

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDİFERANSİYE İNSAN ANAPLASTİK TİROİT
KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA
KALSİTRİOLÜN NDRG2 (N-MYC
DOWNSTREAM REGULATED GENE-2) VE NIS
(SODYUM İYOT SİMPORTER) GEN
EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİSİ**

MURAT SİPAHİ

MOLEKÜLER TIP YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-201097007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDİFERANSİYE İNSAN ANAPLASTİK TİROİT
KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA
KALSİTRİOLÜN NDRG2 (N-MYC
DOWNSTREAM REGULATED GENE-2) VE NIS
(SODYUM İYOT SİMPORTER) GEN
EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİSİ**

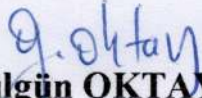
MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MURAT SİPAHİ

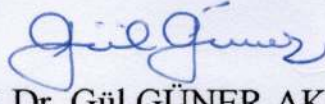
Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gülgün OKTAY

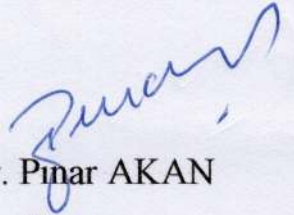
Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2012.KB.SAG.053 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSILMSc-2010970007

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Murat SİPAHİ ‘İNDİFERANSİYE İNSAN ANAPLASTİK TİROİT KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA KALSİTRİOLÜN N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE-2 VE SODYUM İYOT SİMPORTER GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİSİ’ konulu yüksek lisans tezini 24.07.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Gülgün OKTAY
BAŞKAN


Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
ÜYE


Doç. Dr. Pınar AKAN
ÜYE

Yard. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Halil RESMİ
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER TABLOSU

İÇİNDEKİLER TABLOSU	i
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 TİROİT KANSERİ.....	3
2.1.1 İnsidans.....	4
2.1.2 Mortalite	4
2.1.3 Risk Faktörleri.....	5
2.1.4 Genetik Değişiklikler	5
2.1.4.1 Somatik Mutasyonlar.....	6
2.1.4.1.1 RET/PTC Düzenlenmeleri.....	6
2.1.4.1.2 Ras Mutasyonları.....	6
2.1.4.1.3 BRAF Mutasyonları	7
2.1.4.1.4 PAX8/PPARγ Yeniden Düzenlenmesi.....	7
2.2 MUTASYONLAR VE ETİYOLOJİ.....	8
2.3 ANAPLASTİK TİROİT KANSERİ	8
2.4 DİFERANSİYASYON.....	9
2.5 D VİTAMİNİ.....	10

2.5.2	<i>D Vitamini Sentezi</i>	11
2.5.3	<i>D Vitamini Eksikliği</i>	12
2.5.4	<i>D Vitamini Toksisitesi</i>	13
2.5.5	<i>Kalsitriol ve Kanser</i>	14
2.6	<i>N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE (NDRG)</i>	16
2.6.1	<i>Myc Ailesi ve Tarihçe</i>	16
2.6.2	<i>NDRG2 ve Kanser</i>	18
2.7	<i>SODYUM İYOT SİMPORTER (NIS)</i>	19
2.7.1	<i>Tiroid Kanserinde NIS Ekspresyon Düzeyleri</i>	21
3.	<i>GEREÇ VE YÖNTEM</i>	22
3.1	<i>ARAŞTIRMANIN TİPİ</i>	22
3.2	<i>ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI</i>	22
3.3	<i>ÇALIŞMA MATERYALİ</i>	22
3.4	<i>ÇALIŞMANIN DEĞİŞKENLERİ</i>	22
3.5	<i>VERİ TOPLAMA ARAÇLARI</i>	22
3.5.1	<i>Hücre Kültürü</i>	23
3.5.1.1	<i>Hücrelerin Çözülmesi</i>	24
3.5.1.2	<i>Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi</i>	25
3.5.1.3	<i>Hücrelerin Kültür Ortamlarının Değiştirilmesi</i>	25
3.5.1.4	<i>Hücrelerin Pasajlanması</i>	26
3.5.1.5	<i>Hücrelerin Dondurulması</i>	27
3.5.1.6	<i>Hücrelerin Sayılması</i>	27
3.5.1.7	<i>Katlanma Zamanı Tayini</i>	27
3.5.2	<i>Hücre Canlılık Testi (WST-1)</i>	28
3.5.3	<i>Hücelere D Vitamini Muamelesi</i>	30

3.5.3.1	<i>Hücrelere Uygulanacak 1,25-dihidroksivitamin D₃'ün (Kalsitriolün)</i>	
	<i>Hazırlanması.....</i>	31
3.5.4	<i>Real-Time PCR (Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....</i>	32
3.5.4.1	<i>Total RNA İzolasyonu</i>	32
3.5.4.2	<i>RNA Örneklerinin Kantitasyonu</i>	34
3.5.4.3	<i>Agaroz Jel Elektroforezi</i>	34
3.5.4.3.1	<i>RNA % 1,2 Formaldehit Agaroz Jeli Hazırlama.....</i>	36
3.5.4.3.2	<i>İzole Edilen RNA Örneklerinin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi</i>	37
3.5.4.4	<i>Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....</i>	38
3.5.4.5	<i>Real-Time PCR.....</i>	39
3.5.4.5.1	<i>Real-Time PCR Formatları</i>	41
3.5.4.5.2	<i>Real-Time PCR İçin Kantitasyon Yöntemleri.....</i>	43
3.5.4.5.3	<i>Kantitasyonun Analizindeki Temel Modeller.....</i>	43
3.5.4.5.3.1	<i>Kesin Kantitasyon</i>	43
3.5.4.5.3.2	<i>Rölatif Kantitasyon</i>	44
3.6	<i>ARAŞTIRMA TAKVİMİ</i>	47
3.7	<i>VERİLEN DEĞERLENDİRİLMESİ.....</i>	48
3.8	<i>ARAŞTIRMANIN SINIRLIKLARI.....</i>	48
3.9	<i>ETİK KURUL ONAYI.....</i>	48
4.	<i>BULGULAR.....</i>	49
4.1	<i>KATLANMA ZAMANI BULGULARI</i>	49
4.2	<i>KALSTİROLÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN WST-1 İLE BELİRLENMESİ</i>	51
4.3	<i>REAL-TİME PCR BULGULARI.....</i>	61
4.3.1	<i>RNA örneklerinin %1,2 formaldehit agaroz jelde görüntülenmesi</i>	61
4.3.2	<i>RNA Örneklerinin Kantitasyonu</i>	62

4.3.3 Gen Ekspresyon Analizleri	63
4.3.3.1 NDRG2 Gen Ekspresyon Analizi.....	63
4.3.3.2 NIS Gen Ekspresyon Analizleri.....	69
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
7. KAYNAKLAR.....	82
8. EKLER.....	99
EK-1 ETİK KURUL ONAYI.....	99
EK-2 AKADEMİK CV	100

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihaz ve malzemeler.	23
Tablo 2. Hücre canlılık testi sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler.	28
Tablo 3. Deney grupları ve oluşturulma gerekçeleri.	29
Tablo 4. RNA izolasyonu sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler.	32
Tablo 5. RNA örneklerinin kantitasyonu sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler.	34
Tablo 6. %1,2 Formaldehit agaroz jelde hazırlanması ve görüntülenmesinde kullanılan cihaz ve malzemeler.	35
Tablo 7. % 1,2 Formaldehit agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.	36
Tablo 8. cDNA sentezinde kullanılan cihaz ve malzemeler.	38
Tablo 9. RT mix hazırlama.	39
Tablo 10. Real-Time PCR için kullanılan malzeme ve cihazların markaları ve kod numaraları.	46
Tablo 11. Reaksiyon karışımı.	46
Tablo 12. Araştırma takvimi.	47
Tablo 13. Nthy-ori 3-1 ve 8505C hücrelerine ilişkin gün/hücre sayısı.	49
Tablo 14. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisinin % canlılık bulguları.	51
Tablo 15. DMSO'nun 8505C hücrelerine etkisinin %canlılık bulguları.	52
Tablo 16. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri.	52
Tablo 17. DMSO'nun 8505C hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri.	52
Tablo 18. 8505C hücreleri için IC50 değerleri.	57
Tablo 19. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisine ait %canlılık bulguları.	58
Tablo 20. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri.	58
Tablo 21. 8505C hücreleri için IC50 değerleri.	60
Tablo 22. Örneklerle ait RNA miktarları.	62
Tablo 23. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri.	64
Tablo 24. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde ortalama NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.	64
Tablo 25. Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmaya ait p değeri.	64
Tablo 26. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerindeki NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler.	66

Tablo 27. 8505C hücrelerinde ortalama NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.....	67
Tablo 28. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerinde, gruplar arası NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılmasına ilişkin p değerleri.....	68
Tablo 29. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde NIS gen ekspresyon düzeyleri.....	69
Tablo 30. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde ortalama NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.....	70
Tablo 31. Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde NIS gen ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmaya ait p değeri.....	70
Tablo 32. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerindeki NIS gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler.....	72
Tablo 33. 8505C hücrelerinde ortalama NIS gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.....	73
Tablo 34. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerinde, gruplar arası NIS gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılmasına ilişkin p değerleri.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Folliküler epitelyal hücrelerden köken alan tiroid kanserinde dediferansiyasyon adımları (2).	3
Şekil 2. 1975-2006 yılları arasında kadınlar ve erkeklerde tiroid kanseri insidansındaki artış (29).	4
Şekil 3. Tiroit kanserinde rol alan ana sinyal yolları (2).	6
Şekil 4. D Vitamini sentezi.	12
Şekil 5. D vitamini metabolizması ve antikanser mekanizmaları (2).	15
Şekil 6. Sodyum-iyod simpoter ikincil yapı modeli (20).	19
Şekil 7. Tiroid bezindeki iyod transportunun şematik modeli (140).	20
Şekil 8. Deney akış şeması.	31
Şekil 9. % 1,2 Formaldehit agaroz jel hazırlama.	37
Şekil 10. İzole edilen RNA örneklerinin jele yüklenmesi.	37
Şekil 11. cDNA sentezi akım şeması (160).	38
Şekil 12. Amplifikasyon eğrisi (161).	40
Şekil 13. Syber Green I varlığında PCR (162).	41
Şekil 14. Hidroliz problemleri (162).	42
Şekil 15. Sealing foil ile kapatılmış temsili plak görüntüsü.	47
Şekil 16. Nthy-ori 3-1 katlanma zamanı grafiği.	50
Şekil 17. 8505C katlanma zamanı grafiği.	50
Şekil 18. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	53
Şekil 19. DMSO'nun 8505C hücre hattına 24 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	53
Şekil 20. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	54
Şekil 21. DMSO'nun 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	54
Şekil 22. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	55
Şekil 23. DMSO'nun 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	55

Şekil 24. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 96 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	56
Şekil 25. DMSO'nun 8505C hücre hattına 96 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	56
Şekil 26. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24-48-72-96 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulgularının dağılım grafiği.	57
Şekil 27. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	59
Şekil 28. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	59
Şekil 29. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.	60
Şekil 30. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24-48-72saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulgularının dağılım grafiği.	61
Şekil 31. RNA jel görüntüsü.	62
Şekil 32. Nthy-ori-3-1 ile 8505C hücrelerine ait NDRG2 rölatif gen ekspresyon değerleri. ..	65
Şekil 33. 8505C hücrelerine kalsitriol uygulaması sonucu NDRG2 gen ekspresyonlarındaki değişimler. *p < 0,05.	68
Şekil 34. Nthy-ori-3-1 ile 8505C hücrelerine ait NIS rölatif gen ekspresyon değerleri.	71
Şekil 35. 8505C hücrelerine kalsitriol uygulaması sonucu NIS gen ekspresyonlarındaki değişimler.	74

KISALTMALAR

AIT: Apikal iyod taşıyıcı
ATK: Anaplastik tiroid kanseri
BRAF: V-raf fare sarkoma viral onkogen homologu B1
CDK2: Siklin bağımlı kinaz 2
c-Myc: Myelositomasis hücrel onkogen homologu
CP: Aşma noktası
CYP24A1: 24-hidroksilaz
CYP27A1: 27-hidroksilaz
CYP27B1: 1-alfa-hidroksilaz
CYP2R1: 25-hidroksilaz
DMSO: Dimetilsülfoksit
DTK: Diferansiye tiroid kanseri
FBS: Fetal bovin serum
HIF-1: Hipoksiyle indüklenen faktör-1
HRAS: Transforme edici protein 21
IC50: İnhibitör konsantrasyonu 50
Ikb: Nükleer faktör kappa B inhibitör proteini
IL-1: İnterlökin-1
IL-8: İnterlökin-8
İİAB: İnce iğne aspirasyon biyopsisi
KRAS: Kirsten sıçan sarkoma viral homologu
MAPK: Mitojen ile aktiflenen protein kinaz
miRNA: MicroRNA
NDRG2: N-myc Downstream Regulated Gene
NFkB: Nükleer faktör kappa B
NIS: Sodyum-iyod simporter
NRAS: Nöroblastoma RAS viral onkogen homologu
NTRK1: Nörotropik tirozine kinaz reseptör tip I
p21/Waf/kip1: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A
p27/kip1: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B
p53: Protein 53

PAX8/PPAR γ : Paired box gene 8 / Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör

PBS: Fosfat tamponu

PI3K-AKT: Fosfoinositid 3 kinaz- serin treonin spresik protein kinaz

PTK: Papiller tiroid kanseri

RET/PTC: Papiller tiroid kanserin RET geni yeniden düzenlenmeleri

rhTSH: Rekombinant insan tiroid uyarıcı hormonu

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute medium 1640

RTP: İndirgeyici ajan ve tunikamisin yanıt proteini

RT-PCR: Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RXR: Retinoid X reseptörü

Tg: Tiroglobulin

ThOX1: Tiroid oksidaz 1

ThOX2: Tiroid oksidaz 2

TPO: Tiroid peroksidaz

TSH: Tiroid uyarıcı hormon

VDR: Vitamin D reseptörü

VDRE: Vitamin D yanıt elemanları

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

v-Myc: Myelositomazis viral onkogen homoloğu

WST: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum

TEŞEKKÜR

Üniversite sınavını ilk seferinde kazanamadığım zaman odama gelip “Bana evlat lazım, üniversite değil” diyerek beni hayata döndüren babam Fadıl SİPAHİ’yi; sağduyusunu, sıcaklığını, hoşgörüsünü ve neşesini hala hissedebildiğim annem Nazife SİPAHİ’yi rahmetle anıyorum. Bana bıraktığınız güzel anılar o kadar çok ki, kimi zaman kalbime sığdıramıyorum ikinizi de.

Çocukluğumda beni yaramazlık konusunda sabırla eğiten, bana kitap okumayı, santranc oynamayı sevdiren; zekâsına, bilgi birikimine, kültürüne hep saygı duyduğum ağabeyim Can SİPAHİ’ye,

Tanıştığımız günden bu yana sadece bilgi birikimiyle değil, güler yüzünü ve hoşgörüsünü benden biran olsun eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Gülgün OKTAY’a,

Desteğini ve güler yüzünü her zaman hissettiğim Moleküler Tıp Anabilim Başkanı Gül GÜNER AKDOĞAN’a

Bu süreçte beni yalnız bırakmayan, pratik zekâsı, tecrübesi, azmi ve çalışkanlığı ile beni her zaman şaşırtmayı başaran, yol arkadaşım Didem KELEŞ’e,

Her türlü laboratuvar desteğini sağladıkları için ARLAB ve UYDU LAB çalışanlarına,

Bana kız kardeş sevgisini tattıran 21 yıllık dostum Vildan MANAVOĞLU’na,

Yokluğunda dahi varlığını hissedebildiğim, telefonun diğer ucundaki adam Hilmi Can DALLIKAVAK’a

Beni benden çok düşünen, alçak gönüllülüğünden asla taviz vermeyen can dostum Önder KARADAŞ’a

Özlemini çektiğim aile saadetini bana yaşatan Tuğçe-Serhat E. AKSOY çiftine,

En sancılı dönemlerimde tüm kaprislerimi, hırçınlıklarımı hoşgörüyle karşılayan, benden biran olsun vazgeçmeyen üniversitede tanıştığım muhteşem yediliye,

Bu araştırmaya destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi’ne teşekkürü bir borç bilirim.

Murat SİPAHİ

ÖZET

**İNDİFERANSİYE İNSAN ANAPLASTİK TİROİT KARSİNOMA HÜCRE
HATTINDA KALSİTRİOLÜN NDRG2 (N-MYC DOWNSTREAM REGULATED
GENE-2) VE NIS (SODYUM İYOT SİMPORTER) GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİSİ**

Murat SİPAHİ

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 35340 İnciraltı-İzmir**

Giriş: Anaplastik tiroid kanseri en agresif neoplazilerden biridir. Sodyum-iyod simporter ve TSH-reseptöründeki ekspresyon kayıpları, tiroidektomi ya da radyoaktif iyodür tedavisi gibi konvansiyonel tedavilerin sonuçsuz kalmasına neden olmaktadır. Ameliyat, radyoterapi ve agresif kemoterapi ajanlarının birlikte kullanıldığı multimodel tedavilere rağmen, sağ kalım oldukça düşüktür. Bu nedenle anaplastik tiroid kanserinin tedavisinde tümör büyümesini inhibe edici ve diferansiyasyonu tetikleyici, kemoterapötikler ile kullanımında düşük sitotoksosite gösteren ajanların geliştirilmesi önemlidir.

Amaç: Bu çalışmanın amacı Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde N-Myc Dowstream Regulated Gene-2 (NDRG2) ve Sodyum-İyot Simporter (NIS) gen ekspresyonlarındaki olası farkın karşılaştırılması ve 1,25-dihidroksivitamin D₃'ün (kalsitriol) farklı sürelerde inübasyonunun 8505C hücrelerinde hücre canlılığı ile NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları üzerindeki meydana getirebileceği olası değişimlerin incelenmesidir.

Materyal ve Yöntemler: Çalışma, Nthy-ori-3-1 normal insan tiroid folliküler epitelyal hücreleri ile 8505C indiferansiye insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerinde gerçekleştirildi. Her iki hücre hattındaki başlangıç NDRG2 ve NIS gen ekspresyon düzeyleri Real-Time Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) ile incelendi. Kalsitriolün 8505C hücre hattında, hücre canlılığı üzerindeki etkisi WST-1 testi ile değerlendirildi. Kalsitriolün 8505C hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları üzerinde meydana getirdiği olası değişimler de RT-PCR ile değerlendirildi.

Bulgular: Nthy-ori-3-1 hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları, 8505C hücrelerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu. WST-1 bulgularına göre 8505C hücrelerinin 60 nM

kalsitriol ile 24,48 ve 72 saat inkübasyonları sonucu, kalsitriolün hücre canlılığı üzerinde sırasıyla %62, %63 ve %56 düzeyinde azalma meydana getirdiği gözlemlendi. 60 nM kalsitriol ile 24 ve 48 saat inkübe edilen 8505C hücreleri ile kalsitriol uygulanmayan kontrol grubu arasında NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları bakımından anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuç: Nthy-ori-3-1 hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları 8505C hücrelerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu. Ancak kalsitriolün 8505C hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları üzerinde anlamlı bir fark yaratmadığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: Anaplastik tiroid kanseri, 1,25-dihidroksivitamin D₃, N-myc Downstream Regulated Gene-2, Sodyum-İyot Simporter

ABSTRACT
**THE POSSIBLE EFFECT OF CALCITRIOL ON NDRG2 (N-MYC DOWNSTREAM
REGULATED GENE-2) AND NIS (SODIUM-IODIDE SYMPORTER) GENE
EXPRESSIONS IN UNDIFFERENTIATED HUMAN ANAPLASTIC THYROID
CANCER CELL LINE**

Murat SİPAHİ

**Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences,
Department of Molecular Medicine, 35340, Inciralti, Izmir**

Background: Anaplastic thyroid cancer is one of the most aggressive neoplasm. The loss of expressions in sodium-iodide symporter and TSH-receptor leads to failed conventional therapies such as thyroidectomy and radioactive iodide treatment. Despite surgery, radiotherapy and chemotherapy agents used in combination with aggressive multimodal therapies, the survival rate is extremely low. Thus, it is important to develop tumor growth inhibiting and differentiation inducing agents which can be used with chemotherapeutics that have low cytotoxicity.

Aim: The aim of this study is to compare the possible difference of N-myc Downstream Regulated Gene-2 (NDRG2) and Sodium-Iodide Symporter (NIS) gene expressions in Nthy-ori-3-1 and 8505C cells and to investigate the possible effects of 1,25- dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) on cell viability as well as NDRG2 and NIS gene expressions in 8505C cells with different incubation time.

Material and Methods: This study was carried out on Nthy-ori-3-1, normal human thyroid follicular epithelial cells and 8505C, undifferentiated human anaplastic thyroid carcinoma cell line. The basal expression levels of NDRG2 and NIS on both cell lines were investigated with RT-PCR. The effect of calcitriol on cell viability was evaluated with WST-1 test. The changes in NDRG2 and NIS gene expressions in calcitriol treated 8505C cells were also investigated with Real-Time Polymerase Chain Reaction.

Results: NDRG2 and NIS gene expressions were found significantly higher in Nthy-ori-3-1 cells compared with 8505C cells. According to WST-1 test results, the incubation of 8505C

cells with 60 μ M calcitriol by 24 - 48 and 72 hours resulted in 62% - 63% and 56% decrease in cell viability, respectively. No significant differences were found in NDRG2 and NIS gene expressions between control group without calcitriol and 8505C cells which were incubated with 60 μ M calcitriol by 24 and 48 hours.

Conclusions: NDRG2 and NIS gene expressions were found significantly higher in Nthy-ori-3-1 cells compared to 8505C cells. However, it was shown that calcitriol didn't lead to any differences on NDRG2 and NIS gene expressions in 8505C cells.

Keywords: Anaplastic thyroid cancer, 1-25dihydroxvitamin D₃, N-myc Downstream Regulated Gene-2, Sodium-Iodide Symporter

1. GİRİŞ VE AMAC

Tiroid bezinde meydana gelen ve malign bir neoplazi olan tiroid kanseri endokrin organlarda en sık görülen malignitedir. Özellikle sanayileşmiş ülkelerde insidansı hızla artmaktadır ve Birleşik Devletlerde geçen 30 yıl içinde insidansın üçe katlandığı bildirilmiştir (1).

Anaplastik tiroid kanseri (ATK), en az görülen tiroid kanseri türü olmasına rağmen çok hızlı seyretmesi nedeniyle tiroid tümörlerinin en agresif olanıdır. Anaplastik karsinomalar *de novo* oluşabildikleri gibi papiller ve folliküler karsinomaların birkaç dediferansiyasyon adımı geçirmesiyle de meydana gelebilirler (2). Anaplastik tiroid kanseri geç yaşlarda (60-70) daha sık gözlenir (3). Tanı konduktan sonra ortalama yaşam süresi 6 aydır (4).

Yağda çözünür bir vitamin olan D vitamini insanlarda prohormon olarak fonksiyon gösterir ve güneş ışığının yeterli olduğu koşullarda Vitamin D₃ şeklinde sentezlenir. Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D₃ (kalsitriol), vitamin D reseptörü (VDR) ile etkileşerek hücrede bir dizi moleküler olayı tetikler. Böylece kalsiyum metabolizması, hücre proliferasyonu ve immun cevap düzenlenir (5). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar D vitamininin hücre büyümesi (6-8) , apoptoz (9-11), anjiyogenez (12, 13) ve inflamasyon (14) için önemli olan gen ekspresyonları üzerinde direkt ya da indirekt etki ettiğini belirterek anti-kanser potansiyelinde olduğunu göstermiştir.

N-Myc Downstream Regulated Gene-2 (NDRG2), N-Myc Downstream Regulated Gene (NDRG) protein ailesinin bir üyesidir (15) ve hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ile stres yanıtlarında rol oynar. Kanser alanında yapılan son çalışmalar, bu proteinin tümör büyümesi ile tümörün invazyon ve metastaz yeteneğini azaltarak tümör baskılayıcı fonksiyonun yanı sıra tümör diferansiyasyonunu indükleyici özellikte olduğunu göstermiştir (16-19).

Sodyum-iyod simporter (NIS) 13 transmembran domaininden oluşan membrana bağlı bir glikoproteindir. Follikül hücrelerinin bazolateral membranında eksprese olur ve kandaki iyodürün follikül hücrelerinde birikmesine aracılık eder (20). Anaplastik kanserinde sodyum-iyod simporter (NIS) ve TSH-reseptöründeki (TSH-R) ekspresyon kaybı, tiroidektomi ya da radyoaktif iyodür tedavisi, gibi konvensiyonel tedavilerin sonuçsuz kalmasına neden olmaktadır (21).

Bu çalışmada, Nthy-ori 3-1 insan tiroid folliküler epitelyal hücreleri ile 8505C insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde diferansiyasyon ilişkisi bir gen olan NDRG2 ve tiroid

kanserinde diferansiyasyon belirteci olarak tanımlanmış NIS gen ekspresyonları arasındaki olası fark ile kalsitriolün 8505C hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonu üzerinde meydana getirebileceği olası değişimlerin incelenmesi planlandı. Bu plan doğrultusunda iki hipotez meydana getirildi.

Hipotez 1: “Nthy-ori 3-1 hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları 8505C hücrelerinde göre anlamlı ölçüde fazladır.”

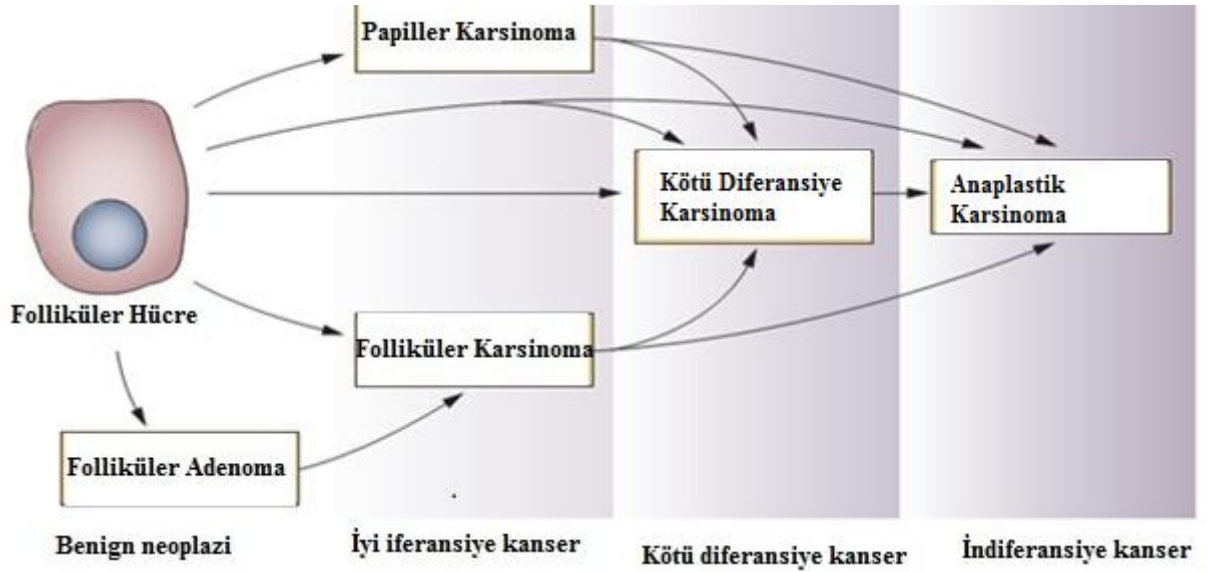
Hipotez 1: “Kalsitriol, 8505C hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları anlamlı ölçüde arttırır.”

Bu amaçla uygun kalsitriol dozu, “WST-1 Hücre Canlılık” testi ile belirlendi. Her iki hücre hattı arasındaki genlerin ekspresyon farklılıkları ile kalsitriolün gen ekspresyonları üzerindeki etkileri “Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)” ile değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 TİROİT KANSERİ

Tiroid kanseri endokrin organlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür. Tiroid tümörlerinin büyük bir bölümü tiroid folliküler epitelyal hücrelerden, %3-5'i parafolliküler ya da C hücrelerinden meydana gelir. Folliküler hücre kaynaklı tiroid kanserleri, iyi diferansiye papiller ve folliküler karsinoma, kötü diferansiye karsinoma ve anaplastik (indiferansiye) karsinoma olarak alt sınıflara ayrılır (2). Folliküler adenomalar, bazı folliküler karsinomalara öncülük edebilen benign tümörlerdir. Kötü diferansiye ve anaplastik tiroid karsinomalar *de novo* oluşabildikleri gibi papiller ve folliküler karsinomaların birkaç dediferansiyasyon adımıyla geçmesiyle de meydana gelebilirler (Şekil 1).



Şekil 1. Folliküler epitelyal hücrelerden köken alan tiroid kanserinde dediferansiyasyon adımları (2).

Tiroid kanseri, yetişkinlerin büyük bir kısmında elle muayene ve görüntülemeyle fark edilen tiroid nodüllerinde meydana gelir (22). Çoğu tiroid nodülü benign'dir ve klinik açıdan kanser barındıran nodüllerin doğru ve hızlı şekilde tanımlanması büyük önem teşkil eder.

Tiroid nodüllerinden ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİBA) ile örnek alınarak yapılan sitolojik inceleme günümüzde en tutarlı ve en yaygın tanısal araçtır. Çoğu durumda nodüllerin benign ya da malign olmaları ile ilgili kesin bir tanı konsa da, tüm olguların %25'inde İİBA ile kesin bir sonuca ulaşılamamaktadır (23-27). Bu tip nodüller yeni diyagnostik yaklaşımları

gerektirmektedir.

2.1.1 İnsidans

Hundahl ve arkadaşlarının US National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) veri tabanı üzerinde yaptıkları çalışmada, 1985 ile 1995 yılları arasında 53.856 tiroid kanseri olgusunun kayda alındığını bildirmişlerdir (28). Benzer bir rapor Europe of GLOBOCAN 2000 tarafından ortaya sunulmuş, 2000 yılında dünya genelindeki tiroid kanseri olgu sayısının 122.803 olduğu ve tiroid kanserine bağlı 8570 ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir (29). Bu bilgilerin yanı sıra, son 30 yıl içerisinde tiroid kanseri insidansında Amerika başta olmak üzere, Asya, Avrupa ve Güney Amerika'da yaklaşık 2,5 kat bir artış gözlemlendiği saptanmıştır (29, 30). Dünya genelinde tiroid kanserinde en büyük artış ise %177,8 erkeklerde ve %252,2 kadınlarda olmak üzere Güney Avustralya'dadır. İnsidanstaki artış büyük ölçüde, ultrasonografi başta olmak üzere yüksek çözünürlüklü görüntülemenin ve küçük nodüller üzerinde ince iğne aspirasyon biyopsisinin (İİAB) artan kullanımının bir sonucudur. 1975-2006 yılları arasında, kadınlarda ve erkeklerde görülen tiroid kanseri olgularının yıllara bağlı grafiği aşağıda belirtilmiştir (29) (Şekil 2).



Şekil 2. 1975-2006 yılları arasında kadınlar ve erkeklerde tiroid kanseri insidansındaki artış (29).

2.1.2 Mortalite

Birçok tiroid kanseri olgusunda iyi prognoz gözlenmesinden dolayı, tiroid kanserine

bağlı yıllık ölüm oranı oldukça düşüktür; milyonda ortalama beş ölüm gerçekleşmektedir. Mortalite oranları, özellikle 50 yaş altı bireylerde oldukça düşmektedir. ABD’de, tiroid kanserine bağlı yıllık yaklaşık 1490 ölüm gerçekleştiği bildirilmiş (31), bu sayının tüm kanserlere bağlı ölümlerin yalnızca %0,26’sını oluşturduğu bildirilmiştir. Artan insidansa rağmen, erken tanı, gelişmiş tedaviler, anaplastik tiroid kanserinde azalan insidans nedeniyle, son 50 yılda mortalite azalmıştır. Öyle ki, tiroid kanserine ilişkin 5 yıllık sağ kalım oranı %80 iken, 1992-1999 yılları arasında bu oran %96’ya ulaşmıştır.

2.1.3 Risk Faktörleri

Tiroid kanseri insidansı ile belirli risk faktörleri arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Bunların bazıları aşağıda belirtilmiştir:

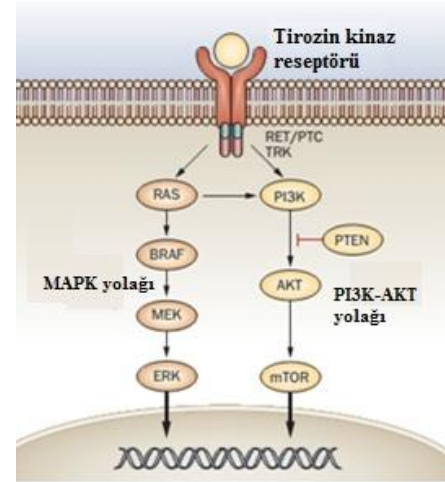
- 1- Tiroid kanserinde insidans, yaş ile birlikte artar.
- 2- Kadınlarda görülme sıklığı, erkeklerden daha yüksektir (32). Bu duruma hormonların neden olduğu belirtilmektedir. Bazı çalışmalar, hamilelik süresince meydana gelen biyolojik değişimlerin tiroid kanseri riskini arttırdığını belirtmiştir (33-35).
- 3- Hashimoto tiroiditinin, tiroid lenfoma gelişimi riskini arttırdığı saptanmıştır (36).
- 4- İyot bakımından fakir bir diyet ve radyasyona maruz kalmak tiroid kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır (32).

2.1.4 Genetik Değişiklikler

Diğer kanser türlerine benzer şekilde, tiroid kanserinin başlangıcı ve ilerleyişi, aktifleyici ve inaktifleyici somatik mutasyonları, gen ekspresyon paternlerinde meydana gelen değişimleri, microRNA (miRNA) disregülasyonunu ve anormal gen metilasyonunu kapsayan çeşitli genetik ve epigenetik değişimlerin aşamalı olarak birikimi sonucu meydana gelir. Bu değişimler içerisinde, elde edilen birçok veri, erken transformasyon sürecinde meydana gelen ve kanser gelişiminde rol alan somatik mutasyonlarla ilgilidir.

2.1.4.1 Somatik Mutasyonlar

Tiroid kanserinde yer alan çoğu mutasyon, MAPK yolağı ile PI3K-AKT yolağının etkilerini içermektedir (Şekil 3). MAPK yolağının aktivasyonu tümör başlangıcı için çok önemlidir. Bu yolakları etkileyen, mutasyona uğramış genler hücre-membran reseptör kinazları olan RET ve NTRK1 ile intrasellüler sinyalleticileri BRAF ve RAS'ı kodlar. Bu tipik mutasyonlar papiller tiroid kanseri olgularının yaklaşık %70'inde görülmektedir (37-40). Folliküller tiroid kanserinde, RAS mutasyonuna ek olarak, yaygın olan diğer bir olay PAX8/PPAR γ yeniden düzenlenmesidir. Tiroid kanserinin ilerleyişi ve dediferansiyasyonu, PI3K-AKT yolağını ve diğer sinyal yollarını etkileyen ek mutasyonları içerir.



Şekil 3. Tiroid kanserinde rol alan ana sinyal yolakları (2).

2.1.4.1.1 RET/PTC Düzenlenmeleri

RET/PTC papiller tiroid kanserinde görülen kromozomal bir yeniden düzenlenmedir (41). Yeniden düzenlenmenin sonucu olarak, RET geninin bir kısmı birtakım olası genlerle birleşir. RET geninin bir kısmını içeren bu genler, RET proteinine ait ve bütünlüğü bozulmamış tirozin kinaz domainini kodlar. Bu durum, tiroid hücrelerinde MPK sinyal yolağının devamlı uyarılmasına ve tümöröenez ile sonuçlanan RET/PTC proteinin ekspresyonu ile ligand bağımlı dimerizasyonuna neden olur (42-44).

2.1.4.1.2 Ras Mutasyonları

İnsan HRAS, KRAS ve NRAS genleri, hücre membranının iç yüzeyinde yer alan ve hücre membran reseptör kinazları ile G-protein eşlikli reseptörler olan MAPK, PI3K-AKT ve diğer sinyal yollarından türeyen sinyalleri ileten G-proteinlerini kodlarlar. Aktive edici nokta mutasyonları, RAS geninde tipik olarak 12,13 ve 61 nolu kodonları etkilemektedir. Tiroid kanserinde, NRAS 61 nolu kodon ile HRAS 61 nolu kodon mutasyonları yaygındır. RAS

mutasyonları papiller tiroid kanseri olgularının %10-20'sinde, folliküler tiroid kanseri olgularının %40-50'sinde, kötü diferansiye ve anaplastik karsinomaların %20-40'ında görülmektedir (45-51).

2.1.4.1.3 BRAF Mutasyonları

Bir serin-treonin kinaz olan BRAF, RAS tarafından bağlandıktan ve aktive edildikten sonra hücre membranına transloke olarak MAPK kinaz ve diğer aşağı-yönlü hedeflerin fosforilasyonu ile aktivasyonuna neden olur. Tiroid kanserinde BRAF nokta mutasyonları, insersiyonlar ya da kromozomal yeniden düzenlenmeler tarafından aktiflenebilir. Aktivasyon mekanizmalarından en yaygını 1799 nolu nükleotitteki timin-adenin değişimidir ve 600 nolu rezidüde valin-glutamat değişimi (Val600Glu) ile sonuçlanır (38, 40). Bu tip BRAF mutasyonu, tiroid kanserindeki tüm BRAF mutasyonlarının %98-99'unu oluşturur. Diğer değişimler Lys601Glu nokta mutasyonunu, 600 nolu kodonu içeren küçük çerçeve içi insersiyonlarını ya da delesyonlarını (52-56) ve AKAP9/BRAF yeniden düzenlenmesini içerir (57).

BRAF Val600Glu aminoasit yer değişimi papiller tiroid kanserinde en sık görülen (olguların %40-45'inde) genetik değişikliktir (58). Mutasyon aynı zamanda kötü diferansiye tiroid kanserlerinin %20-40, anaplastik tiroid kanserlerinin %30-40'ında görülmektedir (59-62).

2.1.4.1.4 PAX8/PPAR γ Yeniden Düzenlenmesi

Bu yeniden düzenlenme, PAX8 geninin bir kısmı ile PPAR γ geninin füzyonunu içerir. Bu füzyon kimerik PAX8/PPAR γ proteininin güçlü overekspresyonu ile sonuçlanır (63, 64) .

PAX8/PPAR γ yeniden düzenlenmesi folliküler tiroid kanserlerinin %30-35'inde görülür (65-67). Çoğu çalışmada, bu yeniden düzenlenme bazı folliküler adenomalar (%2-13) ile papiller kanserinin folliküler biçimlerinin ufak bir kesminde (%1-5) yer aldığı belirtilmiştir (65-69).

2.2 MUTASYONLAR VE ETİYOLOJİ

Geçen on yıl içinde, tiroid kanserinde meydana gelen genetik değişimler hakkında artan bilgiler tiroid kanseri etiyolojisinde yeni yaklaşımların gündeme gelmesini, tiroid nodülü bulunan hastalarda gelişmiş ve kişiye özgü yeni diyagnostik araçlar ile prognostik belirteçlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Papiller tiroid kanserinde, belirli kromozomal yeniden düzenlenmeler ile tiroid kanseri için iyi bilinen bir risk faktörü olan iyonize radyasyona maruz kalma arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. RET/PTC yeniden düzenlenmeleri, kazayla radyasyona maruz kalma (çoğunlukla radyoiodine) ya da terapötik radyasyon alma (çoğunlukla eksternal ışın) ile meydana gelen papiller karsinoma olgularının %80'inde görülmektedir (70-72). Çernobil kazasından sonra, RET/PTC3 yeniden düzenlenmesi ile farklı türlerdeki RET/PTC yeniden düzenlenmelerindeki sıklığın arttığı bildirilmiştir (70-73). Diğer bir kromozomal yeniden düzenlenme olan BRAF/AKAP9 da radyasyon maruz kalma sonucu oluşan papiller karsinomaların çoğunda bulunmaktadır (57). Çernobil kazasından sonra radyasyona maruz kalma sonucu tiroid kanserinin görüldüğü çocuklar arasında, hem RET/PTC hem BRAF/AKAP9 prevalansı, 10 yıldan daha kısa sürede oluşmuş tümörlerde, daha uzun sürelerde meydana gelen tümörlerden daha yüksektir (57, 70). Tam tersi durum radyasyonla ilişkili tümörlerde nadiren görülen fakat genel popülasyonda yaygın bulunan BRAF ve RAS genlerinde nokta mutasyonları için geçerlidir (74). Japonya'da atom bombası sonrası sağ kalan papiller karsinoma olguları arasında, artan RET/PTC prevalansı ile artan radyasyon dozu arasında güçlü pozitif bir ilişki, BRAF nokta mutasyonları ile radyasyon dozu arasında ters bir ilişki bulunduğu bildirilmiştir (75, 76).

2.3 ANAPLASTİK TİROİT KANSERİ

Anaplastik tiroid kanseri (ATK) primer malign tiroid neoplazilerin %5-15'ini oluşturur (77). Papiller ve foliküller tiroid kanserlerinin aksine, ATK en agresif neoplazilerden biridir (78). Ortalama sağ kalım genelde tanı konduktan sonra 6 aydır (4). Nadir görüldüğü için, yeterli sayıda hastayla çalışmak ve tümörün doğal histolojisini ve sağ kalımı etkileyen faktörleri anlamak zordur.

ATK'nin görülme sıklığı, milyonda bir ya da ikidir ancak coğrafik olarak farklılık

gösterir. Avrupada'ki insidansı Amerika'dakinden daha yüksektir (79). Ayrıca, endemik guatr bölgelerinde insidansın daha yüksek olduğu bildirilmiştir (80).

Anaplastik tiroid kanserinin kadınlarda görülme sıklığı ise erkeklere göre daha fazladır. İndisansın yaşamın altıncı ve yedinci onyılında pik verdiği gözlenmiştir (3). Bu gözlemler, ATC hastalarının %68'inin 70 yaş üstü olduğu ve olgularının %70'nin kadınlarda, %30'unun erkeklerde gözlemlendiğini bildiren çalışmalarla desteklenmiştir (81).

Anaplastik tiroid kanseri için tam olarak tanımlanan herhangi bir risk faktörü bulunmamaktadır. Geçmişinde tiroid bezi ile ilgili herhangi bir hastalığı olmayan kişilerde ortaya çıktığı gibi, guatr geçmişi olan kişilerde ATK ile birlikte diferansiye tiroid kanseri de ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte ATK'nın endemik guatrın olduğu yerlerde daha yaygın olduğu ve iyod bakımından zengin tuz tüketiminin ATK insidansında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (82).

2.4 DİFERANSİYASYON

Diferansiyasyon ve anaplazi, bir hücrenin morfolojik ve fonksiyonel olarak normal öncüsüne ne kadar benzediği ile ilgilidir. Bir hücre ne kadar iyi diferansiye ise, normal akranlarının işlevsel yetenekleri o kadar kendisinde barındırır.

Benign hatta iyi diferansiye neoplaziler, genellikle endokrin bezlerde meydana gelen kanserlerdir; normal akranlarına morfolojik ve fonksiyonel açıdan oldukça benzeyen iyi diferansiye hücrelerden oluşurlar.

Malign neoplazmlar ise, iyi diferansiyeden tamamen indiferansiye arasında değişen hücre diferansiyasyonu ile karakterizedir. Örneğin, iyi diferansiye tiroid adenokarsinomu normal görünümde folliküller içerebilir. Böyle tümörleri benign proliferasyonlardan ayırmak bazen güç olabilir. İki uç arasındaki tümörler orta diferansiye tümörler olarak değerlendirilir.

Diferansiyasyon kaybı veya anaplazi, malignitenin önemli özelliği olarak kabul edilir. Geriye dönüş anlamına gelen anaplazi terimi, normal bir hücrede dediferansiyasyonu, diğer bir anlatıyla hücredeki yapısal ve işlevsel özelliklerin kaybını yansıttmasının yanı sıra bir hücrede diferansiyasyonun olmaması anlamına da gelir. Çünkü bazı kanserlerin dokudaki kök hücrelerden meydana geldiği bilinmektedir, böyle durumlarda tümörü oluşturan hücrelerde dediferansiyasyondan çok diferansiyasyonun gerçekleşmemiş olması durumu (indiferansiyasyon) söz konusudur (83)

2.5 D VİTAMİNİ

2.5.1 Keşfi ve Tarihçesi

D vitaminin tarihçesi 17. yüzyıla kadar uzanmaktadır. D vitamini eksikliğinden kaynaklanan bir kemik hastalığı olan raşitizm 1650 yılında F. Glisson tarafından tanımlanmış, raşitizm için birçok neden ve tedavi önerilmiştir (84). Her ne kadar morina karaciğeri yağı o zamanlar ilaç olarak kullanılsa da, ilk defa D. Scheutte 1824 yılında morina karaciğeri yağ kullanımını raşitizm tedavisi olarak önermiştir. 1906 yılında Hopkins, iskorbüt veya raşitizm gibi hastalıkların önlenmesi için birtakım temel besin faktörlerinin gerekliliğine dikkati çekmiştir (85).

McCollum ve arkadaşları 1914 yılındaki araştırmalarında (86), genç sıçanlarda gözlerde kuruluğa yol açan bir göz hastalığı olan kseroftalminin tedavisi amacıyla tereyağından yağda çözünür, sabunlaşmayan bir madde izole etmişlerdir. Bu maddeyi “yağda-çözünür faktör A” daha sonra da “A vitamini” olarak isimlendirmişlerdir.

Mellanby yavru köpekleri düşük miktarda yağ içeren süt ve ekmekle beslemiş, X-ray, kemik-kalsiyum tahlili ve kemik histolojisini incelemesi sonucu köpekler ile ratışık çocukların arasında büyük bir benzerlik olduğunu saptamıştır. Köpeklerin diyetine suda çözünür B vitamini sağlama amacıyla maya ve iskorbütü engelleme amacıyla C vitamini (portakal suyu) eklemesi herhangi bir değişim meydana getirmemiştir. Raşitizmi, diyetlerine tereyağı ya da en etkili olarak morina karaciğeri yağı ekleyerek önlemiştir. Bu sebepten ötürü, raşitizmin [McCollum’un] yağda-çözünür faktör A ya da ona benzer bir maddenin alımındaki eksiklikten dolayı meydana geldiği yorumunu yapmıştır (87).

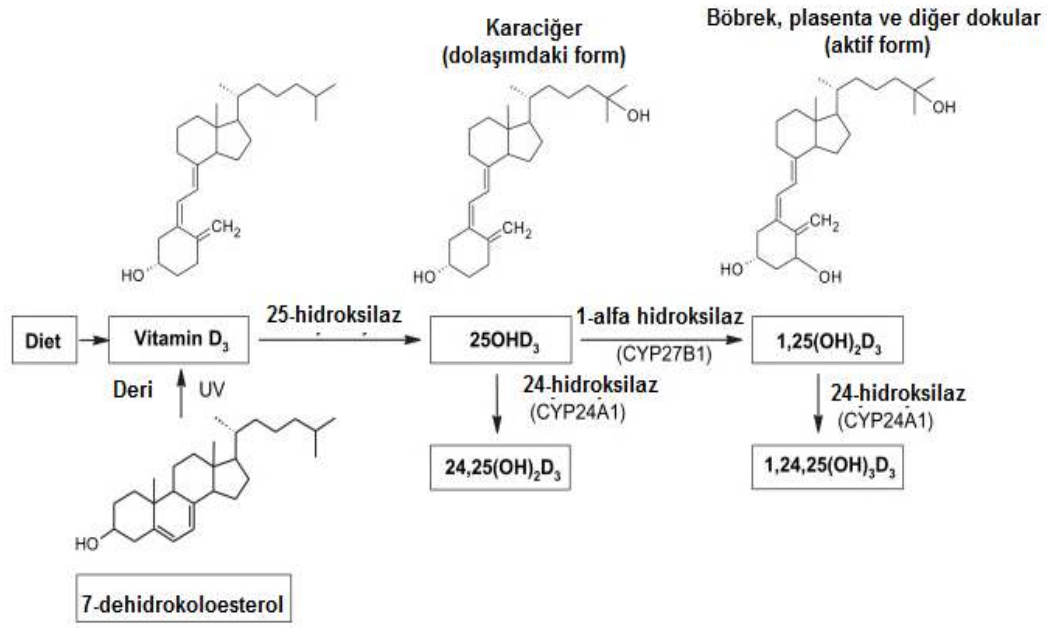
1920’de Hopkins tereyağındaki yağda-çözünür faktör A’nın havanlandırmayla ya da ısıtmayla yok olabileceğini saptamıştır. Tereyağı ile beslenen sıçanlarda kseroftalmi geliştiğini, sıçanların 40-50 gün içinde öldüklerini bildirmiştir (88).

Kilit deneme 1922 yılında McCollum ve arkadaşları tarafından yapılmış, bu denemede ısıtılmış okside olmuş morina karaciğeri yağının sıçanlarda kseroftalmiyi iyileştirmede ancak raşitizmi tedavi edebileceğini saptamışlardır. Bunun üzerine “Oksidasyonun, kemik gelişiminde önemli rolü olan diğer maddeyi yok etmeden, yağda-çözünür faktör A’nın yıkıldığını göstermektedir” yorumu yapmışlardır. Yağda çözünür faktör A’nın iki bileşenden oluştuğu sonucuna varmışlardır; biri “A vitamini” diğeri yeni keşfedilen antiraşitik bir faktör.

Suda çözünür faktörlere B vitamini, anti-iskorbütik faktöre C vitamini adı verildiğinden bu yeni faktöre D vitamini adı verilmiştir (89).

2.5.2 D Vitamini Sentezi

D vitamini her ne kadar diyet yoluyla D₃ vitamini (kalsiferol) ve D₂ vitamini (ergokalsiferol) formlarında alınabilse de, ihtiyacın büyük bir kısmı güneş ışığı tarafından karşılanır (90). Bu sentez yolağında kolesterol hidroksillenir (7-dehidrokolesterol ya da pro-vitamin D₃) daha sonra deride ultraviole ışık tarafından pre-vitamin D₃'e dönüştürülür. Pre-vitamin D₃ (kolekalsiferol) kandaki D vitamini bağlayıcı proteinlere bağlanarak karaciğere taşınır. Hepatositlerin endoplazmik retikulumunda 25-hidroksilaz enzimi (CYP2R1 geni tarafından kodlanır) pre-vitamin D₃'ü, 25 nolu pozisyonundan hidroksiller, bu sayede dolaşımdaki başlıca form olan 25-hidroksivitamin D₃ [25(OH)D₃ ya da kalsidiol] oluşur. Bu adımda CYP27A1 geni tarafından kodlanan sterol 27-hidroksilaz enzimi de rol almaktadır. Ancak insanlarda 25-hidroksilaz enzimi daha aktiftir. Böbreklerde, 1-alfa hidroksilaz enzimi (CYP27B1 geni tarafından kodlanır), 25-hidroksivitamin D₃'ün 1 nolu pozisyonuna ikinci bir hidroksil grubu ekleyerek hormonal olarak aktif 1,25-dihidroksivitamin D₃'ü (1,25(OH)₂D₃) yani kalsitriolü meydana getirir (91). Kalsidiol ve kalsitriol, CYP24A1 tarafından kodlanan 24-hidroksilaz enzimi tarafından yıkılır; yıkım ürünleri sırasıyla 24,25(OH)₂D₃ ve 1,24,25(OH)₃D₃'tür (92) (Şekil 4).



Şekil 4. D Vitamini sentezi.

Vitamin D'nin tüm biyolojik aktiviteleri nükleer hormon reseptör ailesinden olan vitamin D reseptörü (VDR) ile etkileşimi sonucu meydana gelir. Vitamin D reseptörü, hem sitoplazmada hem de nükleusta bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (93) ve diğer nükleer reseptörler gibi karboksil ucunda yer alan, transkripsiyonel aktivasyon için gerekli AF-2 domainine sahiptir; reseptöre ligand bağlanması ile konformasyonel değişikliğe uğrar. Kalsitriolün VDR'ye bağlanması sonucu VDR/retinoid X reseptörü (RXR) birlikteliği indüklenir. Bu heterodimerizasyon, RXR-VDR-ligand kompleksinin sitoplazmadan nükleusa göçü için gereklidir (94). Nükleusta kalsitriol-VDR-RXR kompleksi, vitamin D-yanıt genlerinin promotorlarındaki spesifik D vitamini yanıt elementleriyle (VDRE) etkileşerek gen ekspresyonlarını düzenler (95) (şekil 5).

2.5.3 D Vitamini Eksikliği

D vitamini eksikliği, çocuklarda raşitizm olarak da bilenen ve kemiklerin yumuşaması anlamına gelen osteomalaziye neden olur. Raşitizm gelişmiş ülkelerde nadir görülen bir hastalıktır ancak D vitamini eksikliği dünya çapında bir sorun haline gelmiştir (96, 97). Bu

durumun nedeni, güneşten kaçınmanın bir sonucu olan düşük kan kalsidiol (25-hidroksi-vitamin-D) düzeyleridir (98). Bu durum kemik-yumuşamasına neden olan bir takım hastalıklara öncülük eder (99).

Bu hastalıklardan biri olan raşitizm, çoğunlukla D vitamini eksikliğine bağlı olan, genellikle 6 aylık-18 aylık çocuklarda görülen kemik hastalığıdır. Kemik oluşumunun tamamlanmaması nedeniyle tedavisi geciktirilmiş, ihmal edilmiş vakalarda, çocuk büyüdükçe ağırlığı nedeniyle uzun kemiklerde şekil bozukluğu meydana gelir. Bu şekil bozukluğu ‘yay bacak’ olarak adlandırılır; D vitamini eksikliği ile kalsiyum ve fosfor yetersizliğinin bir sonucudur. Günümüzde Afrika, Asya ve Orta-Doğu gibi düşük gelirli ülkelerde (100) sıklıkla görülmektedir.

Kemik mineralizasyondaki bir eksikliğin diğer bir sonucu olan osteomalazi, D vitamini eksikliği veya D vitamini metabolizması ile ilgili bozuklukların daha çok erişkinlerde görülen türüdür. En sık görülen semptomlar kas zayıflığı, kemiklerde kırılabilirlik, tüm vücutta yaygın ağrıdır. Osteomalazi, kemiklerde kalsiyum emilimini azaltır; kalsiyum kaybını artırır böylece kemiklerdeki kırılma riski artar (101).

D vitamini yetersizliği sonucu ortaya çıkan bir diğer hastalık, kemik metabolizmasındaki bir bozukluk sonucu kemikteki protein örgüsünün seyrelmesiyle iskelette ortaya çıkan ve kemiklerin çok kolay kırılabilmesine sebep olan osteoporozdur (102). Osteoporoz ve osteomalazi, kemik kırıklarındaki ve kemik kaybındaki yüksek risk bakımından birbirleriyle yakından ilişkilidir. Çalışmalar, D vitamini takviyesi ile başta kalça kırıkları olmak üzere birçok osteoporotik kırıklardaki riskte azalma olduğunu ortaya koymuştur (97, 103, 104).

2.5.4 D Vitamini Toksisitesi

D vitamini toksisitesi nadir görülen bir durumdur (97). D vitamini toksisitesi güneş ışığına maruziyetten kaynaklanmaz; yüksek D vitamini takviyesinin bir sonucudur. Sağlıklı yetişkinlerde, 1250 mikrogram/gün (50,000 IU)’den fazla alımı birkaç aydan sonra toksisiteye neden olabilir ve serum 25-hidroksivitamin D düzeylerini yükseltebilir. Primer hiperparatiroidizmi olanlar D vitaminine daha hassastırlar (105). Diyet yoluyla alım sonucu artan D vitamini düzeylerine bağlı olarak bu kişilerde kandaki kalsiyum seviyesinin normalin üstünde olması anlamına gelen hiperkalsemi gelişir. Hamilelik süresince maternal

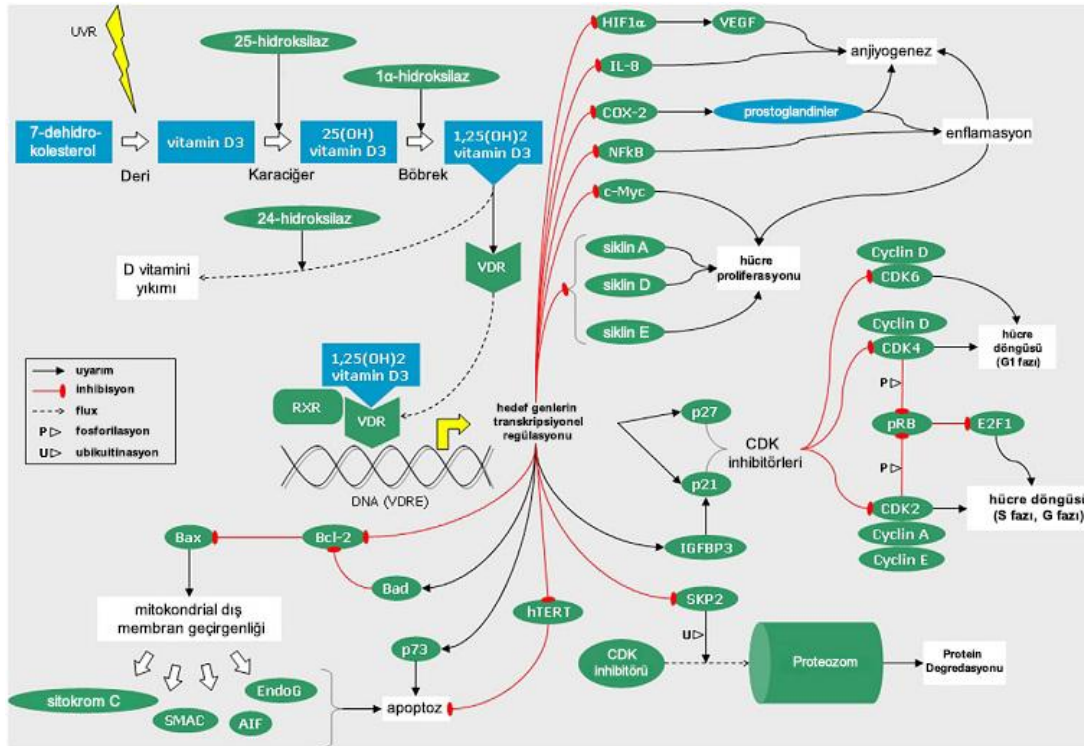
hiperkalsemi, fetüsün D vitaminine olan hassasiyetini arttırır ve mental gerilik ile yüz deformitelerine neden olabilir (105).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından tolere edilebilir günlük D vitamin miktarının yaşa göre dağılımı şu şekildedir (32):

- ✓ 0–12 ay: 25 µg/gün (1000 IU)
- ✓ 1–10 yaş arası: 50 µg/gün (2000 IU)
- ✓ 11–17 yaş arası: 100 µg/gün (4000 IU)
- ✓ 17 yaş üstü: 100 µg/gün (4,000 IU)
- ✓ Hamile/emziren kadınlar: 100 µg/gün (4,000 IU)

2.5.5 Kalsitriol ve Kanser

D vitamininin aktif formu olan kalsitriolün (1,25-dihidroksivitamin D₃) anti-kanser potansiyeli direkt ya da indirekt (örneğin transaktivasyon) olarak kanser gelişiminde ve sürecinde rol alan dört anahtar mekanizmada; hücre büyümesi, apoptoz, anjiyogenez ve inflamasyonda rol alan genlerin ekspresyonlarına etki etme özelliğinde yatar (Şekil 5).



Yapılan çalışmalar kalsitriolün çoğu malign hücrede proliferasyonu, hücre döngüsünü durdurarak ve hücrelerin G0/G1 evresinde birikmesini sağlayarak engellediğini göstermiştir. Prostat kanser hücrelerinin kalsitriol ile muamelesi sonucu, bu hücrelerde siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri olan p21/Waf/cip1 ve p27/kip1 ekspresyonlarının arttığı ve proliferasyonun inhibe edildiği saptanmıştır (6, 7). Benzer şekilde, kalsitriolün MCF7 insan meme kanseri hücrelerinde p21 ve p27 ekspresyonlarını arttırırken; siklin D1, D3, A1 ve E1 ekspresyonlarını azalttığı, bunun sonucu olarak CDK aktivitesinin inhibe edildiği bildirilmiştir (8, 106).

Prostat (9) ve meme (10) kanseri hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar, kalsitriolün mitokondrial fonksiyon bozukluğuna yol açtığını, sitokrom-C salınımı ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olarak intrinsik apoptotik yolağı aktiflediğini göstermiştir. Diğer araştırmalar kalsitriol aracılıklı apoptoz için farklı mekanizmalar önermişlerdir. Jiang ve arkadaşları, kalsitriolün telomeraz aktivitesini downregüle ettiğini, telomer kısalması üzerinden apoptozun indüklendiğini belirtmişlerdir (11).

Preklinik modeller, kalsitriolün güçlü bir anjiyogenez inhibitörü olduğunu göstermiştir. Mantell ve arkadaşları, kalsitriolün MCF-7 meme kanseri hücre hattında VEGF

ekspresyonunda ve *in vivo* çalışmalarda tümör damarlaşmasında anlamlı bir düşüş meydana getirdiğini belirtmişlerdir (107). Benzer şekilde kalsitriolün pro-anjiyogenik faktörlerden olan hipoksi-indüklenebilir faktör 1(HIF-1) (108) ile IL-8 (12) ekspresyonunu baskılayarak VEGF ekspresyonunda azalmaya yol açtığını saptamışlardır. Yabanıl fare ile VDR knockout farede oluşturulmuş fare prostat transgenik adenokarsinom tümör modellerinde, damar büyüklüğünün ve hacminin VDR knockout farede daha fazla olduğunun gözlenmesi ise VDR-kalsitriol etkileşiminin tümör damarlanmasındaki inhibe edici etkisini göstermektedir (13).

Kalsitriolün anti-enflamasyonel etki gösterdiği hipotezini destekleyen farklı çalışmalar da bulunmaktadır. Krishnan ve arkadaşları, prostat kanser hücrelerinde kalsitriolün, prostaglandin sentezini inhibe eden ve IL-1, IL-8 gibi pro-enflamasyonel sitokinleri indükleyen genlerin ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir (14). Van Waes ve arkadaşları ise kalsitriolün NFkB aktivasyonunu ve sinyalini baskıladığını; böylece pro-enflamasyonel sitokinlerin, kemokinlerin ve anti-apoptotik faktörlerin aktivasyonunun engellendiğini saptamışlardır (109). İnaktif durumda, çoğu NFkB dimeri, NFkB (Ikb) inhibitör proteinlere bağlıdır ve pro-enflamasyonel sinyaller NFkB'yi Ikb kinase-bağımlı fosforilasyon ve proteazom-bağımlı Ikb degradasyonu üzerinden aktive eder; bir kere NFkB aktive edildiğinde, nükleusa geçer ve pro-enflamasyonel sitokinleri, kemokinleri ve anti-apoptotik faktörleri aktive eder.

In vitro çalışmalarda ise, VDR eksik farede NFkB inhibe edici protein (Ikb) düzeylerinde bir azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (110). Kolon kanseri hücrelerinin, VDR antagonisti ile muamelesi sonucu Ikb düzeylerinin düşmesi; NFkB aktivitesinde artış gözlenmesi ise VDR-kalsitriol ilişkisinin NFkB aktivasyonundaki önemini gösterir (111).

2.6 N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE (NDRG)

2.6.1 *Myc Ailesi ve Tarihçe*

Myc protein ailesi; c-Myc, MYCN (n-Myc) ve MYCL1 (l-myc) olmak üzere üç üyeden oluşur. Fizyolojik durumda, her üç protein de fetal gelişim süresince eksprese edilirken yalnızca c-Myc erişkin dokularda eksprese edilir. Bu üyeler transkripsiyon faktörü olmaları nedeniyle deregülasyonları sonucu apoptoz, diferansiyasyon, anjiyogenez ve proliferasyon ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek kanserleşme sürecinde rol alırlar (112). Hücre

proliferasyonu, diferansiyasyonu ve apoptozun yanı sıra transkripsiyon faktörü olarak c-Myc fonksiyonunun ve regülasyonunun incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır.

c-Myc, biyolojik fonksiyonlarını hedef genlerinin transkripsiyonu ile düzenler (113). c-Myc hedef genlerinin tanımlanması, hücre davranışı için kullandığı mekanizmaları anlamada önem teşkil eder (114). Myc tarafından baskılanan genlerin büyük bir kısmı hücrelerin dış çevreyle olan etkileşimi ve iletişimde yer alır. Bu genlerin tümör baskılayıcı ve anti-metastatik özelliklere sahip olduğunu belirtmek gerekir (115).

NDRG terimini Shiono ve arkadaşları 1999 yılında, N-Myc knockout fare embriyolarında daha fazla ekprese edilen genleri temsil etmek amacıyla kullanmışlardır (116). NDRG1 gen ekspresyonunun, döllenmeden 10,5 gün sonra N-Myc knockout embriyolarda 20 kat arttığını saptamışlar ve bunun N-Myc geninin represyonu sonucu olduğunu bildirmişlerdir. Yabani tip embriyolardan gelişen dokularda ise, N-myc ile NDRG1 arasında negatif bir ilişki gözlemlenmiştir. Aynı grup, NDRG1'e oldukça benzer proteinler kodlayan NDRG2 ve NDRG3 genlerini tanımlamışlardır. Ancak Okuda ve arkadaşları, N-Myc knockout mutantlarda NDRG2 ve NDRG3'ün, NDRG1'den farklı olarak overeksprese olmadığını belirtmişlerdir (117).

İnsan NDRG1 geni, aslında fare NDGR ailesinden önce keşfedilmiştir. 1997 yılında Kokami ve arkadaşları, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde indirgeyici ajan ve tunikamisin tarafından ekspresyonu indüklenen bir gen keşfetmişlerdir (118). Bu gene indirgeyici ajan ve tunikamisin yanıt proteini tanımının baş harflerinden oluşan RTP (reducing agent and tunicamycin responsive protein) adını vermişlerdir. Van Belzen ve arkadaşları bu geni klonlayarak diferansiyasyon ilişkili gen (differentiation related gene) DRG1 adını vermişlerdir (119). DRG1 ekspresyonunun kolon adenomaları ile adenokarsinomalarında azaldığını, fakat kolon kanseri hücrelerinde diferansiyasyonun indüklenmesiyle ekspresyonunun arttığını saptamışlardır.

İnsan NDRG2 proteini ilk tanımlayanlar Deng ve arkadaşlarıdır. NDRG2 proteinini açıl-taşıyıcı proteine (ACP)- benzer domaine sahip protein olarak tanımlamışlardır (120).

N-myc Downstream Regulated Gene (NDRG) protein ailesi, birbiriyle %57-60 aminoasit benzerliği gösteren 4 üyeyi, NDRG1, NDRG2, NDRG3 ve NDRG4 kapsar (15). Bu dört protein arasında en yüksek homolojiyi NDR domaini ve alfa/beta hidrolaz katlı bölgeleri gösterir. Ancak bu ailenin hiçbir üyesi hidrolaz aktivitesi için gerekli katalitik motifi içermez (121, 122). Aile üyelerindeki dizi farklılıkları genellikle N- ve C- terminallerinde yer

alır. İnsan NDRG2 geni, kromozomun 14q11.2 kolunda lokalize olmuştur (123) ve NDRG2'nin tam boy cDNA'sı biri 371 aa (41kDa) (124), diğeri 357 aminoasit uzunluğundaki iki farklı proteini kodlar.

NDRG ailesinin üyeleri, *zebra balığı* (125), *Xenopus laevis* (126), *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegant* ve *Dictyostelium discoideum*'un yanısıra, ayçiçeği gibi birçok türde bulunmaktadır (127). Ancak, prokaryotlarla, fungi ve protoza'da NDRG2'ye anlamlı ölçüde benzer herhangi bir proteinin bulunmaması, NDRG ailesinin metazoa ve bitkilerle sınırlı olduğunu göstermektedir.

2.6.2 NDRG2 ve Kanser

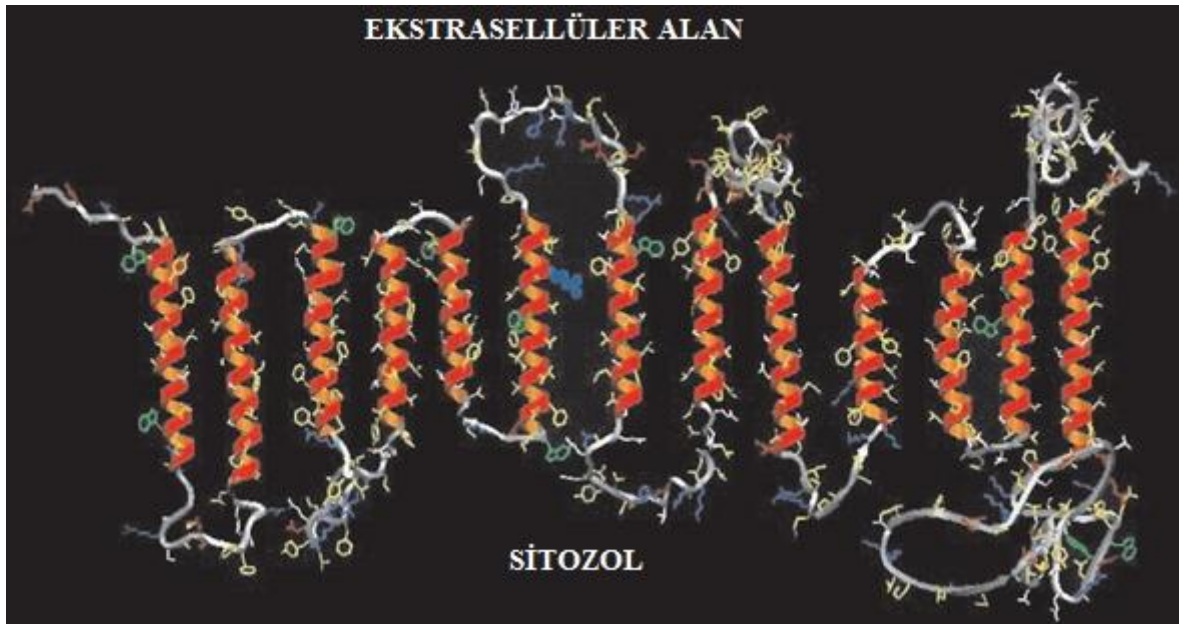
Erişilebilir literatür, birçok insan kanser hücre hattında ile primer tümörlerde NDRG2'nin gen ve protein ekspresyonunun downregüle olduğunu göstermiştir. Meme (16), kolon (17), akciğer kanseri hücre hatları ile karaciğerde (18), NDRG2'nin downregüle olduğu ve promotöründe CpG metilasyonu bulunduğu saptanmıştır. Karaciğer, pankreas kanseri ve primer glioblastomlarda (128, 129) NDRG2 ekzonlarında herhangi bir mutasyon bulunamamış ancak HepG2 hücrelerinin promotöründe tek bir mutasyon, -13 (C>T) gözlenmiştir. Gastrointestinal stromal tümörlerde NDRG2'nin yer aldığı kromozom 14q11.2'nin çoğunlukla silindiği bulunmuştur (130). Ayrıca mide kanserlerinde NDRG2 ekspresyon kaybının kötü prognoz ile ilişkili olması nedeniyle, NDRG2 prognostik bir belirteç olarak tanımlanmıştır (124). Shi ve arkadaşları 213 kolorektal kanserli doku üzerindeki gerçekleştirdikleri çalışmada, diferansiyasyon derecesi ile c-Myc mRNA ve protein ekspresyonları arasında negatif; NDRG2 mRNA ve protein ekspresyonları arasında ise pozitif bir ilişki saptamışlardır. HT29, SW480 ve SW620 kolon kanseri hücre hatlarında diferansiyasyonun indüklenmesi sonucu c-Myc mRNA ve protein ekspresyonlarında azalma, NDRG2 mRNA ve protein ekspresyonlarında artma olduğunu belirtmişlerdir (19). Zhao ve arkadaşlarının tiroid adenoma ve karsinoma dokuları ile yaptıkları çalışmada ise, karsinoma dokularında, normal dokulara kıyasla NDRG2 mRNA ve protein ekspresyonlarında anlamlı bir düşüş; c-Myc mRNA ve protein ekspresyonlarında ise anlamlı bir artış saptamışlardır (131). Bu bilgiler c-Myc ve NDRG2'nin diferansiyasyonda rol aldığını ve aralarında negatif bir ilişki olduğunu göstermektedir.

NDRG2'nin kanserde tümör baskılayıcı bir rolünün gösterildiği çalışmalar da

bulunmaktadır (132). İnsan glioblastoma hücre hattında NDRG2 ekspresyonunun arttırılması, tümör hücrelerinin büyümesini baskılamış fakat apoptozu etkilememiştir (133). Mide kanseri hücre hattı SNU-620’de NDRG2’nin susturulması ile benzer durum gözlenmiştir. NDRG2’nin susturulduğu SNU-620 hücrelerinde, sisplatin ile indüklenmiş hücre ölümünün azalması, NDRG2 inaktivasyonu ile kemoterapiye olan direncin arttığı görüşünü ortaya koymuştur (124). Lee ve arkadaşları, invazyon yeteneği yüksek karaciğer kanseri hücre hattı SK-hep-1’de NDRG2’nin invazyon ve metastazı baskıladığını *in vivo* ve *in vitro*’da çalışmalarda göstererek karaciğer kanseri metastazının baskılanmasında NDRG2’nin klinik ve fonksiyonel açıdan önemini kanıtlamışlardır (18).

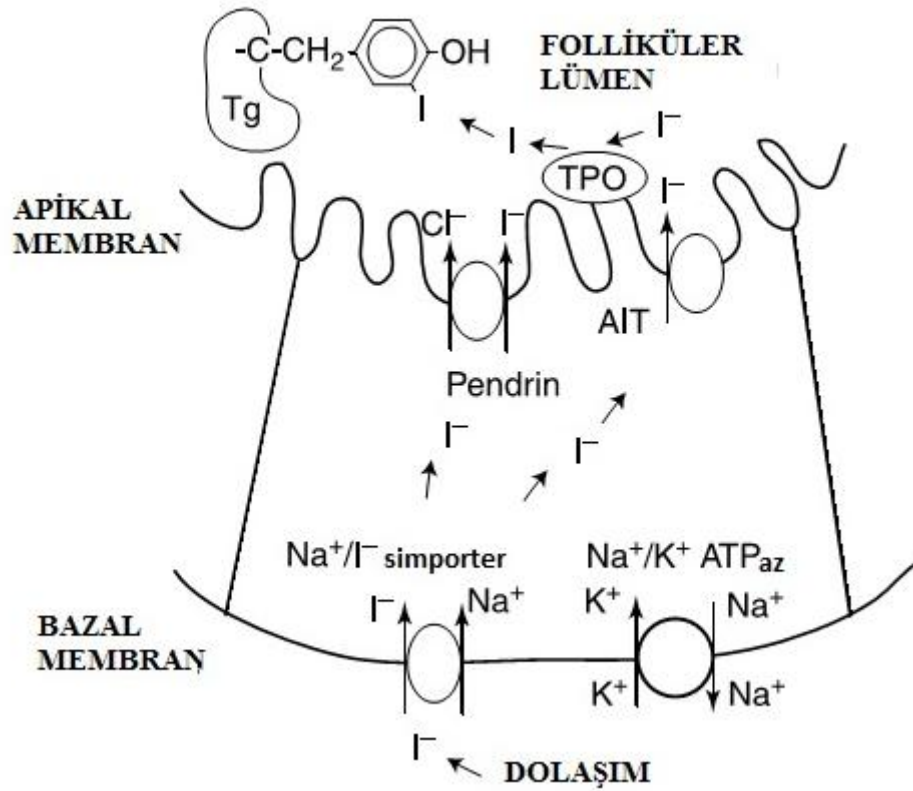
2.7 SODYUM İYOT SİMPORTER (NIS)

Vücuttaki toplam iyotun %70-90’ını (9-10 mg) ihtiva eden tiroid bezi (134), yeterli tiroid hormon üretimi için dolaşımdan günde 60 µg iyod yakalamalıdır. Tiroid bezi için gerekli olan iyotu, tiroid foliküller hücrelerin bazolateral membranında eksprese edilen sodyum-iyod simporter (NIS ya da SLC5A5) sayesinde temin eder. On üç transmembran domaininden oluşan bir glikoprotein olan NIS, sodyum/solüt simporter ailesinin üyesidir (20). Gereken miktardaki iyodürün, dolaşımdan foliküllere aktarılmasına aracılık eder (135). Amino ucu ekstrasellüler tarafa, karboksil ucu sitozole doğrudur (Şekil 6).



Şekil 6. Sodyum-iyod simpoter ikincil yapı modeli (20).

Normal bir tiroid dokusunda NIS, hücre içine Na^+/K^+ ATPaz aktivitesiyle oluşan Na^+ iyon gradiyenti ile iki Na^+ ve bir I^- taşır. Böylece tiroid hücresi ile ekstrasellüler sıvı arasında iyodür konsantrasyonu bakımından 30:1'lik bir fark meydana gelir (136, 137). Follikül hücrelerinde alıkonan iyodür, apikal iyod taşıyıcılar (AIT or SLC5A8) (138) ve pendrin (SLC26A4) (139, 140) ile lümene salınır. Apikal membranın lümene bakan kısmında yer alan tiroglobulinin (Tg) tirozil rezidüleri, tiroid peroksidaz (TPO) tarafından iyodine edilir. İyodürün organik bir bileşiğe bağlanması nedeniyle bu durum 'organifikasyon' olarak da adlandırılır. Tiroid oksidazlar (ThOX1 ve ThOX2) (141) H_2O_2 oluşturarak TPO'nun normal fonksiyon gösterebilmesi için gereken oksidatif koşulları meydana getirirler. Tiroid uyarıcı hormon (TSH), tiroid iyodür metabolizması ve tiroid hormonu sentezinde yer alan NIS, Tg, ve TPO'ya ait genlerin ekspresyonlarını artırır (142).



Şekil 7. Tiroid bezindeki iyod transportunun şematik modeli (140).

Tiroid follikülünde, iyodürün lümene toplanması iki adımlı bir işlemdir ve NIS ile birlikte, AIT (SLC5A8) (138) ve pendrin (SLC26A4) (139) taşıyıcıları da bu işleme aracılık

eder. Bazolateral membranda yer alan NIS, kandaki iyodürün hücrelerde birikmesini sağlar. Apikal membranda eksprese edilen AIT ve pendrin (138, 139, 143) iyodürün lümene transportunu gerçekleştirir (140, 144) (Şekil 7). NIS'in iyodüre olan affinitesi çok yüksektir (K_m 20-40 μM) (145-147), bu nedenle tiroid hücreleri kandan, 2mM'a kadar olan iyodürü konsantre edebilirler (140). Pendrinin iyodür transportörü olarak fonksiyon gösterebilmesi için sitoplazmada göreceli olarak daha yüksek iyodür konsantrasyonuna (1mM'dan fazla) gereksinimi vardır (144). Bu nedenle lümene pendrin tarafından sağlanan iyodür akışı, fonksiyonel NIS ekspresyonuna bağlıdır.

NIS gen ve protein ekspresyonunun TSH bağımlı uyarımının, insan primer tiroid hücrelerinde cAMP yolağı tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (148, 149). TSH bağımlı NIS upregülasyonu hem transkripsiyonel hem de post-translasyonel düzeylerde olur. TSH, NIS promotorunu ve NIS upstream güçlendiricisini uyararak NIS proteininin yarı ömrünü uzatır ve NIS'in plazma membranına geçişi uyarılır (150).

2.7.1 Tiroid Kanserinde NIS Ekspresyon Düzeyleri

Metastatik diferansiye tiroid kanserinde, maksimum iyodür alımına ulaşmak için TSH uyarımı gereklidir. Bu duruma total tiroidektomiden sonra tiroid hormon replasmanının bırakılması ya da rhTSH uygulaması ile ulaşılır (151).

Ancak bazı diferansiye tiroid kanserlerinde, (yaklaşık %10-20) TSH uyarımına rağmen radyoiyodür konsantre edilmez (152, 153). Bu durum TSH-R'nün bulunmamasından kaynaklanır. Neredeyse tüm diferansiye tiroid kanserlerinde TSH-R proteini eksprese olur (154-156). Ancak TSH-R ekspresyonundaki azalma ile papiller tiroid kanserinde kötü prognoz arasında bir ilişki bulunmaktadır (157). Agresif diferansiye tiroid kanserlerinde NIS gen ekspresyonu için gereken sinyal iletiminin ve/veya transkripsiyon faktörlerinin başarısız olmasının nedeni büyük ihtimalle iyodür birikiminin olmamasıdır. Çalışmalar nükleer reseptör ligandlar ve epigenetik değişim inhibitörleri gibi tekrar diferansiye edici ajanlarının agresif tiroid kanserlerinde NIS indüksiyonu için potansiyel teşkil ettiğini göstermiştir.

3. GEREC VE YÖNTEM

3.1 ARAŞTIRMANIN TİPİ

Araştırma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2 ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu araştırma Mayıs 2012 ile Haziran 2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3 ÇALIŞMA MATERYALİ

Araştırmada insan tiroid folliküler epitelyal hücre hattı Nthy-ori 3-1 (ECACC No: 90011609) ile indiferansiye insan tiroid kanseri hücre hattı 8505C (ECACC No: 94090184) kullanılmıştır.

3.4 ÇALIŞMANIN DEĞİŞKENLERİ

Çalışmanın bağımsız değişkeni: 1,25 dihidroksivitamin D₃ (kalsitriol) uygulaması

Çalışmanın bağımlı değişkeni: Hücresel canlılık oranları, N-myc Downstream Regulated Gene-2 ve Sodyum İyot Simporter gen ekspresyonları

3.5 VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

Bu çalışmada kullanılan Nthy-ori 3-1 ve 8505C hücre hatları ticari olarak satın alınmıştır (ECACC, The European Collection of Cell Cultures, İngiltere).

3.5.1 Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihaz ve malzemeler.

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod Numarası</i>
PRMI 1640	LONZA	BE12-167F
FETAL DANA SERUM (FBS)	LONZA	DE14-801F
L-Glutamin	LONZA	BE17-605E
Penisilin/Streptomisin	LONZA	DE17-602E
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (10X)	LONZA	BE17-517Q
Tripsin/EDTA	LONZA	DE17-161E
Tripan Mavisi	BIOCHROM	L 6323
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Fischer Scientific	EC-200-664-3
25 cm ² ’lik Kültür Kabı	Greiner Bio-one	690175
75 cm ² ’lik Kültür Kabı	Sarstedt	83.1813.002
Steril Tüp (15 mL)	Greiner Bio-one	188271
Steril Tüp (50 mL)	Greiner Bio-one	227261
Laminar Akımlı Kabinet	ESCO	EQR / GL-64
CO ₂ İnkübatörü	Thermo	Model:311
Ters-faz Işık Mikroskobu	Nikon	ECLIPSE TS100
Salınlımlı santrifüj	Hettich	320R
Otoklav	Hirayama	HICLAVE HV-50
Spinner	WISD	Wisepin CF-45
Derin Dondurucu -80 ⁰ C	Thermo	Forma Model 705
Derin Dondurucu -20 ⁰ C	Ariston	Hotpoint
Buzdolabı +4 ⁰ C	Ariston	Hotpoint

Nthy-ori-3-1, immortalizasyon için SV-40 genomu (SV-ori) içeren plasmid ile transfekte edilmiş normal insan primer tiroid epitelyal hücreleridir.

Nthy-ori-3-1 hücre kültürü için %10 fetal dana serumu ile desteklenen RPMI 1640 kültür ortamı [RPMI+Penisilin/ Streptomisin (100 U/ml)+ FBS (%10) + L-Glutamin (%1)] kullanıldı. Aracı firma tarafından getirilen hücreler 25 cm²'lik kültür kabına ekildi. Ertesi gün kültür kabına yapışmayan ve canlı olmayan hücreler uzaklaştırılarak taze ortam eklendi. Laboratuvar koşullarımızda hücrelerin haftada 2 kez % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA ile kültür kabından kaldırılarak pasajlanması yeterli oldu. Pasaj işlemi bir sonraki deney seti için gerekli hücre sayısına bağlı olarak en az bire iki, en çok bire dört olacak şekilde 75 cm²'lik kültür kaplarına ekilerek yapıldı. Hücre kültürü işlemleri laminar akımlı kabinet içinde gerçekleştirildi ve hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edildi.

8505C, 78 yaşında tiroid kanseri tümörlü bir kadın hastadan elde edilmiş (ticari) epitelyal benzeri tek tabaka halinde büyüyen hücrelerdir.

8505C hücre kültürü için %10 fetal dana serumu ile desteklenen RPMI 1640 kültür ortamı [RPMI+Penisilin/ Streptomisin (100 U/mL)+ FBS (%10) + L-Glutamin (%1)] kullanıldı. Aracı firma tarafından getirilen hücreler 25 cm²'lik kültür kabı ekildi. Ertesi gün kültür kabına yapışmayan ve canlı olmayan hücreler uzaklaştırılarak taze ortam eklendi. Laboratuvar koşullarımızda hücrelerin haftada 2 kez % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA ile kültür kabından kaldırılarak pasajlanması yeterli oldu. Pasaj işlemi bir sonraki deney seti için gerekli hücre sayısına bağlı olarak en az bire iki, en çok bire dört olacak şekilde 75 cm²'lik kültür kaplarına ekilerek yapıldı. Hücre kültürü işlemleri laminar akımlı kabinet içinde gerçekleştirildi ve hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edildi.

Bahsi geçen tüm aşamalar ayrıntılarıyla alt başlıklarda anlatılmıştır.

3.5.1.1 Hücrelerin Çözülmesi

1. Önceden hazırlanan ve 4 °C'de saklanan %10 serum içeren ortamlar 37 °C'e ısıtıldı.
2. Her bir hücre hattı için birer adet 25 cm²'lik hücre kültür kabı hazırlandı.
3. Dondurma tüpleri içindeki hücreler azot tankından veya -80°C'den çıkarılarak hızlıca çözüldü.
4. Çözünmüş olan hücreler pipet ile 2-3 kez süspanse edilerek 15 mL'lik steril tüplere aktarıldı ve üzerlerine 9 mL büyüme ortamı eklenerek pipet ile 1-2 kez alt üst edildi.

5. Tüpler oda sıcaklığında 1300 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
6. Üst faz atılıp, dipte kalan çökelti 2-3 ml büyüme ortamı ile süspanse edilerek ve uygun kültür kaplarına aktarılarak üzeri ortam ile uygun hacime tamamlandı.
7. 1 gün sonra (16-20 saat) hücrelerin morfolojileri ve yüzeye tutunma oranları ters-faz ışık mikroskop ile değerlendirildi.

3.5.1.2 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

1. Hücre süspanسیونunda bulunan hücrelerin %0,4'lük tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi.
2. 1:1 oranında hücre süspanسیونu örneği ile tripan mavisi bir ependorf içinde karıştırıldı. Santrifüj sonunda dipte kalan çökeltinin miktarına göre, gerek görüldüğü yerde steril 1x PBS ile seyreltmeler yapıldı.
3. Hücre süspanسیونundan 10 µL alınarak Neubauer Lamı ve lamel arasına yayıldı.
4. Neubauer lamının 16 küçük kare içeren 4 farklı alanındaki canlı ve ölü hücrelerin tümü ters faz ışık mikroskobu ile sayılarak, canlı ve ölü hücre sayısının ortalaması alındı.
5. Ölü ve canlı hücre sayısı için hesaplama (hücre sayısı/mL): Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x 10^4
6. Hücre canlılığının yüzde cinsinden ifadesi: $(100 \times \text{canlı hücre sayısı}) / (\text{ölü} + \text{canlı hücre sayısı})$

3.5.1.3 Hücrelerin Kültür Ortamlarının Değiştirilmesi

1. Hücre kültürü kaplarına ekimi yapılan hücrelerin doluluğu, her gün ters faz ışık mikroskop ile kontrol edildi.
2. % 90 doluluğa erişmeyen fakat ortamları sararan Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinin ortamları, taze RPMI 1640 ile değiştirildi.
3. Bu amaçla, hücre kültür kaplarındaki ortamlar atıldı.
4. Ölü hücreleri uzaklaştırmak için hücre kültür kapları 37°C'ye ısıtılmış steril 1 x PBS ile yıkandı.
5. Ardından hücre kültür kaplarına taze RPMI 1640 ortamı eklendi.

6. Her iki hücre hattının ekildiği 25 cm²'lik kültür kapları % 90 doluluğa eriştiğinde hücreler pasajlandı.

3.5.1.4 Hücrelerin Pasajlanması

1. Hücre kültür kaplarının içindeki ortam atıldı.
2. Hücre kültür kapları 37°C'ye ısıtılmış steril 1 x PBS ile yıkandı.
3. 25 cm²'lik kültür kaplarına 1 mL, 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına 2 mL önceden 37°C'ye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi.
4. Hücre kültür kapları 1 dakika, %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde bekletildi. İnkübatörden alınan hücrelerin morfolojileri ters ışık mikroskopunda kontrol edildi.
5. Kalkmayan hücreler, hücre kültürü kabının tabanına hafifçe vurularak fiziksel kuvvet ile kaldırıldı.
6. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra tripsin/EDTA'yı inhibe etmek amacıyla, hücre kültür kaplarına en az tripsin/EDTA hacmi kadar büyüme ortamı ilave edildi ve hücreler steril 15 mL'lik steril falkon tüplere aktarıldı.
7. Hücre kültürü kapları 37°C'ye ısıtılmış steril 1 x PBS ile yıkandıktan sonra aynı falkon tüplere aktarıldı. Bu şekilde kalkan, ancak kültür kabı yüzeyinden ayrılmayan hücrelerden doğan kayıp engellendi.
8. Tüpler oda sıcaklığında 1300 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
9. Santrifüj sonunda ortamlar atıldı ve meydana gelen çökeltiye bağlı olarak çökelti RPMI 1640 ortamla süspanse edildi.
10. Hücre süspansiyonu, RPMI 1640 ortam konulan hücre kültür kaplarına eşit olarak dağıtıldı. Hücre kültür kapları dairesel hareketlerle, hafifçe birkaç defa çalkanarak hücrelerin hücre kültür kabı yüzeyinin tümüne dağılması sağlandı.
11. Hücrelerin durumu ters faz ışık mikroskopunda değerlendirildi.
12. Hücre kültür kaplarına hücre hattının adı, pasaj sayısı ve pasajlanma tarihi yazıldı.
13. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatöre kaldırıldı.

3.5.1.5 Hücrelerin Dondurulması

1. Dondurma ortamı hazırlandı: RPMI 1640 +%10 dimetilsülfoksit (DMSO)
2. Hücre sayımı sonucu süspansiyon, en fazla 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde dondurma tüplerine (cryovial) paylaştırıldı.
3. Süspansiyon üzerine 1:1 olacak şekilde dondurma ortamı eklenerek DMSO oranı %5'e düşürüldü.
4. Dondurma tüpleri önce -20°C 'de 1 saat bekletildikten sonra hücrelerin ihtiyaç duyulan saklama zamanına göre -80°C 'ye veya -180°C 'ye (sıvı nitrojen) kaldırıldı.

3.5.1.6 Hücrelerin Sayılması

1. Hücrelerin pasajlanması işleminde ilk basamaklar aynen yapıldıktan sonra homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 50 μL alındı.
2. 1:1 oranında hücre süspansiyonu örneği ile tripan mavisi bir ependorf tüp içinde karıştırıldı. Santrifüj sonunda dipte kalan çökeltinin miktarına göre, gerek görüldüğü yerde steril 1x PBS ile seyreltmeler yapıldı
3. Seyreltilmiş hücre süspansiyonunun 10 μL 'si, Neubauer Lamı ve lamel arasına yayıldı.
4. Ters-faz ışık mikroskobunda 20 x büyütmede sayım yapıldı.
5. Neubauer lamının 16 küçük kare içeren 4 farklı alanındaki canlı ve ölü hücrelerin tümü ters faz ışık mikroskobu ile sayılarak, canlı ve ölü hücre sayısının ortalaması alındı.
6. Hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını (hücre sayısı/mL) belirlemek için hesaplama yapıldı.
7. Hesaplama (hücre sayısı/mL): Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü $\times 10^4$

3.5.1.7 Katlanma Zamanı Tayini

1. Duplikasyon zamanı olarak da bilinen bu adım, hücre sayısının ne kadar sürede iki katına çıktığının belirlenmesi için yapıldı.
2. Deneyler için 6 kuyucuklu plaklar kullanıldı.

3. Önceden 5 mL RPMI 1640 ortam konmuş kuyucukların her birine 8505C için 2×10^5 , Nthy-ori-3-1 için 1×10^5 hücre ekildi.
4. 24, 48 ve 72. saatlerde hücre sayımı yapıldı.
5. Sonuçların doğruluğu açısından her gün için üç kuyucuğa ekim yapıldı.
6. Kuyucukların sayımı kendi içinde altı kere tekrar edildi.
7. Oluşturulan hücre sayısı-zaman grafiği yardımıyla katlanma zamanı hesaplandı (158).

3.5.2 Hücre Canlılık Testi (WST-1)

Kalsitriolün 8505C hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi, WST1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) hücre canlılık testi kiti kullanılarak yapıldı. Yöntemin temeli MTT testine benzer şekilde, bir tetrazolyum tuzu olan WST-1'in canlı hücrelerde süksinat tetrazolyum redüktaz tarafından indirgenmesi ve suda çözünabilir formazan kristalleri oluşturmaya dayanır. Oluşan kristaller suda çözünabilir yapıdadır (159). Çözünen kristallerinin oluşturduğu sarı-turuncu renk 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Hücre canlılık testi sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler.

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
WST-1 Kiti	Roche	11 664 807 001
Plak Okuyucu	BioTek	ELX 50

Hücre canlılık testi için öncelikle ön denemeler yapıldı. Bu denemelerde oluşturulan deney gruplar ile bunların oluşturulma gerekçeleri Tablo 3'te açıklanmıştır.

Tablo 3. Deney grupları ve oluşturulma gerekçeleri.

Deney Grupları	Oluşturulma Nedeni
Hücre + Büyüme ortamı	Bu grup kontrol grubudur. Kalsitriol uygulanan grupların absorbans değerlerinin, kontrol grubuna oranlanması ve bu sayede kalsitriolün hücre canlılığı üzerindeki etkisinin kıyaslanabilmesi amacıyla oluşturuldu.
Hücre + Farklı konsantrasyonlarda kalsitriol içeren büyüme ortamı	Farklı konsantrasyonlardaki kalsitriolün, hücre canlılığı üzerindeki etkilerini inceleyebilmek amacıyla oluşturulan deney grubudur.
Ortam (kör)	Ölçümler sırasında büyüme ortamından gelen girişimi önleyebilmek için oluşturuldu.
Hücre + Farklı konsantrasyonlarda DMSO içeren büyüme ortamı	Kalsitriol DMSO içinde çözünmüştür, DMSO ise hücreler için toksiktir. Bu grup hücre canlılığı üzerindeki yalancı pozitifliğin giderilmesi için oluşturuldu.

Uygulama basamakları

1. Kontrol, deney ve DMSO grupları için 96 kuyucuklu plaklardaki kuyucuklara 100 μ L RPMI 1640 ortamı içerisinde 5000 hücre olacak şekilde süspansiyonlar ekildi.
2. Hücrelerin yüzeye tutunmaları için 24 saat beklendi.
3. 24 saat sonunda kuyucuklara ekilen hücrelerin ortamları;
 - kontrol grubu için 100 μ L taze ortamla,
 - deney grubu için belirlenen konsantrasyonlarda kalsitriol içeren 100 μ L ortamla,
 - DMSO grubu için eklenen kalsitriol hacmi kadar hacim içeren DMSO'lu ortam ile değiştirildi.
4. Bu sırada kuyucuklara sadece ortam eklenerek kör grubu oluşturuldu.
5. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası, içinde 100 μ L besiyeri bulunan her kuyuya 10 μ L WST-1 boyası eklendi ve WST-1'in ortama iyice karışması için 5-10 sn el ile sallanarak karıştırıldı.

6. Plakların üzeri alüminyum folyo ile sarılarak 37°C’de %5 CO₂ inkübatöründe toplam dört saat bekletildi.
7. Dört saat süresince, ilk yarım saat ve ardından her saat başı ELİSA plak okuyucusunda 450 nm ve 600 nm referans dalga boyunda absorban okutulması yapıldı.

Hesaplama: % Canlılık= (Ortalama Örnek Abs – Kör Abs/ [Ortalama Kontrol Abs- Ort. Kör Abs]) x 100

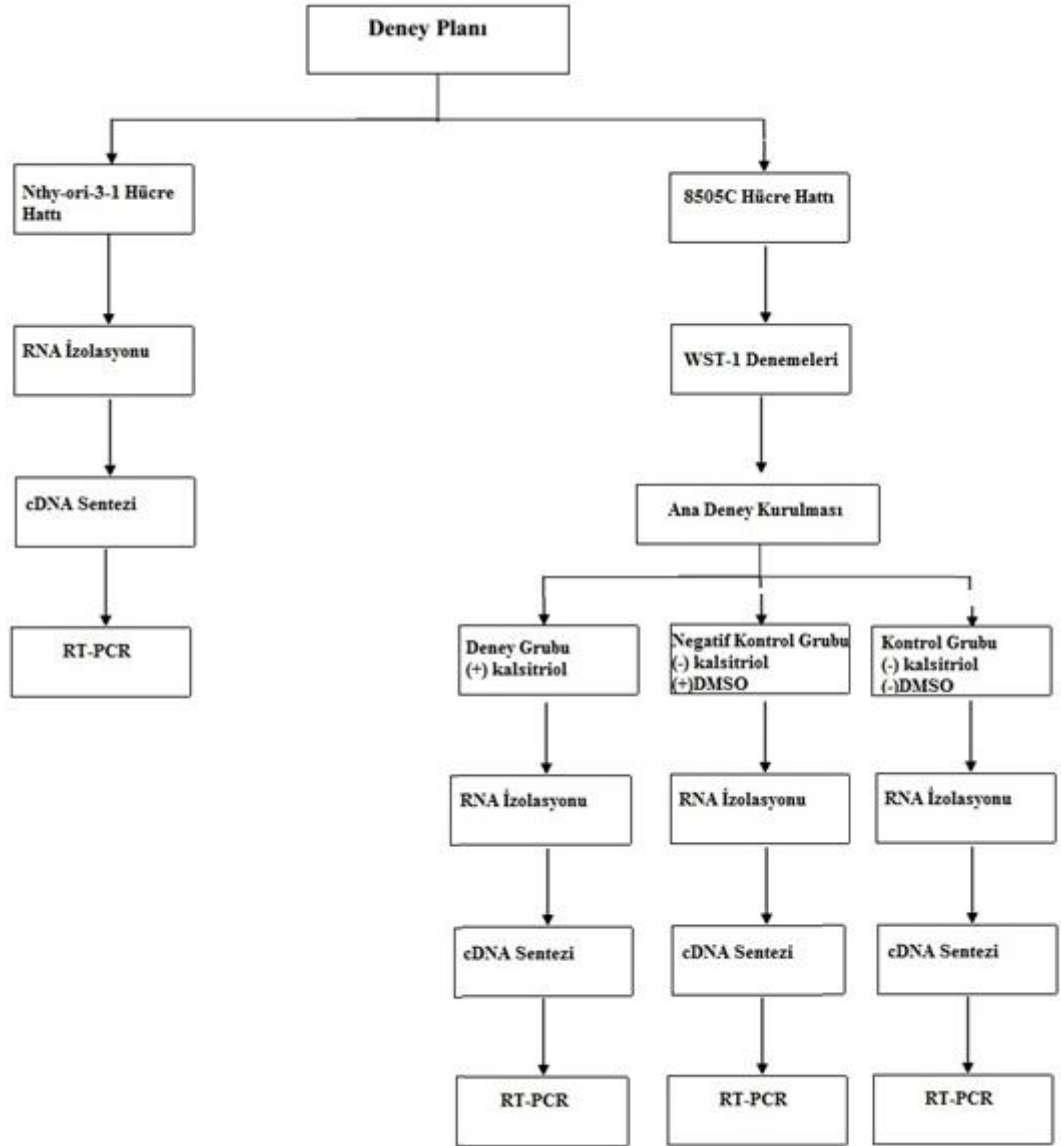
3.5.3 Hücrelere D Vitamini Muamelesi

In vitro deneyler için gerekli hücre sayısına ulaşıldıktan sonra deney setleri hazırlandı. Bu deneylerde Nthy-ori-3-1 hücre hattı pasaj 16 (P16) ile pasaj 21 (P21) aralığında kullanılırken ve 8505C pasaj 19 (P19)’a kadar idameye devam edildi.

Nthy-ori-3-1 hücre hattında NDRG2 ve NIS başlangıç ekspresyonları inceleneceğinden bu hücrelerin gerektiğinde ortamları değiştirildi ve pasajlandı.

8505C hücreleri ise üç farklı grup olarak çalışıldı; kültür ortamında inkübe edilen kontrol grubu, kalsitriol içeren kültür ortamında inkübe edilen deney grubu ve kalsitriolün DMSO’da çözülmesi nedeniyle DMSO’nun negatif kontrol olarak kullanıldığı “negatif kontrol” grubu.

Altı kuyulu plaklarda, her bir kuyuya 500.000 hücre ekildikten sonra hücrelerin yüzeye tutunmaları için hücreler RPMI 1640 ortamında 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Ertesin gün kontrol grubunun ortamı taze RPMI 1640 ortamıyla, deney ve negatif kontrol grubunun ortamları sırasıyla kalsitriol ve DMSO içeren ortamlarla değiştirildi. Deney grubunun ortamları ile negatif kontrol grubunun ortamları 72 saat boyunca her 24 saatte bir yenilendi. Kontrol grubunun ortamı herhangi bir ajan içermediğinden, bu grubun ortamlarının sadece ilk 24 saat değiştirilmesi ve RNA izolasyonu, cDNA sentezi gibi sonraki adımlara geçilmesi yeterli oldu. Üç gün boyunca her gün deney ve negatif kontrol gruplarından RNA izolasyonu yapıldı. Bütün deneylerde her ayrı kültür koşulu için en az üç eş örnek (triplicate) kullanılarak deneyler gerçekleştirildi (Şekil 8).



Şekil 8. Deney akış şeması.

3.5.3.1 Hücrelere Uygulanacak 1,25-dihidroksivitamin D₃'ün (Kalsitriolün) Hazırlanması

İn vitro deneylerde kullanılan kalsitriol (71820, Cayman) deneyler için uygun çözügede çözüldükten sonra alikotlanarak saklandı. Bir mg kalsitriol steril koşullarda 100 µl DMSO'da

Çözüldü. Elde edilen 24 mM’lik anastok, 0,5 ml’lik steril tüplerde, her birinde 15 L olacak şekilde alikotlandı. Canlılık testi için gerekli olan ara stok (100 nM), 24 mM’lik anastoktan uygun hacimdeki RPMI 1640 ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

3.5.4 Real-Time PCR (Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real Time PCR, ift zincirli DNA’ya bağlandıklarında floresan sinyal veren boyalar kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı ile açığa çıkan floresan sinyalin kantitasyonunu yapan bir PCR tekniğidir.

Bunun için öncelikle total RNA veya mRNA izolasyonu, daha sonra reverse transkriptaz tarafından komplementer DNA (cDNA) sentezi ve son olarak PCR işleminin uygulanması gereklidir.

3.5.4.1 Total RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonunu içeren bu adımda kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. RNA izolasyonu sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler.

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod Numarası</i>
Total RNA İzolasyon Kiti	Roche	11 828 665 001
Santrifuj	Heraeus	Biofuge Stratos
Vorteks	Heidolph	REAX Top

Uygulama basamakları:

1. 25 cm²’lik hücre kültür kaplarına pasajlanan hücreler, hücrelerin pasajlanması adımımda anlatıldığı şekilde kaldırıldı ve hücrelerin sayılması adımımda anlatıldığı şekilde sayıldı.
2. Bir milyon hücreye karşılık gelen hücre süspansiyonu, 1,5 mL’lik DNaz/RNaz free tüplere aktarıldı.
3. Tüpler oda sıcaklığında 2500 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi.

4. Santrifüjün ardından kitin talimatları doğrultusunda aşağıda belirtilen adımlar uygulandı:
- a) Santrifüj sonunda üst faz atıldı, pelletler 200 µL 1x PBS ile süspanse edildi.
 - b) Süspansiyon içerisine 400 µL lizis/bağlanma tamponu (yeşil kapaklı tüp) eklendi.
 - c) Tüpler oda sıcaklığında 15 saniye vortekslendi.
 - d) Kit ile birlikte gelen filtreli tüpler, toplama tüplerinin içine yerleştirildi.
 - e) Lizatlar, filtreli tüplerin içeresine aktarıldı.
 - f) Tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
 - g) Santrifüj sonunda filtreli tüpten toplama tüplerine geçen sıvı atılarak, her bir filtreli tüp tekrar kendi toplama tüpüne yerleştirildi.
 - h) Steril bir tüpte 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ile 10 µL DNaz I karıştırıldı. Örnek sayısına bağlı olarak miktarlar arttırıldı.
 - i) Hazırlanan karışım, filtreli tüplere, tam filtreyi kapatacak gelecek şekilde aktarıldı.
 - j) Tüpler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
 - k) İnkübasyonun ardından, tüplere 500 µL yıkama tamponu I eklendi ardından tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
 - l) Santrifüj sonunda filtreli tüpten toplama tüplerine geçen sıvı atılarak, her bir filtreli tüp tekrar kendi toplama tüpüne yerleştirildi.
 - m) Tüplere 500 µL yıkama tamponu II eklendi ve tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
 - n) Santrifüj sonunda filtreli tüpten toplama tüplerine geçen sıvı atılarak, her bir filtreli tüp tekrar kendi toplama tüpüne yerleştirildi.
 - o) Tüplere 200 µL yıkama tamponu II eklendi ve tüpler oda sıcaklığında 13000 g'de 2 dakika santrifüjlendi.
 - p) Toplama tüpleri atılarak, filtreli tüpler 1,5 mL'lik PCR tüplerine yerleştirildi.
 - q) Filtreli tüplere 50 µL elüsyon tamponu eklendi.
 - r) Tüpler oda sıcaklığında 8000 g'de 1 dakika santrifüjlendi.
 - s) Santrifüj sonunda filtreye tutulan RNA, elüsyon tamponu ile yıkanarak tüplerde toplandı.
 - t) Filtreli tüpler atıldı, RNA içeren PCR tüpleri daha sonraki denemeler için -80°C'ye kaldırıldı.

3.5.4.2 RNA Örneklerinin Kantitasyonu

Bu adım, izole edilen RNA'nın saflığını kontrol etmek ve konsantrasyonunu belirlemek için yapıldı. RNA örneklerinin kantitasyonu sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. RNA örneklerinin kantitasyonu sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler.

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod Numarası</i>
Nanodrop	Thermo	NanoDrop 3300

Uygulama basamakları:

1. İzole edilen RNA örneğinin 1 µL'si Nanodrop'taki aşağı optik bölmeye damlatıldı.
2. Nanodrop'un üst optik bölgesi aşağı optik bölmenin üzerine kapatılarak RNA örneğinin iki optik bölme arasında kalması sağlandı.
3. Nanodrop'ta 260 nm ve 280 nm dalga boylarında örneklere ait absorbands değerleri ölçüldü.
4. RNA saflık kontrolü için hesaplama: A_{260nm}/A_{280nm}
5. RNA konsantrasyonu için hesaplama: $C_{RNA} = A_{260nm} \times 40 \mu g/ml$

3.5.4.3 Agoroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla, RNA örnekleri % 1,2 Formaldehit agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Çoğu RNA'lar intramoleküler baz eşleşmesinden dolayı sekonder yapılar oluştururlar. Bu durum elektroforez sırasında molekül boyutuna göre örneklerin doğru bir şekilde göç etmesine engel olur. Bu nedenle RNA örnekleri görüntülenirken jele, yürütme tamponuna ve örnek yüklem tamponuna denatürasyon ajanı olan formaldehit eklenir ayrıca örneklerin ısıyla denatürasyonu sağlanır. Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. %1,2 Formaldehit agaroz jelde hazırlanması ve görüntülenmesinde kullanılan cihaz ve malzemeler.

<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Model/Kod Numarası</i>
Horizontal Elektroforez Sistemi	Thermo	OWL EASYCAST B1
Güç Kaynağı	Thermo	EC 300 XL
Görüntüleme Cihazı	UVP	EC3 Chemi HR 410
% 37 Formaldehit (12.3M	Sigma	F1635
Agaroz Tip III High EEO	Sigma	A6138
Etidyum Bromür	Sigma	E8751
Gliserol	AppliChem	A1123
Agaroz Tip III High EEO	Sigma	A6138
EDTA	Sigma	E02P
MOPS	Sigma	M1254
N, N-Dimetil formamide	Sigma	D8654
Sodyum asetat	CODEY	366207

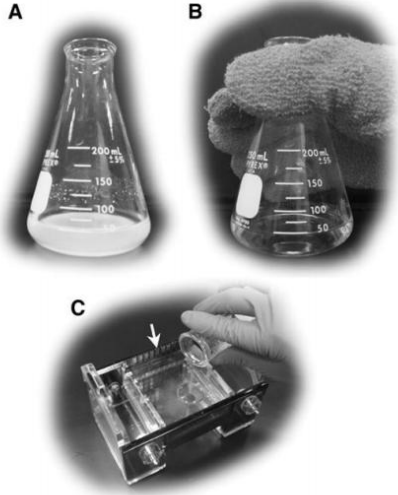
3.5.4.3.1 RNA % 1,2 Formaldehit AgaroZ Jeli Hazırlama

% 1,2 formaldehit agaroz jel hazırlanması sırasında çözeltiler Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. % 1,2 Formaldehit agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	Özellikleri
10X Formaldehit (FA) Jel Tamponu	10 mM EDTA, pH 7,0 200 mM MOPS 50 mM Sodyum Asetat
5X RNA Örnek Yükleme Tamponu	0,5 M EDTA pH 8,0 % 37 Formaldehit % 100 Gliserol Formamid 10X FA Jel Tamponu 40 µg/ml Etidyum Bromür
1X FA Yürütme Tamponu	50 ml 10X FA Jel Tamponu 10 ml % 37 Formaldehit 440 ml RNaz free dH ₂ O

Uygulama basamakları:



Şekil 9. % 1,2 Formaldehit agaroz jel hazırlama.

1. 50 ml agaroz jel için bir erlene; 5 ml 10X FA jel tamponu (Tablo 7), 45 ml RNaz free dH₂O ve 0,6 gr agaroz konuldu (Şekil 9A).

2. Karışım eriyene kadar mikrodalga fırında 3-5 dakika kaynatıldı.

3. Yaklaşık 65°C'ye kadar soğutuldu (Şekil 9B).

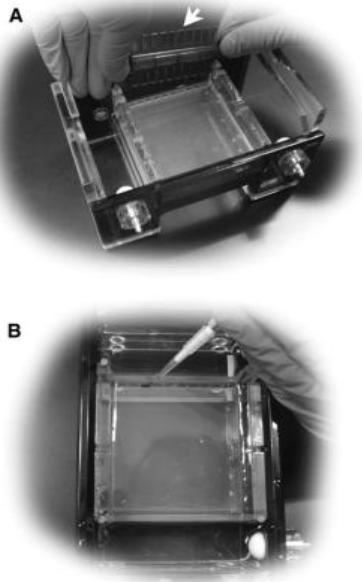
4. Üzerinde 900 µL % 37 Formaldehit ilave edildi.

5. Horizontal elektroforez sistemine karışım döküldü ve taraklar yerleştirildi (Şekil 9C).

6. Jelin polimerleşmesi için yaklaşık 1 saat beklendi.

3.5.4.3.2 İzole Edilen RNA Örneklerinin Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Uygulama basamakları:



Şekil 10. İzole edilen RNA örneklerinin jele yüklenmesi.

1. 5X RNA örnek yükleme tamponu (Tablo 7) ile RNA örnekleri karıştırılarak her kuyucukta 1 µg RNA olacak şekilde hazırlandı.

2. Hazırlanan örnekler 65°C'de 5 dakika inkübe edildi ve süre sonunda hızla buz içerisine alındı.

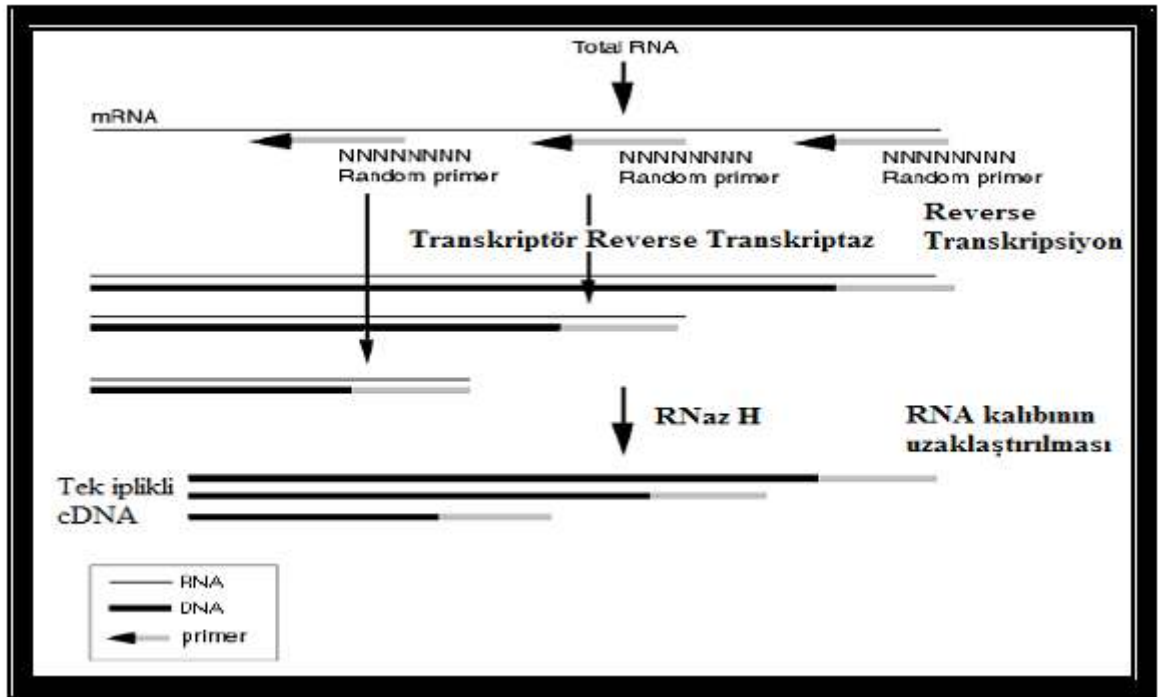
3. Daha önce hazırlanan % 1,2 formaldehit agaroz jel, elektroforez sistemine yerleştirildi ve üzerine 1X FA yürütme tamponu (Tablo 7) konuldu (Şekil 10 A).

4. Taraklar jelde dikkatlice çıkarıldıktan sonra örnekler kuyucuklara yüklendi (Şekil 10 B).

5. 70V sabit, 50mA'de 30-45 dakika elektroforez uygulandı ve jeller görüntülendi.

3.5.4.4 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

mRNA molekülünün tek iplikli cDNA molekülüne dönüştürülmesi işlemi iki basamakta gerçekleşir. İlk adımda mRNA, random primer ile hibridize olur ve transkriptör reverse transkriptaz enzimiyle dNTP'ler kullanılarak zincir uzaması sağlanır. İkinci adımda ise, transkriptör reverse transkriptazın RNaz H aktivitesi aracılığıyla RNA-DNA hibritlerindeki RNA molekülü parçalanır ve tek iplikli cDNA elde edilir (Şekil 11). Çalışmalarımız sırasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 13'te gösterilmiştir.



Şekil 11. cDNA sentezi akım şeması (160).

Tablo 8. cDNA sentezinde kullanılan cihaz ve malzemeler.

Malzeme/Cihaz Adı	Markası	Model/Kod Numarası
Thermal Block Cycler PCR Cihazı	Techne	TC-512
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	04897030001

Uygulama Basamakları

1. İlk olarak RNA örneklerinden 1 µg'a karşılık gelen hacim alındı ve RNaz, DNaz free dH₂O ile son hacim 11 µL'ye tamamlandı.
2. Her tüpe 2 µL random hegzamer primer konuldu.
3. RNA sekonder yapılarının denatürasyonu amacıyla tüpler, "Thermal Block Cycler PCR cihazında" 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Inkübasyon sırasında örnek sayısına göre "RT mix" hazırlandı (Tablo 9).

Tablo 9. RT mix hazırlama.

<i>Reaktifler</i>	<i>Tek örnek için miktar</i>
Transcriptor RT Reaction Buffer	4 µl
Protector RNaz Inhibitor	0,5 µl
Deoxynucleotide mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5 µl

5. Inkübasyon sonrası her tüpe 7 µl RT mix konuldu.
6. Daha sonra tüpler Thermal Block Cycler PCR cihazına yerleştirilerek;
 - a) 10 dakika 25°C'de
 - b) 60 dakika 50°C'de
 - c) 5 dakika 85°C'de
 - d) ∞ zamanda +4°C'de inkübe edildi.
7. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.5.4.5 Real-Time PCR

Real-Time PCR hem kalitatif hem de kantitatif analizler için alternatif bir yöntem sunar. Tek bir tüpte tek bir cihazla amplifikasyon ve floresan sinyalin deteksiyonu ile oluşan veriyi eş-zamanlı kaydetme imkânı verir. PCR'ın kendisi ve ürünlerin deteksiyonu aynı reaksiyon içerisinde gerçekleştiği için bu işleme aynı zamanda "homojen PCR" da denmektedir.

PCR ürünleri floresan özellikte ve floresans döngü sayısının üzerine kurulmuş ise, PCR

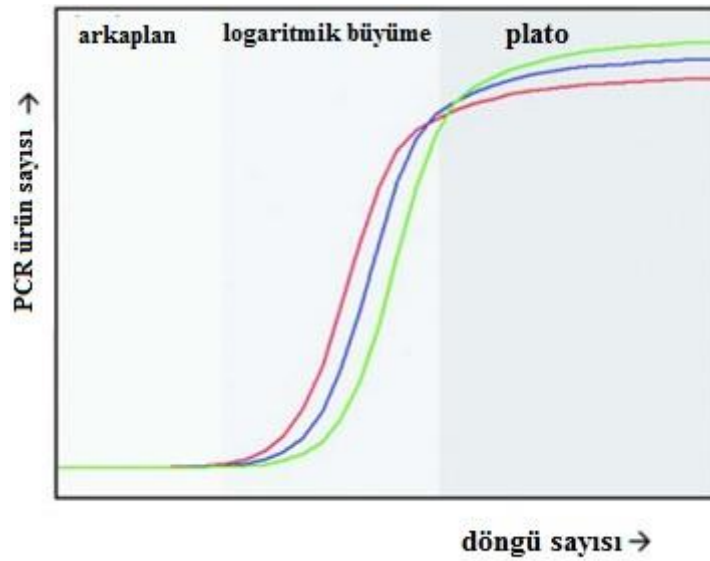
ürünlerinin birikimi bakteriyal büyüme eğrisine benzer şekilde bir eğri ile gösterilebilir (Şekil 12); erken arkaplan evresi (cihazın deteksiyon sınırının altında), ekponansiyel büyüme evresi (ya da log faz) ve plato (son-nokta) evresi.

Arkaplan evresi PCR ürününe ait sinyalin sisteme ait arkaplan sinyalinden büyük olduğu anda sonlanır.

Ekponansiyel evre, biriken yeteri miktarda ürünün arkaplan sinyalinin üstünde dedekte edilmesiyle başlar, reaksiyon veriminin düşmesiyle sonlanır; bu noktadan sonra reaksiyon durağan evreye girer.

Genellikle 4-6 döngüden 40 döngüye kadar gerçekleşen reaksiyon ekponansiyel büyümeyi ifade eder. Bundan sonra, reaksiyon bileşenleri sınırlanmaya başlar. Ekponansiyel faz süresince, eğim bilindiğinden hedef molekülün başlangıç sayısı hesaplanabilir.

Durağan fazda, verimlilik değişken bir hal alır ve eğim ekponansiyel fazda olduğu gibi hedef molekülün başlangıç sayısını hesaplamak mümkün değildir (161).



Şekil 12. Amplifikasyon eğrisi (161).

Real-Time PCR’da, PCR ürünün konsantrasyonuna ilişkin veri her döngüde çevrim içi olarak toplanır. Real-Time PCR bu veriyi amplifikasyon eğrisi şeklinde ya da grafik formatında gösterir. Reaksiyon bittikten sonra, ekponansiyel döngüler, kaydedilmiş verinin çözülmesi ile belirlenebilir. Sonra veri ekponansiyel faz süresince var olan PCR ürününün ve ekstrapolasyon ile her bir reaksiyondaki kalıp başlangıç miktarlarının

belirlenmesi için kullanılır. İleri Real-Time PCR cihazları ve yazılımları sayesinde bu veriler kolayca elde edilebilir.

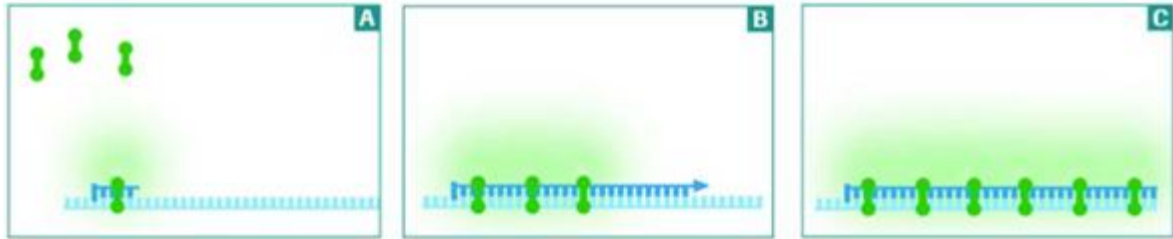
3.5.4.5.1 Real-Time PCR Formatları

Tüm Real-Time PCR sistemleri floresan boyaları detekte eder, ardından bu floresan sinyal ile reaksiyondaki PCR ürünü arasında bir ilişki kurar. Florometrik olarak PCR ürünlerinin deteksiyonu ve değerlendirilmesi için birtakım yöntemler bulunmaktadır. En sık kullanılan floresan yöntemi 2 sınıfa ayrılır, dizi-bağımsız deteksiyon yöntemleri ve dizi-spesifik prob bağlanma yöntemleri. Her birinin kendi kullanım alanı ve sınırlamaları bulunmaktadır.

Dizi-Bağımsız Deteksiyon Yöntemleri

Dizi-bağımsız deteksiyon yöntemleri Syber Green I gibi tüm çift zincir DNA moleküllerine bağlanan floroforlara dayalıdır.

SYBER Green I çözelti içinde serbest halde iken çok nadir ışıma yapar fakat çift zincir DNA'nın minör boşluğuna bağlanır (162). Bağlanma gerçekleştiğinde konformasyonel değişimler nedeniyle ışıma artar (Şekil 13). Bu nedenle, SYBER Green I sinyalindeki artış ile PCR sırasında amplifiye olmuş ürün arasında bir ilişki bulunmaktadır.



Şekil 13. Syber Green I varlığında PCR (162).

SYBER Green I herhangi bir çift zincir DNA'ya bağlanabileceğinden, farklı çift zincir DNA türleri arasındaki fark ayırt edilemez. Spesifik ürün, non-spesifik ürünler ve primer dimerlemeleri de dedekte edilir. Bu nedenle yanlış sonuçlar elde edilebilir (163).

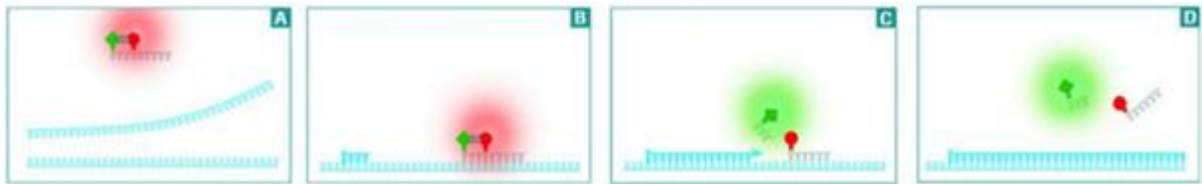
Dizi-Spesifik Probe Bağlanma Yöntemleri

Dizi spesifik bağlanma yöntemleri, hedef PCR'daki tamamlayıcı diziye hibridize olan oligonükleotitlere dayanır ve bu nedenle sadece spesifik ürün dedekte edilir. En sık kullanılan problemler hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri ya da tek işaretli problemlerdir (simple-probe). Problemlere, Real-Time PCR cihazları tarafından ölçülebilen floroforlar takılır. Farklı deteksiyon formatları bulunsalar da bunlar çok sık kullanılmamaktadır.

Florofor işaretli, diziye spesifik problemlerin kullanıldığı bir PCR yöntemi, reaksiyondaki hedefin bulunması halinde floresans artacağından oldukça spesifikdir. Dizi özgüllüğü nedeniyle, diğer artık ürünler (primer-dimerleri, PCR yan ürünleri gibi) dedekte edilemeyecektir. Bu nedenle non-spesifik artıkları ayırmak için ek bir işleme gerek kalmayacaktır (164).

Hidroliz Problemleri

Çalışmamızda kullandığımız hidroliz problemleri, Taq DNA Polimerazın 5' hidrolaz aktivitesiyle hidrolize edildiklerinde ışığa yaparlar (Şekil 14). Yöntem tek bir 3'-uzamayan probun kesilmesinin spesifik hedef DNA dizisinin birikimini belirtmesi bakımından diğer 5' nükleaz yöntemlerine benzerdir. Tek bir prob birbirine yakın olan floresan bildirici ve floresan söndürücü barındırır. Prob bir bütünken söndürücü boya, bildirici boyayı baskılar böylece sinyal oluşumu engellenir. PCR süresince, polimerazın 5' nükleaz aktivitesi probu keser, bildiriciyle söndürücü birbirinden ayrılır ve böylece ışığa gerçekleşir.



Şekil 14. Hidroliz problemleri (162).

3.5.4.5.2 Real-Time PCR İçin Kantitasyon Yöntemleri

Bir amplifikasyon reaksiyonunda, floresansının arkaplanı aştığı döngüye aşma döngüsü (crossing point-CP-) denilir. Diğer bir anlatıyla, amplifiye edilen ürünün veride ilk görülebilir olduğu noktadır. Floresans-döngü sayısı grafiğinde, örneğe ait CP keskin yukarı doğru bir eğri şeklinde görülür.

Real-Time PCR’da kantitasyon örneğin CP’sinin belirlenmesini kapsar. PCR cihazınca ölçülecek PCR ürünleri için ürün molekülü sayısı o cihazın deteksiyon sınırını geçmelidir. Bu nedenle örneğin CP’si örnekteki başlangıç DNA konsantrasyonuna bağlıdır; eğer başlangıç DNA konsantrasyonu düşükse CP değerine ulaşmak için daha fazla amplifikasyon döngüsüne gerek vardır.

Yazılımlar CP belirlemesi için iki farklı yöntem kullanırlar:

- Otomatik yöntem: Örneğin CP değeri floresans eğrisinin keskince yukarı döndüğü nokta olarak alınır. Bu dönme noktası eğrideki ikinci eğimin türevine karşılık gelir. Bu nedenle yöntemin diğer adı “Maksimum İkinci Türev Yöntemi”dir. En büyük avantajı çok az kullanıcı bilgisinin gerekmesidir.
- Manuel Yöntem: PCR eğrisindeki eksponansiyel (log-çizgisel) faz süresince biriken floresans noktalarından (değerlerinin) regresyon çizgisinin oluşturulmasıyla CP değerinin belirlenmesidir. CP, regresyon eğrisi ile dikey çizginin kesişimi olan ve kullanıcı tarafından belirlenen bir değerdir. Yöntemin diğer adı “Uygun Noktalar” yöntemidir.

3.5.4.5.3 Kantitasyonun Analizindeki Temel Modeller

Real-Time PCR da kantitasyonun analizi iki temel modelle yapılır; kesin ve rölatif kantitasyon. Her iki model de deneysel açıdan belirlenen CP değerlerini farklı olarak kullanır.

3.5.4.5.3.1 Kesin Kantitasyon

Kesin kantitasyon yöntemlerinde, hedef molekülün konsantrasyonu kesin değer olarak ifade edilir (örn. Kopya sayısı, ug/uL, vb...) Kesin kantitasyon yöntemi bilinmeyen hedef molekülün konsantrasyonunu belirlenmesi için, bilinen konsantrasyonların eksternal standart

örneklerinden oluşturulmuş standart eğriyi kullanır (165) . Bu nedenle, kesin bir kantitasyon yöntemi, eğer standartlar ve bilinmeyenler aynı verim ile amplifiye ve detekte edilmişler ise geçerli sonuçlar sağlar.

Standart eğri oluşturmak için standart örneklerin konsantrasyonlarına karşı CP değerlerinin bir grafiği çizilir. Oluşan eğrinin eğiminden yola çıkılarak hesaplama şu eşitlikle yapılır:

$$E = 10^{-\left[\frac{1}{\text{eğim}}\right]}$$

3.5.4.5.3.2 Rölatif Kantitasyon

Rölatif kantitasyon yöntemi tüm gen ekspresyon analizleri için ya da rölatif gen doz seviyelerinin belirlenmesi için uygundur.

Bu yöntemde hedef genin konsantrasyonu, aynı örnekteki hedef-referans gene oranı şeklinde ifade edilir. Rölatif kantitasyon yöntemleri başlangıç örnek miktarındaki varyasyonlar, cDNA sentezi verimliliği ya da örnek yükleme/pipetleme hataları gibi nicelik ve nitelikteki farklılıkları düzeltir. Hedef ve referans gen miktarı PCR verimliliğinin ve örnek CP değerinin bir fonksiyonu olduğu için, herhangi bir standart eğri gerekmez. Referans gen olarak, gliseraldehit- 3-fosfat-dehidrogenaz (G3PDH), β -aktin gibi tüm hücrelerde eksprese edilen, hücre canlılığı için gerekli ve deneysel uygulamalarda dahi ekspresyon düzeyleri sabit kabul edilen “Housekeeping Gen”ler kullanılabilir (166). Hesaplama şu eşitlikten yola çıkılarak yapılır (167).

$$\text{rölatif değer} = \frac{(E_{\text{hedef gen}})^{\Delta CP_{\text{hedef gen(kontrol-örnek)}}}{(E_{\text{referans gen}})^{\Delta CP_{\text{referans gen(kontrol-örnek)}}}$$

$\Delta CP_{\text{referans gen}}$ = referans genin kontrole ait CP değeri- referans genin örneğe ait CP değeri

$\Delta CP_{\text{hedef gen}}$ = hedef genin kontrole ait CP değeri- hedef genin örneğe ait CP değeri

Yukarıda belirtildiği gibi referans genlerin deneysel uygulamalarda dahi ekspresyon düzeyleri sabit kabul edildiğinde $\Delta CP_{\text{referans gen}}=0$ olacağından eşitlik şu şekilde

basitleştirilebilir:

$$\text{rölatif değer} = \frac{(E_{\text{hedef gen}})^{\Delta CP_{\text{hedef gen(kontrol-örnek)}}}}{(E_{\text{referans gen}})^0} = (E_{\text{hedef gen}})^{\Delta CP_{\text{hedef gen(kontrol-örnek)}}}$$

Verimin kalibre edildiği (E=2) “delta-delta” metodu rölatif kantitasyon için basit bir eşitlik sunar:

$$\text{rölatif değer} = 2^{-[\Delta CP_{\text{örnek}} - \Delta CP_{\text{kontrol}}]} = 2^{-\Delta \Delta CP}$$

$\Delta CP_{\text{örnek}} - \Delta CP_{\text{kontrol}} = \text{hedef genin örnekteki CP değeri} - \text{hedef genin kontroldeki CP değeri}.$

Rölatif kantitasyon yöntemleri iki parametrenin uygulanması ile düzeltilir:

- Kalibratördeki hedef/referans oranına göre hedef/referans oranları normalize edilir. Böylece, kalibratör, hedef ve referans arasında prob birleşmesindeki farklılıklar, FRET verimi ya da boya eksitasyon sabitleri gibi deteksiyon farklılıkları düzeltilir.
- Hedef ve referans genlerin PCR verimlerindeki farklılıkları düzeltilir. Rölatif kantitasyon yöntemi tüm gen ekspresyon analizleri için ya da rölatif gen doz seviyelerinin belirlenmesi için uygundur.

Uygulama Basamakları

1. Real-Time PCR denemesinde üç tane gen ekspresyonunun analizi yapıldı, housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı.
2. Real-Time PCR için kullanılan malzeme ve cihazların markaları ve kod numaraları Tablo 10’da sıralanmıştır.

Tablo 10. Real-Time PCR için kullanılan malzeme ve cihazların markaları ve kod numaraları.

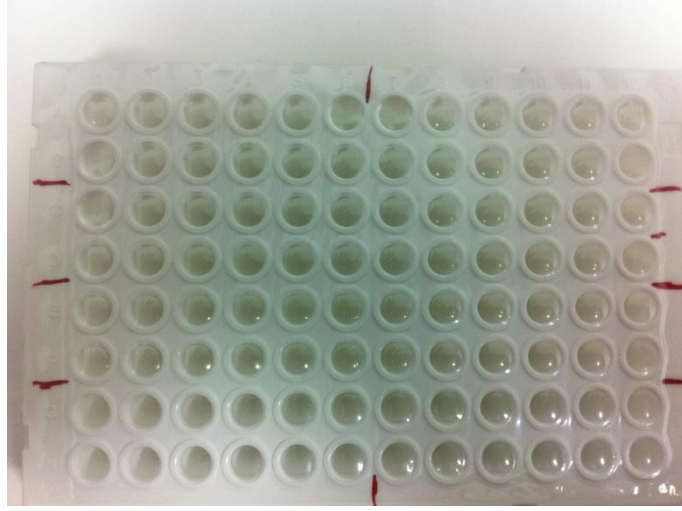
<i>Malzeme/Cihaz Adı</i>	<i>Markası</i>	<i>Kod Numarası</i>
RT-PCR Cihazı	Roche Ligtcycler® 480	Versiyon 2.0
RT-PCR Yazılımı	Roche Lightcycler® 480 Software	Verisyon 1.5.0
Enzim (2x)	LightCycler® 480 Probes Master	04887301001
Santrifüj	Eppendorf	5430
96 Kuyucuklu Plak	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	04729692001
Plak Kapatıcı	LightCycler® 480 Sealing Foil	04729757001

3. Her bir örnek için 8 µl’lik reaksiyon karışımı Tablo 11’de anlatıldığı şekilde hazırlandı.

Tablo 11. Reaksiyon karışımı.

<i>Reaktifin Adı</i>	<i>Miktarı (µl)</i>
PCR grade su	3,0
Primer prob mix (NDRG2 ya da NIS)	1,0
Enzim (2x)	5,0
<i>Reaktifin Adı</i>	<i>Miktarı (µl)</i>
PCR grade su	2,5
Primer prob mix (GADPH için)	0,5
Enzim (2x)	5,0

4. Sekiz µL’lik reaksiyon karışımları 96 kuyulu plaklardaki konduktan üzerlerine ikişer µL’lik cDNA örnekleri eklendi. Negatif kontrol için PCR grade su kullanıldı.
5. Buharlaşmayı önlemek amacıyla plağın üzeri sealing foil ile kapatıldı (şekil 15).



Şekil 15. Sealing foil ile kapatılmış temsili plak görüntüsü.

6. Plak 2000 rpm’de 30 saniye santrifüjlenerek tüm karışımın kuyuların dibinde toplanması sağlandı.
7. Plak, Light Cycler 480 II cihazına yerleştirildi ve Real-Time PCR işlemi başlatıldı.
8. 95°C’de 10 dakika, 1 döngü denatürasyon basamağının ardından 95°C’de 10 saniye, 60°C’de 10 saniye, 72°C’de 10 saniye, 55 döngü amplifikasyon basamağı uygulandı.
9. Roche Lightcycler 480 (V 1.5.0) yazılımı kullanılarak her bir örneğe ait NDRG2 ve NIS gen ekspresyonu, eşlenik GAPDH ekspresyonu ekspresyonuna oranlanarak “Rölatif Kantitasyon” yapıldı.

3.6 ARAŞTIRMA TAKVİMİ

Tablo 12. Araştırma takvimi.

Projelendirme	Ocak 2012 - Nisan 2012
Hücre Kültürü	Ocak 2013 – Mart 2013
WST-1 Analizleri	Mart 2013 – Nisan 2013
Real-Time PCR Analizleri	Nisan 2013 – Mayıs 2013
Tez Yazımı	Mayıs 2013 – Haziran 2013

3.7 VERİLEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Her deney en az 3 kez tekrar edilmiştir. Bulguların istatistiksel karşılaştırılmaları t testi analizi kullanılarak, SSPS programı (V15.0) ile değerlendirilmiştir. Analizlerin sonucunda anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3.8 ARAŞTIRMANIN SINIRLIKLARI

Araştırmamız bir *in vitro* çalışmadır. Diğer indifferansiye insan tiroid kanseri hücreleri, primer hücre kültürü ile elde edilmesi, bu hücrelerin ticari olarak satın alınmasının mümkün olmaması, çalışmamızda diğer insan anaplastik tiroid kanseri hücre hatlarının kullanılmasını engellemiştir. Bunun yanı sıra çalışmamızda primer hücre kültürü eldesi ve idamesi zor olduğundan uygulanmamıştır. Protein ekspresyonlarındaki olası değişimlerin araştırılması için başta antikolar olmak üzere, diğer sarf malzemelerin ticari olarak satın alınması araştırma bütçesi göz önüne alındığında mümkün olmadığından, araştırmamızda sadece gen ekspresyonlarındaki değişimler araştırılmıştır.

3.9 ETİK KURUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu, 22.03.2012 tarih ve 2012/11-03 no.lu kararında; 549-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

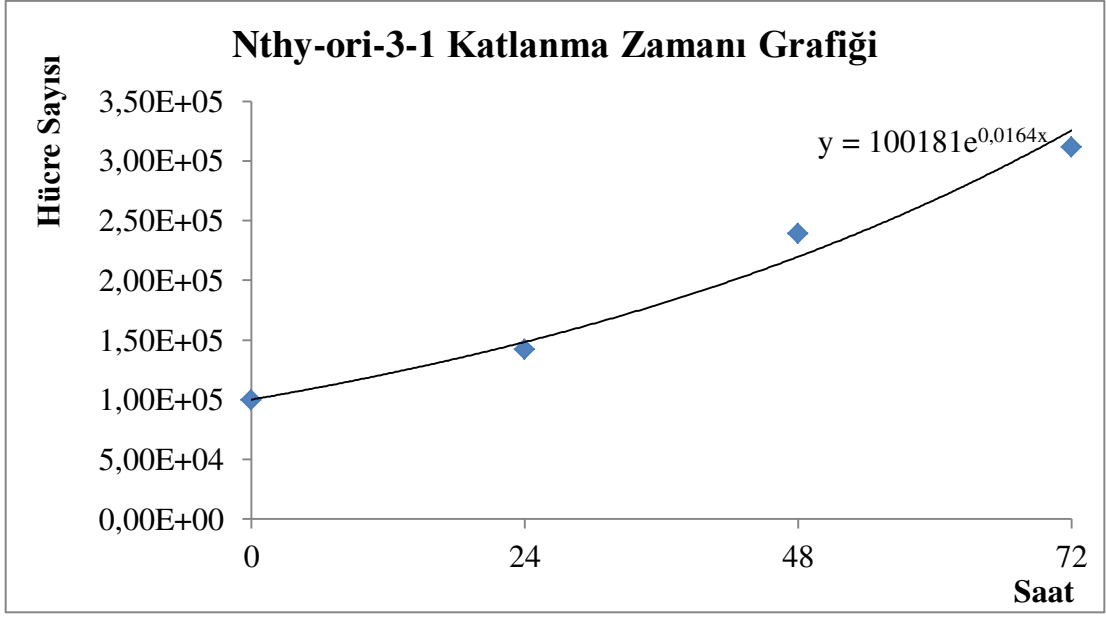
4. BULGULAR

4.1 KATLANMA ZAMANI BULGULARI

Nthy-ori-31 ve 8505C hücrelerine ilişkin katlanma zamanını belirlemek için, altı kuyulu plaklara ekilen hücrelere ait gün/hücre sayısı tablosu oluşturuldu (Tablo 13). Bu tablolardan yola çıkılarak oluşturulan grafiklere (Şekil 16 ve Şekil 17) ait denklemden katlanma zamanları hesaplandı. Başlangıç hücre sayısı Nthy-ori-3-1 için 100.000, 8505C için 200.000'dir.

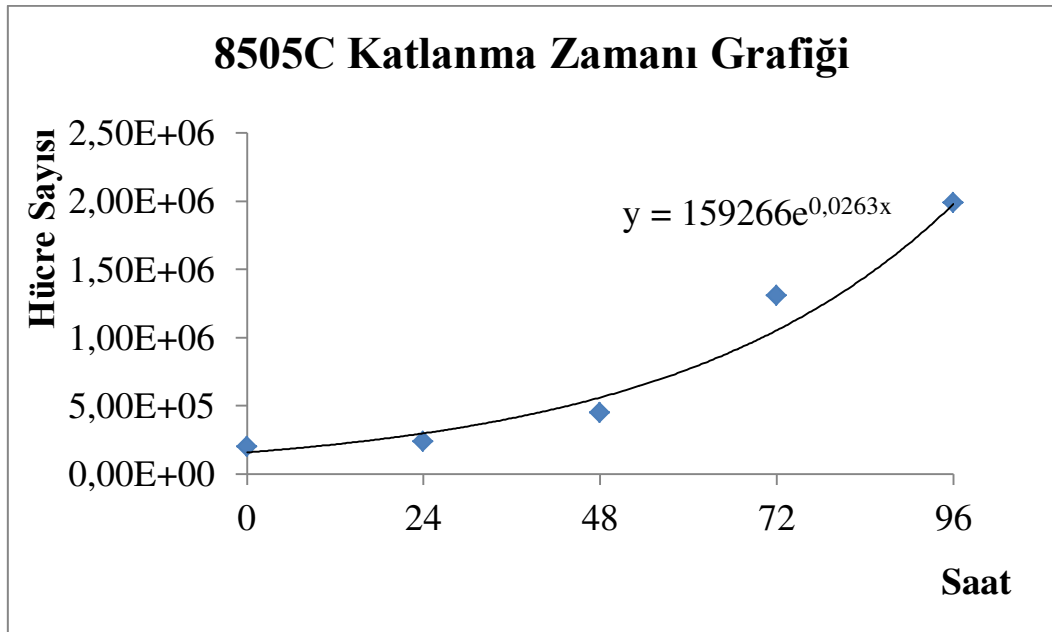
Tablo 13. Nthy-ori 3-1 ve 8505C hücrelerine ilişkin gün/hücre sayısı.

Nthy-ori 3-1		8505C	
Saat	Ortalama Hücre Sayısı	Saat	Ortalama Hücre sayısı
0	100.000	0	200.000
24	142.513	24	237.708
48	239.512	48	451.406
72	311.484	72	1.309.688
		96	1.991.250



Şekil 16. Nthy-ori 3-1 katlanma zamanı grafiği.

Oluşturulan grafik yardımıyla Nthy-ori-3-1 hücrelerine ait katlanma zamanı; $\ln(2)/0,0164 = 42,2$ saat bulundu (158).



Şekil 17. 8505C katlanma zamanı grafiği.

Oluşturulan grafik yardımıyla 8505C hücrelerine ait katlanma zamanı; $\ln(2)/0,0263=26,35$ saat bulundu (158).

4.2 KALSTİROLÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN WST-1 İLE BELİRLENMESİ

0,01-100 μM ile 24, 48, 72 ve 96 saat farklı dozlarda kalsitriol ile inkübe edilen 8505C hücrelerinde, kalsitriolün doza bağımlı olarak hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği etkilere ilişkin bulgular Tablo 14'te verilmiştir. Bulgular $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Kontrol grubu kalsitriol uygulanmayan gruptur.

Tablo 14. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisinin % canlılık bulguları.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Kontrol	100,00 $\pm$ 3,58	100,00 $\pm$ 7,03	100,00 $\pm$ 18,80	100,00 $\pm$ 8,43
0,01 μM Kalsitriol	107,20 $\pm$ 3,27	97,89 $\pm$ 23,78	91,60 $\pm$ 9,20	100,99 $\pm$ 23,12
0,1 μM Kalsitriol	103,24 $\pm$ 6,82	96,41 $\pm$ 4,18	68,38 $\pm$ 10,53	102,91 $\pm$ 10,53
1 μM Kalsitriol	106,82 $\pm$ 4,45	94,58 $\pm$ 8,03	79,00 $\pm$ 11,40	105,47 $\pm$ 14,17
10 μM Kalsitriol	102,88 $\pm$ 10,73	89,63 $\pm$ 9,19	60,62 $\pm$ 8,92	77,71 $\pm$ 12,61
100 μM Kalsitriol	21,70 $\pm$ 4,94	3,57 $\pm$ 0,91	-0,89 $\pm$ 1,658	-5,91 $\pm$ 0,33

Kalstirolün DMSO'da çözünmesi nedeniyle, kalsitrolün dozlarına karşılık gelen DMSO hacimleri 8505C hücrelerine uygulanarak, DMSO'nun hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. DMSO'nun 8505C hücrelerinde canlılık üzerindeki meydana getirdiği değişimlere ilişkin Tablo 15'te verilmiştir. Her bir kalsitriol dozuna karşılık gelen DMSO miktarı v/v cinsinden hesaplanmıştır. Bulgular $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Kontrol grubu DMSO uygulanmayan gruptur.

Tablo 15. DMSO'nun 8505C hücrelerine etkisinin %canlılık bulguları.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Kontrol	100,00±3,60	100,00±7,03	100,00±18,79	100,00±8,43
% 42*10 ⁻⁶ DMSO (v/v)	119,71±2,98	118,28±4,88	102,89±10,36	96,81±2,83
% 42*10 ⁻⁵ DMSO (v/v)	122,77±5,041	121,46±5,93	91,52±7,33	98,07±4,33
% 42*10 ⁻⁴ DMSO (v/v)	119,74±7,16	125,01±10,10	98,30±11,83	97,99±5,77
% 42*10 ⁻³ DMSO (v/v)	125,24±9,13	120,82±6,37	88,71±9,59	95,34±1,13
% 42*10 ⁻² DMSO (v/v)	132,06±5,47	137,48±9,094	107,15±13,73	96,66±3,390

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde gösterilmiştir. * p < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. P değerleri Tablo 16 ve 17'de gösterilmiştir.

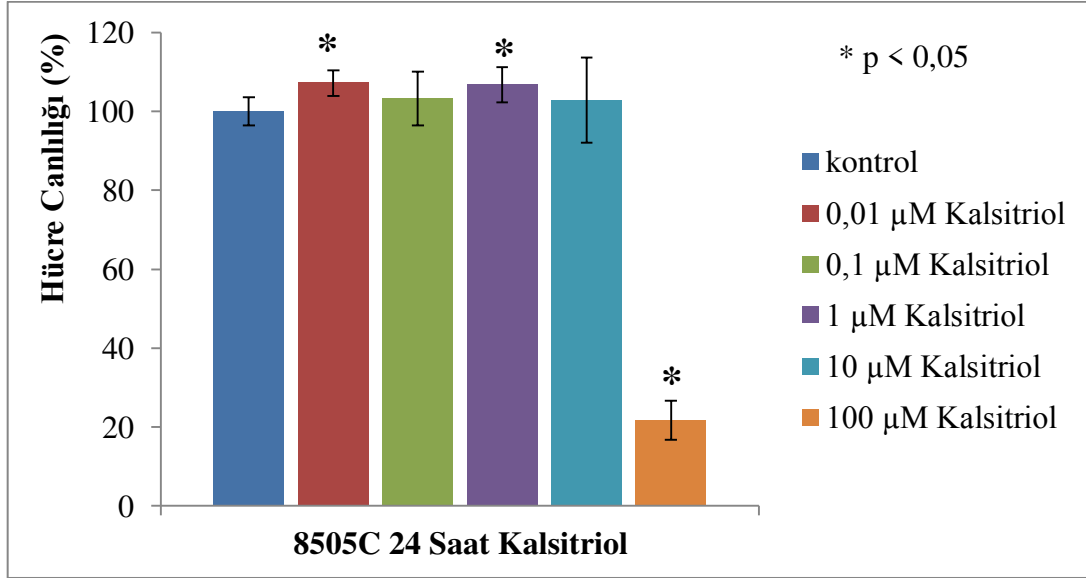
Tablo 16. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
0,01 µM Kalsitriol	0,027	0,861	0,331	0,940
0,1 µM Kalsitriol	0,394	0,437	0,071	0,700
1 µM Kalsitriol	0,005	0,130	0,053	0,554
10 µM Kalsitriol	0,112	0,157	0,007	0,043
100 µM Kalsitriol	0,000	0,000	0,000	0,000

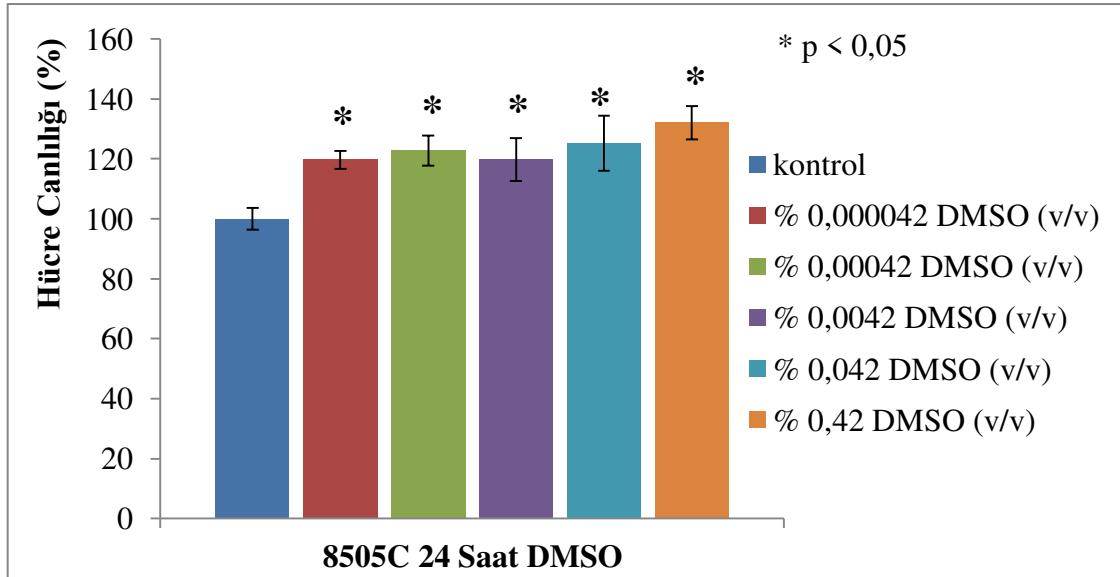
Tablo 17. DMSO'nun 8505C hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
% 42*10 ⁻⁶ DMSO (v/v)	0,000	0,007	0,783	0,419
% 42*10 ⁻⁵ DMSO (v/v)	0,001	0,004	0,349	0,659
% 42*10 ⁻⁴ DMSO (v/v)	0,003	0,005	0,936	0,650
% 42*10 ⁻³ DMSO (v/v)	0,005	0,005	0,140	0,199
% 42*10 ⁻² DMSO (v/v)	0,001	0,001	0,537	0,066

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattının 24 saatlik farklı konsantrasyonlarda kalsitriol ve DMSO içeren hücre kültürü ortamı ile inkübasyonu sonucu elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 18 ve Şekil 19’da gösterilmiştir.



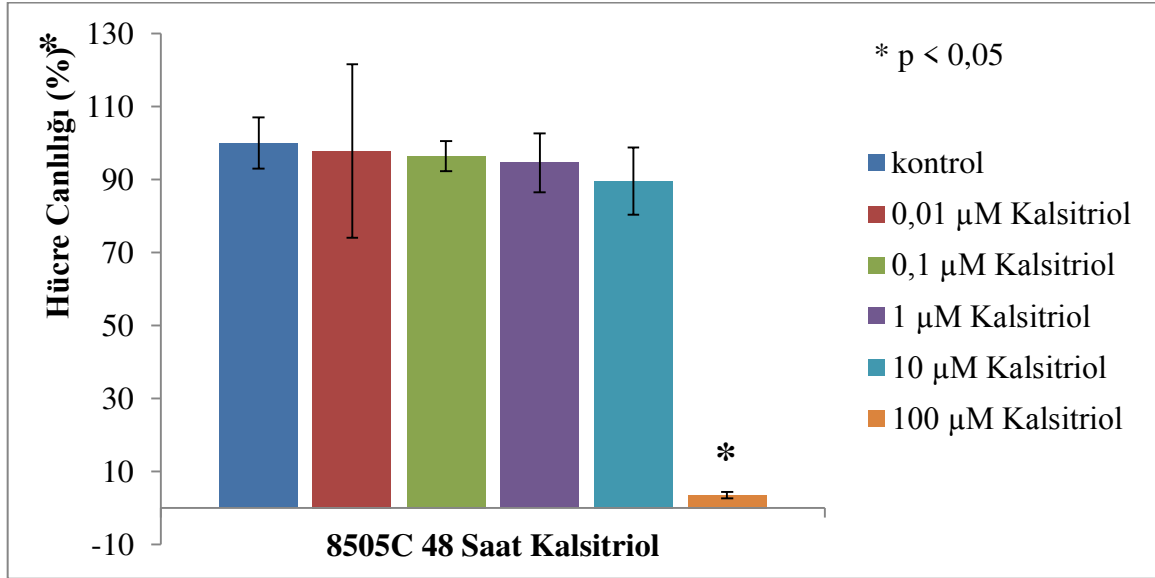
Şekil 18. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.



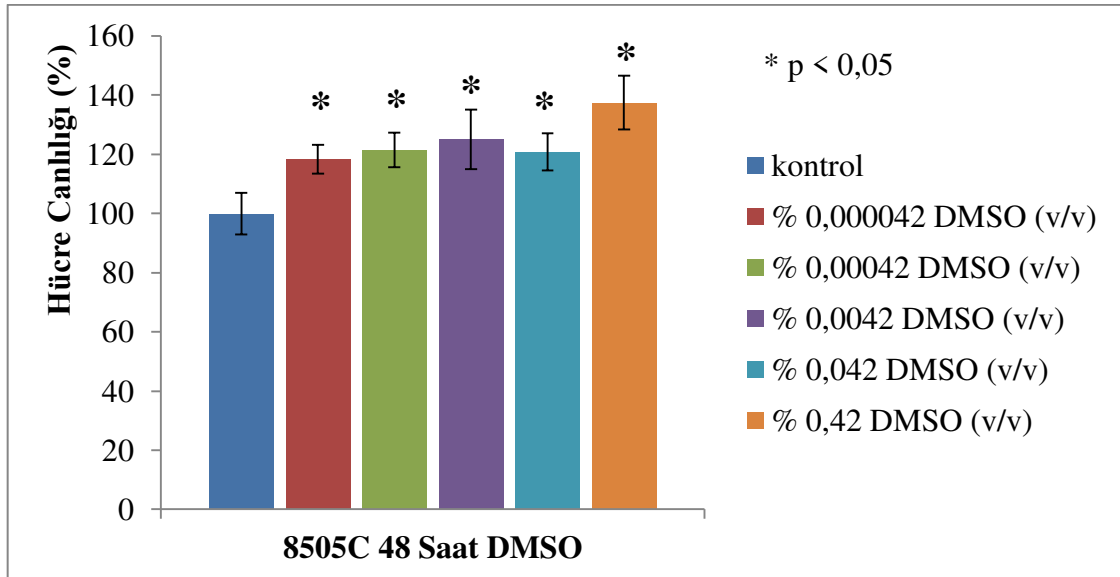
Şekil 19. DMSO’nun 8505C hücre hattına 24 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattının 48 saatlik farklı konsantrasyonlarda

kalsitriol ve DMSO içeren hücre kültürü ortamı ile inkübasyonu sonucu elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 20 ve Şekil 21’de gösterilmiştir.



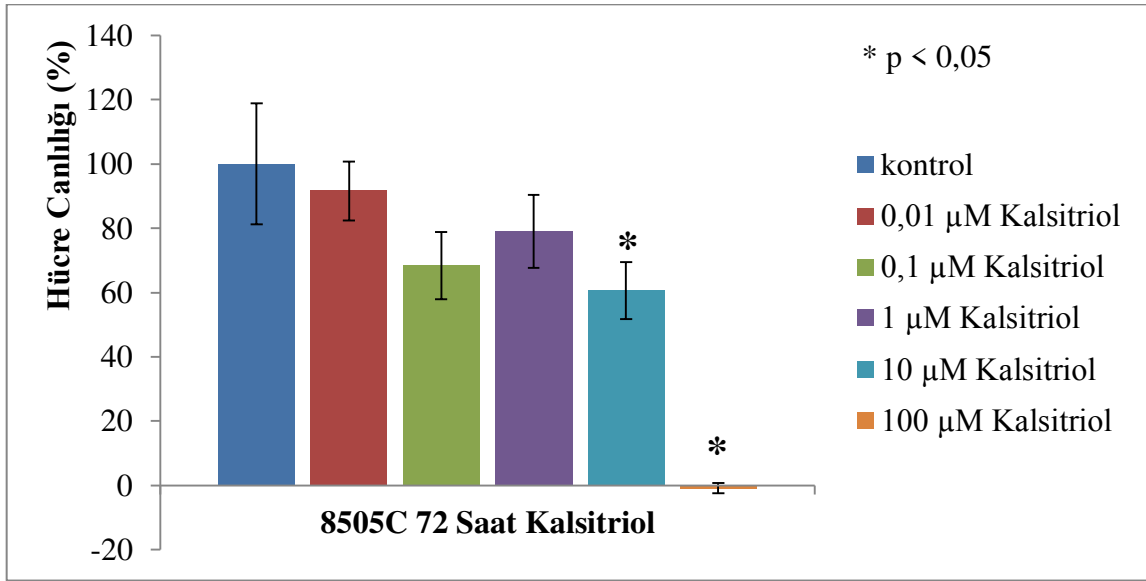
Şekil 20. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.



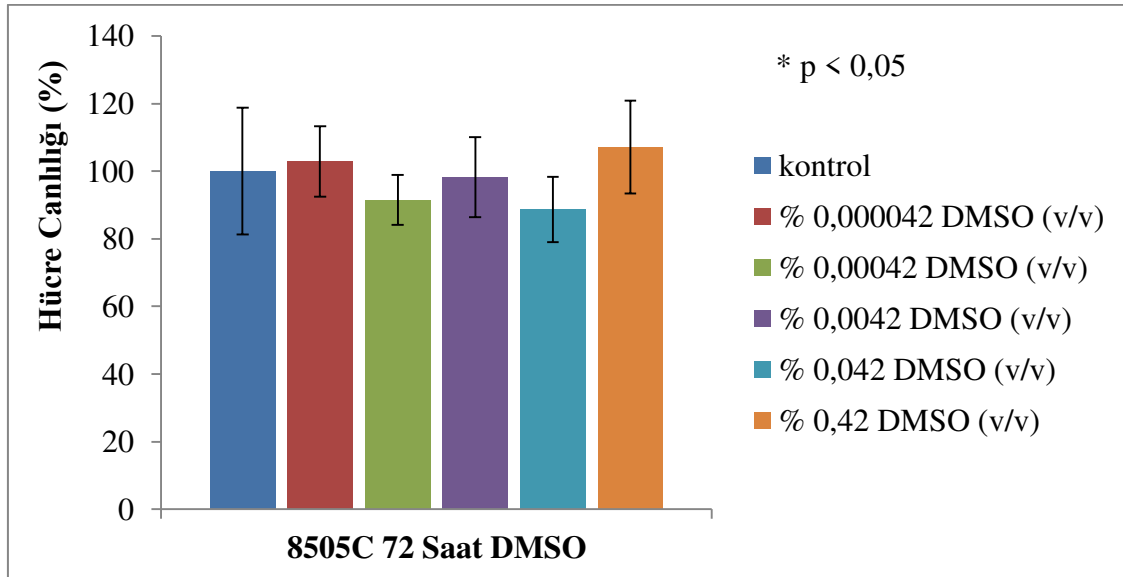
Şekil 21. DMSO’nun 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattının 72 saatlik farklı konsantrasyonlarda kalsitriol ve DMSO içeren hücre kültürü ortamı ile inkübasyonu sonucu elde edilen WST-1

testi bulguları Şekil 22 ve Şekil 23’de gösterilmiştir.



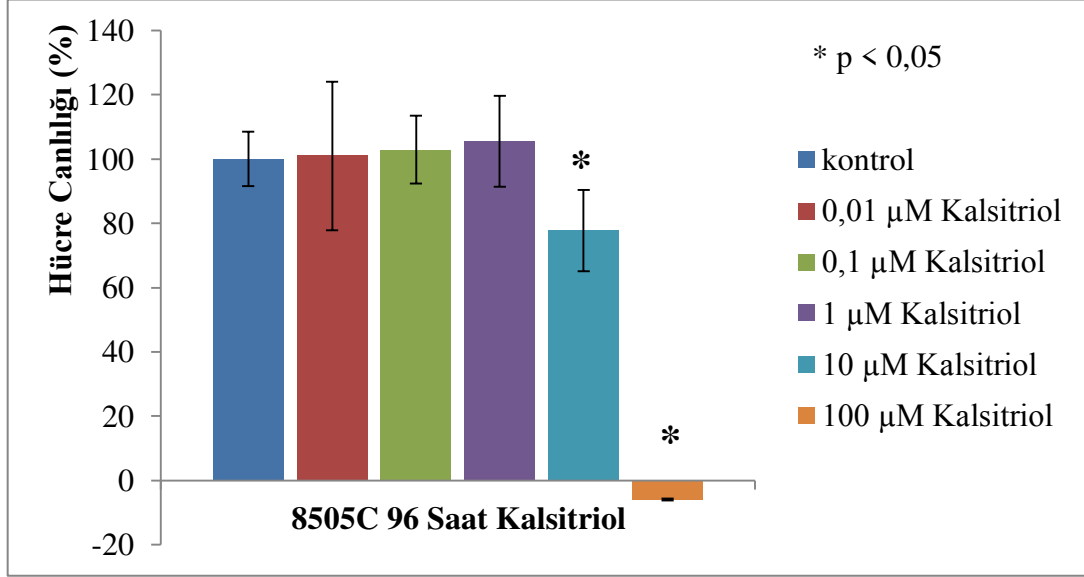
Şekil 22. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.



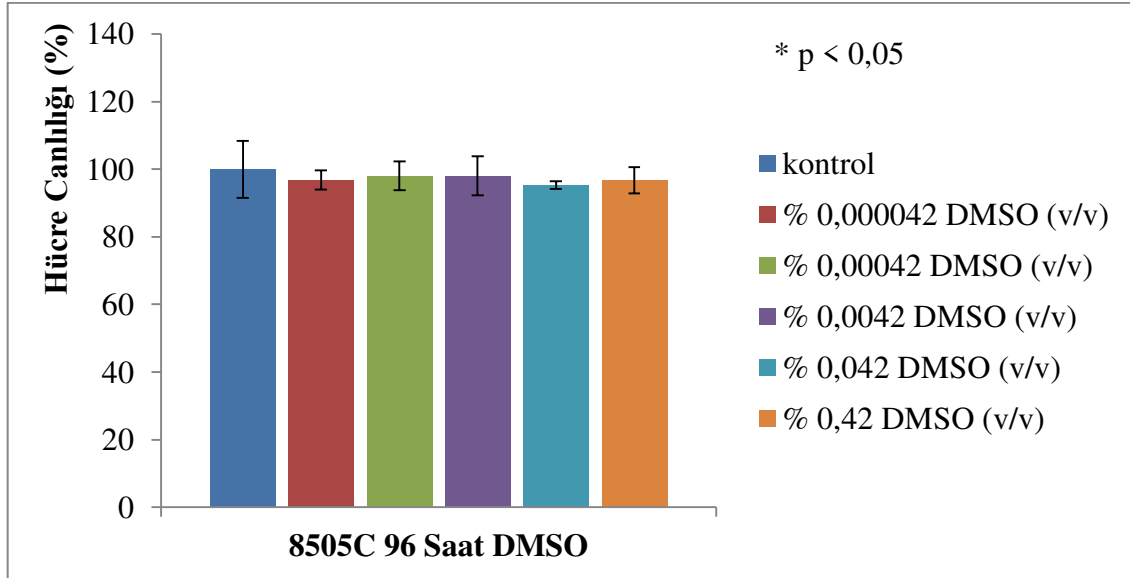
Şekil 23. DMSO’nun 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattının 96 saatlik farklı konsantrasyonlarda

kalsitriol ve DMSO içeren hücre kültürü ortamı ile inkübasyonu sonucu elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 24 ve Şekil 25’te gösterilmiştir.



Şekil 24. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 96 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

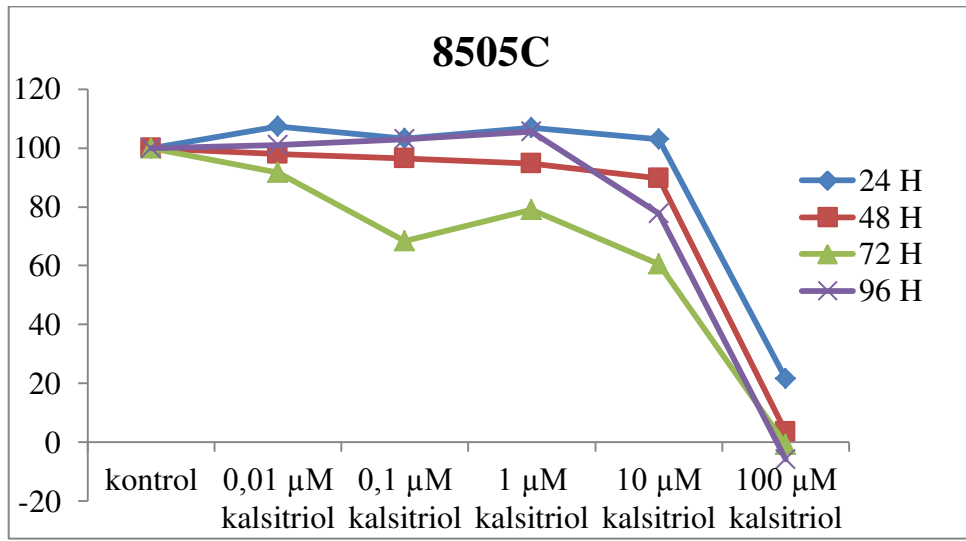


Şekil 25. DMSO’nun 8505C hücre hattına 96 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

8505C hücreleri için her dört inkübasyon süresi için oluşturulan dağılım grafiği Şekil 26’da, IC50 değerleri Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18. 8505C hücreleri için IC50 değerleri.

IC50	8505C
24 saat	< 100 μ M
48 saat	< 100 μ M
72 saat	< 100 μ M
96 saat	< 100 μ M



Şekil 26. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24-48-72-96 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulgularının dağılım grafiği.

Hücre canlılık testleri sonucu 10 ile 100 μ M kalsitriol dozları, hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir düşüş meydana getirdiğinden, bu aralığı kapsayacak şekilde 20, 60 ve 80 μ M kalsitriolün uygulandığı farklı bir deney kuruldu. DMSO'nun hücre canlılığını anlamlı ölçüde düşürmediği için, bu denemede hücreler yalnızca farklı dozlarda kalsitriol ile inkübe edildi.

20-80 μ M ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen 8505C hücrelerinde, kalsitriolün doza bağımlı olarak hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği etkilere ilişkin bulgular Tablo 17'de verilmiştir. Bulgular $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Kontrol grubu kalsitriol uygulanmayan gruptur.

Tablo 19. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisine ait %canlılık bulguları.

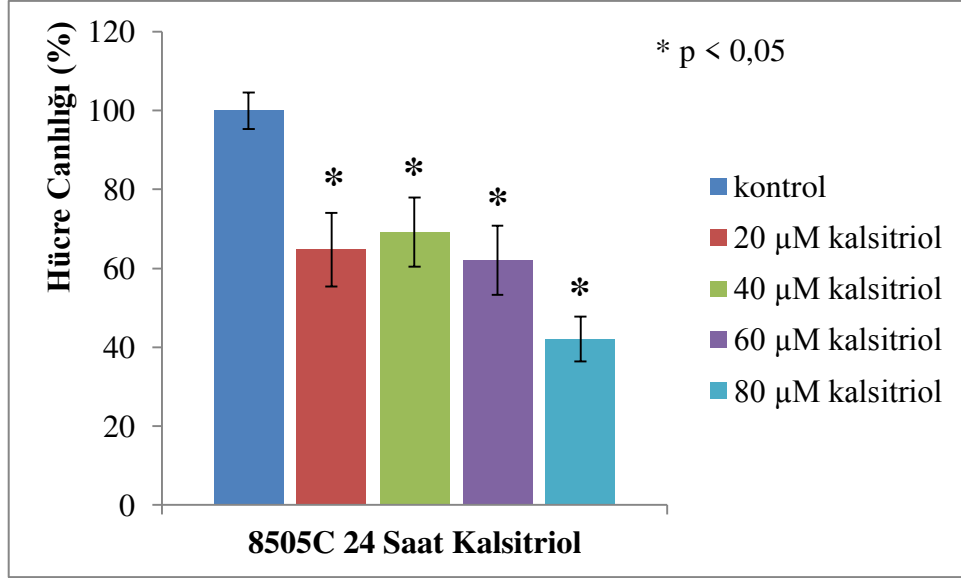
Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	100,00±4,64	100,00±12,34	100,00±9,25
20 µM Kalsitriol	64,71±9,28	78,90±13,72	70,86±6,22
40 µM Kalsitriol	69,17±8,76	68,64±15,09	75,37±6,86
60 µM Kalsitriol	62,05±8,81	63,82±7,70	56,14±28,24
80 µM Kalsitriol	42,07±5,66	33,56±7,89	34,19±18,61

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde gösterilmiştir. * $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. P değerleri Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Kalsitriolün 8505C hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri.

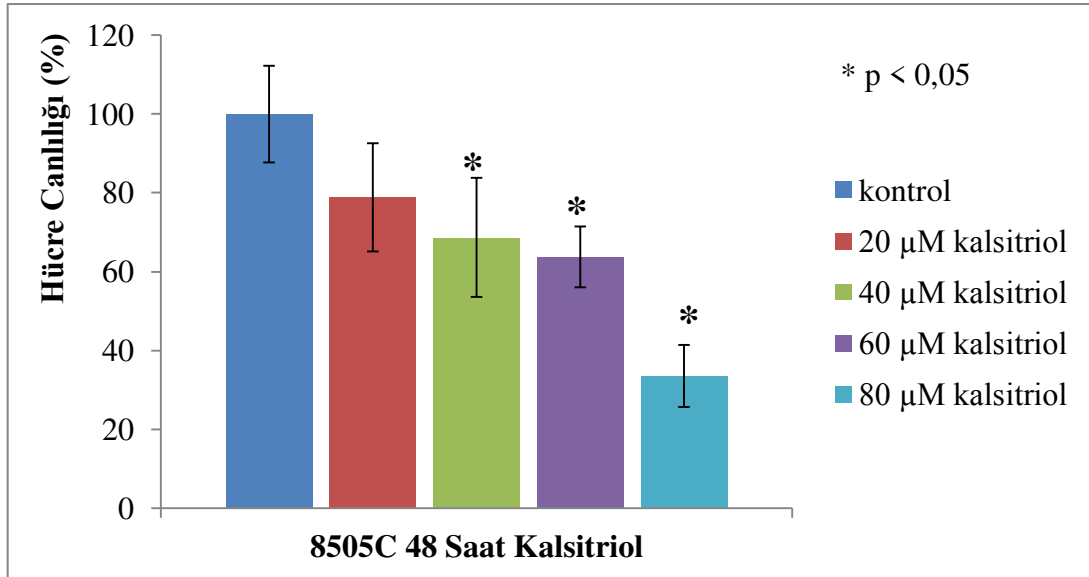
Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
20 µM Kalsitriol	0,000	0,090	0,001
40 µM Kalsitriol	0,000	0,007	0,006
60 µM Kalsitriol	0,000	0,003	0,000
80 µM Kalsitriol	0,002	0,000	0,000

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattının, 24 saatlik farklı konsantrasyonlarda kalsitriol içeren hücre kültürü ortamı ile inkübasyonu sonucu elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 27’de gösterilmiştir.



Şekil 27. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

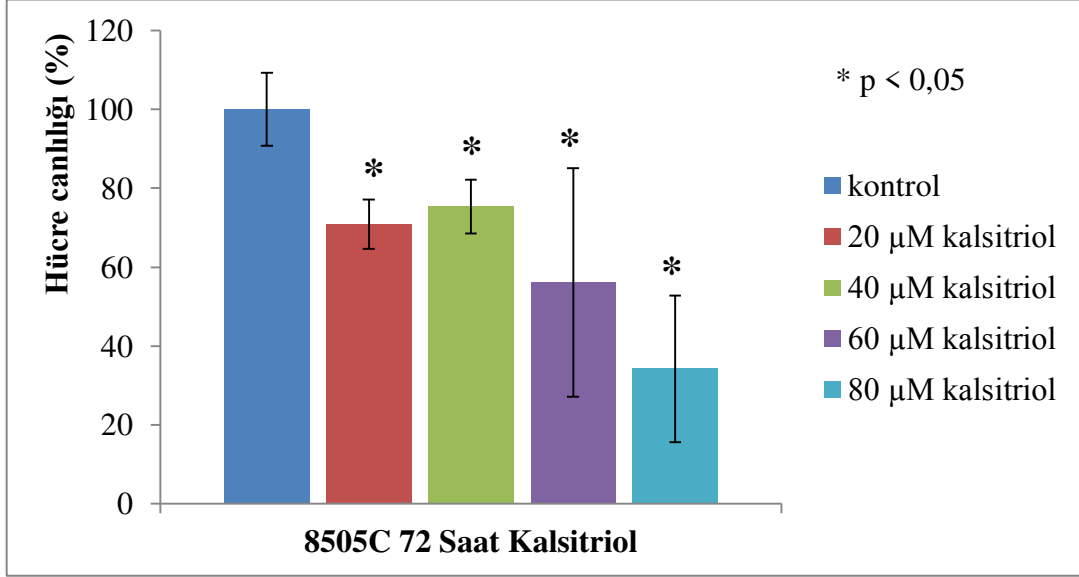
8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattının, 48 saatlik farklı konsantrasyonlarda kalsitriol içeren hücre kültürü ortamı ile inkübasyonu sonucu elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 28’de gösterilmiştir.



Şekil 28. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 48 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

8505C anaplastik tiroid kanseri hücre hattının, 72 saatlik farklı konsantrasyonlarda

kalsitriol içeren hücre kültürü ortamı ile inkübasyonu sonucu elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 29’da gösterilmiştir.

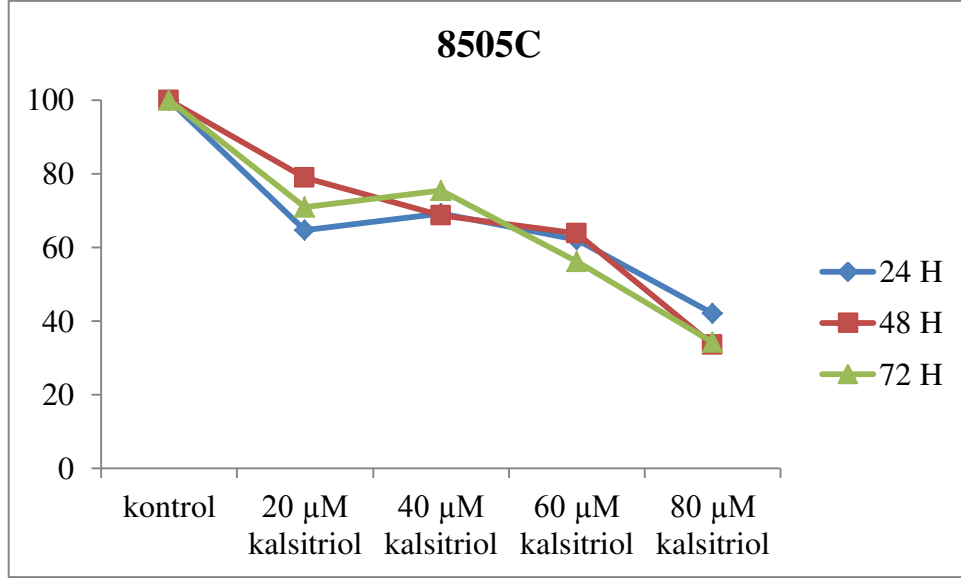


Şekil 29. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 72 saat inkübasyonu sonucu WST-1 testi bulguları.

8505C hücreleri için her üç inkübasyon süresi için oluşturulan dağılım grafiği Şekil 30’da, IC₅₀ değerleri Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 21. 8505C hücreleri için IC₅₀ değerleri.

IC50	8505C
24 saat	> 60 µM
48 saat	> 60 µM
72 saat	> 60 µM



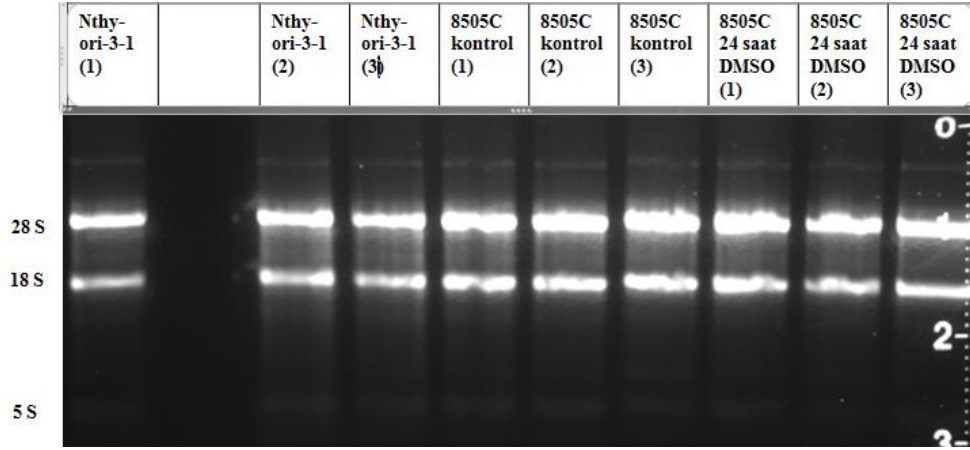
Şekil 30. Kalsitriolün 8505C hücre hattına 24-48-72saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulgularının dağılım grafiği.

WST-1 denemeleri sonucu, 8505C hücreleri için kalsitriol inhibitör dozu 50 değeri 24 saat için 75 µM, 48 saat için 76 µM ve 72 saat için 67,36 µM olarak bulundu. Ancak denemelerimizde her üç inkübasyon süresi için IC50 değerine yakın olan 60µM kalsitriol dozu kullanıldı.

4.3 REAL-TİME PCR BULGULARI

4.3.1 RNA örneklerinin %1,2 formaldehit agaroz jelde görüntülenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin intakt olup olmadığını belirlemek amacıyla denatüre koşullar altında agaroz jel elektroforezi uygulandı. Temsili jel görüntüsü Şekil 31'dedir.



Şekil 31. RNA jel görüntüsü.

4.3.2 RNA Örneklerinin Kantitasyonu

Total RNA izolasyonu sonucu örneklerin içerdiği RNA miktarı Tablo 22’de verilmiştir. DMSO grupları, ortamlarında 3,75 µl (%0,25 v/v) DMSO içeren negatif gruplardır.

Tablo 22. Örneklerle ait RNA miktarları.

Örnek adı	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260 nm} / A _{280 nm}	A*40(µg/ml)
8505C- 24 Saat Kalsitriol 1	5,609	2,796	2,01	224,3
8505C- 24 Saat Kalsitriol 2	7,979	3,836	2,08	319,2
8505C- 24 Saat Kalsitriol 3	7,954	3,863	2,06	318,2
8505C- 24 Saat DMSO 1	9,885	4,795	2,06	395,4
8505C- 24 Saat DMSO 2	11,436	5,592	2,05	457,4
8505C- 24 Saat DMSO 3	9,548	4,617	2,07	381,9
8505C- 48 Saat Kalsitriol 1	7,935	3,947	2,01	317,4
8505C- 48 Saat Kalsitriol 2	6,065	3,094	1,96	242,6
8505C- 48 Saat Kalsitriol 3	6,413	3,25	1,97	257,5
8505C- 48 Saat DMSO 1	8,729	4,264	2,05	349,2
8505C- 48 Saat DMSO 2	8,564	4,266	2,01	342,5
8505C- 48 Saat DMSO 3	6,762	3,434	1,97	270,5
8505C- 72 Saat Kalsitriol	7,96	3,861	2,06	318,5

8505C- 72 Saat DMSO 1	3,614	1,77	2,04	144,6
8505C- 72 Saat DMSO 2	6,025	2,994	2,01	241
8505C- 72 Saat DMSO 3	6,948	3,397	2,05	277,9
8505C- Kontrol 1	8,081	3,928	2,06	323,2
8505C- Kontrol 2	9,197	4,487	2,05	367,9
8505C- Kontrol 3	8,887	4,301	2,07	355,5
Nthy-ori-3-1 - 1	4,721	2,411	1,96	188,8
Nthy-ori-3-1 - 2	7,029	3,506	2,00	281,1
Nthy-ori-3-1 - 3	12,917	6,323	2,04	516,7

4.3.3 Gen Ekspresyon Analizleri

NDRG2 ve NIS gen ekspresyon düzeyleri, Light Cycler Software 1.05 (Roche Diagnostic) kullanılarak belirlendi. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Absolute Quantification analizi ile NDRG2 ve NIS ile GAPDH ekspresyonları oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı.

4.3.3.1 NDRG2 Gen Ekspresyon Analizi

Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde, NDRG2 gen ekspresyon düzeylerine ait RT-PCR verileri ile ortalama değerler ve standart sapma değerleri sırasıyla Tablo 23 ve Tablo 24’de gösterilmiştir. Örnekler üçlü çalışılmıştır.

Tablo 23. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri.

Örnek	Hedef Gen	Referans Gen	Ortalama CP (NDRG2)	Ortalama CP (GAPDH)	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
8505C (1)	NDRG2	GAPDH	33,22	16,97	16,25	-0,09	1,06
8505C (2)	NDRG2	GAPDH	32,88	16,85	16,04	-0,305	1,24
8505C (3)	NDRG2	GAPDH	32,85	16,51	16,34	0	1,00
Nthy-ori-3-1 (1)	NDRG2	GAPDH	25,02	15,69	9,33	-7,01	128,89
Nthy-ori-3-1 (2)	NDRG2	GAPDH	25,62	16,15	9,47	-6,87	116,97
Nthy-ori-3-1 (3)	NDRG2	GAPDH	24,61	15,38	9,23	-7,11	138,14

Tablo 24. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde ortalama NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.

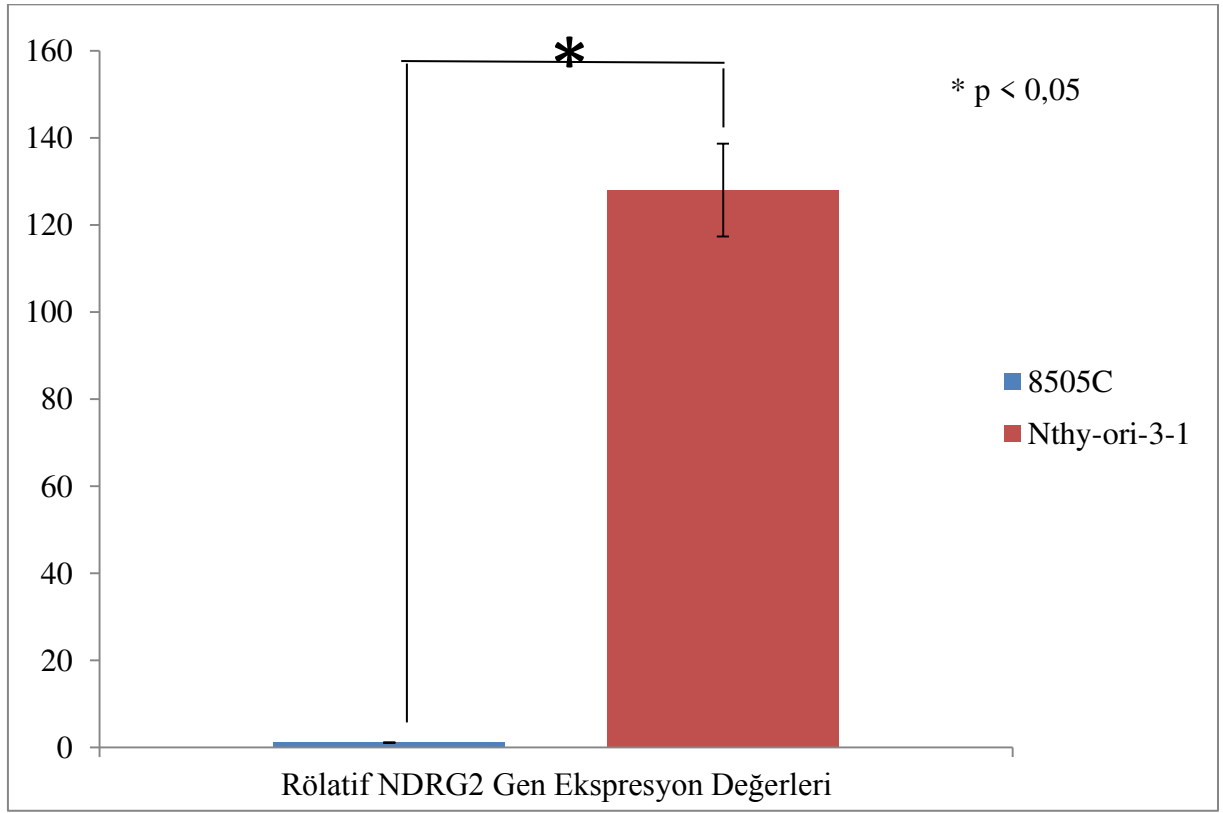
Örnek	Ortalama $2^{-\Delta\Delta$ CT	Standart Sapma
8505C	1,10	0,122
Nthy-ori-3-1	128,00	10,613

Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde, NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki farka ilişkin p değeri Tablo 25’de gösterilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

Tablo 25. Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmaya ait p değeri.

Karşılaştırılan Gruplar (NDRG2)	Ortalama Değer	Standart Sapma	p değeri
8505C vs. Nthy-ori-3-1	126,300	10,78	0,002

Tablo 20 ve 21'deki veriler sonucu oluşturulan grafik şekil 32'de gösterilmiştir.



Şekil 32. Nthy-ori-3-1 ile 8505C hücrelerine ait NDRG2 rölatif gen ekspresyon değerleri.

RT-PCR analizleri sonucu Nthy-ori-3-1 hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyonu, 8505C hücrelerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p=0,002$).

RT-PCR analizleri sonucu, kalsitriolün 8505C hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri bakımından meydana getirdiği değişimlere ait RT-PCR verileri ile ortalama değerler ve standart sapma değerleri sırasıyla Tablo 26 ve Tablo 27'de gösterilmiştir. DMSO grupları, ortamlarında 3,75 μ l (%0,25 v/v) DMSO içeren negatif kontrol gruplarıdır. Örnekler üçlü çalışılmıştır.

Tablo 26. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerindeki NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler.

Örnek (8505C)	Hedef Gen	Referans Gen	Ortalama CP (NDRG2)	Ortalama CP (GAPDH)	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
24 Saat kalsitriol (1)	NDRG2	GAPDH	33,73	17,21	16,52	-0,41	1,33
24 Saat kalsitriol (2)	NDRG2	GAPDH	33,47	16,55	16,93	-0,01	1,00
24 Saat kalsitriol (3)	NDRG2	GAPDH	33,75	16,91	16,84	-0,09	1,06
24 Saat DMSO (1)	NDRG2	GAPDH	32,27	16,2	16,07	-0,86	1,82
24 Saat DMSO 2	NDRG2	GAPDH	32,1	15,58	16,52	-0,41	1,33
24 Saat DMSO (3)	NDRG2	GAPDH	31,29	15,24	16,05	-0,88	1,84
48 Saat Kalsitriol (1)	NDRG2	GAPDH	33,31	16,89	16,42	-0,515	1,43
48 Saat Kalsitriol (2)	NDRG2	GAPDH	33,37	16,68	16,69	-0,24	1,18
48 Saat Kalsitriol (3)	NDRG2	GAPDH	32,82	16,60	16,22	-0,71	1,64
48 Saat DMSO (1)	NDRG2	GAPDH	31,86	16,24	15,62	-1,31	2,48
48 Saat DMSO (2)	NDRG2	GAPDH	31,77	16,54	15,23	-1,705	3,26
48 Saat DMSO (3)	NDRG2	GAPDH	32,42	16,86	15,56	-1,37	2,58
72 Saat Kalsitriol (1)	NDRG2	GAPDH	33,08	17,18	15,90	-1,03	2,04
72 Saat DMSO	NDRG2	GAPDH	31,67	16,08	15,59	-1,34	2,53

(1)							
72 Saat DMSO (2)	NDRG2	GAPDH	32,06	16,18	15,88	-1,05	2,07
72 Saat DMSO (3)	NDRG2	GAPDH	32,72	17,03	15,69	-1,24	2,36
Kontrol (1)	NDRG2	GAPDH	33,22	16,97	16,25	-0,68	1,60
Kontrol (2)	NDRG2	GAPDH	32,88	16,85	16,04	-0,89	1,86
Kontrol (3)	NDRG2	GAPDH	32,85	16,51	16,34	-0,59	1,51

Tablo 27. 8505C hücrelerinde ortalama NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.

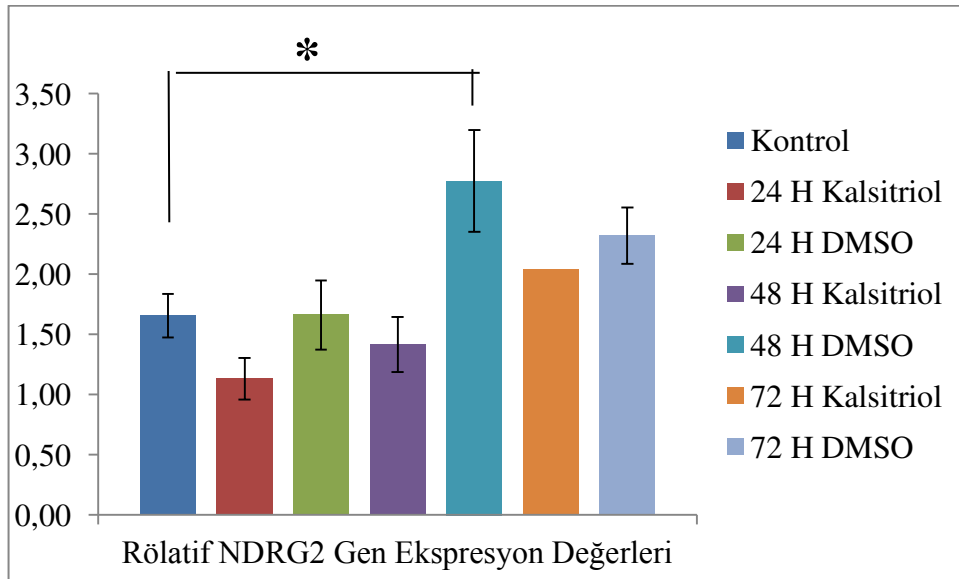
Örnek (8505C)	Ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$	Standart Sapma
24 Saat (+Kalsitriol)	1,13	0,173
24 Saat (+DMSO)	1,66	0,288
48 Saat (+Kalsitriol)	1,42	0,228
48 Saat (+DMSO)	2,77	0,424
72 Saat (+Kalsitriol)	2,04	
72 Saat (+DMSO)	2,32	0,230
Kontrol	1,66	0,183

8505C hücrelerinde gruplar arası NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki farka ilişkin p değerleri Tablo 28’de gösterilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 28. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerinde, gruplar arası NDRG2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılmasına ilişkin p değerleri.

Karşılaştırılan Gruplar (NDRG2)	Ortalama Değer	Standart Sapma	p değeri
8505C (kontrol) vs. 8505C (kalsitriol 24 saat)	0,570	0,267	0,060
8505C (kontrol) vs. 8505C (kalsitriol 48 saat)	0,283	0,524	0,350
8505C (kontrol) vs. 8505C (DMSO 24 saat)	0,037	0,478	0,899
8505C (kontrol) vs. 8505C (DMSO 48 saat)	-1,073	0,620	0,029
8505C (kontrol) vs. 8505C (DMSO 72 saat)	-0,620	0,359	0,095
8505C (kalsitriol 24 saat) vs. 8505C (DMSO 24 saat)	-0,533	0,228	0,056
8505C (kalsitriol 48 saat) vs. 8505C (DMSO 48 saat)	-1,357	0,629	0,065

Tablo 27 ve 28'deki veriler sonucu oluşturulan grafik şekil 33'te gösterilmiştir.



Şekil 33. 8505C hücrelerine kalsitriol uygulaması sonucu NDRG2 gen ekspresyonlarındaki değişimler. *p < 0,05.

8505C hücrelerinin 60 µM kalsitriol ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu NDRG2 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmadı (p <0,05). Yetmiş iki saat grubu tek örnek çalışıldığı için değerlendirmeye alınmadı. DMSO ile 48 saat inkübe edilen 8505C hücrelerinde, NDRG2 gen ekspresyonu bakımından anlamlı bir artış saptandı. (p = 0,029).

4.3.3.2 NIS Gen Ekspresyon Analizleri

Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde, NIS gen ekspresyon düzeylerine ait RT-PCR verileri ile ortalama değerler ve standart sapma değerleri sırasıyla Tablo 29 ve 30'da gösterilmiştir. DMSO grupları, ortamlarında 3,75 µl (%0,25 v/v) DMSO içeren negatif gruplardır. Örnekler üçlü çalışılmıştır.

Tablo 29. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde NIS gen ekspresyon düzeyleri.

Örnek	Hedef Gen	Referans Gen	Ortalama CP (NIS)	Ortalama CP (GAPDH)	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
8505C (1)	NIS	GAPDH	35,71	16,83	18,10	-0,78	1,72
8505C (2)	NIS	GAPDH	35,01	16,54	18,88	0,00	1,00
8505C (3)	NIS	GAPDH	36,55	17,36	18,47	-0,41	1,33
Nthy-ori-3-1 (1)	NIS	GAPDH	30,70	16,15	14,56	-4,32	19,97
Nthy-ori-3-1 (2)	NIS	GAPDH	29,62	15,38	14,55	-4,33	20,11
Nthy-ori-3-1 (3)	NIS	GAPDH	35,71	16,83	14,24	-4,64	24,93

Tablo 30. Nthy-ori-3-1 ve 8505C hücrelerinde ortalama NDRG2 gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.

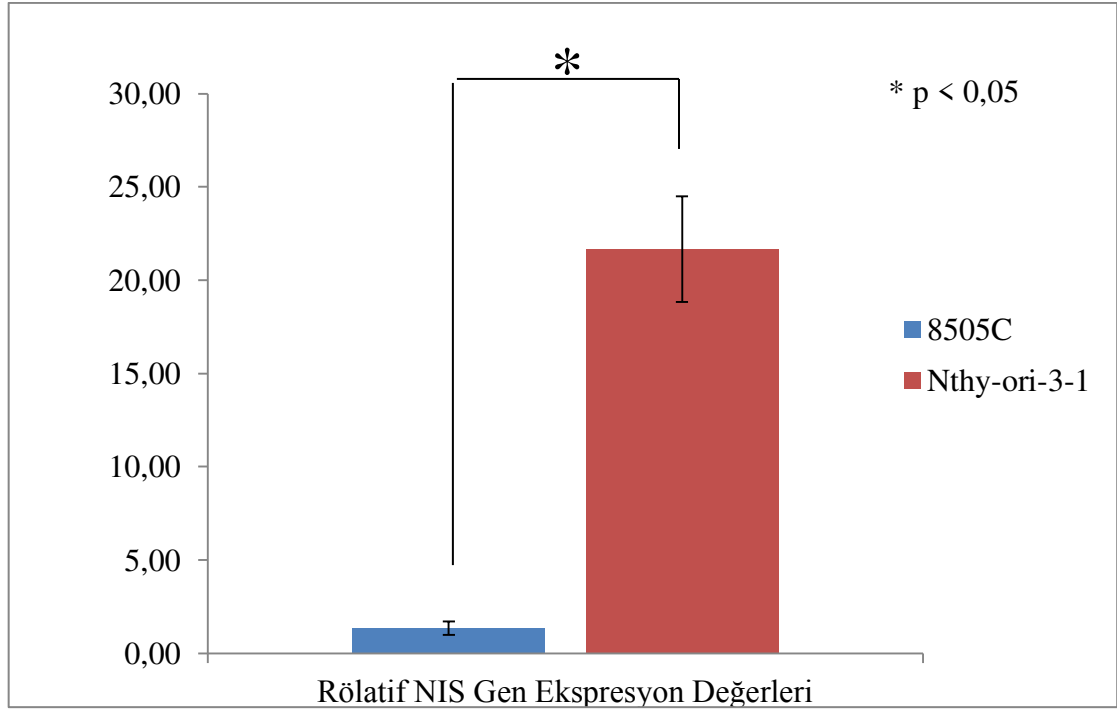
Örnek	Ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$	Standart Sapma
8505C	1,35	0,359
Nthy-ori-3-1	21,67	2,824

Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde, NIS gen ekspresyon düzeylerindeki farka ilişkin p değeri Tablo 31’de gösterilmiştir.

Tablo 31. Nthy-ori-3-1 hücreleri ile 8505C hücrelerinde NIS gen ekspresyon düzeylerindeki karşılaştırmaya ait p değeri.

Karşılaştırılan Gruplar (NIS)	Ortalama Değer	Standart Sapma	p değeri
8505C vs. Nthy-ori-3-1	19,31	2,94	0,008

Tablo 30 ve 31’deki veriler sonucu oluşturulan grafik şekil 34’te gösterilmiştir.



Şekil 34. Nthy-ori-3-1 ile 8505C hücrelerine ait NIS rölatif gen ekspresyon değerleri.

RT-PCR analizleri sonucu Nthy-ori-3-1 hücrelerinde NIS gen ekspresyonu, 8505C hücrelerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p=0,008$).

RT-PCR analizleri sonucu kalsitriolün 8505C hücrelerinde NIS gen ekspresyon düzeyleri bakımından meydana getirdiği değişimlere ait RT-PCR verileri ile ortalama değerler ve standart sapma değerleri sırasıyla Tablo 32 ve 33’de gösterilmiştir. DMSO grupları, ortamlarında 3,75 μ l (%0,25 v/v) DMSO içeren negatif kontrol gruplarıdır. Örnekler üçlü çalışılmıştır.

Tablo 32. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerindeki NIS gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler.

Örnek (8505C)	Hedef Gen	Referans Gen	Ortalama CP (NIS)	Ortalama CP (GAPDH)	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
24 Saat kalsitriol (1)	NIS	GAPDH	36,55	17,36	19,19	-0,50	1,41
24 Saat kalsitriol (2)	NIS	GAPDH	35,38	16,55	18,83	-0,86	1,82
24 Saat kalsitriol (3)	NIS	GAPDH	36,56	16,91	19,65	-0,04	1,03
24 Saat DMSO (1)	NIS	GAPDH	34,35	16,38	17,98	-1,72	3,28
24 Saat DMSO 2	NIS	GAPDH	34,82	15,91	18,92	-0,78	1,71
24 Saat DMSO (3)	NIS	GAPDH	35,10	15,41	19,69	0,00	1,00
48 Saat Kalsitriol (1)	NIS	GAPDH	35,27	17,06	18,21	-1,48	2,79
48 Saat Kalsitriol (2)	NIS	GAPDH	33,92	16,56	17,36	-2,33	5,03
48 Saat Kalsitriol (3)	NIS	GAPDH	34,26	16,69	17,57	-2,12	4,35
48 Saat DMSO (1)	NIS	GAPDH	34,56	16,23	18,33	-1,36	2,57
48 Saat DMSO (2)	NIS	GAPDH	34,19	16,09	18,10	-1,59	3,01
48 Saat DMSO (3)	NIS	GAPDH	35,80	16,83	18,97	-0,72	1,65
72 Saat Kalsitriol (1)	NIS	GAPDH	34,03	17,15	16,88	-2,81	7,01
72 Saat DMSO (1)	NIS	GAPDH	34,81	16,08	18,73	-0,96	1,95
72 Saat DMSO (2)	NIS	GAPDH	34,27	16,18	18,09	-1,60	3,03
72 Saat DMSO (3)	NIS	GAPDH	35,27	17,03	18,24	-1,45	2,73
Kontrol (1)	NIS	GAPDH	34,83	16,73	18,10	-1,59	3,01
Kontrol (2)	NIS	GAPDH	35,71	16,83	18,88	-0,81	1,75

Kontrol (3)	NIS	GAPDH	35,01	16,54	18,47	-1,22	2,32
----------------	-----	-------	-------	-------	-------	-------	------

Tablo 33. 8505C hücrelerinde ortalama NIS gen ekspresyon düzeyleri ve standart sapma değerleri.

Örnek (8505C)	Ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$	Standart Sapma
24 Saat (+Kalsitriol)	1,42	0,395
24 Saat (+DMSO)	2,00	1,168
48 Saat (+Kalsitriol)	4,05	1,148
48 Saat (+DMSO)	2,41	0,695
72 Saat (+Kalsitriol)	7,01	
72 Saat (+DMSO)	2,57	0,561
Kontrol	2,36	0,630

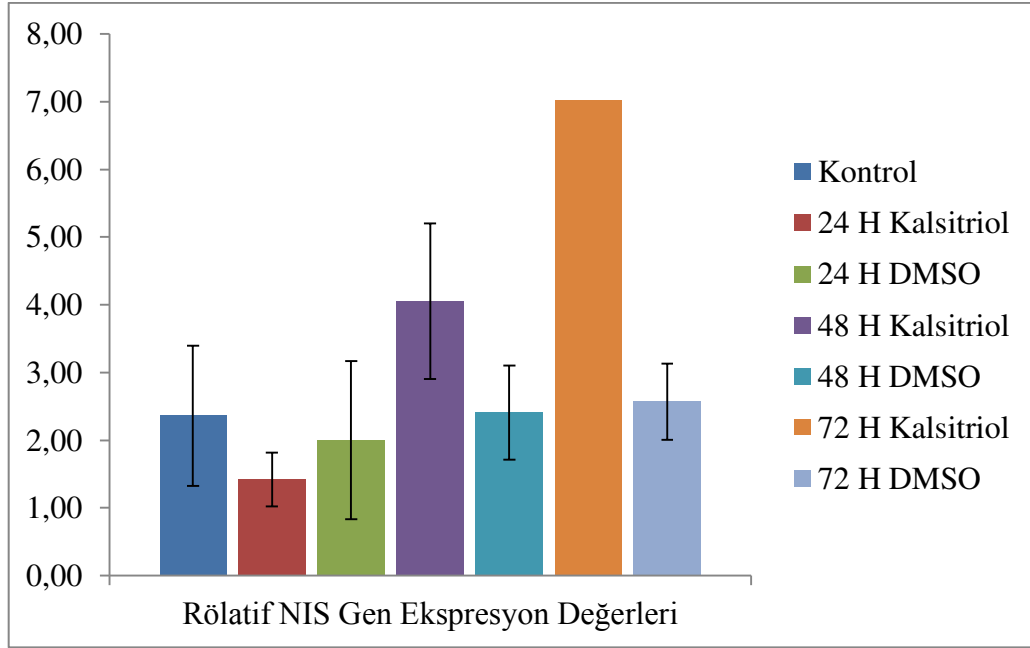
8505C hücrelerinde gruplar arası NIS gen ekspresyon düzeylerindeki farka ilişkin p değerleri Tablo 34’te gösterilmiştir. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 34. Kalsitriol uygulaması sonucu 8505C hücrelerinde, gruplar arası NIS gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılmasına ilişkin p değerleri.

Karşılaştırılan Gruplar (NIS)	Ortalama Değer	Standart Sapma	p değeri
8505C (kontrol) vs. 8505C (kalsitriol 24 saat)	0,940	0,888	0,208
8505C (kontrol) vs. 8505C (kalsitriol 48 saat)	-1,697	1,774	0,239
8505C (kontrol) vs. 8505C (DMSO 24 saat)	0,363	0,843	0,533
8505C (kontrol) vs. 8505C (DMSO 48 saat)	-0,050	1,054	0,942
8505C (kontrol) vs. 8505C (DMSO 72 saat)	-0,210	1,183	0,788
8505C (kalsitriol 24 saat) vs. 8505C (DMSO 24 saat)	-0,577	1,121	0,467

8505C (kalsitriol 48 saat) vs. 8505C (DMSO 48 saat)	1,647	1,281	0,156
---	-------	-------	-------

Tablo 33 ve 34'teki veriler sonucu oluşturulan grafik şekil 35'te gösterilmiştir.



Şekil 35. 8505C hücrelerine kalsitriol uygulaması sonucu NIS gen ekspresyonlarındaki değişimler.

60 μ M kalsitriol ile 24 ve 48 saat inkübe edilen 8505C hücrelerinde NIS gen ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p < 0,05$). Yetmiş iki saat grubu, tek örnek çalışıldığı için değerlendirmeye alınmadı. DMSO'nun NIS gen ekspresyonu üzerindeki herhangi bir etkisi olmadığı saptandı ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kalsitriolün indifferansiye 8505C insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde, diferansiyasyoda rol olan NDRG2 ve tiroit kanserinde diferansiyasyon belirteci olarak tanımlanan NIS gen ekspresyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflendi. Bu hedef doğrultusunda ilk olarak Nthy-ori 3-1 normal insan tiroid folliküler epitelyal hücreleri ve 8505C tiroid kanseri hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmamızın sonunda Nthy-ori-3-1 normal tiroid hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonlarının, 8505C hücrelerine göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,002$; $p=0,008$). Bu durum normal tiroid hücrelerinde diferansiyasyonla ilişki genlerinin ekspresyonlarının, indifferansiye 8505C hücrelerine göre yüksek olduğunu gösterdi. Bu nedenle, diferansiyasyonu tetiklemek amacıyla 8505C hücreleri kalsitriol ile muamele edildi ve 8505C hücrelerinde kalsitriolün NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları üzerindeki olası etkileri incelendi. WST-1 canlılık testi sonucunda 8505C hücrelerinde, IC50 değerine yakın olan 60 μ M kalsitriol dozu kullanıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde 60 μ M kalsitriol ile 24 ve 48 saat inkübe edilen 8505C hücrelerinde, NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları bakımından anlamlı bir artış gözlemlenmedi ($p>0,05$; $p>0,05$). Buna karşılık 72 saat 60 μ M kalsitriol ile inkübe edilen 8505C hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyon düzeylerinde belirgin bir fark gözlemlenmezken, NIS gen ekspresyon düzeylerinde 2,96 katlık bir artış saptandı ancak çalışma tek tekrarlı yapıldığı için istatistiksel olarak değerlendirmeye alınamadı. DMSO ile 48 saat inkübasyon sonucu, 8505C hücrelerinde NDRG2 gen ekspresyonundaki anlamlı artışa karşın ($p = 0,029$), 72 saat sonunda NDRG2 gen ekspresyonundaki artışın anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$).

Tiroid kanserinde D vitamini metabolizması ile vitamin D reseptörünün rollerinin araştırıldığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Khadz Kou ve arkadaşları differansiye papiller tiroid kanseri (PTK) dokularında, normal dokulara göre 1- α hidroksilaz ile VDR protein düzeylerinde anlamlı bir artış saptamışlardır. PTK doku örneklerinde protein düzeylerindeki anlamlı artışı papiller tiroid kanserindeki genel iyi prognoz ile açıklamışlardır. Bu bulguları, lenf nodu metastazı yapan PTK doku örneklerinde VDR gen ekspresyon düzeylerinin primer PTK doku örneklerine göre anlamlı ölçüde azalmasıyla da desteklemişlerdir (168). Clinckspoor ve arkadaşlarının benign foliküller adenoma (FA), differansiye tiroid karsinoma (DTK) (papiller ve foliküller tiroid kanseri) ve anaplastik tiroid

kanserinde (ATK) D vitamini metabolizmasını inceledikleri bir çalışmada, DTK dokularında, FA ve normal tiroid dokularına göre VDR gen ve protein ekspresyonları ile 24-hidroksilaz ve 1- α hidroksilaz protein ekspresyonlarında anlamlı bir artış saptamışlardır. Aynı zamanda DTK grubu içerisinde ile 24-hidroksilaz ve 1- α hidroksilaz protein ekspresyonları arasında pozitif anlamlı bir ilişki bulunduğunu belirterek aktif bir D vitamin metabolizmasının varlığına dikkati çekmişlerdir. Lenf nodu metastazı yapan papiller tiroid kanseri ile anaplastik tiroid kanseri örneklerinde VDR, 24-hidroksilaz, 1- α hidroksilaz mRNA ve protein ekspresyonlarının azaldığını saptamışlardır. Bu bulgular D vitamini metabolizmasının tiroid kanserinin erken evrelerinde anti-tümör etki gösterdiğini açıklamaktadır (169). Stepien ve arkadaşları tiroid kanseri olgularına ait serum örneklerinde, kalsitriol konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düştüğünü gözlemlemişlerdir. Bunun yanı sıra serum kalsitriol konsantrasyonlarındaki düşüş ile hastalığın artan derecesi anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (170). Bu çalışmalar D vitamini metabolizması ile bu metabolizmadaki aktif form olan kalsitriolün tiroid kanserinde koruyucu bir etkisi olduğunu ve tiroid kanseri hastalarında hastalığın seyri üzerindeki önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Erişilebilir literatür incelendiğinde, kalsitriolün koruyucu etkilerinin yanısıra, tiroid kanserinde kanser gelişimi ve sürecinde yer alan mekanizmalara etki ettiğinin gösterildiği *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır. Okano ve arkadaşları kalsitriolün NPA papiller tiroid kanseri hücre hattında DNA sentezini ve bir proto-onkogen olan c-Myc mRNA ekspresyonunu anlamlı ölçüde azalttığını saptamışlardır (161). Liu ve arkadaşları benzer bir çalışmada kalsitriolün tiroid kanseri hücre hatları TPC1, NPA, WRO ve FRO'da proliferasyonu anlamlı ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Kalsitriolün bu hücreleri apoptoza yönlendirmediğini, fakat hücre döngüsünün G1/S fazında hücrelerin tutulmasından sorumlu, siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p27 proteininin degradasyonunu azaltması sayesinde p27 protein düzeylerinin arttırdığını, ayrıca p27'nin nükleusa translokasyonunu sağlayarak bu hücrelerin G1/S fazında tutulmasını sağladığını bildirmişlerdir (171). Erişilebilir literatürde kalsitriol ile D vitamini metabolizmasının tiroit kanseri gelişimi ve sürecindeki koruyucu/önleyici etkilerinin gösterildiği çalışmalara rağmen, başta anaplastik tiroit kanseri olmak üzere diğer folliküler kaynaklı tiroit kanserlerinde kalsitriolün diferansiyasyon üzerindeki etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bu boşluk, anaplastik tiroit kanserinde kalsitriolün NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini inceleme kararımızın temelini oluşturmaktadır.

Sodyum-iyod simpoter (NIS) ekspresyonunda değişimler ve bu değişimlerin sağ kalım ve hastalığın seyri üzerindeki etkisi tiroid kanserinde yaygın olarak araştırılan bir diğer konudur. Normal tiroid dokusunda NIS proteini, bazolateral membranda eksprese edilirken, tiroid kanserinde çoğunlukla sitozolde eksprese edilir (172-174). Tiroid tümörleri gibi epitelyal tümörlerde doku polaritesinin kaybı karakteristik bir değişim olduğundan (175), tiroid kanserinde NIS trafiği ve doğru polarite zarar görür. Kogai ve arkadaşları, primer tiroid hücreleri ile yaptıkları üç boyutlu kültür çalışması ile tam bir fonksiyonel NIS ekspresyonu için hücre polaritesinin önemini belirtmişlerdir (149).

Diferansiye tiroid kanserine ilişkin NIS gen ve protein ekspresyonlarındaki değişimlere ait bulgular farklılık göstermektedir. Birtakım araştırmacılar papiller ve folliküler tiroid kanserlerinde NIS gen ve protein ekspresyonlarında azalma saptandığını bildirirken (21, 176-180) farklı çalışmalar papiller tiroid kanserinde NIS ekspresyonunun arttığını bildirmiştir (172-174). Ancak bu çalışmalardaki NIS ekspresyon artışının, Kogai ve arkadaşları tarafından belirtildiği gibi tam bir NIS fonksiyonu geri kazanımı anlamına gelmediği unutulmamalıdır.

Anaplastik tiroid kanserinde ise Arturi ve arkadaşları, anaplastik tiroid kanseri dokularında NIS mRNA ekspresyonunun normal dokulara göre anlamlı ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (177). Lee ve arkadaşlarının NIS geni transfeksiyonu ile oluşturdıkları anaplastik tiroid kanseri hücre hattı ARO-N hücrelerinde iyodür alımının 109 kat arttığını saptamışlardır (181). Pugliese ve arkadaşları, anaplastik tiroid kanseri hücre hatları ile tiroidektomi uygulanan anaplastik tiroid kanseri hastalarından primer kültür ile elde ettikleri hücrelerde bir histon deasetilaz inhibitörü LBH589'un NIS gen ekspresyonu ile radyoiyodür alımını arttırdığını göstermişlerdir. Cal-62 anaplastik tiroid kanseri hücrelerini kullanarak oluşturdıkları tümör modellerinde, LBH589'un NIS gen ve protein ekspresyonlarını arttırmasının yanısıra, NIS proteinin membranda lokalize olduğunu bildirmişlerdir (182).

Sodyum iyod simpoterin, rediferansiasyon alanında bir diferansiasyon belirteci olarak kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Vivaldi ve arkadaşları medüller (TT), folliküler (WRO) ve anaplastik (FRO) insan tiroid kanseri hücre hatlarında 5-Aza-2'-deoksisidin ve retinoik asitin rediferansiye edici etkilerini incelemişler, diferansiasyonda yer alan PAX-8, TTF-1 ve NIS gen ekspresyonlarında anlamlı bir artış gözlemişlerdir. İyodür alımında herhangi bir değişim gözlememelerini, hücre membranında lokalize olması gereken NIS proteinlerinin sitoplazmada bulunmasıyla açıklamışlardır (183).

Zhao ve arkadaşlarının tiroid adenoma ve karsinoma dokuları ile yaptıkları çalışmada,

karsinoma dokularında, normal dokulara kıyasla NDRG2 mRNA ve protein ekspresyonunda anlamlı bir düşüş; c-Myc mRNA ve protein ekspresyonlarında ise anlamlı bir artış saptamışlar, NDRG2 ve c-Myc arasında negatif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (131). Lorentzen ve arkadaşları tiroit tümörlerinde normal tiroid dokularına göre NDRG2 gen ekspresyonunun anlamlı ölçüde azaldığını göstermişler ancak Zhao ve arkadaşlarının aksine c-Myc gen ekspresyonunda anlamlı bir artış saptamamışlardır (184).

Erişilebilir literatürde, kalsitriol ile NDRG2 arasındaki ilişkinin incelendiği kansere yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak kalsitriolün Wnt/ β -katenin sinyal yolu üzerinden bu sinyal yolunun downstream ürünlerinden biri olan c-Myc ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelendiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Wnt/ β -katenin yolağı kanser başlangıcındaki ve ilerleyişindeki önemli rolleri nedeniyle yaygın olarak çalışılmaktadır (185). Bu yolağın kontrolsüz aktivasyonu ile β -katenin yıkım kompleksi elemanlarındaki mutasyonlar, nükleer β -katenin birikimine ve c-Myc başta olmak üzere invazyon ve proliferasyonda yer alan genlerin overekspresyonuna neden olur (186). Kolon kanserinde kalsitriolün Wnt/ β -katenin sinyal yolu üzerindeki etkilerinin incelendiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, kalsitriolün VDR'nin nükleusa translokasyonunu uyarması ile nükleer β -katenin düzeylerini azaltarak c-Myc gen ve protein ekspresyonlarında azalmaya yol açtığını göstermektedir (187-190). NDRG2'nin c-Myc tarafından baskılandığının gösterilmesine rağmen (191), bu çalışmalarda kalsitriolün NDRG2 gen ve protein ekspresyonu üzerindeki olası etkileri incelenmemiştir. Literatürde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının tiroit kanserinde aktif olduğunun, ayrıca kalsitriolün tiroid kanseri hücrelerinde c-Myc ekspresyonunda azalmaya yol açtığının gösterildiği çalışmalar bulunmaktadır (192-195). Bu bilgiler, tiroit kanserinde, kalsitriolün Wnt/ β -katenin sinyal yolu üzerinden c-Myc ekspresyonunu azaltarak NDRG2 ekspresyonunu arttırabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmamızdaki hipotezlerimizden biri kalsitriolün 8505C hücre hattında NDRG2 ve NIS gen ekspresyonlarını arttıracak yönündeydi. Elde ettiğimiz sonuçların beklediğimiz gibi çıkmamasının üç farklı nedeni olabilir:

1. Kalsitriol ile inkübe 8505C hücrelerinde NIS gen ekspresyonunun 72. saat sonunda artması, bu hücre hattında kalsitriolün diferansiye indükleyici etkisinin uzun bir süreçte olduğu anlamına gelebilir. Ancak tek tekrarlı çalışılması böyle bir yorumun savunulması için yeterli değildir.
2. 8505C hücre hattında D vitamini reseptörü (VDR) polimorfizmleri olabilir. Çalışmalar,

VDR reseptörünün ikinci ekzonunda (*FokI*), sekizinci intronunda (*Bsm I* ve *ApaI*) ve dokuzuncu ekzonunda (*TaqI*) tanımlanan polimorfizmlerle kolon (196, 197), over (198, 199), meme (200-202) ve prostat kanseri (203-205) arasında ilişki bulunduğunu göstermektedir. FokI polimorfizmi allellerden en az birinde, 5'-kodlayıcı bölgede meydana gelen T-C değişimidir; nükleik asit değişimini barındıran allel *f*, barındırmayan ise F harfi ile ifade edilir. *f* alleli tarafından sentezlenen VDR proteini ile F alleli tarafından sentezlenen VDR proteini arasında üç aminoasitlik bir fark bulunmaktadır (206). Penna-Martinez ve arkadaşlarının tiroid kanseri hastalarından aldıkları kan örneklerinde, *ff* FokI polimorfizmi ile folliküler tiroit kanseri olguları arasında bir ilişki olduğunu belirtmişler ancak papiller tiroid kanseri için aynı sonuca ulaşamamışlardır (207). Sharma ve arkadaşları 8505C hücre hattında FF FokI polimorfizmini tanımlayarak bu hücre hattının D vitaminine dirençli olabileceğini savunmuşlardır, ancak bu polimorfizmin VDR'nin nükleusa translokasyonunu engellediğine dair herhangi bir veri ortaya koymamışlardır (208).

3. Gen ekspresyonlarını arttırmak için uygulanan kalsitriol dozu ve inkübasyon süresi yeterli değildir.

Bizim çalışmamızla paralel olarak; Clinckspoor ve arkadaşları, 8505C hücrelerine 1 µM kalsitriol uygulaması ile 24 ve 72 saatler sonunda NIS gen ekspresyonu üzerinde herhangi bir değişim gözlememelerine karşın E2F1 (DNA replikasyonu ile hücre döngüsünde G₁ fazından S fazına geçişte rol alan genler için bir transkripsiyon faktörü) gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir azalma saptamaları (209), kalsitriolün bu hücre hattı üzerindeki etkinliğine dikkati çekmektedir. Bahsedilen bu çalışma ile bizim çalışmamız dışında anaplastik tiroid kanserinde kalsitriolün NIS gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelendiği başka bir çalışma bulunmamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmanın hipotezleri; “Nthy-ori 3-1 insan tiroid folliküler epitelyal hücreleri ile 8505C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri arasında NDRG2 ve NIS gen ekspresyonu bakımından fark vardır” ve “kalsitriol 8505C hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonunu anlamlı ölçüde arttırır” şeklinde kurgulandı. Bu amaçla, kalsitriolün hücre canlılığı üzerindeki etkileri WST-1 testi ile belirlendi. Nthy-ori 3-1 ile 8505C hücre hatlarındaki NDRG2 ve NIS başlangıç gen ekspresyon düzeyleri ve kalsitriol muamelesi ile NDRG2 ve NIS gen ekspresyonlarındaki değişimler Real-Time PCR ile analiz edildi.

Çalışmamızda, NDRG2’nin diferansiyasyonda rol alması, NIS’in ise bir diferansiyasyon belirteci olması nedeniyle, aynı zamanda bu iki gen arasında bir ilişki kurulmaya çalıştık. Tiroid kanserinde NIS dışında tanımlanan diğer diferansiyasyon belirteçlerine karşın, çalışmamızda NIS’in seçilmesinin nedeni, anaplastik tiroid kanseri hastalarında NIS ekspresyonunun olmaması nedeniyle, bu hastalarda diferansiye tiroid kanseri tedavisinde kullanılan radyoiyodürün kullanılamamasıdır.

Araştırmanın bulguları şu şekilde özetlenebilir: Nthy-ori 3-1 hücrelerinde NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları, 8505C hücrelerine göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu. 8505C hücrelerinin 60 µM kalsitriol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonunun bu hücrelerde %56’ya varan canlılık kaybına neden olduğu saptandı. Kalsitriol ile 24 ve 48 saat inkübe edilen 8505C hücrelerinde, NDRG2 ve NIS gen ekspresyonları bakımından anlamlı bir değişim gözlenmedi.

Çalışmamız erişilebilir literatür incelendiğinde, tiroid kanserinde kalsitriolün NDRG2 gen ekspresyonunu üzerindeki etkisinin incelendiği ilk *in vitro* çalışmadır.

Çalışmamızdaki bulgular ışığında ileriye yönelik yapılması uygun olacak çalışmaları şu şekilde sınıflandırabiliriz:

- Kalsitriolün 8505C hattında NIS’in yanısıra tiroid kanserinde tanımlanmış diğer diferansiyasyon belirteçlerinin gen ekspresyonları üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.
- Yetmiş iki saat deneyleri tekrarlanmalı, NIS gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözleendiği takdirde, NDRG2 gen ekspresyonundaki olası artışı saptamak amacıyla daha uzun süreli ana deneyler kurulmalıdır.

- Farklı tiroid kanseri hücre hatlarında kalsitriolün NDRG2 ve NIS gen ekspresyonu ile birlikte protein ekspresyonu bakımından meydana getirebileceği olası değişimler incelenmemiştir.
- Kalsitriol ile NIS arasındaki olası sinyal yolları aydınlatılmalıdır.
- Daha düşük sitotoksik etki gösteren daha etkin kalsitriol analogları kullanılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Albores-Saavedra J, Henson DE, Glazer E, Schwartz AM. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype--papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. *Endocr Pathol*. 2007;18(1): 1-7.
2. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(10): 569-80.
3. Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA ve ark. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005;103(7): 1330-5.
4. Aldinger KA, Samaan NA, Ibanez M, Hill CS, Jr. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a review of 84 cases of spindle and giant cell carcinoma of the thyroid. *Cancer*. 1978;41(6): 2267-75.
5. Mocellin S. Vitamin D and cancer: deciphering the truth. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1816(2): 172-8.
6. Campbell MJ, Elstner E, Holden S, Uskokovic M ve ark. Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin. *J Mol Endocrinol*. 1997;19(1): 15-27.
7. Yang ES, Burnstein KL. Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem*. 2003;278(47): 46862-8.
8. Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S ve ark. Action of 1,25(OH)2D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;142(1-2): 57-65.
9. Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, Weigel NL. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology*. 2000;141(1): 10-7.
10. Narvaez CJ, Welsh J. Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2001;276(12): 9101-7.
11. Jiang F, Bao J, Li P, Nicosia SV ve ark. Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through the down-regulation of telomerase. *J Biol Chem*. 2004;279(51): 53213-21.
12. Bao BY, Yao J, Lee YF. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2006;27(9): 1883-93.

13. Chung I, Han G, Seshadri M, Gillard BM ve ark. Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 2009;69(3): 967-75.
14. Krishnan AV, Shinghal R, Raghavachari N, Brooks JD ve ark. Analysis of vitamin D-regulated gene expression in LNCaP human prostate cancer cells using cDNA microarrays. *Prostate.* 2004;59(3): 243-51.
15. Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C ve ark. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem.* 2002;229(1-2): 35-44.
16. Liu N, Wang L, Liu X, Yang Q ve ark. Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(1): 164-9.
17. Piepoli A, Cotugno R, Merla G, Gentile A ve ark. Promoter methylation correlates with reduced NDRG2 expression in advanced colon tumour. *BMC Med Genomics.* 2009;2: 11.
18. Lee DC, Kang YK, Kim WH, Jang YJ ve ark. Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res.* 2008;68(11): 4210-20.
19. Shi H, Jin H, Chu D, Wang W ve ark. Suppression of N-myc downstream-regulated gene 2 is associated with induction of Myc in colorectal cancer and correlates closely with differentiation. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(6): 968-75.
20. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C ve ark. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev.* 2003;24(1): 48-77.
21. Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M ve ark. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(11): 4102-6.
22. Mazzaferri EL. Thyroid cancer in thyroid nodules: finding a needle in the haystack. *Am J Med.* 1992;93(4): 359-62.
23. Gharib H. Changing trends in thyroid practice: understanding nodular thyroid disease. *Endocr Pract.* 2004;10(1): 31-9.
24. Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS ve ark. Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer.* 2000;90(6): 335-41.
25. Sclabas GM, Staerckel GA, Shapiro SE, Fornage BD ve ark. Fine-needle aspiration of the

- thyroid and correlation with histopathology in a contemporary series of 240 patients. *Am J Surg.* 2003;186(6): 702-9; discussion 09-10.
26. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT ve ark. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2006;16(2): 109-42.
27. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC ve ark. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer.* 2007;111(6): 508-16.
28. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see comment]. *Cancer.* 1998;83(12): 2638-48.
29. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2010;22(6): 395-404.
30. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X ve ark. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control.* 2009;20(5): 525-31.
31. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A ve ark. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(1): 10-30.
32. <http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-risk-factors>.
33. Kravdal O, Glatre E, Haldorsen T. Positive correlation between parity and incidence of thyroid cancer: new evidence based on complete Norwegian birth cohorts. *Int J Cancer.* 1991;49(6): 831-6.
34. Glatre E, Kravdal O. Male and female parity and risk of thyroid cancer. *Int J Cancer.* 1994;58(4): 616-7.
35. Ron E, Kleinerman RA, Boice JD, Jr., LiVolsi VA ve ark. A population-based case-control study of thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1987;79(1): 1-12.
36. Holm LE, Blomgren H, Lowhagen T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med.* 1985;312(10): 601-4.
37. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL ve ark. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(2): 216-22.
38. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA ve ark. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(7): 1454-

7.

39. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J ve ark. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003;22(29): 4578-80.
40. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D ve ark. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2004;23(44): 7436-40.
41. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA ve ark. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest*. 1992;89(5): 1517-22.
42. Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q, Parker-Thornburg J ve ark. Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology*. 1996;137(1): 375-8.
43. Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A, Salvatore D ve ark. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene*. 1996;12(8): 1821-6.
44. Powell DJ, Jr., Russell J, Nibu K, Li G ve ark. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res*. 1998;58(23): 5523-8.
45. Suarez HG, du Villard JA, Severino M, Caillou B ve ark. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene*. 1990;5(4): 565-70.
46. Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW ve ark. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;50(4): 529-35.
47. Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H ve ark. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract*. 2000;196(1): 1-7.
48. Manenti G, Pilotti S, Re FC, Della Porta G ve ark. Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur J Cancer*. 1994;30A(7): 987-93.
49. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 1990;4(10): 1474-9.
50. Karga H, Lee JK, Vickery AL, Jr., Thor A ve ark. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73(4): 832-6.
51. Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A ve ark. Prevalence of activating ras mutations in

morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid*. 1996;6(5): 409-16.

52. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V ve ark. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol*. 2004;202(2): 247-51.

53. Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F ve ark. Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(1): 105-9.

54. Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle*. 2007;6(3): 377-9.

55. Chiosea S, Nikiforova M, Zuo H, Ogilvie J ve ark. A novel complex BRAF mutation detected in a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol*. 2009;20(2): 122-6.

56. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M ve ark. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(9): 4197-205.

57. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M ve ark. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*. 2005;115(1): 94-101.

58. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2): 245-62.

59. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N ve ark. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9): 4393-7.

60. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW ve ark. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11): 5399-404.

61. Begum S, Rosenbaum E, Henrique R, Cohen Y ve ark. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol*. 2004;17(11): 1359-63.

62. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M ve ark. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009;69(11): 4885-93.

63. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ ve ark. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*. 2000;289(5483): 1357-60.
64. Gregory Powell XW, Brandon L Allard¹, Mustafa Sahin, Xiao-Li Wang, Ian D Hay, Henry J Hiddinga, Seema S Deshpande, Todd G Kroll, Stefan KG Grebe, Norman L Eberhardt and Bryan McIver. The PAX8/PPARgamma fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARgamma inhibition. *Oncogene*. 2000;23: 3634-41.
65. French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V ve ark. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol*. 2003;162(4): 1053-60.
66. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK ve ark. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5): 2318-26.
67. Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO ve ark. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9): 4440-5.
68. Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG ve ark. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(8): 1016-23.
69. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S ve ark. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8): 3947-52.
70. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E ve ark. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2000;6(3): 1093-103.
71. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H ve ark. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res*. 1997;57(9): 1690-4.
72. Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF ve ark. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene*. 1997;15(11): 1263-73.
73. Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H ve ark. Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J*

Cancer. 1999;80(1): 32-8.

74. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M ve ark. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. Cancer Lett. 2004;209(1): 1-6.

75. Hamatani K, Eguchi H, Ito R, Mukai M ve ark. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. Cancer Res. 2008;68(17): 7176-82.

76. Takahashi K, Eguchi H, Arihiro K, Ito R ve ark. The presence of BRAF point mutation in adult papillary thyroid carcinomas from atomic bomb survivors correlates with radiation dose. Mol Carcinog. 2007;46(3): 242-8.

77. Franssila KO. Prognosis in thyroid carcinoma. Cancer. 1975;36(3): 1138-46.

78. Ain KB. Anaplastic thyroid carcinoma: behavior, biology, and therapeutic approaches. Thyroid. 1998;8(8): 715-26.

79. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. Cancer. 1997;79(3): 564-73.

80. Bakiri F, Djemli FK, Mokrane LA, Djidel FK. The relative roles of endemic goiter and socioeconomic development status in the prognosis of thyroid carcinoma. Cancer. 1998;82(6): 1146-53.

81. Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E ve ark. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. Cancer. 2000;89(1): 202-17.

82. Besic N, Hocevar M, Zgajnar J. Lower incidence of anaplastic carcinoma after higher iodination of salt in Slovenia. Thyroid. 2010;20(6): 623-6.

83. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R, Robbins Temel Patoloji. Philadelphia, Saunders, 2007; 174-177, (758).

84. Wolf G. The Discovery of Vitamin D: The Contribution of Adolf Windaus. American Society for Nutritional Sciences J Nutr. 2004;134: 1299-302.

85. Hopkins FG. The analyst and the medical man. Analyst. 1906;31: 385– 404.

86. McCollum EV, Davis M. Observations on the isolation of the substance in butter fat which exerts a stimulating effect on growth. J Biol Chem. 1914;19: 245–50.

87. Mellanby E. An experimental investigation on rickets. *Lancet*. 1919;196: 407– 12.
88. Hopkins FG. The Effects of Heat and Aeration upon the Fat-soluble Vitamine. *Biochem J*. 1920;14(6): 725-33.
89. Simoni RD, Hill RL, Vaughan M. Nutritional Biochemistry and the Discovery of Vitamins: the Work of Elmer Verner McCollum. *J Biol Chem*. 2002;227(19): 16-18.
90. Toner CD, Davis CD, Milner JA. The vitamin D and cancer conundrum: aiming at a moving target. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(10): 1492-500.
91. Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr Rev*. 1999;20(2): 156-88.
92. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9): 684-700.
93. Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ ve ark. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnene X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4): 742-59.
94. Prufer K, Barsony J. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol Endocrinol*. 2002;16(8): 1738-51.
95. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC ve ark. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*. 1998;13(3): 325-49.
96. Eriksen EF, Glerup H. Vitamin D deficiency and aging: implications for general health and osteoporosis. *Biogerontology*. 2002;3(1-2): 73-7.
97. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3): 266-81.
98. Schoenmakers I, Goldberg GR, Prentice A. Abundant sunshine and vitamin D deficiency. *Br J Nutr*. 2008;99(6): 1171-3.
99. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev*. 2005;10(2): 94-111.
100. Lerch C, Meissner T. Interventions for the prevention of nutritional rickets in term born children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(4): CD006164.
101. Norman AW, Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235(9): 1034-45.
102. Gullberg B, Johnell O, Kanis JA. World-wide projections for hip fracture. *Osteoporos*

Int. 1997;7(5): 407-13.

103. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Willett WC, Staehelin HB ve ark. Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. JAMA. 2004;291(16): 1999-2006.

104. Lyles KW, Schenck AP, Colon-Emeric CS. Hip and other osteoporotic fractures increase the risk of subsequent fractures in nursing home residents. Osteoporos Int. 2008;19(8): 1225-33.

105. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. Am J Clin Nutr. 1999;69(5): 842-56.

106. Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L ve ark. Inhibitory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. Mol Endocrinol. 2001;15(8): 1370-80.

107. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB ve ark. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Circ Res. 2000;87(3): 214-20.

108. Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH ve ark. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. Mol Cancer Ther. 2007;6(4): 1433-9.

109. Van Waes C. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(4): 1076-82.

110. Sun YX, Hu SJ, Zhang XH, Sun J ve ark. [Plasma levels of vWF and NO in patients with metabolic syndrome and their relationship with metabolic disorders]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2006;35(3): 315-8.

111. Schwab M, Reynders V, Loitsch S, Steinhilber D ve ark. Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF kappa B signalling. Mol Immunol. 2007;44(15): 3625-32.

112. Ponzielli R, Katz S, Barsyte-Lovejoy D, Penn LZ. Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc. Eur J Cancer. 2005;41(16): 2485-501.

113. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16: 653-99.

114. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. Mol Cell Biol. 1999;19(1): 1-11.

115. O'Connell BC, Cheung AF, Simkevich CP, Tam W ve ark. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. J Biol Chem. 2003;278(14): 12563-73.

116. Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev.* 1999;83(1-2): 39-52.
117. Okuda T, Kondoh H. Identification of new genes ndr2 and ndr3 which are related to Ndr1/RTP/Drg1 but show distinct tissue specificity and response to N-myc. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;266(1): 208-15.
118. Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem.* 1996;271(47): 29659-65.
119. van Belzen N, Dinjens WN, Diesveld MP, Groen NA ve ark. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms. *Lab Invest.* 1997;77(1): 85-92.
120. Deng YC YL, Liu XP, Nie XY, Wang JC, Zhang XG, Su CZ. Exploring a new gene containing ACP like domain in human brain and expression it in E. coli. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;28: 72-76.
121. Bhaduri A, Krishnaswamy L, Ullal GR, Panicker MM ve ark. Fold prediction and comparative modeling of Bdm1: a probable alpha/beta hydrolase associated with hot water epilepsy. *J Mol Model.* 2003;9(1): 3-8.
122. Shaw E, McCue LA, Lawrence CE, Dordick JS. Identification of a novel class in the alpha/beta hydrolase fold superfamily: the N-myc differentiation-related proteins. *Proteins.* 2002;47(2): 163-8.
123. Zhao W, Tang R, Huang Y, Wang W ve ark. Cloning and expression pattern of the human NDRG3 gene. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1519(1-2): 134-8.
124. Choi SC, Yoon SR, Park YP, Song EY ve ark. Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death. *Exp Mol Med.* 2007;39(6): 705-14.
125. Qu X, Jia H, Garrity DM, Tompkins K ve ark. Ndr4 is required for normal myocyte proliferation during early cardiac development in zebrafish. *Dev Biol.* 2008;317(2): 486-96.
126. Kyuno J, Fukui A, Michiue T, Asashima M. Identification and characterization of Xenopus NDRG1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309(1): 52-7.
127. Krauter-Canham R BR, Evrard JL, Hahne G, Friedt W, Steinmetz A. A transmitting tissue-and pollen-expressed protein from sunflower with sequence similarity to the human

RTP protein. *Plant sci.* 1997;129: 191-202.

128. Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH ve ark. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int J Cancer.* 2008;123(9): 2080-6.

129. Hu XL, Liu XP, Lin SX, Deng YC ve ark. NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. *World J Gastroenterol.* 2004;10(23): 3518-21.

130. Assamaki R, Sarlomo-Rikala M, Lopez-Guerrero JA, Lasota J ve ark. Array comparative genomic hybridization analysis of chromosomal imbalances and their target genes in gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(6): 564-76.

131. Zhao H, Zhang J, Lu J, He X ve ark. Reduced expression of N-Myc downstream-regulated gene 2 in human thyroid cancer. *BMC Cancer.* 2008;8: 303.

132. Lusk EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M ve ark. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res.* 2005;65(16): 7121-6.

133. Deng Y, Yao L, Chau L, Ng SS ve ark. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer.* 2003;106(3): 342-7.

134. Riggs DS. Quantitative aspects of iodine metabolism in man. *Pharmacol Rev.* 1952;4(3): 284-370.

135. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 1996;379(6564): 458-60.

136. Eggo MC, Bachrach LK, Mak W, Burrow GN. Disparate uptake of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and $^{125}\text{I}^-$ in thyroid cells in culture. *Horm Metab Res.* 1986;18(3): 167-72.

137. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1154(1): 65-82.

138. Rodriguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B ve ark. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(7): 3500-3.

139. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R ve ark. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology.* 2000;141(2): 839-45.

140. Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE ve ark. Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.*

2002;87(7): 3356-61.

141. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S ve ark. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*. 2000;275(30): 23227-33.

142. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*. 2001;11(5): 407-14.

143. Bidart JM, Mian C, Lazar V, Russo D ve ark. Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(5): 2028-33.

144. Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, Sasaki N ve ark. Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. *Endocrinology*. 2004;145(9): 4301-8.

145. Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology*. 1984;114(4): 1090-8.

146. Mandell RB, Mandell LZ, Link CJ, Jr. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res*. 1999;59(3): 661-8.

147. Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, Huang M ve ark. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15): 8519-24.

148. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M ve ark. Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(10): 3331-6.

149. Kogai T, Curcio F, Hyman S, Cornford EM ve ark. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression. *J Endocrinol*. 2000;167(1): 125-35.

150. Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem*. 2001;276(24): 21458-63.

151. Dow KH, Ferrell BR, Anello C. Quality-of-life changes in patients with thyroid cancer after withdrawal of thyroid hormone therapy. *Thyroid*. 1997;7(4): 613-9.

152. Robbins J, Merino MJ, Boice JD, Jr., Ron E ve ark. Thyroid cancer: a lethal endocrine neoplasm. *Ann Intern Med*. 1991;115(2): 133-47.

153. Schmutzler C, Koehle J. Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur J*

Endocrinol. 2000;143(1): 15-24.

154. Brabant G, Maenhaut C, Kohrle J, Scheumann G ve ark. Human thyrotropin receptor gene: expression in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 1991;82(1): R7-12.

155. Mizukami Y, Hashimoto T, Nonomura A, Michigishi T ve ark. Immunohistochemical demonstration of thyrotropin (TSH)-receptor in normal and diseased human thyroid tissues using monoclonal antibody against recombinant human TSH-receptor protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(2): 616-9.

156. Gerard AC, Daumerie C, Mestdagh C, Gohy S ve ark. Correlation between the loss of thyroglobulin iodination and the expression of thyroid-specific proteins involved in iodine metabolism in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10): 4977-83.

157. Tanaka K, Inoue H, Miki H, Masuda E ve ark. Relationship between prognostic score and thyrotropin receptor (TSH-R) in papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical detection of TSH-R. *Br J Cancer.* 1997;76(5): 594-9.

158. <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

159. Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods.* 2008;73(3): 211-5.

160. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productE6500.asp>.

161. Okano K, Usa T, Ohtsuru A, Tsukazaki T ve ark. Effect of 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D3 on human thyroid cancer cell growth. *Endocr J.* 1999;46(2): 243-52.

162. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998;24(6): 954-8, 60, 62.

163. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10(4): 413-7.

164. Bernard PS, Wittwer CT. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem.* 2000;46(2): 147-8.

165. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999;26(1): 112-22, 24-5.

166. Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.* 1992;2(1): 1-9.

167. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9): e45.
168. Khadz Kou K, Buchwald P, Westin G, Dralle H ve ark. 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(3): 355-61.
169. Clinckspoor I, Hauben E, Verlinden L, Van den Bruel A ve ark. Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling in malignant and benign thyroid tumors. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(7): 502-11.
170. Stepień T, Krupinski R, Sopinski J, Kuzdak K ve ark. Decreased 1-25 dihydroxyvitamin D3 concentration in peripheral blood serum of patients with thyroid cancer. *Arch Med Res.* 2010;41(3): 190-4.
171. Liu W, Asa SL, Fantus IG, Walfish PG ve ark. Vitamin D arrests thyroid carcinoma cell growth and induces p27 dephosphorylation and accumulation through PTEN/akt-dependent and -independent pathways. *Am J Pathol.* 2002;160(2): 511-9.
172. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M ve ark. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest.* 1998;101(7): 1296-300.
173. Dohan O, Baloch Z, Banreji Z, Livolsi V ve ark. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na(+)/I(-) symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6): 2697-700.
174. Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS ve ark. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(4): 1880-8.
175. Fish EM, Molitoris BA. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N Engl J Med.* 1994;330(22): 1580-8.
176. Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL ve ark. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology.* 1997;138(8): 3555-8.
177. Arturi F, Russo D, Schlumberger M, du Villard JA ve ark. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(7): 2493-6.
178. Ryu KY, Tong Q, Jhiang SM. Promoter characterization of the human Na⁺/I⁻ symporter. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9): 3247-51.

179. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahe C ve ark. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(9): 3228-34.
180. Ringel MD, Anderson J, Souza SL, Burch HB ve ark. Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol.* 2001;14(4): 289-96.
181. Lee YJ, Chung JK, Shin JH, Kang JH ve ark. In vitro and in vivo properties of a human anaplastic thyroid carcinoma cell line transfected with the sodium iodide symporter gene. *Thyroid.* 2004;14(11): 889-95.
182. Pugliese M, Fortunati N, Germano A, Asioli S ve ark. Histone Deacetylase Inhibition Affects Sodium Iodide Symporter (Nis) Expression and Induces (1)(3)(1)I Cytotoxicity in Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *Thyroid.* 2013.
183. Vivaldi A, Miasaki FY, Ciampi R, Agate L ve ark. Re-differentiation of thyroid carcinoma cell lines treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;307(1-2): 142-8.
184. Lorentzen A, Lewinsky RH, Bornholdt J, Vogel LK ve ark. Expression profile of the N-myc Downstream Regulated Gene 2 (NDRG2) in human cancers with focus on breast cancer. *BMC Cancer.* 2011;11: 14.
185. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005;434(7035): 843-50.
186. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H ve ark. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998;281(5382): 1509-12.
187. Larriba MJ, Ordonez-Moran P, Chicote I, Martin-Fernandez G ve ark. Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/beta-catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PLoS One.* 2011;6(8): e23524.
188. Larriba MJ, Valle N, Palmer HG, Ordonez-Moran P ve ark. The inhibition of Wnt/beta-catenin signalling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is abrogated by Snail1 in human colon cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14(1): 141-51.
189. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT ve ark. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* 2001;154(2): 369-87.
190. Zheng W, Wong KE, Zhang Z, Dougherty U ve ark. Inactivation of the vitamin D

receptor in APC(min/+) mice reveals a critical role for the vitamin D receptor in intestinal tumor growth. *Int J Cancer*. 2012;130(1): 10-9.

191. Zhang J, Li F, Liu X, Shen L ve ark. The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter. *J Biol Chem*. 2006;281(51): 39159-68.

192. Cerrato A, Fulciniti F, Avallone A, Benincasa G ve ark. Beta- and gamma-catenin expression in thyroid carcinomas. *J Pathol*. 1998;185(3): 267-72.

193. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML ve ark. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol*. 2001;158(3): 987-96.

194. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG ve ark. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 1999;59(8): 1811-5.

195. Kurihara T, Ikeda S, Ishizaki Y, Fujimori M ve ark. Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid*. 2004;14(12): 1020-9.

196. Flugge J, Krusekopf S, Goldammer M, Osswald E ve ark. Vitamin D receptor haplotypes protect against development of colorectal cancer. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007;63(11): 997-1005.

197. Ochs-Balcom HM, Cicek MS, Thompson CL, Tucker TC ve ark. Association of vitamin D receptor gene variants, adiposity and colon cancer. *Carcinogenesis*. 2008;29(9): 1788-93.

198. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE ve ark. Vitamin D receptor gene polymorphisms and epithelial ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(12): 2566-71.

199. Clendenen TV, Arslan AA, Koenig KL, Enquist K ve ark. Vitamin D receptor polymorphisms and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2008;260(1-2): 209-15.

200. Guy M, Lowe LC, Bretherton-Watt D, Mansi JL ve ark. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16): 5472-81.

201. Sinotte M, Rousseau F, Ayotte P, Dewailly E ve ark. Vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI) and breast cancer risk: association replication in two case-control studies within French Canadian population. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4): 975-83.

202. Barroso E, Fernandez LP, Milne RL, Pita G ve ark. Genetic analysis of the vitamin D receptor gene in two epithelial cancers: melanoma and breast cancer case-control studies. *BMC Cancer*. 2008;8: 385.
203. Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G ve ark. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res*. 1996;56(18): 4108-10.
204. Correa-Cerro L, Berthon P, Haussler J, Bochum S ve ark. Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer. *Hum Genet*. 1999;105(3): 281-7.
205. Oakley-Girvan I, Feldman D, Eccleshall TR, Gallagher RP ve ark. Risk of early-onset prostate cancer in relation to germ line polymorphisms of the vitamin D receptor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(8): 1325-30.
206. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML ve ark. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res*. 1996;11(12): 1850-5.
207. Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hinsch N ve ark. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2009;19(6): 623-8.
208. Sharma V, Fretwell D, Crees Z, Kerege A ve ark. Thyroid cancer resistance to vitamin D receptor activation is associated with 24-hydroxylase levels but not the ff FokI polymorphism. *Thyroid*. 2010;20(10): 1103-11.
209. Clinckspoor I, Verlinden L, Overbergh L, Korch C ve ark. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and a superagonistic analog in combination with paclitaxel or suberoylanilide hydroxamic acid have potent antiproliferative effects on anaplastic thyroid cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;124(1-2): 1-9.

8. EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/11-03	Tarih: 22.03.2012			
	Prof.Dr.Gülgün OKTAY'ın sorumlusu olduğu "İndiferansiye İnsan Anaplastik Tiroit Karsinoma Hücre Hattında Kalsitriolün N-myc Downstream Regulated Gene-2 ve Sodyum İyot Simporter Gen Ekspresyonları Üzerindeki Olası Etkisi Kod:G.O-01" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

EK-2 AKADEMİK CV

Adı SOYADI	Murat SİPAHİ
TC Kimlik No / Pasaport No:	13975630622
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı 35340 Inciraltı/İZMİR
Telefon :	+90 (505) 587 09 63
Faks :	+90 (232) 412 44 31
e-posta :	sipahi_murat_86@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya		2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı	Tamamlanan Devam Eden

	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	Poster Ödülü	Türk Biyokimya Derneği	Aralık-2011

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Şeniz İnanç, Didem Keleş, Aras Emre Canda, Tarkan Ünek, Murat Sipahi, Cem Terzi, Sedat Karademir, İbrahim Astarçioğlu, Gülgün Oktay; RhoC'nin MMP-2 Aktivasyonu Aracılığıyla Kolorektal Kansere Karaciğer Metastazına Katkısı; 6. Ulusal Cerrahi Araştırma Kongresi Bildiri Özet Kitabı p: 138, (2011).

Didem Keleş, **Şeniz İnanç**, Aras Emre Canda, Cem Terzi, Murat Sipahi, Hülya Ellidokuz, Mehmet Füzün, Gülgün Oktay; RhoC, ROCK-II ve MMP-2'nin

Kolorektal Kanser İnvazyonu Üzerindeki Etkisi; 6. Ulusal Cerrahi Araştırma Kongresi Bildiri Özet Kitabı p:136, (2011).

Didem Keleş, **Şeniz İnanç**, Aras Emre Canda, Cem Terzi, Murat Sipahi, Hülya Ellidokuz, Mehmet Füzün, Gülgün Oktay; THE EFFECTS OF RHOC, ROCKII AND MMP-2 ON COLORECTAL CANCER INVASION; Turkish Journal of Biochemistry: Congress Special Issue 1 Vol 36 p: 97, (2011).

Şeniz İnanç, Didem Keleş, Aras Emre Canda, Tarkan Ünek, Murat Sipahi, Cem Terzi, Sedat Karademir, İbrahim Astarcioglu, Gülgün Oktay; CONTRIBUTION OF RHOC TO LIVER METASTASIS OF COLORECTAL CANCER THROUGH MMP-2 ACTIVATION; Turkish Journal of Biochemistry: Congress Special Issue 1, Vol 36 p: 100; (2011).