



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PTERJİYUMDA WWOX GEN EKSPRESYONUNUN
ve PROTEİN SEVİYESİNİN ANALİZİ**

Hazırlayan

Nihan BOZKURT

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT – 2018



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PTERJİYUMDA WWOX GEN EKSPRESYONUNUN
ve PROTEİN SEVİYESİNİN ANALİZİ**

Hazırlayan

Nihan BOZKURT

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Hacı Ömer ATEŞ

TOKAT – 2018

Her hakkı saklıdır

**PTERJİYUMDA WWOX GEN EKSPRESYONUNUN
VE PROTEİN SEVİYESİNİN ANALİZİ**

Tezin Kabul Eğiliş Tarihi: 19/11/2014

Jüri Üyeleri (Unvan, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Hanıyet ALTUNTAŞ

Üye : Prof. Dr. H. Ömer ATIŞ

Üye : Doç Dr. Akın TEKCAN

Üye : Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU

Üye : Dr Öğr. Üyesi Sait ALİM



Bu tez, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/09/2014 tarih ve 20/01 Sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. H. Ömer ATIŞ


T.C.
GAZIOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 83116987 - 500
Konu : Etik Kurul Kararı
Toplantı Tarihi : 25.11.2014
Toplantı No : 2014/20
Proje No : 14-KAEK-228

27.11.2014

Sayın, Doç.Dr.Hacı Ömer ATEŞ

Etik Kurulumuzun 25.11.2014 tarihli toplantısında görüşülen 14-KAEK-228 numaralı "Pterijumda WWOX Gen Ekspresyonunun ve Protein Seviyesinin Analizi" başlıklı çalışmanızın yapılmasında sakınca olmadığına karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Doç.Dr.Ahmet EYİBİLEN
Başkan

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

15/10/2018

Nihan BOZKURT

TEŞEKKÜR

Akademik hayata başladığım andan itibaren hep yanımda olan; bilgisini, sabrını, desteğini bir an olsun esirgemedi sunan, danışmanım olduğu için kendimi şanslı saydığım değerli danışman hocam Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ'e,

Her türlü problememi çözmeme yardımcı olan Tıbbi Biyoloji AD hocaları Doç Dr. Nevin KARAKUŞ'a, Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU'na ve Doç. Dr. Serbülent YİĞİT'e,

Çalışmam için gerekli örneklerin kriterlere uygun olarak toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Göz hastalıkları Anabilim Dalı hocalarına ve Dr. Hüseyin ORTAK'a,

Tanıdığım ilk günden itibaren hayatımda büyük yerleri olan, yaşadığımız her türlü olumsuzluğu birlikte bertaraf ettiğimiz, Arş. Gör Saime SEZER SONDAŞ'a, Arş. Gör Emel ENSARİ'ye,

Çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Msc. Bıo Sümeyya Deniz ÇELİK'e,

Doktora eğitimim süresince resmi işlemleri yürüten Sağlık Bilimleri Enstitü personeline,

Atlas Biyoteknoloji'ye,

Ve Ailem.... Hayatımın her anında yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan, desteklerini bir an olsun esirgemeyen Annem ve Babam'a, varlıklarıyla hayatıma neşe katan evlatlarım Defne ve Tuna'ya, hayatımızı birleştirdiğimiz günden bu yana kendisini akademik çalışmalar içerisinde bulan, ilgisi, sevgisi ve sabrıyla bana her daim destek olan canım eşim Volkan BOZKURT'a sonsuz teşekkürler...

Nihan BOZKURT

Bu alışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Porje No: 2015/26 (Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi)

Proje No: 215S692 (TÜBİTAK)

Nihan BOZKURT



ÖZET

Bozkurt,N (2018). Pterijyumda WWOX Gen Ekspresyonunun ve Protein Seviyesinin Analizi. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD. Doktora Tezi, Tokat

WWOX, yaklaşık 1.1 mb'lık genomik bir bölgeyi kaplayan ve 16q23.3→q24.1'te yerleşik bir tümör baskılayıcı gendir. Bu bölge insanlarda en yaygın ikinci frajil bölge olan FRA16D'yi kapsamaktadır. WWOX geni, 2.2 kb uzunluğunda bir transkriptten ve 414 amino asit'ten oluşan 46 kDa'luk bir protein kodlar. WWOX proteini N-terminalinde iki WW alanından ve C terminalinde ise SDR adlı bir kısa zincirli dehidrojenaz domeininden oluşur. WW alanları, prolin içeren ligandlarla bağlanarak protein-protein etkileşimlerine aracılık etmektedir. WWOX; hücre çoğalması, embriyonik gelişim, metabolizma ve apoptozu düzenleyen birçok sinyal yolağında görev almaktadır. Birçok kanser türünde WWOX'un kaybı veya anormal transkriptlerinin bulunması WWOX'un tümör baskılayıcı aktivitesini göstermektedir.

Bu çalışmada, bir tümör analogu olabileceği düşünülen pterijyumda WWOX gen ifade ve protein düzeyinin belirlenmesi amaçlandı.

Bu amaçla 27 hastaya ait pterijyum dokusunda WWOX gen ifade değişimi gerçek zamanlı PZR yöntemi ile, WWOX protein değişimi ise Western Blot yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışma sonuçlarımıza göre pterijyum dokusunda WWOX geni ifade ve protein düzeyinin kontrol dokusuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir oranda azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bilgiler ışığında; bir tümör baskılayıcı gen olan WWOX'un, pterijyum dokusunda ifade ve protein düzeyinin azalması, pterijyumun kanser analogu bir doku olabileceği yönündeki iddiaları desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Gerçek Zamanlı-PZR, Pterijyum, Western Blot, WWOX

ABSTRACT

Bozkurt,N (2018). Analysis of WWOX Gene Expression and Protein Levels in Pterygium. Tokat Gaziosmanpaşa University, Health Sciences Institute, Department of Medical Biology, Ph.D. Thesis, Tokat.

WWOX is a tumor suppressor that covering approximately 1.1 MB genomic region and the 16q23.3 → q24.1. This region includes FRA16D, the second most common fragile region in humans. The WWOX gene encodes a protein of 46 kDa consisting of a 2.2 kb long transcript and 414 amino acids.. The WWOX gene consists of two WW domains at the N-terminal and a short chain dehydrogenase domain at the C-terminal. WW domains mediate protein-protein interactions by binding to proline-containing ligands. WWOX is involved in many signal pathways such as; cell proliferation, embryonic development, metabolism and apoptosis. In many cancers, the loss of WWOX or the presence of abnormal transcripts indicates the tumor suppressor activity of WWOX.

In this study, it was aimed to determine WWOX gene expression and protein level in pterygium which may be a tumor analog.

For this purpose, the WWOX gene expression change in 27 pterygium tissue was investigated by real-time PCR method, and the change in WWOX protein was investigated using the Western Blot method.

According to our results, it was found that the expression and protein levels of WWOX gene in pterygium tissue decreased significantly compared to control tissue ($p < 0.05$).

This informations indicate that a decrease in expression and protein level in pterygium tissue of WWOX, a tumor suppressor gene, supports claims that pterygium may be a cancer analogue tissue.

Key Words: Pterygium, Real-Time PCR, Western Blot, WWOX

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Epidemiyoloji.....	5
2.2. Etiyoloji.....	6
2.3. Pterjiyum Oluşumunda Etkili Olan Faktörler.....	7
2.3.1. UV Radyasyon.....	7
2.3.2. p53.....	14
2.3.3. Viral Enfeksiyonlar ve Kalıtım.....	19
2.4. Pterjiyum Gelişimi İle İlişkili Moleküler Mekanizmalar.....	21
2.4.1. Pterjiyumda Hücre Proliferasyonu, Migrasyonu ve Anjiyogenez.....	22
2.4.2. Epigenetik Faktörler.....	25
2.4.3. İnflamatuar Mediatorler ve Büyüme Faktörleri.....	27
2.4.4. İmmünolojik Mekanizmalar.....	31
2.4.5. Ekstrasellüler Matriks Modulatorleri.....	32
2.4.6. Epitelyal-Mezankimal Geçiş.....	32
2.4.7. Kolesterol Metabolizması Değişiklikleri.....	33
2.5. Pterjiyumda DNA Tamiri.....	34
2.6. Pterjiyumda Apoptoz ve Apoptozla İlişkili Genlerin İfade Düzeyleri.....	35
2.7. Pterjiyumda Hsp90.....	37
2.8. Pterjiyumda Heterozigotluk Kaybı ve Mikrosatellit İnstabilite.....	39
2.9. WWOX Geni.....	41
2.9.1. WWOX Proteinini.....	43
2.9.2. WWOX'un Tümör Süpresör Aktivitesi.....	49
2.9.3. TNF, Bcl-2, Bcl-xL, p53, p73, ve Diğer Apoptozla İlişkili Faktörler.....	53
2.9.3.1. C-jun.....	54
2.9.3.2. p73.....	55
2.9.3.3. AP-2γ.....	56
2.9.3.4. E2F1.....	56
2.9.3.5. Ezrin.....	57
2.9.3.6. Dvl Proteinleri.....	57
2.9.4. WWOX Regülasyonunun Karsinogenez ve Metastaz İle İlişkisi.....	59
2.9.5. WWOX ve DNA Hasarına Cevap.....	59
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
3.1. GEREÇ.....	61
3.1.1. Çalışma Grupları.....	61
3.1.2. Dokuların Saklanması.....	61
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	62

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Kit İçerikleri.....	63
3.1.5. Tampon ve Çözeltiler.....	64
3.1.5.1. RNA Eldesinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	64
3.1.5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Tamponları.....	64
3.1.5.3. Western Blot Tamponları.....	65
3.1.5.4. Gerçek Zamanlı PZR'de Kullanılan Taqman Problar.....	65
3.2. YÖNTEM.....	66
3.2.1. Dokudan RNA İzolasyonu.....	66
3.2.2. RNA Miktar Ölçümü.....	67
3.2.3. cDNA Sentezi.....	67
3.2.4. cDNA Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	68
3.2.5. WWOX mRNA İfade Analizi.....	68
3.2.5.1. Gerçek Zamanlı PZR.....	68
3.2.6. WWOX Geni Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları Analizi.....	70
3.2.7. Protein İzolasyonu.....	71
3.2.8. Protein Ölçümü.....	71
3.2.9. WWOX Geni Protein Analizi.....	71
3.2.9.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	72
3.2.9.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	73
3.2.9.3. Blotlama.....	74
3.2.10. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	75
4. BULGULAR.....	76
4.1. WWOX mRNA İfade Analizi.....	77
4.2. Western Blot Analiz Sonuçları.....	81
5. TARTIŞMA.....	83
6. KAYNAKLAR.....	91

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo2.1:	Büyüme Faktörleri ve Pterijyum Patogenezindeki Rollerini.....	30
Tablo3.1	Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Taqman Problar.....	65
Tablo3.2.	cDNA Sentezinde Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	67
Tablo3.3.	cDNA Sentezinde Kullanılan 2.Aşama Bileşenler ve Miktarları.....	67
Tablo3.4:	Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Tepkime Karışımının Miktarları.	70
Tablo 3.5.	Gerçek Zamanlı PZR Protokolü.....	70
Tablo3.6.	Protein Örneklerinin Hazırlanmasında Kullanılan Reaktifler ve Miktarları.....	73
Tablo4.1	Pterijyum Hasta Gruplarına Ait Demografik Veriler.....	76
Tablo 4.2:	Pterijyum ve Normal Dokulara Ait WWOX ve Referans Gen (β -Aktin) Ct Değerleri.....	79
Tablo 4.3.	WWOX ve β -Aktin Genine Ait Ct, Δ Ct, $2^{-\Delta\Delta$ CT ve p Değeri.....	80
Tablo 4.4:	WWOX ve GAPDH Proteinine Ait p Değeri.....	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1	Pterjiyum Gelişiminde Etkili Olan Çevresel ve Genetik Faktörler...	7
Şekil 2.2	Pterjiyum Gelişimi İle İlişkili Temel Nedensel Faktörler ve Etkilenen Moleküler Mekanizmalar.....	9
Şekil 2.3	Pterjiyum Gelişimi İle İlişkili Moleküler Mekanizmalar.....	21
Şekil 2.4	Pterjiyumda DNA Tamiri.....	34
Şekil 2.5	WWOX'un Sistemik Gösterimi.....	43
Şekil 2.6	WWOX Protein Domainleri.....	44
Şekil 2.7	WWOX Sinyal Yolağı.....	48
Şekil 2.8	WWOX Yapısının Şematik Diyagramı ve Sinyallemedeki Rolü....	54
Şekil 2.9	WWOX'un Hücre İçi Trafığı.....	58
Şekil 3.1	Pterjiyum Dokusuna Ait Histopatolojik Görüntü.....	62
Şekil 3.2	Taqman Siteminin Şematik Gösterimi.....	69
Şekil 3.3	Western Blot Yönteminin Çalışma Prensibi.....	72
Şekil 4.1	Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Cinsiyet Dağılımı.....	76
Şekil 4.2	Çalışmada Kullanılan Pterjiyum ve Normal Konjonktiva Dokularının alındığı Göz.....	77
Şekil 4.3	Pterjiyum Dokusunda WWOX Genine Ait Gerçek Zamanlı PZR Görüntüsü.....	78
Şekil 4.4	β -Aktin Genine Ait Gerçek Zamanlı PZR Görüntüsü.....	78
Şekil 4.5	WWOX ve β -Aktin Genine Ait Ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri.....	80
Şekil 4.6	$2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerlerine Göre WWOX Gen İfade Düzeyindeki Değişimler.....	81
Şekil 4.7	Pterjiyum ve Kontrol Dokusuna Ait Membran Görüntüsü.....	81
Şekil 4.8	Pterjiyum ve Normal Dokularda WWOX Proteinine Ait Artış Azalış Oranları.....	82

KISALTMA ve SİMGE LİSTESİ

- CTF:** C-terminal fragman
TNF- α : Tümör nekroz faktör- α
4-HHE: 4-hidroksiheksenal
4-HNE: 4-hidroksinonenal
6-4PPs: 6-4 photoproduct
8-OHdG: 8-hidroksi-20-deoksiguanozin
ACK1: Aktif Cdc42-ilişkili tirozin kinaz 1
ADH/SDR: Alkol dehidrojenaz/redüktaz
AP-2 γ : Aktivatör protein 2 γ
BaP: Benzo(a)piren
BCC: Bazal Hücreli Karsinoma
bç: baz çifti
BPDE: Benzo(a)piren delepoksit
CFS: Yaygın kırılğan bölge
CMV: Sitomegalovirüs
COX: Sikloksijenaz
CPD'ler: Siklobütan pirimidin dimerleri
CYP1A1: Sitokrom p4501A1
DNMT3b: DNA metil transferaz 3b
Dvl: Disheveled protein
ECM: Ekstraselüler matriks
EMT: Epitelyal Mezenkimal geçiş
ErbB4: V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
FGF2: Fibroblast Büyüme Faktörü 2
FS: Frajil bölge
GSK-3 β : Glikojen Sentaz Kinaz 3 β
HB-EGF: Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü
HCC: hepatoselüler karsinoma
HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HLA-DR: insan lökosit antijeni-DR
hOGG1: insan 8-okzoguanin glikosilaz I
HPV: İnsan Papilloma Virüs
Hsp90: heat shock protein 90
HSV: Herpes Simpleks Virüs
ICAM-1: hücre içi adezyon molekülü-1
IGFBP-2: insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini-2
IL-1: İnterlökin-1
IL-4: İnterlökin-4
IL-6: İnterlökin-6
IL-8: İnterlökin-8
JAK/STAT: Janus kinase-2/signal transducer and activator of transcription-3
JNK1: c-Jun N-terminal kinaz 1
kb: kilobaz
kDA: KiloDalton
KHDAK: Küçük hücre dışı akciğer kanseri

LOH: Heterozigotluk kaybı
LSC: Limbal Kök Hücre
MDA: Malondialdehit
MI: Mikrosatellit instabilitesi
MMP: Matriks Metalloproteinazlar
NF-κB: Nükleer Faktör-κB
NLS: Çekirdek yerleşim sinyali
nm: nanometre
NOS: nitrik oksit sentaz
NPC: nazofarenks karsinom
PCNA: Proliferasyon Hücre Çekirdeği Antijeni
PDGF: Trombosit Türevi Büyüme Faktörü
PEDF: pigment epiteli türetilmiş faktör
PI3K/AKT: Fosfotidilinositol3kinaz/Akt yolağı
PLK-1: Polo benzeri kinaz
POSTN: Osteoblasta Özgü Faktör
PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri
RFS: Nadir kırılğan bölge
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
SAT1: N1-Asetiltransferaz 1
OSCC: özofagal squamoz hücre karsinoması
SDF-1: Stroma türetilmiş faktör
SIMPLE: Lizozom/geç endozom küçük integral membran proteini
SNP: Tek nükleotid polimorfizmi
TGM2: Transglutaminaz-2
TIMP1': Mtallopeptidaz inhibitörü 1
Tsp-1: trombospondin-1
uPA: Urokinaz tipi plazminojen aktivatörü
UVR: Ultraviyole Radyasyon
VCAM-1: Vasküler hücresel adezyon molekülü-1
VEGFA: Vasküler Endotelial Growth Factor A
YAP65: Yes-associated protein

1. GİRİŞ

Pterjiyum; etiyoloji ve patogenezini tam olarak anlamamış, genellikle nazal tarafta yerleşim gösteren, bulber konjonktivanın korneaya doğru ilerlediği üçgen şeklinde, dejeneratif ve hiperplastik bir lezyon olarak tanımlanmaktadır. Pterjiyum; inflamasyon, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu ile karakterize bir durumdur (Solomon, 2006; Anguria ve ark., 2014).

Hastalığın etiyolojisi ile ilgili olarak birçok faktör tanımlanmıştır (Riau ve ark., 2011). Epidemiyolojik çalışmalar; pterjiyum insidansının güneş ışığına maruz kalma ile ilişkili olduğunu ve hastalığın iyi huylu bir tümör olabileceğini düşündürmektedir. UV radyasyonu, normal hücre büyüme kontrolünün kaybı ile hasarlı hücrelerde karsinojenik bir etkiye sahiptir (Kato ve ark., 2007; Maxia ve ark., 2008). Pterjiyum gelişimi için olası diğer nedenler arasında; epidermal proliferasyonda anormallikler, inflamasyon, ekstraselüler matrikste değişiklikler, metabolik hastalıklar, nöronal disfonksiyon, epitelyal-mezenkimal geçişteki değişikliklerin yanı sıra antiapoptoz, immün aktivite, oksidatif stres, viral tutulum ve kalıtım sıralanmaktadır (Riau ve ark., 2011; Kim ve ark., 2013). Pterjiyuma yol açan temel faktörlerden birinin hücre döngüsü bozuklukları olduğu kabul edilmektedir, yani proliferasyon ve apoptozdan kaçışa neden olan hücre döngüsü hareketlerinden sapma pterjiyum oluşum ve gelişiminde önemli bir role sahiptir (Kim ve ark., 2013).

İlk kez 2000 yılında tespit edilen FOR veya WOX1 olarak bilinen WW domaini içeren bir oksidoredüktaz olan WWOX, 16. kromozomun uzun kolunda lokalize olan tümör baskılayıcı bir gendir (Qu ve ark., 2013; Nowakowska ve ark., 2014a). NH₂-ucunda iki adet WW etki alanı (domain) ve C-terminalinde kısa zincir

dehidrogenaz/redüktaz (SDR) etki alanına sahiptir (Płuciennik ve ark., 2012). WW domaini protein-protein bağlanmasına katılan korunmuş bir yapıdır. WWOX proteini çok sayıda önemli sinyal yollarında çeşitli proteinlerle etkileşiminden dolayı bir tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gösterir. Örneğin WWOX; c-Jun, erbB4 ve MDM21 gibi onkogenlerin karsinogenik etkilerini baskılar ve apoptozu uyaran tümör baskılayıcı genleri aktive eder. Proapoptotik yolda, bazı kanser genlerini düzenlemesinin yanı sıra tümörögenезin başlangıcında sıklıkla fonksiyonunu kaybeder. WWOX'un promotor hipermetilasyonu ile susturulduğu meme, kemik, yumurtalık, prostat, özofagus, karaciğer, akciğer ve pankreas kanserleri gibi çeşitli insan kanserlerinde gözlenmiştir (Winardi ve ark., 2013).

Çalışma kapsamında 27 hastanın pterjiyum dokusu ve normal konjonktiva dokusundan RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR analizi ile WWOX geni ifade düzeyindeki değişim; Western blot analizi ile WWOX protein miktar değişimi saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırılarak WWOX ifadesindeki değişimin pterjiyum patogenezinde bir rolü olup olmadığını belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Pterijyum, yüzyıllar önce Hipoccrates, Galen, Celcus tarafından tanımlanmış olup kornea yüzeyine uzanan fibrovasküler konjonktiva dokusunun invaziv, üçgen şeklinde büyüme gösterdiği ve görme keskinliğinin azalmasına neden olan yaygın, oküler yüzey hastalıklarından birisidir (Aslankurt ve ark., 2003; Kim ve ark., 2013; Xu ve ark., 2013; Feng ve ark., 2017). Değişmiş bazal epitelyal hücre proliferasyonu, vaskülarizasyon ve bitişik korneal epitelyum yayılımı ile karakterizedir (Girolama ve ark., 2004; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Hastalık öncelikle limbus yakınlarındaki korneada gri sınırdaki noktaların oluşumu ve plikanın yer değiştirmesi ile başlar. (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Korneayı merkeze doğru istila eden pterijyum epiteli, skuamöz metaplazi ve goblet hücre hiperplazisi gösterir. Pterijyum baş kısmında Bowman tabakası ve epitelyal bazal membran arasında ilerleyen fibroblastlar görülmektedir. Ayrıca Bowman membranına damarlar ve bağ dokusu yerleşerek bu yapıyı bozmaktadır (Arffa,1991). Fibroblastların ve kan damarlarının stromal aşırı büyümesine, inflamatuvar hücre infiltratı ile elastin ve kollajenden oluşan anormal bir hücre dışı matris birikimi de eşlik eder (Girolama ve ark.,2004).

Konjonktivanın kornea üzerine doğru limbus boyunca kanat şeklinde büyüyen invaziv fibrovasküler bir doku olarak tanımlanan pterijyum, sık görülen bening bir bozukluktur (Anguria ve ark., 2014; Hacıoğlu ve Erdöl; 2017). Pterijyumun, kutanöz aktinik keratozise benzeyen, mukozal epitelin kanser öncesi durumunu temsil edebilmesinin yanı sıra; en geleneksel tedavi olarak uygulanan cerrahi müdahale sonrasında hastalığın agresif olarak tekrarlayabilmesi, konjonktivanın sadece basit bir dejeneratif durumu olmadığını aynı zamanda neoplazi benzeri bir büyüme bozukluğu olabileceğini de düşündürmektedir (Perra ve ark., 2006).

Genellikle nazal tarafta lokalize olmasına karşın temporal tarafta da yerleşim gösterebilir (Hacıoğlu ve Erdöl; 2017). Pterijyumun bu tipik yerleşiminin, medial limbüste meydana gelen güneş ışığının korneada odaklanmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Perra ve ark., 2006). İyi huylu seyretmesine rağmen görmeyi tehdit edebilir bir durumdur ve ameliyat sonrası nüks yaygın olmasına karşın cerrahi müdahaleye oldukça sık başvurulur. Hiyaloid dejenerasyon, eozinofilik granüler materyal birikimi ve yoğun fibroblastik proliferasyon patolojik özellikleridir. Pterijyumda bozuk fibriller yapılar da oldukça sık görülür (Detorakis ve ark., 2000).

Pterijyum; anterior korneaya giren baş, yüzeyel limbus içeren boyun ve sklerayı örten gövde olmak üzere 3 bölüme ayrılmıştır (Anguria ve ark., 2014; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Baş kısmı, çok katlı yassı hücrelerden oluşan konjonktiva epiteliyle kaplıdır. Bu tabakanın altında ise kalınlaşmış, hipertrofiye ve dejenerasyona uğramış bağ dokusu yer alır (Özeç ve ark., 2008). Oluşan lezyonun görme eksenine ilerlemesi görme kaybına yol açmaktadır (Perra ve ark., 2006). Pterijyum patogenezinin halen tam olarak anlaşılmasından dolayı pterijyum oluşumunun ve cerrahi sonrası nüksün önlenmesi ile ilgili sorunların çözümünde başarılı olunamamıştır (Anguria ve ark., 2014).

Pterijyum prevelansı ile genellikle ekvatora yakın bölgelerde yaşayan kişiler arasında sıkı bir bağlantı olduğunun yapılan çalışmalarla desteklenmesi patogeneizde ultraviöle (UV) radyasyonun etkisini güçlendirmektedir. Alternatif olarak viral enfeksiyonlar, epigenetik bozukluklar, immünolojik ve antiapoptotik mekanizmalar, angiyojenik ve lenfangiyogenik uyarılar, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks yeniden şekillenmesi (Perra ve ark., 2006; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016), ekstrasellüler matriks modulatorlerinin deregülasyonu, epitelyal-mezenkimal geçişteki değişimler,

inflamasyon kaskadı ve kolesterol metabolizması modifikasyonlarını içeren geniş bir patojen faktör dizisi de önerilmektedir. Ancak bu faktörlerin çoğu hastalığın kökeninden çok gelişimi ve devamı ile ilişkilidir. Bu faktörlerin bazılarının UV radyasyona maruz kalma ile direkt veya indirekt olarak ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.1. Epidemiyoloji

Pterijyum tüm dünyada görülmekle birlikte, güneşli, sıcak ve tozlu iklim koşulları ile tropikal, subtropikal bölgelerde daha yaygın olup (Aslankurt ve ark., 2003), pterijyum bölgesi olarak da bilinen ekvatora yakın bölgelerde yaşayan toplumlarda çok sık görülen fibrovasküler bir lezyondur. Bu bölgedeki bazı ülkelerde sıklığının genel nüfusun yaklaşık %22'si olduğu tahmin edilirken bu bölge dışındaki ülkelerde ise pterijyum sıklığının önemli ölçüde az olması (%2'den az) pterijyum gelişiminde çevresel faktörlerin etkisinin güçlü olduğunu göstermektedir. Çoğunlukla güneş ışığına çok fazla maruz kalan insanların bu hastalıktan etkilenmesi güneş ışığındaki UV radyasyonun pterijyum gelişimdeki en önemli çevresel faktör olduğunu göstermektedir (Liu ve ark., 2013b). Bu hipotez, epidemiyolojik veriler ve UV hasarlı cilt ile ortak özellikler gösteren histopatolojik değişikliklerin pterijyumda da gözleniyor olması ile desteklenmektedir (Perra ve ark; 2006).

Erkeklerde görülme sıklığı bayanlardan 2 kat fazla olması ise erkeklerin dışarıda daha fazla kalmasından kaynaklanabilir. Benzer yaşam tarzına sahip gruplarda ise cinsiyete göre prevelans açısından bir farklılık gözlenmemektedir. Ailesel geçiş gösteren olgular bildirilmiş olsa da hastalık genellikle sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (Aslankurt ve ark., 2003).

2.2. Etiyoloji

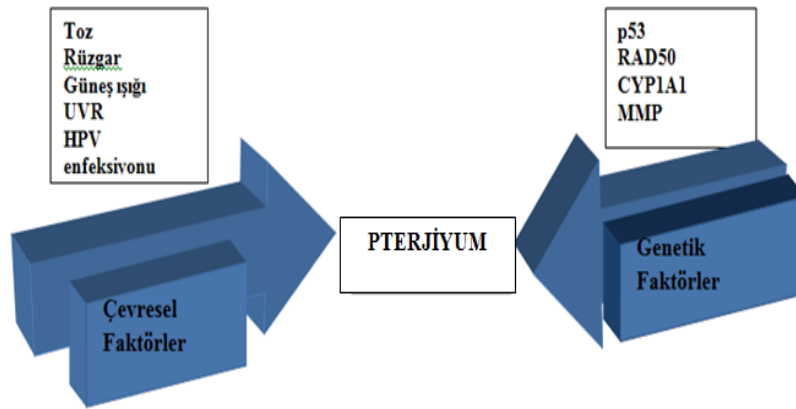
Pterijyum etiopatogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen yapılan çalışmalar özellikle UV ışınlarına aşırı maruz kalmanın hastalık patogenezinde çok önemli bir yeri olduğunu göstermektedir (Hacıoğlu ve Erdöl; 2017). Pterijyum; UV radyasyon, viral enfeksiyon, kalıtsal faktörler, immünolojik faktörler, aseptik inflamasyon, rüzgar, toz, travma, duman ve göz kuruluğu gibi çevresel etkiler dahil olmak üzere çok sayıda risk faktörü ile ilişkilidir. Son yıllarda ise transkripsiyon faktörleri, cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein, sitokrom P450 1A1 proteini, fosfolipaz D ve aquaporin-1 ve -3'ün artmış seviyeleri bir risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır (Zhou ve ark., 2016).

Hastalık sıklığı coğrafik bölgelere göre de farklılık göstermektedir. Pterijyum sıklığı sahil köylerinde yaşayanlarda dağlık bölgeler ve düzlüklerde yaşayanlara göre anlamlı derecede yüksektir (Liu ve ark., 2013b).

Yapılan bazı araştırmalarda, pterijyum patogenezinin alerjik ve immünolojik temelleri olabileceğini destekleyen sonuçlara da ulaşılmıştır. Çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve metalloproteinaz enzimler, fotorekraktif keratektomi sonrası toplanma süresince korneada tespit edilmiştir. Lökositler tarafından sentezlenen bu biyolojik faktörlerin pterijyum oluşumunda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Ayrıca pterijyum epitel hücrelerinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin üretimini sağlayan sinyal yolağı UV tarafından aktive edilir. İnflamatuar mediatör salınımından dolayı hem akut hem de kronik komplikasyonlar atopik hastalarda gözlenmiştir (Shayegan ve ark., 2016). Birçok çalışma, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ve interlökinler gibi çeşitli moleküllerin pterijyum patolojisinde yeri olan anjiyogenez,

fibrozis, proliferasyon ve iltihaplanma ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Feng ve ark., 2017).

Hastalıkta aile öyküsünün varlığı ise patogeneizde genetik faktörlerin rolünü göstermektedir. Bu bilgiler ışığında bile pterjiyum etiyojisi halen gizemini korumaktadır. Ancak son yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalarla pterjiyum patogenezine ait önemli bilgiler elde edilmiştir. En önemli hipotezlerden birisi genetik yatkınlığı olan kişilerde, UV radyasyon ve HPV enfeksiyonları gibi çevresel etkilere maruz kalmanın, pterjiyum gelişimi ile sonuçlanmasıdır. Hastalığın klinik olarak ortaya çıkması için, çevresel ve genetik faktörlerin birden fazla yolla kesişmesi gerekmektedir (Şekil 1.1) (Liu ve ark., 2013a).



Şekil 2.1 Pterjiyum Gelişiminde Etkili Olan Çevresel ve Genetik Faktörler

2.3. Pterjiyum Oluşumunda Etkili Olan Faktörler

2.3.1. UV Radyasyon

Pterjiyum, 'pterjiyum zonu' olarak bilinen ekvatorun 40° kuzey ve güney enlemleri arasındaki bölgede yaşayan popülasyonlarda daha yaygın olarak görülür ve bu durum daha yüksek UV yoğunluğu ile ilişkilendirilmiştir (Zhou ve ark., 2016). UV radyasyona maruz kalma ile pterjiyum gelişmesi arasındaki ilişki oftalmüloz' olarak

kabul edilen lezyonun çalışılması ile kurulmuştur. Bu konudaki ilk görüş güneş ışığının, daha sonra 'pterjiyogenetik' veya 'anjyogenetik' faktör gibi davranabilen dejenere bir protein materyalinin oluşumuna neden olabileceği idi. Özellikle dağınık ışık (albedo) şeklindeki UV-A (320-400nm) ve UV-B radyasyonun (280-320 nm dalga boyu ile) en tehlikelisi olduğu düşünülmektedir. Pterjiyum ile bazal hücreli karsinoma (BCC), porfiriler ve kseroderma pigmentosum gibi güneş ışığıyla ilişkili olduğu bilinen diğer durumlar arasında güçlü bir epidemiyolojik korelasyon vardır. Erkeklerdeki pterjiyum insidansının ykseklieği de, mesleki nedenlerden dolayı güneşe maruz kalma düzeylerinin yükselmesine bağlanmıştır. Işık hasarı, serbest radikal oluşumu ile ilgilidir ve hücresel seviyedeki bu hasar korneoskleral limbusun immünolojik durumunun modifikasyonu ile ilişkilendirilebilir (Detorakis ve ark., 2000).

Epidemiyolojik alışmalar, özellikle UV-B ışınları da dahil olmak üzere güneş ışığına uzun süre maruz kalınmasının pterjiyum gelişiminde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. UV ışınları normal büyüme kontrolünün kaybı ile oluşan DNA hasarına yol açmakta ve kanserojen etkisini bu yolla göstermektedir (Rodrigues ve ark., 2008).

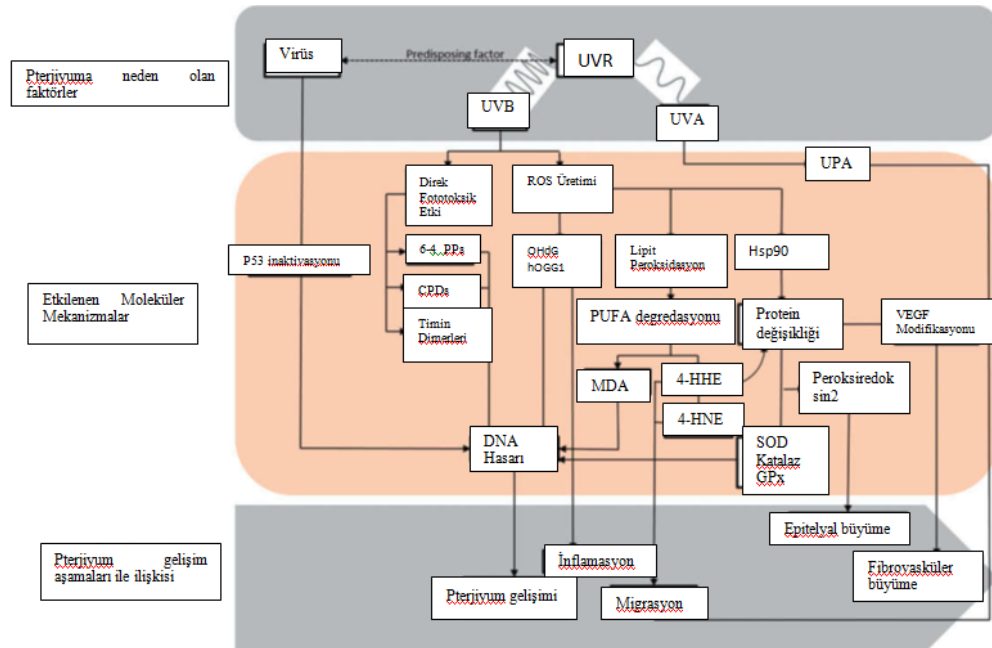
UV radyasyon (UV-A ve UV-B), DNA hasarı, oksidatif stres, hücre yüzeyi reseptörü ve hücre içi sinyal yolağı aktivasyonu da dahil olmak üzere sayısız biyolojik etkilerle ilişkilendirilmiştir. Bu etkiler çoklu genlerin transkripsiyonel profilinin değişimi ve dolayısıyla hücrelerin biyolojik davranışındaki değişikliklerle yakından ilişkilidir. UV radyasyon, limbal kök hücreler (LSC'ler) dahil oküler hücreler üzerinde biyolojik etkileri yoluyla pterjiyum patogenezinde rol oynayabilir (Zhou ve ark., 2016).

UV radyasyonun pterjiyum oluşumuna etkisi; güneş ışığına maruz kalma ile pterjiyum sıklığı arasındaki ilişkinin açık bir şekilde gözlenmesinden bu yana tam

olarak netlik kazanmıştır. UV radyasyonun hücelere zarar vermesi ve dokularda hasar oluşturması iki mekanizma ile gerçekleşmektedir:

- A) Hücresel DNA üzerinde doğrudan fototoksik etki
- B) Hücresel DNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi (Perra ve ark., 2006; Sebastia ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

300 nm'nin altındaki küçük dalga boylarının biyolojik açıdan en aktif form olduğu ve çoğunlukla kornea tarafından emildiği bilinmektedir. 280-315 nm arasında değişen UV-B radyasyon dalga boyları, oküler yüzeyi etkiler ve bu etki doğrudan UV'ye maruz kalma seviyesiyle ilişkilidir. UV radyasyonunun pterijyuma nasıl bir moleküler mekanizma ile neden olduğu hala araştırılmakta ve çeşitli alternatifler önerilmektedir. Şekil 2 'de pterijyum gelişimi ile ilişkili temel nedensel faktörler ve etkilenen moleküler mekanizmalar gösterilmiştir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).



Şekil 2.2: Pterijyum Gelişimi İle İlişkili Temel Nedensel Faktörler ve Etkilenen Moleküler Mekanizmalar (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016)

UV-B radyasyon, oksidatif strese neden olma kapasitesinden dolayı pterijyum oluşumundan sorumlu temel faktör olarak düşünülmektedir (Sebastia ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Yüksek mutajenik potansiyele sahip bir oksidatif stres belirteci olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) molekülü primer pterijyumun baş bölgesi epitelinde sağlıklı konjonktivaya oranla 4,7 kat daha yüksek seviyede bulunmuştur. Antioksidan fonksiyonuna ek olarak bu molekülün üretimi oksidatif stres kaynaklı inflamasyona karşı hücrelerin savunma mekanizmalarından biri olabilir. Hücresel DNA'da 8-OHdG bulunması pterijyum dokusunda aşırı eksprese edildiği gösterilen hOGG1 enzimi (insan 8-okzoguanin glikosilaz I) ile azaltılabilir. hOGG1 geni ekson 7'de 1245 pozisyonunda C-G değişimi, Ser326Cys değişimi ile sonuçlanır ve Kau ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada bu değişim pterijyum gelişmesine yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (Kau ve ark., 2006; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

8-OHdG'nin, oksidatif DNA hasarının derecesini değerlendirmek için hassas ve stabil bir biyolojik belirteç olduğu gösterilmiştir. Pterijyum bir oksidatif dejeneratif hastalık olarak kabul edilmesine rağmen, birçok araştırmacı pterijyumun muhtemelen UV ışınlarıyla indüklenen bir hücresel proliferatif hastalık olduğunu düşünmektedir. (Sebastia ve ark., 2013). Perra ve ark tarafından yapılan bir çalışma da, tamamı dışarda çalışan 31 pterijyum olgusunun 21'inde 8-OHdG'in, kontrol grubuna oranla daha yüksek tespit edilmesi pterijyumda oksidatif stres ve UV radyasyonun etkili olduğu görüşünü desteklemektedir (Perra ve ark., 2006).

Oksidatif stres aynı zamanda lipid ve proteinlerin modifikasyonundan da sorumludur. UV-B radyasyon ile ROS oluşumu hücresel membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olur böylece reaktif aldehyitler olan 4-hidroksiheksenal (4-HHE) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) içeren çeşitli doymamış yağ asitlerinin (PUFA)

dejenerasyonunu uyarır. Bu moleküller; pterjiyumun ön kısmında, korneal göçün meydana geldiği baş kısmında ve subepitelyal bağ dokularının aktif çoğalmasının gerçekleştiği orta kısmında artmaktadır. 4-HHE ve 4-HNE, histidin, sistein ve lizin rezidüleri ile reaksiyona girerek proteinleri değiştirme ve normal işlevlerini etkileme potansiyeline sahiptir. Bu protein modifikasyonları normal konjonktivanın aksine pterjiyum dokusunda belirgindir. UV-B radyasyon ile oluşan lipid peroksidasyonunun bir diğer belirteci olan malondialdehitte (MDA) önemli bir artış antioksidan enzimler olan süperoksitdismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin pterjiyum dokusunda sürekli azalması ile DNA hasarına neden olan ROS birikimine neden olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, bir çalışmada diğer bir antioksidan enzim olan peroksiredoksin 2'nin pterjiyum epitelinde çok fazla eksprese olduğu bulunmuştur. Artan bu ekspresyon, peroksit ile uyarılan apoptozun inhibisyonu ile ilişkilidir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

UV ışını doğrudan fototoksik etkileri ile de DNA hasarına neden olabilir. Cimpean ve ark. çalışmalarında primer pterjiyum fibroblastlarında, endotel hücrelerinde ve nükseden pterjiyum fibroblastlarında timin dimerlerinin varlığını tespit etmişlerdir. Timin dimerlerinin arttığı hücre kümelerinin primer pterjiyumdan alınan epitelin bazal kısmında bulunması, Chui ve ark.'larının, UV radyasyon ile modifiye edilen bazal epitel hücrelerinin pterjiyumla ilişkili invazyon ve nüks oranından sorumlu olduğu hipotezini desteklemektedir. Ayrıca, nüks pterjiyumda bazal hücre miktarının belki de DNA onarım mekanizmasındaki bir hasara bağlı olarak azaldığı ve daha yüksek bir mutasyon oranının meydana gelmesine izin verdiği bulunmuştur (Chui ve ark., 2011; Cimpean ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

UV-B radyasyonunun DNA tarafından doğrudan absorbe edilmesi, iki tür sarmal fotolezyona neden olur: DNA replikasyonu sırasında C'nin T'ye ve CC'nin TT'ye dönüşmesine neden olan komşu primidinler arasında Siklobütan pirimidin dimerleri (CPD'ler) ve 6-4 fotoprodüktörler (6-4PPs) oluşur. CPD'ler memeli hücrelerinde UV-B ışığının neden olduğu mutasyonların yarısından fazlası ile ilişkilidir ve sadece UV maruziyetini takiben gözün ön bölgesinde bulunmuştur. Bu DNA lezyonları, transkripsiyon ve replikasyon gibi temel hücresel metabolik süreçleri etkileyebilir. UV ışık maruziyeti ile oluşan pirimidin dimerleri premutajenik özelliklere sahiptir ve DNA yapısını değiştirirler. Timin dimerleri fotoreaktivasyonla onarılabilir, ancak düzeltilmemiş dimerler mutajeniktir (Cimpean ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Nükseden pterijyumda timin dimer ifadesinin sürekliliği insan pterijyum fibroblastlarında DNA tamirinin başarısızlığına neden olur. Fibrovasküler bölgedeki bu tamir edilmeyen DNA hasarı, pterijyumda UV ışığına bağlı gen mutasyonları ve polimorfizmlerinden sorumlu olabilir (Cimpean ve ark., 2013).

UV, pterijyum oluşumundan sorumlu birçok sinyal yolağını da aktive edebilme özelliğine sahiptir. UV, aktif serbest radikallerin oluşumunu sağlayabilmesinin yanı sıra DNA metilasyonunu, pterijyum oluşumunda etkili matriks yeniden şekillenmesi ve hücre adhezyonunu da regüle edebilir. Pterijyum epiteli, proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulmasından dolayı UV radyasyon aracılı apoptoza mümkün olduğunca dirençlidir (Liu ve ark., 2013b).

Kornea UV-A'nın % 45'ini absorbe edebilme özelliğine sahiptir. Chao ve ark., çalışmalarında UV-A radyasyonundan sonra pterijyum fibroblastlarında ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünün (uPA) mRNA düzeylerini ve aktivitesini araştırmışlardır. Bu

proteaz, matriks metaloproteinazları (MMP'ler) aktive edebilir ve doku bozunumundan ve tümör hücresi invazyonundan sorumludur (Chao ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalarda pterjiyum dokusu kan damarlarındaki endotel hücrelerinde UV ışığından kaynaklanan DNA hasarı bildirilmiş ve potansiyel bir terapötik hedef olarak insan primer ve rekürren pterjiyum patogenezinde UV ışığına bağlı anjiyogenezin rol oynadığı belirtilmiştir. Anjiyogenez ve lenfanjiyogenez yaygın olarak kabul edilmekle birlikte insan pterjiyum patogenezinde yer alan tamamlanmamış karakterize süreçlerdir. Pterjiyumda kan ve lenfatik damar gelişiminde inflamasyon, büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu, hipoksi ve transkripsiyon faktörlerini içeren çeşitli mekanizmalar da etkilidir (Cimpean ve ark., 2013).

Pterjiyumun histolojik kesitleri, çoğunlukla konjonktival bölgede yaygın elastik dejenerasyonla ortaya çıkar. Bu amorf dejeneratif materyal de ışığa maruz bırakılmış ve yaşlanmış insan derisinde tespit edilmiştir. Bu değişiklikler arasında epidermal proliferasyon, inflamatuvar infiltrat, aktive olmuş fibroblastlar, elastin birikimi, glikozaminoglikanlar ve değiştirilmiş kollajen turnoveri gibi ekstraselüler matriks değişiklikleri sayılabilir. UV ayrıca aktin hücre iskeleti yapılanmasını etkiler ve, keratinosit hareketini kolaylaştırarak aderans moleküllerinin regülasyonunu azaltır. Son zamanlarda, Mitojenle aktive olan protein (MAP) kinazların indüksiyonu ve c-Jun, c-Fos ve AP-1 transkripsiyon faktörlerinin aşağı akış aktivasyonunu da içeren UV radyasyonla aktive edilen bazı moleküler yolaklar aydınlatılmıştır. Benzer olaylar pterjiyumda da meydana gelmektedir (Girolama ve ark., 2004).

UV maruziyeti ile etkilenen bir protein olan p53 ise, antikanser fonksiyon mekanizmalarına dahil olup, apoptoz, genomik stabilite ve anjiyogenezin

inhibisyonunda rol oynar. UV ışığına bağlı DNA hasarında ve onarımında p53'ün rolü, UV ışığına bağlı cilt karsinogenezi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. (Cimpean ve ark., 2013).

Özetle, pterjiyumun başlamasının yanı sıra, UV ışınları; pro-inflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri ve MMP'lerin regülasyonunun artması yoluyla pterjiyumun ilerlemesinde rol oynar. Bu efektörler, pterjiyumu karakterize eden iltihaplanma, fibrozis, anjiyogenezis ve ECM yenilemesinde de önemlidir (Zhou ve ark., 2016).

2.3.2. p53

Yakın zamana kadar, subepitelyal doku içeren dejeneratif bir bozukluk olarak kabul edilen pterjiyum ile neoplazi arasında çeşitli ortak özelliklerin varlığı pterjiyumun neoplazi benzeri bir büyüme bozukluğu olma ihtimalini artırmıştır. Bu özelliklerin başında, cerrahi çıkarım sonrası tekrarlama, etiyolojik faktör olarak UV radyasyon ve yaygın tedavi modaliteleri (antimetabolitler, radyasyon) içermesi gelmektedir (Girolama ve ark., 2004).

p53, DNA hasarına normal cevabı düzenleyerek, genetik istikrarın korunmasında rol oynayan kilit bir unsurdur (Cimpean ve ark., 2013). Bir tümör baskılayıcı gen olan p53, hücre siklusunu, DNA tamir ve sentez sürecini, hücre farklılaşmasını ve apoptozu regüle eder (Liu ve ark., 2013b., Girolama ve ark., 2004). p53 genom hasar gördüğünde, genom onarılincaya kadar hücre döngüsünü durdurarak genomik kararsızlığa karşı hücreyi korur (Weinstein ve ark., 2002; Girolama ve ark., 2004). Hasar telafi edilemez ise, p53 geni apoptoza yol açar (Weinstein ve ark., 2002). p53 geninde oluşan mutasyonlar, proteinin işlevlerini etkisiz hale getirerek veya değiştirerek etkisini gösterir. p53 mutasyonları neoplastik hücre gelişiminde en yaygın

genetik belirteçtir. Yapılan immünohistokimya çalışmaları ile pterjiyumda anormal seviyede p53 ekspresyonu gözlenirken kontrol örneklerinde p53 tespit edilememiştir. p53 kodon 72 polimorfizmi (Arg72Pro) tümör yatkınlığı için önemli bir belirteçtir. p53'ün anormal ekspresyonuna kodon 72 polimorfizminin eşlik etmesi de p53 mutasyonlarının pterjiyum patogenezinde etkili olabileceğini göstermektedir (Liu ve ark., 2013b).

Pterjiyum epitelinde p53 proteininin anormal seviyeleri tespit edilmiş ve birçok araştırmacı tarafından pterjiyumun UV ile ilişkisinin, kontrolsüz hücre çoğalması olmasından dolayı tümör ile uyumlu olduğu düşünülmüştür. p53 tümör baskılayıcı geni, insan tümörlerinde gözlenen en yaygın mutasyona uğramış genlerden biridir ve tüm insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında bulunmaktadır. Normal sağlıklı hücrelerde p53, genellikle tespit edilemeyen seviyelerde bulunan, kısa ömürlü bir proteindir ancak p53'te meydana gelen mutasyonlar, proteinin hücre içindeki stabilitesinin artmasına neden olur. Pterjiyumda p53 ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu sonuçlar ışığında tahmin edilen p53 gen mutasyonu prevalansı %7.9'dan %100'e kadar uzanmaktadır (Rodrigues ve ark., 2008).

p53 mutasyonlarına sebep olan çok sayıda etken vardır. Benzo(a)piren (BaP) gibi çevre kirleticilerinden birisi bu etkenler arasındadır. BaP'nin son metaboliti olan benzo(a)piren delepoksit (BPDE), p53 gen mutasyonlarında deoksiguanozine saldırarak BPDE-N2-dG eklentisini oluşturabilir. Pterjiyum örneklerinde, BPDE benzeri DNA eklentisinin oluşumunun sitokrom p4501A1 (CYP1A1) polimorfizmi ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle CYP1A1 polimorfizmi pterjiyum ile korelasyon gösterir ve pterjiyum yatkınlığı için bir markır olabilir (Liu ve ark., 2013b).

Nükleer p53'ün, pterjiyumun limbal epitelinde arttığı bildirilmiştir. Bu tür genetik değişiklikler, bu koşulların gelişmesinin başlarında UV radyasyondan kaynaklanabilir. Pterjiyum ve limbal tümörlerin çok adımlı gelişimi için bir modele göre, p53'teki mutasyonlar, apoptotik prosedürleri bozabilir, bu nedenle diğer genlerde (bcl-2, ve bax) mutasyonların progresif olarak birikmesine yol açabilir. Bu şekilde, pterjiyumun gelişimi, konjonktivadaki apoptozun indüksiyonu ya da baskılanması ile ilişkili genlerin bozulmuş ekspresyonlarının bir sonucu olabilir (Detorakis ve ark., 2000).

Hücre döngüsü, özellikle apoptozun kusurlu düzenlenmesi, pterjiyum oluşumunda ve büyümesinde önemli bir rol oynamaktadır. Pingueculae, pterjiyum ve limbal tümörlerin limbal epitelinde artmış p53 ifadesi, gelişimlerinin erken dönemlerinde p53 mutasyonlarının muhtemel varlığını gösterir. p53, proliferasyonu önleyerek ve DNA mutasyonları mevcut ise apoptozu indükleyerek bir kontrol noktası görevi görür (Sebastia ve ark., 2013).

UV ışını post-translasyonel mekanizmalarla p53'ü stabilize eder. p53 DNA'ya bağlanır ve hücre siklusu arrestini, apoptozu ve DNA tamirini uyarır. p53'ün stabilizasyonu p53 ve regülatörleri ile bax ve bcl-2 oranı arasındaki etkileşimleri içerebilir. Bu oran doza bağlıdır; düşük doz UV, hücre döngüsünün durması ile sonuçlanırken yüksek dozda ise bax birikimi ile ilişkili apoptoz başlatır (Girolama ve ark., 2004).

Weinstein ve ark. Pterjiyumun bir dejenerasyondan ziyade kontrolsüz hücre proliferasyonundan kaynaklanan bir büyüme bozukluğu olduğunu araştırmak için pterjiyumdaki p53 geninin ifade düzeyini incelemişlerdir. 13 pterjiyum hastası (9 nüks) ile yaptıkları çalışmada 7 olguda anormal p53 ekspresyonu pozitif olarak tespit

edilmiştir. Nüks olan ve olmayan gruplar arasında ise bir fark bulunamamıştır. 9 nüks hastanın 5'i (%54) ve 4 primer olgunun 2'si (%50) pozitifken kontrol numunelerinde hiçbir patolojik boyama gözlenmemiştir. Bu bulgular, pterjiyumun maling bir tümör olmadığı yönündeki görüşü desteklemektedir (Weinstein ve ark., 2002).

p53'ün anormal ifadesi, insanlardaki malign tümörler için kullanılan en yaygın belirteçtir. p53'ün anormal ifade prevalansı tümör tipleri arasında %0-60 arasında değişmektedir (örn. Akciğer karsinomasında %56, kolon karsinomasında %50, cilt tümörleri içinde %44). Spandidos ve ark. pterjiyumun %60'unda, tümör ve premalign hücrelerde sık görülen genetik değişikliklerin (heterozigotluk kaybı ve mikrosatellit instabilitesi) ortaya çıktığını belirterek, pterjiyum gelişiminde tümör baskılayıcı genlerin rolü olduğunu ve DNA replikasyonu ve onarımında bozulma ile uyumlu olduğunu ayrıca, pterjiyumun benign neoplastik bir lezyon olarak düşünülmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Spandidos ve ark., 1997). Chowers ve ark. ise primer ve nüks pterjiyumda p53 immünreaktivitesini araştırmışlar ve primer pterjiyum ile tekrarlayan pterjiyum arasında fark bulunamamışlardır. Sonuç olarak, p53 genindeki bir mutasyonun pterjiyum oluşumu ve nüks açısından kritik önemi kalmamaktadır. Pterjiyum epitelinde anormal p53 ekspresyon bulgusu, transforme olmuş hücre içeriğine ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve kontrolünde başarısızlık olduğuna işaret edebilir. Transformasyonun nedeni, çeşitli cilt kanserleri (örn., Skuamöz hücreli karsinom) için genetik materyal üzerindeki etkisiyle bir risk faktörü olarak iyi bilinen UV radyasyon olabilir (Chowers ve ark., 2001; Weinstein ve ark., 2002).

p53 proteininin pterjiyum epitelinde anormal ifadesi, pterjiyumun bir tümör gibi ultraviyoleye maruz kalma ile ilişkili, kontrol edilemeyen bir hücre çoğalması olarak kabul edilmesi görüşünü kuvvetlendirmektedir. Benzo(a)piren (BaP), sitokrom

p4501A1 (CYP1A1), 2C9 ve 3A4 gibi iyi karakterize edilmiş bir dizi enzim tarafından oksitlenir. CYP1A1'in MSP I restriksiyon alanındaki bir timin/sitozin noktası mutasyonunun enzim aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. CYP1A1 MspI alelik varyantı, oral, kolon, göğüs ve akciğer kanseri gibi sigara kullanımı ile ilişkili kanserlere yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir. Peng ve ark., 150 pterjiyum örneği ile yaptıkları çalışmada CYP1A1 protein ifadesinin, pterjiyum grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu ve CYP1A1 protein ifadesinin allelik varyasyon ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuç, CYP1A1 protein ifadesinin bağımsız bir risk faktörü olarak pterjiyum gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir (Peng ve ark., 2012).

UV radyasyona bağlı p53 gen mutasyonlarının pterjiyum hücrelerinin gelişiminde rol oynayabileceği pterjiyum epitel bazal hücrelerinde anormal p53 protein ifade seviyeleri tespit edilmesi ile ileri sürülmüştür. Bu hipoteze göre, kronik fokal UV ışını maruziyetinde parental bazal LSC'lerde p53 mutasyonları meydana gelmektedir. p53'e bağlı programlanmış hücre ölümünün eksikliği nedeniyle, diğer genlerdeki mutasyonlar, sonunda pterjiyum hücrelerine dönüşen LSC'ler tarafından kademeli olarak ortaya çıkar. p53 protein ürünü, UVB radyasyonu da dahil olmak üzere bazı mutajenik ajanlardan kaynaklanan DNA hasarına tepki olarak hücre çoğalmasını önleyerek veya apoptozu indükleyerek bir kontrol noktası görevi görür. Normal koşullar altında, p53 proteininin 30 dakikalık kısa bir yarılanma ömrü vardır ve hücre içinde genellikle saptanamaz. p53 genindeki mutasyonların, birkaç saatlik daha uzun yarılanma ömrüne sahip anormal bir p53 proteininin birikimiyle sonuçlandığı düşünülür (Zhou ve ark., 2016).

UV'ye maruz kalan cilt, p53 tümör baskılayıcı geninde kodon 245 ve 247/248'de, spesifik mutasyonlara uğramaktadır. UV ile indüklenen p53 mutasyonları, skuamoz hücreli karsinomun ilerlemesinde kanser öncesi bir durum olan aktinik keratozda bulunmuş ve skuamoz hücre karsinomu p53 eksik farelerde deneysel olarak UV-B ile indüklenmiştir. Yapılan çalışmalar, UV'ye bağlı p53 mutasyonları ile UV'ye maruz kalmanın neden olduğu hastalık arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu göstermektedir. p53'ün anormal ifadesi, mutant p53 proteinine yönelik monoklonal antikolarla immün boyama yoluyla pterjiyumda gösterilmiş olması p53'ün pterjiyum patogenezinde bir rolü olabileceği görüşünü destekleyen bir sonuçtur (Shimmura ve ark., 2000).

2.3.3. Viral Enfeksiyonlar ve Kalıtım

Pterjiyum oluşumu çevresel faktörlerin, genetik yatkınlığın ve viral enfeksiyonların etkili olduğu çok aşamalı bir süreç olmasının yanı sıra; bu dokularda viral DNA saptanması hastalığın neoplastik doğasını da desteklemektedir. Bu görüş, pterjiyum örneklerinde insan papilloma virüs (HPV), sitomegalovirüs (CMV) ve herpes simpleks virüs (HSV) de dahil olmak üzere çeşitli onkogenik virüslerin saptanması ile gündeme gelmiştir (Detorakis ve ark., 2000; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

HPV, p53'ü inaktive eden proteinleri kodlayarak kromozomal instabiliteye ve hücrede malignite gelişmesi olasılığının artmasına yol açar (Liu ve ark., 2013). Bu virüslerin pterjiyum patogenezi üzerine olası etkisinin araştırıldığı çalışma sonuçları pterjiyum patogenezinde en sık rastlanan virüsün HPV olduğunu göstermiştir. Araştırma sonuçları, pterjiyum örneklerinde en düşük HPV prevalansının Türk, Japon ve Ekvador hastalarında; en yüksek prevalansın ise İtalyan, Brezilya ve İngiliz hastalarında olduğunu göstermektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

HPV-18 ve HPV-16, göz kapaklarının, lakrimal çıkış yolu ve konjonktivanın malign tümörlerinin yanı sıra papillomalarla ilişkilidir. Bununla birlikte, pterijyumda HPV tutulumu ile ilgili tartışılmalı bulgular mevcuttur. Bazı çalışmalarda pterijyumda ve makroskopik olarak normal konjonktiva örneklerinde HPV tespit edilirken diğerlerinde ise bu virus tespit edilememiş ve HPV DNA'sının pterijyum ve limbal tümörlerin gelişmesinde bir kofaktör olarak gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır (Detorakis ve ark., 2000).

HSV-1 enfeksiyonu, ABD'de en yaygın görülen enfektif körlük nedenidir. HSV, insanlarda akut keratit, blefarit ve konjonktivite neden olabilir. Hem DNA hibridizasyon teknikleri hem de viral kültürler akut fazdan sonra HSV enfeksiyonunun latent hale gelebildiğini göstermiştir. Başlangıçta, HSV'nin varlığı nöronlarda tespit edilmiştir. "Skin trigger" teorisine göre, HSV, gangliyon hücreleri tarafından sürekli salınır ve rahatsız edici uyarılardan sonra periferde aktive edilir. Bununla birlikte, virüsün nöronal olmayan hücrelerde gizli kalabileceğine dair güçlü göstergeler de bulunmaktadır. Deneysel kanıtlara dayanarak, kronik göz kapağı, korneal ve konjonktiva lezyonlarında HSV bulunabileceği önerilmiştir. Pterijyumda HSV tespit edilmesi bu virüsün pterijyum patogenezinde daha belirgin bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (Detorakis ve ark., 2000).

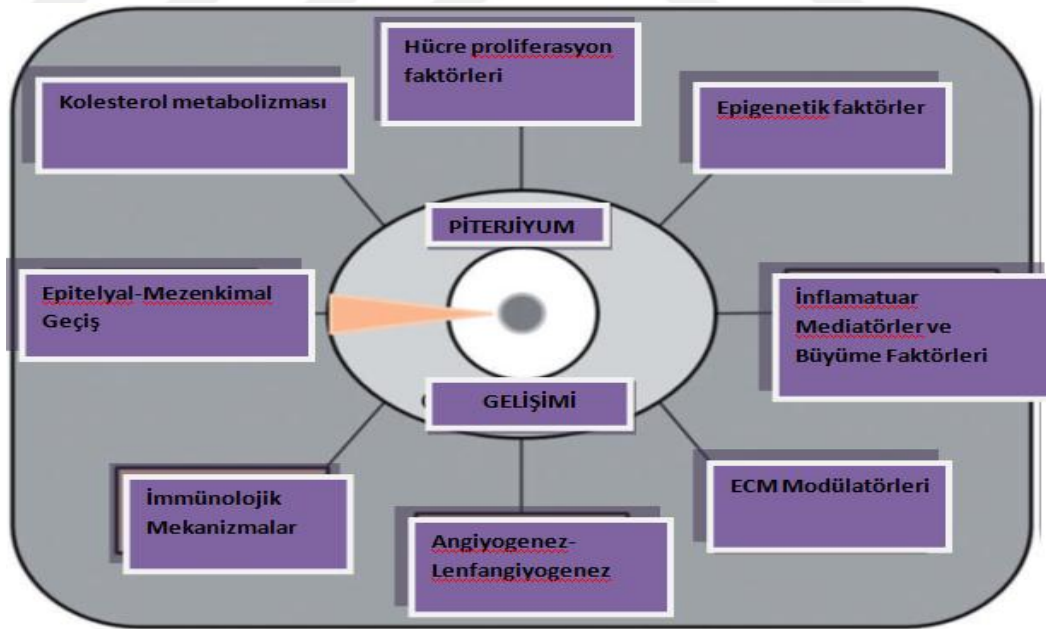
HSV'nin hücrelerde hem nokta mutasyonlara hem de daha yaygın genetik değişikliklere neden olabileceği kanıtlanmıştır. Ayrıca, proto-onkogenlerin ifadesini güçlendirerek veya p53'ün inaktivasyonu yoluyla kimyasal karsinojenlerin hareketini artırabilir. HSV tarafından indüklenen hücresel fenotipik değişikliklerin, virüsün transle olamayan DNA parçaları ile gerçekleştirilebilmesi ilginçtir. Diğer kanserojen virüslerden farklı olarak, HSV tarafından enfekte olan hücreler viral genleri sürekli

olarak ifade etmez, fakat vur-kaç hipotezi olarak adlandırılan viral saldırılardan etkilenirler. (Detorakis ve ark., 2000).

Bazı pterjiyum olgularında ise HSV ve HPV ile ortak enfeksiyon varlığı tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, HPV ve HSV'nin eşzamanlı olarak saptanması, postoperatif nüks ve konjonktivit öyküsü gibi klinik özelliklerle uyum göstermektedir (Detorakis ve ark., 2000).

2.4. Pterjiyum Gelişimi İle İlişkili Moleküler Mekanizmalar

Epigenetik faktörler, hücre proliferasyon faktörleri, inflamatuvar mediatörler, büyüme faktörleri, hücre dışı matris modülatörleri, anjiogenik ve lenfanjiyogenik faktörler, immünolojik mekanizmalar, epitelyal mezenkimal geçiş ve kolesterol metabolizmasındaki değişiklikler gibi çeşitli faktörler pterjiyum patogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Pterjiyum Gelişimi İle İlişkili Moleküler Mekanizmalar (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016)

2.4.1 Pterijyumda Hücre Proliferasyonu, Migrasyonu ve Angiyogenez

Sağlıklı yetişkin organizmada, yeni damarların gelişimi (anjiyogenez) yara iyileşmesi sırasında gözlenirken patolojik koşullarda ise anjiyogenez düzensizdir. Özellikle, tümör anjiyogenezi sınırlı tümör büyümesinden metastaza geçişi destekler. Maligniteye dönüşmüş hücreler anjiyogenik faktörler üretirler ve bu da sırasıyla neovaskularizasyonun otokrin büyüme kontrolünü ve parakrin kontrolünü uyarır (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Pterijyum neoplastik benzeri bir büyüme bozukluğu olarak düşünülmesine rağmen metastatik bir tümör değildir. Ancak pterijyum gelişiminde metastaza benzer bir hücre göçü ve lokal anjiyogenez esastır. Yapılan çalışmalarla çoğalan hücre çekirdeği antijeni (PCNA) ve mutant p53 gibi hücre çoğalmasından sorumlu genlerin pterijyumda anormal eksprese edildiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda hücre proliferasyonunda görevli olan ve kanserde sürekli aktif formda tutulan MAP kinaz sinyal yolağı üyelerinin de (FGF2 ve c-Myc gibi) pterijyumda anormal ekspresyonu söz konusudur (Liu ve ark., 2013).

Biyolojik süreçleri modüle etmek için diğer proteinlerle etkileşime giren dimerik kalsiyum bağlayıcı proteinler olan S100 protein ailesinin de pterijyum patogenezinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Oküler yüzeyde, S100 proteinlerinin yapısal proteinlere, transkripsiyon faktörlerine ve bağışıklık modülatörlerine bağlanması kornea taban membranları üzerindeki immün hücrelerin adhezyonunu ve migrasyonunu etkiler, ve bu aynı zamanda immün efektörlerin veya antikor üretiminin aktivasyonunun yanı sıra MMP'lerin ve pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini de etkilemektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

S100 proteinleri, hücre göçü, proliferasyonu ve farklılaşması gibi biyolojik fonksiyonları modüle etmek için diğer proteinlerle etkileşime giren kalsiyum ile aktive olan sinyal proteinleridir. S100A6, S100A8 ve S100A9 gibi S100 proteinlerinin konjonktivaya oranla pterjiyumda aşırı eksprese olması bu S100 proteinlerinin pterjiyum gelişimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Liu ve ark., 2013).

15 pterjiyum numunesinden elde edilen cDNA kütüphanesinden oluşan bir çalışmada, poliamin metabolizmasında hız sınırlayıcı enzim olan N1-asetiltransferaz 1 (SAT1); MMP-9 aktivitesinin uyarılmasında rol oynayan anneksin A2; ve hücre göçünün kontrolünde yer alan S100A9 proteini ifadesinin arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, immünofloresans analiz, pterjiyum gövdesinin ön kenarında SAT1 ve S100A9'un mevcut olduğu gösterilmiştir (Hou ve ark., 2014). Ayrıca başka bir çalışmada ise S100A8 ve S100A9'un mikrodizileri kullanarak analiz edildiğinde insan pterjiyum numunelerinde bu proteinlerin ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir. S100A8 ve S100A9, pterjiyumlu göze ait gözyaşlarında daha yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. S100A8 ve S100A9, terminal epidermal farklılaşma sırasında kodlanan keratin filamentlerine bağlandığından, bu proteinler için pterjiyum gibi hiperproliferatif oküler yüzey hastalıkları sırasında hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde işlevsel bir rol oynadıkları düşünülmektedir. (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016)

Pterjiyum dokusunda IL-4 transkripsiyonel olarak yükselir ve hücre döngüsü, bağ dokusu gelişimi, fonksiyonu ve hücre morfolojisi ağına bağlı olan POSTN (osteoblasta özgü faktör) indüksiyonunu uyarabilir. Ancak IL-4'ün bu indüksiyon etkisinin MAP kinaz / ERK kinaz 1 inhibitörü tarafından bastırılabilmesi MAP kinaz yolağının pterjiyum oluşumunda rol oynadığını gösterir (Liu ve ark., 2013).

Hücre göçü ve angiyoenezle ilişkili genler pterjiyum ile kontrol grupları arasında farklı miktarlarda ifade edilirler. MMP-2, MMP-9, MMP-10 gibi matriks metalloproteinazlar ve bunların aktivatörü LCN2, pterjiyum dokusunda yüksek oranda ifade edilirken TIMP1'in (TIMP metalloproteinaz inhibitörü 1) ifade düzeyi azalmaktadır. Ayrıca angiyoenezde görevli bir gen olan VEGFA, pterjiyumda normal konjonktiva dokusuna göre anlamlı şekilde yüksek oranda ifade edilir. Aynı zamanda kan damarlarının gerilemesi için geliştirilen anti-anjiyogenik/anti-VEGF tedavisi ile pterjiyum ilerlemesi geciktirilebilir. (Liu ve ark., 2013).

İnflamasyonun neovaskülarizasyona ve pterjiyum büyümesine neden olabilecek anjiyogenik yolları uyardığı bilinmektedir (Anguria ve ark., 2014; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Pterjiyumda anjiyogenik uyarının VEGF düzeylerinde yükselme, düşük trombospondin-1 düzeyleri (Tsp-1) ve substans P'de bir azalma ile ilişkili olduğu görülmektedir ki bunların hepsi, doğrudan anjiyogenik aktiviteyi indükleyen ETS-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesini uyarmaktadır. VEGF, endotel hücrelerinin daha ileri hareket ve proliferasyonu için gerekli bir süreç olan anjiyogenez sırasında bazal membranın bozunmasının ilk basamağında bir kemokin görevi görür, böylece tübül benzeri yapılar gelişir. Tsp-1, anti-anjiyogenik faktör olarak görev yapan çok işlevli trombosit ve hücre dışı matris proteindir. Pterjiyumda Tsp-1 seviyesinin azalması, anjiyogenez uyarıcılarının inhibe edilmiş bir durumda tutmaktadır. VEGF ile birlikte indüklenebilir nitrik oksit sentazının (iNOS) aşırı miktarda eksprese edildiği ve bunun sonucunda nitrik oksitte bir artışa ve anjiyogenik uyarıya yol açtığı bilinmektedir. Embriyogenez sırasında vasküler pleksusun kompleks organizasyonunu oluşturmak için gerekli olan protein ve onun tirozin kinaz tipi reseptör olan efrin-eph sisteminin oküler angiyoenezde katıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, UV ile uyarılan timin dimerleri primer

ve nüks pterjiyum patogenezinde angiogenez ile ilişkilidir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla pterjiyumda lenfanjiyogenez geliştiği de gösterilmiştir. Lenfatik damarların bolluğu ile pterjiyumun şiddeti arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur. Tek taraflı nasal pterjiyumun şiddeti farklı olan 96 hastanın dahil edildiği bir çalışmada, pterjiyum dokusunda kan mikrodamar yoğunluğu ve lenfatik mikrodamar yoğunluğunun belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Ayrıca, cerrahi örneklerde lenfatik mikrodamar yoğunluğunun artması, pterjiyum nüksünü öngörmektedir. Kan damarları, daha fazla iltihap yaratan immün efektör hücreler için bir giriş yolu sağlar ve lenfatik damarlar antijenik materyalin oküler yüzeyden bölgesel lenf nodlarına çıkışını sağlarlar. Böylece inflamasyon için pozitif bir feed-back oluştururlar. Bu mekanizmalar pterjiyum başlamasından çok, hastalığın büyümesi ve gelişimi ile ilgilidir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

ki-67 proteini, moleküler seviyede iyi karakterize edilmiş ve yaygın olarak bir çoğalma belirteci olarak kullanılmaktadır. Hücre proliferasyonu ile ilişkili bir protein olan ki-67, hücre döngüsünün tüm aktif fazları boyunca mevcutken G₀ fazında bulunmaması onu büyüme fraksiyonunu belirlemek için uygun bir belirteç yapar. Proliferasyona uğramayan hücrelerde pki-67 ekspresyonu güçlü şekilde azalmaktadır. Sebastia ve ark tarafından yapılan çalışmada pterjiyum örneklerinde ki-67 ifadesinin yüksek olması pterjiyumda hücre proliferasyonunda bir artış olduğunu göstermektedir (Sebastia ve ark., 2013).

2.4.2. Epigenetik Faktörler

Pterjiyum, hücre proliferasyonu, invazyon ve rezeksiyon sonrası nüks özellikleri ile kansere benzerlik göstermektedir. Proliferatif aktivite artışı (ki-67, proliferasyon

hücre çekirdeği antijeni (PCNA) ve eritropoietin), düşük hücrel apoptoz (Bcl-2 ve p53) ve malignite (Hsp90) ile ilişkili proteinler pterjiyumun epitelyal hücre tabakasında aşırı eksprese olmaktadır. Bu proteinler farklı kanser tiplerinde, neoplastik koşullarda artmakta ve bir tümörün proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016)

Gen ekspresyonunda meydana gelen epigenetik değişimler insan kanserlerinin gelişiminde önemli bir role sahiptir. Promotor bölgedeki CpG adacıklarında DNA hipo ve hipermetilasyonu kansere neden olmaktadır. Memelilerde DNA metilasyonu özellikle CpG adacıklarında görülür ve bu dinükleotidler %60-90 oranında modifiyedir. Promotordaki bu modifikasyon, DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonel baskılamaya neden olabileceği gibi gen indüksiyonundan sorumlu faktörlere erişimi engelleyen inhibitör proteinlerin metile DNA ile etkileşime girerek de gen baskılanması meydana getirebilir (Riau ve ark., 2011).

DNA metilasyon modellerinde görülen bu tip değişiklikler birçok kanser tipinde yaygın görülen bir durumdur ve bu da pterjiyumu kansere yaklaştırmaktadır. Matrix remodelingi (MMP-2) ve hücre adezyonu (TGM-2 ve CD24) ile ilgili genlerin anormal DNA metilasyonu, pterjiyum ile yüksek derecede ilişkili süreçlerdir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). TGM2'nin promoter bölgesindeki hipermetilasyon, transkript ve protein seviyelerinin azalmasına; MMP2'nin intergenik bölgeleri ve CD24'ün promotor bölgesindeki hipometilasyon ise transkript ve protein seviyelerinin artmasına yol açmaktadır. Bu genler hücre dışı matriks yeniden modellenmesinde ve hücre adezyonunda rol oynarken, bozulmaları ise pterjiyum gelişiminde etkili olabilir (Liu ve ark., 2013; Li ve ark., 2016). Buna ek olarak, bir tümör baskılayıcı gen olan p16'nın hipermetilasyonu, pterjiyumda DNA metil transferaz 3b'deki (DNMT3b) ifade artışı ile

uyumludur. Bu epigenetik modifikasyonlar, pterjiyumun patogeneziyle ilgili önemli genlerin kontrolsüz ekspresyonuna veya baskılanmasına neden olabilecek DNA mutasyonlarına alternatiftir. UV radyasyonunun neden olduğu oksidatif stres, bu anormal metilasyon kalıplarından sorumlu olabilir, ancak henüz böyle bir araştırma yapılmamıştır (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016)

2.4.3. İnflamatuar Mediatörler ve Büyüme Faktörleri

İnflamasyon, pterjiyumun sık görülen bulgularından biridir ve bu durumun gelişmesi için kronik inflamasyonun devamlılığı gereklidir. Pterjiyum epiteline ve matrikse geçen inflamatuvar hücreler arasında nötrofiller, mast hücreleri, lenfositler ve plazma hücreleri bulunmaktadır. İnterlökin 1 (IL-1), 6 (IL-6) ve 8 (IL-8) gibi çok sayıda klasik inflamatuvar faktörün, pterjiyum örneklerinde ifade düzeylerindeki artış, pterjiyumda iltihaplı infiltrat varlığını açıklamaktadır (Zhou ve ark., 2016).

UV-B radyasyona bağlı gelişen pterjiyumda interlökin 1 (IL-1), 6 (IL-6) ve 8 (IL-8) düzeylerinin yanı sıra tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) düzeyleri de artmaktadır. Siklooksijenaz-2 (COX2), pterjiyum dokusunda aşırı ifade edilir ve prostaglandin üretimi ve inflamatuvar basamakların daha da güçlendirilmesinden sorumludur. İnflamasyon ve hücrel farklılaşmada görevli bir enzim olan fosfolipaz D seviyesi de pterjiyum dokusunda artmaktadır (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Reaktif oksijen türleri, lipid metabolizmasının artan ürünleri olarak kendini gösteren hücre zarı lipidlerini fosforile eder ve bu lipid ürünlerinde prostaglandin E2 bulunmaktadır. Oksitlenmiş fosfolipidler, pro-inflamatuvar olan siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimi ve interlökin-8'in (IL-8) üretimini uyarır (Sebastia ve ark., 2013).

IL-1, korneada IL-6 ve IL-8 dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonuna aracılık etmektedir. Ayrıca, IL-1'in (TNF- α ile bağlantılı

olarak) kültüre PEC'lerde MMP-1, MMP-2 ve doku MMP inhibitörleri (TIMP)-1 transkripsiyonunu indüklemektedir. Pterjiyumda benzer bir prosedürün meydana gelebileceği ve IL-1'in inflamasyonu Őiddetlendirdiđi ve yukarıda belirtilen faktörlerin indüksiyonu yoluyla pterjiyumda ECM yeniden Őekillenmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu sitokin, inflamasyona uğramış korneada spesifik kemokinlerin upregülasyonu yoluyla nötrofil alımına katıldığından, IL-6'nın pterjiyumda nötrofillerin birikiminden sorumlu olabileceği hipotezini desteklemektedir. Ayrıca, IL-6'nın çeşitli hücre hatlarında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu ind klediğinden IL-6'nın pterjiyum dokusunun anjiyogenezisine dolaylı olarak katkıda bulunması da olasıdır. IL-8, lenfositler ve diğer spesifik olmayan inflamatuvar hücreler üzerinde kemotaktik aktivite gösterdiği ve nötrofilleri aktive ettiği için IL-8'in anormal ekspresyonu pterjiyum dokusunda lökosit infiltrasyonu ve nötrofil birikiminde belirgin artış ile iliŐkilendirilebilir. Ayrıca IL-8 anjiogenezi de uyarmaktadır. Tüm bu bulgulara rağmen IL-1, IL6 ve IL-8'in pterjiyum geliŐimindeki rolleri tam olarak kesinlik kazanmamıŐtır (Zhou ve ark., 2016).

UV radyasyonunun insan kornea hücreleri ve HeLa hücrelerinde IL-1 üretimini indüklemesi, pterjiyum epitelinde IL-1'in ifade artışının altında yatan bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir. Di Girolamo ve arkadaŐları, IL-6 ve IL- 8'in mRNA ve protein düzeylerinin UV-B radyasyonunu takiben PEC'lerde zamana ve doza bağlı bir Şekilde indüklendiğini göstermişlerdir. Ayrıca, ERK 1/2, JNK ve p38 sinyal yolakları kültüre PEC'lerde UV-B'nin neden olduğu IL-6 ve IL-8'in üretilmesinden sorumludur. Bunun dışında, TNF-  promotoru, nükleer faktör- B (NF- B) için bağlanma bölgeleri içerir. UV radyasyonunun NF- B'yi aktive ettiği ve NF- B'nin pterjiyumda aktive olduğu göz önüne alındığında, TNF- 'nın pterjiyumda UV radyasyonla uyarılabileceği

olasıdır (Di Girolamo ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2016). Pterjiyum ve sağlıklı konjonktiva dokusundan çekirdek ekstraktları ile yapılan bir çalışmada, bir NF- κ B proteini olan RelA ve p50 seviyelerinin pterjiyumda yüksek olduğu ve aynı çalışmada primer pterjiyum fibroblastları TNF- α ile uyarıldığında RelA'nın (p65) çekirdeğe 30 dakika sonra ve RelB'nin 24 saat sonra translokasyonu gözlenmiştir. Bu bulgular göstermiştir ki, NF- κ B'nin kanonik ve nonkanonik yolları (sırasıyla akut ve gecikmiş inflamatuvar süreçlerle ilgili) pterjiyumda aktiftir. İnflamatuvar hücrelerin pterjiyum dokusuna alınması, hücrelerin hareketliliğini ve invazivliğinin artırılması, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ve hücre döngüsü proteinlerinin sentezlenmesi gibi çeşitli biyolojik etkilerde rol oynayabilir. Bu yolla pterjiyum patogenezinde katkıda bulunur (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). İnflamasyon sonucu aktive olan transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) fibroblastları kollajen sentezlemeye teşvik eder. Kollajen rastgele birikerek (fibrozis), dokuların opak hale gelmesine neden olur. TGF- β aynı zamanda MMP'leri inhibe eder. MMP'lerin inhibisyonu kollajenolizi azaltma eğilimi gösterir, ancak kollajen dejenerasyonu pterjiyumu karakterize eder. Kollajen dejenerasyonu, ROS'un neden olabileceği uzamış kollajenolizin bir işaretidir. Yapılan bazı çalışmalarda, pterjiyum fibroblastlarındaki MMP'leri saptanamamış olmasına rağmen, çeşitli çalışmalarda ise MMP ekspresyonu bildirilmiştir; bu da, pterjiyumda kollajen dejenerasyonunun MMP'lere bağlı olduğunu düşündürmektedir (Anguria ve ark., 2014).

Pterjiyum oluşumunda karakteristik olan hücre çoğalması nedeniyle geniş bir dizi büyüme faktörü incelenmiştir. Bu faktörler ve patojenik rolleri tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Büyüme Faktörleri ve Pterjiyum Patogenezindeki Rollerini (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Büyüme Faktörü	Bulunan Anormallik	Patogenezde Rolü
bFGF	UVB radyasyon sonrası ifade artışı	Hücre proliferasyonunu artırır
PDGF	Aşırı ifade düzeyi	Hücre proliferasyonunu artırır
TGF- β	Aşırı ifade düzeyi	Hücre proliferasyonunu ve inflamasyonu artırır
HB-EGF	UV-B radyasyon sonrası ifade artışı	Hücre migrasyonunu artırır
PEDF	İfade azalması	Angiogenezi artırır
VEGF	UV-B radyasyon sonrası ifade artışı	Angiogenezi artırır
IGFBP-2	Aşırı ifade düzeyi	Hücre proliferasyonunu artırır
Stem cell factor	Aşırı ifade düzeyi	Angiogenezi artırır
CTGF	Aşırı ifade düzeyi	Bağ doku yeniden şekillenmesini artırır

Büyüme faktörleri pterjiyumda; hücre proliferasyonunda, inflamasyonda, bağ dokusu yeniden biçimlenmesinde ve anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır. Kültür ortamında pterjiyumda büyüme faktörleri üzerine yapılan bir araştırmada, aktif primer ve nüks pterjiyum fibroblastlarının trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sebastia ve ark., 2013).

Pterjiyumda hücre göçü Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ile indüklenmektedir. Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve HB-EGF, UV-B radyasyonu takiben hücre içi miktarları artmaktadır. COX2 ile birlikte VEGF, pterjiyum makrofajlarında bulunur ve bunun da anjiyogenezde, kollajen birikiminde ve muhtemelen pterjiyum büyümesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Pterjiyumda pigment epiteli türetilmiş faktörde (PEDF) bir azalma

ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini-2'de (IGFBP-2) bir artış gözlenmiştir. PEDF'deki bu azalma, anjiyogenik bir inhibitör olduğu için anjiyogeneze neden olabilir. Kök hücre faktörü olan trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) ekspresyon seviyelerinde artış ise pterjiyumda kesinleştirilmiştir. (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Bu inflamatuvar mediatörlerin tümü pterjiyum oluşumunun birincil nedeni olmaktan ziyade gelişiminin bir sonucudur; ancak bunlar hastalığın idame ettirilmesinde önemlidirler ve bu nedenle patojenik faktörler olarak düşünülebilirler (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.4. İmmünolojik Mekanizmalar

Tam olarak anlaşılmamış olsa da, bağışıklık sisteminin pterjiyum gelişiminde hem patogenezinde hem de oluşumunun bir sonucu olarak doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir. Vasküler hücresel adezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve insan lökosit antijeni-DR (HLA-DR) dahil olmak üzere immünolojik aktivite göstergeleri pterjiyumda artmaktadır. Aynı zamanda E-kaderin ve b-katenin'in up-regülasyonu da gözlenmiştir. Pterjiyumda mast hücreleri, lenfositler, plazma hücreleri, dendritik hücreler ve CD4 + ve CD8 + T hücrelerinde bir artış da tespit edilmiştir. İnflamatuvar sürecin yoğunluğu antijen seviyelerine bağlı olarak değiştiği için, makrofaj tipi hücreler pterjiyum dokusunda düzensiz dağılmıştır. Bu immün hücre infiltrasyonu subepitelyal ve epiteli kaplayan erozyona uğramış olduğu bölgelerde daha fazla bulunması inflamatuvar sürecin hücre proliferasyonundan, anjiyogenez sürecinden veya pterjiyumun nüksünden sorumlu olmadığını düşündürmektedir (Detorakis ve ark., 2000; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.5. Ekstrasellüler Matriks Modölatörleri

Ekstrasellüler matriks modölyasyonunda düzensizlik pterjiyum oluşumu ile ilişkilendirilmiş bir durumdur ve bu hastalığın kilit bir özelliği olarak kabul edilir. (Sebastia ve ark., 2013).

Ekstrasellüler matriks yeniden şekillenmesi, esasen farklı proteinazların etkisiyle sağlanır; bunlar arasında MMP'ler daha ayrıntılı incelenmiştir. Pterjiyumda MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 ve MMP-9 da dahil olmak üzere birçok MMP'nin ifade düzeyleri, özellikle migrasyon ve proliferasyonun asıl noktası olan baş kısmında artmaktadır. Ekstrasellüler matriks yeniden şekillenmeyi güçlendiren transglutaminaz-2 (TGM2) ve MMP2'nin anormal DNA metilasyonuna sahip olması, pterjiyum patogenezinin esansiyel ekstrasellüler matris genlerinin metilasyon durumuyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. MMP inhibitörlerinin (TIMPs) pterjiyumda ifade düzeyleri artar, yüksek MMP seviyeleri ile birlikte, bu proteinler pterjiyumu karakterize eden infiltrasyonda ve artmış matriks turnoverında aktif katılımcılar olabilir. Bu proteinazların ve bunların inhibitörlerinin ekspresyon seviyelerinin, pterjiyum oluşum ve gelişim hızına aracılık edebileceği düşünülmektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

2.4.6. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

Epitelyal Mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücrelerin farklı durum ve uyarılar sonucunda epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmaları durumudur. Bu süreç birçok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucu meydana gelir. EMT embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve tümör hücrelerinin migrasyonunda görülen bir mekanizmadır. Embriyonik gelişim süresinde epitel hücreleri organizmanın farklı kısımlarına göç ederek morfogenez sırasında farklı dokuları oluşturmak üzere farklılaşırken, özellikle tümör hücrelerinde ise metastaz oluşturma mekanizmasında yer

almaktadır (Vatansever, 2016). EMT, kanser hücrelerinde görülen ortak bir özelliktir. Pterjiyum dokusunda yapılan bir çalışmada, ana EMT uyarıcısı olan doku faktörü (TF)'nin aktif olduğu ve özellikle ekspresyonunu bazal, suprabazal ve yüzeyel epitel hücrelerinin sitoplazmasında daha yüksek düzeylerde olduğu saptanmıştır. Ayrıca, klasik bir EMT işareti olan α -SMA'nın protein ekspresyonu, pterjiyum epitel hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüştüğünü göstermektedir. E-kaderin'in downregülasyonu ve hücre-hücre yapışmasını düzenleyen β -kateninin hücre içi birikimi pterjiyum epitelinde tespit edilmiştir. E-kaderin'in down-regülasyonu EMT sırasında önemli bir son yolaktır, kanonik β -katenin sinyal yolağı, gelişimde EMT'yi harekete geçiren ve sıklıkla kanserde aktive olan gerekli bir bileşendir. S100A4, kemik morfogenetik protein 7, heterojen nükleer ribonükleoprotein A/B (hnRNP), alanin-glikozilat aminotransferaz 2'yi içeren EMT ile ilişkili genlerin pterjiyum doku örneklerinde eksprese olmaktadır. Yakın tarihli bir çalışmada EMT'nin miRNA düzenleyicilerinin pterjiyumda diferansiyel ekspresyonu da gösterilmiştir. Mezenkimal belirteç fibronektinin artışının yanı sıra EMT'yi inhibe eden ve kanserde migrasyon ve istilayı arttıran miR-200 ailesinden dört üyenin down-regülasyonu ise EMT'nin potansiyel olarak pterjiyum patogenezinde rol oynayabileceğini ve terapötik bir hedef oluşturabileceği görüşünü desteklemektedir (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

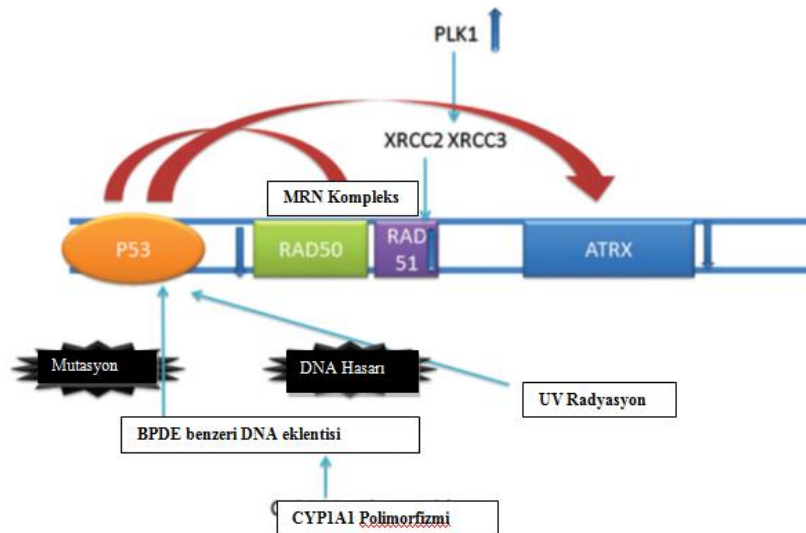
2.4.7. Kolesterol Metabolizması Değişiklikleri

Pterjiyum kaynaklı fibroblastlarda kolesterol metabolizması aktivitesinde bir artış olmaktadır. Buna ek olarak, pterjiyum fibroblastlarında Hidroksil-metilglutaril-koenzim-A-redüktaz (kolesterol biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörünün (kolesterol açısından zengin lipoproteinleri içine

alan) mRNA seviyeleri de artmaktadır. Kolesterol metabolizmasını değiştiren ilaçlar olan Everolimus ve pioglitazonun, pterjiyum fibroblast proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları kolesterol ester metabolizmasının modülasyonu ile pterjiyum proliferasyonunun önlenmesinde topikal ilaçların kullanımını önermektedir (Crdenas-Cant ve ark., 2016)

2.5. Pterjiyumda DNA Tamiri

Oksidatif DNA hasarına neden olan UV radyasyonun pterjiyum patogenezinde major faktör olduğu bilinmektedir. DNA tamirinde p53 çok önemli olduğundan bu yolağın aşağı yn bileşenlerinin de anormal ifadesi söz konusudur (şekil 2.4). Başta MRN kompleksinin yeleri (RAD 50 ve RAD 51) ile iki RAD 51 paraloğu (XRCC2 ve XRCC3) olmak üzere çift zincir DNA kırık tamirinde görevli genlerin ekspresyonunda pterjiyum ve kontrol grubu arasında farklılık olduğu bildirilmiştir. RAD50 proteininin artmış ekspresyonu normal konjonktiva dokusuna oranla pterjiyum dokusunda fazladır (Liu ve ark., 2013).



şekil 2.4: Pterjiyumda DNA Tamiri (Liu ve ark., 2013).

RAD50 çift zincir DNA kırıklarının hızlı bir şekilde onarılmasına katkı sağlar. Pterjiyum dokusunda RAD50 proteinin artmış ekspresyonu rekombinasyonel DNA tamir mekanizmasının pterjiyumda aktive olabileceğini düşündürmektedir. RAD51, XCRR2 ve XCRR3 gen ekspresyonları ailesel pterjiyum nüks öyküsü olan hastaların periferal kan lenfositlerinde artar. RAD51 aktivitesini düzenleyen PLK-1 (polo benzeri kinaz) ekspresyonu da pterjiyumda artmaktadır. Bu kanıtlar, pterjiyum patogenezi ile çift zincir DNA tamir sistemi arasında önemli bir bağlantı olabileceğini göstermektedir. (Liu ve ark., 2013).

2.6. Pterjiyumda Apoptoz ve Apoptozla İlişkili Genlerin İfade Düzeyleri

Programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz temelinde genetik mekanizma olan bir hücre intihar şeklidir. Hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir yoldur. Apoptozda gözlenen tipik morfolojik değişimler; hücre küçülmesi, nükleer kromatinin yoğunlaşması, nükleusun fragmentasyonu ve DNA'nın internükleozomal alanda ayrılmasıdır (Özeç ve ark., 2008).

Hücrel homeostazın devamlılığı hücrel çoğalma ve hücrel apoptoz arasındaki sıkı düzenleme ile sağlanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, pterjiyum ve normal konjonktiva dokuları arasında benzer hücre proliferasyon modellerinin gösterilmesi, pterjiyumun hücrel proliferasyonda bir değişiklikten ziyade bunun hücrel apoptoz başarısızlığından kaynaklanması olasılığını da gündeme getirmiştir. Bu olasılığı araştırmak için, Tan ve ark. tarafından apoptozun düzenlenmesinde rol aldığı bilinen genlerin ifade modelleri için pterjiyum örneklerinde apoptotik hücreler incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada pterjiyum ve kontrol dokularında p53, bcl-2 ve bax

gen ifade düzeyleri araştırılmıştır. Buna göre; pterjiyum dokularında p53, bax ve aynı zamanda anti-apoptotik bir protein olan bcl-2'nin önemli seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir. Buna karşılık, normal konjonktival örneklerinin hiçbirinde bcl-2 ekspresyonu tespit edilememiş ancak artmış bax ekspresyonu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, pterjiyum gelişiminin, konjonktivada meydana gelen normal apoptoz sürecinin bozulmasının bir sonucu olduğu bir modelini desteklemektedir (Tan ve ark., 2000).

Apoptozda görevli bir protein olan p53; hücre döngüsünün engellenmesi, DNA hasarının giderilmesi ve apoptozun uyarılmasında rol oynar. DNA'da bir hasar meydana geldiğinde p53 protein ürünü ortamda birikir ve öncelikle hücre siklusunu G-1 fazında durdurup hücrenin tamiri için zaman sağlar. Ancak hasar tamir edilemezse, p53 hücreyi apoptoza sürükler. Bunu Bax'ı indükleyip Bcl-2'yi bloke ederek gerçekleştirir.

Pterjiyum fibroblastları, heterozigotluk kaybı ve mikrosatellit instabilitesini içeren transforme hücre özelliklerini gösterir. Benzer şekilde, kültüre pterjiyum epiteli, normal konjonktival epitel hücreleriyle karşılaştırıldığında yaşlanmanın daha uzun sürdüğü transforme bir hücrenin karakteristik özelliklerini de göstermektedir. UV'ye maruz kalan kornea epiteli apoptoza uğrayarak kornea yüzeyinden dökülürken, pterjiyum epiteli ise UV ile indüklenen apoptoza dirençlidir ve pterjiyum epiteli, konjonktivaya kıyasla daha az apoptoz sergilemektedir (Girolamo ve ark., 2014). Bu durum pterjiyum epitelinde anti-apoptotik protein bcl-2 bulunurken hem konjonktiva hem de pterjiyum epitelinde pro-apoptotik protein bax'ın varlığı ile açıklanabilir (Girolamo ve ark., 2014; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016).

Ayrıca UV-B maruziyetinin neden olduğu oksidatif stres, bir antiapoptotik protein olan survivinin ekspresyonunu indüklemektedir. (Cárdenas-Cantú ve ark., 2016)

Bunların dışında, COX-2 (siklooksigenaz-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü eksprese eden makrofajlar, pterjiyum patogeneziyle ilişkili olabilir. Primer pterjiyum ile Cox2 ve survivin arasında anlamlı bir ilişkinin bulunması pterjiyumun anti-apoptotik bir mekanizma yoluyla ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir (Liu ve ark., 2013).

2.7. Pterjiyumda Hsp 90

Pterjiyum, hafif displaziden karsinomaya ve lokal invaziviteye kadar değişen tümör benzeri birçok özellik göstermektedir. Epiteldeki HSP'ler epitel hücre bütünlüğünün gözlemlenmesinde önemli olabilir ve stres ajanının neden olduğu epitel hücrelerinin transformasyonuna karşı ilk savunma hattını temsil edebilir. Sebastia ve ark tarafından 15 primer pterjiyum ve 10 normal konjonktiva dokusunda yaptıkları bir çalışmada hsp90 ve ki-67 açısından pozitif hücre miktarının pterjiyum dokusunda anlamlı olarak fazla olduğu bildirilmiştir (Sebastia ve ark., 2013).

Hsp90 (heat shock protein 90) moleküler bir koruyucudur ve ısı şoku proteinleri yüksek sıcaklıklara maruz kalan hücreleri korur. Ökaryotlarda canlılık için gerekli olan, bol miktarda bulunan ve oldukça korunmuş bir moleküldür. Hsp90'nın, stres altında olmayan hücrelerdeki toplam çözünebilir sitosolik proteinin %1'ini oluşturmakta ve onu en bol proteinlerden biri haline getirmektedir. Hsp90, açılmış proteinlerin bir araya toplanmasını önleyerek protein katlanmasını düzenler. Aynı zamanda, tümör büyümesinde rol oynayan bir takım proteinleri de dengelemektedir. Kanseri hücreler, EGFR gibi büyüme faktörü reseptörleri de dahil olmak üzere bir takım proteinleri aşırı miktarda eksprese eder. Bu büyüme faktörü reseptör yollarının aşırı ekspresyon veya yapısal aktivasyon ile düzensizleştirilmesi, bu büyüme faktörünün düzeninin bozulması, anjiyogenez ve metastaz dahil olmak üzere tümör prosesini içerebilir ve birçok insan

malignitelerinde kötü prognoza neden olur. Hsp90'nın inhibisyonu, PI3K/AKT sinyal yolunun ve büyüme faktörü sinyalinin genel olarak inhibisyonu yoluyla apoptozu indükleyebilir. Hücre stresiyle indüklenen ısı şoku proteinleri geniş bir tümör aralığında yüksek seviyelerde ifade edilir ve kötü prognoz ve tedaviye direnç ile yakından ilişkilidir. HSP'lerin tümör hücrelerinde artmış transkripsiyonu, p53 fonksiyonunun kaybedilmesi ve proto-onkogenler HER2 ve c-Myc'nin daha yüksek ekspresyonundan kaynaklanır ve tümörögenез için önemlidir. HSP aile üyeleri hem özerk hücre çoğalmasını teşvik ederek hem de ölüm yollarını inhibe ederek tümör büyümesinde önemli rol oynar. HSP'ler bu nedenle rasyonel anti-kanser ilaç tasarımı için hedefler haline gelmiştir (Sebastia ve ark., 2013). Hsp90 ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) indüksiyonu için gereklidir (Sebastia ve ark., 2013; Cárdenas-Cantú ve ark., 2016). Moleküler şaperon Hsp90 ile protein-protein etkileşimleri ve protein kinaz Akt tarafından serin 1179 üzerinde fosforilasyon, endotelial nitrik oksit sentazın aktivasyonuna yol açar. Sebastia ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kontrole kıyasla tüm pterjiyum dokularında Hsp90'ın aşırı eksprese olduğu bulunmuştur. Aynı faktörler pterjiyumda olduğu gibi bazı tümörlerin patogeneğinde de etkilidir. Hsp90'ın bu faktörlerin çoğunu tümörlerde stabilize ettiği bilinmektedir. Hsp90, stres cevabında ve normal homeostatik kontrol mekanizmalarında yer alan bir proteindir. Tümör hücreleri malignitelerini korumak için normal hücrelere göre daha yüksek Hsp90 aktivitesi gerektirir, bu nedenle Hsp90 pterjiyum tedavi gelişiminde umut vaad eden bir hedefdir. Hsp90 inhibitörlerinin araştırılması büyük önem taşımakta ve yeni bir terapötik modaliteyi temsil edebileceği düşünülmektedir (Sebastia ve ark., 2013).

2.8. Pterjiyumda Heterozigotluk Kaybı ve Mikrosatellit İnstabilite

Pterjiyum gelişiminde çevresel faktörler dışında ultraviyole radyasyon maruziyeti altında onkogen aktivasyonu, büyüme faktörlerinin anormal ifadesi ve herpes virüslerin mevcudiyeti gibi birçok moleküler değişikliğin önemli bir rolü olduğu kabul edilmiştir. Bu moleküler değişiklikler, pterjiyumun neoplazi ile benzerlik göstermesi ve böylece neoplastik bir benign lezyon olarak düşünülmesine yol açmıştır. Yeni tümör baskılayıcı genlerin (TSG'lerin) tanımlanması, kanser gelişiminin moleküler yolağı hakkında bilgi sağlar. TSG'lerin inaktivasyonu, çok aşamalı karsinogenezde kritik bir rol oynamaktadır (Spandidos ve ark., 1997). TSG'ler genellikle bir allelde genetik materyalin kaybı yoluyla veya mutasyonlarla inaktive edilir. Eğer normal allel kaybolursa (LOH) bir tümör potansiyel olarak gelişebilir (Detorakis ve ark., 1998). Ayrıca, neoplastik hücrelerin bir özelliği de, yüksek mutasyon hızını gösteren mikrosatellit instabilitesidir. Mikrosatellite instabilitesi (MI) hemen hemen tüm insan tümörlerinde olduğu kadar nörodejeneratif hastalıklarda, insan aterosklerotik plaklarında ve spontan olarak bırakılmış embriyonik dokularda tespit edilmiştir. Spandidos ve ark. yaptıkları çalışmada pterjiyum mikrosatellit DNA'sındaki iki genetik değişikliği tanımlamışlardır: örneklerin %53'ünü etkileyen TSG'lerin varlığını gösteren heterozigotluk kaybı ve olguların %13'ünü etkileyen yüksek bir mutasyona karşılık gelen mikrosatellit instabilitesi. Mikrosatellit instabilitesi hemen hemen tüm insan tümörlerinde tespit edilmesi bu hastalığın neoplastik benign lezyonlar olarak düşünülmesi görüşünü kuvvetlendirmiştir. Spandidos ve ark tarafından yapılan çalışmada pterjiyum hücrelerinde yüksek heterozigotluk kaybı insidansının tespit edilmesi pterjiyumu neoplastik lezyonlara yaklaştırmaktadır (Spandidos ve ark., 1997).

Tümör hücrelerinde veya malign hastalığa ilerleyen premalign hücrelerde gerçekleşen bir başka durum ise LOH'tur. Bu pterjiyumda transforme hücrelerin oluştuğunun bir göstergesidir. Son yıllardaki çalışmalarla pterjiyal fibroblastların transforme fenotip özelliklerinin çoğunu kazandığı teorisi desteklenmektedir. Knudson'un 'çift vuruş hipotezine' göre, LOH fenomeni, hastalığa karışan tümör baskılayıcı genlerin varlığı ile koreledir. 17q11.2-q21'de LOH önemli bir insidansının tespit edilmesi, pterjiyumun gelişimi için önemli TSG'lerin bu kromozomal bölge üzerine yerleşebileceğini düşündürmektedir. 17q'deki delesyonlar, çeşitli neoplazmalarda sık görülür. 17q'daki aday TSG'lerdeki değişikliklerden etkilenen insan kanserlerinin geniş spektrumu, bu genlerin neoplazi gelişiminde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Spandidos ve ark., 1997).

Mikrosatellit markırlar kullanarak pterjiyumda LOH'un yüksek insidansı özellikle 9p, 9q ve 17q bölgelerinde olduğu bildirilmiştir. Çift vuruş hipotezine göre LOH, TSG'lerin varlığına ilişkin önemli bir markırdır. 9p, 9q ve 17q kromozomal alanlarda göğüs, akciğer, yemek borusu, böbrek, mesane, deri ve kan gibi çeşitli organlarda neoplastik lezyonların sıklıkla LOH göstermesi, p16 ve p53 gibi aday TSG'lerin buraya lokalize olması gerçeğine rağmen neoplazi gelişiminde universal bir rol oynaması ile uyumludur (Detorakis ve ark., 2000).

LOH, üst göz kapağından Güneş radyasyonundan korunan bölgelerden çıkarılan fenotipik olarak normal konjonktival dokuda tespit edilememesi, genetik değişimlerin güneş ışığına maruz kalma şiddeti ile ilişkili olabileceğini gösterir. Ayrıca 9q bölgesindeki LOH insidansı ile nüksün pterjiyumla uyumlu olduğunun bunması, belki de bu alandaki LOH'un nüks açısından prognostik bir belirteç olarak yararlı olabileceğini düşündürür (Detorakis ve ark., 2000).

Tümör ve periferik kan numunelerindeki mikrosatellit belirteçlerinin karşılaştırmalı değerlendirmesi ile tümör dokusunda çoklu allellerin varlığını ortaya çıkarabilir; bu, mikrosatellit instabilitesi olarak da bilinir. MI'nın, onkogenezdeki mutator yolağının bir göstergesi olduğu bu hataların doğru replikasyonunda veya replikasyon sonrası düzeltmelerdeki bir kusurun onkogenleri veya TSG'leri (ras, p53 ya da Rb gibi) destabilize edebileceği ve daha sonra kanser gelişimine yol açabileceği ileri sürülmüştür. Ancak pterijyumda MI insidansının LOH insidansına kıyasla oldukça düşük olması, 'baskılayıcı' yolağın (LOH) pterijyum patogenezinde oldukça aktif olduğunu 'mutator' yolağın ise (MI) önemli bir rol oynamayabileceğini gösterir (Detorakis ve ark., 2000).

2.9. WWOX Geni

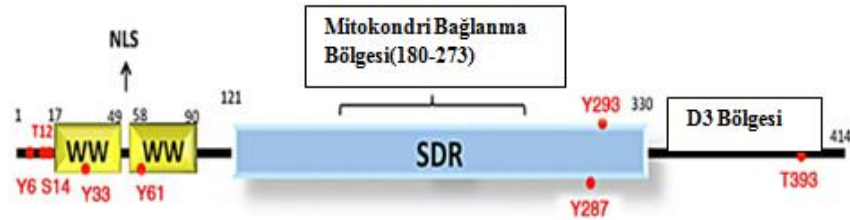
WOX1 veya FOR (WW domaini içeren oksidoredüktaz) olarak da bilinen WWOX, tümör baskılayıcı bir gendir. WW domaini içeren oksidoredüktaz geni (WWOX), yaklaşık 1.1 mb'lık genomik bir bölgeyi kaplar ve 16q23.3→q24.1'te yerleşiktir. Bu bölge insanlarda en yaygın ikinci frajil bölge olan FRA16D'yi kapsamaktadır. Yüksek oranda translokasyon, hemizigot ve homozigot delesyonlar, artmış kardeş kromatit değişimi gibi değişikliklerin gözlemlendiği DNA hasarına oldukça duyarlı olan FRA16D; göğüs, yumurtalık, prostat, akciğer, özofagus, gastrik, pankreas ve karaciğer kanserleri gibi çok sayıda kanserle ilişkilidir (Baryla ve ark., 2015).

Normal dokuda, WWOX ürünü, 1245 bç'lik açık okuma çerçevesini kodlayan dokuz ekson ve en uzun intronu 779 639 baz çifti (bç) olan 8 intron içerir (Mare ve ark., 2009; Guo ve ark., 2013a). Ancak birçok tümörde, genellikle normal dokularda bulunmayan WWOX geninin yedi farklı izoformu eksprese olmaktadır (Mare ve ark., 2009). Bu varyantlar, WWOX mRNA'sında 5. 6. 7. 8. ve 9. ekzonlarda meydana gelen

çeşitli delesyonlarla ortaya çıkmaktadır (Chang ve ark., 2007; Barylva ve ark., 2015). WW domaininde herhangi bir delesyon oldukça nadir görülür (Lo ve ark., 2015). WWOX transkriptleri (varyantlar 1-8), N-terminal WW alanları ortak, ancak C terminalinde farklı olan proteinleri kodlamaktadır (Yang ve Zhang; 2008). WWOX üreme, endokrin ve ekzokrin organların sekretuar epitel hücreleri ve üriner sistemin belirli bölümlerinde bulunan duktal epitel hücrelerinin yanı sıra, merkezi sinir sistemi boyunca nöronal cisimlerde, ependimal hücreler, astrositler ve serebellumun purkinje tabakası da dahil olmak üzere yüksek oranda eksprese edilirken en yüksek ekspresyon seviyesine tiroid, beyin, (Aldaz ve ark., 2014), hormonlarla düzenlenen testis, yumurtalık ve prostatta ulaşmaktadır (Qu ve ark., 2013). Buna karşılık WWOX ifadesi, yağ, bağ ve lenfoid dokularda, myelinize yapılarda ve kan damarlarında saptanmamıştır (Yang ve Zhang; 2008). Yapılan çok sayıda çalışma; göğüs, yumurtalık, gastrik, karaciğer, akciğer, tiroid, pankreas gibi çoklu neoplazilerde WWOX protein ekspresyonunun kaybedildiğini göstermiştir. Ayrıca Meme kanseri, yumurtalık kanseri, küçük hücre dışı akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde, WWOX ekspresyonunun azalması, kötü prognoz ve sonuç ile de ilişkilendirilmiştir. WWOX ekspresyonunun kaybolmasına yol açan en önemli mekanizma, kromozomal delesyonlar ve yeniden düzenlemeler yoluyla genetik kayıpların yanı sıra promotor hipermetilasyonu ile epigenetik susturmayı içermektedir. WWOX ayrıca poliübiquitinasyon ve ardından proteozomal bozulma yoluyla da inaktive edilebilir. Bu inaktivasyon için ACK1 (aktive tirozin kinaz 1) Y287'de WWOX'u fosforiller ve böylece WWOX hızlı bir şekilde degradasyona uğrar (Aldaz ve ark., 2014).

2.9.1. WWOX Proteini

WWOX geni, 2.2 kb uzunluğunda bir transkriptten, 414 amino asit'ten oluşan 46 kDa'luk bir protein kodlar. Bu isim kısa zincirli dehidrogenaz/redüktaz enzim ailesine yüksek homoloji gösteren bir bölgeye bağlanmış iki WW alanına sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Baryla ve ark., 2015). WWOX geni, NH₂-terminal ucunda iki WW alanından, SDR enzim ailesinde bulunan 17 β -hidroksiterol redüktaz-3 homologu olan (Salah ve ark., 2010) bir kısa zincirli alkol dehidrojenaz/redüktaz domeininden (ADH/SDR) (Hezova ve ark., 2007; Schrock ve ark., 2015) ve bir proapoptotik C-terminal D3 kuyruğundan oluşur (Chiang ve ark., 2013). Ayrıca iki WW domaini arasında ise çekirdek yerleşim sinyali (NLS) bulunmaktadır (Şekil 2.5) (Chang ve ark., 2007; Li ve ark., 2014).



Şekil 2.5: WWOX'un Sistemik Gösterimi (Chiang ve ark., 2013)

WW domainleri transkripsiyonel regülasyon ve protein stabilitesi gibi hücrel süreçlerde yer alan sinyal yolları ile ilişkili komplekslere aracılık ettiği bilenen en küçük düzenleyici alanlar arasındadır. WW domainleri sırasıyla 17- 49 ile 58-90 amino asitler arasında lokalizedir. İlk WW domaini, 26 amino asitten oluşan, iyi korunmuş iki triptofan (W) rezidüsü ve bir de prolinden oluşmaktadır ve WWOX'un protein-protein

etkileşimini PPXY motifini taşıyan proteinleri bağlayarak sağlar (P;prolin, Y;tirozin, X; herhangi bir amino asit). İkinci domainde ise bir triptofan rezidüsü, WW alanlarında daha az bulunan bir tirozin ile değiştirilmiştir (Baryla ve ark., 2015). İkinci işaretli triptofan 85. pozisyonda bir tirozin ile değiştirildiğinden klasik bir WW domaini olmayan bu alan (Aldaz ve ark., 2014) WW1'in fizyolojik bağlanmasının güçlendirilmesi için bir şaperon olarak görev yapmaktadır (Schrock ve ark., 2015). Ayrıca bu ikinci WW domaini korunmuş bir kaspaz tanıma motifi (Gln–Glu–Thr–Asp) de içermektedir (Chang ve ark., 2007). Bu domainler, transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu, protein stabilitesi ve hücre büyümesinin kontrolü gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan sinyal yolları ile bağlantılı komplekslere aracılık etmektedir. Prolin açısından zengin ligandların tanınmasına dayanarak, WW alanları iki major iki de minor olmak üzere dört gruba ayrılır (Aqeilan ve ark., 2007; Salah ve ark., 2010; Lo ve ark., 2015). Distrofin, Yes-associated protein (YAP65), ve Nedd4 E3 ubiquitin ligaz gibi grup 1 WW domainli proteinler PPXY ve LPXY gibi peptid motifleriyle etkileşir. Grup II WW alanları PPLP motiflerine bağlanmaya aracılık eder ve grup III WW alanları arginin veya lizin ile çevrili poli-P motiflerini seçerler. Grup IV WW alanları ise p(S/T)P (fosfoserin veya fosfotreoninli kısa dizileri takip eden fosfat grubu) motiflerini tanımaktadır (Salah ve ark., 2010; Lo ve ark., 2015).



Şekil 2.6: WWOX Protein Domainleri (Aldaz ve ark., 2014).

SDR enzim ailesi ise geniş bir spektruma sahiptir. Bazı SDR ailesi proteinleri hücrel metabolizma ve redoks fonksiyonlarını düzenleyen reaksiyonları katalizler (Guo ve ark., 2013b; Lo ve ark., 2015). SDR proteinleri arasında önemli bir grup hidroksteroid dehidrogenaz ailesidir. SDR domaini, düşük molekül ağırlıklı ligandları bağlar ve bu kısa zincirli dehidrogenaz /redüktazlar genellikle androjenler ve östrojenler gibi steroid hormon metabolizmasına katılan redoks katalitik aktivitesine sahiptir (Hezova ve ark., 2007; Gou ve ark., 2013). SDR domaininin androjen ve östrojen ile etkileşime girebilen bir NSYK motifine sahip olmasından dolayı WWOX, cinsiyet steroid hormonları için alternatif bir reseptör görevi yapmaktadır (Chiang ve ark., 2013).

WWOX'un mitokondri bağlanma bölgesi de SDR alanı içerisinde bulunmaktadır (Chiang ve ark., 2013). Ayrıca C-terminal SDR alanı, mikrotübül toplanması ve stabilitesinde önemli bir rolü olan Tau hiperfosforilasyonunu düzenleyen Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (GSK-3 β) ile WWOX'un bağlanmasına da aracılık etmektedir. Tau hiperfosforilasyonu mikrotübül afinitesini azaltır ve böylece mikrotübül stabilitesi bozulur. WWOX'un GSK-3 β 'ye bağlanması Tau fosforilasyonunu inhibe eder (Wang ve ark., 2012).

SDR domainli proteinler; lipid hormonlar, şekerler, alkoller ve retinoidler gibi çeşitli substratların oksidasyonuna ve indirgenmesine katılırlar (Li ve ark., 2014). Wwox (fare ortoloğu)'un steroid metabolizmasındaki rolü SDR domaini ile sağlanmaktadır. Wwox nakavt farenin şiddetli bir postnatal metabolik sendroma sahip olması Wwox'un hem gonadal gelişim hem de steroid metabolizmasında kritik bir rolü olduğunu göstermektedir. Wwox nakavt farelerin karaciğere özgü lipoprotein profilleri, Wwox'un kolesterol homeostazı ve yağ asiti biyosentezi/trigliserid metabolizmasında

rolü olabileceğini göstermiştir. Ayrıca WWOX ekspresyonunun yumurtalık, prostat ve testis gibi hormonal olarak düzenlenmiş dokularda en yüksek seviyelerde olması, Wwox'un lipoprotein, yüksek yoğunluklu lipoprotein ve cinsiyet steroid metabolizmasında kritik bir rol oynadığının kanıtıdır (Schrock ve ark., 2015).

WWOX'un subsellüler lokalizasyonu tam olarak netlik kazanamamış olsa da yapılan immünohistokimyasal çalışmalarla, WWOX'un hem normal hem de neoplastik dokularda sitoplazmik bir protein olduğu gösterilmiştir (Güler ve ark., 2004). Ludes-Meyers ve ark., ise endojen WWOX ve eksojen WWOX-GFP füzyon proteini ile yaptıkları çalışmada WWOX'un Golgi aparatında lokalize olduğunu ve bu yerleşim için SDR domaininin yeterli ve gerekli olduğunu göstermişlerdir (Ludes-Meyers ve ark., 2003). Ayrıca WWOX mitokondri ve çekirdekte de lokalize olmaktadır (Aqeilan ve ark., 2007; Chang ve ark., 2007). Endojen WWOX epidermal keratonsitler ve meme bezi hücreleri gibi çeşitli hücre hatlarında mitokondride bulunmaktadır ve tümör nekroz faktör- α uyarısı ile nükleusa transloke olur (Li ve ark., 2014). Sonuç olarak, kullanılan hücre tipine göre WWOX; mitokondri, Golgi kompleksi, düz ER, plasma membranı ve çekirdekte lokalize olabilmektedir (Chang ve ark., 2007).

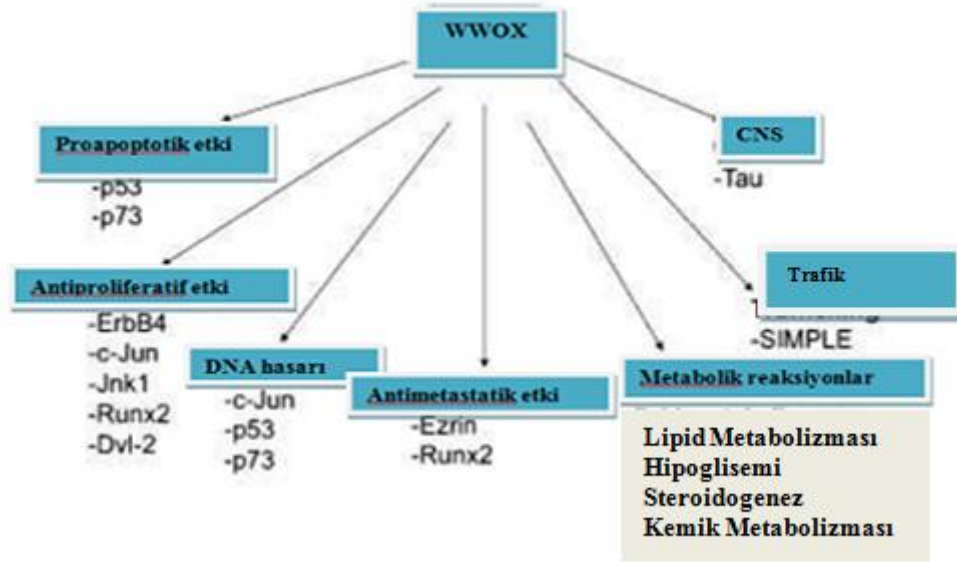
WWOX'un subsellüler lokalizasyonu ve fonksiyonu fosforilasyonla düzenlenir. Tyr (33) ve Tyr (287) bilinen WWOX fosforilasyon bölgeleridir. (Li ve ark., 2014). Diğer fosforilasyon bölgeleri ise sırasıyla Tyr6, Thr12, Ser14, Tyr61, Tyr293 ve Thr3B3'dir (Chiang ve ark., 2013). Örneğin, Src ilk WW alanında tirozin 33 (Y33) fosforilasyonuna aracılık eder ve WWOX'un bağlanma yeteneğini etkiler. WWOX fosforilasyonu, diğer proteinler ile etkileşime geçme yeteneği ve protein istikrarını düzenlenmesi açısından önemlidir (Aqeilan ve ark., 2007). PPXY motifi ile WW alanı etkileşimleri, grup I WW alanlarındaki tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile

düzenlenebilir. Tyr33'ün WWOX'in ilk WW alanında fosforilasyonunun, p53, c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK1) ve p73'e bağlanması için çok önemlidir. Src tarafından fosforile olan Tyr33, hedef proteinlerin PPXY motifleri içindeki prolin kalıntılarıyla önemli molekül içi teması girmektedir (Lo ve ark., 2015). WWOX'un Tyr33 fosforilasyonu östrojen reseptöründen (ER) bağımsız olarak steroid hormonu 17 β -östradiol (E2) tarafından stimüle edilebilir. WWOX ayrıca ilk N-terminal WW domaininden anizomisin veya UV ışığından indüklenen Tyr33 fosforilasyonu ile çekirdeğe transloke olabilir (Li ve ark., 2014). Src kinaz aktivasyonu ve UV radyasyonun dahil olduğu stres uyarısı, Tyr33'den WWOX fosforilasyonuna yol açarak apoptozu teşvik eder (Mahajan ve ark., 2005).

WWOX'un Tyr287'de fosforilasyonu Aktif Cdc42-ilişkili kinaz (ACK1) ile sağlanır ve bu fosforilasyon işlemi WWOX übiqtinasyonuna ve protozoamal degradasyonuna yol açmaktadır. (Chang ve ark., 2007). Tyr287'de fosforillenen WWOX'un proapoptotik etkisi ortadan kalkar ve böylece tümörögenezi teşvik eder. Primer androjen-bağımsız prostat tümörlerinde yapılan bir çalışmada ACK1 ile tirozin fosforilasyonun artıp, WWOX'un azalması bu durumu desteklemektedir (Mahajan ve ark., 2005).

İlk WW domaini, prolin açısından zengin PPxY ligand aracılığı ile p73, AP2- γ , c-Jun (Aqeilan ve ark., 2007) gibi bir dizi transkripsiyon faktörü ile Yes-ilişkili protein (YAP), RSP5, PUB1 ve ERbB-4 gibi çeşitli proteinlerin (Gou ve ark., 2013) yanı sıra eritroblastik lösemi viral onkogen homolog 4, ezrin, lizozom/geç endozom küçük integral membran proteini (SIMPLE), c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK) ile de bağlanabilmektedir (Wang ve ark., 2012; Lo ve ark., 2015). WWOX, bu proteinlerin sitoplazmadaki hedefleriyle ilişkilidir ve bu proteinlerin çekirdeğe translokasyonlarını

önleyerek transkripsiyonel aktivitelerini düzenler (Aqeilan ve ark., 2007) Bu yolla kanser hücrelerinin sağ kalımları baskılanmış olur (Chiang ve ark., 2013).



Şekil 2.7: WWOX Sinyal Yolağı (Mare ve ark., 2009)

Ekzon 5-8 tarafından kodlanan WWOX'un C terminal SDR bölgesi insan kanserlerinin çoğunda genellikle delesyonlu veya alternatif (anormal) formlarda bulunurken WW domaininde herhangi bir delesyon nadiren görülmektedir (Lo ve ark., 2015). WWOX ekspresyon kaybına birçok insan tümöründe sık karşılaşıldığından, bu tümörlerde hedefleri ile WWOX etkileşiminin eksikliğinin tümörögeneze katkıda bulunabileceği düşünülebilir. Örneğin, meme kanserinde hem WWOX ekspresyonu belirgin şekilde değişmekte hem de WWOX meme kanserinde rol oynayan bir protoonkogen olan ErbB4 ile etkileşime girmektedir. Çekirdekte işlev gören ErbB4'ün C-terminal fragmanı (CTF), üç PPxY ligandı ihtiva eder. Başka bir WW alanını içeren protein olan Yes-associate protein (YAP), ErbB4 ile ilişkilidir ve CTF ile birlikte

transkripsiyonal aktivatörü olarak görev yapar. WWOX mevcut olduğunda CTF'yi sitoplazmada tutar ve transaktivasyon işlevini inhibe eder. Bu nedenle, hem WWOX hem de YAP'ın, transkripsiyonel aktivasyonunu veya baskısını kontrol etmek için CTF ile etkileşim için rekabet ettiği düşünülmektedir. Ayrıca son zamanlarda, meme kanseri hastalarında WWOX ve ErbB4 ekspresyonunun iyileşmiş sağkalım ile ilişkili olduğu da gözlemlenmiştir (Aqeilan ve ark., 2007).

Birçok çalışma, WWOX'un önemli bir tümör baskılayıcı gen olduğunu ve WWOX'in kaybedilmesi veya deregülasyonunun çeşitli tümörlerin gelişiminde etkili olduğunu göstermiştir (Li ve ark., 2014).

2.9.2. WWOX'un Tümör Süpresör Aktivitesi

Frajil bölgeler (FS), BrdU, 5-azacytidin ve hipoksi gibi ekstrinsik ve intrinsik DNA replikasyon inhibitörlerine maruz kaldığında kırılan veya boşlukların artış gösterdiği kromozomal bölgelerdir. FS'ler, insan popülasyonundaki oluşum sıklığına göre, ortak ve nadir bulunan kırılgen bölgeler olarak iki gruba ayrılmıştır. Yaygın kırılgen bölgeler (CFS) tüm bireylerde görülürken, nadir kırılgen bölgeler (RFS) insan popülasyonunun% 5'inden azında bulunur. CFS'ler normal kromozom yapısının bileşenleridir ve tekrar dizilerinin genişlemesinin bir sonucu değildir. FRA3B (3p14.2), FRA16D (16q23.2) ve FRAXB (Xp21.1) en karakteristik CFSlerdir. İnsanlardaki en aktif kırılgen bölgelerden biri olan (Gou ve ark., 2013) ve ikinci sıklıkta eksprese olan FRA16D, WWOX genini kapsamaktadır (Li ve ark., 2014). Bu bölgelerde bulunan genler; LOH, delesyonlar (Schrock ve ark., 2015) ve translokasyonlar gibi genomik anormallikle aktivitelerini kaybeder (Lo ve ark., 2015). Frajil bölgede bulunan WWOX'un kaybı da göğüs kanseri (% 81.8), özofagal squamoz hücre karsinoması (SCC) (% 38.9), küçük hücre dışı akciğer kanseri (% 37), pankreatik adenokarsinoma

(% 26.7) ve gastrik karsinoma (% 30.8) gibi çok sayıda insan kanserleriyle ilişkilendirilmiştir (Lo ve ark., 2015; Schrock ve ark., 2015). 16q kromozomunu etkileyen genomik anormallikler ise, prostat, göğüs, yumurtalık, özofagus, akciğer, gastrik ve hepatik karsinomlar olmak üzere çeşitli epitelyal tümörlerin sitogenetik çalışmalarında sıklıkla rapor edilmektedir (Gou ve ar., 2013).

FRA16D kırılma bölgesinin, yumurtalık, göğüs, hepatoselüler ve prostat karsinomlarında ve diğer neoplazilerde kromozomal yeniden düzenlenmenin ve heterozigotluk kaybının sık görüldüğü bir bölge olması WWOX'un bir tümör baskılayıcı gen olabileceğini gündeme getirmiştir. Son yıllardaki araştırmalar, normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde WWOX protein ekspresyonunun azaldığını hatta kaybolduğunu ve bu bulgunun bazı klinik ve patolojik parametrelerle ilişkili olabileceğini göstermiştir (Aldaz ve ark., 2014).

Birçok kanser tipinde WWOX ekspresyonunun tespit edilemeyecek kadar azalması ise WWOX'un bir tümör baskılayıcı gen olabileceği yönündeki düşünceleri güçlendirmiştir. WWOX, Pro-282-Ala polimorfizmi (SNP), tiroid karsinoması için potansiyel bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. WWOX'daki diğer bir SNP rs2548861, yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol (HDL-C) seviyeleri ile ilişkilidir. Genom çapı bağlantı analizi çalışmaları, WWOX'in rs1079635 bölgesindeki polimorfizmlerinin prostat kanseri yatkınlığı ile de ilişkili olabileceğini göstermiştir. 16q23-24 kromozomunda sıklıkla allelik kayıplar ve homozigot delesyonlar meme, gastrik ve pankreas kanserinde FRA16D lokusunda bulunur. Genetik polimorfizmlere ilaveten, artan şekilde, promotör CpG ada metilasyonu ile gen ekspresyonunun epigenetik susturulmasının, tümörün inaktive edilmesinde önemli bir mekanizması olduğu da bilinmektedir. Transkripsiyonel regülasyonda değişikliğe yol açan

WFOX'un anormal metilasyonu, hematopoyetik, göğüs, akciğer, mesane, glioblastoma multiforme ve pankreatik neoplazilerde önerilen bir mekanizmadır (Gou ve ark., 2013). Nunez ve ark. meme kanserinde WFOX ifade düzeyi ile klinik-patolojik özellikler arasındaki ilişkiyi değerlendirmişler ve tüm normal meme epitel örneklerinde WFOX'un ifade düzeyinin arttığı, buna karşın invaziv tümörlerin % 34'ünde (69/203 olgu) WFOX ekspresyonunun tamamen kaybolduğunu ve % 26'sında (52/203) ise WFOX ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir. WFOX mRNA düzeylerinin, yüksek apoptotik indeksli tümörlerde artması hastalıksız sağkalım oranları ile ilişkilendirilmiştir. Bu verilerden, WFOX geninin ekspresyonu ve statüsünün meme tümörlerinin malignite sonuç ve derecesi ile ilişkili olduğu görülmektedir (Nunez ve ark., 2005).

Küçük hücre dışı akciğer kanserinde (KHDAK) primer tümörlerin % 25.9'unda, hücre hatlarının % 62,5'inde ise WFOX eksonundan yoksun transkriptler tespit edilmiştir. Primer tümörlerin %37'sinde ise WFOX lokusunda heterozigotluk kaybı gözlenmiştir. WFOX ifade değişikliklerinin akciğer kanserlerinin önemli bir bölümünde ortaya çıktığı ve bu nedenle KHDAK'nin patogeneğinde etkili olduğu açıktır. İmmunohistokimya çalışmaları, KHDAK tümörlerinin çoğunda WFOX ifadesinin kaybolduğunu veya azaldığını göstermiştir. WFOX ifade kaybı, yüksek tümör agresivitesi ve tümör histopatolojisi ile kuvvetli bir şekilde ilişkilidir (Yang ve Zhang, 2008). Prostat kanserinde Qin ve ark. WFOX mRNA ve protein ekspresyonunun prostat kanseri kaynaklı LNCaP, DU145 ve PC-3 hücrelerinde kanserli olmayanlara kıyasla önemli ölçüde düştüğünü bulmuşlardır. Aynı zamanda, primer prostat kanserlerinin % 84'ünde WFOX ifadesinin azaldığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, prostat kanseri kaynaklı hücrelerdeki WFOX ekspresyonunun

azalmasının, WWOX düzenleyici bölgedeki DNA hipermetilasyonuna bağlı olduğunu tespit etmişlerdir (Qin ve ark., 2007; Yang ve Zhang; 2008).

WWOX ekspresyonunun kaybı veya deregülasyonu pankreas adenokarsinoması, renal hücreli karsinoma ve endokrin ve ekzokrin karsinomlar gibi çeşitli kanser tiplerinin gelişimi ile de ilişkilidir. İmmünohistokimyasal boyama ile normal yumurtalık dokusunda kuvvetli bir WWOX ifadesi tespit edilirken tümörlerin % 37'sinde eksiklik veya neredeyse saptanamayacak WWOX ekspresyonu görülmüştür. Ayrıca prostat kanserlerinin% 84'ünde WWOX ifade düzeyi azalmaktadır. Özofagus skuamöz hücreli karsinom, küçük hücre dışı akciğer kanseri ve göğüs kanserlerinde, yüksek heterozigotluk kaybı, düşük mutasyon oranı ve WWOX geninin anormal kopyalarının ekspresyonu gösterilmiştir. Promotor bölgedeki DNA hipermetilasyonu, prostat kanseri kaynaklı hücrelerdeki WWOX ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır. Prostat kanseri hücrelerindeki WWOX mRNA ve protein ifadeleri, bir DNA metil transferaz inhibitörü olan 5-aza-2-deoksisitidin (AZA) ile arttırılabilir. Azalmış WWOX ifadesi kanserin klinik evresi, ve kötü prognoz ile önemli bir korelasyon gösterir. Bu nedenle, WWOX'in ifade durumu, kanser progresyonu ve prognoz üzerinde bir etkiye sahiptir (Li ve ark., 2014).

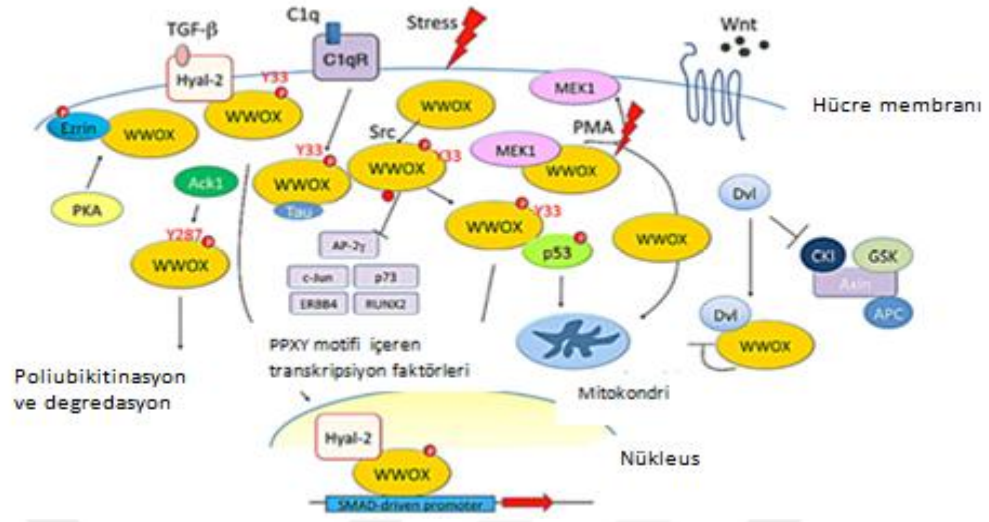
İnsan tümörlerinde WWOX ifade düzeyinin azalmasından sorumlu olabilecek bir diğer mekanizma ise promotör bölge metilasyonudur ve akciğer, skuamoz hücre, meme ve mesane karsinoması gibi kanser hücrelerinde WWOX ifadesinde azalma veya kayıp, genetik ve epigenetik değişimlerden kaynaklanabilir. Gen ekspresyonunun tüm bu sapmaları, tümör oluşumu ile ilişkilendirilir ve WWOX proteininin tümör büyümesini baskılayabileceğini düşündürmektedir. Primer kanserlerde ve kanser kökenli hücre hatlarında WWOX'un genetik değişimi homozigotik delesyon, LOH,

DNA metilasyonu, somatik mutasyonlar ve diğ er DNA instabilitesini i eremektedir (Yang ve Zhang; 2008).

2.9.3. TNF, Bcl-2, Bcl-xL, p53, p73, ve Diğ er Apoptozla İlişkili Faktörler

WFOX, esas olarak mitokondride bulunur ve apoptozu teşvik ederek tümör büyümesini inhibe eder. TNF-  uyarısı ile mitokondriyal geçirgenliğin indüklenmesi, mitokondriden WFOX salınımı ve bunun ardından çekirdek translokasyonu ile sonuçlanmaktadır. L929 hücrelerinde, WFOX'un WW ve SDR doaminleri ile TNF -  sitotoksisitesini arttırdığı ve bu artışın kısmen, apoptoz inhibitörleri Bcl-2 ve Bcl-xL'nin ifade düzeylerini azalması ve pro-apoptotik p53' n ise artışından kaynaklandığı bulunmuştur (Yang ve Zhang; 2008).

WFOX'un, p73 (p53 homologu), ErbB4 (eritroblastik lösemi viral onkogen homolog4), AP-2  (aktivatör protein 2 ) ve c-jun da dahil olmak üzere PPxY motiflerine sahip olan proteinlerle etkileşerek hücre döngüsü ve apoptotik süreç içerisinde yer aldığı bilinmektedir (şekil 2.8). WFOX, bu proteinlere bağlanır ve hücrelerin stoplazmalarında bu proteinleri ayrı tutarak transkripsiyonel aktivitelerini baskılar (Li ve ark., 2014).



Şekil 2.8: WWOX Yapısının Şematik Diyagramı ve Sinyallemedeki Rolü (Chiang ve ark., 2013)

2.9.3.1. c-jun

c-jun protoonkogeni, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu düzenleyen WWOX ile ilişkili bir transkripsiyon faktörüdür. UV radyasyon etkisi ile c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK)'ın aktivasyonu ve hızlı fosforilasyonundan dolayı c-Jun yüksek oranda uyarılır bu da sırasıyla p53 ve p21'in transkripsiyonunun düzenlenmesi yoluyla UV cevabını ortaya çıkarır (Gaudio ve ark., 2006; Aqeilan ve ark., 2007). WWOX; protein-protein etkileşimlerini sağlayan ilk WW domaininden c-Jun proto-onkogeninin prolin açısından zengin motifleriyle spesifik olarak ilişkilidir ve c-Jun'un up-stream aktivatörü olan mitojen ile aktive olan protein kinaz kinaz kinaz 1'in (MEKK1) aşırı ekspresyonunun yol açtığı c-Jun fosforilasyonu, c-Jun'un WWOX ile etkileşimini artırır. Ayrıca UV-C radyasyona maruz kalma, çoğunlukla sitoplazmada meydana gelen endojen WWOX-c-Jun komplekslerinin oluşumuyla da sonuçlanmaktadır. Bu bulgular, c-Jun transkripsiyon faktörü ve WWOX tümör baskılayıcı gen arasında işlevsel bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır (Gaudio ve ark., 2006; Yang ve Zhang; 2008).

2.9.3.2. p73

WWOX'un aşırı ekspresyonu, hücre büyümesini inhibe ederek apoptozu indükleyebilir. WWOX ilk WW domaininden p53 gen ailesinin bir üyesi olan p73 ile fiziksel olarak etkileşebilir. Src kinaz (protoonkogenik trozin kinaz grubu), WWOX'u ilk WW alanında bulunan Y33'ten fosforile eder ve WWOX'un Src aracılı fosforilasyonu, p73'e bağlanmasını sağlayarak güçlü bir kompleks oluşturur. (Salah ve ark., 2010; Chiang ve ark., 2013). Bu bağlanma, p73 β alt birimi ve Y33 fosforilasyon bölgesi ile sağlanmaktadır. WWOX ile bağlanan p73 stoplazmaya geçmesine ve burada lokalize olmasına yol açar. siRNA ile WWOX susturulduğunda ise daha fazla p73 çekirdeğe transloke olur. p73'ün Wwox'a bağlanması ile p73'ün sitoplazmik apoptotik aktivitesi artmaktadır. Ayrıca Wwox, p73'e bağlanan ve WW doamini içeren diğer proteinlerle p73'e bağlanmak için yarışarak p73'ün transkripsiyonel ve apoptotik aktivitesini değiştirebilir. Wwox, p73'ün Yap tarafından koaktivasyonunu inhibe eder. Wwox, p73 ile birlikte çekirdekte bulunduğu, Yap ile olan bağlantısı inhibe haldedir, ve bu da Wwox ifadesinin Yap'ın etkisinden daha üstün olduğunu gösterir. Son yıllarda, kaspaz ile parçalanmış p73 fragmanının mitokondriye lokalize olduğu ve TRAIL ile indüklenen apoptozu arttırdığı da gösterilmiştir (Salah ve ark., 2010).

Ayrıca, WWOX sitoplazmada p53'le birlikte lokalize olmakta ve WW alanını kullanarak p53'ün prolin açısından zengin bölgesine bağlanmaktadır. Hücrelerin hem p53 hem de WWOX ile birlikte geçici transferi, apoptozu sinerjik bir şekilde indükler. Öte yandan, p53 ile indüklenen apoptoz, WWOX ekspresyonu antisens mRNA tarafından bloke edildiğinde kaldırılır. Geçici olarak aktive olan JNK1, aynı zamanda, WWOX ile uyarılan apoptozu inhibe eden anti-apoptotik bir yanıtı indüklemektedir. Bu bulgularla, WWOX'un hem p53 hem de c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK1)'in

aktivasyonunu düzenleyerek apoptotik yanıtta dahil olduğu sonucuna varılabilir (Yang ve Zhang; 2008). Aynı zamanda stres uyarısı ile tirozin 33'den Src ile fosforile olan WWOX serin 46'dan fosforile olan p53'e bağlanır ve oluşan WWOX/p53 kompleksi mitokondri veya çekirdeğe transloke olarak apoptozu uyarır (Chiang ve ark., 2013).

WWOX, hücre zarı lipid sallarında bulunan mitojenle aktive olan protein kinaz 1 (MEK1) ile fiziksel olarak da etkileşime girer. Pro-apoptotik rezidüforobol miristat asetat (PMA), MEK/WWOX kompleksinin ayrışmasına neden olarak WWOX'u mitokondriye bırakır ve Jurkat T hücrelerinde (lenfoma hc) apoptoza neden olur. Böylece, WWOX, protein-protein etkileşimi ile onko-proteinlerin down-regülasyonu yoluyla tümörojenez baskılar (Li ve ark., 2014).

2.9.3.3. AP-2 γ

AP2 γ geni meme kanserinde amplifiye olmakta ve ekspresyonunun artması Ap2 γ kodlayan genin artmış ekspresyonu, meme kanserinde zayıf prognoz ile ilişkilidir. WWOX, ilk WW domaini ile göğüs karsinomlarında artan AP-2 γ 'nın PPPY motifine bağlanarak hem AP-2 γ 'nın çekirdekte sitoplazmaya geçişini uyarır hem de AP2- γ 'yı sitoplazmada tutarak onkojenik aktivitesini inhibe etmektedir. WWOX'un ilk WW domaininde tirozin 33'teki veya AP-2 γ daki prolin açısından zengin motifteki değişiklikler bu etkileşimi önemli ölçüde azaltmaktadır (Yang ve Zhang; 2008).

2.9.3.4. E2F-1

WWOX ayrıca PPxY motifleri aracılığıyla ErbB4 tirozin reseptör kinazı ile etkileşime girer ve bu proteini sitoplazmada tutarak transkripsiyonel aktivasyonunu baskılar. ErbB4, hücrel farklılaşma ve proliferasyonda önemli bir rol oynar (Salah ve ark., 2010). E2F-1 ekspresyonu, apoptozu indükleyen FHIT ve WWOX ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. E2F-1 aşırı sentezlenmesi, kısmen FHIT'nin transkripsiyonel

regülasyonu ve ilgili WWOX aktivasyonu yoluyla tümör supresyonunda rol oynar (Yang ve Zhang; 2008).

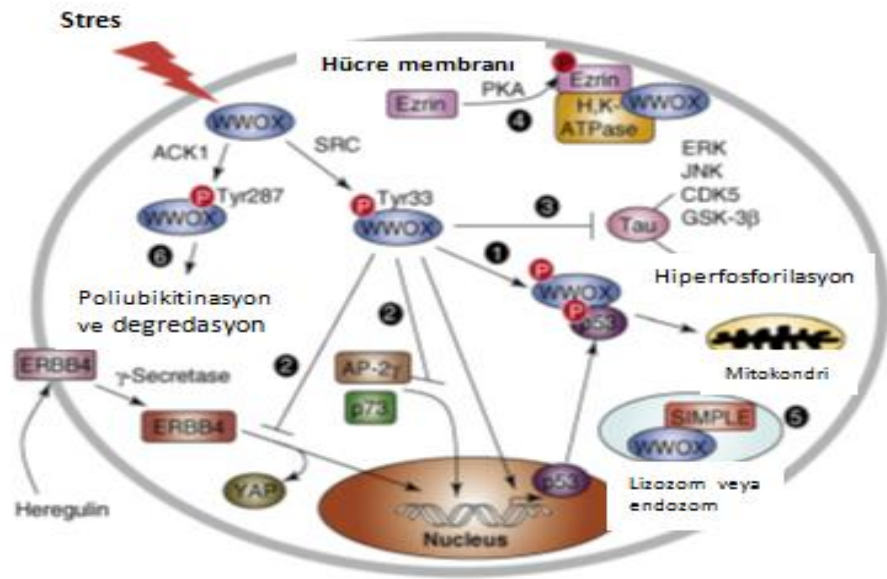
2.9.3.5. Ezrin

WWOX'un ilk WW domaini aracılığıyla fiziksel olarak etkileşim halinde olduğu bir diğer protein ise Ezrin'dir (Salah ve ark., 2010). Plazma membranı ve hücre iskeleti arasında bağlayıcı olarak görev yapan ve hücre göçünü yönlendiren itici güçler üreten ERM (ezrin / radixin /moesin) ailesinin bir üyesi olan Ezrin protein ailesi, band 4.1 süper ailesinin korunmuş üyeleridir (Vaheeri ve ark., 1997; Salah ve ark., 2010) ve bazı kanserlerin ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ezrin'in PKA aracılı fosforilasyonu, Wwox proteininin apikal yerleşimi için gereklidir. Fosfoezrin ve Wwox arasındaki etkileşim parietal hücre aktivasyonu sırasında proton pompası H, K-ATPazın apikal membrana alınmasını kolaylaştırarak apikal membranın dinlenme durumundan salgılama durumuna transformasyonuna aracılık eder. Ezrin-Wwox etkileşiminin bozulması, H, K-ATPaz'ın apikal zar içine translokasyonu ve yerleşimi ile bağlantılı apikal membran hücre iskeletinin yeniden modellenmesini engellemektedir. Ezrin, aktin hücre iskeletinin yeniden biçimlenmesini modüle eder ve tümör hücresi migrasyonu ve bazı tümörlerin ilerlemesinde rol oynar. Bu proteinin Wwox regülasyonu tümör progresyonunun önlenmesinde oldukça önemlidir (Salah ve ark., 2010).

2.9.3.6. Dvl Proteinleri

WWOX, tümör oluşumu ve gelişimiyle yakından ilgili olan Wnt/beta-Katenin yolağında yer alan Disheveled (Dvl) proteinlerine bağlanarak Dvl proteinlerinin nükleer importunu inhibe eder. Dvl proteinleri (Dvl-1,2 ve 3) Wnt reseptör aktivasyonunda rol oynamaktadır. Sitoplazma ve çekirdek arasında sürekli yer değiştiren Dvl proteinleri ve nükleer lokalizasyonları, Wnt/b-katenin yolağındaki işlevleri için oldukça önemlidir

(Boutelle ve ark., 2009). WWOX, Wnt-katenin yolağındaki transkripsiyonel aktiviteyi SDR domaini aracılığı ile inhibe ederek Wnt-katenin yolunda yer alan Dvl ailesi elemanları ile bağlanır. WWOX, Dvl-2'nin β -katenin bozunma kompleksiyle olan etkileşimini bozarak değil Dvl proteinlerini stoplazmik bölgede tutarak Wnt-katenin yolağını inhibe eder (Salah ve ark., 2010). Endojen WWOX ekspresyonunun inhibisyonu ile Wnt/beta-katenin yolağının transkripsiyonel aktivitesi birçok insan kanseri tipinin gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu bulgular, WWOX'un bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğünü ve tümör oluşumunun inhibisyonunda kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Boutelle ve ark., 2009).



Şekil 2.9: WWOX'un Hücre İçi Trafığı (Chang ve ark., 2007).

2.9.4. WWOX rRegülasyonunun Karsinogenez ve Metastaz İle İlişkisi

Ekzojen WWOX ekspresyonu kanser hücresi büyümesini baskılamakta ve apoptozu uyarmaktadır. DU145/LNCaP/PC-3'de (WWOX negatif prostat kanseri hücresi) WWOX'in aşırı ekspresyonu, kanser hücresi kolonilerinin sayısını önemli ölçüde azaltarak kaspaz bağımlı mekanizma yoluyla apoptoza yol açar (Li ve ark., 2014).

WWOX, metastaz sürecinde kritik bir role sahiptir. WWOX protein ekspresyonu, metastatik kanser dokularının neredeyse % 100'ünde kaybolur veya azalır. WWOX'un azalmış protein seviyesi, bazal zar yoluyla kanser hücrelerinin migrasyonunu artırır. Intergrin $\alpha 3$, hücreler ve ekstraselüler matriks (ECM) arasındaki bağlanmaya aracılık eden ve göç ve tümör invazyonunda hayati rol oynayan bir transmembran reseptördür. WWOX ekspresyonu kaybı membranöz intergrin $\alpha 3$ protein ekspresyonunu indükler ve kanser hücrelerinin ve ECM arasındaki etkileşimi modüle ederek kanser hücrelerinin bazal membran boyunca taşınmasına neden olur (Li ve ark., 2014).

2.9.5 WWOX ve DNA Hasarına Cevap

DNA tek ve çift zincir kırıkları gibi DNA hasarından sonra WWOX ifadesi artar. Ubiquitin E3 ligaz ITCH'ün, WWOX'un Lys-63'e bağlı ubikitlemesine fonksiyonel olarak aracılık etmesi stabilizasyonuna ve nükleer lokalizasyonuna neden olur. Çekirdekte lokalize olan WWOX, apoptoz ve DNA onarımı gibi DNA hasar yanıtına aracılık etmek için ATM ve p73 dahil olmak üzere bir dizi proteinle etkileşime girer. WWOX; H2AX, MDC1, CHK2 ve KAP1 gibi ATM substratlarının artan fosforilasyonuna yol açar ve ATM'yi etkinleştirir. Fiziksel etkileşme yoluyla ATM aktivasyonunu düzenleyerek DNA hasar cevabında ve DNA onarımında rol oynayan

WFOX'un ifade düzeyinin azalması veya kaybı, genomik kararsızlığa neden olabilen faktörler arasında yer almaktadır (Pospiech ve ark., 2018).

WFOX kaybına bağlı ATM işlevi engellenmesi ise DNA çift iplik kırıklarının birikmesine yol açar ve sonuç olarak genom daha az kararlı hale gelir. DNA hasarına bağlı WFOX artışı, apoptotik kaskad aktivasyon veya büyüme hızının azaltılmasıyla hasar görmüş hücrelerin sınırlanmasını kolaylaştırabilir. Örneğin, WFOX fiziksel olarak p73 ile fonksiyonel olarak etkileşime girerek apoptozu teşvik eder. WFOX, hücrel apoptozda aracılık eden bazı hücrelerde p53 ve Jnk1 ile etkileşime girebilir. Bu bulgular WFOX'un DNA hasar onarımında ve apoptozda merkezi bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır (Abu-Remaileh ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

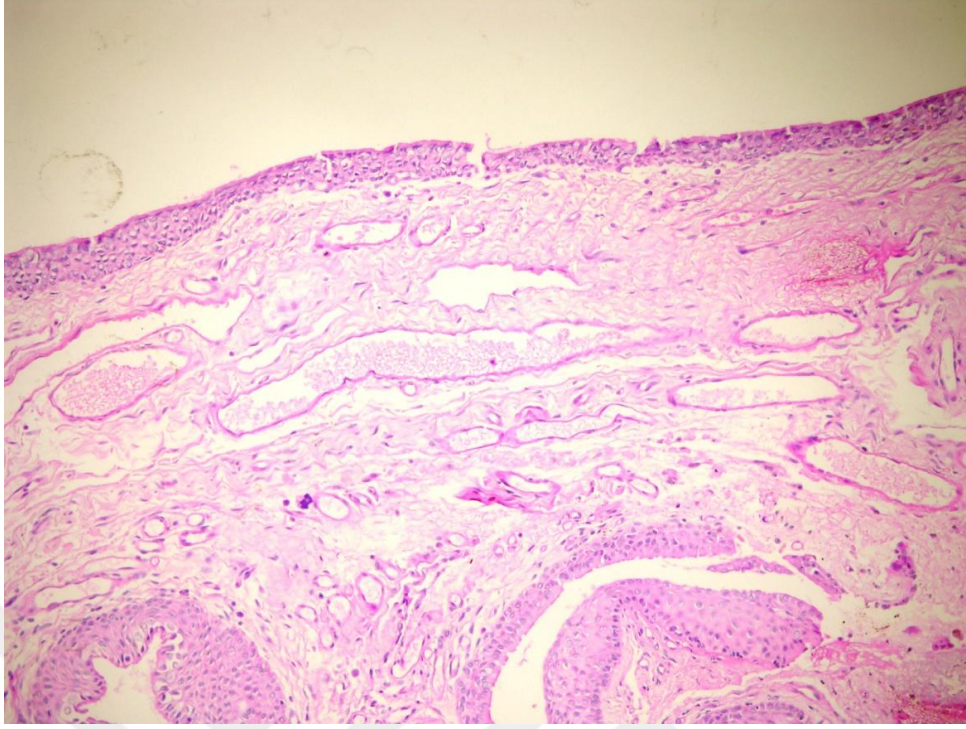
3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma Grupları

Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD'na başvuran ve pterjiyum tanısı alan 27 hasta (18 erkek, 9 kadın) dahil edilerek gerçekleştirildi. Çalışma gruplarının oluşturulmasında ameliyat sırasında alınan pterjiyum dokuları hasta grubu olarak; aynı hastaların aynı gözüne ait sağlıklı konjonktiva dokuları ise kontrol grubu olarak tanımlandı. Çalışma için gerekli izin Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 25.11.2014 tarihli toplantısında 14-KAEK-228 proje numarası ile alındı. Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca 2015/26 proje numarası ve TÜBİTAK 215S692 proje numarası ile desteklendi.

3.1.2. Dokuların Saklanması

Katılımcıların izni ve bilgisi dahilinde ameliyat sırasında alınan doku örneklerinin bir kısmı histopatolojik incelemeye gönderilerek pterjiyum tanısı teyit edildi (Resim 3.1). Kalan dokular ikiye ayrılarak sıvı azot içerisinde hızlı bir şekilde donduruldu. Birinci grup dokulardan cDNA elde edilerek WWOX genine ait ifade düzeyleri Gerçek-Zamanlı PZR ile tespit edildi. İkinci grup doku örnekleri ise protein izolasyonu yapılarak Western Blot analizinde kullanıldı. Dokular -80 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1 Pterijyum Dokusuna Ait Histopatolojik Görüntü (HE, X100).

Yüzeyde konjonktiva epiteli altta ödemli subepiteliyal mesafelerde konjesyone farklı çaplarda dilate vasküler yapılara ait kesitler izleniyor.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Blotlama sistemi (Biorad, 1704150, ABD)

Buzdolabı (Arçelik, 570465 MB, Türkiye)

Çalkalayıcı (İka, Almanya)

-20 °C Derin Dondurucu (Arçelik, 2052DY, Türkiye)

-80 °C Derin Dondurucu (Nuatre, NU-9483E, ABD)

Dikey Elektroforez Seti (Biorad, 1658030, ABD)

Distile Su Cihazı (Elga-option Q7, İngiltere)

Etüv (Memmert, Almanya)

Güç Kaynağı (Biorad, 1645070, ABD)

Hassas Terazı (Kern ABT, WB0750631, Almanya)

Homojenizatör (Next Advance Storme 24, BBY24M-CE, ABD)

Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica, F20520162, İtalya)

Mikrodalga fırın (Arçelik, MD554, Türkiye)

Otoklav (HMC, HV25, Almanya)

Otomatik pipetler (Gilson, Fransa)

pH Metre (Hanna Instruments, HI2020W, ABD)

Plate (Applied Biosystems, 4346907, İngiltere)

Plate yapıştırıcı (Applied Biosystems, 201405092, İngiltere)

Qubit 2.0 Fluormeter (Invitrogen by life teknologies, Avustralya)

Real-Time PZR (Appiled Biosystems, İngiltere)

Santrifüj (Hettich, D78532, Almanya)

Soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya)

PZR (Termal Döngü Cihazı (Techne, İngiltere)

Vorteks (Velp Scientifica, F20220176, İtalya)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Kit İçerikleri

B-merkaptoetanol (Merck, Almanya)

cDNA sentez kiti (GeneAll, Hyperscript, First strand synthesis kit Katalog no: 601-005, Kore)

Revers Transkriptaz Enzimi
 10X RTase Reaksiyon Solüsyonu
 0.1 M DTT
 10 mM dNTP karışımı
 RNase Engelleyici
 Oligo (dT)₂₀
 Random hegzamer (primer)
 Nükleaz içermeyen su

Etanol (Sigma-Aldrich Katalog No: E7023, ABD)

GAPDH-antikör (Cell Signaling Katalog No: 2118S, Hollanda)

NuPAGE LDS Örnek Solüsyonu (Thermo Katalog No: NP0008, ABD)

NuPAGE İndirgeyici Ajan (Thermo Katalog No: NP0004, ABD)

Marker (NZytech Katalog No: MB09002, Portekiz)

Poncu (Sigma-Aldrich, Katalog No: P7170-1L, ABD)

Proteaz inhibitör kokteyli (Santa Cruz Biotechnology Katalog No: SC-29130, ABD)

Qubit Protein Assay Kit (İnvitrogen Katalog No: Q33212, ABD)

Qubit ssDNA Assay Kit (İnvitrogen Katalog No: Q10212, ABD)

Qubit RNA HS-Assay Kit (İnvitrogen Katalog No: Q32852, ABD)

RNA izolasyon kiti (Thermo, Katalog No: 12183018A, ABD)

Lizis Solüsyonu

Yıkama Solüsyonu 1

Yıkama Solüsyonu 2

RNase içermeyen Su

RNaz Zap (Thermo Katalog No: AM9780, ABD)

Running Solüsyonu (ThermoFisher, NP0002, ABD)

Western Blot Breeze Kit (İnvitrogen, Kromojenik Immunodeteksiyon Sistem, Rabbit Primer Antikor Katalog No:WB7105)

Bloker/Solüsyon A

Bloker/Solüsyon B

Antikor Yıkama Solüsyonu (16X)

Kromojenik Substrat

Sekonder Antikor Solüsyonu

WWOX-antikor (Cell Signaling, Katalog No: 4045S, Hollanda)

WWOX Taqman primer-prob seti (Thermo, ABD)

3.1.5. Tampon ve Çözeltiler

3.1.5.1. RNA Eldesinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

LYS Solüsyonu: 400µL Lys

4µL B-merkaptotanol (Lys'nin %1'i olacak şekilde)

3.1.5.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Tamponları

20X MES Solüsyonu (Running Solüsyonu) 1X olarak hazırlandı.

3.1.5.3. Western Blot Tamponları

Blokkung Solüsyonu: Western Breeze kit içeğinde bulunan Solüsyon A: 2ml, Solüsyon B: 3ml, Distile su: 5ml olarak hazırlandı.

3.1.5.4. Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Taqman Problar

Tablo 3.1: Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Taqman Problar

Test	Marka	Katalog No
WWOX	Thermo	Hs03044790_m1
β -act	Thermo	Hs01060665_g1

3.2. YÖNTEM

Ameliyat sırasında alınan dokular iki parçaya ayrılarak -80°C 'de muhafaza edildi. Birinci grup doku parçaları RNA eldesi ve gen ifade analiz işlemleri için kullanıldı. Diğer grup ise protein izolasyonu yapılarak Western blot analizi için kullanıldı.

3.2.1. Dokudan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Thermo marka RNA izolasyon kiti kullanıldı. İzolasyon aşamaları aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

- -80°C 'de saklanan dokular RNAaz'lardan arındırılmış bir çalışma ortamında bistüri ile ufak parçalara ayrılarak her bir örnekten yaklaşık 20-25 mg kullanıldı. Çalışma buz üzerinde yapıldı.
- Parçalanmış dokuların üzerine 400 μl LYS buffer ve doku hacmi kadar çelik bilye eklenerek homojenizatörde 10.000 rpm'de 5 dk parçalandı. Tam parçalama sağlandıktan sonra bilyeler uzaklaştırıldı ve homojenizatör max. hızda 5 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst kısım alınarak buna eşit hacimde % 70'lik etanol ilave edildi. Elde edilen lizat vortekslenip mini spin kolona aktarıldı.
- 11.500 rpm'de 15 sn vortekslendi.
- Yıkama Solüsyonu I'den 700 μl eklenerek 11.500 rpm 'de 15 sn santrifüj edildi.
- Yıkama Solüsyonu II'den 500 μl eklenerek 11.500 rpm 'de 15 sn santrifüj edilerek bu basamak tekrarlandı.
- Tüpler bir kez de boş olarak 11.500 rpm'de 1-2 dk santrifüj edildi.
- Spinler temiz bir ependorf tüpe aktarıldı.

- 30 µl elution Solüsyonu eklenerek oda ısısında 1 dk bekleyip max. hızda 2 dk. Santrifüj edildi.

Elde edilen RNA'lar - 20°C'de saklandı.

3.2.2. RNA Miktar Ölçümü

RNA örneklerinin konsantrasyonları ölçümü için Qubit 2.0 cihazı ile RNA HS-Assay kit (Q32852) kullanılarak yapıldı.

3.2.3 cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan Gene All, Hyperscript, First strand synthesis kit (Kat No: 601-005) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Sentez iki aşamada gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. cDNA Sentezinde Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	Miktar (1X)
dH ₂ O	7 µl
dNTP	1 µl
Oligo dT primer	0,5 µl
Random heksamer	0,5 µl
RNA örneği	5 µl
Total hacim	14 µl

Bileşenler eklendikten sonra 65°C' de 5 dakika PZR cihazında inkübe edildi.

Daha sonra örnekler buz üzerine alınarak sentezin ikinci aşamasına geçildi.

Tablo 3.3. cDNA Sentezinde Kullanılan 2.Aşama Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	Miktar(1X)
10xReaksiyon Solüsyonu	2 µl
0.1 M DTT	2 µl
Enzim(Revers Transkriptaz 200 U/µl)	1 µl
RNaz Engelleyici	1 µl
Total hacim	6 µl

İkinci aşamada Tablo 3.3’de belirtilen bileşenler eklendikten sonra PZR cihazında 55°C’de 60 dakika, 95°C’de 5 dakika inkübe edildi. Örnekler -20 °C’de çalışma anına kadar bekletildi.

3.2.4. cDNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

Qubit 2.0 cihazında ile Qubit ssDNA Assay Kit (İnvitrogen, Q10212) kullanılarak cDNA miktarları ölçüldü. cDNA miktarı her bir reaksiyonda 60 ng olacak şekilde hesaplama yapılarak reaksiyona eklenecek cDNA miktarları her bir örnek için ayrı ayrı hesaplandı.

3.2.5. WWOX mRNA İfade Analizi

Pterjiyum ve normal konjonktiva dokularında WWOX gen ifade analizi Applied Biosystem StepOnePlus cihazında Taqman temelli Gerçek Zamanlı PZR metodu kullanılarak yapıldı.

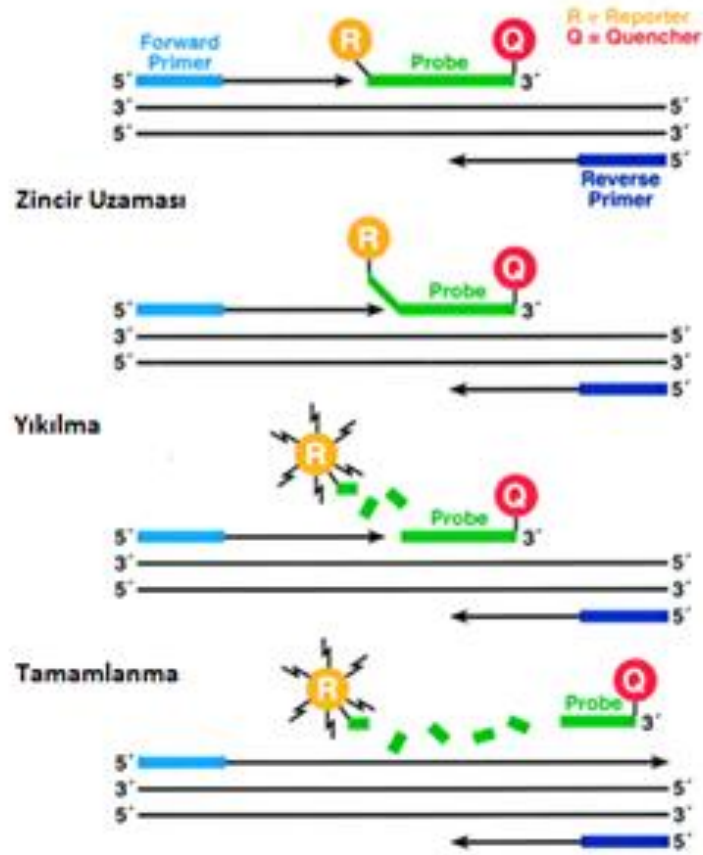
3.2.5.1. Gerçek Zamanlı PZR

Nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan Gerçek Zamanlı PZR, DNA miktarı ile orantılı olarak artan floresan sinyali ölçmeye dayanan bir tekniktir. Bu yöntemde DNA sarmalına bağlanarak floresan ışımaya yapan boylarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile amplifikasyon miktarı tespit edilir (Nolan ve ark., 2006).

TaqMan sistemi, çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer olan ve 5' ucunda fluorophore (6-karboksifloresin 6-FAM) ve 3' ucunda quencher (6-karboksitetrametil-rodamin TAMRA) ile floresan isaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmaya 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası ile engellenmektedir. Prob, çoğaltılma sırasında tek zincirli hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasına bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir

oluşmaya başlar. Probu bağli olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya ve her bir döngüde ürün arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder (Günel, 2007).

Polimerizasyon



Şekil 3.2: Taqman Siteminin Şematik Gösterimi (Yuan ve ark., 2000)

Çalışmada 5' ucundan FAM ile, 3' ucundan ise MGB (Minor Groove Binding) ile işaretli Taqman prob kullanıldı.

Tablo 3.3’de verilen bileşenler belirtilen miktarlarda eklenerek tepkime toplam hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 3.4: Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Tepkime Karışımının Miktarları

Bileşenler	Miktar (1X)
dH ₂ O	7 µl
Primer-Prob(WWOX için; Thermo, Hs03044790_m1 β-aktin için;Hs01060665_g1)	1µl
Gen ekspresyon Master Mix (Thermo-10297018)	10µl
cDNA	2µl
Total hacim	20 µl

WWOX geni ifade analizi için internal kontrol (housekeeping gen) olarak β-aktin, negatif kontrol olarak cDNA içermeyen PZR karışımı kullanıldı. Analiz 2 tekrarlı olarak yapıldı.

Tablo 3.5. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Döngü sayısı			Süre
1	Başlangıç	50°C	2 dk
	Denatürasyon	95°C	10dk
40	Yapışma	95°C	10sn
	Uzama	60°C	1 dk

3.2.6. WWOX Geni Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları Analizi

Çıkan sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ methodu ile hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$\Delta Ct(\text{pterjiyum dokusu}) = \text{WWOX Geni (Ct ortalama)} - \text{Aktin Geni (Ct ortalama)}$$

$$\Delta Ct(\text{Kontrol dokusu}) = \text{WWOX Geni (Ct ortalama)} - \text{Aktin Geni (Ct ortalama)}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct(\text{pterjiyum dokusu}) - \Delta Ct(\text{Kontrol dokusu})} \quad (\text{Schmittgen ve Livak,}$$

2008; Rao ve ark., 2013).

3.2.7. Protein İzolasyonu

Dokulardan protein izolasyonu için GeneAll ProteinEx Animal cell/tissue (Cat. No:701-001) kiti kullanıldı.

Dokular bistüri ile ufak parçalara ayrılarak her bir örnekten yaklaşık 20-25mg kullanıldı. 250 µl ProteinEx solüsyonu, 2,5 µl proteaz inhibitör kokteyli ve doku hacmi kadar çelik bilye eklenerek homojenizatör cihazına yerleştirildi. Tüm dokular parçalanıncaya kadar cihazda bekletildi. İşlem sonunda bilyeler uzaklaştırıldı ve örnekler soğutmalı santrifüjde 16.000xg, 4 °C de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatan yeni bir ependorf tüpe alınarak izolasyon işlemi tamamlandı. İzole edilen protein örnekleri -80⁰C'de muhafaza edildi.

3.2.8. Protein Ölçümü

Protein konsantrasyonu, Qubit Protein Assay Kit (invitrogen Q33212, ABD) yardımı ile Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı (Life Technologies PN Q32866, ABD) ile saptandı.

3.2.9. WWOX Geni Protein Analizi

Western blot; hazırlanan örneklerin; SDS-poliakrilamid jel elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde yürütülerek, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik metotlarla gösterilmesi aşamalarından oluşur. Elektroforez işlemi tamamlanan örnekler, bir destek ortamına (PVDF/Nitroselüloz) elektro-blotting yöntemi ile aktarılır. Blotlama işlemini takiben membranla antikorlar arasındaki non-spesifik bağlanmaları en aza indirebilmek için bloklama yapılarak kullanılacak primer antikorların sadece hedef proteinlere bağlanmaları sağlanır.

Bloklamadan sonra ilgilenilen proteine özgü primer antikor ile membran inkübe edilir. Bağlanmayan primer antikor yıkanarak uzaklaştırılır ve konjuge enzim ya da

boya içeren sekonder antikor ile membran inkübe edilerek, primer antikora bağlı sekonder antikor kompleksi oluşturulur.

Membran üzerinde özgül bağlamaları tespit etmek için sekonder antikora konjuge enzimle reaksiyona girerek sinyal oluşturacak substratlar kullanılmaktadır.

- 1- Kromojenik Tanımlama
- 2- Kemilüminesan Tanımlama
- 3- Floresan Tanımlama (Karaaslan, 2008).



Şekil 3.3: Western Blot Yönteminin Çalışma Prensibi

3.2.9.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Ölçüm sonrası elde edilen protein miktar değerine ve transfer sonrası kullanılacak deteksiyon (Kemilüminesans/Kromojenik) yöntemine göre jele yüklenecek protein miktarı belirlenir. Kromojenik deteksiyon yöntemi kullanılacak ise jele en az 50 ug, kemilüminesans deteksiyon yönteminde ise en az 30 ug protein yüklenmesi gerekir.

Deteksiyon yöntemine bağlı olarak Jele yüklenmesi gereken minimum miktar ölçülen protein miktarına bölünür = A değeri (örnek miktarı)

A değeri 6,5 ul değerine bölünür = B değeri (NuPAGE İndirgeyici Ajan (10X) miktarı)

B değeri 2,5 ile çarpılır = C değeri (NuPAGE LDS Örnek Solüsyonu (4X) miktarı)

Hazırlanan örnekler 70°C'de 10 dk boyunca denatüre edildi. Denatüre edilen örnekler 2 dk buz üzerine alınarak soğuması sağlandı.

Tablo 3.6. Protein Örneklerinin Hazırlanmasında Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Reaktif	Miktar
Örnek	A değeri
NuPAGE İndirgeyici Ajan	B değeri (A değeri/6,5)
NuPAGE LDS Örnek Solüsyonu	C değeri (B değeriX2,5)
Deiyonize su	X

3.2.9.2 SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Yürütme solüsyonu olarak kullanılan 20xMES Running Solüsyonundan (ThermoFisher, NP0002) 25 ml bir mezüre alınarak üzerine 475 ml distile su eklenerek 1X MES Solüsyonu hazırlandı.

Hazırlanan running solüsyonu ile ilk önce üst solüsyon odasına jel, kuyucuklarının üzerini 0,5 cm geçene kadar dolduruldu. Kalan buffer alt solüsyon odasına ilave edildi.

Jel kasetindeki ilk kuyucuğa 8µl marker (NZY Colour Protein Marker II) ve kalan kuyuculara hazırlanan 50 µl (total protein miktarı eşitlendikten sonra 50 µl protein içerecek şekilde hesaplanmıştır.) protein örneği % 4-12'lik Bis-Tris gradient jele

(İnvitrogen. NP0321Box, ABD) yüklendi. Örnekler 120V'da 50 dk yürütüldü. Yürütme işlemi sonunda jel, içerisinde distile su bulunan bir kaba alındı.

3.2.9.3 Blotlama

Blotlama işlemi için Biorad transblotter yarı-kuru Blotlama Sistemi kullanıldı. Jel ve aktarım yapılacak membran (Nitroselüloz) üst üste konularak filtre kağıtları ve blotmala süngerleri arasında yerleştirildi. Sistem güç kaynağına bağlanarak 10 dk'da blotlama gerçekleştirildi.

Membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alındı.

Transfer işleminin başarılı olup olmadığını anlayabilmek için membran Ponceu ile boyandı. Proteinler görüldükten sonra membran ponceudan yıkayarak uzaklaştırıldı.

Bu aşamadan sonra Western Breeze kiti kullanıldı (İnvitrogen, Chromogenic Immunodetection System, Rabbit Primary Antibody Cat:WB7105).

Bloklama işlemi için; Solüsyon A: 2ml, Solüsyon B: 3ml, Distile su: 5ml olarak eklendi ve yavaş çalkalayıcıda ağzı kapalı bir şekilde 1 saat bekletildi. Membranlar 20 ml distile su ile 2x5 dk yıkandı.

Yıkama işlemi tamamlanan membranlar 1/500 oranında sulandırılan WWOX primer antikor ve GAPDH primer antikor ilave edilerek bir gece çalkalayıcıda bekletildi.

Membranlar 3x5 dk Antikor Yıkama Solüsyonu ve 2x5 dk distile su ile çalkalayıcıda yıkandıktan sonra üzerine 10 ml AP konjuge sekonder antikor eklenerek 1 saat yavaş çalkalayıcıda bekletildi.

Daha sonra membranların yıkama işlemi 3x5 dk 20 ml Antikor yıkama solüsyonu ile çalkalayıcıda, 2x2 dk 20 ml distile su ile hızlı çalkalayıcıda tamamlandı.

5 ml kromojenik substrat (İnvitrogen, ABD) eklenerek yavaş çalkalayıcıda 20 dk inkübe edildi. Bantlar görüntülenebilir hale geldikten sonra reaksiyonu durdurmak için 2X2 dk 10 ml distile su ile yıkama yapıldı. Bant görüntüleri kamera yardımı ile alınıp JPEG formatında bilgisayar ortamına aktarıldı ve ImageJ analiz programı yardımı ile bant kalınlıklarındaki kat artışı oranları hesaplandı.

3.2.10. Verilerin İstatistiksel Analizi

Pterijyum dokusu ve normal dokulardaki WWOX mRNA ifadesi ve western blot yöntemi ile saptanan protein miktarlarının istatistiksel analizi için SPSS 18 programı kullanıldı. SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programında, Independent Samples T Test kullanılarak elde edilen p değerlerine göre değerlendirme yapıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kabul edilmiş olup, $p \leq 0,05$ ise anlamlı, $p > 0,05$ ise anlamlı farklılık olmadığı yönünde değerlendirme yapıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışma; 2015-2017 yılları arasında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Polikliniğine başvurarak pterijyum tanısı alan 27 hasta ve aynı hastaların aynı gözüne ait sağlıklı konjonktiva dokusu alınarak Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Çalışma grubu yaş aralığı 43-78 (ortalama $58\pm 8,43$) olan 18 erkek 9 kadından oluştu.

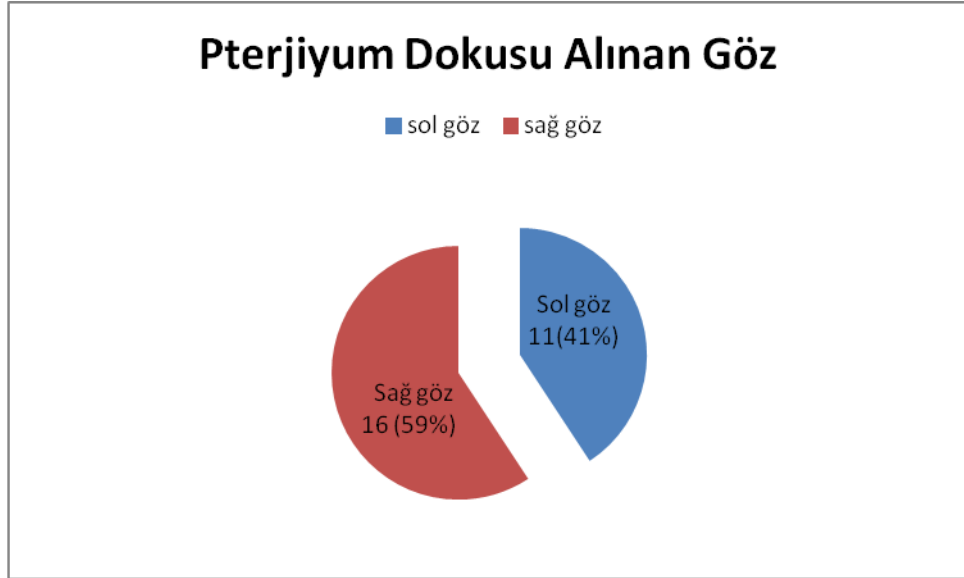
Çalışmaya dahil edilen pterijyum tanısı alan hasta gruplarına ait demografik veriler tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Pterijyum Hasta Gruplarına Ait Demografik Veriler

	Pterijyum n=27
Yaş	$58\pm 8,43$
Cinsiyet	18 E/9 K
Sağ/sol göz	16sağ göz/11 sol göz



Şekil 4.1: Çalışmaya Dahil Edilen Hastaların Cinsiyet Dağılımı

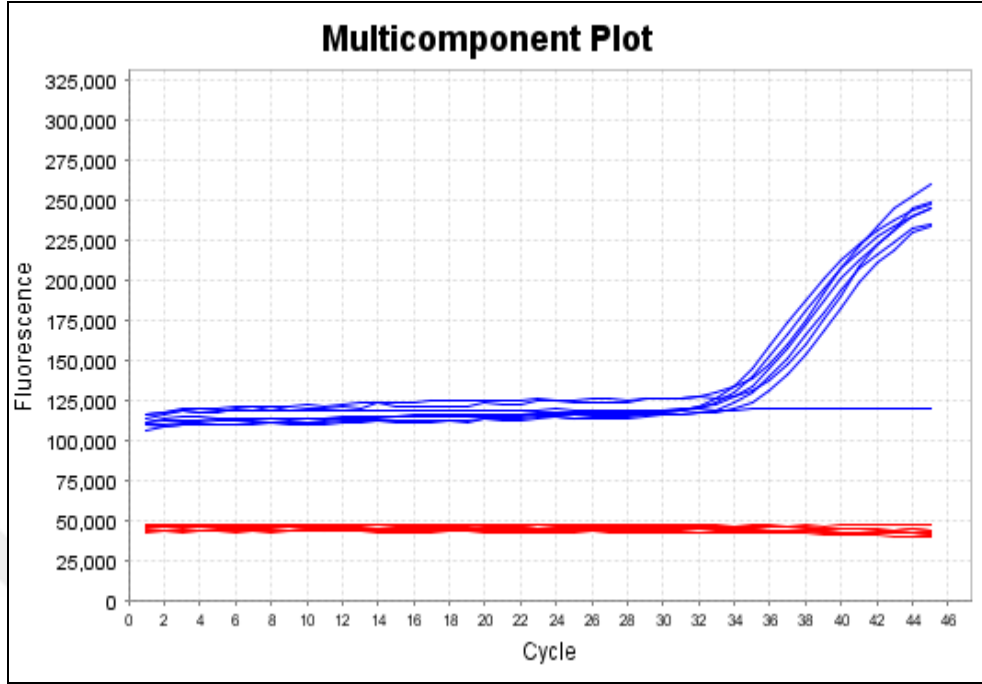


Şekil 4.2. Çalışmada Kullanılan Pterjiyum ve Normal Konjonktiva Dokularının Alındığı Göz

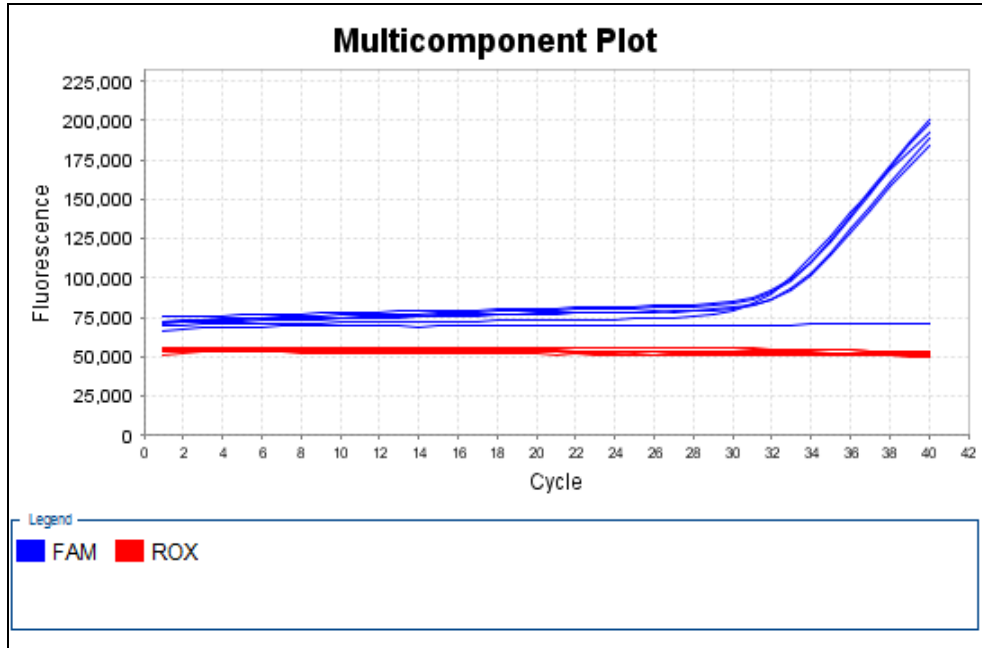
4.1. WWOX mRNA İfade Analizi

Toplam 27 Pterjiyum ve sağlıklı konjonktiva doku örneklerinden izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılarak Applied Biosystem StepOnePlus cihazında Taqman temelli Gerçek Zamanlı PZR analizi yapıldı. Analiz için referans gen olarak β -aktin kullanıldı. WWOX ve β -aktin genlerinin Ct (Cycle Threshold) değerleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerini hesaplamak için kullanıldı.

Elde edilen değerlerin analizi 0,9 – 1,1 aralığına göre yapıldı. 0,9'dan düşük olan değerlerde normal dokuya oranla pterjiyum dokusunda WWOX geninin ifade düzeyinin azaldığı, 0,9–1,1 aralığında ise normal dokuya göre değişmediği ve 1,1 değerinden yüksek değerlerde ise normal dokuya oranla bir artış olduğu kabul edildi (Schmittgen ve Livak, 2008).



Şekil 4.3. Pterijum Dokusunda WWOX Genine Ait Gerçek Zamanlı PZR Görüntüsü



Şekil 4.4. β -Aktin Genine Ait Gerçek Zamanlı PZR Görüntüsü

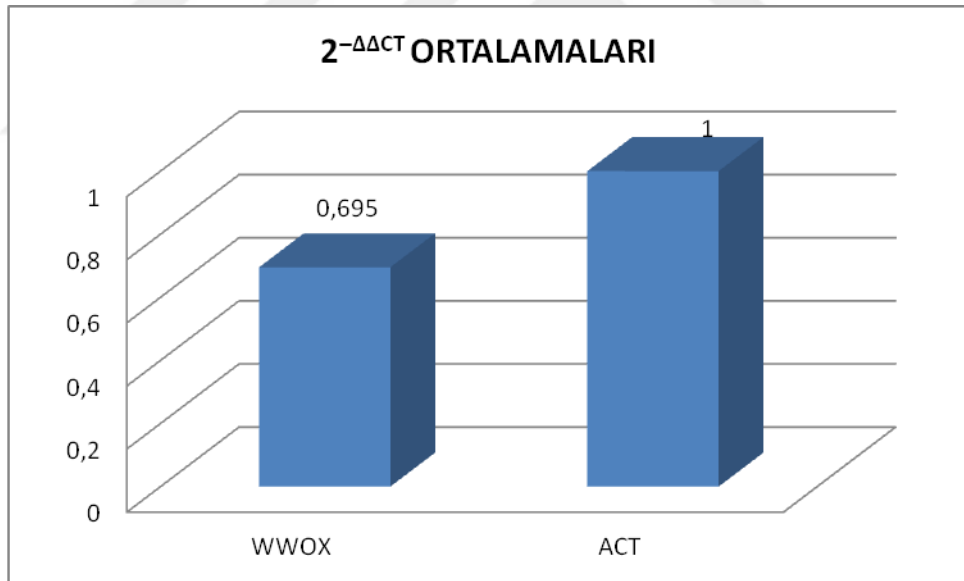
Tablo 4.2: Pterjiyum ve Normal Dokulara Ait WWOX ve Referans Gen (β -Aktin) Ct Değerleri

HASTA NO	Ct WWOX PTERJİYUM	Ct β -Aktin PTERJİYUM	Ct WWOX NORMAL	Ct β -Aktin NORMAL	2- $\Delta\Delta$ CT
1	30,02	22,9	28,28	20,3	1,815
2	31,67	22,14	28,98	20,73	0,411
3	28,07	21,78	36	28,86	1,802
4	33,88	28,76	27,69	23,65	0,473
5	30,11	22,4	34,21	25,8	1,624
6	29,22	19,77	28,88	20,65	0,432
7	27,74	18,78	29,26	20,31	0,993
9	30,38	21,15	30,68	22,04	0,664
11	28,6	19,98	29,47	25,26	0,047
12	27,12	18,87	28,44	19,38	1,753
13	32,71	24,95	28,82	21,64	0,668
14	36,79	27,55	35,9	27,65	0,503
15	31,06	23,2	30,99	23,83	0,615
16	34,21	25,68	34,02	26,82	0,397
17	30,42	21,72	30,39	22,01	0,801
18	31,19	22,81	30,84	22,28	1,132
19	35,57	25,35	28,95	24,45	0,018
20	31,49	24,44	32,68	26,11	0,716
21	37,6	31	31,6	29,1	0,060
22	34,2	26,2	37,9	29,6	1,231
23	39,1	29,6	35,4	31,7	0,018
24	36,2	28,1	35,4	29,6	0,200
26	34,5	29	33,6	30,7	0,160
28	34,11	31,2	35	31,2	1,853
29	37,6	31,3	33,8	30,7	0,110
30	34,8	29,6	32,9	30,1	0,190
31	36,1	30,8	32,4	30,7	0,080

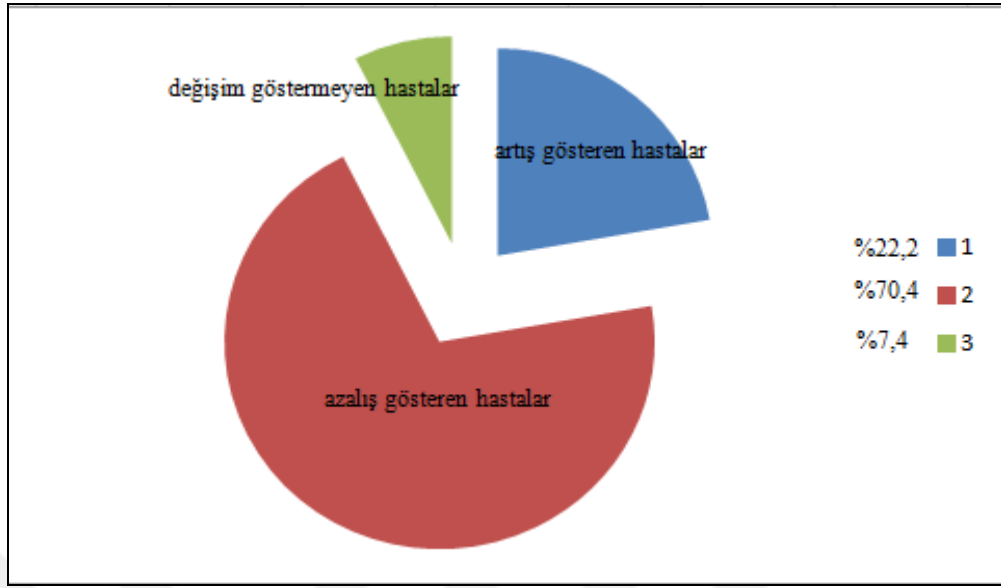
Tablo 4.3. WWOX ve β -Aktin Genine Ait Ct, Δ Ct, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ve p Değerleri

	WWOX Ct(Ort±Ss)	β -Aktin Ct(Ort±Ss)	Δ Ct (Ort±Ss)	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	p
Pterjiyum Dokusu	32,75±3,34	25,14±4,06	7,60±1,73	1,37	0,695	<u>0,013</u>
Normal Konjonktiva Dokusu	31,94±2,89	25,74±4,07	6,19±2,40	0	1	

Gerçek Zamanlı PZR analiz sonuçlarına göre pterjiyum dokusunda ve normal konjonktiva dokularına göre WWOX gen ifade düzeyindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,013$) (Tablo 4.3).

**Şekil 4.5.** WWOX ve β -Aktin Genine Ait Ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değerleri

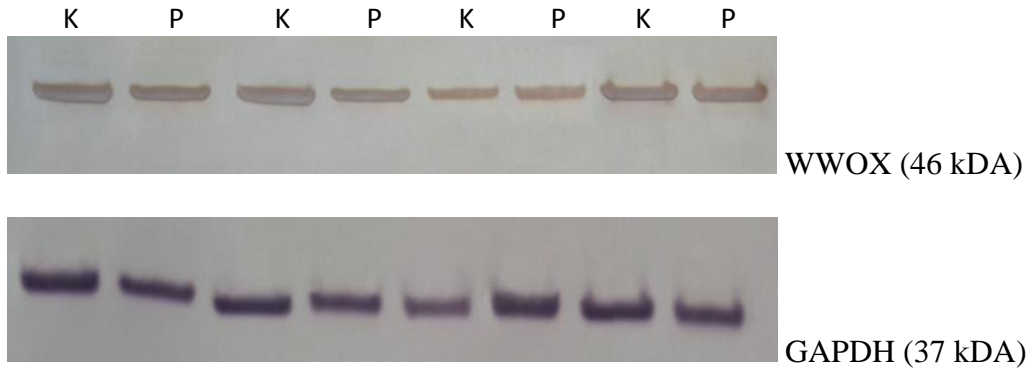
Ayrıca çalışma sonuçlarımıza göre WWOX gen ifade düzeyi 27 hastanın 6'sına ait (%22,2) pterjiyum dokusunda bir artış gösterirken, 19'unda (%70,4) azalma ve 2'sine (% 7,4) ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.6: $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerlerine Göre WWOX Gen İfade Düzeyindeki Değişimler

4.2. Western Blot Analiz Sonuçları

Pterjiyum dokusunda WWOX ve GAPDH antikorları ile yapılan analiz görüntüleri şekil 4.6'de gösterilmiştir.



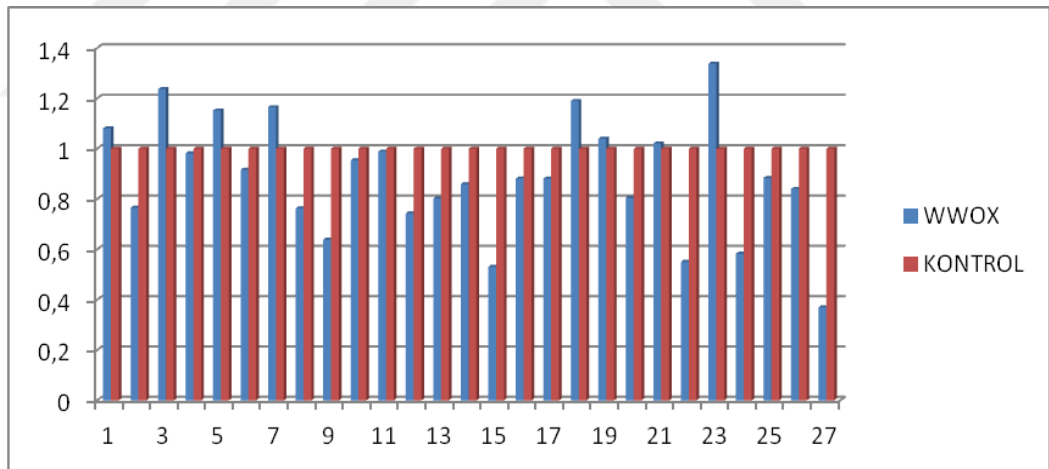
Şekil 4.7. Pterjiyum ve Kontrol Dokusuna Ait Membran Görüntüsü K:kontrol, P: pterjiyum

Pterjiyum dokusunda WWOX protein düzeyi ortalamaları $0,802 \pm 0,17$ iken kontrol grubunda ise $0,963 \pm 0,33$ olarak hesaplandı.

Bu sonuçlara göre; 5 pterjiyum dokusunda protein miktarı açısından artış, 15 dokuda azalma ve 7 dokuda ise herhangi bir değişim saptanmadı. İstatistiksel olarak bu azalmanın anlamlı olduğu belirlendi ($p= 0,022$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: WWOX ve GAPDH Proteinine Ait p Değeri

	WWOX/GAPDH (Ort±Ss)	WWOX artış azalış oranı (Ort±Ss)	p
Pterjiyum Dokusu	0,80± 0,17	0,89±0,23	<u>0,022</u>
Normal Konjonktiva Dokusu	0,96±0,33	1	



Şekil 4.8. Pterjiyum ve Normal Dokularda WWOX Proteinine Ait Artış Azalış Oranları

5. TARTIŞMA

Pterjiyum, konjonktivanın kornea üzerine doğru limbus boyunca kanat şeklinde büyüme gösterdiği invaziv fibrovasküler bir doku olarak tanımlanmaktadır. Güneş ışığının ultraviyole (UV) radyasyonu pterjiyum gelişiminde önemli bir çevresel faktördür. Pterjiyum elastik dejenerasyon ile dejeneratif bir lezyon olarak kabul edilmesine rağmen günümüzde yapılan çalışmalar ışığında; normal dokuyu istila etmesi, rezeksiyon sonrası yüksek nüks oranları ve sekonder premalign lezyonlarla birlikte olması gibi birçok tümör benzeri özellik göstermesi, pterjiyuma premalign doku olma özelliği kazandırmaktadır. Spandidos ve ark. pterjiyum olgularının % 60'ının tümör ve premalign hücrelerde yaygın olarak görülen genetik değişikliklerle uyum gösterdiğini bulmuşlardır. Yapılan birçok çalışmada pterjiyum patogenezinin p53 gen mutasyonu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Böylece pterjiyumun, dejeneratif disfonksiyondan ziyade daha çok bir tümör gibi kontrolsüz hücre proliferasyonun sonucu olarak ortaya çıktığı ve neoplasi benzeri bir büyüme bozukluğu olduğu kabul edilebilir (Spandidos ve ark., 1997; Weinstein ve ark., 2002; Huang ve ark., 2015). Pterjiyumun hem sınırlı lokal istilası ve metastaz göstermeyen lezyon olması hem de hücrelerinin bir tümörün genetik özelliklerini göstermesi pterjiyumun benign neoplastik bir lezyon olabileceği yönündeki düşünceleri kuvvetlendirmektedir (Weinstein ve ark., 2002).

Liang ve ark, 33 pterjiyum dokusunda yaptıkları çalışma sonuçlarına göre; proliferasyon belirteci olan PCNA ve Ki67'nin yanı sıra anti apoptotik özellikte olan bcl-2 ifadesinin anlamlı düzeyde artması pterjiyum patogenezinde hem hücre proliferasyonunun hem de apoptozun önemli bir yeri olduğunu göstermektedir (Liang ve ark., 2011).

16. kromozom üzerinde bulunan FRA16D bölgesi insan genomunda en yaygın kırılğan ikinci bölge olup bu bölgede sıklıkla pankreas, prostat, meme, over, özofagus, ve akciğer kanserlerinde homozigotik delesyonlar ve heterozigotluk kaybı olduğu gösterilmiştir (Wistuba ve ark., 2000). FRA16D bölgesinde yerleşik WW alanı içeren bir oksidoredüktaz olan WWOX bir tümör baskılayıcı genidir ve meme, mide, prostat, küçük hücre dışı akciğer kanseri ve Wilm's tümörleri gibi birçok kanser tipinde ekspresyonunun değiştiği gözlemlenmiştir. WWOX'un apoptoz ve hücre çoğalması gibi birçok temel hücre sel süreçteki etkisi yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla doğrulanmıştır. WWOX proteini, bazı transkripsiyon faktörleri ile etkileşebildiği için doku morfojeninde ve hücre farklılaşmasında etkili genlerin ekspresyonunun kontrol edilmesinde de rol oynar (Nowakowska ve ark., 2014).

Frajil bölgede bulunan WWOX'un kaybı meme kanseri (% 81.8), özofagal squamoz hücre karsinoması (SCC) (% 38.9), küçük hücre dışı akciğer kanseri (% 37), pankreatik adenokarsinoma (% 26.7) ve gastrik karsinoma (% 30.8) gibi çok sayıda insan kanserleriyle ilişkilendirilmiştir (Lo ve ark., 2015; Schrock ve ark., 2015).

Son yıllardaki araştırmalar, normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde WWOX protein düzeyinin azaldığını hatta kaybolduğunu ve bu bulgunun bazı klinik ve patolojik parametrelerle ilişkili olabileceğini göstermiştir. Çeşitli tümör tiplerinde bugüne kadar WWOX genine ait toplam 44 yeni somatik mutasyon saptanmıştır; bunlardan 5 tanesi anlamsız mutasyon (baş ve boyun kanserlerinde 3, akciğer kanserlerinde 2), 3 tanesi çerçeve kayması mutasyonu ve 36 tanesi ise yanlış anlamlı mutasyon olarak belirlenmiştir (Aldaz ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalarla WWOX'un apoptozu uyararak ve genom bütünlüğünün korunmasını destekleyerek tümör baskılayıcı etkisini gösterdiği tespit edilmiştir.

WFOX, esas olarak ilk WW alanı aracılığı ile tümör baskılayıcı aktivitelere aracılık etmek için p53 ailesi üyeleri, DNA hasar kontrol noktası proteinleri ve metabolik ve stres proteinleri ile etkileşime girer (Abdeen ve ark., 2018).

Literatürde WFOX'un tümör baskılayıcı aktivitesini destekleyen çok sayıda çalışma mevcuttur. Nowakowska ve ark.,'nın, nöroblastik tümör dokusunda yaptıkları çalışma sonuçları, WFOX'un apoptoz ve hücre döngüsündeki rolünü destekler niteliktedir. Bu ilişki apoptotik proteinlerle pozitif, hücre siklusu proteinleri ile negatif yöndedir (Nowakowska ve ark., 2014).

Pluciennik ve ark., Wilm's tümör dokusunda yaptıkları çalışmada WFOX ekspresyonu ile apoptoz proteinleri (BCL2, BCL2/BAX oranı), sinyal iletim proteinleri (EGFR, ERBB4), ve TP73 ile pozitif, hücre döngüsü proteinleri (siklinler) ile negatif yönde ilişki tespit etmişlerdir (Pluciennik ve ark., 2012). Yang ve ark. nazofarenks karsinom (NPC) dokusunda bu sonuçları destekler nitelikte verilere ulaşmışlardır. Bu çalışmada, WFOX ifadesinin, tümörlü olmayan dokulardakine kıyasla anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Yine bu çalışmada WFOX ifadesinin azaldığı dokularda WFOX geninde metilasyon saptanması, promotor metilasyonunun ifade düzeyini etkileyebileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar, WFOX'un, NPC ve Wilm's tümörleri gibi bir çok kanser türünün gelişmesine katkıda bulunabileceği ve önemli bir prognostik belirteç olabileceğini desteklemektedir (Pluciennik ve ark., 2012; Yang ve ark., 2014).

Buna paralel bir çalışma ise Qin ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada prostat kanserinde, WFOX mRNA ifade ve protein düzeyinin prostat kanseri kaynaklı LNCaP, DU145 ve PC-3 hücrelerinde kanserli olmayanlara kıyasla önemli ölçüde düştüğü bulunmuştur. Aynı zamanda, primer prostat kanserlerinin % 84'ünde WFOX

ifadesinin azaldığı bildirilmiştir. Bu araştırmacılar da, prostat kanseri kaynaklı hücrelerdeki WWOX ekspresyonunun azalmasının, WWOX düzenleyici bölgedeki DNA hipermetilasyonuna bağlı olduğunu tespit etmişlerdir (Qin ve ark., 2007; Yang ve Zhang; 2008).

Nunez ve ark.'nın meme kanserinde WWOX protein düzeyi ile klinik-patolojik özellikler arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri bir çalışmada; tüm normal meme epitel örneklerinde WWOX protein düzeyinin yüksek miktarda olduğunu, buna karşın invaziv tümörlerin % 34'ünde (69/203 olgu) WWOX ekspresyonuna bağlı protein düzeyinin tamamen kaybolduğunu ve % 26'sında (52/203) ise azaldığını bildirmişlerdir. Bu veriler, WWOX geninin ekspresyonunun meme tümörlerinin malignite sonuç ve derecesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Nunez ve ark., 2005). Chang ve ark. ise meme kanserinde WWOX'un, hücre metastazını ve JAK2/STAT3 yolağı aracılığı ile hücre çoğalmasını baskıladığı sonucuna ulaşmışlardır (Chang ve ark., 2018). Benzer şekilde, Pospiech ve ark' da çalışmalarında WWOX ifade düzeyinin azalmasını meme kanserinde kötü prognoz ve artan oranda mortalite ile ilişkilendirmeleri; WWOX'un meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı özelliğe sahip olduğu fikrini desteklemektedir (Pospiech ve ark., 2018).

Oral skuamöz hücreli karsinomalarda (OSSC), Pimenta ve ark. tümörlerin % 50'sinde WWOX geninde değişiklik tespit etmeleri oral kanser karsinogenezinde WWOX genindeki değişimin etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Özofageal skuamöz hücreli karsinomalarda böyle bir genin potansiyel rolünü aydınlatmak için, Kuroki ve ark., 36 tümör dokusu incelemişler ve 14 tümörde (% 39) WWOX lokusunda heterozigotluk kaybı, bir tümörde tümöre spesifik bir yanlış anlamlı mutasyona ilaveten diğer allelde de kayıp ve 2 tümörde ise ekzon 6-8'in eksik olduğu anormal WWOX gen

transkriptleri ve bir tümörde de transkriptin tamamen eksik olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, WWOX geni değişiminin ve inaktivasyonunun, özofagus skuamöz hücreli tümörlerin karsinogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir (Kuroki ve ark., 2002; Pimenta ve ark., 2006; Yang ve Zhang; 2008). OSSC'lerde görülen bu değişiklikler hematopoietik maligniteler ve pankreas kanserlerinde de görülmüştür. Özellikle, WWOX transkriptleri, primer vakaların % 51'inde ve lösemik hücre dizilerinin % 55'inde eksik veya anormaldir. Buna ek olarak, Kuroki ve ark., incelenen tüm pankreatik kanser hücre hatlarında ve altı primer tümör dokusunda WWOX'un hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır (Yang ve Zhang; 2008).

WWOX'un tümör baskılayıcı aktivitesini çeşitli mekanizmalarla sağladığı bilinmektedir. Örneğin meme kanserindeki tümör baskılayıcı etkisini apoptozu uyararak değil hücre proliferasyonunu inhibe ederek göstermektedir. Ayrıca yumurtalık kanserinde ise tümörojiteyi baskılayabilmek için integrin aktivitesi ve tümör hücrelerinin fibronektine yapışmasını engellemektedir. Lin ve ark, prostat kanserinde WWOX'un etki mekanizmasını açıklayabilmek için yaptıkları çalışmada; WWOX'un hem mRNA ifadesi hem de protein düzeyinde prostat kanseri dokusunda bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışma sonuçları; WWOX'un, prostat kanseri ilerlemesini baskılayabilmek için hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişte kontrol noktasında etkili olan siklin D1'in ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir (Lin ve ark., 2015).

Cui ve ark., 38 primer lösemi hastası ve 10 lösemi hücre hattında yaptıkları çalışmada lösemide WWOX ifadesinin anlamlı düzeyde azaldığını, ve WWOX'un tümör baskılayıcı etkisini hem mitokodriden sitokrom-c salınımını uyararak hem de kaspaz-9

ve kaspaz-3'ü aktive ederek gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar WWOX'un lösemik hücrelerde tümör baskılayıcı bir etkisi olabileceğini ve bunu da mitokondriyel yolak aracılığı ile apoptozu uyarıp hücre proliferasyonunu baskılayarak gösterdiğini ortaya koymuştur (Cui ve ark., 2013).

Winardi ve ark., bir çeşit beyin tümörü olan 38 astrositom dokusunda yaptıkları çalışmada; normal dokuya oranla 19 dokuda WWOX protein düzeyinde yüksek oranda, 14 dokuda orta düzeyde 5 dokuda ise hafif düzeyde bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. WWOX düzeyindeki bu azalmanın hastaların yaşı, tümörün yerleşimi ve semptomların şiddeti ile ilişkili olduğu görülürken bu değişikliğin hastalığın aşaması ile bir uyum göstermediği görülmüştür. Bu sonuçlar WWOX'un astrositom patogenezinde erken dönemde etkili olabileceğini göstermiştir (Winardi ve ark., 2013).

Ekizoğlu ve ark, 80 baş ve boyun skuamoz hücre karsinomasında kontrollere oranla 61 dokuda (% 76,3) WWOX ifadesinin anlamlı düzeyde azaldığını, bu ifade değişiminin metilasyona bağlı olabileceğini ve bu karsinomda WWOX inaktivasyonunun etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Ekizoğlu ve ark., 2015).

Park ve ark., hepatoselüler karsinoma (HCC) hücre hattında yaptıkları çalışmada; WWOX ifade düzeyinde % 60 oranında bir azalma olduğunu ve bu durumun ekzon 6-8'in delesyonu sonucu oluşan anormal WWOX ürünleri ile uyum gösterdiğini tespit etmişlerdir. 18 hücre hattının 13'ün normal karaciğer dokusuna oranla WWOX protein seviyesinin azalması HCC'de WWOX geninin anormal formlarının bulunduğunu ve WWOX'un HCC karsinogenezinde rol oynayabileceği ihtimalini artırmaktadır (Park ve ark., 2004). Bu sonuca paralel şekilde, Zhou ve ark., hepatoselüler karsinomada hastalığın patolojik ve prognostik özellikleri ile WWOX ekspresyonunun ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında; agresiflik ve nüks açısından

WFOX'un azalan ifade düzeyi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu da WFOX'un HCC için prognozu öngören potansiyel bir biyobelirteç olarak düşünülebileceğini mümkün kılmıştır (Zhou ve ark., 2018). Tüm bu sonuçlar, hücre proliferasyonunda artış, yüksek nüks oranına sahip olması ve agresif özellikler göstermesi gibi birçok açıdan premalign dokulara benzerlik gösteren pterijyum patogenezinde WFOX geninin önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Huang ve ark., ise primer (8) ve nüks (8) pterijyum dokusunda yaptıkları çalışmada dokuları baş ve boyun kısımlarına ayırarak konjonktiva dokusu ile kıyaslamışlardır. Çalışma sonuçları özellikle baş bölgesinde WFOX ekspresyonunda bir artışın olduğunu göstermiştir (Huang ve ark., 2015). Ancak bu sonuçların bizim sonuçlarımızla uyuşmaması nedeniyle yapılacak yeni çalışmalarla bu verilerin doğrulanması gerekmektedir.

Bu çalışmada, pterijyum dokusunda WFOX'un ifade ve protein seviyesi normal konjonktivaya oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,022$). Tüm bu veriler göz önüne alınırsa, çalışma sonuçlarımız, tümör dokularında WFOX ifade ve protein düzeyinin kanserli olmayan dokulara oranla azaldığı sonuçlarını destekler niteliktedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar pterijyum patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi için moleküler bir temel sağlayabilir. WFOX'un bir tümör baskılayıcı gen olması ve ekspresyonunun pterijyum dokusunda düşük bulunması pterijyumun kanser analogu bir doku olma özelliğini desteklemektedir. WFOX ifade düzeyindeki bu azalma, promotor bölge hipermetilasyonundan kaynaklanabileceği gibi WFOX geninde mevcut mutasyonlardan da kaynaklanabilir. Bu bağlamda, sonuçlarımızın WFOX metilasyon çalışmaları, mutasyon analizleri, WFOX ve etkili olduğu hücresel yollardaki

proteinlerle pterijyumun olası ilişkilerinin araştırılacağı doku kültürü dahil ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abdeen, S. K., David, U. B., Shweiki, A., Maly, B., Aqeilan, R. I. (2018).** Somatic loss of WWOX is associated with TP53 perturbation in basal-like breast cancer. *Cell Death and Disease* (2018) 9:832.
- Abu-Remaileh, M., Joy-Dodson, E., Schueler-Furman, O., and Aqeilan, R. I. (2015).** Pleiotropic Functions of Tumor Suppressor WWOX in Normal and Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 290(52); 30728–30735.
- Aldaz, C. M., Ferguson, B. W., Abba, M. C. (2014).** WWOX at the crossroads of cancer, metabolic syndrome related traits and CNS pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1846 188–200.
- Anguria, P., Kitinya, J., Ntuli, S., Carmichael, T. (2014).** The role of heredity in pterygium development. *Int. J. Ophthalmol*; 7(3):563-573.
- Aqeilan, R. I., Croce, C. M. (2007).** WWOX in Biological Control and Tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*; 212: 307–310.
- Arffa, R. C. (1991).** Grayson's Disease of the Cornea. Kist K, ed. St. Louis: Mosby Year Book:342-345
- Aslankurt, M., Yazıcı, A. T., Astam, N. (2003).** Pterijum Etiyoloji. *Tıp Araştırmaları Dergisi*.1(2): 39-42.
- Baryla, I., Styczen -Binkowska, E., and Bednarek, A. K. (2015).** Alteration of WWOX in human cancer, a clinical view. *Experimental Biology and Medicine*; 240: 305–314.
- Bouteille, N., Driouch, K., El Hage, P., Sin, S., Formstecher, E., Camonis, J., ve ark. (2009).** Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein. *Oncogene*.; 28: 2569-80.
- Cárdenas-Cantú, E., Zavala, J., Valenzuela, J., Valdez-García, J. E. (2016).** Molecular Basis of Pterygium Development. *Seminars in Ophthalmology*; 31(6): 567-583.
- Chang, N.S., Hsu, L. J., Lin, Y. S., Lai, F. J., and Sheu, H. M. (2007).** WW domain-containing oxidoreductase: a candidate tumor suppressor; 13(1), 12-22.
- Chang, R., Song, L., Xu, Y., Wu, Y., Dai, C., Wang, X., Sun, X., Hou, Y., Li, W., Zhan, X., Zhan, L. (2018).** Loss of Wwox drives metastasis in triple-negative breast cancer by JAK2/STAT3 axis. *Nat Commun*. 28;9(1):3486.
- Chao, S.C., Hu, D.N., Yang, P.Y., Lin, C.Y., Nien, C.W., Yang, S.F., Roberts, J.E. (2013).** UltravioletA irradiation upregulated urokinasetype plasminogen activator in pterygiumfibroblasts through ERK and JNK pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Feb 5;54(2):999-1007.
- Chiang, M.F., Chou, P. Y., Wang, W. J., Sze, C. I., Chang, N. S. (2013).** Tumor Suppressor WWOX and p53 Alterations and Drug Resistance in Glioblastomas. *Front Oncol*.; 4(3) 43-49.
- Chowers I, Pe'er J, Zamir E, Livni N, Ilsar M. (2001).** Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology*; 108: 985–988.
- Chui J, Coroneo MT, Tat LT, et al. (2011).** Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol*;178 (2):817–827.
- Cimpean, A. M., Sava, M. P., Raica, M. (2013).** DNA damage in human pterygium: One-shot multiple targets. *Molecular Vision*; 19:348-356.

- Cui, Z., Lin, D., Cheng, F., Luo, L., Kong, L., Xu, J., Hu, J., Lan, F. (2013).** The role of the WWOX gene in leukemia and its mechanisms of action. *Oncology Reports* 29: 2154-2162.
- Detorakis, E. T., Drakonaki, E. E. and Spandidos, D. A. (2000).** Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium (Review). *International Journal Of Molecular Medicine* 6: 35-41.
- Detorakis, E. T., Sourvinos, G., Tsamparlakis, J., Spandidos D. A. (1998).** Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol*, 82:1324–1328.
- Di Girolamo, N., Chui, J., Coroneo, M.T., Wakefield, D. (2004).** Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye ResMar*;23(2):195-228.
- Ekizoglu, S., Bulut, P., Karaman, E., Kilic, E., Buyru, N. (2015).** Epigenetic and Genetic Alterations Affect the WWOX Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*, Doi:10.1371/.
- Feng, Q.Y., Hu, Z. X., Song, X. L., Pan, H. W. (2017).** Aberrant expression of genes and proteins in pterygium and their implications in the pathogenesis. *Int J Ophthalmol*, Vol. 10 (6): 973-981.
- Gaudio, E., Palamarchuk, A., Palumbo, T., Trapasso, F., Pekarsky, Y., Croce, C.,M. And Aqeilan, R. I. (2006).** Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer Res.* 66, 11585-11589.
- Girolamo, N. D., Chui, J., Coroneo, M. T., Wakefield, D. (2004).** Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Progress in Retinal and Eye Research* 23; 195–228.
- Guler, G., Uner, A., Guler, N., Han, S.Y., Iliopoulos, D., Hauck, W.W., McCue, P., Huebner, K. (2004).** The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer* 100:1605–1614.
- Guo, W., Dong, Z., Dong, Y., Guo, Y., Kuang, G., Yang, Z. (2013) (a).** Genetic and Epigenetic Alterations of WWOX in the Development of Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54:112-123.
- Guo, W., Wang, G., Dong, Y., Guo, Y., Kuang, G., Dong, Z. (2013) (b).** Decreased Expression of WWOX in the Development of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* 52:265–274.
- Günel, T. (2007).** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 27:763-767.
- Hacıoğlu, D., ve Erdöl, H. (2017).** Developments and current approaches in the treatment of pterygium. *Int Ophthalmol.*; 37(4):1073-1081.
- Hezova, R., Ehrmann, J., Kolar, Z. (2007).** Wwox, A New Potential Tumor Suppressor Gene. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*; 151(1):11–15.
- Hou, A., Lan, W., Law, K.P., Khoo, S.C., Tin, M.Q., Lim, Y.P., Tong, L. (2014).** Evaluation of global differential gene and protein expression in primary Pterygium: S100A8 and S100A9 as possible drivers of a signaling network. *PLoS One*. 13;9(5):e97402.
- Huang, Y.H., Chang, N. S., Tseng, S. H. (2015).** Expression of WW domain-containing oxidoreductase WWOX in pterygium. *Molecular Vision*; 21:711-717.
- Karaaslan Ç. 2008.** “Western Blot” Tekniği. *Astım alerji İmmünoloji* 6(1):38-40.

- Kato, N., Shimmura, S., Kawakita, T., Miyashita, H., Ogawa, Y., Yoshida, S., Higa, K., Okano, H., and Tsubota K. (2007).** Beta-Catenin Activation and Epithelial–Mesenchymal Transition in the Pathogenesis of Pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*; 48(4):1511–1517.
- Kau, H. C., Tsai, C. C., Lee, C. F. et al. (2006).** Increased oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy- guanosine, in human pterygium. *Eye (Lond)*; 20(7):826–831.
- Kim, K. W., Park, S. H. Wee, S. W., and Kim, J. C. (2013).** Overexpression of Angiogenin in Pterygium Body Fibroblasts and Its Association With Proliferative Potency. *54*:6355–6362.
- Kuroki T., Trapasso F., Shiraishi T., Alder H., Mimori K., Mori M. And Croce C.M. (2002).** Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 62, 2258-2260.
- Li, J., Liu, J., Ren, Y., Yang, J., Liu, P. (2014).** Common Chromosomal Fragile Site Gene WWOX in Metabolic Disorders and Tumors. *International Journal of Biological Sciences*; 10(2):142-148.
- Li, W., Liu, J., Galvin, J. A. (2016).** Epigenetics and Common Ophthalmic Diseases. *Yale Journal of Biology And Medicine*, 89, 597-600.
- Liang, K., Jiang, Z., Ding, B., Cheng, P., Huang, D., Tao, L. (2011).** Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Molecular Vision*; 17:1687-1693.
- Lin, J. T., Li, H.Y., Chang, N. S., Lin, C. H., Chen, Y. C., Lu, P. J. (2015).** WWOX suppresses prostate cancer cell progression through cyclin D1-mediated cell cycle arrest in the G1 phase. *Cell Cycle.* 14(3):408-16.
- Liu, M. M., Chan, C., and Tuo, J. (2013) (a).** Epigenetics in Ocular Diseases. *Current Genomics*, 14, 166-172.
- Liu, T., Liu, Y., Xie, L., He X., Ji Bai, J. (2013) (b).** Progress in the Pathogenesis of Pterygium. *Current Eye Research*, 38(12): 1191–1197.
- Lo, J. Y., Chou, Y. T., Lai, F. J., and Hsu, L. J. (2015).** Regulation of cell signaling and apoptosis by tumor suppressor WWOX. *Experimental Biology and Medicine*; 240: 383–391.
- Ludes-Meyers, J. H., Bednarek, A.K., Popescu, N. C., Bedford, M., Aldaz, C. M. (2003).** WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenet Genome Res* 100:101–110.
- Mahajan, N. P., Whang, Y. E., Mohler, J. L., Earp, H. S. (2005).** Activated Tyrosine Kinase Ack1 Promotes Prostate Tumorigenesis: Role of Ack1 in Polyubiquitination of Tumor Suppressor Wwox. *Cancer Res* 2005; 65 (22): 10514-10523.
- Mare, S. D., Salah, Z., and Aqeilan, R. I. (2009).** WWOX: Its Genomics, Partners, and Functions. *Journal of Cellular Biochemistry* 108:737–745 .
- Maxia, C., Perra M.T., Demurtas, P., Minerba, L., Murtas, D., Piras, F., Corbu, A., Gotuzzo, D.C., Cabrera, R.G., Ribatti, D., Sirigu, P. (2008).** Expression of survivin protein in pterygium and relationship with oxidative DNA damage. *J. Cell. Mol. Med.* 12 (6A): pp. 2372-2380.
- Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. A. (2006).** Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*; 1(3): 1559-1582.

- Nowakowska, M., Pluciennik, E., Wujcicka, W., Sitkiewicz, A., Kazanowska, B., Zielińska, E., Bednarek, A.K. (2014) (a) The correlation analysis of WWOX expression and cancer related genes in neuroblastoma- a real time RT-PCR study. *Acta Biochim Pol.*; 61(1):91-97.
- Nowakowska, M., Pospiech, K., Lewandowska, U., Piastowska-Ciesielska, A. W., Bednarek, A. K. (2014). Diverse effect of WWOX overexpression in HT29 and SW480 colon cancer cell lines. *Tumor Biol.* 35:9291–9301.
- Nunez, M. I., Ludes-Meyers, J., Abba, M. C., Kil, H., Abbey, N. W., Page, R. E., Sahin, A., Klein-Szanto, A. J. and Aldaz, C. M. (2005). Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status. *Breast Cancer Res. Treat.* 89, 99-105.
- Özeç, A. V., Erdoğan, H., Toker, M. İ., Özer, H., Arıcı, M. K. (2008). Pterijum Etiyopatogenezinde P53 ve Apoptozisin Rolü. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 30 (2-3-4): 58 – 67.
- Park, S.W., J Ludes-Meyers, J. L., Zimonjic, D.B., Durkin, M.E., N C Popescu, N.C., Aldaz, C. M. (2004). Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2004 Aug 16; 91(4): 753–759.
- Peng, M.L., Tsai, Y. Y., Chiang, C. C., Huang, Y. C., Chou, M.C., Huei Lee, H. L., Cheng, Y. W. (2012). CYP1A1 protein activity is associated with allelic variation in pterygium tissues and cells. *Molecular Vision*, 18:1937-1943.
- Perra, M. T., Maxia, C., Corbu, A., Minerba, L., Demurtas, P., Romano Colombari, R., Rodrigues, F. W., Arruda, J.T., Silva, R.E. and Moura, K.K. (2006). Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Molecular Vision* 2006; 12:1136-42.
- Pimenta, F.J., Gomes, D.A., Perdigão, P.F., Barbosa, A.A., Romano-Silva, M.A., Gomez, M.V., Aldaz, C.M., De Marco, L., Gomez, R.S. (2006). Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.*; 1;118(5):1154-8.
- Pluciennik, E., Nowakowska, M., Wujcicka, W. I., Sitkiewicz, A., Kazanowska, B., Zielińska, E., Bednarek, A. K. (2012). Genetic alterations of WWOX in Wilms' tumor are involved in its carcinogenesis. *Oncol Rep.* 28(4):1417-22.
- Pospiech, K., Pluciennik, E., Bednarek, A. K. (2018). *WWOX* Tumor Suppressor Gene in Breast Cancer, a Historical Perspective and Future Directions. *Front Oncol.* Aug 28;8:345. doi: 10.3389/fonc.2018.00345.
- Qu, J., Lu, W., Li, B., Lu, C., Wan, X. (2013). WWOX induces apoptosis and inhibits proliferation in cervical cancer and cell lines. *International Journal Of Molecular Medicine* 31: 1139-1147.
- Qin, H.R., Iliopoulos, D., Nakamura, T., Costinean, S., Volinia, S., Druck, T., Sun, J., Okumura, H., Huebner, K. (2007). *Wwox* suppresses prostate cancer cell growth through modulation of ErbB2-mediated androgen receptor signaling. *Mol Cancer Res.*;5(9):957-65.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 3(3): 71–85.

- Riau, A.K., Wong, T. T., Finger, S. N., Chaurasia, S. S., Hou, A. H., Chen, S., Yu, S. J., Tong, L. (2011).** Aberrant DNA Methylation of Matrix Remodeling and Cell Adhesion Related Genes in Pterygium. *Plos One*. 6 (2): 1-11.
- Rodrigues, F. W., Arruda, J. T., Silva, R. E., Moura, K. K. (2008).** TP53 gene expression, codon 72 polymorphism and human papillomavirus DNA associated with pterygium. *Genet Mol Res.*;7(4):1251-8.
- Salah, Z., Aqeilan, R., Huebner, K. (2010).** WWOX gene and gene product: tumor suppression through specific protein interactions. *Future Oncol*. 6(2): 249–259.
- Sebastiá, R., Ventura, M. P., Solari, H. P., Antecká, E., Orellana, M. E., and Burnier, M. N. (2013).** Immunohistochemical detection of Hsp90 and Ki-67 in pterygium. *Diagnostic Pathology*, 8:32.
- Schrock, M. S., Huebner, K. (2015).** WWOX: A fragile tumor suppressor. *Experimental Biology and Medicine*; 240: 296–304.
- Schmittgen, T. D. and Livak, (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3 (6): 1101- 1108.
- Shayegan, M. R., Khakzad, M. R., Gharaee, H., Varasteh, A. R., Sankian, M. (2016).** Evaluation of transforming growth factor-beta1 gene expression in pterygium tissue of atopic patients. *J Chin Med Assoc.*; 79(10):565-9.
- Shimmura, S., Ishioka, M., Hanada, K., Shimazaki, J., and Tsubot, K. (2000).** Telomerase Activity and p53 Expression in Pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;41:1364–1369.
- Solomon, A.S. (2006).** Pterygium. *Br. J. Ophthalmol*, 90: 665-666.
- Spandidos, D. A., Sourvinos, G., Kiaris, H., Tsampanlakis, J. (1997).** Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *British Journal of Ophthalmology*, 81:493–496.
- Tan, D. T. H., W. Y. Y., Liu, Y. P., Goh, H., Smith, D. R. (2000).** Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol*; 84:212–216.
- Vaheri, A., Carpen, O., Heiska, L., Helander, T. S., Jaaskelainen, J., Majander-Nordenswan, P., Sainio, M., Timonen, T., Turunen, O. (1997).** The ezrin protein family: membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr Opin Cell Biol*. 9(5):659-66.
- Vatansever, H. S. (2016).** Epitelial Mezenkimal Transition (Geçiş-Aktarım). *Türkiye Klinikleri Radyasyon Onkolojisi Özel Dergisi*, 2(1), 52-55.
- Yuan, C.C., Peterson, R.J., Wang, C.D., Goodsaid, F., Waters, D.J. (2000).** 5' Nuclease Assays for the Loci CCR5-1/D32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A Related to Pathogenesis of AIDS. *Clinical Chemistry* 46:1. 24-30.
- Wang, H. Y., Juo, L. I., Lin, Y. T., Hsiao, M., Lin, J. T., Tsai, C. H., Y-H Tzeng, Y. H., Chuang, Y. C., Chang, N. S., Yang, C. N., and P-J Lu, P. J. (2012).** WW domain-containing oxidoreductase promotes neuronal differentiation via negative regulation of glycogen synthase kinase 3 β . *Cell Death Differ*, 19(6): 1049–1059.
- Weinstein, O., Rosenthal, G., Zirkin, H., Monos, T., Lifshitz, T. and Argov, S. (2002).** Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye*; 16, 619–621.
- Winardi, W., Tsai, C. Y., Chen, W. T., Chai C. Y., Kwan, A. L. (2013).** Reduced WWOX protein expression in human astrocytoma. *Neuropathology*; 33(6):621–627.

- Wistuba, I. I., Behrens, C., Virmani, A. K. (2000).** High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*; 60: 1949-1960.
- Xu, K., Tao, T., Jie, J., Lu, X., Li, X., Mehmood, M. A., He, H., Liu, Z., Xiao, X., Yang, J., Ma, J. X., Li, W., Zhou, Y., Liu, Z. (2013).** Increased importin 13 activity is associated with the pathogenesis of pterygium. *Mol Vis.*; 19: 604-13.
- Yang, J. and Zhang, W. (2008).** WWOX tumor suppressor gene. *Histol Histopathol*; 23: 877-882.
- Yang, Z., Lan, H., Chen, X., Li, P., Li, S., Mo, W., Tang, A. (2014).** Molecular alterations of the WWOX gene in nasopharyngeal carcinoma. *Neoplasma*. 61(2):170-
- Zhou, W. P., Zhu, Y. F., Zhang, B., Qiu, W.Y., Yao, Y.F. (2016).** The role of ultraviolet radiation in the pathogenesis of pterygia (Review). *Mol Med Rep*. 2016 Jul;14(1):3-15.
- Zhou, C., Chen, W., Sun, J., Atyah, M., Yin, Y., Zhang, W., Guo, L., Ye, Q., Dong, Q., Shi, Y., Ren, N. (2018).** Low expression of WW domain-containing oxidoreductase associates with hepatocellular carcinoma aggressiveness and recurrence after curative resection. *Cancer Med*. 2018 Jun 14.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: NİHAN BOZKURT

Doğum Tarihi: 29/11/1981

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	İstanbul Üniversitesi	2004
Y. Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.D	TOGÜ	2008
Doktora	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	TOGÜ	Devam ediyor

Görevler:

Arş.Gör.	Tokat Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D	2007-
----------	---	-------

Uluslararası ve Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Ates O, Kurt S, **Bozkurt N**, Karaer H. NRAMP1 (SLC11A1) variants: Genetic susceptibility to Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Immunology* 2010. DOI:10.1007/s10875-010-9422-5.
2. Yigit S, Karakus N, Tasliyurt T, Kaya SU, **Bozkurt N**, Kisacik B. Significance of MEFV gene R202Q polymorphism in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Gene* DOI: 10.1016/j.gene.2012.06.074.
3. Rustemoglu A, Gül U, Gümüş-Akay G, Gönül M, Yiğit S, **Bozkurt N**, Karadağ A, Pişkin E, Sunguroğlu A, Kadıkıran A. MDR1 gene polymorphisms may be associated with Behçet's disease and its colchicum treatment response. *Gene* DOI: 10.1016/j.gene.2012.05.040.
4. Yigit S, Inanir A, Karakus N, Kesici E, **Bozkurt N**. Common Mediterranean fever (MEFV) gene mutations associated with ankylosing spondylitis in Turkish population. *Dis Markers*. DOI: 10.3233/DMA-2012-0911.
5. Ates O, Karakus N, Sezer S, **Bozkurt N**. Genetic association of 5-HT1A and 5-HT1B gene polymorphisms with migraine in a Turkish population. *Journal of the Neurological Sciences* doi: 10.1016/j.jns.2013.01.013. Epub 2013 Jan 31.
6. Kalkan G, Yigit S, Karakuş N, Ateş O, **Bozkurt N**, Ozdemir A, Pancar GS. Metylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation in patients with alopecia areata in Turkish population. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2013.08.016.

7. Karakus N, Yigit S, Rustemoglu A, Kalkan G, **Bozkurt N**. Effects of interleukin (IL)-6 gene polymorphisms on recurrent aphthous stomatitis. Arch Dermatol Res. doi: 10.1007/s00403-013-1406-x. Epub 2013 Aug 28.
8. Demirturk F, Ates O, Gunal O, **Bozkurt N**, Aysal T, Nacar MC. IL-6 gene promoter polymorphisms: genetic susceptibility to recurrent pregnancy loss. Bratislava Medical Journal 2014; doi:10.4149/BLL_2014_092.
9. Inanir A, Karakus N, Ates O, Sezer S, **Bozkurt N**, Inanir S, Yigit S. Clinical symptoms in fibromyalgia are associated to catechol-O-methyltransferase (COMT) gene Val158Met polymorphism. Xenobiatica. 2014. DOI: 10.3109/00498254.2014.913083
10. Sezer S, Altınışık J, **Bozkurt N**, Akkanet S, Ates O. Migrende Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) İnsersiyon/Delesyon (I/D) Gen Polimorfizminin Analizi. Çağdaş Tıp Dergisi 2013;3:7-11

