

Pankreasın Duktal Adenokarsinomlarında PAK-1 Ekspresyonu: Bir Doku Mikroarray Çalışması

PAK-1 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Tissue Microarray Study

İpek ÇOBAN¹, Olca BAŞTÜRK², Edi LEVİ³, Murat ALPER⁴, N. Volkan ADSAY¹

¹Emory Üniversitesi, Patoloji Bölümü, ATLANTA, ²New York Üniversitesi, Patoloji Bölümü, NEW YORK, ³Wayne State Üniversitesi, Patoloji Bölümü, DETROIT, ABD;

⁴S.B. Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü, ANKARA, TÜRKİYE

Department of Pathology, ¹Emory University, ATLANTA, ²New York University, NEW YORK, ³Wayne State University, DETROIT, USA;

⁴M.H. Dışkapı Yıldırım Beyazıt Education and Research Hospital, ANKARA, TURKEY

ÖZ

Amaç: p21 ile aktive olan serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesi olan PAK-1 molekülü hücre motilitesinin ve invazyon yeteneğinin düzenlenmesindeki önemli faktörlerdendir. Bildiğimiz kadarıyla, literatürde pankreasın duktal adenokarsinomlarındaki (PDA) rolü hakkında yapılmış bir çalışma yoktur.

Gereç ve Yöntem: PAK-1 ekspresyonu, 98 PDA olgusu içeren bir doku mikroarray setinde test edildi. Ekspresyonun derecesine (boyanma oranını ve şiddetini değerlendiren bir skorlama sistemi ile belirlendi) göre olgular 4 gruba ayrıldı: 0 - Boyanmayan, 1 - minimal boyanan, 2 - orta dereceli boyanan, 3 - güçlü boyanan. Grupların PDA'nın klinikopatolojik özellikleriyle, bilinen prognostik parametreleriyle, sağkalım süresiyle, K-ras mutasyonunun varlığı (PCR) ve DPC4, p53, p21, p27 ve Her2/neu ekspresyonlarının derecesi ile ilişkisine bakıldı.

Bulgular: Duktus ve asinüsler PAK-1 ile minimal boyanırken, endokrin adacıklarında boyanma görülmedi. PDA'larda sırasıyla 35, 42 ve 21 olguda güçlü, orta dereceli ve minimal boyanma izlendi. PAK-1 ekspresyonu ile tümör derecesi arasında anlamlı bir ters korelasyon vardı ($p=0,04$, $\rho=-0,201$). Güçlü PAK-1 boyanması gösteren olguların yaşam sürelerinin (medyan 24 ay) orta dereceli ve minimal boyanan olgularinkine (medyan 7 ay) göre daha iyi olduğu görüldü (Ki-Kare=41,07, $p=0,001$). Cox Proportional-Hazards regresyon analizi de PAK-1 ekspresyonunun sağkalım süresini diğer değişkenlerden bağımsız olarak olumlu yönde etkilediğini gösterdi ($p=0,0001$). PAK-1 boyanması ile DPC4 boyanması arasında da anlamlı bir korelasyon vardı ($p=0,035$). K-ras, p53, p21, p27 ya da Her2/neu ekspresyonu ile anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

Sonuç: PAK-1 ekspresyonu, meme ve kolorektal kanserlerinin aksine, PDA'lar için iyi prognostik faktör olarak görünmektedir. PAK-1 ekspresyonu ve DPC4 ekspresyonu arasındaki korelasyon ise PAK-1'in pankreasta TGF- β sinyal yolu ile ilişkili olabileceğini ve bu yüzden PDA gelişiminde meme ve kolorektal kanserlerdekinden farklı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. PAK-1'in PDA'lardaki rolünün ortaya konabilmesi için ek çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: PAK-1, Pankreas, Duktal adenokarsinom

ABSTRACT

Objective: PAK-1, a member of p21-activated serine/threonine protein kinases family, plays an important role in regulating cell motility and invasiveness. To our knowledge, it has not been investigated in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) yet.

Material and Method: Expression level of PAK-1 was tested in a set of tissue microarray containing 98 cases of PDA. Based on the degree of expression level (calculated by an established scoring system incorporating the *extent* and *the intensity* of labeling), cases were assigned to one of 4 categories: 0-none, 1-minimal, 2-moderate, and 3-significant. Expression levels were correlated with clinicopathologic features, prognostic parameters, survival, the archival data on K-ras mutation (PCR) and DPC4, p53, p21, p27 and Her2/neu.

Results: PAK-1 had a weak expression in ducts and acini while the islets were not stained. In PDAs, 35, 42, and 21 cases had significant, moderate and minimal expression, respectively. The expression had a strong inverse correlation with tumor grade ($p=0.04$). Cases with significant PAK-1 expression had a much better overall survival (median 24 months) compared to those with moderate and minimal expression (median 7 months) (Chi-square=41.07, $p=0.001$). Cox Proportional-Hazards Regression Analysis showed that PAK-1 expression was independently correlated with better survival ($p=0.0001$). PAK-1 expression also had a strong correlation with DPC4 expression ($p=0.035$). No significant association with K-ras, p53, p21, p27 or Her2/neu was found.

Conclusion: In contrast to breast and colorectal cancers, PAK-1 expression seems to be a good prognostic factor in PDA. Correlation of PAK-1 and DPC4 expression, suggests that PAK-1 expression may be associated with TGF- β signaling and has a different role in PDA compared to breast and colorectal cancers. Further studies are needed to explore the role of PAK-1 in PDA.

Key Words: PAK-1, Pancreas, Ductal adenocarcinoma

GİRİŞ

Pankreasın duktal adenokarsinomu (PDA) tüm dünyada kansere bağlı ölümler sıralamasında sekizinci sırada yer alır (1). Ameliyat edilebilirlik (dolayısıyla evre), cerrahi sınırların durumu ve tümör derecesi bu potansiyeli belirleyen temel prognostik faktörler olmakla birlikte, aynı evre ve derecedeki tümörlerde bile farklı davranış modellerinin bulunabilmesi, ilişkili başka faktörlerin de olduğunu düşündürmekte ve yeni belirleyicilere gereksinim duyulmaktadır (2).

Bu arayış içerisinde son zamanlarda gündeme gelen PAK-1, serin/treonin kinaz yapısındaki PAK (p21 ile aktive olan kinaz) ailesinin ilk tanımlanan üyesidir (3). NADPH oksidazı aktive ederek (4) ve glikolizi baskılayıp pentoz fosfat yolunun aktive olmasını sağlayarak (5,6) hücre içi serbest radikal oluşumunu arttırdığı, Bcl-2 ve Bcl-X inhibisyonu (7) ve NFkB aktivasyonu (8) ile apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca hem E-cadherini baskılayarak (9,10) hem de aktin depolimerizasyonu ve mikrotübül stabilizasyonu ile (1,3,11) hücrenin motilite ve invaziv özellik kazanmasına yardım eder (12). Mitozun regülasyonu (1), hücrenin uyarandan bağımsız otonom büyüme özelliği kazanmasına yardım etmesi gibi etkileri de rapor edilmiştir (3, 13-15).

PAK-1 aktivasyonu veya aşırı ekspresyonu başta meme (1,16) olmak üzere, beyin (3), kolon (17), mesane (3), over (18) tümörlerinde ve T-hücreli lenfomalar (19) gibi birçok malignitede tanımlanmıştır. Ancak bildiğimiz kadarıyla literatürde PAK-1 ve pankreas tümörleri üzerinde yayınlanmış bir çalışma yoktur. Çalışmamızın amacı, immünohistokimyasal boyama yöntemi ile bu moleküler belirleyiciyi kendi serimizde değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular

Çalışmamızda, Wayne State Üniversitesi ve Karmanos Kanseri Enstitüsünde 1985-2003 yılları arasında tanı almış toplam 98 PDA yer almaktadır. Her olgudan alınan dokularla oluşturulan doku mikroarraylerinde immünohistokimyasal olarak PAK-1 boyanma oranı ve şiddeti değerlendirilmiştir. Demografik bilgiler hastaların patoloji raporlarından, hastane dosyalarından ya da klinisyenleri arayarak elde edilmiştir.

Derecelendirme

Olgular Adsay ve ark., tarafından öne sürülen derecelendirme sistemine göre derecelendirilmiştir (20). Bu sistemi kı-

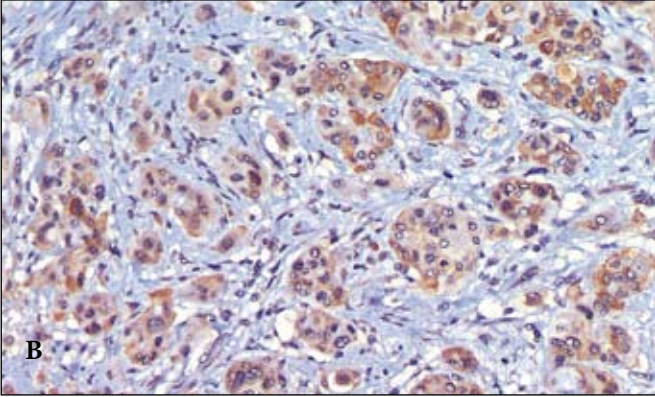
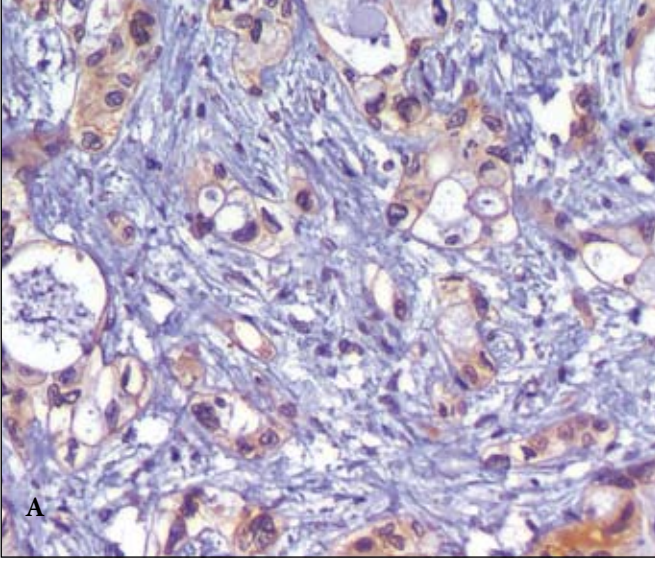
saca özetlemek gerekirse: Sınırları kolaylıkla seçilebilen iyi gelişmiş tübüler yapılar derece 1; sınırları net seçilemeyen, yer yer birbiri ile birleşen ya da kribriiform yapılar derece 2; tek tek hücreler, kordonlar ya da solid tabakalar da derece 3 olarak sınıflanmıştır.

İmmünohistokimyasal Yöntem

Formalinde tespit edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan olgunun tümör derecesini temsil eden bir blok seçildi. Her bloktan 3 adet 0,6 mm'lik invaziv tümör örneği otomatik doku mikroarray cihazı (Beecher Instruments Microarray Technology, Woodland, MD) ile ayrı bloklara yerleştirildi. Bu bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler poly-L-lizinin kaplı lamalar üzerine alındı. Kesitler ksilen ve etanol ile deparafinize ve rehidrate edildi. Daha sonra deiyonize su ile yıkandı ve non-spesifik zemin boyanmasını önlemek amacıyla Tris buffered saline (TBS) içerisinde %5 oranında dilue edilmiş at serumu ile oda sıcaklığında 10 dk. protein blokajı yapıldı ve primer antikor uygulamasına geçildi. Kesitler insan PAK-1 proteinine yönelik poliklonal fare antikoruna PAK-1 (1:50 dilüsyonda; Cell signaling, Beverly, MA, USA) ile oda ısısında bir gece inkübe edilip, TBS ile 2 kez 5'er dakika yıkandı. Daha sonra preparatlar tekrar dilue antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve TBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Sekonder antikor işlemi için sırasıyla streptavidin-biotin (Lab Vision, Biotinylated Goat Anti-Mouse, Lot: MBN11206A, CA, USA) ve streptavidin-peroksidaz (Lab Vision Streptavidin Peroxidase, Lot: SHR11210) solüsyonlarında 15'er dakika inkübe edildi. Ardından kromojen olarak diaminobenzidin (Lab Vision, Lot: AHD21119, CA, USA) solüsyonunda 15 dakika bekletilip distile su ile yıkandı. Asitsiz ve alkolsüz Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra deiyonize su ile yıkanarak %95 ve %100'lük alkollerden ve sonra ksilenden geçirildi ve kurutularak kapatıldı.

İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi

Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma oranı ve şiddeti değerlendirildi. Boyanma *oranı* semikantitatif olarak şu şekilde derecelendirildi: 0 = tümör hücrelerinin %1'den azında boyanma; 1+ = tümör hücrelerinin %1-10'unda boyanma; 2+ = tümör hücrelerinin %11-50'sinde boyanma; 3+ = tümör hücrelerinin %51-80'inde boyanma; 4+ = tümör hücrelerinin %80'inden fazlasında boyanma. Boyanma *şiddeti* de şu şekilde derecelendirildi: 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun. Daha sonra $(1 + \text{boyanma şiddeti}) \times \text{boyanma oranı}$ formülü ile toplam skor hesaplandı ve bu skora göre olgular 4 gruba ayrıldı: 0 = boyanmayan, 1 = minimal boyanan (Şekil 1A,B),



Şekil 1A,B: Skor 1 PAK-1 immün boyanması (A, x400; B, x200).

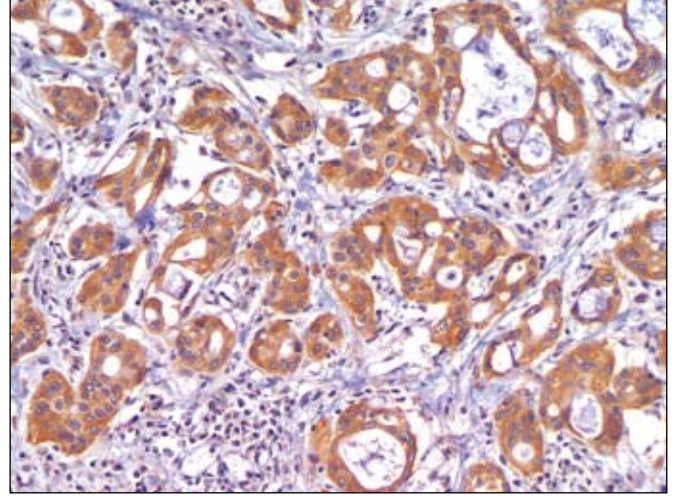
2 = orta dereceli boyanan (Şekil 2), 3 = güçlü boyanan (Şekil 3).

K-ras, DPC4, p53, p21, p27 ve Her2/neu

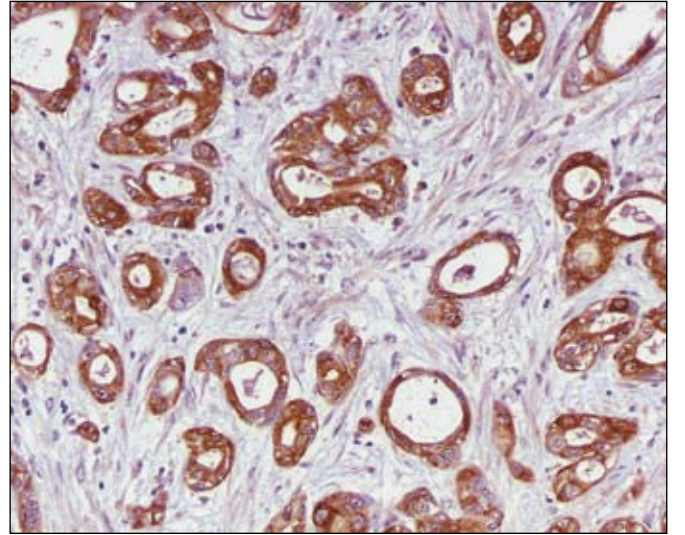
Daha önceki çalışmalara dahil edilmiş sınırlı sayıda olgunun K-ras mutasyonu (PCR ile değerlendirme) ve DPC4, p53, p21, p27 ve Her2/neu (immünohistokimyasal boyama ile değerlendirme) sonuçları patoloji raporlarından ya da Dr. Adsay'ın kişisel arşivinden taranarak kaydedildi.

Sonuçların İstatistiksel Değerlendirmesi

PAK-1 immünohistokimyasal boyaması ile PDA'nın bilinen prognostik parametreleri (tümör büyüklüğü, tümör derecesi, cerrahi sınırlar ve lenf nodu metastazı) ve sağkalım süresi arasında herhangi bir ilişki olup olmadığına ve de PAK-1 boyanması ile literatürde PDA patogenezinde rol oynadığı bildirilen K-ras mutasyonu ve DPC4, p53, p21, p27 ve Her2/neu ekspresyonu (22) arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığına bakıldı.



Şekil 2: Skor 2 PAK-1 immün boyanması (x200).



Şekil 3: Skor 3 PAK-1 immün boyanması (x200).

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde kişisel bilgisayarda çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 16.00 versiyonu kullanıldı. Korelasyonun araştırılmasında Spearman'ın Korelasyon Testi uygulandı. Sağkalımın değerlendirilmesinde Kaplan-Meier sağkalım eğrileri kullanıldı. PAK-1 ile minimal ve orta dereceli boyanan olgularla, güçlü boyanan olguların sağkalımı Log Rank Testi ile karşılaştırıldı. Cox Proportional-Hazards regresyon analizi ile PAK-1 ekspresyonu, PDA'nın önemli klinikopatolojik özellikleri (cinsiyet, yaş) ve bilinen önemli prognostik parametreleri (tümör büyüklüğü, tümör derecesi, cerrahi sınır ve lenf nodu metastazı) çoklu analizi yapıldı. p değeri <0,05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Olgular

Çalışmamıza dahil olan 64'ü kadın (%65,3), 34'ü erkek (%34,6) 98 olgunun yaşları 36 ila 86 yıl (Ortalama: 63,8), izlem süreleri ise 0 ila 120 ay (ortalama: 15,44 ay) arasında değişiyordu. 85 olgu (%86,7), 0-25 ay (ortalama: 10,2) içinde tümörleri nedeniyle öldü. On üç olgu (%13,2) ise çalışma tamamladığı sırada halen yaşıyordu.

Tümörler

Yetmiş bir tümör pankreasın baş bölgesinde, 21 tümör ise kuyruk bölgesinde lokalizeydi. Altı olguda tümör lokalizasyonu bilgisine ulaşılamadı. Tümör büyüklüğü 0,8 cm - 9 cm arasında değişiyordu (Ortalama 3,4 cm). Cerrahi sınır bilgisine ulaşılan 56 olgudan 34'ünde cerrahi sınır tutulumu olmadığı görüldü. 14 olguda cerrahi sınırda invaziv lezyon, 2 olguda ise cerrahi sınırda in situ lezyon saptandı. Otuz yedi tümör derece 1 (%37,7), 36 tümör derece 2 (%36,7), 25 tümör de derece 3 (%25,5) olarak sınıflandırıldı. Olgu başına diseke edilen lenf nodu sayısı 1 ila 26 arasında değişiyordu (ortalama 9,6). Lenf nodu metastazı bilgisine ulaşılan 94 olgudan 71'inde (%75,5) lenf nodu metastazı saptandı. Yirmi üç olguda lenf nodu metastazı yoktu.

Normal Pankreasda PAK-1

Normal pankreas dokusunda, asinus ve duktuslarda minimal PAK-1 boyanması izlenirken, Langerhans hücre adacıklarında herhangi bir boyanma görülmedi.

Duktal Adenokarsinomda PAK-1

Doksan sekiz tümörün 21'inde (%21,4) minimal (Skor 1, Şekil 1), 42'sinde (%42,8) orta dereceli (Skor 2, Şekil 2) ve 35'inde (%35,7) güçlü (Skor 3, Şekil 3) PAK-1 boyanması izlendi.

İstatistiksel Değerlendirme

Derece:

PAK-1 boyanması ile tümör derecesi arasında anlamlı bir ters korelasyon olduğu ($p=0,04$, $\rho = -0,201$) ve PAK-1 boyanma skorunun tümör derecesi arttıkça azaldığı görüldü. Otuz yedi adet derece 1 tümörden 16'sında (%43,2) ve 36 adet derece 2 tümörden 14'ünde (%38,8) güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması izlenirken; 25 adet derece 3 tümörden yalnızca 5'inde (%20) güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması saptandı.

Lenf Nodu Tutulumu:

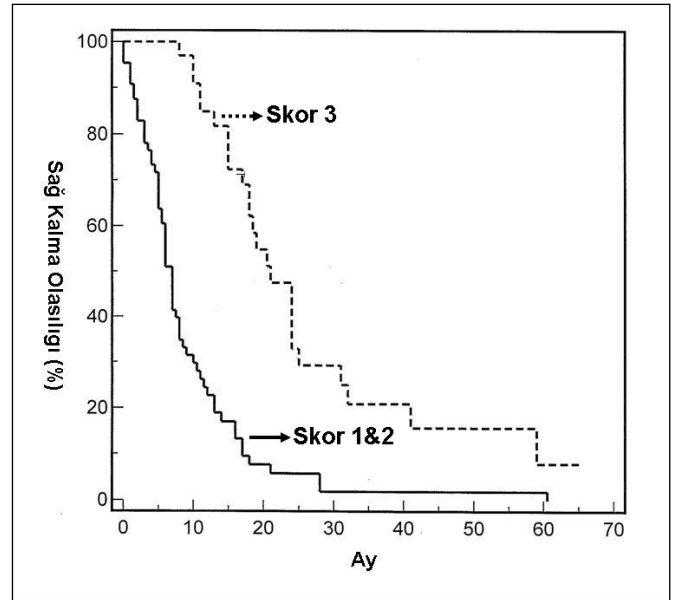
PAK-1 boyanması ile lenf nodu tutulumu arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı ($p=0,6345$).

Sağkalım Süresi (Grafik I, Tablo I):

Çalışmaya dahil edilen olguların ortalama sağkalım süresi beklendiği üzere çok kısa (medyan: 15,44 ay) olmakla birlikte Kaplan-Meier sağkalım eğrileri güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması izlenen olguların sağkalım süresinin (median: 24 ay), orta dereceli ve minimal (skor 2 ve 1) PAK-1 boyanması gösteren olgularinkinden (medyan: 7 ay) anlamlı derecede daha iyi olduğunu gösterdi (Ki-Kare=41,07; $p=0,001$).

K-ras, DPC4, p53, p21, p27 ve Her2/neu (Tablo II):

Arşiv taraması 98 olgumuzun 29'una daha önceki çalışmalar için PCR yapıldığını ve bunların 26'sında (%89,6) K-ras mutasyonu saptandığını gösterdi. Yirmi altı olgunun 6'sında minimal (skor 1), 9'unda orta dereceli (skor 2) ve



Grafik I: PAK-1 ile minimal ve orta dereceli (skor 1 ve 2) boyanan olgularla, güçlü (skor 3) boyanan olguların sağkalımlarını gösteren Kaplan-Meier eğrileri.

Tablo I: Long Rank Testi Sonuçları

	Long Rank Testi			
	Skor 1&2 PAK-1 Ekspresyonu		Skor 3 PAK-1 Ekspresyonu	
	Medyan Sağkalım: 7 ay		Medyan Sağkalım: 24 ay	
	6. ay	7. ay	21. ay	24. ay
Sağkalım Oranı	0,508	0,413	0,508	0,373
Standart Hata	0,0630	0,062	0,089	0,087
Ki-Kare	41,07			
Önem	p=0,001			

9'unda güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması izlendi. PAK-1 ekspresyonu ile K-ras ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

Yine daha önceki çalışmalar için DPC4 immünohistokimyasal boyaması yapılan 26 tümörden 16'sında (%61,5) DPC4 boyanması yoktu (skor 0). Dokuz tümörde minimal (skor 1) ve yalnız 1 tümörde orta dereceli (skor 2) DPC4 boyanması vardı. Bu 26 tümörün 6'sında minimal (skor 1), 8'inde orta dereceli (skor 2) ve 12'sinde de güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması görüldü. PAK-1 ekspresyonu ile DPC4 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı ($p=0,035$).

p53 ve p21 immünohistokimyasal boyamaları yapılan 29 tümörden 10'unda p53 boyanması yoktu (skor 0). Dört tümörde minimal (skor 1), 5 tümörde orta dereceli ve 10 tümörde de güçlü (skor 3) p53 boyanması vardı. 10 tümör p21 ile boyanmazken (skor 0), 9 tümörde minimal (skor 1), 8 tümörde orta dereceli (skor 2) ve 2 tümörde de güçlü (skor 3) p21 boyanması vardı. Bu 29 tümörün 7'sinde minimal (skor 1), 10'nunda orta dereceli (skor 2) ve 12'sinde de güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması izlendi.

p27 immünohistokimyasal boyaması yapılan 19 tümörden 6'sında p27 boyanması yoktu (skor 0). Bir tümörde minimal (skor 1), 4 tümörde orta dereceli (skor 2) ve 8 tümörde

de şiddetli (skor 3) p27 boyanması vardı. Bu 19 tümörün 4'ünde minimal (skor 1), 9'unda orta dereceli (skor 2) ve 6'sında da güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması dikkati çekti.

Her2/neu immünohistokimyasal boyaması yapılan 26 tümörden 3'ü Her2/neu ile boyanmazken (skor 0), 9 tümörde minimal (skor 1), 9 tümörde orta dereceli (skor 2) ve 5 tümörde de güçlü (skor 3) Her2/neu boyanması vardı. Bu 26 tümörün 7'sinde minimal (skor 1), 9'unda orta dereceli (skor 2) ve 10'unda da güçlü (skor 3) PAK-1 boyanması izlendi.

PAK-1 ekspresyonu ile p53, p21, p27 ya da Her2/neu ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. PAK-1 ve adı geçen diğer mutasyon/moleküllerin karşılaştırılmasının istatistiksel sonuçları Tablo I'de özetlendi.

Çoklu Analiz (Tablo III):

Cox Proportional-Hazards regresyon analizi ile PAK-1 ekspresyonu, PDA'nın klinikopatolojik özellikleri (cinsiyet, yaş) ve bilinen prognostik parametreleri (tümör büyüklüğü, tümör derecesi, cerrahi sınır ve lenf nodu metastazı) çoklu analizi yapıldı. PAK-1 ekspresyonunun sağkalım süresini diğer değişkenlerden bağımsız olarak olumlu yönde etkilediği görüldü ($p=0,0001$). Aynı analiz tümör büyüklüğünün de sağkalım süresini diğer değişkenlerden bağımsız olarak ancak olumsuz yönde etkilediğini gösterdi ($p=0,033$).

TARTIŞMA

Pankreasın duktal adenokarsinomunun (PDA) en ölümcül kanserlerden biri olması ve günümüz tedavi yöntemleriyle (cerrahi + kemoterapi) yeterince iyi sonuçlar alınamaması, prognostik açıdan değeri olan moleküller ve yeni farmakolojik hedefler arayışlarını gündeme getirmiştir. Bu arayışın ilk basamağını PDA'larda karsinogenezin nasıl ilerlediğinin ve hangi aşamalara müdahale edilebileceğinin anlaşılmasından geçer.

Tablo II: PAK-1 ve diğer mutasyon/moleküller arasındaki ilişki

	Spearman'ın Korelasyon Testi	Önem
K-ras	-0,094	$p=0,6188$
DPC4	0,420	$p=0,035$
p53	-0,340	$p=0,0724$
p21	0,009	$p=0,9627$
p27	0,289	$p=0,2207$
Her2/neu	-0,042	$p=0,8324$

Tablo III: Cox Proportional-Hazard regresyon analizi

Değişken	b	Standart Hata	Önem (p)	Exp (b)	%95 Güven Aralığı
PAK-1	-0,6065	0,1510	0,0001	0,5452	0,4062 - 0,7319
Cinsiyet	-0,2646	0,2660	0,3200	0,7675	0,4569 - 1,2894
Yaş (>60 yaş)	0,4270	0,2884	0,1387	1,5327	0,8734 - 2,6896
Tümör Büyüklüğü (>2 cm)	0,6969	0,3283	0,0337	2,0075	1,0585 - 3,8077
Tümör Derecesi	0,1282	0,1561	0,4113	1,1368	0,8385 - 1,5412
Cerrahi Sınır	0,2622	0,2457	0,2859	1,2998	0,8050 - 2,0988
Lenf Nodu	0,4311	0,2762	0,1186	1,5389	0,8980 - 2,6371

Şu anki bilgilerimiz PDA'nın normal hücrelerin somatik DNA'sındaki birçok değişikliğin birikimi sonucu ortaya çıkan çok basamaklı bir süreç olduğu yönündedir (23). Saptanan tüm genetik değişikliklerin içinde özellikle, K-ras proto-onkogeninde ve *p16/CDKN2A*, *DPC4/SMADH4* ve *TP53* tümör supressör genlerindeki mutasyonlar önemli yer tutar (23). PDA'ların %90-95'inde *K-ras* geni mutasyonları (23), %80-95'inde de *p16/CDKN2A* gen lokusunda homozigot delesyonu izlenir. Delesyonla birlikte *p16/CDKN2A* geni inaktive olur ve tümör supresör özelliği ortadan kalkar. PDA'ların %50'sinden fazlasında saptanan *DPC4/SMADH4* (24) ve *TP53* (25) gen mutasyonları için de benzer bir durum söz konusudur. *DPC4/SMADH4*'ün hücre siklusunun G1 fazında durmasına neden olarak hücrenin büyümesini inhibe eden TGF- β sinyal yolunda önemli bir düzenleyici olduğu bilinmektedir (24). Mutasyonla birlikte *DPC4/SMADH4* geni inaktive olur ve tümör supresör özelliği ortadan kalkar. *DPC4/SMADH4* inaktivasyonunun izlendiği (immünhistokimyasal olarak DPC4 ile boyanmayan) PDA'ların daha agresif seyirli olduğu gösterilmiştir (26, 27).

Pankreasın intraduktal neoplazilerinde (PanIN) displazinin aşamalı bir şekilde ilerlemesi (28) ve bu premalign lezyonların hemen tamamında da PDA benzeri genetik değişikliklerin izlenmesi; kolorektal karsinomlar için öne sürülmüş adenom-karsinom sekansı benzeri bir modelin PDA için de geçerli olabileceği tezini gündeme getirmiştir (29). Ancak yalnızca bazı premalign lezyonların invaziv lezyona dönüşmeleri, hangi lezyonların kansere dönüşeceğini belirlemede başka mekanizmaların da etkili olduğunu düşündürmektedir. Birçok onkojenik sinyal yolunun merkezindeki p21 ile aktive olan kinazların (PAK) özellikle hücre proliferasyonu, apoptozun regülasyonu (7,13) ve anormal mitoz (1) gelişimindeki rollerinin saptanması ve beyin (3), meme (1, 16), kolon (17), mesane (3), over (18), tümörlerinde (3) ve T-hücreli lenfomalarda (19) gibi malignitelerde PAK ekspresyonunda değişiklikler izlenmesi (3); bu moleküllerin PDA gelişimde de rol oynuyor olabilecekleri kuşkusunu doğurmuştur.

Bildiğimiz kadarıyla literatürde PAK-1 molekülünün PDA'lardaki ekspresyonu üzerine yapılmış bir çalışma yoktur. Bu açıdan bir ilk olan çalışmamızda, PAK-1 immünohistokimyasal boyanması ile tümör derecesi arasında anlamlı bir ters korelasyon olduğu ($p=0,04$) ve PAK-1 boyanma oranının tümör derecesi arttıkça azaldığı görülmüştür. Ayrıca güçlü PAK-1 boyanması izlenen olgulardaki sağ kalım süresinin (medyan: 24 ay), orta dereceli ve minimal PAK-1 boyanması gösteren olgularinkinden (medyan: 7 ay) anlamlı derecede daha iyi olduğunu saptanmıştır ($p=0,001$). Yani PAK-1 ekspresyonu -meme ve

kolon kanserlerindeki aksine- PDA için iyi prognostik faktör olarak görünmektedir. PAK-1 ekspresyonunun sağ kalım üzerindeki etkisinin çoklu "multivariate" analizde de bağımsız bir değişken olarak öne çıkması ($p=0,0001$), PAK-1'in tümör biyolojisini doğrudan ilgilendiren önemli bir faktör olduğunu ve hatta prognostik bir marker olarak da potansiyeli bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuçlarımızın, diğer organ tümör çalışmalarındaki sonuçlara göre farklılık göstermesi PAK ailesi üyelerinin dokuya spesifik ekspresyon göstermeleri ve değişik dokularda farklı etkilerinin olmasından (30) kaynaklanıyor olabilir. Özellikle de PAK-1 ekspresyonu ile DPC4 ekspresyonu arasında saptadığımız korelasyon ($p=0,035$), PAK-1'in pankreas dokusunda, diğer dokulardakinden farklı olarak TGF- β yolu (31) üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Yukarıda da belirtildiği üzere *DPC4/SMADH4*'ün hücre siklusunun G1 fazında durmasına neden olarak hücrenin büyümesini inhibe eden TGF- β sinyal yolunda önemli bir düzenleyici olduğu bilinmektedir (24, 27). Ancak PAK-1'in PDA' daki rolünün ve PAK-1 ile TGF- β sinyal yolu arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılabilmesi için başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ek olarak çalışmamızda, benign duktuslarda yalnızca minimal boyanma görülmesi PAK-1'in özellikle iğne biyopsilerinde benign lezyonlarla kanserlerin ayırımında kullanılabilecek bir molekül olabileceği olasılığını akla getirmiştir. Normal duktuslardaki minimal boyanma çalışmamızda değerlendirilen normal duktusların tümörlere komşu alanlardaki duktuslar olması ile açıklanabilir. Tümörsüz insan pankreas dokularından (normal ya da kronik pankreatitli) hazırlanacak doku mikroarraylerle yapılacak çalışmalarda PAK-1'in kronik pankreatiti boyamadığını gösterilebilirse, PAK-1 – tıpkı DPC4 gibi – kanser/kanser değil ya da kronik pankreatit/iyi diferansiyel kanser ayırımında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. *Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, Wang RA, Pestell RG, Vadlamudi RK, Kumar R*: p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *J Biol Chem* 2004, 279:1422-1428
2. *Kuhlmann KE, de Castro SM, Wesseling JG, ten Kate FJ, Offerhaus GJ, Busch OR, van Gulik TM, Obertop H, Gouma DJ*: Surgical treatment of pancreatic adenocarcinoma; actual survival and prognostic factors in 343 patients. *Eur J Cancer* 2004, 40:549-558
3. *Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ*: p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:459-471
4. *Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bokoch GM*: Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-coupled receptors. *Science* 1995, 269:221-223

5. **Gururaj A, Barnes CJ, Vadlamudi RK, Kumar R:** Regulation of phosphoglucosyltransferase 1 phosphorylation and activity by a signaling kinase. *Oncogene* 2004, 23:8118-8127
6. **Shalom-Barak T, Knaus UG:** A p21-activated kinase-controlled metabolic switch up-regulates phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2002, 277:40659-40665
7. **Schürmann A, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM:** p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:453-461
8. **Frost JA, Swantek JL, Stippec S, Yin MJ, Gaynor R, Cobb MH:** Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem* 2000, 275:19693-19699
9. **Grooteclaes ML, Frisch SM:** Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* 2000, 19:3823-3828
10. **Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, Kumar R:** Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res* 2005, 65:3179-3184
11. **Dummler B, Ohshiro K, Kumar R, Field J:** Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009, 28:51-63
12. **Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN:** Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1999, 1:253-259
13. **Vadlamudi RK, Bagheri-Yarmand R, Yang Z, Balasenthil S, Nguyen D, Sahin AA, den Hollander P, Kumar R:** Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. *Cancer Cell* 2004, 5:575-585
14. **Rayala SK, Molli PR, Kumar R:** Nuclear p21-activated kinase 1 in breast cancer packs off tamoxifen sensitivity. *Cancer Res* 2006, 66:5985-5988
15. **Rayala SK, Talukder AH, Balasenthil S, Tharakan R, Barnes CJ, Wang RA, Aldaz CM, Khan S, Kumar R:** P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer Res* 2006, 66:1694-1701
16. **Holm C, Rayala S, Jirström K, Stål O, Kumar R, Landberg G:** Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:671-680
17. **Carter JH, Douglass LE, Deddens JA, Colligan BM, Bhatt TR, Pemberton JO, Konicek S, Hom J, Marshall M, Graff JR:** Pak-1 expression increases with progression of colorectal carcinomas to metastasis. *Clin Cancer Res* 2004, 10:3448-3456
18. **Schraml P, Schwerdtfeger G, Burkhalter E, Raggi A, Schmidt D, Ruffalo T, King W, Wilber K, Mihatsch MJ, Moch H:** Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2003, 163:985-992
19. **Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ:** Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 2003, 101:1513-1519
20. **Adsay NV, Basturk O, Bonnett M, Kilinc N, Andea AA, Feng J, Che M, Aulicino MR, Levi E, Cheng JD:** A proposal for a new and more practical grading scheme for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005, 29:724-733
21. **Greene FL, Page DL, Fleming ID:** *AJCC Cancer Staging Manual*, New York, Springer-Verlag, 2002
22. **Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS:** *Tumors of the Pancreas*, Series IV, 4th ed., Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology, 2007
23. **Schneider G, Schmid RM:** Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2003, 2:15
24. **Biankin AV, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Biankin SA, Head DR, Hugh TB, Henshall SM, Sutherland RL:** Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 2001, 61:8830-8837
25. **Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE:** Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997, 57:1731-1734
26. **Biankin AV, Morey AL, Lee CS, Kench JG, Biankin SA, Hook HC, Head DR, Hugh TB, Sutherland RL, Henshall SM:** DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2002, 20:4531-4542
27. **Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M:** The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001, 7:4115-4121
28. **Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ:** Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001, 25:579-586
29. **Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE:** Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6:2969-2972
30. **Jaffer ZM, Chernoff J:** p21-activated kinases: Three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* 2002, 34:713-717
31. **Miyaki M, Kuroki T:** Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 306:799-804