

T.C
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

BAŞ-BOYUN KANSERLERİNDE, ING1 SPLICING
VARYANTLARININ (p24ING1 VE p33ING1) KARSİNOGENEZ
VE METASTAZDAKİ ROLLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Gökhan NAS

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ

Ankara-2014

T.C
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

BAŞ-BOYUN KANSERLERİNDE, ING1 SPLICING
VARYANTLARININ (p24ING1 VE p33ING1) KARSİNOGENEZ
VE METASTAZDAKİ ROLLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Gökhan NAS

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ

Ankara-2014

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

.././..

İmza

Ad ve Soyadı

ONAY

Gökhan NAS tarafından hazırlanan “BAŞ-BOYUN KANSERLERİNDE, ING1 SPLİCİNG VARYANTLARININ (P24ING1 VE P33ING1) KARSİNOGENEZ VE METASTAZDAKİ ROLLERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma, tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (oybirliği/oyçokluğu) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından tıbbi genetik dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

[İ m z a]

.....

[Unvanı, Adı ve Soyadı] (Başkan)

.....

[İ m z a]

.....

[Unvanı, Adı ve Soyadı]

.....

[İ m z a]

.....

[Unvanı, Adı ve Soyadı]

.....

ÖNSÖZ

Akademisyenlik yolu, fonksiyonunu en iyi şekilde eda etmek isteyen bir proteine benzer. Önce, DNA da kodlanmış bir gen olarak uygun zemin ve şartlarda açığa çıkmayı bekler. Yol çok uzun ve meşakkatlidir. Transkripsiyon ile mRNA'ya dönüşmesi, RNA splicing ile fazlalıklarından kurtulması, modifikasyonlar ile kendisini sindirebilecek etmenlerden korunması, translasyon ile protein yapıya bürünmesi, chaperone proteinler yardımıyla üç boyutlu fonksiyonel bir hale dönüşmesi gerekir. Hücrede en hayati fonksiyonlarda görev almaya hazır bu protein tek başına da bir anlam ifade edemez. Ancak, hücre içerisindeki diğer proteinlerin yardımı ve desteğiyle hayat bulur ve fonksiyonunu eda edebilir.

Akademisyen olma yolundaki en önemli basamak olan Yüksek Lisans eğitimimde bana uygun zemin ve şartları sağlayan, bilgi, birikim ve tecrübeleriyle destek olan tez danışmanım, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ'e, çalışkanlığı ve akademik kariyeriyle kendisini örnek almaktan gurur duyduğum Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ'e, laboratuvar çalışmalarında kendisinden çok şey öğrendiğim Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR'a, bilimsel katkılarıyla her zaman yanımda olan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve yardımlarını esirgemeyen bölümdeki herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Tez projemin gerçekleşmesinde her türlü laboratuvar imkanlarını sağlayan Turgut Özal Üniversitesi'ne ve verdiği maddi destekle yüksek lisans eğitimime büyük katkısı olan TÜBİTAK-BİDEB-2210 programına ve 110S424 proje numarasıyla çalışmayı destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na (ARDEB) teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca benden hiçbir maddi manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme de teşekkür ederim.

ÖZET

Bu tezin amacı, Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomda (HNSCC), tümör baskılayıcı genlerden, Inhibitor of Growth (ING) gen ailesinin bir elemanı olan ING1 genine ait iki farklı varyantın (p33ING1 ve p24ING1) etkinliğini araştırmaktır. Bu amaçla, HNSCC ye ait primer (74A) ve metastatik (74B) iki farklı hücre hattında, rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen varyantlar transfekte edilerek gen ifadelerinin oluşması sağlanmıştır. Oluşan gen ifadelerinin, hücreler üzerindeki etkinliği, xCELLigence sistemi ve yara deneyleri ile gerçek zamanlı olarak ölçülmüş, kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grupları ile yapılan kıyaslamalar sonucunda p33ING1 varyantının primer tümörlü hücre hatlarında proliferasyonu %88,7 oranında, metastatik hücre hatlarında proliferasyonu %92 oranında azalttığı, p24ING1 varyantının ise primer tümörlü hücre hatlarında proliferasyonu %83.4 oranında, metastatik hücre hatlarında proliferasyonu %84.1 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Bu hücre hatlarının migrasyon kabiliyetleri incelendiğinde ise, %54 oranında azalma olduğu görülmüştür.

ING gen ailesinin hücre içi mekanizmalarda rol aldığı ve tümör baskılayıcı diğer genler ile ortak veya onlardan bağımsız olarak hücre proliferasyonunu etkilediği düşünülmektedir. Literatürde ING1 varyantlarının, özellikle p24ING1 varyantının, HNSCC de proliferasyon ve migrasyondaki rolüne ait veriler kısıtlı olmasına karşın, bu çalışma ile, ING1 genine ait iki varyantın primer ve metastatik kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkisi gösterilmiş, potansiyel bir terapötik ajan olabileceği düşünülmüştür.

**Bu çalışma TÜBİTAK (Proje No: 110S424) tarafından desteklenmiştir.*

Anahtar Sözcükler 1. KANSER 2. HNSCC, 3. ING1, 4. Rekombinant DNA Teknolojisi, 5. Bioteknoloji

ABSTRACT

The aim of this thesis is to reveal the activity of two splicing variants (p33ING1 and p24ING1) of ING1 gene, which is the member of Inhibitor of Growth (ING) gene family, in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). For this purpose, variants that obtained by recombinant DNA technology, transfected into primer (74A) and metastatic (74B) cell lines which belongs to HNSCC and gene expression is provided. The effects of gene expressions on cell lines quantified in real time by xCELLigence system and observed by wound healing experiments. Results were evaluated in comparison with control groups.

As a result of the comparisons with the control groups, p33ING1 variant reduces proliferation by 88.7% in primer cell line and reduces proliferation by 92% in its metastatic cell line. Besides, it is revealed that p24ING1 variant reduces proliferation by 83.4% in primer cell line and reduces proliferation by 84.1% in its metastatic cell line. When the migration ability of these cell lines examined, was found to decrease by 54%.

ING gene family is thought to be involved in the intracellular mechanisms and affect cell proliferation by collaborating with other tumor suppressor genes or independently way. Although, in the literature, the data about the role of ING1 variants (especially p24ING1) in the proliferation and migration on HNSCC is limited, this study revealed anti-proliferative affects of two splicing variants of ING1 gene, on primary and metastatic HNSCC cell lines and is thought to be a potential therapeutic agent.

**This study was supported by TÜBİTAK (Project Number: 110S424)*

Key Words 1. CANCER 2. HNSCC, 3. ING1, 4. Recombinant DNA Technology, 5. Biotechnology

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Baş Boyun Kanseri	2
1.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	2
1.1.2. Patogenez	3
1.2. Tanı ve Evreleme	4
1.3. Tedavi	5
1.4. Tümör Süpresör Genler	5
1.5. Onkogenler	6
1.6. ING Ailesi Genleri Yapı ve Fonksiyonları	6
2. MATERYAL VE METOD	8
2.1. DNA İzolasyonu.....	8
2.2. RNA İzolasyonu.....	9
2.3. cDNA Sentezi.....	10
2.4. PCR.....	11
2.5. Jel Ekstraksiyonu.....	12
2.6. PCR Pürifikasyonu.....	13
2.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	14
2.8. Enzim Kesimi.....	16
2.9. Plasmid İzolasyonu.....	17
2.10. Ligasyon.....	18
2.11. Transformasyon.....	19
2.12. Bakteri Kültürü.....	20
2.13. DNA Dizileme.....	21
2.14. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi.....	24

2.15. Migrasyon Assay.....	24
2.16. Transfeksiyon.....	25
2.17. Hücre Kültürü.....	26
3. SONUÇ VE TARTIŞMA	29
4. KAYNAKÇA	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
ING	Inhibitor of Growth
HPV	Human Papilloma Virus
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
LOH	Loss of Heterozygosity
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PET	Positron Emission Tomography
CT	Computed Tomography
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
TSG	Tumor Suppressor Gene
DEPC	Diethylpyrocarbonate
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
FBS	Fetal Bovine Serum

TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 1: HNSCC H¼cre Hatlarında p53 Mutasyonlarının Belirlenmesi

Şekil 1: Splicing Varyantların Sentezi, Enzim Kesimi ve Saflaştırılması

Şekil 2: Transformasyon ve Verifikasyon PCR'ı

Şekil 3: Vektör Plasmidlerin İzolasyonu ve Enzim Kesimi

Şekil 4: Dizi Analizi ve Multiple Alignment

Şekil 5: Transfeksiyon Optimizasyonu

Şekil 6: H¼cre Proliferasyon Analizi

Şekil 7: Cell Index Analizi

Şekil 8: H¼cre Migrasyon Analizi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinoma (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC)) oral kavitede, orofarenks, larenks ve hipofarenkste ortaya çıkan insidansı ile dünya genelinde en sık görülen altıncı kanser türüdür [1]. Karsinojenlere maruz kalma, tütün ve alkol kullanımı, insan papilloma virüsü (HPV)'nin yüksek riskli tipleri ile enfeksiyon ve genetik yatkınlık önemli risk faktörleri arasında gösterilmektedir [2]. HNSCC olan hastalarda prognoz büyük ölçüde kanserin evresi ile korelidir. Tümörün büyüklüğü, lenf düğümü metastazı ve diğer doku ve organlara metastaz kanserin evresinin belirlenmesinde etkilidir. Erken evre tümörlerde tedavi, cerrahi yöntemler ve radyoterapi ile gerçekleştirilir ve olumlu bir prognoz vardır. İleri tümörlerde başlıca tedavi, cerrahi ile kombine post operatif radyoterapi ile gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda organ koruma protokollerinin de etkisiyle cerrahi ile kombine kemoradyoterapi de uygulanmaktadır. Hedefe yönelik ilaçlarda tedavide önemli rol almakta, özellikle Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)'a özgü antikorlar radyoterapi ile kombine kullanılmaktadır.

Gelişen cerrahi ve terapötik yöntemler organ koruma protokollerinin de etkisiyle hastaların yaşam kalitesinde olumlu yönde bir etki yapmasına karşılık, hayatta kalma oranında anlamlı bir değişme gözlenmemiştir. Bunda hastalığın nüksetmesi ve metastaz kabiliyeti önemli bir faktördür. Dolayısıyla moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamış HNSCC'de moleküler yolların ortaya çıkarılması, hastalığın karsinogenezinin aydınlanmasına ve yeni, hedefe yönelik terapötik stratejilerin ortaya çıkmasını sağlayacaktır.

1.1. Baş Boyun Kanseri

1.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom (HNSCC) her yıl yaklaşık 650.000 yeni kanser vakası ve 350.000 hastanın ölümüyle sonuçlanan, tüm kanser vakalarının %6'sını oluşturan, en sık görülen altıncı kanser türüdür [3]. Oral kavite kanseri en çok Melanezya, merkezi-güney Asya, batı-güney Avrupa, güney Afrika iken, Larenks kanseri en çok doğu-güney Avrupa, güney Amerika ve batı Asya da görülmektedir [3].

Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) veri tabanına göre HNSCC'nin tüm evreleri baz alındığında 5-yıllık sağ kalım oranı %60 olarak belirtilmiştir. Tütün ve alkol tüketimi, tüm HNSCC'li hastaların %75'inde görüldüğü ve karsinogenezde sinerjistik etki yaptığı belirtilmiştir [4]. Hiç sigara içmemiş kişilerde, yüksek alkol tüketiminin, günde üç veya daha fazla, yüksek HNSCC ile ilişkisi saptanmıştır. Alkol ve tütünü metabolize eden enzimlerdeki polimorfizmlerin HNSCC de riski arttırdığı gösterilmiştir. [5, 6]. Dumansız tütünün ve betel tütününün oral kavite kanserinde risk oluşturduğu iyi bilinmektedir [7]. Sebze ve meyve tüketimi düşük HNSCC riski ile ilişkilendirilmiştir [8]. HNSCC de ailesel kalıtımın da etkili olduğu düşünölmektedir [9]. Ayrıca, kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser, Fi-Fraumeni sendromu, Fanconi anemisi ve Ataksitelejiektazi gibi kansere duyarlı sendromların da HNSCC riskini arttırdığı bulunmuştur [10, 11].

HPV, özellikle tip 16 ve daha az oranla tip 18, HNSCC için tanımlanmış nedensel bir faktördür [12]. HNSCC hastalarının %25'inde HPV genomik DNA'sı bulunmaktadır [13]. HPV ve HNSCC arasındaki ilişki bademcik kanserinde en çok, orofarenks kanseri için orta derecede ve en zayıf oral kavite ve larinks kanserinde görölmektedir [14]. In-situ hibridizasyon yöntemi ile orofaringeal kanserlerde %72'ye varan oranlarda HPV16 genomik DNA'sı tespit edilmiştir [12]. HPV ile ilişkili HNSCC daha çok sigara ve alkol kullanmayan, bağışıklık sistemi baskılanmamış, farklılaşmanın az olduğu, bazaloid histolojinin görüldüğü bireylerde bulunmaktadır. Yüksek riskli onkojenik HPV tipleri (HPV16, HPV18) karsinojenik etkilerini tümör süpresör proteinlerden olan p53 ve Rb'yi inaktifleştiren E6 ve E7

viral proteinleri aracılığıyla göstermektedirler [15]. HPV-pozitif ve HPV-negatif tümörlerde gen ifade profilleri ve kromozomal bozukluklar yönünden farklılıkları ortaya konmuştur [16]. HPV pozitifliği HNSCC için olumlu bir prognostik faktördür. HPV pozitif tümörler kemoterapi ve radyoterapiye daha iyi yanıt vermekte ve HPV-negatif tümörlere nazaran tümör spesifik antijenlere karşı bağışıklık sistemi daha duyarlıdır. Bu nedenle HPV durumu HNSCC'nin prospektif klinik çalışmalarda dikkate alınması gereken önemli bir biomarker'dır [17].

1.1.2. Patogenez

HNSCC gelişiminde tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna ya da proto-onkogenlerin aktivasyonuna neden olan birçok genetik değişiklik vardır. Moleküler teknikler yardımıyla pre-malign ve invaziv lezyonlarda genetik ve epigenetik değişiklikler saptanarak HNSCC'nin karsinogenezi için bir ilerleme modeli oluşturulmaya çalışılmıştır [18-20]. HNSCC'de %90 oranında telomeraz aktivitesinin tekrar aktif hale geldiği [21], ayrıca %70-80 oranında 9p21 delesyonu yaygın olarak görülmektedir [22]. HNSCC'nin erken evrelerinde homozigot delesyon, nokta mutasyon ya da promotor hipermetilasyonu sonucu aktivitesini kaybeden p16 ve 3p delesyonu görülebilmektedir [19]. TP53 nokta mutasyonları ve 17p'de görülen heterozigotluk kaybı (Loss of Heterozygosity-LOH) HNSCC'li hastaların %50'sinden fazlasında saptanmıştır [23]. 11q13 ve siklin D1 aşırı amplifikasyonu da HNSCC'de tespit edilmiş, bu durum agresif tümör davranışı ile ilişkilendirilmiştir [24, 25].

ErbB büyüme faktörü reseptör tirozin kinaz ailesine ait EGFR, HNSCC çalışmalarında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu reseptöre bağlanan ligandlar homodimer oluşumuna ya da ErbB ailesinin diğer elemanları ile heterodimer oluşumuna neden olur. Oluşan kompleksler, reseptöre bağlı tirozin kinaz yollarını aktive ederek hücre proliferasyonu, apoptoz ve anjiyogenez de etkili olan yolları tetikler. EGFR protein ifadesinin %90 oranında HNSCC'de görüldüğü [26] aşırı ifadesinin ise, HNSCC de kötü prognoza sebebiyet verdiği birçok retrospektif

çalışma ile gösterilmiştir [27]. Bu reseptörü hedefleyen ajanlar terapötik amaçlı kullanılmaktadır.

Anjiogenez, kanserin büyümesi ve metastazı için gerekli olup, birçok endojen proanjyogenik ve antianjiyogenik faktör tarafından kontrol edilmektedir. Anjiyogenezde bilinen en önemli faktörlerden biri, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve reseptörleridir [28]. VEGF seviyesi HNSCC'de artmakta ve prognostik önem arz etmektedir [29]. Antianjiyogenik tedavi stratejileri geniş çaplı olarak solid tümörlerde incelenmiş ve HNSCC tedavisinde de değerlendirme altına alınmıştır.

HNSCC'de malign hücreler bağışıklık sistemini kendi faydalarına kullanarak ya da inhibe ederek bağışıklık sisteminden kaçarlar. HNSCC'li hastalarda periferik kanda CD3+, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde azalma görülmüş, bu azalmanın opere edilen ve iyileşen hastalarda dahi senelerce devam ettiği gözlenmiştir [30].

1.2.Tanı ve Evreleme

Baş ve Boyun kanserinde belirtilerin ve semptomların erken fark edilmesi erken tanı için önem arz etmektedir. Oral kavite boşluğu kanseri için yüksek riskli bölgelerde görsel muayene ile popülasyon taraması haricinde hiçbir kanıtlanmış tarama yöntemi mevcut değildir [31]. Tanıyı doğrulamak için her zaman şüpheli malign lezyonların biyopsisi alınması ve uzmanlar tarafından değerlendirilmesi gerekmektedir. HNSCC'nin histolojik çeşitleri nadirdir ve verrüköz, bazaloid, iğsi hücreli ve adenoskuamöz karsinomu içerir. Az diferansiye veya farklılaşmamış baş ve boyun karsinomları HNSCC'ye benzer bir şekilde değerlendirilmektedir. Tedavinin belirlenmesinde doğru evreleme en önemli faktördür. Baş ve boyun cerrahı tarafından muayene, BT veya MR, ya da her ikisi ile boyun görüntüsü alınıp radyolojik değerlendirme yapılarak hastalığın evresine karar verilir. Lokal boyuna lenf nodu metastazı dışında en sık uzak metastaz akciğerlerde, sonrasında karaciğer ve kemiklerde görülmektedir. Özellikle ileri evre HNSCC hastalarında akciğer görüntüsü rutin olarak alınarak akciğer metastatik kanserinin varlığı değerlendirilir.

[18F]floro-2-deoksiglukoz ile PET taraması özellikle nodal ve uzak metastaz tespiti için kullanılmaktadır [32]. Kombine kullanılacak PET ve CT görüntüleri tanı için sinerjistik bir etki yapmaktadır [33].

1.3.Tedavi

HNSCC'de tedavi, hastalığın evresine göre farklılık göstermektedir. Tedavi yöntemi olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, gen terapisi ve bunlarla kombine yeni tedavi ajanları kullanılabilir. Tedavi yöntemi olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, gen terapisi ve bunlarla kombine yeni tedavi ajanları kullanılabilir.

HNSCC hastalarının yaklaşık üçte birine 1. veya 2. evre tanısı konmaktadır. Tedavi amacı ile bu hastalara genel olarak cerrahi veya radyoterapi uygulanmaktadır. Evre 1 de bulunan hastaların %90'ı ve Evre 2 de bulunan hastaların %70'i cerrahi ve radyoterapi ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Tümörün lokalizasyonu da tedavi şeklinde belirleyici rol oynamaktadır.

Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ileri evre hastalığıdaki (Evre 3, Evre 4) temel tedavi araçlarıdır. Bu aşamadaki hastalarda kemoterapi ve radyoterapinin eş zamanlı uygulanması (kemoradyoterapi) halen kullanılan bir tedavi aracıdır. Kemoradyoterapi'nin sadece kemoterapi veya radyoterapiden daha etkili olduğu klinik öncesi ve faz 3 klinik denemelerinde gösterilmiştir [34]. Kemoradyoterapide Cisplatin, fluorouracil gibi kemoterapötik ajanlar radyoterapi ile birlikte kullanılmaktadır. Ayrıca Cetuximab gibi belli bir reseptöre veya yolağı hedef alan terapötik ajanlar radyokemoterapi ile birlikte kullanılabilir.

1.4.Tümör Süpresör Genler

Tümör süpresör genler (TSG) hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre döngüsü, DNA replikasyonu ve tamiri ile segregasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutan genlerdir.

Tümör süpresör genlerin hücre üzerindeki etkileri genetik değişiklikler sonrasında farklılık gösterebilir. Resesif karakter gösterdiklerinden her iki allelde de

değişiklik (çift vuruş - two hit) olması durumunda TSG'ler tümüyle inaktive olur ve hücre üzerindeki fonksiyonları ortadan kalkar. İnaktivasyon sonrasında hücre üzerindeki kısıtlayıcı etkilerinin kaybolmasına bağlı olarak kanser gelişimi gözlenir. Baş boyun kanserinin gelişmesinde de tümör süpresör genler büyük rol oynamaktadır.

1.5.Onkogenler

Kanser genellikle DNA hasarı, hücre döngüsü tutulmaları ve apoptozu içeren hücre sel sinyal yollarını düzenleyen moleküllerin değişikliğe uğramasıyla ortaya çıkmaktadır. Baş ve boyun kanserinde, p53 tümör baskılayıcı gendeki mutasyonlar, siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p16INK4a'nın inaktivasyonu, siklin D1 ve EGFR'ın aşırı ifadenmesi sık görülen değişikliklerdir. Bu moleküller, tümör baskılayıcı genlerin veya aktif onkogenlerin ürünleridirler.

1.6. ING1 Ailesi Genlerin Yapı ve Fonksiyonları

ING tümör süpresör gen ailesinin ilk üyesi olan ING1 cDNA düzeyinde ilk defa 1999 yılında tanımlanmıştır. [35]. Bu genin bilinen en önemli tümör süpresör gen olan p53 ile ortak olarak hareket ettiği ve birinin yokluğunda diğerinin yeterince çalışmadığı gösterilmiştir [36]. Bu da ING1 geninin önemini daha da artırmıştır. Gündüz ve arkadaşları dünyada ilk defa bu genin ekzon-intron genom yapısını ve dizilerini, promoter alanlarını ve splicing varyantlarını ortaya koymakla beraber baş-boyun kanserlerinde tümöre spesifik mutasyonlar ve allelik delesyon olduğunu bularak tümör süpresör gen olarak fonksiyonu olduğunu göstermişlerdir [37]. Ayrıca bu genlerin baş boyun kanserlerindeki rolleri ile ilgili dünyadaki çalışmaların büyük bir kısmı yine Gündüz ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır [37-47]. ING1 ile birlikte günümüze kadar ING ailesine ait 5 ayrı gen tanımlanmıştır [43, 46]. Bu aileden ING3 2002 yılında tanımlanmıştır [38]. 2000 yılında ING1'in splicing

varyantları tanımlanmış ve bu gene ait araştırmalar ön plana çıkmıştır. İlerleyen zamanlarda bu splicing varyantlarının değişik kanser türlerinde mRNA ekspresyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır [48-56]. Bu alışmalar farklı kanser türlerinde ve splicing varyantların doku ekspresyon farklılığı üzerine yapılan çalışmalardır. Ancak, yapılan bu çalışmalar sonucunda varyantlarla ilgili yeterince bilgi sahibi olunamamıştır. Ayrıca protein düzeyindeki çalışmalarda da mevcut antikolların bu varyantların ayırımı yapılamamış ve sadece p33ING1 varyantını içermiştir [57-60]. Her ne kadar bu protein düzeyindeki çalışmalar varyantlara spesifik bir ayırım getirmese de ilginç bir şekilde p33ING1'in karsinogenez sürecinde nükleer-sitoplazmik translokasyona uğradığı gösterilmiş ve bu bulguların prognostik etki yapabileceği belirtilmiştir. Takip eden dönemde bu genle ilgili hücre düzeyinde diğer bazı kanserlerde de rolü olduğunu düşündüren çalışmalar yayınlanmıştır. Ancak splicing varyantları ve bunların fonksiyonları, kanserleşme ve metastazdaki rolleri ile ilgili literatürde az sayıda yayın bulunmaktadır. Bu çalışmaların hepsi farklı kanser türlerinde ve fonksiyonel çalışma olarak da biri hariç [61] tüm splicing varyantları içermemektedir [60-64]. Ayrıca ING gen ailesinin yayınlanan sınırlı sayıda prognostik kullanımı ile ilgili yayınlar mevcuttur [41, 65].

2. MATERYAL VE METOD

2.1.DNA İzolasyonu:

Kimyasallar

PureLink® Genomic DNA Mini Kit (İnvitrogen, cat. No. K1820-01)

10X PBS (Lonza, 51226), %90-%100 etanol

Ekipmanlar

Isı bloğu (Techne, Dri-Block DB-2D)

Microsantrifüj (Hitachi, VWR, Himac CT 15 RE)

1,6 ml Microsantrifüj tüpleri (Neptune, 3745.S.X)

Spektrofotometre (Shimadzo Corporation, biospec-nano)

Protokol

1. Su banyosu veya ısıtıcı blok 55 ° C ye ayarlandı.
2. 60 lıkpetridishlere ekilmiş hücrelerin %90 konflüent olması beklendi.
3. Üzerindeki besi yeri atıldı.
4. 5 ml 1xPBS ile iki defa yıkandı.
5. 20 µl Proteinase K eklendi.
6. 20 µl RNase A eklendi, kısaca vortekslenerek (Hücre hatları için; petri kabını sallayarak) iyice karışması sağlandı. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
7. 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer eklenerek vorteks yapıldı (Hücre hatları için; petri kabının dibi kazılarak homojenizasyon sağlandı).
8. 55 °C' de 10dk inkübe edildi.
9. 200 µl %90-100 ethanol eklenip 5 sn vorteks yapıldı. (Hücre hatları için; petri kabındaki solusyonmicropipet yardımı ile homojenize edildi).
10. Lizat, spin kolona aktarıldı.
11. 10.000 g de 1 dk 25°C de santrifüj edildi.

12. Toplama tüpü değiştirildi.
13. Spin kolona 500 µl Wash Buffer 1 konuldu.
14. 10.000 g de 1 dk 25°C santrifüj edilerek toplama tüpü değiştirildi.
15. Spin kolona 500 µl'lik Wash Buffer 2 eklendi.
16. 13.000 rpm de 3 dk 25 °C santrifüj edildi.
17. Spin kolon 1.6 ml'lik steril microsantrifüj tüpüne aktarıldı.
18. 100 µl Genomik Elution Buffer spin kolonun tam ortasına eklendi.
19. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
20. 13.000 rpm de 1 dk 25°C de santrifüj edildi.
21. Spin kolon atıldı. Nanodrop'da ölçüm yapıldıktan sonra DNA etiketlendi ve -20 C'de saklandı.

2.2.RNA İzolasyonu:

Kimyasallar

Trizol (Invitrogen, cat. No. 15596-026), 10X PBS (Lonza, 51226)

Adherent Hücreler, Kloroform (Merck, 102431)

2-propanol (Merck, cat. No. 100995), Etanol (Merck, cat. No. 100983)

DEPC water (Invitrogen, 46-2224)

Ekipmanlar

Sınıf II BioGüvenlik Kabini

Microsantrifüj (Hitachi, VWR, Himac CT 15 RE)

Spektrofotometre (Shimadzo Corporation, biospec-nano)

Protokol

1. Adherent hücreler üzerindeki medium'un tamamı çekildi.
2. Hücreler 1XPBS ile bir kez yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine 1000 µl Trizol eklendi.
4. Hücrelerin homojenize parçalanması için pipetaj yapıldı ve 1,6 ml lik microsantrifüj tüplerine aktarıldı.

5. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
6. 200 µl kloroform eklendi ve 2-3 dk sallandı.
7. 12.000 rpm 15 dk 40°C de santrifüj yapıldı.
8. Üstteki şeffaf kısım yeni 1,6 ml'lik microsantrifüj tüpe aktarıldı.
9. 500 µl 2-propanol eklendi. Sallanarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. 12.000 rpm 10 dk 40°C de santrifüj yapıldı.
10. Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. %75'lik etanolden 1000 µl eklendi. Hafifçe sallandı.
11. 12.000 rpm 5 dk 40°C de santrifüj yapıldı.
12. Süpernatant atıldı ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletildi.
13. 40 µl DEPC water eklenerek RNA pipetejla çözüldü.
14. Spektrofotometrede ölçüm yapıldıktan sonra RNA etiketlendi ve -80°C de saklandı.

2.3.cDNASentezi:

Kimyasallar

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, cat. No. K1621), RNA örneği

Ekipmanlar

Microsantrifüj (Hitachi, VWR, Himac CT 15 RE)

1,6 ml Microsantrifüj tüpleri (Neptune, 3745.S.X)

Protokol

1. Örnek sayısı kadar 1,6 ml'lik microsantrifüj tüp çıkartıldı.
2. Her tüpe ayrı ayrı 1µl oligo(dT)₁₈ eklendi.
3. Her bir örnek için 1 µg RNA sırasıyla microsantrifüj tüplerine eklendi.
4. Her bir örnek için son hacim 12 µl olacak şekilde su eklendi.

5. Reaksiyon karışımı hazırlanır (Bir reaksiyon için hazırlanacak miktarlar).

5X Reaction Buffer	4µl
Ribolock™ RNase Inhibitor(20 u/µl)	1µl
10mM DNTP Mix	2µl
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1µl
Toplam	8µl

6. Hazırlanan karışım örnek tüplerinin üstüne 8µl olacak şekilde dağıtıldı ve toplam hacim her örnek için 20 µl oldu.
7. 42°C de 60 dk inkübasyona bırakıldı.
8. Sonra 70°C de 5 dk bekletildi. Spin atırıldı.
9. Elde edilen cDNA'lar etiketlendikten sonra -80°C de muhafaza edildi.

2.4.PCR

Kimyasallar

ThermoPhusion High-Fidelity DNA polymerase kit

Protokol

1. Örnek sayısı kadar, aşağıdaki protokol kullanılarak master mix hazırlanır.
2. Her bir tüpe 18 ul master mix'den eklenir.
3. Master mix içine 2 ul DNA eklenerek reaksiyona hazır hale getirilir.
 - a. PCR Koşulları: 35 cycle
 - i. 98°C 5 dakika başlangıç denatürasyonu
 - ii. 98°C 30 saniye denatürasyon
 - iii. 60°C 30 saniye bağlanma
 - iv. 72°C 30 saniye uzama
 - v. 72°C 5 dakika son uzama
 - vi. 4°C muhafaza sıcaklığı

<u>PCR karışımı (bir tüp için)</u>	
5x Buffer	4 ul
dNTP	0.4 ul
F primer	0.5 ul
R primer	0.5 ul
HF polymerase	0.2ul
ddH2O	12.4 ul
DNA	2 ul
Total	20 ul

2.5.Jel Ekstraksiyonu:

Kimyasallar

Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, cat. No. 28704), Jel dilimi

Ekipmanlar

Microsantrifüj (Hitachi, VWR, Himac CT 15 RE)

Isı bloğu (Techne, Dri-Block DB-2D)

Spektrofotometre (Shimadzo Corporation, biospec-nano)

1,6 ml Microsantrifüj tüpleri (Neptune, 3745.S.X)

İso-propanol (Meck, cat. No. 100983)

Pipet/Tip

Protokol

1. Kesilen her jel diliminin~40 mg olduğu hassas tartı ölçümleri ile belirlendi.
2. Kesilen jel dilimleri microsantrifüj tüplerine aktarılarak üzerine 3 hacim QG buffer eklendi. (1 hacim: 40 mg jel = 40 μ l), konsantrasyonu 2%'den büyük agaroz jeller için 6 hacim QG eklendi.

3. Örnekler daha önceden 50 dereceye ısıtılmış ısı bloğunda 10 dakika inkübe edildi. Her iki dakikada bir vortexlendi. Jel parçasının tamamen erimesine dikkat edildi.
4. Örnekler bir hacim iso-propanol eklenerek pipetajla iyice karıştırıldı.
5. Örnekler spin kolonlara aktarılarak, oda sıcaklığında, 1 dakika, 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Spin kolonlara 750 µl PE buffer eklenerek oda sıcaklığında, 1 dakika, 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı atıldı.
7. Spin kolonlar oda sıcaklığında, 1 dakika, 13.000 rpm'de santrifüj edilerek PE buffer'dan tamamıyla arındırıldı.
8. Kolonlara 30 ul Elution Buffer eklenerek, oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edilir.
9. Kolonlar temiz microsantrifüj tüplerine aktarılarak oda sıcaklığında, 1 dakika, 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Elde edilen elüsyonların konsantrasyonu ölçülerek etiketlendi.

2.6.PCR Pürifikasyonu:

Kimyasallar

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, cat. No. 11 732 668 001)

DNA örneği

Ekipmanlar

Microsantrifüj (hitachi, VWR, himac CT 15 RE)

1,6 ml Microsantrifüj tüpleri (Neptune, 3745.S.X)

Protokol

1. Saflaştırılmak istenen örnek 100 µl'ye tamamlanır.
2. Örnek üzerine 500 µl Binding Buffer eklenir
3. Pipetaj yapılarak iyice karıştırılan örnek, filtre tüplerine aktarılır.
4. 1 dakika 15.000 g'de santrifüj edilir. Altta toplanan sıvı dökülür.

5. Filtre tüpüne 500  l Wash Buffer eklenir.
6. 1 dakika 13.000 g'de santrifüj edilir. Altta toplanan sıvı dökülür.
7. Filtre tüpüne 200  l Wash Buffer eklenir.
8. 1 dakika 13.000 g'de santrifüj edilir. Altta toplanan sıvı dökülür.
9. Filtre tüpüne 50  l Elution Buffer eklenir.
10. 4 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
11. Toplama kabı yerine 1,5 ml'lik microsantrifüj tüpü konur.
12. 1 dakika 13.000 g'de santrifüj edilir.
13. Toplanan sıvının konsantrasyonu ve OD değerleri  l lerek t p etiketlenir.

2.7. Agaroz Jel Elektroforezi:

Kimyasallar

6x LoadingDye^a, TBEBuffer^b

DNA  rnekleri

Agaroz(Invitrogen, cat. No. 16500-100)

Ethidiumbromide (Merck, 11608.0030)

Ekipmanlar

Mikrodalga fırın (Samsung), Parafilm (Parafilm, PM-996)

Makas (Mikro), Pipet/tip

Elektroforez Tankı (Cleaver, cat. No. MSMIDI7)

Güç kaynağı (VWR, cat. No. 93000-744), U.V. Transilluminat r

Reaktif Hazırlanışı

^a6x Loading Dye:

0.0125g Xylene Cyanol (Sigma, cat. No. X4126)

0.0125g Bromophenol Blue (Sigma, cat. No. B8026)

3 ml Glycerol

7 ml ddH₂O

^bTBE Buffer:

108 g Tris Base

55 g Boric Asit

40 ml EDTA pH8.0

1 litreye tamamlanır.

Protokol

1. (0,8 lik jel için) 0,8 g agaroz 100 ml TBE buffer içine eklenir.
2. Karışım homojen olana kadar mikrodalga fırında ısıtılır.
3. Karışımın içine 3,6 µl etidium bromide eklenir ve jel tanklarına dökülür
4. İstenen büyüklükte taraklar yerleştirilerek jel kurumaya bırakılır.
5. Kuruyan jel elektroforez tankı içine alınır.
6. Örneklerin sığacağı büyüklükte parafilm kesilir.
7. Her bir örnek için 1 µl 6x Loading Dye parafilm üzerinde konur.
8. 5 µl DNA örneği 1 ul Loading Dye ile parafilm üzerinde karıştırılarak agaroz jelde belirlenen kuyucuğa yüklenir.
9. 80 V da 45 dakika yürütülür.
10. Yürüyen bantlar UV transilluminatörde görüntülenir.

2.8. Enzim Kesimi:

Kimyasallar

EcoRI (NEB cat. No. R3101S)

BamHI (NEB cat. No. R3136V)

NEBuffer 4 (NEB, enzimler ile birlikte temin edilmektedir.)

Vektör DNA, DNA template (500ng)

Moleküler sınıf su (Thermo Scientific, cat. No. SH30538.01)

Ekipmanlar

İnkübatör (Nüve FN400)

200 µl steril tüp (Neptune, cat. No. 3423.S.X), Pipet/Tip

Protokol

10X Buffer 4	5µl
EcoRI Enzyme	1µl
BamHI	1µl
DNA örneği (500 ng)	X µl
ddH ₂ O	X µl
Toplam	50µl

1. DNA örneği hariç diğer kimyasallar karıştırılarak örnek sayısınca master mix hazırlandı.
2. Hazırlanan master mix, 200 ul'lik tüplere eşit miktarda dağıtıldı.
3. Karışım içine 500 ng DNA örneği konularak 37°C'de 60 dk inkübe edilir.
4. Kesim işleminin kontrolü elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi.
5. Kesilen örnekler saflaştırma işlemi için +4°C'de muhafaza edildi.

2.9. Plasmid İzolasyonu:

Kimyasallar

Sıvı kültürü yapılmış Bacteri Kolonileri (E.Coli, DH5-alfa suşu)

Gene jet midiprep kit (Thermo Scientific, cat. No.K0482)

Ekipmanlar

Santrifüj (Nüve, FN 1200)

Falkon tüpleri 15ml (Thermo Scientific, Nunccat. No. 339650)

1,6 ml Microsantrifüj tüpleri (Neptune, 3745.S.X), Pipet/tip

Protokol

1. 50 ml LB (antibiyotik dirençli) içinde çoğaltılan bakteriler 5.000g de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
2. Pellet üzerine 2 ml Resuspension Solution koyuldu. Pellet çözülene kadar vortexlendi.
3. 2 ml Lysis Solution konularak kibar bir şekilde tüp 4-6 defa ters-düz edildi. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. 2 ml Neutralization Solution konularak tüp hemen 5-8 defa ters-düz edildi.
5. 0.5 ml Endotoxin Binding Reagent konularak tüp hemen 5-8 defa ters-düz edildi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. 30 dakika, oda sıcaklığında, 5.000 rpm 'de tüpler santrifüj edildi.
7. Supernatant temiz 15 ml'lik falkonlara alındı.
8. 96% Etanol eklenerek tüpler 5-6 defa ters-düz edildi.
9. 5.5 ml sıvı kolonlara aktarılarak 2.000 g de 3 dakika santrifüj edildi.
10. Tüplerdeki sıvı bitene kadar 9. Basamak tekrar edildi.
11. 4 ml Wash Solution I kolonlara eklenerek 3.000 g de 2 dakika santrifüj edildi.

12. 4 ml Wash Solution II kolonlara eklenerek 3.000 g de 2 dakika santrifüj edildi.
13. 12. Basamak tekrar edildi.
14. 3.000 g de 5 dakika santrifüj edilerek kolon tamamen wash solüsyonundan arındırıldı.
15. Kolon filtresi temiz bir falkon tüpüne aktarılarak üzerine 0.35 ml elution buffer konuldu.
16. 4 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
17. 5 dakika 3.000 g'de santrifüj edildi. Elüsyon, microsantrifüj tüplerine aktarıldı.
18. Elüsyonun konsantrasyonu ve OD değeri ölçülerek etiketlendi.

2.10. Ligasyon:

Kimyasallar

T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, cat. No. EL0016)

Vektör DNA (100 ng) (EcoRI-BamHI kesik)

DNA örneği (300ng – 500ng) (EcoRI-BamHI kesik)

Moleküler sınıf su (Thermo Scientific, cat. No. SH30538.01)

Ekipmanlar

Thermal Cycler (Techne, 5000)

200 µl steril tüp (Neptune, cat. No. 3423.S.X), Pipet/Tip

Protokol

Vektör DNA (100 ng)	Xµl
DNA örneği (300ng,500ng)	Xµl
10X T4 DNALigaseBuffer	2 µl

T4 DNALigase Enzim	1 µl
ddH ₂ O	X µl
Toplam	20µl

- 1- DNA örneği hariç diğer kimyasallar karıştırılarak örnek sayısınca master mix hazırlandı.
- 2- Hazırlanan master mix, 200 µl'lik tüplere eşit miktarda dağıtıldı.
- 3- Mix içine 300ng veya 500ng DNA örneği konuldu.
- 4- Thermalcycler'da 22°C de 10 dakika, ardından 70°C de 5 dakika inkübe edildi.

2.11. Transformasyon:

Kimyasallar

Competent Bacteri Kolonileri (E.Coli, DH5-alfa suşu), Plasmid DNA

LB-Broth (Sigma, cat. No. L2897), LB-Agar(Lennox, cat. No. 1231.00)

Ekipmanlar

İnkübatör (Nüve, EN 032), Isı bloğu (Techne, Dri-Block DB-2D)

Pipet/tip, BunsenBurner, Cam Loop

LB-Broth hazırlanışı

100 ml deionize su içine 2,5 gr LB-Broth eklenir.

Otoklavlanır.

Soğuması beklenir.

Gerekli ise uygun antibiyotik 25 ug/ml veya 50 ug/ml olacak şekilde karışıma eklenir.

LB-Agar Plate hazırlanışı

100 ml deionize su içine 3,5 gr LB-Agar eklenir.

Otoklavlanır.

50 - 60°C'ye kadar soğuması beklenir.

Gerekli ise uygun antibiyotik 25 ug/ml veya 50 ug/ml olacak şekilde karışıma eklenir.

Karışım petri kaplarına Bunsen Burner'in yanında steril bir şekilde aktarılır. Kaplar parafilmlelenerek +4°C'de muhafaza edilir.

Protokol

1. 50 ul Competent Hücre -80 °C'den buz üzerine alınarak 5 dakika buzda çözülmesi beklenir.
2. 1 ul Plasmid DNA Competent Hücrelere eklenir ve yavaşça pipetaj yapılarak karıştırılır.
3. 45 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
4. 42°C de 1 dakika heatshock uygulanarak tekrar buz üzerine alınır.
5. Bunsen Burnerin yanında steril bir şekilde 100 ul sıvı, antibiyotiksiz LB-Broth, Competent hücrelere eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edilir.
6. Bakteriler uygun antibiyotikli LB-Agarlı plâtelere, Bunsen Burner'in yanında cam loop yardımıyla steril bir şekilde yayılır.
7. 16 saat 37°C'de, kapakları aşağı bakacak şekilde inkübe edilerek koloni oluşumu gözlemlenir.

2.12. Bakteri Kültürü:

Kimyasallar

LB-Broth (Sigma, cat. No. L2897), LB-Agar (Lennox, cat. No. 1231.00)

Ekipmanlar

İnkübatör (Nüve, EN 032), Steril kürdan, Bunsen Burner

Protokol

1. LB-Agar plâtelere gözlenen tek koloniler kürdan yardımıyla, Bunsen Burner'in yanında steril bir şekilde alınır.

2. Uygun antibiyotikli, 3 ml LB-Broth içinde eklenir.
3. 8 saat 37°C'de çalkalanması sağlanarak inkübe edilir.
4. Çoğalan bakterilerden 50-100 ul alınarak 100 – 500 ml LB-Broth bulunan kaplara aktarılır.
5. Overnight çalkalanması sağlanarak gerekli bakteri popülasyonu elde edilir.

2.13. DNA Dizileme:

Kimyasallar

ABI 310/3130 DNA dizileme reaktifleri;

5x buffer, Mix3.1 (Bigdye), Sephadex, ddH2O

Ekipmanlar

ABI 310/3130 (Life Technologies), Thermalcycler (Techne, 5000)

Santrifüj (hitachi, VWR, himac CT15RE),

200 µl tüp,

Falkon15 ml

Spin kolon

Protokol

Sekans PCR:

1. Reaksiyon karışımı hazırlanır (Bir örnek için).

Mix3.1 (BigDye)	2 µl
5x Buffer	2 µl
Primer (2 pmol)	2 µl

H ₂ O (nuclease free)	2 µl
Toplam	8 µl

2. Her örnek için 200 µl'lik tüpe karışımdan 8 µl konur.
3. Üstlerine 2 µl Jel ekstraksiyonu veya PCR pürifikasyonu yapılmış DNA örneği konur.
4. Pozitif kontrol olarak PGEM vektörü kullanılır. Bu mix ayrı bir tüpte hazırlanır.

Mix3.1	2 µl
5x buffer	2 µl
M13 primer	2 µl
H ₂ O (nuclease free)	2µl
PGEM	2 µl
Toplam	10 µl

5. Örnekler termal cycler'ın içine konur.
6. PCR koşulları;

96°C de 1 dakika initial denaturation	25 Cycle
96°C de 15 saniye denaturation	
50°C de 15 saniye annealing	
60°C de 4 dakika extention	
No final extention	

7. PCR başlatılır.

Sephadex Kolonların Hazırlanışı:

1. 15 ml'lik Falkon tüpü içinde 1 gr Sephadex 14 ml MiliQ içinde iyice çözünür.
2. İçindeki maddenin porlu yapıya ulaşması için en az 1 saat +4°C'de bekletilir. Ara sıra çalkalanır.
3. Kolon tüpleri işaretlenerek Sephadex kullanımına hazır hale getirilir.
4. 1 ml'lik tipin ucu kesilir.
5. Sephadex iyice karıştırıldıktan sonra pipetaj yapılarak her kolon tüpüne 750 µl konulur.
6. Kolon tüpleri 4800 rpm'de 3 dakika 4°C'de santrifüj edilir.
7. Toplama tüplerindeki su atılır
8. Toplama tüpü peçeteye vurdurularak içindeki sıvının iyice uzaklaşması sağlanır.

Sekans Örneklerinin Hazırlanışı:

1. Örnekler yatay duran Sephadex tabakasının tam ortasına değdirilmeden konulur.
2. 4800 rpm 3 dakika 4°C'de santrifüj edilir.
3. Toplama kabındaki sıvının hepsi sekans tüplerine konur. 10 µl'den az çıkan örneklerin üstü MilQ ile tamamlanır.
4. Üstleri Gri sekans tıparları ile kapatılarak okuma işlemi için cihaza yüklenir.
5. ABI 310 cihazında her örnek 1 saat içinde analiz için hazır hale gelir.
(ABI 3130 cihazı için 4 örnek)

2.14. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Kimyasallar

Suspend Hücreler, Opti-MEM (Gibco, cat. No. 31985-047)

Ekipmanlar

Sınıf II BioGüvenlik Kabini, RTCA- DP sistemi (Roche)

E-Plate 16 (Roche), İnkübatör (Sanyo, MCO-5AC), Pipet/tip

Protokol

1. Opti-MEM ile suspend edilmiş hücreler 1' lık E-Platelere, her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde ekilerek inkübatöre yerleştirilir.
2. Hücrelerin tutunması ve proliferasyonları gerçek zamanlı olarak izlenir.
3. Logaritmik büyüme fazının orta bölümünde transfeksiyon gerçekleştirilir.
4. Transfekte edilen hücrelerin proliferasyon eğrileri incelenerek, transfeksiyonun hücreler üzerindeki etkisi değerlendirilir.

2.15. Migrasyon Assay:

Kimyasallar

Adherent Hücreler (24 well)

High Glukoz DMEM (Gibco, cat. No. 11965-092)

Ekipmanlar

İnverted mikroskop (Leica, DFC295)

24well plate (Thermo Scientific, cat. No. 142475)

İnkübatör (Sanyo, MCO-5AC)

Protokol

1. Hücreler Transfekte edildikten 24 saat sonra deney gerçekleştirildi.
2. 24 well platelerde 1000 µl'lik tip ucu ile kuzey-güney doğrultusunda yara açıldı.
3. Serolojik pipet yardımı ile besi yeri değiştirilerek inverted mikroskopta yaraların resimleri çekildi.
4. Hücreler inkübatörde (37°C, 5% CO₂) inkübe edildi.
5. 0, 12, 24, 36, 48 saatlerde besi yeri değiştirilip tekrar resimler çekilerek hücrelerin yarayı kapatıp kapatmadığı kontrol edildi.

2.16. Transfeksiyon:

Kimyasallar

Lipofectamine 2000 (Invitrogen cat. No. 11668-019)

Opti-MEM (Gibco, cat. No. 31985-047),

Adherent Hücreler (24 well / 96 well)

DMEM, High Glucose (Gibco, cat. No. 11965-092)

Vektör Plasmid/Raportör Vektör

Ekipmanlar

Class 2 güvenlik kabini, İnkübatör (Sanyo, MCO-5AC)

1,6 ml Microsantrifüj tüpleri (Neptune, 3745.S.X)

Su Banyosu (Mettler, WNE 14)

Floresan mikroskop (Leica, DFC295 – ebq100-04)

24well plate (Thermo Scientific, cat. No. 142475)

Protokol (24 well protokolü)^a:

1. Hücreler transfeksiyondan bir gün önce Opti-MEM ile plâtelere ekilir.
 2. Her bir kuyucuk için 1 µg Vektör, 50 µl Opti-MEM içinde seyreltilir.
 3. Her bir kuyucuk için 2 µl Lipofectamine 2000, 50 µl Opti-MEM içinde seyreltilir, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
 4. Seyreltilmiş vektör ve Lipofectamin 2000 karışımları birbirine nazikçe eklenerek karıştırılır.
 5. Karışım 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
 6. 500 µl Opti-MEM konulmuş her kuyucuğa, 100 µl bu karışımdan eklenir.
 7. Nazikçe karışımın kuyucukta homojen olarak karışması sağlanır.
 8. 6 saat sonra Opti-MEM besi yeri DMEM besi yeri ile değiştirilir.
 9. Transfeksiyon sonuçları 24-48 saat içinde gözlenir.
- ^a 96 well plate transfeksiyonu için firmanın önerdiği standart koşul ve değerler kullanılmıştır.

2.17. Hücre Kültürü:

Kimyasallar

DMEM, High Glucose (Gibco, cat. No. 11965-092)

FBS (HY- CH30160.02), Penisilin /streptomysin (HY-SV30010)

L-Glutamin (Wisent-609-065-ZL), Plasmocin (invivogen)

10xPBS, Trypsin-EDTA, Tryphan Blue

Ekipmanlar

Class 2 güvenlik kabini, İnkübatör (Sanyo, MCO-5AC)

Su Banyosu (Mettler, WNE 14),

25 cm² Flask (Thermo Scientific, Nunc)

75 cm² Flask (Thermo Scientific, Nunc)

Pipet Tabancası, Serolojik Pipetler, Hemositometre

Santrifüj (Hettich, Rotina 380 R)

Protokol

Besi Yeri Hazırlanışı:

50 ml FBS, 5 ml penisilin /streptomysin, 4 ml L-Glutamin, 0.5ml Plasmocin DMEM besi ortamına eklenerek hazırlanır.

Stok Hücrelerin Ekimi:

1. Su banyosu 37°C'ye ayarlandı.
2. Stok hücreler alınarak 37°C'deki ısıtıcıda 2 dakika bekletildi.
3. Cryovial tüplerin etrafı alkol ile temizlenip, kapak o şekilde açıldı.
4. 9 ml DMEM besi ortamı konmuş flasklara hücreler ekildi.
5. Ekilen hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre kondu.

Hücrelerin Pasajlanması:

1. Besi ortamı boşaltılır.
2. Flask 10 ml 1XPBS ile yıkanır.
3. 1,5 ml Trypsin-EDTA eklenip, inkübatöre konulur, 2-4 dk beklenerek hücrelerin kalkması sağlanır.
4. 5 ml besi ortamı eklenir, pipetaj yapılarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarılır.
5. 1100 rpm'de 25°C'de 3dk santrifüj yapılır.
6. Süpernatant atılır ve temiz besi ortamı eklenerek istenilen deney kabına ekim işlemi gerçekleştirilir.

Hücrelerin Beslenmesi:

%90 hücre yoğunluğu elde edilene kadar, 2 günde bir, kirlenen besi ortamı yenisi ile değiştirildi.

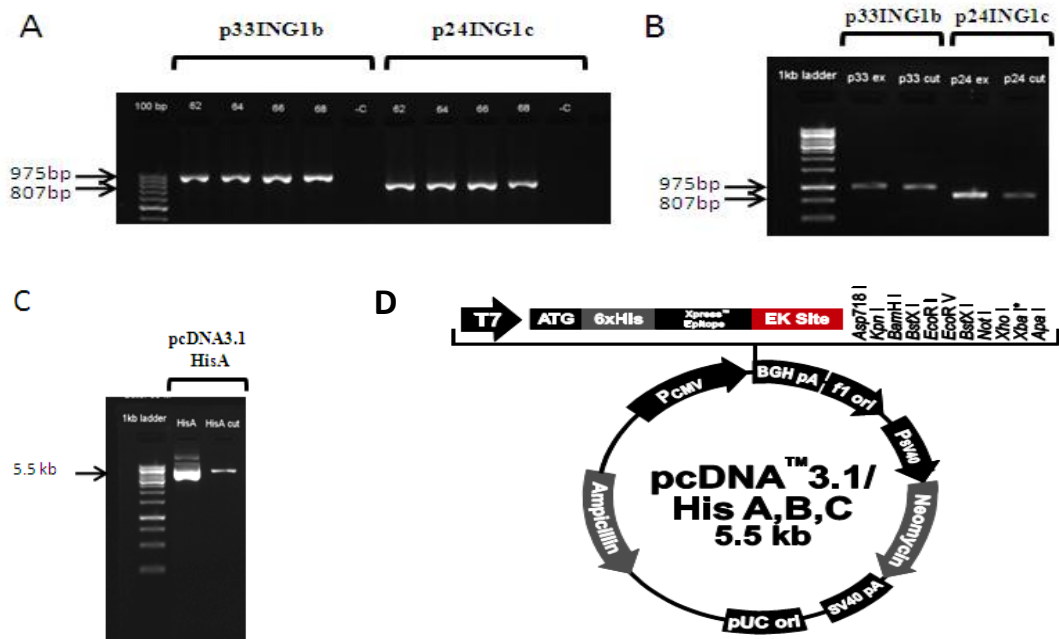
Hücre Sayımı:

1. 100 ul Trypan Blue, 100 ul hücre örneği ile karıştırılır.
2. Hemositometre yardımı ile toplam hücre sayısı elde edilir.
3. Hemositometrede 5 alan sayıldı ve konsantrasyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı.
4. Konsantrasyon (hücre/ml) = (Toplam yaşayan hücre sayısı/5)*Seyreltme Faktörü*10⁴
5. 96 wellplate'e her well'de 10.000 24 wellplate'de her well'de 40.000 hücre olacak şekilde hücreler ekilir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

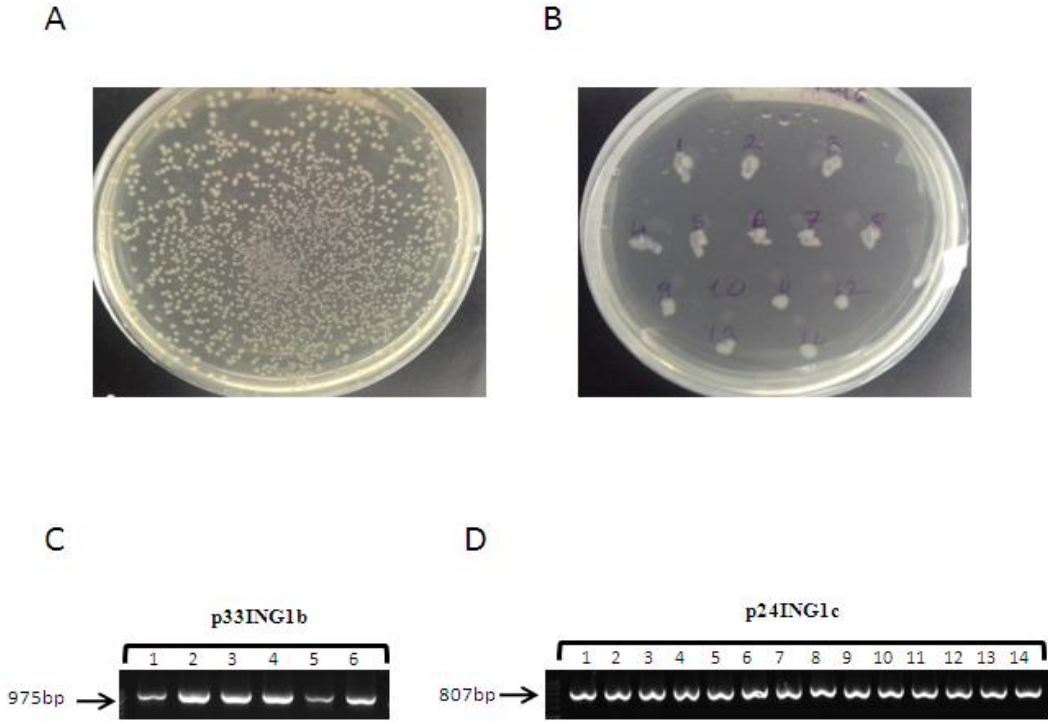
p33ING1b ve p24ING1c Splicing Varyantlarının Klonlanması: p33ING1b ve p24ING1c varyantlarının klonlanabilmesi için primerler dizayn edilmiştir. Primerler dizayn edilirken primerlere restriksiyon enzim kesim noktaları konmuş ve bu noktaların kullanılacak vektör'lede uyumlu olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca primerler tasarlanırken ORF (open reading frame)'in istenilen protein kodon yapısını oluşturmasına dikkat edilmiştir. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları in Slico ortamda belirlenmiş, insan cDNA Kütüphanesi kullanılarak, gradient PCR yöntemi ile test edilmiştir. PCR işlemi sonucu tahmin edilen dört farklı sıcaklıkta (62°C, 64°C, 66°C, 68°C) da primerlerin bağlandığı, 975 bp uzunluğunda p33ING1b ve 807 bp uzunluğunda p24ING1c varyantlarının sentezlendiği ve yeterli miktarda PCR ürününün olduğu gözlenmiştir (Şekil 1A).

PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Arındırılması ve Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi: PCR işlemi sonucunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntüledikten sonra jelden arındırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 1B). Böylece, primer ve diğer reaktifler PCR ürünlerinden uzaklaştırılmıştır. Saf olarak elde edilen iki varyanta ait DNA parçaları vektörle rekombine edilmeden önce Restriksiyon Endonükleazlar (EcoRI–BamHI) ile kesilmiş, ardından saflaştırma işlemi gerçekleştirilerek atık parça ve enzimlerden izole edilmesi sağlanmıştır (Şekil 1B). Aynı şekilde vektör DNA (pcDNA3.1 HisA) da aynı Restriksiyon Endonükleazlar ile kesilerek saflaştırılmıştır (Şekil 1C).



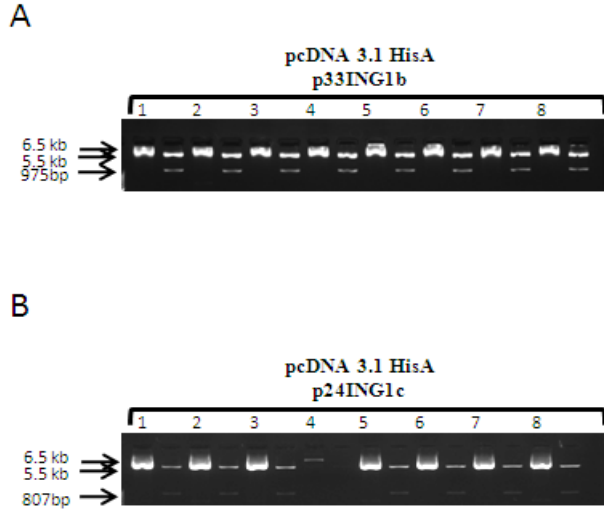
Şekil 1: Splicing Varyantların Sentezi, Enzim Kesimi ve Saflaştırılması A) 975 bp uzunluğunda p33ING1b ve 807 bp uzunluğunda p24ING1c gradient PCR yöntemi ile sentezlenmiştir. B) Sentezlenen ürünler jelden ekstrakte edilerek EcoRI ve BamHI Restriksiyon Endonükleazları ile kesilip saflaştırılmıştır. C) Insert'lerin aktarılacağı pcDNA3.1 vektörü de aynı enzimler ile kesilmiş ve saflaştırılmıştır. D) pcDNA3.1 HisA Vaktör haritası

Ligasyon ve Transformasyon: Kesilen varyant DNA'lar ve vektör, ligasyon yoluyla birleştirilmiş ve oluşan vektör plasmid, bakterilerin transformasyona en uygun suşu olan DH5Alfa suşuna transforme edilmiştir (Şekil 2A). Transformasyon sonucunda ampicillin dirençli bakteri plate'lerinde beliren tek koloniler seçilerek verifikasyon PCR'ı yapılmıştır (Şekil 2B,2C,2D). Bu işlem sonucunda p33ING1b varyantına sahip 6, p24ING1c varyantına sahip 14 farklı pozitif bakteri kolonisi tespit edilmiştir.



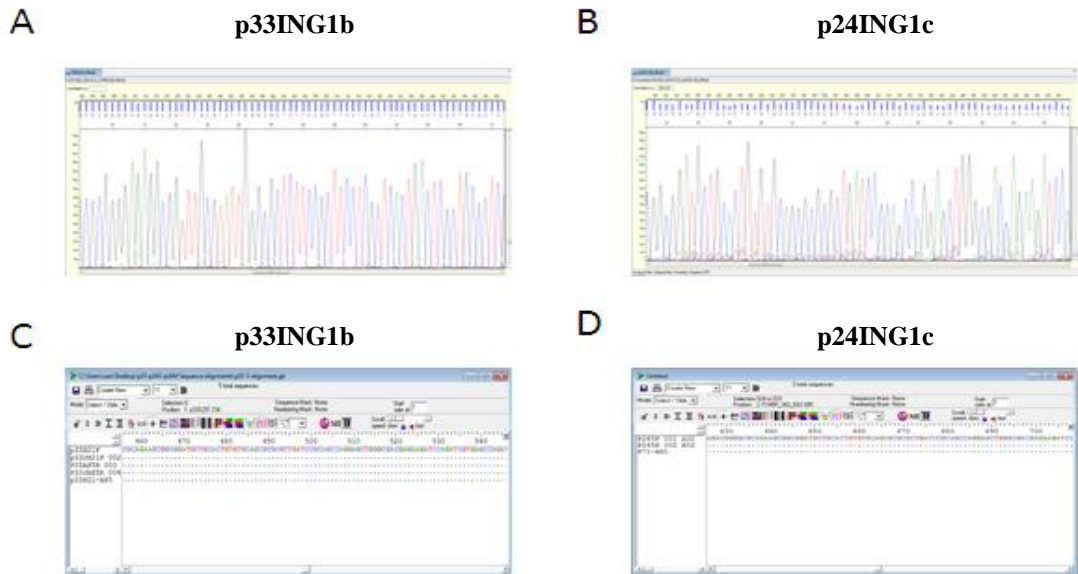
Şekil 2: **Transformasyon ve Verifikasyon PCR’i.** A) Vektör plazmid transformasyonu gerçekleşen bakteriler Ampicillin dirençli plate’de çoğalmışlardır. B) Tek koloniler seçilmiştir. C) Verifikasyon PCR’i ile 975 bp uzunluğunda p33ING1b varyantına sahip 6 pozitif koloni belirlenmiştir. D) Verifikasyon PCR’i ile 807 bp uzunluğunda p24ING1c varyantına sahip 14 pozitif koloni belirlenmiştir.

Pozitif koloniler sıvı kültüre alınmış, sıvı kültürü yapılan bakterilerden vektör plazmidler izole edilerek Restriksiyon Endonüklazlar (EcoRI–BamHI) ile kesilmiştir (Şekil 3A,3B). Vektör ve varyant uzunlukları kontrol edilerek uygun plazmidler seçilmiştir.



Şekil 3: Vektör Plasmidlerin izolasyonu ve Enzim Kesimi. A) Her kuyucuğa, p33ING1b varyantına sahip izole edilmiş vektör plasmidler ve enzim kesim sonucu sırasıyla yüklenmiştir. B) Her kuyucuğa, p24ING1c varyantına sahip izole edilmiş vektör plasmidler ve enzim kesim sonucu sırasıyla yüklenmiştir.

Plazmidlerin Doğruluk Analizi: Seçilen plazmidlerde mutasyonun olup olmadığı sekans yöntemi ile belirlenmiş, her plazmid forward ve reverse bölgeden sekanslanarak protein kodlayan bölgenin tüm verileri elde edilmiştir (Şekil 4A,4B). Sekans verileri ile NCBI veri tabanından elde edilen referans dizi, BioEdit programı ile karşılaştırılarak klonlanan varyantlarda mutasyonun olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4C, 4D)



Şekil 4. Dizi Analizi ve Multiple Alignment. A) p33ING1b varyantının dizi analiz sonucu B) p24ING1c varyantının dizi analiz sonucu. C) p33ING1b varyantının referans dizi ile karşılaştırılması. D) p24ING1c varyantının referans dizi ile karşılaştırılması.

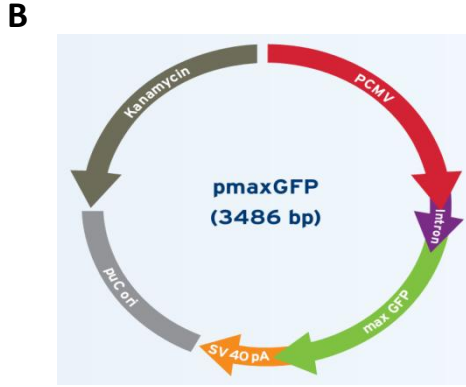
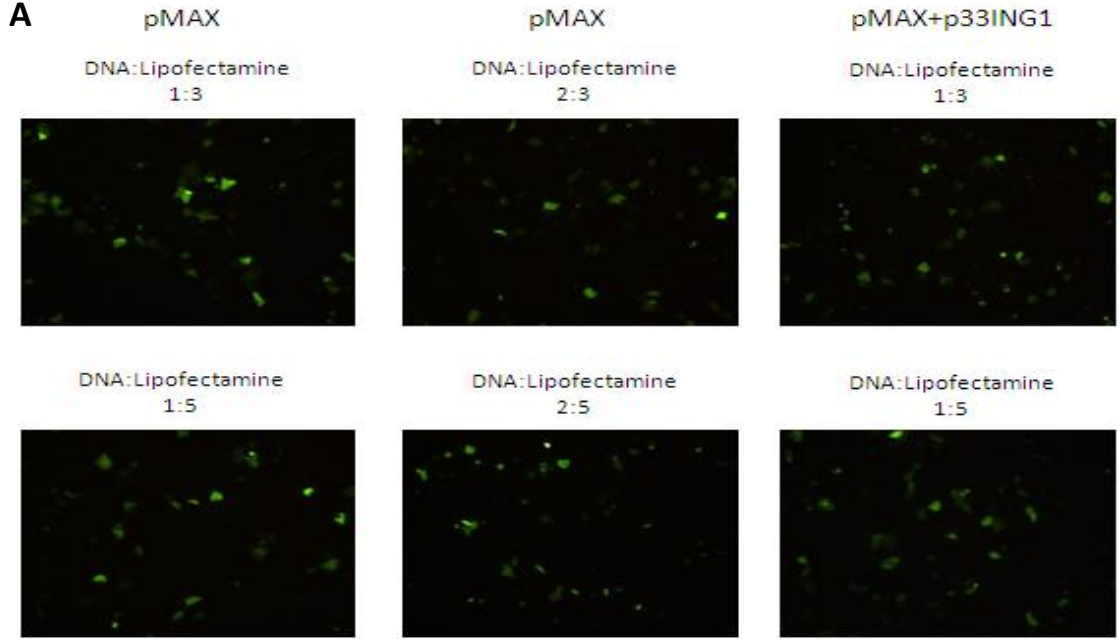
Hücre Hatlarında p53 Gen Mutasyon Durumu: p53 geninde mutasyonların büyük bir kısmı Exon4 ve Exon9 arasında bulunmaktadır. Araştırmada kullanılan primer ve metastatik iki hücre hattı (UT-SCC 74A, UT-SCC 74B) p53 gen mutasyonu yönüyle incelenmiştir. Exon4 ve Exon9 arasında yapılan tüm exon dizileme sonuçlarına göre iki hücre hattında da bulunan ortak 3 varyasyon tespit edilmiştir (Tablo 1). Bu varyasyonlar exon4 (kodon72), exon6 (kodon193) ve exon8 (kodon305)'de lokalizedir.

Hücre Hattı	Mutasyon Noktası	Exon	Kodon	WT Kodon	Mutant Kodon	WT A.A.	Mutant A.A.	Durum
74A	11397	exon4	72	CCC	CGC	Pro	Arg	C->G
74A	13844	exon8	305	AAG	CCG	Lys	Pro	A->A,C
74A	12598	exon6	193	CAT	CGT	His	Arg	A->G
74B	11397	exon4	72	CCC	CGC	Pro	Arg	C->G
74B	13844	exon8	305	AAG	CCG	Lys	Pro	A->A,C
74B	12598	exon6	193	CAT	CGT	His	Arg	A->G

Tablo 1: HNSCC Hücre Hatlarında p53 Mutasyonlarının Belirlenmesi. Primer (74A) ve Metastatik (74B) hücre hatlarında p53 mutasyon analizi yapılmış ve her iki hücre hattında homozigot kodon 72, homozigot kodon 193 ve heterozigot kodon 305 mutasyonu gösterilmiştir.

Transfeksiyon Optimizasyonu: Oluşturulan vektörlerin kimyasal ajanlarla hücre içerisine transferi, hücre proliferasyonu ve migrasyonu deneylerinden önceki en önemli basamaktır. Kullanılan vektörün saflığı, konsantrasyonu, miktarı ve kullanılan ajanlar hücrelerin farklı reaksiyonlar vermesine neden olmaktadır. Bu nedenle hücrelere en etkili ve verimli bir şekilde transferin gerçekleştirilmesi ve hücre kimyasına da zarar verilmemesi gerekir. Bu amaçla farklı Vektör:Kimyasal

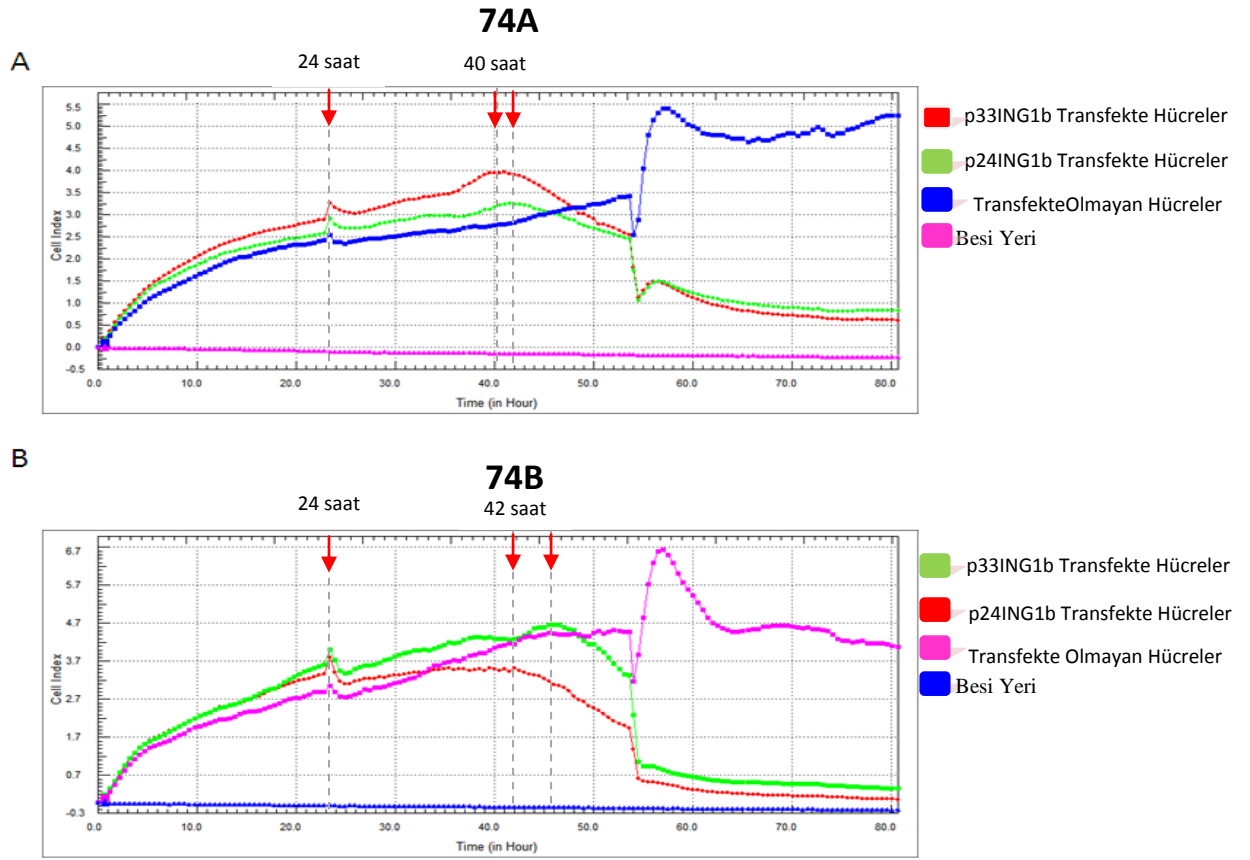
Ajan konsantrasyonları denenerek en optimize değerler saptanmıştır. Verimliliğin belirlenmesinde raportör vektör olarak GFP (Green Flourescen Protein) içeren pMAX vektörü kullanılmış, 1:3 oranının en optimal değer olduğu bulunmuştur (Şekil 5A, 5B).



Şekil 5: **Transfeksiyon Optimizasyonu.** A) Farklı Vektör:Kimyasal Ajan konsantrasyonları (1:3, 1:5, 2:3, 2:5) denenerek en optimal şart belirlenmiştir. B) pmaxGFP Vektör haritası

Proliferasyon Assay: Serumsuz ortamda kültüre edilen primer ve metastatik hücre hatları, 74A ve 74B, 24. saatte klonlanan iki splicing varyant (p33ING1b ve p24ING1c) ile transfekte edilmiş, xCELLigence sistemi ile hücrelerin proliferasyonları 80 saat boyunca gerçek-zamanlı olarak incelenmiştir. Elde edilen

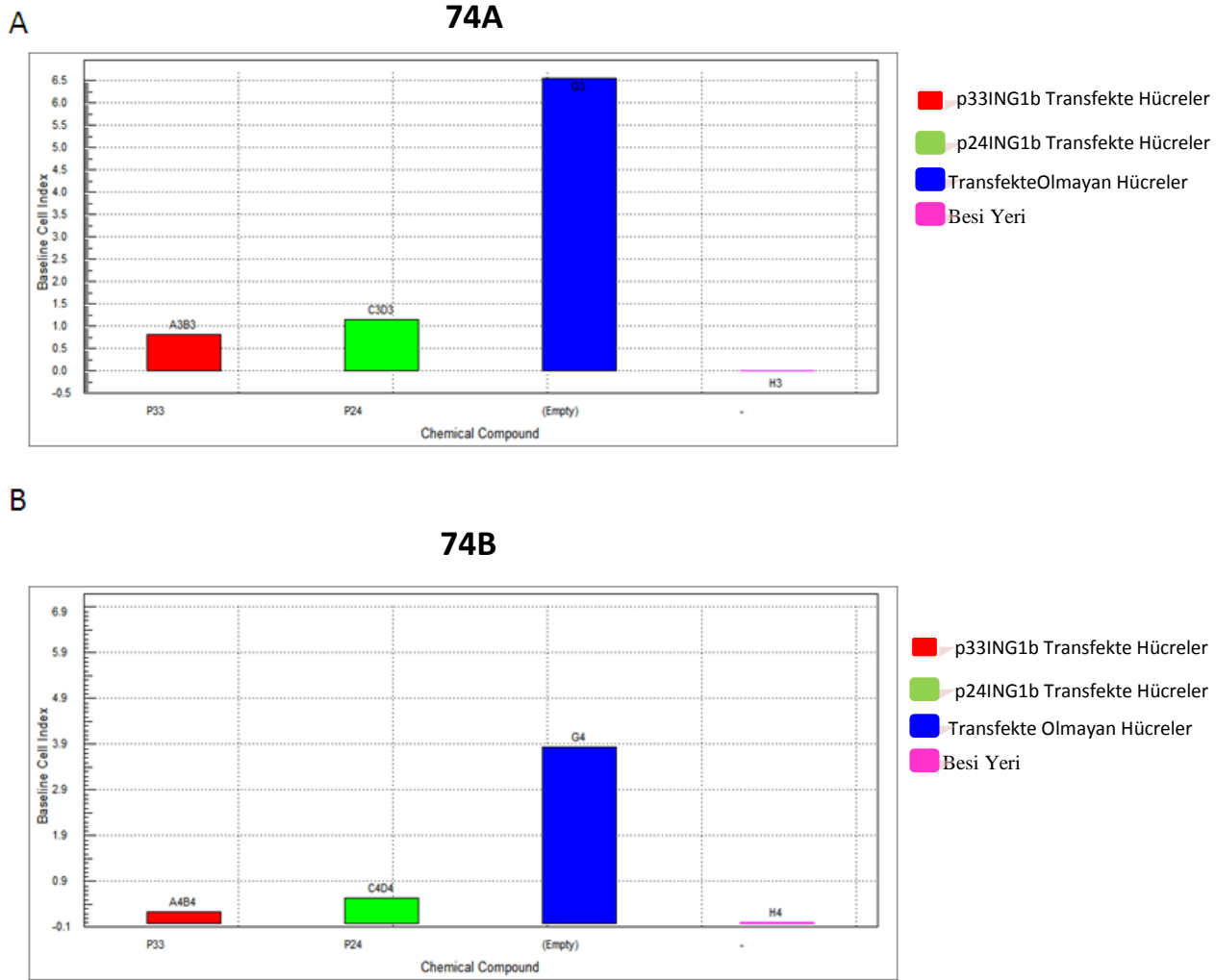
verilere göre, transfeksiyon işleminden 16 saat sonra p33ING1b hücrelerin proliferasyonuna negatif yönde etki etmeye başlayarak hücrelerin ölümüne neden olmuştur (Şekil 6A). Yine buna benzer bir etki p24ING1c'de de görülmektedir. Transfeksiyon işleminden 18 saat sonra ifadesi artan p24ING1c, hücrelerin proliferasyonunu durdurarak hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. 54. Saatte besi yeri değiştirilmiş, ölen hücreler ortamdan uzaklaştırılmış, p33ING1b ve p24ING1c ile transfekte edilen hücre hatlarında yaşayan hücre sayısının anlamlı bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 6A, 6B).



Şekil 6: **Hücre Proliferasyon Analizi.** A) xCELLigence sistemi ile ING1 splicing varyantlarının primer HNSCC hücre hattındaki proliferasyonu üzerindeki etkisi gösterilmiştir. B) xCELLigence sistemi ile ING1 splicing varyantlarının metastatik HNSCC hücre hattındaki proliferasyonu üzerindeki etkisi gösterilmiştir.

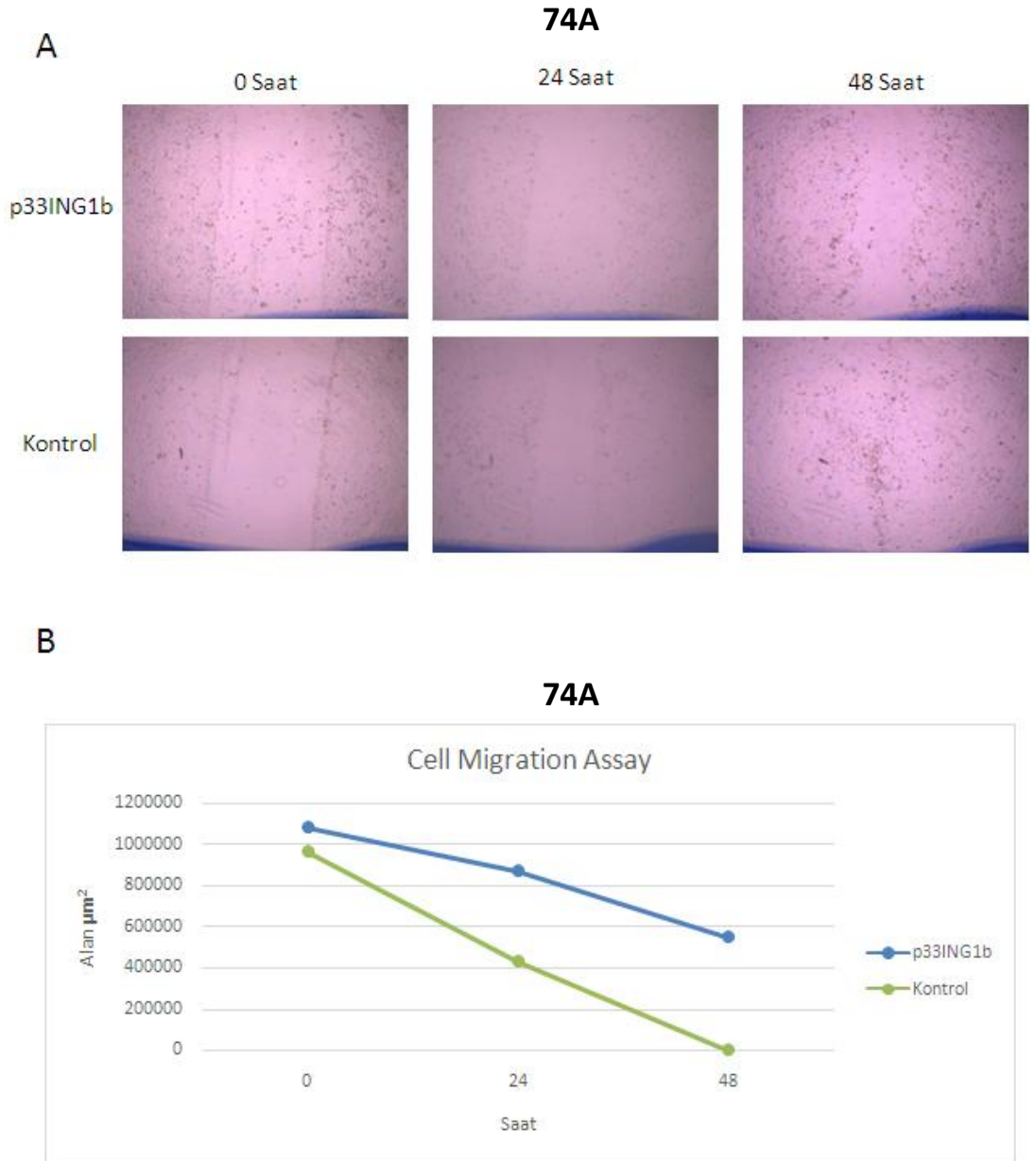
3 kopya olarak gerçekleştirilen deneyde, verilerin ortalamaları alınarak grafiğe yansıtılmıştır. Deney sonucunda oluşan Cell Index'ler karşılaştırıldığında primer HNSCC hücrelerinde (74A), p33ING1b ile transfekte edilen hücreler kontrol

hücrelerine kıyasla 8.125 kat, p24ING1c ile transfekte edilen hücreler ise kontrol hücrelerine kıyasla 6 kat daha az çoğalmıştır. Metastatik HNSCC hücrelerinde (74B) ise p33ING1 ile transfekte edilen hücrelerde 12.6 kat, p24ING1c ile transfekte edilen hücrelerde 6.3 kat azalma gözlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7: **Cell Index Analizi** A) xCELLigence sistemi ile ING1 splicing varyantlarının primer (74A) HNSCC hücre hattındaki proliferasyonu üzerindeki etkisi cellindexleri belirlenerek gösterilmiştir. B) xCELLigence sistemi ile ING1 splicing varyantlarının metastatik (74B) HNSCC hücre hattındaki proliferasyonu üzerindeki etkisi cell indexleri belirlenerek

Hücre Migrasyon Analizi: Hücre proliferasyonuna negatif yönde etkisi görülen ING proteinlerinin hücre migrasyonu üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Primer HNSCC hatlarında (74A) yapılan yara çalışmasında p33ING1b ile transfecte edilen tümör hücrelerinde %54 oranındaki alanın kapanmadığı, kontrol grubunda ise 48 saat sonunda yaranın tamamen kapandığı gözlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8: **Hücre Migrasyon Analizi.** A) p33ING1 varyantı ile transfecte edilen primer HNSCC hücre hatlarında yara açılarak 24. Ve 48. Saatte hücre migrasyonu gösterilmiştir. B) 48 saat sonunda açık kalan alanlar hesaplanarak deney ve kontrol grubu arasındaki fark sayısal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda rekombinant olarak elde edilen ING1 genine ait iki varyantının (p33ING1b, p24ING1c) hücre proliferasyonuna negatif yönde etki ederek tümör büyümesini yavaşlattığı, p33ING1 varyantının primer tümörlü hücre hatlarında proliferasyonu %88,7 oranında, metastatik hücre hatlarında proliferasyonu %92 oranında azalttığı, p24ING1 varyantının ise primer tümörlü hücre hatlarında proliferasyonu %83.4 oranında, metastatik hücre hatlarında proliferasyonu %84.1 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Bu hücre hatlarının migrasyon kabiliyetleri incelendiğinde ise, %54 oranında azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, ING1 varyantlarının (p33ING1b, p24ING1c), HNSCC gelişiminde anti-proliferatif özellik göstermesi açısından önemli olmakla birlikte, bu etkiyi hangi mekanizma ile gerçekleştirebileceği hakkında da öngörüler sunmaktadır. Literatürde ING1 proteinlerinin p53 bağımlı veya bağımsız yollardan hücre içi fonksiyonlara dahil olduğu belirtilmektedir. Yaptığımız çalışmada kullanılan hücre hatlarında p53 genine ait mutasyon taraması yapılmış ve hem primer, hem metastatik hücre hatlarında 3 farklı noktada (exon4, exon6, exon8) mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonların p53 proteininde fonksiyon bozukluğuna sebebiyet verebileceği düşünüldüğünde, ING1 varyantlarının p53 den bağımsız bir yolla hücre proliferasyonuna etki edebileceği düşünülmüştür. Bu durum, yapılabilecek farklı moleküler çalışmalar ile aydınlatılarak, ING1 proteinin etki mekanizmasının açıklanması yolunda önemli bir adım teşkil edebilir. Çalışmamızın sonucu ayrıca, ING1 varyantlarının potansiyel bir terapötik ajan olabileceği potansiyelini ortaya koymuştur. Verilerin validasyonunun farklı moleküler teknikler (Western Blot vb.) ile yapılarak, in vivo olarak da etkinliğinin gösterilmesi halinde, gen terapilerinde kullanılabilir alternatif bir ajan olma potansiyeli de mevcuttur.

4. KAYNAKÇA

1. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
2. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
3. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
4. Vineis, P., et al., *Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(2): p. 99-106.
5. Hashibe, M., et al., *Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(4): p. 696-703.
6. Sturgis, E.M. and Q. Wei, *Genetic susceptibility--molecular epidemiology of head and neck cancer*. Curr Opin Oncol, 2002. **14**(3): p. 310-7.
7. Proia, N.K., et al., *Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(6): p. 1061-77.
8. Pavia, M., et al., *Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(5): p. 1126-34.
9. Suarez, C., et al., *Tumours of familial origin in the head and neck*. Oral Oncol, 2006. **42**(10): p. 965-78.
10. Trizna, Z. and S.P. Schantz, *Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer*. Otolaryngol Clin North Am, 1992. **25**(5): p. 1089-103.
11. Foulkes, W.D., et al., *Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study*. BMJ, 1996. **313**(7059): p. 716-21.
12. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(19): p. 1944-56.

13. Kreimer, A.R., et al., *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(2): p. 467-75.
14. Hobbs, C.G., et al., *Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Clin Otolaryngol*, 2006. **31**(4): p. 259-66.
15. Munger, K. and P.M. Howley, *Human papillomavirus immortalization and transformation functions*. *Virus Res*, 2002. **89**(2): p. 213-28.
16. Slebos, D.J., et al., *Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. **36**(4): p. 409-17.
17. Licitra, L., et al., *High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(36): p. 5630-6.
18. Califano, J., et al., *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. *Cancer Res*, 1996. **56**(11): p. 2488-92.
19. Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin, and R.C. Jordan, *Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Clin Pathol*, 2006. **59**(5): p. 445-53.
20. Ha, P.K. and J.A. Califano, *Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma*. *Lancet Oncol*, 2006. **7**(1): p. 77-82.
21. McCaul, J.A., et al., *Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer*. *Lancet Oncol*, 2002. **3**(5): p. 280-8.
22. Mao, L., et al., *Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment*. *Nat Med*, 1996. **2**(6): p. 682-5.
23. Balz, V., et al., *Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens*. *Cancer Res*, 2003. **63**(6): p. 1188-91.

24. Pignataro, L., et al., *Clinical relevance of cyclin D1 protein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol, 1998. **16**(9): p. 3069-77.
25. Capaccio, P., et al., *Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes*. Head Neck, 2000. **22**(3): p. 234-40.
26. Grandis, J.R. and D.J. Tweardy, *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer*. Cancer Res, 1993. **53**(15): p. 3579-84.
27. Rubin Grandis, J., et al., *Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(11): p. 824-32.
28. Ferrara, N., *VEGF as a therapeutic target in cancer*. Oncology, 2005. **69** Suppl 3: p. 11-6.
29. Smith, B.D., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(10): p. 2046-52.
30. Kuss, I., et al., *Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3755-62.
31. Sankaranarayanan, R., et al., *Effect of screening on oral cancer mortality in Kerala, India: a cluster-randomised controlled trial*. Lancet, 2005. **365**(9475): p. 1927-33.
32. Ng, S.H., et al., *Prospective study of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomography and magnetic resonance imaging in oral cavity squamous cell carcinoma with palpably negative neck*. J Clin Oncol, 2006. **24**(27): p. 4371-6.
33. Branstetter, B.F.t., et al., *Head and neck malignancy: is PET/CT more accurate than PET or CT alone?* Radiology, 2005. **235**(2): p. 580-6.
34. Cooper, J.S., et al., *Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2004. **350**(19): p. 1937-44.

35. Garkavtsev, I.I., *Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 373.
36. Garkavtsev, I., et al., *The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 295-8.
37. Gunduz, M., et al., *Genomic structure of the human ING1 gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas*. Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3143-6.
38. Gunduz, M., et al., *Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers*. Oncogene, 2002. **21**(28): p. 4462-70.
39. Gunduz, M., et al., *Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas*. Gene, 2005. **356**: p. 109-17.
40. Shinno, Y., et al., *Fine deletional mapping of chromosome 4q22-35 region in oral cancer*. Int J Mol Med, 2005. **16**(1): p. 93-8.
41. Gunduz, M., et al., *Downregulation of ING3 mRNA expression predicts poor prognosis in head and neck cancer*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 531-8.
42. Cetin, E., et al., *Deletion mapping of chromosome 4q22-35 and identification of four frequently deleted regions in head and neck cancers*. Neoplasma, 2008. **55**(4): p. 299-304.
43. Gunduz, M., et al., *The inhibitor of growth (ING) gene family: potential role in cancer therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(4): p. 275-84.
44. Gunduz, M., et al., *Potential usage of ING family members in cancer diagnostics and molecular therapy*. Curr Drug Targets, 2009. **10**(5): p. 465-76.
45. Cengiz, B., et al., *Tumor-specific mutation and downregulation of ING5 detected in oral squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2010. **127**(9): p. 2088-94.
46. Gunduz, M., *Functions of the Tumor Suppressor ING Family Genes*. Journal of Oral Biosciences, 2005. **47**(3): p. 211-220.

47. Cengiz, B., et al., *Fine deletion mapping of chromosome 2q21-37 shows three preferentially deleted regions in oral cancer*. Oral Oncology. **43**(3): p. 241-247.
48. Chen, X., J. Du, and T. Zhu, *ING1a and ING1b different expressed in sporadic hepatocellular carcinoma*. Pathol Biol (Paris), 2009. **57**(3): p. e17-21.
49. Chen, L.S., et al., *Genetic alterations and expression of inhibitor of growth 1 in human sporadic colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(39): p. 6120-4.
50. Shen, D.H., et al., *Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer*. Carcinogenesis, 2005. **26**(4): p. 855-63.
51. Tallen, G., et al., *No ING1 mutations in human brain tumours but reduced expression in high malignancy grades of astrocytoma*. Int J Cancer, 2004. **109**(3): p. 476-9.
52. Tallen, G., K. Riabowol, and J.E. Wolff, *Expression of p33ING1 mRNA and chemosensitivity in brain tumor cells*. Anticancer Res, 2003. **23**(2B): p. 1631-5.
53. Bromidge, T. and C. Lynas, *Relative levels of alternative transcripts of the ING1 gene and lack of mutations of p33/ING1 in haematological malignancies*. Leuk Res, 2002. **26**(7): p. 631-5.
54. Campos, E.I., et al., *The novel tumour suppressor gene ING1 is overexpressed in human melanoma cell lines*. Br J Dermatol, 2002. **146**(4): p. 574-80.
55. Ito, K., et al., *Expression and sequence analyses of p33(ING1) gene in myeloid leukemia*. Am J Hematol, 2002. **69**(2): p. 141-3.
56. Tokunaga, E., et al., *Diminished expression of ING1 mRNA and the correlation with p53 expression in breast cancers*. Cancer Lett, 2000. **152**(1): p. 15-22.
57. Zhang, J.T., et al., *Nuclear to cytoplasmic shift of p33(ING1b) protein from normal oral mucosa to oral squamous cell carcinoma in relation to clinicopathological variables*. J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(3): p. 421-6.

58. Nouman, G.S., et al., *Downregulation of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in invasive carcinoma of the breast.* J Clin Pathol, 2003. **56**(7): p. 507-11.
59. Nouman, G.S., et al., *Loss of nuclear expression of the p33(ING1b) inhibitor of growth protein in childhood acute lymphoblastic leukaemia.* J Clin Pathol, 2002. **55**(8): p. 596-601.
60. Nouman, G.S., et al., *Nuclear to cytoplasmic compartment shift of the p33ING1b tumour suppressor protein is associated with malignancy in melanocytic lesions.* Histopathology, 2002. **40**(4): p. 360-6.
61. Tallen, G., et al., *The inhibitor of growth 1 (ING1) proteins suppress angiogenesis and differentially regulate angiopoietin expression in glioblastoma cells.* Oncol Res, 2009. **18**(2-3): p. 95-105.
62. Zhu, Z., et al., *Human inhibitor of growth 1 inhibits hepatoma cell growth and influences p53 stability in a variant-dependent manner.* Hepatology, 2009. **49**(2): p. 504-12.
63. Vieyra, D., et al., *ING1 isoforms differentially affect apoptosis in a cell age-dependent manner.* Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4445-52.
64. Gong, W., et al., *Subcellular targeting of p33ING1b by phosphorylation-dependent 14-3-3 binding regulates p21WAF1 expression.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(8): p. 2947-54.
65. Borkosky, S.S., et al., *Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma.* J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(5): p. 703-13.