

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.TURGAY İSBİR

**İNSAN NORMAL VE KANSERLİ AKCİĞER DOKUSUNDA KAZEİN
KİNAZ II (CK II) ENZİMİNİN MYC ONKOPROTEİNİNİ SUBSTRAT
OLARAK KULLANARAK KİNETİK KAREKTERİZASYONU VE
L-MYC ONKOGENİNİN RESTRICTION FRAGMENT LENGTH
POLYMORPHISM (RFLP) ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

Tıbbi Biyolog İLHAN YAYLIM

91665

İSTANBUL-2000





*Tezimin hazırlanmasında desteğini ve ilgisini
esirgemeyen danışmanım Sayın Prof.Dr.Turgay İsbir'e,
değerli çalışma arkadaşlarıma, gösterdikleri
sonsuz sabır ve verdikleri destek için fedakâr aileme
sonsuz teşekkürler...*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1-2

2.GENEL BİLGİLER

3-19

2.1.PROTEİN KİNAZLAR

2.1.1.Kazein Kinaz I (CK-1)

2.1.2.Kazein Kinaz II (CK II)

2.1.2.1. Kazein Kinaz II alt ünitelerinin özellikleri

2.1.2.2.CK II substratları

2.1.2.3.Kazein Kinaz II'nin Subsellüler Lokalizasyonu

2.1.2.4.Enzim Aktivasyonu ve Düzenlemesi

2.2.ONKOGENLER ve MYC ONKOPROTEİNLERİ

3.MATERYAL VE METOD

20-29

3.1.ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILACAK ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.2.1. CK II TAYİNİ İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.2.2. LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.2.3. L-MYC GEN POLİMORFİZM GÖSTERMEK İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3. ÖRNEKLERİN SEÇİMİ VE TANIMI

3.4. KAZEİN KİNAZ II'NİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI

ve TAYİNİ

3.5. L-MYC GEN POLİMORFİZMİ İÇİN KULLANILAN

YÖNTEMLER

3.6.SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN

İSTATİSTİKSEL HESAPLAR

4.BULGULAR

30-52

4.1.Kazein Kinaz II Enziminin Kinetik Özelliklerinin

RRRDDDSDDD Dizili Sentetik Substrat Peptid ve

c-myc⁴¹⁰⁻⁴¹⁹ (EQKLISEEDL) Peptid Kullanarak Saptanması

4.2. L-myc Gen Polimorfizminin Gösterilmesi

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

53-61

6.ÖZET

62

7.SUMMARY

63

8.KAYNAKLAR

64-69

9.ÖZGEÇMİŞ

70

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanserinin özellikle Amerika Birleşik Devletlerinde, diğer kanser türlerinin tedavisi ile ilgili sayısız ilerlemelere rağmen hemen hemen tamamen ölümcül olduğu rapor edilmiştir. Değişik akciğer kanser türlerinin iki gruba ayrılmaktadır. Birinci grup, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) olup, nöroendokrin kökenli olduğu düşünülmektedir. Bu tip akciğer kanserinde hastaların yaşam süresinin kemoterapi ile aylarca uzatılabileceği çeşitli klinik çalışmalar ile gösterilmiştir. İkinci grubu oluşturan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) içerisinde skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom yer almakta olup bu grupta, mevcut kemoterapötik ajanların hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir (70).

Kazein kinaz (CKII) enzimi bir serin treonin kinazdır. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin çoğunda tanımlanan protein kinazlardan biri olan CK II, memeli hücrelerin çoğunda hem sitoplazma hem de çekirdekte bulunmuş olmasına rağmen , hücre regülasyonundaki kritik rolü son yıllarda anlaşılmaya başlanmıştır (21,47,61). Normal proliferasyon olmuş dokularda ve büyüme fazındaki malign kanser hücrelerinde CKII aktivitesi yüksek bulunmuştur. Özellikle mitojenle uyarılan lenfositlerde, fare embriyogenezinde ve transforme insan hücre kültürlerinde artmış CKII aktivitesi gözlemlendiği bildirilmiştir (44,50).

CKII enzimi kendi kendini fosforile eden bir enzim olup 100' den fazla substratı bulunmaktadır (4). CKII'nin substratlarından olan myc onkoproteini (pmyc), c-myc (hücrel myc geni) onkogeninin bir ürünü olup miktarı pekçok kanser türünde artmaktadır (9). C-myc geninin amplifikasyonu sonucu p62 proteininin aşırı üretiminin, özellikle küçük hücreli akciğer kanserinde (SCLC) amplifiye olduğu belirlenmiştir (68). Myc'in, CK II için substrat olarak görev yapıp yapmadığını tayin etmek için, c-myc onkoproteini içeren kompleksler γ ^{32}P ATP varlığında saflaştırılmış enzimle inkübe edilmekte ve sonuçta otofosforilasyon özelliği olan CK II enziminin β alt ünitesine fosfat grubu girmektedir. CK II, substrat olarak uyumlu dizilere karşılık gelen sentetik peptidler kullanabilme özelliğine sahiptir (37). Bu çalışmamızda, çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılması önerilen RRRDDDSDDD dizili sentetik peptid ve c-myc ⁴¹⁰⁻⁴¹⁹ peptid dizilerini, normal ve kanser tanısı konmuş olgulara ait akciğer dokusunda CK II enzimine karşı substrat olarak kullanılması planlanmıştır.

Myc geninin c-myc, v-myc, N-myc, L-myc, P-myc, R-myc ve B-myc gibi farklı genomları bulunmuştur. Herbir genomun amplifikasyonu, kanser türlerine göre

değişmektedir (10). C-myc, N-myc ve L-myc'den oluşan myc ailesi onkogenlerinin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu, küçük hücreli akciğer kanserinde sıklıkla rastlanmasına karşılık küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yaygın değildir. C-myc aktivasyonunun yaygın mekanizması, aşırı ekspresyonla sonuçlanan gen amplifikasyonudur (43). N-myc geni ilk kez, c-myc geninin 2.ekzonu ile homoloji göstermesi ile saptanmıştır. Bu gen nöroblastoma, retinoblastoma ve küçük hücreli akciğer kanserinden türevlenmiş tümör ya da hücre soylarında amplifiye olmakta veya eksprese edilmektedir. Ayrıca, hem c-myc hem de n-myc genlerinin küçük bir bölgesi ile homoloji gösteren, küçük hücreli akciğer kanseri DNA'sından klonlanan üçüncü bir myc ilişkili gen tarif edilmiştir. L-myc adı verilen ve gen haritalama çalışmaları ile insan 1p 32 kromozomunda yer alan bu genin, insan tümörlerinde sitogenetik anormallikle ilişkili olduğu bildirilmiştir (45). Kanser hastaları, L-myc için 2 allel tarafından tanımlanan polimorfik paterne göre 3 genetik tipe sınıflandırılabilirler. Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLP) analizi ile L-myc onkogeninin S allelinin kansere yatkınlıkla ilişkili olabileceği düşünülmekte olup, halen tümör safhası, metastaz durumları ve hastalığın prognozu ile ilgisi açıklığa kavuşmamıştır (63).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, birçok kanser türünde myc geninin amplifiye olmasının saptanmasına karşın, genin genomik işleyişi nasıl kontrol ettiği anlaşılamamıştır. Bazı araştırmacılar da, L-myc geninin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarında metastatik potansiyel için bir belirleyici olduğunu rapor etmişlerdir (26, 27). Ayrıca, akciğer kanserlerinde temel olan ilk bulgulara karşılık L-myc polimorfizminin, önceden teşhiste ve 1p32 bölgesiyle ilgili insan tümörlerinde sitogenetik değişikliklerin analizinde geniş çapta uygulanabilir bir genetik marker olabileceği düşünülmektedir (45).

Yaptığımız literatür araştırmasında insan akciğer dokusunda CK II enziminin kinetik özelliklerini gösteren karşılaştırılmalı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın ilk aşamasında, hem normal hem de akciğer tanısı konmuş doku örneklerinde, CK II enziminin c-myc ve sentetik peptide karşı gösterdiği kinetik özellikler hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise, normal ve akciğer tanısı konmuş olgularda incelenecek L-myc gen polimorfizmi ile, hastalığa yatkınlık, prognoz ve metastatik durum arasında bir ilişkinin var olup olmadığının araştırılması planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Akciğer kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde en başta gelen ölüm nedenidir. Diğer kanser türlerinin tedavisi ile ilgili ilerlemelere rağmen akciğer kanseri, hemen hemen tamamen ölümcüldür. Akciğer kanserinin karsinogenez döneminde moleküler seviyede olan olaylar ile ilgili son yıllarda birçok yeni bilgi bulunmuştur. Bu bulgular, akciğer kanserinin gelişimini anlamaya yardım eder, ayrıca tanı ve tedavisinde de önemlidir (70).

Çoğu epidemiyolojik, sitogenetik ve deneysel çalışmalar, dolaylı olarak kanserin genetik hasar tarafından oluştuğu hipotezini desteklemektedir. Klinik olarak onkogenler, hastalığın etyolojisinin anlaşılması ile birlikte tümörlerin tedavi, prognoz ve teşhisi için daha kesin tanıya olanak sağlamaya yardım etmektedir (64).

Kanserde etyolojik faktörleri teker teker incelerken bunların önem sıralarını saptamak güçtür. Çünkü bir bölgeden diğerine , cinsler arasında ve zaman süreci içerisinde bu faktörlerin önem sıraları bariz bir biçimde değişebilir. Bütün bunlar değerlendirilerek yapılan incelemeler sonucunda, kanserlerde etyolojik faktör olarak kabul edilen başlıca nedenler; iyonize radyasyon, ultraviyole ışınları, hava kirliliği, beslenme faktörleri, alkol, virüsler, genetik faktörler ve immün yetersizliktir. Akciğer kanserlerinin etyoloji ve patogenezinde ise yukarda saydığımız etyolojik faktörlerin yanı sıra, uzun süreli sigara içiminin, mesleki faktörlerin ve solunum yolu ile alınan radyoaktif parçacıkların rolü olduğunu bildiren araştırmalar mevcuttur (56) .

Son zamanlarda akciğer kanserinin patogenezindeki moleküler temeller araştırılmaya başlanmıştır. Akciğer kanserindeki başlıca moleküler değişiklikler şunlardır:

Genetik İnstabilitenin Göstergeleri: Akciğer kanseri karsinogenezin birçok basamağının sonunda görülür ve birçok olguda kronik sigara içimine bağlı karsinogenler tarafından oluşturulan genetik ve epigenetik hasar sonucu görülür. İnsan kanserlerinde genetik instabilite iki seviyede oluşur; bunlardan birincisi, kromozomal seviyede olup sayı anomalileri (aneuploidi) ve yapısal anomalilerdir (delesyon ve non-resiprokal translokasyonlar). İkincisi, sellüler genlerle ilgili olup protoonkogenler, tümör süpresör genler ve DNA onarım genleri bu grup içerisinde yer almaktadır (13).

Akciğer kanseri hücrelerinde gözlenen özel moleküler değişiklikler ise büyümenin uyarılması sonucu onkogenlerde olmaktadır. Uyarılmayı sağlayan yolların birçoğu protoonkogen oluşumuna neden olmaktadır. Uyarıyı sağlayan başlıca yollar;

gastrin serbestleyen peptid (GRP)/Bombesin (BN) otokrin halkası, epidermal büyüme faktör reseptörü (ERBB) ailesi, diğer membran protein kinazları, nikotin ve opioid reseptörleri, ras protoonkogen ailesi ve myc' tir. Diğer spesifik değişiklikler ise tümör süpresör genleri (P53) , p 16-siklin D1-CDK4-Rb Yolu (Retinoblastom geni, siklin D1 ve CDK 4, p19^{ARF} diğer aday TSG'ler) , apoptozis , telomeraz aktivitesi, belirgin metilasyon, anjiyogenezis ve metaztazlar olarak tanımlanmıştır (13) .

2.1.PROTEİN KİNAZLAR

Proteinlerin fosforilasyonu ve defosforilasyonu, hücrelerin büyüme ve çoğalması ile ilişkili olayları kapsayan hücresel olayların değişikliğini kontrol eden başlıca mekanizmadır. Yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalarda, düzenleyici sinyallerin iletilmesine ve hücre bölünmesinin düzenlenmesine karışan protein kinaz ağı varlığı gösterilmiştir (35).

Protein kinazlar (PK) protein substratlarda seril, treonil ve trozil kalıntıları üzerine nükleozid trifosfatlarının γ fosfatlarını transfer eden enzim ailesi olarak tanımlanır (24). Protein kinazlar sitoplazma, nükleus, membranlar ve organellerde mevcut olup, aktiviteleri genellikle sinyal iletişim yolları aracılığı ile olan allosterik düzenleyici mekanizmalara bağlıdır. Protein kinazlar, fosforilasyon yoluyla hücresel düzenlemede, çeşitli fizyolojik işlemlerin modülasyonunda rol alır. Bu fizyolojik olaylar arasında, metabolik yolların düzenlenmesi ve metabolitlerin, iyonların membran transportu, gen transkripsiyonu, DNA replikasyonu, hücre bölünmesi ve sinaptik ileti sayılabilir (61). Protein kinazlar, çoklu substratları varlığına izin veren protein substrat spesifitesinden çok, alıcı amino asid spesifitesine göre sınıflandırılır. Buna göre protein kinazların sınıflanması aşağıda gösterilmiştir (24).

- Protein- serin /treonin protein kinazlar
- Protein- tirozin kinazlar
- Protein sistein kinazlar
- Protein histidin kinazlar
- Protein-aspartil ya da glutamil kinazlar

Protein kinazlar için moleküler düzenleyicilerin tanımlanması bir başka sınıflandırmaya izin vermektedir.

- Protein serin/treonin kinazlar (ser/thr kinaz) aşağıdaki gibi düzenleyicilere göre gruplandırılabilirler (24).

- Siklin nükleotid düzenleyici protein kinazlar
- Ca²⁺ kalmodulin düzenleyici protein kinazlar
- Dİaçil gliserol Ca²⁺-düzenleyici protein kinazlar
- Ribozomal S6 protein kinazları
- Serpentin reseptör kinazlar
- Kazein kinaz II
- Glikojen sentaz kinaz 3
- cdc2 ailesi
- cdc2-ilişkili protein kinazlar
- MAP kinazlar
- Mos/raf protein kinazlar
- Kazein kinaz I
- Çift spesifisiteli protein kinazlar
- Diğer protein kinazlar

Bu protein kinazların çoğu, onların allosterik düzenleyicilerinin bağlanması sonrası holoenzim durumundan, düzenleyici alt ünitelerinin ayrılması ile aktif hale gelirler. Kazein kinazlar (CK) olarak bilinen enzim grubu ve siklin bağımlı protein kinazlarda (CDKs) holoenzim, (düzenleyici bağlanması sonrası) katalitik alt üniteleri ile düzenleyici alt ünitelerinin birleşmesi ile aktive hale gelmektedir (2). Kazein kinazlar, çoğu hücre alt kompartmanlarında tanımlanmış siklin nükleotid-bağımsız ve Ca²⁺/kalmodulin duyarsız ser/thr kinazlardır (1). Kazein kinazlar kazein, fosvitin ve diğerlerini içeren asidik proteinleri fosforile ederler. Kazein kinazların fosforil vericisi olarak ATP, GTP veya diğer nükleozid trifosfatları kullandığı, kofaktör olarak Mg²⁺ veya Mn²⁺ye sıkı bir şekilde bağımlılık gösterdiği açıklanmıştır. Doğal olarak kazein kinazlar, poliaminler gibi, oluşan polikasyonik moleküller tarafından aktive edilebilirler ve negatif yüklü karbonhidratlar ve heparin gibi polianyonik bileşikler tarafından da inhibe edilebilirler. Hücre düzenlenmesinde 100 den fazla proteini fosforile eden, kazein kinazların rolü hala tam olarak açıklığı kavuşmamıştır (15,21) . Kazein kinazların, dietil aminoetil (DEAE) selüloz kromatografisindeki elüsyonlarına bağlı olarak, kazein kinaz I (CK I) ve kazein kinaz II (CK II) olmak üzere 2 gruba ayrıldığı bildirilmiştir (4).

2.1.1.Kazein Kinaz I (CK-I): Bu enzim kazein kinaz II'den önce DEAE sellüloz kromotografik kolonundan elüe olup maya, kümes hayvanları ve memeliler içeren çeşitli ökaryotların, çoğu hücresinde tanımlanmıştır (22) .

Bu enzimin nükleus, sitoplazma ve mitokondride bulunduğu ve tek bir alt ünite içerdiği ve tavşan retikülositlerinden elde edildiğinde molekül ağırlığının 37.000 dalton olduğu gösterilmiştir (20). Fosforilasyon reaksiyonlarında, CK I sadece seril kalıntılarını fosforile eder ve optimal aktivitesi için fosforil vericisi olarak da sadece ATP'yi kullanmaktadır. Ek olarak enzim, seril ve treonil kalıntıları üzerinde kendi kendini fosforilleyebilme özelliğine sahiptir. Kazein kinazlar I substratların bazılarının protein sentezi başlatma faktörleri, aracı ribonükleoprotein partikülleri, RNA polimeraz içeren nükleer asidik proteinler, kırmızı hücre membran proteini ve glikojen sentaz olduğu bildirilmesine karşılık, moleküler seviyede enzimin fonksiyonel rolü ve düzenlenme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (22).

2.1.2.Kazein Kinaz II (CK II) : Kazein kinaz II, çoğu bitki ve hayvan dokularını içeren farklı hücre tiplerinden izole edilmiş olup, hem sitoplazma hem de nükleusta lokalize olduğu gösterilmiştir (4,32).

Enzimin gen replikasyonu, transkripsiyon ve hücre proliferasyonunda önemli rolleri olan bilinen protein substratlarının olması yanında, iki katalitik alt üniteden (α veya α') ve iki reglatuvar (enzimin aktivitesini uyaran) alt ünite (β)'dan oluşması ve onun spesifik etkileşimlerinin bazı substrat ve inhibitörlerle etkilenmesi, CK II enzimini ilginç yapan en önemli yaklaşımlardır. Kazein Kinaz II, 55 yıl önce keşfedilmesine rağmen, doğal düzenlenmesi hala açıklanmaktan uzaktır. Bu problemin çözülmesi sırasında ulaşılan en önemli bulgu, fonksiyonel analogların, düzenleyici CK2 β alt ünitesinin, siklin bağımlı protein kinazların, regülasyonlarında görev alan siklinlere benzediği ve bu alt ünitelerin CK II'nin katalitik aktivitesinin modülasyonunda bir faktör olup olmadığını tayin etmede önemli olacağı sonucuna ulaşılmıştır (4).

Kazein Kinaz II asidik substratlarda, hem seril hemde tereonil kalıntılarını fosforile etmektedir. Kazein Kinaz II'nin molekül ağırlığı yaklaşık 130.000 dalton olup, en önemli yapısal özelliği α 2 β 2, α α' β 2 ve α' 2 β 2 izoformlarını oluşturmak üzere birleşen α , α' , β olmak üzere 3 farklı alt üniteden oluşan bir heterotetramer olmasının yanında α ve α' alt ünitelerinin katalitik , β ünitelerinin ise düzenleyici özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (4).

2.1.2.1.Kazein Kinaz II alt ünitelerinin özellikleri: İnsan CK II α ve α' alt ünitelerine ait genlerin sırasıyla 20. ve 16. kromozomda, β alt ünitesinin geninin ise 6.kromozom üzerinde yer aldığı gösterilmiştir. İnsan rekombinant α ve α' alt ünitelerinin sırasıyla 391 ve 350 amino asitten oluştuğu ve moleküler ağırlıklarının yine sırasıyla 43.000 ve 38.000 dalton olduğu bildirilmiştir. Beta (β) alt ünitesi 215 amino asitten meydana gelirken, moleküler ağırlığı 28000 dalton olduğu gösterilmiştir (35,53).

İnsan α alt ünitesinin, nükleozid bağlama ve fosforilasyon için gerekli birimleri içerdiği ve substrat bağlaması için histidin grupları ile korunmuş bir bölgeye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Karboksil ucunun p34 cdc-2 kinaz tarafından fosforile edilen özel bir bölge içerdiği ve α alt ünitesi için 71-80 amino asid (a.a.) ve α' alt ünitesi için ise 72-81a.a arasında bulunan ana diziyi (K^{71} PVKKKKIKR 80) bünyesinde bulundurduğu gösterilmiştir. Beta (β) alt ünitesinin, N terminal bölgesinin bir otofosforilasyon elementi içerdiği bildirilmiştir (31). Ayrıca α ve α' alt üniteler, bir nükleer sinyal birimi içerirler ki bu birimin β alt ünitesinde mevcut olmadığı gösterilmiştir. Alfa ve α' ünitelerinin sitoplazmadan nükleusa translokasyonun bu diziler aracılığıyla olabileceği ve α alt ünitelerinin kendi kendilerine aktifleşebileceği ileri sürülmüştür (4). β ünitesi ve iki α alt ünitesinin birbirini fosforile ederek, tetramer yapı oluşumundan dolayı otofosforilasyonu arttırabileceği fikri ortaya atılmıştır (23). Beta (β) alt ünitesi, aslında katalitik olarak inaktif olup, mutasyon sonucu β otofosforilasyon bölgelerinin kaybının, α alt ünitelerini aktive etme kapasitesi üzerine hiç bir etkisi olmadığı açıklanmıştır (40). Ancak β alt ünitesi ile α ve α' katalitik alt ünitelerinin ısı ve ürenin etkisi sonucu oluşan proteolitik degradasyon ve denaturasyona karşı stabilize etkisi gösterilmiştir. Beta (β) ünitesinin söz konusu alt ünitelere aktivasyonlarını spesifik bölgelerine polibazik efektörlerin bağlanması sonucu gerçekleştiği bildirilmiştir. Diğer taraftan, β alt ünitesinin potansiyel substratlarının bir kısmının için CK II spesifitesini ayarladığı ve kalmodulin varlığında β alt ünitesi fosforilasyonunun inhibe olabileceği rapor edilmiştir (5). Kazein Kinaz II nin biyolojik rolleri, düzenlenmeleri ve farklı dokularda CK II'nin alt ünitelerinden tetramerik holoenzim oluşum hızı henüz anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar sonucu, söz konusu holoenzimin, çok uzun yarı ömre sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Ancak serbest β alt ünitesinin böyle bir özelliğe

sahip olmadığı ve CK II'nin α ve α' alt ünitelerinin sadece β ile etkileşime girebileceği, oysaki β alt ünitesi α , α' ve β alt üniteleriyle de etkileşime girebileceği gösterilmiştir (17). Kazein kinaz II, hem prokaryot hem de ökaryot dokularında ve çoğu hücrelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Kazein Kinaz II farklılaşmış hücrelerde düşük, hızla çoğalan hücrelerde yüksek aktivite göstermektedir. Yapılan son çalışmalar, CK II'nin hem sinyal iletimi, hem de hücre siklus kontrol sistemini de direkt olarak içine alan hücre proliferasyonunun kontrol edilmesinde kritik bir role sahip olduğu teorilerini desteklemektedir. Kazein Kinaz II (CK II) düzenleyici enzimler, yapısal proteinler, onkoproteinler ve kanser süpresör genlerin proteinlerini de içeren 50'den fazla farklı proteini fosforile etmektedir. Kazein kinaz II'nin ya ATP'yi ya da GTP'yi, magnezyum veya manganez varlığında fosfat verici substrat olarak kullandığı bildirilmiştir (18).

2.1.2.2.CK II substratları: Kazein kinaz II enziminin 100'den fazla bileşiği substrat olarak kullanabileceği gösterilmiştir. Söz konusu substratlar arasında çoğu sitoplazmik, nükleer enzimler düzenleyici proteinler, yapısal elementler, onkogenlerin proteinleri, tümör supresör gen ürünleri ve bir kaç zara bağlı reseptörün önemli olduğu bulunmuştur (21, 39) (Tablo 1a,1b). Kazein kinaz II, pek çok dokudan saflaştırılmış olup, hem sitoplazma hem de çekirdekte bulunduğu ve büyüme faktörlerinin uyarmasıyla da aktive olabildiği bilinmektedir. Bu klasik bilgilere ek olarak, CK II'nin maya hücre bölünmesini kontrol eden proteinlerle bir benzerlik göstermesi onun hücre proliferasyonunun kontrolünde bazı olaylarda görev alabileceği görüşü ileri sürülmüştür. Kazein kinaz II'nin, myc, myb, fos, SV40 büyük T antijen ve E1a tranforme edici proteini içeren bir kaç onkoproteini substrat olarak kullandığı da yapılan araştırmalar sonucu kesinlik kazanmıştır (37).

Tablo 1a. CK-II'nin Kullandığı Protein Yapısındaki Substratlar (4)

Nükleik asid sentezinde görev alan enzimler

RNA polimeraz I
RNA polimerazIIa
DNA Topoisomeraz I
DNA Topoizomeraz II
DNA ligaz

Transkripsiyon faktörleri: Nükleer protein ürünleri ve tümör baskılayıcı proteinler

Baskılayıcı proteinler
Androjen reseptör
c-myc
SV-40^a'ın büyük T antijeni
c-myb^a
Serum cevap faktörü (SRF)
EIA-adenovirus^a
N-myc
C-jun
P-53^a
Retinoblastoma^a
Papilloma virus E7
cAMP düzenleyici element bağlayan protein

Sinyal iletimi proteinleri

p34 cdc-2
Protein kinaz C
Protein kinaz A – düzenleyici alt ünite
İnsülin reseptörü
Kalneksin
Kaldesman^a
Kalsequestrin
Kalmodulin
DAR PP-32
Phosphate inhibitor-2
Synaptotagmin
LD-Lipoprotein reseptör

Protein Sentez Faktörleri

eIF3
eIF4B
eIF5
eIF1^a
eIF2^β
eIF2^β (protein sentez guanin nükleotid değiştirici faktör)

Tablo 1b. CK-II'nin Kullandığı Protein Yapısındaki Substratlar (4)

İskelet ve yapısal proteinler

β-Tubulin
Myozin ağır zinciri (beyin, düz ve iskelet kası)
Myozin hafif zinciri a
Spektrin
Troponin-T
Klatrin zincir b-zinciri
tqu
MAP-IB

Diğer nükleer ve nükleolar proteinler

HMG1^a
HMG14
Nükleolin^a
Nükleolar protein B23
HMG-benzer protein P1
P120 hücre proliferasyonu nükleolar protein
pp35 proliferasyon nükleer P proteini
Nükleer DNA bağlayıcı protein p200
FK 506-bağlayıcı protein

a: Bu proteinler aynı zamanda cdc-2/cdks kinazlar tarafından da fosforile edilebilirler.

2.1.2.3.Kazein Kinaz II'nin Subsellüler Lokalizasyonu: Kazein kinaz II (CK II), genellikle hücre sitoplazmalarında baskın olan, aktivitesi ise hızlı çoğalan normal hücreler ve tüm kanser hücrelerinde oldukça yüksek bir ezimdir. Mitojenik olaylar sırasında kinazların, nükleus ve nükleolar kompartmanlarda yoğunlaştığı gösterilmiştir (12). CK II'nin G₀ / G₁ geçiş fazı sırasında hem stoplazma hem de nükleusta bulunduğu gösterilmiştir. G₁'in erken fazında alfa alt ünitesinin nükleusta yoğunlaştığı, G₁/S geçiş fazı sırasında sitoplazmaya doğru hareket ettiği yapılan araştırmalar sonucu açıklık kazanmıştır (47). CK II α şeklinin G₁ fazında sitozolik, α'nün ise nükleusta yoğunlaştığı ve ayrılabilceği rapor edilmiştir (73). Daha sonraları , α, α' ve β alt ünitelerinin tümünün nükleusta lokalize olduğu bildirilmiştir (35).

Kazein kinaz II enzimi, substrat olarak kullandığı bileşiklerin spesifik amino dizilerini fosforile eder. Kinazlar, hücre yüzeyinden fosforilasyon reaksiyonları sırasında ekstrasellüler matrikse salınırlar. Böylece CK II'nin sitoplazmadan nükleus

içine ve nükleus içinde mitogenik sinyal iletiminde bir rolü olduğu fakat düzenleme mekanizmalarının ise hala açıklanamadığı görülmektedir (69).

2.1.2.4.Enzim Aktivasyonu ve Düzenlemesi: Doğal olarak oluşan polikatyonik uyarıcılar arasında yer alan poliaminlerden, putresin, spermin ve spermidin, kazein kinaz II enziminin aktivitesini düzenlemekte görev alırlar. Lizin ve ornitin polimerlerini içeren sentetik polimerlerin de bu amaç için kullanıldığı gösterilmiştir. Bu bileşiklerin tümü pozitif yüklü organik bileşiklerdir (62). Heparin, dextran sülfat, inozitol hekzasüfat, kondroitin sülfat A, C, hyolürik asit, 2-3 bifosfoglisarat ve poliglutamat, polianyonik inhibitörler olup negatif yüklü polisakkaridlerdir. Heparin, CK II aktivitesinin tanımlanmasında hem ATP hem de GTP ile kullanılan bilinen en iyi inhibitör olarak tanımlanmıştır. Bu inhibitörler, protein substratlarla genellikle yarışır. Heparinin hem α alt ünitesinin aktivitesini hem de CK II'nin otofosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (19,21). Kazein Kinaz II aktivitesindeki artmanın, enzimin yeniden yapımında alt ünitelerinin tümünün arttığı ancak bu durumun hücre serum hormon ve büyüme faktörlerinin etkisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Enzimin aktivitesinin, serumla uyarılmış insan W 138 fibroblast hücrelerinde (8) IGF-I ile uyarılmış fare Balb c 3T3 hücrelerinde (30) insüline indüklenmiş fare 3T3 sıçan adipositleri (11) ve tümör nekrozis faktör ile uyarılmış fare Swiss 3T3 hücrelerinde (66) arttığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, hızla proliferen olan hücrelerde ve tümör içermeyen dokularla karşılaştırıldığında proliferen olan tümör dokusunda CK II aktivitesinin arttığını göstermiştir (44,50). Son yıllarda düzenleyici nükleer proteinlerin fosforilasyonu ile nükleer olayların düzenlenmesinde, CK II'nin rolü hızla önem kazanmaktadır. Özellikle CK II için fizyolojik substratların listesinde nükleer onkoproteinler, tümör süpresör proteinler , transkripsiyon faktörleri ve DNA metabolizmasına karışan proteinler önem taşımaktadır . Bu proteinlerin tümünün hücrelerde fosforile edilebilen bölgelerinin CK II tarafından fosforile edilebileceği düşünülmektedir. Ancak , son zamanlarda fosforilasyon proteinleri arasında özellikle c-myc (37) ve N-myc (46) proteini ile yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır (35) (Tablo 2).

Tablo 2. CK II tarafından fosforile edilen düzenleyici nükleer proteinler (35)

Protein	Fonksiyonu	Fosforilasyonun Etkisi
c-myc	Transkripsiyon faktörü	Bilinmiyor
N-myc	Transkripsiyon faktörü	Bilinmiyor
Max	Transkripsiyon faktörü	Max/max homodimerlerinin DNA'ya bağlanmasını inhibe eder
c-myb	Transkripsiyon faktörü	DNA bağlanmasını değiştirir
c-Jun	Transkripsiyon faktörü	DNA bağlanmasını inhibe eder
SRF	Transkripsiyon faktörü	DNA bağlanmasının hızını artırır veya azaltır
c-ErbA	Transkripsiyon faktörü	Bilinmiyor
PU.1	Transkripsiyon faktörü	NF-EM5 ile etkileşimi başlatır
P53	Tümör baskılayıcı	DNA bağlanmasını aktive eder CK II mutasyonu antiproliferatif potansiyeli bozar.
UBF	Nükleer transkripsiyon faktörü	RNA polimeraz bağımlı transkripsiyonun bariz transaktivasyonu
E7	HPV tip 16 protein'e dönüştürücü	CK II bölgesindeki mutasyon transformasyon potansiyelini azaltır
Büyük T	SV40'm transforme edici proteini	Nükleer transport artar
Topoizomera II	DNA topoizomera II	Aktivitesi 10 kat artar
DNA ligaz	DNA'nın ATP bağımlı ligasyonu	Aktivitesi artar

Görüldüğü gibi, CK II nükleer proteinlerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde oldukça önemli bir role sahiptir. Özellikle gen ekspresyonuna karışan proteinlerin CK II ile fosforilasyonu, CK II'nin proliferatif olayları kontrol eden düzenleyici yolların önemli bir elemanı olduğunu gösterilmiştir (35).

2.2.ONKOGENLER ve MYC ONKOPROTEİNLERİ

Onkogen araştırmaları üzerinde yapılan çalışmalar son 10 yılda önem kazanmıştır. Bu yoğunlaşmanın sebebi ise, her yıl evrensel olarak 6.3 milyon insanın kanserden ölmesinden kaynaklanmaktadır. Onkogenler, kansere yol açan genler olarak tanımlanmaktadır. Onkogenler, tüm normal hücrelerde mevcut normal protoonkogenlerin değişmiş şekilleridir. Günümüzde yaklaşık 200 protoonkogen

tanımlanmıştır ve bu genlerin en azından birinin aktive olmuş onkogenik şekli çoğu insan tümör gruplarıyla ilişkili olduğu açıklanmıştır. Protoonkogenler özellikle, hücreler arası sinyal iletiminin önemli proteinlerini kodlama özelliğine sahip olup normal hücre genleridir. Onkoproteinler, protoonkogenlerin mutasyona uğramış şekillerinin transkripsiyonu sonucu oluşan onkogenler tarafından kodlanan proteinlerdir. Bu gibi mutasyona uğramış proteinler fonksiyon olarak anormaldirler ve normal hücrede bulunmazlar. Pek çok grupta onkogenler, büyüme faktör uyarısına karşılık olarak normal olarak üretilen transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Bu proteinler spesifik DNA dizilerine bağlanmada büyüme kontrol genlerinin ekspresyonu regüle etmektedirler Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin, fosforilasyonla düzenlediği açıklanmıştır. Myc proteinlerinin tümü (c-myc, N-myc ve L-myc) temel, helix-loop-helix ve lösin zipper bölgesi içerirler. Myc gen ürünlerinin başlıca fonksiyonları hücre proliferasyonunu indüklemek ve mitojenik uyarıya karşılık olarak son dönem farklılaşmanın inhibisyonu olarak tanımlanmışlardır. Bu genler, insan tümörlerin çoğunda sıklıkla, ya amplifikasyon ya da aşırı ekspresyonla onkogenlere dönüşme yeteneğine sahiptirler (68)..

C-myc tavuk (avian) myelositomatozis virus MC29'dan elde edilmiş viral transformasyon onkogeni olan v-myc'nin normal hücre sel homologudur (60) C-myc geninin 2. ve 3. egzonunun translasyonu sonucu oluşan Myc onkoprotein, birkaç protein kinaz tarafından fosforile edilebildiği ve nükleusta yerleştiği bilinmektedir . Ancak, diğer kromozomlarda V-myc, N-myc, L-myc benzeri birçok alt şeklinin bulunduğu bildirilmiştir. DNA'ya güçlü bağlanma ve dimerizasyondaki P-myc proteinlerinin kabiliyeti, onların nükleer yerleşimi bu proteinlerin fonksiyonel olarak transkripsiyonel düzenleyiciler olduğunu göstermektedir (9,60). P-myc hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli sorumluluklar üstlenmiştir. Amplifikasyon, kromozomal translokasyon ya da nokta mutasyonu tarafından C-myc genindeki oluşan moleküler değişimler, büyüme faktör gereksiniminin azalmasına, hücre siklusunun G₁ fazının kısalmasına , normal hücrelerin transformasyonuna ve immobilizasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (29,49,60) P-myc'nin küçük hücre akciğer kanserinde (55), kolon kanseri (3) ve diğerlerinde de amplifiye olduğu bilinmektedir (3,49,55)

Yapılan çalışmalarda c-myc onkoproteininin başlıca hücre çekirdeğinde lokalize olan ve DNA'ya bağlanabilen 64-67 kDA ağırlığında bir protein olduğu anlaşılmıştır (54). Bazı iyi tanımlanmış protoonkogenlerin evölüsyon sırasında

drozofiladan vertebralılara kadar iyi korunmuş olduğu bildirilmiştir (59). İn situ hibridizasyon çalışmalarıyla myc gen lokusunun Burkitt lenfoma translokasyonlarının kırılma noktası olan 8.kromozomun q24 bölgesinde yer aldığı tarif edilmiştir (52). Son yıllarda yapılan çalışmalar, çeşitli insan malignitelerinde aktive olduğunda önemi gösterilmiş olan myc gen ailesinden üçünde odaklanmıştır. Bunlardan en yaygın çalışılan c-myc, ilk olarak avian myelomatoses virüsü MC29'un transforme edici geni ile benzerlik göstermesiyle tanımlanmıştır. Diğer iki myc geninden, N-myc nöroblastoma, L-myc ise küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde amplifiye olan dizilerde v-myc ile benzerlikleriyle keşfedilmişlerdir. Bu üç proto-onkogenik aileye ek olarak S-myc ve B-myc denilen iki myc geni de tanımlanmıştır. Daha henüz kısmi olarak tanımlanmalarına rağmen, bu iki gen, c-myc, L-myc ve N-myc'den farklı olarak malign oluşumları baskılamada görev alan proteinleri kodladıklarından oldukça ilginçtirler (9,54,60) (Tablo 3).

Tablo 3. Günümüzde tanımlanmış memeli myc genleri (54)

Myc geni	Fonksiyonları	c-myc ile amino asid dizisi benzerliği (%)
c-myc	Hücrel transformasyon Apoptozis Hücre döngüsü ilerleyişi	-
L-myc	Hücrel transformasyon Hücre döngüsü ilerleyişi	35
N-myc	Hücrel transformasyon Hücre döngüsü ilerleyişi	38
S-myc	Büyümenin baskılanması Apoptozis	31
B-myc	Neoplastik transformasyonun inhibisyonu	61
P-myc, L-myc	Psödogenler	L-myc'den türevlenmiş

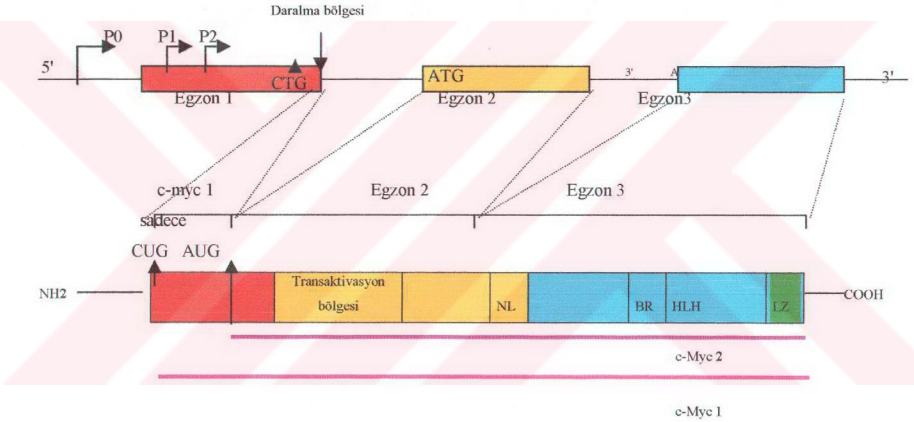
Myc genleri, gen amplifikasyonu, kromozomla translokasyon, proviral insersiyon ve retroviral transdüksiyon ile aktive olabilirler (Tablo 4) (54).

Tablo 4. Myc aktivasyonunun hangi durumlarda görüldüğü, mekanizması ve etkileri (54)

C-myc Aktivasyon Mekanizması	Etkileri	Görülmesi
Amplifikasyon	Artmış myc proteini	Gastrik adenokarsinom, küçük hücreli akciğer kanseri, glioblastom, meme kanseri, kolon kanseri, plazma hücre lösemisi, promyelositik lösemi, granülositik lösemi
Proviral insersiyon	Viral uzun uç tekrarlarıyla myc'in ekspresyonunun yeniden düzenlenmesi	Avian leukosis virüsü veya Molony mürin lösemi virüsü ile infekte olma sonucu lösemi
Retroviral transdüksiyon	Viral Gag-myc füzyon proteininin ekspresyonunun yeniden düzenlenmesi	Felin lösemi virüsleri (GT3 ve FTT) avian lösemi virüsleri (MC29 ve MH2)
Kromozomal translokasyonlar	Tümden ya da kesintili olarak myc'in ekspresyonunun yeniden düzenlenmesi	Burkit lenfoma, fare plazmastomasi

C-myc proteini dizisinin bilinen diğer transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi bir seri özellik içermesi ile bu proteinin gen ekspresyonu kontrolünde bir rolü olabileceği kanısına varılmıştır. Lösin zipper bölgesi, v-fos ve v-Jun onkoproteinlerdekine benzer olarak tanımlanmış ve bu proteinin en sondaki karboksil (C) ucunda lokalize olduğu bildirilmiştir. Bunun hemen ardından, helix-loop-helix motifi ismini alan ikinci bir bölge yer almakta ve bu bölge immünglobulin bağlanmasını artırıcı proteinlerden E12 ve E47 içeren transkripsiyon faktörlerinin bir kısmında da tanımlanmıştır. C-myc proteinin, amino (N) ucunda dizi spesifik DNA bağlanmasına karışan ve transkripsiyonel transaktivatör etkisine sahip bir bölge olan "temel bölge" yer almaktadır ve bu bölge de daha önceleri myogenik transkripsiyon faktörü olarak bilinen Myo D'de tanımlanmıştır (54) C-myc'in transkripsiyonel aktivasyonda olduğu kadar, transkripsiyonel baskılamada da etkin olduğu ve hatta onun proglamlanmış hücre ölümü (apoptozis) ile hücre döngüsü ilerleyişinde olduğu gibi bir rolü olabileceği düşünülmektedir (49,54)

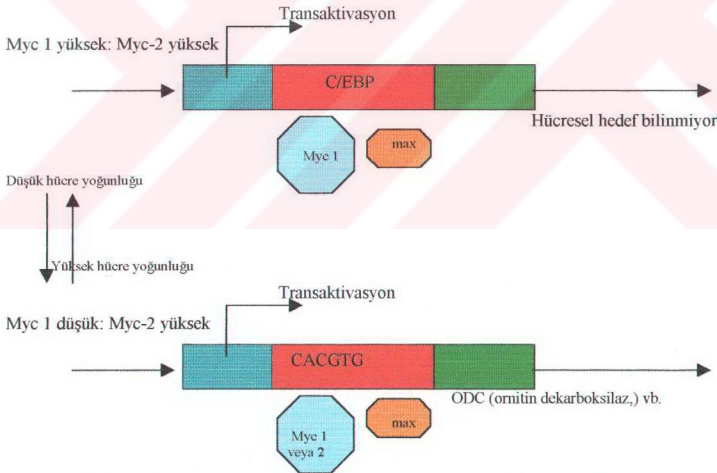
P1 promotörü sitoplazmik c-myc mRNA'sının %75-90, P2 promotörü ise %10-25 ine katkıda bulunmaktadır. P1 ve P2 promotörünün yaklaşık 1500 bp aşağısında ve transkripsiyon başlama bölgesinin yakınında P3 promotörü yer almaktadır. Bu promotör c-myc mRNA'sının sadece %5 kadar katkıda bulunduğundan P1 ve P2 ye oranla daha az önemli olduğu düşünülmektedir. Sadece insan c-myc geninde bulunan P0 promotörünün, P1 ve P2 başlama bölgesinin 600 bp daha yukarısında yer aldığı gösterilmiştir. P0 promotörünün önemi henüz anlaşılamamış olup, çoğu hücre soylarında genin tekrardan düzenlenmesinde rol aldığı gözlenmiştir. C-myc'in mRNA'sının yarı ömrünün 15 dakika, proteininin 30 dakika olduğu gösterilmiş, ancak hala bu değerlere tam bir kesinlik getirilememiştir (10,49,54) (Şekil 1).



Şekil 1: İnsan c-myc geninin yapısının şematik olarak gösterilmesi ve c-myc 1 ve c-myc 2 protein ürünleri

Gen promotör bölgeleri P0,P1,P2,P3 olarak gösterilmiştir. İki proteinin başlatıcı bölgeleri başlatıcı amino asit kodonu CTG (CUG) ve ATG (AUG) olarak gösterilmiştir. NL;nükleer lokalizasyon, BR; temel bölge, HLH; helix-loop-helix, LZ; lörin zipper

Son zamanlarda araştırmacıların ilgisi, c-myc geninin iki alternatif translasyon ürünü olan c-myc 1 ve c-myc 2'nin farklı roller üstlenmesi çevresinde toplanmıştır. Buna göre c-myc 2'nin hücre büyümesini uyardığı, c-myc 1'in ise büyümeyi baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 1). C-myc 2, c-myc'in daha kısa ve baskın olan formu olup bir standard AUG kodonundan başlatılırken, c-myc 1 daha uzun bir proteindir ve AUG olmayan bir kodondan (insanda CUG) başlatılmakta olduğu saptanmıştır. EFII adı verilen spesifik çoğaltıcı bir elementin c-myc 2 tarafından değil c-myc 1 tarafından aktive olduğu bildirilmiştir. EFII analiz edildiğinde ise myc ile uyan max bağlanma bölgesi (CACGTG) içermediği ve c-myc 1 tarafından aktivasyonunun bir CCAAT/enhancer bağlama proteini (EBP) için uyumlu bir bağlama bölgesi içeren tekrarlayan bir diziye bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu durumda myc:max heterodimerlerine bağlanırken max:max dimerlerine bağlanamamakta olduğu saptanmıştır. Tüm bu bilgilerden, myc:max ile CCAAT/EBP nin aynı bağlama bölgesi için yarıştığı düşünülmektedir (54) (Şekil 2).



Şekil 2: İki myc proteininin (c-myc 1 ve c-myc 2) farklı özellikleri

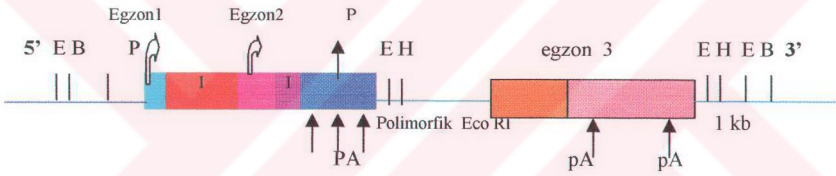
Myc ailesinin onkogenlerinin farklı kanserlerin çeşitliliğinde rol aldığı bilinmektedir (29,49,54). Myc genleri karsinogeneze karıştıklarında, oluşan olayların başlangıç safhasında değil, tümör ilerleyişi sırasında myc'in tekrar düzenlenmesi ve amplifikasyonu sonucu meydana geldiğini göstermiştir. Myc amplifikasyonu gösteren küçük hücreli akciğer tümörlerinin, daha fazla agresif (kötü huylu) ve bu tümöre sahip hastaların da, daha kötü prognoza sahip oldukları açıklanmıştır (68).

Myb proteini transkripsiyonel aktivasyon, negatif düzenleme, dizi spesifik DNA bağlama birimleri içermektedir. Myb pozitifliği myc'yi içeren genlerin çoğunun transkripsiyonunu stimülasyonu kadar kendi transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Myc, myb'ye benzer olarak genellikle amplifikasyonla aktive olur ve lösemi, kolon kanseri melanom, göğüs kanserleri ve aynı zamanda bazı servikal tümörlerde de gösterilmiştir (51,68). Diğer taraftan tüm 3 myc geninin anormal ekspresyonu, hem küçük hücreli hem de küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde saptanmıştır. Myc'in amplifikasyonunun p62 protein ürününün aşırı üretimine yol açtığı ve küçük hücreli akciğer kanserinin progresyonu ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (68).

Myc gen ailesinin birkaç insan tümöründe, kromozomal translokasyonlar ya da gen amplifikasyonları gibi yeniden yapılan DNA düzenlenmelerinden dolayı aktive olabildiği bildirilmiştir (38). İlk kez L-myc geni, C-myc ve N-myc geni ile homoloji gösteren bir dizi gen amplifikasyonu varlığında insan küçük hücre akciğer kanseri hücre soyundan izole edilmiş (45) ve Kaye ve ark 1988 (28) tarafından dizilendirilmiştir. C-myc veya N-myc'in biyokimyasal fonksiyonları bilinmemesine rağmen, her iki gen kısa yaşam süreli nükleer fosforile proteinler kodladığı ve DNA'ya bağlanabilme özelliği bilinmektedir. L-myc geninin ekspresyonunun düzenlenmesinin kompleks olduğu bildirilmiştir. C-myc ekspresyonu, daha yaygın olmasına rağmen, L-myc gen ekspresyonunun fetal beyin, böbrek ve akciğer dokusu ile yetişkin akciğer dokusu ile sınırlı olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, küçük hücreli akciğer kanserinde yükselen endokrin hücrelerin, fetal akciğerde bol ve yetişkin akciğerde azalmış sayıda olmasından dolayı, hem yeni doğan ve yetişkin akciğerinde neonatal L-myc ekspresyonu olması ilgi çekicidir (65). N-myc'in artmış ekspresyonunun, kemoterapiye alınan zayıf cevap, hızlı tümör büyümesi ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, N-myc sıklıkla

nöroblastoma, retinoblastoma, glioma ve astrositomalarda amplifiye olurken, L-myc amplifikasyonu küçük hücreli akciğer kanserinde tespit edilmiştir (68).

İnsan küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) hücre soylarında gen amplifikasyonu varken ya da olmaksızın bu genin 1p32 kromozom bölgesinde yer aldığı gösterilmiştir. Myc gen ailesinin yapısal organizasyonu 3 egson 2 intronla korunmakta ve .bariz bir şekilde translasyon olmayan egson 1 ile egson 2'nin 5' ucunun yakınında yer alan , baskın bir translasyon başlama bölgesi, diğer myc genleri ile benzemektedir. L-myc geninin oldukça stabil yapısının oluşumuna yüksek derecede G ve C'ler katıldığı gösterilmiştir (28) (Şekil 3). L-myc geninin 1.8 Kb (34kDa), 2.0 Kb (37 kDa), 3.6 Kb (60 kDa) ve 3.8 Kb (66 kDa) olmak üzere 4 farklı transkripti olduğu bildirilmiştir (49)



Şekil 3. İnsan L-myc geninin kısmi bir restriksiyon haritası (İ: intron, E: EcoRI, B: Bam HI, P:Pvu II, H:Hind III pA:Poly A) (28)

İnsan plasental genomik kütüphanesinde yapılan analizlerde Eco RI kesimi sonucu, L-myc'in gen polimorfizminden sorumlu 10 kb (L) ve 6 kb (S) lık iki fragment tanımlanmıştır (28). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde RFLP'nin 6 kb'lık allelini taşıyan hastaların (heterozigot veya homozigot durumunda), diğer organlara metastazın artmış insidansı olacağı gibi lenf nodu metastazını da en yüksek derecede sahip oldukları bildirilmiştir (27). L-myc gen polimorfizmi akciğer, böbrek, mide ve meme kanserlerinde çalışılmış olup , çoğu tümörde lokal veya uzak metastazı belirttiği bildirilmesine rağmen konu halen tartışılmaktadır (67).

3.MATERYAL VE METOD

3.1.ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE CİHAZLAR

3.1.1.KİMYASAL MADDELER

MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid) (Sigma M 8899), β -gliserol fosfat (Sigma G 6626), EGTA (Ethylene Glycol-bis(β -aminoethylether N,N,N',N'-Tetraacetic Acid) (Sigma E 0396), sodium ortovanadat (Sigma S-6508), Dithiothreitol (Sigma D 9779), β -merkaptotanol (Sigma M 6250), EDTA (Ethylenedinitrilo tetraacetic acid dihidrat) (Merck K-90602121), Trizma hidroklorid (Sigma T 3253), 2,5-difeniloksazol (PPO) (Sigma D 4630), 1,4-di 2(5-fenil oksazolil) benzen (POPOP) (Merck 838 K 1661149), Toluen (Sigma T 4428), TCA (triklor asetik asit) (Sigma T 9159), Fosforik asit (Sigma P 6560), Aseton (Carlo Erba Code:301511), c-myc peptid-1 (EQKLISEEDL) (Calbiochem PP01-PP62), Protein Kinaz A inhibitör peptid (PK I) (Cat #12-151), ATP (Sigma A 2383), CK II enzimi için sentetik substrat peptid dizisi (RRRDDDSSDD) (Arg-Arg-Arg-Asp-Asp-Asp-Ser-Asp-Asp-Asp) (American Peptide Company, 86-2-25), ^{32}P (3000Ci/mmol) (Amersham), Sodyum hidroksit (Merck B 102362), Sodyum karbonat (Sigma S 7795), Potasyum sodyum tartarat (Sigma P 0165), Folin-Ciocalteau (Sigma F 9252), Sığır serum albumini (Sigma) Sodyum tungstat (Sigma S 0765), Sodyum molibdat (Sigma S 6646), Lityum sülfat , Bakır sülfat (Merck) , Agaroz (Sigma A 9414), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorid (Sigma A-5666), Asetik asit (Merck K-04134156), Borik asit (Sigma B-6768), Hidroklorik asid (%37 Merck K-13190114), Brom fenol mavisi (Sigma B-6896), dNTP seti (MBI Fermentas), Etanol (%99Tekel), Etidium bromid (Sigma E-8751), Hidrojen peroksit (%35 Merck K-22035097), Mineral yağ (Sigma M 5904), Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Sodium dodesil (Lauryl) sülfat (Sigma L-5750), Sodyum Hidroksid (Merck C754962), Potasyum dihidrojen fosfat (Merck A 741071), Sodyum Klorür (Carlo Erba 368257), Trizma Baz (Sigma T 1503), DNA marker (100 bp DNA ladder, PUC 19/Msp 1), Proteinaz K (Stratagene 300-141), Potasyum hidroksid (Sigma P 1767), Primerler (L-myc gen bölgesi için kullanılan primer dizileri 5'AGT TCA CTC ACA GGC CAC AT 3' 5' TGC ATA TCA GGA AGC TTG AG 3' (Stratagene)

3.1.2-CİHAZLAR

Homojenizatör (Ultraturrax), Ultrasantifüj (Sorval), Beta sayacı (Peckard TRI-CARB 1000 TR), Hassas terazi (Mettler), Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PCR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Falkon santrifüj (Hereaus), spektrofotometre (Schimadzu UV-1208), Su Banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light transilluminator), Vortex (Nuve mix), Elektroforez sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxipor electrophoresis).

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILACAK ÇÖZELTİLERİN

HAZIRLANMASI

3.2.1. CK II TAYİNİ İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

Seyreltme Tamponunun Hazırlanması(ADB):

20mM MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid) (pH 7.2), 25 mM β -glycerol phosphate, 5mM EGTA, 1mM sodium orthovanadate, 1mM dithiothreitol içeren tampon hazırlandı.

Substrat Karışımlarının Hazırlanması

Substrat Peptidin Hazırlanması: CK-II enzimine özgün 1mM'lık substrat peptid 0,5 mM ve 0.1 mM'lık konsantrasyonlarda seyreltme tamponu içerisinde seyreltme yapılmıştır.

a)0.5 mM Substrat Peptid: 100 μ l 1mM lık substrat peptid alınarak 200 μ l seyreltme tamponunda seyreltilmiştir.

b)0.1 mM Substrat Peptid: 20 μ l 1mM lık substrat peptid alınarak 200 μ l seyreltme tamponunda seyreltilmiştir.

c-myc Peptid Karışımlarının Hazırlanması: 100 ug -20°C'de saklanan c-myc peptid, 100 μ l (20 mM Tris, 0.15M NaCl, pH7.4) tamponda çözüldü. Daha sonra bu peptidin de 1.5 μ M, 1 μ M, 10 μ M ve 0.5 μ M lık dilüsyonları hazırlanarak fraksiyonlarına ayrıldı. Tüm bu işlemler soğuk odada gerçekleştirildi.

a)10 μ M c-myc Peptid hazırlanması: Hazırlanan stok peptid karışımından 13,6 μ l alınıp seyreltme tamponu ile 200 μ l'ye tamamlandı.

b)1.5 μ M c-myc Peptid hazırlanması: 10 μ M lık c-myc çözeltisinden 30 μ l alınıp 200 μ l'ye seyreltme tamponu ile tamamlandı.

c) 0.5 μ M c-myc Peptid hazırlanması: 10 μ M lık c-myc çözeltisinden 5 μ l alınıp 100 μ l'ye seyreltme tamponu ile tamamlandı.

d) 1 μ M c-myc Peptid hazırlanması: 10 μ M lık c-myc çözeltisinden 10 μ l alınıp 100 μ l'ye seyreltme tamponu ile tamamlandı.

Mg/ATP Kokteylinin Hazırlanması: 75 mM $MgCl_2$ ve 500 μ M ATP seyreltme tamponunun 1 ml'sinde çözülerek hazırlandı.

P^{32} Hazırlanması: 90 μ l Mg/ATP kokteyline 10 μ l (100 uCi) 3000 Ci/mmol P^{32}

eklenmesi koşuluna göre, son hacmi 250 μ l olan bir radyoaktif P^{32} karışımı hazırlandı

Sintilasyon Sıvısının Hazırlanması: 1 litre toluen/alkol (3/1), v/v içinde 2 g 2,5-difeniloksazol (PPO) ve 25 mg 1,4-di [2-(5-feniloksazolil)] benzen (POPOP) çözüldü.

3.2.2. LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

A: 0.1 N NaOH içinde %2 Na_2CO_3

B: %1 sodyum potasyum tartarat içinde %0.05 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

C: 50ml (A) + 1 ml (B) (Hazırlandığı gün kullanılır)

D: 1N Folin-Ciocalteu Fenol Ayırıcı (Merck)

3.2.3. L-MYC GEN POLİMORFİZM GÖSTERMEK İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.2.3.1. DNA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

1. Eritrosit Parçalama Tamponu

8.74 gram amonyum klorür, 1 gram potasyum bikarbonat, 200 μ l 0.5 molarlık Etilen diamine tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre ddH₂O eklendi ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra +4°C'de saklandı.

2. 0.5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)

186.1 gram etilen diamin tetra asetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı sodyum hidroksid çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl)

233.6 gram Sodyum klorür tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

4. Lökositleri Parçalama Tamponu

25 mililitre 4 molar sodyum klorür ve 50 mililitre 0,5 molar 50 mililitre etilen diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

5. 1 Molar Tris tamponu (stok)

121.1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 mikrolitre hidroklorik asit ile yaklaşık 800 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120⁰C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra kullanıldı.

6. 9,5 Molar Amonyum asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilir ve +4⁰C'de saklandı.

7. %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)

10 gr sodyum dodesil sülfat tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alındı ve üzerine 80 mililitre ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edilip, oda ısısında saklandı.

8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 mililitreye tamamlandı ve -20 °C'de saklandı.

9. 5xTBE Tamponu: 54 g Tris Base ve 27.5 g Borik asit tartılarak bir erlende 800 ml ddH₂O ile çözüldü üzerine 20 ml 0.5 M EDTA(pH:8) eklenerek distile su ile 1L'ye tamamlandı.

3.2.3.2. L-MYC GEN POLİMORFİZMİ İÇİN KULLANILAN ÇÖZELTİLER

%2 'lik Agaroz Jelin Hazırlanması:

2 g agaroz tartılarak behere alındı. Üzerine 100 ml 1xTBE çözeltisi eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı. Daha sonra üzerine 1 µl 10 mg/ml 'lik etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Yaklaşık 70 °C'ye soğutularak elektroforez küvetine döküldü. Tarak yerleştirildi ve jel soğumaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tank 1xTBE çözeltisi ile dolduruldu.

3.3. ÖRNEKLERİN SEÇİMİ VE TANIMI

Çalışmada akciğer kanserli ve kontrol olmak üzere iki farklı grup kullanılmıştır. Akciğer kanserli bireyler Yedikule, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Süreyyapaşa, Siyami Ersek ve Marmara Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Bilim Dallarında takip edilen 35-76 yaşları arası erkek ve 43-70 yaşları arası kadın hastalardan seçilmiştir. Kontrol grubu ise, herhangi bir akciğer rahatsızlığı olmayan, tercihen sigara kullanmayan 19-78 yaşları arası erkek ve 25-62 yaşları arasındaki kadınlardan oluşturulmuştur. Hastaların klinik parametrelerine göre yapılan ayrımlarla kanser evrelendirilmeleri, kan örneklerinin sağlandığı klinikler tarafından yapılarak, bu analize göre hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Buna göre, akciğer grafisinde kitle tespiti yapılmış, klinik olarak da akciğer kanserine özgün belirtiler veren hastalar çalışma grubuna alınmıştır. Hastalar sürvileri açısından kanser evrelendirilmesine göre de daha detaylı takipe alındı. Diğer taraftan, herhangi bir akciğer kanserine yönelik bulgusu olmayan akciğer grafisi temiz çıkan ve ailede bilinen bir kanser hastalığı olmayan bireylere ait örnekler çalışmada kontrol grubu olarak kullanılmışlardır. Örneklerin alınması sırasında uygulanan protokolda, sigara, alkol ve çeşitli ilaç alışkanlıkları, beslenme ve sosyoekonomik düzeyleri de ayrıntılı olarak incelemeye alınmıştır.

Kazein kinaz II enziminin normal ve akciğer tanısı konmuş olgularda kinetik özelliklerine ait değişkenliklerini incelemek üzere alınan doku örnekleri kuru buz içinde laboratuvara getirerek çalışmaya alınmıştır.

L-myc gen polimorfizmi kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınarak, DNA izolasyonu için, en geç bir gün içinde çalışılmak üzere oda ısısında saklanmıştır.

3.4. KAZEİN KİNAZ II'NİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI ve TAYİNİ

1.HOMOJENİZASYON VE SİTOZOL FRAKSİYONUNUN HAZIRLANMASI:

Cerrahi ameliyat sırasında CKII enzim aktivitesinin tayini için hastadan alınan normal ve akciğer tümörlü insan dokusuna bir ön saflaştırma protokolü uygulandı. (21) Buna göre önce alınan taze doku örneklerinin yaş ağırlıkları saptandıktan sonra dokular +4°C'de ağırlıklarının 2 katı hacmindeki 0.1 M Tris-HCl (pH:7.5), 2mM EDTA ve 2mM β -merkaptoetanol içeren soğutulmuş tampon içersinde ultraturrax aletinde homojenize edildikten sonra +4°C'de 39.000 g'de 2 saat santrifüj edilmişlerdir. Daha sonra sitozol fraksiyonlarındaki protein miktarı Lowry yöntemi ile belirlenmiş ve bu fraksiyonlara ayrılarak CK II enzim tayini için için kullanılmıştır.

CK II Enziminin Hazırlanması: Normal ve tümörlü doku homojenatından elde edilen sitozol fraksiyonlarındaki enzim miktarı 10-200 ug protein olacak şekilde seyreltme tamponu içersinde seyreltilmiştir.

2. PROTEİN TAYİNİ

Hazırlanan akciğer homojenatı ve sitozol örneklerinin kapsadığı protein düzeylerinin belirlenmesinde, Lowry ve ark'nın (36) önerdiği yöntem kullanıldı.

0.1 N NaOH içinde %2 lik olacak şekilde hazırlanmış Na_2CO_3 çözeltisinden 50 ml alındı ve %1'lik sodyum potasyum tartarat içindeki %0.05 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin 1 ml'sine katıldı. Hazırlanan bu taze çözeltiden 2 ml alınarak, üzerine 0.1 ml sitozol ve kaba akciğer doku homojenatı katıldı, iyice karıştırıldıktan sonra 10 dak. oda ısısında tutuldu. 0.1 ml Folin ayırıcı katılmasından 30 dak. sonra, spektrofotometrede 546 nm dalga boyunda göstermiş olduğu absorbans şiddeti okundu. Sığır serum albumini kullanılarak çizilen standart eğriden, sitozol ve homojenat örneklerinin içerdiği protein düzeyleri hesaplandı.

3.KAZEİN KİNAZ II'NİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN GÖSTERİLMESİ

Endojen Kazein Kinaz II aktivitesi tayin için eksojen fosfat alıcıları eklendikten sonra asidde çöken proteinlerin yapısına sokulan γP^{32} ATP'nin (3000 Ci/mmol) verdiği radyoaktivitenin ölçülmesi ile tayin edildi (21,32). Eksojen alıcı

olarak kazein kinaz II substrat peptid ve c-myc reaksiyona eklendi. Her yöntem kokteyli seyreltme tamponu içersinde 100 µmol ATP (3000 Ci/mmol) ve 500 µM soğuk ATP içeriyordu. Protein muhteviyatı (10-200 µg protein) olan doku preparatları kullanıldı. Reaksiyonun son hacmi 50 µl 'ye tamamlandı. Reaksiyon, eksojen substratların varlığında tayin kokteylinin reaksiyona eklenmesi ile başlatıldı. Tüpler karıştırıldıktan sonra 30°C çalkalamalı su banyosunda 10 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon %40'lık triklor asetik asidin (TCA) nın herbir tüpe eklenmesi ile durduruldu. P81 kağıtlarına örneklerden 25 µl tatbik edildikten 30 sn sonra bu kağıtlar önce fosforik asit sonra asetonda yaklaşık 3 defa sıvıları her seferinde yenilenerek iyice yıkandıktan sonra, 5 ml sintilasyon sıvısı içinde Beta sayacında radyoaktiviteleri okundu. CK-II enziminin aktivite tayini aşağıdaki formüle dayanarak pmol fosfat/min olarak hesaplandı.

Sonuçların Hesaplanması:

$$\frac{[(A-B)-(C-B)] \cdot 2.8}{SR \times 10} \text{ — pmol fosfat (CK-II substratına sokulan)/min}$$

A=CKII Enzim+inhibitör+substrat

B=Substrat

C=CK II Enzimi

SR=2680 cpm/pmol ATP

Michaelis- Menten Katsayısı (Km) ve Maksimum Hız (V max)'ın Grafiks

Yöntemlerle Belirlenmesi: Bir reaksiyonun başlangıç hızı v ile kullanılan substratın konsantrasyonu [S] arasında Michaelis-Menten eşitliği geçerlidir. Kullandığımız deney koşullarında CK II'ye özgü sentetik substrat peptid, c-myc-peptidin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesinde giderek artan substrat kullanarak sitozol fraksiyonunda söz konusu enzimin fosforilasyon hızını belirledik. Yukarda belirtilen bilgilerin ışığı altında Kazein kinaz enziminin aktivitesi, peptid substatların reaksiyona çeşitli konsantrasyonlarda (substrat peptid 1mM, 0,5 mM ve 0.1 mM; c-myc peptid 1.5 µM, 1µM, 10 µM ve 0.5 µM) eklenmesi sonrasında asidde çöken proteinlerin yapısına sokulan γP^{32} -ATP nin ölçülmesi ile tayin edildi. Sentetik substrat peptid ve c-myc peptid kullanılarak kazein kinazın kinetik değerlendirilmesi için gerekli Vmax ve Km değerleri saptanmıştır.

Hill Eğrisi: İlk hız ile substrat derişimi arasındaki ilişki, Hill denklemini kullanılarak incelenmiştir. Eğim (n) , apsis ekseninde log [S], oordinat eksenine log V0/Vmax-V0

değerlerini işaretleyerek hesaplandı. N değerinin birden küçük ve büyük olmasına göre enzimin negatif ve pozitif kooperite değerleri belirlenmiştir. n, esas alt birim sayısına yaklaştığında, alt birim sayısı ile n arasındaki ilişkide, pozitif bir kooperativite için geçerlidir. Negatif kooperativitede n, birden küçük olarak kabul edilmektedir. (57)

3.5. L-MYC GEN POLİMORFİZMİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

1-DNA HAZIRLANMASI

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırılıp ve +4°C'de 15 bekletildi. +4°C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atılıp ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantları atılarak pelletleri süspanse edilmiştir. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37 ml 9.5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmın üzerine 1:2 oranında %99'luk absöüt alkol eklenerek DNA'nın presipitasyonu sağlanmıştır. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklenerek yüzeye çıkan DNA steril bir mikropipet ucuyla alınıp, DNA %70'lik alkolde yıkanmıştır ve daha sonra korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çözündürülmüştür (41) .

DNA Saflık Tayini: DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans Tris EDTA çözeltisi ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü.

260 nm'de okunan absorbans / 280 nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı. O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildiğinden bu oranın altında bir değere sahip olan DNA'lara temizleme işlemi uygulandı.

DNA Miktarının Saptanması: Çift iplikli DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 absorbans 50 µg/ml (50ng/µl)' dir. Bu temel bilgiden faydalanarak DNA formülü aşağıdaki formüle göre hesaplandı .

"DNA Konsantrasyonu (ng/µl) : Sulandırma katsayısı (100) x OD₂₆₀ x 50"

2. L-MYC GEN POLİMORFİZM ÇALIŞMASI

DNA örneklerinden L-myc gen bölgesinin çoğaltılması için 25 µl hacimde PCR karışımı hazırlandı. Karışım 1 ünite taq polimeraz enzimi ve enzimin çalışması için gereksinim duyduğu 10xReaksiyon çözeltisi, L-myc bölgesine özgü 100 ng'lık primer çifti, 200 µM deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) içermektedir. DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklenmiştir. Buharlaştırmanın engellenmesi için karışımın üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Techne Mini Thermal Cycler'da aşağıdaki koşullarda PCR'ları gerçekleştirildi (63,72).

L-myc gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu: 94 °C'de 30sn denatürasyon, 50 °C'de 1 dak bağlanma 72 °C'de 1 dak uzanma olmak üzere 34 döngü olarak gerçekleşmiştir.

Agaroz jel elektroforezi: PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler agaroz elektroforezinde hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 voltluk elektrik akımında yürütüldü.

Alınan 15 µl PCR ürünleri son konsantrasyonu 1x olacak şekilde eklenen 5x lık yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birine PUC19 /Msp I size marker yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra elektrotlar yerleştirilerek örnekler 80-100 V'ta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve poloroid kamera ile jelin fotoğrafı çekildi.

Amplifikasyon Ürünlerinde L-Myc Gen Polimorfizminin Tespiti:

Amplifiye olan PCR ürünleri Eco RI enzimi ile kesildi. Kesim işleminde bir örnek için 20 µl PCR amplifikasyon ürünü, 16.3 ul didistile su, 2 µl 10x buffer, 0.2 µl Acetylated BSA (10 ug/ul) kullanıldı.

Kesim işlemi için karışım hazırlandıktan sonra örnekler 37°C ısıtma bloğunda en az bir en çok 4 saat inkübe edildiler. Kesim ürünleri, %2'lik agaroz jelde 1xTBE çözeltisi içinde, 120 voltluk elektrik akımında 2 saat yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve poloroid kamera ile fotoğrafı çekilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.6.SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN İSTATİSTİKSEL HESAPLAR

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak alınmıştır. L-myc allellerinin görülme sıklığının ve gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesinde Ki kare testi kullanılmıştır.



4.BULGULAR

4.1.Kazein Kinaz II Enziminin Kinetik Özelliklerinin RRRDDDSDDD Dizili Sentetik Substrat Peptid ve c-myc ⁴¹⁰⁻⁴¹⁹ (EQKLISEEDL) Peptid Kullanarak Saptanması:

Doku Ekstraktlarının Hazırlanması

Normal (yaş ağırlık 4,4 g) ve akciğer kanseri tanısı konmuş olgulardan elde edilmiş doku örnekleri (yaş ağırlık 1,2 g), soğukta küçük parçalara ayrıldıktan sonra soğuk 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 2mM β -merkaptoetanol içeren tamponda ultrathorax cihazı ile homojenize edildikten sonra, +4°C'de, 39.000 g'de 2 saat santrifüj edilmişlerdir. Elde edilen sitozol fraksiyonunda Kazein Kinaz II'nin enziminin kinetik özellikleri araştırılmıştır.Yapılan kısmi fraksinasyon sırasında, akciğer tümörlü hastanın, tümör içermeyen dokusunun kaba homojenatındaki, total hacim, protein ve total protein değerleri sırasıyla 8.8 ml, 38mg/ml, 334.4 mg protein olarak saptanmıştır. Aynı fraksiyonun tümör içeren dokudaki total hacim, protein ve total protein değerleri ise sırasıyla 2.4ml, 22.8 mg/ml ve 54.72 mg protein olduğu gözlenmiştir. Kaba homojenatların 39.000 g'de 2 saat santrifüj edilmesi ile hazırlanan sitozol fraksiyonlarında ise, tümör içermeyen normal doku için, total hacim 8 ml , 31.2 mg/ml, 249.6 mg protein bulunmuştur. Tümörlü doku sitozolünde ise, total hacim 1.5 ml, 19.2 mg/ml, 28.8 mg protein olduğu saptanmıştır.

4.1.1.Substrat Olarak Sentetik Substrat Peptidin (RRRDDDSDDD) Kullanılması ile Kinetik Analiz

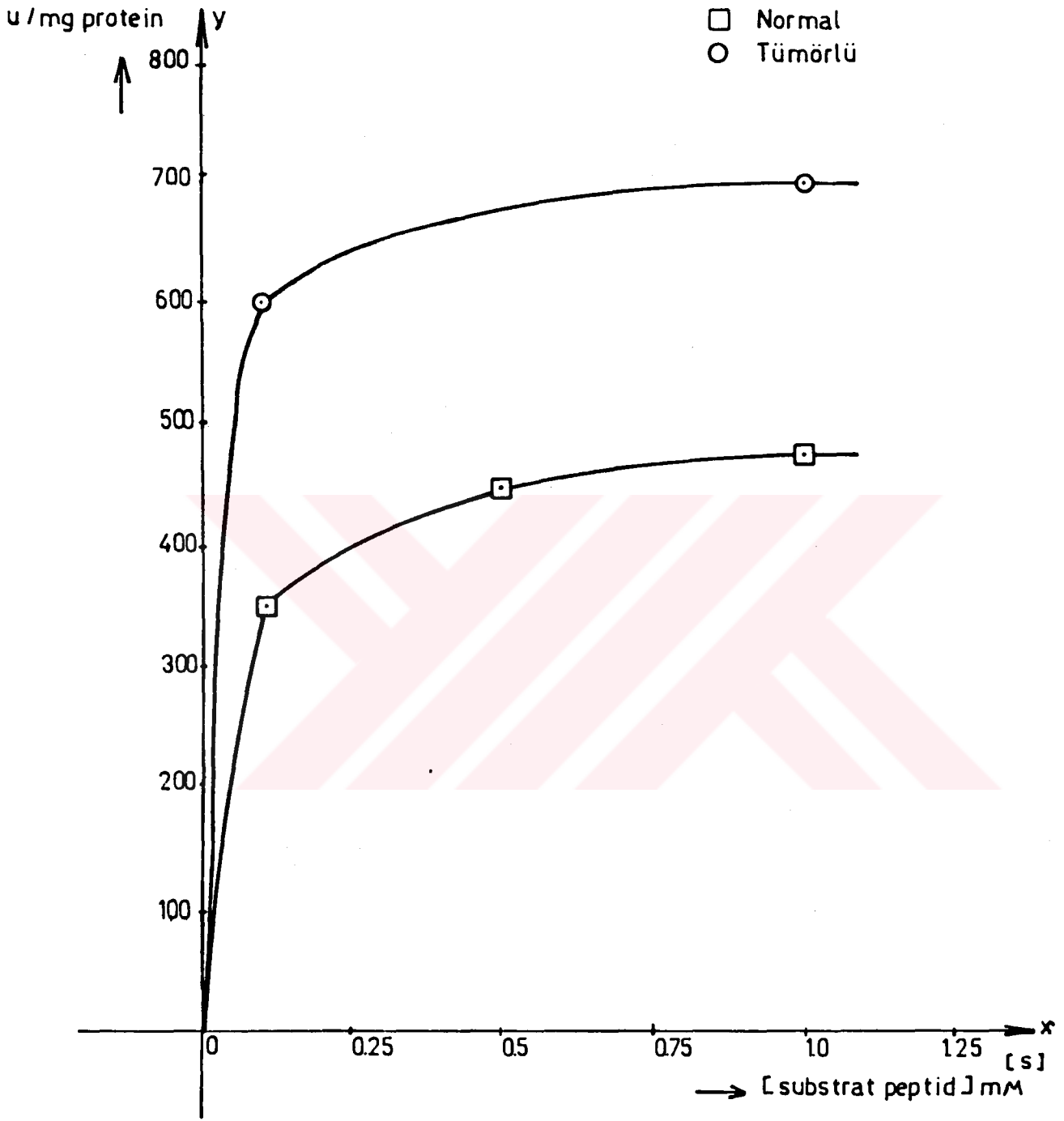
Kazein kinaz II enziminin kinetiği, sentetik substrat peptid (RRRDDDSDDD) kullanarak çalışıldı. Önceden hazırlanmış 1mM, 0.5 mM, 1mM konsantrasyonda substrat peptid kullanarak CK II enziminin aktivite değerleri pmol fosfat /min/mgprotein olarak hesaplanmış, CK-II enziminin, subtrat peptidin yukarıda verilen konsantrasyonlarına göre Michaelis Menten tipi kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bir enzim ünite (U) değeri ise, 37 derecede bir dakikada substrat içine 1 pmol ³²P transferini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Verilen substrat konsantrasyonlarına özgü Vmax ve km değerleri hesaplanmıştır.1/V ve 1/[S] noktalarına göre çizilen Lineweaver Burk doğrusundan, normal akciğer dokusundaki CK II aktivitesi Vmax:500 pmol/min/mg protein ve Km:0.05 mM, kanserli dokuda ise Vmax:1250 pmol/min/mg protein ve Km:0.77 mM olarak saptanmıştır (Şekil 4,5).

İlk hız ile substrat derişimi arasındaki ilişki, Hill denklemi kullanılarak incelemiştir. Hill grafiklemesinde geniş bir substrat derişimi aralığı içinde, linner bir ilişki elde edilmiştir Eğim (n) asgari alt birim sayısı RRRDDDSDDD substrat peptidi için normal ve tümörlü dokuda sırasıyla 0.83 ve 0.95 olarak saptanmıştır (Şekil 6).

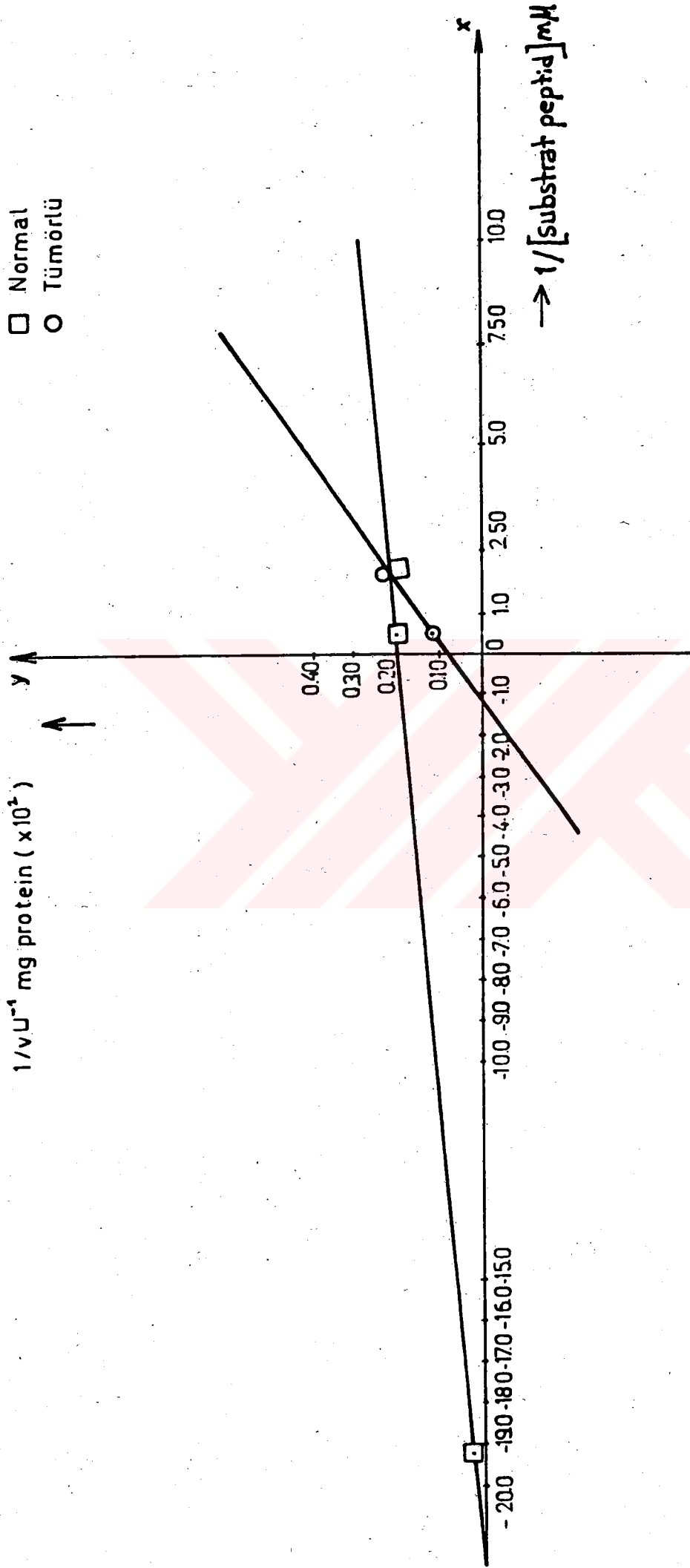
4.1.2.Substrat Olarak c-myc Peptidin Kullanılması ile Kinetik Analiz

Kazein kinaz II enziminin Michaelis Menten kinetiği, c-myc⁴¹⁰⁻⁴¹⁹ (EQKLISEEDL) peptidi kullanarak araştırılmıştır. c-myc için 1.5µM, 1 µM, 10 µM, 0.5 µM konsantrasyonlarında CK II enziminin aktivite değerleri pmol fosfat /min/mgprotein (U/mg protein) olarak hesaplanmıştır. 1/V ve 1/[S] noktalarına göre çizilen Lineweaver Burk doğrusundan, normal akciğer dokusundaki CK II aktivitesi Vmax:714 pmol/min/mg protein ve Km:0.33 µM, kanserli dokuda ise Vmax:666 pmol/min/mg protein ve Km:0.18 µM olarak bulunmuştur (Şekil 7,8).

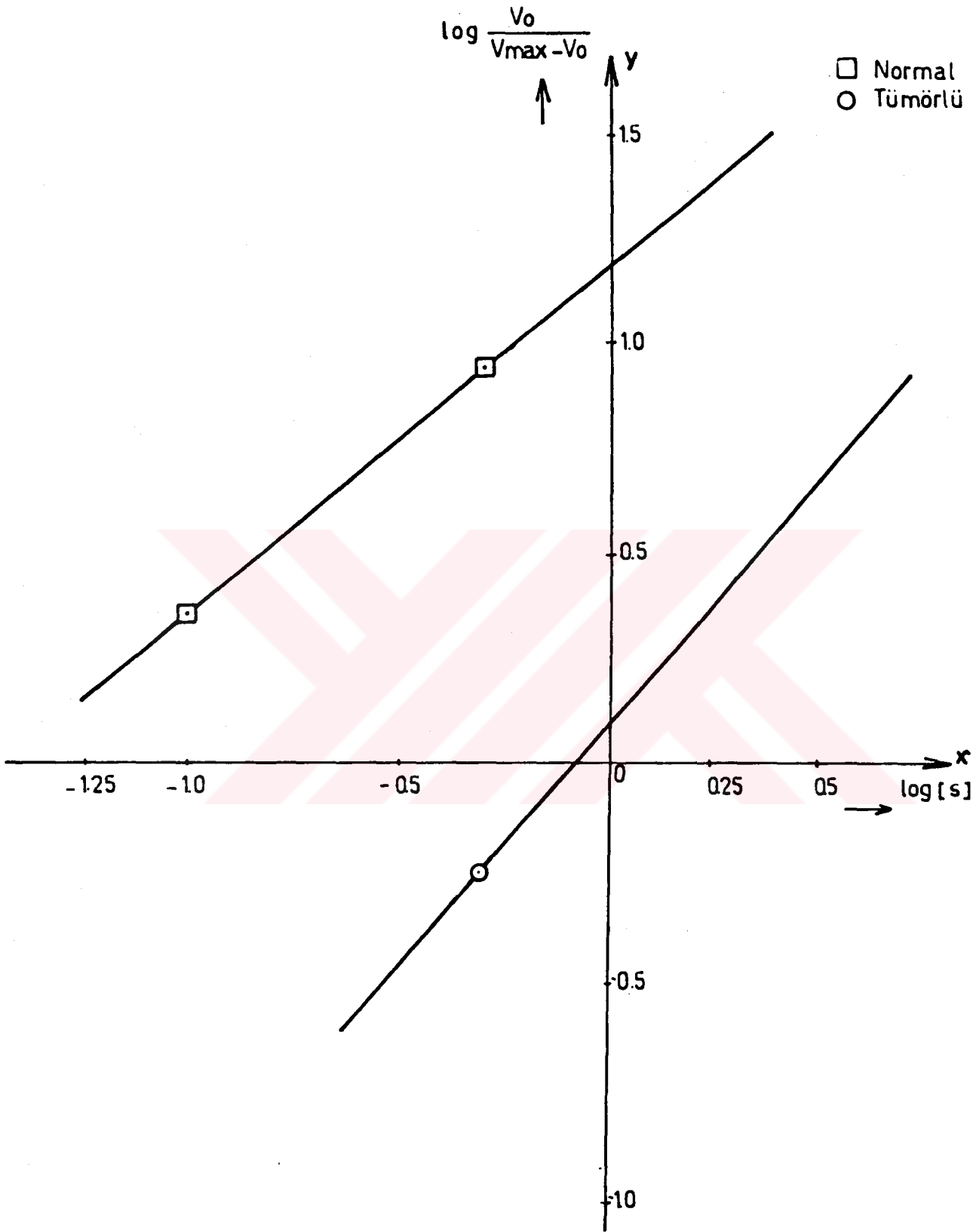
Hill grafiklemesinde geniş bir substrat derişimi aralığı içinde, linner bir ilişki elde edilmiştir Eğim (n) asgari alt birim sayısı c-myc substrat peptidi için normal ve tümörlü dokuda 0.66 olarak saptanmıştır (Şekil 9).



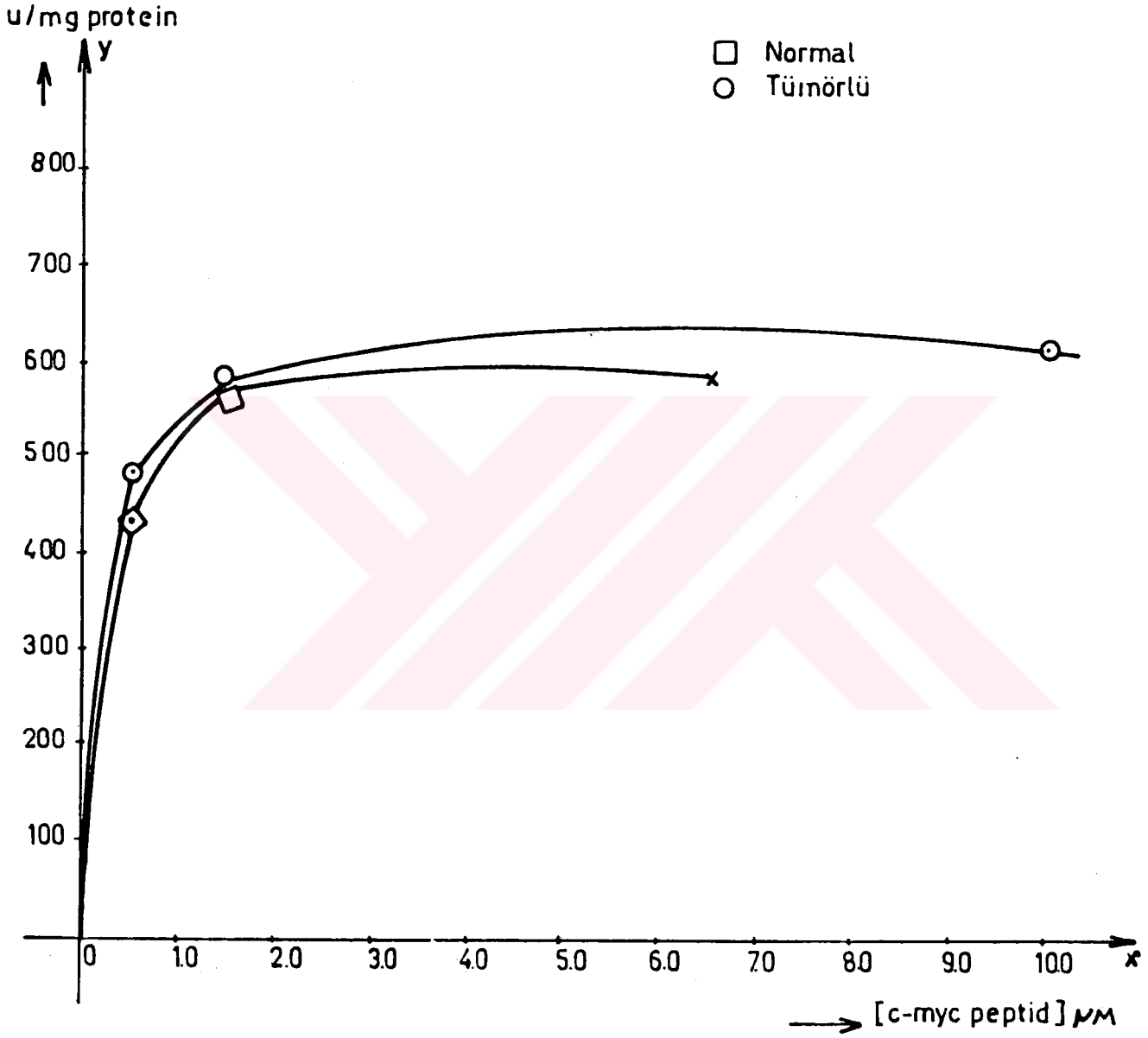
Şekil 4. Normal ve kanserli dokuda RRRDDDSDDD substrat peptidi kullanarak CK II aktivitesi



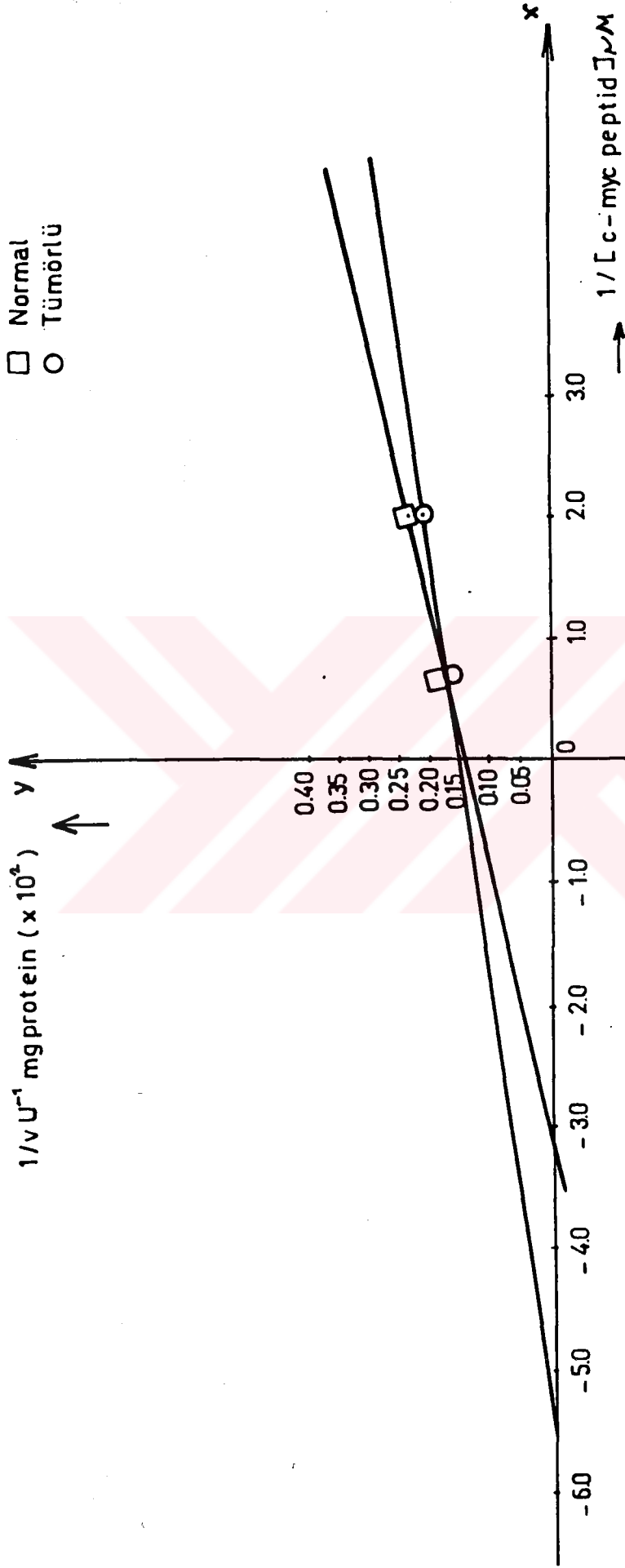
Şekil 5. Normal ve kanserli dokuda RRRDDSDDD substrat peptidi kullanarak CK II aktivitesi (Lineweaver Burk Eğrisi)



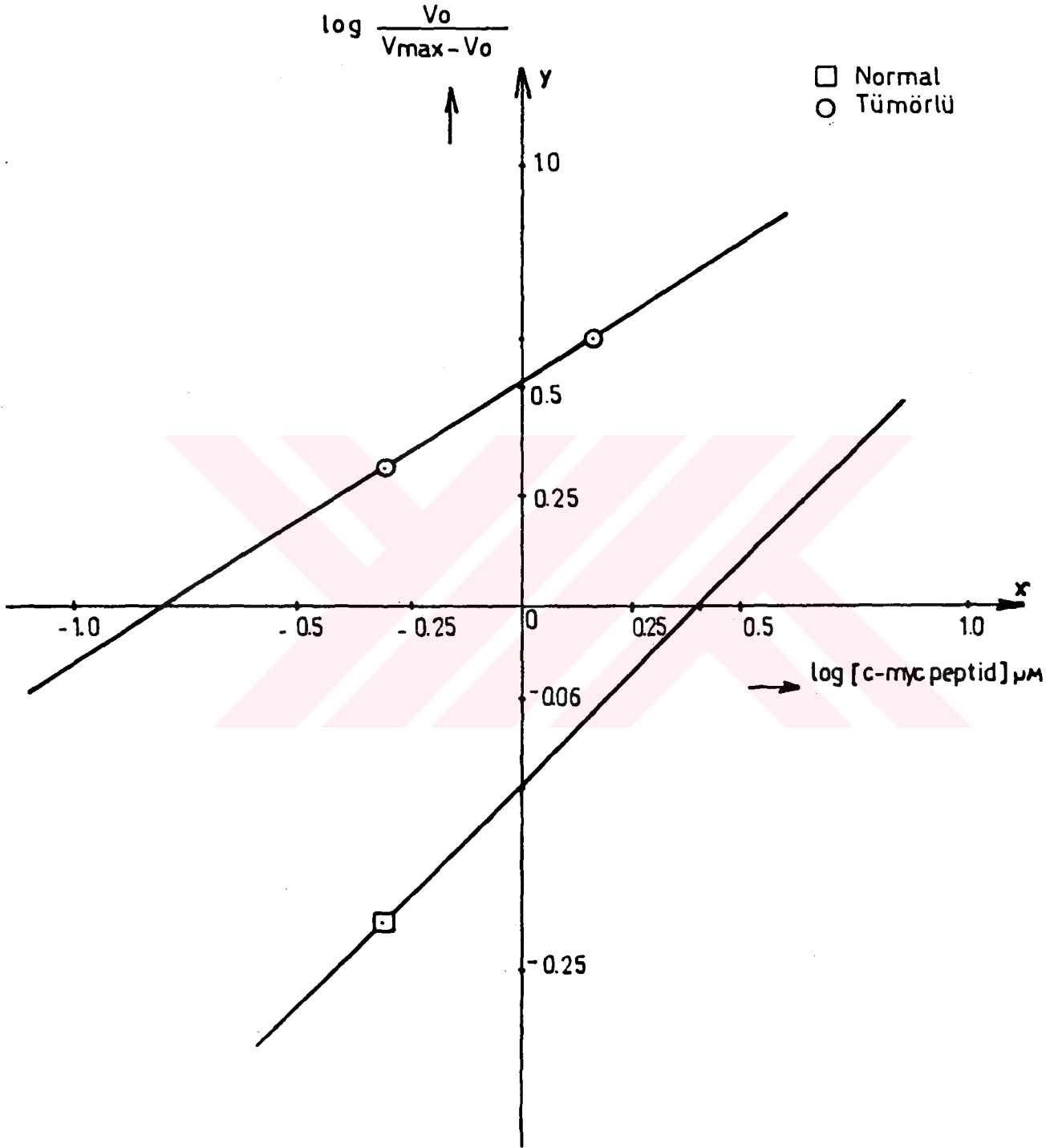
Şekil 6. Normal ve kanserli dokuda RRRDDDSDDD substrat peptidi kullanarak CK II aktivitesi (Hill Grafiği)



Şekil 7. Normal ve kanserli dokuda c-myc (EQKLISEEDL) peptidi kullanarak CK II aktivitesi



Şekil 8. Normal ve kanserli dokuda c-myc (EQKLISEEDL) peptidi kullanarak CK II aktivitesi (Lineweaver Burk Eğrisi)



Şekil 9. Normal ve kanserli dokuda c-myc (EQKLISEEDL) peptidi kullanarak CK II aktivitesi (Hill Eğrisi)

4.2. L-myc Gen Polimorfizminin Gösterilmesi

Çalışmamızda kullanılan sağlıklı ve akciğer kanserli olgulara ait yaş ortalamaları Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Gruplara ait yaş ortalamaları

<i>Grup</i>	<i>Yaş (yıl)</i>
Sağlıklı grup	55.3±16.29 (erkek 19-78 yaş, kadın 25-62 yaş)
Akciğer kanserli hasta grubu	58.53±11.01 (erkek 35-76 yaş, kadın 43-70 yaş)

Tablodaki değerler ortalama±standart sapma olarak cinsiyet farkı gözetmeksizin verilmiştir.

Vücut-kütle indekslerinin student-t testi kullanarak istatistiksel olarak karşılaştırılmasında, sağlıklı grupta kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Vücut kütle indekslerinin, sağlıklı ve kanser grubunda karşılaştırılması sonucunda kadınlarda, vücut kütle indeksinin her iki grupta da anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Gruplar arası vücut-kütle indekslerinin karşılaştırılması

Grup	Vücut -kütle indeksi (kg/m²)		P
	<i>Kadın</i>	<i>Erkek</i>	
Sağlıklı	27.6±3.4 N=7	21.8±2 N=7	P<0.01
Akciğer kanserli grup	29.8±3.7 N=6	24.4±3.9 N=46	P<0.01

Tablodaki değerler ortalama±standart sapma olarak yaş dikkate alınmadan verilmiştir (N=örnek sayısı, $p<0.05$).

Sağlıklı ve akciğer kanserli gruplar arasında sigara kullanımı karşılaştırıldığında, hastaların yaklaşık %94'ünün sigara kullandığı ortaya çıkmıştır. Buna göre yapılan analiz sonucunda, akciğer kanserli bireylerde sigara kullanımının yüksek olduğu saptanmış, ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 7). Ayrıca, akciğer kanserli hastalarda yılda 20 paketten fazla sigara içmenin erkeklerde kadınlara göre daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0.01$) (Tablo 8).

Tablo 7. Gruplar arası sigara kullanımının karşılaştırılması

Sigara Gruplar	Kullanmayanlar	Kullananlar	Toplam
Sağlıklı grup	N=4 (%18.2)	N=18 (%81.8)	N=22 (%25)
Akciğer kanserli grup	N=4 (%6.1)	N=62 (%93.9)	N=66 (%75)
Toplam	N=8 (%9.1)	N=80 (%90.9)	N=88 (%100)

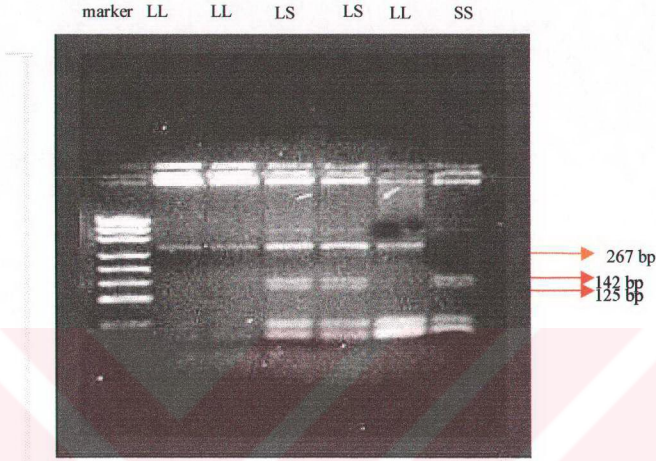
Tablodaki değerler N=örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($X^2:2.93;p>0.05$).

Tablo 8. Akciğer kanserli hastalarda sigaranın yıldaki paket miktarına göre kullanımının cinsiyet faktörüyle incelenmesi

Cins Sigara (paket/yıl)	Kadın	Erkek	Toplam
Sigara>20 paket/yıl	N=4 (%44.4)	N=5 (%55.6)	N=9 (%14.1)
Sigara<20 paket/yıl	N=4 (%7.3)	N=51 (%92.7)	N=55 (%85.9)
Toplam	N=8 (%12.5)	N=56 (%87.5)	N=64 (%100)

Tablodaki değerler N=örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir (Fisher testi p:0.01;odds ratio 10.2;%95 CI 1.934-53.786).

L-myc geni PCR ürünleri, Eco RI enzimi ile 1-4 saat 37 derecede kesim sonrası [LL :267 ; LS: 267,142,125 ve SS: 142,125 baz çifti(bp)] olmak üzere 3 farklı genotip gösterdi. L-myc genotiplerinin allel tiplerine göre heterozigot (LL) ve homozigot (LL ve SS) taşıyan bireyler Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. L myc genotiplerinin gösterilmesi (Kanal 1:PUC19 DNA/MSP1 marker ; Kanal 2:LL ; Kanal 3: LL; Kanal 4: LS; Kanal 5:LS Kanal 6:SS

L-myc genotiplerinin 37 sağlıklı bireyde (18 kadın, 19 erkek) ve 67 akciğer kanserli hastada (9 kadın, 58 erkek) total olarak yapılan karşılaştırmalarında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 9).

Gen sayım metodu ile sağlıklı ve akciğer kanserli grupta belirlenen L-myc'in L ve S allel sıklığı ise sırasıyla, 0.595:0.405 ve 0.586:0.414 olarak saptanmıştır.

Tablo 9. L-myc genotiplerinin gruplara göre dağılımı

L-myc Grup	LL	LS	SS	Toplam
Sağlıklı	N=14 (%37.8)	N=16 (%43.2)	N=7 (%18.9)	N=37 (%36.6)
Akciğer kanserli	N=19 (%29.7)	N=37 (%57.8)	N=8 (%12.5)	N=64 (%63.4)
Toplam	N=33 (%32.7)	N=53 (%52.5)	N=15 (%14.8)	N=101 (%100)

Gruplar arası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir. (X^2 :2.075;p:0.354;N=örnek sayısı)

S allelini taşıma , cinsiyet faktörü açısından sağlıklı ve akciğer kanserli hasta grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, S allelinin kontrol grubundaki kadın bireylerde daha sık olarak bulunduğunu gösteren, anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.02$) (Tablo 10).

Tablo 10. S Allelini taşıma açısından sağlıklı grubun cinsiyet faktörü göze alınarak karşılaştırılması.

S alleli Cins	S taşımayanlar (LL)	S taşıyanlar (LS+SS)	Toplam
Kadın	N=4 (%22.2)	N=14 (%77.8)	N=18 (%48.6)
Erkek	N=10 (%52.6)	N=9 (%47.4)	N=19 (%51.4)
Toplam	N=14 (%37.8)	N=23 (%62.2)	N=37 (%100)

Gruplararası farklılık kikare testi ile gösterilmiştir. (X^2 :3.63;p<0.05;N=örnek sayısı)

Akciğer kanserli hasta grubunda ise, S alleli taşımada cinsiyet açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 11)

Tablo 11.Akciğer kanserli hastalarda S alleli taşımada cinsiyet faktörü

S alleli Cins	S taşımayanlar (LL)	S taşıyanlar (LS+SS)	Toplam
Kadın	N=3 (%37.5)	N=5 (%62.5)	N=8 (%12.5)
Erkek	N=16 (%28.6)	N=40 (%71.4)	N=56 (%87.5)
Toplam	N=19 (%29.7)	N=45 (%70.3)	N=64 (%100)

Gruplararası farklılık kıkare testi ile gösterilmiştir. (X^2 :0.15; $p>0.05$; N=örnek sayısı)

Çalışmamızda küçük hücreli olmayan akciğer kanserli vakalarımızın %23'ü adenokarsinom, %72.1 'i epidermoid karsinom, %4.9'u ise bronkiolo alveolar karsinomdu. Çalışmamıza alınan küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastaların tümör alt tiplerinin L-myc genotiplerine göre dağılımları Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Akciğer kanserli hastaların L -myc genotiplerine göre tümör tiplerinin ayrımı

Tümör tipi	L myc genotipi		
	LL	LS	SS
Adenokarsinom	4 %33.3	8 %66.7	-
Epidermoid	15 %39.5	18 %47.4	5 %13.2
Bronkioloalveolar	-	3 %100	-

LL:homozigot, LS: heterozigot, SS:homozigot bireyler

SS homozigot olma açısından tümör tipine göre hastalar incelendiğinde, epidermoid kanserli hastalarda SS genotipi sıklığı diğer türlere göre yüksek olup, istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (p:0.1539) (Tablo 13).

Tablo 13.Akciğer kanserli hastalarda SS genotipi taşıma ve tümör tipinin epidermoid kanser olmasının değerlendirilmesi

L-myc Cins	SS	LL+LS	Toplam
Epidermoid Karsinom	N=5 (%11.6)	N=38 (%88.4)	N=43 (%72.9)
Diğer kanser tipleri	N=- (%0)	N=16 (%100)	N=16 (%27.1)
Toplam	N=5 (%8.5)	N=54 (%91.5)	N=59 (%100)

Gruplararası farklılık kıkare testi ile gösterilmiştir. (p:0.1539 Odd ratio: 1.3158 %95 CI 1.01531-1.26116; N=örnek sayısı)

Akciğer kanserli hastalarda SS genotipi taşıma ve tümör tipinin adenokarsinomun olması değerlendirildiğinde, adenokarsinomlu hastalarda SS genotipi sıklığı istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 14. Akciğer kanserli hastalarda SS genotipi taşıma ve tümör tipinin adenokarsinomun olmasının değerlendirilmesi

L-myc Cins	SS	LL+LS	Toplam
Adenokarsinom	N=0 (%0)	N=13 (%100)	N=13 (%72.9)
Diğer kanser tipleri	N=5 (%10.9)	N=41 (%89.1)	N=46 (%27.1)
Toplam	N=5 (%8.5)	N=54 (%91.5)	N=59 (%100)

Gruplararası farklılık kıkare testi ile gösterilmiştir.(p:0.214 Odd ratio: 0.8913 %95 CI 0.805-0.986; N=örnek sayısı)

Hasta grubundaki bireylerin %94.1'inin özgeçmişlerinde kanser bulunmamakta iken, %5.9'unda ise ikincil bir kanser vardı. Hasta grubundaki bireylerden %81.5'unun geçmişinde herhangi bir akciğer hastalığı geçirme bulgusunun olmadığı, %18.5 vakanın özgeçmişlerinde ise, tüberküloz veya kronik obstrüktif akciğer hastalığının mevcut olduğu saptandı. Hastaların %29.7'sinde ailede 1.dereceden akrabalarında kanser varken, %70'inde ise böyle bir bulguya rastlanmadı. Ailede 2. veya 3. derecede kanser varlığı incelendiğinde ise, sadece 4 (%6.3) vaka bu durumdaydı. Buna göre, çalışmamızdaki akciğer kanserli bireylerin geçmişte kanser veya herhangi bir akciğer hastalığı geçirmiş olup olmamaları birinci ve ikinci üçüncü dereceden akrabalarında kanser hikayesi olup olmamasına ait bilgiler ve hastaların L-myc genotip dağılımları Tablo 15'de gösterilmiştir. Bu parametreler ile L-myc genotipi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 15. Akciğer kanserli hastaların özgeçmiş bilgileri ve L-myc genotip dağılımları

	<i>L-myc genotipi</i>		
	LL	LS	SS
Geçmişte akciğer hastalığı			
(-)	16	26	4
(+)	3	7	1
Ailede 1.dereceden akrabada kanser			
(-)	12	24	3
(+)	6	9	2
Ailede 2. veya 3.derecedeki akrabada kanser			
(-)	17	30	5
(+)	1	3	-
Geçmişte kanser hikayesi			
(-)	19	31	5
(+)	-	4	-

LL:homozigot, LS: heterozigot,SS:homozigot bireyler

Çalışmamıza katılan hastalar L-myc genotipi ile lenf nodu metastazı, tümör büyüklüğü ve klinik evreleme açısından karşılaştırıldıklarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 16).

Tablo 16. Akciğer kanserli hastalarda cerrahi teşhisle nod metastazı, tümör büyüklüğü

cerrahi müdahale öncesi ve sonrası klinik evreleme, farklılaşma ve uzak metastaz açısından L-myc genotipi dağılımının incelenmesi

	L-myc Genotipi		
	LL	LS	SS
Lenf nodu metastazı			
No	7	10	-
N1	1	2	3
N2	3	6	-
Tümör büyüklüğü			
T1	3	2	-
T2	6	10	3
T3	1	3	-
T4	1	3	-
Cerrahi Müdahale			
Öncesi Evre			
I	13	18	2
II	-	2	2
III	3	7	2
IV	2	4	-
Klinik evre			
IA	3	2	-
IB	3	6	-
II (a,b)	1	2	3
III a	2	3	-
III b	1	4	-
IV	1	1	-
Farklılaşma			
Bilinmiyor	-	3	-
İyi	1	1	-
Orta	6	2	3
Zayıf	4	2	1
Uzak Metastaz			
(-)	12	26	6
(+)	3	4	-

LL:homozigot, LS: heterozigot,SS:homozigot bireyler

Akciğer kanserli hastalarda tümör büyüklük safhası ile nod metastazı arasında istatistiksek olarak anlamlı fark bulunmuştur. Buna göre tümör safhası T2, T3 ve T4 olan hastalarda nod metastazı safhasının N1 veya N2 olma durumunun daha yüksek oranda olduğunu gösteren anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 17).

Tablo 17. Akciğer kanserli hastaların tümör safhası ile nod metastazı arasındaki ilişki

Nod metastazı Gruplar	N0	N1,N2	Toplam
T1	N=6 (%100)	N=0 (%81.8)	N=6 (%25)
T2,T3,T4	N=14 (%42.4)	N=19 (%57.6)	N=33 (%75)
Toplam	N=20 (%51.3)	N=19 (%48.7)	N=39 (%100)

Tablodaki değerler N=örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kikare testi le gösterilmiştir (Fishet testi p:0.02 Cohort:7 %95 CI 0.525-0.933).

Yılda 20 paket ve üzeri sigara içen akciğer kanserli hastalar, nod metastazı açısından değerlendirildiğinde, bu hastaların nod metastazlarının yılda 20 paketten az içen diğer hastalara göre daha ileri evrelere ulaşması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 18).

Tablo 18. Akciğer kanserli hastaların sigara içimi ile nod metastazı arasındaki ilişki

Nod metastazı Gruplar	N0	N1,N2	Toplam
Sigara <20 paket/yıl	N=1 (%12.5)	N=7 (%87.5)	N=8 (%22.9)
Sigara >=20 paket/yıl	N=17 (%63)	N=10 (%37)	N=27 (%77.1)
Toplam	N=18 (%51.4)	N=17 (%48.6)	N=35 (%100)

Tablodaki değerler n=örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kikare testi le gösterilmiştir (Yate's testi p:0.035; Odds ratio>=20: 0.084 %95 CI 0.009-0.786;N=örnek sayısı).

Yılda 50 paket ve üzeri sigara içen akciğer kanserli hastalar, nod metastazı açısından değerlendirildiğinde, bu hastaların nod metastazlarının yılda 50 paketten az içen diğer hastalara göre N2 evresinde olma riski 3 kat artmış bulunmuştur (Tablo 19).

Tablo 19. Akciğer kanserli hastalarında >50 paket/yıl sigara içimi ile nod metastazı arasındaki ilişki

Nod metastazı Gruplar	N2	N1,N0	Toplam
Sigara <50 paket/yıl	N=4 (%18.2)	N=18 (%81.8)	N=22 (%75.9)
Sigara ≥50 paket/yıl	N=3 (%42.9)	N=4 (%57.1)	N=7 (%24.1)
Toplam	N=7 (%24.1)	N=22 (%75.9)	N=29 (%100)

Tablodaki değerler N=örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir (p:0.18391; Odds ratio≥50: 3.375 %95 CI 0.53181-21.419).

Yılda 50 paket ve üzeri sigara içen akciğer kanserli hastalar, tümör tipi açısından değerlendirildiğinde, yılda 50 paketten fazla içen hastaların, epidermoid karsinom olma sıklığı, yılda 50 paketten az içenlere göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 20).

Tablo 20. Akciğer kanserli hastalarında >50 paket/yıl sigara içimi ile tümör tipi arasındaki ilişki

Nod metastazı Gruplar	Adeno karsinom	Epidermoid karsinom	Toplam
Sigara <50 paket/yıl	N=13 (%59.1)	N=9 (%40.9)	N=22 (%56.4)
Sigara ≥50 paket/yıl	N=1 (%5.9)	N=16 (%94.1)	N=17 (%43.6)
Toplam	N=7 (%17.9)	N=22 (%56.4)	N=39 (%100)

Tablodaki değerler N=örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir (Fisher testi p:0.040; Odds ratio≥50: 6.933 %95 CI 0.57983-0.83).

Çalışmamızdaki akciğer kanserli hastaların beslenmesi meyve ve zeytinyağı açısından araştırıldığında, %33.3'ünün az, %40.7'sinin orta, %25.9'unun ise bol meyve yediği, ancak sadece %18.5'unun bol zeytinyağı kullandığı ortaya çıkmış olup, L-myc genotipi ve diğer parametrelerle aralarında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Meyve ve zeytinyağı alımı açısından akciğer kanserli hastaların L-myc genotipine göre dağılımları Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Meyve ve zeytinyağı ile beslenme açısından L-myc genotiplemesi

L-myc	LL	LS	SS
Meyve			
Az	6 %37.5	9 %60	1 %6.25
Orta	6 %31.6	10 %52.6	3 %15.8
Bol	4 %28.6	10 %71.4	-
Zeytinyağı			
Az	7 %36.8	11 %57.9	1 %5.3
Orta	5 %23.8	13 %61.9	3 %14.3
Bol	4 %44.4	5 %55.6	-

LL:homozigot, LS: heterozigot, SS:homozigot bireyler

Geçmişte akciğer hastalığı geçirmiş olma, meyve kullanımı az ve bol olan akciğer kanserli hastalarda incelendiğinde, geçmişte akciğer hastalığı olan kişilerin olmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde bol meyve ile beslendikleri saptanmış olup ($p<0.05$) (Tablo 22), böyle bir anlamlılık zeytinyağı ile beslenme ele alındığında, söz konusu olmamıştır.

Tablo 22. Geçmişte akciğer hastalığı geçirme açısından meyve ile beslenmenin değerlendirilmesi

Geçmişte akciğer Hastalığı Meyve	Geçmişte akciğer hastalığı yok	Geçmişte akciğer hastalığı var	Toplam
Meyve az	N=11 (%61.1)	N=7 (%38.9)	N=18 (%33.3)
Meyve bol	N=32 (%88.9)	N=4 (%11.1)	N=36 (66.7)
Toplam	N=43 (%79.6)	N=11 (%20.4)	N=54 (%100)

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir. ($X^2=4.12$; $p:0.042$; Odds ratio: 0.196; %95 CI 0.048-0.802;N=örnek sayısı)

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda tümörün histolojik tipi ile meyve ile beslenme ele alındığında, az meyve ile beslenen akciğer kanserli hastalarda epidermoid kanser tipinin adeno karsinoma göre anlamlı derecede daha sık bulunduğu saptanmıştır ($p<0.05$) (Tablo 23).

Tablo 23. Akciğer kanserli hastalarda histolojik olarak belirlenmiş tümör tipi ile meyve ile beslenmenin değerlendirilmesi

Histolojik tümör tipi Meyve	Adenokarsinom	Epidermoid	Toplam
Meyve az	N=1 (%6.3)	N=15 (%93.7)	N=16 (%33.3)
Meyve bol	N=14 (%40)	N=21 (%60)	N=35 (66.7)
Toplam	N=15 (%29.4)	N=36 (%70.6)	N=51 (%100)

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir. ($X^2=4.5$; $p:0.034$; Odds ratio: 1; %95 CI 0.012-0.845;N=örnek sayısı)

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Kazein kinaz II (CK II), hem prokaryot hem de ökaryotların stoplazma ve nükleusunda bulunan serin-treonin kinazlardan biri olup, hem sitoplazmik hem de nükleer 100'den fazla asidik substratı fosforile ettiği bildirilmiştir (4). Kazein kinaz II aktivitesinin, farklılaşan hücelere karşı çoğalan hücelerde farklı olduğu, çoğalmayan ve farklılaşmayan hücelerde ise bu aktivitenin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. CK II'nin sitozolik substratları arasında translasyonel kontrolde, metabolik düzenlemede görev alan proteinlerle, hücre iskeleti proteinlerinin, nükleer substratları arasında da çeşitli transkripsiyon faktörleri ve onkoproteinlerin yer aldığı gösterilmiştir. Bu onkoproteinler arasında myc, myb, fos, SV 40 ve p 53'ün de yer alması bu enzimi ilgi çekici bir hale getirmiştir (35,39). Çalışmamızda, kanser mekanizmasında önemli rol oynayan onkoproteinlerden c-myc'in EQKLISEEDL peptid dizisini ve yine enzim için RRRDDDSDDD dizili spesifik sentetik bir substrat peptid varlığında, enzimin aktivitesinin normal ve akciğer kanserli dokudaki değişimi incelenmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında, çeşitli substrat peptid dizileri kullanarak CK II aktivitesini tayin edildiği rapor edilmiştir (32, 33, 39). RRRDDDSDDD dizili peptid ile yapılan çalışmalarda, km değerinin 0.06 mM olduğu bildirilmiştir (32). Çalışmamızda, insan akciğer tümörlü dokuda kazein kinaz aktivitesini eksojen substrat olarak RRRDDDSDDD peptid dizisi varlığında 1250 U/mg protein, enzimin Km değerini ise 0.177 mM olarak saptadık. Akciğer tümörlü dokuda saptanan CK II aktivitesi aynı hastanın normal dokusunda bulunan değerden yaklaşık %150 daha yüksek bulundu. Tümör taşımayan dokudaki CK II enziminin, sentetik substrat peptide karşı km değeri ise 0.05 mM olarak bulunmuştur.

Bu çalışmamız, insan akciğer dokusu kullanılarak yapıldığından, bu konuda yapılan çalışmalar arasında orijinallğini korumaktadır. CK II'nin substrat olarak kullandığı peptidin en önemli özelliklerinden birinin, birkaç aspartik ya da glutamik asit kalıntısı içermesi olduğu bilinmektedir (39). Çalışmamız ile en uyumlu araştırma, Münstermann ve arkadaşlarının (44) göğüs ve kolorektal kanserli hasta dokularında, CK II aktivitesini tayin etmede, RRRDDDSDDD peptidini substrat olarak kullandıkları çalışmadır. Münstermann ve arkadaşları (44) aynı hastanın tümörlü ve tümör taşımayan dokusunda CK II aktivitesini ölçmüş ve normal kolorektal mukozada CK II enzim aktivitesini 13-106 U arasında saptamışlardır. Buradaki CK II

aktivitesinin , kanser olmayan dokudakine göre 8 kat yüksek bulunduğu saptanmıştır. Çalışmamızda ise RRRDDDSDDD substratı kullanıldığında kanserli dokudaki CK II enzim aktivitesini, normal akciğer dokusundakine oranla 2,5 kat artmış olduğu gözlenmiştir. Prowald ve arkadaşları (50) ise yaptıkları çalışmada, insan menenjiyom, glioblastom, anaplastik bir kanserin beyin metastazını içeren primer hücre kültürlerinde, C K II aktivitesini 200-500 U /mg protein olarak, transforme hücre serilerinde ise bu aktiviteyi 1000-1600 U /mg protein olarak saptamışlardır . Ayrıca Kuenzel ve Krebs (32) sığır karaciğerinden saflaştırdıkları CK II enziminin aktivitesini, Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Glu (RRREEETEEE) sentetik substart peptidi kullanarak tayin etmişler ve enzimin km değerini 500uM, Vmax değerini ise 33 nmol/min/mg protein olarak saptamışlardır. Bu çalışmanın sonunda, karaciğer dokusunda, diğerk kinaz aktivitelerinden CK II aktivitesini ayırmada bu peptidin de yararlılığı belirlenmiştir.

CK II enziminin aktivitesinin EQKLISEEDL dizili c-myc peptid kullanarak saptandığı çalışmamızda, CK II enziminin normal doku (714U) ile akciğer kanserli dokudaki aktivitesi (666 U) arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır. Kazein kinaz II için km değerleri ise normal ve tümörlü doku için sırasıyla 0.33 µM ve 0.18 µM olarak saptanmıştır. Yapılan literatür araştırmalarında, H-Glu-Glu-Glu-Thr-Pro-Pro-Thr-Thr-Ser-Ser-Asp-Ser-Glu-Glu-Glu-Gln-Glu-Asp-Glu-Glu-Glu-OH (H-EEETPPTTSSDSEEEQEDEEE-OH) dizili myc-peptidi ile CK II enziminin aktivitesinin Vmax değeri 31 nmol/min/mg protein, km değeri ise 27 µM olarak bulunmuştur (39). Yaptığımız literatür araştırmasında c-myc peptidinin kazein kinaz ile kinetik özelliklerini, normal ve kanserli insan akciğer dokusunda gösteren bir kinetik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle substrat olarak c-myc kullanarak elde ettiğimiz kazein kinaz II 'ye ait kinetik bulgularımızın literatürde yeri belirlenmiştir. Ancak, çalışmamızda, normal ve akciğer tümörlü dokudaki CK II aktivitesi, myc peptidi kullanarak ölçüldüğünde elde edilen değerler incelendiğinde, enzimin her iki dokuda da Vmax değeri açısından büyük bir farklılık gözlenmemesine rağmen, enzimin tümörlü dokudaki km değerinin normal dokudakine oranla düşük olmasının ilgi çekici olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgu, tümörlü dokuda enzimin c-myc peptide karşı ilgisinin normal dokudakine göre daha fazla olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

İnsan CK II enziminin moleküler ağırlığı sırasıyla 43 ve 38 kDa olan iki kinaz aktif alt ünite (α ve α') ile molekül ağırlığı 28 kDa olan iki düzenleyici alt ünitelerden (β) oluşan tetramerik bir yapı olduğu bildirilmiştir (35,53). Çalışmamız sonucu çizdiğimiz Hill eğrilerinden belirlenen n değerleri, alt birim sayısına ulaşılmadığından, CK II enzimi ile kullandığımız substratları arasında, negatif bir kooperasyon varlığı gözlenmiştir. Literatürde, farklı amino asit dizilerinden oluşan c-myc peptidlerinin kullanıldığı çalışmalarda, myc 222-238 ve myc 246-263 için k_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 10.43 μM ve 26-104 nmol/min/mg protein; 20 μM ve 116 nmol/min/mg protein) olduğu bildirilmiştir (37). Gündoğuş ve arkadaşları ise (18), taze koyun akciğer dokusunda pmyc kullanarak CK II aktivitesini 100 U olarak bildirmişlerdir .

Myc onkoproteini farklı protein kinazlarla 4 veya 5 ser/thr kalıntıları üzerinden fosforile edilebilmektedir. Fosforile edilmemiş myc onkoproteininin, biyolojik olarak aktif olmadığı max proteini ile bir heterodimerizasyona girmesinin engellendiği bilinmektedir. P_{max} 'ın ise çoğu memeli hücresinde bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir (18). CK II'nin fosfor vericisi olarak ATP veya GTP'yi, kofaktör olarak da Mg^{+2} ve Mn^{+2} kullandığı ve poliaminlerin varlığında hem aktivitesi hem de substrat spesifitesinin değişebileceği rapor edilmiştir (15,21). Manduca sexta beyin sitozölü, drozofilo melanogaster ve sıgır timusundan saflaştırılan CK II 'nin GTP kullanılarak ölçülen k_m değerleri sırasıyla 55, 66, 30 μM olarak saptanmıştır. Substrat olarak kazein ve fosfor vericisi olarak ATP kullanıldığında ölçüm değerlerinin ise, 34 ,17, 14 μM olarak bulunduğu bildirilmiştir (6).

Küçük hücreli akciğer kanserinde c-myc ekspresyonunun maligniteye katkıda bulunduğu, ancak malignensiye yol açabilecek primer genetik bozukluktan ziyade, artmış tümörjenite için ikincil bir faktör olabileceği bildirilmiştir (29). Çalışmamızda ise, insan akciğer tümürlü dokudan elde ettiğimiz CK II için, ATP fosfat vericisi ve c-myc substrat peptidi kullanılarak saptanan k_m değerleri, normal dokudan elde edilene oranla daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç bizim, akciğer kanserli dokuda CK II enziminin substrat olarak c-myc peptide affinitesinin daha fazla olduğu şeklinde yorumlamamıza neden olmuştur. Her iki dokudan elde edilen V_{max} değerleri arasında ise, önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Yapılan çalışmalarda, CK II için eksojen substrat olarak bilinen pp105, pp135 gibi nükleolar fosfoproteinler gibi faktörler için ölçülen k_m değerleri sırasıyla 0.15 ve 0.1 μM olarak bildirilmiştir (48) . Bu

sonuçlardan yola çıkarak, c-myc peptidi için hem normal (0.33 uM) hem de tümörlü akciğer dokusundan (0.18 µM) elde ettiğimiz km değerlerinden, c-myc 'in CK II için iyi birer substrat olduğu izlenimi elde edilmiştir.

C-myc geninde translokasyon, amplifikasyon veya yakın retroviral insersiyon gibi yapısal değişiklikler taşıyan tümörlerde, c-myc ekspresyonunun düzenlenme bozukluğu ya da artmış ekspresyonunun tümör oluşuma katkıda bulunduğu düşünülmektedir. C-myc'deki genetik değişikliklerin niçin bazı tümör tiplerinde olup, bazılarında olmadığı henüz açıklanamamıştır. Özel bir somatik değişikliğin, hücre tipine bağlı olarak artmış olmasının, sebeplerden biri olabileceği düşünülmekte ve bazı hücrelerde myc'in daha tümörojenik olabildiği, diğerlerinde ise tümör spesifik başka faktörlerin yanında yer alabileceği düşünülmektedir. C-myc ekspresyonu, tek başına ne normal gelişme için ne de tümör oluşumu için yeterli değildir. Bulgular malign transformasyon için, en az iki onkojenik olayın birarada bulunması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Böylece hücre gelişmesi için, c-myc ekspresyonu gerekli olmasına rağmen, tek başına yeterli görülmemektedir. Ayrıca gelişmenin her aşamasında c-myc ekspresyonunun gerekliliği de açık olmayıp, myc'e benzer fonksiyonları olan N-myc, L-myc gibi proteinlerin c-myc'in yerini doldurabileceği düşünülmektedir (29). L-myc geninin hem yenidoğanda hem de yetişkin akciğerinde neonatal ekspresyonu önemlidir (65).

L-myc, tümör oluşumu sırasında geç aktive olduğu düşünülen, 1. kromozomun uzun kolunun 32. segmentinde yer alan bir nükleer onkogendir. L-myc geni, L (10 kilobaz) ve S (6 kilobaz) olmak üzere EcoRI enzimi kesimiyle iki allel polimorfizmine sahiptir (16) Kawashima ve arkadaşlarının (27) 51 Japon akciğer kanserli hastada yaptıkları çalışmada, L-myc geni ile metastatik durum arasında bir ilişkinin olduğu rapor edilmiş ve L-myc RFLP'sinin sadece metastaz sıklığını değil, metastaz uzaklığı ve hızını da etkileyebileceği savı ortaya atılmıştır. LS ve SS taşıyan akciğer kanserli bireylerde LL tipli olanlardan daha hızlı metastaz gelişebilmektedir (27). Weston ve arkadaşları ise (71), Afrikalı Amerikalılar ve Beyaz ırk arasında yaptıkları çalışmalar sonucunda, her iki ırk arasında lenf nod metastazı ve L-myc genotipi arasında bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Tümör histolojik tipi açısından incelediklerinde de her iki grup arasında bir farklılık gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Her iki ırk arasında, L ve S allel sıklığı açısından ise anlamlı fark saptamış olup, Beyaz ırk ve Afrikalı Amerikalılarda sırasıyla 0.509:0.491 ve

0.277:0.763 olarak bildirmişlerdir. Tamai ve arkadaşları (63), histolojik olarak tipi tayin edilmiş, radyasyon veya kemoterapi görmeyen 56 akciğer kanserli hastada L-myc gen polimorfizmini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda akciğer kanseri ile L-myc'in allelik sıklığı arasında herhangi bir ilgi bulunamamış ve her iki grupta da allel sıklığını birbirine yakın olduğu anlaşılmıştır (63). Çalışmamızda sağlıklı bireylerde L ve S alleli sıklığının oranlarını , 0.595:0.405 olarak saptanmıştır. Akciğer kanserli hastalarda ise bu oran, 0.586:0.414 olarak bulundu. Bu sonuçlarımız, Tamai ve arkadaşlarının bildirdikleri sağlıklı beyaz popülasyondaki L-myc polimorfizm çalışması ile uygunluk göstermektedir (0.562:0.438) (63). Weston ve arkadaşları (72) Amerika popülasyonunda yaptıkları çalışmada, L-myc genotipinin akciğer kanseri riskini tayin etmediğini bildirmişlerdir. Bu bulguların, daha önce Amerika (63), Norveç (65), Japon (27) popülasyonlarında yapılan çalışmalardakine benzer olduğu sonucuna varmışlardır. Ge ve arkadaşları (16) sağlıklı ve akciğer kanserli hastalarda yaptıkları L-myc genotipinin sıklığını sırasıyla LL:LS:SS için 0.30:0.34:0.36 ve 0.23:0.46:0.31 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca, L-myc gen polimorfizminde, baskın genotipin hem normal ve akciğer kanserli bireylerde LS ve SS olduğunu açıklamışlardır (16). Çalışmamızda L-myc genotiplerini çalışma grubumuzdaki sağlıklı ve akciğer kanserli hastalarda 0.37:0.43:0.20 ve 0.29:0.59:0.12 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlarımız, Ge ve arkadaşlarının (16) çalışması ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ancak Türk popülasyonundaki akciğer kanseri hastalarında LS genotipinin sıklığının fazla, SS'nin ise az olduğu göz önüne alınması gereken bir bulgu olup istatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşmamıştır. Cinsiyet açısından, akciğer kanserli ve sağlıklı bireylerdeki L-myc gen polimorfizmi araştırıldığında sonuçlarımız, sağlıklı kadınlarda SS genotipinin erkeklere oranla daha fazla sıklıkta bir dağılım göstermiştirirdiğini ortaya koymaktadır .Bu sonucumuz, Ge ve arkadaşlarının kadın bireylerde LS heterozigotluğunun anlamlı olarak azalması ve bu anlamlılığın erkeklerde gözlenmemiş olması ile uyumludur (16).

Çalışmamızdaki akciğer kanserli hastalar cerrahi teşhis ile saptanan tümör büyük safhalarına göre sınıflandırıldığında, %15.4'ü T1, %56'sı T2, %17.3'ü T3, %10.3'ü T4 everesindeydi. Nod metastazı açısından ise, %51.3'ü N0, %25.6'sı N1, %23.1'i N2 safhasındaydı. Hastalarımızın %86.2 'sinde uzak metastaz yokken 1.5 yıllık takip sonrası ancak %13.7'inde metastaz tespit edildi. Tümör farklılaşması açısından ele alındığında ise hastalarımızın, %10.7'sinin farklılaşma düzeyi bilinmezken, %7.1 'inin iyi, %50'sinin orta, %32'sinin de zayıf derecede farklılaşma

gösterdiği saptandı. Kanserli vakaların %75.9'u herhangi bir kanserojen maddeye maruz kalmamışken, %24.1'inin kanserojenle temas edilebilen ortamlarda bulunduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, SS alleli taşımanın adenokarsinom riski üzerine etkisi bildirilmiştir (65). Çalışmamızda, tümör tipi açısından epidermoid kanserli hastalarda SS genotipitasma sıklığı anlamlılığa yakın olarak yüksek bulunmuşken, adenokarsinomda böyle bir yükseklik saptanmamıştır.

Gelişmiş ülkelerde orta yaşta, erkekler arasında sigaranın kansere bağlı ölümlerde en önemli nedenlerden biri olabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Amerika'da, orta yaşta kadın ölümlerinin hemen hemen 1/3'ünün sebebinin sigara olduğu düşünülmektedir. Sigaradan etkilenen başlıca bölge akciğer olup, Kanada, İngiltere, İsveç, Japonya veya Amerika'yı kapsayan 5 gelişmiş ülkede sigara içmenin akciğer kanserinde ölüm oranına katkısı değerlendirilmiştir. Bu katkı oranının erkeklerde %83-92, kadınlarda da %57-80 arasında olduğu bildirilmiştir (7). Çalışmamızda sağlıklı ve akciğer kanserli grup arasında sigara kullanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Akciğer tümörlerinden epidermoid karsinom, adenokarsinom göre sigara içimi ile daha çok ilişkili olduğu saptanan bir tümör tipidir. Akciğer tümörlerinden epidermoid karsinom 20.yüzyılın son yarısının erken dönemlerinde tüm dünyada en yaygın hücre tipi iken, şimdilerde Japonya ve Amerikada, bu hücre tipi yerine adenokarsinomdan daha çok yaygın hale gelmiştir. Ancak epidermoid kanser halen Avrupa ve çoğu dünya ülkesinde en yaygın kanser türü olmaya devam etmektedir. Amerika ve Japonya'da epidermoid karsinom sıklığının azalıp adenokarsinomun artmasının iki ülkede muhtemel sigara alışkanlığının azalmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (58). Sigaranın, içinde polinükleer aromatik hidrokarbonları fenol, nikotin, karbazol, benzo (a)piren indol vb. gibi karsinojen ve kokarsinojen pek çok maddeyi barındırdığı bilinmektedir (25). Sigara içme alışkanlığının değiştiği Amerika ve Japonya'da da görüldüğü üzere, epidermoid karsinomun sigara ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (58). Çalışmamızda da, yılda 50 paketten yüksek sigara içenlerde, epidermoid karsinom sıklığının istatistiksel açıdan anlamlı olarak adenokarsinoma göre yüksek olduğunu saptanmıştır.

Sigarada bulunan bu karsinojen ve kokarsinojen maddelerin oksidan hasara yol açabilecekleri düşünüldüğünde, meyve ve sebzeden zengin beslenmenin bu kanser tipinin ilerleyişini azaltabileceği akla gelmektedir. Nitekim yapılan pek çok karşılaştırmalı çalışmalarda, akciğer kanser riski ve meyve ve sebze incelenmiş olup,

beta karoten, C, E vitamini ile akciğer kanseri riski arasında zıt anlamlı bir ilişkinin bulunduğu rapor edilmiştir (34). Çalışmamızda meyveden az beslenen akciğer kanserli hastalarda epidermoid karsinom sıklığını adenokarsinoma göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Böylece, meyve ve sebze ile beslenmenin sigaranın oksidan hasar yapıcı etkisini hafifletmesinden dolayı, epidermoid karsinomun bu hastalarda daha az olabileceği kanısına vardık.

Ayrıca çalışmamızda, L-myc genotipi ile sigara kullanımı arasında da herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır. Ancak 50 paket/yıldan fazla sigara içen hastalarda LL, LS ve SS genotipi taşımaya göre, epidermoid kanser olanların yüzdeleri sırasıyla %80 , %64.7 ve %100 olarak saptanmış olup bu değerler istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. 50 paket/yıl dan fazla sigara içenlerde nod metastazının daha ileri safhada olma riski yüksek bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Akciğer kanseri hastalarında tümör tipi ve lenf nod metastazı açısından L-myc genotipi incelendiğinde, aralarında bir ilişki saptanmamış olup, bu bulgularımız, Ge ve arkadaşları (16) ile Fong ve arkadaşlarının (14) yaptığı çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir. Weston ve arkadaşları (71) L-myc genotipinin tümör safhası ile hiçbir ilgisinin olmadığını bildirmiş ve L-myc genotipinin zayıf prognozun bir belirleyicisi olma savını çürütmüşlerdir (71).

Akciğer kanserinin evresinin belirlenmesinde kullanılan geniş serilerle uyumlu olarak, çalışmamızda da akciğer kanserli hastalarda tümör büyüklüğü (T safhası) arttıkça nod metastazının da attığı gözlenmiştir (42).

Tamai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, lenf nodu metastazı olması ya da olmamasının L-myc genotipi ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (63). Klinik safha ve L-myc genotipi arasındaki ilgi ele alındığında, bizim bulgularımız da, akciğer kanseri hastalarında klinik safha ile L-myc'in allelik sıklığının bir ilişkisi olmadığını ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak diyebiliriz ki;

1. Kazein kinaz II enziminin aktivitesinin RRRDDDSDDD substrat peptidi kullanıldığında, tümörlü insan akciğer dokusunda, normal insan akciğerinkine oranla 2.5 kat yüksek olduğu bulunmuştur.
2. Kazein kinaz II aktivitesinde, substrat olarak EQKLISEEDL dizili c-myc peptidi kullanıldığında, tümörlü ve normal insan akciğer dokusu arasında herhangi bir değişim gözlenmemiştir.
3. Kazein kinaz II enziminin c-myc peptidine affinitesinin tümörlü dokuda normal dokuya kıyasla daha yüksek olduğu ve bu peptidle her iki dokuda da elde edilen Km değerlerinden de, EQKLISEEDL dizili c-myc peptidinin CK II için iyi bir substrat olduğu kanısına varılmıştır.
4. L-myc geni allelik durumunun akciğer kanserli ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir.
5. Sigara alışkanlığının akciğer adenokarsinomuna değil epidermoid karsinomuna etki eden bir faktör olduğu düşünüldüğünde meyve ile beslenmenin antikarsinojenite açısından oldukça önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, kazein kinaz II enziminin RRRDDDSDDD sentetik peptidini ve EQKLISEEDL dizili c-myc peptidini iyi birer substrat olarak kabul ettiği, tümörlü akciğer dokusunda enzimin aktivitesinin RRRDDDSDDD peptidi kullanıldığında, normal dokuya göre daha yüksek olması tümörigenezde bu enzimin aldığı yerin oldukça önemli olduğunu yansıtmaktadır. Ayrıca, akciğer kanserinin metastatik durumu ve hastalığın prognozu ile L-myc genotipi arasında bir ilişki olmadığı saptanmış olup, çalışma gruplarını daha da genişletmek ve Türk popülasyonundaki L-myc'in allelik dağılımı -saptamanın, faydalı olacağı kanısındayız.

6. ÖZET

Çalışmamızda akciğer tümörlü ve tümör içermeyen akciğer dokusunda , CK II aktivitesi, hem RRRDDDSDDD dizili peptid hem de c-myc (401-419 a.a.) peptidi kullanarak tayin edilmiştir. Tümör içeren dokuda CK II aktivitesi, RRRDDDSDDD peptidi kullanıldığında normal dokuya oranla yaklaşık 2.5 kat daha yüksek tespit edilmiş olup, aynı zamanda kullanılan c-myc peptide karşı CK II affinitesinin de oldukça iyi (yüksek) olduğu bulunmuştur. Sonuçlarımızın CK II enziminin hücre proliferasyonunda rolünü ve aktivasyon mekanizmalarını açıklamaya yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır.

Ayrıca, L-myc gen polimorfizmi saptamak için Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragmanı Gen Polimorfizmi (RFLP) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır. 37 sağlıklı, 64 akciğer kanseri tanısı konmuş hastada L-myc gen polimorfizmi saptanmış ve L-myc gen polimorfizminin klinik ve cerrahi teşhis sırasında göz önüne alınan parametrelerle olan ilişkisi incelenmiştir. L-myc gen polimorfizmi saptamak için Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragmanı Gen Polimorfizmi (RFLP) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda L-myc gen polimorfizminin (LL, LS ve SS) tümör safhası veya nod metastazına etkisi olduğuna dair bir bulgu saptanmamıştır. Ancak L-myc geninin S allelinin bulunması ilemetastaz durumu arasındaki ilgi, hasta takibi için gerekli süree kısa olduğundan yeterince incelenememiştir. Bu sonuçlara göre L-myc genotipinin akciğer kanser riski ve hastalığın evrenmesindeki parametreler üzerine bir etkisi olmadığı kanısına varılmıştır.

7.SUMMARY

THE KINETIC CHARECTERIZATION OF CASEIN KINASE II (CK II) BY USING MYC ONCOPROTEIN AS SUBSTRATE IN NORMAL AND LUNG CANCER TISSUES AND RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS OF THE L-MYC GENE

In our study, casein kinase (CK) II activity was assayed in lung cancer and normal tissue using RRRDDDSDDD sequenced peptide and c-myc (401-419th aminoacid seunce). In the lung cancer tissue RRRDDDSDDD peptide was phosphorylated by CK II 2.5 fold higher comparing the activity of the enzyme in normal lung tissue. Also, the c-myc phosphorylating activity of CKII was found to be considerably high. Our results may help to explain the role of CK II in cellular proliferation and its mechanisms of activation.

Additionally, L-myc gene polymorphism was studied using restriction fragment length polymorphism (RFLP) and agarose gel electrophoresis was performed in order to assess the gene fragments. L-myc gene polymorphism and its clinical, surgical prognostic importance in 64 lung cancer patients, comparing the data from 37 healthy individuals were investigated. There was no statistically significant correlation between L-myc gene polymorphism (LL, LS and SS) and T stage or nodal status in lung cancer patients. However, no connection was found between presence of S allele of L-myc and metastatic status of the patients possibly due to relatively short follow-up period of the cases.

As a result, L-myc genotype has no effect on clinical or surgical staging factors of patients with lung cancer.

8.KAYNAKLAR

1. Ackerman P, Glover C.V.C., Osheroff N. Stimulation of casein kinase II by epidermal growth factor: Relationship between the physiological activity of the kinase and the phosphorylation state of its β subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:821-825.
2. Ahmed K:Significance of the casein kinase system in cell growth and proliferation with emphasis on studies of the androgenic regulation of the prostate. *Cellular and Molecular Biology Research* 1994; 40:1-11.
3. Alitalo K., Schwab M., Lin C.C., Varmus H.E., Bishop J.M. Homogenously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (cmyc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80:1701-1711.
4. Allende J., Allende C.:Protein kinase CK 2; an enzyme with multiple substrates and puzzling regulation. *Faseb J* 1995; 9:313-323.
5. Bidwai A.P., Reed J.C., Glozer C.V.C. Phosphorilation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993; 300:265-70.
6. Birnbaum M.J., Wendell L.C., Bloom T.J., Gilbert L.I. Polyamine regulation of protein phosphorylation in the brain of the tobacco hornworm, *manduca sexta*. *J Neurochem* 1987; 48: 935-942.
7. Boyle P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe: A review including the recommendations of European cancer experts consensus meeting. *Lung Cancer* 1997; 17:1-60.
8. Carroll D., Marshak D.R. Serum stimulated cell growth causes oscillations in casein kinase II. *Activity J Bio Chem* 1989; 264:7345-48.
9. Cole M.D. The myc oncogene:it's role in transformation and differentiation. *Ann Rev Genet* 1986; 20:361-84.
10. DePinho R., Schreiber-Agus N., Alt F.W. Myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Advances in Cancer Research* 1991; 57:1-46.

11. Diggle T.A., Schimitz-Peiffer C., Borthwick A.C., Welch G.I., Denton R.M. Evidence that insulin activates CK II in rat epididymal fat-cells and that this may result in the increased phosphorylation of an acid-soluble 22 kDa protein. *Biochem J* 1991 ; 279:545-551.
12. Filhol O., Cochet C., Chambaz E.M. Cytoplasmic and Nuclear Distribution of casein kinase II: Charecterization of the enzyme uptake by bovine adrenocortical nuclear preparation. *Biochemistry* 1990; 29:9928-9936.
13. Fong K. M., Sekido Y., Minna J.D. Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1999;118:1136-52.
14. Fong K.M., Kida Y., Zimmerman P.V., Smith P.J. MycL Genotypes and Loss of Heterozygosity in non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 1996; 74, 1975-1978.
15. Gatica M., Hinrichs M.V., Jedlicki A., Allende C.C., Allende J.E. Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus Laevis*. *FEBS* 1993; 315: 173-177.
16. Ge H., Law W.K. Lee J., Wong M.P., Yew W.W. Lung M.L. Analysis of L-myc and GST M1 genotypes in Chinese non-small cell lung carcinoma patients *Lung Cancer* 1996; 15: 355-66
17. Gietz R.D.Graham K.C., Litchfield D.W. Interactions between the subunits of casein kinase II. *J. Bio Chem* 1995; 270:13017-13021.
18. Gündoğuş N., Criss W. Purification of casein kinase II from lung tissue and kinetic evaluations with polyamines and myc-onkoprotein. *Turkish J Medical Sciences* 1998; 28: 599-604.
19. Hathaway G.M., Lubben T.H., Traugh J.A. Inhibition of casein kinase II by heparin *J Bio Chem* 1980; 255:8038-8041.
20. Hathaway G.M., Traugh J.A. Cyclic Nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. *J.Bio.Chem.* 1979; 254:762-8.
21. Hathaway G.M., Traugh S.A. Casein Kinase II. *Methods in Enzymology* 1983; 99: 317-331.
22. Hathaway G.M., Tuazon P.T., Traugh J.A. Casein Kinase I. *Methods in Enzymology* 1983 ; 99:308-317.

23. Hinrichs M.V., Jedlicki A., Tellez R., Pongor S., Gatica M., Allende C.C., Allende J.E. Activity of recombinant α and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis* Biochemistry 1993; 32:7310-16.
24. Hunter T. Protein Kinase Classification. Methods in Enzymology 1991; 200:3-37.
25. Holbrook J.H. Nicotine Addiction. In: Isselbacher K.J, Braunwald E., Wilson J.D., Martin J.B. Fauci., Kasper D.L (eds) Harrison's Principles of Internal Medicine. 13.ed. McGraw Hill Inc. New York, 1994; 2433-2437.
26. Kawashima K., Nomura S., Hirai H., Fukushi S., Karube T., Takeuchi K., Naruke T., Nishimura S. Correlation of L-myc RFLP with metastasis prognosis and multiple cancer in lung-cancer patients Int J Cancer 1992; 50:557-61.
27. Kawashima K., Shikama H., Imoto K., Izawa M., Tsuguo N., Obayashi K., Nishimura S. Close correlation between restriction length polymorphism of the L-myc gene and metastasis of human lung cancer to lymph nodes and other organs. Proc Natl Acad Sci. USA 1988; 85:2353-2356.
28. Kaye F., Battey J., Nau M., Brooks B., Seifter E., de Greve J., Birrer M., Sausville E., Minna J. Structure and expression of human L-myc gene reveal a complex pattern of alternative mRNA processing Molecular and Cellular Biology 1988; 8:186-95.
29. Kelly K. The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells Ann Rev Immunol 1986 ; 4:317-38.
30. Klarlund J.K. Czech M.P. Insulin like growth factor I and insulin rapidly increase casein kinase activity in Balb/c 3T3 fibroblasts. J. Bio Chem 1988; 263:15872-75.
31. Krehan A., Lorenz P., Plana-Coll M., Pyerin W. Interaction sites between catalytic and regulatory subunits in human protein kinase CK2 holoenzymes as indicated by chemical cross-linking and immunological investigations. Biochemistry 1996; 35:4966-75.
32. Kuenzel E., Krebs E.G. A synthetic peptide substrate specific for casein kinase II. Proc.Natl Acad Sci 1985; 82:737-41.
33. Kuenzel E.A. Mulligan J.A. Sommercorn J., Krebs E.G. Substrate specificity Determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptide. J.Biol Chem 1987; 262: 9136-40.
34. Lee B.W., Wain J.C., Kelsey K.T., Wiencke J.K., Christiani D.C. Association between diet and lung cancer location. An Respir Crit Care 1998;158:1197-1203.

35. Litchfield D W and Lüscher B. Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1993;127:187-199.
36. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem* 1951; 193:265-275.
37. Lüscher B., Kvenzel E.A., Krebs E.G., Eisenman R.N. Myc Oncoproteins are Phosphorilated by Casein Kinase II, *The EMBO Journal* 1989; 8:4, 1111-1119.
38. Makela T.P., Saksela K., Evan G., Alitalo K. A fusion protein formed by L-myc and a noval gene in SCLC *The EMBO Journal* 1991; 10:1331-1335.
39. Marshak D., Carroll D. Synthetic peptide substrates for casein kinase II *Methods in Enzymology* 1991; 200:134-155.
40. Meggio F., Boldyreff B., Issinger O-G, Pinna L. The autophosphorilation and p34 cdc2 phosphorylation sites of casein kinase-2 β subunit are not essential for reconstituting the fully-active heterotetrameric holoenzyme *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1164:223-225.
41. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.S. Simples salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 1988 ;16:1215-1219.
42. Mountain C.F., Dresler C.M. Regional lymph node classification for lung cancer staging *Chest* 1997 ; 111:1718-23.
43. Mountain C.F. New prognostic factors in lung cancer: Biologic prophets of cancer cell aggression *Chest* 1995; 108:246-54.
44. Munstermann U., Fritz G., Seitz G., Yiping L., Schneider H.R., Issinger O-G . Casein Kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur.J. Biochem* 1990;189: 251-257.
45. Nau M.M., Brooks B.J., Battey J., McBride O.W., Bertness V., Hollis G.F., Minna J.D. L-myc a new myc-related gene amplified and expressed in human cell lung cancer. *Nature* 1985; 318:69-73.
46. Nau M.M., Brooks B.J., Carney D.N., Jr., Gazdar A.F., Battey J.F., Sausville E.A., Minna J.D. Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 1092-1096.
47. Onesmo K. And Yoi O-M. Casein kinase II in theileriosis. *Science* 1995; 267:834-835.

48. Pfaff M., Anderer F.A. Casein kinase II accumulation in the nucleus and its role in nucleolar phosphorylation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1988; 969: 100-109.
49. Prins J., DeVries E.G.E. Mulder N.H. The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types *Anticancer Research* 1993;13: 1373-1386.
50. Prowald K., Fischer H., Issinger O-G. Enhanced casein kinase II activity in human tumour cell cultures *FEBS Lett* 1984; 176:479-83.
51. Punyammalee B., Crabeel M., de Lannoy C., Perbal B., Glansdorff N. Two c-myc proteins differing by their aminotermini exhibit different transcriptional transactivation activities. *Oncogene* 1991; 6:11-19.
52. Rabbitts T.H., Hamlyn P.H., Baer R. Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature* 1983; 306:760-765.
53. Robitzki A., Bodenbach L., Voss H., Pyerin W. Human casein kinase II. *J Bio Chem* 1993; 268:5694-5702.
54. Ryan K.M. and Birnie G.D. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J.* 1996; 314: 713-721.
55. Saksela K., Bergh J., Lehto V-P, Nilsson K., Alitalo K. Amplification of the c-myc oncogene in a subpopulation of human cell lung cancer *Cancer Research* 1985; 45:1823-27.
56. Salih O.K. Akciğer kanserlerinde doku ve eritrosit zarında denozin trifosfataz (ATPaz) enzim sistemindeki değişimler, Ç.Ü.Tıp Fakültesi , Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı,Uzmanlık Tezi, Adana, 1984.
57. Segel I.H.. *Enzyme kinetics.* John Wiley and Sons.Inc., 1975; 371-385
58. Shields TW. Pathology of Carcinoma of the Lung. In: Shields TW, LoCicero J, Pann RB (eds). *General Thoracic Surgery.* 5.ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia USA, 2000;1249-1255.
59. Shilo B-Z and Weinberg R. A. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster* *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 6789-92.
60. Snyder R.C. and Miller D.M. Regulation of c-myc transcription initiation and elongation *Critical Reviews in Oncogenesis* 1992; 3: 283-291.
61. Soderling T.R. Protein Kinases: Regulation by Autoinhibitory Domains. *J.Biol.Chem.* 1990; 265: 1823-1826.
62. Tabor C.W. and Tabor H. Polyamines. *Ann Rev Biochem* 1984; 53:749-90.

63. Tamai S., Sugimura H., Caporaso N.E., Reseau J.H., Trump B.F., Weston A., Harris C.C. Restriction fragment length polymorphism analysis of the L-myc gene locus in a case control study of lung cancer. *Int J Cancer* 1990; 46:411-415.
64. Taylor J.A. Oncogenes and their applications in epidemiologic studies. *American Journal of Epidemiology* 1989; 130: 6-13.
65. Tefre T., Borresen A-L, Aamdal S., Brogger A. Studies of the L-myc DNA polymorphism and relation to metastasis in Norwegian lung cancer patients *Br.J.Cancer* 1990; 61:809-812.
66. Van lint J., agonistis P., Vandeuoorde V., Haegeman G., Fiers W., Merlevede W J.R. Tumor necrosis factor stimulates multiple serine/threonine protein kinases in Swiss 3T3 and L929 cells: Implication of CK II and extraselluler signal regulated kinases in the tumour necrosis factor signal transduction pathways *J. Bio Chem* 1992; 267:25916-25921.
67. Vineis P., Caporaso N. The analysis of restriction fragment length polymorphism in human cancer: A review from an epidemiological perspective *Int J Cancer* 1991; 47:26-30.
68. Wallis Y.L. Macdonald F. *Molecular Pathology Demystified.. Oncogenes.* British Medical Journal 1999; 52: 55-63.
69. Walter J., Schnölzer M., Pyerin W., Kinzel V., Kübler D. Induced release of cell surface protein kinase yields CK1 and CK2 enzymes in tandem *J Bio Chem* 1996; 271:111-119.
70. Weintraub SJ. Lung Cancer , The Role of Tumor Suppressor Genes. In: JL Jameson (ed) *Principles of Molecular Medicine*, Humana Press Inc., Tptowa, NJ, 1998; 357-361.
71. Weston A., Caporaso N.E., Perin L.S., Sugimura H., Tamai S., Krontiris T.G., Trump B.F., Hoover R.N., Harris C.C. Relationship of H-ras-1, L-myc and p53 polymorphisms with lung cancer risk and prognosis *Environmental Health Perspectives* 1992; 98:61-7.
72. Weston A., Ling-Cawley H.M., Caporaso N.E., Bowman E.D., Hoover R.N., Trump B.F., Harris C.C. Determination of the allelic frequencies of an L-myc and a p53 polymorphism in human lung cancer *Carcinogenesis* 1994; 15:583-587.
73. Yu IJ, Spector DL, Base Y-S, Marshak OR. Immunocytochemical localization of Casein kinase II during interphase and mitosis *J.Cell Biol* 1991; 114: 1217-1232.

9.ÖZGEÇMİŞ

1971 yılı İstanbul doğumluyum. Orta ve Lise öğrenimimi 1987 yılında Çemberlitaş Kız Lisesi'nde tamamladım. 1987 yılında İ.Ü.cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'ne girerek 1991 yılında mezun oldum. 1991 yılında İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ve 1995 yılında tamamladım. 1995 yılında İ.Ü.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Aynı yıl İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda doktora çalışmalarına başladım. Halen İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Tıbbi Biyolog İlhan Yaylın