

Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi*

The detection of p21, p27, p57 cyclin dependent kinase inhibitor gene (CDKI) expression in colorectal cancer

Mustafa Ertan AY¹, Orhan TERZİOĞLU¹, Cem TERZİ², Özlem İZCİ AY¹

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı¹, Genel Cerrahi Anabilim Dalı², İzmir

Giriş ve amaç: Kanser gelişiminde rolü olduğu gösterilen bazı moleküllerdeki genetik değişimler, hastaların tanı, tedavi ve takibinde belirleyici olarak kullanılabilir. Kolorektal kanserlerde ise, hücre döngüsü, DNA sentezi ve onarımı, diferansiyasyon ve apoptozun kontrolü ile tümör supressör genlerde meydana gelen birçok genetik değişim araştırılmaya devam etmektedir. Bu çalışmada; kolorektal kanserli hastaların, normal ve tümör dokuları arasındaki p21, p27 ve p57 geni ekspresyon düzeyi değişimlerinin belirlenmesi ve bu değişimlerin, hastalara ait klinik ve patolojik özellikler ile ilişkisinin saptanması amaçlandı. **Gereç ve yöntem:** Bu çalışmaya, 19 kolorektal kanser hastasından alınan, 19'u normal ve 19'u tümör dokusu olmak üzere, toplam 38 kolorektal doku örneği dahil edildi. p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi analizleri, RT-PCR ve yarı ölçümsel dansitometrik analizler kullanılarak gerçekleştirildi. **Bulgular:** Normal dokularla karşılaştırıldığında, kolorektal kanserli hastalara ait tümör dokularındaki p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyleri artmış olarak saptandı. p27 ekspresyon düzeyleri yüksek olan tümörlerin, p27 ekspresyon düzeyi düşük olan tümörlere göre daha iyi diferansiyasyon gösterildi. p57 ekspresyon düzeyleri artmış olan hastaların ise ileri klinik ve patolojik evrelerde oldukları saptandı. **Sonuç:** Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi değişimlerinin saptanmasının, kolorektal kanser tümör biyolojisinin anlaşılmasına katkıda bulunacağı ve hasta prognozlarının belirlenmesinde prediktif markır olarak kullanılabilineceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Kolorektal kanser, CDKI, ekspresyon düzeyi, RT-PCR

Background/aim: The genetic changes in some molecules that underlie malignant transformation of cells can be used as markers to diagnose, monitor or characterize various forms of cancer. In colorectal cancer, many genetic changes have been studied in the control of cell cycle, DNA synthesis, DNA repair, differentiation, apoptosis and tumor suppressor genes. This study aims to clarify the expression pattern of p21, p27 and p57 genes between normal and tumor colorectal tissues and correlate with clinicopathological features. **Materials and methods:** A total of 38 tissue samples (19 normal and 19 tumor tissue) were included in this study. The expression of p21, p27 and p57 was investigated using the RT-PCR and semi-quantitative densitometric approaches. **Results:** The expression levels of p21, p27 and p57 were detected to be increased in tumor tissues with respect to normal colorectal tissues. We demonstrated that the tumor differentiation of patients expressing high levels of p27 was significantly well differentiated compared to that of cases expressing low levels of p27. The clinical and pathological stages of patients expressing high levels of p57 were significantly worse than in the other patients. **Conclusion:** Our study suggests that the detection of expression changes of p21, p27, and p57 might contribute to further understanding of the tumor biology of colorectal cancer and could serve as predictive markers for patient prognosis.

Key words: Colorectal cancer, CDKI, expression level, RT-PCR

GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre her yıl 945 bin kişi kolorektal kansere yakalanmakta ve 492 bin kişi kolorektal kanser nedeniyle ölmektedir (1-3). Epidemiyolojik bulgular, risk faktörlerinin belirlenmesi ve özgül moleküler genetik bulguların saptanması nedeniyle, kolorektal kanserlerin tanı, tedavi ve prognozunun belirlenmesi için yeni bakış tarzlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (4, 5).

Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrolü, normal hücrelerin büyüme ve diferansiyasyonu yanında tümör gelişiminde de önemli roller

oyunmaktadır. Hücre döngüsünü düzenleyen ve kontrol eden proteinler, döngünün belli aşamalarında işlev gören ve birbirleri ile olan etkileşimleri yoluyla, pozitif ve/veya negatif düzenleyici etki göstererek, döngünün ilerlemesini ya da kısıtlanmasını sağlayan proteinlerdir (6-11).

Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (CDKI) 1993-1995 yıllarında tanımlanmış ve klonlanmışlardır. Hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumludurlar (9). Hücre döngüsü ilerlemesi, döngünün devamını sağlayan siklinlerin, katalitik partneri olan siklin bağımlı kinazlar (Cdk) tarafından

*Bu çalışma kısmen Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir.

kontrol edilmektedir. Düzenli olarak kontrol edilmeden Cdk aktivitesi, artmış hücre çoğalmasına ve genomik instabiliteye neden olmaktadır. Bu durum; hücrenin ölümsüzlük kazanması veya kanserleşmesi ile sonuçlanır. Cdk'ların hücre döngüsündeki işlevlerinin düzenlenmesi, CDKI'leri tarafından gerçekleştirilmektedir. Büyümeyi inhibe edici sinyalden sonra, Cdk aktivitesini düzenleyen ve hücre döngüsü baskılanmasını uyarayan üç farklı Cip/Kip (Cdk Inhibitory protein / Kinase Inhibitory Protein) ailesi CDKI'ü tanımlanmış olup, bunlar; p21^{Cip1} (CDKN1A), p27^{Kip1} (CDKN1B) ve p57^{Kip2} (CDKN1C)dir (8-11). İlk klonlanan Cip/Kip üyesi CDKI'ü p21 olup, DNA hasarına karşı oluşan cevapta G1 baskılanmasından sorumludur (12, 13). p27 ise antimitojenik sinyalle karşı oluşan cevapta, büyümeyi düzenleyen önemli bir moleküldür (14). p57; p27 ile %40 oranında homolojiye sahip olup, proliferasyon ve diferansiyasyonda görevlidir (8). Hücre döngüsü negatif kontrolünde p21'in bazı işlevleri, p27 ve p57 tarafından karşılanabilmektedir. Ancak, bu moleküllerin özgül fonksiyonlarına karşılık, aralarındaki fonksiyonel ilişkiler henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçlarına göre; p21'in "growth arresti" uyardığı, p57'nin "growth arrestin" devamını sağladığı ve p27'nin ise diferansiyasyon genlerini uyardığı bilinmektedir. Cip/Kip ailesi CDKI'lerinin mutasyonel inaktivasyonlarına çok nadir olarak rastlanılmaktadır (15-16).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, hücre döngüsündeki ve tümör baskılanmasındaki işlevlerinden dolayı, kanser gelişiminde birer genetik değişiklik hedefidirler. Ayrıca kanser gelişim sürecinde yer alan diğer moleküllerin genetik değişimi ile başlayan onkogenik süreçlerde, fonksiyonlarında meydana gelen bozulmalar ile de ikincil olarak etkili olabilmektedirler (9, 17). Bu nedenle; kanser hücrelerinde, p21, p27 ve p57 CDKI'leri gibi hücre döngüsünün negatif kontrolünden ve tümör baskılanmasından sorumlu moleküllerin fonksiyonlarının saptanması ve bu fonksiyonların neoplastik süreçteki etkilerinin belirlenmesi, klinik tanı, tedavi ve prognoz belirlenmesinde faydalı olmaktadır (14).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta Örnekleri:

Bu çalışmaya, 9'u (%47.3) rektum kanserli ve 10'u (%52.7) kolon kanserli olmak üzere toplam 19 hastaya ait toplam 38 normal ve tümör doku örneği dahil edildi. Hastalara ait klinik ve patolojik özelliklerin genel dağılımları Tablo 1'de verilmektedir. Pozitif kontrol olarak K562 ve SW480 hücre hatları ve plasentadan elde edilen hücreler kullanıldı.

Tablo 1. Hastalara ait özelliklerin genel dağılımı

Yaş (46-85)		Cinsiyet	
46-65	7/19 (%36.8)	Kadın	4/19 (%21.1)
66-85	2/19 (%63.2)	Erkek	15/19 (%78.9)
Tümör Yerleşimi		Diferansiyasyon	
Rektum (9/19,%47.3)		İyi	3/19 (%15.7)
Alt/orta Rektum	1/9 (%11.1)	Orta	15/19 (%78.9)
Üst Rektum	8/9 (88.9)	Az	0/19 (%0)
Kolon (10/19,%52.7)		Değerlendirilemeyen	1/19 (%5.4)
Sağ Kolon	3/10 (%30)	Patolojik Evrelendirme	
Sol Kolon	7/10 (%70)	Evre 1	2/19 (%10.5)
Klinik Evrelendirme		Evre 2	3/19 (%15.7)
Evre 2	9/19 (%47.4)	Evre 3	10/19 (%52.6)
Evre 3	5/19 (%26.3)	Evre 4	4/19 (%21.2)
Evre 4	5/19 (%26.3)	İnvazyon	
Histolojik Tip		Müsinöz Adenokarsinom	8/19 (%42.1)
Müsinöz Adenokarsinom	5/19 (%26.3)	Venöz İnvazyon	1/19 (%5.2)
Adenokarsinom	14/19 (%73.7)	Perinöral İnvazyon	6/19 (%31.5)
		İnvazyon Yok	4/19 (%21.2)

RNA Eldesi ve cDNA Sentezi:

Hasta örneklerinden ve pozitif kontrollerden RNA eldesinde NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel-740.955.250) kullanıldı (18). Elde edilen RNA'lerden cDNA sentezinde, kalıp olarak kullanılacak RNA miktarları, her bir örnek için, toplam 20µl'lik reaksiyon volümü içinde 3 µg/ml olacak şekilde hesaplandı ve reaksiyon karışımına eklendi. Bu yolla, bütün örnekler için eşit miktarlarda RNA'ların kalıp olarak kullanılması ile cDNA sentezlenmesi sağlandı. cDNA sentezinde, Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas-K1622) kullanıldı (18). Sentez, Moloney Murin Lösemi Virusu Reverse Transkriptazı (M-MuLV RT) ve Random Hekzamer primerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

cDNA'ların Kontrol Amplifikasyonları:

Sentezlenen cDNA'ların, p21, p27 ve p57 gen amplifikasyonları öncesinde kontrolü, iyi korunmuş genler olan β-aktin (β-aktin F: 5'-ATC ATG TTT GAA ACC TTC AA-3', β-aktin R: 5'-CAT CTC CTG CTC GAA AGT CCA-3') veya Gliser Aldehid-difosfat Dehidrogenaz (GAPDH) (GAPDH F: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', GAPDH R: 5'-TCC ACC CTG TTG CTG TA-3') geni primerleri kullanılarak gerçekleştirildi (18). Toplam reaksiyon hacmi 25µl olup, 2.5µl 10XPCR tamponu (Fermentas), 2.5mM MgCl₂ (Fermentas), 10mM

dNTP karışımı (Fermentas), 25pmol primer (MWG) ve 1 U Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. Elde edilen ürün büyüklükleri sırasıyla, 320 ve 451 bp'dir.

p21, p27 ve p57 RT-PCR'ları:

Sentezlenen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak, p21, p27 ve p57 geni primerleri (MWG) ile RT-PCR yapıldı. Kullanılan primer dizileri sırasıyla; p21F: 5'-ATT AGC AGC GGA ACA AGG AGT CAG ACA T-3', p21R: 5'-CTG TGA AAG ACA CAG AAC AGT ACA GGG T-3', p27F: 5'-ATG TCA AAC GTG CGA GTG TC-3', p27R: 5'-TCT GTA GTA GAA CTC GGG CAA-3', p57F: 5'-TCG CTG CCC GCG TTT GCG CA-3' ve p57R: 5'-CCG AGT CGC TGT CCA CTT CGG-3' dir (19-21). Uygulanan RT-PCR karışımı toplam reaksiyon hacmi olan 25 µl içinde, 2.5 µl 10XPCR tamponu (Fermentas), 2.5mM MgCl₂ (Fermentas), 0.4mM dNTP karışımı (Fermentas), 25pmol primer (MWG) ve 1 U Taq DNA polimeraz (Fermentas)dir. PCR sonrası elde edilen sırasıyla; 318, 268 ve 287 bp'lik p21, p27 ve p57 geni ürünleri %2'lik Agaroz (AppliChem) jelde yürütülerek EagleSight Software (Stratagene) kullanılarak görüntüledi. Moleküler ağırlık markını olarak 1 µl, ΦX174 DNA/BsuRI (*HaeIII*) Marker, 9 (Fermentas-SM0251) kullanıldı.

Dansitometrik Analiz:

RT-PCR ürünlerinin dansitometrik analiz ile ekspresyon düzeylerinin saptanması Bio-Rad GS-700 Imaging Dansitometer (170-761) ve Molecular Analyst paket programı kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel Analizler:

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 11.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Normal ve tümör dokularında saptanan p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel analizi için "Wilcoxon'un İşaretli Sıralar Testi", tümör dokularında saptanan p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkinin ve tümörlü dokularında saptanan p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyleri ile klinik ve patolojik özellikler arasındaki ilişkinin belirlenmesinde "Spearman Sıra Korelasyonu Analizi" kullanıldı.

BULGULAR

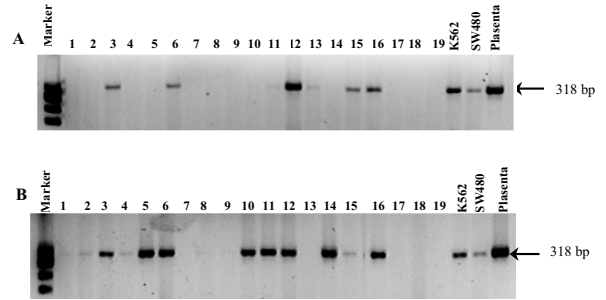
β-aktin ve GAPDH Kontrol Amplifikasyon Sonuçları:

Tüm hasta örneklerinde ve K562, SW480 ve plasenta hücrelerinde β-aktin ve/veya GAPDH genle-

rine özgül primerler ile gerçekleştirilen kontrol amplifikasyonlarında, özgül PCR ürünleri elde edildi (veriler gösterilmemiştir).

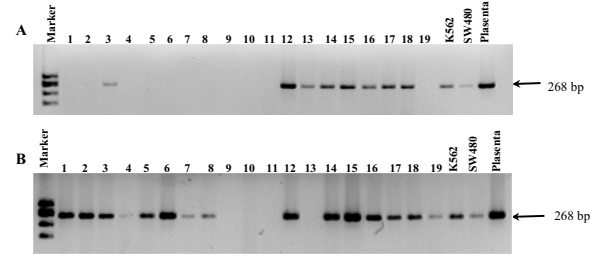
p21, p27 ve p57 RT-PCR Sonuçları:

p21 primerlerinin kullanıldığı RT-PCR sonuçlarına göre, 7 (%36.8) normal dokuda ve 12 (%63.2) tümör dokusunda p21 amplifikasyon ürünü (318 bp) saptandı (Şekil 1). p27 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR'larda, 8 (%42.1) normal doku örneğinde ve 15 (%78.9) tümör dokusu örneğinde özgül amplifikasyon ürünü (268bp) saptandı (Şekil 2). p57 genine özgül primerlerle gerçekleştirilen RT-PCR sonuçlarına göre ise 9 (%47,3) normal ve 15 (%78.9) tümör dokusunda p57 amplifikasyon ürünü (287 bp) saptandı (Şekil 3). K562, SW480 ve plasenta hücrelerinde de p21, p27 ve p57 özgül RT-PCR ürünleri elde edildi.



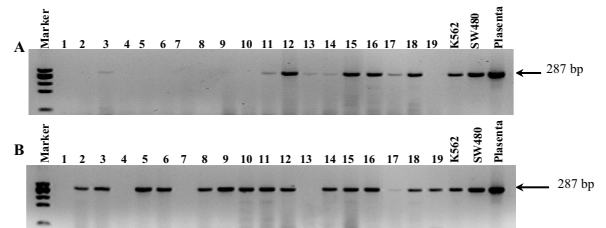
A: Normal Dokular, B: Tümör Dokuları, M: Markır, 1-19: Hasta Örnekleri

Şekil 1. Kolorektal kanserli hastalara ait p21 RT-PCR sonuçları



A: Normal Dokular, B: Tümör Dokuları, M: Markır, 1-19: Hasta Örnekleri

Şekil 2. Kolorektal kanserli hastalara ait p27 RT-PCR sonuçları



A: Normal Dokular, B: Tümör Dokuları, M: Markır, 1-19: Hasta Örnekleri

Şekil 3. Kolorektal kanserli hastalara ait p57 RT-PCR sonuçları

p21 Ekspresyon Düzeyi Değişimleri:

Dansitometrik analiz sonuçlarına göre; 19 hastaya ait 19 tümör dokusundan 12'sinde (%63.2) p21 ekspresyonu saptandı. Bu hastalardan 6'sının (%31.5) normal dokularında p21 ekspresyonu saptanmaz iken, 4'ünün (%21) p21 ekspresyon düzeyinin, dansitometrik analiz verilerine göre, normal dokular ile karşılaştırıldığında, tümör dokularında ciddi şekilde arttığı gözlemlendi. Böylece 10 (%52.6) hastaya ait tümör dokusunda, p21 ekspresyon düzeyinin arttığı saptandı (Tablo 2).

Tablo 2. Kolorektal kanserli hastalara ait normal ve tümör dokularında saptanan p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeylerinin dansitometrik ölçüm değerleri

Hs. No	p21		p27		p57	
	Norm.	Tüm.	Norm.	Tüm.	Norm.	Tüm.
1		0.90**		131.05**		
2		2.30**		139.61**		52.95**
3	18.45*	43.58**	5.33*	108.99**	2.73*	129.45**
4		2.21**		2.16**		
5		144.51**		69.81**		136.55**
6	13.18*	122.46**		159.15**		121.97**
7				5.06**		
8				14.20**		86.66**
9						148.34**
10		88.0**				135.24**
11	0.95*	104.24**			4.54*	123.36**
12	109.33**	103.34*	134.28**	117.39*	87.32*	114.38**
13	2.43**		10.16**		2.67**	
14		96.94**	31.90*	125.46**	1.91*	107.81**
15	16.27**	3.73*	87.08*	152.58**	126.30*	131.02**
16	30.88*	101.28**	16.67*	109.59**	121.25**	70.63*
17			43.56*	46.63**	3.78**	1.14*
18			46.55*	61.36**	89.61**	57.67*
19				5.79**		51.17**

*Hastanın diğer dokusuna göre düşük ekspresyon, **Hastanın diğer dokusuna göre yüksek ekspresyon, boş kısımlarda ekspresyon yok

p27 Ekspresyon Düzeyi Değişimleri:

19 hastaya ait 19 tümör dokusundan 15'inde (%78.9) p27 ekspresyonunun varlığı gösterildi. Bu hastalardan 8'inin (%42.1) normal dokularında p27 ekspresyonu saptanmaz iken, 6'sının (%35) ise p27 ekspresyon düzeyinin, dansitometrik analiz verilerine göre, normal dokular ile karşılaştırıldığında, tümör dokularında önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Böylece 14 (%73.6) hastaya ait tümör dokusunda, p27 ekspresyon düzeyinin, arttığı saptandı (Tablo 2).

p57 Ekspresyon Düzeyi Değişimleri:

p57 RT-PCR ve dansitometrik analiz sonuçlarına göre 19 tümör dokusundan 15'inde (%78.9) p57 ekspresyonu saptandı. Bu hastalardan 7'sinin

(%36.8) normal dokularında p57 ekspresyonu saptanmaz iken, 5'inin (%26.3) dansitometrik analizleri sonucunda, normal dokular ile karşılaştırıldığında, tümör dokularında önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. Böylece 12 (%63.1) hastanın tümör dokularındaki p57 ekspresyon düzeyinin, arttığı tesbit edildi (Tablo 2).

İstatistiksel Analiz Sonuçları:

Normal dokularda saptanan p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyleri dikkate alınarak, tümör dokularında saptanan p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi artışları istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p=0.033$, $p=0.004$, $p=0.005$). p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi artışları arasındaki ilişkinin istatistiksel analizi sonucunda ise tümör dokularında saptanan p21 ekspresyon düzeyi artışı ile p57 ekspresyon düzeyi artışı arasında istatistiksel olarak, olumlu, çok güçlü ve anlamlı bir korelasyon saptandı (Spearman $r:0.536$, $p=0.018$). Tümörlü dokularda saptanan p21, p27 ve p57 ekspresyon düzeyi artışı ile hastalara ait klinik ve patolojik özellikler arasındaki ilişkinin istatistiksel analizi sonucunda, tümör dokularında saptanan p27 ekspresyon düzeyleri ile diferansiyasyon ve tümör gelişim bölgeleri arasında istatistiksel olarak, olumlu, çok güçlü ve anlamlı bir korelasyon saptandı (Sırasıyla Spearman $r:0.501$, $p=0.034$ ve $r:0.470$, $p=0.034$). Tümör dokularında saptanan p57 ekspresyon düzeyleri ile klinik evre ve patolojik evre arasında ise istatistiksel olarak, olumlu, çok güçlü ve anlamlı bir korelasyonun varlığı gösterildi (Sırasıyla Spearman $r:0.450$, $p=0.042$ ve $r:0.498$, $p=0.032$).

TARTIŞMA

Moleküler biyolojik yöntemlerin gelişimine paralel olarak, kolorektal kanser hastalarında pek çok prognostik markır aday tanımlanmıştır. Ancak kolorektal kanserlerin değerlendirilmesinde tek bir markırın kullanılması yerine birbirleriyle etkileşim gösteren birçok markırın birlikte değerlendirilmesi gerektiği literatürlerde belirtilmektedir (1, 6).

p21 ekspresyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, meme kanserlerinde, melanomlarda, baş-boyun skuamöz hücre kanserlerinde, gliomlarda ve akciğer kanserlerinde p21 ekspresyon düzeyinin arttığı gözlenmektedir. Tümörlerde saptanan artmış p21 ekspresyon düzeyi, proliferasyon hücrelerin veya DNA hasarına cevap veren, genetik olarak stabil olmayan hücrelerin varlığını göstermektedir. Artmış p27 ekspresyon düzeyinin ise;

bozulmuş hücre proliferasyonunu durdurduğu ya da kanser hücresine selektif bir avantaj mı sağladığı henüz açıklık kazanmış değildir (14). İnsan kanserlerindeki p57 ekspresyon düzeyi çalışmalarını ise daha kısıtlı sayıda. Literatürde yer alan p21, p27 ve p57 ekspresyon çalışmalarının sonuçları arasında birbirleriyle çelişen sonuçlar dikkati çekmektedir. Bu duruma; çalışmalarda sıklıkla immünohistokimyasal yöntemlerin kullanılması, kullanılan antikörlerin özgüllükleri ve duyarlılıkları arasındaki farklılıklar, seçilen eşik değerlerinin farklılığı ve farklı sayılarda hasta örneğinin çalışmaya alınması gösterilebilir (8, 9, 17). Bu çalışmada, kolorektal kanserli hastalara ait normal ve tümör dokularındaki, p21, p27 ve p57 genlerinin ekspresyon düzeyleri, immünohistokimyasal yöntemlere göre daha özgül ve duyarlı yöntemler olan RT-PCR ve dansitometrik analiz yöntemleri ile belirlendi. Elde edilen verilerin, hastalara ait klinik ve patolojik verilerle birlikte değerlendirilmesi sonucunda ise bu genlerin kolorektal kanser moleküler patogenezindeki olası etkileri belirlenmeye çalışıldı.

p21 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışmalarımız sonucunda 10 (%52.6) hastaya ait tümör dokusunda, p21 ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiş oldu. Normal dokularda saptanan p21 ekspresyon düzeyi ortalaması 10.0784 (SD: 5.8645) iken, bu değer tümör dokularında 42.8153'e (SD: 2.3210) yükselmektedir. Tümör dokularında p21 ekspresyon düzeyinin artması, bu hücrelerin, genetik olarak stabil olmayan ve DNA hasarına karşı yanıt veren hücrelerin varlığını düşündürmektedir. Hem normal hem tümör dokusunda p21 ekspresyonu saptanmayan 6 (%31.5) hastada ise hücrede p21 uyarımından sorumlu olan p53 aktivitesinin veya DNA hasarına karşı oluşturulan cevabın azaldığı ve p21 aktivitesinin p27 ve/veya p57 tarafından karşılandığı düşünülmektedir. Kolorektal kanserli hastaların tümör dokularında saptanan p21 ekspresyon düzeyi artışı ile klinik ve patolojik özellikler arasında bir ilişki saptanmaması, p21 ekspresyon düzeyi artışının hastalara ait klinik ve patolojik özellikleri belirleyen bir kriter olmadığını düşündürmektedir.

p27 primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilere göre, toplam 14 (%73.6) hastaya ait tümör dokusunda, p27 ekspresyon düzeyinin, arttığı görüldü. Normal dokularda saptanan p27 ekspresyon düzeyi ortalaması 19.7647 (SD:8.3216) iken, bu değer tümör dokularında 65.7279'a (SD: 14.0674) yükselmektedir. Tümör dokularında saptadığımız p27 ekspresyon düzeyi artışının, bozulmuş hücre proliferasyonunun bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Hem normal hem tümör dokusunda p27 ekspresyonu saptanmayan 3 (%15.7) hastada ise p27 aktivitesinin p21 ve/veya p57 tarafından karşılandığı düşünülmektedir (38,41). Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, kolorektal kanserli hastalara ait tümörlü dokularda, normal dokularla karşılaştırıldığında p27 ekspresyon düzeyinin arttığı ve bu artışın, kolorektal kanserli hastaların diferansiyasyonlarının ve tümör gelişim bölgelerinin belirlenmesinde önemli bir moleküler markır olabileceği gösterildi.

p57 geni ekspresyon düzeylerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarımız sonucunda, kolorektal kanserli 12 (%63.1) hastanın tümör dokularındaki p57 ekspresyon düzeyinin arttığı saptandı. Normal dokularda saptanan p57 ekspresyon düzeyi ortalaması 23.1637 (SD: 10.2835) iken, bu değer tümör dokularında 77.2811'e (SD: 12.7317) yükselmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda, kolorektal kanserli hastaların tümör dokularında normal dokularla karşılaştırıldığında p57 ekspresyonunun arttığı ve bu artışın, hastaların ileri klinik ve patolojik evrelere sahip olduğunu gösteren bir markır olarak kullanılabileceği gösterildi. p57 ekspresyon düzeyleri ile kanser gelişimi arasındaki ilişkinin saptanmasına yönelik çalışmalar, literatürde kısıtlı sayıda yer almaktadır. Elde ettiğimiz bulguların bu konuda yapılan çalışmalara katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

Yapılan istatistiksel analizler ile tümörlü dokularda saptanan p21 ekspresyon düzeyi artışı ile p57 ekspresyon düzeyi artışı arasında saptanan istatistiksel korelasyonun varlığı, kolorektal tümörlerin gelişiminde, p21 ve p57'nin birlikte işlev gördüklerini düşündürülebilir.

Hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumlu, CDKI'lerinin farklı kanser tiplerindeki ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı bir çok araştırma yayınlanmaktadır. Çalışmamızda p21, p27 ve p57 CDKI'leri ekspresyon düzeyleri ile klinik ve patolojik özellikler arasındaki ilişki tanımlanmaya çalışılmıştır.. Kolorektal kanserlerde, moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak, bu genlere ait ekspresyon düzeylerinin ve birbirleriyle olan etkileşimlerinin ne olduğu henüz tam olarak aydınlatılmadığından elde ettiğimiz bulguların, kolorektal kanser patogenezinin anlaşılmasında faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Weitz J, Koch M, Debus J and et al. *Colorectal Cancer*, *Lancet* 2005; 365:153-65.
2. Robins SL, Kumar V, *Basic Pathology*. W.B. Saunders Company, West Washington Square, PA, USA, 1987. p:718-31
3. Rashid A, Houlihan PS, Booker S and et al. *Phenotypic and Molecular Characteristics of Hyperplastic Polyposis*. *Gastroenterology* 2000; 119:323-32.
4. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. *Pathology of Colorectal Cancer*. *Digest Liver Dis*, 2001; 33:372-86
5. Decker BC. *Published, Cancer Medicine*. Hamilton, Ontario, 2003. [www.bcdecker.com] Erişim: 1 Mayıs 2005
6. Cai K, Dynlacht BD. *Activity and Natur of p21WAF1 Complexes During the Cell Cycle*. *PNAS* 1998; 95: 12254-9.
7. Alberts A, Johnson A, Lewis J and et al. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York, USA, 2002. p: 983-1027.
8. Zieske JD. *Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors During Corneal Wound Repair*. *Progression in Retinal and Eye Research* 2000; 19: 257-70.
9. Tsihlias J, Kapusta L, Singerland J. *The Prognostic Significance of Altered Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Human Cancer*. *Annual Review of Medicine* 1999; 50:401-23.
10. Sherr CJ. *Cancer Cell Cycles*. *Science* 1996; 274: 19672-7
11. Lewin B. *Genes VI*. Oxford University Press, New York, USA, 1997. p:1089-129.
12. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. *p21-Negative Regulator of the Cell Cycle*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1996; 213(2): 138-49.
13. Nakanishi M, Kaneko Y, Matsushime H and et al. *Direct Interaction of p21 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 263: 35-40.
14. Nho RS, Sheaff RJ. *p27Kip1 Contributions to Cancer*. *Progression in Cell Cycle Research* 2003; 5: 249-59.
15. Deschènes C, Vézina A, Beaulieu JF and et al. *Role of p27Kip1 in Human Intestinal Cell Differentiation*. *Gastroenterology* 2001; 120: 423-38.
16. Bastians H, Townsley FM, Ruderman JV. *The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 Induces N-terminal Proteolytic Cleavage of Cyclin A*. *PNAS* 1998; 95: 5374-81.
17. Adams PD, Kaelin WG. *Negative Control Elements of the Cell Cycle in Human Tumors*. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10:791-7.
18. Genç S, Kızıldağ S, Genç K and et al. *Interferon Gamma and Lipopolysaccharide Upregulate TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Expression in Murine Microglia*. *Immunology Letters* 2003; 85: 271-4.
19. Tsunehiro I, Satomi Y, Katoh D and et al. *Induction of Cell Cycle Arrest and p21CIP1/WAF1 Expression in Human Lung Cancer Cells by Isoliquiritigenin*. *Cancer Letters* 2004; 207: 27-35.
20. Shin JY, Kim HS, Park J and et al. *Mechanism for Inactivation of the KIP Family Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Genes in Gastric Cancer Cells*. *Cancer Research* 2000; 60: 262-5.
21. Chen CL, Ip SM, Cheng D and et al. *p73 Gene Expression in Ovarian Cancer Tissues and Cell Lines*. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3910-5.