

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KANSERDE TELOMERAZ AKTİVİTESİNİN DÜZENLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Uzm.Ecz.Emel ÇALIŞKAN CAN

Tez Danışmanı
Doç.Dr.Sevgi AKAYDIN

ANKARA
Ocak 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KANSERDE TELOMERAZ AKTİVİTESİNİN DÜZENLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Uzm.Ecz.Emel ÇALIŞKAN CAN

Tez Danışmanı
Doç.Dr.Sevgi AKAYDIN

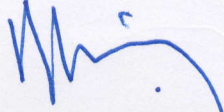
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
GÜ BAP 02/2009-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Ocak 2012

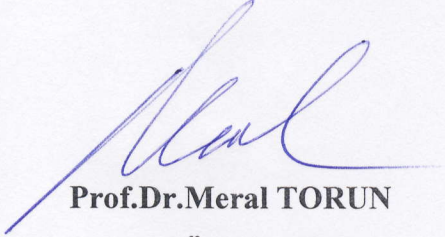
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Ecz.) Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/02/2012



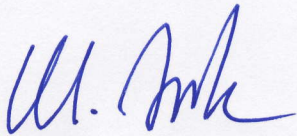
Prof.Dr.Bolkan ŞİMŞEK
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



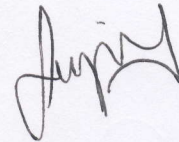
Prof.Dr.Meral TORUN
Gazi Üniversitesi



Prof.Dr.Cumhur BİLGİ
Gölhane Askeri Tıp Akademisi



Prof.Dr.Mustafa ARK
Gazi Üniversitesi



Doç.Dr.Sevgi AKAYDIN
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	I
Şekiller	IV
Grafikler	V
Tablolar	VII
Kısaltmalar	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.2. Kanser Oluşumunda ve Progresyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	7
2.2.1. Onkogenler	7
2.2.2. Büyüme Faktörleri	8
2.2.3. Tümör Baskılayıcı Genler	8
2.3. Kolon, Meme, Mide ve Yumuşak Doku Kanserlerinin Özellikleri	9
2.3.1. Kolon Kanseri	9
2.3.2. Meme Kanseri	11
2.3.3. Mide Kanseri	12
2.3.4. Yumuşak Doku Kanseri (Yumuşak Doku Sarkomu)	13
2.4. Telomer	14
2.4.1. Telomer Yapısı	14
2.4.2. Telomer Kısalması	17
2.5. Telomeraz Enzimi	18
2.6. Telomerazın Kanserle İlişkisi	22
2.7. Telomeraz Enzim Kompleksi Bileşenleri	23
2.7.1. TERC	23
2.7.2. TERT	23
2.7.3. Diskerin	24
2.8. AAA⁺ Süperaillesi ATPazları	27
2.8.1. Telomeraz ile Kompleks Oluşturan AAA ⁺ ATPaz Proteinleri	28
2.8.1.1. Pontin	29
2.8.1.2. Reptin	33
2.9. TERT, Pontin, Reptin ve Diskerin İlişkisi	35
2.10. Pontin, Reptin ve Diskerinin Kanserdeki Roller	37

2.11.	Pontin ve Reptinin Yer Aldığı Hücresel Yolaklar	38
2.11.1.	Transkripsiyon Aktivasyonu	39
2.11.2.	Transkripsiyon Baskılanması	40
2.11.3.	DNA Hasar Cevabı	41
2.11.4.	snoRNP Oluşumu	43
2.11.5.	Hücre Transformasyonu ve Metastaz	43
2.11.6.	DNA Replikasyonu, Mitoz ve Uri/Prefoldin Kompleksleri	46
2.12.	Serbest Radikal Hasarları ve Ürünleri	46
2.12.1.	DNA Hasarı	47
2.12.1.1.	DNA Şeker Hasarı	47
2.12.1.2.	DNA Baz Hasarı	48
	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8OHdG)	48
2.12.2.	Lipit Peroksidasyonu	50
	Malondialdehit (MDA)	51
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	52
3.1.	Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımı ve Özellikleri	52
3.1.1.	Hasta Grubu	52
3.1.2.	Kontrol Grubu	52
3.2.	Materyal	54
3.2.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.2.2.	Kullanılan Alet ve Cihazlar	55
3.2.3.	Kullanılan Biyolojik Materyal	56
3.3.	DeneySEL Prosedür	57
3.3.1.	Doku Örneklerinde Kantitatif Real-Time RT-PCR (qRT-PCR/ Gerçek Zamanlı RT-PCR) ile hTERT, Pontin, Reptin ve Diskerin Gen Ekspresyonlarının Analizi	57
3.3.1.1.	Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu	57
	Kullanılan Çözeltiler	57
	Örneklerin Hazırlanışı	58
3.3.1.2.	RNA Örneklerinden RT-PCR ile cDNA Sentezi	58
	Kullanılan Çözeltiler (Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit)	58
	Örneklerin Hazırlanışı	59
3.3.1.3.	Kantitatif Real-Time PCR Analizi	60
	Kullanılan Çözeltiler (Roche LightCycler 480 Probes Master Kit)	60

	Örneklerin Hazırlanışı	60
3.3.2.	İdrar Örneklerinde ELISA ile 8OHdG Analizi	63
	Kullanılan Çözeltiler (8OHdG EIA Kit)	63
	Örneklerin Hazırlanışı	64
	Standartların Hazırlanışı	65
3.3.3.	İdrar Örneklerinde Spektrofotometri ile Kreatinin Analizi	67
	Kullanılan Çözeltiler (Kreatinin Kit)	67
	Örneklerin Hazırlanışı	68
	Standartların Hazırlanışı	68
3.3.4.	Serum Örneklerinde HPLC ile MDA Analizi	69
	Kromatografi Şartları	69
	Kullanılan Çözeltiler	70
	Örneklerin Hazırlanışı	70
	Standartların Hazırlanışı	71
3.4.	Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	73
4.	BULGULAR	74
4.1.	Hasta Grubunda Normal ve Tümör Dokularındaki hTERT, Pontin, Reptin ve Diskerin Gen Ekspresyonlarının Düzeyleri	74
4.2.	Hasta ve Kontrol Gruplarında 8OHdG/Kreatinin ve MDA Düzeyleri	91
4.3.	Hasta Grubunda Gen Ekspresyonları, 8OHdG/Kreatinin ve MDA Arasındaki Korelasyonlar	98
5.	TARTIŞMA	102
6.	SONUÇ	119
7.	ÖZET	121
8.	SUMMARY	123
9.	KAYNAKLAR	125
10.	EKLER	147
10.1.	Etik Kurul İzni	147
10.2.	Teşekkür	148
11.	ÖZGEÇMİŞ	149

ŞEKİLLER

Şekil 1:	İşaretlenmiş telomerler	14
Şekil 2:	Telozom yapısında bulunan proteinler	16
Şekil 3:	Yetişkin kök hücrelerde telomer tekrarları kısalmıştır	18
Şekil 4:	Telomeraz enzim kompleksinin yapısı	19
Şekil 5:	Telomerin telomeraz ve polimeraz tarafından uzatılması	20
Şekil 6:	Telomeraz yüksek üreme hızı olan hücrelerde etkindir	21
Şekil 7:	İnsan telomeraz ribonükleoprotein kompleksinin kısmi yapısı	24
Şekil 8:	Bir snoRNP partikülü içinde insan diskerin modeli	26
Şekil 9:	Pontinin monomer ve heksamer yapıları	31
Şekil 10:	Pontin monomeri ve monomerlerin oluşturduğu çeşitli oligomerik pontin formları	32
Şekil 11:	Saccharomyces cerevisiae'de pontin ve reptinin insanda pontinle kıyaslanması	33
Şekil 12:	Pontin-reptin dodekamer yapısı	34
Şekil 13:	TERT kompleks yapıları	36
Şekil 14:	Hücre döngüsü	37
Şekil 15:	Ino80 kompleksinin kromatin yeniden modelleme fonksiyonu	40
Şekil 16:	KAI1 metastaz baskılayıcı genin reptin, pontin, β -katenin ve Tip60 ile regülasyonu	45
Şekil 17:	8OHdG'nin yapısı	49
Şekil 18:	MDA'nın yapısı	51

GRAFİKLER

Grafik 1:	Bir mikrolaka içindeki tüm cDNA örneklerinin real-time PCR amplifikasyon eğrileri	61
Grafik 2:	Hasta grubuna ait bir amplifikasyon grafiği	62
Grafik 3:	8OHdG standart kalibrasyon grafiği	67
Grafik 4:	Kreatinin standart kalibrasyon grafiği	69
Grafik 5:	Hasta grubuna ait bir MDA kromatogram örneği	71
Grafik 6:	MDA standart kalibrasyon grafiği	72
Grafik 7:	Standartlara ait bir MDA kromatogram örneği	73
Grafik 8:	Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan hTERT ekspresyonlarının ortalama değerleri	80
Grafik 9:	Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan pontin ekspresyonlarının ortalama değerleri	80
Grafik 10:	Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan reptin ekspresyonlarının ortalama değerleri	81
Grafik 11:	Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan disklerin ekspresyonlarının ortalama değerleri	81
Grafik 12:	Total hasta grubunda kanser fazına göre hTERT ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	83
Grafik 13:	Total hasta grubunda kanser fazına göre pontin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	83
Grafik 14:	Total hasta grubunda kanser fazına göre reptin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	84
Grafik 15:	Total hasta grubunda kanser fazına göre disklerin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	84
Grafik 16:	Total hasta grubunda cinsiyete göre hTERT ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	86

Grafik 17:	Total hasta grubunda cinsiyete göre pontin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	86
Grafik 18:	Total hasta grubunda cinsiyete göre reptin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	87
Grafik 19:	Total hasta grubunda cinsiyete göre diskerin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	87
Grafik 20:	Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre hTERT ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	89
Grafik 21:	Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre pontin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	89
Grafik 22:	Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre reptin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	90
Grafik 23:	Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre diskerin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	90
Grafik 24:	8OHdG/kreatinin oranının kontrol ve hasta gruplarında total ve kanser tiplerine göre ortalama değerleri	93
Grafik 25:	MDA'nın kontrol ve hasta gruplarında total ve kanser tiplerine göre ortalama değerleri	93
Grafik 26:	Total hasta grubunda kanser fazına göre 8OHdG/ kreatinin ortalama değerleri	94
Grafik 27:	Total hasta grubunda kanser fazına göre MDA ortalama değerleri	95
Grafik 28:	Total hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre 8OHdG/ kreatinin ortalama değerleri	96
Grafik 29:	Total hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre MDA ortalama değerleri	96
Grafik 30:	Total hasta ve kontrol gruplarında menopozal duruma göre 8OHdG/kreatinin ortalama değerleri	97
Grafik 31:	Total hasta ve kontrol gruplarında menopozal duruma göre MDA ortalama değerleri	98

TABLÖLER

Tablo 1:	Çeşitli canlılarda terminal tekrar dizileri	15
Tablo 2:	Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri	53
Tablo 3:	Hasta ve kontrol gruplarının rutin biyokimya değerleri	54
Tablo 4:	cDNA sentezi için gerekli reaksiyon karışımında 1 RNA örneği için kullanılan çözelti miktarları	59
Tablo 5:	Her bir mikrolakaya kuyucuğu için gereken PCR reaksiyon karışım oranı.	60
Tablo 6:	Mikrolakalara örnek uygulama düzeni	64
Tablo 7:	Mikrolakalara uygulanacak örneklerin pipetlenen miktarları	65
Tablo 8:	8OHdG standart çözeltilerinin %B/B ₀ değerleri	66
Tablo 9:	Kreatinin standart çözeltilerinin absorpsiyon farkı değerleri	68
Tablo 10:	MDA standart çözeltilerinin pik alanı değerleri	72
Tablo 11:	Gen ekspresyonları normal dokuya kıyasla tümörlü dokuda daha fazla olan örneklerin ilgili gruplar içindeki oranları	74
Tablo 12:	Hasta grubunda hTERT geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları	75
Tablo 13:	Hasta grubunda p21 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları	76
Tablo 14:	Hasta grubunda p53 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları	77
Tablo 15:	Hasta grubunda p16 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları	78
Tablo 16:	Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan gen ekspresyonlarının ortalama değerleri	79
Tablo 17:	Total hasta grubunda kanser fazına göre gen ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	82
Tablo 18:	Total hasta grubunda cinsiyete göre gen ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	85
Tablo 19:	Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre gen ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri	88

Tablo 20:	Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen 8OHdG/kreatinin ve MDA değerleri	91
Tablo 21:	Hasta ve kontrol gruplarında 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri	92
Tablo 22:	Total hasta grubunda kanser fazına göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri	94
Tablo 23:	Total hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri	95
Tablo 24:	Total hasta ve kontrol gruplarında menopozal duruma göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri	97
Tablo 25:	Gen ekspresyonlarının total hastalarda ve kanser tiplerine göre korelasyonları	99
Tablo 26:	Gen ekspresyonlarının total hastalarda ve kanser tiplerine göre erken ve ileri faz korelasyonları	100
Tablo 27:	Total hasta grubunda cinsiyete göre gen ekspresyonlarının 8OHdG/kreatinin ve MDA ile korelasyonları	101

KISALTMALAR

8OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
8OHGua	8-hidroksiguanin
8-oxodG	8-okso-2'-deoksiguanozin
%B/B ₀	%Bağı analit/maksimum bağı işaretleyici
AAA	Çeşitli hücresel aktivite ilişkili ATPazlar
AChE	Asetilkolinesteraz
ALT	Telomerlerin alternatif uzatılması
APC	Adenomatöz polipozis koli geni
AR	Androjen reseptörü
ATF	Aktive edici transkripsiyon faktörü
ATM	Mutant ataksi telenjipektazi
ATR	Rad3 ilişkili ataksi telenjipektazi
B ₀	Maksimum bağlanma
Bak	Bcl2 antagonist/killer proteini
BAX	BCL2 ilişkili X geni
BCL	B hücreli lösemi/lenfoma geni
Blk	Kör
BRCA	Meme kanseri duyarlılık geni
Cdc25a	Hücre bölünme siklusu 25 proteini homologu A
Cdk	Siklin bağımlı protein kinaz
cDNA	Komplementer DNA
CE	Kapiller elektroforez
Chk	Kontrol noktası kinazı
C _T	Eşik döngüsü
DES	Dietilstilbesterol
DK	Diskeratozis konjenita
DKC1	Diskerin geni
DKCA1	Telomeraz RNA komponenti
DNMT3β	DNA metiltransferaz 3 beta
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
E2F	E2F transkripsiyon faktörü
ECD	Elektrokimyasal dedektör
ECP51	Eritrosit sitozolik protein 51kDa-reptin
ECP54	Eritrosit sitozolik protein 54kDa-pontin
EIA	Enzim immün assay
ELISA	Enzim bağı immün assay
EST2	Telomeraz ters transkriptaz

FAP	Ailesel adenomatoz polipozis
FOS	FBJ osteosarkoma proto-onkogeni
GAR1	H/ACA küçük nükleolar RNP komponenti
GC	Gaz kromatografisi
H2A	Histon H2A
H2AX	Histon H2AX varyantı
H4	Histon H4
HAT	Histon asetiltransferaz
HCC	Hepatoselüler karsinoma
HDAC	Histon deasetilaz
HeLa	Henrietta Lacks ölümsüz tümör hücreleri
Hint	Histidin üçlü nükleotit bağlayıcı protein
HNPCC	Kalıtımsal polipozis-olmayan kolorektal kanser geni
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
hTERT	İnsan telomeraz ters transkriptazı
hTR	İnsan telomeraz RNA komponenti
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
INK	Cdk inhibitörü
KAI	Kangai metastaz baskılayıcı geni
KIP	Kinaz inhibitör proteini
LP	Lipit peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
Mdm	p53 bağlayıcı protein homologu (mouse double minute)
Miz	Myc ilişkili çinko parmak proteini
MLH	MutL homologu
mRNA	Haberci RNA
MS	Kütle spektrometrisi
MUC	Müsin protein geni
MutL	Metil-yönetimli hatalı eşleşme onarımı proteini
MutY	Adenin DNA glikozilaz
MYC	Myelositomatozis proto-onkogeni
MYH	MutY homologu
NF	Nörofibromatozis
(NF)-κB	B-hücrelerinde hafif zincir arttırıcı nükleer faktör kappa
NHP	Histon olmayan kromozom proteini
NMP238	Nükleer matriks proteini 238-pontin
NOP	Küçük nükleolar ribonükleoprotein homologu
NSB	Spesifik olmayan bağlanma

NTP	Nükleotit trifosfat
NuA4	Nükleozomal histon H4 asetiltransferaz
onc	Onkogen
p16	Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 2A
p21	Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 1A
p27	Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 1B
p53	Tümör protein 53
p57	Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 1C
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Trombositten türeyen büyüme faktörü
Pex	Peroksin
PKC α	Protein kinaz C inhibitörü
POT	Telomerleri koruma proteini
pRB	Retinoblastoma proteini
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
Rap	Represör aktivatör protein
RAS	Rat sarkoma proto-onkogeni
RB	Retinoblastoma geni
RK	Rölatif kantifikasyon
RNP	Ribonükleoprotein
RNT	Reaktif nitrojen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
Rpb5	RNA polimeraz II B subüniti
rRNA	Ribozomal RNA
RT	Ters transkriptaz
RT-PCR	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
RuvB	Holliday kavşağı DNA helikazı
Ruvbl	RuvB-benzeri protein
RuvBL	RuvB-benzeri protein
Rvb	RuvB-benzeri protein
SCARNA19	Telomeraz RNA komponenti
SENP	SUMO-sentrin spesifik proteaz
SERPINE	Serin proteaz inhibitör (serpin) protein
SKD	K ⁺ transport defekt baskılayıcı protein
SMAD	Mad (mothers against decapentaplegic) homologu protein
snoRNA	Küçük nükleolar RNA
snoRNP	Küçük nükleolar ribonükleoprotein
snRNA	Küçük nükleer RNA
SRC	Sarkoma proto-onkogeni
SRH	İkinci homoloji bölgesi
STK	Serin/treonin protein kinaz
SUMO	Küçük ubiquitin benzeri modifiye edici

SUSP	SUMO-spesifik proteaz
SV-40	Simian virüs 40
Swr	Swi2 ATPaz bölgesi ilişkili kompleks
TA	Total aktivite
TAP54 α	TIP60-ilişkili protein 54 alfa-pontin
TAP54 β	TIP60-ilişkili protein 54 beta-reptin
Tat	İnsan immünyetersizliği virüsü-HIV
TBARs	Tiyobarbitürik asit-reaktif bileşikleri
TBP	TATA-bağlayıcı protein
TCF	T hücre faktörü
TCS1	Telomeraz ters transkriptaz
TER	Telomeraz RNA komponenti
TERC	Telomeraz RNA komponenti
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
TGF β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TIN	TRF1 etkileşimli nükleer protein
Tip48	TBP-etkileşimli protein 48kDa-reptin
Tip49	TBP-etkileşimli protein 49kDa-pontin
Tip49a	TBP-etkileşimli protein 49kDa-pontin
Tip49b	TBP-etkileşimli protein 48kDa-reptin
Tip60	Tat-etkileşimli protein 60kDa
TR	Telomeraz RNA komponenti
TRC3	Telomeraz RNA komponenti
TRF	Telomerik tekrar bağlanma faktörleri
TRF	Terminal restriksiyon fragmanı
tRNA	Taşıyıcı RNA
TRT	Telomeraz ters transkriptaz
UBC	Ubikitin-konjuge enzim
Uri	Alışılmadık prefoldin Rpb5 etkileşimli protein
Vps4p	Vakuoler protein ayırma-ilişkili protein 4p
Wnt	Wingless proteini
YY	Ying yang proteini

1.GİRİŞ

Günümüzde insan ölümlerinin kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelen en önemli sebebi kanser olmaktadır. Kanser oluşumu kimyasal ajanlar, virüsler, radyasyon etkileri, genetik faktörler, herediter özellikler, yaşam biçimi, obezite, diyet gibi çok çeşitli etkenlerle tetiklenmektedir. Bugüne kadar yapılan pek çok çalışmayla bu faktörlerin etkileri araştırılmış ve kanser oluşumunda çok önemli katkıları olduğu kanıtlanmıştır. Günümüzde kanser araştırmalarında çevresel etkilerin yanı sıra genetik faktörlerin karsinogenez yani kanser oluşum süreci üzerindeki etkilerine odaklanılmaktadır.

Kanser hücreleri; normal hücrelerin büyüme, bölünme ve gerektiğinde yavru hücreler üretme sürecinden farklı olarak büyümenin denetiminde azalma veya ortadan kalkmaya bağlı ve kontrolsüz bir biçimde bölünmektedir. Bundan daha kritik olarak komşu dokulara ve vücudun diğer bölümlerine yayılma ve metastaz nitelikleri ile karakterize edilmektedir. Kanserde tedavi sürecini zorlaştıran en önemli etken, büyüyen ve yayılan bu hücrelerin “ölümsüz” olmalarıdır. Bu noktada karşımıza telomer yapıları çıkmaktadır. Telomerler, ökaryotik hücre kromozomlarının her iki ucunda bulunan ve tüm canlılarda benzersiz (5')(T_XG_Y)_n tekrarlarını içeren, heterokromatin yapıda DNA dizileridir.^{1,2,3} Telomer yapısı, telomerik proteinler için pek çok bağlanma bölgesine sahip moleküler bir iskele oluşturmaktadır.⁴ Telomerlere bağlı, bu yapısal proteinlerin TTAGGG tekrarlarını bağlama ve telozom yapımını kolaylaştırma yetenekleri bulunmaktadır.⁵

Telomerik baz dizileri, kromozomların 3' uçlarını çift zincir kırıklarından, eksonükleaz ve ligazlardan, DNA yıkımından, uç uca birleşmelerden, yeniden düzenlenmelerden ve kromozom kayıplarından koruyan bir başlık oluşturduğu gibi telomerik proteinler vasıtasıyla DNA

replikasyonunda, DNA onarımında ve kromatin reorganizasyonunda aktif rol oynamaktadır.^{1,5} DNA uçlarının kendini eşlemesi için gerekli özel bir mekanizma olmadığında genç ve bölünmekte olan somatik hücrelerde, her bir hücre bölünmesinde telomer boyu giderek kısalmakta ve zamanla hücre bölünmesi sona ermektedir.^{2,6} Bunun tersine bugüne kadar incelenen ölümsüz hücrelerde, hücre bölünmesiyle net bir telomer kısalması veya sekans kaybı görülmemiştir. Dolayısıyla telomerlerin bakım ve onarımı hücrelerin süresiz çoğalması için gereklidir.⁷ Her hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kaybı, telomeraz enzim kompleksi tarafından telafi edilerek hücrenin yaşam süresi uzatılmaktadır.²

Kromozomların telomerler tarafından nasıl korunduğunun ortaya çıkarılması ve telomeraz enziminin keşfedilmesi ile ilgili çalışmalarından dolayı moleküler biyolog Elizabeth H. Blackburn, 2009 yılında Carol W. Greider ve Jack W. Szostak ile birlikte Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'nü kazanmıştır. Telomeraz, 5'-TTAGGG-3' tekrarlarının kromozom uçlarından kaybını dengelemek üzere, bu tekrarları hücre siklusunun replikatif fazında telomerlerin sonuna eklemektedir. Telomeraz aktivitesinin kanser hücrelerinde çoğunlukla ancak normal somatik hücrelerde nadiren saptanabildiği gösterilmiştir. Embriyogenez sonrası, çoğu somatik hücrede telomeraz aktivitesi kaybolmasına karşın fizyolojik olarak kendini dikkate değer biçimde yenileyebilen somatik hücrelerde telomeraz aktivitesinin düşük de olsa varolduğu gösterilmiştir.¹ Bu da göstermektedir ki bu enzim, ister normal ister malign olsun yüksek üreme hızı gösteren hücrelerde etkindir.⁸ Sonuç olarak düşük telomeraz aktivitesi gösteren normal hücrelerde telomerik tekrarlar korunmakta, böylece hücreler kendini yenileyebilmektedir.⁴ Telomeraz aktivitesinin eksik olduğu somatik hücrelerde ise telomerler kısalmaktadır. Telomeraz ters transkriptazı insan somatik hücrelerine in vitro olarak sokulduğunda telomeraz aktivitesi yenilenmekte ve hücresel yaşam süresi dikkate değer biçimde artmaktadır.⁶

Tümör hücresinin ölümsüzlüğü ve karsinogenez süreci için telomeraz aktivitesi gereklidir.² İnsan kanserlerinde telomeraz, fonksiyonel telomerlerin korunmasına yardım ederek tümör proliferasyonunu arttırma görevi üstlendiği yerlerde up-regüle olmaktadır.⁹ Telomeraz insan kanserleriyle oldukça yakından ilişkilidir. Hematolojik malignansi, beyin tümörleri, primer akciğer kanseri, hepatoselüler kanser, mide kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri, meme kanseri, serviks kanseri, endometriyal kanser, over kanseri ve mesane kanserinde telomeraz enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.^{2,8} Bu şekilde çoğu insan kanser hücresinde telomeraz aktivitesinin bulunması ve telomeraz aktivitesinin kanserin ilerlemesine uygun bir şekilde artış göstermesi; bu enzimin hem kanser tanısı için diagnostik ve tümör seyrinin takibi için prognostik bir belirteç olabileceğini, hem de antikanser terapi için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.^{2,9} Telomer uzunluğu ve dolayısıyla bu uzunluğun korunmasında görevli olan telomere bağlı proteinler ile telomeraz enzim aktivitesi hakkında elde edilecek her çeşit bilgi, kanserin moleküler düzeyi, erken teşhisi ve tedavisi konusunda önemli derecede yol gösterici olabilecektir.²

Telomeraz kompleksi TERT (telomeraz ters transkriptaz), TERC (telomeraz RNA komponenti) ve TERC bağlı protein diskerinden oluşmaktadır. Bunun yanı sıra telomeraz enzim kompleksinde pontin ve reptin ATPaz'ları da onun bileşenleri olarak tanımlanmıştır. Pontin ve reptin, diğer telomeraz bileşenleri TERT ve diskerin ile etkileşime girmekte ve telomeraz aktivitesi için kritik bir öneme sahip olmaktadır. Pontin ve reptin ayrıca, yeni bir TERT içeren kompleks oluşturmaktadır.¹⁰ Bu TERT-pontin-reptin kompleksi, hücre döngüsünün her S fazı esnasında pik yapmaktadır.⁹ Bu da TERT komplekslerinin dinamik olduğunu, pontin ile reptinin döngüsel telomeraz kuruluşunda yer aldığını ve kompleksin en az iki farklı formda bulunduğunu düşündürmektedir.^{9,10} Bu formlardan biri düşük telomeraz katalitik aktiviteye sahip TERT-pontin-reptin kompleks

formu (pretelomeraz kompleksi), diğeri ise yüksek enzimatik aktiviteye sahip TERT-TERC-diskerin kompleks formudur (olgun telomeraz kompleksi).¹⁰ Pretelomeraz yapının kurulmasının ardından pontin ve reptin, TERT-TERC-diskerin kompleksinden ayrılmakta ve TERT-pontin-reptin kompleksi, TERT-TERC-diskerin kompleksine dönüşmektedir.^{9,10}

Telomeraz aktivitesi ve hTERT (insan telomeraz ters transkriptazı) ekspresyonu (ifadelenmesi) daha önce pek çok kanser türünde çalışılmışken, pontin ekspresyonu küçük hücreli olmayan akciğer kanseri,¹¹ kolon kanseri,^{12,13} hepatoselüler karsinoma;¹⁴ reptin ekspresyonu hepatoselüler karsinoma,¹⁵ mide kanseri;¹⁶ diskelerin ekspresyonu ise meme kanseri,^{17,18} prostat kanseri¹⁹ vakalarında ayrı ayrı çalışılmıştır.

Çalışmamız kolon kanseri, meme kanseri, mide kanseri ve yumuşak doku kanseri gibi çeşitli kanser tiplerinde tümör hTERT, pontin, reptin ve diskelerin ekspresyonunu aynı anda inceleyen ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda hTERT, pontin, reptin ve disklerinin ekspresyonlarının tümör spesifik olup olmadığının araştırılması ve çalışma sonunda elde edilen bulgular ışığında, birlikte pek çok işlevi olan bu proteinlerin telomeraz aktivitesini düzenleyici etkilerinden dolayı yapılacak antikanser çalışmalarına katkıda bulunması amaçlanmıştır. Çalışmamız; ileride hTERT, pontin, reptin ve diskelerini dolayısıyla telomerazı hedefleyen etkili terapötik ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilecektir.

Çalışmamızda hTERT, pontin, reptin ve diskelerin genlerinin ekspresyonunun çeşitli kanser tiplerinde nasıl etkilendiği araştırılmış ve buna paralel olarak oksidatif stres düzeyi 8OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) ve MDA (malondialdehit) belirteçleri ile ölçülerek gen ekspresyon düzeyleriyle ilişkilendirilmesi yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

Kanser, bazı hücrelerin düzgün fonksiyon göstermediği, çok hızlı bölündüğü ve sonuçta tümör oluşumuyla seyreden bir hastalıktır. Organizma, normal şartlar altında tamir edilebilen ve yeniden üretilen çok çeşitli, küçük hücrelerden oluşmaktadır. Kanserde ise bu süreç bozulmakta, hücreler kontrolsüz bir biçimde bölünmekte ve tümör oluşturmaktadır. Eğer tümörü oluşturan bu hücreler belli bir bölgede sınırlı kalıyorsa oluşumlar **benign tümör** adını almaktadır. Tümör hücreleri komşu doku veya organları da işgal ederse bu oluşumlar **malign tümör** olarak adlandırılmaktadır. Malign kanser hücreleri kan dolaşımına veya lenfatik sisteme geçerek vücudun başka bölgelerinde **metastatik** (sekonder) **tümör** oluşturabilmektedir. Sonuç olarak kanser hücreleri; büyümenin denetiminde azalma veya ortadan kalkma, komşu dokuları işgal, vücudun diğer bölümlerine yayılma ve metastaz nitelikleri ile karakterize edilmektedir.²⁰⁻²²

Karsinogenez temel olarak ışıma etkisi, kimyasal bileşikler ve virüsler nedeniyle oluşmakla birlikte herediter özellik de göstermektedir. Bu faktörler genellikle genlerde mutasyonlara neden olmaktadır.²⁰ DNA'nın oksidatif hasara uğraması da mutasyon hızını arttıran etkenlerden biridir.^{20,21}

İşıma etkisiyle oluşan karsinogenezde DNA yapısında pirimidin dimerlerinin oluşması, pürinsiz veya pirimidinsiz bölgelerin ortaya çıkması, tek veya çift zincir kırılmaları, zincirler arasında çapraz bağlanmalar görülebilmektedir. x ve γ-ışınları, DNA üzerindeki doğrudan etkilerinin yanı sıra dokularda serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır.²⁰ Oluşan bu reaktif oksijen türleri (ROT) [süperoksit ($O_2^{\cdot-}$),

hidroksil (OH[•]), alkoksil (RO[•]), peroksil (ROO[•]) ve hidroperoksil (ROOH[•]) gibi oksijen merkezli serbest radikaller]] ile reaktif nitrojen türleri (RNT) [nitrik oksit (NO[•]), nitrojen dioksit (NO₂[•]) gibi serbest radikaller] protein, lipid ve DNA yapılarıyla etkileşmekte, moleküler hasara neden olmakta ve karsinogeneze yol açmaktadır. Serbest radikaller ayrıca aerobik canlılarda oksijenin yer aldığı pek çok biyokimyasal tepkime ve çevreden kaynaklanan kimyasal ve fiziksel etkenlerin yanı sıra; hiperoksi, inflamasyon gibi durumlarla, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara (örneğin parakuat), antineoplastik ajanlara ve ksenobiyotiklere maruziyetle de oluşmaktadır.²³⁻²⁵

Kimyasal karsinojenler, insan kanserlerinin yaklaşık %80' inden sorumlu olduğu düşünülen çevresel etkiler içinde en ön sıralarda yer almaktadır.²⁰ Benzo [a] piren, benzen, asbest, aflatoksin B₁ en çok bilinen kimyasal karsinojenlerdir. Etkilerini DNA, RNA ve proteinler gibi hücresel makromoleküllere genellikle kovalent bağlanarak göstermektedir.²⁰

İnsan kanserlerinin yaklaşık %15'inden sorumlu karsinojenik ajanlar virüslerdir.²⁰ Eppstein-Barr, hepatit B, insan papilloma virüsleri, SV-40 virüsü (Simian virüsü-40), insan T hücre lösemi virüsü tip I ve tip II gibi çeşitli virüsler karsinojenik virüslerden bazılarıdır ve bunlar onkojenik virüsler olarak tanımlanmaktadır.²⁰ Bunlar, yeni genleri hücre içine sokarak, hücreleri enfekte ederek veya gen ifadesini değiştirerek malign dönüşüme neden olmaktadır.^{20,21}

2.2.Kanser Oluşumunda ve Progresyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

2.2.1.Onkogenler

Onkogenler karsinogenez oluşturan genlerdir. Viral onkogenlerde (v-onc/viral onkogen) virüsler hücrelerden geçişleri sırasında bu hücrelere ait bazı genleri kendi genomları içine yerleştirirken, dönüşüme uğrattığı hücrelerde değişmiş büyüme özelliklerine sebep olmaktadır. Proto-onkogenler ise normal hücrelerde bulunan, ürünleri normal farklılaşma ve diğer hücreyel olaylarda etki gösteren genlerdir (x-onc proto-onkogeni). Tümör hücrelerinden elde edilen onkogenler (c-onc/hücreyel onkogen) ise hücre kültürlerinde kullanılmaktadır. Proto onkogenlerin ifadesini veya yapısını değiştiren yani onkogene dönüşmesini sağlayan promoter sokulması, arttırıcı sokulması, kromozom translokasyonları, gen amplifikasyonu, nokta mutasyonu gibi mekanizmalar işlemektedir. Kanser gelişiminde sadece onkogenlerin aktivitesinde artış değil, tümör baskılayıcı genlerin aktivitesinde de azalma söz konusu olmaktadır.^{20-22,26}

Onkogenler, hücreyel büyümeyi dış kaynaklı uyarılardan bağımsız olarak yönetmek üzere hücre içi kilit mekanizmaları etkilemektedir. Çeşitli hedef proteinleri tirozin kalıntıları üzerinden fosforile eden bir protein-tirozin kinaz kodlayan **SRC** (sarkoma proto-onkogeni), adenilil siklaz etkinliğini uyarmak üzere G tipi bir proteini kodlayan **RAS** (rat sarkoma proto-onkogeni), DNA-bağlayıcı bir protein kodlayarak gen ekspresyonunu değiştiren **MYC** (miyelositomatozis proto-onkogeni) bunlara örnek verilebilmektedir. Bunlar mitozun denetimini etkileyebilmektedir. Mutasyonlarda veya kanserlerde siklinler, siklin bağımlı protein kinazlar (Cdks) ve Cdk inhibitörleri etkilenmektedir. Cdk inhibitörleri; kinaz inhibitör protein ailesi (KIP) üyeleri p21, p27, p57 (siklin

bağımlı kinaz inhibitör 1A, 1B, 1C) ve proteinlerin Cdk4 inhibitör ailesi (INK4) üyelerini (p16-siklin bağımlı kinaz inhibitör2A) kapsamaktadır. Sıklıkla, mutant kanser hücrelerinde pRB (retinoblastoma proteini), p53 (tümör protein 53), p16 gibi baskılayıcı genlerin protein ürünleri de hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.²⁰

2.2.2.Büyüme Faktörleri

Çeşitli büyüme faktörleri kendilerine ait hedef hücrelerde mitojenik bir yanıt oluşturmaktadır. **PDGF** (trombositten türeyen büyüme faktörü) bunlara örnektir. Hücrelerin PDGF' ye maruz kalması, bazı hücrel proto-onkogenlerin [MYC ve FOS (FBJ osteosarkoma proto-onkogeni) gibi] hızla etkinleşmesine neden olmaktadır. Büyüme faktörleri ile onkogenler arasında ilişki bulunmaktadır. Keza hücre kültüründe bulunan birçok tümör hücresi ortama büyüme faktörleri salgılamaktadır. **TGFβ** (dönüştürücü büyüme faktörü beta) gibi büyümeyi inhibe eden faktörler de bulunmaktadır.²⁰

2.2.3.Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler anti-onkogenler veya çekinik onkogenler olarak da adlandırılmaktadır. Bu genlerin baskılanması büyüme üzerindeki bazı kısıtlamaları ortadan kaldırmaktadır. Bunların en önemlilerinden biri de **p53** genidir. Bu genin ürünü olan protein, çekirdeğe yerleşiktir, fosforilasyon ve defosforilasyona uğramakta ve bazı viral proteinleri bağlamaktadır. p53 hücre bölünmesine katılan bazı genleri düzenleyerek bir transkripsiyon aktivatörü olarak etki göstermektedir. Ayrıca DNA hasarında bir G₁ denetim noktası işlevi görmektedir. DNA hasarı çoksa p53 etkinliği artmakta, hücre bölünmesi inhibe olmakta ve onarım için zaman sağlanmaktadır. Hücre bölünmesi denetimsiz olarak

devam edecek olursa hasarlı DNA replike olmakta ve genomda kalıcı mutasyonlar oluşmaktadır. p53 çok sayıda tümörde görülmesine rağmen etkisizleştirildiğinde DNA hasarı hücrede birikmektedir. p53'ün bir diğer işlevi de programlı bir hücre ölümü olan apoptozisin başlatılmasıdır. p53 bunu BAX (BCL2 ilişkili X geni) geninin transkripsiyonunu aktive ederek ve BCL2 (B hücreli lösemi/lenfoma protein2 geni) geninin transkripsiyonunu baskılayarak yapmaktadır. Kaspazlar ise apoptozisi başlatan ve hücre içi bileşenlerin sindiriminden sorumlu bir proteaz enzim ailesidir. Apoptozis embriyonik büyüme ve dokuların yeniden biçimlenmesi gibi fizyolojik ve Alzheimer, Parkinson gibi patolojik durumlarda görülmektedir. MYC apoptozisi uyaran, BCL2 inhibe eden onkogenlerdir. Pek çok kanser vakasında p53 geninin en az 100 şekilde mutasyona uğradığı görülmektedir.^{20,21,26}

RB1 (retinoblastoma1) diğer önemli tümör baskılayıcı genlerdendir. pRB de p53 proteini gibi hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasında görevi olan bir tümör baskılayıcı proteindir.^{21,26}

Tümörün ilerlemesi muhtemelen DNA onarım sistemlerindeki kusurlara, onkogen aktivasyonuna ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna bağlı oluşan tümör genomundaki kararsızlığı yansıtmaktadır.²⁰

2.3.Kolon, Meme, Mide ve Yumuşak Doku Kanserlerinin Özellikleri

2.3.1.Kolon Kanseri

Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü 2006 yılı verilerine göre Türkiye'de görülen kanser tipleri arasında kolon kanseri kadınlarda 13.2 insidansla 2.sırada, erkeklerde 17.3 insidansla 4.sırada yer almaktadır

(100,000 kişi içinde). Dünya Sağlık Örgütü GLOBOCAN 2008 (Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008) verilerine göre Dünya genelinde gelişmiş ölkelerde kadınlar arasında 24.2 (2.sırada), erkekler arasında 37.6 (3.sırada), az gelişmiş ölkelerde kadınlar arasında 9.4 (5.sırada), erkekler arasında 12.1 (4.sırada) insidans görölmektedir.

Kolon kanserinde malign tümörler metastaz yaptığında en çok karaciğer ve akciğerde tutulum göstermektedir.²⁷

Risk faktörleri arasında aile kanser öyküsü, sigara içme, 60 yaş üzerinde olma, cinsiyet, yüksek yağlı düşük lifli diyet, kilo artışı ve obezite, fiziksel aktivite yokluğu, sedanter yaşam, kentsel bölgede yaşama (kırsal bölgeye oranla daha fazla görölmektedir), adenomatoz polipler, inflamatuvar barsak hastalıkları (ölseratif kolit, Crohn hastalığı gibi), artmış anaerobik barsak florası, alkol bağımlılığı, pelvik radyoterapi yer almaktadır.²⁷⁻²⁹

FAP (ailesel adenomatoz polipozis), **HNPCC** (kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser) ve **MYH** (MutY homoloğu) gen mutasyonlarının, kolon kanserine yatkınlığı arttırdığı düşünölmektedir. FAP'ların çoğu **APC** (adenomatoz polipozis koli) gen mutasyonlarına bağlıdır. APC geni tümör supresör gendir ve kodladığı protein transkripsiyon faktörü β -katenin ile etkileşmektedir. FAP'ın ayrıca retinal pigment konjenital hipertrofisi, desmoid tümörler ve beyin tümörleri ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. HNPCC'nin de ayrıca endometriyum, over kanserleri, üst gastrointestinal kanserler ve renal pelvis/üreter kanserleri ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. MYH kromozomun kısa ucuna yerleşmiş baz eksizyon yenileme genidir. Bu gendeki mutasyonların kolorektal kanserlerle ilişkili olduğu düşünölmektedir.²⁷

2.3.2.Meme Kanseri

Kadınlarda en sık görülen kanser tiplerinden biridir. Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü 2006 yılı verilerine göre Türkiye’de görülen kanser tipleri arasında meme kanseri kadınlarda 39.1 insidansla (100,000 kişi içinde) 1.sırada yer almaktadır. Bununla beraber erkeklerde de 0.7 insidans görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü GLOBOCAN 2008 verilerine göre Dünya genelinde kadınlar arasında, gelişmiş ülkelerde 66.4 (1.sırada), az gelişmiş ülkelerde 27.3 (1.sırada) insidans görülmektedir.

Malign tümörler metastaz yaptığında kanserli hücreler meme dokusuna yakın lenf düğümlerinde görülmektedir. Meme kanseri ayrıca kemikler, karaciğer, akciğer ve beyin gibi vücudun farklı bölgelerinde metastaz yapmaktadır.^{30,31}

Risk faktörleri arasında 40 yaş üzerinde olma, birinci derece akrabalarda meme kanseri, meme dokusundaki belirgin değişiklikler, genetik değişiklikler [BRCA1 ve BRCA2 (meme kanseri duyarlılık geni1 ve 2) genlerindeki mutasyonlar], üreme ve menstrüel geçmiş (erken menarş, geç menopoza, çocuk doğurmamak veya ilk doğumu 30 yaşından sonra yapmak), torasik radyoterapi, meme dokusu yoğunluğu, dietilstilbesterol (DES) alımı, kilolu olma veya obezite, fiziksel aktivite kaybı, alkol alımı sayılmaktadır.²⁹⁻³³

BRCA1 ve **BRCA2** tümör supresör genlerdir. DNA hasar cevabında ve DNA onarımında yer almaktadır. Bu genlerde oluşan mutasyonlar meme kanseri duyarlılığını arttırmaktadır. BRCA1 ve BRCA2’nin meme kanseri dışında over, prostat, pankreas kanseri ve melanom ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. **PTEN** (fosfatase ve tensin

homoloğu), **p53**, **MLH1** (MutL homoloğu1), **MLH2** ve **STK11** (serin/treonin protein kinaz11) genlerindeki nadir görülen mutasyonlar da riski arttırabilen diğer genetik faktörlerdir.^{31,33}

2.3.3.Mide Kanseri

Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü 2006 yılı verilerine göre Türkiye’de görülen kanser tipleri arasında mide kanseri, kadınlarda 7.8 insidansla 6.sırada, erkeklerde 14.6 insidansla 5.sırada yer almaktadır (100,000 kişi içinde). Dünya Sağlık Örgütü GLOBOCAN 2008 verilerine göre Dünya genelinde gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında 7.3 (8.sırada), erkekler arasında 16.7 (4.sırada), az gelişmiş ülkelerde kadınlar arasında 10.0 (4.sırada), erkekler arasında 21.1 (2.sırada) insidans görülmektedir.

Malignan primer mide kanseri hücreleri başlangıçta midenin en iç tarafındaki mukoza tabakasında sınırlıdır. Ancak ilerlemeye bağlı olarak tümör hücreleri adım adım mide duvarının dış tabakalarına doğru infiltrate olmaktadır. İlerleyen evrelerde dalak, transvers kolon, karaciğer, pankreas, abdominal boşluk, over, akciğer, beyin gibi organlarda metastaz yapmaktadır.^{29,34,35}

Risk faktörleri arasında *Helicobacter pylori* ve Epstein-Barr virüs enfeksiyonu, genetik faktörler, aile kanser öyküsü, 55 yaş üstünde olma, tuzlu, füme, nitrit-nitratlı gıda tüketimi, sigara içme, kronik atrofik gastrit, ülser, ailesel adenomatoz polipozis, hipertrofik gastropati, gastrik polip, pernisiyöz anemi, düşük sosyoekonomik düzey ve obezite sayılmaktadır.³⁵⁻⁴⁰

HNPCC ve **E-kaderin** mutasyonu mide kanseriyle ilişkili olabilmektedir. **IL10** (interlökin10), **IL17**, **MUC1** (müsin protein1 geni), **MUC6**, **DNMT3 β** (DNA metiltransferaz 3 beta), **SMAD4** (Mad homoloğu protein4) ve **SERPINE1** [serin proteaz inhibitör (serpin) protein] genlerinin varyantlarının mide kanseri riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.^{35,37}

Mide malignansilerinin %90'ını adenokarsinomalar oluşturmaktadır. Mide lenfomaları %2-7 arasında bir orana sahipken geriye kalanları mide stromal sarkomalar oluşturmaktadır.³⁴

2.3.4.Yumuşak Doku Kanseri (Yumuşak Doku Sarkomu)

Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü 2006 yılı verilerine göre Türkiye'de görülen kanser tipleri arasında yumuşak doku kanseri, kadınlarda 1.8, erkeklerde 2 insidansla alt sıralarda yer almaktadır (100,000 kişi içinde).

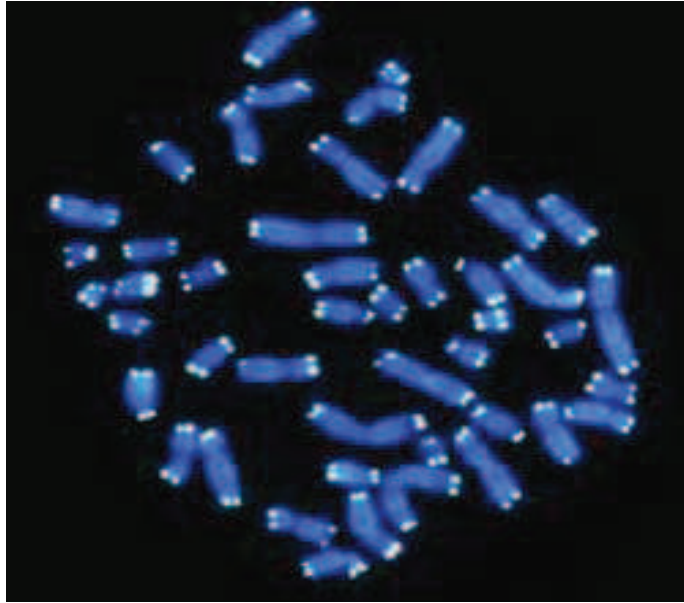
Genellikle ekstremitelerde (yaklaşık %45 oranında), abdominal bölgede görülmekle birlikte baş, boyun, gövde veya kalp gibi tüm vücut bölgelerinde de oluşabilmektedir. Yağ, kas, kıkırdak, bağ dokusu, damarlar ve diğer mezenkimal dokulardaki tüm malign tümörleri kapsamaktadır. Liposarkom, nörosarkom, anjiyosarkom, malign fibröz histiyositom ve leyomiyosarkom gibi histolojik alt tipleri bulunmaktadır. Yumuşak doku kanserinde çoğunlukla sporadik tümörler görülmektedir. Genetik veya çevresel risk faktörlerinin etkisi görülmemektedir. Bununla birlikte **nörofibromatozis1 (NF1)**, **herediter retinoblastoma** ve **Li-Fraumeni sendromu** ile sarkom gelişimi riskinin arttığı ile ilgili görüşler vardır. Ayrıca radyoterapi veya kemoterapinin kanser gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Yabancı cisimlere bağlı oluşan sekonder kronik

irritasyonlar da etken olabilmektedir. Ekstremit ve gövde sarkomları en çok akciğerde; karın ve karın zarı sarkomları akciğer ve karaciğerde metastaz yapmaktadır.^{41,42}

2.4.Telomer

2.4.1.Telomer Yapısı

Telomerler, ökaryotik hücre kromozomlarının her iki ucunda bulunan ve tüm canlılarda benzersiz $(5')(T_xG_y)_n$ tekrarlarını içeren, özelleşmiş, heterokromatin yapıda DNA dizileridir, x ve y genellikle 1-4 arasındadır (Şekil 1).^{1,2,3} Telomer zinciri, tamamlayıcı zincirinden daha uzundur ve 3' ucunda birkaç yüz nükleotit uzunluğunda tek zincirli bir DNA parçası bulunmaktadır.⁶



Şekil 1: İşaretlenmiş telomerler.⁴³

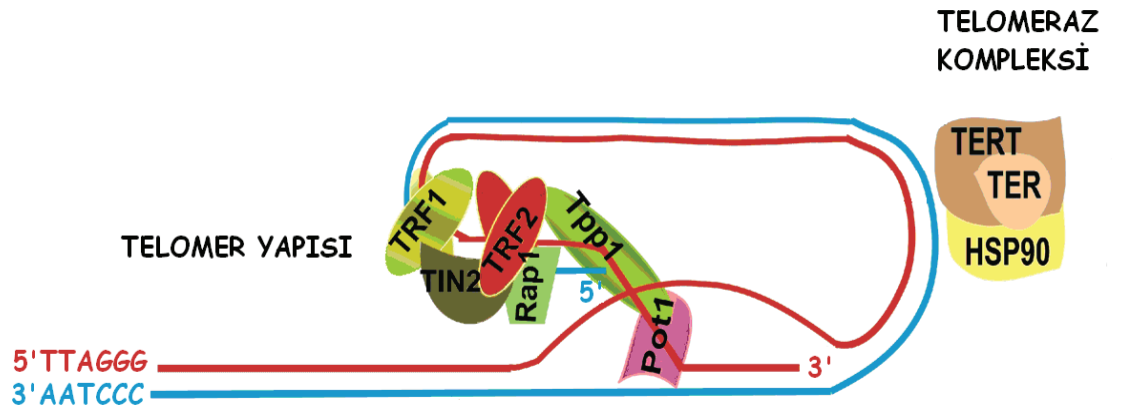
Telomer tekrar sayısı n, çoğu tek hücreli ökaryotun ve genellikle 1,500'ün üzerinde memelinin kromozomları için 20-100 arasındadır.³ Dolayısıyla telomer uzunluğu, bazı silli protozoalarda birkaç

düzine baz çiftinden, memelilerdeki onbinlerce baz çifti uzunluğuna kadar değişmektedir.⁶ İnsanda telomerler (5'-TTAGGG-3')_n tekrarlarını içermekte iken pek çok canlıda bu tekrarlar farklılık göstermektedir (Tablo 1).²

Tablo 1: Çeşitli canlılarda terminal tekrar dizileri.⁴⁴

Telomer Dizisi	Tür
TTTTGGGG	Euplotes (protozoa) Oxytricha (silli protozoa) Stylonychia (protozoa)
TTGGGG	Glaucoma (sincap cinsi) Tetrahymena (protozoa)
TTGGGG ve TTTGGG	Paramecium (silli protozoa) (terliksi hayvan)
TTTAGGG ve TTCAGGG	Plasmodium (protozoa) (sıtma etkeni)
TTAGGG	Trypanasoma brucei (protozoa) (uyku hastalığı etkeni) Podospora anserina (mantar) Fusarium oxysporum (maya) Neospora crassa (protozoa) Didymium iridis (civik mantar) Physarum polycephalum (civik mantar) Homo sapiens (insan) Mice (fare)
TAGGG	Giardia lamblia (protozoa) (ince barsak paraziti)
(TG) ₁₋₆ TG ₂₋₃	Saccharomyces cerevisiae (bira mayası)
TTACAG ₁₋₈	Schizosaccharomyces pombe (fisyon mayası)
TTAGGGGG	Cryptococcus neoformans (kapsüllü maya)
ACGGATGTCTAACTTCTTGGTGT	Candida albicans (maya)
AG ₁₋₈	Dictyostelium discoideum (küf mantarı)
TTAGGC	Ascaris lumbricoides (yuvarlak solucan)
TTGCA	Parascaris univalens (parazit)
TTAGG	Bombyx mori (ipek böceği)
HeT-A, TART (retroposons)	Drosophila melanogaster (sirke sineği)
TTTAGGG	Arabidopsis thaliana (brassicaceae familyası)
TT(T/A)AGGG	Lycopersicon esculentum (domates)
TTTTAGGG	Chlamydomonas reinhardtii (yeşil alg)

Art arda gelen tekrarlar, telomerik proteinler için pek çok bağlanma bölgesine sahip moleküler bir iskele oluşturmaktadır.⁴ Telomerlere bağlı, histon olmayan bu yapısal proteinlerin TTAGGG tekrarlarını bağlama ve **telozom** olarak da bilinen bir kompleks T ilmeği yapımını kolaylaştırma yetenekleri bulunmaktadır. Bu proteinler **TRF1** ve **TRF2** (telomerik tekrar bağlanma faktörleri 1 ve 2), **TIN2** (TRF1 etkileşimli nükleer protein2), **Rap1** (represör aktivatör protein1) ve **POT1** (telomerleri koruma proteini1)'dir. Artan kanıtlar TRF2 ve POT1'in, telomer bütünlüğünün korunmasında anahtar rol oynadığını göstermektedir (Şekil 2).⁵



Şekil 2: Telozom yapısında bulunan proteinler.⁵

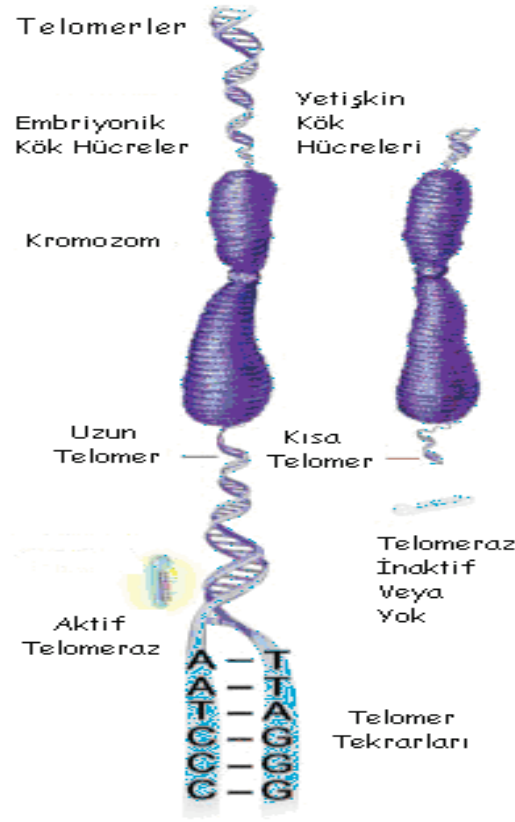
Telozomlar oluşurken telomerin tek zincirli ucu geriye doğru katlanmakta ve çift zincirli kısmındaki tamamlayıcı bölgeyle eşleşmektedir. Böylece telomerin tek zincirli 3' ucu, T ilmeğini oluşturarak çift zincirli DNA'yı sarmaktadır.⁶ Telozomlar, dolayısıyla telomerik baz dizileri, kromozomların 3' uçlarını çift zincir kırıklarından, eksonükleaz ve ligazlardan, DNA yıkımından, uç uca birleşmelerden, yeniden düzenlenmelerden ve kromozom kayıplarından koruyan bir başlık oluşturduğu gibi telomerik proteinler vasıtasıyla DNA replikasyonunda, DNA onarımında ve kromatin reorganizasyonunda aktif rol oynamaktadır.^{1,5}

2.4.2.Telomer Kısılması

Hücresel DNA polimerazlar doğrusal DNA sentezini 5'-3' yönünde gerçekleştirirken başlangıç için bir RNA primerine ihtiyaç duymaktadır.⁴⁵ Ancak doğrusal DNA molekülünün ucundaki kalıp bölgesi RNA primerinin bağlanması için yeterli uzunlukta değildir.⁶ DNA uçlarının kendini eşlemesi için gerekli özel bir mekanizma olmadığında genç ve bölünmekte olan somatik hücrelerde, her bir hücre bölünmesinde telomer boyu giderek kısalmaktadır.^{2,6}

Bugüne kadar incelenen bütün normal somatik hücrelerde TRFs (terminal restriksiyon fragmanları) analizleri, DNA polimerazın lineer DNA uçlarını replike etmedeki yetersizliği ile tutarlı olarak, kromozomların her hücre bölünmesinde telomerik dizisinin 50 ila 200 arasındaki nükleotidini kaybettiğini göstermiştir.^{1,7} Buna bağlı olarak zamanla hücre bölünmesi sona ermektedir.² Dolayısıyla hücre ve organizma yaşlanmasında temel nedenin bu telomerik kısalma olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 3).⁴⁵

Böyle DNA replikasyon-bağımlı telomer kısalması, hücresel yaşlanmada hücre bölünmesinin ve sinyalizasyonunun sayısını saymakta; dolayısıyla insan somatik hücrelerinin maksimum replikatif kapasitesinin belirlenmesinde bir mitotik saat olarak rol oynamaktadır.⁴⁷ Bunun tersine bugüne kadar incelenen ölümsüz hücrelerde, hücre bölünmesiyle net bir telomer kısalması veya sekans kaybı görülmemiştir. Dolayısıyla telomerlerin bakım ve onarımı hücrelerin replikatif yaşlanmadan kaçabilmesi ve süresiz çoğalması için gereklidir.⁷



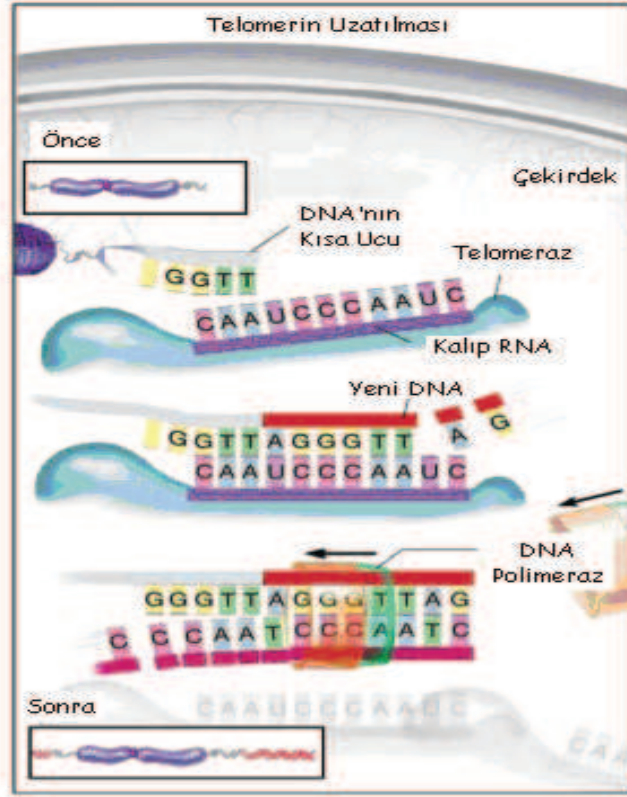
Şekil 3: Yetişkin kök hücrelerde telomer tekrarları kısalmıştır.⁴⁶

Bunun yanı sıra, telomer kısalması, hücrenin apoptozise geçmesini veya kromozomal kararsızlık oluşmasını da indükleyebilmektedir.⁴⁸

Telomer kısalmasına; uç replikasyon problemi, kalıp zincir degradasyonu ve tek zincir hasarları olmak üzere üç farklı mekanizmanın katkıda bulunduğu düşünülmektedir.¹

2.5.Telomerez Enzimi

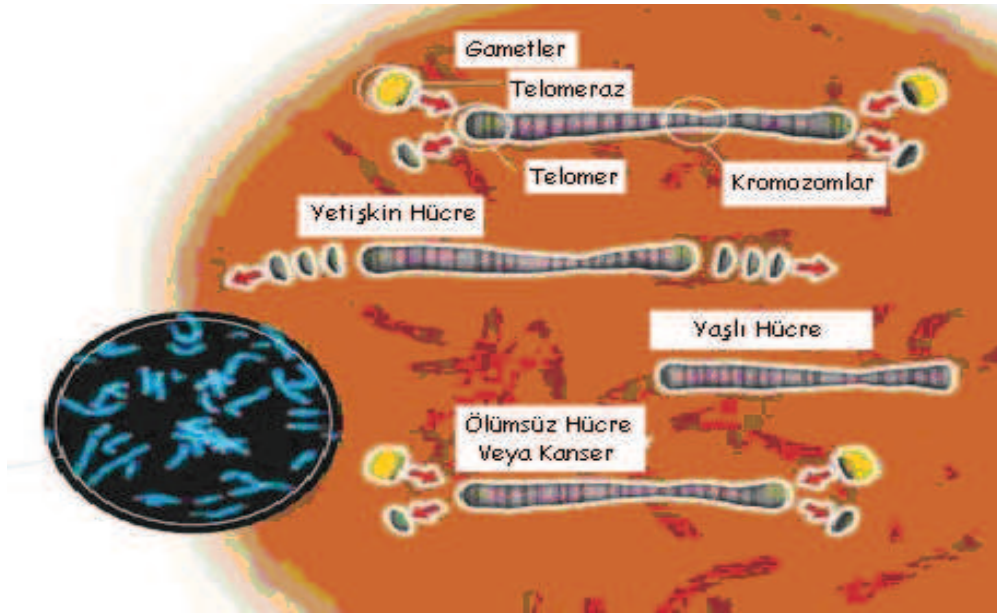
Telomerez ribonükleik asit-protein kompleksinden oluşan hücresel bir ters transkriptaz (RT)'dır ve telomer boyunun kontrolünden sorumludur.^{1,2} Telomerez enzimi sayesinde, her hücre bölünmesinde



Şekil 5: Telomerin telomeraz ve polimeraz tarafından uzatılması.⁴⁶

Pek çok çalışma yapılmasına karşın telomeraz aktivasyon ve regülasyonun mekanizması tespit edilememiştir. Ancak en önemli yolağın telomer uzunluğu ile ilişkili mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte telomeraz aktivasyonunun regülasyonu için telomer uzunluğu bağımlı mekanizma farklı hücre tiplerinde önemli veya spesifik olabilmektedir. Örneğin dinlenen lenfositlerde düşük telomeraz aktivitesi gözlenirken, hücre plazma membranında spesifik antijen ve mitojen reseptörlerinin stimülasyonu ile önemli derecede artmış telomeraz aktivitesi gözlenmektedir. Ayrıca normal insan derisinin yüksek düzeyde güneş ışığına maruziyetinde telomeraz aktivitesinin arttığı, insan hematopoetik hücrelerinin γ -ışını maruziyetinde veya insan kanser hücrelerinin x-ışını maruziyetinde telomeraz aktivitesinin indüklendiği gösterilmiştir.¹

Telomeraz aktivitesinin kanser hücrelerinde çoğunlukla ancak normal somatik hücrelerde nadiren saptanabildiği gösterilmiştir. Embriyogenez sonrası, çoğu somatik hücrede telomeraz aktivitesi kaybolmasına karşın hematopoetik kök hücreler, deri ve barsak epitel hücreleri, özofagus epiteli, gamet hücreleri, endometriyum hücreleri ve saç folikülleri gibi fizyolojik olarak kendini dikkate değer biçimde yenileyebilen somatik hücrelerde telomeraz aktivitesinin düşük de olsa varolduğu gösterilmiştir.¹ Bu da göstermektedir ki bu enzim, ister normal ister malign olsun yüksek üreme hızı gösteren hücrelerde etkindir (Şekil 6).⁸



Şekil 6: Telomeraz yüksek üreme hızı olan hücrelerde etkindir.⁵⁰

Sonuç olarak düşük telomeraz aktivitesi gösteren normal hücrelerde telomerik tekrarlar korunmakta, böylece hücreler kendini yenileyebilmektedir.⁴ Telomeraz aktivitesinin eksik olduğu somatik hücrelerde ise her hücre bölünmesinde telomerler kısalmaktadır.^{6,51} Telomeraz ters transkriptazı insan somatik hücrelerine in vitro olarak sokulduğunda telomeraz aktivitesi yenilenmekte ve hücresel yaşam süresi dikkate değer biçimde artmaktadır.⁶

2.6.Telomerazın Kanslerle İlişkisi

Tümör hücrelerinin ölümsüzlüğü ve karsinogenez süreci için telomeraz aktivitesi gereklidir.² İnsan kanserlerinde telomeraz, fonksiyonel telomerlerin korunmasına yardım ederek tümör proliferasyonunu artırma görevi üstlendiği yerlerde up-regüle olmaktadır.⁹

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemlerinin gelişimine bağlı olarak artan çalışmalarda pek çok tümör grubunda telomeraz aktivitesi araştırılmış ve %85 oranında pozitiflik saptanmıştır.⁸

Çoğu insan kanser hücresinde telomeraz aktivitesinin bulunması ve telomeraz aktivitesinin kanserin ilerlemesine uygun bir şekilde artış göstermesi; bu enzimin hem kanser tanısı için diagnostik, hem de tümör seyrinin takibi için prognostik bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.^{2,9} Telomeraz enzim aktivitesinin hematolojik malignansi, beyin tümörleri, primer akciğer kanseri, hepatoselüler kanser, mide kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri, meme kanseri, serviks kanseri, endometriyal kanser, over kanseri ve mesane kanserinde arttığı belirlenmiştir.^{2,8}

Telomer fonksiyonu telomeraz aktivitesinin yanısıra telomer uzunluğunun ölçülmesi ile de değerlendirilebilmektedir.⁴⁸ Kromozom TRFs analizi, bir hücre popülasyonundaki tüm telomerlerin karma uzunluklarını vermektedir. Telomeraz aktivitesi ise TERT'in oligonükleotit primerleri üzerine telomerik tekrarları sentezlediği bir primer uzatma analizi olan PCR ile in vitro olarak ölçülebilmektedir.⁷

Karsinogeneze katkıda bulunan farklı moleküler faktörler arasında telomer disfonksiyonu (kısalmış telomerler) genetik kararsızlıkla

ilgili erken uyarı olarak ortaya çıkmaktadır. Gerçekten de genetik bütünlük, kısmen telomerlerin yapısal şekliyle korunmaktadır. Ancak telomerler her hücre replikasyon döngüsüyle birlikte kısaltıldıkça, bu genetik bütünlük de giderek kaybolmaktadır.⁴⁸

2.7.Telomeraz Enzim Kompleksi Bileşenleri

Telomeraz 3 esansiyel bileşenden oluşmaktadır: **TERT** (telomeraz ters transkriptaz), **TERC** (telomeraz RNA komponenti) ve TERC bağlı protein **diskerin**.¹⁰

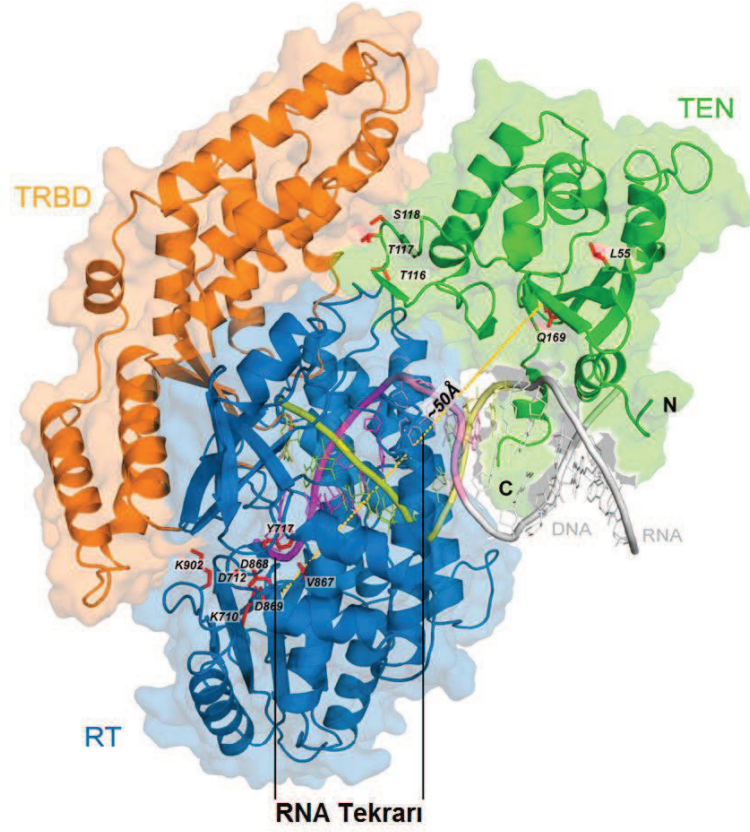
2.7.1.TERC

TER, TR, hTR, TRC3, DKCA1, SCARNA19 isimleriyle de tanımlanmıştır.⁵² Başlangıç telomer replikasyonu için kalıp olarak kullanılan bir snoRNA (küçük nükleolar RNA)'dır.⁵³ Telomerazın taşıdığı RNA bileşeni yaklaşık 451 nükleotit uzunluğundadır ve telomeraz RNA'sı telomer DNA tekrarının yaklaşık 1.5 katı kadar olan komplementer C_YA_X tekrarlarını kullanarak telomer DNA tek zincirini sentezlemektedir.^{2,6,52} TERC, korunmuş RT homolog bölgelerinin dışındaki TERT bölgelerine yüksek afinitede bağlanmaktadır.⁴

2.7.2.TERT

EST2, TCS1, TRT isimleriyle de tanımlanmıştır.⁵⁴ Telomeraz aktivitesinin hız kısıtlayıcı faktörüdür.⁵⁵ Hücrede nükleolusta, nükleoplazmada ve telomerlerde bulunmaktadır.⁵⁴ Telomerazın katalitik protein subüniti olan TERT, kendi RT bölgesinin dışındaki korunmuş bölgeleri içeren oldukça büyük bir yapıya sahip selüler bir

ribonükleoproteindir (RNP).⁴ İnsanlarda TERT 1,132 amino asitlik, 127 kDa'luk bir proteindir.⁴⁷ TERT protein yapısı Şekil 7 'de görülmektedir.



Şekil 7: İnsan telomeraz ribonükleoprotein kompleksinin kısmi yapısı. RT: Katalitik ters transkriptaz bölgesi, TRBD: RNA bağlayıcı bölge, TEN: N-terminal “çapa” bölgesi. RNA tekrarı olarak etiketlenen yapı TERC RNA zincirini göstermektedir (sarı). Mor renkli şerit ise komplementer DNA zincirini göstermektedir.⁵⁶

2.7.3.Diskerin

RNA-bağlayıcı bir protein olan disklerin, TERC yapısının ve diskleratozis konjenitanın (DK) analiz edilmesi, ardından üçüncü telomeraz komponentinin belirlenmesiyle keşfedilmiştir.⁹

Bir kemik iliği yetmezliği sendromu olan DK'nın X bağlantılı formu olan hastalarda diskerin mutasyonu, TERC düzeylerinde önemli bir azalmaya, azalmış telomeraz aktivitesine ve oldukça kısa telomerlere neden olmaktadır.^{9,53} Telomer disfonksiyonu muhtemelen; kan, deri, akciğer ve oral mukoza gibi kendini yenileyebilen dokularda, çoklu ciddi defektlerin bulunduğu DK fenotipinin temelini oluşturmaktadır. DK'nın otozomal dominant formları, bu hastalıkta bozulmuş telomeraz fonksiyonu için santral rolü olması ile tutarlı olarak, TERT ve TERC mutasyonları ile bağlantılıdır.⁹

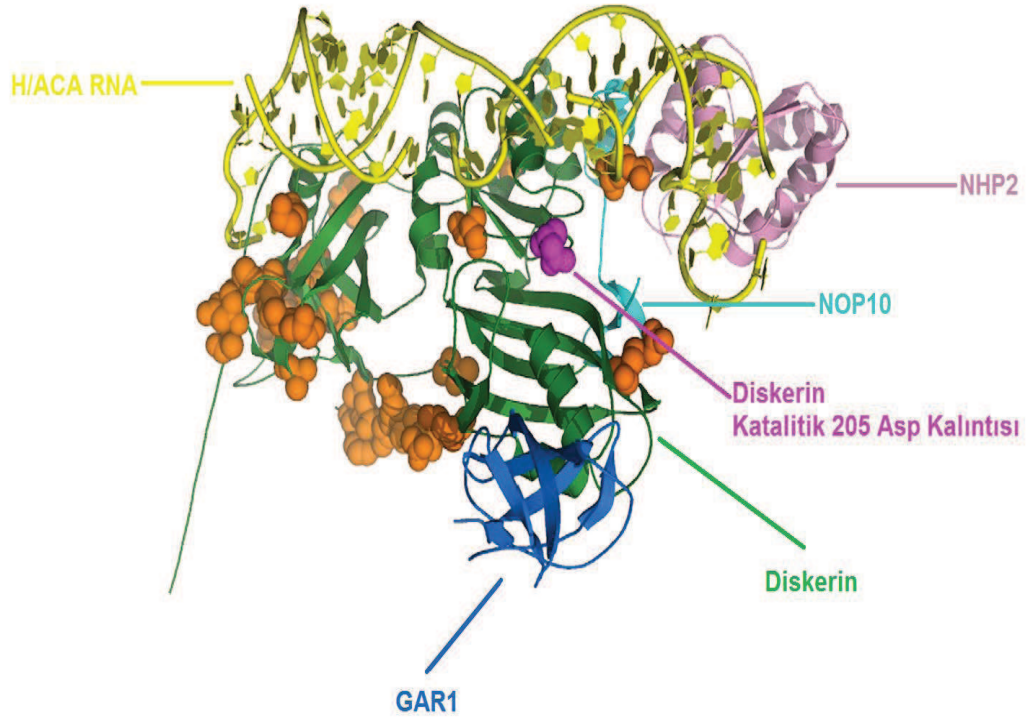
Diskerin, telomer stabilitesi ve sürdürülebilirliğine katkıda bulunmak üzere ve telomeraz kompleksinin tam aktivite göstermesi için, 3' bölgesinde H/ACA motifi sergileyen, kompleks yapısı içinde bulunan TERC ile birleşen bir proteindir.^{18,53,57}

Nükleolar multifonksiyonel bir protein olan diskerin, DKC1 geni tarafından kodlanmaktadır ve 58 kDa'dur. Çok çeşitli biyolojik proseslerle ilişkili olmasına rağmen, DKC1 geni moleküler seviyede ayrıntılı olarak karakterize edilmemiştir ve şimdiye kadar, tek temel transkript olan nükleolar diskerin tanımlanmıştır.⁵⁷

Diskerin en az iki farklı fonksiyonel kompleksin içinde yer almaktadır: Aktif telomeraz kompleksi ve rRNA (ribozomal RNA) işleme ve psödouridilasyon işlemine katılan H/ACA snoRNP (küçük nükleolar ribonükleoprotein) kompleksleri.^{17,53,57,58}

RNA modifikasyonuna katılan H/ACA snoRNP'ler içinde diskerin, NOP10 (küçük nükleolar ribonükleoprotein homoloğu10), NHP2 (histon olmayan kromozom proteini2), GAR1 (H/ACA küçük nükleolar RNP komponenti) proteinleri ve snoRNA molekülü içindeki H/ACA motifi ile

birleşmekte, uridin rezidülerinin psödouridine çevrilmesine katkıda bulunarak katalitik psödouridin sentaz olarak etki etmektedir (Şekil 8).^{17,57}



Şekil 8: Bir snoRNP partikülü içinde insan disklerin modeli.⁵⁹

Uridinlerin psödouridinlere izomerizasyonu, ökaryotik hücrelerde en çok gerçekleşen RNA modifikasyonlarından biridir. rRNA psödouridilasyonun en büyük hedefini temsil etmesine rağmen, splisozomalRNA [snRNA (küçük nükleer RNA) ve protein subünitinden oluşan bir kompleks] ve tRNA (taşıyıcı RNA) gibi başka RNA'lar da bu modifikasyonlara maruz kalabilmektedir. Spesifik fonksiyonunun belirlenmesi zor olsa da, psödouridilasyonun RNA moleküllerinin stabilite, katlanma ve fonksiyonelliğini etkilediğine inanılmaktadır.⁵⁷ Katalitik rolünün ötesinde disklerin, kodlama yapmayan H/ACA snoRNA'lara bağlanarak onları stabilize etmektedir.^{53,57}

2.8.AAA⁺ Süperailisi ATPazları

Hücrede kimyasal enerjinin biyolojik olaylara dönüşümünde veya farklı selüler aktivitelerde ATPaz veya NTPazların kritik önemi vardır. En yaygın olarak bulunan NTPazlar, NTP (nükleotit trifosfat) bağlama ve hidrolizde yer alan Walker A ve B motiflerinden isim alan Walker tipi NTPazlardır.^{60,61}

AAA proteinleri (ATPases associated with diverse cellular activities-çeşitli hücrel aktivite ilişkili ATPazlar) Walker tipi NTPazların alt familyasını oluşturmaktadır ve AAA modülü veya kaseti olarak adlandırılan 200-250 aminoasit kalıntısından oluşan ATPaz bölgesi içermektedir. AAA ATPazlarının çoğu enerji-bağımlı bir şekilde protein katlanması ve açılması, protein komplekslerinin kurulması ve ayrılması, membran füzyonu aracılığıyla protein transportu, nükleik asitlerin yeniden modellenmesiyle hedef makromoleküllerin çözülmesi ve birbirinden ayrılması gibi proseslere katılmaktadır.^{61,62}

Son zamanlarda klasik AAA ailesini de kapsayan daha geniş bir AAA⁺ süperailisi önerilmiştir.⁶¹ Kristallografik çalışmalar AAA⁺ üyelerinin benzer sekans ve yapıya sahip olduğunu göstermektedir.^{61,63} Klasik AAA ailesi üyeleri, SRH (ikinci homoloji bölgesi) olarak anılan spesifik bir motif veya Walker A ve B motiflerine ek olarak ortak AAA modülü içermesiyle ayırt edilebilmesine rağmen, AAA ile AAA⁺ gösterimleri birbirlerinin yerine kullanılabilir. Pek çok AAA⁺ proteini AAA proteinlerine benzer şekilde fonksiyon göstermesine karşın diğer AAA⁺ proteinleri DNA replikasyonunda, rekombinasyonda, onarımda ve transkripsiyonda yer almaktadır.⁶¹

AAA⁺ proteinleri korunmuş ATP bağlayıcı ve hidroliz bölgesi içermekte ve oligomerik yapıların kurulumuyla aktive edilmektedir. ATP bağlanması ve hidrolizi, hedef substratların translokasyonu veya yeniden modelleme aktiviteleri için gerekli olan konformasyonel değişiklikleri indüklemektedir.⁶² Bu proteinlerden bir kısmı ATP bağlasa bile ATPaz aktivitesi göstermemekte, ATPaz aktivitesi göstermesi için bu ailenin diğer üyeleriyle kompleks oluşturmak zorundadır.⁶³

AAA⁺ proteinlerinin birçok sınıfı bulunmaktadır. Bunlar; ATP-bağımlı proteazlar, membran füzyon proteinleri, Pex1p (peroksin1p) ve Pex6p, katanin ve SKD1/Vps4p (K⁺ transport defekt baskılayıcı/vakuoler protein ayırma-ilişkili protein 4p), dinein, DNA replikasyon proteinleri, RuvB (Holliday kavşağı DNA helikazı) proteinleridir.⁶¹

2.8.1. Telomeraz ile Kompleks Oluşturan AAA⁺ ATPaz Proteinleri

Pek çok genin transkripsiyonu, koordineli olarak transkripsiyonel kofaktörler ve kromatin-yeniden modelleme kompleksleri tarafından düzenlenmektedir.¹⁰

Kromatin yeniden modelleme kompleksleri kromatin yapısını ve proteinlerin DNA'ya girişini düzenlemektedir.⁶⁰ Kromatin değişen derecelerde DNA ve histon modifikasyonları taşıdığından ve bu modifikasyonların bazıları transkripsiyonel regülasyonla ortak yürütüldüğünden, epigenetik durumu ayarlayan kromatin-modifiye edici proteinlere odaklanılmaya başlanmıştır.¹⁰ Bu proteinlerden ikisi olan pontin ve reptin ile telomeraz enzim kompleksinin yapısına katılan TERT ve diskerin bu çalışmanın temel konusunu oluşturmaktadır.

Pontin ve reptin, ilk olarak TATA-bağlayıcı protein (TBP) ve 50'den fazla komponent içeren, protein kodlayan genlerin transkripsiyonundan sorumlu, büyük RNA polimeraz II holoenzim kompleksi ile etkileştiğinde bulunmuştur.⁶⁰ Daha sonradan pontin ve reptin, β -katenin proteini, transkripsiyon faktörleri c-Myc; sadece pontin E2F1 (E2F transkripsiyon faktörü1); sadece reptin ATF2 (aktif edici transkripsiyon faktörü2) ve snoRNA kompleksleriyle fiziksel etkileşimleri yoluyla tanımlanmıştır.^{9,60}

Venteicher ve arkadaşları, HeLa hücrelerinden (Henrietta Lacks ölümsüz tümör hücreleri) TERT kompleksinin saflaştırılmasını başarmışlar, pontin ve reptin ATPazlarını telomeraz komponenti olarak tanımlamışlardır.¹⁰

SUMO (küçük ubiquitin benzeri modifiye edici) modifiye edici enzimler pontin ve reptin-içeren komplekslerden elde edilmektedir. Pontin ve reptinin SUMO modifikasyonları transkripsiyonel aktivitelerini ve protein-protein etkileşimlerini düzenlemektedir. Bundan dolayı; pontin ve reptinin çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlarının, telomeraz etkisinin karmaşık modülasyonuna (örneğin telomer uzunluğunun epigenetik regülasyonu) katıldığı tahmin edilmektedir. SUMOilasyon, ubiquitinasyon ve metilasyon gibi potansiyel düzenleyici mekanizmaların, sinyal yollarıyla bağlantılı olarak pontin ve reptin fonksiyonları arasında düzenleyici ve/veya anahtar olabileceği düşünülmektedir.¹⁰

2.8.1.1.Pontin

Pontin; Ruvbl1 (RuvB benzeri protein), RuvBL1, Rvb1, Tip49 (TBP-etkileşimli protein 49kDa), Tip49a, ECP54 (eritrosit sitozolik protein 54kDa), NMP238 (nükleer matriks proteini238), TIH1 (Saccharomyces

cerevisiae), TAP54 α (TIP60-ilişkili protein 54 alfa) (metazoa) ve pontin 52 isimleriyle de tanımlanan helikaz AAA⁺ ATPazıdır.^{10,60,64,65}

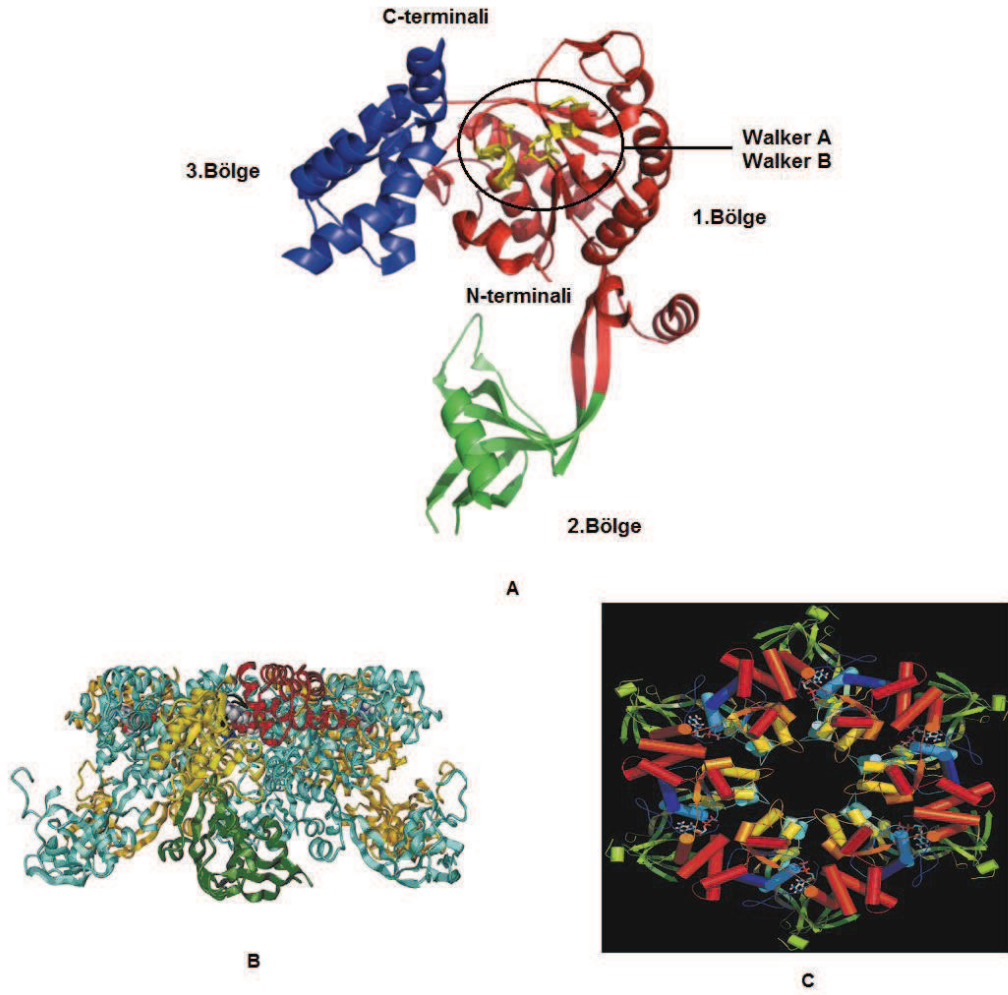
Pontin homolog rekombinasyonunda veya ilerlemesi durmuş replikasyon çatalının onarımında fonksiyon göstermektedir.⁶⁴ Keza pontin ve reptinle sınırlı homoloji gösteren bakteriyel helikaz RuvB de homolog rekombinasyonu veya geciken replikasyon çatalının onarımı esnasında oluşan Holliday kavşaklarındaki zincir göçünü katalize etmektedir.⁶⁶

Pontin başlıca nükleusta lokalizedir ancak aynı zamanda sitozolde de bulunmuştur.⁶⁰ Bununla birlikte pontin ve reptinin sitoplazmadaki multimerik durumu çok iyi tanımlanmamıştır. Pontin ve reptinin hücre bölünmesi devam ederken farklı subselüler lokasyonlarda bulunduğu dair bilgiler bulunmaktadır. Bu iki proteinin bilinen bütün fonksiyonları nükleer lokalizasyonla tutarlıdır, keza her iki protein de çeşitli organizmalardan alınan pek çok farklı hücre tipinde nükleusta lokalizedir. Diğer taraftan mitoz esnasında farklı lokasyonlarda bulunabilirlerse de hem pontin hem de reptin mitotik aygıtla birleşmiş olarak da bulunabilmektedir. Dolayısıyla bu süreç boyunca kendi nükleer fonksiyonlarından farklı olarak farklı roller oynayabilmektedirler.⁶⁵

Pontin 456 amino asitten oluşmaktadır.⁶⁰ İn vitro koşullarda heksamerik veya duble heksamerik (dodekamerik) halka sistemini oluşturmaktadır.⁶⁵

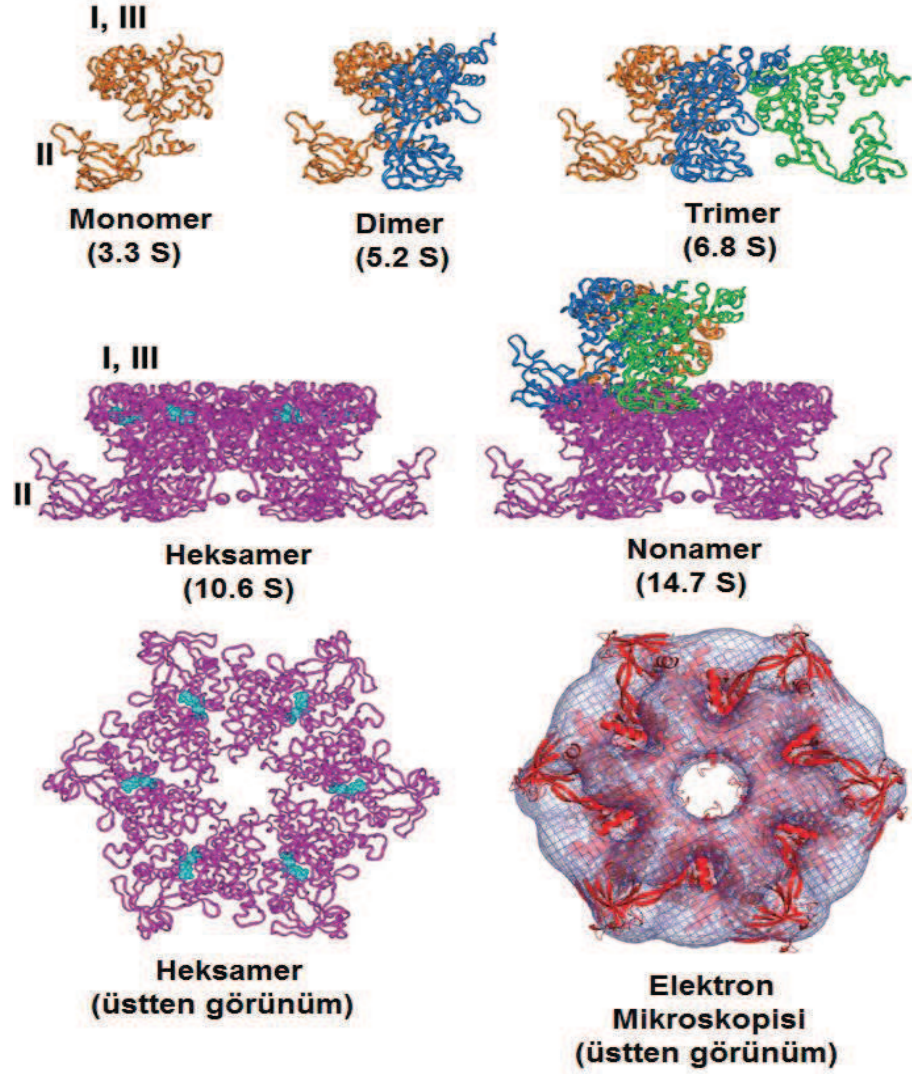
Pontin üç farklı bölgeden oluşmaktadır.⁶⁶ 1.Bölge (amino asit 1-120 ve 296-365) ve 3.bölge (amino asit 368-456), ATP bağlanmasında ve hidrolizinde görev almakta, bakteriyel RuvB ve diğer AAA⁺ helikazlarda da bulunmaktadır.⁶⁶⁻⁶⁸ 1.Bölge, P-ilmeği $\alpha\beta\alpha$ nükleotit bağlayıcı çekirdek bölgesini içermekte ve 5 zincirli α -heliksler arasında β -plili yapısından

oluşmaktadır. 3.Bölge ise diğer AAA⁺ proteinlerle benzer şekilde katlanma yapmakta ve α -heliks demetlerinden oluşmaktadır.⁶³ 2.Bölge (amino asit 121-295) pontine spesifiktir ve DNA/RNA bağlayıcı görevi vardır.^{63,66,67} Şekil 9'da pontinin monomer ve heksamer yapıları görülmektedir.



Şekil 9: Pontinin monomer ve heksamer yapıları. (A) ADP'ye bağlı pontin monomerinin şeritsel gösterimi. (B) Pontin heksamerinin şeritsel gösterimi (yandan görünüm). Bitişik monomerler mavi ve sarı olarak gösterilmiştir. (C) Pontin heksamerinin farklı gösterimi (üstten görünüm). Herbir zincir farklı N-terminalinden (kırmızı) C-terminaline (mavi) kadar çeşitli renklerle gösterilmiştir.^{66,69}

Şekil 10'da pontinin çeşitli oligomer yapıları ve elektron mikroskopisi haritası gösterilmektedir.



Şekil 10: Pontin monomeri ve monomerlerin oluşturduğu çeşitli oligomerik pontin formları. Her modelden tahmin edilen sedimentasyon katsayısı parantez içinde gösterilmiştir. Mavi renkte görülenler heksamer yapısına bağlı 6 adet ADP molekülünü temsil etmektedir.⁷⁰

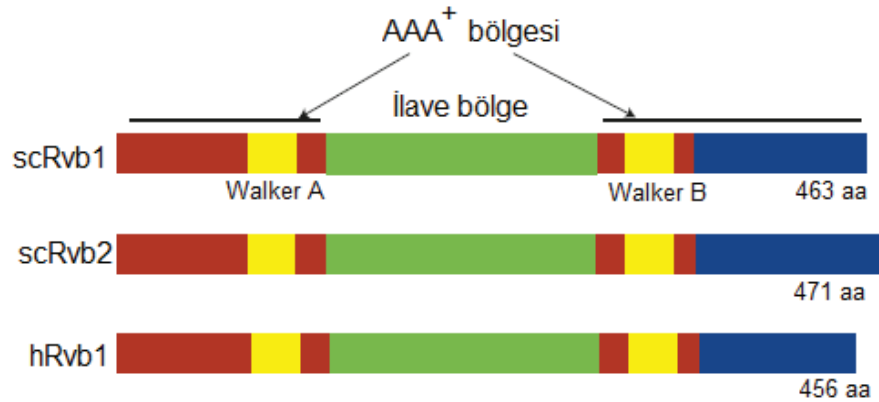
2.8.1.2.Reptin

Reptin, Ruvbl2, RuvBL2, Rvb2, Tip48 (TBP-etkileşimli protein 48kDa), Tip49b, ECP51 (eritrosit sitozolik protein 51kDa), CGI-46 (metazoa), TIH2 (*Saccharomyces cerevisiae*), TAP54 β (TIP60-ilişkili protein 54 beta) ve reptin52 isimleriyle de tanımlanan helikaz AAA⁺ ATPazıdır.^{10,60,64,65} Homolog rekombinasyonunda veya geciken replikasyon çatalının onarımında pontin ile birlikte fonksiyon göstermektedir.⁶⁴

Reptin başlıca nükleusta lokalizedir ancak aynı zamanda sitozolde de bulunmuştur.⁶⁰

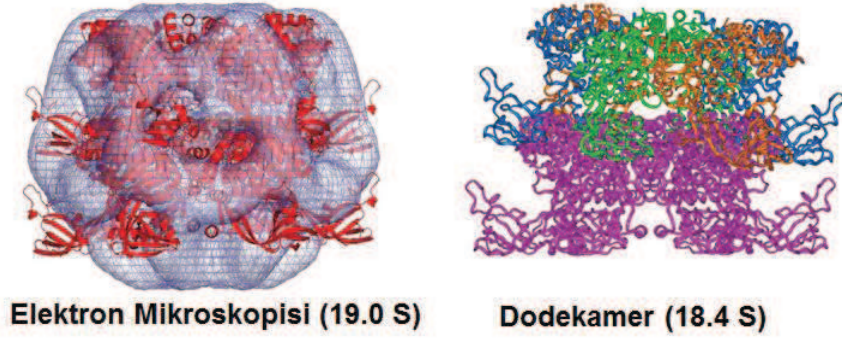
Reptin, 463 amino asitten oluşmaktadır. Pontin ile %43 özdeşir ve nükleotit dizisi %65 benzerlik göstermektedir.⁶⁰ İn vitro koşullarda pontin gibi heksamerik veya duble heksamerik halka sistemini oluşturmaktadır.⁶⁵

Reptinde, pontinde olduğu gibi $\alpha\beta\alpha$ altbölgesi bulunmaktadır. Şekil 11’de bu bölge kırmızı, Walker A ve B bölgeleri sarı ile gösterilmiştir.



Şekil 11: *Saccharomyces cerevisiae*'de pontin ve reptinin insanda pontinle kıyaslanması.⁶⁹

Reptinin katlanmış yapısı henüz belirlenmemiştir ancak pontin-reptin karışımı oligomerler elektron mikroskopisi ile analiz edilmiştir. Pontin ve reptin, farklı şekillenmiş, her ikisi de pontin heksamerlerinden farklı görünen, sıralanmış iki heksamer içeren bir dodekamer yapı oluşturmaktadır. Dodekamerler pontin ve reptinin eşit miktarlarından oluşmasına rağmen, heksamerlerden birinin yalnızca reptin, diğerinin yalnızca pontin içerip içermediği veya her iki heksamerin de eşit miktarda pontin ve reptin içerip içermediği kesinleşmemiştir.⁶⁶ Bununla birlikte pontin ve reptin dodekamerik yapı oluştursa bile, bu yapının kısmi olarak pontince zengin tek bir heksamer yapısına ayrılabilirdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak pontin ve reptin monomer, homo veya hetero heksamer ve genellikle de 2 homo heksamerden oluşmuş dodekamer yapılarında bulunabilmektedir.⁶⁷ Şekil 12’de pontin-reptin kompleksinin elektron mikroskopisi haritası ve dodekamer yapısı gösterilmiştir.



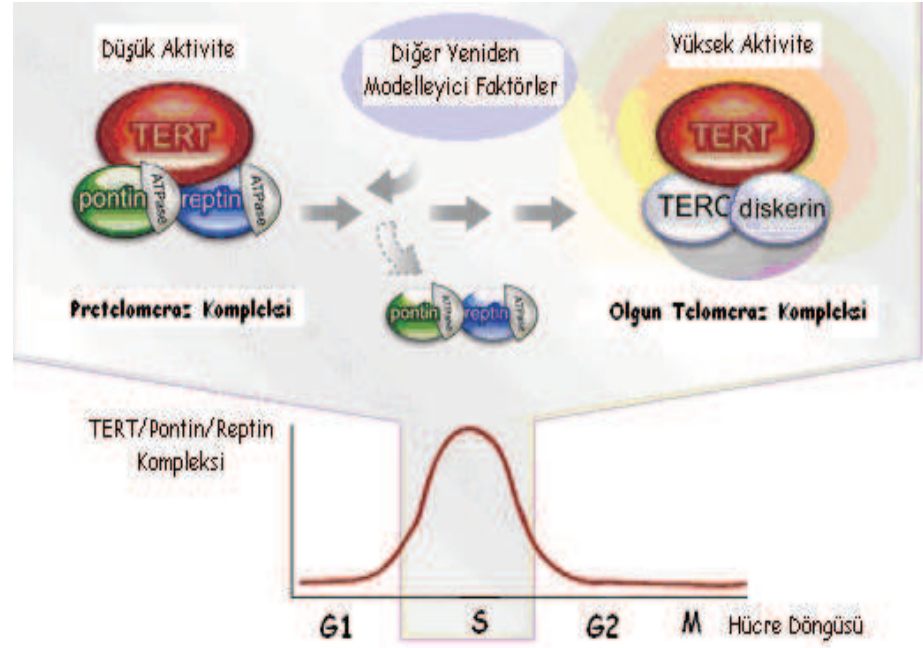
Şekil 12: Pontin-reptin dodekamer yapısı. Dodekamer kafa-kuyruk modeli için üst üste binmiş pontin-reptin kompleksinin elektron mikroskopisi haritası gösterilmiştir.⁷⁰

2.9.TERT, Pontin, Reptin ve Diskerin İlişkisi

TERC düzeylerinin sürdürülmesinde pontin, reptin ve diskerinin benzer şekilde gerekli olması bu proteinler arasında fonksiyonel bir ilişki olduğunu akla getirmektedir.⁹

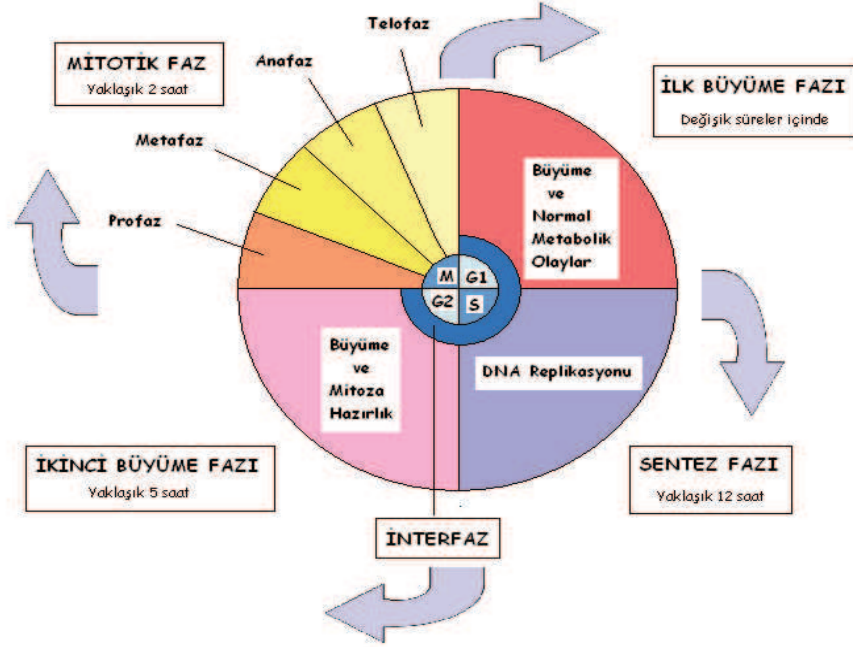
Telomeraz kompleksinde pontin ve reptinin rollerine göz attığımızda ilk olarak, pontin ve reptin; telomeraz komponentleri olan TERT ve diskerin ile etkileşmektedir. İkinci olarak pontin ve reptin, yeni bir TERT içeren kompleks oluşturmaktadır.¹⁰ Bu TERT-pontin-reptin kompleksi hücre döngüsünün her S fazı esnasında pik yapmaktadır.⁹ Bu da TERT komplekslerinin dinamik olduğunu, pontin ile reptinin döngüsel telomeraz kuruluşunda yer aldığını ve kompleksin en az iki farklı formda bulunduğunu düşündürmektedir.^{9,10}

Bu formlardan biri düşük telomeraz katalitik aktiviteye sahip ***TERT-pontin-reptin kompleksi (pretelomeraz kompleksi)***, diğeri ise yüksek enzimatik aktiviteye sahip ***TERT-TERC-diskerin kompleks (olgun telomeraz kompleksi) formudur.***¹⁰ Pretelomeraz yapının kurulmasının ardından pontin ve reptin TERT-TERC-diskerin kompleksinden ayrılmaktadır ve TERT-pontin-reptin kompleksi, TERT-TERC-diskerin kompleksine dönüşmektedir (Şekil 13).^{9,10}



Şekil 13: TERT kompleks yapıları. Pontin ve reptin, S fazına spesifik biçimde telomerez komplekslerini kurmak veya yeniden modellemek üzere TERT ile etkileşmektedir.¹⁰

TERT-pontin-reptin kompleksi ortamda TERT-TERC-diskerin kompleksine göre daha fazla bulunmaktadır. Bunun nedeni; TERT-pontin-reptin kompleksinin oluşması için belli bir zaman gerekmesi veya bu kompleksin regülasyon için hedef olması gibi olasılıklardır. Bu düşünce ile tutarlı olarak TERT'in pontin ve reptin ile birleşmesi önemli ölçüde hücre döngüsüne bağımlıdır; S fazında oldukça yüksek görülürken G2, M ve G1 fazlarında azalmaktadır. TERT ve pontin/reptin birleşmesinin S fazına bağımlı olması telomerez kompleksinin her S fazı esnasında de novo oluştuğu düşüncesini uyandırmaktadır.⁹ Şekil 14'te hücre döngüsü görülmektedir.



Şekil 14: Hücre döngüsü.

2.10.Pontin, Reptin ve Diskerinin Kanserdeki Roller

Pontin ve reptin ekspresyonunun pek çok kanser tipinde arttığı düşünülmektedir.⁶⁵ Pontin ve reptinin etkileştiği çok sayıda molekülün kanserde rolü olduğu bilinmektedir.^{65,67}

İlk ipucu pontin, reptin ve kanser arasındaki ilişkinin; yani bu iki proteinin β -katenin ve c-Myc ile etkileştiğinin keşfedilmesiyle elde edilmiştir.⁶⁵ β -katenin ve c-Myc özellikle karaciğer karsinogenezinde anahtar rol oynamaktadır.¹⁵ Bunun dışında her iki proteinin ekspresyonu c-Myc tarafından regüle edilmektedir.⁶⁵ Transkripsiyon faktörleri arasında onkogenik potansiyeli ile c-MYC, insan kanserlerindeki mutasyonların en sık tekrarlanan bölgelerinden biridir.⁶⁰

Hücre proliferasyonunun regülasyonundaki rollerinin yanında pontin ve reptin, apoptozis regülasyonunda da yer almaktadır. Pontin ve reptin hücre proliferasyonunu desteklerken apoptozisi inhibe etmektedir. İn vitro koşullarda pontin ve reptinin azalmış ekspresyonu, tümör hücrelerinin büyümesinde azalma ve apoptoziste artma ile sonuçlanmaktadır.⁶⁵

Moleküler düzeyde antagonistik etki ediyor görünse de, her iki protein de tümör gelişimine yol açan olaylarda yer almaktadır.⁶⁵

Diskerinin tümör oluşumuna katkıda bulunması için hangi spesifik fonksiyonunun bozulmuş olabileceği açık değildir. Telomeraz fonksiyonunun yokluğu, kansere yatkınlığın artmasına neden olabilmektedir.¹⁷

Bütün bu varsayımların yanı sıra her üç proteinin de, kanserle ilgisi bulunan telomeraz kompleksiyle ilişkili olması bu proteinlerin de kanserle ilgisi olduğunu akla getirmektedir.

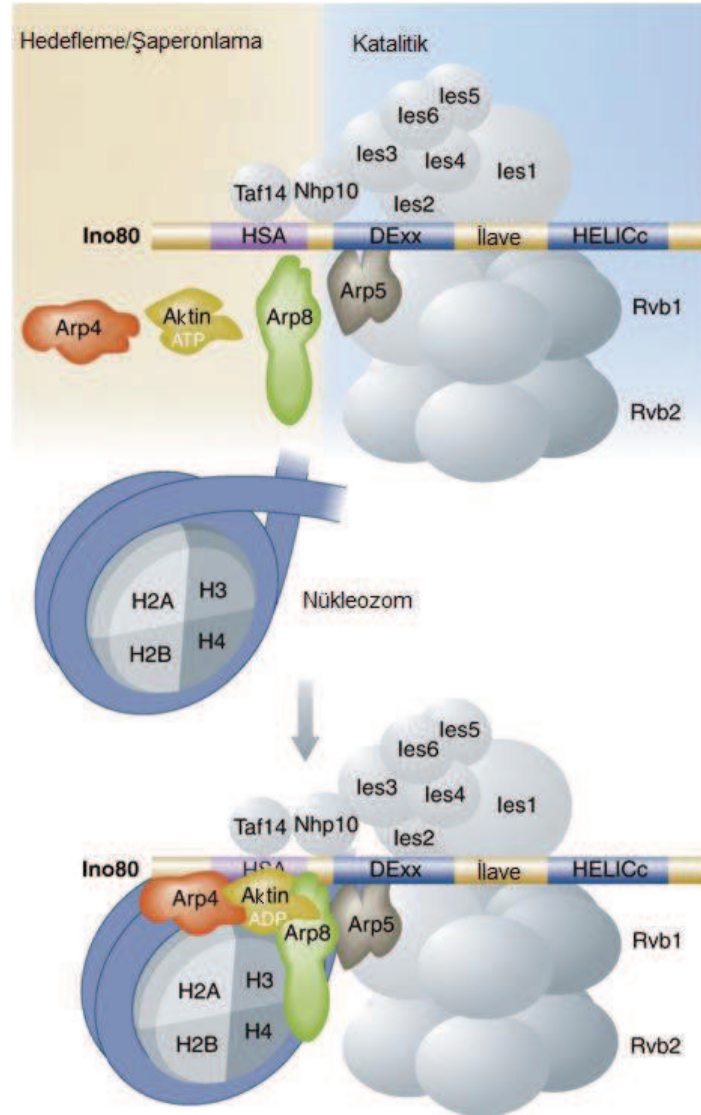
2.11.Pontin ve Reptinin Yer Aldığı Hücresel Yolaklar

Pontin ve reptin pek çok hücresel yolağa katılmaktadır. Bunlar transkripsiyon aktivasyonu ve baskılanması, DNA hasar cevabı, snoRNP kurulumu, hücresel transformasyon, metastaz, apoptozis, DNA replikasyonu, mitoz, büyüme, Uri (alışılmadık prefoldin Rpb5 etkileşimli protein)/prefoldin kompleksleri bilinen bu yolaklardan bazılarıdır.⁶⁷

Mayadan insana kadar çok çeşitli pontin ve reptin-içeren kompleksin bulunduğu rapor edilmiştir.¹⁰

2.11.1. Transkripsiyon Aktivasyonu

Genlerin transkripsiyonu için DNA'ya erişimi kolaylaştıran kromatin yeniden modelleme komplekslerinin varlığı gereklidir.⁶⁷ Bu kompleksler DNA'daki histonların değişimi, nükleozomların mobilize edilmesi veya histonların kovalent olarak modifiye edilmesi gibi kromatin durumunu değiştiren modifikasyonlarda, bu modifikasyonları tanıyan proteinleri bir arada tutarak, ATP'nin hidrolizinden açığa çıkan enerjiden faydalanmaktadır.^{67,69} RVB proteinleri bu kromatin yeniden modelleme komplekslerinin yapısında yer almakta ve transkripsiyonu regüle etmektedir.^{10,67} **Ino80**, **Swr1** (Swi2 ATPaz bölgesi ilişkili kompleks) ve **Tip60** (Tat-etkileşimli protein 60kDa) bu komplekslerden bazılarıdır.⁶⁷ Şekil 15'te kromatin yeniden modelleme fonksiyonu Ino80 kompleksi üzerinden gösterilmiştir.



Şekil 15: Ino80 kompleksinin kromatin yeniden modelleme fonksiyonu.⁷¹

2.11.2. Transkripsiyon Baskılanması

RVB proteinleri, transkripsiyon baskılayıcı fonksiyonu olan protein komplekslerine de katılmaktadır. c-Myc başka bir transkripsiyon faktörü olan Miz1'e (Myc ilişkili çinko parmak proteini¹) bağlanarak baskılayıcı olarak etki etmektedir.^{67,69,72} Bu kompleks siklin-bağımlı kinaz ve hücre proliferasyonunun inhibitörü olan p21 genini baskılamaktadır.

RVB oligomerleri **c-Myc/Miz1** kompleksi ile birleşerek kompleks ile işbirliği yapmakta, p21 genini baskılamakta ve bu da hücre proliferasyonunu tetiklemektedir.^{66,67} RVB proteinleri polycomb, β -katenin ve nükleer faktör (NF)- κ B (B-hücrelerinde hafif zincir arttırıcı nükleer faktör) benzeri diğer baskılayıcı komplekslerin yapısında da bulunmakta ve bu komplekslerinkine benzer fonksiyon göstermektedir.^{10,66,67}

2.11.3.DNA Hasar Cevabı

DNA hasar sensörü olarak etki eden **ATM** (mutant ataksi telenjipektazi) protein kinazı, DNA hasar sinyalini algılamakta ve sinyali aktive etmektedir. ATM aracılığı ile oluşan DNA hasar sinyalinin etkili bir biçimde aktive olabilmesi için **Tip60**'ın asetiltransferaz aktivitesi gereklidir.⁷³ RVB proteinlerinin, Tip60'ın histon H4 üzerindeki histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesi için gerekli olması, DNA hasarını algılamada ATM asetilasyonu için de bu proteinlerin gerekli olduğunu düşündürmektedir.⁶⁵ Bununla birlikte pontinin down regülasyonu ATM substratlarının fosforilasyonunu azaltmamakta, pontinin Tip60 kompleksinin asetiltransferaz aktivitesi için gerekli olmasının substrat spesifik olması ihtimalini arttırmaktadır.^{65,67}

RVB içeren drosophila, maya ve insan **NuA4** (nükleozomal histon H4 asetiltransferaz)/**Tip60** kompleksleri, DNA hasar bölgesine toplanmakta ve oluşan DNA hasar sinyal amplifikasyonunun ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. İnsan Tip60 kompleksi DNA hasar bölgesinde fosfoH2AX (fosforillenmiş histon H2AX varyantı) içeren nükleozomların yeniden modellenmesinden ve fosfoH2AX'in defosforillenmesinden önce histon H4'ü asetillendirmektedir.⁷⁴ Pontin, Tip60 kompleksinin HAT aktivitesinin sürdürülmesindeki rolünden dolayı fosfoH2AX'nin defosforillenmesi için kritik öneme sahiptir.^{67,74}

RVB proteinlerini içeren **Tip60** kompleksi, özellikle çift zincir kırıklarının etkili bir biçimde onarılmasında histon H2A veya H2AX varyantının asetilasyonu için kritik role sahiptir. Kompleks çift zincir kırıklarının bir belirteci olan fosfoH2AX'i hedef seçmekte ve histon varyantını asettillemektedir.⁶⁹

İnsan Ino80 ve RVB proteinleri aynı zamanda **YY1** (ying yang proteini1) kompleksinde de bulunmuştur. YY1'in veya Ino80'in tükenmesi, homolog rekombinasyonundaki bir bozulmaya bağlı oluşan DNA hasarından sonra hücrenin hayatta kalma şansını azaltmaktadır. Reptin tükenmesinin de benzer bir etkiye sahip olmasına rağmen reptinin, memeli Ino80 veya YY1 komplekslerinin aktivitesi için gerekli olup olmadığı halen bilinmemektedir. Memeli RVB proteinleri, DNA hasar bölgesinde kromatin yeniden modelleme için gerekliliğinden dolayı kısmen de olsa DNA hasarının onarımı için önemli olmaktadır.⁶⁷

DNA hasarı, hücre döngüsünün bir sonraki evreye geçmesinden önce hasarın onarıldığından emin olmak için hücre döngüsünü bloke eden kontrol noktası yollarını aktive etmektedir. Kontrol noktası aktivasyonuna katılan iki ATM/ATR (Rad3 ilişkili ataksi telenjiyektazi)-bağımlı yolak vardır. **ATM-Chk2-(kontrol noktası kinazı2) Cdc25a (hücre bölünme siklusu 25 proteini homologu A) yolağı**, DNA hasar cevabında DNA sentezini inhibe eden erken cevaptır. p53'ü fosforilleyen, Mdm2 (p53 bağlayıcı protein homologu2) ile etkileşimini zayıflatan ve böylece p53'ü stabilize eden **ATM-Chk2-p53 sinyal yolağı** ise DNA hasarına verilen geç cevaptır. İnsan Tip60 kompleksi ATM aktivasyonuna katılmakta ve her iki yolakta pontin, Tip60 aktivitesi için gerekmektedir. Ino80 ve Swr1 kompleksi de hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonuna katılmaktadır.^{67,68}

2.11.4.snoRNP Oluşumu

snoRNP'ler, proteinlerle kompleks oluşturan snoRNA'ları içeren RNP kompleksleridir. snoRNP'ler snRNA, rRNA ve tRNA'ların ayrılmasına ve modifikasyonuna katılmaktadır.⁶⁷ RVB proteinleri snoRNP'lerle çalışmaktadır. Yapılan çalışmalar RVB proteinlerinin snoRNP'lerin lokalizasyonunda, muhtemelen de kuruluşunda ve snRNA'ların stabilitesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir.^{67,75}

2.11.5.Hücre Transformasyonu ve Metastaz

RVB proteinleri, en iyi karakterize edilen onkogenik transkripsiyon faktörlerinden biri olan **c-MYC** ve **β -katenin** onkogenlerinin fonksiyonlarının regülasyonundaki rollerinden dolayı hücresel transformasyona katılmaktadır.^{67,76}

RVB proteinleri, hücrelerin proliferasyonu ve hücre akıbetinin belirlenmesi gibi çeşitli hücresel prosesleri regüle eden **Wnt (wingless proteini)- β -katenin** sinyal yolağına da katılmaktadır.^{67,76} Pontinin hem in vivo hem de in vitro ortamda β -kateninin 187-284 rezidüleri ile etkileştiği keşfedilmiştir. Pontin, β -katenin tarafından hedef alınan genlerin kromatin yapısını modüle ederek Wnt- β -katenin sinyal yolağının verimini regüle etmektedir. **Hint1/PKCI** (histidin üçlü nükleotit bağlayıcı protein1/protein kinaz C inhibitörü) RVB proteinlerinin etkileşimlerini sağlamakta ve regüle etmektedir.^{66,67,77}

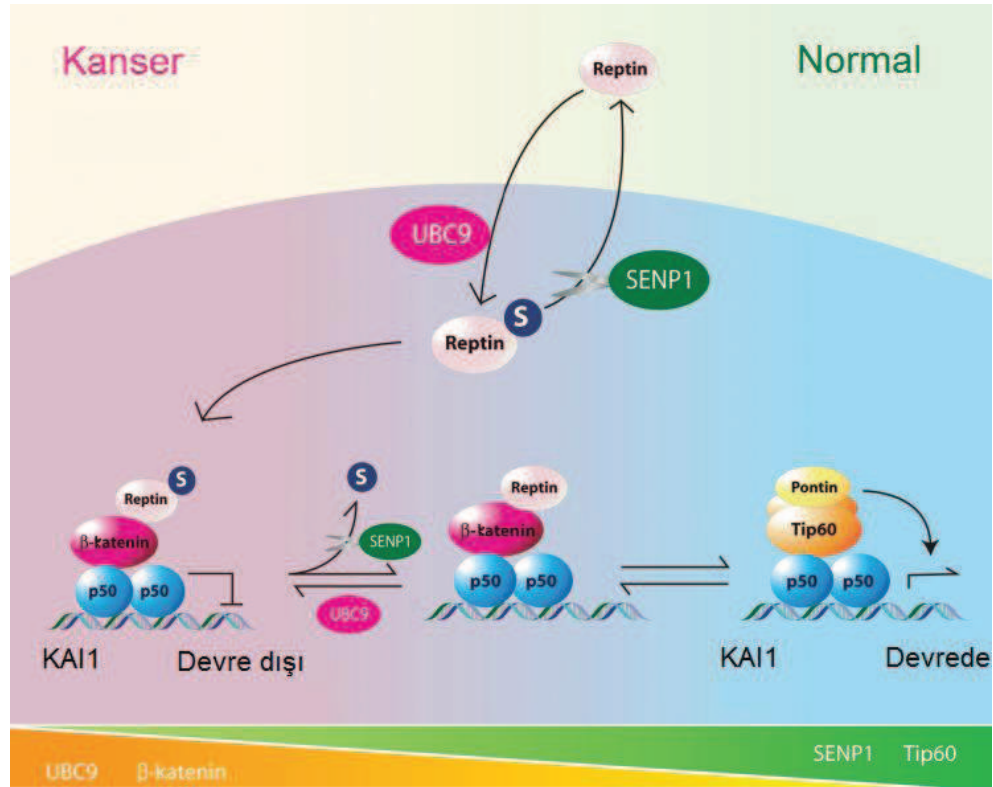
Hint1, pontin ve reptin halkaları arasındaki etkileşime aracılık etmek için RVB proteinlerinin 2.bölgesine bağlanmaktadır.^{65,67} Hint1'in aşırı ekspresyonu RVB- β -katenin regülasyonlu genleri modüle etmekte ve Hint1'in RVB ve Wnt- β -katenin sinyal yolağının regülatörü olduğunu

desteklemektedir. Tümör supresörü Hint1 pontinin agonistik fonksiyonunu baskımlarken, reptin indüklü baskılanmayı arttırmaktadır.⁶⁹

KAI1 (kangai), metastaz baskılayıcı genler arasında tanımlanmış birkaç genden biridir.^{66,67} KAI1 tetraspanin ailesi proteindir.⁶⁹ Hücre adhezyonunu başlatarak ve pek çok plazma membran reseptörüyle etkileşerek metastazı inhibe etmektedir. RVB ilişkili transkripsiyon faktörlerinin karmaşık etkileşimi KAI1'in regülasyonunu yönetmektedir.^{10,67} Tip60 pontinin yanı sıra, KAI1 promoterine bağlanmakta ve promoter bölgedeki histonların asetilasyonu yoluyla KAI1 ekspresyonunun koaktivatörü olarak etki etmektedir. Tip60'ın metastatik hücrelerde aşırı ekspresyonu hem Tip60'ın KAI1 promoterine bağlanmasını hem de KAI1 düzeylerini restore etmektedir. Bunun tersine metastatik hücrelerde, reptin β -kateninin yanı sıra KAI1 promoter bölgesini işgal etmekte ve gen ekspresyonunu baskılamaktadır.^{67,76} **Tip60-pontin** (aktivatör) ve **β -katenin-reptin** (represör) komplekslerinin antagonistik aktivitesi ile tutarlı olarak^{76,78} iki kompleks birbirini dışlayan bir şekilde, nonmetastatik hücrelerde Tip60'ın orijinal üstünlüğünü sağlamak için Tip60 veya β -kateninin düzeyleri manipüle edildiğinde bile KAI1 promoter bölgesini işgal etmektedir. Reptin ismi de bu antagonistik aktiviteden gelmektedir (reptin52=repressing pontin52).^{67,76}

Yapılan çalışmalarda **HDAC1** (histon deasetilaz1) ile etkileşen iki yeni **SUMO**-modifiye edici enzim tanımlanmıştır: **SENP1** (SUMO-sentrin-spesifik proteaz1) ve **SUSP1** (SUMO-spesifik proteaz1). Reptin kompleksinde SUMO-modifiye edici enzimlerin varlığı ile tutarlı olarak reptin, lizin 456 üzerinden SUMOilasyona uğramaktadır. SUMO akseptör bölgesindeki mutasyonlar ve bir SUMO molekülünün bu mutant ile birleşmesi, reptin SUMOilasyonunun reptinin nükleusa translokasyonu ve promoter baskılaması için esansiyel olduğunu ortaya koymaktadır.

UBC9 (ubikitin-konjuge enzim9)'un aşırı ekspresyonu ile SUMOilasyonun artışı, reptin tarafından transkripsiyonel baskılanmayı arttırmaktadır. **SENP1** aşırı ekspresyonu ile SUMOilasyonun azalması ise reptin aracılığıyla transkripsiyonel baskılanmayı tersine çevirmektedir. Sonuç olarak reptinin SUMOilasyonu, nükleer transporttaki rolüne bağlı olarak promotor baskılama için kritiktir. Çünkü büyük olasılıkla SUMO modifikasyonu KAI1 promotor bölgesine HDAC1 yönlendirilmesi için gereklidir.^{66,67} Pontinin SUMOilasyonu, lizin 225 üzerinden gerçekleşmektedir ve pontinin nükleer lokalizasyonunu koruyarak AR (androjen reseptörü)-bağımlı transkripsiyon üzerindeki agonist aktivitesini arttırmaktadır. Ayrıca prostat kanseri hücre proliferasyonunun regülasyonuna katılmaktadır.⁶⁸ Reptin, pontin, β -katenin, Tip60'ın KAI1 geni üzerindeki regülasyonu Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16: KAI1 metastaz baskılayıcı genin reptin, pontin, β -katenin ve Tip60 ile regülasyonu. S: SUMO.⁷⁸

2.11.6.DNA Replikasyonu, Mitoz ve Uri/Prefoldin Kompleksleri

Ino80, RVB proteinlerinin yanı sıra replikasyon stresinden sonra durmuş replikasyon çatalının yeniden başlatılması ve sürdürülmesi için gereklidir. RVB proteinleri mitoza katılan komplekslerin içinde de tanımlanmıştır.^{67,75} Pontin ve reptinin her ikisi de **tubulin** ile etkileşmekte, mitotik iğ ipliklerini ve iğ kutuplarını lokalize etmektedir.^{63,69} Ayrıca pontini knockdown edilmiş (ekspresyonu azaltılmış) hücrelerde, hücre ölümü daha sık görülmekte ve apoptozisin başlatılmasından önce mitozun durduğu görülmektedir.⁶⁹ RVB proteinlerini içeren bir başka protein kompleksi **Uri** kompleksidir.^{66,67} Uri kompleksi E3-ubikitin ligaz SCF, Rpb5 (RNA polimeraz II B subüniti) ve birkaç prefoldin ilişkili Uri1 proteininden oluşmaktadır.⁶⁶ **Prefoldinler** protein katlama komplekslerinde kullanılan bir protein ailesidir. Uri kompleksinin genom stabilitesinin kontrolünde rolü olduğu bulunmuştur.⁶⁸ RVB proteinleri Uri kompleksi içinde tanımlanmasına rağmen, bu proteinlerin kompleks içindeki rolü henüz tespit edilememiştir.⁶⁷

2.12.Serbest Radikal Hasarları ve Ürünleri

ROT yüksek redoks potansiyeline bağlı olarak proteinler, lipitler ve DNA gibi yapıların oksidatif modifikasyonlarını yaratma yeteneğine sahiptir.⁷⁹

Lipit peroksidasyonu (LP), biyolojik önemi en büyük serbest radikal reaksiyonlarından biridir. Verimli bir lokal antioksidatif savunma sistemiyle karşı koyulmadığında plazma fosfolipitlerinde oluşan peroksidatif hasar, ciddi hücre hasarına yol açabilmektedir. Diğer yandan endojen oksidanların, serbest radikallerin ve diğer reaktif türlerin oluşturduğu oksidatif hasarın en büyük hedefi DNA olmaktadır. Selüler

makromolekülleri oksidasyona karşı koruyan birçok savunma sistemi olmasına rağmen yüksek oranda DNA hasarı oluşmaktadır.⁸⁰⁻⁸² Proteinlerin ROT/RNT tarafından oksidasyonu, protein hidroperoksitler gibi geçiş metal iyonlarıyla etkileştiğinde fazladan radikal üretebilen reaktif ürünler oluşturabilmektedir.⁸³ Membran proteinleri LP sırasında hasara uğrayabilmektedir. Aynı zamanda serbest radikaller tarafından da direkt hasara uğratılabilmektedir.⁸⁴ Proteinlerde yer alan tirozin ve fenilalanin özellikle serbest radikal ataklarına uygun aminoasitlerdir.⁸⁵

2.12.1.DNA Hasarı

DNA'nın oksijen serbest radikalleri ile hasara uğraması, sıklıkla insan kanserlerinin başlaması ve ilerlemesiyle ilişkili olan mutasyonlara neden olmaktadır.⁸⁶⁻⁸⁹

ROT kaynaklı DNA hasarı; modifiye edilmiş bazlar, abazik bölgeler, tek veya çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanması, kardeş kromatit değişimi ve sonradan ortaya çıkan klastojenik faktörlerin üretimi şeklinde olabilmektedir.^{88,90,91}

2.12.1.1.DNA Şeker Hasarı

Serbest radikaller deoksiriboz molekülleri üzerinden de DNA'ya hasar verebilmektedir. Bazı şeker ürünleri, modifiye şekerler olarak DNA'dan çözülürken, diğerleri DNA üzerinde kalabilmekte veya kırılmış DNA zincirinin sonlanma grubunu oluşturabilmektedir. DNA'ya bağlı olarak bulunan oksidatif hasar ürünlerine 2-deokspentoz-4-uloz, eritroz, 2-deokspentonik asit lakton; 3' sonlanma grubunu oluşturan hasar ürünlerine 2,3-dideokspentoz-4-uloz, glikolik asit; 5' sonlanma grubunu

oluşturan hasar ürünlerine ise 2,5-dideoksipentoz-4-uloz, 2-deoksitetrodialdoz, 5'-aldehit nükleozit örnek verilebilmektedir.⁹²

2.12.1.2.DNA Baz Hasarı

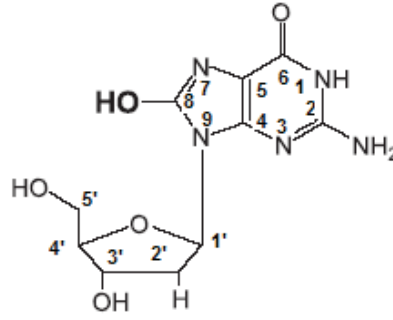
DNA oksidasyonu dört nükleik bazın hepsinde hasarla sonuçlanabilmektedir. Bütün pürin ve pirimidin bazları arasında en fazla okside olmaya eğilimi olan baz guanindir. 8OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin), 8OHGua (8-hidroksiguanin), 5-hidroksi-6-hidro timin, timin glikol, sitozin glikol, urasilglikol, 5-hidroksimetilurasil, 5-hidroksi-5-metil hidantoin, 5-formilurasil, alloksan, 8-hidroksiadenin, oksazolon gibi çeşitli DNA hasar ürünleri bulunmuştur.^{92,93} Son yıllarda, 8-OHdG [veya 8-oxodG (8-okso-2'-deoksiguanozin)] oksidatif stres belirteci olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle üriner 8-OHdG, teknik olarak karışık ve agresif olmamasından dolayı endojen oksidatif DNA hasarının ve prekürsörlerinin derecesini göstermek için en sık ölçülen belirteçtir. 8OHdG, oldukça hassas olarak ölçülebilmekte ve hedef dokulardaki düzeyleri oksidatif stres ve kanser insidansı ile korelasyon göstermektedir. Bu nedenle 8OHdG oksidatif hasar çalışmaları için oldukça kullanışlı olmaktadır.^{80,82,88,91,94-97}

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8OHdG)

ROT indüklü hasarın pek çok spesifik formundan biri olması nedeniyle, hayvan ve insanlarda yapılan çalışmalarda oksidatif stres ve oksidatif DNA hasarının gösterilmesinde bir belirteç olarak geniş kullanımı bulunmaktadır.^{88,90,91,97-99}

8OHdG inflamatuvar süreç ve yaşlanma gibi pek çok hastalık ve durumda üretilmektedir. 8OHdG kimyasal olarak hidroksil radikalının

veya singlet oksijenin guaninin 8.pozisyonuna atak yapmasıyla oluşmaktadır. Ayrıca LP ürünleri aracılığıyla da üretildiği gösterilmiştir.¹⁰⁰ Kanser çeşitli evrelerinde önemli rol oynadığının bulunmasından itibaren DNA baz modifikasyonlarının tüm kalitatif ve kantitatif özellikleri, özel ilgi görmektedir. Okside bazların hidrojen bağlarını değiştirmesi ya da spesifik kodlamada transversiyon mutasyonlarına neden olmasıyla karsinogenez meydana gelmektedir. Transversiyon mutasyonlarını (G-T eşleşmesi gibi) oksidatif olarak modifiye edilmiş DNA replikasyonu izlemektedir.^{88,98,101} Şekil 17’de 8OHdG’nin numaralandırılmış yapısı görülmektedir.



Şekil 17: 8OHdG’nin yapısı.⁹⁷

Guaninin 8.pozisyonundan oksidatif hidroksilasyonu, en sık görülen ve nükleer DNA’daki en mutajenik lezyondur. 8OHdG’nin oluşmasıyla görülen DNA oksidatif hasarı, mutajenezde olduğu gibi karsinogenez sürecinde de önemli olmaktadır. Guaninin hidroksilasyonu özgül baz eşleşmesinde eksikliklere ve modifiye bazlarla onların yakın rezidülerinin yanlış okunmasına yol açmaktadır. Hücrelerin hayatta kalması için oksidatif DNA modifikasyonlarının ortadan kaldırılmasına veya onarılmasına aracı olan çeşitli onarım enzim sistemleri bulunmaktadır. Onarılamayan herhangi bir oksidatif lezyon, mutasyonlara ve karsinogenez riskinin artmasına yol açmaktadır.⁸⁰

Oksidatif olarak modifiye edilmiş DNA miktarındaki artış insan dokularında özellikle tümörlerde tespit edilebilmektedir. 8-OHdG kan dolaşımına ve idrara salınmakta, hasarlı DNA'nın onarımının değerlendirmesi için fikir vermektedir.^{80,81,98,102}

8OHdG düzeylerinin çeşitli tümörlerde arttığı ortaya çıkarılmıştır. Uteral miyomlarda tümörün büyüklüğünün 8OHdG düzeylerinin artmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Meme kanserinde kanserli dokularda ve kan hücrelerindeki DNA'da 8OHdG ve 5-hidroksimetil-2'-deoksiuridin düzeylerinde artış olduğu bulunmuştur. Küçük hücreli akciğer, mesane ve prostat kanserli hastalarda 8OHdG düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Dolayısıyla üriner 8OHdG'nin kanser riskinin gösterilmesinde oldukça kullanışlı olduğu görülmektedir.⁸⁰ Bunların dışında kolorektal kanserde de 8OHdG düzeylerinin arttığı bildirilmiştir.¹⁰³

8OHdG düzeylerini ölçmek için HPLC/ECD (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi/elektrokimyasal dedektör ile),^{80,97,100,104} HPLC-MS/MS (tandem kütle spektrometrisi ile),^{80,81,97} GC/MS (gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi ile),^{82,88-90,95} CE (kapiller elektroforez)⁸⁹ yöntemleri kullanılmaktadır. Son zamanlarda 8OHdG'ye spesifik monoklonal antikor yöntemi yaygınlaşmakta, serum ve idrardaki 8OHdG düzeyleri ELISA (enzim bağlı immün assay) yöntemiyle de ölçülebilmektedir.^{80,81,89,105}

2.12.2.Lipit Peroksidasyonu

Başlıca hücre membranında lokalize olan lipitler, oksidatif strese çok hassastır. Membran lipitlerinin oksidatif hasarı, LP'yi başlatmaktadır. Serbest radikal atakları özellikle hücre membranı veya lipoproteinler içindeki poliansatüre yağ asidi zincirleri üzerine etki göstermekte, LP meydana gelmekte ve sonuçta lipit hidroperoksit,

tiyobarbitürik asit-reaktif bileşikler (TBAR_S) ve uzun ömürlü aldehit üretimi olmaktadır. Bu reaksiyon, ilerleyerek hücre hasarına neden olabilen ve zincir reaksiyonu gibi kendi kendine devam edebilen bir süreçtir. LP ürünleri serbest radikal aktivitesi gösterebilmekte, bu nedenle kendi lipid membranında hasarı arttırabilmektedir.⁷⁹ LP reaksiyonlarının sonunda MDA (malondialdehit), 4-OH nonenal, konjuge yağ asitleri, izoprostanlar, etan ve pentan oluşmaktadır.^{79,87,106-109}

LP ürünleri ve reaktif oksijen türlerinin, DNA'ya bağlanmak suretiyle mutasyonlara ve kanserlerin başlamasına neden olduğu bulunmuştur. Çeşitli organlarda üretilen veya artan LP ürünleri serum içine salınmaktadır.^{79,87,106,109} LP için tasarlanmış en popüler belirteçler MDA, okside LDL, MDA-modifiye LDL, okside LDL ve MDA-modifiye LDL'ye karşı gelişen oto-antikorlar, F2-izoprostan ve konjuge dienlerdir.⁸⁰

Malondialdehit (MDA)

MDA LP'den ve prostaglandin biyosentezinden endojen olarak türeyen ve biyolojik ortamlarda bazı biyomoleküllerin SH ve/veya NH₂ gruplarına bağlı olarak veya serbest formda bulunan bir bileşiktir (Şekil 18). Enzimatik ve oksijen radikali indüklü LP ürünüdür, genotoksiktir.^{86,110} MDA'nın potansiyel olarak DNA hasarına ve mutasyonuna önemli katkıları vardır. MDA'nın bakteri ve memeli hücre testlerinde mutajen ve tavşanlarda karsinojen olduğu gösterilmiştir.⁸⁶



Şekil 18: MDA'nın yapısı.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımı ve Özellikleri

3.1.1.Hasta Grubu

Hasta grubu, T.C.Sağlık Bakanlığı Dr.Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji ve Eğitim Araştırma Hastanesi'nden biyopsi ile kesin kolon kanseri, meme kanseri, mide kanseri ve yumuşak doku kanseri teşhisi konmuş, herhangi bir tedavi almamış ve tedavi amacıyla opere edilerek dokularının çıkarılmasına karar verilmiş olan 17'si kadın 10'u erkek olmak üzere toplam 27 (13 kolon, 7 meme, 6 mide ve 1 yumuşak doku kanseri) hastadan oluşturuldu. Yumuşak doku kanseri hastası parametrelerde değişiklik olup olmadığını kontrol etmek amacıyla çalışmadan çıkarılmadı.

3.1.2.Kontrol Grubu

Kontrol grubu, T.C.Sağlık Bakanlığı Dr.Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji ve Eğitim Araştırma Hastanesi'nden, kanser tanısı almamış, hiçbir hastalığı olmayan, rutin kontroller için hastaneye başvurmuş sağlıklı, özellikle cinsiyet ve yaş bakımından hasta grubuna benzer 14'ü kadın 13'ü erkek olmak üzere toplam 27 kişiden oluşturuldu.

Sadece serum ve idrar deneylerinde, sağlıklı gönüllülerden alınan serum ve idrar örnekleri ile kanserli hasta grubundan alınan serum ve idrar örneklerinde karşılaştırma yapıldı. Doku çalışmalarının karşılaştırmaları, kanserli hastaların tümör dokuları ve kendi sağlıklı dokuları arasında yapıldı. Kanser hastalarından alınan doku örnekleri rezeksiyon amacıyla alınan dokulardan seçildi. Tablo 2'de hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri, Tablo 3'te rutin biyokimya değerleri yer almaktadır.

Tablo 2: Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri

Değişken	Hasta Grubu (n=27)	Kontrol Grubu (n=27)
Yaş (Standart Sapma)	55.48 (10.41)	45.37 (6.58)
Cinsiyet		
Kadın (%)	17 (63.0)	14 (51.9)
Erkek (%)	10 (37.0)	13 (48.1)
Menopoz Durumu		
Premenopoz (%)	5 (29.4)	10 (71.4)
Postmenopoz (%)	12 (70.6)	4 (28.6)
Kanser türü		
Kolon (%)	13 (48.1)	-
Meme (%)	7 (26.0)	-
Mide (%)	6 (22.2)	-
Yumuşak Doku (%)	1 (3.7)	-
Kanser Evresi*		
Total Hasta- Evre I, II,III,IV	7,7,7,5	-
Kolon- Evre I, II,III,IV	5,2,3,3	-
Meme- Evre I, II,III	1,5,1	-
Mide- Evre I,III, IV	1,2,2	-
Yumuşak Doku- Evre I	1	-
Kanser Fazı		
Total Hasta		
Erken Faz** (%)	15 (55.6)	-
İleri Faz** (%)	11 (40.7)	-
Kolon		
Erken Faz (%)	7 (53.8)	-
İleri Faz (%)	6 (46.2)	-
Meme		
Erken Faz (%)	6 (85.7)	-
İleri Faz (%)	1 (14.3)	-
Mide		
Erken Faz (%)	1 (16.7)	-
İleri Faz (%)	4 (66.7)	-
Yumuşak Doku		
Erken Faz (%)	1 (100.0)	-

*Evreleme American Joint Committee on Cancer kriterlerine göre yapılmıştır.

**Erken Faz =Evre I + Evre II, İleri Faz = Evre III + Evre IV

Tablo 3: Hasta ve kontrol gruplarının rutin biyokimya değerleri

Ortalama (Standart Sapma)			
Parametre	Hasta Grubu (n=27)	Kontrol Grubu (n=27)	p*
Glukoz (mg/dL)	130.62 (48.04)	94.63 (27.99)	0.002
Total protein (g/dL)	5.54 (0.79)	7.12 (0.54)	0.000
Albümin (g/dL)	3.08 (0.58)	4.05 (0.75)	0.000
Ürik asit (mg/dL)	3.31 (1.11)	4.52 (1.17)	0.001
AST (SGOT) (U/L)	23.00 (14.13)	20.81 (8.83)	0.499
ALT (SGPT) (U/L)	16.37 (14.72)	28.19 (14.97)	0.005
GGT (U/L)	28.25 (18.16)	17.00 (8.06)	0.005
BUN (mg/dL)	13.69 (5.52)	29.79 (7.64)	0.000

*p>0.05 anlamsız, p<0.05 anlamlı

3.2.Materyal

3.2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

- RNaz inhibitörü çözelti: RNase Zap
- RNA koruyucu çözelti: RNASafer
- RNA izolasyon çözeltisi: Roche Tripure Isolation Reagent
- Kloroform: Merck
- İzopropanol: Merck
- Etanol: Merck
- cDNA sentez kiti: Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit
- Real-Time PCR enzim kiti: Roche LightCycler 480 Probes Master Kit
- Nükleaz içermeyen su
- 8OHdG EIA (enzim immün assay) kiti: Cayman
- Kreatinin kiti: Bio Aktif Kimya
- Kreatinin kontrol solüsyonu: Bio-Rad Liquichek Urine Chemistry Control
- Ultra saf su
- Tetraetoksipropan %95 (TEP): Fluka

- Sülfürik asit %95-98 (H_2SO_4): Merck
- Sodyum hidroksit (NaOH): Merck
- Perklorik asit %70-72 (PCA): Merck
- Hidroklorik asit %37 (HCl): Merck
- Dinitrofenilhidrazin (DNPH): Acros
- Heksan %95: Lab-Scan
- Asetonitril (ACN): Merck
- Asetik asit %96: Merck
- Metanol: Sigma-Aldrich
- Ultra saf su

3.2.2.Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Buzdolabı: Bosch
- Derin dondurucu (-20°C): Bosch
- Derin dondurucu (-80°C): New Brunswick Scientific U410 Premium
- Distile su cihazı: GFL-2012
- Ultra saf su cihazı: Thermo Scientific Barnstead NANOpure, Millipore-Simplicity 185
- Hassas terazi: And GR-200
- Otomatik pipetler: Eppendorf, Hirschmann, Axygen-Axypet, Pipetus
- Ultrasonik banyo: Bandelin Sonorex RK 100
- Vorteks: Select Bio-Products Select Vortexer
- Termal çalkalayıcı: Analytik Jena TMix, Biosan Bio TDB-100
- Su banyosu: GFL-1083
- Santrifüj cihazı: Jouan MR-1822, Hettich Mikro 200R
- Mini santrifüj cihazı: Grant-Bio PCV-3000
- Isıticılı manyetik karıştırıcı: FALC F-60
- Süzme kiti: Knf, Alltech Applied Science
- Örnek konsantratörü: Techne

- Isıtıcı blok: Techne DB 3A
- HPLC cihazı: Hewlett Packard-1050
- HPLC enjekör: Hamilton 702SNR
- HPLC kolonu: Hewlett-Packard ODS Hypersil 5 µm, 100 x 4.6 mm
- Spektrofotometre: Shimadzu UV-160A
- Mikroplaka çalkalayıcı: Grant-Bio PMS-1000
- Mikroplaka yıkayıcı: TriContinent Multiwash Advantage
- Mikroplaka okuyucu: Molecular Devices-VersaMax
- Mikroplaka santrifüj: Kubota PlateSpinII
- Bariyerli pipet uçları: Neptune Barrier Tip, Greiner Bio-one Filter Tip
- Homojenizatör: Roche MagNA Lyser
- Homojenizasyon tüpleri: MagNA Lyser Green Beads
- Biyogüvenlik Kabini: Esco Class II BSC Airstream Max
- Rotator: Biosan Multi RS 60
- PCR cihazı: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
- Real-Time PCR cihazı: Roche Light Cyclers 480II
- Mikroplakalar: Real Time Ready Custom Panel 96 + 16

3.2.3.Kullanılan Biyolojik Materyal

Kanserli hasta grubundan alınan tümör doku örneklerinde ve aynı hasta grubundan alınan sağlıklı doku örneklerinde hTERT, p21, p53, c-myc ve bcl-2 gen ekspresyon analizleri yapıldı.

Sağlıklı kontrol grubundan ve kanserli hasta grubundan alınan idrar örneklerinde 8OHdG analizi, serum örneklerinde ise MDA analizleri yapıldı.

Her bir doku örneği, alındıktan sonraki 30 dakika içinde aseptik koşullarda küçük parçalara ayrılarak içinde 1 mL RNASafer

çözültisi bulunan eppendorf tüpler içinde, -80°C'de ölçümlere kadar saklandı. Serum ve idrar örnekleri ise alındıktan sonra 3,000 g'de santrifüjlenerek eppendorf tüplerde -80°C'de ölçümlere kadar saklandı.

3.3.Deneysel Prosedür

3.3.1.Doku Örneklerinde Kantitatif Real-Time RT-PCR (qRT-PCR/Gerçek Zamanlı RT-PCR) ile hTERT, Pontin, Reptin ve Diskerin Gen Ekspresyonlarının Analizi

Çalışmanın yöntemi; tümör dokuları ve normal dokuların homojenizatör yardımıyla parçalandıktan sonra izole edilen total mRNA (haberci RNA)'larından hareketle komplementer DNA (cDNA)'larının sentezlenmesi, ardından bu cDNA'ların in vitro koşullarda real-time PCR cihazı yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonunda elde edilen değerler ne oranda yüksek ise her bir genin dokudaki ekspresyon düzeyi de o oranda fazla olacaktır.

3.3.1.1.Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu

Kullanılan Çözeltiler

- RNase Zap
- Roche Tripure Isolation Reagent
- Kloroform
- İzopropanol
- %75 Etanol
- Nükleaz içermeyen su

Örneklerin Hazırlanışı

Çalışma ortamı ile kullanılan alet ve cihazlar RNase Zap çözeltisi ile temizlendi. Her bir homojenizasyon tüpüne 1 mL Tripure izolasyon rejanı koyuldu. RNASafer içerisinde donmuş olarak bulunan yaklaşık 100 mg'lık doku örnekleri çözüldü ve bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış doku örnekleri homojenizasyon tüplerine alındı. Tüpler homojenizatörde 6,000 rpm'de 50 saniye çevrildi. Örnekler önce 4°C'de 2 dakika, daha sonra oda ısısında 5 dakika bekletildi. Her bir parçalanmış doku örneğine 200 µL kloroform eklenerek 5 dakika oda ısısında bekletildi ve daha sonra 4°C'de 12,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 3 faza ayrıldı. En üstteki aköz ve renksiz RNA fazından 500 µL nükleaz içermeyen eppendorf tüplere alındı. Her bir örneğe 500 µL izopropanol eklendi. Oda ısısında 10 dakika rotatorda çevrilerek inkübe edildi. Örnekler daha sonra 4°C'de 15,000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak oluşan RNA pelletinin üzerine 1 mL %75'lik etanol eklenip vortekslendi. Örnekler 4°C'de 10,000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. 57°C'de ısıtıcı blokta etanol uçuruldu. Kalan RNA pelletine 50 µL nükleaz içermeyen su eklenerek pipetaj yapıldı. Ardından 57°C'de ısıtıcı blokta 15 dakika inkübe edilerek RNA pelleti çözüldü. Tüpler 3,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. RNA çözeltileri daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklamaya alındı. RNA izolasyonu üretici firmanın yönergesine uygun olarak yapıldı.

3.3.1.2.RNA Örneklerinden RT-PCR ile cDNA Sentezi

Kullanılan Çözeltiler (Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit)

-Ters transkriptaz (200 mM potasyum fosfat, 2 mM ditiyotritol, %0.2 triton X-100 (v/v), %50 gliserol (v/v) içeren tampon içinde, pH yaklaşık 7.2)

- Reaksiyon Tamponu [250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH yaklaşık 8.5 (25°C)]
- 40 U/μL koruyucu RNaz inhibitör [20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditiyotritol, %50 gliserol (v/v), pH 7.6 (4°C) tamponu içinde]
- Deoksinnükleotit karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP-Her biri 10 mM)
- 600 μM random heksamer primeri
- 0.1 M ditiyotritol (DTT)

Örneklerin Hazırlanışı

Doku ekstraktlarından total RNA izole edildikten sonra buradan RT-PCR ile cDNA elde edilmesi işlemine geçildi. Bunun için 4°C’de nükleaz içermeyen her bir eppendorf tüpüne 2 μL random heksamer primer çözeltisi koyuldu. RNA örnekleri çözölüp her birinden 9.4 μL eppendorf tüplere eklendi. 65°C’de 10 dakika PCR cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnek tüpleri doğrudan buza yerleştirildi. Bu arada 1.5 mL’lik eppendorf tüpte reaksiyon karışımı, her bir RNA örneği için Tablo 4’te verilen miktarlardan hesaplanarak hazırlandı.

Tablo 4: cDNA sentezi için gerekli reaksiyon karışımında 1 RNA örneği için kullanılan çözelti miktarları

Reaksiyon Tamponu	DTT	Deoksinnükleotit Karışımı	Koruyucu RNaz İnhibitör	Ters Transkriptaz	Toplam
4 μL	1 μL	2 μL	0.5 μL	1.1 μL	8.6 μL

Daha önce inkübe edilen her bir örnek tüpü üzerine hazırlanan bu karışımdan 8.6 μL eklendi. Örnekler PCR cihazında 55°C’de 30 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80°C’de saklamaya alındı. cDNA sentezi üretici firmanın yönergesine uygun olarak yapıldı.

3.3.1.3.Kantitatif Real-Time PCR Analizi

Kullanılan Çözeltiler (Roche LightCycler 480 Probes Master Kit)

- Enzim karışımı [tampon, $MgCl_2$, dNTP (deoksiribonükleotit trifosfat), FastStart Taq DNA Polymerase enzimi içeren LightCycler 480 Probes Master]
- Primer, prob (mikroplakalar üzerinde kaplanmış olarak)
- Nükleaz içermeyen su

Örneklerin Hazırlanışı

Elde edilen cDNA örneklerinden hareketle real-time PCR ile amplifikasyon işlemine geçildi. Bu işlemlerle hTERT, pontin, reptin ve diskerin gen ekspresyonlarının düzeylerinin ölçülebilmesi için kit üretici firmanın tasarladığı her bir gene özgü ileri ve geri primerler ile bu primerlere uygun proplar kullanıldı ve her dört gen ekspresyonu için aynı deney protokolü uygulandı.

Reaksiyon karışımları her bir cDNA örneği için ayrı tüplerde ve her bir mikrolaka kuyucuğu için Tablo 5'te verilen miktarlardan hesaplanarak 4°C'de hazırlandı. Negatif kontrol olarak her bir örneğin RNA'sı kullanıldı. Mikroplakaların üzeri folyo ile kaplanarak mikrolaka santrifüjünde 3,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Deney protokolü üretici firmanın yönergesine uygun olarak yapıldı.

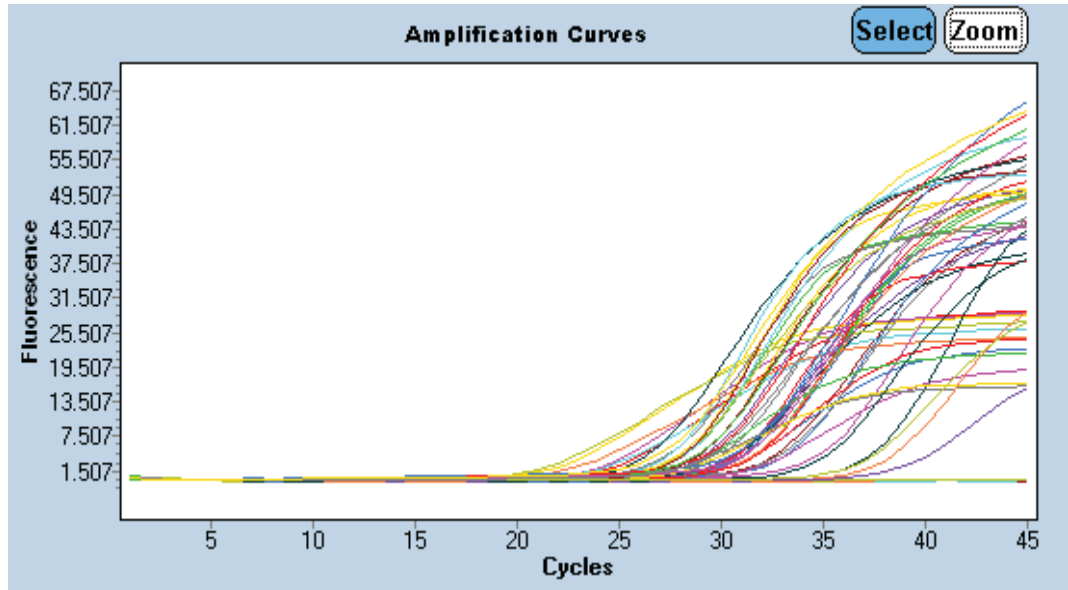
Tablo 5: Her bir mikrolaka kuyucuğu için gereken PCR reaksiyon karışım oranı

cDNA	Enzim Karışımı	Su	Primer, Prob	Toplam
5 µL	10 µL	4 µL	1 µL (Mikrolaka üzerinde kaplanmış olarak)	20 µL

Gen amplifikasyonu için kit üreticisinin önerdiği aşağıdaki PCR programı kullanıldı.

Pre-İnkübasyon:	95°C'de 10 dakika	}	1 döngü
Amplifikasyon:	95°C'de 10 saniye		
	60°C'de 30 saniye	}	45 döngü
	72°C'de 1 saniye		
Soğutma:	40°C'de 30 saniye	}	1 döngü

Grafik 1'de bir amplifikasyon eğrisi örneği görülmektedir.



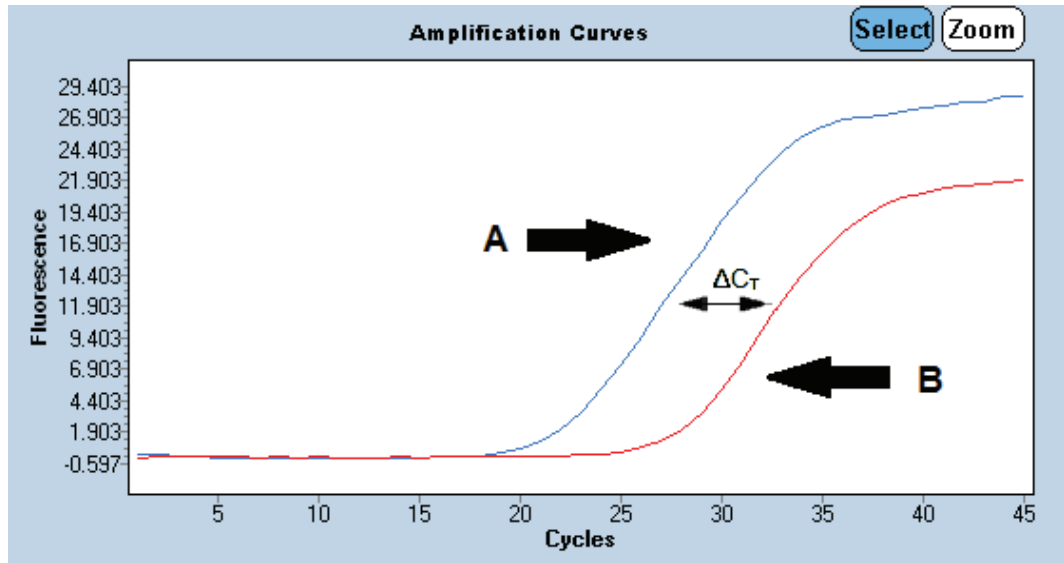
Grafik 1: Bir mikroluka içindeki tüm cDNA örneklerinin real-time PCR amplifikasyon eğrileri.

Bağıl ekspresyon, hedef genin tümör doku örneklerinde ve normal doku örneklerinde (kalibratör örnek) referans bir gene göre kantifikasyonunun [rölatif kantifikasyon (RK)] hesaplanmasıyla belirlendi. Çalışmada referans gen olarak β -aktin kullanıldı. RK değeri,

$$2^{[C_T(\text{tümör, referans gen}) - C_T(\text{tümör, hedef gen})]}$$

$$2^{[C_T(\text{kalibratör, referans gen}) - C_T(\text{kalibratör, hedef gen})]}$$

formülünden hesaplandı.¹¹ Bu yöntemle referans gen kullanılarak ΔC_T değeri hesaplandı. C_T (eşik döngüsü), gen amplifikasyonunun lineer bölgeye ulaşması için gerekli PCR döngü sayısını ifade etmektedir.¹¹ Hedef ve referans genler arasındaki C_T değerleri farkından (ΔC_T), tümör dokusundaki ve normal dokudaki hedef gen ekspresyonları (oransal olarak) referans gen ekspresyonlarına kıyasla hesaplandı (Grafik 2).



Grafik 2: Hasta grubuna ait bir amplifikasyon grafiği. A referans gen eğrisini, B hedef gen eğrisini göstermektedir.

Tümör dokusundaki ekspresyon oranının normal dokudaki (kalibratör örnek) ekspresyon oranına bölünmesiyle elde edilen değer, hedef genin tümör dokusunda normal dokuya göre kaç kat daha fazla ifadelendiğini belirtmektedir. Bu değer **RK** ekspresyon oranıdır.

3.3.2.İdrar Örneklerinde ELISA ile 8OHdG Analizi

Yöntemde anti-fare IgG (immünoglobulin G)-kaplı mikrolaka ve 8OHdG-enzim konjugatından oluşan bir işaretleyici kullanılmaktadır ve bu yöntem sınırlı miktardaki 8OHdG monoklonal antikor için, 8OHdG ve 8OHdG-asetilkolinesteraz (AChE) konjugatı (8OHdG işaretleyicisi) arasındaki yarışmaya dayanmaktadır. 8OHdG konsantrasyonu değişirken, 8OHdG işaretleyicisinin konsantrasyonunun sabit kalmasından dolayı, 8OHdG monoklonal antikora bağlanabilen 8OHdG işaretleyicisinin miktarı, kuyucuktaki 8OHdG'nin konsantrasyonuyla ters orantılı olmaktadır. Bu antikor-8OHdG kompleksi daha önce kuyucuğa bağlanmış olan keçi poliklonal anti-fare IgG'ye bağlanmaktadır. Mikrolaka, bağlanmamış herhangi bir reajanı bertaraf etmek için yıkanmakta ve daha sonra AChE substratı içeren Ellman's reajanı kuyucuklara eklenmektedir. Bu enzimatik reaksiyonun ürünü sarı renkli bir bileşiktir ve 412 nm dalga boyunda güçlü bir absorbans vermektedir. Spektrofotometrik olarak saptanan bu rengin şiddeti, inkübasyon sırasında kuyucuklarda bulunan serbest 8OHdG miktarıyla ters orantılı olan 8OHdG işaretleyicisinin (kuyucuğa bağlı olan) miktarıyla orantılıdır. Analiz sonunda elde edilen 8OHdG değerleri kreatinin değerleriyle normalize edilerek ele alınmıştır.

Kullanılan Çözeltiler (8OHdG EIA Kit)

- 1060 nmol/L 8OHdG EIA standardı
- EIA tamponu
- Yıkama tamponu
- Tween 20
- 8OHdG AChE işaretleyici
- 8OHdG AChE işaretleyici boyası
- 8OHdG EIA monoklonal antikor

- 8OHdG EIA monoklonal antikor boyası
- Ellman's reajanı

Örneklerin Hazırlanışı

Tüm konsantre çözeltiler kitte belirtilen miktarlarda ultra saf su veya EIA tamponu ile seyreltildi. Mikroplaka üzerinde çalışmayı kolaylaştırmak üzere 8OHdG AChE işaretleyici boyası, 8OHdG AChE işaretleyiciye; 8OHdG EIA monoklonal antikor boyası ise 8OHdG EIA monoklonal antikora 1:100 oranında eklenerek hazırlandı. İdrar örnekleri 1:100 oranında EIA tamponu ile seyreltildi. Keçi anti-fare IgG kaplı mikrolakalara Tablo 6'da belirtilen düzende ve Tablo 7'de belirtilen miktarlarda pipetleme yapıldı. Deney protokolü üretici firmanın yönergesine uygun olarak yapıldı.

Tablo 6: Mikrolakalara örnek uygulama düzeni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	Ö1	Ö5	Ö9	Ö13	Ö17	Ö21	Ö25	Ö29	Ö33	Ö37
B	Blk	S2	Ö1	Ö5	Ö9	Ö13	Ö17	Ö21	Ö25	Ö29	Ö33	Ö37
C	NSB	S3	Ö2	Ö6	Ö10	Ö14	Ö18	Ö22	Ö26	Ö30	Ö34	Ö38
D	NSB	S4	Ö2	Ö6	Ö10	Ö14	Ö18	Ö22	Ö26	Ö30	Ö34	Ö38
E	B ₀	S5	Ö3	Ö7	Ö11	Ö15	Ö19	Ö23	Ö27	Ö31	Ö35	Ö39
F	B ₀	S6	Ö3	Ö7	Ö11	Ö15	Ö19	Ö23	Ö27	Ö31	Ö35	Ö39
G	B ₀	S7	Ö4	Ö8	Ö12	Ö16	Ö20	Ö24	Ö28	Ö32	Ö36	Ö40
H	TA	S8	Ö4	Ö8	Ö12	Ö16	Ö20	Ö24	Ö28	Ö32	Ö36	Ö40

Blk (Blank-kör): Ellman's reajanından kaynaklanan absorbands.

NSB (Non-spesifik bağlanma): İşaretleyicinin kuyucuklara immünolojik olmayan bağlanması. Spesifik antikorun yokluğunda bile çok düşük miktarlarda işaretleyici kuyucuklara bağlanmaktadır. NSB bu düşük bağlanma miktarının ölçüsüdür.

B₀ (Maksimum bağlanma): Serbest analitin yokluğunda antikorun bağlayabildiği maksimum işaretleyici miktarı.

%B/B₀: Örnek ya da standart kuyucuk absorbansının maksimum bağlanmaya oranı.

TA (Total aktivite): AChE-bağlı işaretleyicinin total enzimatik aktivitesi.

S₁₋₈: Standartlar

Ö₁₋₄₀: İdrar örnekleri

Tablo 7: Mikroplakalara uygulanan örneklerin pipetlenen miktarları

Kuyucuk	EIA Tamponu	Standart/Örnek	İşaretleyici	Antikor
Blk	-	-	-	-
NSB	100 µL	-	50 µL	-
B ₀	50 µL	-	50 µL	50 µL
Standart/Örnek	-	50 µL	50 µL	50 µL
TA	-	-	5 µL (developman aşamasında)	-

Mikroplakalar kit ile birlikte verilen filmler ile kapatılarak 4°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılarak yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 200 µL Ellman's reajanı, ayrıca TA kuyucuğuna 5 µL işaretleyici eklendi. Mikroplakalar film ile kapatılarak karanlıkta, 100 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. 412 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

Standartların Hazırlanışı

1059 nmol/L'lik 8OHdG standart çözeltisinden EIA tamponu ile seyreltmeler yapılarak 10.59 nmol/L-0.04 nmol/L konsantrasyonları arasında standart 8OHdG çözelti serisi hazırlandı. Her bir mikroplaka için yeni standart serisi hazırlandı. Standart çözeltilerine idrar örneklerine

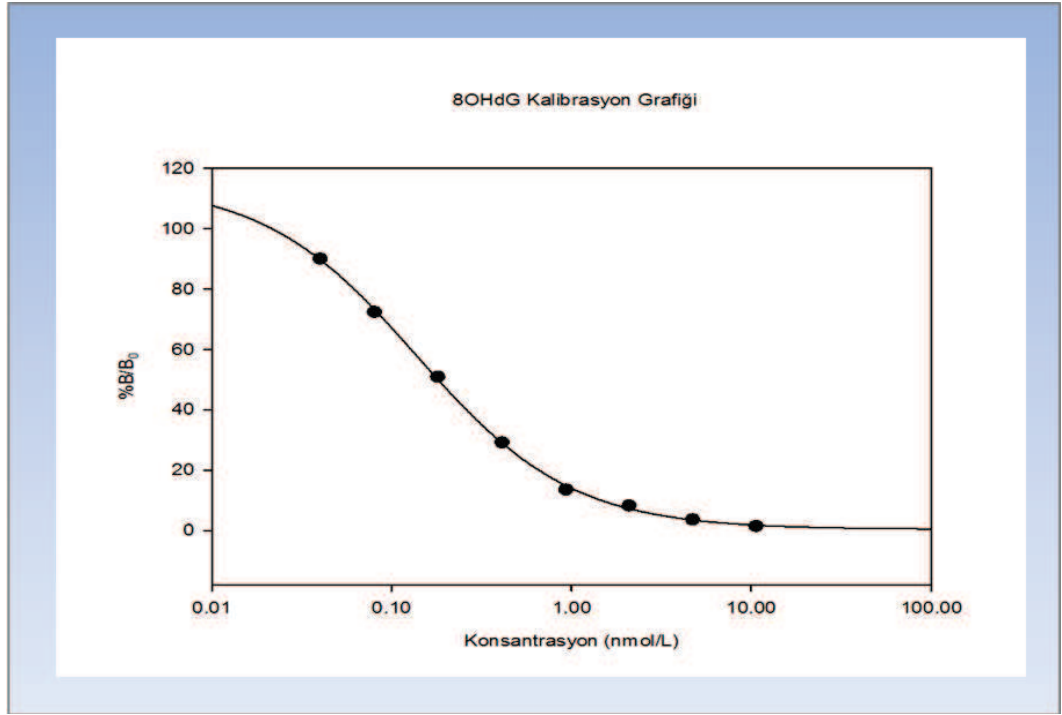
uygulanan tüm işlemler uygulandı. Mikroplakalar film ile kapatılarak karanlıkta, 100 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. 412 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve elde edilen değerlerden kalibrasyon grafiği çizildi (Tablo 8, Grafik 3).

Tablo 8: 8OHdG standart çözeltilerinin %B/B₀ (%bağlı analit/maksimum bağlı işaretleyici) değerleri

Konsantrasyon (nmol/L)	%B/B ₀
10.59	1.49
4.71	3.72
2.09	8.29
0.93	13.60
0.41	29.22
0.18	51.01
0.08	72.48
0.04	90.12

$$r^2=0.9994$$

$$y=0.4087+[(115.1437-0.4087)/(1+(x / 0.1385)^{1.0141})]$$



Grafik 3: 8OHdG standart kalibrasyon grafiği. Konsantrasyon (x) eksenini logaritmik olarak gösterilmiştir.

3.3.3.İdrar Örneklerinde Spektrofotometri ile Kreatinin Analizi

Yöntem idrar örneklerinde bulunan kreatininin pikrik asitle oluşturduğu kırmızı renkli kreatinin pikrat bileşiğinin 510 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometre ile ölçülmesine dayanmaktadır. Absorbans idrardaki kreatinin miktarıyla doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler (Kreatinin Kit)

-478.4 mM NaOH	}	R2 rejanı
-24.2 mM sodyum tetra borat		
-28.1 mM disodyum hidrojen fosfat		
-22.2 mM pikrik asit		R1 rejanı

Örneklerin Hazırlanışı

R1 ve R2 reajanı oda sıcaklığına getirilerek 4:1 oranında karıştırıldı ve çalışma çözeltisi elde edildi. İdrar örnekleri 1:100 oranında seyreltildi. Her bir idrar örneğinden 160 µL alınarak üzerine 1600 µL çalışma çözeltisi eklendi. 510 nm dalga boyunda 10. ve 130. saniyede ölçülen absorbans değerlerinin farkı alınarak hesaplama yapıldı. Deney protokolü üretici firmanın yönergesine uygun olarak yapıldı.

Standartların Hazırlanışı

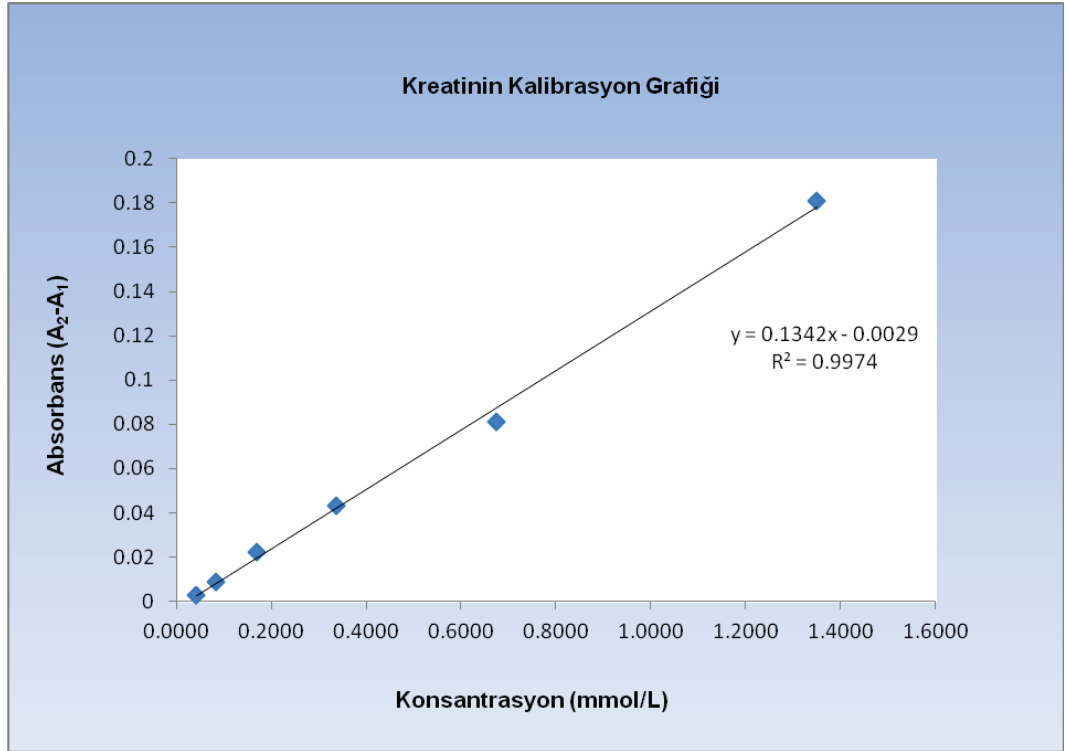
6.47 mmol/L'lik kreatinin kontrol çözeltisinden ultra saf su ile seyreltmeler yapılarak 1.35 mmol/L-0.04 mmol/L konsantrasyonları arasında standart kreatinin çözelti serisi hazırlandı. Standart çözeltilerine idrar örneklerine uygulanan tüm işlemler uygulandı. 510 nm dalga boyunda 10. (A₁) ve 130. (A₂) saniyede ölçülen absorbans değerlerinin farkı alınarak hesaplama yapıldı. Elde edilen değerlerden kalibrasyon grafiği çizildi (Tablo 9, Grafik 4).

Tablo 9: Kreatinin standart çözeltilerinin absorbans farkı değerleri

Konsantrasyon (mmol/L)	Absorbans (A ₂ -A ₁)
1.35	0.181
0.68	0.081
0.34	0.043
0.17	0.022
0.08	0.009
0.04	0.003

$$r^2=0.9974$$

$$y=0.1342x-0.0029$$



Grafik 4: Kreatinin standart kalibrasyon grafiği.

3.3.4.Serum Örneklerinde HPLC ile MDA Analizi

Yöntem serum örneklerinde bulunan total MDA'nın DNPH ile türevlendirilmesi ve oluşan türevin 310 nm dalga boyunda HPLC cihazı ile pik alanının ölçülmesine dayanmaktadır. Pik alanı serumdaki MDA miktarıyla doğru orantılıdır.

Kromatografi Şartları

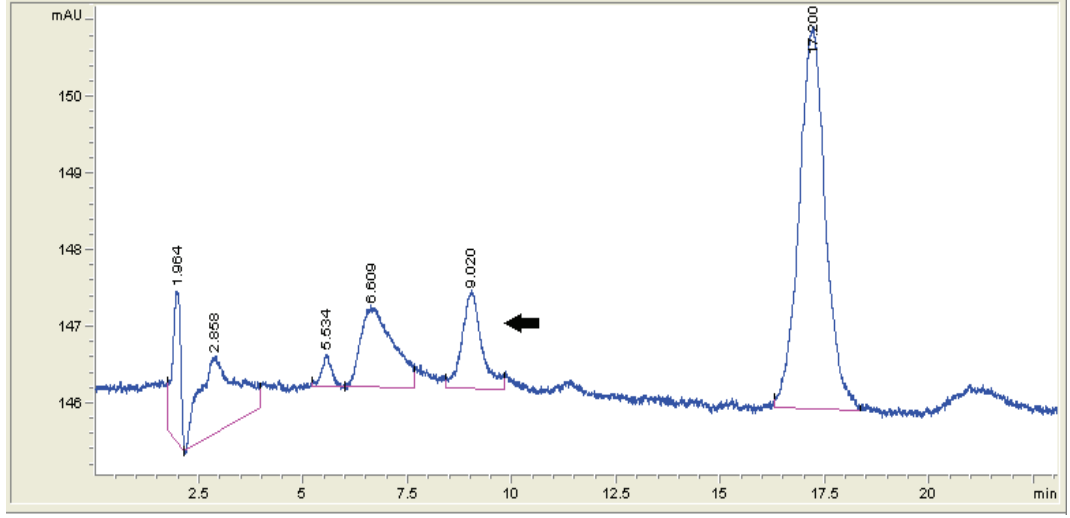
- Kolon Isısı: 30°C
- Akış Hızı: 0.6 mL/dak
- Mobil Faz: Asetonitril:Ultra saf su [%0.2(v/v) Asetik Asit] (38:62)
- Dalga Boyu: 310 nm
- Enjeksiyon Miktarı: 20 µL

Kullanılan Çözeltiler

- 20 µmol/L TEP standardı
- 6M NaOH
- %35 PCA
- 2M HCl
- 5 mM DNPH
- %1 H₂SO₄
- Metanol:Ultra saf su (70:30) (sistem yıkama çözeltisi)

Örneklerin Hazırlanışı

Her 250 µL serum üzerine 50 µL NaOH çözeltisi ilave edildikten sonra örnekler 60°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Hidrolize olmuş örnekler 125 µL perklorik asit çözeltisi ile asidifiye edildi. 14,000 g'de 10 dakika santrifüjden sonra 250 µL süpernatant cam tüplere aktarıldı. 25 µL DNPH çözeltisi ilave edildikten sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler heksan ile iki kez ekstre edildi. Organik faz cam tüplere alındı, azot altında 40°C'de kurutuldu. Her bir örnek 100 µL mobil fazda çözülerek 20 µL'lik reaksiyon karışımı direkt HPLC sistemine enjekte edildi.¹¹² Serum örneklerine ait bir kromatogram örneği Grafik 5'te verilmiştir.



Grafik 5: Hasta grubuna ait bir MDA kromatogram örneği. Ok işareti MDA pikini göstermektedir.

Standartların Hazırlanışı

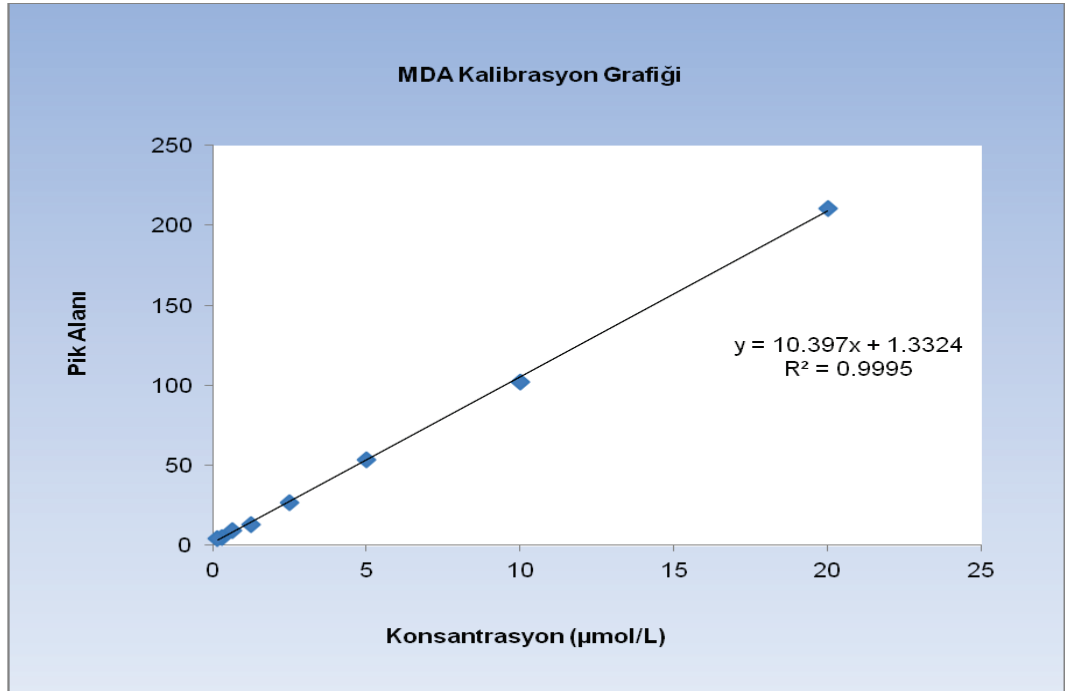
%1'lik H_2SO_4 çözeltisi içinde 4 mmol/L konsantrasyonda hazırlanan TEP standart çözeltisinden H_2SO_4 çözeltisi ile seyreltmeler yapılarak 20 $\mu\text{mol/L}$ -0.63 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonları arasında standart MDA çözelti serisi hazırlandı. Standart çözeltilerine serum örneklerine uygulanan tüm işlemler uygulandı. Her bir standart HPLC sistemine 20 μL enjekte edilerek 310 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı ve elde edilen değerlerden kalibrasyon grafiği çizildi (Tablo 10, Grafik 6).

Tablo 10: MDA standart çözeltilerinin pik alanı değerleri

Konsantrasyon (µmol/L)	Pik Alanı
20.00	210.8
10.00	102.2
5.00	53.7
2.50	26.9
1.25	13.0
0.63	9.1
0.31	4.8

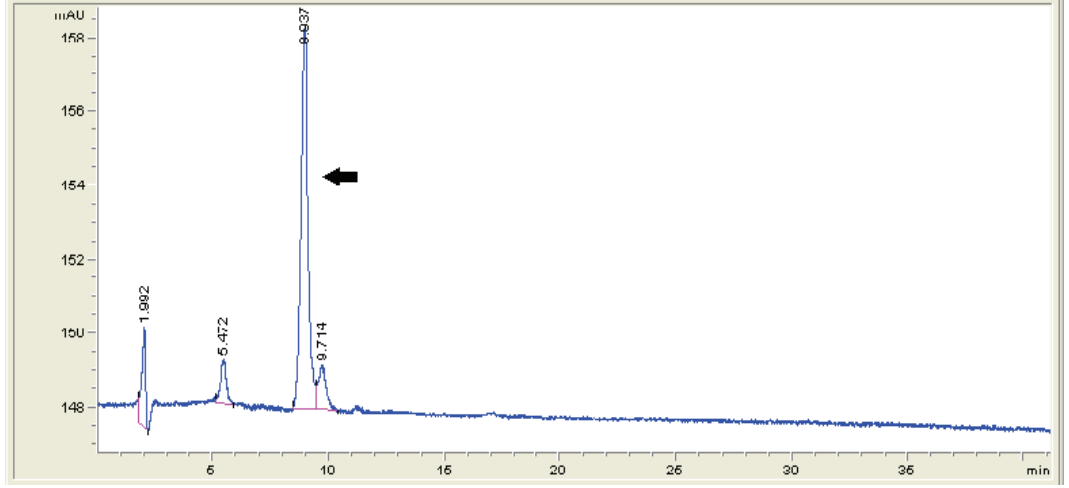
$$r^2=0.9995$$

$$y=10.422x+0.9799$$



Grafik 6: MDA standart kalibrasyon grafiği.

Standart çözeltilerine ait bir kromatogram Grafik 7’de verilmiştir.



Grafik 7: Standartlara ait bir MDA kromatogram örneği. Ok işareti MDA pikini göstermektedir.

3.4.Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Çalışma sonucu elde edilen veriler ortalama (standart sapma) olarak ifade edilmiştir. Parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması, student-t testi ve Mann-Whitney U (küçük gruplar için) testi kullanılarak yapılmıştır. Normal doku tümörlü doku karşılaştırmasını yapabilmek için Compared-t testi ve Wilcoxon Signed Ranks testi (küçük gruplar için) kullanılmıştır. Parametreler arasındaki korelasyonların incelenmesinde Pearson korelasyon testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 11.5 Paket Programı ile yapılmıştır (SPSS Inc, USA).

4.BULGULAR

4.1.Hasta Grubunda Normal ve Tümör Dokularındaki hTERT, Pontin, Reptin ve Diskerin Gen Ekspresyonlarının Düzeyleri

Çalışmamızda total hastaların %40.7'sinde (3 meme, 2 mide, 5 kolon, 1 yumuşak doku kanseri=toplam 11 kişi) bütün genlerin RK değerleri 1'in üzerinde iken %29.6'sında (3 meme, 2 mide, 3 kolon=toplam 8 kişi) bütün genlerin RK değerleri 1'in altında bulunmuştur. Bazı normal ve tümör dokusu örneklerinde ekspresyon gözlenmediği için RK değeri sayısal olarak hesaplanamamıştır. Bu örneklerdeki gen ekspresyon sonuçları "tümörlü dokudaki ekspresyon normal dokudan fazla/az" şeklinde ifade edilmiştir. Total hasta grubunda, tümör doku ekspresyonu normal doku ekspresyonundan fazla olan örnekler, hTERT için %55.6, pontin için %77.8, reptin için %66.7, diskerin %55.6 oranında bulunmuştur. Tablo 11'de gen ekspresyonları normal dokuya kıyasla tümörlü dokuda daha fazla olan örneklerin ilgili gruplar içindeki oranları verilmiştir.

Tablo 11: Gen ekspresyonları normal dokuya kıyasla tümörlü dokuda daha fazla olan örneklerin ilgili gruplar içindeki oranları*

	Total Hasta (n=27)	Kolon (n=13)	Meme (n=7)	Mide (n=6)	Yumuşak Doku (n=1)
hTERT	15/27 (55.6)	9/13 (69.2)	3/7 (42.9)	2/6 (33.3)	1/1 (100)
Pontin	21/27 (77.8)	11/13 (84.6)	5/7 (71.4)	4/6 (66.7)	1/1 (100)
Reptin	18/27 (66.7)	7/13 (53.8)	6/7 (85.7)	4/6 (66.7)	1/1 (100)
Diskerin	15/27 (55.6)	5/13 (38.5)	5/7 (71.4)	4/6 (66.7)	1/1 (100)

*RK değeri 1'in üzerinde olan değerler dikkate alınmıştır.

Tablo 12, 13, 14 ve 15'te hasta grubunda ölçülen hTERT, pontin, reptin ve diskerin gen ekspresyonlarının normal dokularda ve tümör dokularındaki düzeyleri ile tümör dokusu/normal doku ekspresyon oranları (RK) yer almaktadır.

Tablo 12: Hasta grubunda hTERT geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

Hasta No	Cinsiyet	Evre	Normal Doku Ekspresyonu (β -aktin/hTERT Oranı)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (β -aktin/hTERT Oranı)	RK Ekspresyon Oranı (Tümör Dokusu/ Normal Doku)
Kolon					
1	Kadın	1	0.0000706	0.0014076	19.92328 ^e
2	Kadın	3	0.0000535	0.0000610	1.140764 ^e
3	Kadın	4	0.0000466	0.0001130	2.424893 ^e
4	Erkek	4	0.0002010	0.0002460	1.223881 ^e
5	Kadın	2	0.0001690	0.0002017	1.193619 ^e
6	Kadın	4	0.0000000	0.0034010	Hesaplanamadı ^b
7	Kadın	3	0.0000000	0.0000167	Hesaplanamadı ^b
8	Erkek	1	0.0000527	0.0000000	0.0000000 ^c
9	Erkek	2	0.0000447	0.0000650	1.454139 ^e
10	Erkek	1	0.0000131	0.0000000	0.0000000 ^c
11	Kadın	3	0.0000169	0.0000000	0.0000000 ^c
12	Kadın	1	0.0008774	0.0014000	1.595633 ^e
13	Erkek	1	0.0000161	0.0000000	0.0000000 ^c
Meme					
1	Kadın	2	0.0000000	0.0000000	Hesaplanamadı ^a
2	Kadın	2	0.0000000	0.0000000	Hesaplanamadı ^a
3	Kadın	2	0.0000000	0.0000204	Hesaplanamadı ^b
4	Kadın	2	0.0000000	0.0000083	Hesaplanamadı ^b
5	Kadın	1	0.0000000	0.0000193	Hesaplanamadı ^b
6	Kadın	3	0.0000000	0.0000000	Hesaplanamadı ^a
7	Kadın	2	0.0000000	0.0000000	Hesaplanamadı ^a
Mide					
1	Kadın	-	0.0000000	0.0000075	Hesaplanamadı ^b
2	Kadın	4	0.0000000	0.0000000	Hesaplanamadı ^a
3	Erkek	3	0.0000000	0.0000231	Hesaplanamadı ^b
4	Erkek	1	0.0007610	0.0000035	0.0046386 ^d
5	Erkek	3	0.0001170	0.0000800	0.6837607 ^d
6	Erkek	4	0.0000351	0.0000000	0.0000000 ^c
Yumuşak Doku					
1	Erkek	3	0.000000	0.0001490	Hesaplanamadı ^b

a Normal ve tümör dokusunda ekspresyon yok

b Normal dokuda ekspresyon yok, tümör dokusunda ekspresyon var

c Normal dokuda ekspresyon var, tümör dokusunda yok

d Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha az

e Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha fazla

Tablo 13: Hasta grubunda pontin geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

Hasta No	Cinsiyet	Evre	Normal Doku Ekspresyonu (β -aktin/Pontin Oranı)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (β -aktin/Pontin Oranı)	RK Ekspresyon Oranı (Tümör Dokusu/ Normal Doku)
Kolon					
1	Kadın	1	0.0229841	0.2539416	11.04856 ^b
2	Kadın	3	0.0096564	0.0278842	2.887641 ^b
3	Kadın	4	0.0050130	0.0532900	10.63036 ^b
4	Erkek	4	0.0257370	0.0595400	2.313401 ^b
5	Kadın	2	0.0085201	0.0227916	2.675058 ^b
6	Kadın	4	0.0017825	0.1261144	70.75106 ^b
7	Kadın	3	0.0092522	0.0170879	1.846898 ^b
8	Erkek	1	0.0084315	0.0085492	1.013959 ^b
9	Erkek	2	0.0061857	0.0070961	1.147181 ^b
10	Erkek	1	0.0072151	0.0088866	1.231664 ^b
11	Kadın	3	0.0074943	0.0025594	0.3415101 ^c
12	Kadın	1	0.0479203	0.1704006	3.555914 ^b
13	Erkek	1	0.0062584	0.0037732	0.6029039 ^c
Meme					
1	Kadın	2	0.0000000	0.0387410	Hesaplanamadı ^a
2	Kadın	2	0.0073400	0.0144780	1.972480 ^b
3	Kadın	2	0.0098343	0.0245005	2.491315 ^b
4	Kadın	2	0.0041578	0.0155171	3.732042 ^b
5	Kadın	1	0.0065709	0.0166344	2.531513 ^b
6	Kadın	3	0.0083732	0.0078125	0.9330330 ^c
7	Kadın	2	0.0052992	0.0039883	0.7526234 ^c
Mide					
1	Kadın	-	0.0187868	0.0318392	1.694765 ^b
2	Kadın	4	0.0112121	0.0223767	1.995760 ^b
3	Erkek	3	0.0054860	0.0896220	16.33649 ^b
4	Erkek	1	0.0178240	0.0019130	0.1073272 ^c
5	Erkek	3	0.0148907	0.0315170	2.116558 ^b
6	Erkek	4	0.0019396	0.0018350	0.9460576 ^c
Yumuşak Doku					
1	Erkek	3	0.0072390	0.0170980	2.361928 ^b

a Normal dokuda ekspresyon yok, tümör dokusunda ekspresyon var

b Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha fazla

c Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha az

Tablo 14: Hasta grubunda reptin geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

Hasta No	Cinsiyet	Evre	Normal Doku Ekspresyonu (β -aktin/Reptin Oranı)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (β -aktin/Reptin Oranı)	RK Ekspresyon Oranı (Tümör Dokusu/Normal Doku)
Kolon					
1	Kadın	1	0.0660443	0.1332386	2.017412 ^a
2	Kadın	3	0.0115624	0.0561128	4.853025 ^a
3	Kadın	4	0.0231960	0.0934280	4.027763 ^a
4	Erkek	4	0.0392820	0.0953910	2.428364 ^a
5	Kadın	2	0.0423939	0.0445016	1.049717 ^a
6	Kadın	4	0.0035369	0.1330185	37.60855 ^a
7	Kadın	3	0.0351581	0.0238478	0.6783022 ^b
8	Erkek	1	0.0289559	0.0092265	0.3186402 ^b
9	Erkek	2	0.0094204	0.0091628	0.9726549 ^b
10	Erkek	1	0.0306069	0.0155171	0.5069797 ^b
11	Kadın	3	0.0310341	0.0103087	0.3321715 ^b
12	Kadın	1	0.2669081	0.3597935	1.348005 ^a
13	Erkek	1	0.0480273	0.0055243	0.1150235 ^b
Meme					
1	Kadın	2	0.0163530	0.1215820	7.434831 ^a
2	Kadın	2	0.0099580	0.0178240	1.789918 ^a
3	Kadın	2	0.0439872	0.0965528	2.195019 ^a
4	Kadın	2	0.0076264	0.0323181	4.237669 ^a
5	Kadın	1	0.0120906	0.0718782	5.944943 ^a
6	Kadın	3	0.0106722	0.0096183	0.9012505 ^b
7	Kadın	2	0.0087895	0.0089122	1.013959 ^a
Mide					
1	Kadın	-	0.0433313	0.0494857	1.142030 ^a
2	Kadın	4	0.0105117	0.0237564	2.259994 ^a
3	Erkek	3	0.0137920	0.1707550	12.38073 ^a
4	Erkek	1	0.0445020	0.0074420	0.1672284 ^b
5	Erkek	3	0.0319258	0.0751575	2.354131 ^a
6	Erkek	4	0.0144779	0.0037994	0.2624292 ^b
Yumuşak Doku					
1	Erkek	3	0.0140820	0.0250330	1.777659 ^a

a Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha fazla

b Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha az

Tablo 15: Hasta grubunda diskerin geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

Hasta No	Cinsiyet	Evre	Normal Doku Ekspresyonu (β -aktin/Diskerin Oranı)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (β -aktin/Diskerin Oranı)	RK Ekspresyon Oranı (Tümör Dokusu/Normal Doku)
Kolon					
1	Kadın	1	0.0157381	0.1270865	8.075070 ^a
2	Kadın	3	0.0113135	0.0142068	1.255738 ^a
3	Kadın	4	0.0145790	0.0295640	2.027848 ^a
4	Erkek	4	0.0738120	0.0683930	0.9265838 ^b
5	Kadın	2	0.0283600	0.0230355	0.8122524 ^b
6	Kadın	4	0.0018230	0.1018268	55.85579 ^a
7	Kadın	3	0.0107464	0.0107464	1.000000 ^c
8	Erkek	1	0.0168629	0.0077585	0.4600938 ^b
9	Erkek	2	0.0069924	0.0053732	0.7684376 ^b
10	Erkek	1	0.0105253	0.0039063	0.3711309 ^b
11	Kadın	3	0.0125167	0.0016769	0.1339717 ^b
12	Kadın	1	0.0248377	0.0777924	3.132028 ^a
13	Erkek	1	0.0415214	0.0064343	0.1549635 ^b
Meme					
1	Kadın	2	0.0043465	0.0266450	6.130281 ^a
2	Kadın	2	0.0026680	0.0068010	2.549100 ^a
3	Kadın	2	0.0048718	0.0158374	3.250816 ^a
4	Kadın	2	0.0021559	0.0280781	13.02411 ^a
5	Kadın	1	0.0044429	0.0318007	7.157720 ^a
6	Kadın	3	0.0094859	0.0086086	0.9075192 ^b
7	Kadın	2	0.0052992	0.0041866	0.7900413 ^b
Mide					
1	Kadın	-	0.0150366	0.0268463	1.785397 ^a
2	Kadın	4	0.0094005	0.0188200	2.002029 ^a
3	Erkek	3	0.0287560	0.0379440	1.319516 ^a
4	Erkek	1	0.0174580	0.0054480	0.3120632 ^b
5	Erkek	3	0.0117387	0.0272838	2.324261 ^a
6	Erkek	4	0.0055627	0.0008680	0.1560413 ^b
Yumuşak Doku					
1	Erkek	3	0.0082010	0.0312500	3.810511 ^a

a Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha fazla

b Tümör dokusundaki ekspresyon, normal dokudaki ekspresyondan daha az

c Normal dokudaki ekspresyon ile tümör dokusundaki ekspresyon eşit

Total hasta grubunda pontin, reptin ve diskerinin; kolon kanserinde pontinin, meme kanserinde reptinin tümörlü dokudaki ekspresyonları, normal doku ekspresyonlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. hTERT ekspresyonu ise kolon kanseri grubunda tümör dokusunda yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildir (Tablo 16).

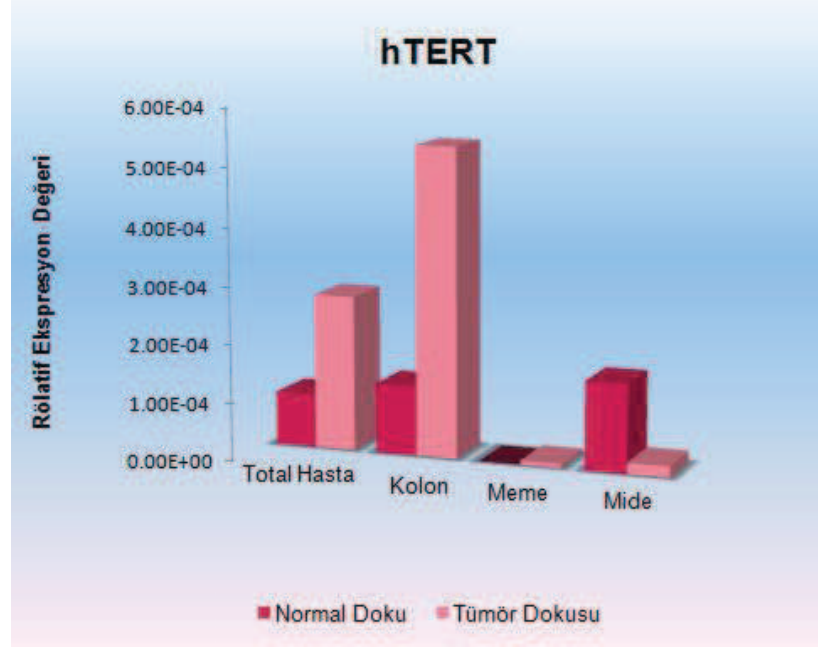
Tablo 16: Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan gen ekspresyonlarının ortalama değerleri

	Normal Doku Ekspresyonu (Standart Sapma)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (Standart Sapma)	p*
Total Hasta (n=27)			
hTERT	9.17E-05 (21.67E-05)**	26.75E-05 (72.66E-05)	0.214
Pontin	10.57E-03 (9.65E-03)	40.00E-03 (58.24E-03)	0.008
Reptin	3.40E-02 (4.92E-02)	6.31E-02 (7.62E-02)	0.006
Diskerin	14.78E-03 (15.04E-03)	27.71E-03 (31.35E-03)	0.042
Kolon (n=13)			
hTERT	1.20E-04 (2.36E-04)	5.32E-04 (9.98E-04)	0.064
Pontin	12.80E-03 (12.56E-03)	58.61E-03 (77.98E-03)	0.011
Reptin	4.89E-02 (6.76E-02)	7.61E-02 (9.73E-02)	0.173
Diskerin	20.74E-03 (18.95E-03)	36.75E-03 (42.39E-03)	0.754
Meme (n=7)			
hTERT	0.00E-00 (0.00E-00)	6.86E-06 (9.38E-06)	0.109
Pontin	5.94E-03 (3.22E-03)	17.38E-03 (11.48E-03)	0.063
Reptin	1.56E-02 (1.28E-02)	5.12E-02 (4.55E-02)	0.043
Diskerin	4.75E-03 (2.38E-03)	17.42E-03 (11.35E-03)	0.063
Mide (n=6)			
hTERT	15.22E-05 (30.17E-05)	1.90E-05 (3.11E-05)	0.225
Pontin	11.69E-03 (6.81E-03)	29.85E-03 (32.25E-03)	0.249
Reptin	2.64E-02 (1.55E-02)	5.51E-02 (6.28E-02)	0.345
Diskerin	14.66E-03 (8.07E-03)	19.54E-03 (14.14E-03)	0.345

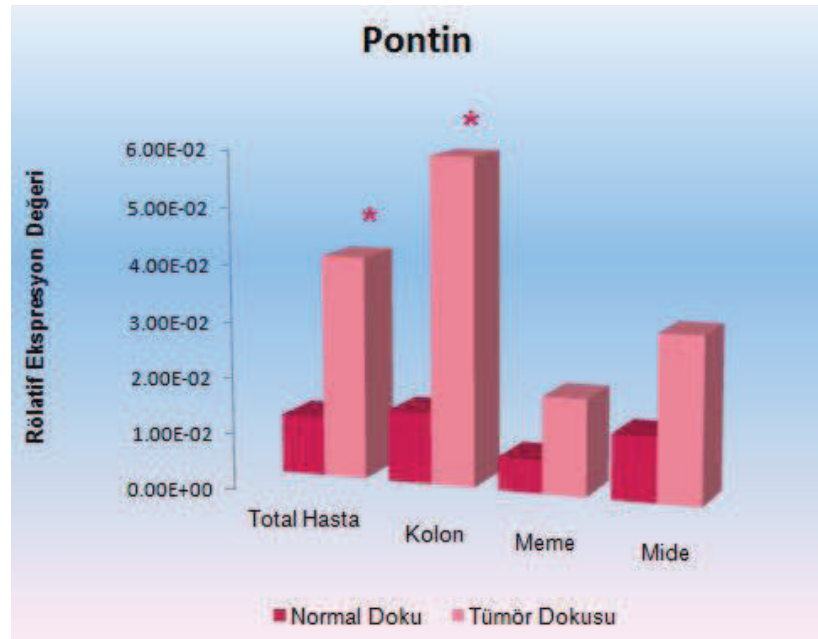
*p>0.05 anlamsız, p<0.05 anlamlı

**E-0n = x 10⁻ⁿ

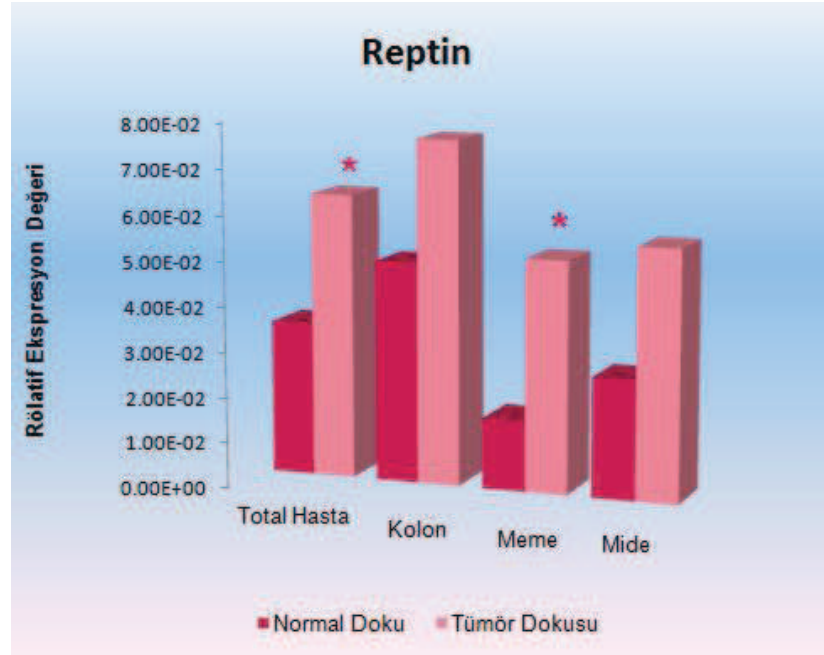
Grafik 8-11'de gen ekspresyonlarının kanser tiplerine göre normal ve tümörlü dokulardaki ortalama değeri gösterilmektedir.



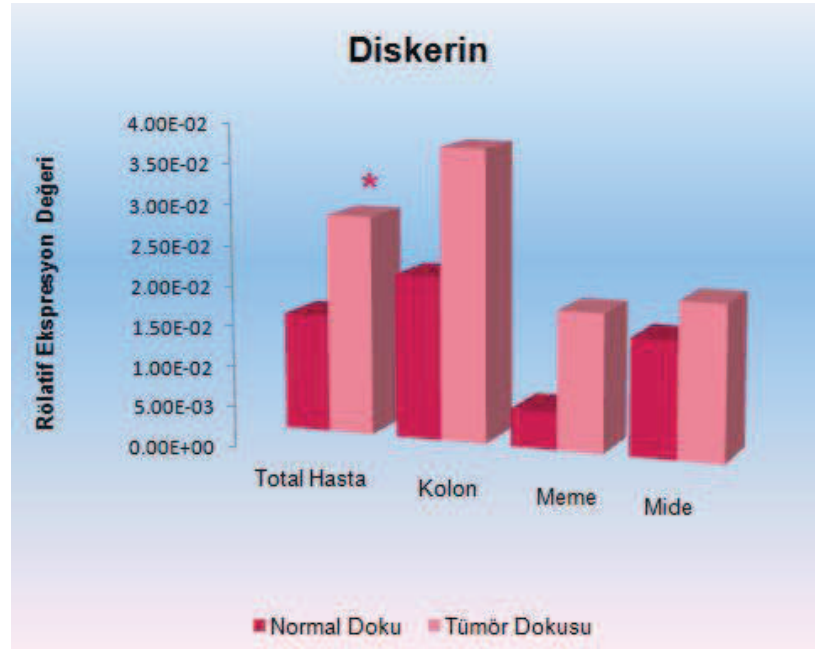
Grafik 8: Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan hTERT ekspresyonlarının ortalama değeri.



Grafik 9: Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan pontin ekspresyonlarının ortalama değeri.



Grafik 10: Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan reptin ekspresyonlarının ortalama değerleri.



Grafik 11: Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan disklerin ekspresyonlarının ortalama değerleri.

Total hasta grubunda ileri fazda pontin ve reptinin tümörlü dokudaki ekspresyonları, normal doku ekspresyonlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 17).

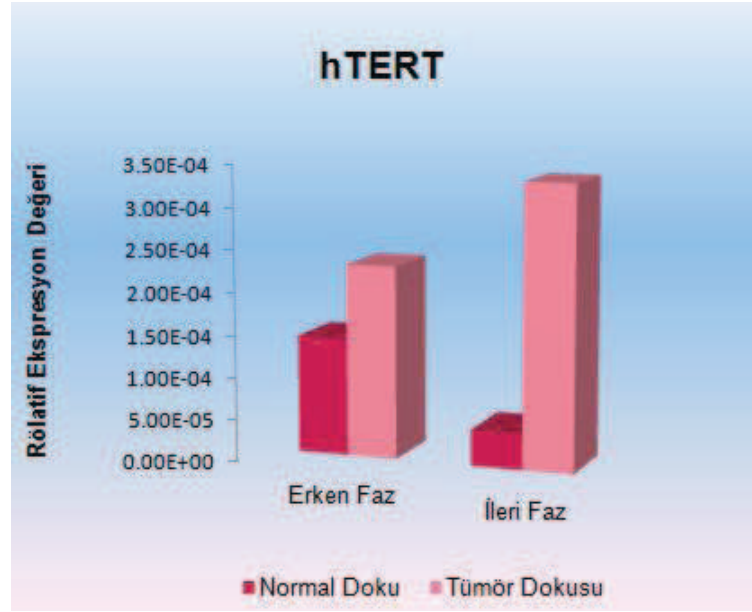
Tablo 17: Total hasta grubunda kanser fazına göre gen ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri

	Normal Doku Ekspresyonu (Standart Sapma)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (Standart Sapma)	p*
Erken Faz (n=14)			
hTERT	13.99E-05 (29.23E-05)	22.92E-05 (50.14E-05)	0.464
Pontin	11.40E-03 (11.93E-03)	42.94E-03 (74.18E-03)	0.098
Reptin	4.57E-02 (6.62E-02)	6.78E-02 (9.47E-02)	0.100
Diskerin	1.34E-02 (1.16E-02)	2.83E-02 (3.45E-02)	0.138
İleri Faz (n=12)			
hTERT	4.29E-05 (6.07E-05)	33.38E-05 (96.85E-05)	0.326
Pontin	8.92E-03 (6.47E-03)	37.23E-03 (38.58E-03)	0.031
Reptin	1.95E-02 (1.20E-02)	5.87E-02 (5.52E-02)	0.037
Diskerin	1.64E-02 (1.92E-02)	2.71E-02 (3.02E-02)	0.231

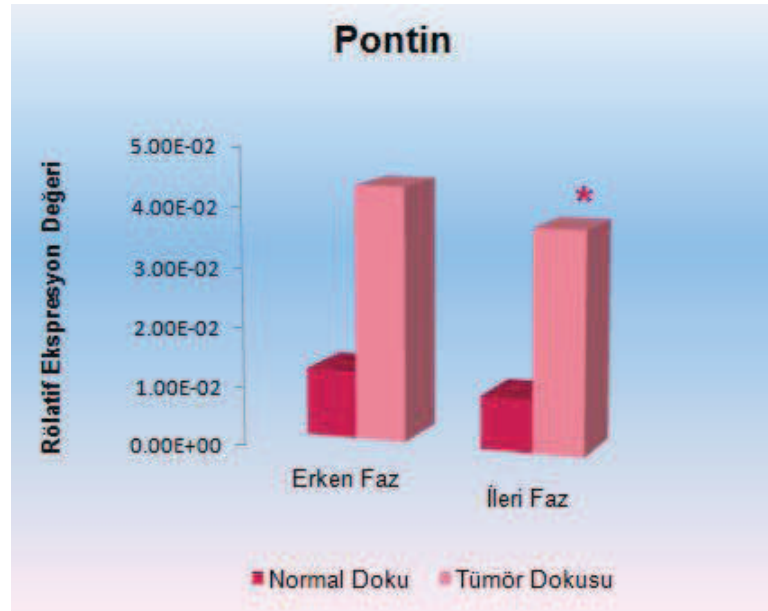
*p>0.05 anlamsız, p<0.05 anlamlı

Kanser türleri ve kanser fazına göre değerlendirme yapıldığında, meme kanserinde ileri fazda sadece 1 hasta, mide kanserinde de erken fazda sadece 1 hasta olması nedeniyle sadece kolon kanserine göre değerlendirme yapılmıştır. Kolon kanserinde sadece hTERT oranı erken fazda yüksek bulunurken, diğer genlerin mRNA ekspresyonları ileri fazda yüksek bulunmuştur ancak farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

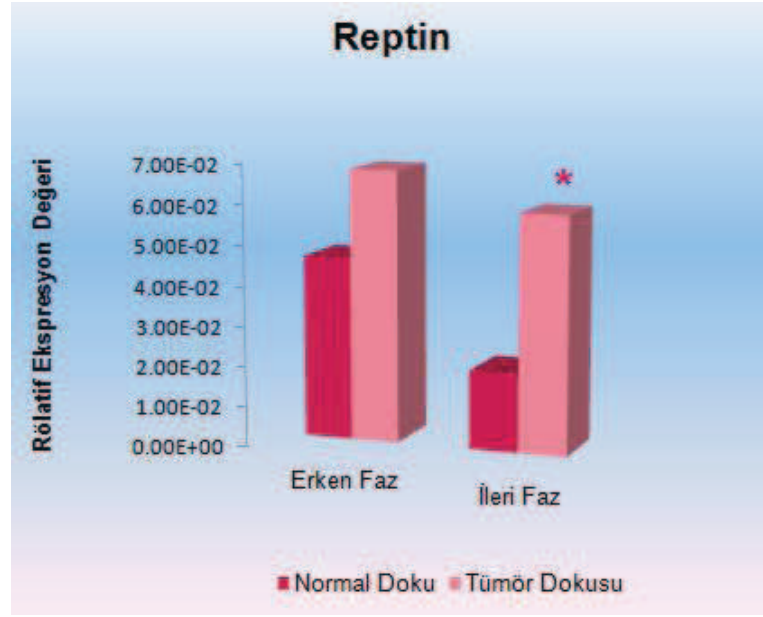
Grafik 12-15'te gen ekspresyonlarının total hasta grubunda kanser fazına göre normal ve tümörlü dokulardaki ortalama değerleri gösterilmektedir.



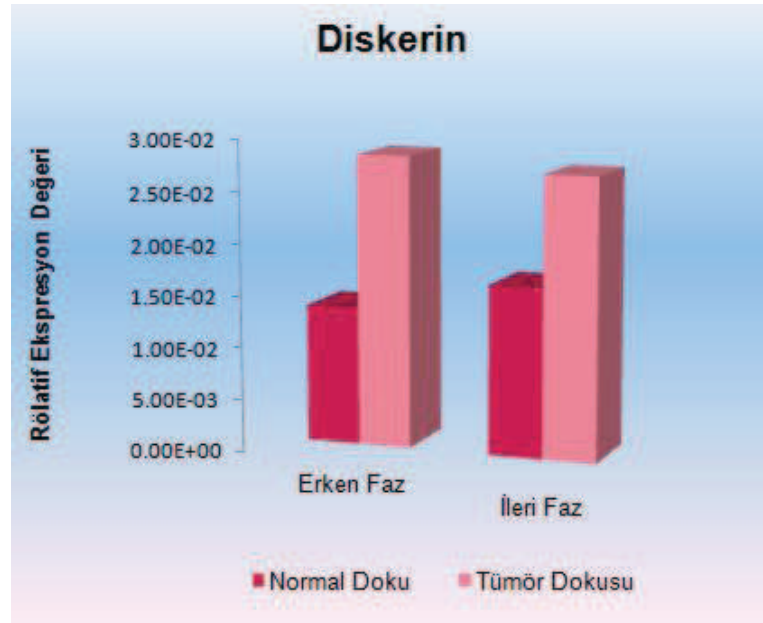
Grafik 12: Total hasta grubunda kanser fazına göre hTERT ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 13: Total hasta grubunda kanser fazına göre pontin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 14: Total hasta grubunda kanser fazına göre reptin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 15: Total hasta grubunda kanser fazına göre disklerin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.

Total hasta grubunda kadınlarda pontin, reptin ve diskerinin tümörlü dokudaki ekspresyonları, normal doku ekspresyonlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 18).

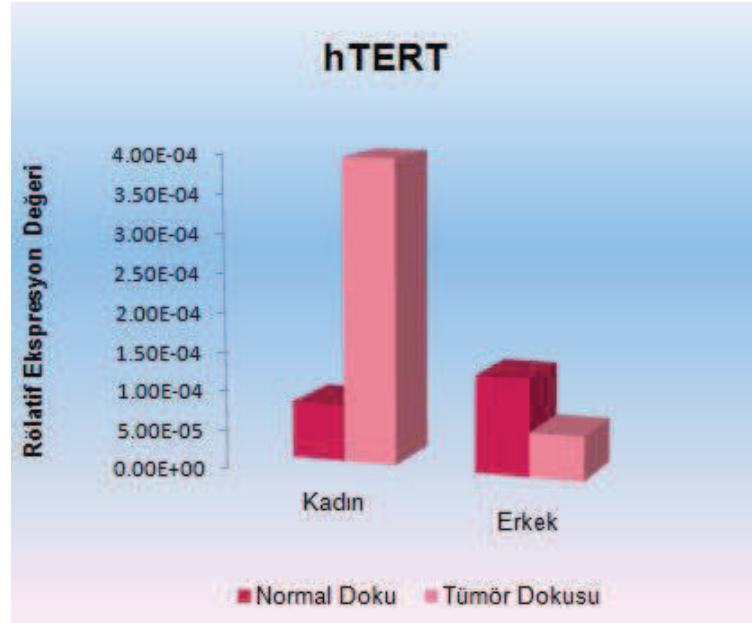
Tablo 18: Total hasta grubunda cinsiyete göre gen ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri

	Normal Doku Ekspresyonu (Standart Sapma)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (Standart Sapma)	p*
Kadın (n=17)			
hTERT	7.26E-05 (21.20E-05)	39.16E-05 (90.00E-05)	0.147
Pontin	10.84E-03 (11.05E-03)	50.00E-03 (68.82E-03)	0.020
Reptin	3.78E-02 (6.16E-02)	7.57E-02 (8.51E-02)	0.003
Diskerin	10.45E-03 (7.65E-03)	32.56E-03 (35.57E-03)	0.019
Erkek (n=10)			
hTERT	12.41E-05 (23.23E-05)	5.67E-05 (8.29E-05)	0.415
Pontin	10.12E-03 (7.18E-03)	22.98E-03 (29.45E-03)	0.184
Reptin	2.75E-02 (1.39E-02)	4.17E-02 (5.54E-02)	0.469
Diskerin	22.14E-03 (21.29E-03)	19.46E-03 (21.67E-03)	0.612

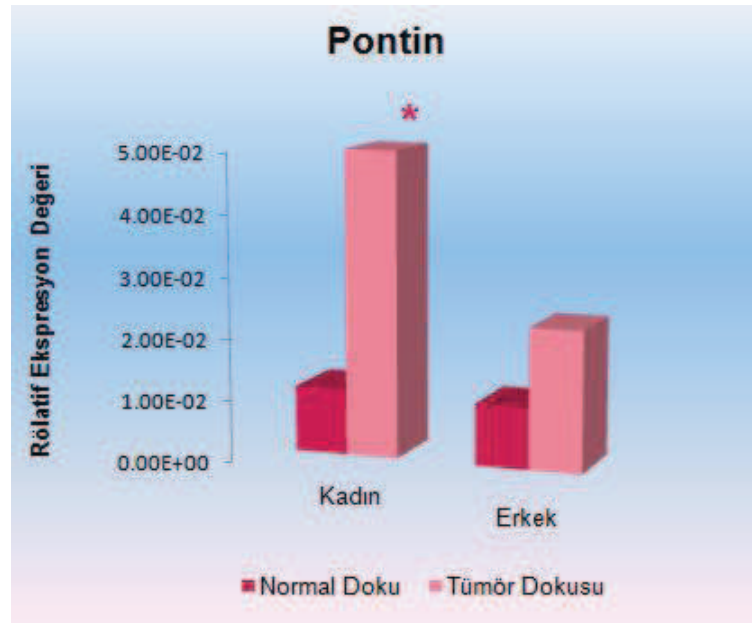
*p>0.05 anlamsız, p<0.05 anlamlı

Kanser türleri ve cinsiyete göre gen ekspresyonları değerlendirildiğinde sadece kolon kanserinde hTERT karşılaştırılması yapılabildi. Buna göre bütün genlerin ekspresyon oranları erkeklere göre kadınlarda daha yüksek bulunmakla birlikte, sadece pontin ve diskerinde anlamlı bir yükselme vardı (p=0.045).

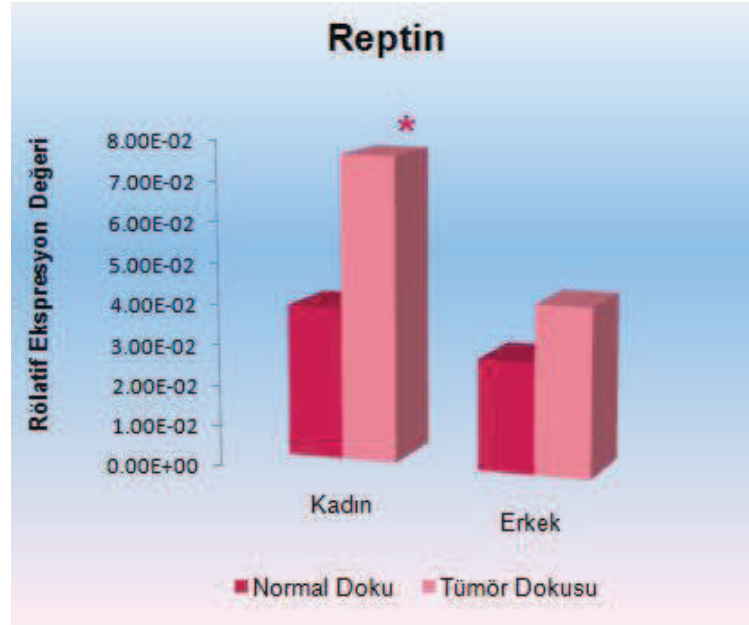
Grafik 16-19'da gen ekspresyonlarının total hasta grubunda cinsiyete göre normal ve tümörlü dokulardaki ortalama değerleri gösterilmektedir.



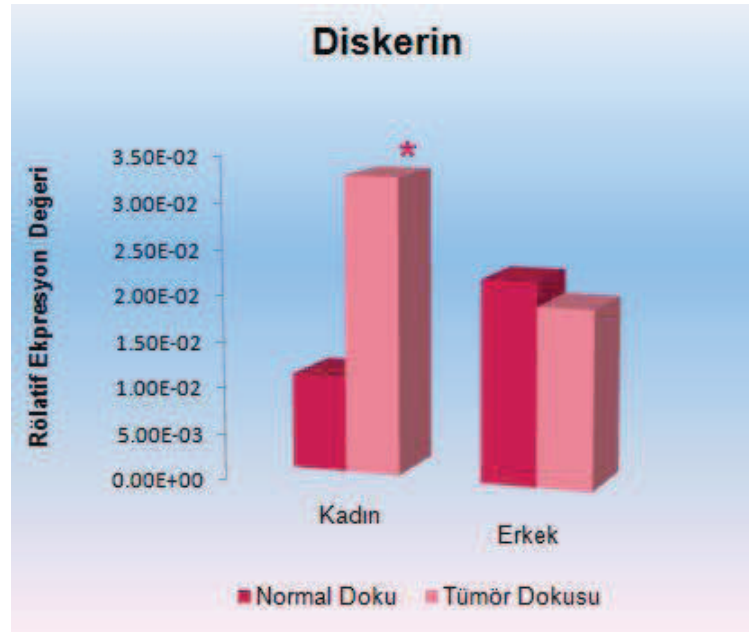
Grafik 16: Total hasta grubunda cinsiyete göre hTERT ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 17: Total hasta grubunda cinsiyete göre pontin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 18: Total hasta grubunda cinsiyete göre reptin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 19: Total hasta grubunda cinsiyete göre disklerin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.

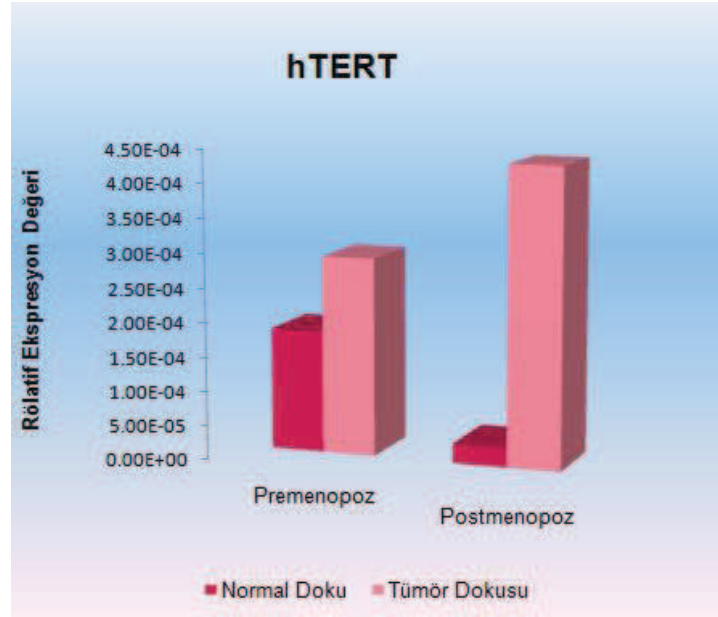
Kadın hasta grubunda postmenopoz durumunda reptinin tümörlü dokudaki ekspresyonları, normal doku ekspresyonlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 19).

Tablo 19: Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre gen ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri

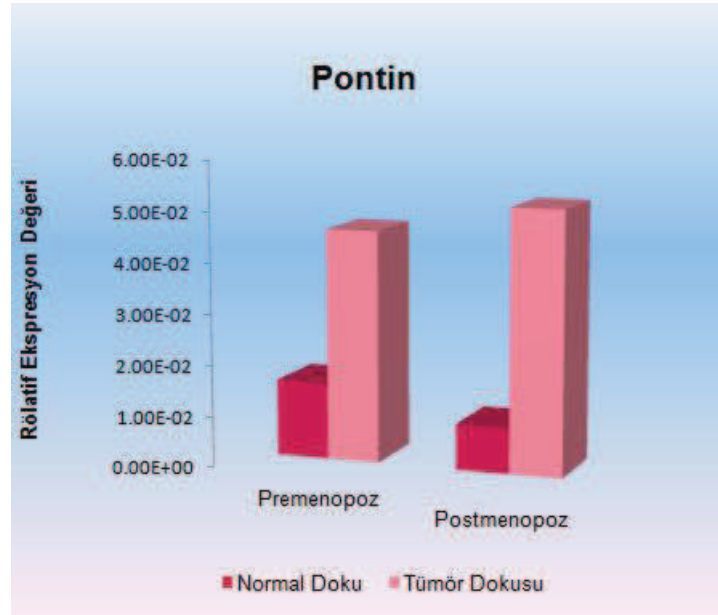
	Normal Doku Ekspresyonu (Standart Sapma)	Tümör Dokusu Ekspresyonu (Standart Sapma)	p*
Premenopoz (n=5)			
hTERT	17.88E-05 (39.05E-05)	28.95E-05 (62.07E-05)	0.344
Pontin	15.20E-03 (18.41E-03)	45.92E-03 (70.03E-03)	0.256
Reptin	7.23E-02 (10.98E-02)	11.42E-02 (14.13E-02)	0.093
Diskerin	9.76E-03 (9.29E-03)	31.04E-03 (28.67E-03)	0.112
Postmenopoz (n=12)			
hTERT	2.83E-05 (5.13E-05)	43.40E-05 (101.56E-05)	0.195
Pontin	9.02E-03 (6.49E-03)	51.70E-03 (71.38E-03)	0.054
Reptin	2.35E-02 (1.91E-02)	5.96E-02 (4.82E-02)	0.021
Diskerin	10.73E-03 (7.31E-03)	33.20E-03 (39.24E-03)	0.076

*p>0.05 anlamsız, p<0.05 anlamlı

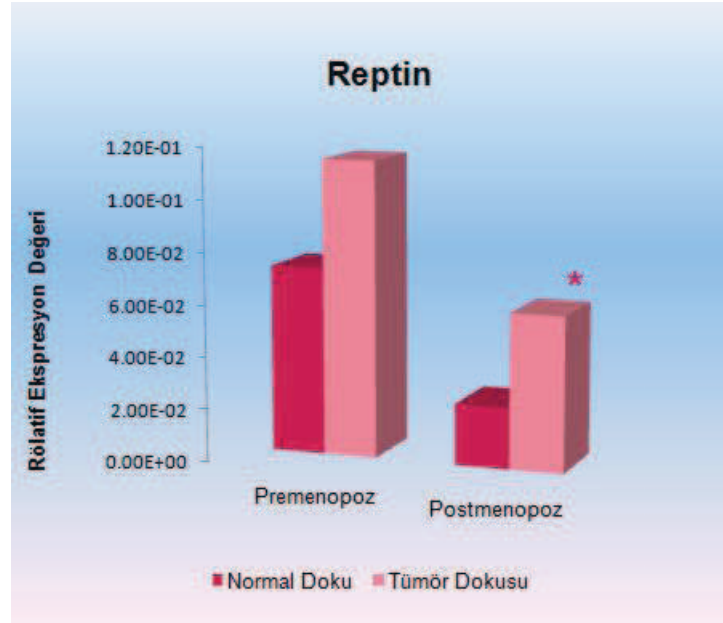
Grafik 20-23'te gen ekspresyonlarının kadın hasta grubunda menopozal duruma göre normal ve tümörlü dokulardaki ortalama değerleri gösterilmektedir.



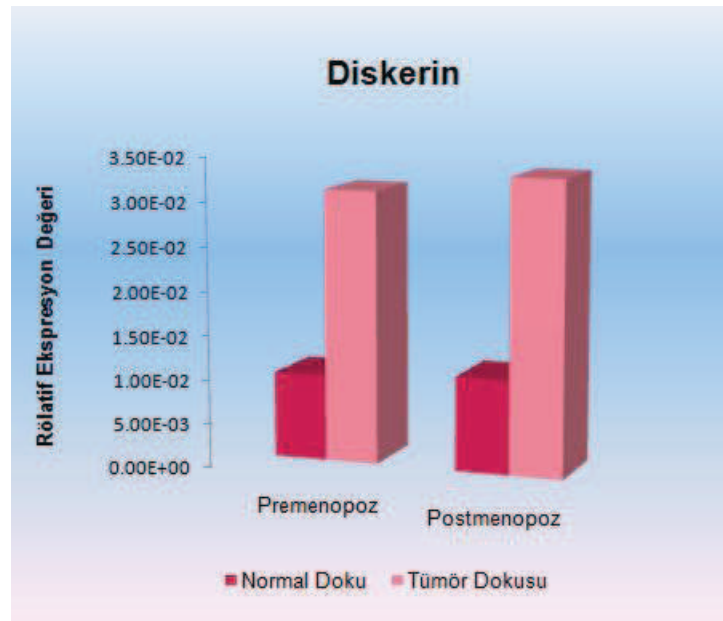
Grafik 20: Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre hTERT ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 21: Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre pontin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 22: Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre reptin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.



Grafik 23: Kadın hasta grubunda menopozal duruma göre disklerin ekspresyonlarının normal ve tümör dokularında saptanan ortalama değerleri.

4.2.Hasta ve Kontrol Gruplarında 8OHdG/Kreatinin ve MDA Düzeyleri

Tablo 20’de hasta ve kontrol gruplarında ölçülen idrar 8OHdG/kreatinin ve serum MDA düzeyleri yer almaktadır.

Tablo 20: Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen 8OHdG/kreatinin ve MDA değerleri

Hasta Grubu					Kontrol Grubu			
No	Cinsiyet	Evre	8OHdG/ Kreatinin Oranı (nM/mM)	MDA (μ M)	No	Cinsiyet	8OHdG/ Kreatinin Oranı (nM/mM)	MDA (μ M)
Kolon					1	Erkek	-	0.84
1	Kadın	1	-	-	2	Erkek	30.44	4.04
2	Kadın	3	21.67	5.02	3	Erkek	23.36	1.29
3	Kadın	4	72.01	1.87	4	Erkek	23.23	0.71
4	Erkek	4	20.73	3.87	5	Erkek	22.08	2.07
5	Kadın	2	33.77	3.21	6	Erkek	17.59	0.81
6	Kadın	4	19.36	4.66	7	Erkek	-	2.43
7	Kadın	3	24.00	2.42	8	Kadın	-	3.96
8	Erkek	1	22.33	3.46	9	Kadın	23.14	0.66
9	Erkek	2	18.04	3.48	10	Kadın	18.02	2.32
10	Erkek	1	14.41	2.73	11	Kadın	27.34	2.23
11	Kadın	3	36.29	2.86	12	Kadın	32.10	2.82
12	Kadın	1	19.02	2.44	13	Kadın	20.14	1.55
13	Erkek	1	24.56	2.32	14	Kadın	16.44	2.26
Meme					15	Kadın	-	2.44
1	Kadın	2	17.68	2.77	16	Erkek	25.45	2.94
2	Kadın	2	-	-	17	Erkek	8.69	2.97
3	Kadın	2	-	-	18	Kadın	-	2.62
4	Kadın	2	47.07	3.62	19	Erkek	11.45	1.96
5	Kadın	1	-	-	20	Kadın	31.65	3.28
6	Kadın	3	17.56	2.98	21	Kadın	30.82	3.02
7	Kadın	2	-	-	22	Kadın	21.90	3.19
Mide					23	Erkek	15.49	2.46
1	Kadın	-	15.55	4.23	24	Kadın	7.77	1.33
2	Kadın	4	23.99	4.03	25	Erkek	20.05	3.67
3	Erkek	3	41.38	4.37	26	Kadın	26.50	3.82
4	Erkek	1	32.46	2.41	27	Erkek	-	2.65
5	Erkek	3	18.02	3.94				
6	Erkek	4	22.42	2.99				
Yumuşak Doku								
1	Erkek	3	-	-				

Tablo 21’de hasta ve kontrol gruplarında ölçülen idrar 8OHdG/kreatinin ve serum MDA düzeylerinin ortalama değerleri yer almaktadır. Buna göre kontrol grubuna kıyasla serum MDA düzeyleri total hasta grubunda, kolon kanseri grubunda ve mide kanseri grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Tablo 21: Hasta ve kontrol gruplarında 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri

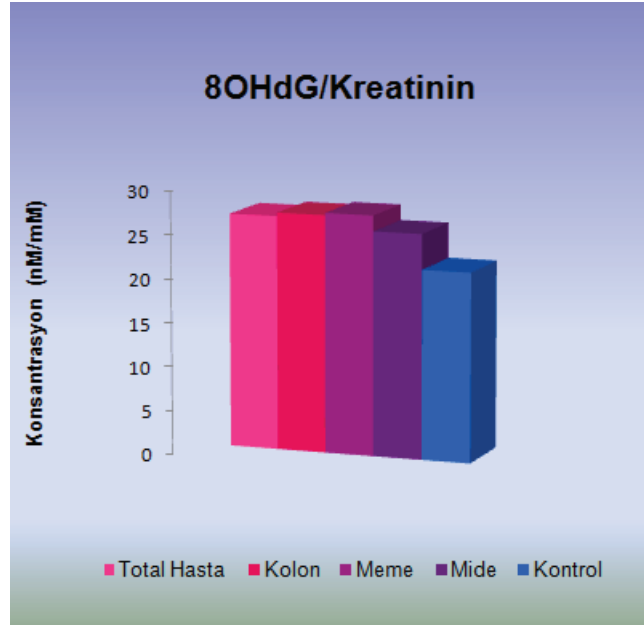
	Ortalama (Standart Sapma)	
	8OHdG/Kreatinin (nM/mM)	MDA (µM)
Total Hasta (n=27)	26.78 (13.56)	3.32 (0.85) ^a
Kolon (n=13)	27.18 (15.44)	3.19 (0.96) ^b
Meme (n=7)	27.43 (17.00)	3.12 (0.44)
Mide (n=6)	25.64 (9.67)	3.66 (0.78) ^c
Kontrol (n=27)	21.60 (7.12)	2.38 (0.99)

a, p=0.001 Kontrollerle karşılaştırıldığında

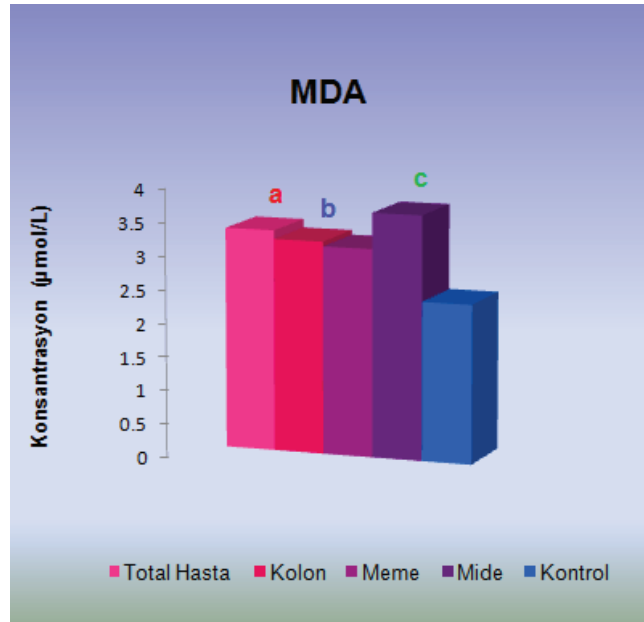
b, p=0.049 Kontrollerle karşılaştırıldığında

c, p=0.007 Kontrollerle karşılaştırıldığında

Grafik 24’te 8OHdG/kreatinin oranının, Grafik 25’te ise MDA’nın kontrol grubunda ve hasta gruplarında total ve kanser tiplerine göre ortalama değerleri verilmiştir.



Grafik 24: 8OHdG/kreatinin oranının kontrol ve hasta gruplarında total ve kanser tiplerine göre ortalama değerleri.

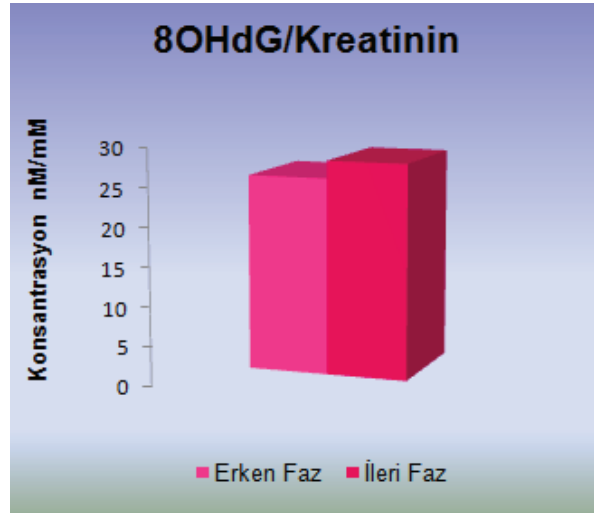


Grafik 25: MDA'nın kontrol ve hasta gruplarında total ve kanser tiplerine göre ortalama değerleri. Kontrollerle karşılaştırıldığında a, $p=0.001$; b, $p=0.049$; c, $p=0.007$ anlamlılık dőzeyi görölmektedir.

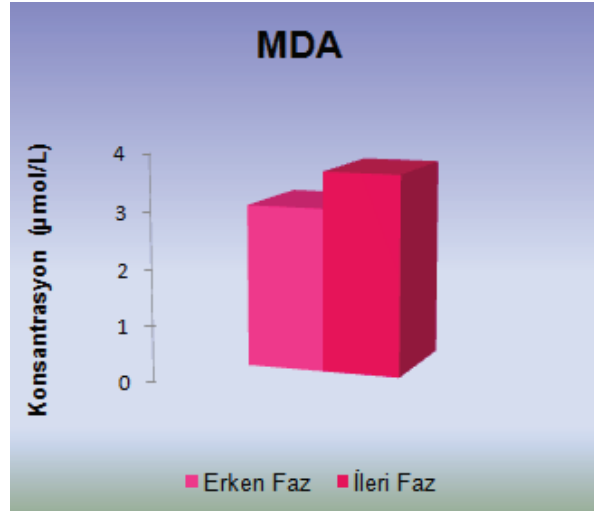
Total hasta grubunda kanser fazına göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri Tablo 22 ve Grafik 26, 27’de verilmiştir. Buna göre erken ve ileri fazlarda değerler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 22: Total hasta grubunda kanser fazına göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri

	Ortalama (Standart Sapma)	
	8OHdG/Kreatinin (nM/mM)	MDA (μM)
Erken Faz (n=15)	25.48 (10.46)	2.94 (0.51)
İleri Faz (n=11)	27.75 (15.89)	3.60 (0.96)



Grafik 26: Total hasta grubunda kanser fazına göre 8OHdG/kreatinin ortalama değerleri.

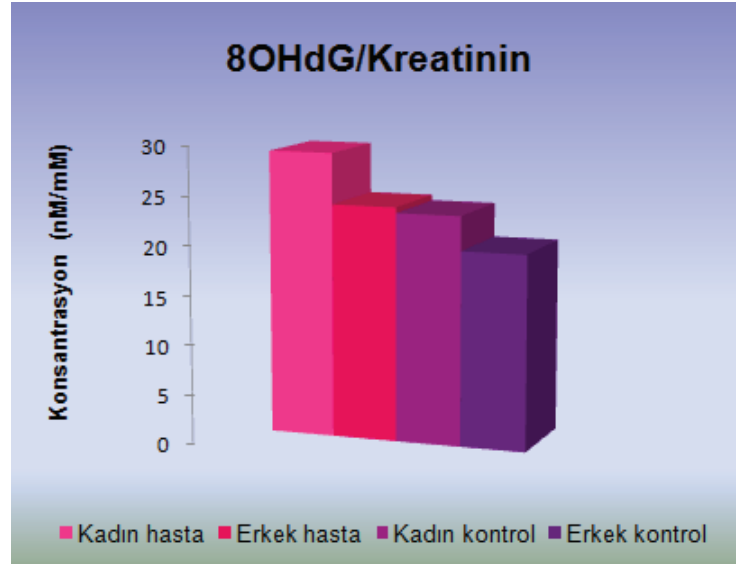


Grafik 27: Total hasta grubunda kanser fazına göre MDA ortalama değerleri.

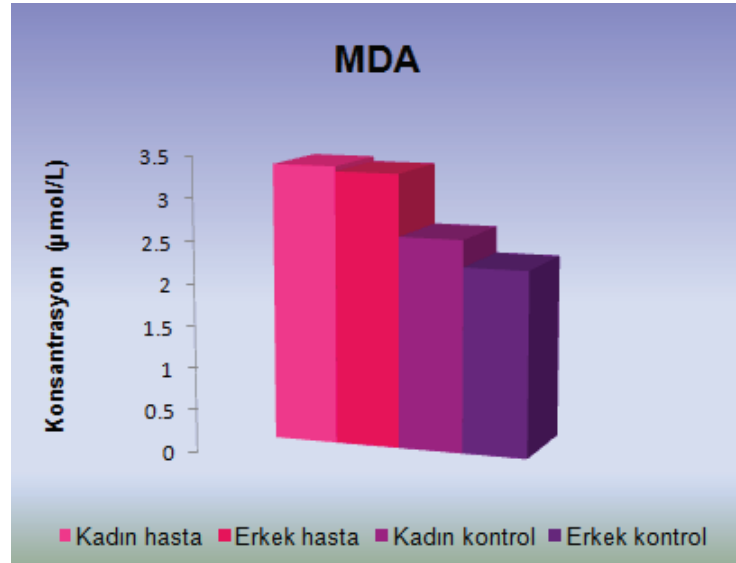
Cinsiyete göre parametre değerlerine bakıldığında kadın ve erkek gruplarında 8OHdG/kreatinin ve MDA düzeylerinde anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 23, Grafik 28, 29).

Tablo 23: Total hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri

Ortalama (Standart Sapma)		
	8OHdG/Kreatinin (nM/mM)	MDA (µM)
Hasta (n=27)		
Kadın (n=17)	29.00 (16.48)	3.34 (0.97)
Erkek (n=10)	23.82 (8.31)	3.28 (0.72)
Kontrol (n=27)		
Kadın (n=14)	23.26 (7.47)	2.54 (0.93)
Erkek (n=13)	19.78 (6.59)	2.22 (1.08)



Grafik 28: Total hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre 8OHdG/kreatinin ortalama değeri.

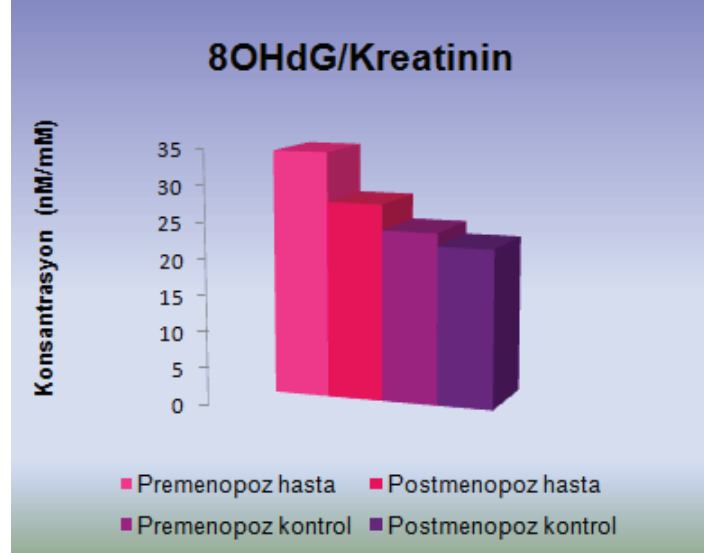


Grafik 29: Total hasta ve kontrol gruplarında cinsiyete göre MDA ortalama değeri.

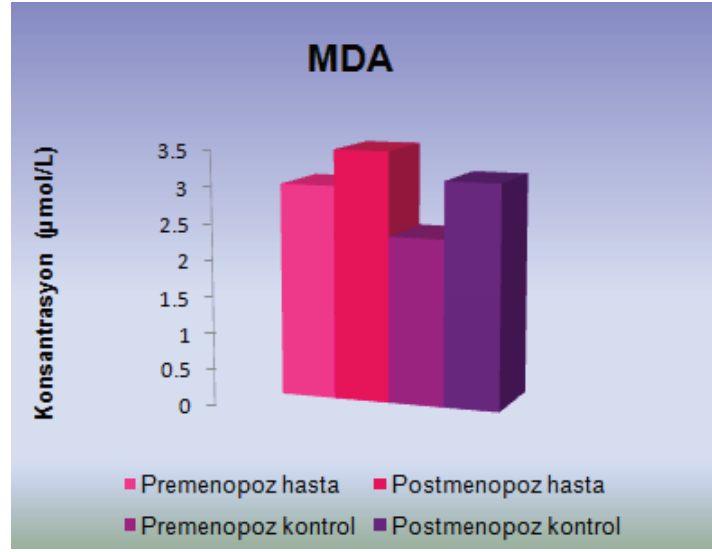
Total hasta ve kontrol gruplarında menopozal duruma göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri Tablo 24 ve Grafik 30, 31’de verilmiştir. Buna göre premenopoz ve postmenopoz grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 24: Total hasta ve kontrol gruplarında menopozal duruma göre 8OHdG/kreatinin ve MDA ortalama değerleri

	Ortalama (Standart Sapma)	
	8OHdG/Kreatinin (nM/mM)	MDA (μM)
Hasta (n=27)		
Premenopoz (n=5)	34.12 (14.15)	2.97 (0.60)
Postmenopoz (n=12)	27.29 (17.62)	3.47 (1.07)
Kontrol (n=27)		
Premenopoz (n=10)	23.74 (5.80)	2.31 (0.74)
Postmenopoz (n=4)	21.97 (12.57)	3.10 (1.22)



Grafik 30: Total hasta ve kontrol gruplarında menopozal duruma göre 8OHdG/kreatinin ortalama değerleri.



Grafik 31: Total hasta ve kontrol gruplarında menopozal duruma göre MDA ortalama değerleri.

4.3.Hasta Grubunda Gen Ekspresyonları, 8OHdG/Kreatinin ve MDA Arasındaki Korelasyonlar

Hasta grubunda gen ekspresyonlarının birbirleriyle korelasyonları ele alındığında total hasta grubunda ve kolon kanseri grubunda hTERT ile reptin dışında diğer genler arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur. Meme kanseri grubunda sadece pontin ile diskerin arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Mide kanserinde hTERT ile reptin ve diskerin arasında, pontin ile reptin arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir (Tablo 25).

Tablo 25: Gen ekspresyonlarının total hastalarda ve kanser tiplerine göre korelasyonları

Korelasyonlar (R/p)				
	hTERT	Pontin	Reptin	
Total Hasta (n=27)				
Pontin	0.752 / 0.002			
Reptin	0.208 / 0.475	0.975 / 0.000		
Diskerin	0.937 / 0.000	0.947 / 0.000	0.929 / 0.000	
Kolon (n=13)				
Pontin	0.742 / 0.009			
Reptin	0.175 / 0.606	0.988 / 0.000		
Diskerin	0.955 / 0.000	0.994 / 0.000	0.985 / 0.000	
Meme (n=7)				
Pontin	-			
Reptin	-	0.736 / 0.096		
Diskerin	-	0.914 / 0.011	0.643 / 0.119	
Mide (n=6)				
Pontin	0.907 / 0.277			
Reptin	0.999 / 0.028	0.995 / 0.000		
Diskerin	0.998 / 0.037	0.113 / 0.831	0.192 / 0.715	

Kanser fazına göre değerlendirme yapıldığında total hasta grubunda erken fazda diğer tüm genler arasında pozitif korelasyonlar gözlenirken sadece pontin ile reptin arasında korelasyon gözlenmemiştir. İleri fazda ise pontin ile tüm genler arasında, reptin ile disklerin arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Bununla birlikte anlamlılık düzeyine erişememesine rağmen hTERT ile reptin arasında da korelasyon gözlenmiştir. Kolon kanserinin erken fazında tüm genler arasında pozitif korelasyon gözlenirken ileri fazda disklerin ile tüm genler arasında, pontin ile reptin arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca anlamlılık düzeyine erişememesine rağmen hTERT ile pontin arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Meme kanserinde sadece erken fazda pontin ile disklerin arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Mide kanserinde sadece

ileri fazda pontin ile reptin arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir (Tablo 26).

Tablo 26: Gen ekspresyonlarının total hastalarda ve kanser tiplerine göre erken ve ileri faz korelasyonları

Korelasyonlar (R/p)				
	hTERT	Pontin	Reptin	
Total Hasta (n=27)				
Erken Faz (n=15)				
Pontin	0.969 / 0.000			
Reptin	0.799 / 0.017	0.313 / 0.276		
Diskerin	0.958 / 0.000	0.614 / 0.019	0.712 / 0.003	
İleri Faz (n=11)				
Pontin	0.923 / 0.009			
Reptin	0.806 / 0.053	0.990 / 0.000		
Diskerin	0.679 / 0.138	0.974 / 0.000	0.953 / 0.000	
Kolon (n=13)				
Erken Faz (n=7)				
Pontin	0.974 / 0.000			
Reptin	0.806 / 0.029	0.881 / 0.009		
Diskerin	0.957 / 0.001	0.985 / 0.000	0.885 / 0.008	
İleri Faz (n=6)				
Pontin	0.932 / 0.068			
Reptin	0.732 / 0.268	0.994 / 0.000		
Diskerin	0.978 / 0.022	0.994 / 0.000	0.995 / 0.000	
Meme (n=7)				
Erken Faz (n=6)				
Pontin	-			
Reptin	-	0.664 / 0.221		
Diskerin	-	0.903 / 0.036	0.571 / 0.236	
İleri Faz (n=1)				
Pontin	-			
Reptin	-	-		
Diskerin	-	-	-	
Mide (n=6)				
Erken Faz (n=1)				
Pontin	-			
Reptin	-	-		
Diskerin	-	-	-	
İleri Faz (n=4)				
Pontin	-			
Reptin	-	0.994 / 0.006		
Diskerin	-	-0.020 / 0.980	0.085 / 0.915	

Korelasyon tablolarına yumuşak doku sarkomu örnek sayısı yeterli olmadığı için dahil edilmemiştir.

Total hasta grubunda gen ekspresyonlarının 8OHdG/kreatinin ve MDA ile korelasyonları ele alındığında sadece MDA ile reptin arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir ($r=0.469$, $p=0.032$). 8OHdG/kreatinin ile MDA arasında korelasyon bulunamamıştır.

Total hasta grubunda gen ekspresyonlarının 8OHdG/kreatinin ve MDA ile korelasyonları cinsiyete göre ele alındığında erkeklerde 8OHdG/kreatinin ile pontin ve reptin arasında, MDA ile reptin ve diskerin arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir (Tablo 27).

Tablo 27: Total hasta grubunda cinsiyete göre gen ekspresyonlarının 8OHdG/kreatinin ve MDA ile korelasyonları

Korelasyonlar (R/p)		
	8OHdG/Kreatinin	MDA
Kadın		
hTERT	0.508 / 0.383	-0.378 / 0.531
Pontin	-0.102 / 0.765	0.365 / 0.270
Reptin	-0.149 / 0.645	0.441 / 0.151
Diskerin	-0.130 / 0.687	0.426 / 0.167
Erkek		
hTERT	-0.372 / 0.365	0.697 / 0.055
Pontin	0.731 / 0.025	0.660 / 0.053
Reptin	0.713 / 0.031	0.712 / 0.031
Diskerin	0.018 / 0.964	0.755 / 0.019

5.TARTIŞMA

Çoğu kanser hücresinde telomeraz aktivitesinin bulunması ve telomeraz aktivitesinin kanserin ilerlemesine uygun bir şekilde artış göstermesi; bu enzimin hem kanser tanısı için diagnostik bir belirteç hem de tümör seyrinin takibi için prognostik bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.^{2,9} Telomeraz enzim aktivitesinin hematolojik malignansi, beyin tümörleri, primer akciğer kanseri, hepatoselüler kanser, mide kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri, meme kanseri, serviks kanseri, endometriyal kanser, over kanseri ve mesane kanserinde arttığı belirlenmiştir.^{2,8}

Telomer dizisi kaybını telafi eden telomeraz, normalde germinal ve yetişkin kök hücrelerinde gözlenmektedir.¹¹³ Embriyogenez sonrası, çoğu somatik hücrede telomeraz aktivitesi kaybolmasına karşın fizyolojik olarak kendini dikkate değer biçimde yenileyebilen somatik hücrelerde telomeraz aktivitesinin düşük de olsa var olduğu gösterilmiştir.¹ Bu da göstermektedir ki bu enzim, ister normal ister malign olsun yüksek üreme hızı gösteren hücrelerde etkindir. Telomeraz aktivitesinin kanser hücrelerinde çoğunlukla ancak normal somatik hücrelerde nadiren saptanabildiği gösterilmiştir.^{1,8} Telomeraz ters transkriptazı insan somatik hücrelerine in vitro olarak sokulduğunda telomeraz aktivitesi yenilenmekte ve hücresel yaşam süresi dikkate değer biçimde artmaktadır.⁶ Telomerin korunması vasıtasıyla hücresel ölümsüzlük, bir tümör hücresini tanımlayan temel özelliklerden biri olarak kabul edilir. Malign kanserlerin büyük çoğunluğunun (%85-90), bu amaçla telomeraz aktivitesi göstererek, kalanının da telomerlerin alternatif uzatılması (ALT) olarak anılan bir rekombinasyon-bazlı mekanizmayı kullanarak telomerlerini koruduğu bilinmektedir.¹¹³

Telomeraz, 5'-TTAGGG-3' tekrarlarının kromozom uçlarından kaybını dengelemek üzere, bu tekrarları hücre siklusunun replikatif fazında telomerlerin sonuna eklemektedir.¹ Telomeraz enziminin aktif formunun en az üç bileşenden oluştuğu bilinmektedir: hTERC, hTERT ve diskerin. Telomerazın düzenlenmesi henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, çoklu mekanizmalar aracılığıyla oluştuğu düşünülmektedir. Telomerazın diğer bileşenleri her yerde eksprese edilmekte ve bu nedenle genel düzenleme büyük ölçüde hTERT gen ekspresyonuna bağımlı olmaktadır. hTERT gen promoterinin epigenetik durumu, transkripsiyon başlangıç bölgesi yakınındaki histon asetilasyonu ve DNA hipometilasyonu ile hTERT ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir belirleyicidir. hTERT, telomeraz aktivasyonundaki hız sınırlayıcı determinanttır ve hTERT'in hipermetilasyonu telomeraz ekspresyonu ile ilişkilidir.¹¹⁴

Total hasta grubundaki hTERT mRNA ekspresyon düzeylerinin ortalamalarını ele aldığımızda, tümör dokusunda ekspresyon yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildir. Cinsiyete göre karşılaştırma yapıldığında kadınlarda hTERT ekspresyonları yüksek ancak anlamlı değildir.

Total hasta grubuna bakıldığında, 15 hastanın hTERT mRNA ekspresyonu tümör dokusunda normal dokudan fazla bulunmuştur. hTERT mRNA ekspresyon düzeylerinin ortalamaları karşılaştırıldığında, kolon ve meme kanserinde tümör dokusundaki düzeyler normal dokudan anlamlılık düzeyine ulaşmasa da yüksek bulunmuştur. Yumuşak doku kanserli 1 hastanın normal dokusunda ekspresyon gözlenmezken, tümör dokusunda gözlenmiştir.

Çalışmamızda yer alan kolon kanserli hastaların %69.2'sinde (9/13) hTERT mRNA ekspresyonu tümör dokusunda normal dokudan fazla bulunmuştur. Bu hastaların 6'sı evre 3 ve 4' de yer almakta idi. Palmqvist ve arkadaşları, kolorektal kanserli hastalarla yürüttükleri çalışmalarında hastaların %77'sinde pozitif telomeraz aktivitesi ve %91'inde değişen düzeylerde hTERT mRNA ekspresyonu tespit etmişlerdir. Çalışmalarında hTERT ile telomeraz aktivitesi arasında pozitif korelasyon gözlemişlerdir.¹¹⁵ Benzer şekilde, Flavin ve arkadaşları çalışmalarında kolon kanserli hastaların %78'inde pozitif hTERT ekspresyonu göstermişlerdir.¹¹³ Saleh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kolorektal kanserli hastaların tümünde tümör dokularında hTERT ekspresyonu gözlenmiştir. hTERT'in tümör dokusundaki ekspresyonu normal dokudaki ekspresyonlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.¹¹⁶ Valls-Bautista ve arkadaşları, hTERT promoter metilasyonunun hTERT ekspresyonu ve telomeraz aktivitesi için gerekli olduğunu, ancak özellikle kolon kanserinde hTERT aktivasyonu için yeterli olmadığını öne sürmektedirler.¹¹⁷

Gigek ve arkadaşları, 55 mide kanserli hasta ve 18 kontrolle yaptıkları bir çalışmada tümör dokularının %80'inde hTERT ekspresyonu gözlerken kontrol dokularında ekspresyon olmadığını gözlemişlerdir. Hipermetilasyonun da normal mukoza ile karşılaştırıldığında tümöral mukozada artmış olduğu gözlenmiştir. Ancak hipermetillenmiş promoterler ile hTERT ekspresyonu arasında ilişki bulamamışlardır.¹¹⁸ Bir başka çalışmada, 42 mide kanserli hastanın %86'sında hTERT ekspresyonu gözlenmiş, ancak ekspresyon cinsiyet, tür, kanser fazı ile ilişkili bulunmamıştır.¹¹⁹ Çalışmamızda, mide kanserli 6 hastadan sadece 2'sinde (%33.3) hTERT mRNA ekspresyonu tümör dokusunda eksprese edilmiştir. Aynı hastaların normal dokusunda ekspresyon görülmemiştir. Mide

kanserli hastaların 1'inde ne normal ne de tümör dokusunda hTERT mRNA ekspresyonu gözlenmemiştir.

Çalışmamızda meme kanserli hastaların %42.9'unda hTERT mRNA ekspresyonu tümör dokusunda normal dokudan fazla bulunmuştur. Hastaların normal dokularının hiçbirinde ve tümör dokularının da bazılarında ölçülebilir düzeyde hTERT ekspresyonu gözlemedik. Kirkpatrick ve arkadaşlarının 18 meme kanserli hasta ile yaptıkları bir çalışmada ise, hTERT mRNA ekspresyonu telomeraz aktivitesi ile korelasyon göstermiş ve hTERT'in telomerazın katalitik ve hız sınırlayıcı subüniti olduğu hipotezi doğrulanmıştır.¹²⁰ Elkak ve arkadaşları 116 meme tümör dokusu ve 31 normal dokuda yaptıkları çalışmada, kanser dokularının hepsinde ve sağlıklı dokuların da çoğunda hTERT mRNA ekspresyonu gözlemlendiğini ve tümör doku ekspresyonunun yaklaşık 2.5 kat fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, kanser fazına göre hTERT ekspresyonunun arttığını da göstermişler ve hTERT'in, meme kanserinde kötü klinik sonuçla ilişkili olabileceğini ve prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar, hTERT'in sadece telomeraz aktivitesinin bir yansıması olmakla kalmayıp aynı zamanda telomerazın kontrolü için bir araç ve ilaç tedavi stratejileri için de potansiyel olarak yaşamsal bir öneme sahip olduğunu öne sürmüşlerdir.¹²¹ Çalışmamızda yer alan meme kanserli hastaların hepsinin erken fazda olması ve bir kısmında hTERT ekspresyonunun gözlenmemesi bahsedilen çalışmadaki sonuçlarla tutarlıdır. Bir başka çalışmada, plazmada hTERT ekspresyonu, 87 meme kanserli hastanın %47'sinde, kanser olmayan hasta 22 kişinin %32'sinde, 21 sağlıklı kontrolün %5'inde pozitif çıkmıştır.¹²² Rha ve arkadaşlarının çalışmasında, meme kanserli 45 hastanın 38'i (%84) telomeraz aktivitesi, 41'i (%91) hTERT ekspresyonu göstermiş, telomeraz aktivitesi en çok tam boy ve β -varyantlarında görülmüştür.¹²³ Dolaşım hTERT DNA'sının erken

meme kanserinde CA 15-3'ten daha iyi bir diagnostik belirteç olacağı öne sürülmektedir.¹²⁴

RuvB grubunda yer alan iki ökaryotik AAA+ proteini olan RUVBL1 ve RUVBL2, c-Myc ile ilişkili nükleer protein kompleksi, kromatin yeniden modelleme kompleksi, Tip60 histon asetilaz kompleksi gibi bazı makromoleküler grupların komponentleri olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, pontin ve reptinin; transkripsiyonel regülasyon, DNA onarımı, kromatin yeniden modelleme, apoptozis ve onkojenik transformasyon gibi farklı yollara katıldıklarını öne sürmektedir. Bununla birlikte pontin ve reptinin biyokimyasal özellikleri hakkında, etkili ATP hidrolizi için şart olan bir heteromultimer oluşturmalarının dışında, bilinenler aynıdır.¹²⁵ Pontin ve reptinin öne sürülen özelliklerini gösteren deneysel çalışmaların çok az olması nedeniyle, çalışmamızda da olduğu gibi son yıllarda giderek artan sayıda klinik çalışma yapılmaktadır.⁶⁵ Pontin ve reptinin kanserle ilişkisini öne süren ilk ipuçları, her iki proteinin de β -katenin^{76,126} ve c-Myc¹²⁷ ile olan ilişkisinin keşfinden gelmektedir. Ayrıca her iki protein de c-Myc tarafından regüle edilmektedir.^{19,65}

Çalışmamızda, pontin ve reptin için total hasta grubunda tümör doku ekspresyonu normal doku ekspresyonundan fazla olan örnekler, sırasıyla %77.8 ve %66.7 olarak bulunmuştur. Gen ekspresyon düzeylerinin ortalamaları ele alındığında pontin ve reptin tümör doku ekspresyonları normal doku ekspresyonlarından anlamlı derecede yüksektir. Evreye göre değerlendirme yaptığımızda, hem evre 1 ve 2'de hem de evre 3 ve 4'te her iki genin de tümör doku ekspresyonları normal dokulara göre yüksek olmasına karşın sadece ileri faz pontin ve reptin ekspresyonlarında normal dokularla karşılaştırıldığında anlamlılık bulunmuştur. Cinsiyete göre karşılaştırma yapıldığında kadınlarda pontin ve reptinin tümör doku ekspresyonları normal dokulara kıyasla anlamlı

derecede yüksektir. Premenopozal ve postmenopozal durumların her ikisinde tüm genlerde tümör doku ekspresyonu normal dokulara göre artmıştır ancak anlamlı artış sadece reptin geninde görülmüştür.

Yakın zamana kadar, pontin ve reptinin insan kanserlerindeki ekspresyonuna dair bilgi bulunmamakta idi. Rousseau ve arkadaşları tarafından 96 hepatoselüler karsinomalı (HCC) hastada yapılan çalışmada, çoğu hastada reptinin aşırı eksprese edildiği gözlenmiş ve reptinin tümör hücrelerinin yaşayabilmesi için gerekli olduğu öne sürülmüştür. Bu aşırı ekspresyonun tümör farklılaşma safhasıyla ilişkili olduğu ve kötü prognozun bir belirteci olabileceği düşünülmüştür. Son zamanlarda, reptinin anti-metastatik KAI1 geninin transkripsiyonu üzerinde β -kateninin baskılayıcı etkisi için gerekli olduğunun gösterilmiş olmasına rağmen, Rousseau ve arkadaşları reptin ekspresyonu ile β -katenin ekspresyonu arasında bir ilişki olmadığını göstermişlerdir.¹⁵ Bunu, β -kateninden bağımsız olmasının, reptinin onkojenik özelliklerini gösterebildiği şeklinde yorumlamışlardır. Haurie ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada pontinin de reptin gibi HCC'de aşırı eksprese edildiği ve HCC'de hücre büyümesi ve yaşaması için gerekli olduğu öne sürülmüştür. Araştırmacılar ayrıca, karsinogenezdeki muhtemel rolleri ve özgün hücre homeostazisi için pontin ve reptin arasındaki sitokiyometrinin sıkı kontrolünün sürdürülmesinin önemini vurgulamaktadırlar.¹⁴ Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada, pontinin aşırı eksprese edildiği ve β -katenin aracılı neoplastik transformasyonun önemli bir kofaktörü olduğu gösterilmiştir.¹¹

Çalışmamızda, kolon kanseri grubunda tümör doku ekspresyonu normal doku ekspresyonundan fazla olan örnekler, pontin için %84.6 ve reptin için %53.8 olarak bulunmuştur. Gerek pontin gerekse reptin ekspresyon oranları, kolon kanserli kadın hastalarda erkek

hastalardan ve post-menopozal kadınlarda da pre-menopozal kadınlardan daha yüksek bulunmuştur. Lauscher ve arkadaşlarının kolorektal kanserde yaptıkları bir çalışmada pontinin ve beraberinde β -kateninin up-regülasyonunun, kolorektal kanserin ilerlemesine katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir. Araştırmacılar, pontinin β -katenin ile etkileşerek, TCF (T hücre faktörü)/ β -katenin aracılı Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu arttırabileceğini ve böylece karsinogeneze katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir.¹² Wnt sinyalizasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının kontrolünde temel bir role sahiptir ve Wnt hedef genlerinin ekspresyonundaki artmaya yol açan kolorektal kanserde sıklıkla deregüle edilmektedir. Flavin ve arkadaşları çalışmalarında kolon kanserli hastaların %60'ında pozitif reptin ekspresyonu göstermişlerdir.¹¹³

Çalışmamızda kolon kanserli hastaların yalnızca 2'sinde tümör doku pontin ekspresyonu düşük görülmekle birlikte, 4'ünü erkeklerin oluşturduğu 6 hastada pontinin partneri olan reptinin ekspresyonu düşük bulunmuştur. Reptindeki bir down regülasyonun, DNA fragmentasyon oluşumu ve kaspaz 3 aktivitesindeki artma ile kanıtlandığı gibi hücre proliferasyonunda bir azalma ve tabi ki güçlü bir apoptozisin indüksiyonunu gösterdiği öne sürülmektedir. Yani reptin eksikliğinin apoptozisi indüklediği öne sürülmektedir. Çünkü reptindeki bir down regülasyon Bak1 (Bcl2 antagonist/killer1 proteini) ve Bax gibi proapoptotik proteinlerin konformasyonel aktivasyonlarındaki artışla ilişkili bulunmuştur. Onların aktivasyonu mitokondri dış membranının permeabilitesinde artışa yol açmakta, bu da sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Reptin eksikliği ile apoptozis indüklenmesi, proapoptotik Bcl2 ailesi üyelerinin aktivasyonu ile de ilişkili olabilmektedir.¹⁵

Mide kanseri grubumuzda tümör doku ekspresyonu normal doku ekspresyonundan fazla olan örnek oranları pontin ve reptin için %66.7 olarak tespit edilmiştir. Pontin ve reptin ekspresyonlarındaki artış aynı hastalarda gözlenmiştir. Li ve arkadaşları mide kanserli hastalarda, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında aşırı reptin ekspresyonu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, kanser hücrelerinin klonojenik potansiyeli için reptin gereksinimleri ile birlikte mide kanseri ve diğer katı tümörlerdeki aşırı reptin ekspresyonu bulgusunu, reptinin olası bir tedavi hedefi olabileceği şeklinde yorumlamışlardır.¹⁶

Telomeraz kompleksinin iki çekirdek bileşeninin, TERT ve TERC'in dışında kompleksin tam aktivitesi için çeşitli ilave faktörlere de gereksinim duyulmaktadır. Diskerin bunlardan biri olup, kompleks içinde TERC'e direkt bağlanmakta ve onu stabilize etmektedir. Diskerin RNP'nin biyogenezi için gerekli olan, oldukça iyi korunmuş ve yaşamsal bir nükleolar RNA bağlayıcı proteindir. Diskerinin fonksiyon kaybı, TERC'in kararlı durum düzeylerini düşürmekte, telomeraz aktivitesini azaltmakta ve prematüre (erken) telomer kısalmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, diskerinin ribozom yapımı ve fonksiyonunda da önemli roller oynadığı gösterilmiştir. H/ACA snoRNA'ya bağlanarak, diskerin prekürsör rRNA'nın post-translasyonel işlenmesinde de kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, diskerinin internal bir ribozom giriş bölgesi vasıtasıyla bir mRNA alt kümesinin translasyonunu regüle ettiği de öne sürülmektedir. Böylece diskerin, tümör hücre fenotipi için esas olarak önemli olan iki moleküler yolağın anahtar bir bileşenidir; neoplazmalar sadece telomer homeostazisi için bir mekanizmaya ihtiyaç duymamakta, protein sentezi için de yüksek bir talepleri bulunmaktadır. Bu amaçla, DKC1'in mRNA'sının, lenfoma, melanoma, nöroblastoma ve meme, kolon ve overin adenokarsinomalarını da içeren pek çok insan kanserinde sık sık ve önemli derecede aşırı eksprese edildiği görülmüştür.⁵³

Çalışmamızda, total hasta grubunda tümör doku diskerin mRNA ekspresyon değerleri normal dokulardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Cinsiyete göre karşılaştırma yapıldığında kadınlarda diskerinin tümör doku ekspresyonları normal dokulara kıyasla anlamlı derecede yüksek çıkarken, erkeklerde fark gözlenmemiştir. Kansere fazının da diskerin ekspresyonlarını değiştirmedini gözledik.

Montanaro ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, meme kanserli hastalarda diskerin mRNA düzeylerinin oldukça değişken ve TERC ile direkt olarak ilişkili olduğunu gösterdiler. Araştırmacılar, düşük diskerin ekspresyonunun daha iyi bir klinik bakım ve prognoz göstergesi olduğunu iddia ettiler.¹⁷ Çalışmamızda meme kanserli 7 hastanın 5'inde (%71.4) diskerin mRNA ekspresyonları tümör dokusunda normal doku ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bulunmuştur. 2 hastada ise diskerin ekspresyon düzeyleri normal ve tümör dokusunda birbirine yakın ancak normal dokuda daha yüksek olarak gözlenmiştir.

Çalışmamızda mide, kolon ve yumuşak doku kanserinde de diskerin mRNA ekspresyonunu inceledik. Ancak başka çalışma bulunmaması nedeniyle sonuçlarımızı karşılaştıramadık. Bununla birlikte kolon kanserinde elde ettiğimiz diskerin mRNA ekspresyon artışları meme kanserine göre düşük düzeydedir. 13 hastanın 5'inde (%38.5) diskerin ekspresyonu tümör dokusunda artarken, 4 hastada belirgin azalma, 4 hastada da düşük oranda azalma gözlenmiştir. Çalışmamızda yer alan hastaların yeni kanser teşhisi konmuş ve tedavi almamış olmaları nedeniyle, düşük diskerin düzeylerinin hastalığın fazı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, gerçekten de oldukça düşük diskerin düzeylerine sahip hastaların erken fazda oldukları gözlenmiş olsa da, erken fazda olup yüksek diskerin düzeylerine sahip 1 hasta bulunmaktadır. Etkili olabilecek diğer faktörler incelendiğinde dikkati çeken nokta, yüksek

tümör mRNA ekspresyonuna sahip hastaların tümünün kadın olduğu ve erkek hastaların hepsinde düşük tümör diskerin ekspresyonu gözlenmiş olmasıdır. Mide kanserinde yalnızca 2 (%33.3) hastanın tümör diskerin mRNA ekspresyon düzeylerinde belirgin düşme gözlenmiştir. Yumuşak doku kanserinde de tümör doku diskerin ekspresyonu artmıştır.

Telomeraz; yaşlanma, hücre yaşlanması ve kanserde önemli bir rol oynayan ve anti-kanser tedavide potansiyel bir hedef olarak odaklanılmış bir enzimdir. Venteicher ve arkadaşları, HeLa hücrelerinden; TERT, TERC ve diskerinden oluşan TERT kompleksinin afinite saflaştırmasını yaptılar ve pontin ile reptin ATPaz'larını da telomeraz bileşenleri olarak tanımladılar. TERT ile pontin ve reptin ilişkisi endojen düzeyde oluşmakta ve reptin bir TERT kompleksine pontin köprüsü vasıtasıyla dahil olmaktadır. Bu şekilde yeni tanımlanmış telomeraz kompleksinde pontin ve reptinin rollerine bakıldığında birincisi; pontin ve reptin, telomeraz bileşenleri TERT ve diskerin ile etkileşime girmekte, telomeraz aktivitesi ile TERC ve diskerin birikimi için kritik öneme sahip olmaktadır. İkincisi, pontin ve reptin, son derece S fazına özgü olan yeni bir TERT içeren kompleks oluşturmaktadır. Telomerazın hücre döngüsü sırasında dinamik olarak düzenlenme şekli uzun süre belirsiz kalmıştır. Venteicher ve arkadaşları TERT, pontin ve reptin arasındaki S fazına spesifik etkileşimin, TERT'in hücre döngüsü regülasyonunu ve hücre döngüsüne bağımlı bir şekilde telomeraz kompleksinin oluşumunu açıklayabileceğini ileri sürmektedir.⁹ Ayrıca, TERT komplekslerinin dinamik olduğunu ve bu nedenle en az iki farklı formda TERT kompleksinin var olduğunu iddia etmektedirler. Bu formların biri düşük telomeraz katalitik aktiviteli pontin/reptin/TERT kompleksi yani pretelomeraz kompleksi, diğeri de yüksek enzimatik aktiviteye sahip bir TERT/TERC/diskerin kompleksi yani olgun telomeraz kompleksidir. Adım adım montaj modelinde, oluşan pontin/reptin/TERT kompleksi, daha sonra TERT/TERC/diskerin kompleksi

oluşturacak şekilde yeniden şekillenmektedir. Telomeraz kompleksinin 3 bileşenden oluştuğunun söylenmesinin yanısıra 5 bileşenden oluştuğu da öne sürülmektedir.¹²⁸ Buna göre, TERT, TERC ve diskerinin yanısıra telomeraz montajına yardımcı olabilecek 2 ilave protein yani pontin ve reptin de telomeraz kompleksi içine dahil edilmektedir. Çalışmamız, bu komplekste yer alan bileşenlerin değişik kanser türlerinde incelenmesi üzerine kurgulanmıştır. Buna göre, genlerin birbirleriyle korelasyonlarını incelediğimizde, total kanser hastalarında hTERT ile pontin ve diskerin arasında yüksek pozitif korelasyon gözlememize rağmen, reptin ile bir korelasyon gözlemedik. Bunun yanında pontin ile reptin arasında ve diskerin ile pontin ve reptin arasında yüksek pozitif korelasyonlar gözlemledik. Total hasta grupları açısından ele alındığında, elde edilen korelasyonlar, kanserde telomeraz kompleksini doğrular niteliktedir. Diskerin ve hTERT, zaten aktif telomeraz kompleksinin bileşenleri olarak açıklanmışlardır. Pontin ve reptin ise bu oluşumun bir önceki safhası yani pretelomeraz kompleksinin bileşenleri ve ayrıca telomeraz kompleksinin oluşumuna yardımcı olabilecek proteinler olarak kabul edilmektedirler. Yani her ne kadar tümör hücresinde lider olan formun TERT/TERC/diskerin kompleksi olduğu kabul edilse de pontin ve reptinin gen ekspresyonlarının da artması beklenmelidir. Çalışmamızda reptin ile hTERT arasında korelasyon görülmesi de diğer bileşenlerle hTERT arasında yüksek korelasyon görülmesi, telomeraz kompleksi oluşumunda bu bileşenlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Sonuçların değerlendirilmesinde yapılan korelasyon işleminde RK yani tümör doku/normal doku oranlarının kullanılması gerekmektedir. Diğer genler hemen hemen tüm hastaların normal ve tümör dokusunun her ikisinde de eksprese edilirken hTERT 8 hastanın tümör dokusunda eksprese edilip normal dokularında değerlendirilebilir oranda eksprese edilmemiş, dolayısıyla bu hastalarda RK oranları hesaplanamamıştır. İlginç bir şekilde bu hastaların tümünde yüksek pontin RK oranları, aynı hastalar olmak üzere 7'sinde yüksek reptin ve diskerin RK oranları gözlenmiştir. Öte

yandan normal dokuda hTERT ekspresyonu olup tümör dokusunda ölçülebilir hTERT ekspresyonu göstermeyen 5 hastanın, diğer genlerinin de tümör doku ekspresyonu düşük bulunmuş, sadece 1'inde pontin RK değeri 1'in üzerinde çıkmıştır. Bu hTERT RK oranı hesaplanamayan 13 hasta istatistiksel değerlendirmeye dahil edilebilmiş olsaydı, elde edilen korelasyon değerleri genler arasındaki iddia edilen ilişkiyi destekler nitelikte olacaktı.

Kanser tiplerine göre ayrı ayrı değerlendirme yaptığımızda, kolon kanseri hastalarının total grubun yansıması niteliğinde olduğunu ve hemen hemen aynı korelasyon değerlerini gösterdiğini gözledik. Yukarıda bahsedildiği gibi hTERT ile reptin arasındaki ilişkiyi kolon kanseri grubunda da gözlemleyemedik. Flavin ve arkadaşları ise kolon kanserinde reptin ve TERT arasında pozitif bir korelasyon göstermişlerdir.¹¹³

Mide kanserli hastalarda ise hTERT'in ekspresyonunda çok değişken sonuçlar elde edilmiştir. Bir hastada her iki dokuda da ekspresyon gözlenmezken, 2 hastanın normal dokusunda, 1 hastanın da tümör dokusunda hTERT ekspresyonu gözlenememiştir. Bu nedenle hTERT ile diğer genler arasındaki korelasyonların değerlendirilmesinin doğru olmayacağı düşünülerek göz ardı edilmiştir. Bununla birlikte, diğer genler açısından değerlendirme yaptığımızda yalnızca pontin ile reptin arasında gözlenen pozitif korelasyon ve tümör doku ekspresyonlarındaki artış, bu iki genin farklı mekanizmalarla mide kanserinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Nitekim bu çalışmanın devamında pontin ve reptin ile Tip 60 arasında pozitif korelasyon gözlemledik (veriler bu çalışmaya dahil edilmemiştir). Li ve arkadaşları mide kanserli hastalarda, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında aşırı reptin ekspresyonu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca reptin ekspresyonu ile TERT ekspresyonu arasında pozitif ilişki olduğunu gösterdiler. TERT geni,

reptinin direkt hedefidir ve TERT'in transkripsiyonu, reptinin ekspresyonunu ve onun c-Myc ile kooperasyonunu gerektirmektedir. Böylece reptin telomerazı iki farklı düzeyde regüle etmektedir.¹⁶

Meme kanserli hastalarda da, değişken sonuçlar elde edilmesinden dolayı hTERT açısından değerlendirme yapmanın doğru olmadığı kanısındayız. Bununla birlikte meme kanserli hastalarda pontin ile reptin arasında zayıf ama diskerin ile güçlü pozitif korelasyon gözledik. Genel olarak meme kanserli hastalara tek tek bakıldığında genlerde aynı anda artma ve azalma gözlenmiştir. Montanaro ve arkadaşları, meme kanserli hastalarda diskerin mRNA değerlerinin düşmesi ile telomeraz aktivitesinin azalması arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Bunun TERT'ten bağımsız olduğunu ancak TERC düzeylerinin regülasyonu yoluyla olduğunu tespit etmişlerdir.¹⁸

ROT proteinler, lipitler ve DNA gibi bileşiklerin oksidatif modifikasyonlarını yaratma yeteneğine sahiptir.⁷⁹ DNA'nın oksijen serbest radikalleri ile hasara uğraması, sıklıkla insan kanserlerinin başlaması ve ilerlemesiyle ilişkili olan mutasyonlara neden olmaktadır.⁸⁶⁻⁸⁹ DNA'nın ROT indüklü oksidatif hasarı sonucu oluşan 8OHdG'nin, mutajenez ve karsinogenez süreçlerinde önemli olan oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak geniş kullanımı bulunmaktadır.^{80,88,90,91,97-99}

Yapılan çalışmalarda akciğer^{95,129,130} ve prostat⁹⁵ kanserli hastalarda idrar; meme^{95,131-133} ve kolon¹³⁴⁻¹³⁶ kanserli hastalarda idrar ve serum (veya plazma) 8OHdG düzeylerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu gözlenmiştir.^{137,138} Genel olarak kanserli hastalardaki düzeylerinin artmış olması, üriner 8OHdG'in kanser riskinin gösterilmesinde oldukça kullanışlı olduğunu göstermektedir.⁸⁰

Çalışmamızda idrar 8OHdG düzeylerinde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak total hasta, kolon, meme ve mide kanseri gruplarındaki hastaların tümünde kontrol grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha yüksek sonuçlar bulduk.

LP ürünleri ve reaktif oksijen türlerinin, DNA'ya bağlanmak suretiyle mutasyonlara ve kanserlerin başlamasına neden olduğu bulunmuştur. Çeşitli organlarda üretilen veya artan LP ürünleri serum içine salınmaktadır.^{79,87,106,109} LP'nin başlıca ürünü olan MDA'nın potansiyel olarak DNA hasarına, mutasyonuna ve karsinogeneze önemli katkıları vardır.⁸⁶

Yapılan çalışmalarda akciğer kanseri,^{129,139,140} prostat kanseri,¹⁴¹ endometriyal kanser,¹⁴² yumurtalık kanseri,¹⁴² ağız kanseri,¹⁴³ meme kanseri,¹⁴⁴⁻¹⁴⁹ kolon kanseri¹⁵⁰⁻¹⁵² ve mide kanserinde^{153,154} hasta gruplarının serum veya plazma MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlenmiştir.¹⁵⁵ Çalışmamızda serum MDA düzeylerinde diğer çalışmalarla uyumlu olarak, total hasta, kolon ve mide kanseri gruplarındaki hastaların tümünde kontrol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı derecede artış gözledik. Meme kanseri grubunda da yalnız 3 hastanın ölçümü yapılabildiği için istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın artış gözledik.

G-C içeriğinin fazla olması ve tekrarlayan DNA dizilerinin uzun olması, telomerleri telomerik olmayan baz dizilerine göre oksidatif stres hasarına daha açık hale getirdiğini düşündürmektedir. Ayrıca telomerik DNA dizisinin, direkt ROT ile veya indirekt olarak DNA onarım sürecinin bir parçası olarak tamir edilememesinden dolayı tek zincir kırıkları oluşabilmektedir. Bunun tersine antioksidanların in vitro olarak

telomer kısalma hızını azalttığı gösterilmiştir.¹⁵⁶ Peterson ve arkadaşları insan fibroblastlarındaki telomer restriksiyon fragmanlarının kısalma hızının oksidatif stres tarafından önemli derecede arttırılabileceğini belirtmişlerdir.¹⁵⁷

Artmış oksidatif stres altında telomeraz çekirdeğin dışında ve mitokondri içinde bulunabilmektedir. Bu telomeraz eksprese eden hücreler içinde azalmış oksidatif stresle ve geliştirilmiş mitokondriyal fonksiyon ile ilişkili görünmektedir. Saretzki, oksidatif stresin telomerik DNA hasarını arttırarak ve telomeraz düzeylerini düşürerek telomer kısalmasına katıldığını belirtmektedir. Oksidatif stresin telomerazın nükleustan mitokondriye geçişini indüklediği ileri sürülmektedir.¹⁵⁸

Lopez ve arkadaşları kemoterapötik ilaçların toksik mekanizmaları esnasında oluşan oksidatif stresin Bcl2 artışını indüklediğini, telomeraz aktivitesini arttırdığını ve onkojenik prosesleri reaktif ettiğini ileri sürmektedirler.¹⁵⁹

İntrasellüler ROT'un hTERT'i, ekspresyonunun ve aktivitesinin düzenlenmesi, lokalizasyonunu modüle etme ve işlevlerini değiştirme gibi değişik düzeylerde regüle ettiği gösterilmiştir.¹⁶⁰⁻¹⁶² Hücrel redoks durumunun hTERT biyolojisini etkilediğine dair inandırıcı kanıtlar olmasına rağmen, hTERT'in kanser hücresi redoks ortamı üzerine etkisi daha az tanımlanmıştır. Bu bağlamda çalışmalar, aşırı hTERT eksprese eden hücrelerde oksidatif strese karşı koruyucu bir hücrel yanıt öne sürmektedir.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Buna ek olarak, raporlar hTERT ekspresyonunun mitokondri fonksiyonunu onun kalsiyum tamponlama kapasitesini arttırarak ve $O_2^{\cdot -}$ üretimini azaltarak pozitif olarak etkilediğini de öne sürmektedir.¹⁶⁶

Pizzimenti ve arkadaşları bir LP ürünü olan 4-hidroksinonenalin hTERT'i inhibe ettiğini göstermişlerdir.¹⁶⁷

Nishikawa ve arkadaşları oksidatif stres belirteci olarak 8OHdG düzeylerini ölçtükleri bir çalışmada oksidatif stres düzeyi arttıkça ortalama telomer boyunun özellikle hTERT-negatif hepatoselüler karsinomlu hastalarda önemli derecede kısaldığını, hTERT-pozitif hücrelerin hTERT-negatif hücrelere göre çok daha proliferatif ve daha az apoptotik özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca telomeraz aktivitesinin hepatoselüler karsinomada oksidatif stresle güçlü bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Oksidatif stresin, telomer kısalması ile ilişkili olduğunu ve aynı zamanda telomeraz aktivasyonu ile hepatoselüler karsinomanın malignan potansiyelini arttırdığını ileri sürmektedirler.¹⁶⁸

Liu ve arkadaşları hepatoselüler karsinomada yaptıkları bir çalışmada, hepatoselüler karsinomalı örneklerin %85.7'sinde telomeraz aktivitesinin artmış olduğunu buna karşın kanser olmayan sirozlu örneklerin %13.4'ünde zayıf telomeraz aktivitesi bulunduğunu göstermişlerdir. Ayrıca MDA miktarının hepatoselüler karsinomalı ve sirozlu örneklerde anlamlı derecede farklı olduğunu gözlemişlerdir. Bununla birlikte telomeraz aktivitesi ile MDA miktarı arasında anlamlı pozitif korelasyon görülmesi, aynı zamanda anti-oksidatif sistemin disfonksiyonunun sirozun hepatoselüler kansere doğru ilerlemesiyle sıkı ilişki içinde olması nedeniyle oksidatif stresin kısmen telomeraz aktivitesine katkıda bulunabileceğini öne sürmektedirler.¹

Çalışmamızda gen ekspresyonlarıyla parametreler arasındaki korelasyon ele alındığında erkek hastalarda 8OHdG/kreatinin oranı ile pontin ve reptin arasında pozitif korelasyonlar bulunmuştur. Yine

erkek hastalarda MDA ile reptin ve diskerin arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Bununla birlikte erkek hastalarda MDA ile hTERT ve pontin arasında anlamlı olmayan pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalar ışığında, oksidatif stresin telomer kısalmasına neden olduğunu, telomeraz aktivitesini arttırdığını akla getirmektedir. Çalışmamızda bu hipotezle tutarlı olarak kanserli hastalarda oksidatif stres belirteçleri olan MDA ve 8OHdG düzeyleri artmış ve telomeraz komponenti proteinlerin gen ekspresyonlarıyla pozitif korelasyon göstermiştir.

6.SONUÇ

- Total hasta grubunda, tümör doku ekspresyonu normal doku ekspresyonundan fazla olan örnekler, hTERT için %55.6, pontin için %77.8, reptin için %66.7, diskerin için %55.6 oranında bulunmuştur.
- Total hasta grupları açısından ele alındığında, elde edilen korelasyonlar, kanserde telomeraz kompleksinin etkisini doğrular niteliktedir. Çalışmamızda reptin ile hTERT arasında korelasyon görülmesi, telomeraz kompleksi oluşumunda bu bileşenlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.
- Genlerin birbirleriyle korelasyonları değişken olmasına rağmen genel olarak aynı hastada hTERT hariç pontin, reptin ve diskerin ekspresyonları aynı anda artıp aynı anda azalmaktadır.
- Ekspresyon oranlarının aynı olmaması, bu genlerden sentezlenen proteinlerin muhtemelen başka yollarda da fonksiyon göstermesinden kaynaklanabilir. Değişik yollarda eksprese edilen farklı gen gruplarının bir arada çalışılması daha aydınlatıcı olacaktır.
- Kolon kanserinde erken fazda tüm genler arasında görülen korelasyonların ileri fazda aynı şekilde görülmemesi, genlerin kanserin ileri fazında farklı yollara yönelebileceğine işaret edebilir.
- Çalışmamızda, hasta ve sağlıklı kontrollerde oksidatif stres belirteçlerinden LP ürünü MDA ve DNA hasar ürünü 8OHdG çalışılmış, kanserli hastalarda daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir.

- MDA ve 8OHdG düzeyleri ile bazı genlerin ekspresyonları arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Bu sonuçlar serbest radikallerin telomeraz ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını tetikleyebileceği yönündeki çalışmaları destekler niteliktedir.
- Çalışmamız değişik kanser türlerinde pontin ve reptinin telomeraz kompleksinin oluşumundaki rollerine ışık tutarak, pontin veya reptini hedefleyen etkili terapötik ilaçların geliştirilmesi için de fikir verebilecektir.
- Bu araştırmada her bir hastadan alınan normal ve tümörlü doku örneklerini aynı anda çalışıp, kıyaslayarak oldukça net sonuçlar elde etmemize rağmen her hasta grubunda daha fazla örnekle çalışmak daha aydınlatıcı olacaktır.

7.ÖZET

KANSERDE TELOMERAZ AKTİVİTESİNİN DÜZENLENMESİ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, çevresel etkilerin yanı sıra genetik faktörlerin karsinogenez üzerindeki etkilerine odaklanılmaktadır. Tümör hücrelerinin ölümsüzlüğü ve karsinogenez süreci için telomeraz aktivitesi gereklidir. İnsan kanserlerinde telomeraz, fonksiyonel telomerlerin korunmasına yardım ederek tümör proliferasyonunu artırma görevi üstlendiği yerlerde up-regüle olmaktadır.

Çalışmamızda, RT-PCR yöntemiyle kolon, mide, meme ve yumuşak doku kanserlerinde telomeraz ile ilişkili hTERT, pontin, reptin ve diskerinin normal ve tümör dokularında gen ekspresyonlarının düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca kanserle ilişkisi bulunan oksidatif stres belirteçleri 8OHdG'in idrar düzeyleri ve MDA'nın serum düzeyleri ölçülmüştür.

Total hasta grubunda pontin, reptin ve diskerinin tümörlü doku ortalama ekspresyonları normal doku ortalama ekspresyonlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.006$ ve $p=0.042$). hTERT tümörlü doku ortalama ekspresyonu da normal doku ortalama ekspresyonundan yüksek bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.214$). Kanser türlerine göre değerlendirildiğinde, mide kanserinde hTERT ekspresyonu hariç, tüm kanser gruplarında genlerin tümörlü doku ortalama ekspresyonları normal doku ortalama ekspresyonlarından yüksek bulunmuştur. Ancak anlamlılık düzeylerinde artışlar kolon kanserinde pontinde ve meme kanserinde reptinde elde edilmiştir (sırasıyla $p=0.011$ ve $p=0.043$).

Çalışmamızda, total hasta ve tüm kanser gruplarında MDA ve 8OHdG/kreatinin düzeyleri kontrollere göre belirgin derecede yüksek bulunurken, anlamlı artışlar sadece total hasta, kolon ve mide kanseri gruplarında, MDA değerlerinde elde edilmiştir (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.049$ ve $p=0.007$).

Total hasta grubunda diğer tüm genler arasında pozitif korelasyonlar gözlenirken sadece hTERT ile reptin arasında korelasyon bulunamamıştır. Oksidatif stres belirteçleri ile gen ekspresyonları arasındaki korelasyonlar ele alındığında total hasta grubunda MDA ile reptin arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, tümör dokusunda artan pontin, reptin ve diskerin ekspresyonları kanserde, özellikle hastalığın erken fazında telomeraz aktivitesindeki artışı destekler nitelikte olabilir. Ayrıca kanserli hastalarda arttığı gösterilen oksidatif stres belirteçlerinin çalışılan genlerden sadece birkaçıyla bulunan pozitif korelasyonları, oksidatif stresin telomeraz aktivitesinde kısmen etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Telomeraz, hTERT, pontin, reptin, diskerin, kanser

8.SUMMARY

REGULATION OF TELOMERASE ACTIVITY IN CANCER

Recently, in addition to environmental effects, researches focused on effects of genetic factors on carcinogenesis. The telomerase activity is required for immortality of tumor cell and carcinogenesis process. In human cancers, telomerase is up regulated where it serves to increase tumor proliferation by helping to protection of functional telomeres.

In our study, gene expression levels of hTERT, pontin, reptin and dyskerin measured with RT-PCR method which telomerase related molecules in normal and tumor tissues in colon, gastric, breast and soft tissue cancers. In addition 8OHdG levels in urine and MDA levels in serum were measured which cancer related oxidative stress markers.

In total patient group, mean expression levels of pontin, reptin and dyskerin in tumor tissues were significantly higher than normal tissues ($p=0.008$, $p=0.006$ and $p=0.042$, respectively). Also mean expression levels of hTERT in tumor tissues were higher than normal tissues but it was not significant level ($p=0.214$). When we evaluated according to the types of cancer, average gene expression levels of tumor tissues in all cancer groups were higher than in normal tissues, except hTERT expression in gastric cancer. However, significantly increased levels were obtained for pontin in colon cancer and for reptin in breast cancer ($p=0.001$ and $p=0.043$, respectively).

In our study, while the levels of MDA and 8OHdG/creatinine in total patient group and all types of cancer were higher compared to

control group, significant increases were only in MDA levels in total, colon and gastric cancer groups ($p=0.001$, $p=0.049$ and $p=0.007$, respectively).

We did not find any correlation between hTERT and reptin, while all other genes were in positive correlations in total patient group. There was a positive correlation between MDA and reptin according to correlations between oxidative stress markers and gene expressions.

Results obtained in this study reveal that increasing expressions of pontin, reptin and dyskerin in tumor tissues may be supporting the telomerase activity in cancer, especially in the early stage of disease. Additionally, positive correlations observed between only a few of the studied genes and oxidative stress markers which were shown to have increasing levels in cancer patients lead us to suggest that oxidative stress may be partially effective in telomerase activity.

Key Words: Telomerase, hTERT, pontin, reptin, dyskerin, cancer

9.KAYNAKLAR

1. Liu DY, Peng ZH, Qiu GQ, Zhou CZ. Expression of telomerase activity and oxidative stres in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis. World J Gastroentero 2003; 9(8): 1859-1862.
2. Bayramoğlu A. Mesane kanserli hastaların idrar örneklerinde telomeraz enzim aktivitesi. FÜ Sağ Bil Tıp Derg 2006; 20(6): 423 426.
3. Ekmekçi A (Çev.), Genler ve kromozomlar (Bölüm 24). İçinde: Nelson DN, Cox MM, editörler. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Kılıç N (Çev.Ed.), 3.Baskıdan Çeviri. Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık; 2005. s.907-930.
4. Blackburn EH. Telomeres and telomerase: Their mechanism of action and the effects of altering their functions. FEBS Lett 2005; 579: 859-862.
5. Zhang P, Dilley C, Mattson MP. DNA damage responses in neural cells: Focus on the telomere. Neuroscience 2007; 145: 1439-1448.
6. Menevşe S (Çev.), RNA metabolizması (Bölüm 26). İçinde: Nelson DN, Cox MM, editörler. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Kılıç N (Çev.Ed.), 3.Baskıdan Çeviri. Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık; 2005. s.979-1019.
7. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266: 2011-2015.
8. Dikmen G, Doğan P. Telomeraz ve kanser. Turk Klin Tıp Bilim 2003; 23: 334-341.

9. Venteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD, Artandi SE. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 2008; 132: 945-957.
10. Baek SH. When ATPases pontin and reptin met telomerase. *Dev Cell* 2008; 459-461.
11. Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, Lipson D, Frimer H, Rienstein S, Simansky D, Krupsky M, Yaron P, Friedman E, Rechavi G, Perlman M, Aviram-Goldring A, Izraeli S, Bittner M, Yakhini Z, Kaminski N. Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 56: 175-184.
12. Lauscher JC, Loddenkemper C, Kosel L, Gröne J, Buhr HJ, Huber O. Increased pontin expression in human colorectal cancer tissue. *Hum Pathol* 2007; 38: 978-985.
13. Carlson ML, Wilson ET, Prescott SM. Regulation of COX-2 transcription in a colon cancer cell line by Pontin52/TIP49a. *Mol Cancer* 2003; 2(42): 1-5.
14. Haurie V, Ménard L, Nicou A, Touriol C, Metzler P, Fernandez J, Taras D, Lestienne P, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Prats H, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J. Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology* 2009; 50(12): 1-13.
15. Rousseau B, Ménard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, Hugues M, Boyault S, Lemièrre S, Canron X, Costet P, Cole M, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, Rosenbaum J. Overexpression and role of the ATPases and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 46: 1108-1118.

16. Li W, Zeng J, Li Q, Zhao L, Liu T, Björkholm M, Jia J, Xu D. RReptin is required for the transcription of telomerase reverse transcriptase and over-expressed in gastric cancer. *Mol Cancer* 2010; 9(132):1-11.
17. Montanaro L, Brigotti M, Clohessy J, Barbieri S, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, Calienni M, Teruya-Feldstein J, Trerè D, Pandolfi PP, Derenzini M. Dyskerin expression influences the level of ribosomal RNA pseudo-uridylation and telomerase RNA component in human breast cancer. *J Pathol* 2006; 210: 10-18.
18. Montanaro L, Calienni M, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, Pileri S, Trerè D, Derenzini M. Relationship between dyskerin expression and telomerase activity in human breast cancer. *Cell Oncol.* 2008; 30(6): 483-490.
19. Kim JH, Lee JM, Nam HJ, Choi HJ, Yang JW, Lee JS, Kim MH, Kim SI, Chung CH, Kim KI, Baek SH. SUMOylation of pontin chromatin-remodeling complex reveals a signal integration code in prostate cancer cells. *P Natl Acad Sci USA* 2007; 104(52): 20793-20798.
20. Murray RK. Kanser genleri ve büyüme faktörleri (Konu 62). Kanser, hücre dışı ve hücre içi iletişimin biyokimyası (Bölüm5). Özgürtaş T (Çev), İçinde: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editörler. Harper'ın Biyokimyası. Dikmen N, Özgönen T (Çev.Ed.), 25.Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. s.787-811.
21. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kanser (Kısım 3, Bölüm 18). İçinde: Genetik Kavramlar. Öner C, Sümer S, Öner R, Öğüş A, Açıık L. (Çev.Ed.), 8. Baskıdan Çeviri. Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık; 2009. s.434-456.
22. Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. General principles. In: *Molecular Biology of Cancer. Second Edition.* New York, USA: BIOS Scientific Publishers; 2004. p.1-10.

23. Matsuo M, Kaneko T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Z, editor. Free Radicals In Exercise And Aging. Versa Press; 2000. p.1-31.
24. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochem Soc T 2002; 30(2): 280-285.
25. Gutteridge JMC, Halliwell B. Oxygen, the breath of life or oxygen, the first toxic oxidizing air pollutant (Chapter 1). In: Antioxidants In Nutrition, Health and Disease. 1994. p.1-16.
26. İşlekel H (Çev.), Biyosinyal iletimi (Bölüm13). İçinde: Nelson DN, Cox MM, editörler. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Kılıç N (Çev.Ed.), 3.Baskıdan Çeviri. Ankara, Türkiye: Palme Yayıncılık; 2005. s.437-483.
27. Ryan DP. Kolon kanseri (Konu 48). Gastrointestinal kanser (Kısım 11). Dinçer ST (Çev.), İçinde: Chabner BA, Lynch TJ, Longo DL, editörler. HARRISON Onkoloji El Kitabı. Dönmez B (Çev.Ed.), İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. s.423-429.
28. Adrouny AR. Who gets colon cancer and why (Chapter 1). In: Understanding Colon Cancer. Jackson, MS, USA: University Press of Mississippi; 2002. p.1-16.
29. Baysal A, Criss WE. Kanser türleri hakkında bilmemiz gerekenler (Bölüm 2). İçinde: Kanser Tanıyalım-Belirtileri, Nedenleri, Korunma ve Tedavi Yolları. Ankara, Türkiye: Hatiboğlu Yayınevi; 2004. s.29-95.
30. Bellinir K. Breast cancer fundamentals (Chapter 6). In: Breast Cancer Sourcebook. Third Edition. Detroit, MI, USA: Omnigraphics; 2009. p.35-49.

31. Cigler T, Ryan PD. Meme onkolojisi: Klinik bulgular ve genetik (Konu 58). Meme onkolojisi (Kısım 14). Dönmez B (Çev.), İçinde: Chabner BA, Lynch TJ, Longo DL, editörler. HARRISON Onkoloji El Kitabı. Dönmez B (Çev.Ed.), İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. s.511-519.
32. Phipps AI, Li CI. Breast Cancer biology and clinical characteristics. In: Li CI, editor. Breast Cancer Epidemiology. New York, USA: Springer Science + Business Media; 2010. p.21-46.
33. Van der Groep P, Van der Wall E, Van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. Cell Oncol 2011; 34: 71-88.
34. Roukos DH, Agnantis NJ, Fatouros M, Kappas AM. Gastric cancer: Introduction, pathology, epidemiology. Gastric Breast Cancer 2002; 1(1): 1-3.
35. Blaszkowsky LS. Mide kanseri (Konu 44). Gastrointestinal kanser (Kısım 11). Tabak Dinçer S (Çev.), İçinde: Chabner BA, Lynch TJ, Longo DL, editörler. HARRISON Onkoloji El Kitabı. Dönmez B (Çev.Ed.), İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. s.395-401.
36. Zagari RM, Bazzoli F. Gastric cancer: Who is at risk? In: Ebert M, Malfertheiner P, editors. New Developments in the Management of Gastric Cancer/Digestive Disease Clinical Reviews Volume 22. Basel, Switzerland: Karger Publishers; 2004. p.302-305.
37. Resende C, Thiel A, Machado JC, Ristimäki A. Gastric cancer: Basic aspects. Helicobacter 2011; 16 (1): 38-44.
38. Li W, Li L, Liu Z, Liu C, Liu Z, Strååt K, Björkholm M, Jia J, Xu D. Expression of the full-length telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcript in both malignant and normal gastric tissues. Cancer Lett 2008; 260: 28-36.

39. Bilgin Akyagcı S, Bağcıvan E, Özgüç H, Kırdak T, Korun N. Mide kanserinde prognostik faktörler. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 31(2): 113-118.
40. Dinçtürk C. Mide kanserinde etioloji-pathogenesis (Bölüm 4). İçinde: Cerrahi Onkoloji Mide Kanseri. Ankara, Türkiye: Türk Tarih Kurumu Basımevi; 1989. s.40-47.
41. Clapp RW. Soft tissue sarcoma. Occupational diseases and injuries (Part II). In: Levy BS, Wagner GR, Rest KM, Weeks JL, editors. Preventing Occupational Disease and Injury. Second ed. Washington, USA: American Public Health Association; 2005. p.73-527.
42. Yoon SS, Hornicek FJ, Harmon DC, DeLaney TF. Yumuşak doku ve kemik sarkomları (Konu 62). Sarkom (Kısım16). Işıklı L. (Çev.), İçinde: Chabner BA, Lynch TJ, Longo DL, editörler. HARRISON Onkoloji El Kitabı. Dönmez B (Çev.Ed.), İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. s.549-565.
43. Yıldız Lab. Molecular Motors research Group. Telomere Loop Formation. [İnternette]. [29 Haziran 2009'da okundu]. Elektronik adresi: <http://physics.berkeley.edu/research/yildiz/Research.html>
44. Kipling D. The Telomere. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p.37.
45. Durusoy M. Telomeraz aktivitesini değerlendirmede kullanılan yöntemler ve dayandıkları esaslar. Turk J Biochem 2003; 28(1): 25-29.
46. Stem Cell Information. The National Institutes of Health Resource for Stem Cell Research. Human Embryonic Stem Cells and Human Embryonic Germ Cells. [İnternette]. 2001 [29 Haziran 2009'da okundu]. Elektronik adresi: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixC.asp>

47. Huang XQ, Wang J, Liu JP, Feng H, Liu WB, Yan Q, Liu Y, Sun SM, Deng M, Gong L, Liu Y, Li DWC. hTERT Extends proliferative lifespan and prevents oxidative stress-induced apoptosis in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(7): 2503-2413.
48. Frías C, García-Aranda C, De Juan C, Morán A, Ortega P, Gómez A, Hernando F, López-Asenjo JA, Torres AJ, Benito M, Iniesta P. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 60: 416-425.
49. Telomeres and telomerase [İnternette]. [7 Şubat 2012'de okundu]. Elektronik adresi: <http://www-shankar.ch.cam.ac.uk/telomeresandtelomerase.html>
50. What are telomeres? [İnternette]. [29 Haziran 2009'da okundu]. Elektronik adresi: http://www.ccs.k12.in.us/chsBS/kons/kons/what_are_telomeres.htm
51. Jiang YA, Luo HS, Fan LF, Jiang CQ, Chen WJ. Effect of antisense oligodeoxynucleotide of telomerase RNA on telomerase activity and cell apoptosis in human colon cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10(3): 443-445.
52. TERC telomerase RNA component (*Homo sapiens*). [İnternette]. [4 Şubat 2012'de okundu]. Elektronik adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7012>
53. Alawi F, Lin P, Ziober B, Patel R. Correlation of dyskerin expression with active proliferation independent of telomerase. *Head & Neck* 2011; 33(7): 1041-1051.
54. Telomerase reverse transcriptase [İnternette]. [4 Şubat 2012'de okundu]. Elektronik adresi: <http://www.uniprot.org/uniprot/O14746>

55. Wang Z, Xu J, Geng X, Zhang W. Analysis of DNA methylation status of the promoter of human telomerase reverse transcriptase in gastric carcinogenesis. *Arch Med Res* 2010; 41(1): 1-6.
56. Steczkiewicz K, Zimmermann MT, Kurcinski M, Lewis BA, Dobbs D, Kloczkowski A, Jernigan RL, Kolinski A, Ginalski K. Human telomerase model shows the role of the TEN domain in advancing the double helix for the next polymerization step. *P Natl Acad Sci USA* 2011; 108(23): 9443-9448.
57. Angrisani A, Turano M, Paparo L, Di Mauro C, Furia M. A new human dyskerin isoform with cytoplasmic localization. *BBA-Gen Subjects* 2011; 1810: 1361-1368.
58. Dikmen ZG, Dikmen E, Doğan P. Kanserde telomeraza yönelik tedavi stratejileri. *Hacettepe Med J* 2006; 37: 49-55.
59. Vulliamy TJ, Dokal I. Dyskeratosis congenita: The diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex. *Biochimie* 2008; 90: 122-130.
60. Gorynia S, Matias PM, Bandejas TM, Donner P, Carrondo MA. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the human RuvBL1-RuvBL2 complex. *Acta Crystallogr F* 2008; 64: 840-846.
61. Ogura T, Wilkinson AJ. AAA⁺ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 2001; 6: 575-597.
62. Papin C, Humbert O, Kalashnikova A, Eckert K, Morera S, Käs E, Grigoriev M. 3'- to 5' DNA unwinding by TIP49b proteins. *FEBS J* 2010; 277: 2705-2714.
63. Cheung KLY, Huen J, Houry WA, Ortega J. Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins. *Biochem Cell Biol* 2010; 88: 77-88.

64. Kim T, Franke D, Svergun DI, Kim KK. SAXS analyses of reptin in solution. [Internet]. 2007 [29 Haziran 2009'da okundu]. Elektronik adresi:http://hasyweb.desy.de/science/annual_reports/2007_report/part2/contrib/73/20982.pdf
65. Huber O, Ménard L, Haurie V, Nicou A, Taras D, Rosenbaum J. Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res* 2008; 68(17): 6873-6876.
66. Gallant P. Control of transcription by pontin and reptin. *TRENDS Cell Biol* 2007; 17(4): 187-192.
67. Jha S, Dutta A. RVB1/RVB2:Running rings around molecular biology. *Mol Cell* 2009; 34: 521-533.
68. Grigoletto A, Lestienne P, Rosenbaum J. The multifaceted proteins reptin and pontin as major players in cancer. *BBA-Rev Cancer* 2011; 1815: 147-157.
69. Huen J, Kakiyama Y, Ugwu F, Cheung KLV, Ortega J, Houry WA. Rvb1-Rvb2:essential ATP-dependent helicases for critical complexes. *Biochem Cell Biol* 2010; 88: 29-40.
70. Niewiarowski A, Bradley AS, Gor J, McKay AR, Perkins SJ, Tsaneva IR. Oligomeric assembly and interactions within the human RuvB-like RuvBL1 and RuvBL2 complexes. *Biochem J* 2010; 429: 113-125.
71. Kast DJ, Dominguez R. Are you ready for actin in the nucleus? *EMBO J* 2011; 30: 2097-2098.
72. Etard C, Gradl D, Kunz M, Eilers M, Wedlich D. Pontin and reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1. *Mech Develop* 2005; 122: 545-556.
73. Sapountzi V, Logan IR, Robson CN. Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell B* 2006; 38: 1496-1509.

74. Jha S, Shibata E, Dutta A. Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2008; 28(8): 2690-2700.
75. Cvačková Z, Albring KF, Koberna K, Ligasová A, Huber O, Raška I, Staněk D. Pontin is localized in nucleolar fibrillar centers. *Chromosoma* 2008; 117: 487-497.
76. Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbacher U, Aragnol D, Kemler R, Pradel J. Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of β -catenin signalling activity. *EMBO J* 2000; 19(22): 6121-6130.
77. Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with pontin and reptin and inhibits TCF- β -catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 2005; 118: 3117-3129.
78. Baek SH. A novel link between SUMO modification and cancer metastasis. *Cell Cycle* 2006; 5(14): 1492-1495.
79. Zieba M, Suwalski M, Kwiatkowska S, Piasecka G, Grzelewska-Rzymowska I, Stolarek R, Nowak D. Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchyma. *Resp Med* 2000; 94: 800-805.
80. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 1-9.
81. Inoue T, Hayashi M, Takayanagi K, Morooka S. Oxidative DNA damage is induced by chronic cigarette smoking, but repaired by abstention. *J Health Sci* 2003; 49(3): 217-220.

82. Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Möller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1999; 448: 120-122.
83. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Japi* 2004; (52): 794-804.
84. Gutteridge JMC, Halliwell B. Oxidative stress (Chapter 5). In: *Antioxidants In Nutrition, Health and Disease*. 1994. p.90-102.
85. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 2001; 8: 829-838.
86. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278(33): 31426-31433.
87. Uzun K, Vural H, Öztürk T, Özer F, İmecik İ. Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer. *Eastern Journal Of Medicine* 2000; 5(2): 48-51.
88. Cadenas S, Barja G, Poulsen HE, Loft S. Oxidative DNA damage estimated by oxo⁸dG in the liver of guinea-pigs supplemented with graded dietary doses of ascorbic acid and α -tocopherol. *Carcinogenesis* 1997; 18(12): 2373-2377.
89. Lin HS, Jenner AM, Ong CN, Huang SH, Whiteman M, Halliwell B. A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: Measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction. *Biochem J* 2004; 380: 541-548.
90. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. 8-hydroxydeoxyguanosine a marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett* 1994; 348: 131-138.

91. Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 1997; 18(9): 1763-1766.
92. Evans MD, Dizdaroğlu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. *Mutat Res-Rev Mutat* 2004; 567: 1-61.
93. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res-Gen Tox En* 1999; 443: 37-52.
94. Pérez DD, Strobel P, Foncea R, Díez MS, Vásquez L, Urquiaga I, Castillo O, Cuevas A, San Martín A, Leighton F. Wine, diet, antioxidant defenses, and oxidative damage. *Ann NY Acad Sci* 2002; 957: 136-145.
95. Rozalski R, Gackowski D, Roszkowski K, Foksinski M, Olinski R. The level of 8-hydroxiguanine, a possible repair product of oxidative DNA damage, is higher in urine of cancer patients than in control subjects. *Cancer Epidem Biomar* 2002; 11: 1072-1075.
96. Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *P Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 288-293.
97. Rebelo IA, Piedade JAP, Oliveira-Brett AM. Development of an HPLC method with electrochemical detection of femtomoles of 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in the presence of uric acid. *Talanta* 2004; 63(2): 323-331.

98. Marczynski B, Rozynek P, Kraus T, Schlosser S, Raithel HJ, Baur X. Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA of white blood cells from workers highly exposed to asbestos in Germany. *Mutat Res-Gen Tox En* 2000; 468: 195-202.
99. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
100. Krapfenbauer K, Birnbacher R, Vierhapper H, Herkner K, Kampel D, Lubec G. Glycooxidation, and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci* 1998; 95: 331-337.
101. El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res-Fund Mol M* 2001; 475: 123-139.
102. Kato J, Kobune M, Nakamura T, Kuroiwa G, Takada K, Takimoto R, Sato Y, Fujikawa K, Takahashi M, Takayama T, Ikeda T, Niitsu Y. Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 2001; 61: 8697-8702.
103. Kondo S, Toyokuni S, Tanaka T, Hiai H, Onodera H, Kasai H, Imamura M. Overexpression of the hOGG gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: Regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1394-1400.
104. Foksinski M, Gackowski D, Rozalski R, Olinski R. Cellular level of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA does not correlate with urinary excretion of the modified base/nucleoside. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(2): 549-553.

- 105.** Yoshida R, Ogawa Y, Shioji I, Yu X, Shibata E, Mori I, Kubota H, Kishida A, Hisanaga N. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and biopyrrins levels among construction workers with asbestos exposure history. *Ind Health* 2001; 39: 186-188.
- 106.** Kim J, Chehade J, Pinnas JL, Mooradian AD. Effects of select antioxidants on malondialdehyde modification of proteins. *Nutrition* 2000; 16: 1079-1081.
- 107.** Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 200-227.
- 108.** Mac-Nee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *TRENDS Mol Med* 2001; 7(2): 55-62.
- 109.** Lee GJ, Chung HW, Lee KH, Ahn AS. Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 267-272.
- 110.** Cighetti G, Allevi P, Anastasia L, Bortone L, Paroni R. Use of methyl malondialdehyde as an internal standart for malondialdehyde detection: Validation by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 2002; 48: 2266-2269.
- 111.** Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 2002-2007.
- 112.** Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B* 2000; 742: 315-325.

113. Flavin P, Redmond A, McBryan J, Cocchiglia S, Tibbitts P, Fahy-Browne P, Kay E, Treumann A, Perrem K, McIlroy M, Hill ADK, Young LS. RuvBI2 cooperates with Ets2 to transcriptionally regulate hTERT in colon cancer. *FEBS Lett* 2011; 585: 2537-2544.
114. Cairney CJ, Keith WN. Telomerase redefined: Integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie* 2008; 90: 13-23.
115. Palmqvist R, Zhang A, Xu D, Golovleva I, Norrback KF, Gruber A, Öberg Å, Stenling R, Roos G. hTERT gene copy number is not associated with hTERT RNA expression or telomerase activity in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2005; 116: 395-400.
116. Saleh S, Lam AK, Ho YH. Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in colorectal cancer. *Pathology* 2008; 40(1): 25-30.
117. Valls-Bautista C, Piñol-Felis C, Reñe Espinet JM, Buenestado-García J, Viñas-Salas J. Telomerase activity and telomere length in the colorectal polyp-carcinoma sequence. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101(3): 179-186.
118. Gígek CO, Leal MF, Silva PNO, Lisboa LCF, Lima EM, Calcagno DQ, Assumpção PP, Burbano RR, Smith MAC. *hTERT* methylation and expression in gastric cancer. *Biomarkers* 2009; 14(8): 630-636.
119. Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002; 8(4): 586-590.
120. Kirkpatrick KL, Clark G, Ghilchick M, Newbold RF, Mokbel K. hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. *EJSO* 2003; 29: 321-326.

121. Elkak A, Mokbel R, Wilson C, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. hTERT mRNA expression is associated with a poor clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 4901-4904.
122. Perhavec A, Cerkovnik P, Novakovic S, Zgajnar J. The hTERT mRNA in plasma samples of early breast cancer patients, non-cancer patients and healthy individuals. *Neoplasma* 2008; 55(6): 549-554.
123. Rha SY, Jeung HC, Park KH, Kim JJ, Chung HC. Changes of telomerase activity by alternative splicing of full-length and beta variants of hTERT in breast cancer patients. *Oncol Res* 2009; 18(5-6): 213-220.
124. Divella R, Tommasi S, Lacalamita R, Daniele A, Abbate I, Garrisi VM, Savino E, Coviello M, Rubini V, Simone G, Paradiso A, Quaranta M. Circulating hTERT DNA in early breast cancer. *Anticancer Res* 2009; 29(7): 2845-2849.
125. Li H, Lee TH, Avraham H. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (*hTERT*) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* 2002; 277(23): 20965-20973.
126. Bauer A, Huber O, Kemler R. Pontin52, an interaction partner of β -catenin, binds to the TATA box binding protein. *P Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14787-14792.
127. Wood MA, McMahon SB, Cole MD. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* 2000; 5: 321-330.
128. Chen HP, Tollefsbol TO. Telomerase control by epigenetic processes in cellular senescence. In: Tollefsbol TO, editor. *Epigenetics of Aging*. New York, USA: Springer Science + Business Media; 2010. p.191-204.

- 129.** Çalışkan-Can E, Firat H, Ardiç S, Simşek B, Torun M, Yardim-Akaydin S. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and its relationship with lipid peroxidation and antioxidant vitamins in lung cancer. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(1): 107-112.
- 130.** Gackowski D, Speina E, Zielinska M, Kowalewski J, Rozalski R, Siomek A, Paciorek T, Tudek B, Olinski R. Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 4899-4902.
- 131.** Kuo HW, Chou SY, Hu TW, Wu FY, Chen DJ. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res-Gen Tox En* 2007; 631(1): 62-68.
- 132.** Atukeren P, Yavuz B, Soydinc HO, Purisa S, Camlica H, Gumustas MK, Balcioglu I. Variations in systemic biomarkers of oxidative/nitrosative stress and DNA damage before and during the consequent two cycles of chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(10): 1487-1495.
- 133.** Himmetoglu S, Dincer Y, Ersoy YE, Bayraktar B, Celik V, Akcay T. DNA oxidation and antioxidant status in breast cancer. *J Invest Med* 2009; 57(6): 720-723.
- 134.** Obtulowicz T, Swoboda M, Speina E, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Janik J, Janowska B, Ciesla JM, Jawien A, Banaszkiewicz Z, Guz J, Dziaman T, Szpila A, Olinski R, Tudek B. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis* 2010; 25(5): 463-471.
- 135.** Hsu WY, Chen WTL, Lin WD, Tsai FJ, Tsai Y, Lin CT, Lo WY, Jeng LB, Lai CC. Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 2009; 402(1-2): 31-37.

- 136.** Sato T, Takeda H, Otake S, Yokozawa J, Nishise S, Fujishima S, Orii T, Fukui T, Takano J, Sasaki Y, Nagino K, Iwano D, Yaoita T, Kawata S. Increased plasma levels of 8-hydroxydeoxy guanosine are associated with development of colorectal tumors. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 47(1): 59-63.
- 137.** Mei SR, Yao QH, Wu CY, Xu GW. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches-capillary electrophoresis and GUMS: An assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *J Chromatogr B* 2005; 827(1): 83-87.
- 138.** Roszkowski K, Jozwicki W, Blaszczyk P, Mucha-Malecka A, Siomek A. Oxidative damage DNA: 8-oxoGua and 8-oxodG as molecular markers of cancer. *Med Sci Monitor* 2011; 17(6): CR329-CR333.
- 139.** Torun M, Yardim S, Gönenç A, Sargin H, Menevse A, Simsek B. Serum β -carotene, vitamin E, vitamin C and malondialdehyde levels in several types of cancer. *J Clin Pharm Ther* 1995; 20(5): 259-263.
- 140.** Özkan Y, Torun M, Şimşek B. Lipid peroxidation and lipid parameters in lung cancer. *Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2002; 19(1): 47-54.
- 141.** Arsova-Sarafinovska Z, Aydin A, Sayal A, Eken A, Erdem O, Savaser A, Erten K, Ozgok Y, Dirnovski A. Rapid and simple determination of plasma and erythrocyte MDA levels in prostate cancer patients by a validated HPLC method. *J Liq Chromatogr R T* 2007; 30(13-16): 2435-2444.
- 142.** Matejckova J, Samec M, Jacek M, Tuma P. HPLC monitoring of malondialdehyde in patients with endometrial and ovarian cancer. *Chem Listy* 2011; 105(5): 375-380.

143. Chole RH, Patil RN, Basak A, Palandurkar K, Bhowate R. Estimation of serum malondialdehyde in oral cancer and precancer and its association with healthy individuals, gender, alcohol, and tobacco abuse. *J Cancer Res Ther* 2010; 6(4): 487-491.
144. Carneiro JLD, Nixdorf SL, Mantovani MS, Herrera ACDD, Aoki MN, Amarante MK, Fabris BA, Fungaro MHP, Watanabe MAE. Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin* 2009; 135(8): 997-1004.
145. Akbulut H, Akbulut KG, Icli F, Buyukcelik A. Daily variations of plasma malondialdehyde levels in patients with early breast cancer *Cancer Detect Prev* 2003; 27(2): 122-126.
146. Yeh CC, Hou MF, Tsai SM, Lin SK, Hsiao JK, Huang JC, Wang LH, Wu SH, Hou LA, Ma H, Tsai LY. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 361(1-2): 104-111.
147. Suzana S, Normah H, Fatimah A, Fadilah RN, Rohi GA, Amin I, Cham BG, Rizal RM, Fairulnizal MN. Antioxidants intake and status, and oxidative stress in relation to breast cancer risks: A case-control study. *Asian Pac J Cancer P* 2008; 9(2): 343-349.
148. Khanzode SS, Muddeshwar MG, Khanzode SD, Dakhale GN. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different stages of breast cancer. *Free Radical Res* 2004; 38(1): 81-85.
149. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raina V, Ashok S, Husain SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Tr* 2000; 59(2): 163-170.
150. Bayraktar MR, Harputluoglu M, Bayraktar NM. Investigation of serum C-reactive protein and malondialdehyde levels in patients with colon cancer. *Turk Klin Tip Bilim* 2007; 27(1): 13-15.

- 151.** Lauschke H, Tolba R, Burger B, Minor T, Hirner A. Lipid peroxidation as additional marker in patients with colorectal cancer. Results of a Preliminary Study. *Eur Surg Res* 2002; 34: 346-350.
- 152.** Otamiri T, Sjodahl R. Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Cancer* 1989; 64(2): 422-425.
- 153.** Bakan E, Taysi S, Polat MF, Dalga S, Umudum Z, Bakan N, Gumus M. Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32(5): 162-166.
- 154.** Bitla AR, Reddy EP, Sambasivaih K, Suchitra MM, Reddy VS, Rao PVLNS. Evaluation of plasma malondialdehyde as a biomarker in patients with carcinoma of stomach. *Biomed Res-India* 2011; 22(1): 63-68.
- 155.** Unsal D, Akmansu M, Ozer C, Gonul B, Bora H. Plasma level of lipid peroxidation, total sulphydryl groups and nitric oxide levels in cancer patients irradiated on different anatomic fields: A case-control study. *Experimental Oncology* 2005; 27(1): Pages: 76-80.
- 156.** Prescott J, Wentzensen IM, Savaged SA, De Vivoa I. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat Res-Fund Mol M* 2012; 730: 75- 84.
- 157.** Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998; 239: 152-160.
- 158.** Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol* 2009; 485-492.

- 159.** López-Díazguerrero NE, Pérez-Figueroa GE, Martínez-Garduño CM, Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Gutiérrez-Ruiz MC, Konigsberg M. Telomerase activity increase in response to mild oxidative stress due to Bcl-2 overexpression. *Cell Biol Int* 2011; (Epub ahead of print)
- 160.** Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, Birch-Machin MA, von Zglinicki T, Saretzki G. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci* 2008; 121: 1046-1053.
- 161.** Chou WC, Chen HY, Yu SL, Cheng L, Yang PC, Dang CV. Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation. *Blood* 2005; 106: 304-310.
- 162.** Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1757-1768.
- 163.** Armstrong L, Saretzki G, Peters H, Wappler I, Evans J, Hole N, von Zglinicki T, Lako M. Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 2005; 23: 516-529.
- 164.** Mondello C, Bottone MG, Noriki S, Soldani C, Pellicciari C, Scovassi AI. Oxidative stress response in telomerase-immortalized fibroblasts from a centenarian. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1091: 94-101.
- 165.** Dairkee SH, Nicolau M, Sayeed A, Champion S, Ji Y, Moore DH, Yong B, Meng Z, Jeffrey SS. Oxidative stress pathways highlighted in tumor cell immortalization: association with breast cancer outcome. *Oncogene* 2007; 26: 6269-6279.

- 166.** Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Metivier D, Sabatier L, Kroemer G, Soria JC. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006; 25: 4505-4514.
- 167.** Pizzimenti S, Menegatti E, Berardi D, Toaldo C, Pettazzoni P, Minelli R, Giglioni B, Cerbone A, Dianzani MU, Ferretti C, Barrera G. 4 Hydroxynonenal, a lipid peroxidation product of dietary polyunsaturated fatty acids, has anticarcinogenic properties in colon carcinoma cell lines through the inhibition of telomerase activity. *J Nutr Biochem* 2010; 21(9): 818-826.
- 168.** Nishikawa T, Nakajima T, Katagishi T, Okada Y, Jo M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y, Yoshikawa T. Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. *Liver Int* 2009; 29(6): 846-856.

10.EKLER

10.1.Etik Kurul İzni

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
08/12/2011	06	2011/81

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sevgi AKAYDIN'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Kolon, Meme ve Mide Kanserlerinde Telomeraz Aktivitesinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan Pontin ve Reptinin Gen Ekspresyonunun İncelenmesi" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 06/12/2011 tarihinde sunulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Başvuru Formu ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan

İmza
Doç. Dr. Olgü HALLIOĞLU KILINÇ
Başkan Yrd.

İmza
Yrd. Doç. Dr. Gülçin YAPICI
Raportör

İmza
Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ
Üye

İmza
Doç. Dr. İrfan AYAN
Üye

İmza
Doç. Dr. Aylin ERTEKİN YAZICI
Üye

İmza
Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN
Üye

(Katılmadı)
Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN
Üye

İmza
Doç. Dr. Sabire YURTSEVER
Üye

İmza
Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE
Üye

(Katılmadı)
Yrd. Doç. Dr. Oya ÖGENLER
Üye

İmza
Yrd. Doç. Dr. Nalan TİFTİK
Üye

(Katılmadı)
Uzm. Dr. Oğuz KARDAŞ
Üye

İmza
Hürrem Betül LEVENT
Üye

(Katılmadı)
Lale DAĞLI
Üye

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan
ASLI GİBİDİR

10.2. Teşekkür

Çalışmamın bu aşamalara gelmesini sağlayan, hiçbir zaman yardım ve desteğini esirgemeyen, her an varlığını yanımda hissettiğim danışmanım, hocam Sayın Doç.Dr.Sevgi AKAYDIN'a, anlayış, destek ve ilgilerinden dolayı Sayın Prof.Dr.Bolkan ŞİMŞEK'e, örneklerin bulunması ve toplanmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Doç.Dr.Can ATALAY'a, deney aşamasındaki yardımlarından dolayı Genmar Teşhis Ürünleri Tic.Ltd.Şti. çalışanlarına, her zaman bana destek olan, moral ve güç veren, tez çalışmamda özellikle deney aşamasındaki yardımlarından dolayı çalışma arkadaşım sevgili Arş.Gör.Ece MİSER SALİHOĞLU'na, zor zamanlarımda hep yanımda bulduğum ve güleryüzü ile moral kaynağı olan arkadaşım sevgili Ceren AY GÜL'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu ve uzun süreçte de yanımda olan, sevgi, anlayış, güven ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım ailem ve sevgili eşim Kutay'a sonsuz teşekkür ederim.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı: Emel

Soyadı: ÇALIŞKAN CAN

Doğum Yeri ve Tarihi: Solothurn-İsviçre 21.06.1979

Eğitimi:

2006: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı- “Akciğer Kanseri Hastalarında Oksidatif DNA Hasarı, Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan İlişkisinin İncelenmesi” isimli Yüksek Lisans Çalışması.

2002: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.

1996: Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi.

1993: Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi Orta Kısım.

1990: Ankara Alparslan İlkokulu.

İş Deneyimi:

2005: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı-Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili: İngilizce

Yer Aldığı Projeler:

2011: GÜ BAP 02/2011-31: Değişik Kanseri Türlerinde c-myc, Beta-katenin ve Tip60 Gen Ekspresyonları-Araştırmacı (Devam Ediyor).

2011: GÜ BAP 02/2011-30: Değişik Kanseri Türlerinde Diskerin ve Leptinin Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi-Araştırmacı (Devam Ediyor).

2010: GÜ BAP 02/2010-46: Çeşitli Halk İlaçlarında Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi-Araştırmacı

2010: GÜ BAP 02/2010-45: Akciğer Kanserinde 3-Nitrotirozin Düzeylerinin İncelenmesi-Araştırmacı.

2009: GÜ BAP 02/2009-20: Kanser Türlerinde Telomeraz Aktivitesinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan Pontin ve Reptinin Gen Ekspresyonunun İncelenmesi-Araştırmacı (Devam Ediyor).

2006: GÜ BAP 02/2006-26: Metabolik sendromlu ağır obstrüktif uyku apne hastalarında oksidatif DNA hasarı ve total antioksidan kapasitenin incelenmesi-Araştırmacı.

2006: GÜ BAP 02/2006-25: Metabolik sendromlu kişilerde oksidatif stres belirteçlerinin ve HDL- Paraoxonaz 1 enzim aktivitesinin incelenmesi-Araştırmacı.

2004: GÜ BAP EF 11/2004-17: Akciğer kanserli hastalarda oksidatif DNA hasarı, lipid peroksidasyon ve antioksidan ilişkisinin incelenmesi-Araştırmacı.

Yayınlar:

Yardım-Akaydın S, **Çalışkan-Can E**, Fırat H, Şimşek B. Examination of The Relationship Between DNA Damage and Inflammation in Primary Non-Small Cell Lung Cancer Patients. FABAD J Pharm Sci 2009; 34: 67-72.

Çalışkan-Can E, Fırat H, Ardiç S, Şimşek B, Torun M, Yardım-Akaydın S. Increased levels of 8-hydroxy deoxyguanosine and its relationship with lipid peroxidation and antioxidant vitamins in lung cancer. Clin Chem Lab Med 2008; 46(1): 107-112.

Özkan Y, Yardım-Akaydın S, Fırat H, **Çalışkan-Can E**, Ardiç S, Şimşek B. Usefulness of homocysteine as a cancer marker: Total thiol compounds and folate levels in untreated lung cancer patients. Anticancer Res 2007; 27: 1185-1190.