterparts ($p > 0.05$). Similarly 8-OH-dG damage was also found to be significantly higher in tumor tissues when compared to their normal counterparts ($p > 0.05$). Among DNA repair genes, OGG1 expressions are decreased. On the other hand TG2 expression is increased in tumor tissues when compared to normal counterparts. A negative association between DNA damage and repair gene (OGG1 and NEIL1) expression was determined. Active phosphorylated form of NFκB was found to be inhibited in TG2-knockdown MiaPaCa-2 cells, showing a relationship between TG2 and NFκB. Active NFκB form is inhibited in TG2 knockdown cells and this correlates with decrease in OGG1 promotor activation. When NFκB is activated, the negative effect of TG2-knockdown is compensated and OGG1 promotor activation is shown to increase by reporter assays. Conflicting results between in-vitro assays and patient expression analyses may be due to the selective advantage of epigenetic silencing of DNA repair genes

Keywords: Pancreas adenocarcinoma, DNA damage, DNA repair, OGG1, NEIL1, TG2, NFκB, PMA

1. GİRİŞ VE AMAC

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), histolojik olarak duktal hücrelerden köken alan ve en yaygın olarak izlenen pankreatik neoplazidir. Pankreatik tümör vakalarının %85'den fazlasını oluşturur; bu nedenle de sıklıkla pankreas kanseriyle eşanlamlı olarak kullanılır. Pankreatik duktal adenokarsinomlar tüm kanserler içerisinde en agresif kabul edilenler arasındadır³. Dünyada her yıl 44,000 üzerinde kişiye pankreas kanseri tanısı konulmakta ve kanser ölümleri içerisinde dördüncü sırada yer almaktadır⁴. Pankreas kanserli hastaların prognozu son derecede kötüdür. Pankreas kanser hücrelerinin standard kemoterapötikler ve radyasyon tedavisine karşı direnç göstermesi nedeniyle beş yıllık yaşam süresi %6' civarındadır⁵. Hastalığın agresifliği ve mortalitenin bu kadar yüksek oluşu yeni tedavi stratejilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yeni tedavi stratejileri ise ancak pankreas kanseri oluşum ve gelişim temel biyolojisinin aydınlatılmasıyla oluşturulabilir.

Birçok çevresel ve içsel kaynaklı mutasyonun yanında hücrel metabolizmanın ürünü olan serbest radikaller DNA'da oksidatif hasara neden olur. Kanser oluşumunun primer nedenlerinden biri de DNA'da hasarının oluşup tamir edilememesidir. DNA hasarının, kanser oluşumunun tüm evrelerinde rol oynayabileceği savunulmakta ve bazı kanserlerde oksidatif DNA hasarı düzeyinde artış belirtilmektedir⁶. Bu bilgiler ışığında tez çalışmamızda, literatürde detaylı çalışmaların yer almadığı pankreas kanserinde DNA hasarının etkisi, bu hasarın onarımında rol alan enzimlerin ifade düzey değişimleri, yine bu proteinlerin pankreas kanserinde aşırı ifade edilen doku transglutaminaz gibi proteinler ile etkileşimlerini ortaya koyabilmek istedik.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda pankreas kanserinde yüksek düzeyde ifade edilen TG2 enzimi dikkat çekmektedir. Pankreas kanseri dahil çoğu kanserde TG2 yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Pankreas kanserinde, TG2'nin yüksek düzeyde olması ilaç direnci, metastaz ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. Hastalığın kötü prognozu ile paralellik gösterdiği bilinmektedir.

Tez çalışmamızın amacı, pankreas kanserinin oluşum ve gelişiminde önemli rol oynayabileceğini düşündüğümüz DNA hasarı ve onarım enzimlerinin ekspresyonlarını incelemek, bunun yanı sıra DNA hasarı ve TG2 düzeyleri arasındaki olası ilişkiyi araştırmaktır. Bu amaç çerçevesinde araştırmamızın hipotezini "Pankreas kanserinde TG2 ifade düzeyi ile DNA hasarı arasında doğru orantılı bir ilişki vardır" şeklinde formüle ettik.

2. GENEL BİLGİLER

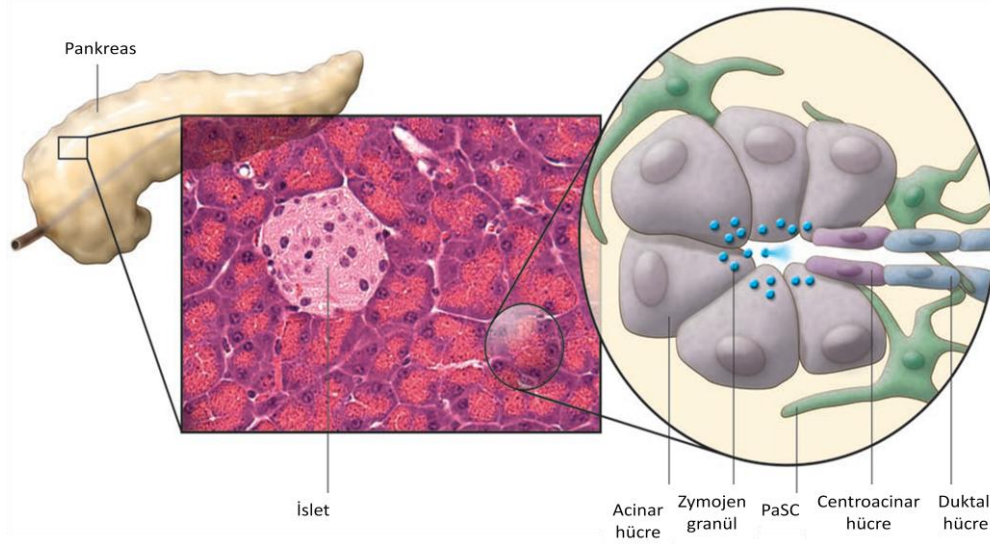
2.1 Pankreas Kanseri

Kanser genetik, immünolojik ve biyokimyasal temelleri olan, çok yönlü ve kompleks bir hastalıktır. Dünya genelinde tüm ölümlerin %13'ünden, gelişmiş ülkelerde ise %25'inden sorumlu olan kanser, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisidir⁷. Normal hücrenin kanser hücresine dönüşüm süreci, neoplastik transformasyon, hücreye proliferatif avantaj sağlayan “sürücü” mutasyonların birikmesi aracılığıyla gerçekleşen bir süreçtir. Bu klonal evolüsyon sürecinde başta DNA tamir mekanizmaları, hücre yaşam döngüsünün kontrol mekanizmaları, hücre ölüm ve sağ kalım sinyali ile ilgili mekanizmalar olmak üzere pek çok hücreyel sinyal etkilidir^{8,9}. Kanser gelişiminde gerçekleşen sayısız nokta mutasyonu, translokasyon, amplifikasyon ve delesyon, bu sinyalleri kontrol eden genleri değiştirmekte ve proteinlerin işlevini etkilemektedir^{10,11}. Kanser hücrelerinin mutasyon profilleri o kadar çeşitli ve farklıdır ki, histolojik olarak birbirinden ayıramayacak kadar benzer kanser dokularında çarpıcı genotipik ve fenotipik farklılıklar gözlenmektedir¹².

Pankreas kanseri görülme sıklığı tüm kanserlerin içerisinde %2.2'lik bir orana sahipken, kanserle ilgili ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır¹³. Globocan 2012 istatistik verilerine göre her yıl dünyada 337.872 yeni pankreas kanseri olgusu görülürken, pankreas kanseri ile ilişkili 330.372 ölüm meydana gelmektedir. Türkiye'de ise yıllık 3174 yeni olgu, 3064 ölüm bildirilmiştir. Pankreas kanseri hem dünyada hem de Türkiye'de mortalite insidans oranı en yüksek kanser tipidir¹⁴. Bu veri var olan tedavi stratejilerinin yeterince etkili olmadığını göstermektedir. Pankreas kanserindeki yüksek mortalitenin temel sebebi kötü prognozudur. Hastalarda beş yıllık sağ kalım %6 civarındadır¹⁵. Bu malign hastalığın temel risk faktörleri sigara kullanmak ve ailesel hastalık öyküsüne sahip olmaktır. Diğer risk faktörleri ise ileri yaş, cinsiyet (erkek), diyabet, obezite, mesleki maruziyet (örn. nikel veya klorlu hidrakerbon solvent), yüksek yağlı diyet, fazla et tüketimi ve az sebze-folat alımıdır¹⁶⁻¹⁸.

Pankreas yaklaşık 15 cm uzunluğunda, vücut orta hattında yer alan bir organımızdır. Mide, ince bağırsak ve karaciğer ile komşudur. En geniş kısmı baş kısmıdır ve kuyruk kısma doğru inceler. Pankreas işlevsel olarak ikiye ayrılabilir. İlki, gastrointestinal sistem sindirim enzimlerini üreten ekzokrin bileşeni, ikincisi karbohidrat metabolizmasını düzenleyen hormonları salgılayan langerhans islet hücrelerinden oluşan endokrin bileşenidir. Ekzokrin

bileşeni başlıca asini diye bilinen asinar hücre kümelerinden oluşur. Bu hücreler asini lümeninde sindirim enzimlerini duodenum vasıtasıyla pankreatik kanallara salgılar (Şekil 1) 19.



Şekil 1. Pankreasın Hücresel Bileşenleri¹⁹.

Pankreas kanseri pankreasın hem ekzokrin hem de endokrin hücrelerinden köken alan farklı kanser tiplerini içerir. Pankreas kanserlerinin %90'ını ekzokrin hücrelerden kaynaklanan pankreas duktal adenokarsinom oluşturur ve bu nedenle sıklıkla pankreas kanseriyle eşanlamlı olarak kullanılır. Pankreas kanserinin cerrahi tedavisi, “Whipple” ameliyatıdır. Bu ameliyat metastazı olmayan az sayıda hastaya uygulanabilmektedir. Pankreas kanseri tedavi protokollerinde, özellikle ameliyat edilemeyen hastalarda ve ameliyat sonrası koruma tedavisi için kemoterapi ve radyoterapi de tercih edilmektedir. Her ikisinin sağ kalım açısından etkinliği düşük olması nedeniyle bu hastalık için yeni terapi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.1 Pankreas Kanseri Tanı, Evrelendirme ve Tedavi

Pankreas kanseri erken evrelerinde genellikle hiçbir belirti göstermediğinden, erken tanı koymak oldukça zordur. Bunun sebepleri arasında pankreas kanserinin belirtilerinin diğer birçok hastalığın belirtileri ile benzerlik göstermesi ve pankreasın yeri sayılabilir. Pankreas mide, ince bağırsak, karaciğer, safra kesesi, dalak, safra kanalı gibi organların arkasında boşlukta bulunmaktadır. Bu bölgede küçük tümörler diğer organlara bası yapmadığından

hastalık hemen bulgu vermemektedir. Hastalığa ait bulgular ortaya çıktığında çoğunlukla hastalık ileri bir evrededir ve pankreas çevresindeki dokulara yayılmıştır. Bulgular, tümörün yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak değişir. Pankreas kanserinde en yaygın görülen bulgular ve görülme sıklıkları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Pankreas Kanseri Bulguları ve Görülme Sıklığı

Bulgular	Görülme Sıklığı
İştahsızlık	(%64)
Nedeni açıklanamayan kilo kaybı	(%66-84)
Üst karında hissedilen ve bazen sırta vurabilen ağrı	(%78-82)
Sırt ağrısı	(%48)
Bulantı ve kilo kaybı	(%50-86)
Erken doyma	(%62)
Sarılık (Tümörün safra yollarını tıkaması sonucunda ortaya çıkar, göz aklarında sararma, idrarda koyulaşma ve dışkı renginde açılma olur)	(%56-80)
Diabet (Şeker hastalığı)	(%97)
Uyku bozukluğu	(%54)

Amerika Kanser Komitesi, pankreas kanserini evrelendirilmesi için TNM sınıflandırmasının kullanılmasını önermektedir²⁰. Evreleme sistemi tablo 2 ve 3'de verilmiştir.

Tablo 2. Pankreas Kanserinde TNM Evreleme Sistemi (T: Tümör, N:Lenf nodu, M:Metastaz)²⁰.

T0	Gösterilebilen bir tümör yok
Tis	Karsinom <i>in situ</i>
T1	Tümör 2 cm den küçük ve pankreasa sınırlı
T2	Tümör ≥ 2 cm ve pankreasa sınırlı
T3	Tümör pankreas dışına çıkarak pankreas çevresindeki yağlı dokuya, ana safra kanalına ve onikiparmak barsağına ulaşmış
T4	Tümör pankreas çevresindeki mide, dalak, kalın barsak ve büyük damarlar gibi komşu organlara yayılım göstermiş
N0	Lokal lenf bezi tutulumu yok
N1	Lokal lenf bezi tutulumu
M0	Uzak organ metastazı yok
M1	Uzak organ metastazı var

Tablo 3. Pankreas Kanserinde Evrelendirme ve TNM ve Operabilite (Rezektabilite)²¹

Evre	TNM	Operabilite
0	TisN0M0	Pankreas sınırlı, rezektabl
1A	T1N0M0	Pankreas sınırlı, rezektabl
1B	T2N0M0	Pankreas sınırlı, rezektabl
2A	T3N0M0	Lokal invaziv, rezektabl
2B	T1, T2 veya T3, N1M0	Lokal invaziv, rezektabl
3	T4, N0 veya N1, M0	Lokal ilerlemiş, anrezektabl
4	T1, T2, T3 veya T4, N0 veya N1,M1	Uzak metastaz

Görüntüleme testleri kullanılarak pankreas kanserinin evresini tespit etmek oldukça zor olduğundan, cerrahi müdahale öncesi tümörün tamamen alınıp alınamayacağı konusunda iyi düşünüp karar verilmesi gerekmektedir. Pankreasa sınırlı (T1, T2, T3) evrelerinde olan ekzokrin pankreas kanserleri cerrahlar tarafından pankreas dışına fazla ilerlememiş ve ameliyat edilebilir düzeyde olarak değerlendirilmektedir.

Evre 0: Yayılma yoktur. Pankreas kanseri sadece tek katman hücrelerle sınırlıdır. Pankreas kanseri, ne görüntüleme testlerinde ne de çıplak gözle görülebilir.

Evre 1: Bölgesel büyüme gösterir. Pankreas kanseri, pankreasla sınırlı ancak, tümör 2 (evre 1A) veya 2 cm'den fazla (evre 1B) büyür.

Evre 2: Bölgesel yayılma gösterir. Lenf nodu metastazı görülmez (evre 2A) ya da görülür (evre 2B).

Evre 3: Daha geniş yayılma gösterir. Tümör, yakınındaki ana damarlara veya sinirlere yayılır ancak uzak metastaz göstermez.

Evre 4: Bu evrede karaciğer, mide gibi organlara uzak metastaz görülür²².

Ameliyatın aslında tek tedavi opsiyonu olması nedeniyle pankreas kanseri tedavisinde hastalığın prognozu için en önemli kriter, tümörün çıkartılmasının mümkün olup olmadığıdır. Ameliyat yapılabilmesi için uzak metastaz olmamalıdır. Uzak metastaz yok ise tümörün lokalizasyona ve yayılımına bağlı olarak operasyon yapılabilir. Operasyon uygulanamıyor ise radyasyon ya da kemoterapi opsiyonları tercih edilir. Sonuç olarak pankreas kanserinin

tedavisi hastalığın evresine bağlıdır²³. Yalnızca lokalize olan kanserler ameliyata uygun olarak düşünülmeyle beraber, tanıda vakaların sadece %20'si lokalize kanser tanısı alır²⁴. Pankreas kanserinde tümörü rezektabl olarak değerlendirmek zordur, çoğu zaman diğer yaşamsal organlarda hasar oluşturmadan tümörün başarılı bir şekilde çıkarılamayacağı ameliyat sırasında ortaya çıkar²⁵. Whipple operasyonu pankreas başı kanserleri için en yaygın küratif olabilen cerrahi tedavidir. Bu prosedür pankreas başı, duodenumla birlikte (pankreatoduodenektomi) ve safra yollarının bu bölgeye yakın bölümlerinin komple alınması ile gerçekleştirilmektedir. Majör bir operasyon olması nedeniyle, hastalar ameliyat sonrası hayatta kalabilecek durumda olmaları ve kanserin lokalize (metastaz görülmediği durumlarda) olması durumunda uygulanır. Bu nedenlerle az sayıda vakada yapılabilmektedir. Öte yandan pankreasın kuyruk bölümünde görülen kanserler distal pankreatektomi olarak bilinen genelde splenektomiye (dalağın çıkarılması) de içeren prosedür kullanılarak rezekte edilir.

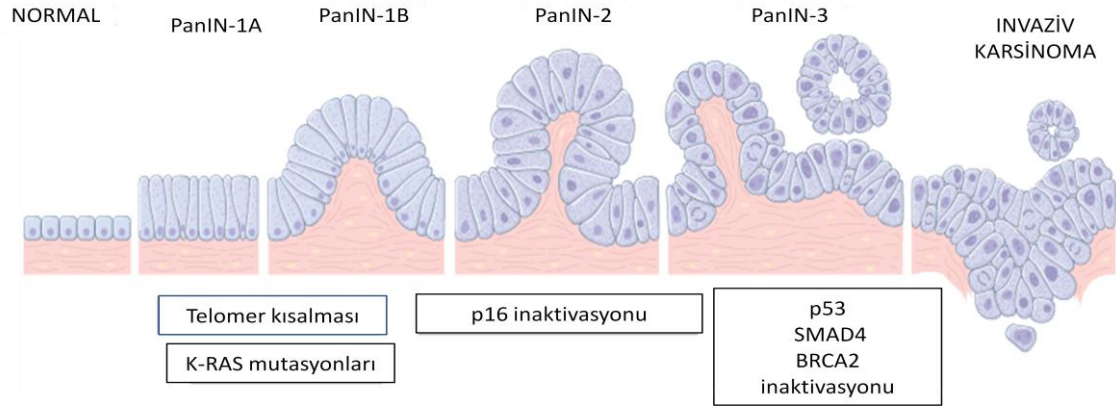
Ameliyat sonrası hastanın durumu uygun ise gemsitabin ya da 5-Fluorourasil adjuvan kemoterapi tercih edilir²⁶. Kemoterapinin yanısıra radyoterapi de hastalığın gidişatı için yararlı olabilmektedir. Radyoterapi, özellikle tümörün yerleşimi ve büyüklüğü cerrahiye zorlaştırıyor ise veya cerrahi uygulanamayan durumlarda cerrahinin yerine tek başına veya kemoterapi ile kombine kullanılmaktadır²⁷.

2.1.2 Pankreas Kanserinin Patofizyolojisi

Pankreas kanseri pankreasın hem ekzokrin hem de endokrin hücrelerinden köken alan farklı malignansileri kapsar. NCI'nin (National Cancer Institute) verilerine göre tüm pankreas kanserlerinin %90'ını duktal (kanal) epitel hücrelerinden köken alan pankreas duktal adenokarsinomlar oluşturur. Bunun dışında pankreas kanserinin asinar hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, kistadenokarsinom (seröz ve müsinoz), dev hücreli karsinom, kistik müsinoz neoplazi ya da intraduktal papiller müsinoz neoplazi ile ilişkili invaziv adenokarsinom, duktal endokrin veya asinar-endokrin karışık-tipte, müsinoz karsinom, pankreatoblastom, papiller-kistik neoplazi (Frantz tumor) ve papiller müsinoz karsinom gibi farklı tipleri vardır (NCI).

Pankreas duktal adenokarsinomların karsinogenezinde, pankreatik intraepitelyal neoplaziler (PanINs) olarak da adlandırılan neoplastik non-invasiv lezyonlardan, invaziv karsinomaya geçiş görülmektedir (Şekil 2)²⁸. Bu lezyonlarda neoplastik transformasyona özgü çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelmesine karşın henüz invaziv özelliğe sahip olmadıklarından duktal adenokarsinom evresi olarak değerlendirilmezler. Pankreatik

intraepitelyal neoplazilerin erken evrelerinde (PanIN-1A, 1B), telomer kısalması ve onkogen K-RAS'da mutasyonlar izlenir.. Ara evrede (PanIN-2) p16 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu ve geç evrede (PanIN-3) ise p53, SMAD4 (DPC4) ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu görülür (Şekil 2)^{21,29,30}. Klonal seçilim ile kazanılmış tüm bu özellikler invaziv duktal adenokarsinoma dönüşümün temelini oluşturmaktadır.



Şekil 2. Pankreatik Kanser Gelişim Modeli³¹.

Pankreas duktal adenokarsinom karsinogenezinde hem intraepitelyal neoplazi hem de invaziv karsinom süreçlerinde meydana gelen moleküler değişiklikler Tablo 4'de özetlenmiştir²⁸.

Tablo 4. İnvaziv Pankreas Duktal Adenokarsinomdaki Moleküler Değişiklikler³².

Gen (Kromozomal Bölge)	Genetik değişikliğe uğrayan tümör yüzdesi
K-Ras (12p)	> %90
P16 (CDKN2A (9p))	> %95
p53 (17p)	%50-70
SMAD4 (18q)	%55
AKT2 (19q)	% 10-20
MYB (6q)	% 10
AIB1 (20q)	% 10
BRCA2 (13q)	% 7-10
LKB1/STK11 (19p)	< %5
MKK4 (17p)	< %5
TGFβ-R1 (9q) veya TGFβ-R2 (3p)	< %5
RB1 (13q)	< %5

Rastgele olmayan (nonrandom) çoklu genetik değişikliklerin zaman içerisinde birikimi, pankreas kanserinin en önemli belirteçlerindedir. Gen kopya sayısı kromozomal değişiklikler, mikrosatellit instabilitesi, epigenetik sessizleşme, gen içi nokta mutasyonlar ve aşırı gen ifadeleri pankreas kanserinde gözlenen genetik anomalilerdir. Bu genetik değişikliklerden kısaca bahsedecek olursak:

Kromozomal değişimler: Primer pankreatik kanserde 9p,17p 18q, 3p, 8p ve 6q kromozomal kayıpları en sık rastlanan anomalilerdir. Bu bölgelerin bazıları bilinen tümör baskılayıcı genleri barındırmaktadır; 9p21'de CDKN2A/p16/MTS1, 17p13'de p53 ve 18q'da MADH4/SMAD4/DPC4. Ayrıca yine pankreatik kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, sırasıyla AKT2, KRAS2, MDM2, ERBB2 ve AIB1 onkogenlerini sırasıyla barındıran 19q, 12p, 12q, 17q ve 20q bölgelerinde çoğalmış DNA bölgeleri FISH (floresan in situ hibridizasyon) yöntemi ile saptanmıştır.

Mikrosatellit kararsızlıklar: Opere edilen vakaların yaklaşık %5'in de gözlenen ve pankreatik adenokarsinomun bir alt tipi olan medüller karsinomada, sıklıkla bozulmuş DNA yanlış eşleşme tamir mekanizması (mismatch repair) bozuklukları gözlenmektedir. Bozulmuş bu tamir mekanizması, mikrosatellit kararsızlığın artmasına neden olmaktadır. Pankreasın birçok duktal adenokarsinomundan farklı olarak, mikrosatellit kararsızlık gösteren tümörler, daha az sayıda heterozigosite kaybı (LOH) ve aneuploidi göstermektedirler. Ayrıca daha az sayıda p53 ve KRAS mutasyonu göstermektedirler. Histolojik olarak medüller kanserler daha az diferansiyedirler. Bu tümörler genel duktal adenokarsinoma göre daha iyi bir prognoz sergilerler.

Epigenetik sessizleşme: Pankreas kanserinde epigenetik olarak sessizleştiği bildirilen genler, ppENK, RARB, CDKN2A/p16, CACNA1G, TIMP53, CDH1, THBBS1 ve hMLH1'dir. Yaklaşık olarak pankreas kanserlerinin %60'ında birçok genin epigenetik olarak sessizleştiği bildirilmiştir.

Spesifik gen değişimleri ve mutasyonlar: Karsinogenezde rol alan genler sınıflandırıldığında bunlar, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve genomun korunması yönünde fonksiyon gösteren genler olarak gruplandırılabilir. Pankreas kanserinde mutasyona uğrayan genler ve bunların görülme yüzdeleri Tablo 4'de verilmiştir.

Özetle, pankreas duktal adenokarsinomu, pankreatik duktal epitelden pre-malign bir lezyon olarak başlayıp basamak basamak değişerek tamamıyla invazif ve agresif bir karakter kazanır. Pankreas kanseri çevresel faktörler ile de ilişkilendirilmiş ve sigara içimin yaklaşık 2 kata kadar kanser riskini artırdığı bildirilmiştir. Ailesel pankreas kanseri yaklaşık vakaların %10'udur. Bu vakalarda BRCA2 ve PALB2 genlerini de içeren birtakım genlerin germline mutasyonları ile ilişkilidir. Pankreas kanseri için spesifik bir başlangıç genetik lezyon varsa bile henüz tanımlanmamıştır. Ancak hücre invazyonu ve adezyonu, apoptoz ve DNA hasar kontrolü ile ilişkili olarak sınıflandırılmış sinyal yolları ile ilgili genetik değişimler, pankreas kanseri oluşumunda önemli olduğu literatürde yer almaktadır³³. Mikroarray tabanlı yapılan bir çalışmada pankreas kanserinde özellikle DNA tamiri ile genlerin ifadelerinde önemli bir artış olduğu bildirilmiştir³⁴. Bu artış oluşan DNA hasarına karşı hücrel bir tepki olarak değerlendirilebilir.

2.2 DNA Hasarı

DNA her yaşayan hücrenin genetik bilgisini barındırdığı için, bütünlüğünü ve doğruluğunu korumak yaşam için şarttır. Bununla beraber DNA inert bir molekül değildir ve kimyasal yapısı nedeniyle çevresel faktörlerden etkilenme eğilimindedir. DNA statik bir molekül olmadığından diğer molekül grupları ve proteinler ile ilişki halindedir. DNA'nın bu özelliği, onu hasara açık hale getirmektedir. Hasar oluşumunun ardından hücre DNA tamir mekanizmaları ile molekül onarım sürecine sokulur. Ancak hasarın düzeltilmemesi durumunda değişiklikler kalıcı hale gelir, mutasyon oluşur ve olası bir hastalık tetiklenebilir. Bilinen en iyi DNA hasarı/ hastalık ilişkisi örneği deri kanseridir. Güneş ışınlarının yoğun UV radyasyon etkisi ve deri kanser ilişkisi bilinmektedir. Çevresel etkiler ile ortaya çıkan DNA hasarlarına ek olarak, hücre bölünmesi temel basamağı DNA replikasyonu da DNA'da hata oluşumunun nedenlerinden birisidir. DNA hasar oluşumunun nedenleri aşağıda gösterildiği biçimde sınıflandırılabilir;

İçsel (Endojen) kaynaklı mutasyon etmenleri:

- DNA replikasyon hataları
- DNA bazlarının tautamerik form özelliklerinden kaynaklanan mutasyonlar
- Serbest radikallerinin neden olduğu mutasyonlar

Çevresel kaynaklı mutasyon etmenleri:

- Kimyasallar (DNA baz analogları vb.)
- Fiziksel (UV, iyonize radyasyon vb.)
- Biyolojik (viruslar).

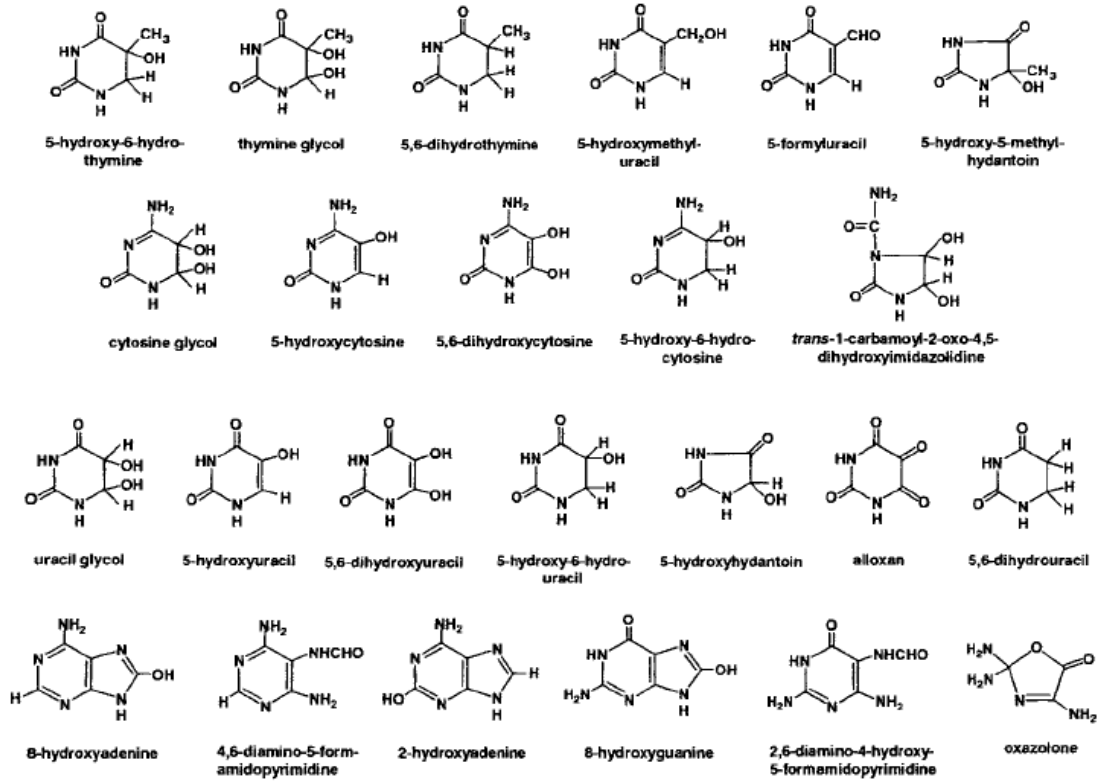
Hüresel metabolizmanın ürünü olan serbest radikaller DNA'da oksidatif hasarın başlıca nedenleridir. Aerobik organizmalarda oksidatif DNA hasarı oksijen kullanımının doğal sonucu olarak ortaya çıkan reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulmaktadır. Reaktif oksijen türlerine en yüksek reaktiviteye sahip hidroksil radikali (.OH) başta olmak üzere, superoksid radikali (O_2^-) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) örnek verilebilir. Reaktif oksijen türleri karbohidrat, protein ve lipid gibi biyomoleküllerin yanı sıra hücre genetik materyali olan DNA'yı da kimyasal olarak oksidatif hasara uğratmaktadır⁶. Yüksek reaktiviteye sahip olduğu bilinen hidroksil radikali (.OH) başta olmak üzere oksijenden türev alan serbest radikaller, DNA'nın bileşenleri ile reaksiyona girerek DNA'nın yapısını bozarlar³⁵. DNA'nın bu tipteki hasarı 'oksidatif DNA hasarı' olarak adlandırılmaktadır³⁶. Başta hidroksil radikali (.OH) olmak üzere oksijenden köken alan bu serbest radikaller DNA ve nükleoprotein üzerinde geniş çaplı modifikasyonlara yol açarlar. Bu değişiklikler modifiye bazlar, okside şekerler, tek veya çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanmaları ve abazik bölgeler şeklinde kendini gösterir. Hücrede oluşan bu hasarları onarabilecek çeşitli tamir mekanizmaları bulunmakla birlikte radikal düzeyinin artışı ve bu enzimlerin kapasitelerinin aşılması DNA hasarını kaçınılmaz hale getirmektedir.

DNA hasarını oluşturan etmenlerin başında hücrenin kendi metabolizmasının ürünleri gelmektedir. Bunların en başında serbest oksijen türleri (ROT) gelmektedir. Hücrede en fazla serbest oksijen radikali, mitokondride gerçekleşen elektron transport zinciri reaksiyonlarında ortaya çıkmaktadır. Oksijen molekülü (O_2) eşlenmemiş elektrona sahiptir. Elektronun ortaklanmadığı veya yörüngesinde tek başına olduğu kimyasal türler (atom, molekül veya iyon) vardır. Bu reaktif özellik taşıyan kimyasal türler radikal veya serbest radikaller olarak adlandırılır³⁷. Moleküler oksijen de bu nedenle reaktif oksijen türleri oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksid ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikali ($\bullet OH$)'dir. ROT'leri intraselüler sinyal molekülleri olarak fonksiyon gösterir³⁸ ve reaktivitelerine göre lipid, protein ve DNA gibi makromolekülleri modifiye ederler. Serbest radikaller ve bunlara karşı vücudun en önemli savunma sistemi olan antioksidanlar arasındaki

dengelessizlik sonucu oluşan bu protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA oksidasyonlarının tümü metabolizmada oksidatif stres olarak adlandırılır.

Oksidatif DNA hasarı hücrenel metabolizmanın kaçınılmaz bir sonucudur. Elektron transport zinciri reaksiyonlarında, elektronların oksijene kaçakları sonucunda süperoksid formlar ortaya çıkar. Bazı enzim aktiviteleri de speroksidleri oluşturur. ROT'lar aynı zamanda iyonize/ultraviyole radyasyon sonucunda da oluşabilirler. Benzer Şekilde redoks döngüsüne giren ekzojen kaynaklı kimyasalların da speroksidleri oluşturma potansiyelleri vardır. Oluşum nedenlerinden bağımsız olarak ROT'leri DNA gibi hücrenel biyomoleküller ile ilişkiye girebilir ve yapılarında deėiŐikliklere neden olabilir.

Reaktif oksijen türlerinin yüksek reaktivitedeki hidroksil radikalleri DNA ile etkileŐir.



Şekil 3. Reaktif Oksijen Türleri İle Etkileşim Sonucu Oluşan DNA Bazları².

DNA bazlarına ikili bağlar ekleyebilir veya timin bazının metil grubundan H atomunu ayırarak baz yapısını bozabilir. Reaktif oksijen türleri ile etkileşim sonucunda 20'den fazla DNA baz formu oluşabilir (Şekil 3). Bunlardan en yaygın görülen 8-oxo guanine (8-OGua)'dir.

DNA guanin bazının reaktif oksijen türleri ile girdiği reaksiyon sonrasında 8-oxo-guanin (8-OGua) ya da tautomerik formu 8-hidroksiguaninin(8-OHGua) oluşturması ve 8-OGua'nın adenin ya da timin ile hatalı eşleşme potansiyeli nedeniyle çok çalışılmış bir konudur. Hatalı eşleşme sonucunda GC→AT, GC→TA ve GC→CG formları oluşabilmektedir. Bu mutasyonlar DNA'nın replikasyonunun ardından kalıcı hale gelebilmekte ve ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir. 8-OGua, normal hücrel metabolik aktivitelerin yanı sıra değişik tipteki radyasyonlar ve kimyasalların etkileri ile de oluşabilir. ROT'leri guanine doğrudan saldırır. Çeşitli ROT'leri arasında hidroksil (•OH) radikalleri en reaktif olanıdır. Enzimatik olan veya olmayan reaksiyon sonucunda açığa çıkabilir ve hemen hemen bütün biyomoleküller ile reaksiyona girerek, DNA iplik kırıklarına, DNA-protein çapraz bağlanmalarına, baz eşleşme mutasyonlarına, DNA baz oksidasyonlarına, lipid peroksidasyonuna vb. yol açabilirler. Hidroksil radikalleri aynı zamanda hidrojen ekleme veya çıkarma ve elektron transfer reaksiyonlarına da katılır. Bu şekilde birçok farklı kimyasal yapının oluşumuna, genom kararsızlığına ve hücrel hasara yol açabilir. Hidroksil radikali, guanin bazının C4, C5 ve C8 pozisyonuna saldırmakla birlikte ve C8 en fazla öne çıkan saldırı bölgesi olmaktadır. Bu nedenle DNA'da en yaygın bilinen oksidasyon ürünlerinden biri 8-oxo-G'dir³³⁹. 8-oxo-G en yaygın görülen oksidatif hasarlı bazdır. 8-oxo-G gibi hasarlı bazlar, baz kesip-çıkarma tamir mekanizması ile onarılır. Onarımın yetersiz kalması durumunda oksidatif stres modifiye DNA baz düzeyinin artmasına ve 8-oxo-G'nin DNA'da birikimine neden olur^{40,41}. DNA üzerinde bu tür modifiye bazların oluşturduğu hasar, kalıcı mutasyonlara yol açar. DNA hasarının kanser oluşumunun tüm evrelerinde rol oynayabileceği savunulmakta ve bazı kanserlerde oksidatif DNA hasarı düzeyinde artış belirtilmektedir⁶.

2.2.1 DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları

Kimyasal değişiklikler bütün hücrel moleküllerde oluşabilir. Protein, RNA, membran fosfolipidleri gibi birçok biopolimer oluşan bu değişikliklerden hücrenin en az düzeyde etkilenecek şekilde kısa ömürlüdürler ve yenileri ile yer değiştirirler. Ancak DNA metabolik olarak stabil olmalıdır. DNA'nın bu stabilitesinin korunmasında yüksek doğruluklu replikasyon ve DNA tamir mekanizmaları önemli rol oynarlar. DNA tamir mekanizmaları, alkilenmiş guaninin tamirinde olduğu gibi hasar etkeninin (alkil grubu) doğrudan uzaklaştırılması şeklinde olabilir ya da hasara uğramış baz veya DNA bölgesinin doğrudan uzaklaştırılması ve çıkarılan bölgenin yeniden sentezlenmesi şeklinde gerçekleşebilir. Bu tür

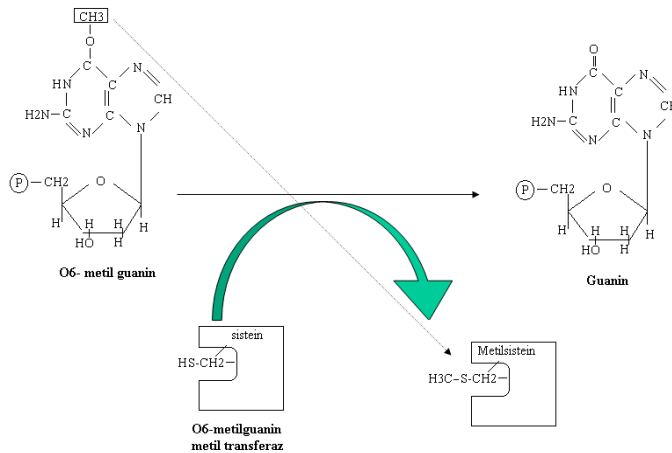
çok basamaklı özelleşmiş tamir mekanizmaları da bulunmaktadır. Bunların yanı sıra tek veya çift iplik DNA kırıklarının tamirinde rol alan homolog olan veya homolog olmayan rekombinasyonel tamir mekanizmaları da bulunmaktadır. Temel olarak DNA tamir mekanizmaları 6 kategoriye ayrılabilir⁴²:

- Doğrudan tamir
- Baz çıkarım tamiri (BÇT)
- Nükleotid çıkarım tamiri (NÇT)
- Yanlış eşleşme tamiri
- Tek ve çift-zincir kırık tamiri
- Zincirler arası çapraz bağların tamiri

2.2.1.1 DNA hasarının doğrudan uzaklaştırılması

DNA bazlarının alkillenmesi DNA'da mutasyon meydana getirebilir. Alkil gruplarının uzaklaştırılmasından sorumlu enzim O⁶-alkilguanin alkil transferazdır. O⁶-alkilguanin alkil transferaz guanindeki etil veya metil gruplarını kendi aktif sitesindeki sistein residüsüne aktarır. Böylece alkil grubunu uzaklaştırmış olur (Şekil 4).

O⁶ alkilguanin alkil transferaz

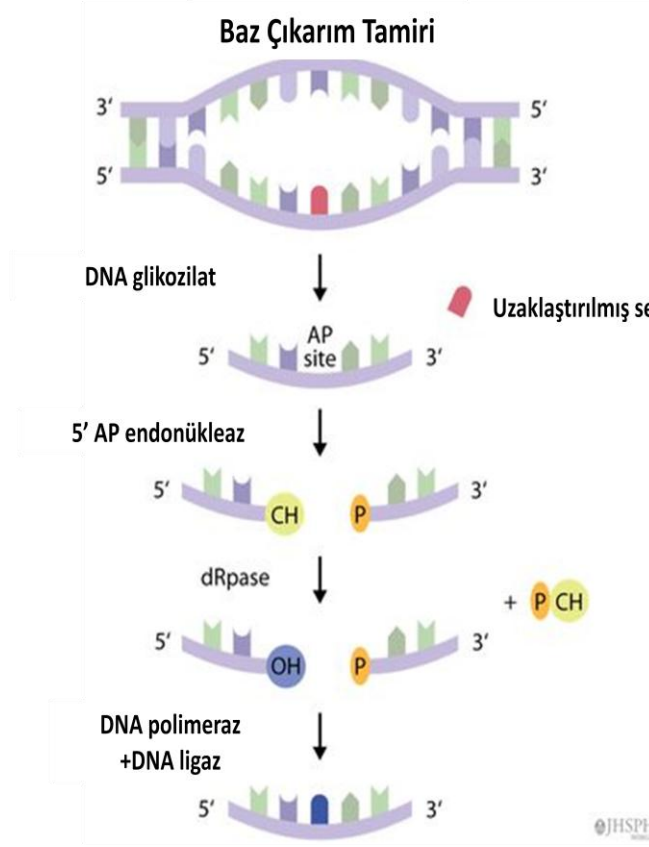


Şekil 4. DNA Hasar Etmeninin Doğrudan Uzaklaştırılması.

2.2.1.2 Baz çıkarım tamir (BÇT) mekanizması

Baz çıkarım tamiri (BÇT), tamirden sorumlu asıl proteinler olan DNA glikozilazların substrat spesifikliğinden dolayı, nükleotid çıkarım tamir (NÇT) ve yanlış eşleşme tamir mekanizmasından ayrılmaktadır⁴³. *E. coli*'de formamidopirimidin glikozilaz (Fpg veya MutM), endonükleaz III (Nth) ve endonükleaz VIII (Nei) olmak üzere üç ayrı DNA glikozilaz bulunmaktadır. İnsanda bu üç genin homoloğu sırasıyla hOGG1, NTH ve NEIL1 olarak adlandırılan substrat spesifik glikozilazlardır.

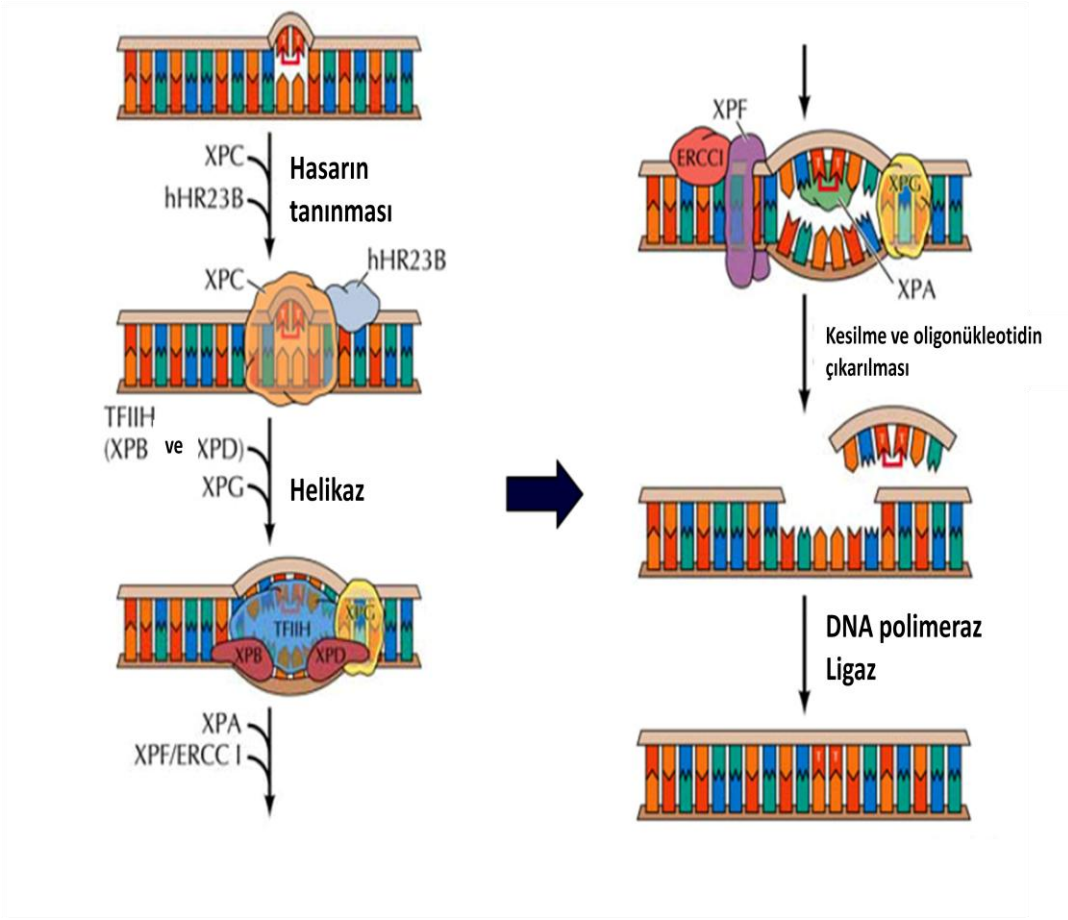
Sitozin ile eşleşmiş modifiye baz 8-OHGua, hOGG1 proteini tarafından tanınır ve kesilerek uzaklaştırılır. Baz çıkarım ilk aşamasında hasara spesifik DNA glikozilazlar, modifiye baz ve şeker arasındaki N-glikozidik bağı hidrolize ederek lezyonu (hasarlı bazı) uzaklaştırırlar ve apürinik/aprimidinik (AP) bir bölge oluştururlar. 8-hidroksiguanin glikozilaz (OGG1), endonükleaz VIII benzeri protein (NEIL1) gibi iki fonksiyonlu bir glikozilazdır ve modifiye bazı uzaklaştırdıktan sonra AP liyaz aktivitesi gösterir^{44,45}. Bu şekilde β - veya β,δ -eliminasyon reaksiyonları ile DNA iskeletini 3' ucundan kırarak DNA'da tek zincir kırığının oluşmasına yol açarlar. Bu kırık, polimerizasyon ve ligasyon öncesinde normal bir 3'-hidroksi grubuna dönüştürülmesi gereken bir 3'- α,β -doymamış aldehid veya 3'-fosfat bulundurmaktadır^{43,46}. Memelilerde bu aşamadan sonra BÇT yolağında apürinik endonükleaz1 (APE1), DNA bazı barındırmayan (abazik) bölgeyi 5' ucundan kırar ve özellikle 3'- α,β -doymamış aldehid olmak üzere engelleyici 3' ucunu uzaklaştırır⁴⁷. BÇT, iki alt yolak ile devam edebilir. Kısa yolakta polimeraz- β (Pol- β) ile yalnız bir baz yerine koyulur ve yeni sentezlenen DNA, DNA ligaz III/XRCC1 heterodimer ile kapatılır^{48,49}. Uzun yolakta ise Pol β , PCNA, Fen 1 ve Ligaz 1'in uyumlu çalışması ile 2-13 arasında DNA'ya eklenebilir^{50,51}. Baz çıkarım mekanizması Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. Baz Çıkarım Mekanizması⁵².

2.2.1.3 Nükleotid Çıkarım (Excision) Tamir Mekanizması

Nükleotid çıkarım tamir mekanizmasında insanda ilk olarak xeroderma pigmentosa (XP)'lı hastalarda tanımlanmış yedi genden oluşan XPA-XPG genlerinin ürünleri rol oynar. NÇT'de ilk basamak hatalı baz eşleşmesinin XPC ve hHR23B proteinlerinin oluşturduğu kompleks ile tanınmasıdır. Ardından XPB, XPD ve XPG proteinleri hasarlı bölgeye toplanır. Hasarlı bölgenin her iki tarafından yaklaşık 30 uzunluğunda bir bölge de ikili sarmal açılır. XPA, XPF ve ERCC1 proteinleri yine hasarlı bölgeye toplanır. XPF/ERCC1 ve XPG DNA'yı hasarlı bölgenin sırasıyla 5' ve 3' yanlarından kesen endonükleazlardır. Bu şekilde yaklaşık 30 nükleotidlik bir bölge çıkarılır. Ortaya çıkan boşluk DNA polimeraz δ ve ϵ tarafından doldurulur ve DNA ligaz uçları birleştirilerek tamir süreci tamamlanır (Şekil 6).

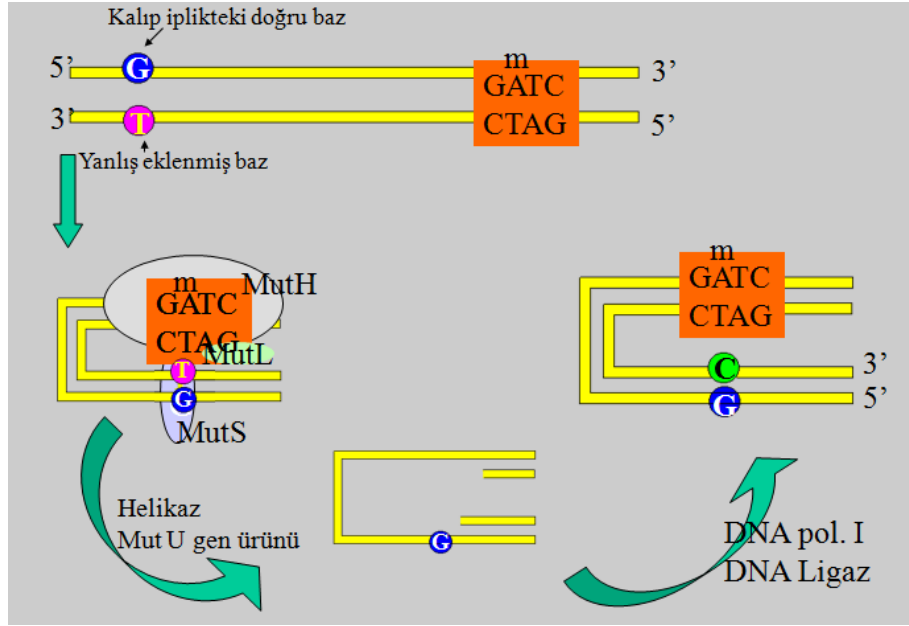


Şekil 6. Nukleotid Çıkarım Tamir Mekanizması⁵³

2.2.1.4 Hatalı Eşleşme (Mismatch Repair) Tamir Mekanizması

DNA polimeraz replikasyon sırasında yanlış bazı eklerse, bu hatayı proofreading mekanizması ile düzeltir. Ama hata düzeltilmezse mutasyon meydana gelir. Bu durum mismatch tamir mekanizması ile düzeltilir. E. coli'de bu tamir mekanizmasında mutH, mut L ve mutS gen ürünleri görev alır. Bunların yanısıra Mut U gen ürünü helikaz II gibi iş görür. Mismatch tamir sistemi yeni sentezlenmiş ipliği tarar. Hatalı eşleşmeleri, baz kayıp ve eklenmelerini tarar. Hatalı bazın varlığında yanlış bazın olduğu yeni replike olmuş ipliği kalıp iplikteki GATC dizisindeki metile olmuş adeninden tanır. Yeni sentezlenmiş iplikte adenin metile değildir. Bu diziden 1kb veya daha uzak bir bölgeyi tarayabilir. E.coli'de mutS hatalı baz eşleşmesine spesifik olarak bağlanır. Mut H proteini GATC dizisine bağlanır ve

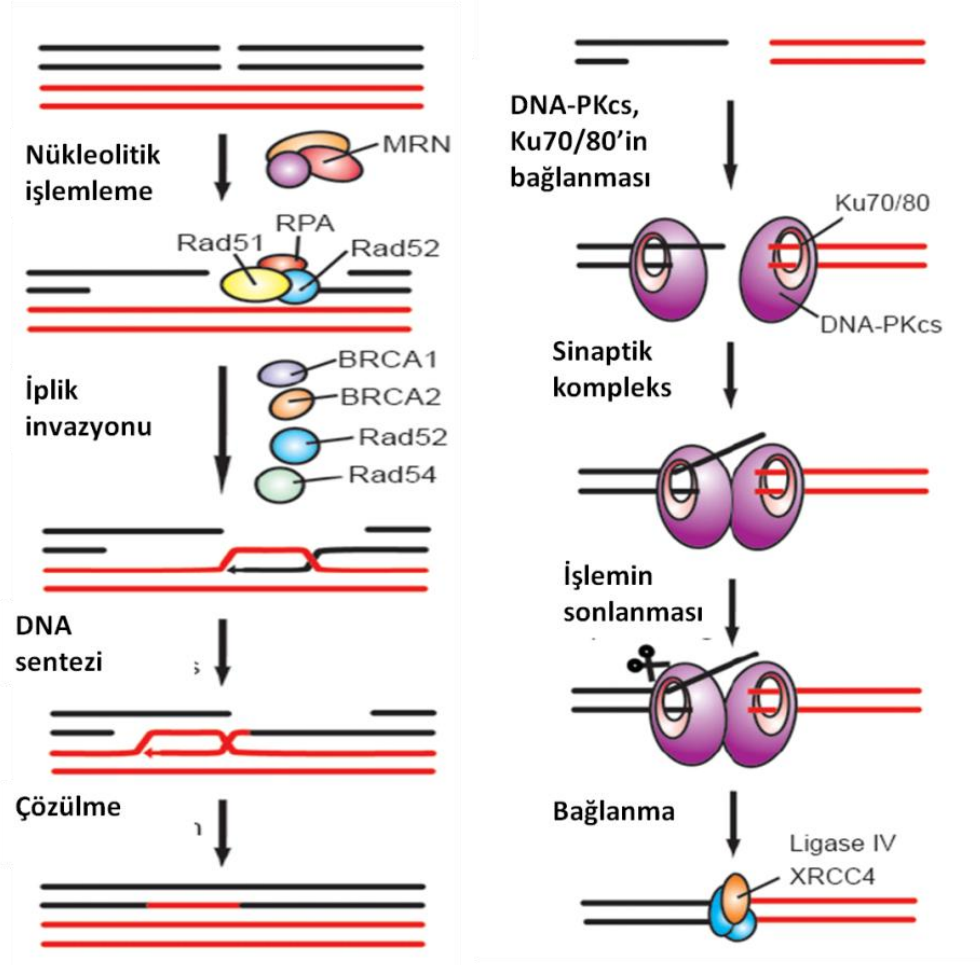
ipliği unmetile GATC dizisinden kırar. Üç protein ürünü bir kompleks oluşturarak çalışır. Oluşan boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur ve DNA ligaz tarafından şeker-fosfat iskeleti tamamlanır. Memelilerde bu sisteme benzer mekanizmalar vardır. İnsanda mut genlerinin homologları olarak hMSH2, hMLH, hPMS1, hPMS2 gibi genler tanımlanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Hatalı Eşleşme Tamir Mekanizması

2.2.1.5 Tek ve Çift İplik Kırıklarının Tamiri

Tek iplik kırıklarında, diğer iplikteki bilgi doğru okunarak hasarlı iplik onarıcı enzimlerle onarılabilirdiğinden çift iplik kırıklarındaki hasar daha önemlidir. DNA çift iplik kırıkları (DÇK) oldukça ciddi ve ölümcül tip DNA hasarlarıdır. Tek bir DÇK hücreyi öldürmek veya genomik bütünlüğü bozmak için yeterlidir. DÇK'ler ekzojen veya endojen kaynaklı hasarlar ile oluşabilir. İndüklenmiş DÇK'lerin yanında programlı DÇK'ler de bulunmaktadır (T ve B hücre reseptör yeniden düzenlenmesi). Hücre başına günde 10 DÇK oluştuğu hesaplanmıştır. Memeli hücrelerinde DÇK'lerin tamiri için iki major mekanizma bulunmaktadır; homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç bağlama (non homolog end joining =NHEJ) (Şekil 8).



Şekil 8. DNA Çift İplik Kırıklarının Tamiri⁵⁴.

HR yolağında genel olarak hata oranı oldukça düşüktür ancak bütünlüğü korunmuş homolog kalıplar (kardeş kromatidler gibi) ister. NHEJ memelilerde daha çok karşımıza çıkan tamir şeklidir. Hata eğilimlidir. Uzun homolog diziler gerektirmez. DÇK'lerin HR veya NHEJ için seçimi hücre döngüsünün fazı önemlidir. HR, S ve G2 fazında geçerli tamir mekanizmasıdır. Homolog olmayan uç bağlama ise G1 fazında ağırlıklı olarak rol almaktadır. Çok hücreli ökaryotların mitotik hücrelerinde DÇK'lar, omurgalı immün sistem lenfositlerinin olgunlaşma süreci dışında patolojiktir. DÇK'lar; S faz boyunca kromatid kırıkları en sık gözlenen durum ve yakınındaki kardeş kromatid kullanılarak HR ile tamir edilir. Kalan bütün DÇK'lar NHEJ ile tamir edilir. Bunlar S faz dışında meydana gelirler ve HR'daki gibi kullanılabilecek bir kardeş kromatid bulunmamaktadır. Bu tip DÇK'lar ROT'leri, infrared ve nükleer enzimlerin beklenmeyen aktiviteleri sonucu ortaya çıkar. Ancak ROT'leri major DÇK nedenidir.

Fosfo inozitol 3 kinaz ilişkili kinaz (PIKK) aile üyeleri DÇK'nın tamirinin değişik basamaklarında önemli role sahiptir. DÇK sinyalinde rol alan hedef proteinleri fosforillerler. PIKK aile üyeleri korunmuş bir kinaz domaini barındırırlar. Memeli hücrelerinde DÇK uçlar MRE11/Rad50/NBS (MRN) ve KU70/Ku80 kompleksleri tarafından tanınır. MRN kompleksi hasar bölgesine ATM'yi çağırır. Ku70/80 DNA-PKcs'yi lezyon noktasına çağırır. MRE11 (mayotik rekombinasyon 11) arkeadan memeli hücrelerine kadar korunmuştur. Telomerlerin korunmasında, HR'da ve NHEJ'de görev alırlar. Tek iplik endonükleaz ve 3'→5' eksonükleaz aktivitesine sahiptir. PIKK ailesi üyesi üç protein DÇK'e yanıtta esastır. ATM, ATR ve DNA-PKcs. ATR sıklıkla DNA tek iplik kırıkları ile ilişkilendirilirken, ATM ve DNA-PKcs DÇK'lar ile ilişkilidir. MRN kompleksinin 3. Partneri NBM aynı zamanda nibrin ve p95 olarak bilinir. MRE11 ve RAD50 interaksyonu her ikisinin de endo ve eksonükleaz aktivitelerini artırır. DÇK'lerin tamir edilemediği durumda DNA Damage Response (DDR) yolu ATM ve ATR gibi kinazları ile aktive olur.

Pankreas kanserinde DNA tamir mekanizmaları ve bu mekanizmalarda rol alan genler arasındaki ilişki çalışılmıştır. DNA çapraz bağlanmalarının (DNA crosslink) tamirinde rol alan BRCA1/BRCA2 kompleksinde yer alan genler özellikle kalıtsal kanserler ile ilişkisi nedeniyle pankreas kanserinde de çalışılmıştır. Buna ek olarak otozomal dominant kalıtsal bir hastalık olan ve kolon kanseri ile ilişkilendirilen Lynch Sendromu, pankreas kanserinin oluşumunda da risk faktörüdür. Bu sendrom DNA hatalı baz eşleşme tamir mekanizması ile ilişkili hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 ve hMSH6/GTBP gibi genlerin germline mutasyonları ile ilişkilidir²⁷. Bunlara ek olarak baz çıkarım onarım mekanizmasında yer alan ve oksidatif DNA hasarlarının uzaklaştırılmasında rol oynayan 8-oxo-guanin DNA glikozilaz (OGG1) geninin pankreas kanserinin oluşumunda önemli bir aday gen olduğu ileri sürülmüştür^{55 56 57}.

2.2.2 8-Oxo-guanin DNA Glikozilaz 1 (OGG1)

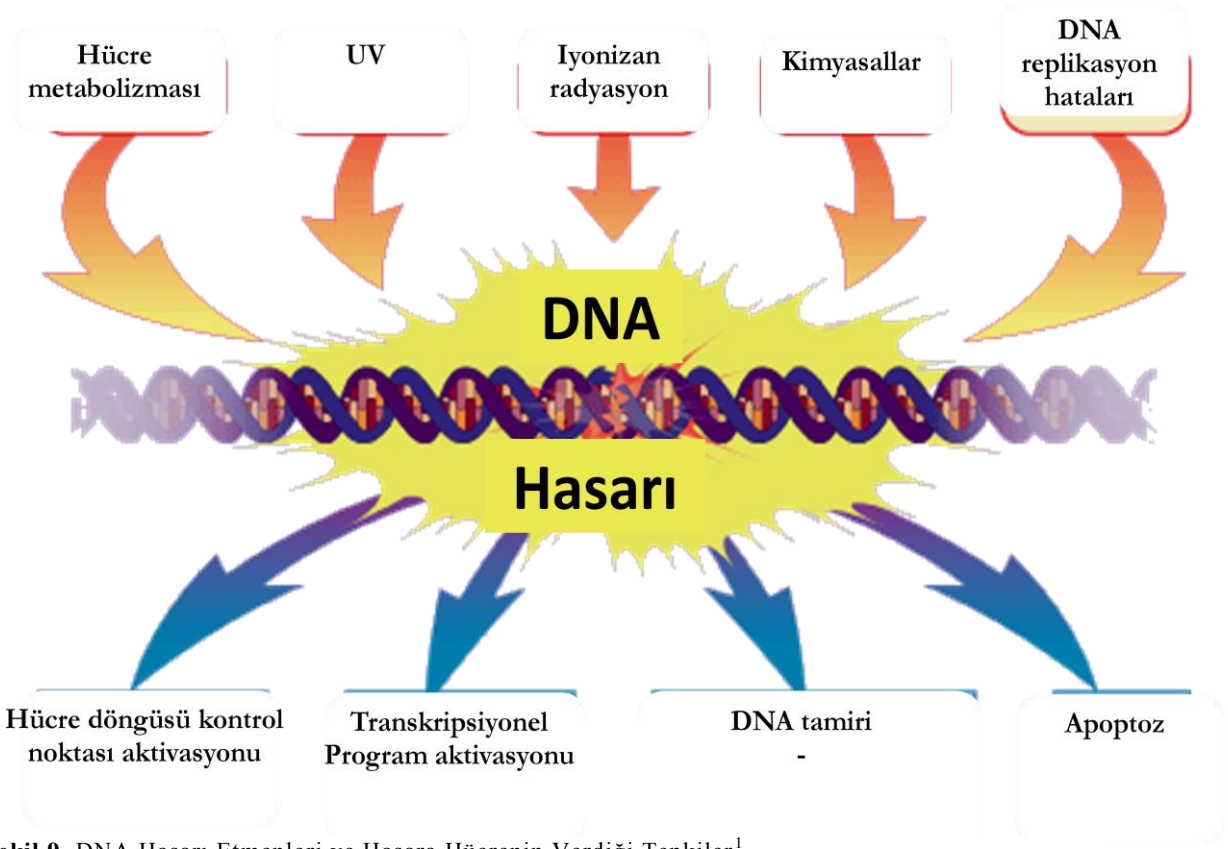
OGG1 geni 8-oxoguaninin çıkarılıp uzaklaştırılmasından sorumlu enzimi kodlayan genidir. Kromozom 3p26.2 bölgesinde yerleşim gösterir. Genin C-terminal bölgesinin alternatif splicing'i 2 ana grubun oluşmasına neden olur ki bunlar Tip1A ve Tip2A olarak gruplandırılır. İki grup arasındaki en önemli fark, Tip1A grubunun 7. Eksonu, Tip2A grubunda 8. eksonu barındırmasıdır. Bütün varyantlarda N-terminal bölgesi ortaktır. Bu bölge mitokondrial hedef sinyali içerir.

2.2.3 Endonükleaz VIII-benzeri 1 (NEIL1)

NEIL1 geni DNA glikosilazları kodlayan ve Nei endonükleaz VII-benzeri gen ailesi olarak tanımlanan grubun bir üyesidir. Genin kodladığı enzim, okside primidinlerin DNA'dan uzaklaştırılması tamirinde rol oynamaktadır. Genin çoklu varyant formları kopyalayan izoformları bulunmaktadır. NEIL1 geni kromozom 15q24.2 'de yerleşiktir ve 14 eksone sahiptir.

2.2.4 DNA Hasarı ve Kanser

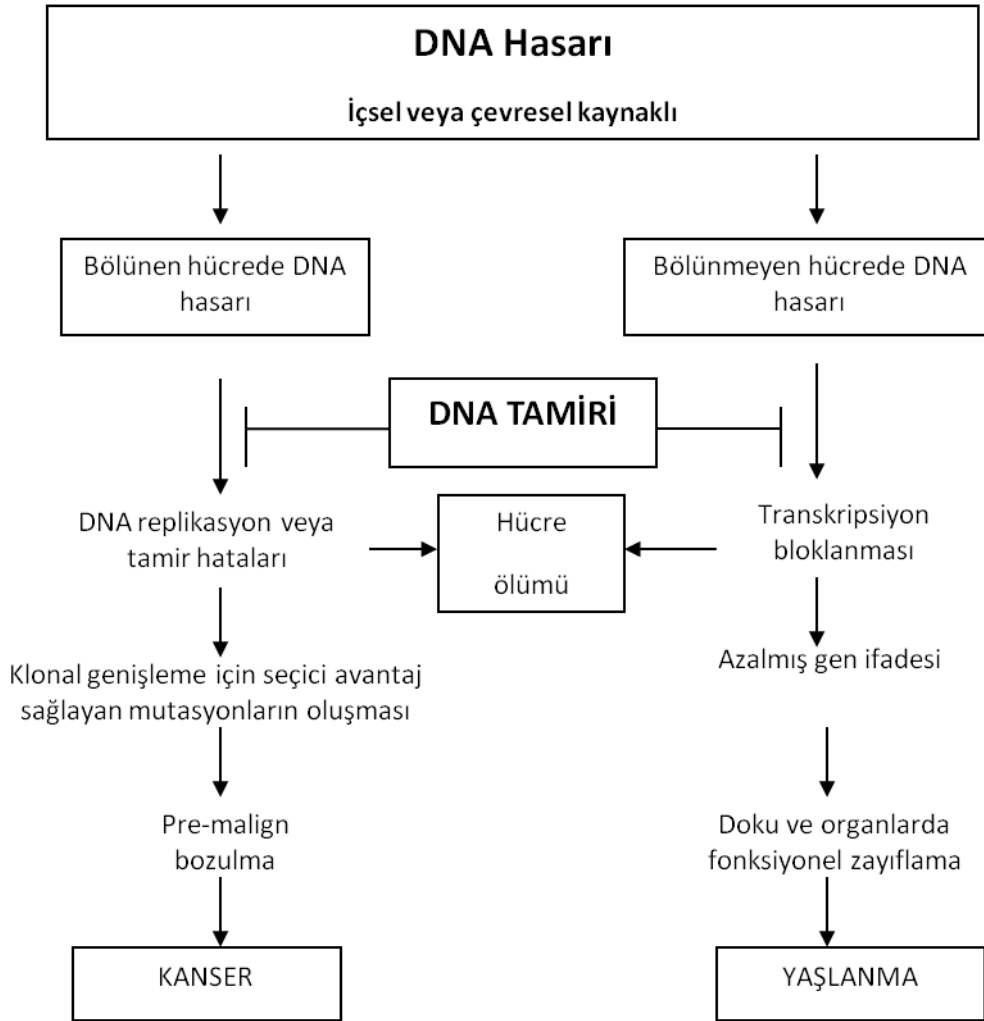
DNA hasarı yaşam için önemli bir sorundur ve kanser oluşumunun primer nedenlerindedir. DNA hasarı mutasyondan farklıdır. DNA hasarı mutasyonların oluşumuna zemin hazırlar. Temel olarak DNA hasarı, DNA'nın kimyasal yapısının değişimidir. Bir memeli hücresinde günde 60000 civarında DNA hasarı oluşmaktadır. DNA hasarı genel olarak, kimyasal bir grubun DNA'ya eklenmesi ya da çıkarılması, DNA ikili sarmalında tek veya iki ipliğin kırılması olarak tanımlanabilir. Hasarların nedeni hücrel metabolizmadan kaynaklanan yan ürünler ya da çevresel faktörler olabilir ve hasarlı DNA'ya hücrenin verdiği tepkilerde farklılık gösterebilir (Şekil 9).



Şekil 9. DNA Hasarı Etmenleri ve Hasara Hücrenin Verdiği Tepkiler¹

Hasarlı bazı barındıran DNA'nın replike olması bu bazın karşısına farklı bir DNA bazının yerleştirilmesine ve bir sonraki replikasyon sürecinde mutasyon oluşumuna neden olur. DNA kırıklarının tamirinde sıklıkla mutasyonların oluşması söz konusu iken, kimyasal değişimler ile meydana gelen DNA hasarları büyük bir oranda özelleşmiş DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilmektedir. DNA hasarı meydana geldiğinde DNA hasarı replikasyondan önce düzeltilir. DNA hasarı proliferen hücrede meydana gelir ve hasar DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilmezse bu durum mutasyon birikimine yol açar ve kanser riskini doğurabilir. Değişime uğramış DNA dizileri replikasyon ile kopyalanır ve döl hücrelere aktarılır. Bir gende meydana gelen mutasyon o gen ürününün fonksiyonunu değiştirmeyebilir (sessiz mutasyon-bir amino asidin birden fazla kodon ile kodlanması nedeniyle) ama genellikle izlenen genin kodladığı proteinin anormal fonksiyon kazanması/kaybı durumudur. Mutasyonlar protoonkogenleri aktive edebilir, tümör baskılayıcı genlerin ifadelerini baskılayabilir ya da hücrede genomik kararsızlığa neden olabilir. Bu tip mutasyonların birikimi ile hücre kanserleşme sürecine girebilir. Kanser genellikle klonal genişleme için seçim avantajı sağlayan mutasyonların birikiminin bir sonucudur. Şekil 10

'da görüldüğü gibi tamir mekanizması, kanserleşme ve/veya yaşlanma sürecinde normal hücrel devamlılığın kontrolünde oldukça önemli bir mekanizmadır⁵⁸.

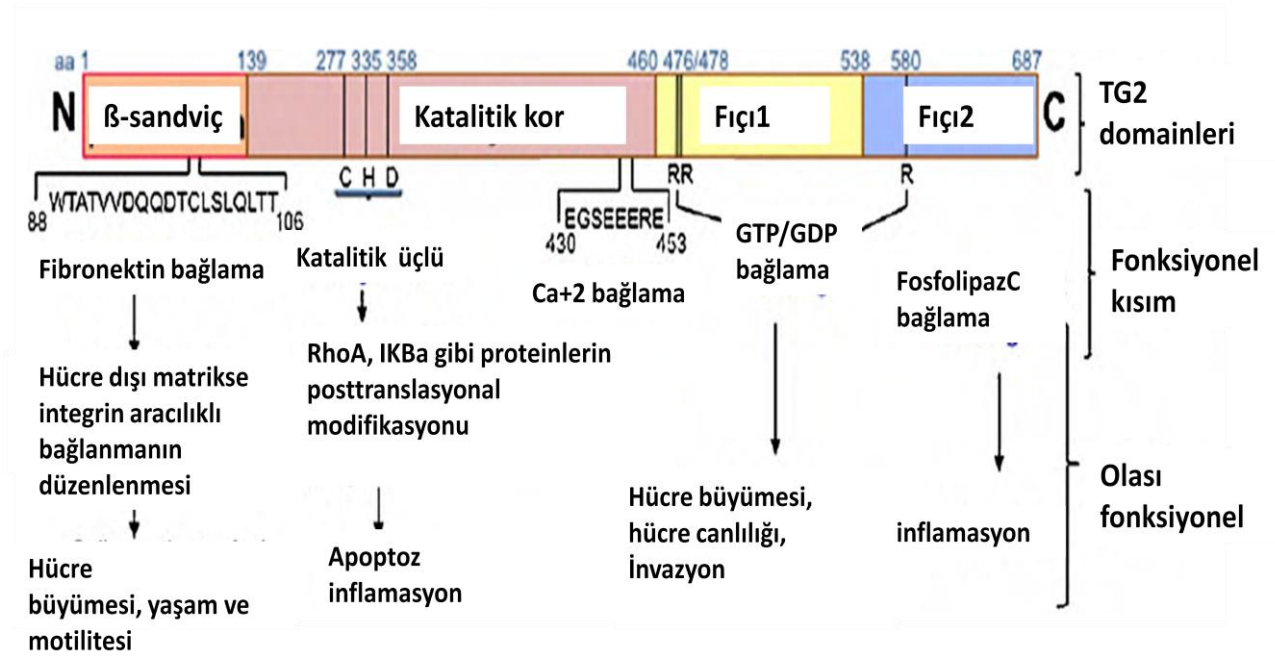


Şekil 10. DNA tamirinin hücrenin normal fonksiyonlarını korumadaki etkisi⁵⁸.

Son yıllarda çok sayıda kanser tipinde önemli rol oynayan proteinlerden biri de doku transglutaminaz (TG2/TGM2)'dir. Pankreas kanseri dahil çoğu kanserde TG2 yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Kanser hücrelerinde artan TG2 ekspresyonu, ilaç direnci, metastaz ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. TG2 proteini ve kanserdeki önemi sırasıyla bölüm 2.3 ve 2.3.1'de verilmiştir.

2.3 Doku Transglutaminaz (TG2)

Transglutaminazlar (TGs;EC2.3.2.13) proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarını katalizleyen bir enzim ailesidir. Proteinleri ϵ -(g-glutamil)lizin izopeptid bağları aracılığıyla çapraz bağlar⁵⁹. Sekiz TG, memelilerde tanımlanmıştır. Tanımlanan tüm transglutaminazlar katalitik aktivite için Ca^{2+} a bağımlıdır. Bazıları propeptid kesimine ihtiyaç duyar ve bunlardan üçü (TG2, TG3 ve TG5) GTP tarafından inhibe edilir⁶⁰. Doku transglutaminaz (TG2 ve ya tTG) TG ailesinin her yerde bulunan üyesidir. TG2 geni (TGM2 insan, kromozom20q11-12) 13 ekzon ve 12 introndan oluşur⁶⁰ ve 687 amino asitlik N- terminal β -sandiviç, katalitik merkez ve 2 C-terminal β -barrel domaini olmak üzere dört farklı domaine sahip monomerik bir proteini (78 kDa) kodlar (şekil 11).

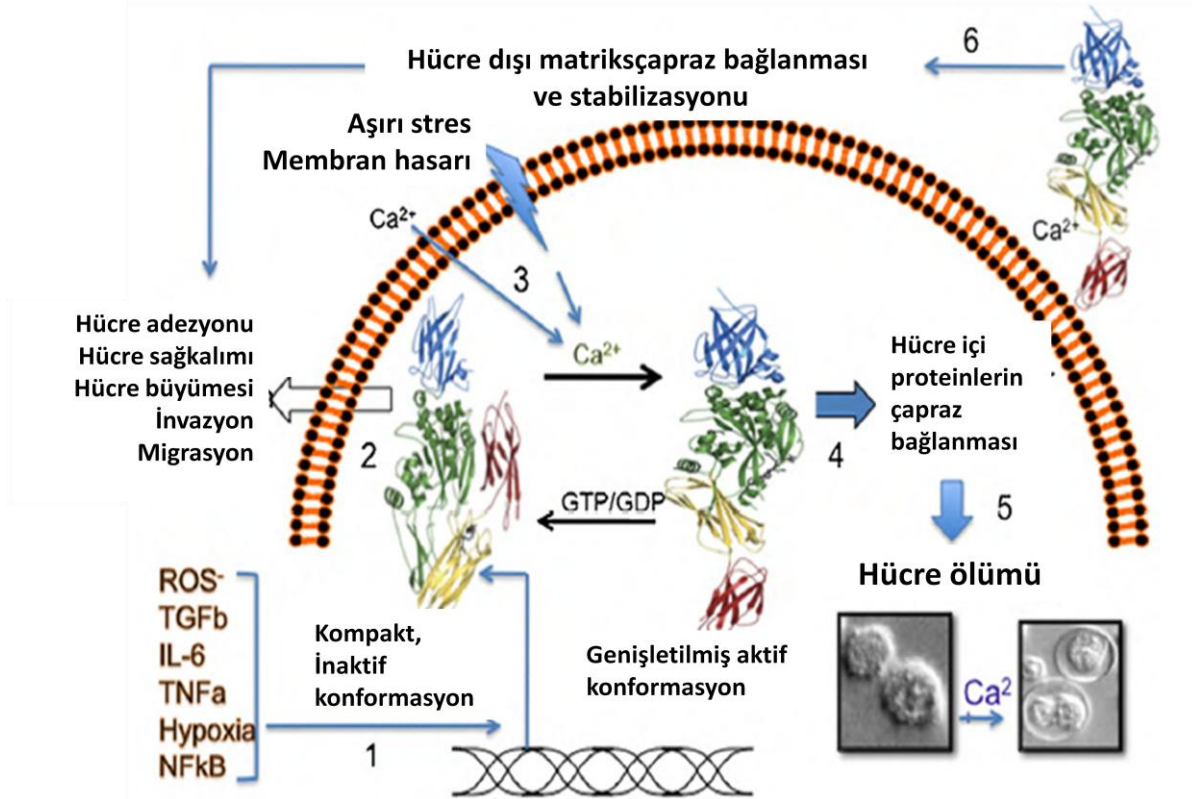


Şekil 11. TG2 Proteininin Yapısal ve Fonksiyonel Domainleri⁶¹.

TG2 hem hücre içi hem de hücre dışı fonksiyonları ile yapısal ve fonksiyonel olarak kompleks bir proteindir. Proteinlerin Ca^{2+} - bağımlı post translasyonel modifikasyonları katalizlemesine ek olarak, TG2 GTP ve ATP'ye bağlanır ve hidrolizleyebilir⁶². Bununla birlikte protein disülfid izomeraz reaksiyonunu katalizleyebilir ve hatta protein kinaz olarak fonksiyon gösterebilir⁶³. GTPaz aktivitesi TG2 fonksiyonu ile ilişkilidir. TG2'nin yüksek afiniteli fibronektin bağlayan bölgesi N-terminalde lokalize olmuştur (Şekil 11). Baskın

olarak intraselüler protein (sitozol, nukleus, hücre membranında lokalize olmuş) olmasına rağmen, henüz bilinmeyen bir mekanizma ile hücre dışına da salgılanır ve ekstraselüler fonksiyon gösterir. Normal koşullar altında hücre içi çevredeki TG2 düşük Ca^{2+} varlığına ve GTP/GDP'nin inhibitör etkisine bağlı olarak latent bir protein olarak varlığını sürdürür (Şekil 12). Bununla birlikte hücrenin zorlayıcı koşulları altında, Ca^{2+} homeostazının kaybı veya bozukluğu sonrası stres, travma gibi durumlarda, TG2 aktive olabilir ve apoptoz ve nekroz sırasında gözlemlendiği gibi hücre içi proteinlerin çapraz bağlanmalarına neden olur ^{64,65}.

TG2, hem hücre içinde hem hücre dışında matriks stabilizasyonu, hücre adezyonu ve göçü, hücre ölümü ve sağ kalımı dahil birçok önemli fonksiyona sahiptir (Şekil 12) ⁶¹. TG2 çeşitli hücre içi veya hücre dışı proteinlerle onların yapısını, fonksiyonunu ya da stabilitesini değiştirerek etkileşime girebilir ⁶⁶. Örneğin, TG2 NFκB inhibitörü olan IκB-α proteinini çapraz bağlayarak, IκB'den ayırarak NFκB'yi aktive eder ⁶⁷. Bu NFκB aktivasyonu, hücreleri reaktif oksijen türleri, enflamatuvar sitokinler ve kemoterapi ilaçları nedeniyle oluşan stres kaynaklı hücre hasarına karşı korur ^{67,68}.



Şekil 12. TG2 ekspresyonu ve hücre ölümü arasındaki ilişki ⁶¹.

2.3.1 Kanserde TG2

Kanser progresyonu, enflamatuvar yanıt, doku hasarı ve yara iyileşmesi ile ilişkilidir ^{69,70}. Artmış TG2 ekspresyonu ve transamidasyon aktivitesi çoğu enflamatuvar hastalığın ortak özelliğidir ^{71,72}. Bu nedenle, doku hasarı ve yara iyileşmesi sırasında salgılanan çeşitli sitokin ve büyüme faktörleri (TNF- α , IL-6, TGF- β 1 gibi) TG2 ekspresyonunun en önemli indükleyicileridir ^{69,73,74}. Enflamatuvar yanıtlar tümör başlangıcı, ilerlemesi, invazyon ve metastazda kritik bir rol oynar. İmmun hücreler tümöre infiltre olur, kanser hücreleri ile haberleşir ve büyümesini, yaşamını sürdürmesini ve gelişimini sağlar ^{75,76}. Benzer olarak primer tümörde TG2'nin ekspresyonunun baskılandığı, sekonder metastazik tümörde ya da kemoterapiye dirençli tümörlerde ise arttığı bildirilmiştir ^{77,78}. Kanser hücrelerinde artan TG2 ekspresyonu, ilaç direnci, metastaz ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. Bu bulgular kronik enflamasyon, TG2, metastaz ve ilaç dirençli kanser arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir ⁶¹.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, pankreas kanser hücrelerinde doku transglutaminaz (TG2)'in aşırı eksprese olduğu ve otofajik hücre ölümünü inhibe ettiği bildirilmektedir. MD Anderson Kanser Merkezi değişik pankreas hücre hatlarında siRNA kullanarak, özellikle doku transglutaminaz (TG2) enziminin spesifik olarak hedeflenmesi ile otofajik hücre ölümünün tetiklendiğini göstermişlerdir ²⁴. Araştırmacılar pankreas kanserli hasta biyopsi örneklerinde ve hücre hatlarında yüksek düzeyde TG2 ekspresyonu saptamışlardır ⁷⁹. Yüksek metastatik potansiyele sahip hücre hatları da yüksek düzeyde TG2 tanımlamaktadır ⁸⁰. Artmış TG2 ekspresyonu kemoterapiye direnç ve kötü prognoz ile paralellik göstermektedir ^{79,81}.

Kanserin progresyonunda izlenen TG2 ekspresyon düzeylerindeki artışın NF κ B molekülü üzerinden gerçekleştiğini bulgulayan çalışmalar bulunmaktadır. Öne sürülen modellere göre TG2, NF κ B inhibitörü I κ B'yi baskılayarak NF κ B aktivasyonunu tetiklemekte buna karşın NF κ B de TG2 promotörü üzerinde transkripsiyonel aktivatör işlevi tükenmektedir. Bu pozitif geri beslemeli döngü her iki molekülün simültane aktivasyonunu sağlamaktadır⁸².

2.4 NF κ B ve Pankreas Kanseriindeki Önemi

NF κ B, transkripsiyon kontrolünde rol oynayan bir protein kompleksidir. Deniz anasından insana kadar bütün canlılarda korunmuştur. Sitokinler, serbest radikalleri UV radyasyon gibi birçok hücrel stres durumlarında hücrel yanıt için gereklidir. NF κ B ailesinin üyeleri iki

alt sınıfta ayrılabilir; NFκB proteinleri ve Rel proteinleri. Bütün bu proteinler rel homoloji domaini (RHD) olarak adlandırılan yüksek düzeyde korunmuş bir DNA-bağlanma/dimerizasyon domaini barındırırlar. Rel proteinleri C-terminal transaktivasyon domaini barındırırlar ve bu domain transkripsiyon aktivasyonu için bir çok türde rol oynar. NFκB süperail üyesi proteinler NFκB1 ve NFκB2 büyük öncül proteinler olarak (p105 ve p100) üretilirler ve işlenilerek sırasıyla p50 ve p52 NFκB alt birimlerini verirler. Bu proteinler Ankrin tekrarlarını barındıran uzun C-terminal domainleri ile Rel proteinlerinden ayrılır. Bu domain büyük öncüllerin işlenmesi sırasında ubikütinasyon mekanizması ile uzaklaştırılır. p50 ve p52 proteinlerinin kendilerinin tek başına transkripsiyon aktivasyon kapasiteleri bulunmaz⁸³.

Aktive olmuş NFκB heterodimer formundadır. Genellikle p65 ve p50 alt ünitelerini barındırır. NFκB'nin her iki alt üniteleri NFκB /Rel ailesinin üyeleridir. Bu ailenin c-Rel, RelB ve p52'dir. NFκB'nin aktivitesi IκBα olarak adlandırılan inhibitör tarafından düzenlenir. İnhibitör sitoplazmada NFκB ile kompleks oluşturur ve dimerin çekirdeğe translokasyonunu engeller. Hücre NFκB için uyarı sinyali aldığıında, IκBα fosforillenir ve ubikütin proteozom kompleksi tarafından yıkılır. IκBα'nin yıkılması, NFκB dimerinin çekirdeğe translokasyonunu tetikler ve spesifik hedef genlerin transkripsiyonu uyarılır. NFκB'nin aktivasyonunda önemli bir mekanizma, hücrenin reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artışıdır. Hidrojen peroksit uygulaması sonrasında hücrelerde NFκB'nin hızla aktif hale geldiği, antioksidan bir madde kullanıldığıında ise hızla NFκB aktivasyonunu blokladığı gösterilmiştir⁸⁴.

NFκB ökaryotik hücrelerde aralarında proliferasyon ve hücre sağkalımı ile ilgili olan birçok genin transkripsiyon faktörüdür. Birçok farklı kanser tipinde düzensizleşmiş/bozulmuş NFκB saptanmıştır. Tümör hücrelerinde NFκB kodlayan dizilerdeki mutasyonlar, ya da IκBα gibi aktiviteyi kontrol eden genlerdeki mutasyonlar NFκB'nin sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır. NFκB'nin bloklanması tümör hücrelerinde proliferasyonu baskılamakta ve anti-tümör ajanlara daha duyarlı hale gelmelerine neden olmaktadır. Bu nedenle NFκB birçok araştırmada hedef olarak çalışılmaktadır⁸⁵.

KontROLSUZ ve sürekli Kras ve NFκB aktivasyonu, pankreatik duktal adenokarsinomlarında sıklıkla izlenmektedir. Pankreas kanseri gelişiminin erken evresinde Kras'ın mutasyonal aktivasyonu pankreas kanserlerinin %80-95'inde gözlenmektedir. Bunun yanında Ink4a/Arf'nin mutasyonal inaktivasyonunda pankreas kanserinde %50-75

gözlenmektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda mutasyona uğramış Kras'ın pankreatik intraepitelyal kanseri indüklediği gösterilmiştir. Bununla beraber, Kras'ın aktivasyonuna rağmen, bu aktivasyonun etkilediği alt sinyal yolları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı çalışmalar, NFκB'nin, Ras'ın etkin olduğu hayvan kanser modellerinde önemli role sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin NFκB'nin baskılanmasının Ras ile uyarılmış invazif epidermal neoplazilerde, Ras'ın etkisini azalttığı gösterilmiştir. Ling ve arkadaşları, RelA/p50 NFκB'nin pankreatik kanser örneklerinin %70'inde sürekli olarak aktif olduğunu ve NFκB'nin aktivitesinin mutant IκBα ile baskılanmasıyla, pankreas kanser karsinogenezini baskıladığını göstermişlerdir ⁸⁶.

Tez çalışmamızın amacı, pankreas kanserli hastalarda DNA hasarı ve onarım enzimlerinin ekspresyonlarını incelemek, DNA hasarı ve doku transglutaminaz (TG2) düzeyleri arasındaki olası ilişkiyi araştırmaktır. Bu bağlamda yaptığımız çalışmaları iki başlık içerisinde toparlayabiliriz. Birincisi farklı evrelerde olan pankreas kanserli hastaların tümör ve eşlenik normal dokuları ile gerçekleştirilen çalışmalar, ikincisi ise hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen TG2, OGG1 ve NFκB arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik yapılan deneylerdir.

Hasta örnekleri ile yaptığımız çalışmalarda, hastaların tümör ve eşlenik normal dokularında baz hasarı düzeyleri GC-MS/MS ile nükleozid hasarı düzeyleri ise LC-MS/MS ile ölçülmüştür. Yine hastaların tümör ve normal doku örneklerinde DNA onarım enzimleri OGG1, NEIL1 ve proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarını katalizleyen bir enzim ailesi üyesi olan TG2 ekspresyonlarının belirlenebilmesi için gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, hasta örneklerinden izole edilen total protein kullanılarak gerçekleştirilen western-blot çalışması ile TG2 ve OGG1 protein düzeyleri tümör ve normal doku örneklerinde incelenmiştir.

Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda ise; pankreas kanserinde yüksek düzeyde ifade edilen TG2 proteininin, DNA tamir enzimi olan OGG1 proteini ifade düzeyine etkisi bildirici vektör kullanılarak analiz edilmiştir. Bu bağlamda ayrıca TG2 ile NFκB arasında ilişki TG2'nin baskılandığı veya NFκB'nin uyarıldığı durumlarda protein düzeylerindeki etkileşim açısından western blot yöntemi ile incelenmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmaların yöntemsel ayrıntıları Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Araştırmanın Tipi

Deneysel Araştırma

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma, 2010 Ocak-2014 Aralık tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya, Tıbbi Biyoloji, Genel Cerrahi, Moleküler Tıp ve Patoloji Anabilim Dallarının katılımı ile gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen kütle spektrometri çalışmaları National Institute of Standards and Technology (NIST) kurumunun Biomolecular Measurement Bölümü'nün DNA Ölçümleri Grubu Laboratuvarı'nda (Maryland, U.S.A), mRNA ve protein düzeyinde yapılan ekspresyon çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Çalışmanın örnekleme, proje kapsamında Genel Cerrahi AD'na pankreas adenokarsinomu nedeniyle cerrahi rezeksiyon geçiren değişik yaş gruplarındaki 45 hastadan toplanan tümör ve normal dokular oluşturdu. Beş hasta patoloji sonucuna göre adenokarsinom tanısı almadığından çalışma dışı bırakıldı. Bu nedenle proje kapsamında 40 hasta ile çalışıldı. Operasyon sırasında cerrahın takibinde ve operasyon sonrası patoloğun makroskopik analizi sonucu, bu hastaların tümörlü dokularından ve tümör dokusundan en az 2-3 cm uzaklıkta olacak şekilde kendi kontrol (normal) dokularından örnek alındı.

Hastaların araştırmaya dâhil olma ve dışlama kriterleri aşağıdaki gibidir;

Çalışmaya alınma kriterleri:

1. Çalışmaya katılmayı kabul etme
2. Pankreas kanseri tanısının konulması
3. Pankreas kanseri nedeniyle yapılacak cerrahi operasyona medikal ve solunum fonksiyonları açısından uygunluk

4. Pankreas kanseri nedeniyle tanı veya tedavi amacıyla cerrahi operasyon endikasyonu olması

5. 18 yaş üzeri olgular

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

1. Çalışmaya katılmayı kabul etmeme

2. 18 yaş altı olgular

3. Medikal inoperabilite

- Hastanın genel anestezi almasına engel oluşturan sistemik hastalık varlığı
- Arteria mesenterica superior, truncus coeliacus ve hepatik arter invazyonu
- Peritoneal karsinomatöz varlığı

4. Kanser dışı nedenlerle yapılmış cerrahi operasyon

3.4 Çalışma Materyali

Pankreas kanserli hastaların tümör ve normal dokuları ile çalışma gerçekleştirildi. Bu dokulardan DNA ve RNA örnekleri elde edildi. Etik Kurul onayı (EK-1) alınarak hasta ve kontrol gruplarındaki katılımcıların kendileri ve/veya yakınları çalışma hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya katıldıklarını kabul ettiklerine dair onam formu imzalatıldı (EK-2).

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken; Pankreas kanserinin süreleri

Bağımlı değişken; DNA hasar belirteçleri ve DNA onarım enzim ekspresyon düzeyleri (bu belirteçler evreye bağlı olarak değişiyor)

3.6 Araştırma Planı ve Takvimi

Örneklerin toplanması	Ocak 2010-Ağustos 2014
DNA hasarı çalışmaları	Ekim 2011-Ekim 2013
DNA onarım enzimlerinin ekspresyon çalışmaları	Ekim 2012- Ekim 2014
Western Blot Çalışmaları	Ocak 2012-Kasım 2014
Hücre kültürü Çalışmaları	Eylül 2012-Kasım 2014
Analizler-Bulguların Değerlendirilmesi	Kasım 2013-Kasım 2014

3.7 Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen DNA hasar bulgularının istatistiksel analizi Graphpad Prism (versiyon 5.03) programı kullanılarak Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapıldı. Klinik evreler ile DNA hasarı arasındaki ilişkinin araştırılması aynı program ile değerlendirildi. Pankreas kanserli hastalarda DNA tamir enzimleri (OGG1 ve NEIL1) ve TG2 ekspresyon çalışmalarının bulguları değerlendirilirken yine Graphpad Prism programı kullanılarak ilgili grafikler elde edildi.

3.8 Araştırmanın Sınırlılıkları

Pankreas kanserli hastalardan yapılan DNA hasar çalışmaları, tez kapsamındaki tüm dokularda ölçülemezdir. Tez kapsamında 29 hastadaki sonuçlar değerlendirilirken, toplanan diğer hastalarda DNA hasar çalışmaları gerçekleştirilemedi.

Dokulardan yapılan protein düzeyinde TG2 ve OGG1 ekspresyon çalışmalarında ise bazı pankreas kanserli hastaların eşlenik normal dokularından protein elde edilememesi nedeniyle sonuçlar değerlendirilememiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında ise pankreas adenokarsinom hücre hattı olan MiaPaca-2 hücre hattında OGG1 proteinin ekspresyonu, western blot yöntemi ile detekte edilememesi nedeniyle NFκB-OGG1-TG2 arasındaki olası ilişki bu hücre hattı üzerinden bu yöntem ile gösterilememiştir.

3.9 Veri Toplama Araçları

3.9.1 Demografik veri toplama

Pankreas kanserli hastaların demografik verileri Dokuz Eylül Üniversitesi Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim dalından elde edildi. Hastalara ait demografik veriler Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Hastaların Demografik Verileri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Evre
1	54	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2B
2	60	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
3	53	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
4	87	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
5	-	-	-	-
6	58	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
7	-	-	-	-
8	51	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
9	-	-	-	-
10	62	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
11	31	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
12	62	Erkek	-	-
13	-	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
14	-	Erkek	Pank.Adenokarsinom	1B
15	-	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
16	-	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
17	62	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2B
18	70	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2A
19	73	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2A
20	-	-	-	-
21	59	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
22	50	Kadın	Pank.Adenokarsinom	1B
23	70	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2B

24	67	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2A
25	43	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2A
26	70	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2B
27	60	Erkek	Pank.Adenokarsinom	3
28	55	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
29	-	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2A
30	-	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
31	64	Erkek	Pank.Adenokarsinom	1B
32	-	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2B
33	-	Erkek	Pank.Adenokarsinom	4
34	69	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2A
35	55	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2A
36	65	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
37	-	Erkek	Pank.Adenokarsinom	4
38	47	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
39	51	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
40	76	Kadın	Pank.Adenokarsinom	1A
41	64	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
42	59	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
43	68	Erkek	Pank.Adenokarsinom	1B
44	77	Erkek	Pank.Adenokarsinom	2B
45	53	Kadın	Pank.Adenokarsinom	2B

Proje kapsamında toplanan hasta dokularından 5'i patoloji sonucuna göre adenokarsinom tanısı almadığından çalışma dışı bırakıldı. Bu dokular 5, 7, 9 ve 12 ve 20 no'lu dokulardır. Bu dokular ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

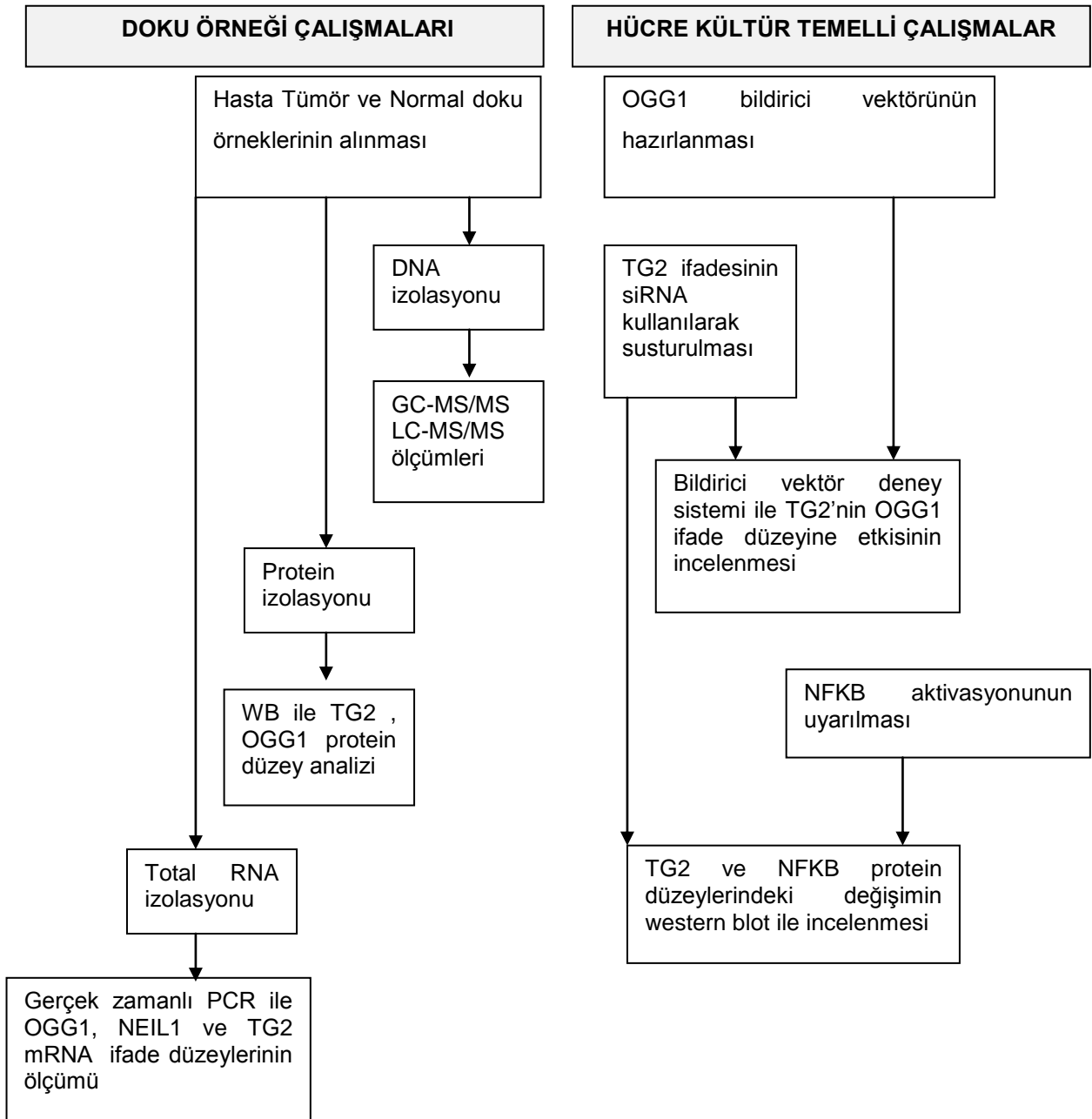
3.9.2 Örneklerin toplanması ve saklanması

Çalışma kapsamındaki pankreas dokularından DNA izolasyonu, RNA izolasyonu ve protein çalışmalarının her biri için yaklaşık 0.5g doku alındı. Toplam alınacak tümör dokusu ve tümör çevresinden normal olarak adlandırılan doku miktarı ise 1,5g düzeyinde alındı. Çalışma kapsamındaki dokularının dağılımı aşağıdaki gibidir:

1. DNA izolasyonu : 0,5g
2. RNA izolasyonu : 0,5g
3. Protein izolasyonu : 0,5g

Hastaların pankreas Normal dokuları N yanına doku numarası yazılarak (N1 gibi), tümör dokuları T yanına doku numarası (T1 gibi) yazılarak adlandırıldı. Bu dokular sıvı azot tankında 15 dakika dondurulduktan sonra -80 °C’de saklandı.

Çalışmamızın akış şeması aşağıda verilmiştir.



3.9.3 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Model
Saf su cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y
Santrifüj	Heraeus	Biofuge stratos
Otomatik pipet	Eppendorf	Eppendorf Research
Derin dondurucu	Thermo	VLT1740-5-V40
Spektrofotometre	PG	T80
Freeze-Dryer (Liyofilizatör)	FTS	Flexi-Dry
GC-MS/MS	Agilent Technologies	7000 GC/MS Triple Quad (pozitif elektron iyonizasyon moduna sahip)
Yüksek çözünürlüklü erimiş-silika kapiler kolon	Agilent Technologies	HP-Ultra 12.5 m, 0.2 mm, 0.33µm film kalınlığı
SpeedVac	Savant ISS 110	SC210A SpeedVac Plus ve RVT 4104 soğutulmuş buhar tuzağı
Real-Time PCR Cihazı	Roche	Light Cycler 2.0
Jel Elektroforez Sistemi	Thermo	EasyCast-B1
Güç Kaynağı	Thermo	EC 300 XL
Thermal Cycler	Eppendorf	Mastercycler personal
Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat	ECX
Buzdolabı	Uğur	USS 748 DIKL
Derin Dondurucu	Uğur	UFR 370 GD
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Stuart	SB162
Vortex	Labnet	-
Isıtıcı Blok	Daihan Wisd	HB-48
ELISA Okuyucu	Thermo	Varioskan
Su Banyosu	Daihan	Wisd
pH Metre	JP selecta	PH-2005
Hassas terazi	Precisa	XB 220A
HPLC Cihazı	Shimadzu	VP serisi
Spinner	Thermo	Espresso centrifuge
Laminar flow kabin	Nüve	LN90
Mikroskop	Euromex	OX.3125

3.9.4 DNA Hasar Çalışmaları

3.9.4.1 Pankreas Normal ve Tümör Dokularından DNA İzolasyonu

Pankreas tümör ve normal dokularındaki DNA hasarının belirlenebilmesi için 41 hastadan alınan tümör ve normal dokularından DNA izolasyonları yapıldı. DNA izolasyonu sırasında yöntemden kaynaklanan oksidasyon reaksiyonları, sonuçları yanlış pozitif yönde etkileyebileceği için DNA izolasyon yöntemi olarak tuzla çöktürme (salting-out/ NaCl) yöntemi tercih edildi. DNA hasar ölçümlerinin yapılması için örnekler National Institute of Standards and Technology (NIST)/MD'a gönderildi.

Dokudan Tuzla Çöktürme Yöntemi (Salting Out/NaCl) ile DNA İzolasyonu³⁶:

- Tümör ve normal dokuları -80°C'lik dondurucudan çıkarılıp buz içerisinde çözümleri sağlandıktan sonra, önce bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı.
- Qiagen Tissue Lyser cihazında 2 ml homojenizasyon tamponu (0.25M sukroz, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 7.4) içerisinde 3 dakika 30 Hz/s'de homojenize edildi.
- 12.000g'de +4°C'de 15 dakika santrifüjlendi.
- 2 ml liziz tamponu (10 mM Tris pH 8.2, 2 mM EDTA, 0.4M NaCl, 1% SDS) eklendi.
- Üzerine son konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde proteinaz K eklendikten sonra ile 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün lizatın üzerine hacminin ¼ ü kadar doymuş NaCl çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı.
- 12.000g'de +4°C'de 15 dakika santrifüjlendi.
- Supernatana 2,5 ml %96'lık soğuk etanol eklendi. -20°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- Pelet son konsantrasyonu 0,2 mg/ml olacak şekilde RNase içeren 1 ml TE tamponu içerisinde süspanse edildi.
- 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı.

- Son konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde proteinaz K içeren 1 ml liziz tamponu eklendi. 55°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Hacminin ¼ ü kadar doymuş NaCl çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı.
- 12.000g'de +4°C'de 15 dakika santrifüjlendi. DNA'yı çöktürmek için üzerine soğuk %96'lık etanol eklendi. -20°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- DNA peleti %80 etanol ile yıkandı ve DNA kurutuldu. Tamamen kurutulduktan sonra 300 µl distile suda çözüldü. 1 gün +4°C'de çözülmesi beklendi.
- Çözünen DNA, yaklaşık 1/100 oranında seyreltildikten sonra spektrofotometrik analizi yapıldı ve 260 nm'deki absorpsiyon kullanılarak kantite edildi. Safılık kriteri A260nm/ A280nm 1.8-2.0 olarak alındı.

3.9.4.2 GC-MS/MS ile DNA Baz Hasarı Ölçümü³⁶

- İzole edilen DNA pelletleri iki kez %70 etanol ile yıkandıktan sonra santrifüj edildi.
- Etanolün uzaklaştırılmasından sonra pelletler vakum altında Speed Vac'da kurutuldu. Ardından 48 saat +4°C'de 500 µL distile su içinde çözülmeye bırakıldı.
- Her bir DNA örneğinin absorpsiyon spektrofotometresinde 200 ile 350 nm dalga boyları arasında, DNA kalitesinden emin olmak ve DNA konsantrasyonunu doğru olarak belirlemek için UV spektrumu alındı.
- DNA örneklerine (50 µg) internal standartları (stabil izotop isaretili analoglar) eklendi. Bunların konsantrasyonları şu şekildedir:
FapyGua (40x): 1 µl; FapyAde (60x): 1 µl; 5OH-5MeHyd(10x):1 µl; 5OHUra (10x):1 µl; 5OHCyt(10x):1 µl; 5OHMeUra (10x):1 µl; ThyGly(10x):1 µl; 8-OHGua(20x):1 µl
- Bu internal standartlar eklendikten sonra 2 µg Fpg ve 2 µg Nth ilave edilerek 37 °C de 1 saat hidroliz edildi.
- Hidroliz evresinin sonunda alınan örneklerin üzerine 150 µl soğuk absolute etanol ilave edildi. Vortekslendikten sonra -20 °C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra örnekler +4 °C'de max hızda (~14,000xg) 30 dakika süreyle santrifüj yapıldı. Supernatant cam viallere aktarıldı. Speed vac'e konarak etanol uçuruldu (yaklaşık 45 dak). Örneklere 200 µl distile su ilave edilerek üzeri ince kağıt mendil ile kapatılarak sıvı nitrojen yada -80°C'de dondurularak gece boyunca 'freeze dryer' da kurutuldu.

- Ertesi gün kuruyan örneklerin üzerine 30 µl BSTFA(N,O,-bis(trimetilsilil)trifluoroasetamid) + 30 µl piridin eklendikten sonra nitrojen gazı altında (amaç oksijeni uzaklaştırmak) ağızları mühürlendi. 120 °C'ye ısıtılmış fırında 30 dakika türevlendirildi. Soğuduktan sonra örnekler birer enjeksiyon vialine (küçük şişe) aktarıldı. Bu şekilde GC-MS/MS'e enjekte edildi. GC-MS/MS ile tanımlandı. Belirleme ve miktar tayini için seçilmiş iyon monitorizasyonu, trimetilsilillenmiş 8-OH-Gua, FapyGua ve FapyAde ve diğer bazların izotop işaretli kararlı analoglarındaki karakteristik iyonların tanınmasında kullanıldı.

3.9.4.3 LC-MS/MS ile DNA Nükleozid Hasarı Ölçümü

- İzotop dilüsyonlu sıvı kromatografi/ kütle spektrometrisi ile DNA örneklerinde, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), R-siklodeoksiadenozin (R-cdA), S-siklodeoksiadenozin (S-cdA) modifiye nükleozidler belirlendi.
- Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA)'den nükleozidlerin internal standartları satın alındı.
- DNA örneği (50µg) üzerine internal standartlar eklendikten sonra nükleaz P1, yılan zehiri fosfodiesterazı ve alkalin fosfataz ile 24 saat hidroliz edildikten sonra LC/MS'de analiz edildi. Belirleme ve miktar tayini için seçilmiş iyon monitorizasyonu, modifiye nükleozidler ve onların izotop işaretli kararlı analoglarındaki karakteristik iyonların tanınmasında kullanıldı.

3.9.5 mRNA Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları

3.9.5.1 Pankreas Normal ve Tümör Dokularından Manuel Fenol Kloroform Yöntemi ile RNA İzolasyonu⁸⁷

- 100 ml liziz solüsyonu hazırlandı.
- Dokular -80 °C'den alınıp hızlıca tartım yapıldı.
- Doku miktarının 10 katı kadar olacak şekilde 2-merkaptetanol içeren PBS solüsyonu içinde Qiagen Tissue Lyser cihazında 20Hz/s'de 1.5 dakika homojenize edildi.
- Üzerine hazırlanan liziz solüsyonundan 500 µl eklendi ve iyice vorteks ile karıştırıldı.
- Üzerine 500 µl fenol eklendi ve iyice vorteks ile karıştırıldı.

- Karışımın üzerine 24:1 kloroform:izoamilalkol karışımından 200 µl eklendi ve iyice vorteks ile karıştırıldı.
- Karışım 15 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Buz ile bekletmenin ardından 10000g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
- DNaz I ile 1/50 oranında muamele edildi.
- Yeni tüpe alınan üst fazın üzerine 1 ml isopropanol eklendi. Tüp yavaşça alt üst edilerek RNA'nın çökmesi sağlandı.
- Tüp 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 10000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüjleme sonrasında tüpün dibinde gözlenen RNA peletinin kaldırılmamasına dikkat edilerek üst faz atıldı.
- RNA peleti üzerine % 80 etanol eklendi.
- 10000 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Santrifüjleme ardından dipteki gözlenen RNA peletinin kaldırılmamasına dikkat edilerek üst faz atıldı.
- İzolasyon tüpü 37 °C'de 1 saat bekletilerek tüp içerisinde RNA'nın kuruması sağlandı.
- Kurutulan peletin üzerine 50 µl distile su eklendi. Pipet yardımıyla pelet çözüldü.
- RNA'nın tam olarak çözülebilmesi için 55°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Elde edilen RNA örnekleri 1/20 seyreltikten sonra PG T80 Spektrofotometre cihazı yardımıyla 260 nm'de absorbansları ölçüldü. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.
- $C_{RNA} = A_{260nm} \times \text{Seyreltme faktörü} (20) \times 40 \mu\text{g/ml}$ RNA'nın saflığını ve miktar tayinini yapmak amacıyla spektrofotometrik ölçümü yapıldı. Saflık kriteri A_{260nm}/A_{280nm} 1.8-2.0 olarak alındı.

3.9.5.2 İzole Edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi⁸⁸

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla, RNA örnekleri % 1,2 formaldehit agaroz jelde 50V 30 dakika yürütüldü. % 1,2 formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. % 1,2 Formaldehit agaroz jel yönteminde kullanılan çözeltiler

10X Formaldehit (FA) Jel Tamponu	10 mM EDTA, pH 7,0 200 mM MOPS 50 mM Sodyum A setat
5X RNA Örnek Yükleme Tamponu	0,5 M EDTA pH 8,0 %37 Formaldehit %100 Gliserol Formamid 10X FA Jel Tamponu 40 µg/ml Etidyum Bromür
1X FA Yürütme Tamponu	50 ml 10X FA Jel Tamponu 10 ml % 37 Formaldehit 440 ml RNaz içermeyen dH ₂ O

% 1,2 Formaldehit Agaroz Jel Hazırlanması:

- 25 ml agaroz jel için bir erlene; 2.5 ml 10X FA jel tamponu, 22.5 ml RNaz içermeyen dH₂O ve 0.3 g agaroz koyuldu.
- Karışım eriyene kadar mikrodalga fırında 1-2 dakika kaynatıldı.
- Yaklaşık 65 °C'ye kadar soğutuldu.
- Üzerinde 450 µl %37 Formaldehit ilave edildi. 10 mg/ml lik Etidyum bromürden 1 µl eklendi.
- Elektroforez tankına karışım döküldü ve tarakları yerleştirildi.
- Jelin polimerleşmesi için beklendi.

RNA Örneklerinin Jele Yüklmesi:

- 2 µl 5X RNA örnek yükleme tamponu ile RNA örnekleri karıştırılarak her kuyucukta 2 µg RNA olacak şekilde hazırlandı.

- Hazırlanan örnekler 65°C’de 5 dakika inkübe edildi ve süre sonunda hızla buz içerisine alındı.
- Daha önce hazırlanan % 1,2 formaldehit agaroz jel, elektroforez sistemine yerleştirildi ve üzerine 1X FA yürütme tamponu eklendi.
- Taraklar jelde dikkatlice çıkarıldıktan sonra örnekler kuyucuklara yüklendi. 50 V sabit, 30dakika elektroforez sisteminde yürütüldü ve görüntüleme yapıldı.

3.9.5.3 *cDNA Sentezi*

Proje kapsamında alınan pankreas tümör ve normal dokularından izole edilen RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezleri, Fermentas RevertAid First strand cDNA Synthesis kiti (#K1622) ile yapıldı. Kit protokolü aşağıda belirtildiği gibi kullanıldı.

Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.

- Kalıp RNA 10 µl
- Primer Oligo (dT)₁₈ 1 µl
- DEPC’li H₂O ile 12 µl’ ye tamamlandı.
- Mix yavaşça karıştırıldı, 65 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Bu üzerine alındı. Çoklu reaksiyonlar için mix hazırlandı.
- 5x Reaction Buffer 4 µl
- Ribolock Rnase İnhibitor (20 U/ µl) 1 µl
- 10mM dNTP Mix 2 µl
- RevertAid M-MulV Reverse Transcriptase (200 U/ µl) 1 µl
- Total 20 µl
- Mix yavaşça karıştırıldı ve spin edildi. 42 °C’de 60 dakika inkübe edildi.
- Reaksiyon 70 °C’de 5 dakika inkübasyon ile sonlandırıldı.

Elde edilen cDNA örnekleri gerçek zamanlı PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı.

3.9.5.4 Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR çalışması OGG1, TG2 ve NEIL1 primerleri ile Light-Cycler Fast Start DNA Master^{Plus} SYBR Green I (roche 03 515 885 001) kiti kullanılarak Light-Cycler 2.0 (Roche) cihazında gerçekleştirildi.

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve relatif kantitasyon⁸⁹:

Hasta örneklerinin cDNA'ları, real time PCR cihazı (Roche – LightCycler 2.0) ile ilgili gen ürününün (OGG1, NEIL1 ve TG2) göreceli kantitasyonlarını belirlemek için kalıp olarak kullanılmıştır. Yaptığımız analiz; pankreas kanserli hastaların eşlenik normal grubuna göre göreceli değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır. Deneyde kullandığımız hastaların normal dokularına ait cDNA'lar kalibratör olarak deney sisteminde kullanılmıştır. Göreceli kantitasyonda, muamelelerden bağımsız ve bütün dokularda eşit eksprese olduğu kabul edilerek, β -actin gen ürünü referans gen olarak kullanılmıştır. Real time PCR cihazı ile göreceli kantitasyon işlemi, normal yani kalibratör olarak tanımlanan hedef gen değerleri 1 olarak kabul edilerek, deney gruplarındaki hedef genlerin mRNA düzeylerinin saptanması temeline dayanan bir testtir. İşlem cihazda gerçek zamanlı olarak amplifikasyonun belirlenmesi noktasında elde edilen ve crossing point (Cp) değeri olarak tanımlanan değerlerin orantılanması şeklinde gerçekleştirilmektedir. PCR reaksiyonunda kalıp miktarı ne kadar yüksek ise o kadar düşük bir Cp değeri elde edilir. Referans gen değeri deney koşullarından etkilenmeyecektir. Bu nedenle referans gen değeri kalibratör ve deney gruplarında normalize edilerek sonuç elde edilir. İşlem;

$$\text{Hedef gen normalizasyon değeri} = \frac{\text{Deney grubu hedef gen Cp değeri}}{\frac{\text{Deney grubu referans gen Cp değeri}}{\frac{\text{Kalibratör hedef gen Cp değeri}}{\text{Kalibratör referans gen Cp değeri}}}}$$

biçiminde formülize edilebilir.

Total RNA'lar izole edildikten sonra elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. Öncül primerler aracılığı ile PCR reaksiyonu kurulmuştur. "Oligos v 9.4" programı yardımı ile primerler dizayn edilmiştir. OGG1, TG2 ve NEIL1 primerleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. OGG1, TG2 ve NEIL1 Primer Dizileri ve PCR Ürün Büyüklüğü

Gen adı	Primer dizisi	PCR Ürün Büyüklüğü (bp/bç)
OGG1	F: 5'-TCC ACT GCA CTG TGT AAC GAG GA-3' R: 5'-AAA GGC ATT CGA TGG GGT CTT-3'	207
TG2	F: 5'-TATGGCCAGTGCTGGGTCTTCGCC-3' R: 5'-GGCTCCAGGGTTAGGTTGAGCAGG-3'	211
NEIL1	F: 5'-AGA AGA TAA GGA CCA AGC TGC-3' R: 5'-GAT CCC CCT GGA ACC AGA TG-3'	213
B-AKTİN	F: 5'-CCACACTGTGCCCATCTACG-3' R: 5'-AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG-3'	99

Gerçek zamanlı PCR çalışmaları Light Cycler ® 2.0 (Roche Diagnostics) cihazı ve Light Cycler Fast Start DNA Master ^{PLUS} SYBR Green 1 (Roche Diagnostics) kiti kullanılarak yapıldı.

Her bir hastadaki OGG1, TG2 ve NEIL1 ekspresyon düzeyini belirlemek için çalışmalar 3 defa tekrarlandı. Sonuçlar her bir hasta ve belirtilen 3 farklı gen için ayrı ayrı değerlendirildi. Üç tekrarlı gerçek zamanlı PCR çalışmaları sonucunda tümör dokularının normalizasyonu sonrası elde edilen kat ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerlerin ortalaması ve standart sapması hesaplanarak değerlendirildi. Tablo 9 ve 10'da sırasıyla OGG1/TG2 ve NEIL1 için kullanılan gerçek zamanlı PCR profili verilmiştir.

Tablo 9. OGG1/TG2 Gerçek Zamanlı PCR Profili

		Süre
Denatürasyon	1 döngü	S:dk:sn
	95 °C	00:10:00
Amplifikasyon	40 döngü	
	95 °C	00:00:10
	63 °C	00:00:10
	72 °C	00:00:20
Erime eğrisi	1 döngü	
	95 °C	00:00:00
	65 °C	00:00:15
	95 °C	00:00:00
Soğutma	1 döngü	
	40 °C	00:00:03

Tablo 10. NEIL1 Gerçek Zamanlı PCR Profili

		Süre
Denatürasyon	1 döngü	Hh:mm:ss
	95 °C	00:10:00
Amplifikasyon	40 döngü	
	95 °C	00:00:10
	66 °C	00:00:10
	72 °C	00:00:20
Erime eğrisi	1 döngü	
	95 °C	00:00:00
	65 °C	00:00:15
	95 °C	00:00:00
Soğutma	1 döngü	
	40 °C	00:00:03

Kalıp: Bu ekspresyon çalışmalarında kalıp olarak tüm hasta cDNA'ları ve negatif kontrol olarak da kalıp yerine su kullanıldı.

Reaksiyon Koşulları (OGG1/TG2)

- Primer: OGG1, TG2 ve β -aktin
- Reaksiyon bileşenlerinden aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenlerinden toplam 20 μ l'lik olacak şekilde çalışıldı.

Sybr green PCR Master mix: 4 μ l

Primer Mix (Forward+Reverse primer, 10 pmol): 2 μ l

Nükleaz içermeyen su: 12 μ l

Kalıp cDNA örneği: 2 μ l

- Reaksiyon sonrası ürünler %2'lik agaroz jelde 110 voltta 30 dakika yürütüldükten sonra görüntü alındı.

Reaksiyon Koşulları (NEIL1)

- Primer: NEIL1 ve β -aktin
- Reaksiyon bileşenlerinden aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenlerinden toplam 20 μ l'lik olacak şekilde çalışıldı.

Sybr green PCR Master mix: 4 µl

Primer Mix (Forward+Reverse primer, 10 pmol): 1 µl

Nükleaz içermeyen su: 14 µl

Kalıp cDNA örneği: 1 µl

- Reaksiyon sonrası ürünler %2'lik agaroz jelde 110 voltta 30 dakika yürütüldükten sonra görüntü alındı.

3.9.5.5 OGG1 Promotor Bölgesi Klonlanması⁸⁷

Lusiferaz bildirici vektör sisteminde kullanılmak üzere OGG1 promotor klonlanması yapıldı. OGG1 için referans DNA dizisi NG_012106.1'dir. Klonlanacak promotör bölgenin PCR ile çoğaltılmasına olanak verecek PCR primerleri manuel olarak dizayn edildi (Tablo 11.) Bidirici (reporter) vektörü olan pGL4.12 plazmidine klonlama amacıyla primerlerin 5' bölgelerine, forward primer için HindIII (Fermentas #FD0504), reverse primer için KpnI (Fermentas #FD0524) restriksiyon enzim (RE) bölgeleri eklendi. Böylelikle elde edeceğimiz PCR ürününün, restriksiyon enzim kesimi sonrasında vektörde oluşmuş olan yapışkan uçlar arasına yerleştirilebileceği planlandı.

Tablo 11. OGG1 Geni Promotör Bölgesi Klonlama Primer Dizileri

Primer	Dizi	Restriksiyon enzimleri	PCR ürün büyüklüğü
OGG1F	5' - 3' tgggacaagcttagcgggc	HindIII	741 bç
OGG1R	5' - 3' gccccgggtaccagaac	KpnI	

Altı çizili diziler RE kesim bölgeleridir.

Hücre kültüründen genomik DNA izolasyonu:

Genomik DNA izolasyonu, "DNeasy Tissue Isolation kit" (Qiagen #69508) kullanılarak yapılmıştır. Yöntem üretici firmanın belirttiği şekilde uygulanmıştır.

Gereçler:

- Standart masa üstü mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge,5417 R)
- 1.5 ml'lik DNase ve RNase içermeyen mikrosantrifüj tüpleri
- Fosfat tuz tamponu (PBS) (pH 7.2, 50mM potasyum fosfat;150 mM NaCl) (Biochrom AG, Kat No:L1825)
- Etil alkol (%96-100)(Merck, K35815971 610)
- Su banyosu (Pharmacia Biotech, Multi temp III)
- Karıştırıcı (VELP scientifica)
- ” DNeasy Tissue Isolation” kit (Qiagen #69508)

Kit içeriği:

- Filtre tüpleri
- 2 ml'lik toplama tüpleri
- AL Lizis Tamponu
- AW1 Yıkama Tamponu
- AW2 Yıkama Tamponu
- AE Elüsyon Tamponu
- Proteinase K

Yöntem:**i- Çalışma tamponlarının hazırlanması:**

Çalışmada kullanılacak tamponlar, üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlandı. Kullanmaya başlamadan önce AW1 yıkama tamponuna 25 ml, AW2 yıkama tamponuna 30 ml saf etil alkol eklendi.

ii- Genomik DNA izolasyonu:

1) Hücre kazıyıcı ile kültür kabı yüzeyinden kaldırılan hücreler 1,5 ml'lik eppendorf tüp içerisinde toplanır.

- 2) Tüp içerisine 20 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklendi.
- 3) Üzerine 200 µl AL lizis tamponu eklendi. Karıştırıcı kullanılarak, tüp içeriğinin (hücreler, proteinaz K ve lizis tamponu) iyice karıştırılması sağlandı.
- 4) Bu karışım su banyosunda 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
- 5) Üzerine 200 µl saf etil alkol eklendi. Karıştırıcı ile homojenize edildi.
- 6) Filtre kolonu, 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilerek, beşinci basamaktaki karışım filtre tüpünün içerisine eklendi. 6000 x g’ de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü, filtre tüpünden alta geçen sıvı ile birlikte atıldı.
- 7) Filtre kolonu, yeni bir 2 ml ’lik toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µl AW1 yıkama tamponu eklendi. 6000 x g’ de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü, filtre tüpünden alta geçen sıvı ile birlikte atıldı.
- 8) 500µl AW2 yıkama tamponu eklendi. 20000 x g’de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü, filtre tüpünden alta geçen karışım ile birlikte atıldı.
- 9) Filtre kolonu, yeni bir 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 10) Filtre kolonu membranı üzerine 200 µl AE elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Ardından 6000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi.
- 11) Filtrasyon kolonunda membrana bağlanmış olan DNA, 1.5 ml’lik yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

Klonlanacak DNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması:

MiaPACA-2 hücre hattı OGG1 promotor bölge klonlama için kullanıldı. Bu hücre hattından izole edilen genomik DNA PCR için kalıp olarak kullanıldı. Hücreden genomik DNA izolasyonu, 3.9.5.5 OGG1 klonlama bölümünde ii-Genomik DNA izolasyonu kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. PCR için yüksek doğruluklu bir DNA polimeraz enzim karışımı kullanıldı.

Yöntem:

1. 0.2 ml' lik tüp içerisinde Tablo 9'da verilen reaksiyon karışımları hazırlandı.
2. PCR tüpleri "Thermal Cycler" cihazına koyuldu ve Tablo 12'deki PCR içeriği ve tablo 13.'deki ısı profili kullanıldı.

Tablo 12. OGG1 Geni Promotor Bölgesinin Pgl4.12 Vektörüne Klonlama Amacı İle Yapılan PCR İçeriği

KİMYASAL	EKLENEN MİKTAR
dH ₂ O	10 µl
10XPCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100mM KCl, 50mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20mM MgCl ₂)	2.5 µl
MgCl ₂ solüsyonu (25mM)	1.5 µl
5'İleri Primer	1 µl
3'İleri Primer	1 µl
dNTP mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	2,5 µl
Fast Start Taq DNA Polymerase (Roche# 12032902001)	0.5 µl
MiaPaCa-2 DNA'sı (kalıp olarak)	1 µl
GC zengin solüsyon 5X kons.	5 µl
Toplam hacim	25 µl

Tablo 13. OGG1 Geni Promotor Bölgesinin Pgl4.12 Vektörüne Klonlama Amacı İle Yapılan PCR Isı Profili

Denatürasyon	95 °C	5 Dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	30 döngü
Bağlanma	58 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	40 saniye	
Son uzama	72 °C	7 Dakika	1 döngü

PCR reaksiyonu sonrasında ürün % 1'lik agaroz jelde aşağıda açıklandığı biçimde yürütülerek kontrol edildi.

Agaroz Jel Elektroforezi:

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforeze edilerek büyüklük ve amplifikasyonların özgülüğü açısından değerlendirildi.

Yöntem :

1. %2 'lik agaroz jel, 2 gram agarozun (Sigma A-5093) 100 ml 0,5 X TBE tamponunda (AppliChem A-4228.5000) çözülmesiyle hazırlandı.
2. Çözünen agarozun sıcaklığının düşmesi için kısa süre oda sıcaklığında beklendikten sonra, son konsantrasyonu 0,05µg/ml olacak şekilde etidyum bromid (SIGMA E7637-1G) eklendi.
3. Hazırlanan jel, jel döküm aparatına dökülerek, kuyuların oluşması için tarak yerleştirildi.
4. Soğuyan jelden tarak dikkatli biçimde çıkarılarak yüklemenin yapılacağı kuyular elde edildi.
5. Hazırlanan jel, içerisinde 0,5X TBE bulunduran elektroforez tankına yerleştirildi.
6. Elektroforeze edilecek örnekler, 6X jel yükleme tamponu (Thermo Scientific 6X Orange DNA loading dye R0631) ile karıştırılarak birbirlerine sızma olmayacak biçimde kuyulara yüklendi.
7. 10V/cm gerilim uygulanarak örneklerin elektroforeze olması sağlandı.
8. Örneklerin büyüklüklerinin saptanması için jelde örnekler ile eş zamanlı olarak moleküler ağırlık belirleyici de (MBI Fermentas SM0313) yürütüldü.
9. Elektroforez sonuçları görüntülendi.

OGG1 PCR ürününün ve pGL4.12 vektörünün restriksiyon enzim kesim reaksiyonları

Elde edilen OGG1 PCR ürünü ve pGL4.12 vektörü KpnI-HindIII enzimleri ile kesildi. KpnI-HindIII Restriksiyon Enzim Kesimi İçin Reaksiyon Karışımın İçeriği ve ısı profili sırasıyla tablo 14 ve 15'de verilmiştir.

Tablo 14. KpnI-HindIII Restriksiyon Enzim Kesimi İçin Reaksiyon Karışımın İçeriği

KİMYASAL	EKLENEN MİKTAR	
	pGL4.12	PCR ürünü
Kalıp	2 µl	15 µl
HindIII	1 µl	1 µl
KpnI	1 µl	1 µl
Enzim Tamponu	2 µl	2,5 µl
dH ₂ O	16 µl	5,5 µl
Toplam hacim	20 µl	25 µl

Tablo 15. KpnI-HindIII Restriksiyon Enzim Kesimi İçin Isı Profili

SICAKLIK	SÜRE
37°C	10 dak
65°C	5 dak

Restriksiyon enzim kesimi tamamlanan ürünler, kesim işleminin kontrolü için % 0,8' lik agaroz jelde yürütüldü. pGL4.12 vektörü kendi üzerine yapışmaları engellemek için fosfataz ile muamele edildi.

pGL4.12 lineerize vektörden fosfat gruplarının uzaklaştırılması:

Fosfat gruplarının uzaklaştırılması için, Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphotase (Thermo Scientific # EF0654) kullanıldı. Reaksiyon içeriği Tablo 16'da, reaksiyon ısı profili Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 16. Pgl4.12 Lineerize Vektörden Fosfat Gruplarının Uzaklaştırılması İçin Kurulan Reaksiyon Profili

KİMYASAL	EKLENEN MİKTAR
Lineer Plazmid	17 µl
10X Fast AP reaksiyon karışımı	2,5 µl
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphotase	1 µl
dH ₂ O	1,5 µl
Toplam hacim	25 µl

Tablo 17. pGL4.12 lineerize vektörden fosfat gruplarının uzaklaştırılması için reaksiyon ısı profili

SICAKLIK	SÜRE
37 °C	10 dak
75°C	15 dak

OGG1 promotor bölgesi PCR ürünü ve fosfataz ile muamele edilmiş vektör DNA'sı tekrar %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek, hedef bantlar jelden kazındı ve MN Nucleospin Extract II PCR Clean-Up kiti ile saflaştırıldı.

PCR ürünü ve pGL4.12 bildirici vektörünün agaroz jelden saflaştırılması:

Klonlama için kullanılacak vektör ve insert son olarak % 0.8'lik agaroz jelden kazındı ve saflaştırılması için MN Nucleospin Extract II PCR Clean-Up (Kat No:740 609.50) kiti kullanıldı.

Yöntem:

1. PCR bandını içeren agaroz jel, bantın sınırlarından kesilerek 1.5 ml'lik tüpe alındı.
2. Agaroz jel parçasının üzerine 200 µl NT tamponu eklendi. 50°C 'de inkübasyona konuldu. İnkübasyon süresince her 2 dakikada bir kez vortekslendi.
3. Homojen hale gelen agaroz-tampon karışımı kolona eklendi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. 600 µl NT 3 tampon eklendi ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Tekrar 11000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. Daha önceden 37°C 'de ısıtılan çekitleme (Elution) tamponundan 20µl eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Saflaştırılan ürünler % 0,8'lik agaroz jele yüklenerek kontrol edildi.

OGG1 PCR ürünü ile pGL4.12 vektörünün ligasyonu :

OGG1 opromotor bölge PCR ürünü ve pGL4.12 vektörü restriksiyon enzimleri ile kesilip saflaştırıldıktan sonra, Roche Rapid DNA ligation kiti (Roche 11 635 379 001) ile birleştirildi. Reaksiyon içeriği Tablo 18'de verilmiştir.

Yöntem:

Tablo 18. OGG1 PCR Ürününün Pgl4.12vektörüne Ligasyonu İçin Karışım İçeriği

KİMYASAL	EKLENEN MİKTAR
1X DNA dilüsyon tamponu	5 µl
Saflaştırılmış PCR ürünü	4 µl
pGL4.12 lineerize vektör	1 µl
Toplam hacim	10 µl

1. Karışımın üzerine 10 µl 2X DNA ligasyon tamponu eklendi ve karıştırıldı.
2. 1µl DNA ligaz enzimi eklendi. Karıştırıldı.
3. 25 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

Plazmid vektöre bağlanan OGG1 dizileri, kimyasal kompetan hücreye transformasyonu, oluşan kolonilerin seçilimi, miniprep plazmid DNA izolasyonu, ve maxiprep plazmid DNA izolasyonu aşağıda anlatıldığı biçimde yapıldı. Plazmid izolasyonu sonrasında elde ettiğimiz OGG1/pGL4.12 vektörünün doğrulanması amaçlı KpnI-HindIII restriksiyon enzim kesim reaksiyon sonucu örnekler %0,8'lik jelde yürütüldü. Seçilen koloniler DNA dizi analizi ile doğrulamasının yapılması için dizileme işlemine gönderildi. Gönderilen dizilerin doğrulukları, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq “Web sayfasından referans dizi ile karşılaştırılarak kontrol edildi. Oluşturduğumuz bildirici vektöründe referans diziye göre bir farklılık ve/veya mutasyon saptanmadı.

Plazmid DNA'ların kimyasal kompetan E.coli suşuna Transformasyonu⁸⁷:

Yöntem:

1. -80°C'den alınan kimyasal kompetan E.coli (Invitrogen One shot TOP10 #C4040-03) buz içerisine alındı ve kendiliğinden çözülmesi beklendi.
2. Ligasyon reaksiyon ürününden 2 µl alındı. Seri pipetleme ya da karıştırma yapılmadan kompetan hücreye nazikçe eklendi.
3. Karışım 30 dakika buz içerisinde bekletildi.
4. Ardından karışım 42 °C 30 saniye inkübe edildikten sonra yeniden 2 dakika buzda inkübe edildi.
5. Üzerine 250 µl oda sıcaklığına getirilmiş SOC (Super Optimal broth with Catabolite Repression) medium eklendi.
6. Transforme bakteri içeren tüp 200 rpm 'de 37° C ' de 1 saat sallamalı inkübatörde inkübe edildi.
7. İnkübasyonun ardından bakteri kültürü, seçim için kullanılan vektörde yer alan seçim genine göre (ör. Ampisilin direnç geni) seçici antibiyotik içeren LB agar bakteri plaklarına ekildi. 10µl ve 100µl olacak şekilde iki farklı hacimde ekim gerçekleştirildi.
8. Bakteri plakları 37 °C 'de bir gece inkübasyona bırakılarak kolonilerin oluşumu sağlandı.
9. Ertesi gün üreyen kolonilerin düzgün kenarlı ve tek tek bağımsız alanlar oluşturanlarından bir pipet ucu yardımı ile seçilerek 5ml seçici antibiyotikli LB içeren tüplere ekildi.
10. Tüpler 37 °C'de 150 rpm'de sallamalı inkübatörde 1 gece inkübasyona bırakıldı.
11. Ertesi gün üremenin olduğu 5ml LB solüsyonundan 2 ml alınarak miniprep DNA izolasyonu için kullanıldı.

Miniprep plazmid DNA izolasyonu:

Miniprep plazmid DNA izolasyonu için Macherey Nagel Nucleospin Plazmid

(Kat No: 740588.50) kiti kullanıldı.

Yöntem:

1. Üreyen bakteri solüsyonundan 2 ml alınarak 11000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
2. 250 µl A1 tampon eklenerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
3. 300 µl A3 tampon eklenerek tüp 6-8 kez alt üst edildi.
4. 11000 g'de 7 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant, kolona aktarıldı. 1 dakika 11000g'de santrifüj edildi.
6. Kolona, 50°C'ye ısıtılmış olan AW solüsyonundan 500 µl eklendi.
7. 11000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Membrana 600 µl A4 eklendi. 11000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Tekrar 11000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
10. Membrana 50 µl AE solüsyonundan eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra toplama tüpü yeni bir tüpe yerleştirildi.
11. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Miniprep plazmid DNA elde edildi.

Plazmid DNA'lar klonlama için kullanılan restriksiyon enzimler ile kesilerek doğru koloninin seçilimi kontrol edildi.

Maxiprep Plazmid DNA İzolasyonu:

Maxiprep plazmid izolasyonu için "Qiagen EndoFree Plazmid Maxi Kit (Kat No:12362) kullanıldı.

Yöntem:

1. Miniprep plazmid DNA izolasyonu için üretilen 5ml'lik başlangıç LB kültüründen 1 ml alınıp 200 ml ampisilin içeren LB ortamına ekildi. Bir gece 37°C'de çalkalayarak inkübe edildi.
2. Ertesi gün 6000 g 4 °C'de 15 dakika çevrilerek bakteriler çöktürüldü.
3. Bakteri pelleti 10 ml P1 tamponunda homojen olarak resüspanse edildi.
4. 10 ml P2 tamponu eklendi ve 4-5 kez alt üst ederek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
5. 10 ml 4°C'ye soğutulmuş P3 tamponu eklendi ve 4-6 defa alt üst ederek karıştırıldı.

Bakteri Lizatının Temizlenmesi:

1. Lizat filtreye eklendi. Oda sıcaklığında (15–25°C’de) 10 dak. inkübe edildi.
2. Filtrenin dış ucunun kapağı çıkarılıp şırıngaya takıldı ve hücre lizati filtreden geçirilerek 50 ml’ lik bir falkon tüpe aktarıldı.
3. 2,5 ml ER tamponu filtre edilen lizat üzerine eklendi. Tüp 10 kez aşağı yukarı çevirilerek karıştırıldı ve buzda 30 dakika inkübe edildi.

Plasmid DNA’nın Kolona Bağlanması, Yıkama ve Elde Edilmesi:

1. Kolon 10 ml Buffer QBT ile yıkandı.
2. Filtre edilen lizat kolona eklendi.
3. Kolon 2 defa 30 ml Buffer QC ile yıkandı.
4. Kolona bağlanmış durumda olan DNA 15 ml QN’de çözülerek elde edildi.

Plasmid DNA’nın Presipitasyonu, Yıkama ve Tekrar Çözülmesi:

1. Elde edilen DNA ve QN tamponu karışımının üzerine 10.5 ml (0.7 katı hacimde) oda sıcaklığında isopropanol eklenip karıştırılarak DNA çöktürüldü.
2. 5000 g’de 4°C’de 60 dakika santrifüj edildi.
3. Üst fazı dikkatlice çekildi.
4. DNA pelleti 5 ml oda sıcaklığında %70’lik etanol ile yıkandı.
5. 5000 g’ de 60 dakika çevirerek DNA çöktürüldü. Pellete zarar vermeden süpernatant döküldü.
6. Pellet oda sıcaklığında 20 dakika kurutularak Tris-EDTA’da çözüldü.
7. TE’de çözülen DNA solüsyonundan 0,2 µl alınıp 10 kat seyreltilerek spektrofotometrede miktar analizi yapıldı.

Hedef genlerin klonlandığı bütün plazmidlerin DNA dizileri, DNA dizi analizine gönderilerek kontrol edildi. Elde edilen DNA dizileri referans mRNA dizileri ile karşılaştırılarak, klonladığımız genlerde herhangi bir mutasyon olmadığı doğrulandı.

3.9.5.6 Dual Luciferaz Reporter Assay

Deney üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Gereçler:

- 1) PBS
- 2) PLB tamponu
- 3) GloMax™ 20/20 Luminometre
- 4) lusiferaz assay ajanı

Yöntem:

- Hücrelerin ortamları uzaklaştırılarak, PBS ile bir kez yıkandı.
- Kit içerisinde bulunan pasif lizis tampon (PLB) hazırlanarak 500µl her kuyuya (6 kuyulu kültür kabı için önerilen) eklendi. Hücreler 15 dakika karıştırıcıda PLB ile oda sıcaklığında muamele edildi.
- Kuyulardaki PLB pipetaj yapılarak 1.5 ml tüplere aktarıldı.
- Tüpler kaba hücresel partikülleri uzaklaştırmak amacıyla 12000g'de 30 saniye santrifüjlendi.
- Kit içerisindeki lusiferaz assay reagent hazırlanarak 100 µl bir tüpe alınmıştır. Üzerine 20 µl hücre lizati eklendi.
- GloMax™ 20/20 Luminometre kullanılarak firefly lusiferaz düzeyi (hazırlanmış olduğumuz reporter vektörlerden elde edilen) ölçüldü.
- Aynı tüpe 100µl Stop&Glo reagent eklenerek kotransfekte ettiğimiz internal kontrol pGL4.74'den kaynaklanan değer yine GloMax™ 20/20 Luminometre'de ölçüldü.
- Deney ve kontrol grupları ile hiç bir transfeksiyon işlemi yapılmamış normal hücrelerden de arka plan değerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler sonrasında, normalizasyon işlemi yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

3.9.6 Biyolojik Verilerin Klinik Evre ile Korelatif Çalışmaları

Graphpad Prism 5.03 Versiyonu kullanılarak DNA hasar sonuçları, ekspresyon çalışmaları ile hasta evreleri arasındaki ilişki araştırıldı.

3.9.7 Protein Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları

Pankreas tümör ve normal dokularından protein izolasyonu yapılarak TG2 ve OGG1 protein düzeyleri western blot yöntemi ile incelendi.

3.9.7.1 Pankreas Normal ve Tümör Dokularından Western Blot

Dokudan Homojenizasyon ve Lizat Hazırlama:

RIPA liziz tamponu:

- 50mM Tris-HCl pH 7.4
 - 150mM NaCl
 - 1mM EDTA
 - %1Nonidet P-40
 - %0.25 Na-deoksikolat
 - 1mM NaF
 - 1mM Na₃VO₄
 - 1XProteaz İnhibitör Kokteyli
-
- Çalışılacak dokular -80°C'den çıkartılıp, buz üzerine alındı.
 - Dokular havan içinde sıvı azot ile dondurularak neşter yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
 - Her bir örneğe hazırlanan RIPA liziz tamponundan 500 µl eklenerek havan eli yardımıyla iyice homojen hale getirildi.
 - Homojenize edilen her bir doku örneği ayrı bir ependorf tüpüne aktarıldı.
 - Homejenat pipet yardımıyla iyice karıştırıldı.
 - Homojenize edilen dokular buz üzerinde 15dk bekletildi, bu süreç içinde her 5dk da bir vortekslendi.
 - Tüpler maksimum hızda (15000rpm) +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi.
 - Süpernatantlar alikvatlar halinde tüplere ayrıldı ve -80°C'de saklandı.

SDS-PAGE:

Western blot çalışmaları için kullanılan jeller aşağıdaki miktarlarda hazırlandı.

% 10' luk SDS PAGE JEL:

- 2,3 ml çift distile su

- 1,3 ml % 40'lık Akrilamid bis akrilamid (29:1) solüsyonu
- 1,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8
- 50 µl % 10 SDS
- 50 µl % 10 Amonyum per sülfat çözeltisi (APS)
- 2 µl TEMED

% 5' lik YÜKLEME JELİ:

- 1,5 ml çift distile su
- 250 µl % 40' lık Akrilamid bis akrilamid (29:1) solüsyonu
- 250 µl 1,0 M Tris pH 6,8
- 20 µl % 10 SDS
- 20 µl % 10 Amonyum per sülfat çözeltisi (APS)
- 2 µl TEMED

- %10' luk SDS PAGE jel döküldü. Üzerine hava kabarcığı kalmaması için isopropanol eklendi. Polimerleşene kadar beklendi.
- Sonra %5 lik yükleme jeli döküldü.
- Tarak yerleştirildi.
- Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak çıkarıldı.

Yükleme:

Dokulardan elde edilen lizatlar jele yüklendi. Lizatlardan 30 µl yükleme yapıldı. 4x Laemmli yükleme tamponu (4x NuPage LDS # NP0008) ile karıştırıldı. Mikro santrifüj tüpleri ısı bloğu üzerinde 95°C' de 5 dak. inkübe edilerek proteinler denatüre edildi. Markerdan (biotechrabbit tricolor protein ladder # BR0900201) 5µl yüklendi. Örneklerle birlikte OGG1 pozitif kontrolü olarak Jurkat hücrelerinden aynı koşullarda elde edilen lizat yüklendi.

Yürütme:

Cell Signalling Tris-Glycine SDS Running Buffer (10X) (cat no:#4050) 70V 30 dakika 110 V' da 1 saat 20 dakika yürütüldü. Jel çıkartılarak blotlamaya geçildi.

Transfer:

- Jel büyüklüğünde PVDF membran kesildi. Membran metanol ile 1 dakika muamele edilerek aktive edildi.
- Towbin Transfer tamponu (25 mM Tris, 19,2 mM Glisin %20 metanol) ile membran, blot kâğıtları ve jel ıslatıldı.
- “Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” (Biorad - Katalog numarası: 170–3940) cihazına aşağıda belirtilen sırada kâğıt, membran ve jel yerleştirildi:
 - En alta ekstra kalın blot kâğıdı
 - Üzerine poliakrilamid jel
 - Üzerine membran
 - En üste ekstra kalın blot kâğıdı
- 15 V' da 45 dakika transfer işlemi yapıldı.

Bloklama: Bloklama, membran yıkama ve antikor hazırlanmasında kullanılan 1xTBST solüsyonu hazırlandı.

10xTBS:

- 100 mM Tris (pH: 8)
- 140 mM NaCl
- 500 ml hazırlandı. pH: 7.4'e ayarlandı. Kullanırken 1xTBS olarak hazırlandı.

1xTBST:

- %0,1 Tween 20 + TBS

- 1x TBS üzerine tween 20'den %0.1 olacak şekilde eklenerek 1xTBST hazırlandı.

Membran % 5 Süt tozu içeren 1xTBST içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bloklandı.

Membran +4 °C' de % 5 süt tozu, 1:1000 oranında primer antikor içeren TBST ile gece boyunca muamele edildi.

Membran üç kez 1xTBST ile yıkandı.

Membran oda sıcaklığında %5 oranında süt tozu ve 1:3000 oranında sekonder antikor içeren TBST içerisinde iki saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

Membran üç kez 1xTBST ile yıkandı ve görüntülemeye geçildi.

Görüntüleme:

- “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” kitinin peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı. Membran 5 dakika boyunca bu karışım içerisinde inkübe edildi.
- Bir poşet dosya içerisine alınıp kaset içerisine yerleştirildi.
- Kaset içerisine karanlık odada film yerleştirildi.
- Kullanılan antikoru göre gerekli görülen süre kadar film kaset içerisinde tutulup, görüntü elde edildi.

NOT: Protein bantı görülemediği durumlarda SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate kullanılarak görüntü alındı.

3.9.8 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.9.8.1 Pankreas Hücre Hattında (MiaPaca-2) TG2 siRNA Transfeksiyonu

Proje kapsamındaki siRNA çalışmalarının optimizasyonu MiaPaCa-2 (pankreas karsinom) hücre hattında yapıldı. TG2 ekspresyon baskılaması için 2 adet siRNA kullanıldı. İki siRNA ve kontroller Dharmacon firmasından alındı. Bunlardan ilki TG2 genine özgü 21 nükleotitlik bir dizidir (custom siRNA, 20 nmol). Diğeri ise ilgili genin 4 farklı bölgesine bağlanabilen oligonükleotidlerden oluşmaktadır (pool siRNA, 10nmol). TG2'nin baskılanmasına özgü siRNA dizilerinin yanı sıra negatif ve pozitif kontrol siRNA'lar da kullanıldı. Negatif kontrol olarak insanda bilinen hiçbir mRNA sekansına bağlanmayan siRNA (20 nmol), pozitif kontrol

olarak da floresan işaretli RISC-içermeyen siRNA (siGLO red transfection indicator, 5 nmol) kullanıldı. Floresan mikroskopunda görüntü alınarak transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi. Bu siRNA'ların transfeksiyonu için bir lipozom temelli transfeksiyon ajanı olan Dharmafect kullanıldı. Çalıştığımız MiaPaCa-2 hücre hattında en etkin transfeksiyonu mümkün kılan Dharmafect 2, transfeksiyon ajanı olarak tercih edilmiştir. Üç farklı optimizasyon çalışması yapıldı:

1. Optimizasyon: Belirli bir siRNA konsantrasyonunda transfeksiyon ajanının farklı miktarları uygulanarak etkin transfeksiyonu sağlayan ve toksik etki göstermeyen optimum transfeksiyon ajanı miktarı floresan mikroskobu ile belirlendi.
2. Optimizasyon: Optimum miktarı belirlenen transfeksiyon ajanı ile farklı TG2 siRNA konsantrasyonları uygulanarak etkin baskılanmanın gerçekleştirildiği siRNA konsantrasyonu gerçek zamanlı PCR ile belirlendi.
3. Her iki optimizasyon sürecinde de inhibisyonun etkinliği 48. ve 72. saatlerde western blot yöntemi ile protein düzeyinde kontrol edildi. Optimum baskılanma süresi western blot yöntemi ile belirlendi.

MiaPaCa-2 hücre hattında (pankreas karsinom hücre hattı) 1. optimizasyon çalışması, uygun miktarda hücre ekimi yapıldıktan sonra siGLO red transfeksiyon indikatörü konsantrasyonu 50nM olacak şekilde farklı miktarlarda Dharmafect 2 ile deneme gerçekleştirildi. Yöntemin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

3.9.8.1.1 1.Optimizasyon

3.9.8.1.1.1 Hücre Ekimi

96-kuyulu plate için önerilen 5000 hücre ekilmesi ve her bir well başına 0,2 µl transfeksiyon ajanı (Dharmafect) eklenmesidir. Çalışmaya göre daha büyük hacimler için yüzey alanı hesaplanarak uygun miktar belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada optimum Dharmafect miktarını belirleyebilmek için sabit konsantrasyonda siRNA kullanılarak üç farklı miktarda Dharmafect ile deneme yapıldı. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği floresan mikroskobu altında 6-well plate kuyucuklarına her bir örnek için paralel olacak şekilde 80.000 hücre ekildi. 2, 5, 10 µl olmak üzere farklı Dharmafect miktarları ile çalışıldı.

1. Hücreler tripsinize edildi, sayıldı.
2. 2 adet 6-well plate kuyucuk başına 70.000 hücre olacak şekilde DMEM ortamı içinde ekildi. (2'şer adet 3 farklı miktarda transfeksiyon ajanı ve 2 adet hiçbir muamele görmemiş hücre)

3. 1,8 ml ortam içinde bir gece 37°C'de, %5 CO₂'de bekletildi.

3.9.8.1.1.2 Transfeksiyon

Hücreler plate yüzeyine yapıştıktan sonra transfeksiyon işlemine geçildi. Pozitif kontrol olan floresan işaretli RISC-içermeyen siRNA (siGLO red transfection indicator, 5 nmol) kullanıldı. 5 nmol siGLO red siRNA 1ml RNaz içermeyen su içinde çözülerek 5 µM ana stok hazırlandı. Hazırlanan ana stoktan 2 ml serumsuz ortam içinde 50 nM olacak şekilde siRNA alındı. (20 µl).

5000nM. x =50nM. 2000 µl

$$x = 20 \mu l$$

Herbir kuyucuk başına 20 µl siGLO red siRNA 80 µl serumsuz ortam olacak şekilde karışım hazırlandı. Ayrıca hiçbir muamele görmemiş hücreler dışındaki her iki kuyucuk başına 2, 5, 10 µl Dharmafect 2 olacak şekilde transfeksiyon ajanı toplam 100 µl serumsuz ortam içinde hazırlandı. Hazırlanan karışımlar 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. siGLO Red siRNA ve transfeksiyon ajanları karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından her bir kuyucuğa 200'er µl siRNA+transfeksiyon ajanı karışımlarından damlatarak dağıtıldı. Böylece transfeksiyon gerçekleştirilmiş oldu. Bir gece 37°C'de, %5 CO₂'de bekletildi.

24 saat sonra ortam değiştirilmeden flouresan mikroskobu altında inceleme yapıldı.

3.9.8.1.2 2.Optimizasyon

3.9.8.1.2.1 Hücre ekimi

Bu çalışma optimum siRNA konsantrasyonunu belirlemek için yapıldı. 1.optimizasyonda belirlenen transfeksiyon ajan miktarı (2 µl) sabit tutularak 10, 25, 50 ve 100 nM olmak üzere 4 farklı konsantrasyon için deneme yapıldı. 1. Optimizasyon çalışmasında olduğu gibi 70.000 hücre 6 well plate kuyucuklarına 1,8 ml ortam içine ekildi. Bir gece 37°C'de, %5 CO₂'de bekletildi.

3.9.8.1.2.2 Transfeksiyon

24 saat sonra hücreler plate yüzeyine yapıştı ve transfeksiyona hazır hale geldi. TG2 geninin baskılanması için TG2 genini baskılayacak iki farklı siRNA (pool siRNA (10nmol), custom siRNA (20nmol)) 4:1 oranında karıştırılarak çalışıldı. Pool siRNA TG2'yi hedef alan 4 farklı dizi içermektedir. Custom siRNA ise bir diziden oluşmaktadır. Her iki siRNA ve Negatif kontrol siRNA (20 nmol) ana stoğu 20 µM olacak şekilde hazırlandı. Pool+custom siRNA 10, 25, 50 ve 100 nM olacak şekilde paralel çalışıldı. Negatif kontrol siRNA 50 nM olacak şekilde kullanıldı. Hiçbir muamele görmemiş hücreler de aynı koşullarda çalışıldı. Toplam 12

kuyucukta çalışılmış oldu. Her bir kuyucukta transfeksiyon ajanı 2 µl olacak şekilde koyuldu. Transfeksiyon koşulları 1. Optimizasyon yapıldığı gibi gerçekleştirildi. Bir gece 37°C’de, %5 CO₂’de bekletildi.

24 saat sonra her bir kuyudaki hücreler ayrı ayrı scraper ile kazınarak alındı. 5 dk 1200 rpm’de santrifüjlendi. PBS ile bir defa yıkandı. MN nucleospin RNA izolasyon kiti kullanılarak 12 örnek için RNA izolasyonu yapıldı. Fermentas Revertaid cDNA sentez kiti kullanılarak da cDNA sentezleri yapıldı. Ardından TG2 primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PCR yöntemi ile ekspresyon düzeyine bakıldı.

3.9.8.1.2.3 Gerçek Zamanlı PCR

Reaksiyon bileşenlerinden aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenlerinden toplam 20 µl’lik olacak şekilde çalışıldı.

- Sybr green PCR Master mix: 4 µl
- Primer Mix (Forward+Reverse primer, 10 pmol): 1 µl
- Nükleaz içermeyen su: 12 µl
- Kalıp cDNA örneği: 3 µl

Reaksiyon sonrası ürünler %2’lik agaroz jelde 110 voltta 30 dakika yürütüldükten sonra görüntü alındı. TG2 ekspresyon düzeyini belirlemek için kullanılan gerçek zamanlı PCR profili Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 19. Gerçek Zamanlı PCR Profili

		Süre
Denatürasyon	1 siklus	Hh:mm:ss
	95 °C	00:10:00
Amplifikasyon	35 siklus	
	95 °C	00:00:10
	63 °C	00:00:10
	72 °C	00:00:20
Erime eğrisi	1 siklus	
	95 °C	00:00:00
	65 °C	00:00:15
	95 °C	00:00:00
Soğuma	1 siklus	
	40 °C	00:00:03

3.9.7.1.3. Optimizasyon

TG2'nin baskılanma etkinliği 48. ve 72. saatlerde western blot yöntemi ile protein düzeyinde kontrol edildi. Bu optimizasyon çalışmasında optimum baskılanma süresi belirlendi. 25 cm²'lik flask kullanıldı. Her bir koşul için 2 adet 25 cm²'lik flaska 200.000 hücre 2,8 ml ortam içerisinde ekildi. Gerçek zamanlı PCR çalışmasında 100 nM pool TG2 siRNA konsantrasyonu optimum olarak seçildi. Transfeksiyon 25 cm²'lik flask başına 5 µl transfeksiyon ajanı gelecek şekilde yapıldı. Daha önce 6-well de optimize edilen miktarlar (hücre, transfeksiyon ajanı) 25 cm²'lik flaska göre hesaplanarak yeni miktarlar belirlendi. Örnekler aşağıdaki gibidir:

- Hiçbir muamele görmemiş 2x25 cm²'lik flask 72 saat
- 100 nM negatif kontrol siRNA 2x25 cm²'lik flask 72 saat
- 100 nM TG2 pool siRNA 2x25 cm²'lik flask 48 saat
- 100 nM TG2 pool siRNA 2x25 cm²'lik flask 72 saat

2,8 ml ortam içindeki hücreler üzerine 200 µl serumsuz ortam içindeki siRNA+transfeksiyon ajanı karışımları eklendi. Pool siRNA ile çalışılan flasklardaki hücreler 48 ve 72. saatlerde toplandı. Negatif kontrol ve hiçbir muamele görmemiş hücre flaskları ise sadece 72. saatte toplandı. Western blot yöntemi ile TG2 geninin baskılanıp baskılanmadığını göstermek için hücreler her bir örnek için çalışılan 2'şer adet flask birleştirilerek lizat haline getirildi ve -80 °C'de saklandı.

3.9.8.2 Western Blot

MiaPaCa-2 hücrelerinde 100 nM TG2 siRNA baskılanma etkinliği 48. ve 72. saatler için western blot yöntemi ile gösterildi. TG2'nin baskılandığı örneklerde NFκB fosfoprotein düzeyine bakıldı. Örnekler aşağıdaki gibidir.

- Hiçbir muamele görmemiş 72 saat hücreleri (Non-treated)
- 100 nM negatif kontrol siRNA 72 saat hücreleri (Negatif kontrol)
- 100 nM TG2 pool siRNA 2x25 cm²'lik flask 48 saat (48h siRNA)
- 100 nM TG2 pool siRNA 2x25 cm²'lik flask 72 saat (72h siRNA)

Lizat Hazırlama:

Örnekler PYLB liziz tamponu ile lize edildi. Ardından BCA protein tayin yöntemi kullanılarak protein miktarları belirlendi.

PYLB

Sodyum Pirofosfat (NaPPi).....2,23 g

Sodyum Florür (NaF).....1,05 g

5M NaCl.....5 ml

0,5M EDTA.....5 ml

1M Hepes.....25 ml

Triton-X.....5 ml

H₂O.....500 ml'ye tamamlandı. pH=7,5'e ayarlandı. Proteaz ve fosfataz İnhibitörleri PYLB hazırlandıktan sonra taze eklendi.

1 ml Liziz Tamponu için:

PYLB.....934 µl

100mM PMSF.....10 µl

2 mg/ml Aprotinin.....7,5 µl

2 mg/ml Leupeptin.....7,5 µl

25x Complete Mini EDTA-free.....40 µl

1M Na₃VO₄.....1 µl

- Yüzeye bağımlı hücreler hücre kazıyıcısı kullanılarak kaldırıldı.
- Bir kez PBS (phosphate tamponed saline) ile yıkandı.
- 400 g' de, 4 °C' de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü.

- Üst faz dikkatlice çekildi.
- Pellet üzerine üç katı hacminde lizis tamponu eklendi.
- 10 Dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- Her 10 dakika sonrası kuvvetlice vortekslendi.
- Bu işleme 30 dakika devam edildi.
- 20 dakika en yüksek hızda (20000 g) 4 °C' de santrifüjlendi.
- Üst faz önceden buzda soğutulmuş üç adet mikrosantrifüj tüpüne aliatlandı.
- Lizat kullanılana kadar - 80 °C' ye kaldırıldı.

SDS-PAGE:

3.6.7 Protein Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları bölümünde belirtildiği gibi %10'luk SDS-PAGE ve %5'lik yükleme jeli aynı koşullarda hazırlandı.

Protein Tayini:

Hücrelerden protein tayini Pierce™ BCA Protein Assay Kit ile yapıldı (cat no:23227) 562 nm'de kolorimetrik olarak absorbans ölçüldü. Konsantrasyonu bilinen BSA standartların 562 nm' de verdiği absorbanslardan yararlanılarak standart grafiği çizildi. Böylece konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları, BSA standart grafiğinin eğiminden hesaplandı. ($y=0,878x+0,098$). Belirlenen protein miktarlarına göre hesap yapılarak 30 µg protein olacak şekilde hazırlanan SDS-PAGE jeline yükleme yapıldı. NEB marker ColorPlus™ Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa) kullanıldı (cat no. P7711S).

Yükleme:

Örnekler 30 µg protein olacak şekilde lizat miktarı kadar 2x Laemmli yükleme tamponu (2x Laemmli Sample Buffer #161-0737) ile karıştırıldı. Mikro santrifüj tüpleri ısı bloğu üzerinde 95°C' de 5 dak. inkübe edilerek proteinler denatüre edildi. Jele örnekler ve marker (10 µl) yüklendi.

3.6.7 Protein Düzeyinde Ekspresyon Çalışmaları bölümünde belirtildiği gibi Yürütme, Transfer, Bloklama ve Görüntüleme aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.10 Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 09.02.2012 tarihli ve 2012/04-24 karar no ile alınan ilk etik kurul ile birlikte 05.08.2014 tarihli ve 234/2009-GOA protokol numaralı 2014/18-27 karar numarası ile tez adı değişikliği nedeniyle alınan son etik kurul onayı EK-1'de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 DNA Hasar Çalışmaları Bulguları

DNA hasar çalışmaları için pankreas tümör ve normal dokularından öncelikle DNA izolasyonları gerçekleştirildi. İzole edilen DNA örnekleri hasar ölçümlerinin yapılabilmesi için NIST/MD'de gönderildi. Örneklerdeki baz ve nükleozid hasar ölçümleri yapıldı.

4.1.1 Pankreas Tümör ve Normal Dokularından DNA İzolasyon Bulguları

İzolasyonu yapılan 29 hastanın DNA hasar ölçümleri NIST/MD'de gerçekleştirilmiştir. Tuzla çöktürme yöntemiyle izole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak elde edilen değerler ile belirlenmiştir. Saflık kriteri A_{260nm} / A_{280nm} 1,8-2,0 olarak alındı.

250 µl distile suda çözülen DNA örnekleri spektrofotometredeki absorban ölçümü için 1/100 oranında seyreltildi (5 µl DNA/495 µl distile su). Spektral analizi yapılan DNA örneklerinin miktar ve saflığı Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. DNA Örneklerinin Miktar ve Saflığı

Örnek No	OD _{260nm}	OD _{280nm}	OD _{260/280nm}	OD _{260nm} *50*100 (µg/ml)	DNA Miktarları(µg)
N1	0.008	0.003	2.442	40.176	10
T1	0.282	0.169	1.663	1407.924	415
N2	0.183	0.100	1.829	916.758	224.6
T2	0.060	0.032	1.866	297.512	87.8
N3	0.177	0.102	1.729	884.661	261
T3	0.044	0.024	1.793	218.746	64
N4	0.064	0.038	1.672	320.131	94
T4	0.040	0.022	1.853	199.410	59
N6	0.019	0.012	1.627	97.117	29
T6	0.096	0.052	1.838	481.362	142
N8	0.081	0.047	1.732	404.541	119
T8	0.018	0.013	1.431	90.823	27
N10	0.038	0.025	1.505	190.865	56
T10	0.013	0.007	1.798	62.204	19
N11	0.177	0.094	1.885	885.176	216.9
T11	0.044	0.025	1.784	220.849	65
N12	0.030	0.020	1.489	150.223	42
T12	0.043	0.028	1.526	216.341	64
N13	0.691	0.378	1.830	3455.312	1019

T13	0.067	0.049	1.361	336.555	99
N14	0.294	0.179	1.643	1417.868	347.4
T14	0.213	0.120	1.775	1066.844	314
N15	0.325	0.187	1.740	1624.855	480
T15	0.119	0.073	1.626	594.224	175
N16	0.246	0.138	1.780	1231.965	363
T16	0.149	0.089	1.680	745.534	220
N17	0.352	0.198	1.774	1760.723	520
T17	0.197	0.110	1.799	986.558	291
N18	0.390	0.225	1.737	1951.029	478.0
T18	0.258	0.146	1.761	1288.550	315.7
N19	0.552	0.305	1.811	2760.750	676.4
T19	0.303	0.177	1.710	1515.034	371.2
N21	0.300	0.156	1.282	999.270	294,7
T21	0.634	0.404	1.569	3169.576	935
N22	0.143	0.121	1.186	716.729	211,4
T22	0.257	0.188	1.365	1282.932	378,4
N23	0.838	0.513	1.634	4189.723	1235,9
T23	0.337	0.236	1.430	1684.314	496,8
N24	0.666	0.416	1.599	3329.128	982,3
T24	0.495	0.324	1.527	2475.357	730,2
N25	0.342	0.236	1.446	1707.726	503,7
T25	0.192	0.146	1.316	961.461	283,6
N26	0.148	0.124	1.187	737.926	217,7
T26	0.297	0.215	1.381	1484.284	437,9
T27	0.163	0.133	1.232	816.671	240,9
N28	0.120	0.108	1.110	602.014	177,6
T28	0.248	0.184	1.366	1238.832	365,3
N29	0.422	0.287	1.472	2110.393	622,5
T29	0.227	0.174	1.305	1135.243	334,9
N30	0.272	0.199	1.368	1359.061	400,9
T30	0.470	0.317	1.498	2349.910	693,2
N31	0.188	0.150	1.253	940.990	277,5
T31	0.165	0.134	1.230	823.979	243
N32	1.093	0.663	1.649	5462.607	1611,4
T32	0.365	0.281	1.299	1825.034	538,3
N33	0.150	0.126	1.190	750.884	221,5
T33	0.239	0.186	1.284	1194.524	352,3

4.1.2 DNA Hasar Ölçüm Bulguları

Doku örneklerinin GC-MS/MS ile alınan DNA baz (8-OHGua, FapyGua, FapyAde, ThyGly ve 5-OH-5-MeHyd,5-OHCyt) hasar ölçüm değerleri Tablo 21’de, LC-MS/MS ile alınan nükleozid (8-OHdG, R-cdA ve S-cdA) hasarı ölçüm değerleri ise Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo 21. Pankreas Tümör ve Normal Dokularında GC-MS/MS İle Ölçülen Baz Hasarı Değerleri

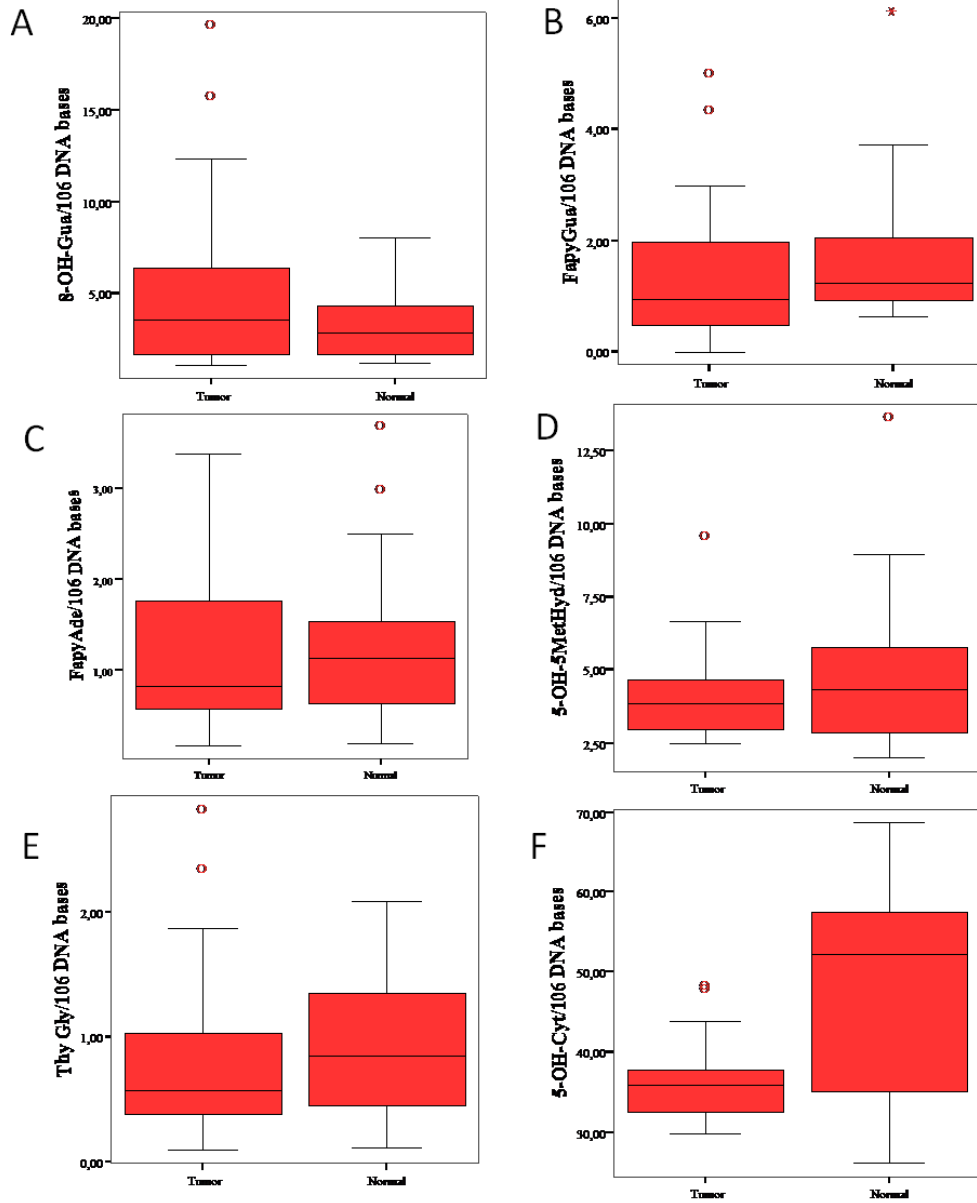
Pancreas tumours		5OH5MeHyd	ThyGly	FapyAde	FapyGua	8-OHGua	5-OHCyt
GC-MS/MS		/106 DNA bases	/106 DNA bases	/106 DNA bases	/106 DNA bases	/106 DNA bases	/106 DNA bases
T Tumours	T						
GK68s1	T1	1,88	0,63	0,47	1,28	11,95	
GK68s2	T2	2,27	2,88	1,77	3,46	10,35	
GK68s3	T3	3,03	1,68	1,30	2,60	8,31	
GK68s4	T4	4,17	4,33	2,32	5,83	15,23	
GK68s5	T6	2,53	3,60	1,18	2,63	6,62	
GK68s6	T10	2,84	3,60	2,48	5,05	18,92	
GK68s7	T11	4,06	2,30	1,68	3,20	9,49	
GK68as2	T13	1,99	0,54	0,62	1,17	5,66	
GK68as3	T14	2,20	0,13	0,52	0,23	3,41	
GK68as4	T15	2,03	0,88	1,09	1,37	5,02	
GK68as5	T16	2,18	1,05	1,70	1,74	5,19	
GK68as6	T17	2,22	1,75	1,29	2,89	5,62	
GK84sa5	T18	4,03	2,14	2,76	3,93	8,09	
GK84sa7	T19	5,82	2,29	1,05	3,34	4,53	
GK128s1	T21	4,36	0,30	0,30	0,26	5,03	35,97
GK128s2	T22	2,96	0,30	0,59	0,47	3,29	43,89
GK128s3	T23	9,59	0,39	0,83	0,00	2,17	37,79
GK128s4	T24	4,73	0,30	0,18	0,74	1,99	33,29
GK128s5	T25	4,49	0,27	0,48	0,42	1,66	34,59
GK128s6	T26	3,76	0,44	0,42	0,47	1,61	48,39
GK128s8	T28	3,92	0,97	0,58	0,30	1,69	29,88
GK128s9	T29	6,68	0,25	1,11	0,83	1,93	36,98
GK128s10	T30	3,58	0,60	0,27	0,44	1,44	32,63
GK128s11	T31	4,63	0,70	0,63	0,67	1,10	32,26
GK128s12	T32	4,82	0,42	0,63	0,94	1,51	36,05
GK128s13	T33	4,74	0,45	0,92	0,60	1,62	47,95
GK200-1s2	T34	2,02	1,40	0,48	0,79	20,4	14,40
GK200-1s4	T36	8,55	0,44	0,11	0,41	5,0	26,62
GK200-1s6	T37	2,61	1,33	0,40	1,11	6,1	29,99

N Normals	N						
GK68s8	N3	2,18	2,32	1,84	2,12	5,97	
GK68s9	N4	3,70	2,06	1,58	3,59	6,85	
GK68s10	N8	3,39	2,96	2,70	1,39	3,57	
GK68s11	N10	6,78	1,00	0,15	1,29	7,76	
GK84sa2	N11	20,70	4,92	2,19	4,46	5,30	
GK68as8	N13	2,09	0,50	0,85	0,80	4,47	
GK84sa3	N14	4,95	4,14	3,08	5,16	11,16	
GK68as9	N15	1,66	1,30	0,77	2,28	3,92	
GK68as10	N16	2,16	0,69	0,51	0,88	3,83	
GK68as11	N17	2,60	0,62	0,89	1,74	4,31	
GK84sa4	N18	3,59	1,55	1,01	2,67	5,16	
GK84sa6	N19	3,03	2,64	1,34	3,89	4,58	
GK128s14	N21	2,65	0,59	0,54	0,64	3,38	26,2
GK128s15	N22	5,00	0,44	0,52	0,90	1,18	33,8
GK128s16	N23	3,63	2,08	1,58	3,73	1,95	36,4
GK128s17	N24	2,84	0,26	0,58	1,15	1,69	31,5
GK128s18	N25	4,13	0,11	0,53	2,27	1,58	52,2
GK128s19	N26	4,88	1,01	0,74	1,04	1,51	43,8
GK128s20	N28	6,42	0,74	0,44	0,67	1,46	59,1
GK128s21	N29	6,03	1,76	1,21	2,14	2,70	56,0
GK128s22	N30	5,52	0,87	1,50	0,71	1,52	62,3
GK128s23	N31	6,20	0,40	1,40	0,91	2,98	55,6
GK128s24	N32	6,00	1,26	2,98	6,11	3,51	68,6
GK128s25	N33	5,26	0,91	1,10	1,26	1,40	52,4
GK200-1s3	N34	7,20	18,3	1,11	1,01	5,9	18,3
GK200-1s5	N36	12,99	21,3	1,29	1,89	4,8	21,3
GK200-1s7	N37	0,57	47,6	1,72	6,82	9,0	47,6

Tablo 22. Pankreas Tümör ve Normal Dokularında LC-MS/MS İle Ölçülen Nükleozid Hasarı Değerleri

	tumor	R-cdA /10 ⁶ bases	S-cdA /10 ⁶ bases	8-OH-dG /10 ⁶ bases		normal	R-cdA /10 ⁶ bases	S-cdA /10 ⁶ bases	8-OH-dG /10 ⁶ bases
GK68e1	T1	0,0025	0,0002	18,3763	GK68e8	N3	0,004	0,013	19,568
GK68e2	T6		0,0025	17,5811	GK68e9	N4	0,001	0,005	9,218
GK200s10	T13	0,451	0,260	5,490	GK68e10	N8	0,007	0,002	17,882
GK68e4	T14	0,0012	0,0016	15,9434	GK68e11	N10	0,003		15,902
GK68e5	T15	0,0003	0,0025	11,6803	GK84s3	N11	0,000	0,004	12,218
GK68e6	T16	0,0007	0,0003	22,2149	GK68e12	N13	0,007	0,009	13,932
GK68e7	T17	0,0021	0,0037	18,9020	GK84s4	N14	0,005	0,004	25,310
GK84s6	T18	0,0009	0,0042	11,6919	GK68e13	N15	0,002	0,007	9,483
GK84s8	T19	0,0016	0,0041	19,2275	GK68e14	N16	0,008	0,011	16,008
GK128s3	T21	0,0000	0,0728	7,6906	GK68e15	N17	0,001	0,001	15,030
GK128s4	T22	0,0000	0,0003	11,0366	GK84s5	N18	0,000	0,002	11,880
GK128s5	T23	0,0000	0,0002	13,4019	GK84s7	N19	0,020	0,001	6,179
GK128s6	T24	0,0010	0,0017	8,9019	GK128s16	N21	0,000	0,000	8,227
GK128s7	T25	0,0004	0,0018	14,1738	GK128s17	N23	0,002	0,005	12,402
GK128s8	T26	0,0001	0,0015	9,1862	GK128s18	N24	0,001	0,001	9,347
GK128s9	T27	0,0005	0,0000	2,3855	GK128s19	N25	0,000	0,000	7,648
GK128s10	T28	0,0001	0,0534	8,5095	GK128s20	N26	0,000	0,000	6,753
GK128s11	T29	0,0002	0,0008	7,0678	GK128s21	N29	0,000	0,000	10,379
GK128s12	T30	0,0005	0,0003	11,3334	GK128s22	N30	0,001	0,001	6,198
GK128s13	T31	0,0022	0,0008	15,3461	GK128s23	N31	0,001	0,000	12,193
GK128s14	T32	0,0005	0,0022	12,7241	GK128s24	N32	0,009	0,006	11,707
GK128s15	T33	0,001	0,000	12,432	GK128s25	N33	0,001	0,000	12,568
GK200s3	T34	0,015	0,105	9,395	GK200s4	N34	0,100	0,121	12,218
GK200s5	T36	0,000	0,115	6,291	GK200s6	N36	0,030	0,159	25,310
GK200s7	T37	0,043	0,089	6,231	GK200s8	N37	0,169	0,277	11,880

Pankreas kanserli hastalardan alınan tümör ve eşlenik normal doku örneklerinde, GC-MS/MS tekniği ile 5-OH-5-MeHyd, FapyAde, FapyGua, ThyGly, 8-OHGua ve 5-OHCyt DNA baz hasarları incelendi. Pankreas kanseri hastalarından alınan tümör ve eşlenik normal doku örneklerinde LC-MS/MS tekniği ile R-cdA, S-cdA ve 8-OH-dG DNA nükleozid hasarları incelendi. DNA hasar ölçümlerinin istatistiksel analiz sonuçları SPSS 15.0 programı kullanılarak Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapıldı. DNA baz ve nükleozid hasarı sonuçlarına ait grafikler aşağıda verilmiştir (şekil 13. ve şekil 14.).

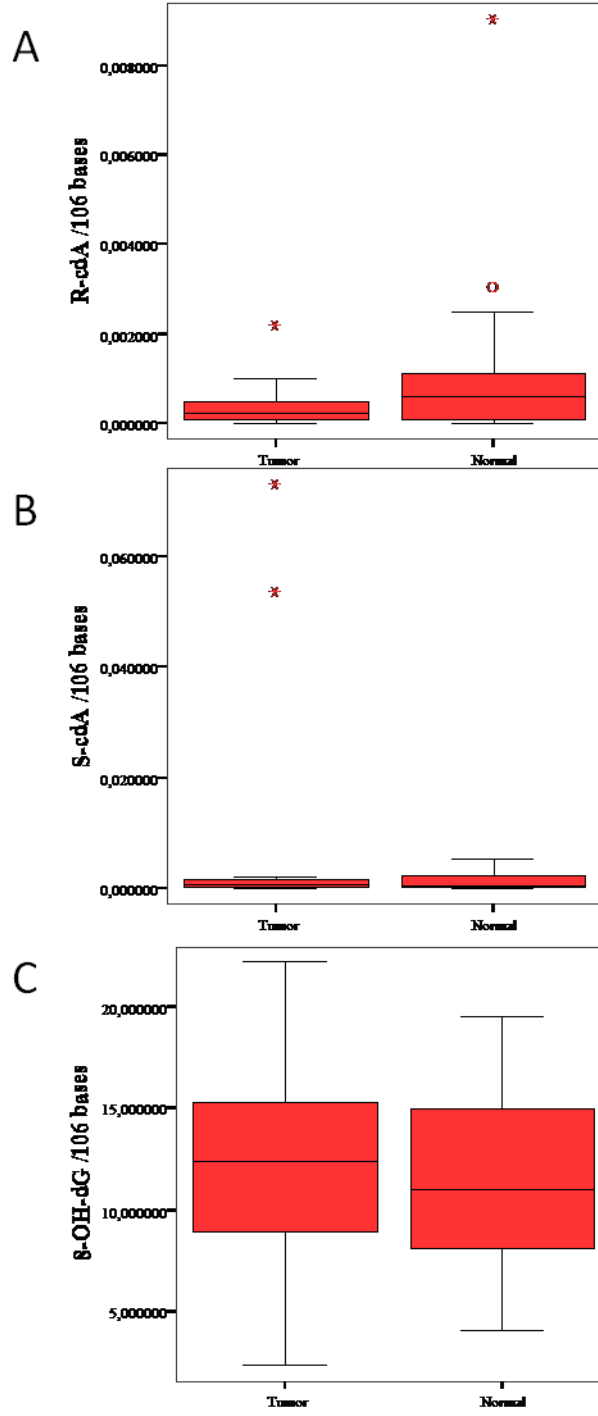


Şekil 13. Pankreas Tümör ve Normal Dokularındaki Hasar Düzey Grafikleri. A. 8-OHGua Düzeyleri B.FapyGua Düzeyleri C. FapyAde Düzeyleri D. 5-OH-5-MeHyd Düzeyleri E.ThyGly Düzeyleri F. 5-OHCyt Düzeyleri

DNA baz ve nükleozid hasarı Wilcoxon işaretli sıralar testine göre yapılmış analiz sonuçlarının p değerleri sırasıyla Tablo 23 ve 24’de verilmiştir.

Tablo 23. DNA Baz Hasarı Sonuçları İçin Wilcoxon İşaretli Sıralar Testine Göre p Değerleri

Analiz Sonucu	5-OH-5-MeHyd	ThyGly	FapyAde	FapyGua	5-OHCyt	8-OHGua
p değeri	0,70	0,33	0,67	0,32	0,034	0,025



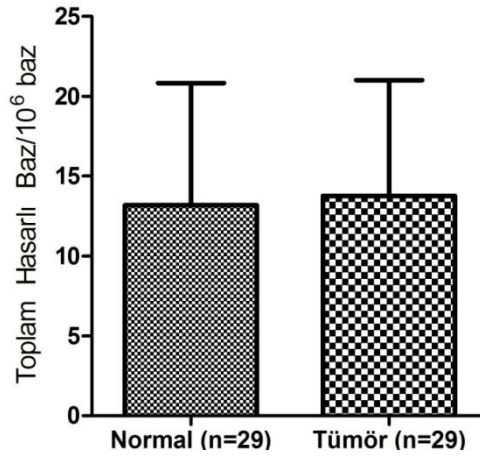
Şekil 14. Pankreas Tümör ve Normal Dokularında Nükleozid Hasar Düzey Grafikleri. A. R-cdA Düzeyleri B. S-cdA Düzeyleri C. 8-OH-dG Düzeyleri

Tablo 24. DNA Nükleozid Hasar Sonuçları İçin Wilcoxon İşaretli Sıralar Testine Göre p Değerleri

Analiz sonucu	R-cdA	S-cdA	8-OH-dG
p değeri	0,221	0,717	0,03

Sonuçlar değerlendirildiğinde, tümör dokularında 8-OH-Gua baz hasarı eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0,025$). Tümör dokularında 5-OH-Cyt DNA baz hasarı eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0,034$, $n=10$). Buna karşılık tümör ve normal eşlenik dokularına ait diğer DNA baz hasarı değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı.

DNA nükleozid hasarı sonuçları değerlendirildiğinde, tümör dokularında 8-OH-dG hasarı eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0,030$). Buna karşılık tümör ve normal eşlenik dokularına ait diğer DNA nükleozid hasar değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Pankreas tümör ve normal dokularındaki toplam hasar düzeyleri ise Şekil 15.'de verilmiştir. Pankreas kanserli hastalarda toplam DNA hasar düzeyi değerlendirildiğinde (Graphpad prism ver.5.03) tümör dokularındaki toplam hasar ile eşlenik normal dokulardaki toplam DNA hasarı arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Sonuç olarak temel farklılığın 8-OH-Gua ve 8-OH-dG düzeylerinde olduğu izlenmektedir.



Şekil 15. Pankreas Tümör ve Normal Dokularındaki Toplam Hasar Düzeyleri

4.2 mRNA düzeyinde Ekspresyon Çalışma Bulguları

Pankreas tümör ve normal dokularından DNA onarım enzimleri (OGG1 ve NEIL1) ve TG2 ekspresyonlarının belirlenebilmesi için gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. Bu çalışma için dokulardan RNA izolasyonu ve cDNA sentezleri yapıldı. Her hasta için 3 tekrarlı gerçek zamanlı PCR çalışması yapıldı.

4.2.1 Pankreas Tümör ve Normal Dokularından RNA İzolasyon Bulguları

Manuel fenol kloroform yöntemi ile tümör ve normal dokularından izole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüm

yapılarak elde edilen değerler ile belirlendi. 50 µl distile suda çözülen RNA örnekleri spektrofotometredeki absorbans ölçümü için 1/20 oranında seyreltildi (5 µl RNA/95 µl distile su). Elimizde 45 µl RNA örneği bulunmaktadır. Spektral analizi yapılan RNA örneklerinin miktar ve saflığı Tablo 25’de verilmiştir.

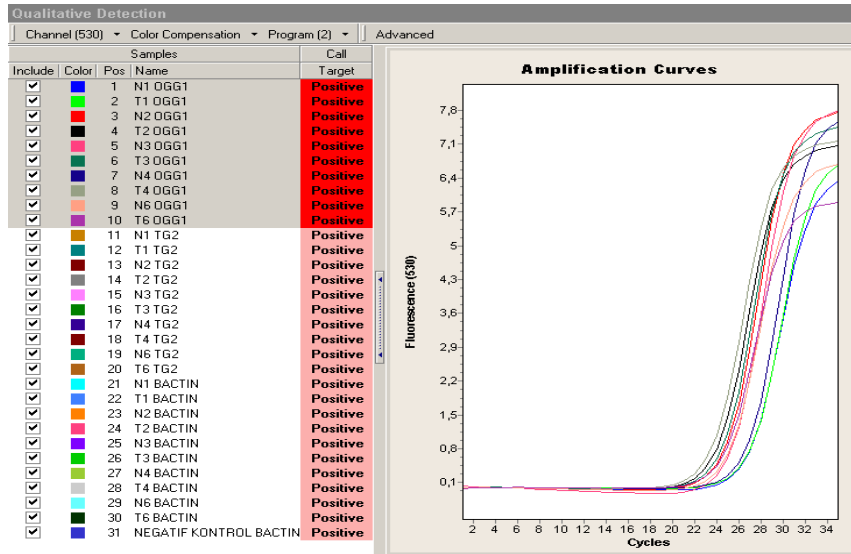
Tablo 25. RNA Örneklerinin Miktar ve Saflığı

Örnek No	OD260nm	OD280nm	OD260/280nm	OD260nm*40*50 (µg/ml)	RNA Miktarları(µg)
N1	0.1540	0.0767	2.00	308	15.4
T1	0.0167	0.0092	2.00	33.4	1.67
N2	0.1373	0.0707	1.94	274.6	13.73
T2	0.1328	0.0657	2.02	265.6	13.28
N3	0.0828	0.0411	2.01	165.6	8.28
T3	0.0967	0.0484	1.99	193.4	9.67
N4	0.0378	0.0195	1.94	75.6	3.78
T4	0.0446	0.0875	1.96	175	8.75
N6	0.1626	0.0837	1.94	325.2	16.25
T6	0.1045	0.0552	1.90	209	10.45
N8	0.0186	0.0102	1.82	37.2	1.86
T8	0.0113	0.0056	2.01	22.6	1.13
N10	0.0709	0.0420	1.70	141.8	7.09
T10	0.0512	0.0268	1.91	102.4	5.12
N11	0.1116	0.0569	1.96	223.2	11.16
T11	0.0569	0.0288	1.97	113.8	5.69
N13	0.0404	0.0246	1.64	80.8	4.05
T13	0.0249	0.0159	1.56	49.8	2.5
N14	0.0088	0.0048	1.83	17.6	0.88
T14	0.1766	0.0927	1.90	353.2	17.66
N15	0.1030	0.0558	1.84	206	10.3
T15	0.0440	0.0221	1.99	88	4.4
N16	0.1169	0.0644	1.81	233.8	11.69
T16	0.0686	0.0346	1.98	137.2	6.86
N17	0.0489	0.0246	1.98	97.8	4.89
T17	0.0217	0.0152	1.42	43.4	2.17
N18	0.0401	0.0209	1.91	80.2	4

T18	0.0567	0.0308	1.84	113.4	5.7
N19	2.812	2.568	1.095	2249.928	101
T19	2.733	2.051	1.333	2186.207	98
N21	1.277	0.978	1.254	981.314	44
T21	2.830	2.535	1.116	2263.793	102
N22	0.947	0.858	1.104	757.889	34
T22	2.298	1.646	1.396	1838.722	82
N23	2.614	1.858	1.407	2091.550	94
T23	0.949	0.831	1.142	759.066	34
N24	1.119	0.966	1.158	895.285	40
T24	1.518	1.143	1.329	1214.760	54
N25	2.739	2.508	1.091	2188.438	98
T25	1.409	1.073	1.314	1127.504	50

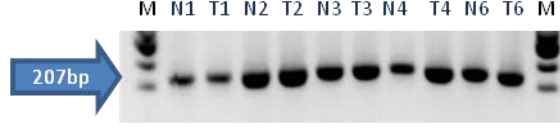
4.2.2 Gerçek Zamanlı PCR Çalışması Bulguları

Gerçek zamanlı PCR çalışması OGG1, TG2, NEIL1 ve house-keeping gen olarak β -aktin primerleri ile Light-Cycler Fast Start DNA Master^{Plus} SYBR Green I (roche 03 515 885 001) kiti kullanılarak Light-Cycler 2.0 (Roche) cihazında gerçekleştirildi. N1, T1,,, N6, T6 örneklerinin gerçek zamanlı PCR’da OGG1, TG2 ve β -aktin eğrileri Şekil 16’da verilmiştir.

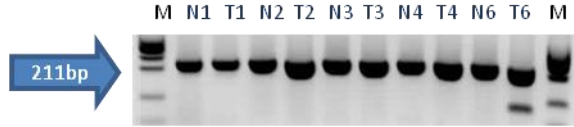


Şekil 16. N1, T1,,, N6, T6 Örneklerinin Gerçek Zamanlı PCR’da OGG1, TG2 ve β -Aktin Eğrileri

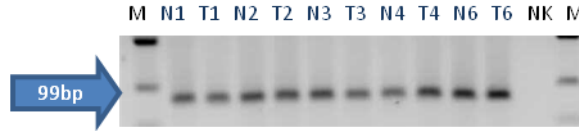
N1, T1, N2, T2, N3, T3, N4, T4, N6, T6 örneklerinin OGG1, TG2 ve β -aktin ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü sırasıyla şekil 17, 18 ve 19'da gösterilmiştir. Şekil 14, 15 ve 16'da 1. ve 12. kuyuda kullanılan marker promega Phi174X'dir.



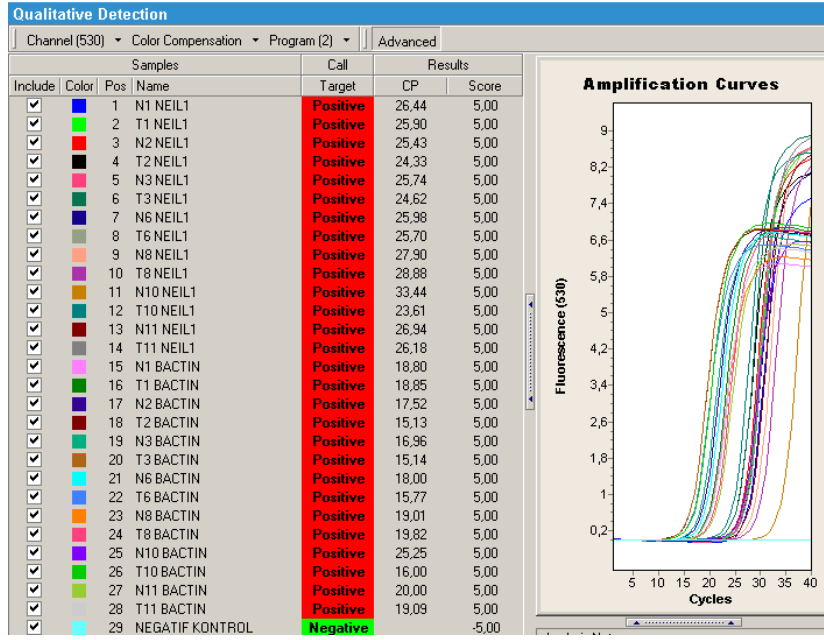
Şekil 17. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N4, T4, N6, T6 Örneklerinin OGG1 Ürününün (207 bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü



Şekil 18. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N4, T4, N6, T6 Örneklerinin TG2 Ürününün (211 bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü



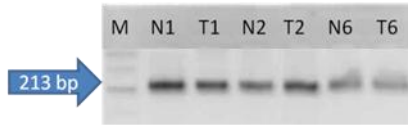
Şekil 19. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N4, T4, N6, T6 Örneklerinin β -Aktin Ürününün (99 Bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü



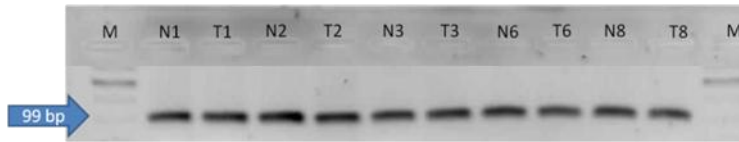
Şekil 20. N1, T1,,,, N11, T11 Örneklerinin Gerçek Zamanlı PCR’da NEIL1ve β-Aktin Eğrileri

Gerçek zamanlı PCR sonucunda N1, T1,,,, N11, T11 örneklerinin gerçek zamanlı PCR’ da NEIL1 ve β-aktin eğrileri Şekil 20.’de verilmiştir.

N1, T1, N2, T2, N6, T6 örneklerinin NEIL1 ve β-Aktin ürününün (213 bp) %2’lik agaroz jel görüntüleri Şekil 21. ve 22.’de verilmiştir.

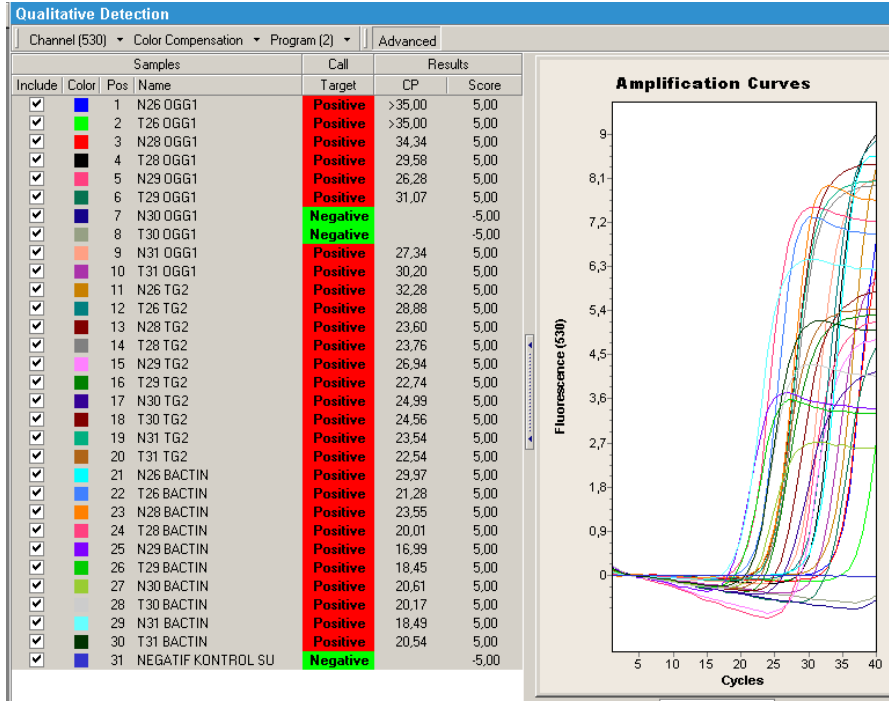


Şekil 21. N1, T1, N2, T2, N6, T6 Örneklerinin NEIL1 Ürününün (213 bp) %2’lik Agaroz Jel Görüntüsü

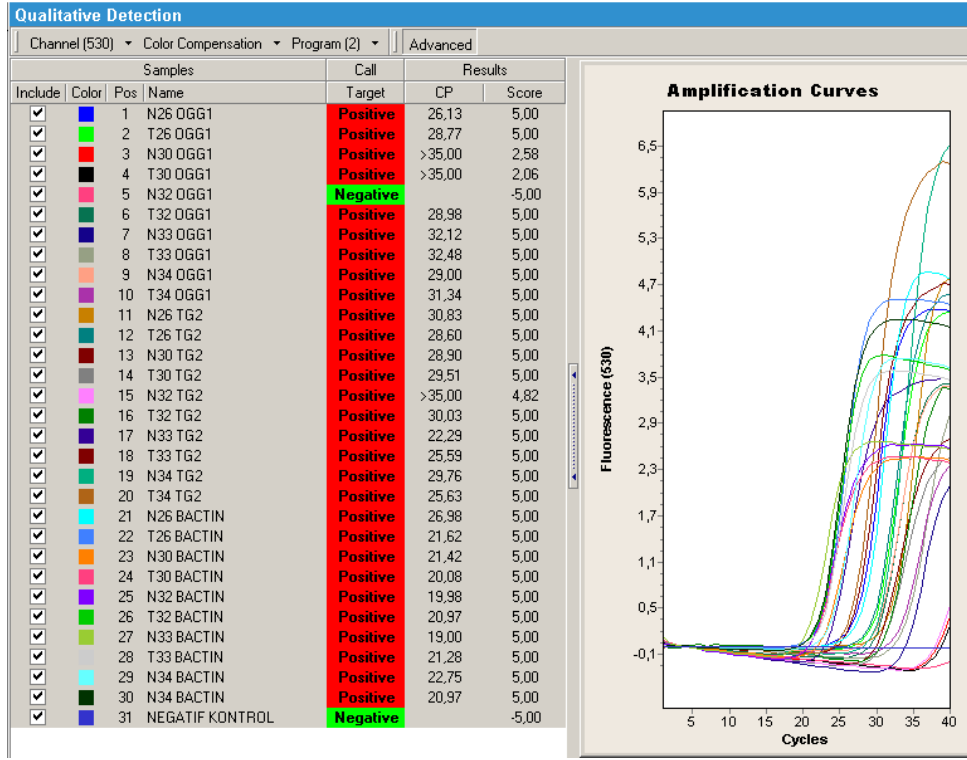


Şekil 22. N1, T1, N2, T2, N3, T3, N6, T6, N8, T8 Örneklerinin β-Aktin Ürününün (99 Bp) %2’lik Agaroz Jel Görüntüsü

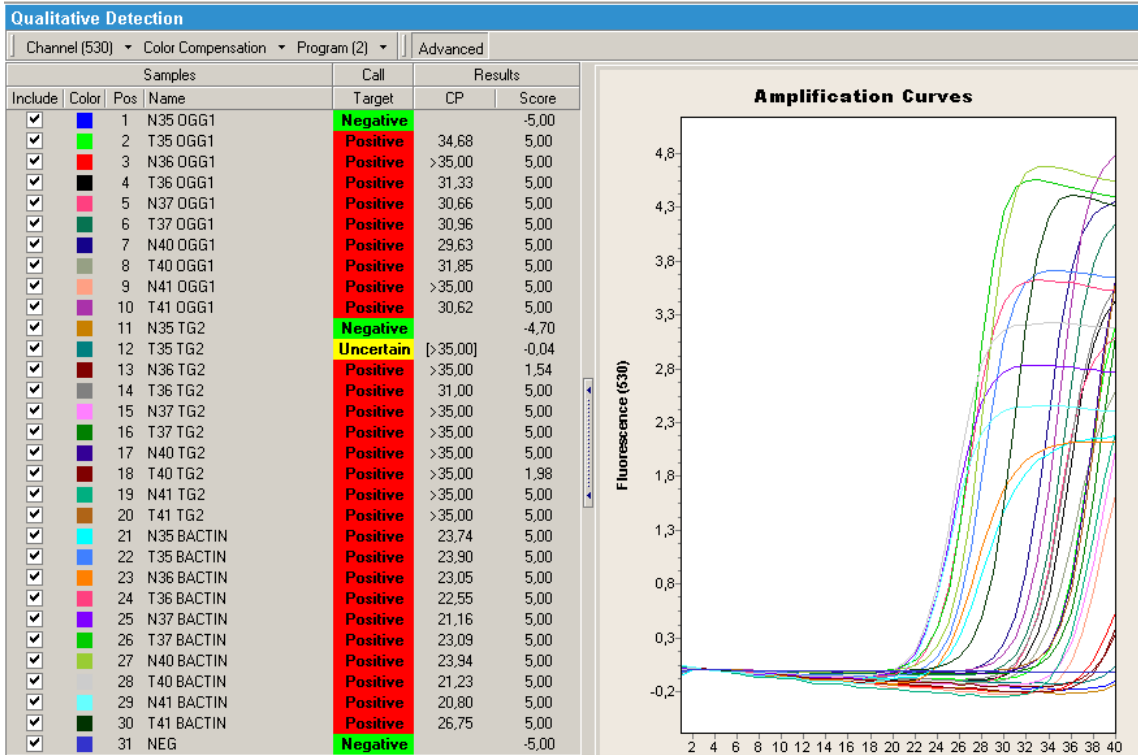
Üç gen için de gerçek zamanlı PCR sonucunda tek pik elde edildi fakat bazı hastalarda negatif sonuçlar elde edildi. N26, T26,,,,,,N34, T34 örneklerinin gerçek zamanlı PCR'da OGG1, TG2 ve β -aktin eğrileri ve Cp değerleri Şekil 23., 24. ve 25.'de verilmiştir.



Şekil 23. 26, 28, 29, 30, 31 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 Ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

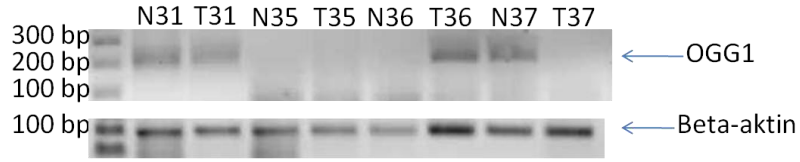


Şekil 24. 26, 30, 32, 33, 34 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

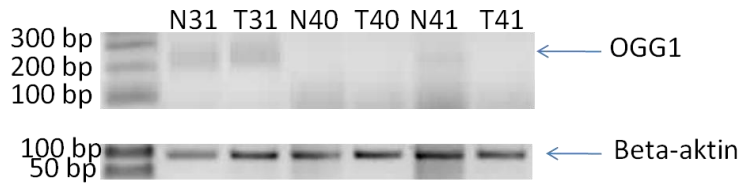


ŞEKİL 25. 35, 36, 37, 40, 41 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da OGG1, TG2 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

N31, T31,,,,,, N41, T41 örneklerinin OGG1 ve β -aktin ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü sırasıyla şekil 26., ve 27.'de verilmiştir.

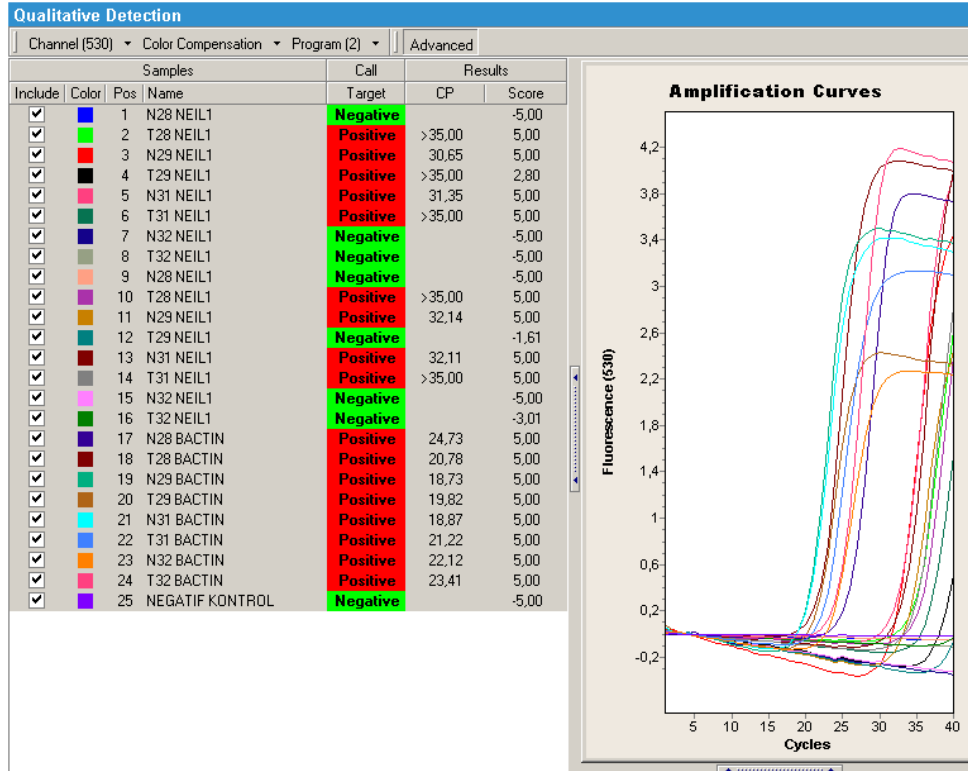


Şekil 26. 31, 35, 36 ve 37 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

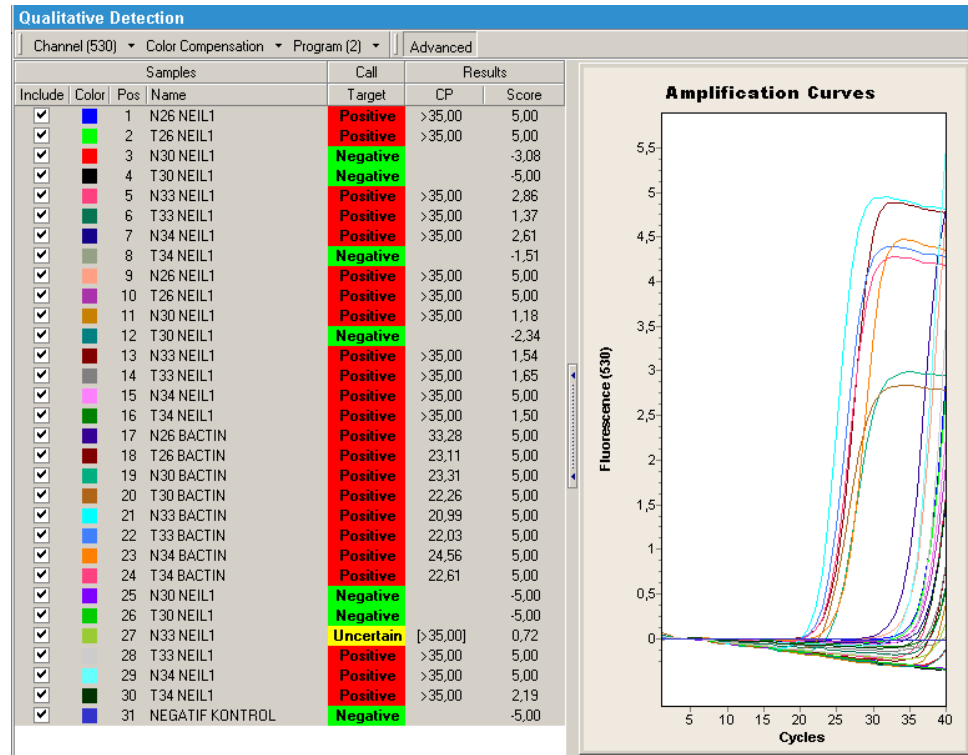


Şekil 27. 40 ve 41 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

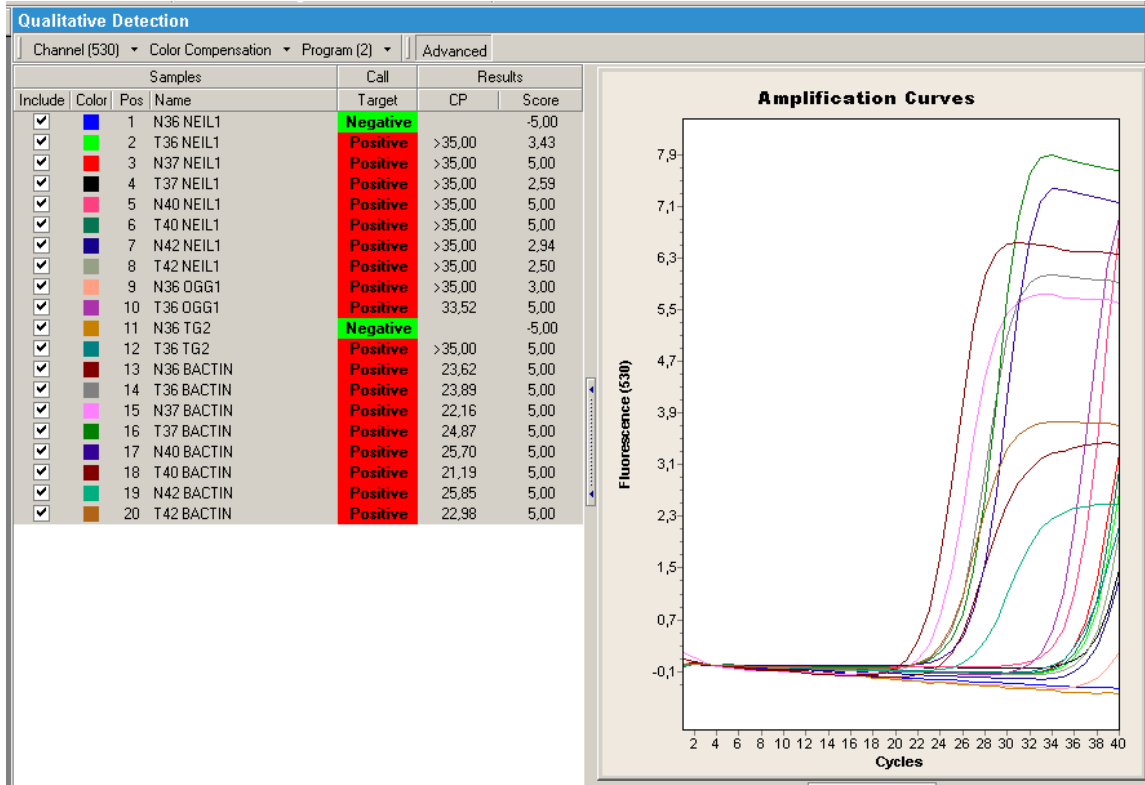
N26, T26,,,,,N42, T42 örneklerinin gerçek zamanlı PCR'da NEIL1 ve β -aktin eğrileri ve Cp değerleri Şekil 28., 29. ve 30.'da verilmiştir.



Şekil 28. 28, 29, 31, 32 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neil1 Ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

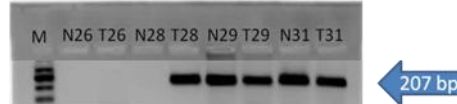


Şekil 29. 26, 30, 33, 34 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neil1 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

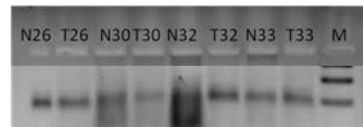


Şekil 30. 36, 37, 40, 42 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neil1 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

Gerçek zamanlı PCR sonucunda elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntü alındı. OGG1 ekspresyon düzeyi belirlenen dokulardan N26, T26, N28, T28,,,,, N34, T34 OGG1 ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 31., 32. ve 33.).



Şekil 31. 26, 28, 29, 31 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

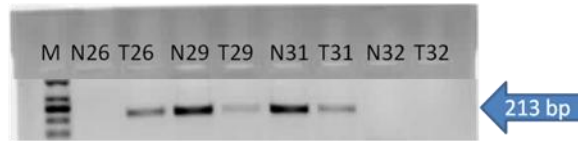


Şekil 32. 26, 30, 32, 33 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207 bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

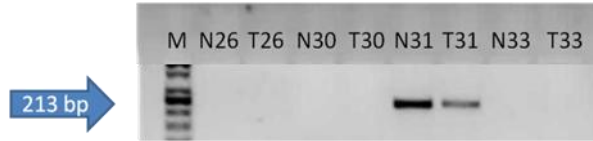


Şekil 33. 26, 31, 34 No'lu Örneklerin OGG1 Ürünlerinin (207 Bp), 34 No'lu Örneğin NEIL1 Ürününün (213bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

NEIL1 ekspresyon düzeyi belirlenen dokulardan N26, T26, N29, T29,,,,, N34, T34 NEIL1 ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 34. ve 35.).

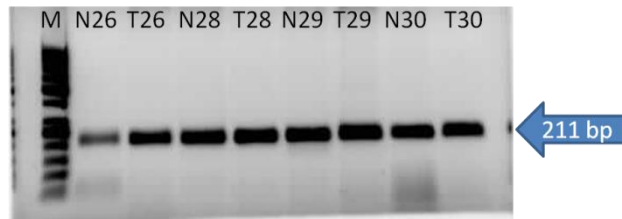


Şekil 34. 26, 29, 31, 32 No'lu Örneklerin Neil1 Ürününün (213bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü



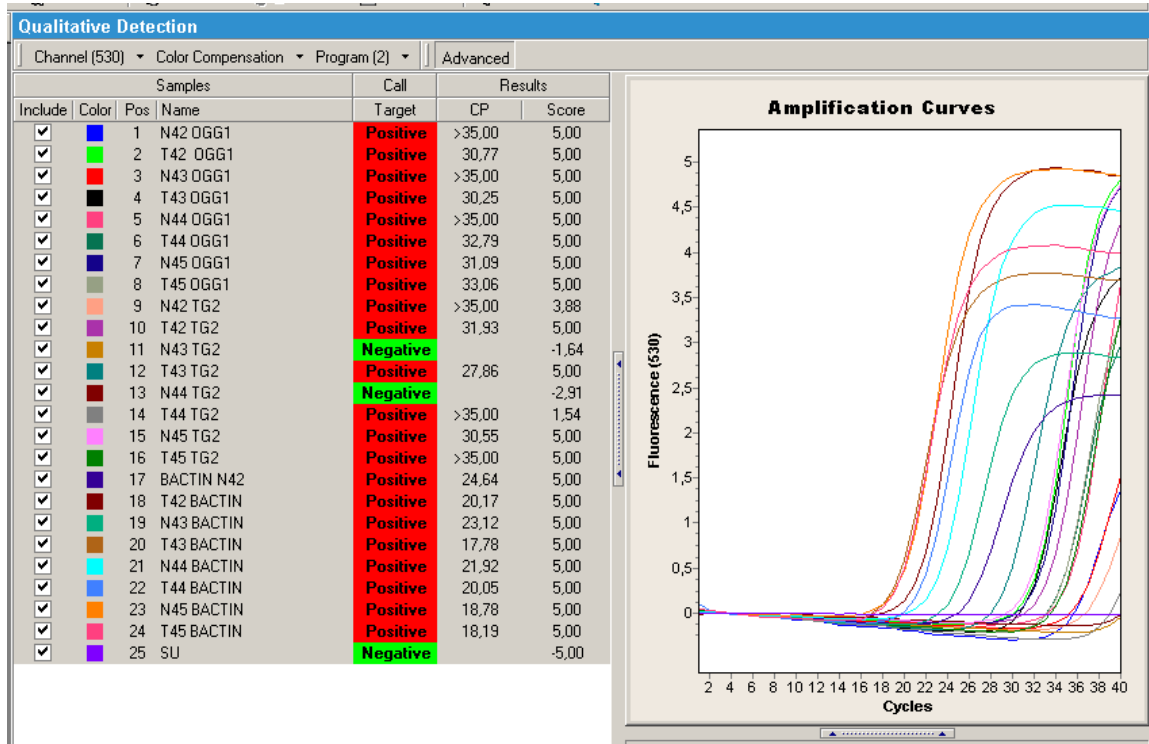
ŞEKİL 35. 26, 30, 31, 33 No'lu Örneklerin Neil1 Ürününün (213bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

TG2 ekspresyon düzeyi belirlenen dokulardan N26, T26, N28, T28, N29, T29, N30, T30 TG2 ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 36.). Agaroz jellerde kullanılan marker fermentas SM0613'tür.



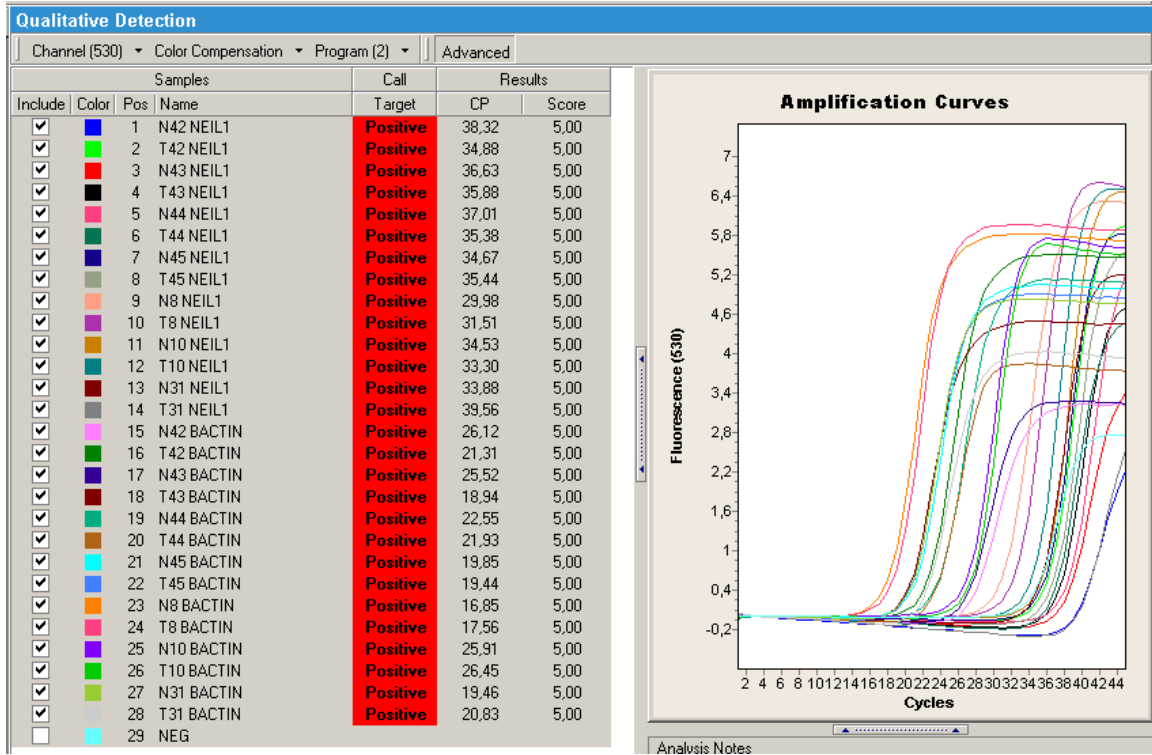
Şekil 36. 26, 28, 29, 30 No'lu Örneklerin TG2 Ürününün (211 Bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

N42, T42,,,,,N45, T45 örneklerinin gerçek zamanlı PCR’da OGG1, TG2 ve β -aktin eğrileri ve Cp değerleri Şekil 37.’de verilmiştir.



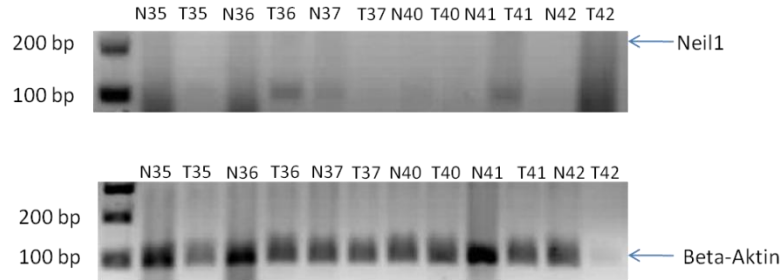
Şekil 37. 42, 43, 44 ve 45 No’lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR’da OGG1, TG2 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

N42, T42,,,,,N45, T45 örneklerinin gerçek zamanlı PCR’da NEIL1 ve β -aktin eğrileri ve Cp değerleri Şekil 38.'de verilmiştir.



Şekil 38. 42, 43, 44 ve 45 No'lu Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR'da Neil1 ve B-Aktin Eğrileri ve Cp Değerleri

NEIL1 ekspresyon düzeyi belirlenen dokulardan N35, T35,..., N42, T42 NEIL1 ve β -Aktin ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 39.).



Şekil 39. 35, 36, 37, 40, 41 ve 42 Örneklerin NEIL1 ve β -Aktin Ürününün (213bp ve 99bp) %2'lik Agaroz Jel Görüntüsü

Hastalardaki OGG1, TG2 ve NEIL1 ekspresyon düzeyleri üç tekrarlı gerçek zamanlı PCR çalışmaları sonucunda tümör dokularının normalizasyonu sonrası elde edilen kat ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerlerin ortalaması ve standart sapması hesaplanarak değerlendirildi. hastalardaki OGG1, NEIL1 ve TG2 kat değişim değerleri sırasıyla tablo 26., 27. ve 28.'da verilmiştir.

Tablo 26. Tümör Dokularında OGG1 Ekspresyon Kat Değişim Değerleri

OGG1						
HASTA NO	1.SET	2.SET	3.SET	4.set	Ortalama Kat Değişimi	Std sapma
1	2,31	1,14	0,84	-	1,43	0,78
2	0,52	1,81	0,55	-	0,96	0,74
3	0,72	0,6	0,3	-	0,54	0,22
4	0,3	0,99	0,44	-	0,58	0,36
6	0,43	0,46	0,37	-	0,42	0,05
8	0,51	0,66	0,03	0,63	0,61	0,07
11	0,30	0,59	0,63	-	0,51	0,18
14	1,54	1,64	1,76	-	1,65	0,11
15	0,61	0,53	0,55	-	0,56	0,04
16	0,49	0,48	0,51	-	0,49	0,02
18	0,79	0,7	1,02	-	0,84	0,17
19	0,78	0,12	0,12	-	0,34	0,38
21	0,02	7,81E-03	0,02	4,80E-03	0,013153	0,01
22	0,04	0,03	0,02	-	0,03	0,01
23	11,53	11,27	6,39	9,93	9,78	2,37
24	7,81E-03	0,01	0,01	3,44E-03	7,81E-03	0,00
25	0,03	Negatif	2,68	8,78	3,83	4,49
26	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
28	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
29	0,12	0,14	0,16	-	-	-
30	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
31	0,38	0,50	0,57	-	-	-
32	Negatif	Negatif	Negatif	-	-	-
33	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
34	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
35	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
36	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
37	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
40	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
41	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
42	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
43	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-

44	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-
45	0,19	0,16	0,17	-	0,17	0,01

Tablo 27. Tümör Dokularında NEIL1 Ekspresyon Kat Değişim Değerleri

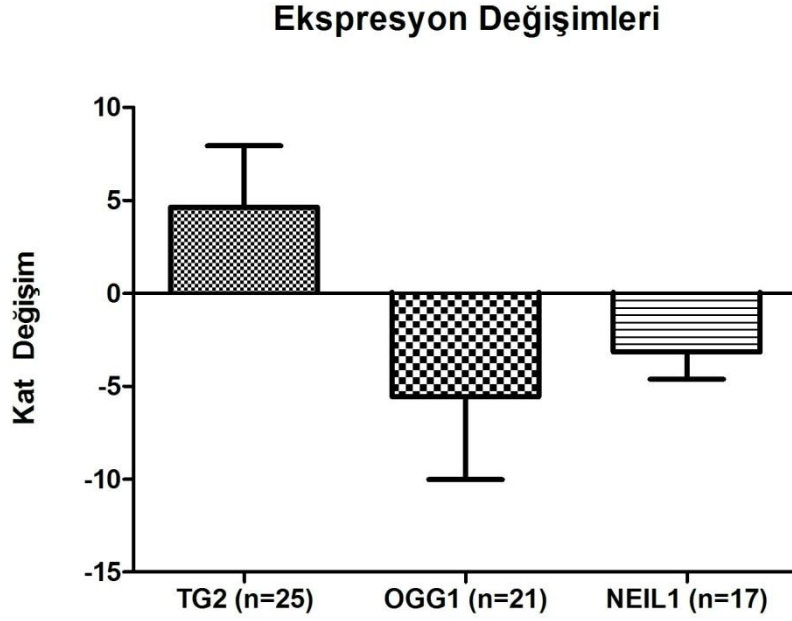
NEIL1						Ortalama Kat Değişimi	Std Sapma
HASTA NO	1.SET	2.SET	3.SET	4.SET	5.SET		
1	1,5	1,51	2,38	-	-	1,796667	0,505206
2	0,41	negatif	0,52	0,52	-	0,465	0,077782
3	0,61	0,49	0,58	-	-	0,56	0,06245
4	1,65	2,75	2,75	Negatif	-	2,383333	0,635085
6	0,26	0,2	0,22	-	-	0,226667	0,030551
8	0,88	0,87	1,06	-	-	0,936667	0,106927
11	0,9	0,71	0,66	-	-	0,756667	0,756667
14	1,86		1,00	0,91	-	1,256667	1,256667
15	0,14	0,22	0,13	-	-	0,163333	0,163333
16	0,24	0,23	0,24	-	-	0,236667	0,236667
18	1,07	0,44	0,72	-	-	0,743333	0,743333
19	0,19	0,02	0,02	0,13	-	0,09	0,09
21	Negatif	0,07	0,04	Negatif	0,12	0,055	0,021213
22	0,05	0,03	negatif	negatif	-	-	-
23	Negatif	0,5	0,61	negatif	0,56	0,555	0,077782
24	0,01	0,64	0,64	0,07	0,01	0,34	0,363731
25	Negatif	negatif	negatif	negatif	Negatif	-	-
26	Negatif	negatif	negatif	-	-	-	-
28	Negatif	negatif	negatif	-	-	-	-
29	0,10	0,10	0,14	-	-	0,11	0,02
30	Negatif	negatif	negatif	-	-	-	-
31	0,40	0,69	0,17	-	-	0,42	0,26
32	Negatif	negatif	negatif	-	-	-	-
33	Negatif	negatif	negatif	-	-	-	-
34	Negatif	negatif	negatif	-	-	-	-
35	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-

36	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-
37	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-
40	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-
41	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-
42	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-
43	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-
44	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-
45	Jelde neg.	Jelde neg.	Jelde neg.	-	-	-	-

Tablo 28. Tümör Dokularında TG2 Ekspresyon Kat Değişim Değerleri

TG2	1.set	2.set	3.set	4.set	Ortalama Kat Değişimi	std sapma
1	0,88	0,44	0,36	-	0,56	0,28
2	3,55	2,10	6,28	3,02	2,92	0,60
3	2,61	1,65	1,48	-	1,91	0,61
4	0,99	7,04	3,59	-	3,87	3,03
6	13,62	1,17	1,72	1,82	1,63	0,31
8	5,32	5,46	3,78	-	4,85	0,93
11	0,61	0,80	0,36	-	0,59	0,22
14	0,36	0,40	0,14	-	0,30	0,14
15	3,10	0,89	0,90	-	1,63	1,27
16	1,79	2,21	2,19	-	2,06	0,24
18	1,94	2,38	1,78	-	2,03	0,31
19	0,96	0,52	0,01	-	0,50	0,48
21	5,50E-04	6,51E-04	1,73E-03	-	0,00	0,00
22	0,12	0,05	0,06	-	0,08	0,04
23	37,27	42,06	9,87	-	29,73	17,37
24	5,00E-02	0,23	0,06	-	0,11	0,10
25	Neg	Neg	24,73	25,34	-	-
26	0,02	0,85	0,03	0,03	0,11	0,04
28	0,08	0,13	0,08	-	-	-
29	79,90	54,20	50,40	-	-	-
30	0,74	0,41	0,99	0,20	0,26	0,16
31	4,55	6,63	8,32	-	-	-
32	62,17	96,67	Neg	-	-	-
33	0,17	0,49	0,53	-	-	-
34	4,03	5,08	6,77	-	-	-
45	0,87	0,17	0,03	-	0,36	0,45

Hastalardaki OGG1, TG2 ve NEIL1 ekspresyon düzeyleri ortalama kat değişim grafiği şekil 40.'da verilmiştir (n değerleri grafikte belirtilmiştir).



Şekil 40. Tümör Dokularında Ekspresyon Değişimi (Kat Değişim) Grafiği

Pankreas tümör dokularında normale göre OGG1 ve NEIL1 ifadesi sırasıyla 5,55 ve 3,16 kat azaldığı, TG2 ifadesinin ise 4,62 kat arttığı belirlenmiştir (şekil 40).

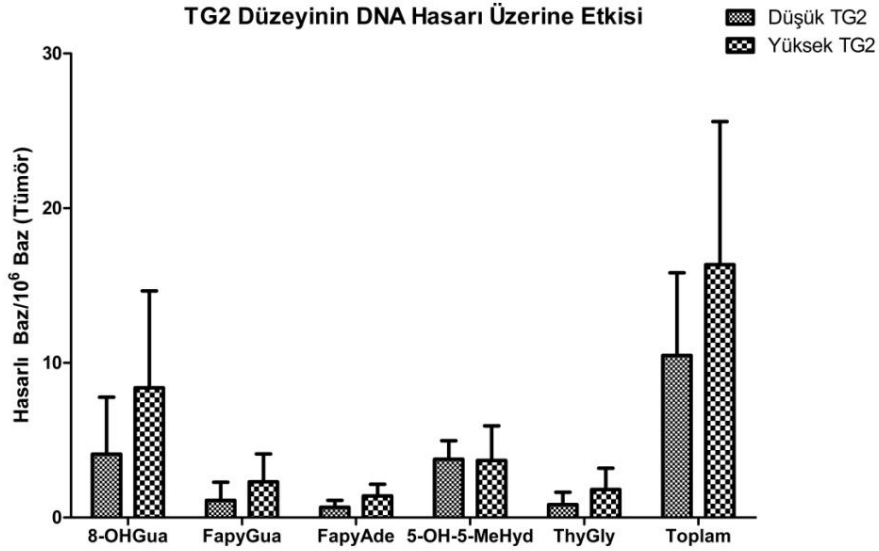
4.3 DNA Hasarı -Ekspresyon Çalışmaları-Evreler Arasındaki İlişkinin Bulguları

Pankreas kanserli hastalarda TG2 düzeyinin DNA hasarı üzerine etkileri incelendi (şekil 41 ve 42). “Wilcoxon işaretli sıralar testi” ile TG2 düzeyinin DNA hasarı üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 29).

TG2 ekspresyon çalışmalarında tüm hasta normal dokularından elde edilen ortalama TG2 düzeyi, normal TG2 düzeyi olarak belirlendi. Bu değer üzerinde kalan TG2 düzeyine sahip hasta dokularında TG2 artmış olarak kabul edildi. Bu hastalarda TG2 yüksek olarak adlandırıldı. Bu değer altında kalan TG2 düzeyine sahip hasta dokularında ise TG2 azalmış olarak kabul edildi. Bu hastalarda TG2 düşük olarak adlandırıldı. Tezde, TG2 düzeyi ve DNA hasar ilişkisi ile ilgili istatistiksel çalışmalar bu ayırım üzerinden değerlendirildi.

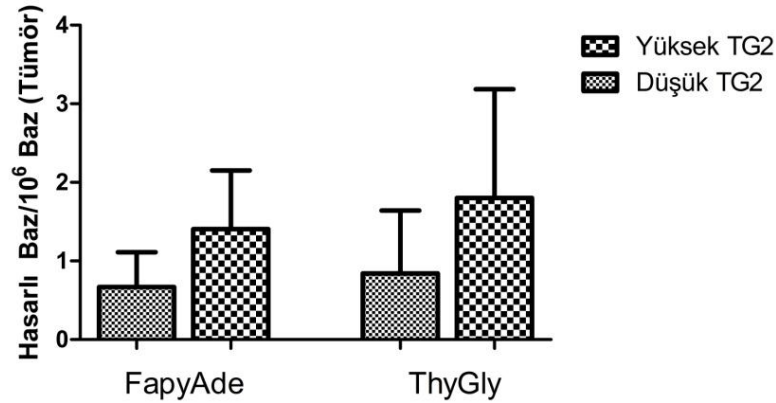
TG2 düzeyi yüksek ve düşük olan hastalarda, FapyAde ve ThyGly DNA baz hasar düzeyi, TG2 düzeyi ile paralel olduğu bulunmuştur. TG2 düzeyi yüksek olan hastalarda FapyAde ve ThyGly baz hasarlarının artışı, TG2 düzeyi düşük olan hastalarda azalışı

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0,03$ ve $0,02$) Diğer baz hasarlarında ise istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır. TG2 düzeyinin toplam DNA hasarı üzerine etkisi değerlendirildiğinde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 41. TG2 Düzeyinin DNA Hasarı Üzerine Etkisi

TG2 Düzeyinin DNA Hasarı Üzerine Etkisi



Şekil 42. TG2 Düzeyinin FapyAde ve ThyGly Hasarı Üzerine Etkisi

Tablo 29. TG2 Düzeyi ve DNA Hasar İlişkisinin İstatistiksel Analizi

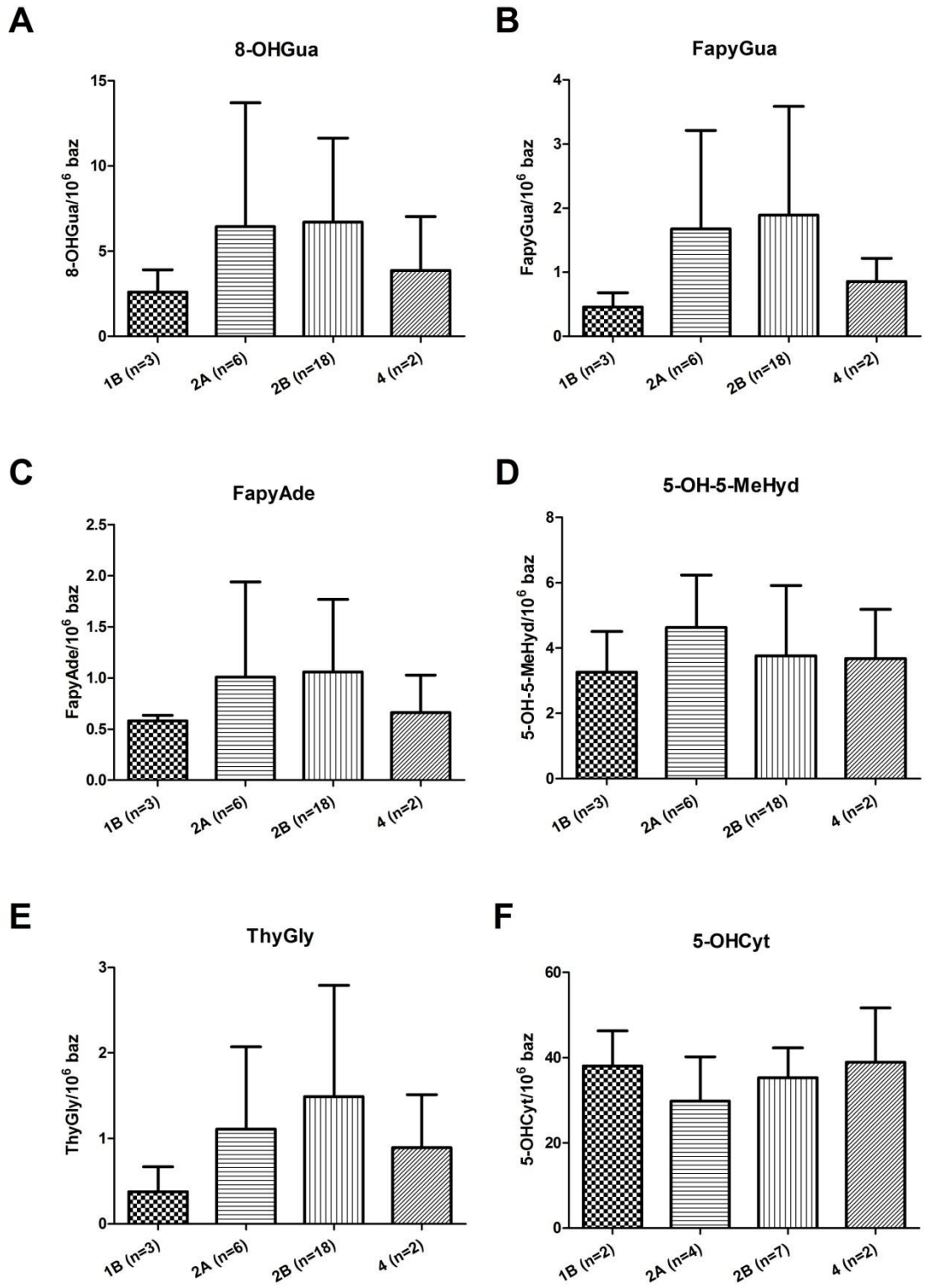
	8-OHGua	FapyGua	FapyAde	5-OH-5-MeHyd	ThyGly	TOPLAM
p değeri	0,05	0,57	0,03	0,20	0,02	0,16

Hastaların tanı konduğu evrelerinin birbirlerine göre DNA baz hasarı açısından değerlendirmesi yapıldı. Klinik evrelere göre hasar düzeyleri şekil 43’de ve toplam hasar düzeyi şekil 44’de verilmiştir. Bu değerlendirmede evre 4 hasta sayısı 2 olduğu için değerlendirmeye katılmadı. 1B-2A, 1B-2B ve 2A-2B evreleri arasında toplam altı hasarın (8-OHGua, FapyGua, FapyAde, 5-OH-5-MeHyd, 5-OH-Cyt, ThyGly) düzeyleri değerlendirildi. “Mann-Whitney U testi” ile evreler arasında DNA hasar düzeyleri istatistiksel değerlendirilmiştir (Tablo 30).

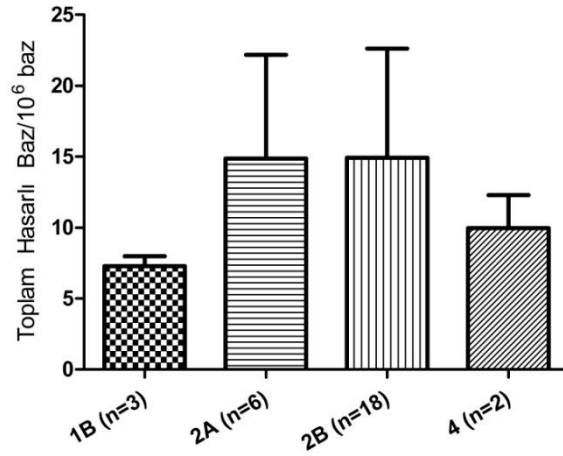
Evreler arasında her bir baz hasarı için yapılan değerlendirmede istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır. Ancak 1B-2B evreleri kıyaslandığında toplam baz hasarı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,04).

Tablo 30. Evrelere Göre DNA Hasar Düzeylerinin İstatistiksel Analizi

p-değeri							
	5-OH-Cyt	8-OHGua	FapyGua	FapyAde	5-OH-5-MeHyd	ThyGly	TOPLAM
1B-2A	-	0,54	0,09	0,89	0,38	0,43	0,09
1B-2B	-	0,09	0,15	0,42	0,95	0,07	0,04
2A-2B	0,64	0,61	0,97	0,71	0,15	0,28	0,81



Şekil 43. Evrelere Göre DNA Hasar Düzeyleri



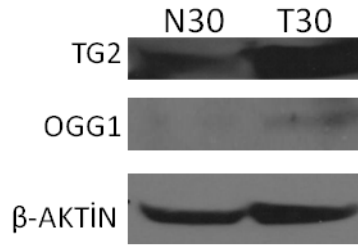
Şekil 44. Evrelere Göre Toplam Hasar Düzeyi

4.4 Protein Düzeyinde Ekspresyon Çalışma Bulguları

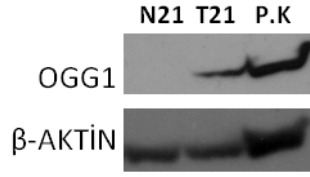
Tez kapsamında 3, 4, 16, 18, 19, 21, 30, 31, 33, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45 no'lu pankreas tümör ve eşlenik normal dokularından OGG1-NFκB-TG2 ilişkisinin araştırılması amacıyla western blot ile ekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi.

4.4.1 Pankreas Normal ve Tümör Dokularından Western Blot

Pankreas kanserli hastalardan protein çalışmaları yapılması için toplanan çoğu dokudan yapılan western blot çalışmaları protein izolasyonu yapılırken yaşanan zorluklar nedeniyle değerlendirilemedi. TG2 ve OGG1 protein ekspresyon düzeyini belirleyebilmek için sadece iki dokudan elde edilen western blot bulguları şekil 45 ve şekil 46 'da verilmiştir.



Şekil 45. 30 No'lu Dokudaki TG2 (80kDa) ve OGG1(37kDa) Düzeyi



Şekil 46. 21 No'lu Dokudaki OGG1 (37kDa) Düzeyi

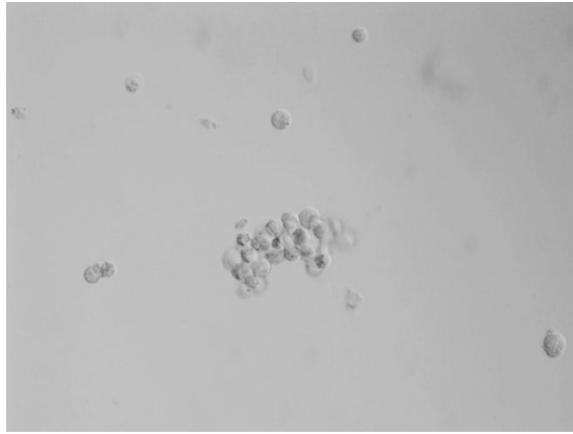
4.5 Hücre Kültürü Çalışma Bulguları

Pankreas kanser hücre hattı Mia-PaCa2 kullanılarak hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. TG2-NFKB-OGG1 arasındaki ilişkinin araştırılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilerek reporter assay ve western blot yöntemleri ile doğrulanmıştır. Hücre kültürde yapılan çalışmaların detayları aşağıda verilmiştir.

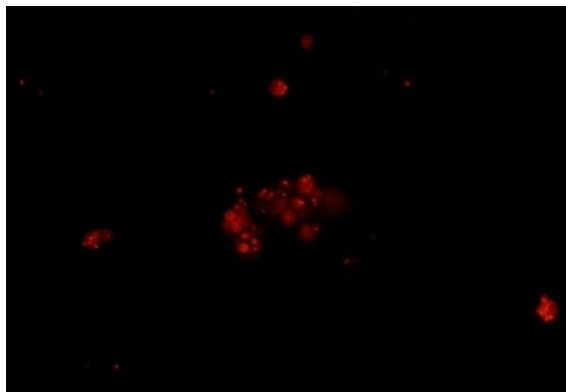
4.5.1 Pankreas Hücre Hattında (MiaPaca-2) TG2 siRNA Transfeksiyon Bulguları

1.Optimizasyon:

Transfeksiyon 50nM siRNA ile 2, 5, 10 μ l olmak üzere farklı Dharmafect 2 miktarları karıştırılarak gerçekleştirildi. Şekil 47'de hücrelerin 50nM siGLO red + 2 μ l Dharmafect 2 kullanılarak yapılan transfeksiyon sonrası ışık mikroskopunda görüntüsü ve şekil 48'de ise hücrelerin floresan mikroskopundaki görüntüsü verilmiştir.



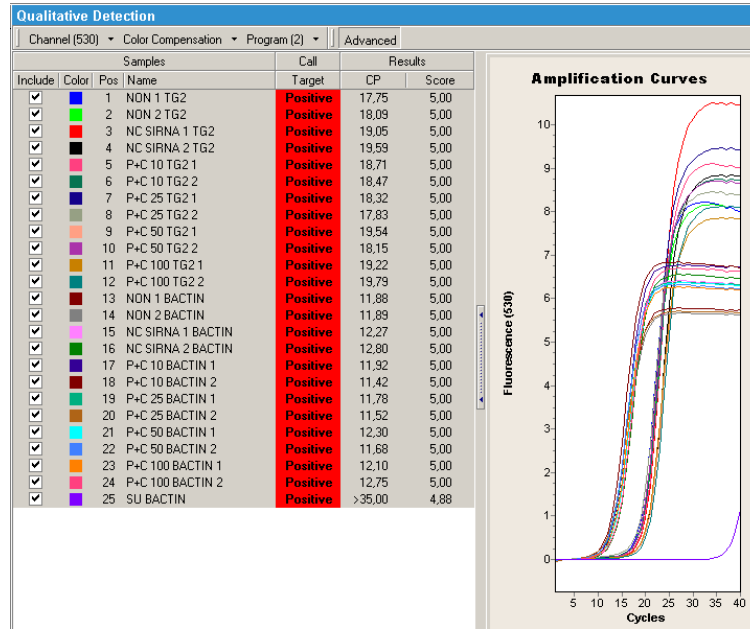
Şekil 47. Hücrelerin Işık Mikroskobu Görüntüsü



Şekil 48. Siglored İle Transfekte Olmuş Hücrelerin Görüntüsü

2. Optimizasyon:

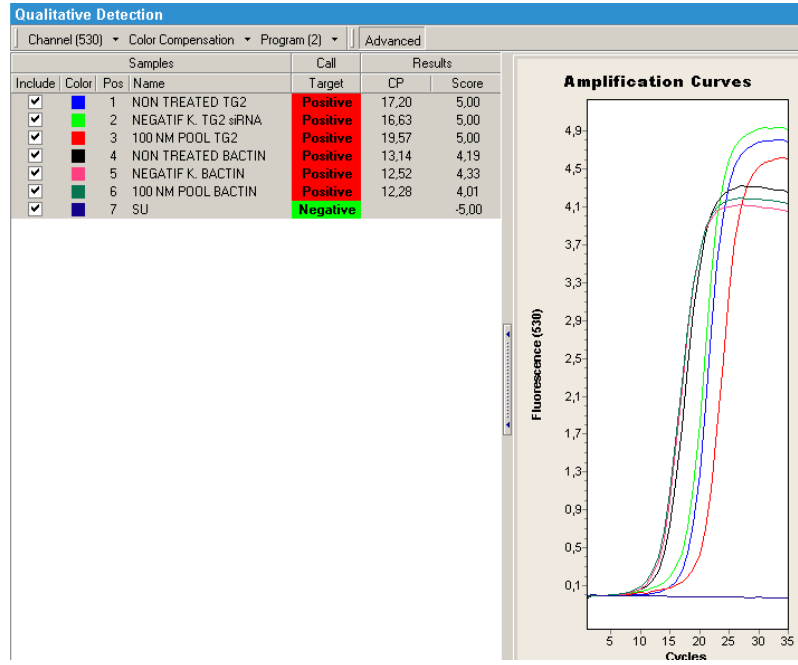
1. Optimizasyonla optimum miktarı belirlenen transfeksiyon ajanı ile farklı TG2 siRNA konsantrasyonları uygulanarak etkin baskılamann gerçekleştirildiği siRNA konsantrasyonu gerçek zamanlı PCR ile belirlendi. 10, 25, 50 ve 100 nM olacak şekilde 4 farklı konsantrasyon kullanıldı. Cp değerleri şekil 49’da verilmiştir. Sonuçlar kat değişim cinsinden Roche Lightcycler 2.0 cihazında değerlendirildi (Şekil 50). Ayrıca Şekil 51 ve 52’de sırasıyla 100nM siRNA uygulamasının Cp ve kat değişim değerleri verilmiştir.



Şekil 49. Farklı Konsantrasyonlarda siRNA Uygulaması Cp Değerleri

Relative Quantification - Monocolor							
Group 1 Summary							
Target	Reference	Pairing	Results				
Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Mi
	Target Calibrator	3	NC SIRNA 1 TG2	19,05	9,10E-3	1,00	
	Reference Calibrator	15	NC SIRNA 1 BACTIN	12,27			
Result Set 1	Target Unknown	1	NON 1 TG2	17,75	0,02	1,88	
	Reference Unknown	13	NON 1 BACTIN	11,88			
Result Set 3	Target Unknown	5	P+C 10 TG2 1	18,71	9,07E-3	1,00	
	Reference Unknown	17	P+C 10 BACTIN 1	11,92			
Result Set 5	Target Unknown	7	P+C 25 TG2 1	18,32	0,01	1,18	
	Reference Unknown	19	P+C 25 BACTIN 1	11,78			
Result Set 7	Target Unknown	9	P+C 50 TG2 1	19,54	6,62E-3	0,73	
	Reference Unknown	21	P+C 50 BACTIN 1	12,30			
Result Set 9	Target Unknown	11	P+C 100 TG2 1	19,22	7,21E-3	0,79	
	Reference Unknown	23	P+C 100 BACTIN 1	12,10			
	Target Calibrator	4	NC SIRNA 2 TG2	19,59	9,02E-3	1,00	
	Reference Calibrator	16	NC SIRNA 2 BACTIN	12,80			
Result Set 2	Target Unknown	2	NON 2 TG2	18,09	0,01	1,49	
	Reference Unknown	13	NON 1 BACTIN	11,88			
Result Set 4	Target Unknown	6	P+C 10 TG2 2	18,47	7,54E-3	0,84	
	Reference Unknown	18	P+C 10 BACTIN 2	11,42			
Result Set 6	Target Unknown	8	P+C 25 TG2 2	17,83	0,01	1,40	
	Reference Unknown	20	P+C 25 BACTIN 2	11,52			
Result Set 8	Target Unknown	10	P+C 50 TG2 2	18,15	0,01	1,25	
	Reference Unknown	22	P+C 50 BACTIN 2	11,68			
Result Set 10	Target Unknown	12	P+C 100 TG2 2	19,79	7,56E-3	0,84	
	Reference Unknown	24	P+C 100 BACTIN 2	12,75			

Şekil 50. Farklı Konsantrasyonlarda siRNA Uygulaması Kat Değişim Değerleri



Şekil 51. 100nM Konsantrasyonunda siRNA Uygulamasında Cp Değerleri

The figure shows the 'Relative Quantification - Monocolor' software interface. It includes a table of relative quantification results.

Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Mi
	Target Calibrator	2	NEGATIF K. TG2 siRNA	16,63	0,06	1,00	
	Reference Calibrator	5	NEGATIF K. BACTIN	12,52			
Result Set 1	Target Unknown	1	NON TREATED TG2	17,20	0,06	1,04	
	Reference Unknown	4	NON TREATED BACTIN	13,14			
Result Set 2	Target Unknown	3	100 NM POOL TG2	19,57	6,42E-3	0,11	
	Reference Unknown	6	100 NM POOL BACTIN	12,28			

Şekil 52. 100nM Konsantrasyonunda siRNA Uygulamasında Kat Değişim Değerleri

MiaPaCa-2 hücrelerinde 100 nM TG2 transfeksiyonu yapılarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası gerçek zamanlı PCR ile TG2, OGG1 VE NEIL1 düzeylerine bakıldı. PCR sonrası elde edilen Cp değerlerinden yararlanılarak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) kat değişim değerleri hesaplandı. Her bir saat için 2'şerli çalışıldı. Kat değişim değerleri Tablo 31'de verilmiştir.

TABLO 31. GERÇEK ZAMANLI 24, 48, 72 SAAT 100 NM SİRNA KAT DEĞİŞİM DEĞERLERİ

Örnek	TG2 Kat değişim Değeri (1)	TG2 Kat değişim Değeri (2)	OGG1 Kat değişim değeri (1)	OGG1 Kat değişim değeri (2)
Negatif kontrol 24 saat	1,00	1,00	1,00	1,00
Non-treated 24 saat	1,76	0,71	1,25	1,44
Pool siRNA 24 saat	0,19	0,31	1,04	1,22
Negatif kontrol 48 saat	1,00	1,00	1,00	1,00
Non-treated 48 saat	0,22	2,15	0,49	1,27
Pool siRNA 48 saat	0,08	0,44	0,94	1,34
Negatif kontrol 72 saat	1,00	1,00	1,00	1,00
Non-treated 72 saat	0,75	0,66	1,23	1,00
Pool siRNA 72 saat	0,09	0,63	1,03	1,08

Proje kapsamındaki TG2 siRNA çalışmalarının optimizasyonu MiaPaCa-2 hücre hattında gerçekleştirildi. TG2 ekspresyon baskılaması için 3 farklı optimizasyon çalışması yapıldı.

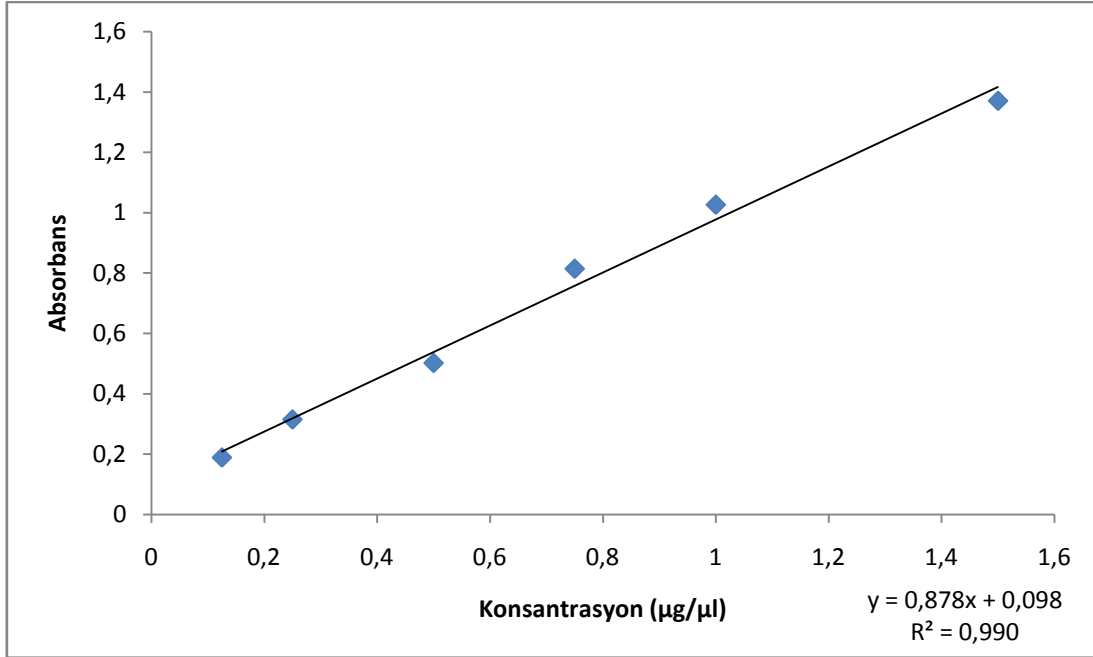
1. Optimizasyon çalışması sonucunda flouresan mikroskobu ile etkin transfeksiyonu sağlayan ve toksik etki göstermeyen optimum transfeksiyon ajanı miktarının 2 µl olduğuna karar verildi. İleriki deneylerin de bu miktara uygun olacak şekilde yapılmasına karar verildi.

2. optimizasyon çalışması ile belirlenen optimum transfeksiyon ajan miktarı ile siRNA custom+pool karıştırılarak farklı konsantrasyon uygulamaları sonrası etkin baskılamının gerçekleştiren siRNA konsantrasyonu belirlendi. Ayrıca etkin transfeksiyonun gerçekleştiği süre de belirlendi. Bu çalışma sonucunda TG2 transfeksiyonu için 48 saat 100 nM pool siRNA uygulamasının mRNA düzeyinde etkin baskılamayı gerçekleştirdiği gösterildi. 3. Optimizasyon çalışması sonucu elde edilen western blot sonuçları 2.5.2 Western Blot Bulguları içinde 4.5.2.2 MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanmasının Western Blot yöntemi ile gösterilmesi bölümünde verilmiştir.

4.5.2 Western Blot Bulguları

4.5.2.1 Protein Tayini

BSA standart grafiği: Konsantrasyonu bilinen BSA standartları ile grafik çizildi (şekil 53).



Şekil 53. BSA Standart Grafiği

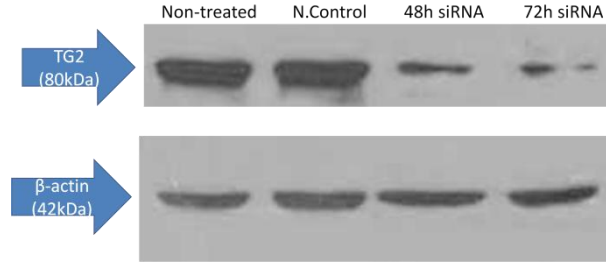
Standart grafiğinin eğimine göre her bir örnekteki protein konsantrasyonu hesaplandı. Örneklerdeki protein ve yükleme miktarları Tablo 32’de verilmiştir.

Tablo 32. Örneklerdeki Protein Konsantrasyonu ve Yükleme Miktarları

Örnek	Protein Konsantrasyonu (µg/µl)	30 µg protein için yüklenen miktar (µl)	2x Laemmli (µl)	Toplam yükleme miktarı (µl)
Non-treated (72h)	7,14	4,20	4,20	8,40
Negatif kontrol (72h)	6,50	4,61	4,61	9,22
48h 100 nM siRNA	4,09	7,33	7,33	14,66
72h 100 nM siRNA	5,42	5,53	5,53	11,06

4.5.2.2 *MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanmasının Western Blot yöntemi ile gösterilmesi*

3. optimizasyon çalışmasında belirtildiği gibi MiaPaCa-2 hücrelerinde 100 nM TG2 siRNA baskılanma etkinliği 48. ve 72. saatler için western blot yöntemi ile gösterildi (Şekil 54).

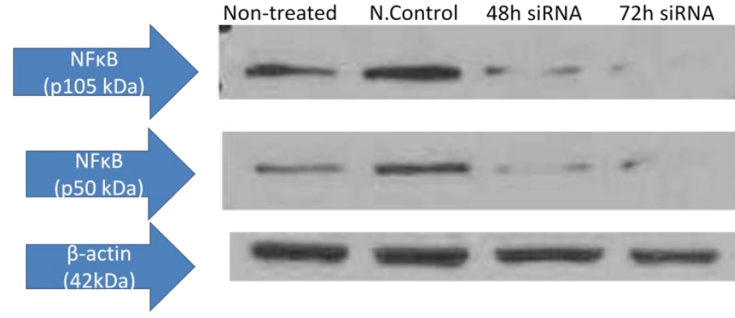


Şekil 54. MiaPaCa-2 Hücrelerinde 100 nM TG2 siRNA Baskılanması

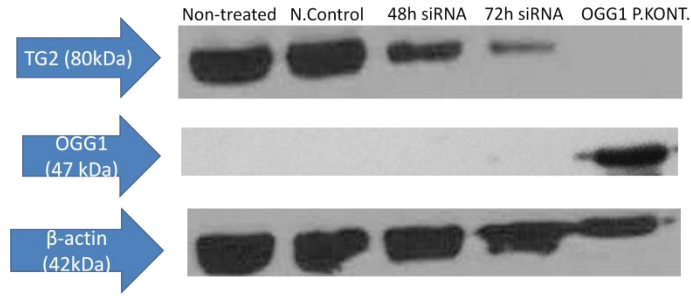
Yapılan her western blot deneyinde TG2'nin 48 ve 72. saatlerde baskılandığı doğrulandı (Şekil 54). MiaPaCa-2 hücrelerinde görülen TG2 baskılanmasının % cinsinden değeri VisionWorksLS release 7.0 software programı ile hesaplandı.

4.5.2.3 *MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanmasının DNA onarım enzimi ile ilişkisinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi*

TG2 ile DNA onarım enzimi OGG1 arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanmasının gösterildiği aynı lizatlar kullanılarak NFkB ve OGG1 ekspresyonu western blot yöntemi ile araştırıldı. Sırasıyla şekil 55 ve 56'da verilmiştir. Bu çalışmanın tekrarlanması gerekmektedir. Negatif kontrolde de OGG1 bantının görülmemesi bu hücrelerde antikorun tanıdığı epitop bölgesinde mutasyon varlığını düşündürmektedir. TG2 ve DNA onarım (BER) enzimleri arasındaki ilişkinin araştırılmasını sürdürmekteyiz. Bu konu ileri araştırmalarımıza temel olacaktır.



Şekil 55. MiaPaCa-2 Hücrelerinde 100 nM TG2 siRNA Baskılanmasında NFκB (P105 ve P50)



Şekil 56. MiaPaCa-2 Hücrelerinde 100 nM TG2 SiRNA Baskılanmasında OGG1 (47kDa)

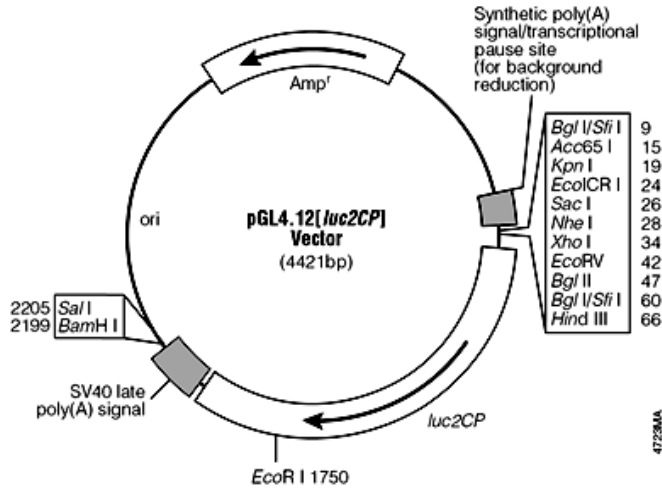
MiaPaCa-2 hücrelerinde 100 nM TG2 siRNA baskılanma etkinliği 48. ve 72. saatler için western blot yöntemi ile gösterildi. 48. saatte yaklaşık %73, 72.saatte ise yaklaşık %80 baskılanma olduğu görüldü. TG2 baskılanması olan örneklerde NFκB proteini fosforile formuna bakıldı. TG2 baskılanması görülen örneklerde NFκB p105 kDa'luk fosfo-formunun da baskılandığı görüldü. TG2 ile NFκB arasında ilişki olduğu, birbirlerini regüle edebildikleri düşünüldü. TG2 ile DNA onarım enzimi OGG1 arasındaki ilişkisi incelendi. MiaPaCa-2 hücrelerinde TG2 baskılanmasının gösterildiği örneklerde OGG1 ekspresyonu gözlenmedi. MiaPaCa-2 hücrelerinde OGG1 proteininin western blot ile gösterilememesi nedeniyle OGG1 bildirici vektör deneyi kuruldu.

4.5.3 OGG1 Bildirici Vektör Deney Bulguları

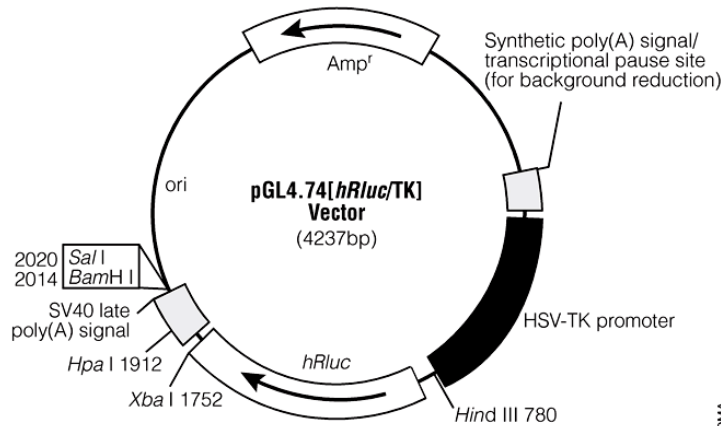
“Reporter Assay” İle OGG1 Promotör Bölgesindeki Uyarının Gösterilmesi

Reporter vektörlerin Hazırlanması

Reporter (bildirici) gen deneyi, mRNA artışlarının direk olarak ilgili genlerin promotor uyarılmalarının bir sonucu olarak ortaya çıktığının gösterilmesinde sağlam deliller sunmaktadır. Çalışmamızda ikili reporter deney sistemini kullanarak, birisi internal kontrol olan iki vektörün kotransfeksiyonu ile, transfeksiyon etkinliği vb. gibi değişkenlik yaratabilecek parametreleri engellemek istedik. Bu amaçla “pGL4 Luciferase Reporter Vektör”leri pGL4.12 (şekil 57) ve pGL 4.74 (şekil 58) (sırasıyla Promega #E6671 ve #E6921) kullandık. pGL4.12 sentetik luc2 lusiferaz (*Photinus pyralis*) genini promotörsüz olarak barındırmaktadır. pGL4.74 ise *hRluc* lusiferaz (*Renilla reniformis*) genini ve promotor olarak HSV-TK promotorünü barındırmakta ve internal kontrol olarak kullanılmaktadır.



Şekil 57. Pgl4.12[Luc2cp](Reporter Vektör)

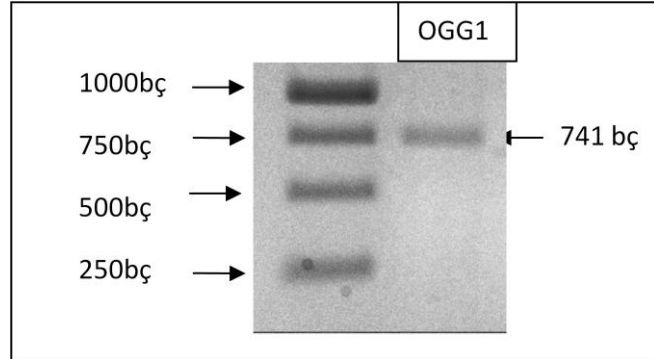


Şekil 58. Pgl4.74[Hrluc/Tk] (İnternal Kontrol Vektör)

Klonlamak istediğimiz OGG1 promotör bölgesi için primerlerin dizileri ve klonlama için kullanılacak restriksiyon enzimler tablo 33'de belirtilmiştir. Kalıp olarak MiaPaCa-2 hücre hattından elde edilmiş genomik DNA kullanılmıştır. PCR reaksiyonları yüksek doğruluklu reaksiyon için uygun DNA polimeraz enzim karışımı (Long PCR Enzyme Mix Fermentas #K0181) ile yapıldı (şekil 59).

Tablo 33. OGG1 Promotör Bölgesi İçin Primerlerin Dizileri ve Klonlama İçin Kullanılacak Restriksiyon Enzimleri

Gen	Primer	Restriksiyon Enzimi
OGG1PF	TGGGAC AAGCTT AGCGGGC	HindIII
OGG1PR	GCCCCG GGTACC CAGAAC	Kpn1

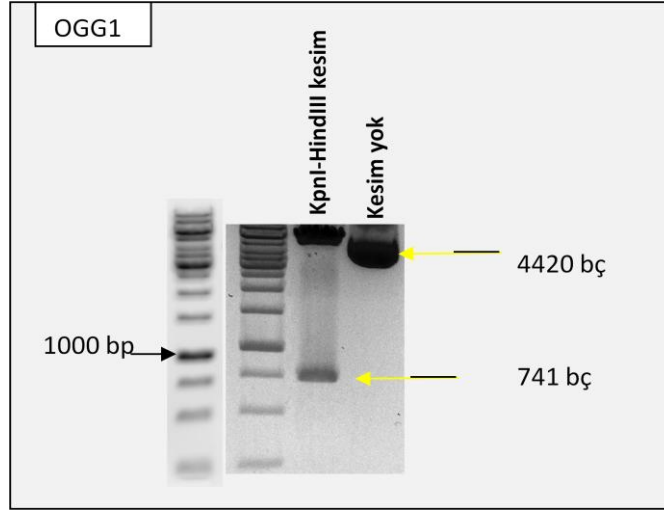


Şekil 59. OGG1 Promotör Bölge Pcr Ürünü Agaroz Jel Görüntüleri[%1'lik Agaroz Jel. Marker 1kb Generuler (Fermentas #Sm0311)]

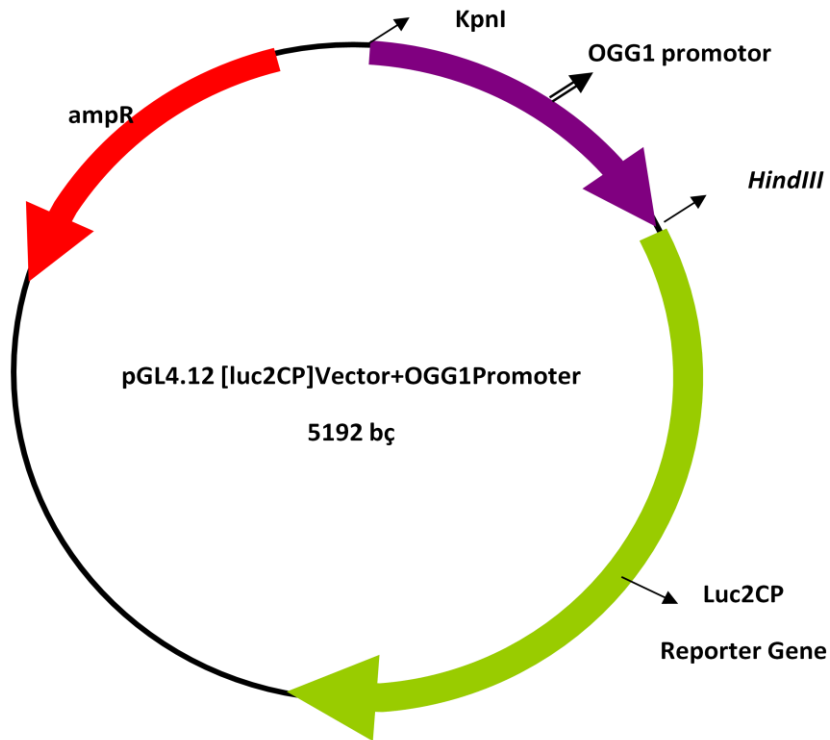
OGG1 promotörü için belirlediğimiz restriksiyon enzimler ile PCR ürünleri muamele edildi. Kesim işleminin ardından agaroz jel elektroforezi sonrasında NucleoSpin® Extract II (MACHEREY-NAGEL #740609) ile jelden saflaştırıldı.

Plazmid ve eklenecek promotör dizisi DNA ligasyon kiti (Roche #1635379) ile birbirlerine eklendi. Ligasyon ürünleri Top10 kompetan bakterisine transforme edilip, bakteri kültür plaklarına ekim gerçekleştirildi. Koloni seçimi miniprep plazmid izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen restriksiyon enzim analizleri ile yapıldı (şekil 60). Maxiprep ile transfeksiyon

deneyleri için kullanılacak OGG1/pGL4.12 reporter vektör elde edildi. Elde edilen vektörün haritası şekil 61'de verilmiştir.



Şekil 60. OGG1 Reporter Vektör Restriksiyon Enzim Analizinin Agaroz Jel Elektrofrezisi [%0,8'lik Agaroz Jel. Marker 1kb Generuler (Fermentas #Sm0311)]



Şekil 61. Pgl4.12/OGG1 Reporter Vektör Haritası

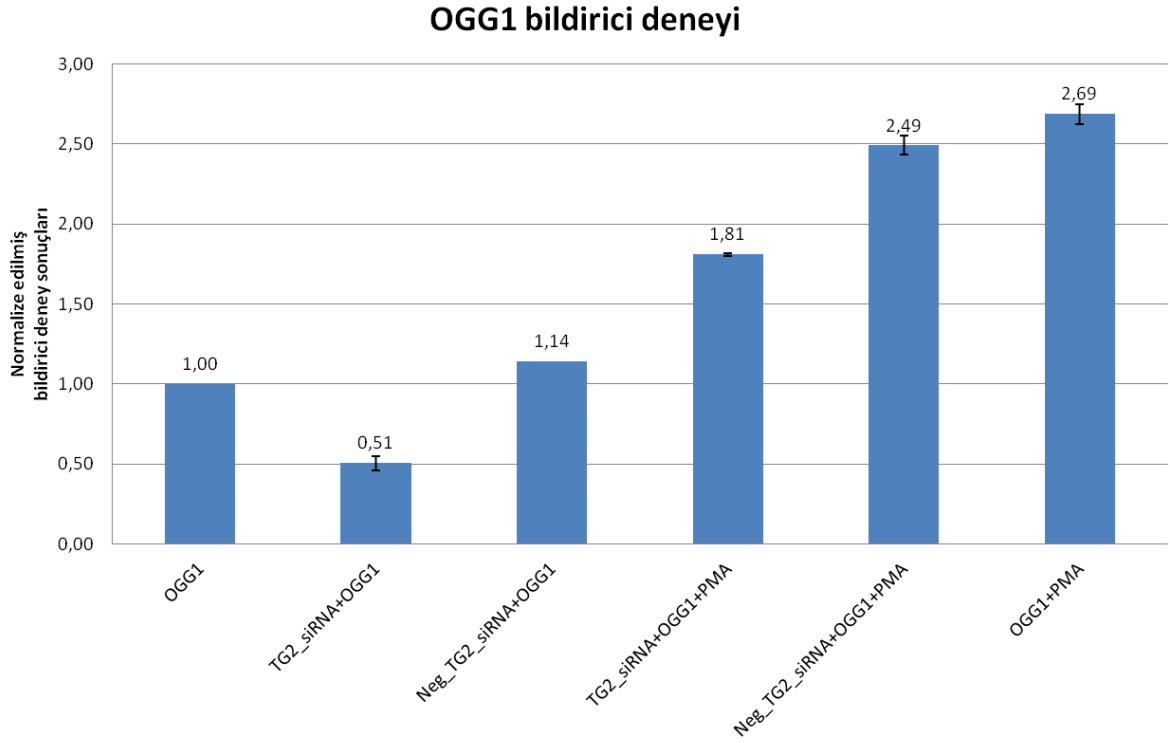
Reporter Assay (Bildirici Deney)

TG2 proteininin OGG1 promotor bölgesi üzerinde transkripsiyonel olarak aktivasyon etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla aşağıdaki koşullarda deney kurgulandı. Aynı deney sistemi içerisine, NFkB'nin TG2 ve OGG1 arasındaki ilişkiye ne şekilde etkisinin olduğunu belirlemek için NFkB aktivatörü Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)'de eklendi. PMA, NFkB'yi Protein kinaz C üzerinden aktive eden bir forbol esteridir. Spesifik olarak etkisini doğrudan NFkB üzerinden göstermemekle beraber, NFkB aktivatörü olarak kullanılmaktadır⁹⁰. Deneyler sırasında 50ng/ml olacak şekilde ve 4 saat muamele ederek PMA kullanılmıştır. Deney koşulları tablo 34'da verildiği gibidir.

Tablo 34. TG2 OGG1 İlişkisinin Belirlenmesi İçin Kurgulanan Deney Planı (OGG1= OGG1/Pg14.12 Bildirici Vektörü, Neg=Negatif)

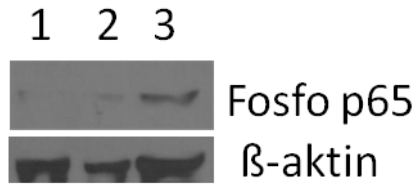
TG2_siRNA	OGG1	TG2_siRNA+OGG1
TG2_neg_siRNA	TG2_neg_siRNA+OGG1	TG2_siRNA+OGG1+PMA
TG2_neg_siRNA+OGG1+PMA	TG2_siRNA+PMA	TG2_neg_siRNA+PMA
Kontrol	PMA	PMA+OGG1

OGG1 reporter vektör ile kurgulanan deney örneklerinde yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde ikili lusiferaz deneyi gerçekleştirildi (şekil 62). PMA'in NFkB aktivasyonunun gösterildiği kontrol deneyi şekil 63'de verilmiştir. Bütün deney örneklerinde ise western-blot uygulaması ile TG2 (şekil 64), NFkB ve fosfo-NFkB proteinlerine bakıldı.

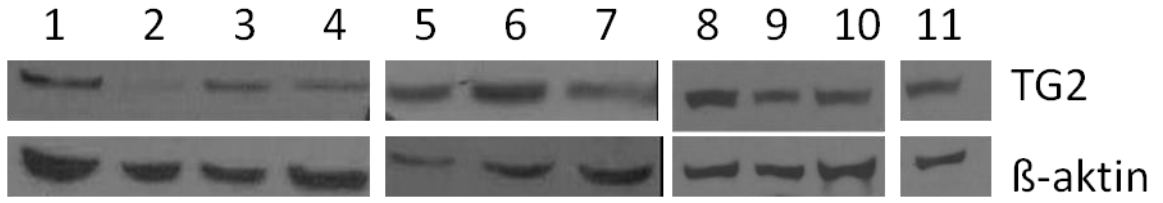


Şekil 62. OGG1 İkili Lusiferaz Deneyi

Deney sonrasında TG2 ile sessizleştirme işlemi gerçekleştirildikten sonra, OGG1 promotor aktivasyonunun, kontrol grubuna göre (sadece OGG1) yarı yarıya azaldığı, TG2 siRNA ile baskılanmasına rağmen PMA varlığında normale göre OGG1 aktivitesinin 1.8 kat arığı, ancak siRNA olmaksızın sadece PMA varlığında OGG1 promotor aktivitesinin normale göre 2.69 kat arttığını saptadık.



Şekil 63. NFκB Aktivatörü Olarak Kullanılan PMA'nin Fosfo P65 (cell signalling #3033) Artışına zaman bağımlı etkisinin Gösterilmesi. 1-0 saat, 2-4



Şekil 64. Bildirici Vektör Deneyinde, TG2 Baskılama Uygulaması. Numaralandırmaların açıklaması aşağıda verilmiştir. Jel yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır (TG2 siRNA-100nM, negatif siRNA 100nM, PMA- 50ng/ml konsantrasyonda kullanılmıştır, TG2 antikoru #ab2386).

- 1- Kontrol
- 2- TG2 siRNA
- 3- Negatif siRNA
- 4- Negatif siRNA + OGG1 bildirici vektör
- 5- TG2 siRNA + OGG1 bildirici vektör + PMA
- 6- Negatif siRNA + OGG1 bildirici vektör +PMA
- 7- TG2 siRNA + PMA
- 8- OGG1 bildirici vektör
- 9- TG2 siRNA + OGG1 bildirici vektör
- 10- OGG1 bildirici vektör +PMA
- 11- PMA

5.TARTIŞMA

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), histolojik olarak duktal hücrelerden köken alan en yaygın pankreatik neoplazidir ve pankreatik tümör vakalarının %85'den fazlasını oluşturur^{3,4}. Pankreatik duktal adenokarsinomlar tüm kanserler içerisinde en agresif olanlardan biri kabul edilmektedir. Dünyada her yıl 44,000 üzerinde kişiye pankreas kanseri tanısı konulmakta ve kanser ölümleri içerisinde dördüncü sırada yer almaktadır⁹¹. Pankreas kanserinin prognozu son derecede kötüdür. Pankreas kanser hücrelerinin standart kemoterapötikler ve radyasyon tedavisine karşı direnç göstermesi nedeniyle beş yıllık yaşam süresi, % 6'nın altındadır⁵. Bu durum yeni tedavi stratejilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yeni tedavi stratejileri ise ancak pankreas kanseri oluşum ve gelişiminin temel biyolojisinin aydınlatılmasıyla geliştirilebilir. Pankreas kanserinde DNA hasarının etkisi, bu hasarın onarımında rol alan proteinlerin ifade düzey değişimleri, yine bu proteinlerin pankreas kanserinde aşırı ifade edilen TG2 gibi proteinler ile etkileşimlerini ortaya koyabilmek için bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında öncelikle, pankreas kanserli hastaların tümör ve eşlenik normal dokularındaki DNA hasar düzeylerini karşılaştırmak, DNA hasarının pankreas kanseri oluşumundaki etkisini belirlemek amacıyla DNA hasar düzeyleri incelendi. Araştırmamız sonucunda ilk defa pankreas kanserli hastalardan alınan tümör ve eşlenik normal doku örnekleri bu düzeyde geniş bir hasar yelpazesinde değerlendirilmiştir. Yirmi baz ve nükleozid hasar türü ilk kez GC-MS/MS ve LC-MS/MS teknikleri kullanılarak bu dokularda ölçülmüştür. Yapılan değerlendirme sonrasında tümör dokularında 8-OH-Gua hasarında eşlenik normal dokularına göre artış görülmektedir. Tez kapsamında FapyGua, FapyAde, ThyGly ve 5-OH-5-MeHyd hasarlı bazlar değerlendirildiğinde, bu baz hasarlarının eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği saptanmıştır. Bunun yanında tüm dokulardaki toplam hasarlı baz oranı normale göre değerlendirildiğinde, tümörde baz hasarında artış görülmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Pankreas kanserli hastalarda nükleozid hasarları değerlendirildiğinde ise tümör dokularında sadece 8-OH-dG hasarı eşlenik normal dokularına göre yüksek olduğu gösterilmiştir. Diğer hasar türlerinde tümör dokularında eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği bulunmuştur.

DNA hasarının kanser oluşumunun tüm evrelerinde rol oynayabileceği bugün bilinmektedir. Bazı kanser türlerinde oksidatif DNA hasarının düzeyinde artış bildirilmiştir. Literatürde birçok çalışmada DNA hasarının karsinogenez sürecinin gelişiminde etkisi

olduğunu göstermişlerdir. Diğer baz hasar türlerinin artmayıp sadece oksidatif strese bağlı oluşan hasarın tümör dokularında artmış olması dikkat çekicidir. Bu durum, eşlenik normal dokuda bulunmayan hangi mekanizmaların tümör dokusunda oksidatif stresi artırdığı sorusunu gündeme getirmektedir. Akla gelen mekanizmalardan biri tümör dokusunun yüksek glukoz kullanımı olabileceği düşünülmekle beraber, konunun aydınlanması ileri araştırmalara bağlıdır. Oksidatif stresin tümör dokusunda artmış olması bu dokudaki spontan mutasyon hızının da artmasına yol açacağından, çevre normal dokudan daha hızlı mutasyon biriktiren ve bunun sonucu olarak değişen çevre koşullarına daha hızlı ve iyi uyum sağlayabilen bir özellik kazanacaktır. Bu da gittikçe tedaviye daha dirençli ve klinik olarak daha agresif bir kanser fenotipine katkıda bulunulacaktır. Bu konunun aydınlatılması için yine ileri araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında pankreas kanserli hastalarda oksidatif DNA hasarının onarımında rol alan enzimler olan OGG1 ve NEIL1'in mRNA ifade düzeylerinin incelenerek, kanserli hastaların tümör ve normal dokuları arasında bu iki enzimin ifade düzeyleri arasında bir fark olup olmadığı incelendi. İnsanda oksidatif DNA hasarının tamirinde sırasıyla hOGG1 ve NEIL1 olarak adlandırılan substrat spesifik glikozilazlar görev almaktadır. Sitozin ile eşleşmiş 8-OH-Gua ve FapyGua, hOGG1 tarafından tanınır ve kesilerek uzaklaştırılır.

Gerçek zamanlı PCR çalışmaları sonucunda, pankreas tümör dokularında, normal dokularına göre OGG1 ve NEIL1 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır. Tümör dokularında, normal dokularına göre OGG1 ifadesi 5,55 kat ve NEIL1 ifadesi 3,16 kat azalmıştır.

Doku Transglutaminaz (TG2) pankreas kanserinde yüksek düzeyde ifade edilen, ilaç direnci, metastaz ve kısa yaşam süresi ile ilişkili bir genidir. Literatürde yer alan bulgular kronik enflamasyon, TG2, metastaz ve ilaç dirençli kanser arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir⁶¹. Meme ve over kanserinde artmış TG2 ekspresyonu kemoterapiye direnç ve kötü prognoz ile paralellik göstermektedir^{80,81,92}. Pankreas kanserinde de aşırı eksprese olan TG2'nin ilaç direncine neden olduğu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁹³.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, pankreas kanser hücrelerinde doku transglutaminaz (TG2)'ın aşırı eksprese olduğu ve hücre ölümünü inhibe ettiği bildirilmektedir. Yayınlanmış verileri göz önünde tutarak biz de çalışmamızda tümör ve eşlenik normal pankreas dokularında TG2 mRNA ifade düzeyini araştırdık. Yaptığımız çalışma sonrasında, pankreas tümör dokularında normal dokulara göre TG2 ifadesi 4,62 kat artmıştır. Bu sonuç daha önce literatürde benzer çalışmalar tarafından elde edilen sonuçlar ile uyumludur^{24,78,93,94}.

Pankreas tümör ve normal dokularında, OGG1 ve TG2 düzeylerini özgün antikolarlar kullanarak, western-blot yöntemi ile de analiz etmeyi tez çalışmamızda amaçladık. Ancak yaptığımız çalışmalar sonrasında sadece bir örnekte OGG1 ifadesini protein düzeyinde saptayabildik. İki nedenden dolayı, protein düzeyinde OGG1'i belirleyememiş olabiliriz. Bunlardan ilki, ifade edilen protein düzeyinin, western-blot ile saptayabileceğimiz düzeyin çok altında olmasıdır. Bunun dışında, ameliyat sırasında elde edilen tümör ve normal pankreas dokuları çok iyi koşullarda elde edilmiş ve saklanmış olsa da, protein izolasyonunun bu dokularda farklı yöntemler uygulamamıza rağmen başarılı olamamasıdır. Özellikle izolasyona konu olan örneklerin çalışılma zorlukları (dokuların aşırı sert olmaları ve mekanik parçalamaya dahi izin vermemeleri) bu tip bir sonuç elde etmemizin nedenlerinden birisi olabilir.

Doku Transglutaminaz (TG2) pankreas kanserinde aşırı ekprese olan, ilaç direnci, metastaz ve düşük sağkalım ile ilişkili bir proteindir. Kanserın progresyonunda izlenen TG2 ekspresyon düzeylerindeki artışın NFκB molekülü üzerinden gerçekleştiğini bulgulayan çalışmalar bulunmaktadır. Öne sürülen modellere göre TG2, NFκB inhibitörü IκB'yi baskılayarak NFκB aktivasyonunu tetiklemekte buna karşın NFκB de TG2 promotörü üzerinde transkripsiyonel aktivatör işlevi tüklenmektedir. Bu pozitif geri beslemeli döngü her iki molekülün simültane aktivasyonunu sağlamaktadır. TG2 baskılanması gerçekleştirilen MIA-PaCa hücrelerinde NFκB proteininin aktif fosforile formunun da baskılandığı ve böylece TG2 ile NFκB arasında ilişki olduğu yaptığımız çalışmalarda gösterilmiştir. TG2'nin patofizyolojideki rolünü araştırma amacıyla siRNA baskılama çalışmaları planlanmış ve proje kapsamında TG2 siRNA baskılaması MiaPaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında gerçekleştirilmiştir. TG2'nin baskılandığı örneklerde NFκB p105 kDa'luk fosfo-formunun da baskılandığı ve böylece TG2 ile NFκB arasında ilişki olduğu, birbirlerini regüle edebildikleri çalışmamızda gösterilmiştir. Benzer şekilde literatürde farklı kanser hatlarında TG2'nin NFκB'yi aktive ettiği ve NFκB'nin de TG2'nin transkripsiyon faktörü olduğu gösterilmiş, aralarında sıkı bir ilişki olduğu belirtilmiştir^{24,79,80,95}. TG2 ile NFκB proteinlerinin ilikisini aydınlatmak ve bu iki proteinin DNA onarım enzimleri üzerindeki etkisini incelemek için çalışmaya, pankreas tümör örneklerinde mRNA ifadesi azaldığı bilinen OGG1 proteinini de dahil ettik. Bu proteini seçmemizdeki temel neden, yaptığımız internet veri bankaları temelli in-siliko çalışmada, OGG1 promotör bölgesinde olası (putatif) bir NFκB bağlanma motifi belirledik. Buna göre NFκB'nin hipotetik olarak OGG1 için bir transkripsiyon faktör olabileceğini düşünerek sonraki deneylerimizi planladık. Genel resim özetlenecek olduğunda;

1) OGG1, 8-OH-Gua hasarlı bazının tamirinde rol alan enzimdir. 2) TG2 ile NFκB arasında karşılıklı birbirini etkilen bir ilişki varlığı hem çalışmamızda hem de literatürde gösterilmiştir. 3) NFκB OGG1 için olası bir transkripsiyon faktörü olabilir. Bu üç protein arasındaki ilişkiyi analiz edebilmek için hücre kültür modelli bir deney planı ile çalıştık. Temel amacımız pankreas kanserinde aşırı ifade edilen TG2 proteini baskılanırsa, diğer iki protein ne şekilde bu sürece tepki vereceklerini analiz etmektir. TG2 baskılanmasının OGG1 ifade düzeyine etkisini analiz etmek amacıyla bildirici vektör sistem temelli bir çalışma gerçekleştirdik. TG2 proteini baskılandığında, OGG1 promotor aktivasyon düzeyinin yarı yarıya azaldığını gözlemledik. Bu TG2 ekspresyon düzeyi ile OGG1 promotör aktivasyonu ile ölçülen transkripsiyonu arasında somut bir korelasyon olduğunu; TG2'nin doğrudan/dolaylı olarak regüle edebilme potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

TG2 ile ilişkili olduğunu gösterdiğimiz NFκB'yi aktive ettiğimizde ise, TG2 proteinini susturmamıza rağmen OGG1 promotor aktivitesinin 1.8 kat arttığını, TG2 sessizleştirmesinin olmadığı durumlarda ise bu artışın 2.69 kat olduğunu saptadık. TG2, NFκB proteinin posttranslasyonel modifikasyonunda rol oynayan bir proteindir. *İnsiliko* olarak da NFκB 'nin OGG1 geni için transkripsiyon faktörü olduğunu yaptığımız ön çalışmada saptadık (<http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?gene=OGG1&species> id=0&factor=NF-kappaB&ninfo=n&ngene=n&nfactor=n). Bulgularımız TG2 baskılanmasının NFκB aktivasyonunu inhibe ettiği ve dolaylı yoldan OGG1 promotor aktivasyonu/transkripsiyonunun da azaldığı şeklinde yorumlanabilir. NFκB PMA gibi bir ajan ile uyarılığında, NFκB daha aktif forma geçerek TG2'nin baskılanmasının olumsuzluğunu kompanse edebilmektedir. Bu nedenle de OGG1 promotor aktivasyonu artmaktadır. Bu da başlangıçta ortaya koyduğumuz hipotezimizi desteklemektedir.

Her ne kadar TG2/NFκB/OGG1 arasında bir etkileşimi hücre hattında göstermiş olsak da hasta bulguları, *in vitro* bulgularımızı desteklememektedir. Hatırlanırsa hastaların tümör dokularındaki TG2 mRNA düzeylerinin artmış; ancak *in vitro* bulgularımızın aksine OGG1 mRNA düzeylerinin tümör dokularında düşmüş olduğunu gözlemlemiştik. Doku yetersizliği nedeniyle normal ve tümör dokularında NFκB düzeylerine bakmak mümkün olamamıştır. NFκB sinyal ileti yolağının aktivasyonu hasta dokularında doğrulanamamıştır. Ancak literatür baz alınır bu yolağın aktif olması beklenir. Bu durumda izlenen -beklenenin aksine- tamir enzimlerinin ekspresyon düşüklüğünde epigenetik mekanizmaların rol oynadığını

düşünmekteyiz. Spontan mutasyon hızının yüksek olması tumör için bir avantajdır. Ortama adaptasyonunu artırmanın yanısıra tedaviye direnç mekanizmalarının gelişimine yol açmaktadır. Dolayısıyla epigenetik olarak tamir genleri baskılanmış hücrelerin tumör içerisinde seçilim şansı daha yüksek olabilir ve zaman içerisinde bu hücreler tumör popülasyonunun çoğunluğunu oluşturabilir. Bu hipotezimizin test edilmesi ancak ileride yapacağımız araştırmalarda mümkün olacaktır.

6. SONUC VE ÖNERİLER

1. Çalışmalarımız pankreas kanserli hastalardan elde edilen tümör ve eşlenik normal dokularda ve MiaPaCa-2 hucre hattında gerçekleştirildi.
2. Hastaların tümör ve normal dokularında gerçekleştirilen DNA baz hasarları GC-MS/MS incelendiğinde, tümör dokularında 8-OH-Gua hasarında eşlenik normal dokularına göre artış görülmektedir ($p=0,025$). Tez kapsamında FapyGua, FapyAde, ThyGly ve 5-OH-5-MeHyd hasarlı bazlar değerlendirildiğinde, bu baz hasarlarının eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği saptanmıştır. Yapılan değerlendirme sonrasında bunun yanında tüm dokulardaki toplam hasarlı baz oranı normale göre değerlendirildiğinde, tümörde baz hasarında artış görülmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Pankreas kanserli hastalarda nükleozid hasarları değerlendirildiğinde ise tümör dokularında sadece 8-OH-dG hasarı eşlenik normal dokularına göre yüksek olduğu gösterilmiştir. Diğer hasar türlerinde tümör dokularında eşlenik normal dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği bulunmuştur ($p=0,03$).
3. Hastaların tümör ve normal dokularında oksidatif DNA hasarının onarımında rol alan enzimler olan OGG1 ve NEIL1'in mRNA ifade düzeyleri arasında bir fark olup olmadığı incelendi. Yaptığımız gerçek zamanlı PCR çalışmaları sonucunda, pankreas tümör dokularında, normal dokularına göre OGG1 ve NEIL1 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin düşük olduğu saptandı. Tümör dokularında, normal dokularına göre OGG1 ifadesi 5,55 kat ve NEIL1 ifadesi 3,16 kat azaldığı belirlendi.
4. Tümör ve eşlenik normal pankreas dokularında TG2 mRNA ifade düzeyini araştırdık. Yaptığımız çalışma sonrasında, pankreas tümör dokularında normal dokulara göre TG2 ifadesi 4,62 kat arttığı belirlendi.
5. Pankreas kanserli hastaların tümör ve eşlenik normal dokularından izole edilen total protein özütünde OGG1 ve TG2 proteinlerinin düzeyleri özgün antikorlar kullanılarak Western-blot yöntemi ile incelendi. Yaptığımız çalışmalar sonrasında sadece birer hastada OGG1 ve TG2 proteini saptanabildi. Diğer hasta tümör ve normal doku örneklerinde bu proteinler saptanamadı.
6. MiaPaca-2 hücrelerinde TG2 ifadesi siRNA ile baskılandı. Bu baskılama sonrasında NFκB proteininin aktif fosforile formunun da baskılandığını saptadık.
7. MiaPaca-2 hücrelerinde TG2 ifadesi siRNA ile baskılandığında, OGG1 promotor aktivitesinin yarı yarıya azaldığı gözlemlendi.

8. NFκB aktivasyonu PMA tarafından uyarıldığında, OGG1 promotor aktivitesinin yaklaşık 2 kat arttığını saptadık.
9. TG2 ifadesi siRNA ile baskılandığında gözlenen OGG1 promotor aktivitesinin, Aktive edilmiş NFκB varlığında yaklaşık 1,5 kat arttığını gözlemledik.
10. TG2 ve NFκB arasındaki ilişkiyi daha iyi açıklayabilmek için ek deneylerin yapılması gerekmektedir. Hasta tümör ve normal dokularda NFκB, OGG1 ve TG2 immunhistokimyası genel sonuçların yorumlanmasında yarar sağlayacaktır.
11. OGG1 ile NFκB arasındaki ilişkinin gösterilmesi için CHIP (chromatin immunoprecipitation), EMSA gibi daha detaylı inceleme yöntemlerinin uygulanması ileriki çalışmalarımızda planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- 1 Friedberg, E. C., Walker, G. C. & Siede, W. *DNA repair and mutagenesis*. (American Society for Microbiology (ASM), 1995).
- 2 Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* **17**, 1195-1214 (2003).
- 3 Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* **20**, 1218-1249 (2006).
- 4 Warshaw, A. L. & Castillo, C. F.-d. Pancreatic carcinoma. *New England Journal of Medicine* **326**, 455-465 (1992).
- 5 Ferlay, J. *et al.* GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer **2010**, 29 (2010).
- 6 Dizdaroglu, M., Kirkali, G. & Jaruga, P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 1610-1621 (2008).
- 7 Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 69-90 (2011).
- 8 Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306-313, doi:<http://www.nature.com/nature/journal/v481/n7381/abs/nature10762.html#supplementary-information> (2012).
- 9 Harris, T. J. R. & McCormick, F. The molecular pathology of cancer. *Nature reviews Clinical oncology* **7**, 251-265 (2010).
- 10 Hudson, T. J. *et al.* International network of cancer genome projects. *Nature* **464**, 993-998 (2010).
- 11 Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719-724 (2009).
- 12 Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* **11**, 85-95, doi:10.1038/nrc2981 (2011).
- 13 Ghaneh, P., Kawesha, A., Howes, N., Jones, L. & Neoptolemos, J. P. Adjuvant therapy for pancreatic cancer. *World journal of surgery* **23**, 937-945 (1999).
- 14 Ferlay, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. *Last accessed April* (2014).
- 15 Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* **64**, 9-29 (2014).
- 16 Klein, A. P. *et al.* Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer research* **64**, 2634-2638 (2004).
- 17 Raimondi, S., Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **6**, 699-708 (2009).
- 18 Ojajärvi, I. A. *et al.* Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occupational and environmental medicine* **57**, 316-324 (2000).
- 19 Omary, M. B., Lugea, A., Lowe, A. W. & Pandol, S. J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *Journal of Clinical Investigation* **117**, 50-59 (2007).
- 20 John, T. G., Greig, J. D., Carter, D. C. & Garden, O. J. Carcinoma of the Pancreatic Head and Periampullary Region Tumor Staging with Laparoscopy and Laparoscopic Ultrasonography. *Annals of surgery* **221**, 156-164 (1995).

- 21 Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. Pancreatic cancer. *The Lancet* **378**, 607-620 (2011).
- 22 You, G. O. Pancreatic Cancer Treatment (PDQ®): Treatment-Health Professional Information [NCI]. *IIB* **1**, M0.
- 23 Livingston, E. H., Welton, M. L. & Reher, H. A. Surgical treatment of pancreatic cancer. *International Journal of Pancreatology* **9**, 153-157 (1991).
- 24 Akar, U. *et al.* Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Research* **5**, 241-249 (2007).
- 25 Allen, V. B., Gurusamy, K. S., Takwoingi, Y., Kalia, A. & Davidson, B. R. Diagnostic accuracy of laparoscopy following computed tomography (CT) scanning for assessing the resectability with curative intent in pancreatic and periampullary cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **11** (2013).
- 26 Seufferlein, T., Bachet, J. B., Van Cutsem, E. & Rougier, P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology* **23**, vii33-vii40 (2012).
- 27 Wolfgang, C. L. *et al.* Recent progress in pancreatic cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* **63**, 318-348 (2013).
- 28 Kumar, V., Abbas, A. K. & Aster, J. C. *Robbins basic pathology*. (Elsevier Health Sciences, 2012).
- 29 Rozenblum, E. *et al.* Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research* **57**, 1731-1734 (1997).
- 30 van Heek, N. T. *et al.* Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American journal of pathology* **161**, 1541-1547 (2002).
- 31 Wilentz, R. E. *et al.* Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Research* **60**, 2002-2006 (2000).
- 32 Bardeesy, N. & DePinho, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* **2**, 897-909 (2002).
- 33 Maginn, E. N., de Sousa, C. H., Wasan, H. S. & Stronach, E. A. Opportunities for translation: Targeting DNA repair pathways in pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **1846**, 45-54 (2014).
- 34 Mathews, L. A. *et al.* Increased expression of DNA repair genes in invasive human pancreatic cancer cells. *Pancreas* **40**, 730 (2011).
- 35 Reddy, P., Jaruga, P., O'Connor, T., Rodriguez, H. & Dizdaroglu, M. Overexpression and rapid purification of *Escherichia coli* formamidopyrimidine–DNA glycosylase. *Protein expression and purification* **34**, 126-133 (2004).
- 36 Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement^{1, 2}. *Free Radical Biology and Medicine* **32**, 1102-1115 (2002).
- 37 Larson, R. A. *Naturally occurring antioxidants*. (CRC Press, 1997).
- 38 D'Autréaux, B. & Toledano, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 813-824 (2007).
- 39 Lindahl, T. & Barnes, D. E. 127-134 (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 40 David, S. S., O'Shea, V. L. & Kundu, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **447**, 941-950 (2007).
- 41 Ba, X. *et al.* The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation. *International journal of molecular sciences* **15**, 16975-16997 (2014).

- 42 Madhusudan, S. & Middleton, M. R. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer treatment reviews* **31**, 603-617 (2005).
- 43 McCullough, A. K., Dodson, M. L. & Lloyd, R. S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annual review of biochemistry* **68**, 255-285 (1999).
- 44 Hazra, T. K., Hill, J. W., Izumi, T. & Mitra, S. Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential *in vivo* functions. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **68**, 193-205 (2001).
- 45 Wallace, S. S., Bandaru, V., Kathe, S. D. & Bond, J. P. The enigma of endonuclease VIII. *DNA repair* **2**, 441-453 (2003).
- 46 Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* **73**, 39-85 (2004).
- 47 Wilson III, D. M. & Bohr, V. A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA repair* **6**, 544-559 (2007).
- 48 Mol, C. D., Parikh, S. S., Putnam, C. D., Lo, T. P. & Tainer, J. A. DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **28**, 101-128 (1999).
- 49 Matsumoto, Y. & Kim, K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* **269**, 699-702 (1995).
- 50 Frosina, G. *et al.* Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 9573-9578 (1996).
- 51 Klungland, A. & Lindahl, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO journal* **16**, 3341-3348 (1997).
- 52 Krokan, H. E. & Bjørås, M. Base excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a012583 (2013).
- 53 Cooper, G. M. & Hausman, R. E. *The cell*. (Sinauer Associates Sunderland, 2000).
- 54 Weterings, E. & Chen, D. J. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell research* **18**, 114-124 (2008).
- 55 Zhao, Z. M., Li, C. G., Hu, M. G., Zhao, G. D. & Liu, R. Association of c. 461G> A genetic variant of OGG1 gene with pancreatic cancer susceptibility in Chinese. *Genetics and molecular research: GMR* **13**, 7256 (2014).
- 56 Lin, Y. *et al.* An overview of genetic polymorphisms and pancreatic cancer risk in molecular epidemiologic studies. *Journal of epidemiology/Japan Epidemiological Association* **21**, 2-12 (2010).
- 57 Yan, Y., Chen, X., Li, T., Li, M. & Liang, H. Association of OGG1 Ser326Cys polymorphism and pancreatic cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Tumor Biology* **35**, 2397-2402 (2014).
- 58 Bernstein, C., Prasad, A. R., Nfonam, V. & Bernstein, H. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. (2013).
- 59 Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 140-156 (2003).
- 60 Mehta, K. Mammalian transglutaminases: a family portrait. (2005).
- 61 Mehta, K., Kumar, A. & Kim, H. I. Transglutaminase 2: a multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology* **80**, 1921-1929 (2010).
- 62 Hasegawa, G. *et al.* A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochem. J* **373**, 793-803 (2003).

- 63 Mishra, S. & Murphy, L. J. Tissue Transglutaminase Has Intrinsic Kinase Activity IDENTIFICATION OF TRANSGLUTAMINASE 2 AS AN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-BINDING PROTEIN-3 KINASE. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 23863-23868 (2004).
- 64 Fesus, L., Madi, A., Balajthy, Z., Nemes, Z. & Szondy, Z. Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia* **52**, 942-949 (1996).
- 65 Nicholas, B., Smethurst, P., Verderio, E., Jones, R. & Griffin, M. Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity. *Biochem. J* **371**, 413-422 (2003).
- 66 Chhabra, A., Verma, A. & Mehta, K. Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context. *Anticancer research* **29**, 1909-1919 (2009).
- 67 Verma, A. & Mehta, K. Transglutaminase-Mediated Activation of Nuclear Transcription Factor-B in Cancer Cells: A New Therapeutic Opportunity. *Current cancer drug targets* **7**, 559-565 (2007).
- 68 Kim, D.-S., Park, S.-S., Nam, B.-H., Kim, I.-H. & Kim, S.-Y. Reversal of drug resistance in breast cancer cells by transglutaminase 2 inhibition and nuclear factor- κ B inactivation. *Cancer research* **66**, 10936-10943 (2006).
- 69 Haroon, Z. A., Hettasch, J. M., Lai, T.-S., Dewhirst, M. W. & Greenberg, C. S. Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *The FASEB journal* **13**, 1787-1795 (1999).
- 70 Falasca, L. *et al.* Transglutaminase type II is involved in the pathogenesis of endotoxic shock. *The Journal of Immunology* **180**, 2616-2624 (2008).
- 71 Nardacci, R. *et al.* Transglutaminase type II plays a protective role in hepatic injury. *The American journal of pathology* **162**, 1293-1303 (2003).
- 72 Tatsukawa, H. & Kojima, S. Recent advances in understanding the roles of transglutaminase 2 in alcoholic steatohepatitis. *Cell biology international* **34**, 325-334 (2010).
- 73 Shweke, N. *et al.* Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF- β activation and cell infiltration. *The American journal of pathology* **173**, 631-642 (2008).
- 74 Seiving, B., Ohlsson, K., Linder, C. & Stenberg, P. Transglutaminase differentiation during maturation of human blood monocytes to macrophages. *European journal of haematology* **46**, 263-271 (1991).
- 75 Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899 (2010).
- 76 Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444 (2008).
- 77 Verma, A. & Mehta, K. Tissue transglutaminase-mediated chemoresistance in cancer cells. *Drug Resistance Updates* **10**, 144-151 (2007).
- 78 Mangala, L. S., Fok, J. Y., Zorrilla-Calancha, I. R., Verma, A. & Mehta, K. Tissue transglutaminase expression promotes cell attachment, invasion and survival in breast cancer cells. *Oncogene* **26**, 2459-2470 (2006).
- 79 Verma, A. *et al.* Therapeutic significance of elevated tissue transglutaminase expression in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* **14**, 2476-2483 (2008).
- 80 Mehta, K., Fok, J., Miller, F. R., Koul, D. & Sahin, A. A. Prognostic significance of tissue transglutaminase in drug resistant and metastatic breast cancer. *Clinical cancer research* **10**, 8068-8076 (2004).
- 81 Han, J. A. & Park, S. C. Reduction of transglutaminase 2 expression is associated with an induction of drug sensitivity in the PC-14 human lung cancer cell line. *Journal of cancer research and clinical oncology* **125**, 89-95 (1999).

- 82 Brown, K. D. Transglutaminase 2 and NF- κ B: an odd couple that shapes breast cancer phenotype. *Breast cancer research and treatment* **137**, 329-336 (2013).
- 83 Gilmore, T. D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684 (2006).
- 84 Chandel, N. S., Trzyna, W. C., McClintock, D. S. & Schumacker, P. T. Role of oxidants in NF- κ B activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *The Journal of Immunology* **165**, 1013-1021 (2000).
- 85 Escarcega, R. O., Fuentes-Alexandro, S., Garcia-Carrasco, M., Gatica, A. & Zamora, A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clinical oncology* **19**, 154-161 (2007).
- 86 Ling, J. *et al.* Kras^{G12D}-Induced IKK2/ β /NF- κ B Activation by IL-1 α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer cell* **21**, 105-120 (2012).
- 87 Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning*. Vol. 2 (Cold spring harbor laboratory press New York, 1989).
- 88 Sambrook, J. & Russell, D. W. Agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols* **2006**, pdb-prot4020 (2006).
- 89 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45-e45 (2001).
- 90 Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928 (1986).
- 91 Siegel, R., Ward, E., Brawley, O. & Jemal, A. Cancer statistics, 2011. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 212-236 (2011).
- 92 Mehta, K. Tissue transglutaminase expression and drug resistance in ovarian cancer. (2009).
- 93 Verma, A. *et al.* Increased expression of tissue transglutaminase in pancreatic ductal adenocarcinoma and its implications in drug resistance and metastasis. *Cancer research* **66**, 10525-10533 (2006).
- 94 Mann, A. P. *et al.* Overexpression of tissue transglutaminase leads to constitutive activation of nuclear factor- κ B in cancer cells: delineation of a novel pathway. *Cancer research* **66**, 8788-8795 (2006).
- 95 Dalby, K. & Tekedereli, I. Targeting the pro-death and pro-survival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* **6**, 322-329 (2010).

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.A.Arzu SAYINER
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Doç.Dr.Servet AKAR
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuza 26.06.2009 tarihinde başvuran; 234/2009 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Güldal KIRKALI'nın proje yöneticisi ve sorumlusu olduğu, "Pankreas adenokarsinomlarında ve primer kültürlerinde oksidatif DNA baz hasarının ölçülmesi, onarım enzim ekspresyonlarının incelenmesi ve programlanmış otofajik hücre ölüm yolunun düzenlenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı
(katılmadı)

Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Üye

Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Üye (katılmadı)

Doç.Dr.Murat DUMAN
Üye

Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Üye

Yunus KARSLI
Üye

Prof.Dr.Tunç ALKIN
Başkan Yardımcısı

Tunç Alkin

Doç.Dr.Güven ASLAN
Üye

Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Üye

Doç.Dr.Servet AKAR
Üye (katılmadı)

Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Üye

Ahmet Can Bilgin

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İÇİ

Tel: 0232 412 22 54

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/04-24	Tarih: 09.02.2012
	Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun tarih ile onayladığı Dr.Güldal KIRKALI'nın sorumlusu olduğu "Pankreas adenokarsinomlarında ve primer kültürlerinde oksidatif DNA baz hasarının ölçülmesi, onarım enzim ekspresyonlarının incelenmesi ve programlanmış otofajik hücre ölüm yolunun düzenlenmesi" isimli klinik araştırmanın adı "Pankreas Kanseri DNA Hasarının ve Programlanmış Hücre Ölüm Yolaklarının İncelenmesi" olarak değiştirilmesi ve sorumlu araştırmacı Dr.Güldal KIRKALI'nın emekli olması nedeniyle Doç.Dr.Zeynep SERCAN'a çalışmayı devretmesi ile ilgili araştırmacı dilekçesi incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr..Zuhâl BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukâddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/18-27	Tarih: 08.05.2014
	Doç.Dr.Zeynep SERCAN'ın sorumlusu olduğu "Pankreas Kanseri DNA Hasarının ve Programlanmış Hücre Ölüm Yolaklarının İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait sorumlu araştırmacı tarafından gönderilen dilekçeye ilişkin olarak; -Çalışma adının "Pankreas Kanseri DNA Hasar ve Onarımının İncelenmesi" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
---------------	---

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılan</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Alper</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>N.Şen</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Ece Böber</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Hüseyin Baskın</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Vesile Öztürk</i>
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Bilgin Cömert</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Mukaddes Güneli</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılan</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Nihal Gelecek</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>İşıl Tekmek</i>
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Müge Kiray</i>
Doç.Dr.Şeyda SerenİNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılan</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>Katılan</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	<i>İhsan Çelikdemir</i>

EK-2 ONAM FORMU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

“Pankreas Kanserinde DNA Hasar ve Onarımının İncelenmesi” adlı çalışmamızda, kalıtsal materyal olan DNA’nın kanser dokularındaki hasarı, eğer varsa bu hasar onarımının nasıl olduğunun incelenmesi ve tümör hücrelerini ölüme götürecekt bazı yolların aranarak ilgili bazı ilaçların hücre kültürü ortamında denenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Pankreas kanseri, önemli bir sağlık sorunudur. Cerrahi tedavi, en önemli tedavi yöntemidir. Sizin de hastalığınız nedeniyle ameliyat olmanız gerekmektedir. Ameliyat, uluslararası cerrahi standartlarında uygulanacaktır. Tümörün patolojik incelenmesi sonucunda hastalığınızın evresi öğrenilerek bundan sonra alacağınız ek tedaviler belirlenecektir. Bunun yanısıra araştırmaya katılmak istemeniz durumunda ameliyat sırasında tedaviniz için gerekli cerrahi işlem sonucu çıkarılan pankreas dokunuzdan 2 adet doku örneği alınacaktır. Bu örneklerden birisi çıkarılan tümörün kendisinden, diğeri ise çıkarılan tümöre 5-6 cm daha uzak bölgeden olacaktır. Bunun amacı sizin kalıtsal materyelinizdeki olası hasarı saptamak, bu hasarın onarımına yönelik molekülleri incelemek, sizin dokunuzdan laboratuvarında ürettiğimiz hücre kültürlerinde düzeyinde bazı ilaçlara gelen yanıtları değerlendirmek amaçlanmaktadır. Bu çalışmadaki gönüllü olarak 40 kişi yer alacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILACAK GÖNÜLLÜLERİN KARŞILAŞABİLECEĞİ RİSK VE RAHATSIZLIKLAR

Doku örneği alınması amacı ile normalde yapılması planlanan ameliyattan farklı bir ameliyat yapılmayacak ya da çıkarılması planlanan dokudan daha fazla doku çıkarılmayacaktır. Alınan doku örnekleri sizin patolojik inceleme sonuçlarınızı etkilemeyecektir; böyle bir kuşku olması halinde çalışma için örnek alınmayacaktır. Örnekler ameliyatı yapan genel cerrahi uzmanı ya da incelemeyi yapacak patoloji uzmanı tarafından alınacaktır. Örnek alımı sırasında sizin sağlığını etkileyebilecek herhangi bir durum oluşmayacaktır.

ÇALIŞMADAN BEKLENEN YARAR

Alınan doku örneklerinde DNA hasarı ve onarımının belirlenmesi, geliştirilecek hücre kültürlerinde tümör hücrelerini ölüme götürecektir yolların çalışılması ve bu ortamlarda bazı ilaçların denenmesi hastalığın gidişatı ve ek tedaviler hakkında ek bilgiler sağlanması açısından önem taşımaktadır.

ÇALIŞMAYA KATILANLARIN HAKLARI

Gönüllüler araştırmaya katılmayı reddetmeye, araştırma devam ettiği sırada araştırmadan ayrılma hakkına sahiptirler. Bu durum hastaların tedavilerinde olumsuz bir duruma neden olmayacaktır.

Gönüllüler kendi rızalarına bakılmaksızın araştırmacı tarafından çalışma dışı bırakılabilirler.

Örnek alınması ve çalışmanın sizin için herhangi bir tıbbi yararı olmayacaktır. Tıbbi yarar oluşturmaya yönelik çalışmalara destek verecektir. Çalışmaların bir kısmı yurt dışında gerçekleştirilecektir.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak, veriler ve size ait bilgiler gizli tutulacaktır. Araştırma sonuçlarının ve alınacak doku örneklerinin bu çalışma dışında başka bir amaç veya çalışma için kullanılması kesinlikle söz konusu değildir. Bu araştırma ile ilgili masraflar size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

Yukarıda yazılı gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı:

Soyadı:

Telefon numarası:

Tarih:

İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı:

Soyadı:

Telefon numarası:

Tarih:

İmza:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı:

Soyadı:

Telefon numarası:

Tarih:

İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı:

Soyadı:

Telefon numarası:

Tarih:

İmza:

EK-3 ARBİS FORMATINDA ÖZGEÇMİŞ

TC Kimlik No / Pasaport No:	17089531240
Doğum Yılı:	1983
Yazışma Adresi :	Mansuroğlu mah. 273/1 sok. Cemre apt no:36 3-4 B Blok Daire:11 Bayraklı İzmir/Türkiye
Telefon :	232-3441252
e-posta :	ferihatoksoz@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	MOLEKÜLER TIP	Doktora	2010-
Türkiye	Ege Üniversitesi	NÜKLEER BİLİMLER ENSTİTÜSÜ	NÜKLEER BİLİMLER	Yüksek Lisans	2009
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	BİYOKİMYA	Lisans	2006

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Diğer
moleküler tıp, moleküler biyoloji, biyokimya

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı		
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı		
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı		
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı	Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans	
	Doktora	

	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Tuna G, Özkaya F, Ertas T, Yener G, Dizdaroğlu M, Kırkalı G, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi-Adana, Türkiye. Alzheimer Hastalığında Oksidatif Dna Baz Hasarının Ve Dna Onarım Enzimlerinin Ekspresyon Düzeyleri, Turk J Biochem, 2011; 36 (S), Syf 285, Poster No:159 (Poster Ödülü).	23. Ulusal Biyokimya Kongresi- Türk Biyokimya Derneği	2011

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

Toksoz, Feriha; Demir, Ilknur; Bayrak, Elif; Kocagozoglu, Gamze; Onursal, Mehmet; Karademir, Gulgun; Lambrecht, Fatma Yurt, Radiolabeling of EGCG with I-131 and biodistribution in rats, 2012, MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH
Unak, Gulcan; Ozkaya, Feriha; Medine, Emin İlker; Kozgus, Ozge; Sakarya, Serhan; Bekis R, Unak Perihan; Timur S.; Özkaya, Feriha, Gold nanoparticle probes: Design and in vitro applications in cancer cell culture, 2012, COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES
"Medine, İlker Emin; Unak, Perihan; Sakarya, Serhan; Toksöz Feriha", Enzymatic Synthesis of Uracil Glucuronide, Labeling with 125/131I, and In Vitro Evaluation on Adenocarcinoma Cells, 2010, CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS
Ozkaya, Feriha; Unak, Perihan; Medine, E. İlker; Sakarya, Serhan; Unak, Gulcan; Timur, Suna., 18FDG conjugated magnetic nanoparticle probes: synthesis and in vitro investigations on MCF-7 breast cancer cells, 2013, JOURNAL OF RADIOANALYTICAL AND NUCLEAR CHEMISTRY
Ozgenturk, Ozdemir Nehir; Oruc, Fatma; Sezerman, Uğur; Kucukural, Alper; Senay Vural Korkut, Toksoz, Feriha; Un, Cemal, Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from Olea europaea L., 2010, COMPARATIVE AND FUNCTIONAL GENOMICS
Medine, E.İlker; Ünak, Perihan; Sakarya, Serhan; Özkaya Feriha, Investigation of in vitro efficiency of magnetic nanoparticle-conjugated 125I-uracil glucuronides in adenocarcinoma cells, 2011, JOURNAL OF NANOPARTICLE RESEARCH

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
Tuna G, Özkaya F, Ertas T, Yener G, Dizdaroğlu M, Kırkalı G, Alzheimer hastalığında oksidatif DNA baz hasarının ve DNA onarım enzimlerinin ekspresyon düzeyleri, Turk J Biochem, , 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011

Tuna G, Ozkaya F, Dizdaroglu M, Kirkali G, Oxidatively Induced DNA Base Damage and DNA Repair Enzyme Expression Levels in Alzheimer's Disease, SFRBM, 18th Annual Meeting, 2011

Akdemir N, Tuna G, Özkaya F, Kırkalı G, Demir N, Farelerde preterm doğumun önlenmesinde anti-makrofaj migrasyon inhibitör faktör antikorunun etkinliği., 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011

Zorlu Y, Eskut N, Filiz C, Balaban G, Tuna G, Ozkaya F, Calis N, Are antiepileptic drugs causes of premature atherosclerosis by disturbing lipid metabolism?, 21st Meeting of the European-Neurological-Society, 2011

Eskut N, Ozkaya F, Tuna G, Zorlu Y, Kirkali G, Evaluating the Lipid Profiles, Lipoprotein(A), Oxidized LDL and Adiponectin Levels in Patients Using Carbamazepin And Valproic Acid., 4th International Congress of Molecular, 2011

Diğer yayınlar