

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ARAŞTIRMA FONU PROJE TEKLİF VE DEĞERLENDİRME FORMU

1. GENEL BİLGİLER

A. Araştırma Projesinin:

P. No: 923.01.01.05

Kod No:
Başlığı : GASTRİK KANSER PATOGENEZİNDE, SIKLIĞI BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖR (CDKI) GENLERİ p21, p27, p57 İLE p53 VE p73 TÜMÖR SUPRESSÖR GENLERİNİN MOLEKÜLER GENETİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ
Ne tür bir çalışma olduğu ^(x) : DOKTORA TEZİ
Kime ait olduğu ^(xx) : M.ERTAN AY

Proje Yöneticisinin:

Ünvanı, Adı ve Soyadı: PROF.DR.ORHAN TERZİOĞLU	İş Tlf : 2777777-4602 / 22
Bölümü : TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI	
Fakülte Enstitü veya Yüksekokulu : TIP FAKÜLTESİ / SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	

B.Proje Personeli

Ünvanı, Adı ve Soyadı	Fakülte Enstitü veya Yüksekokulu	Bölümü	Projedeki Görevi
Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU	TIP FAKÜLTESİ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	YÖNETİCİ
Tıb. Biy. M.Ertan AY	TIP FAKÜLTESİ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	YÜRÜTÜCÜ
Prof. Dr. İlkay ŞİMŞEK	TIP FAKÜLTESİ	İç Hs. ABD. Gastroenteroloji BD	DANIŞMAN
Başlangıç Tarihi ve Süresi:	Teklif (Yönetici)	Teklif (Uzm.Grubu) ^(xxx)	Kabul (Fon Yön.Kur.) ^(xxx)
Başlangıç Tarihi:	OCAK 2001		
Süresi :	18 AY		

Projenin Toplam Bütçesi:

Teklif (Yönetici)	Teklif (Uzm.Grubu) ^(xxx)	Kabul (Fon Yön.Kur.) ^(xxx)

Tarih

İmza

Proje Yöneticisi : Prof.Dr.Orhan TERZİOĞLU
Bölüm Bşk. veya Y.okul Md. : Prof.Dr.Nuran YULUĞ
Dekan veya Enst. Md. : Prof.Dr.Gül GÜNER

REKTÖR

Tarih:

İmza:

(x) Münferit araştırma,ıpta uzmanlık,yüksek lisans veya doktora tezi
(xx) Yüksek lisans veya doktora tezi ise kime ait olduğunu belirtiniz
(xxx) Boş bırakınız

100. Personel giderleri (Üniversite dışından sigortaya tabii olarak istihdam edilecek personel)			Yönetici			Üz. Gr. (x)			Fon Yön. Kur. (x)		
			1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl
Personelin Niteliği	Prim TL/ay	Ücret TL/ay									
Yıllara Göre Toplam											
100. Toplam YOKTUR											
200. Yolluklar			Yönetici			Uz. Gr. (x)			Fon Yön. Kur. (x)		
			1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl
..... Gün X	TL TL									
(Yolluk)		(Yevmiye)									
Yıllara Göre Toplam											
200. Toplam YOKTUR											
300. Hizmet Alımları			Yönetici			Uz. Gr. (x)			Fon Yön. Kur. (x)		
			1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl
Yıllara Göre Toplam											
300. Toplam YOKTUR											
400. Tüketim malları ve malzeme Alımları			Yönetici			Uz. Gr. (x)			Fon Yön. Kur. (x)		
			1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl	1. Yıl	2. Yıl	3. Yıl
Primer Setleri			1.6 milyar								
Taq DNA Polimeraz			785 milyon								
Pfu DNA Polimeraz			290 milyon								
Kısıtlayıcı Enzim (12)			830 milyon								
Kültür Ortamı			550 milyon								
DNAekstraksiyon ve Kim. Sarf Mlz.			550 milyon								
Plastik Sarf Mlz.			350 milyon								
Cam Sarf Mlz.			200 milyon								
Kantitatif amplifikasyon			2.3 milyar								
Yıllara Göre Genel Toplam			7.555 milyar								
400. Toplam			7 555 000 000--								

(x) boş bırakınız

500.Demirbaş Alımları	Yönetici			Uz.Gr.(x)			Fon Yön. Kur. (x)		
	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl
Yıllara Göre Toplam									
500.Toplam YOKTUR									
600.Makina Teçhizat ve Taşıt Alımları	Yönetici			Uz.Gr.(x)			Fon Yön. Kur. (x)		
	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl
Yıllara Göre Toplam									
600.Toplam YOKTUR									
700.Yapı – Tesis	Yönetici			Uz.Gr.(x)			Fon Yön. Kur. (x)		
	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl
Yıllara Göre Toplam									
700.Toplam YOKTUR									
800.Diğer Ödemeler	Yönetici			Uz.Gr.(x)			Fon Yön. Kur. (x)		
	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl	1.Yıl	2.Yıl	3.Yıl
800.Toplam YOKTUR									
Yıllara Göre Genel Toplam									
Genel Toplam									

(x)boş bırakınız

Bütçe Kalemi	Destegi Sağlayan Kuruluşlar	Miktar
100		
200		
300		
400		
500		
600		
700		
800		
	TOPLAM	

III. PROJE HAKKINDA BİLGİLER

III. 1. Projenin Amacı, Ortaya Çıkış Kaynağı

p53, yaklaşık 20 yıl önce bir tümör supressör gen olarak tanımlandıktan sonra, bilim tarihinde üzerinde en çok araştırma yapılan gen olma özelliğine sahip oldu. 1997'ye kadar p53'ün bir başka gen ile homoloji gösterebileceği düşünülüyordu. Ancak bu alana olan yoğun ilgi karşısında p73'ün bir p53 homoloğu olarak saptanması mümkün oldu¹. Multistep karsinogenez teorisinin gelişiminden sonra, hücre siklüsü kontrolünde fonksiyonu olan diğer regülatuar proteinlerin, tümorogenetik etkileri de moleküler biyolojik araştırmaların konusu olmaya başladı. Özellikle, son yıllarda farklı kanser tiplerinde, hücre siklüsü negatif proteinleri olan p53 ve p73 tümör supressör genleri ile bunların transaktivatörleri olan *siklin -bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI)* pek çok araştırmaya konu olmuştur. Çünkü p53, p73, p21, p27 ve p57'nin growth arrest ve apoptozu aktive edici fonksiyonlarının kaybı pek çok kanser tipi için tetikleyici etken olarak karşımıza çıkmaktadır^{1, 5-20}.

Bu çalışmada, p21, p27, p57 CDKI'leri ile p53 ve p73 tümör supressör genlerinin gastrik kanser neoplastik transformasyonundaki etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmaktadır.

III. 2. Projenin Önemi, Getireceği Yenilikler ve Sonuçlar, Bunların Uygulanabilirliği :

Karsinogenezin multistep teorisi kapsamında, hücre siklüsü kontrol noktalarında fonksiyonel olan regülatuar proteinlerin aktivasyonu yada inaktivasyonu, neoplastik transformasyonun tetiklenmesine neden olan en önemli mekanizmalardan birisidir. Farklı kanser tiplerinde yapılan araştırmalar bu regülatuar proteinlerin delesyon, mutasyon, kromozomal yeniden düzenlenim, ekspresyon düzeyinin artışı, histon asetilasyonu / deasetilasyonu, viral onkogenез ve epigenetik değişimler yolu ile normal işlevini kaybettiğini göstermektedir¹⁻³.

Son yıllarda, tümör supressör genlerin ve transaktive ettikleri hücre siklüsü negatif regülatuar proteinlerinin mutasyon ve allelik ekspresyon çalışmaları, farklı kanser tipleri için yapılan araştırmalara konu olmaktadır¹⁻³.

Farklı diferansiyasyon patternleri gösteren gastrik kanserlerin erken tanısı, hastalığın tedavisi ve prognozu açısından önemlidir⁴.

Gastrik kanser olgularında, neoplastik transformasyona neden olan moleküler değişimler arasında, p73 ve p53 tümör supressör genleri ile p21, p27, p57 CDKI'lerinin

ekspresyon düzeylerinin, moleküler düzeyde araştırılması amaçlanan bu çalışma sonucunda elde edilecek veriler, gastrik transformasyonun mekanizması hakkında bilgi edinmemizi sağlayacaktır. Ayrıca, malignensiye geçiş aşamasında klinik olarak izlenen, lokal gastrik lezyonların, moleküler düzeyde analizi, bu olguların erken tanısı için yeni yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Mevcut literatür doğrultusunda , sözü edilen hücre siklüsü regülatuar proteinlerinin, gastrik kanserlerde moleküler düzeyde araştırılması mümkündür.

III.3. Araştırma Materyali ve Yönetimi (Araştırmada kullanılacak ve başvurulacak yöntem veya yöntemler ayrıntılı ve zamanlamasıyla birlikte açıklanacak ve yöntemlerin literatürdeki yeri gösterilecek)

Gastrik kanser olgularında, p21, p27, p57, p53 ve p73'ün, moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak, hastalık etyolojisindeki etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yürütülecektir. Araştırmaya konu olan gastrik kanser olgularının klinik tanısı ve örnek materyallerinin sağlanması, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirilecektir.

Araştırmada kullanılacak yöntemler :

1. Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri p21, p27, p57'nin moleküler analizi:

1.1. Semikantitatif Reverse Transkripsiyon – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile gastrik kanser hücrelerindeki p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyinin saptanması⁵⁻⁸.

1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) – Metilasyon analizi ile p21, p27 ve p57 nin allelik inaktivasyon durumlarının saptanması:

HpaII ve SacII metilasyon bölgelerine özgü restriksiyon enzim kesimi sonrası PCR ve Agaroz Gel Elektroforezi uygulanacaktır⁵⁻⁸.

2. p73 tümör supressör geninin moleküler düzeyde analizi:

2.1. Semikantitatif Reverse Transkripsiyon – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile p73 tümör supressör geninin ekspresyon düzeyinin saptanması⁹⁻¹⁵.

2.2. Nested PCR ve StyI restriksiyon enzim kesim analiziyle p73 zigosite durumunun belirlenmesi⁹⁻¹⁵.

Araştırmanın, Ocak 2001'de başlatılması ve 18 (onsekiz) ayda sonuçlandırılması planlanmaktadır.

III. 4. İlgili Literatürün Işığında Projenin Yeri:

Günümüzde kanser; önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Çünkü gelişmiş ülkelerde bile her beş insandan biri kanser sonucu hayatını yitirmektedir ³.

Bu denli önemli bir toplumsal sağlık problemi olan kanserin nedenlerinin belirlenmesi erken tanı ve tedaviye yönelik hedeflerinin geliştirilmesi genetik biliminin araştırma alanına girmektedir ².

1990 sonrası oluşan kanserin multistep teorisi kapsamında, hücre siklusu ve kontrolü üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda büyük bir hızla artmakta ve giderek önemini daha da arttırmaktadır. Özellikle, hücre siklusu progresyonunda rol alan aktivatör proteinlerin [örn: siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK) v.b.] ile growth arrest ve apoptoz uyarılması yoluyla negatif regülatör rol üstlenen proteinler [Tümör Süpressör Genler, siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) v.b.] ve genleri kanserin oluşum mekanizması içinde önemli tetik noktalarını oluşturmaktadır ^{1-3, 9-14}.

Gastrik kanserler, Asya ülkeleri başta olmak üzere, özellikle sosyo-ekonomik düzeyi düşük toplumlarda sık görülmektedir. Yapılan moleküler biyolojik araştırmalar; gastrik kanser oluşumunu tetikleyen mekanizmalar arasında tümör süpressör gen inaktivasyonu ve genetik instabilitenin yer aldığını göstermiştir ⁴. Pek çok insan tümöründe olduğu gibi gastrik kanserlerde de p53 tümör süpressör gen mutasyonu yada heterozigosite kaybının (LOH), neoplastik transformasyonu tetikleyen etkileri olduğu belirlenmiştir ⁴. Bir hücre siklusu negatif regülatör proteini olan p53; growth arrest ve apoptozu uyarıcı etkisini, spesifik DNA sekanslarının (örn:hücre siklusu inhibitörü p21) transkripsiyonel aktivasyonunu sağlayarak gerçekleştirmektedir ^{1, 10, 13, 16}.

Jost ve arkadaşları ile Kaghad ve arkadaşlarının yaptığı araştırmalar nöroblastomada delete olduğu bilinen 1p36.3 kromozom lokusunda p53'e yüksek oranda homoloji gösteren bir proteini ; p73'ü tanımladılar ^{9-11, 14, 17, 18}. 1p'de delesyon saptanan diğer malignansiler ise melanoma, hepatosellüler karsinoma (HCC) ve meme kanseridir ¹⁰. p53 homoloğu olan p73'ün overekspresse olduğu kanser tiplerinde, p53'e duyarlı genlerin apoptotik etkilerinin tetiklendiği yine Jost ve arkadaşları tarafından belirlendi ⁹. Kritik kromozomal lokasyonu, p53 ile gösterdiği yüksek sekans homolojisi ve üstlendiği hücre siklusu negatif regülatör rolü, p73' ün bir tümör süpressör gen olabileceği düşüncesini doğurdu ^{11, 17, 18}. Ancak daha sonra yapılan araştırmalar bize p73'ün klasik Knudson tümör süpressör gen kavramına uymadığını gösterdi ^{12, 13}. Bu fikrin doğmasına neden olan özellikler şu şekilde sıralanabilir:

1-p73, p53'ün aksine monoallelik ekspresyon patternine sahiptir ^{10, 11}.

2-UV gibi DNA hasarı oluşturan ajanlar p73'ü indüklememektedir ¹¹.

3-1p36 delesyonuna sahip nöroblastoma vakalarında ve diğer bazı kanser türlerinde p73 delesyon veya mutasyonları saptanmamıştır ^{11, 12}.

4-Allellerinden biri imprintlendiği için, p73 monoallelik maternal ekspresyon göstermektedir ^{10, 17, 18}

Bu nedenlerden dolayı p73'ün farklı bir regülasyon mekanizması olduğu düşünülmektedir ¹¹. Daha sonra yapılan araştırmalarla p73'ün 13 ekson üzerinden farklı splicing formları gösteren bir gen tarafından kodlandığı ve farklı izoformlarının olduğu bulundu¹². Bazı kanser tiplerinde yapılan son araştırmalar ise p73'ün wild type allel overekspresyonunun neoplastik transformasyonu tetiklediğini göstermektedir ^{15, 17-19}. Paul G. Corn ve arkadaşları ise p73 promotörü metilasyonu ile p73 inaktivasyonunu ALL olgularında saptadılar ²⁰.

Tümör süpressör genler ile birlikte bir diğer hücre siklusu negatif kontrol elemanı, sikline bağımlı kinaz inhibitörleridir. Hücre siklusu kontrol noktalarında, siklinler ve siklin aktivasyonunu sağlayan siklin-bağımlı kinazlar (CDK) tarafından siklus progresyonu sağlanmaktadır. CDK fonksiyonu ise siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından kontrol edilir. Bilinen iki CDKI ailesi (CIP/KIP ve INK4) içinde p21^{CIP1}, p27^{KIP1} ve p57^{KIP1} ilk tanımlananlardır. p21, p27 ve p57 embriyonik ve adult dokularda ubiquitus olarak ekspresse olmaktadır. Değişik insan tümörlerinde CDKI' ların mutasyonel inaktivasyonları saptanmıştır

2, 3, 5-7

Yukarıda verilen literatüre dayalı bilgiler doğrultusunda, tümör süpressör gen ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin, fonksiyonel kayıpları, kanser gelişiminde önemli roller üstlenmektedir. Gastrik kanser gelişiminde bu önemli hücresel siklus proteinlerinin moleküler düzeyde araştırılması, hastalığın erken tanısı ve tedavinin yönlendirilmesi açısından önemlidir.

III. 5. Projenin Kaynağını Oluşturan Literatürlerin Listesi:

- 1.Compagni A, Christofori G. Recent advences in resarch on multistage tumorigenesis. British Journal Cancer 2000; 83(1): 1-5.
- 2.Lewin B, Genes VI, Oxford University Press, USA . 1997 p:1025-1173.
- 3.Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Basis Of The Cell. Garland Publishing Inc. New York, USA.1994 p:1255-91
- 4.Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. Seminars in Oncology 1996; 23(3):292-307.

5. Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Research* 2000;60:262-5.
6. Park WH, Seol JG, Kim SE, Hyun JM, Jung CW, Lee CC, Kim BK, Lee YY. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Research* 2000; 60: 3065-71.
7. Ravanko K, Jürvinen K, Paasinen-Sohns A, Hölttä E. Loss of p27^{KIP1} from cyclin E/Cyclin-dependent kinase (CDK) 2 but not from Cyclin D1/CDK4 complexes in cells transformed by polyamine biosynthetic enzymes. *Cancer Research* 2000;60:5244-53.
8. Tomoda K, Kubota Y, Kato JY. Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{KIP1} is instigated by Jab 1. *Nature* 1999; 398:160-5.
9. Jost KA, Marin MC, Kaelin Jr WG. p73 is a Human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997;389:191-4.
10. Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T, Takahashi To, Takahashi Ta. Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in Human lung cancer. *Cancer Research* 1998; 58:1380-3.
11. Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DJ, Liu W. Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Research* 1998;58:2547-9.
12. Zaika AI, Kovalev S, MarchenkoND, Moll UM. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Research* 1999; 59:3257-63.
13. Peters UB, Tschan MP, Baskaynak G, Lass U, Tobler A, Fey MF, Schmidt CA. Distinct expression patterns of the p53-homologue p73 in malignant and normal hematopoiesis assessed by a novel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay and protein analysis. *Cancer Research* 1999;59:4233-6.
14. Mihara M, Nimura Y, Ichimiya S, Sakiyama S, Kajikawa S, Adachi W, Amano J, Nakagawara A. Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 1998; 79(1): 164-7.
15. Tokuchi Y, Hashimoto T, Kobayashi Y, Nishida K, Hayashi S, Imai K, Nakachi K, Ishikawa Y, Nakagawa K, Kawakami Y, Tsuchiya E. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. *British Journal of Cancer* 1999; 80(10):1623-9.
16. Zhu M, Jiang J, Zhou W, Chen X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p52 target genes. *Cancer Research* 1998; 58: 5061-5.

17. Stiewe T, Putzer BM. Role of the p53 homologue p73 in E2F-1 induced apoptosis. Nature Genetics 2000; 26 Dec; 464-9.
18. White E, Prives C. DNA damage enables p73. Nature 1999; 399:734-7.
19. Chi SG, Chang SG, Lee SJ, Lee CH, Kim JH, Park JH. Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer. Cancer Research 1999; 59: 2791-6.
20. Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Comitello N, Baylin SB, Herman JG. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's Lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. Cancer Research 1999;59: 3352-6.

IV. Projede Kullanılacak Mevcut Olanaklar (Proje için gerekli olup projenin yürütüleceği kurumda bulunan alet, cihaz, laboratuvar malzeme ve diğer fiziki olanaklar ile bunların ne ölçüde ya da miktarda kullanılacağı hakkında bilgiler)

D.E.Ü.T.F. Hastanesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda moleküler biyolojik araştırmalar yapılmakta olup, bu proje için gereken alet, cihaz ve diğer fiziki olanaklar yeterlidir. Doktora tez projeleri için bu olanakların kullanılmasına dair, Anabilim Dalı Başkanlığının izni bulunmaktadır.

V. Proje için Gerekli Yeni Demirbaş, Araç, Gereç ve Techizat (Nasıl ve nereden sağlanacağı ve projenin bitiminden sonra nasıl kullanılacağını açıklaması)

Proje için gerekli yeni demirbaş gereksinimi yoktur.

VI. Araştırma Fon Saymanlığından daha önce proje aldınız mı? Aldınız ise proje hakkında kısa bilgi veriniz.

Down Sendromunun In situ Hibridizasyon ile Gösterilmesi (Yüksek Lisans Tez Çalışması)

VII. Almış olduğunuz proje ile ilgili ulusal ve uluslar arası yayınlarınızı aşağıdaki maddelerde açıklayınız.

a. Ulusal yayınlarınız:

b. Uluslar arası yayınlarınız

VIII. Almış olduğunuz proje ile ilgili bilimsel kongre, seminer, konferans ve toplantılarda sunulan bildirilerinizi aşağıdaki maddelerde açıklayınız.

a. Ulusal: "Down Sendromunun In situ Hibridizasyon ile Gösterilmesi" III. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Antalya -1994

b. Uluslar arası :