

Derleme

Kanserde Genetik Üstü (Epigenetik) Mekanizmalar

Epigenetic Mechanisms in Cancer

Mustafa AKKİPRİK, Ebubekir DİRİCAN, Gökçe GÜLLÜ AMURAN, Ayşe ÖZER

Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Kanser hücreleri yaşamlarını devam ettirebilmek ve saldırganlık özelliklerini geliştirebilmek için birçok farklı mekanizma kullanırlar. Bu mekanizmalar arasında genetik değişimler detaylı ve yoğun olarak çalışılmakta olsa da bu farklılıkların yanı sıra genetik üstü (epigenetik) mekanizmaların kanser gelişim sürecine katkıları göz ardı edilmemelidir. Bu yazının amacı kanser biyolojisinde ortaya konmuş genetik üstü mekanizmaların özetlenmesidir. Derlemede kanserde genetik üstü mekanizmalar tek tek ele alınacaktır. Genetik üstü mekanizmalar arasında gen ve protein düzeyinde alternatif kırılma, deoksiribonükleik asit (DNA) veya kromatin yapı modifikasyonları, ribonükleik asit (RNA) interferans, posttranslasyonel modifikasyonlar ve protein/protein etkileşimindeki anormallikler ön plana çıkmaktadır ve gen ifadesi bu mekanizmalar ile değişebilmektedir. Kansere sebep olan bu farklılıkların bilinmesi erken moleküler tanı testlerinin, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin ve moleküler prognostik markerların (belirteçlerin) geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Genetik üstü mekanizmalar kanser biyolojisinde önemli rol oynarlar.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Kanser, Alternatif splicing, Epigenetik, RNA interferans, Posttranslasyonel modifikasyon, Protein/protein etkileşimleri

ABSTRACT

Cancer cells use many different mechanisms to survive and improve their properties of aggression. Of these, genetic alterations are studied in detail and intensively but the contribution of different epigenetic mechanisms to cancer development should not be ignored. In this review, epigenetic mechanisms will be discussed individually. Among the mechanisms, alternative splicing at the level of protein and gene, modifications of deoxyribonucleic acid (DNA) or chromatin structure, ribonucleic acid (RNA) interference, posttranslational modifications and protein/protein interaction abnormalities come to the fore and gene expression could be changed by these mechanisms. Knowledge of these cancer-causing mechanisms enables the development of early molecular diagnostic tests, targeted therapies and prognostic markers. Epigenetic mechanisms play important roles in cancer biology.

KEYWORDS: Cancer, Alternative splicing, Epigenetic, RNA interference, Posttranslational modification, Protein/protein interaction

■ GİRİŞ

Hedefe yönelik tedavilerin geliştirilebilmesi için moleküler mekanizmaların kanser gelişim veya ilerlemesinde nasıl roller üstendiklerinin araştırılıp açığa çıkartılması gerekmektedir. İnsan ve birçok organizmanın genom yapısının ve genetik mekanizmaların aydınlatılması ile moleküler biyoloji ve genetik alanında süre gelen baş döndürücü gelişmeler kanser dahil birçok hastalığın moleküler temelini açıklanmasına

büyük ışık tutarak bu hastalıklarla mücadelede yeni boyutlar kazandırmış olacaktır. Bu derlemede gen ve protein düzeyinde alternatif kırılma (splicing), epigenetik, ribonükleik asit (RNA) interferans, posttranslasyonel modifikasyonlar ve protein/protein etkileşimleri kapsamında yenilenmiş bilgiler verilecektir. Güncel bilgiler ışığında bu yeni mekanizmaların anlaşılması kanser tanı ve tedavisi ile ilgili yeni gelişmelere katkı sağlayacaktır.



Yazışma adresi: Ayşe ÖZER

E-posta: aozer@marmara.edu.tr

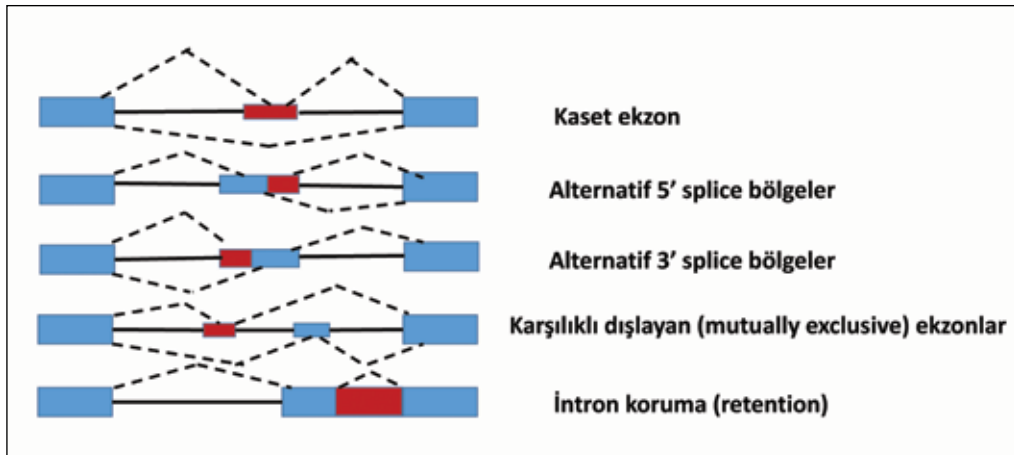
■ ALTERNATİF KIRPILMA (SPLICING)

Alternatif kırılma öncü-mRNA'dan intronların çıkarılması ve ekzonların yeniden düzenlenmesi ile olgun transkriptlerin çeşitli tiplerinin ortaya çıkmasını sağlayan bir süreçtir. Her ne kadar yıllar önce tanımlanmış olsa da alternatif kırılmanın ne kadar yaygın ve önemli olduğu yeni yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlayan genom boyu araştırmalar ile insan genlerinin %90'ından fazlasında alternatif kırılma olaylarının meydana geldiği ortaya konmuştur. Bu da bize alternatif kırılma mekanizmasının proteomik çeşitlilik ve dolayısıyla hücrel fonksiyon repertuarının belirlenmesindeki önemini ortaya koymaktadır. Pek çok splice izoformlar kanserle ilişkili olarak tanımlanmıştır. Ayrıca çeşitli splice faktörlerinin onkogen veya tümör baskılayıcı aktivitelere sahip oldukları bulunmuştur. Günümüzde gerek kanser patogenezinin anlaşılmasında ve gerekse de yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinde alternatif kırılma mekanizmaları ve bu mekanizmalardaki değişikliklerin veya yeniden düzenlenmelerin anlaşılması hücre biyolojisinin yeni bir uygulama alanı olarak karşımıza çıkmaktadır (26).

Alternatif kırılmanın regülasyonu normal doku farklılaşması sırasında sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Alternatif kırılmanın hatalı regülasyonu ise atipik protein izoformlarının oluşmasına neden olabilir ve bunlar kanser gibi hastalıkların ortaya çıkmasına katkı sağlayabilir. Genom boyu çalışmalar pek çok kanser tipinde 15.000'den fazla tümör ilişkili splice varyantını ortaya koymuştur. Biyoinformatik analizler bu varyantların proliferasyon, farklılaşma, hücre döngüsü kontrolü, metabolizma, apoptoz, motilite, invazyon ve angiogenezde rol aldıklarını göstermiştir.

Düzensiz alternatif kırılma olayları sıklıkla kırılma regülasyonundaki anormallikleri yansıtır. Öncü-mRNA kırılması genellikle primer transkriptlerin üzerindeki *cis*-acting kırılma dizileri ve bu RNA dizilerine bağlanan *trans*-acting kırılma faktörleri tarafından düzenlenirler. Regülatör splicing faktörlerin aktivitesi ve protein düzeylerindeki değişimler, *cis*-acting splicing dizilerde mutasyonlar ve splicing düzenineğinin koruyucularında mutasyonlar kanserde düzensiz alternatif kırılma ile sonuçlanabilir ve pek çok kanser fenotipine katkı sağlayabilir (6).

Normal dokularda gözlenen 5 temel alternatif kırılma paterni kanserde de gözlenmektedir (33). Dolayısıyla, kanser hücreleri ve farklılaşmış hücreler temel olarak benzer alternatif kırılma mekanizmalarını kullanmaktadır. Bunlar "kaset" ekzonlar, alternatif 5' splice bölgeler, alternatif 3' splice bölgeler, intron koruma (retention) ve karşılıklı dışlayan (mutually exclusive) ekzonlar (Şekil 1). Örnek vermek gerekirse, *kaset ekzon (bir ekzonun atlanması)*; RON geni makrofaj stimüle edici protein (MSP) için bir tirozin kinaz reseptörüdür. Normal şartlar altında RON MSP'ye bağlanarak hücre mobilitesi ve invazyonunda görev alır. Ekzon 11'i eksik bir splice izoformu olan Δ RON, pek çok kanser türünde aşırı eksprese edilmektedir. Ekzon 11'in atlanması bir ekstrasellüler domain'in delesyonu ile sonuçlanır ve bu proteinin proteolitik olgunlaşmasını etkiler. Truncated Δ RUN ligandı olmasa da sürekli aktivite gösterir ve kanser invazivliğini artırır. *Kaset ekzon (çoklu ekzon atlanması)*; BRAF protoonkogeni üzerinde ekzon 4-8'in atlanması ile oluşan izoform, proteinin N-terminal RAS-bağlama domain'inde çerçeve kaymasına neden olur. Dolayısıyla bu izoformu taşıyan hastalar, BRAF geni üzerinde sık görülen V600E mutasyonunu hedefleyen tedaviye direnç gösterirler. *Alternatif 5' splice bölgeler*; BCL-X genini kodlayan öncü-mRNA üzerinde 2 splice bölgesi izoformu bulunmaktadır. Bunlar BCL-X_L ve BCL-X_S olarak bilinmektedir. Bu izoformlar ekzon 2 üzerinde bulunan 2 rakip 5' splice bölgelerinin alternatif olarak kullanılması ile oluşurlar. Uzun izoform olan BCL-X_L anti-apoptotik etki gösterir ve pek çok kanser tipinde aşırı eksprese edilir. Diğer yandan, kısa izoform olan BCL-X_S ise pro-apoptotiktir ve kanserde ekspresyonu baskılanmıştır. *Alternatif 3' splice bölgeler*; VEGF genini kodlayan öncü-mRNA 8.ekzon üzerinde 2 rakip 3' splice bölge içerir. Bu 3' splice bölgelerin alternatif kullanımı VEGF izoformlarının 2 ailesini oluşturur. Proksimal 3' splice bölgesinin seçilimi VEGFxxx izoformlarının oluşmasına sebep olur. Burada simgelenen xxx bu protein üzerindeki amino asitlerin numarasını göstermektedir. Distal 3' splice bölgesi kullanıldığında ise diğer bir izoform ailesi olan VEGFxxx_b üretilir. Bu 2 izoform aile tamamen birbirine zıt fonksiyon gösterir. VEGFxxx izoformlar pro-angiogeniktir ve çoğu tümörde aşırı eksprese edilir. Buna karşın VEGFxxx izoformları ise anti-angiogeniktir ve tümörlerde baskılanmıştır. Örneğin, VEGF165b reseptörü olan nörofilin 1'e bağlanamaz, dolayısıyla sinyal, yolağını aktiveleştiremez. Intron koruma



Şekil 1: Farklı alternatif splicing modelleri.

(retention); bir transkripsiyon faktörü olan STAT2 üzerinde alternatif olarak kodlanan intron 19 bir dur kodonu oluşmasına neden olur. Oluşan bu dur kodonu STAT dimerizasyonu için gerekli olan Src domain öncesinde olduğu için bu proteinin fonksiyonunu önemli ölçüde etkilemektedir. *Karşılıklı dışlayan (mutually exclusive) ekzonlar*; tümör metabolizmasında önemli bir yere sahip olan pürivat kinaz M (PKM) geni ekzon 9 (E9) ve ekzon 10'u (E10) karşılıklı dışlayan bir alternatif splicing mekanizması gösterir. Erişkin dönemde PKM1 (ekzon 9 bulunur, ekzon 10 bulunmaz), embriyonik dönemde ise PKM2 (ekzon 9 bulunmaz ekzon 10 bulunur) olarak bilinen 2 izoformu bulunmaktadır. PKM2 sıklıkla tümörde eksprese olurken, PKM1 ise farklılaşmış dokularda, örneğin kas ve beyinde eksprese edilir. Tümörde bulunan PKM2 ile PKM1'in yer değiştirilmesinde tümör hücrelerinde laktat üretiminin azaldığı ve oksidatif fosforilasyonun ise arttığı gözlenmiştir. Tüm bu mekanizmaların yanı sıra MDM2 geninde görüldüğü gibi kompleks kırılma paternleri de karşımıza çıkabilmektedir.

■ POSTTRANSLASYONEL MODİFİKASYONLAR

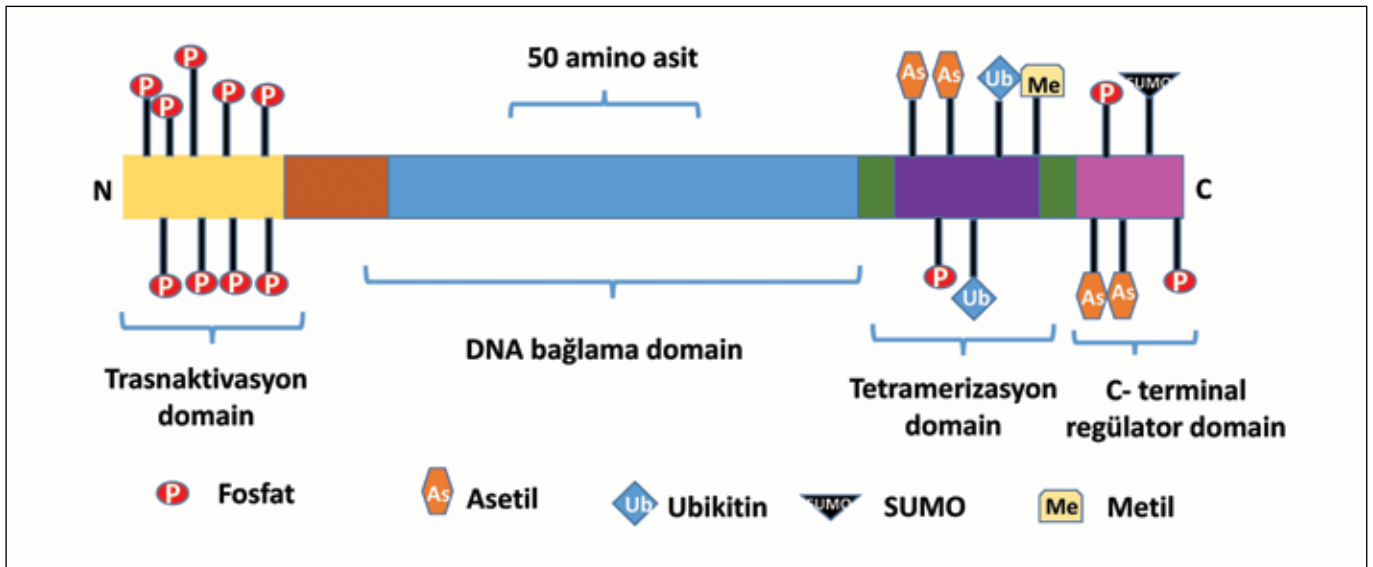
Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları ökaryotik hücrede, hücre büyümesi, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, apoptoz, homeostazis ve gelişim sürecinde önemli roller almaktadır (25). Posttranslasyonel değişiklikler, bir proteinin translasyonundan sonra geçirdiği kimyasal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (32). Bildiğimiz gibi hücreden salınacak proteinlerin çoğu ilk önce büyük öncü moleküller şeklinde olup, fonksiyonel olarak inaktiftirler. Bu yüzden, protein zincirinin parçaları endoproteazlarca ayrımı yapılır ve aktif molekül açığa çıkması sağlanır. Bu işlemlerin endoplazmik retikulum (ER), golgi veya sekretuar veziküller içinde gerçekleşebildiğini bilmekteyiz. Günümüze kadar açıklanmış ve tanımlanmış olan birçok posttranslasyonel değişiklikler olmasına karşın sıklıkla görülenler arasında asetilasyon, proteolitik parçalanma, prenilasyon, fosforilasyon, açilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon,

lipidasyon ve glikolizasyon yer almaktadır (Şekil 2) (2). Bir protein bu modifikasyonların birini veya birden fazlasını geçirebilmektedir. Bu değişikliklerin sayısının 100'den fazla bile olma potansiyeli olabileceği vurgulanmıştır. Bazı posttranslasyonel değişiklikler geriye çevrilebilir (reversible) özellik (fosforilasyon gibi), bazıları ise geri çevrilemez (irreversible) özellik (proteoliz gibi) taşımaktadır. Tablo 1'de yaygın olarak görülen posttranslasyonel değişimler özellikleri ile özetlenmiştir. Bunların birçoğu spesifik enzimatik yolları veya sinyal yollarını hedeflemektedir, ama bazıları enzimatik aktivite özelliği taşımamaktadır. Bunlar dışında proteinlerin hedef yerlere doğru konformasyonda taşınması ve yapının stabilitesinin korunmasında da önemlidir. Yani proteinlerin sentezden sonra rastgele katlanmasına engel olan, istenilen yapıyı almalarını sağlayacak yardımcıları ihtiyaç duyulmaktadır. Bu işlevleri yapan ve protein yapısının katlanmasında rol alan elemanlar şaperonlar (Heat Shock Protein (HSP)-Isı Şok protein) olarak bilinen proteinlerdir. Şaperonlar çok geniş bir protein ailesi olup, bakterilerden insana kadar tüm organizmalarda bulunabilme özelliğinde sahiptirler. Bu elemanlar bir kalıp görevi görerek sentez sırasında veya sentezden hemen sonra proteinlerin doğru şekilde katlanmalarını, işlevsel üç boyutlu yapılarını almalarını sağlar.

Posttranslasyonel modifikasyonlardaki düzensizlik veya bozukluk kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve sağlıksız gibi işitsel hastalıklara kadar birçok patolojik olgunun ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (12). Son zamanlarda, bu posttranslasyonel modifikasyonlar hedeflenerek yeni tedavi şekilleri ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır. Ayrıca mevcut tedavilerde yönlendirici rolleri olduğu da vurgulanmaktadır.

■ PROTEİN KATLANMASI

Proteinler salgı yolağında ER lümenine transloke olduğu zaman katlanmamış yapıdadır. Daha sonra genellikle N-uca glikanlar bağlanır ve doğru şekilde katlanma sağlanır ve disülfid bağlarla stabilize olur. Bu süreçte ER şaperonları ve katlan-



Şekil 2: Çoklu protein modifikasyon bölgeleri.

madan sorumlu enzimler görev alırlar. ER’unda katlanmamış proteinler biriktikçe katlanmamış protein yanıtı tetiklenir. Bu yanıt ER şaperonları ve katlanmadan sorumlu enzimler tarafından koordineli bir şekilde oluşturulur. Son zamanlarda, bu katlanma sürecinin önemli olduğu ve buradaki anormalliklerin başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın gelişmesine yol açtığı rapor edilmiştir.

■ ER ŞAPERONLARI ve PROTEOSTAZIS DENGESİZLİĞİ

Protein homeostazisi (proteostazisi), protein sentezi, katlanma ve oligomerizasyon gibi birkaç dinamik prosesle desteklenmektedir. Proteozis dengesizliği birçok nörodejeneratif hastalıkta anahtar bir olay olduğunu bilmekteyiz. Bunlar yanlış protein katlanmasıyla ilişkili hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Yanlış katlanmış proteinlerle ilişkili hastalıklar tau ve beta-amiloid Alzheimer hastalığında; α -synuclein Parkinson hastalığında; RNA bağlayan proteinler ve protein-like domain FTD ve ALS hastalıklarında; polyglutamin içeren proteinler Huntington ve spinal-serebralları ataksida; prion proteinler Creutzfeldt-Jakob hastalığında karşımıza çıkmaktadır (21).

ER’da proteozisin korunması bir yüksek kompleks süreç olup, şaperonların ve katlanmadan sorumlu proteinlerin koordineli olarak görev yapmalarına bağlıdır. Özellikle katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler “ER stresi” oluştururlar. Katlanmamış protein yanıtı ER şaperonlarının ve katlanmadan sorumlu proteinlerin up-regülasyonunu artırır. Bunu yaparlarken de immünoglobulin protein (BiP)(Grp78), Grp94, kalretikülin (CRT), kalneksin (CNX) ve protein disulfide isomerase (PDI) ailesi üyelerine bağlanarak gerçekleştirirler (29). Katlanmamış proteinlerin ortadan kaldırılması ER’da bulunan ERAD sistemiyle gerçekleşir. ERAD, ER’la ilişki degradasyon sistemi olarak tanımlanmıştır. ERAD aktive olunca ER’da degradasyonu ileten alfa-mannosidaz benzeri-1 (EDEMI) ile HERP proteinini indükler. Böylece katlanmamış protein yanıtının oluşumu sağlanmış olur (15). Normal şartlarda protein sentezlendikten sonra katlanması gereklidir ve bu bir biyolojik süreçtir. Membran veya salgı proteinleri ER’a bağlanır ve şaperonlar ile katlanır. ER stres şartlarında ise şaperonlar katlanmamış polipeptit zincirlerin agregasyonundan kaçabilirler (20). Son zamanlarda farklı nörodejenerasyon fare modellerinde, şaperon proteinlerin nöro-koruyucu özelliklere sahip oldukları ortaya konmuştur.

Tablo I: Yaygın Görülen Posttranslasyonel Değişiklikler ve Özellikleri

Modifikasyon	Özellikleri
Asetilasyon	Polipeptitlerin N-amino terminal uçlarına asetil grubu eklenmesi ökaryotlarda sıklıkla görülen bir modifikasyon türüdür. Asetilasyonun biyolojik rolleri hakkında bilinenler az olmasına karşın, asetilasyonun aktin filamentinin formasyonunda önemli rolü olduğu bilinmektedir (31).
Açılasyon	Açılasyon bazı polipeptitlerin biyolojik membranla etkileşimine yardım eder.
ADP-ribolizasyon	Bu modifikasyon ADP-ribozil transferaz enzimiyle enzimatik olarak indüklenir ve hücre sinyal iletiminde ve kontrolünde rolleri olduğu gösterilmiştir (31).
Amidasyon	C-terminal uçlarına amide grubu eklenmesiyle gerçekleşen ve birçok bioaktif peptitlerin/kısa polipeptitlerde görülen bir özelliktir. Ayrıca bu modifikasyon bu polipeptitlerin biyolojik aktivitesinde veya stabilitesinde rol alırlar (31).
Glikolizasyon	Proteinlere karbonhidrat grubu bağlanmış olması durumudur. Bazı proteinlerde glikolizasyon bunların çözünürlüklerini artırır ve biyolojik yarılanma ömrünü/biyolojik aktivitesini artırabilir (30).
Fosforilasyon	Polipeptide bir veya daha fazla fosfat grubu eklenmesi modifikasyonudur. Fosforilasyon sıklıkla çeşitli polipeptit hormonların biyolojik aktivitelerinde rol aldıkları rapor edilmiştir (31).
Prenilasyon	Bazı polipeptitlerde C-uçlarındaki sistein amino asitlerine farnesil, dolikol ve geranil gibi prenil molekülleri eklenmiştir. Bu modifikasyonun bazı polipeptitlerin membrana bağlanmasını kolaylaştırdığı belirlenmiştir (31).
Metilasyon	Lizin, arjinin ve lösin amino asitlerinin metillendiği belirlenmiştir. Metilasyonun genlerin transkripsiyonel aktivitelerini etkilediği bilinmektedir (31).
Ubikitinasyon	Ubikitin adlı proteinin kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleşen ve proteinlerin proteozomlar tarafından parçalanması için sinyal oluşturur (31).
GPI çapaları eklenmesi	Proteinlerin C-uçlarına amid bağıyla GPI grubunun eklenmesi durumudur. Bunlar proteinlerin hücre yüzeyine tutunmasında önemli rol alır (31).
Sumülasyon	Bir isopeptide SUMO grubun kovalent olarak bağlanması durumudur. Sumülasyon strese yanıtta, transkripsiyonel regülasyonda ve hücre döngüsünde roller alır (31).
Proteoliz	Proteinlerde amino asitlere bağlanıp, peptidaz ve proteozomlar peptid bağlarını kırar. Proteoliz hücre-hücre iletişimde ve transkripsiyonel regülasyonda roller alır (31).

Nörodejeneratif hastalıklarda ER şaperonlarından BiP, Grp94, CRT, CNX ve protein disülfizomeraz (PDI) ailesinin üyeleri up-regüle olduklarında erken safha katlanmamış protein yanıtın aktivasyonunu sebep olurlar (28). Bununla birlikte, bu ER şaperonları Ca^{+2} homeostasi (16) ve ERAD sisteminde de görev yaparlar (Şekil 3) (24). PDI ailesi üyeleri, ER stres şartlarında protein konformasyonu ve protein degradasyon özelliğinin korunmasında önemli rol alır. Bu ailenin üyeleri disülfid kırılmaları, oksidasyon ve izomerizasyon ile salgı yolağında doğal protein katlanmasında anahtar rol oynar (10). PDI'lar *cis* ve *trans* konformasyonlar arasındaki dönüşümlerde de rol alırlar. PDI ailesi üyeleri de nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olmasına rağmen, patolojik şartlarda özel rolleri tam olarak açıklanamamıştır.

■ PROTEİN KESİMİ

Bütün canlılarda sentezlenen proteinler işlevleri tamamlandığında yıkım yolağına sevk edilmektedir. Bu yıkımın birkaç nedeni olduğu vurgulanmıştır. İlki normal şartlar altında, bazı önemli metabolik denetim yerlerinde görev yapan enzimlerin yıkılması ve aktivitelerinin düzenlenerek hücrenin değişen çevre şartlarına ve metabolik ihtiyaçlarına verimli bir şekilde yanıt vermesini sağlamak; ayrıca proteinlerin besin eksikliği durumunda enerji ve amino asit kaynağı olarak değerlendirilmesinin sağlanması ve son olarak hasarlı veya işlevi olmayan proteinlerin uzaklaştırılması en önemli sebepler arasında gösterilmektedir (8). Prokaryotik canlılarda proteinlerin sentezi ve translasyonu sitoplazmada gerçekleştiği için yapım ve yıkım

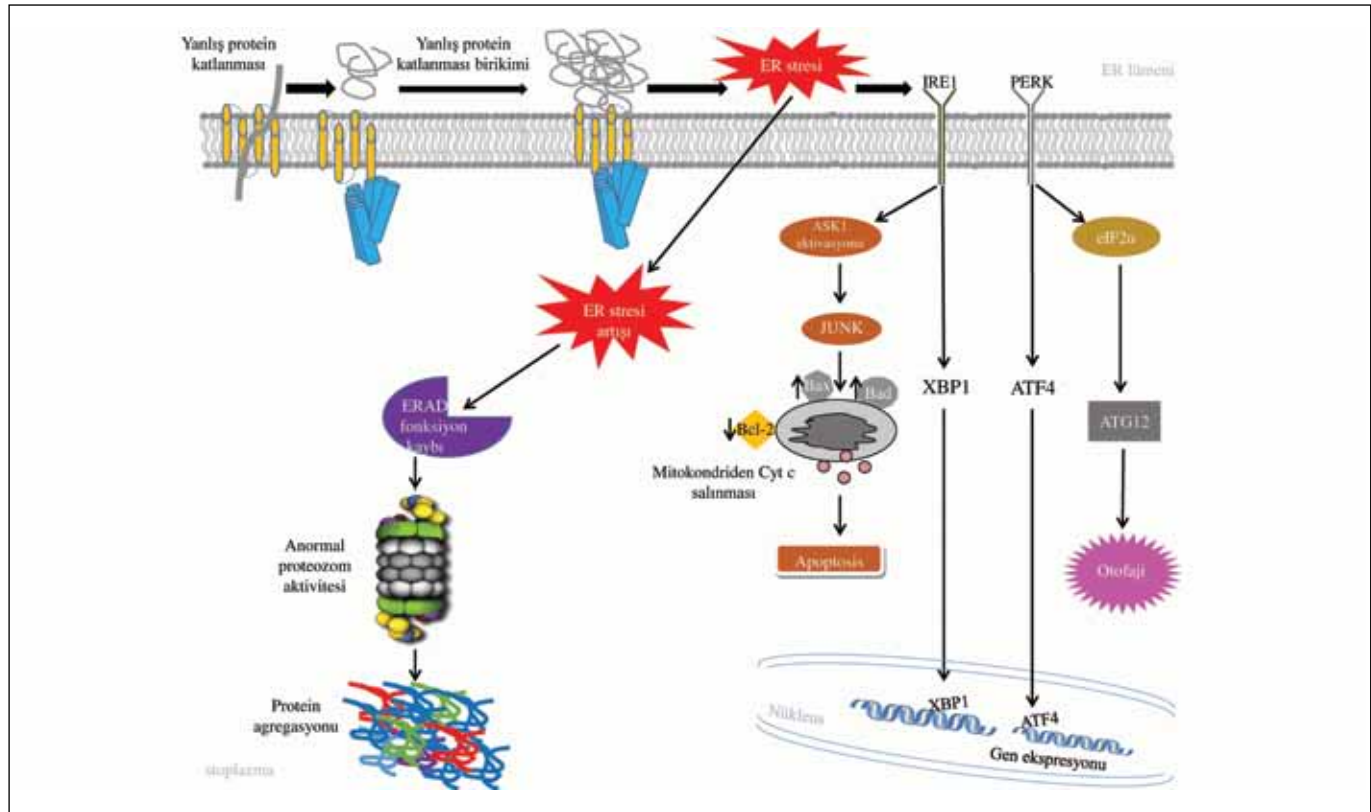
tepkimleri çok hızlı gerçekleşmektedir. Ama ökaryotik canlılarda protein yıkımı biraz farklı gerçekleşir. Çünkü transkripsiyon ve translasyon farklı yerlerde gerçekleşir. Protein yıkımı, hücre içinde veya dışında rol oynayan proteazlarca gerçekleşir. Hasarlı veya hatalı proteinlerin uzaklaştırılması gerekir. Bu süreç çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Proteinlerin yıkımı iki yolda gerçekleşir. Bunlar; lizozomal ve ubiquitin aracılıklı yıkım yolları olarak tanımlanmıştır.

■ UBİKİTİN ARACILIKLI YIKIM YOLAĞI

Nükleer ve sitozolik proteinlerin yıkımı için kullanılan bir yıkım yolağıdır. Ubikitin yıkım yolu hücre içindeki hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa-ömürlü proteinlerin yıkımında önemli rol oynar. Bu yıkımda proteinler lizinlerin amino gruplarına ubiquitin takılmasıyla yıkım için hedeflenir. Sonra çoklu ubiquitin zincirleri oluşur ve eklenirler. Bu oluşan çoklu ubiquitinler bir proteozom kompleksi (proteaz) oluştururlar. Her yıkım işleminin ardından ubiquitinler salınır ve başka bir yıkım da kullanılmak üzere serbest bırakılır. Aslında ubiquitinler endositoz için zemin oluşturmuş olurlar (8).

■ LİZOZOMAL YIKIM YOLAĞI

Lizozomlar hidrolitik enzimleri (glikozidazlar, proteazlar, lipazlar, nükleazlar ve fosfolipazlar) barındırır ve zarla çevrili bir organeldir. Lizozomlar hücre içinde litik aktiviteden sorumludur ve rol oynayan enzimlerin aktivitesi için asidik ortama gereksinim duyarlar. Ökaryotik canlılarda majör proteinlerin yıkılması



Şekil 3: ER stres ve yanlış protein katlanması.

için kullanılan protein yıkım yolağında çok önemli rol oynar. Bu yüzden bu yıkım yolağının aktivasyonu için proteinlerin lizozomlar tarafından alınması gereklidir. Bu lizozomlara proteinlerin alım şekli "otofaji" olarak tanımlanmıştır ve veziküllerin oluşumuyla karakterizedir. Otofajik yolağın açık sırasında veya yabancı madde ve mikropların uzaklaştırılması veyahut ölmüş hücrelerin ortadan kaldırılması için işlev gördüğünü bilmekteyiz. Ubikitin yıkım yolağıyla lizozomal yıkım yolağı karşılaştırıldığında, lizozomal yolağın oldukça seçici olduğu belirtilmiştir.

■ GLİKOZİLENME

Proteinlere karbonhidrat yan grupları eklenmesiyle glikoproteinler oluşur. Özellikle ökaryotlarda nükleer ve sitoplazmik birçok proteinde görülen bir olay olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte glikozillenmiş proteinlerin çoğunlukla hücre yüzeyinde sergilendikleri ve çeşitli rolleri olduğu gösterilmiştir. Glikozillenmenin ER'da protein katlanması, proteinlerin hücrenel hedeflenmesinde ve hücre-hücre etkileşimlerinde rol aldığı belirlenmiştir. Bu glikozillenme olayında, yan grubun takılma yerine göre N-bağlı veya O-bağlı olarak ifade edilmektedirler (N-asetilglikozamin).

■ LİPIDLERİN TAKILMASI

Bazen de proteinlere lipidler gibi yan gruplar takılabilmektedir. Bu lipid yan gruplar ise proteinlerin plazma zarına yönelmesini ve lokalize olmasını sağlar. Bu lipid yan gruplar arasında en sıklıkla karşımıza çıkanlar palmitoillenme, prenillenme ve N-miristillenme yer almaktadır. Yani bu yan gruplar proteinin plazma zarının hücre dışına bakan yüzeyine lokalize olmasına yardımcı olurlar.

Sonuç olarak; PTM'lar enzimatik aktivitelerin sinyalizasyonunda hücre biyolojisinde önemli roller oynamaktadırlar. PTM'ların hücre büyümesi, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok olaya katıldıkları bilinmektedir. PTM'lar asetilasyon, metilasyon, glikolizasyon, ubikitinasyon ve sumülasyon olarak bilinmektedir ve birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu hastalıklar arasında en başta nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson ve Huntington) olmak üzere, kanser ve immün sistemle ilişkili hastalıklar önemli olanların başında gelmektedir. PTM'ların fonksiyonları ve etki şekillerinin belirlenmesi hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkmasına yol açacaktır. Bu yüzden PTM'ların hücre gelişimindeki rollerinin tanımlanması için ek çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

■ EPİGENETİK

Epigenetik genel anlamda, deoksiribonükleik asit (DNA) dizisini değiştirmeksizin etkileyen düzenekleri ifade eder. DNA dizisiyle etkileşmeden, gen ifadesini değiştiren bu düzenekler farklılaşmış hücrelerin dokuya özgül davranışını belirlemede temel gerekliliktir. İnsanda ve diğer türlerde epigenetik olaylar, özellikle embriyonik gelişim döneminden başlayarak, yaşam boyu genetik, fizyolojik ve çevresel etkileri bütünleştirilmesini sağlar. Genetik olaylar tek başına karsinogenezi açıklamaya yeterli olmamaktadır. Kanserde DNA'da meydana gelen mutasyonlardan çok daha fazla epigenetik değişimlerin meydana geldiği düşünülmektedir. Epigenetik modifikasyonlar

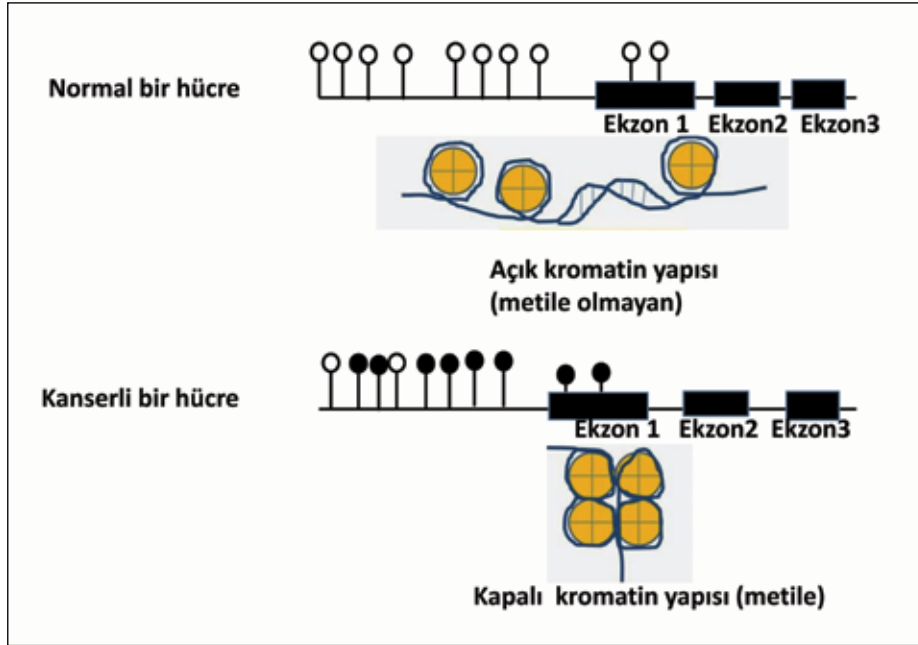
bir genin ifade edilmesini belirlemektedir. Kanserde iki önemli epigenetik modifikasyon vardır. Bunlar histon modifikasyonları ve DNA metilasyonudur (30,31).

Epigenetik değişikliklerin en sık inceleneni DNA metillenmesidir. Omurgalılarda DNA metillenmesi neredeyse yalnızca sitozin-guanin (CpG) ikili nükleotidlerinde görülür. Genomdaki CpG'lerin çoğunluğu metillenmiş durumdadır. DNA metillenmesinin hücre farklılaşmasıyla ve genlerin işleviyle ilişkili olabileceği yaklaşık 30 yıl öncesinde ileri sürülmüştür (27). Son yıllarda çok hızlı bir şekilde hem DNA metillenmesini incelemeye yönelik teknolojiler hem de elde edilen veriler artış göstermiştir. Sitozin metillenmesi hücre bölünmesiyle birlikte yavru hücrelere kalıtılır. DNA'nın yarı-korunmalı tipte eşlenmesinin ardından, yarı metillenmiş ikili sarmalın yeni üyesi DNA metillenmesinden sorumlu enzimlerden bir tanesi tarafından, ata hücredeki ikili sarmal örüntüsüne uygun olarak işaretlenir.

İnsan gen promotorlarının yaklaşık %60'ında CpG adacıkları bulunmaktadır. Yakın geçmişteki çalışmalarda tüm CpG adacıklarının tamamen promotorlarda değil, yaklaşık yarısının gen içi ya da genler arası dizilerde birikim gösterdiği ortaya konmuştur (17); genler arası dizilerdekilerin de kodlamayan RNA'ların transkripsiyon bölgeleriyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Çoğu adacığın her zaman metillenmemiş olduğu düşünülse de, bunlardan bir kısmının (kansere gibi) patolojik süreçlerde, bir kısmının ise embriyonik gelişim döneminde metillenmeye uğradığı bilinmektedir (Şekil 4). Farklılaşmış dokularda da bazı promotorların metillenmiş halde buldukları bilinmektedir. Son dönemde artan metilom çalışmaları bu bulguyu desteklemektedir. Adacıklar dışında kalan CpG'lerin yaklaşık %80'inin metillenmiş halde oldukları düşünülmektedir (19).

Epigenetikle ilişkili çalışmalarda bir dönem kromatin yapısının gen işlevi üzerine etkisine dikkat çekilmemiştir. Metillenmenin kromatin yapısını transkripsiyonda görevli protein düzeneginin erişemeyeceği hale getirmeye görevli olduğu daha sonra gösterilmiştir. Metillenmiş DNA'ya bağlanan farklı proteinler tanımlanmıştır. Bu proteinler yapısal benzerliklerine göre sınıflandırılmıştır. Metillenmiş DNA bağlayan bölgeye sahip (MBD) proteinler olan MBD1, 2, 3, 4 ve MECP2 (Metil CpG bağlayan protein 2) MBD1, 2 ve 3 histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin kromatinle etkileşmesini sağlayarak, kromatin yapısının asetilden arındırılmasını, bu şekilde etkileşime daha kapalı heterokromatin yapının oluşmasına katkı yapar. Bu grup içinde yer alan MECP2 proteini metillenmiş DNA'ya bağlandıktan sonra, transkripsiyon baskılayıcı bölgesi aracılığıyla, HDAC1 ve 2 enzimlerini içeren Sin3 bileşkesinin kromatinle etkileşmesini sağlar. MECP2'nin kromatin yapısını yoğunlaştırmada kullandığı başka bir yöntem, nükleozom ve iki nükleozom arasında kalan bağlayıcı DNA ile etkileşerek, transkripsiyon düzeneginin DNA'ya bağlanmasını engellemektir (3).

Farklı tür kanserlerde erken dönemde epigenetik ve genetik değişikliklerin saptanmasına yönelik girişimler tanının yanı sıra, hastalığın yaygınlığı ve prognoz açısından da önemli kabul edilmektedir (7). Çeşitli epigenetik belirteçler bazı kanserlerde de hastalık sürecine ilişkin tanımlayıcı işaretler olarak görülmektedir. Kanserde erken tanının önemi sayısız çalışma ve klinik olgu tanımlamasıyla ortaya konmuş bulunmaktadır. Epigenetik



Şekil 4: Metile ve metile olmayan bir hücrenin kromatin durumu.

değişiklikler kanserde genellikle genetik değişikliklerden önce ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle kanserin erken tanı almasında daha önemli rol oynayabileceği düşünülebilir. Bu değişikliklerin girişimselliği düşük ya da hiç olmayan yöntemlerle ulaşılabilir vücut sıvılarına dökülen hücrelerden elde edilen DNA üzerinde saptanabilir olması diğer bir olumlu noktadır. Epigenetik değişiklikler, genetik değişiklikler gibi, hücre döngüsünün denetim dışına çıkmasına neden olabilmektedir. DNA onarım, kontrol noktası, tümör baskılayıcı ya da onkogen gibi, hücre çoğalmasına doğrudan etkiyen genlerin ifade edilmesinin baskılanması/tetiklenmesi DNA dizi değişikliklerine benzer etkiyle sonuçlanabilmektedir. Kanserle (ve diğer hastalıklarla) ilişkili olarak incelenen epigenetik değişikliklerin en yaygını sitozin-guanin (CpG) ikili nükleotidlerinde sitozin üzerinde görülen metillenmedir. DNA metillenmesi genel olarak gen ifadesinin baskılanmasıyla ilişkilidir ve aynı yönde etki edecek histon değişikliklerini de tetiklediği gösterilmiştir. DNA ve histon değişikliklerinin yanı sıra, kodlamayan mikro- ve uzun RNA'ların da gen ifadesi üzerindeki düzenleyici/denetleyici etkisi farklı kanser türlerinde ortaya konmuştur.

RNA İnterferans (RNAi)

RNAi yolağı microRNA (miRNA) ve small interfering RNA (siRNA)'ların aracılık ettiği bir RNA inhibisyon yolağıdır (11). Hedef mRNA'nın translasyonel baskılanması ya da yıkımına sebep olarak gen ekspresyonunu değiştirir.

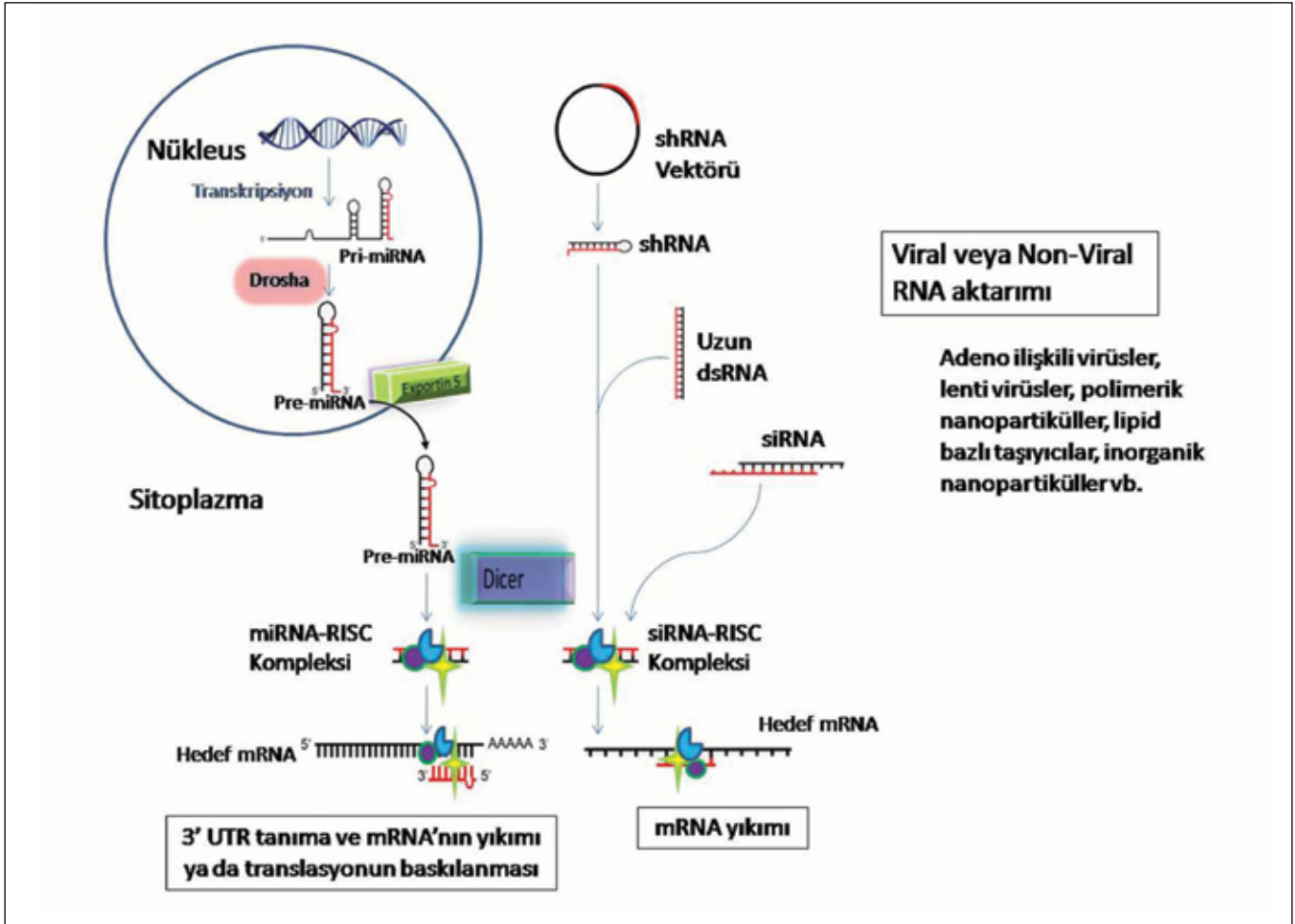
siRNA aracılı yolda sitoplazmaya salınan çift iplikli RNA molekülü (dsRNA) Dicer enzimi ile kesilir ve çift iplikli siRNA oluşur. siRNA'nın baz eşleşmesi ile RNAi mekanizmasını yönlendirecek olan rehber dizisi RNA aracılı susturma kompleksinin (into RNA-induced silencing complex, RISC), yapısına katılır. RISC kompleksi hedef mRNA'ya bağlanarak argonaute 2 (Ago-2) enzimi ile yıkılmasını sağlar (1).

miRNA aracılı yolda ise nükleusta miRNA genlerinden transkripsiyonu yapılmış pri-miRNA'lar RNase III Drosha ile kesilir premiRNA'lar oluşur. Sitoplazmaya taşınan premiRNA'lar Dicer ile kesilerek olgun miRNA'lar meydana getirilir. Olgun miRNA'lar RISC yapısına katılarak hedef mRNA'nın yıkımına ya da translasyonunun baskılanmasına sebep olur (22).

Viral ya da viral olmayan taşıyıcılar ile hücrelere miRNA ya da siRNA aktararak doğal RNAi mekanizması yapay olarak taklit edilebilir ve çeşitli hastalıkların tedavisinde, ilaç duyarlılıklarının artırılmasında, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde bu yöntemden faydalanılabilir. Şekil 5'te miRNA ve siRNA aracılı RNA interferans mekanizması özetlenmiştir. RNAi yolağı gen ekspresyonuna müdahale etme imkanı tanıdığından oldukça kıymetli olmakla birlikte hedeflenen genden farklı genler üzerine etki etmesi, *in-vivo* etkisinin kısa süreli olması, hücresel miRNA'lar ile yarışmacı olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Glioblastoma tedavisinde glioblastoma hücrelerinin temozolomide duyarlı hale getirilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. MGMT, EGFR, PTEN, Galectin-1 gibi genler hedeflenerek *in-vivo* modellerde ilaç etkisi ile tümörün küçüldüğü, hücrelerin ilaca duyarlı hale geldiği gözlenmiştir (23).

Kan beyin bariyeri beyine ekzojen siRNA aktarılmasını zorlaştırmaktadır. Beyin ile ilişkili hastalıkların tedavisinde bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla TARBP-BTP adlı bir füzyon protein oluşturulmuştur. Bu protein spesifik gangliozitleri hedefleyen bir peptid ile çift iplikli RNA bağlayan proteinin füzyonundan oluşur. Fare deneylerinde bu protein ile siRNA aktarımı sonucu Alzheimer model farelerin ve yabani tip farelerin beyinlerinde çeşitli genlerin ekspresyonlarının baskılanabileceği gösterilmiştir (13).



Şekil 5: miRNA genlerinden çekirdekte transkripsiyonu yapılan miRNA'lar Drosha enzimi ile kesilip Pre-miRNA'lara dönüştürülür. Pre-miRNA'lar Exportinler aracılığıyla sitoplazmaya taşınır, RISC kompleksi ile birleşir ve olgun miRNA'lar oluşturulur. Olgun miRNA'lar hedef genin 3' UTR bölgesini tanıyarak mRNA'nın yıkılmasını ya da translasyonunun baskılanmasını yönlendirir. Viral ya da non-viral yollarla sitoplazmaya RNA aktarılması sonucu çift iplikli dsRNA Dicer ile kesilir, siRNA ya da dsRNA RISC kompleksinin yapısına katılır. Olgun siRNA mRNA'yı tanıyarak yıkımına aracılık eder. Hücreye RNA aktarılması amacıyla virüsler, lipid yapıda taşıyıcılar, inorganik nanopartiküller kullanılabilir. siRNA, dsRNA hücrede ekspres edilmediğinden, yapay olarak hücreye dahil edildiğinden tedavi ya da herhangi bir gen ifadesinin değiştirilmesine yönelik bu yöntemin kullanılması durumunda etki geçici olacaktır.

■ PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİ

Protein-protein etkileşimleri biyokimyasal ya da elektrostatik kuvvetler ile iki veya daha fazla sayıda proteinin birbiri ile ilişki halinde olması ile meydana gelir. Protein-protein etkileşimleri, hücre metabolizması, transport, sinyal iletimi gibi birçok hücrel faaliyetlerde hayati önem taşımaktadır (14). Proteinler kalıcı olarak birbiri ile etkileşebileceği gibi etkileşim geçici de olabilir, kovalent veya non-kovalent, homo- ya da heterodimer şeklinde gerçekleşen etkileşimler farklı hücrel olayları yönlendirmektedir. Protein etkileşimlerinde gözlenen herhangi bir anomali hücrede depo hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, iskelet kas sistemi bozuklukları, kanser gibi birçok patolojik durum ile sonuçlanabilmektedir.

Proteinler diğer proteinler ile etkileşimlerini sağlayan çeşitli bölgeler, "domain"ler içerirler. Bunlar beta tabaka, alfa heliks,

beta fıçı gibi sekonder yapıların bir araya gelmesi sonucu oluşmuş özel üç boyutlu yapılardır (18). Önemli bölgelerden biri Src Homoloji Bölgesi 2 (SH2)'dir. Üç beta tabaka ve 2 alfa heliks yapısından oluşur. Büyüme faktörü ve reseptörlerinin etkileşiminde bu bölge rol oynamaktadır (5). Protein-protein etkileşimleri Tablo II'de kabaca sınıflandırılmıştır.

Protein-protein etkileşimleri hücrel düzeyde çok sayıda yolağı etkileyebileceğinden kompleks sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin, içerisinde protein RNA, DNA gibi çeşitli biyomoleküller barındırabilen, çeşitli protein etkileşimleri ile hedeflerine yönlendirilen ekstrasellüler veziküller (EV) merkezi sinir sisteminde homeostaz araçlarıdır. Kanser hücrelerinde hücre büyümesi, angiogenez, kolonizasyon gibi süreçlerde yer alabilirler. Çeşitli beyin tümörü hücreleri tarafından üretilen EV'ler glioblastomalardaki EGFRvIII gibi çeşitli onkogenik materyaller içerebilirler. Bu onkoproteinler protein etkileşimleri

Tablo II: Protein-Protein Etkileşimleri

Tipine Göre Protein-Protein Etkileşimleri

Homo Oligomer	Tek tip protein alt ünitesinden oluşur.
HeteroOligomer	Farklı tipte protein alt üniteleri bir arada bulunur.
Stabil Etkileşim	Genellikle aynı işlevden sorumlu bir kompleksin alt üniteleri olarak hücrede uzun süre etkileşim halinde bulunurlar.
Geçici Etkileşim	Dış etkenler ve bunlara yanıt, hücre yaşam evresinin bazı basamakları gibi durumlarda birbiri ile sıklıkla geri dönüşümlü olarak etkileşen proteinlerde görülür.
Kovalent Etkileşim	Disülfid bağları ya da elektron paylaşımıyla meydana gelen etkileşim tipidir. Kovalent etkileşimler ubiquitinlenme gibi protein modifikasyonlarını da etkilemektedir.
Non-kovalent Etkileşim	Hidroforbik etkileşimler, van der waals etkileşimleri gibi zayıf ve geçici etkileşimlerle meydana gelir.

Domain'e Göre Protein Etkileşimleri

Src Homoloji 2 (SH2)	3 beta tabaka ve 2 alfa heliks yapısından oluşur. Fosfotirozine yüksek afinite gösteren bağlanma bölgesi vardır bu bölge tirozinden fosforillenmiş proteinlerin tanınması için gereklidir. Ör: Büyüme faktörü reseptörüne bağlanan proteinler, phospholipaseCy.
Src Homoloji (SH3)	Beta fıçı yapısındadır. Prolin zengin dizileri tanır. Ör:Grb2
Fosfotirozin Bağlama Domain'i (PTB)	Fosfotirozin grupları ile etkileşir. Ör: İnsülin reseptör substratı.
LIM domain	Sistein zengin çinko parmak motifi ve korunmuş CX2CX16-23HX2CX2CX2CX16-21CX2C/H/D dizisi içerir. LIM domainleri PDZ domainlerine, bHLH transkripsiyon faktörlerine ve diğer LIM domainlerine bağlanır.
Steril alfa motif domain'i (SAM)	Beşli heliks yapısından oluşur. Korunmuş bir hidroforbik koru vardır. Çeşitli proteinler ve RNA bağlar.
PDZ Domain'i	Karboksi terminal tri-peptide motifi, diğer PDZ domeyleri ve LIM domainlerini tanır.
FERM Domain'i	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfat bağlayan bazik aminoasitler içerir. Ör: Talin ve fokal adezyon kinaz.
Kalponin Homoloji (CH) domain'i	Parvin gibi sitoiskelet proteinlerinde bulunur.
Plekstrin Homoloji domain'i	Fosfoinositidler ve sinyal proteinlerindeki asidik domainlere bağlanır.
WW Domain'i	Prolin zengin bölgelere bağlanır.
WsxWs Domain'i	Sitokin reseptörlerinde bulunur.

aracılığıyla hücreden hücreye iletilip hücre popülasyonlarının kanserleşmesine sebep olabilirler (9).

Protein-protein etkileşimleri epigenetik değişikliklere ve dolayısıyla çeşitli patolojik durumlara sebep olmaktadır (Tablo II). Örneğin Alzheimer hastalığında epigenetik modifikasyonların hastalık patogeneze katkı yaptığı bilinmektedir. 5-hidroksi metile sitozin (5hmC) sinir sisteminde çokça bulunmakta ve nöral gelişimde ve yaşa bağlı değişikliklerde rol oynamaktadır. Alzheimer hastalarının beyinlerinde ölüm sonrası bu hidroksi metillenme incelendiğinde 140 genin ekspresyonunda farklılık gözlenmiştir. Bu genler tarafından kodlanan proteinler Alzheimer hastalığı ilişkili genler ile doğrudan protein-protein etkileşimlerine girmektedir, dolayısıyla Alzheimer hastalığının patogenezinde yer alan protein sayısı dolaylı olarak artmaktadır (4).

Hücrenin temel yapısı ve işlevleri proteinler üzerinden yürütüldüğünden protein-protein etkileşimleri gerek hücrenin faaliyetlerinin devamı ve düzeni açısından gerekse de hastalıkların patogenezi açısından oldukça önem taşımaktadır. İki proteinin birbiri ile etkileşmesi hücre içi sinyal iletimini sağlayıp hücrelere bölünme, sağ kalım, ölüm sinyalleri gönderebileceği gibi birbiri ile etkileşen 2 proteinin etkisi çekirdekte gen ekspresyonunun yeniden düzenlenmesi şeklinde sonuçlanabilir. Böylelikle hücrede birkaç protein aracılığı ile başlatılmış bir etkileşim tüm hücreyi hatta doku ve organizmayı etkileyecek sonuçlar doğurabilir.

■ KAYNAKLAR

1. Aagaard L, Rossi JJ: RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 75–86, 2007
2. Aebersold R, Goodlett DR: Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 101:269–295, 2001
3. Angrisano T, Lembo F, Pero R, Natale F, Fusco A, Avvedimento VE, Bruni CB, Chiariotti L: TACC3 mediates the association of MBD2 with histone acetyl transferases and relieves transcriptional repression of methylated promoters. *Nucleic Acids Res* 34(1): 364–372, 2006
4. Bernstein AI, Lin Y, Street RC, Lin L, Dai Q, Yu L, Bao H, Gearing M, Lah JJ, Nelson PT, He C, Levey AI, Mullé JG, Duan R, Jin P: 5-Hydroxymethylation-associated epigenetic modifiers of Alzheimer's disease modulate Tau-induced neurotoxicity. *Hum Mol Genet* 25(12): 2437–2450, 2016
5. Berridge MJ: Module 6-Spatial and temporal aspects of signalling. *Cell Signalling Biology* 6:1-52, 2014
6. Chabot B, Shkreta L: Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J Cell Biol* 212(1):13–27, 2016
7. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF: Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 8(2): 464–470, 2002
8. Cooper GM, Hausman RE: The cell: A molecular approach. 3rd ed. Washington DC: ASM Press, 2006:313-314
9. D'Asti E, Chennakrishnaiah S, Lee TH, Rak J: Extracellular vesicles in brain tumor progression. *Cell Mol Neurobiol* 36(3):383–407, 2016
10. Feige MJ, Hendershot LM: Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 23 (2):167–175, 2011
11. Fire A, Albertson D, Harrison S, Moerman D: Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113: 503–514, 1991
12. Ham SJ, Lee SY, Song S, Chung JR, Choi S, Chung J: Interaction between RING1 (R1) and ubiquitin-like (UBL) domain is critical for the regulation of Parkin activity. *J Biol Chem* 291(4): 1803–1816, 2016
13. Haroon MM, Dar GH, Jeyalakshmi D, Venkatraman U, Saba K, Rangaraj N, Patel AB, Gopal V: A designed recombinant fusion protein for targeted delivery of siRNA to the mouse brain. *J Control Release* 228:120–131, 2016
14. Hence HD, Deng W, Helma J, Leonhardt H, Cardoso MC: Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells. *Nature Commun* 4: 2660, 2013
15. Hetz C: The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 1–14, 2012
16. Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K: Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type1 by ERp44. *Cell* 120(1):85–98, 2005
17. Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A: A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol* 6(1):e22, 2008
18. Janin J, Chothia C: The structure of protein-protein recognition sites. *J Biol Chem* 265(27):16027–16030, 1990
19. Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3(6):415–428, 2002
20. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU: Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 82:323–355, 2013
21. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM: The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(6):384–396, 2014
22. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415–419, 2003
23. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F: Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part II: RNA interference as a promising way to sensitize glioblastomas to temozolomide. *Drug Discov Today* 20(6):772–779, 2015
24. Molinari M, Galli C, Piccaluga V, Pieren M, Paganetti P: Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J Cell Biol* 158(2):247–257, 2002
25. Okamoto S, Lipton SA: S-Nitrosylation in neurogenesis and neuronal development. *Biochim Biophys Acta* 1850:1588–1593, 2015
26. Oltean S: Modulators of alternative splicing as novel therapeutics in cancer. *World J Clin Oncol* 6(5):92–95, 2015
27. Scarano E: Letter: DNA methylation. *Nature* 246(5434):539, 1973
28. Schroder M, Kaufman RJ: The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739–789, 2005
29. Schroder M, Kaufman RJ: ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569(1-2):29–63, 2005
30. Turkeri L, Ozer A, Narter F: Moleküler Üroloji (Ürolojik Hastalıkların Moleküler Temeli). 1. Basım. Ankara: Üroonkoloji Derneği, 2012: 334–336
31. Turkeri L, Ozer A, Narter F: Moleküler Üroloji (Ürolojik Hastalıkların Moleküler Temeli). 1. Basım. Ankara: Üroonkoloji Derneği, pp: 119–121, 2012
32. Walsh G: Post-translational modification of protein biopharmaceuticals. Wiley-Blackwell, 2009
33. Zhang J, Manley JL: Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discov* 3(11):1228–1237, 2013