



WFOX GEN İFADESİNİN KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ İLE İLİŞKİSİ

Association of WFOX Gene Expression with Chronic Lymphocytic Leukemia

Halil HANCI¹ , Birol TOPÇU² , Seval AKPINAR³ , BurhanTURGUT³ , Bahadır BATAR⁴ 

¹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE.

²Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE.

³Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE.

⁴Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, TÜRKİYE.

Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (NKUBAP.02.YL.17.137).

Bu araştırma projesi Trakya Üniversiteler Birliği 3. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur, 24-26 Ekim, 2019.

Çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulunun onayıyla (No. 2017/76/07/11) ve Helsinki Bildirgesi'nin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

Öz

Amaç: WW alanı içeren oksidoredüktaz (WFOX) geni kromozom 16q23.3-q24.1 bölgesinde bulunmaktadır ve yaygın kromozomal fragil bölge, FRA16D, içermektedir. WFOX geni 46 kDa moleküler ağırlığında WFOX tümör baskılayıcı proteini kodlar. Birçok insan kanserlerinde WFOX lokusunda heterozigote kaybı (LOH), WFOX promotor hipermetilasyonu ve sonuç olarak Wfox ifadesi kaybı veya azalması bildirilmiştir. Ayrıca, son çalışmalar çeşitli kanser tiplerinde Wfox eksikliğinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Kronik lenfositik löseminin (KLL) klinik özellikleri ve genetik anomalileri iyi tanımlanmıştır, fakat moleküler detaylar halen araştırılmaktadır. WFOX ifadesi seviyeleri KLL için olası bir biyobelirteç olabilir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde KLL'de WFOX'ın tanı ve prognostik önemi ile ilgili kanıtlar bulunmamaktadır. Çalışmamızda, KLL hastalarında ve sağlıklı kontrollerde WFOX ifadesi düzeylerini tanımlamayı ve KLL hastalarında WFOX ifadesini klinik özelliklerine göre analiz etmeyi amaçladık.

Materyal ve Metot: Bu çalışmayı 40 KLL hastasında ve 26 sağlıklı kontrolde gerçekleştirdik. WFOX ifadesi seviyelerini ters transkriptaz kantitatif PCR (RT-QPCR) tekniğini kullanarak analiz ettik.

Bulgular: Sonuçlarımız WFOX ifadesinin KLL hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdi ($P < 0,001$). WFOX düzeyleri ile KLL'deki klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadık ($P > 0,05$).

Sonuç: Sonuç olarak, WFOX geninin anormal transkripsiyon varyantları, anormal protein izoformları ile ilişkilendirilebilir ve bu izoformlar, KLL hastalarında WFOX geninin tümör baskılayıcı etkilerini değiştirebilir.

Anahtar Kelimeler: Kronik lenfositik lösemi, tümör baskılayıcı, WFOX.

Abstract

Aim: The WW domain-containing oxidoreductase (WFOX) gene is located on chromosome 16q23.3-q24.1 and contains the common chromosomal fragile site, FRA16D. The WFOX gene encodes a Wfox tumor suppressor protein with a molecular weight of 46 kDa. Loss of heterozygosity (LOH) at the WFOX locus, promoter hypermethylation of the WFOX promoter, and consequently Wfox expression loss or reduction has been reported in a large fraction of many human cancers. Also, recent studies have shown that Wfox deficiency is associated with poor prognosis in various types of cancer. Clinical features and genetic anomalies of chronic lymphocytic leukemia (CLL) are well defined, but molecular details are still under investigation. WFOX expression levels could be a possible biomarker for CLL. As much as we know, there is no evidence for diagnostic and prognostic significance of Wfox in CLL. In our study, we aimed to define the expression levels of WFOX in CLL patients and also to analyze the WFOX expression in CLL patients with regard to their clinical characteristics.

Materials and Methods: We performed this study in 40 CLL patients and 26 healthy controls. We analyzed the WFOX expression levels by using reverse transcriptase-quantitative PCR (RT-QPCR). Results: Our results showed that WFOX expression was significantly higher in CLL patients compared to healthy control group ($P < 0.001$). We did not find any statistically significant difference between WFOX levels and clinical parameters in CLL ($P > 0.05$).

Results: Our results showed that WFOX expression was significantly higher in CLL patients compared to healthy control group ($P < 0.001$). We did not find any statistically significant difference between WFOX levels and clinical parameters in CLL ($P > 0.05$).

Conclusion: Abnormal transcription variants of WFOX gene can be associated with abnormal protein isoforms and these isoforms can change the tumor suppressive effects of WFOX gene in CLL patients.

Keywords: Age-related macular degeneration; off-label drug, vascular endothelial growth factor, VEGF.

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Bahadır BATAR

Adres: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 59030 Tekirdağ/TÜRKİYE.

E-posta: batar@nku.edu.tr

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 03.02.2020

Date Accepted / Kabul Tarihi: 09.03.2020

GİRİŞ

WW alanı içeren oksidoredüktaz (WFOX) geni kromozom 16q23.3-q24.1 bölgesinde bulunmaktadır ve yaygın bir kromozomal frajil bölge, FRA16D, içermektedir. FRA16D lokusu replikasyon stresinin öncelikli hedeflerinden bir tanesidir ve replikasyon stresi varlığında kromozomal kırılmalara ve delesyonlara yatkın bir bölgedir. FRA16D epitel kökenli birçok insan kanserinde en frajil lokustur¹.

WFOX geni 46 kDa molekül ağırlığında Wfox tümör baskılayıcı proteini kodlar. Wfox proteini N terminal alanda iki WW bağlanma bölgesi ve merkezde 283 amino asitlik bir kısa zincir dehidrogenaz/redüktaz (SDR) alanı içermektedir¹. Bu alanların karakterizasyonu WFOX'ın hücrel ve fizyolojik fonksiyonlarının tanımlanması için önemlidir. Birinci WW bölgesi (WW1) sahip olduğu PPxY veya PPxL motifleri ile p73, Ap2γ, ErB-4, Smad3 and ATM gibi proteinleri bağlayarak Wfox'ın apoptoz, proliferasyon ve kontrol noktası aktivasyonu gibi çeşitli hücrel fonksiyonlarda görev almasını sağlar^{2,3}. Ayrıca, bizim son çalışma sonuçlarımız Wfox WW1 bölgesinin BRCA1 proteini ile etkileşerek çift zincir DNA onarım yolu seçimini de düzenlediğini ortaya koymuştur⁴. SDR bölgesinin ise steroid hormon metabolizmasında önemli bir role sahip olduğuna inanılmaktadır⁵.

Kanserlerde kopya sayısı değişikliklerinin araştırıldığı çalışmalarda Wfox'ın insan kanserleri arasında üçüncü en yaygın delesyona uğrayan gen olduğu tanımlanmıştır⁶. Birçok insan kanserlerinde WFOX lokusunda heterozigozite kaybı (LOH), WFOX promoter hipermetilasyonu ve sonuç olarak Wfox ifadesi kaybı veya azalması bildirilmiştir⁷. Çeşitli çalışmalar meme, özofagus, pankreas ve tiroid kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde WFOX ifadesinde bir azalma veya kayıp olduğunu göstermiştir⁸⁻¹². Ayrıca, özellikle primer hematopoietik malignitelerde WFOX ifadesinde azalma veya kayıp bildirilmiştir^{13,14}. Wfox protein ifadesi eksikliği genellikle daha agresif kanserler ve daha kötü klinik sonuçlar ile ilişkilidir^{15,16}. Wfox protein ifadesi eksikliği ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi bildiren kanıtlar bulunmasına rağmen, Wfox'un tümör baskılayıcı fonksiyonu henüz tam olarak açığa kavuşmamıştır.

Kronik lenfoblastik lösemi (KLL), olgun klonal CD5⁺ B lenfositlerinin kan, kemik iliği ve lenfoid dokularında birikmesi ile karakterize lenfoproliferatif bir hastalıktır. Kromozomal bozukluklar, mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler KLL patogenezinde önemli rol oynamaktadır¹⁷.

Erken evre ve düşük risk KLL hastalarında doğru diagnostik ve prognostik biyobelirteçleri tanımlamak hastaların hayatta kalmalarını iyileştirmek için kritik bir öneme sahiptir. KLL'nin klinik özellikleri ve genetik anomalileri iyi tanımlanmıştır, fakat moleküler detaylar halen araştırılmaktadır.

Çalışmamızda KLL hastalarında WFOX ifadesi düzeylerini tanımlamayı ve KLL hastalarında WFOX ifadesinin klinik özellikler ile ilişkisini analiz etmeyi amaçladık.

MATERYAL VE METOT

Hasta ve Kontrol Grubu

Bu vaka-kontrol çalışmasına toplam 40 KLL hastası ve 26 sağlıklı birey dahil edildi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı'nda tanı konan ve radyoterapi veya kemoterapi ile tedavi edilmemiş KLL hastalarından ve sağlıklı bireylerden EDTA'lı tüplere 2 ml kan örneği alındı. KLL grubundaki hastalar ve kontrol grubundaki sağlıklı bireyler 18-70 yaş aralığındaydı. Tüm hastalar ve kontrol bireyleri çalışmanın amacı ve prosedürleri hakkında tam olarak bilgilendirildi ve çalışmaya

katılmadan önce tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam alındı. Çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulunun onayıyla (No. 2017/76/07/11) ve Helsinki Bildirgesi'nin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonu, sağlıklı bireylerden ve KLL hastalarından alınan periferik kandan PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fischer Sci.) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi, her bir örnek için 50 ng RNA'dan High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Sci.) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi.

Ters Transkriptaz-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

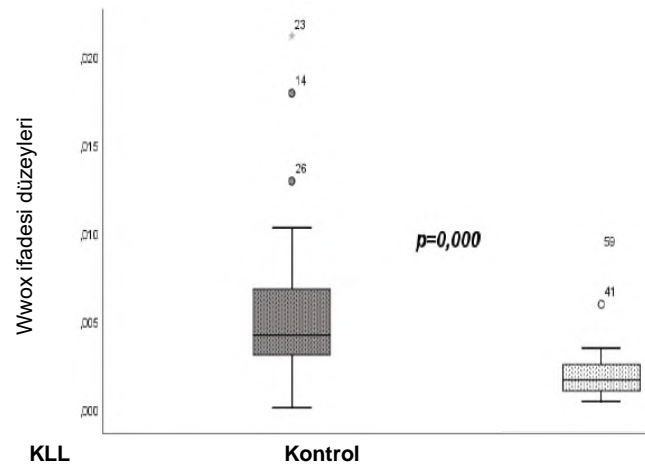
Her bir cDNA örneğinin ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-QPCR) analizi, PowerUp SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fischer Sci.) kullanılarak ve G6PD normalizasyonu ile Qiagen Rotor gen Q (Qiagen) sisteminde gerçekleştirildi. RT-QPCR reaksiyonu 20 ul toplam hacimde gerçekleştirilmiştir: 10ul Power up SYBR Green master mix, 2,5 ul forward primer (500 nM), 2,5 ul revers primer (500 nM), 50ng cDNA ve dH2O. RT-QPCR reaksiyonu için kullanılan WWOX ve G6PD primer dizileri: G6PD revers primer: GGCCAGCCACATAGGAGTT, G6PD forward primer: GCAAACAGAGTGAGCCCTTC, WWOX revers primer: TCTGGGACAGCAGCACAGTA ve WWOX forward primer: GAGGCCTTTCACCAAGTCC. RT-QPCR reaksiyonu sıcaklık döngüsü: 40 döngü olmak üzere 95°C'de 15 sn denatürasyon, 55°C'de 15 sn annealing ve 72°C'de 1 dak uzama. Bağlı mRNA ekspresyon değişiklikleri $2^{-\Delta Ct}$ eşik yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

Verilerin bilgisayara aktarılmasında ve analizlerinde PASW Statistics 18 for Windows istatistik paket programı kullanıldı. Değişkenler ortalama, standart sapma, medyan, minimum-maksimum değer, frekans ve yüzde ile ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Ayrıca, Roc Curve analizi ile cut-off ekspresyon değeri belirlendi. Değişkenlerin karşılaştırılmasında Bağımsız Örneklem t testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

WWOX gen ifadesinin KLL hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($P < 0,001$) (Şekil 1).



Şekil 1: KLL hastalarında ve sağlıklı kontrollerde Wwox ifadesi düzeyleri

KLL hastaları ROC eğrileri analizi (0,029) kullanılarak elde edilen eşik değerine göre, WWOX pozitif ve WWOX negatif olarak iki gruba ayrıldı. Genel olarak, 33 hasta WWOX mRNA ifadesi gösterdi, kalan 7 hasta cutoff değerinin altındaydı. WWOX gen ifadesi düzeyleri ile KLL prognostik faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0,05$) (Tablo 1).

Tablo 1. WWOX negatif ve pozitif KLL hastalarında klinik özellikler

	WWOX Pozitif	WWOX Negatif	P
Hasta Sayısı	33	7	
Cinsiyet E/K	21/12	6/1	
Yaş	59,52	60	0,9
Evre (Rai)			
Evre 0	13	5	
Evre 1	8	1	
Evre 2	10	1	
Evre 3	1	0	
Evre 4	1	0	
WBC ($10^3/uL$)	24,1812	21,0866	0,444
LY ($10^3/uL$)	69,7606	70,3714	0,899
HB (g/DL)	14,1515	14,1114	0,954
PLT ($10^3/uL$)	248,4848	237,7143	0,851
LDH (IU/L)	209,2121	180,7143	0,135
B2M (mg/L)	2,887	2,5	0,367
CD38 (%)	3,0972	3,8683	0,81

TARTIŞMA

Yaygın kromozomal fragil bölgeler (CFS) replikasyon stresine yatkındır. Fragil bölgelerde bir tümör baskılayıcı genin varlığı, DNA hasarına karşı genomik stabilitenin korunmasında önemlidir¹⁸. Bu bölgelerde heterozigotluk (LOH) kaybı, homozigot delesyonlar veya tümör baskılayıcı gen kaybı genomik instabiliteye ve özellikle onkojenik transformasyona yol açar^{13,14}.

WWOX, yaygın fragil bölge FRA16D'yi kapsayan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. Çalışmamızda WWOX'un KLL'deki prognostik önemi araştırdık. WWOX gen ifadesinin KLL hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdik. KLL hastalarında WWOX ifadesindeki artış, özellikle genomik instabilite açısından değerlendirilmesi gereken bir durumu göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda WWOX gen ifadesi düzeyleri ile KLL prognostik faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadık. Birçok çalışma, birçok tümör tipinde WWOX geninin kaybının, tümör agresifliği açısından kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir¹⁹⁻²¹.

Normal dokularda tespit edilmeyen sadece tümör hücrelerinde ifade edilen anormal WWOX transkript varyantlarının varlığı bildirilmiştir. Alternatif ekzon-ekzon kırılmasının neden olduğu bu anormal transkript varyantlarının bir sonucu olarak, Wwox protein izoformlarının tümör hücrelerinde Wwox ifadesinin kaybı veya azalması ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. WWOX gen ifadesinin azalması veya kaybı, bu anormal transkript varyantları nedeniyle kodlanan anormal Wwox protein izoformlarıyla ilişkilidir^{21,22}.

Bildiğimiz kadarıyla, hematopoietik bozukluklarda WWOX ifadesi ile ilgili çok az sayıda büyük ölçekli çalışma bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda WWOX gen ifadesi ile hematolojik kanserler arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Ishii ve çalışma arkadaşları, akut miyeloid lösemi (AML), ALL, kronik miyeloid lösemi (CML) ve multipl miyeloma (MM) dahil olmak üzere hematopoietik bozukluklarda WWOX geninin ifadesinin sıklıkla uyumlu bir şekilde değiştiğini ve WWOX değişikliğinin sıklığını göstermişlerdir¹³. Luo ve ark. WWOX ifadesinin farklı lösemi tiplerinde normal kontrollere kıyasla azaldığını veya kaybolduğunu göstermişlerdir²³. Chen ve ark. WWOX mRNA ifadesini, akut miyeloid lösemi (ALL) örneklerinde kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha düşük gözlemişlerdir²⁴. Cui ve ark.

WFOX mRNA ve Wwox protein ifadelerinin lösemi hastalarında önemli ölçüde azaldığını veya kaybolduğunu bildirmişlerdir²⁵.

WFOX deregülasyonu akciğer, pankreas, mide, kemik ve cilt kanserleri gibi birtakım kanserler ile de ilişkilendirilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer tümör örneklerinde azalmış WFOX ifadesi bulunmuştur^{26,27}. Wwox protein ifadesi kaybı bazı histotipler ve artmış tümör agresifliği ile ilişkilidir²⁸. Pankreatik ve gastrik kanserler ayrıca WFOX LOH'un yanı sıra primer tümörlerde ve hücre hatlarında ifadede azalma belirlenmiştir^{29,30}. Ayrıca WFOX transfeksiyonu apoptoz yoluyla pankreatik hücre koloni oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir³⁰. İnsan invaziv meme karsinomu doku örneklerinde ve meme kanseri hücre hatlarında önemli Wwox eksikliğine dair kanıtlar vardır^{31,32}. Ayrıca, azalmış WFOX ifadesi, üçlü negatif meme kanserleri, bazal fenotip ve tamoksifen direnci gibi çeşitli klinikopatolojik faktörlerle yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir³³⁻³⁵.

Çalışmamızda, KLL hastalarında, özellikle hematolojik malignitelerin kronik alt gruplarında Wwox ifadesindeki artış, bu Wwox protein izoformlarının kanserojen süreçteki rolü hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini düşündürmektedir. İleriki çalışmalarda bu izoformlar ve WFOX transkript varyantları arasındaki ilişkiyi araştırmak yararlı olacaktır.

Kaynaklar

1. Aldaz CM, Ferguson BW, Abba MC. WFOX at the crossroads of cancer, metabolic syndrome related traits and CNS pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1:188-200.
2. Bednarek AJ, Laffin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WFOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3–16q24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Research*. 2000;60:2140-5.
3. Aqeilan RI, Donati V, Palamarchuk A, Trapasso F, Kaou M, Pekarskym Y, Sudol M, Croce CM. WW domain-containing proteins, WFOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function. *Cancer Research* 2005;15:6764-72.
4. Schrock MS, Batar B, Lee J, Druck T, Ferguson B, Cho JH ve ark. Wwox-BCRA1 interaction: role in DNA repair pathway choice. *Oncogene* 2017;36:2215-27.
5. Abu-Odeh M, Salah Z, Herbel C, Hofmann TG, Aqeilan RI. WFOX, the common fragile site FRA16D gene product, regulates ATM activation and the DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:E4716-E4725.
6. Aqeilan RI, Hagan JP, de Bruin A, Rawahneh M, Salah Z, Gaudio E, Siddiqui H, Volinia S, Alder H, Lian JB, Stein GS, Croce CM. Targeted ablation of the WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor leads to impaired steroidogenesis. *Endocrinology*. 2009;3:1530-5.
7. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Taberner J, Baselga J, Tsao MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M. The landscape of somatic copynumber alteration across human cancers. *Nature*. 2010;18:899–905.
8. Wang X, Chao L, Jin G, Ma G, Zang Y, Sun J. Association between CpG island methylation of the WFOX gene and its expression in breast cancers. *Tumour Biology*. 2009;30:8-14.
9. Guo W, Wang G, Dong Y, Guo Y, Kuang G, Dong Z. Decreased expression of WFOX in the development of esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*. 2013;52:265-74.
10. Nakayama S, Semba S, Maeda N, Matsushita M, Kuroda Y, Yokozaki H. Hypermethylation-mediated reduction of WFOX expression in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *British Journal of Cancer*. 2009;100:1438-43.
11. Dias EP, Pimenta FJ, Sarquis MS, Dias Filho MA, Aldaz CM, Fujii JB, Gomez RS, De Marco L. Association between decreased WFOX protein expression and thyroid cancer development. *Thyroid*. 2007;17:1055-9.
12. Yang J, Cogdell D, Yang D, Hu L, Li H, Zheng H, Du X, Pang Y, Trent J, Chen K, Zhang W. Deletion of the WFOX gene and frequent loss of its protein expression in human osteosarcoma. *Cancer Letters*. 2010;291:31-8.
13. Ishii H, Vecchione A, Furukawa Y, Stheesophon K, Han SY, Druck T, Kuroki T, Trapasso F, Nishimura M, Saito Y, Ozawa K, Croce CM, Huebner K, Furukawa. Expression of FRA16D/ WFOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies. *Molecular Cancer Research*. 2003;1:940-7.
14. Ishii H, Furukawa Y. Alterations of common chromosome fragile sites in hematopoietic malignancies. *International Journal of Hematology*. 2004;79:238-42.
15. Nunez MI, Rosen DG, Ludes-Meyers JH, Abba MC, Kil H, Page R, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Liu J, Mills GB. WFOX protein expression varies among ovarian carcinoma histotypes and correlates with less favorable outcome. *BMC Cancer*. 2005;5(1):64.
16. Guler G, Huebner K, Himmetoglu C, Jimenez RE, Costinean S, Volinia S, Pilarski RT, Hayran M, Shapiro CL. Fragile histidine triad protein, WW domain containing oxidoreductase protein Wwox, and activator protein 2γ expression levels correlate with basal phenotype in breast cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2009;115:899-908.
17. Rodríguez D, Bretones G, Arango JR, Valdespino V, Campo E, Quesada V, López-Otín C. Molecular pathogenesis of CLL and its evolution. *International Journal of Hematology*. 2015;101:219-28.

18. Aqeilan RI, Abu-Remaileh M, Abu-Odeh M. The common fragile site FRA16D gene product WWOX: roles in tumor suppression and genomic stability. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(23):4589-99.
19. Schrock MS, Huebner K. WWOX: A fragile tumor suppressor. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2015;240:296-304.
20. Lo JY, Chou YT, Lai FJ, Hsu LJ. Regulation of cell signaling and apoptosis by tumor suppressor WWOX. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2015;240:383-91.
21. Ludes-Meyers JH, Bednarek AK, Popescu NC, Bedford M, Aldaz CM. WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenetic and Genome Research* 2003;100(1-4):101-10.
22. Adam JW, Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D, Porteous DJ, Smyth JF, Gabra H, Watson JE. WWOX: A candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:11417-22.
23. Luo L, Chen Y, Cheng X, Lin Y, Fu X, Li D, Cui Z, Lin D. Reduced expression of the WW domain-containing oxidoreductase in human hematopoietic malignancies. *Oncol Letters*. 2016;11(6):4083-8.
24. Chen X, Zhang H, Li P, Yang Z, Qin L, Mo W. Gene expression of WWOX, FHIT and p73 in acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Letters*. 2013;6(4):963-9.
25. Cui Z, Lin D, Cheng F, Luo L, Kong L, Xu J, Hu J, Lan F. The role of the WWOX gene in leukemia and its mechanisms of action. *Oncology Reports*. 2013;29(6):2154-62.
26. Yendumari S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 2003;63:878-91.
27. Baykara O, Demirkaya A, Kaynak K, Tanju S, Toker A, Buyru N. WWOX gene may contribute to progression of non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Tumour Biology*. 2010;4:315-20.
28. Donati V, Fontanini G, Dell'Omodarme M, Prati MC, Nuti S, Lucchi M, Mussi A, Fabbri M, Basolo F, Croce CM, Aqeilan RI. WWOX expression in different histologic types and subtypes of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007;13:884-91.
29. Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, Baffa R, Huebner K, Edmonds P, Croce CM. Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004;10:3053-8.
30. Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H, Rattan S, Cesari R, Nolli ML, Williams NN, Mori M, Kanematsu T, Croce CM. The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clinical Cancer Research*. 2004;1:2459-65.
31. Driouch K, Prydz H, Monese R, Johansen H, Lidereau R, Frengen E. Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene*. 2002;21:1832-40.
32. Guler G, Uner A, Guler N, Iliopoulos D, Hauck WW, McCue P, Huebner K. The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2004;100:1605-14.
33. Guler G, Himmetoglu C, Jimenez RE, Geyer SM, Wang WP, Costinean S, Pilarski RT, Morrison C, Suren D, Liu J, Chen J, Kamal J, Shapiro CL, Huebner K. Aberrant expression of DNA damage response proteins is associated with breast cancer subtype and clinical features. *Breast Cancer Research*. 2011;129:421-32.
34. Guler G, Huebner K, Himmetoglu C, Jimenez RE, Costinean S, Volinia S, Pilarski RT, Hayran M, Shapiro CL. Fhit, Wwox and AP2γ expression levels correlate with basal phenotype in breast cancer. *Cancer*. 2009;115:899-908.
35. Guler G, Iliopoulos D, Guler N, Himmetoglu C, Hayran M, Huebner K. Wwox and Ap2γ expression levels predict tamoxifen response. *Clinical Cancer Research*. 2007;13:6115-21.

Çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulunun onayıyla (No. 2017/76/07/11) ve Helsinki Bildirgesi'nin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi.
