

# SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ p21, p27 ve p57 EKSPRESYON DÜZEYİ DEĞİŞİMLERİNİN KANSER GELİŞİMİNDEKİ ÖNEMİ

Mustafa Ertan Ay

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

## ÖZET

Kanser, hücre döngüsünü düzenleyen temel mekanizmalarda meydana gelen hatalardan köken aldığı için mutlaka moleküler ve hücresel düzeyde anlaşılması gereken bir hastalıktır. İnsan kanserlerinin moleküler düzeyde karakterizasyonu ile, hastalık durumunda normal işlevleri bozulmuş moleküller tanımlanmıştır. Kanser fenotipi, bozulmuş mitotik hücre döngüsü kontrolünün sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Hücre döngüsü negatif düzenleyicilerinin işlevlerinin bozulması, hücre döngüsü kontrolünün bozulmasına ve böylece hücresel transformasyona neden olmaktadır. Hücre döngüsü ilerlemesi, siklin bağımlı kinazlar (Cdk) tarafından kontrol edilmektedir. Cdk aktivitesi ise siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından baskılanmaktadır. Siklinler, Cdk'lar ve CDKI'lerinin işlevleri kanserde sıklıkla bozulmaktadır. Üç gen ürünü olan p21, p27 ve p57 CDKI'leri, hücre döngüsü, apoptoz ve diferansiyasyonun düzenleyicileri olarak bilinmektedir ve pekçok kanser araştırmasına konu olmaktadır. Bu derleme, p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi değişimlerinin, kanser gelişimindeki önemini tartışmayı amaçlamaktadır.

*Anahtar Kelimeler: Kanser, Hücre Döngüsü, CDKI, Ekspresyon.*

## SUMMARY

### THE SIGNIFICANCE OF p21, p27, p57 CYCLIN DEPENDENT KINASE INHIBITOR (CDKI) EXPRESSION LEVEL VARIATION IN CANCER PROGRESSION

Because, cancer results from defects in fundamental cell cycle regulatory mechanisms, it is a

*Yazışma Adresi:*

Mustafa Ertan AY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

35340 Balçova-İZMİR

Tel: 0 232 412 46 22-30

Faks: 0 232 259 05 41

disease that ultimately has to be understood at the molecular and cellular levels. Molecular characterization of human cancers has identified molecules whose normal function is disrupted in the disease state. The cancer phenotype arises, at least in part, as a result of deregulated mitotic cell cycle control. Functional inactivation of negative regulators of the cell cycle will contribute to deregulated cell cycle control and, thereby, to cellular transformation. Progression through the cell cycle is governed by cyclin-dependent kinases (Cdks), whose activity is inhibited by the cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). Cyclins, Cdks, and CDKIs are frequently deregulated in cancers. Three gene products, p21, p27, and p57 CDKI, have served as paradigms for the study of negative regulators of the cell cycle, apoptosis, and differentiation, and subjected to many cancer research. This review aimed that discuss the prognostic significance of expression levels variation of p21, p27, and p57 on cancer progression.

*Key Words: Cancer, Cell Cycle, CDKI, Expression*

## GİRİŞ

Hücreler evrim süreci boyunca iyi korunmuş, ortak temel özellikler taşımaktadırlar. Sahip oldukları plazma membranları, enerji metabolizmalarındaki benzer mekanizmalar ve kalıtım materyali olarak DNA'yı kullanmaları, bu ortak özelliklerden bazılarıdır. Kendi benzerini üretme ise hücrelerin en temel ortak özelliğidir ve bir hücre döngüsü sonucunda iki yavru hücre oluşumu ile gerçekleşir(1). Ancak gelişim ve büyüme sırasında, hücre döngüsünün doğru kontrolü, canlılığın devamı için önemlidir(1,2).

### *Hücre Döngüsü Kontrolü*

Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrolü, normal hücrelerin büyüme ve diferansiyasyonu ile tümör progresyonunda, önemli roller oynamaktadır. Memeli hücre döngüsü ilerlemesi, döngünün devamını sağlayan pozitif ve durduran veya kısıtlayan negatif düzenleyici faktörler arasındaki etkileşimler yoluyla sağlanmaktadır. Kontrol mekanizmasını oluşturan fonksiyonel moleküller, bir bütünlük içinde işlev görmektedirler(3,4). Bu proteinler arasında, büyüme faktörleri (PDGF, EGF, FGF vb.), büyüme faktörü reseptörleri, siklinler,

siklin bağımlı kinazlar (Cdk-CDK), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI-CKI-Cdk), onkogen ürünleri(c-myc, c-fos vb.), tümör supressör gen ürünleri (p53, Rb vb.) ve bu proteinlerin transaktivatörü olarak işlev gören transkripsiyon faktörleri (E2F vb.) bulunmaktadır(2-6).

### *Siklinler*

Hücre döngüsünde pozitif düzenleyici olarak işlev görerek, döngünün ilerlemesini sağlayan siklinler, Siklin A, Siklin B, Siklin C, Siklin D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>) ve Siklin E dir. Siklinler hücre döngüsünün farklı evrelerinde işlev görmektedirler(2,3,5,6).

### *Siklin Bağımlı Kinazlar (Cdk)*

Hücre döngüsü ilerlemesinde görevli olan siklinlerin aktivite ve hücre düzeyleri, siklin bağımlı kinazların(Cdk), siklinleri fosforillemesi ile kontrol edilmektedir(2,3,5-9). Cdk'lar bu işlevleri ile mitojenik ve büyümeyi baskılayıcı sinyallerinde etkili olduğu, hücre döngüsü kontrol noktalarında düzenleyici etki göstermektedirler. Bu yolla hücre döngüsü evreleri arasındaki geçişlerin tam zamanında gerçekleştirilmesi, Cdk'ların kontrolü altında tutulmaktadır. Ancak düzenli olarak kontrol

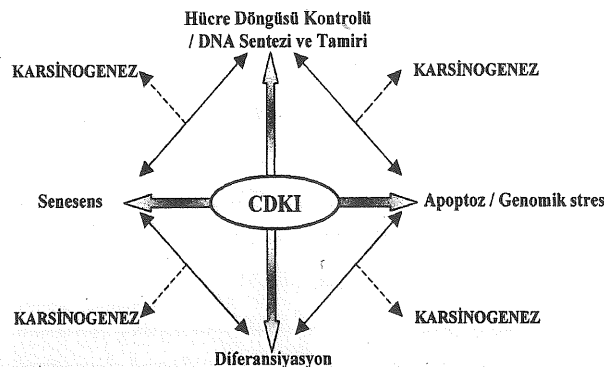
edilmeyen Cdk aktivitesi, artmış hücre proliferasyonuna ve genomik instabiliteye neden olmaktadır. Bu durum; hücrenin ölümsüzlük kazanması veya transforme olması ile sonuçlanır. Cdk'ların hücre siklüsündeki aktivitelerinin düzenlenmesi, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından gerçekleştirilmektedir(5,6,8,9).

#### Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKI):

CDKI'leri 1993-1995 yıllarında tanımlanmış ve klonlanmışlardır. Hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumludurlar(6). Büyümeyi inhibe edici sinyalden sonra, Cdk aktivitesini düzenleyen ve hücre döngüsü arrestini uyarıcı iki farklı aile üyesi toplam 7 CDKI'ü tanımlanmıştır(2-10). *INK4 (Inhibitor of Cdk4) ailesi* CDKI'leri  $p16^{Ink4a}$ ,  $p15^{Ink4b}$ ,  $p18^{Ink4c}$  ve  $p19^{Ink4d}$  dir (2-6,10,11). *Cip/Kip (Cdk Inhibitory protein / Kinase Inhibitory Protein) ailesi* CDKI'leri ise  $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$  (CDKN1A),  $p27^{Kip1}$  (CDKN1B) ve  $p57^{Kip2}$  (CDKN1C) dir. Cip/Kip ailesi CDKI'leri, hücre döngüsü progresyonu sırasında, bir kontrol noktasından diğerine, döngünün devamını sağlarken, negatif ve pozitif düzenleyici roller üstlenmişlerdir. Bu işlevleri ile CDKI'leri, hücre döngüsü kontrolü dışında, hücre senesens, quiescence, diferansiyasyon, apoptoz ve karsinogenezde de işlevlere sahiptir ve bu mekanizmalar arasında geçiş molekülü olarak işlev görmektedirler (Şekil 1) (10).

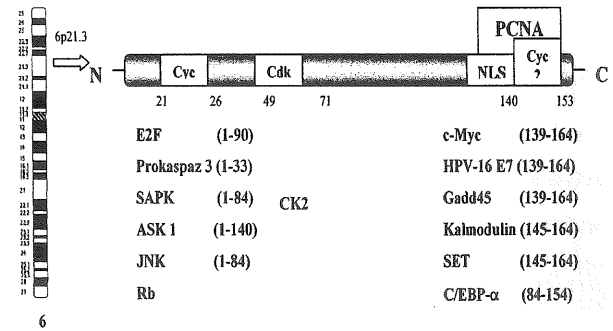
CDKN1A:  $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$

#### Şekil 1: CDKI'lerinin Biyolojik İşlevleri.



$p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$  ilk tanımlanan Cip/Kip ailesi üyesidir(3,4,6,11).  $p21$  geni 6p21.3 kromozom bölgesinde yerleşiktir. 68, 450 ve 1600 bp'lik üç eksona sahiptir (Şekil 2). Çeşitli tümör hücre hatlarında ve farklı kökenli tümör hücrelerinde (kolon, meme, prostat, Burkitt Lenfoma, vb.),  $p21$  geninde ender sıklıkla mutasyonlar saptanmış ancak bu mutasyonların protein işlevini değiştirmediği gösterilmiştir(3).

Şekil 2:  $p21$  Yapısal Haritası ve Özgül Protein Bağlanma Bölgeleri. *Cyc1 ve Cyc2; siklin bağlanma bölgeleri, NLS; Nükleer lokalizasyon sinyal bölgesi ve CDK; Cdk bağlanma bölgesidir.  $p21$  bu moleküllerden bazıları ile direkt etkileşime girerken, bazıları ile de yarışmalı olarak etkileşmektedir (4 no'lu kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır).*



$p21$  protein yapısında özgül protein bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 2) (3,4,6,7).  $p21$ 'in bu özgül bölgeler aracılığı ile etkileşime girdiği proteinler dikkate alındığında,  $p21$ 'in, hücre döngüsü kontrolü dışında, hücre senesens, quiescence, diferansiyasyon, apoptoz ve karsinogenezde de işlevleri olduğunu söylemek mümkündür(7,12)

#### $p21$ 'in Hücre Döngüsü Kontrolü ile DNA Sentezi ve Tamirindeki İşlevleri:

$p21$ 'in hücre döngüsü sürecindeki negatif düzenleyici işlevleri çok iyi tanımlanmıştır. Özellikle DNA hasarına karşı oluşan cevapta,  $p53$ 'ün uyardığı  $p21$ ,  $G_1$  arrestinde ve apoptozda önemli roller almaktadır. Bu işlevi ile  $p21$ ;  $p53$ 'ün efektör molekülü olarak tanımlanmaktadır (3,4,6,11).  $G_2$  evresindeki hücrelerin S evresine geri dönüşünün bloklanması ve  $G_2$  evresinde,

DNA hasarına karşı oluşan G<sub>2</sub> bloğu, p21 tarafından gerçekleştirilmektedir(4). p21 hücre döngüsüne girişte, mitojenler tarafından, p53'ten bağımsız olarak ta aktive edilebilmektedir. p53'e bağımlı ve/veya bağımsız olarak aktive edilen p21, hücre döngüsü ve DNA sentezi kontrolünde farklı moleküller ile etkileşime girerek işlev görmektedir(12).

Cdk inaktivasyonu, p21'in hücre döngüsü kontrolündeki temel işlevidir. p21 bu işlevi ile Siklin-Cdk kompleksi oluşumunu ve dolayısı ile hücre döngüsü ilerlemesini kontrol etmekte ve düzenlemektedir. Artmış p21 düzeyinde ise p21 kinaz aktivitesi G<sub>1</sub>-S geçişini hızlandırmaktadır(5,6).

Memeli hücrelerinde G<sub>1</sub>-S geçişinde, hücre döngüsünün pozitif düzenleyicisi olan Cdk2, Siklin A ve Siklin E gibi moleküllerin ekspresyonları, E2F transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir. Hücrede E2F'nin transaktivatör işlevi ise retinoblastoma protein (pRb) ailesi üyesi olan p107 ve p130 tarafından düzenlenmektedir. p21 ise, Rb'nin E2F üzerinden yürüttüğü transkripsiyonel aktivasyon işlevini inhibe etmektedir. Hücre döngüsü kontrolünde, p21 ile pRb, direkt olarak ta etkileşime girebilmektedirler(7).

p21, büyüme ve DNA sentezi kontrolünde işlev gören proteinlerle de direkt etkileşime girebilmektedir. *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), *Fen1*, *DNA-(cytosine-5) methyltransferase* (MCMT) ve *Growth Arrest and DNA Damage 45* (*Gadd45*) gibi proteinlerle etkileşerek bu işlevini yerine getiren p21, Siklin/Cdk kompleksleri ile DNA sentezi elementleri arasında bir köprü görevi görmektedir (4).

#### *p21'in Apoptozdaki İşlevleri:*

p21 bu işlevini, apoptoza karşı hücreleri koruma şeklinde yürütmektedir(3,4,8). Kolorektal karsinom ve melanomlarda p21 ekspresyonunun, hücreleri, p53'ün uyardığı apoptoza

karşı koruduğu, ekspresyonunun baskılandığı durumlarda ise hücrelerin apoptoza duyarlılıklarının arttığı gösterilmiştir(3). Apoptozun p21 tarafından düzenlenmesi; Siklin/Cdk komplekslerinin baskılanması, apoptozda görevli proteinler ile p21'in direkt etkileşimi ve p21'in apoptozu baskılayan proteinlerin sentezini uyarması yoluyla gerçekleştirilmektedir(8).

#### *p21'in Diferansiyasyondaki İşlevleri:*

Apoptoz ve hücre döngüsündeki kontrol edici işlevlerinden dolayı p21, diferansiyasyonda da önemli roller oynamaktadır. p21<sup>-/-</sup> ve p21<sup>+/+</sup> farelerde yapılan morfogenez ve diferansiyasyon çalışmalarında, p21<sup>-/-</sup> farelerin normal gelişimini tamamladığı, ancak kolon ve intestinal epitelde, diferansiyasyon hatalarının geliştiği gösterilmiştir. Deri ve intestinal epitel hücrelerinin kendini yenileme olayında, p21, hücreleri diferansiyasyona girmeleri için, uyarmakta, ancak diferansiyasyonun diğer aşamalarında işlev almamaktadır. p21'in bu etkisi, hücre döngüsü kontrolü ile direkt ilgili değildir. Hücre tipine bağlı olarak, diferansiyasyonda pozitif ya da negatif düzenleyici işlevler üstlenen p21, bu işlevini sinyal ileti yollarındaki efektör moleküller ile etkileşerek yürütmektedir(3,4).

#### *p21'in Senesens'teki İşlevleri:*

Pek çok memeli hücresi, uzun süreli proliferasyon gösterememektedir. Hücreler bu durumda G<sub>0</sub> evresine girerek, bölünmelerini durdurmaktadır. İnsan G<sub>0</sub> fibroblast hücrelerindeki p27 düzeyi, genç fibroblastlara göre 10-20 kat artmış olarak saptanmıştır. p21'in senescent fibroblastlarda düzeyinin artması p53'ten bağımsız olarak gerçekleşmekle birlikte, p21'in senesens'te de işlevsel olduğunun göstergesidir(3).

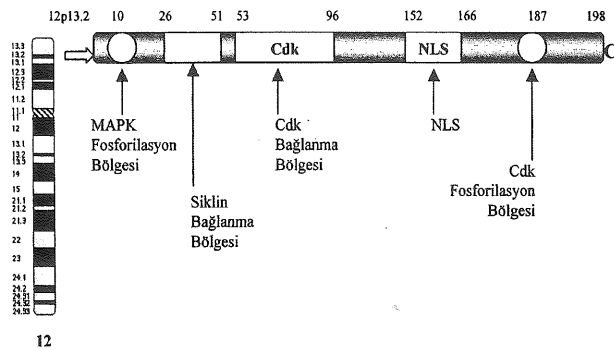
#### *CDKN1A: p27<sup>Kip1</sup>*

p27<sup>Kip1</sup> ilk olarak, kontakt inhibisyon ya da TGF-

tarafından G<sub>1</sub> arresti uyarılan epitel hücrelerinde, SiklinE/Cdk2 kompleksine bağlanarak işlevini baskılayan bir hücre döngüsü kontrol proteini olarak tanımlanmıştır(3). Hücre döngüsünün önemli bir işlevsel molekülü olan p27, antimitojenik sinyallere karşı oluşturulan hücrel cevapta, proliferasyonu düzenlemekle görevlidir(3-5). Bu işlevlerinden dolayı p27, meme, prostat, akciğer, over ve terminal-diferansiye epitel tabakası hücrelerinde yüksek düzeylerde eksprese edilmektedir. Buna karşın proliferasyonu tamamlanmış hücrelerde ise ya çok düşük miktarlarda ya da hiç p27 ekspresyonu saptanmamaktadır(5,9).

12p13.2 kromozom bölgesinde yerleşik olan p27 geni 3 eksona ve farklı protein bağlanma bölgelerine sahiptir(Şekil 3). Cip/Kip ailesi üyesi olan CDK1'lerinin iyi korunmuş N-amino ucu Siklin/Cdk bağlanma bölgesi p27'de de bulunmaktadır. C-karboksi ucunda ise PCNA bağlanma bölgesi vardır(9,12).

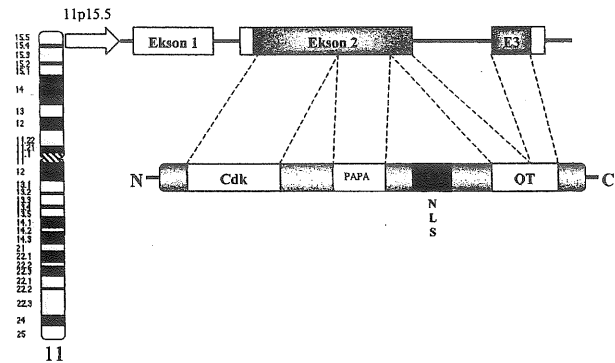
Şekil 3: p27 Yapısal Haritası. 12p13.2 kromozom bölgesinde yerleşik olan p27 geninden kodlanan p27'nin, işlevinde ve düzenlenmesinde, özgül protein bağlanma ve fosforilasyon bölgeleri önemli roller oynamaktadırlar. (5 no'lu kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır).



**p27'nin Hücre Döngüsü Kontrolündeki İşlevleri:** p27; hücre döngüsü kontrolünde, SiklinE/Cdk2 kompleksinin işlevini inhibe etmektedir. Bu etkileşim sırasında p27'nin aynı zamanda SiklinE/Cdk2 için bir substrat olduğu da gösterilmiştir. Kinetik analizler ile p27'nin SiklinE/Cdk2 ile etkileşiminin iki farklı

bağlanma bölgesi üzerinden gerçekleştiği saptanmıştır. Birinci bağlanma bölgesi, p27 N-amino ucunda bulunan Siklin/Cdk bağlanma bölgesidir. Bu bölge aracılığı ile, enzim-inhibitör etkileşimi tarzında kurulan bağ, kimyasal olarak sıkı bir bağ özelliğindedir. İkinci bölge ise C-karboksi ucunda bulunmaktadır. Bu bölgede bulunan treonin 187 rezidüsünün, SiklinE/Cdk2 kompleksi tarafından fosforillenmesi ile kurulan bağ ise enzim-substrat ilişkisi tarzında ve kimyasal olarak zayıf bir bağdır. p27 ile SiklinE/Cdk2 kompleksi arasında, p27'nin fosforilasyonu şeklinde yürütülen enzim-substrat tarzındaki etkileşim, p27'nin, *ubiquitin/protesome* sistemi ile parçalanmasını da katalizlemektedir (5).

Şekil 4: p57 Geninin Yapısı ve p57 Proteini İşlevsel Bölgeleri. p57 geni 1.eksonu transkribe olmamaktadır. N-amino ucu Cdk bağlanma bölgesi, C-karboksi QT - PCNA bağlanma bölgesi ile NLS ve PAPA tekrar dizileri p57 proteininin yapısal bölgeleridir. (15 no'lu kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır)



#### Kanser Gelişiminde p27'nin Rolü:

Hücre döngüsü kontrolünde, p27'nin, Cdk baskılayıcı işlevinin bozulması, kanser hücresine avantaj sağlamaktadır. İnsan kanserlerinde, p27'nin delesyon veya mutasyon yoluyla işlevinin bozulmasına çok ender rastlanılmaktadır. p27'nin tümörleşme sürecine olası etkileri, p27<sup>-/-</sup> fareler üzerinde yapılan çalışmalarla belirlenmeye çalışılmıştır. Her iki p27 alleli de delete olan farelerin, embriyonik gelişimlerini normal olarak tamamladıktan sonra sağlıklı olarak doğdukları ve p27<sup>-/-</sup> ile

p27<sup>+/+</sup> farelerin, Cdk baskılama kapasiteleri arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu, p27'nin kaybolmuş Cdk baskılanması işlevinin, p21 ve p57 tarafından karşılanabildiğini göstermektedir (5,9). p27<sup>-/-</sup> fareler normal doğmakla birlikte, ikinci bir mitojenik uyarıda hiperplastik yapıların geliştiği gözlenmiştir. p18<sup>-/-</sup>/p27<sup>-/-</sup> farelerde, yalnızca p18<sup>-/-</sup> ya da yalnızca p27<sup>-/-</sup> farelere göre, endokrin ve gastrointestinal sistem organlarında yüksek tümör gelişim riski görülmekte ve en fazla 3 ay yaşamaktadırlar. p27<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup> farelerin ise normal farelere göre %44 oranında artmış kolon kanseri gelişme riskine sahip oldukları saptanmıştır(10). Bu çalışmaların sonuçlarına göre, p27'nin hücre döngüsü kontrolü ile birlikte bir tümör supressör gen olarakta işlev gördüğü ve hücre içi p27 düzeyinde meydana gelen değişimlerin kanser gelişiminde önemli bir basamak olduğu söylenebilmektedir (5,10).  
*CDKN1C: p57<sup>Kip2</sup>*

p57<sup>Kip2</sup>, ilk olarak Lee ve arkadaşları tarafından 1995 yılında, çeşitli G1 Siklin/Cdk komplekslerinin baskılanmasından sorumlu, hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisi olarak tanımlandı. 11p15.5 kromozom bölgesinde yerleşik olan p57 geni, 2.1 kb uzunluğundadır ve 3 ekson bölgesine sahiptir(42). p57 geninden kodlanan p57<sup>Kip2</sup> proteini, 316 aminoasitten oluşan ve yapısında 4 işlevsel bölge bulunduran bir proteindir (Şekil 4)(13,14).

p57 proteini yapısında, N-amino ucunda bulunan Cdk bağlanma bölgesi, C-karboksi PCNA ile etkileşimden ve p57'nin nüklear transportundan sorumlu QT bölgesi, NLS bölgesi ve prolin (%28) ve alanince zengin tekrar dizilerinden oluşan PAPA bölgesi bulunmaktadır. QT bölgesi p21'e benzer işlevler üstlenmiştir. Bu bölge, PCNA'ya bağlanan bölge olup, DNA replikasyonunun kontrolünden

sorumludur. PAPA bölgesi ise polimorfik bir bölgedir. PAPA bölgesinde 12 bp'lik (4 aa) bir bölgenin delesyonu şeklinde görülen polimorfizme sık rastlanılmaktadır. PAPA polimorfizminin meme, mesane ve karaciğer kanserlerinin gelişiminde etkisinin olmadığı gösterilmiştir. NLS bölgesi ise p21 ve p27 NLS bölgelerine benzer yapıdadır(15). Sahip olduğu yapısal özellikler ve karakteristik moleküler etkileşimleri nedeniyle p57'nin hücre döngüsü, DNA sentezi, diferansiyasyon ve apoptozla ilgili yollarda önemli görevler aldığı bilinmektedir(14).

Hücre döngüsü kontrolünde, p21 ve p27 ile benzer işlevler üstlenen p57, bu proteinlerle ortak aminoasit sekans motifine sahiptir ve %40 oranında p27 homolojisi göstermektedir. Sahip oldukları yüksek homoloji nedeniyle p27 ve p57 monoklonal antikoları, immunohistokimyasal çalışmalarda çapraz reaksiyon vermektedirler (14). p57 geni inaktivasyonu ise promotör bölge metilasyonu ve histon deasetilasyonu ile gerçekleşmektedir(8).

p27<sup>-/-</sup>/p57<sup>-/-</sup> farelerde, hücrelerin eş zamanlı proliferasyon artışı gösterdikleri saptanmıştır. p57<sup>-/-</sup> farelerin ise normal olarak doğdukları ancak gelişimin ileri evrelerinde diferansiyasyon bozuklukları gösterdikleri bilinmektedir(5).

Pek çok insan tümöründe, p57 genetik değişiklikleri gösterilmiştir. Ancak bu tümörlerde p57'nin somatik mutasyonlarına rastlanılmamıştır. PAPA tekrar dizilerinde saptanan 12 bp'lik bölgedeki delesyonlar ise p57 geninin normal varyasyonları olarak kabul edilmektedir(14).

*Hücre Döngüsü Kontrolünde p57'nin Siklin/Cdk Kompleksleri ile Etkileşimi:*

p57'nin hücre döngüsü kontrolündeki Siklin/Cdk etkileşimi, p21'in Siklin/Cdk etkileşim modeline benzemektedir(14). Hücre döngüsü kontrolündeki işlevleri sırasında p57,



p53 tarafından uyarılmamaktadır. p57 uyarımında, bir p53 homoloğu olan p73-izoformu işlev görmektedir(15).

#### *DNA Sentezi Kontrolünde p57'nin PCNA ile Etkileşimi:*

p21 ve p57'nin PCNA bağlanma bölgeleri arasında 20 aminoasitlik bölgede yüksek oranda homoloji bulunmaktadır. p57'nin PCNA ile etkileşimi, PCNA'ya bağımlı olarak işleyen DNA sentezinin bloklanmasına ve G1 arrestine neden olduğunu düşündürmektedir. Hücre transformasyonunun baskılanmasında ise p57'nin, hem Siklin/Cdk'ya hem de PCNA'ya bağlanma aktivitesinin birlikte işlev gördüğü saptanmıştır(14,15).

#### *Diferansiyasyonda p57'nin Rolü:*

p57, normal embriyogenezde işlev gören tek CDKI'dür. Insulin Like Growth Factor (IGF2) ile birlikte 11p15.5 bölgesine yerleşik olan p57'nin, endoderm, mezoderm ve ektoderm embriyonik germ tabakalarında eksprese olduğu gösterilmiştir. p57 ayrıca, kalp, akciğer, parankimal organlar, böbrek, sindirim yolu organları ve bazı ekstra-embriyonik dokuların embriyonik morfogenezi ve diferansiyasyonunun değişik aşamalarında eksprese edilmektedir. Bu bulgular, p57'nin diferansiyasyonda da işlevsel olduğunun bir kanıtı olarak değerlendirilmektedir(14).

#### *Kanser Gelişimi ve p21, p27 ve p57 Geni Ekspresyon Düzeyi Değişimleri:*

Farklı kanser tiplerinde, p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi değişimlerinin araştırıldığı birçok çalışma yayınlanmaktadır. Çoğunlukla immunohistokimyasal yöntemlerin kullanıldığı bu araştırmaların sonuçları arasında, bazı uyumsuz noktalar bulunmaktadır. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

#### *p21 Ekspresyon Düzeyi Değişimi:*

Barbereschi ve arkadaşları (1996),

immunohistokimyasal yöntemler kullanarak, normal meme dokusunda, p21'in ya çok düşük düzeylerde ya da hiç eksprese edilmediğini, in situ ve invazif meme kanserlerinde ise heterojen p21 ekspresyonunun varlığını gösterdiler(16). Moelandsmo ve arkadaşları (1996), normal melanositlerde, p21'in eksprese edilmediğini, erken evre melanomlarda göreceli olarak daha yüksek p21 ekspresyonu görüldüğünü ve ileri evre tümörlerde ise p21 ekspresyon düzeyinin azaldığını, immunohistokimyasal yöntemler ile gösterdiler (17). Ogawa ve arkadaşları (1997) ise gastrik kanserli hastalara ait tümör hücrelerinde p21 ekspresyonunun azaldığını, immunohistokimyasal yöntemler kullanarak gösterdiler. Bu araştırmaya alınan hastaların p21 ekspresyon düzeyleri ile artmış histolojik evre, invazyon derinliği ve uzak organ metastazları birlikte değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin varlığı gösterildi(18). Noda ve arkadaşları (2001) ise, immunohistokimyasal yöntemler kullanarak erken evre gastrik karsinomlu hastalarda, p21 ekspresyon düzeyleri ile klinik ve patolojik veriler ve hasta prognozları arasında anlamlı bir ilişki saptamadılar(19). Aynı araştırma grubu tarafından 2002'de yayınlanan çalışma sonuçlarına göre ise erken evre gastrik kanserli hastalardaki tümör hücresi proliferasyon artışı ile p21 düzeyi azalması arasında anlamlı bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir(20). Endometrial karsinomlu hastalarda Backe ve arkadaşları (1997) tarafından immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ise p21 ekspresyon düzeyleri ile prognostik belirteçler arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı. Ancak Ito ve arkadaşları (1997) ise yine endometrium karsinomlu hastalarda, düşük p21 ekspresyon düzeyinin, düşük sağkalım oranı ile ilgili olduğunu ancak bu verinin istatistiksel olarak anlamlılık taşımadığını yayınladılar(21,22). Erber

ve arkadaşları (1997) ise baş-boyun skuamöz hücre karsinomlu hastalarda, artmış p21 ekspresyon düzeyinin, kötü prognoz ve kısa sağkalım oranı ile ilgili olduğunu saptadılar. Bu çalışma sonuçlarına göre, yüksek p21 ekspresyon düzeyinin, histolojik evre ve p53 mutasyonları ile ilgili olmadığı gösterildi (23). Shaji ve arkadaşlarının (2003), küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda, immünhistokimyasal olarak p21 ekspresyon düzeylerini araştırdıkları çalışmada, cerrahi yöntemler uygulanan hastalar için artmış p21 düzeyinin tercih edilen bir durum olduğu sonucu saptandı. Ancak diğer klinik ve patolojik veriler ile p21 ekspresyon düzeyi birlikte değerlendirildiğinde, hastadan hastaya değişen prognozlar saptandı(24).

p21 ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, meme kanserlerinde, melanomlarda, baş-boyun skuamöz hücre kanserlerinde, gliomlarda ve akciğer kanserlerinde p21 ekspresyon düzeyinin arttığı gözlenmektedir. Erken evre tümörlerde saptanan artmış p21 ekspresyon düzeyi, proliferasyon hücrelerin veya DNA hasarına cevap veren, genetik olarak stabil olmayan hücrelerin varlığını göstermektedir. Saptanan bu bulgular, p21'in G<sub>0</sub>'daki hücrelerde ya hiç ekspresyon olmadığını ya da düşük miktarlarda ekspresyon olduğunu ve Cdk aktivitesinin kontrolü işlevini çoğalan hücrelerde yürüttüğünü göstermektedir. İleri evre tümörlerde saptanan düşük p21 ekspresyon düzeyi ise, p53 aktivitesinin azalması veya growth inhibitör faktörlere ve DNA hasarına karşı oluşturulan cevabın azalması ile ilgili olabilir(5,6,8,11).

#### *p27 Ekspresyon Düzeyi Değişimi:*

Loda ve arkadaşlarının (1997), kolon kanserli hastalarda gerçekleştirdikleri immünhistokimyasal çalışmalarda, hastaların %60'ında düşük p27 ekspresyonu, %30'unda ise yüksek p27 ekspresyonu saptandı. Bu

sonuçlar doğrultusunda p27 ekspresyon düzeyi azalmasının kolon kanserleri için bağımsız bir prognostik belirteç olduğu düşünüldü(25). Li ve arkadaşları (2002) tarafından, kolon kanserli hastalarda, immünhistokimyasal yöntemler kullanarak saptanan p27 ekspresyon düzeyi azalmasının, tümörün metastatik özelliğinin artmasıyla ilgili olduğu belirtilmektedir. Primer gastrik karsinomlu hastalara ait tümör dokularında, p27 ekspresyon düzeylerinin immünhistokimyasal yöntemler kullanılarak belirlendiği Mori ve arkadaşlarına (1997) ait çalışma sonuçlarına göre, hastaların %62'sinde düşük p27 ekspresyon düzeyi saptanmış ve bunun kötü prognoz ile ilintili olduğu düşünülmüştür(26). Nitti ve arkadaşları (2002) ise gastrik adenokarsinom hastalarında, immünhistokimyasal yöntemler kullanarak saptadıkları, azalmış p27 ekspresyonunun, ileri tümör evresi ve lenf düğümü tutulumu ile ilgili olduğunu yayınladılar(27). Singh ve arkadaşları (1998) tarafından, özofagus kanserli hastalarda saptanan p27 ekspresyon düzeyi azalmasının, artmış tümör evresi, invazyon derinliği, lenf düğümü tutulumu ve kötü prognoz ile korole olduğu belirlenmiştir(28). İnvazif ve invazif olmayan tümörlerde yapılan araştırma sonuçlarına göre, p27 ekspresyon düzeyi azalmasının invazyondan önce meydana geldiği yani tümörün invazif karakter kazanmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Bu sonuç aynı zamanda tümörün metastatik özellik kazanması ile de ilgilidir. Ancak literatürden elde edilen veriler doğrultusunda, p27 ekspresyon düzeyi azalması ile; tümör hücre proliferasyonu, diferansiyasyondaki bozulmalar ve tümör progresyonu arasında anlamlı ilişkiler kurulamamaktadır. Tümör hücrelerinde artmış p27 ekspresyon düzeyinin ise; bozulmuş hücre proliferasyonunu durdurduğu ya da kanser hücresine selektif bir avantaj mı sağladığı henüz açıklık kazanmış değildir(5).



#### *p57 Ekspresyon Düzeyi Değişimi:*

İnsan kanserlerindeki p57 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar ise daha kısıtlı sayıdadır. Thompson ve arkadaşları (1996) tarafından, RT-PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen araştırma sonuçlarına göre Wilm's tümörlü hastalara ait tümör dokusu örneklerinde, normal dokulara göre p57 ekspresyon düzeyinin azaldığı gösterildi(29). Li ve arkadaşları(2003) kolorektal adenomlarda, normal mukozaya oranla p57 düzeyinin arttığını immünohistokimyasal yöntemlerle gösterdiler(30).

#### **SONUÇ**

Hücre döngüsü kontrolünde meydana gelen abnormalitelerinin neden olduğu, kontrolü bozulmuş hücre büyümesi ve bölünmesinin tümör gelişim sürecindeki etkileri bilinmektedir. Ancak, farklı kanser tipleri için, bu etkilerin hangi moleküllerin işlevlerindeki bozulmalarla meydana geldiği ve o kanser tipinin neoplastik gelişim sürecine ne düzeyde yansıdığı halen pek çok araştırmaya konu olmaktadır. Kanser gelişim sürecinde, birer genetik değişiklik hedefi olan p21, p27 ve p57, aynı zamanda, bu süreçte yer alan diğer moleküllerin (tümör supressör, DNA sentezi, DNA hasarı onarımı ve apoptoz proteinleri vb.) genetik değişimi ile başlayan onkogenik süreçlerde, işlevlerinde meydana gelen bozulmalar ile de yer alabilmektedirler(3-10). Sahip oldukları hücre işlevlerinden dolayı p21, p27 ve p57 geni ekspresyon düzeyi değişimlerinin kanser gelişimindeki önemi açıktır. Ancak, bu değişimlerin hangi kanser tipinde, hangi evrelerde ve ne düzeyde gerçekleştiği halen bir çok araştırmaya konu olmakla birlikte, elde edilen sonuçlar arasında çelişkili noktalar bulunması da dikkati çekmektedir. Bu durum p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi değişimlerinin, klinik tanı, tedavi ve prognoz belirlenmesinde birer

biyolojik belirteç olarak kullanılmamasına neden olmaktadır. Özellikle immünohistokimyasal yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda, farklı teknikler ile farklı sınır değerlerinin kullanılması ve çalışmaların homojen olmayan hasta gruplarında yürütülmesi bunun nedeni olarak gösterilmektedir. İmmünohistokimyasal yöntemlere paralel olarak daha duyarlı ve özgül yöntemler olan RT-PCR ve son yıllarda geliştirilen kantitatif Real Time-PCR yöntemlerinin kullanılması p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi analizlerinden elde edilecek sonuçların değerlendirilmesinde daha faydalı olacaktır. Çalışmalara dahil edilen hastaların farklı kliniko-patolojik özelliklere sahip olmaları da bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkların bir diğer nedeni olarak gösterilmektedir. Bu nedenle her kanser tipi için homojen hasta gruplarının oluşturulması ile yapılacak çalışmaların daha faydalı olacağı açıktır. Bu durumda birden fazla tanı merkezinin ortak yürüteceği çalışmalar, yeterli hasta sayısına ulaşılabilmesi için önem taşımaktadır. Ancak tüm bu kısıtlamalara rağmen p21, p27 ve p57 CDKI ekspresyon analizlerinin birlikte ve hücre döngüsü kontrol noktalarında rol oynayan diğer moleküller ile koordineli olarak çalışılması, hem bu moleküllerin kanser gelişim sürecindeki etkilerinin anlaşılması, hem de elde edilecek verilerin klinik uygulamalar açısından getireceği yenilikler bakımından önemli olduğu bir gerçektir.

#### **KAYNAKLAR**

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of The Cell. Garland Science, New York, USA, 2002. p: 983-1027.
2. Sherr CJ. Cancer Cell Cycles. Science 1996; 274: 19672-7.
3. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21-Negative

Regulator of the Cell Cycle. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1996; 213(2): 138-49.

4. Dotto GP. p21<sup>Waf1/Cip1</sup>: More than a Break to the Cell Cycle? *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1471: M43-M56.

5. Nho RS, Sheaff RJ. p27<sup>Kip1</sup> Contributions to Cancer. *Progression in Cell Cycle Research* 2003; 5: 249-59.

6. Tsihlias J, Kapusta L, Singerland J. The Prognostic Significance of Altered Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Human Cancer. *Annual Review of Medicine* 1999; 50:401-23.

7. Nakanishi M, Kaneko Y, Matsushime H, Ikeda K. Direct Interaction of p21 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 263: 35-40.

8. Adams PD, Kaelin WG. Negative Control Elements of the Cell Cycle in Human Tumors. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10:791-7.

9. Shaffer DR, Viale A, Ishiwata R, Leversha M, Olgaç S, Manova K, Satagopan J, Scher H, Koff A. Evidence for a p27 Tumor Suppressive Function Independent of Its Role Regulating Cell Proliferation in the Prostate. *PNAS* 2005; 105: 210-5.

10. Damo LA, Snyder PW, Franklin DS. Tumorigenesis in p27/p53-and p18/p53-Double Null Mice: Functional Collaboration Between the pRb and p53 Pathways. *Molecular Carcinogenesis* 2004; 42(2):109-20.

11. Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y. Functional Collaboration Between Different Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Suppresses Tumor Growth with Distinct Tissue Specificity. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20(16): 6147-58.

12. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB. Effects of p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> on Cellular Gene Expression: Implication for Carcinogenesis, Senescence, and

Age-Related Diseases. *PNAS*; 97(8):4291-6.

13. Michieli P, Chetid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-Independent Pathway. *Cancer Research* 1994;545(13):3391-5.

14. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57<sup>KIP2</sup>, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with Unique Domain Structure and Tissue Distribution. *Genes and Development* 1995; 9(6): 639-49.

15. Balint E, Phillips AC, Kozlov S, Stewart CL, Vousdeb KH. Induction of p57<sup>KIP2</sup> Expression by p73. *PNAS* 2002; 99(6): 3529-34.

16. Barbereschi M, Caffo O, Doglioni C. p21WAF1 Immunohistochemical Expression in Breast Carcinoma: Correlations with Clinicopathological Data, Oestrogen Receptor Status, MIB1 Expression, p53 Gene and Protein Alterations and Relapse-Free Survival. *British Journal of Cancer* 1996; 74: 208-15.

17. Moelandsmo GM, Holm R, Fodstad O. The Cyclin Kinase Inhibitor p21WAF/Cip in Malignant Melanoma: Reduced Expression in Metastatic Lesions. *American Journal of Pathology* 1996; 149: 1813-22.

18. Ogawa M, Maeda K, Onoda N. Loss of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> Expression Correlates with Disease Progression in Gastric Carcinoma. *British Journal of Cancer* 1997; 75: 1617- 20.

19. Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Growth Pattern and Expression of Cell Cycle Regulator Proteins p53 and p21WAF1/Cip1 in Early Gastric Carcinoma. *Cancer* 2001; 92(7): 1828-35.

20. Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased Proliferative Activity Caused by Loss of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> Expression and Its Clinical Significance in Patients with Early-Stage Gastric Carcinoma. *Cancer* 2002; 94(7): 2107-12.

21. Backe J, Gassel AM, Hauber K. p53 Protein in Endometrial Cancer is Related to Proliferative

- Activity and Prognosis but not to Expression of p21 Protein. *International Journal of Gynecological Pathology* 1997; 16: 361-8.
22. Ito K, Sasano H, Matsunaga G. Correlations Between p21 Expression and Clinicopathological Findings, p53 Gene and Protein Alterations, and Survival in Patients with Endometrial Carcinoma. *Journal of Pathology* 1997; 183: 318-24.
23. Erber R, Klein W, Andl T. Abberant p21<sup>Cip1/Waf1</sup> Protein Accumulations in Head-and-Neck Cancer. *International Journal of Cancer* 1997; 74: 383-9.
24. Shaji T, Tanaka F, Takata T, Yanagihara K, Otake Y, Hanaoka N, Miyahara R, Nakagawa T, Kawano Y, Ishikawa S, Katakura H, Wada H. Clinical Significance of p21 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20(18): 3865-71.
25. Loda M, Cukor B, TamSW. Increased Proteasome-Dependent Degradation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27 in Aggressive Colorectal Carcinomas. *Nature Medicine* 1997; 3: 231-4.
26. Mori M, Mimori K, Shiarishi T. p27 Expression and Gastric Carcinoma. *Nature Medicine* 1997; 3:593.
27. Nitti D, Belluco C, Mammano E, Marchet A, Ambrosi A, Mencarell R, Segato P, Lise M. Low Level of p27<sup>Kip1</sup> Protein Expression in Gastric Adenocarcinoma is Associated with Disease Progression and Poor Outcome. *Journal of Surgical Oncology* 2002; 81: 167-76.
28. Singh SP, Lipman J, Goldman H. Loss or Altered Subcellular Localization of p27 in Barret's Associated Adenocarcinoma. *Cancer Research* 1998; 58: 1730-5.
29. Thompson JS, Reese KJ, DeBaun MR, Perlman EJ, Feinberg AP. Reduced Expression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Gene p57<sup>Kip2</sup> in Wilms Tumor. *Cancer Research* 1996; 56: 5723-7.
30. Li JQ, Wu F, Usuki H, Kubo A, Masaki T, Fujita J, Bandoh S, Saoo K, Takeuchi H, Kuriyama S, Ishida T, Omaida K. Loss of p57<sup>KIP2</sup> is Associated with Colorectal Carcogenesis. *International Journal of Oncology* 2003; 23(6): 1537-43.