

ASUMAN ÇELEBİ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**NMRAL1 PROTEİNİNİN HTATIP2 ÜZERİNE ETKİSİ VE
BAŞ-BOYUN KANSERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK
İNCELENMESİ**

ASUMAN ÇELEBİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE NUR BUYRU**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Her zaman minnettar olduğum ve çok sevdiğim aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Zorlu doktora sürecimde varlığı ile bana güç veren danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU'ya,

2211-c Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu ile doktora sürecimde beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Doktora sürecimde sevgi, ilgi ve yardımlarını asla esirgemeyen canım dostlarım Ceren ORHAN, Didem SEVEN ve Leyla ELKANNOVA başta olmak üzere, laboratuvar ekibimizden Ayşegül SOYSAL ve Günay GALAMİYEVA'ya,

Her düştüğümde yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen canım AİLEM'e

Sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30790

Bu proje TÜBİTAK 2211-C bursu ile 1649B031803948 no'lu başvuru ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Baş ve Boyun Kanseri Etiyolojisi	2
2.2. Baş ve Boyun Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.3. Kanseri Biyolojisi	4
2.3.1. Serbest Radikal Oluşturan Hücre İçi Uyarıcılar	5
2.3.2. Serbest Radikal Oluşturan Hücre Dışı Uyarıcılar	6
2.3.3. RONS'lara Karşı Antioksidan Sistemi	6
2.3.4. RONS ile İlişkili Sinyal Yolları	7
2.3.5. Enerji Metabolizması ve kanserde yeniden düzenlenmesi	10
2.4. Oksidoredüktazlar ve Kısa Zincirli Dehidrogenaz/Redüktazlar (SDR) Ailesi	11
2.4.1. HTATIP2 Gen ve Protein Özellikleri	13
2.4.2. NMRAL1 Gen ve Protein Özellikleri	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. GEREÇ	24
3.1.1. Materyal	24
3.1.2. Kimyasal Maddeler	24
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	25
3.1.4. Tampon ve Çözeltiler.....	26
3.1.4.1. HET-1A ve SCC-15 Hücre Hatları için Besiyeri	26

3.1.4.2. Hücre Kültürü için Kaplama Medyumu.....	26
3.1.4.3. Antibiyotiksiz Kültür Medyumu	26
- 2X Antibiyotikli Kültür Medyumu	27
- 800 ng/ml hidrokortizon,.....	27
3.1.4.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi Tamponları	27
3.1.4.5. Kullanılan Jeller	27
3.1.4.6. Western Blot Tamponları.....	28
3.1.5. Kullanılan Antikorlar ve Protein Standartları	28
3.2. YÖNTEM	28
3.2.1. Hücre Kültürü	28
3.2.2. Hücrelerin Sayımı ve 6 Kuyulu Plakalara Ekimi.....	29
3.2.3. NMRAL1 siRNA uygulaması.....	30
3.2.4. RNA İzolasyonu.....	31
3.2.5. cDNA Çevrimi	32
3.2.6. NMRAL1 ve HTATIP2 Genlerinin İfade Analizleri.....	32
3.2.7. Dokudan Sitoplazma ve Çekirdek Proteini Eldesi.....	34
3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE).....	35
3.2.9. Western Blot	35
3.2.10. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT).....	36
3.2.11. İmmünsitokimya (ICC)	36
3.2.12. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. Klinik ve Patolojik Analiz	39
4.2. NMRAL1, HTATIP2, c-MYC ve CCND1 Genlerinin İfade Düzeyleri.....	40
4.3. Nmr1 ve Htatip2 Protein İfade Düzeyleri	43
4.4. NMRAL1 siRNA Sonuçları.....	45
4.5. SCC-15 ve HET-1A hücrelerinde Hücre Canlılık Test Sonuçları (MTT Assay) ..	51
5. TARTIŞMA	53
KAYNAKLAR	59
ETİK KURUL KARARI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	78
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>HTATIP2</i> geninin etkileşimde olduğu diğer genler	17
Tablo 2-2: <i>NMRAL1</i> geninin etkileşimde olduğu diğer genler	22
Tablo 3-1: cDNA çevriminde kullanılan solüsyonların derişim, hacim ve tepkime	32
Tablo 3-2: <i>NMRAL1</i> , <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> , <i>CCND1</i> ve <i>B2M</i> genlerinin GZ-PZT için Primer Dizisi.....	33
Tablo 3-3: GZ-PZT’nde kullanılan karışım içeriği.....	33
Tablo 3-4: <i>NMRAL1</i> , <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> , <i>CCND1</i> ve <i>B2M</i> genlerinin GZ-PZT koşulları	34
Tablo 4-1: Larenks kanserli hastaların klinik ve patolojik özellikleri	39
Tablo 4-2: Larenks kanserli hastalarda <i>NMRAL1</i> , <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>CCND1</i> mRNA ifadesi ve kat değışimleri	41
Tablo 4-3: <i>NMRAL1</i> gen ifadesinin <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>CCND1</i> ifadeleri ile karşılaştırılması.....	42
Tablo 4-4: <i>HTATIP2</i> gen ifadesinin <i>MYC</i> ve <i>CCND1</i> ifadeleri ile karşılaştırılması.....	42
Tablo 4-5: Larenks kanserli 45 hastanın sitoplazma ve çekirdekte <i>NMRAL1</i> ve <i>HTATIP2</i> protein düzeyleri	44
Tablo 4-6: Larenks kanserli hastalarda <i>NMRAL1</i> ’in mRNA ve protein ifade dağılımı .	45
Tablo 4-7: Larenks kanserli hastalarda <i>HTATIP2</i> ’nin mRNA ve protein ifade dağılımı	45
Tablo 4-8: HET-1A ve SCC-15 hücre hatlarında <i>NMRAL1</i> siRNA öncesi ve sonrası <i>NMRAL1</i> proteininin hücresel değışimi	49
Tablo 4-9: HET-1A ve SCC-15 hücre hatlarında <i>NMRAL1</i> siRNA öncesi ve sonrası <i>HTATIP2</i> proteininin hücresel değışimi.....	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Larenks kanseri WHO insidans (17).....	4
Şekil 2-2: RONS'un etki ettiği kanser sinyal yolları	8
Şekil 2-3:İnsanda SDR ailesinin alt grupları (75).....	12
Şekil 2-4: HTATIP2 proteininin katlanma paternini gösteren yapısı	14
Şekil 2-5: HTATIP2'nin dokulardaki RNA ve protein ifade durumları.....	15
Şekil 2-6: NMRAL1 proteini katlanma yapısı.....	18
Şekil 2-7: NMRAL1'in dokulardaki RNA ve protein ifade düzeyleri	18
Şekil 2-8: NMRAL1 proteininin hücrede bulunduğu 3 farklı formun Rossmann katlanma yapısı ile gösterimi(108).	19
Şekil 3-1: Thoma lamı üzerinde hücre sayımı için kullanılan alanların gösterimi (kırmızı).	30
Şekil 4-1: Larenks kanserli hastalarda <i>NMRAL1</i> , <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>CCND1</i> gen ifade sonuçları.....	40
Şekil 4-2:Larenks kanserli 12 hastanın tümör dokusuna ait NMRAL1 western blot görüntüsü	43
Şekil 4-3:Larenks kanserli 12 hastanın tümör dokusuna ait HTATIP2 western blot görüntüsü	44
Şekil 4-4: SCC-15 ve HET-1A hücre hatlarında <i>NMRAL1</i> , <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>CCND1</i> gen ifade sonuçları	46
Şekil 4-5: <i>NMRAL1</i> siRNA uygulaması sonrası SCC-15 hücre hatlarında <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>CCND1</i> mRNA ifade sonuçları.....	46
Şekil 4-6: <i>NMRAL1</i> siRNA uygulaması sonrası HET-1A hücre hatlarında <i>NMRAL1</i> , <i>HTATIP2</i> , <i>MYC</i> ve <i>CCND1</i> mRNA ifade sonuçları	47
Şekil 4-7:HET-1A hücre hattında NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin ICC yöntemi sonrası ışık mikroskobu görüntüsü (40X10 büyütme). A: NMRAL1 proteini, B: HTATIP2 proteini.....	48
Şekil 4-8:SCC-15 hücre hattında NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin ICC yöntemi sonrası ışık mikroskobu görüntüsü (40X10 büyütme). A: NMRAL1 proteini, B: HTATIP2 proteini.....	50

Şekil 4-9: <i>NMRAL1</i> siRNA uygulaması sonrası SCC-15 ve HET-1A hücrelerinde hücre canlılık test (MTT assay) sonuçları	51
---	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μg = mikrogram

μl = mikrolitre

$^1\text{O}_2$ = Tekli oksijen

Akt = Protein kinaz B

ARE = Antioksidan yanıt veren element

ASS = Arginio süksinat sentetaz

ATP = Adenozin trifosfat

BAD = Hücre ölümünün BCL2 ilişkili agonisti

BAFF = B hücre etkinleştirme etmeni

BBK = Baş ve boyun kanseri

BMK1 = Büyük MAP kinaz 1

CCND1 = Siklin D1

CTNNB1 = β -katenin

DHE = Dehidroepiandrosteron

DNA = Deoksiribonükleik asit

DSB = Çift zincir kırıkları

EBV = Epstein-Barr virüsü

EGF = Epidermal büyüme faktörü

EGFR = Epidermal büyüme faktörü alması

EMT = Epitel Mezenkimal Geçiş

ERK1/2 = Hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz ½

G6PD = Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

GDP = Guanozin difosfat

GR = Glutasyon redüktaz

GR = Glutasyon sentetaz

GSH = Glutasyon

GSK3 = Glikojen sentaz kinaz 3

GSTp = Glutasyon S-transferaz pi

GTP = Guanozin trifosfat

H₂O₂ = Hidrojen peroksit

HCC = Hepatoselüler karsinom

HIF = Hipoksi ile indüklenebilir faktör

HPV = İnsan papilloma virüsü

HTATIP2 = HIV-1 tat inaktif protein 2

HTLV = İnsan T hücresi lösemi virüsü

ICC = İmmünsitokimya

IDH = İzositrat dehidrogenaz

IL = İnterlökin

JNK = c-Jun N-uç kinaz

kDA = Kilodalton

Keap1 = Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1

LTp = Lenfotoksin β

MAPK = Mitojenle etkinleşmiş protein kinaz

MDA5 = Melanom farklılaşması ile ilişkili gen 5

mg = miligram

ml = mililitre

mRNA = mesajcı RNA

mTOR = Rapamisin kinazın mekanik hedefi

MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide

NADH = Nikotinamid adenin dinükleotit

NADPH = Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NER = Nükleotid çıkarma onarımı

NES = Çekirdek taşıma sinyali

NFκβ (NFKB) = Nükleer Faktör Kapa Beta

NGF = Sinir büyüme faktörü

NMRAL1 = Nmr-A benzeri redoks sensör 1

NO = Nitrit oksit

NO₂ = Nitrit dioksit

NOX4 = NADPH oksidaz 4
 Nrf2 = Çekirdeğe ait faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2
 O_2^- = Süperoksit
 ODR = Orta zincirli dehidrogenaz/redüktazlar
 OH $^\cdot$ = Hidroksil radikalleri
 ONOO $^-$ = Peroksinitrit
 OPN = Osteopontin
 p53 = Tümör protein 53
 PDGF = Platelet kaynaklı büyüme faktörü
 PDK = Fosfoinositid bağımlı protein kinaz
 PFY = Pentoz fosfat yolu
 PI3K = Fosfotidilinositol-3-kinaz
 PIP2 = Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat
 PIP3 = Fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfat
 pRB = Retinoblastoma protein
 PRC1 = Policomb baskılayıcı kompleksin 1
 PRDX = Peroksiredoksin
 PRX = Peroksiredoksin
 PTEN = Fosfataz ve tensin homologu
 RIG1 = Retinoikasıit ile uyarılan gen-1
 RNA = Ribonükleik asit
 RONS = Tepkin oksijen ve nitrojen türevleri
 SCLC = Küçük hücreli akciğer kanseri
 SDR = Kısa zincirli dehidrogenaz/redüktazlar
 SDS-PAGE = Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
 SHBBK = Skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri
 siRNA = susturucu RNA
 TKA = Trikarboksilik asit döngüsü
 TNF = Tümör nekroz faktör
 TRR = Tiorredoksin redüktaz

TRX = Tioeredoksin

UDR = Uzun zincirli dehidrogenaz/redüktazlar

VEGF = Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WHO = Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

Çelebi A. (2021). NMRAL1 Proteininin HTATIP2 Üzerine Etkisi ve Baş-Boyun Kanserinde Biyobelirteç Olarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Baş-boyun kanserlerinden en sık görülen skuamöz hücreli baş-boyun kanseridir. Kanser hücreleri artmış oksidatif stresi azaltmak, redoks dengesini korumak için NADPH'a ihtiyaç duyar. NADPH, Htatip2 ve Nmrall1 gibi proteinlerle etkileşime girerek işlev gösterir. Çalışmanın amacı; Nmrall1'in yokluğunda Htatip2'nin ifade düzeyinin ve hücresel yerleşiminin değişip değişmediğini belirlemektir. Htatip2 ile etkileşimi gösterilmiş olan c-Myc ve siklin D1 genlerinin Nmrall1 yokluğunda ifade düzeylerini incelemektir.

Kanserli ve normal hücre hatlarında Nmrall1 geni siRNA ile susturularak *HTATIP2*, *c-MYC* ve *CCND1* gen ifade düzeylerine bakılmıştır. İmmünohistokimya ile Nmrall1 ve Htatip2'nin hücresel yerleşimi belirlenmiştir. Ayrıca larenks kanserli 50 hastanın tümör ve normal dokularında mRNA ve protein ifadelerine bakılmıştır.

NMRAL1 geni normal baş-boyun hücre hattında %62, kanser hücre hattında %74 susturuldu. Susturma sonrası; kanser hücre hattında *HTATIP2* ve *CCND1* mRNA ifadesi değişmezken, *c-MYC* ifadesi azalmıştır. Normal hücre hattında *HTATIP2* mRNA ifadesi azalırken, *c-MYC* ve *CCND1* ifadesi değişmedi. *NMRAL1* susturması sonrası; Htatip2 protein miktarı ve yerleşimi kanserli hücre hattında değişmezken, normal hücre hattında sitoplazmada yoğunlaşmıştır. *NMRAL1* ifade düşüklüğü her iki hücre hattında hücre canlılığını ortalama %60 oranında azaltmıştır. Larenks tümör dokularında *NMRAL1* (p=0,001) ve *c-MYC* (p<0,001) mRNA ifadesi azalmıştır. *HTATIP2* ifadesi artan hastaların %85,2'sinde *c-MYC* ifadesi, %65,9'unda *CCND1* ifadesi azalmaktadır. *NMRAL1* mRNA ifadesi azalan hastaların %85,7'sinde *c-MYC* ifadesi azalmaktadır.

Sonuç olarak; Normal baş-boyun hücre hattında *NMRAL1* geni yokluğunda Htatip2 proteininin sitoplazmada daha yoğun olması sitoplazmik görevlerinin arttığını düşündürmektedir. *HTATIP2* larenks kanserinde *c-MYC* ve *CCND1* gen ifadesi üzerine baskılayıcı etkisi söz konusudur. Ancak *NMRAL1* geninin *c-MYC* ile aynı yönlü, *CCND1* ile ters yönlü korelasyon göstermektedir. Öngörülen bu ilişkileri belirlemek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Baş-Boyun kanseri, NMRAL1, HTATIP2, siRNA, Western Blot

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30790

ABSTRACT

Celebi, A.(2021). The Effect of NMRAL1 Protein on HTATIP2 and Investigation as a Biomarker in Head and Neck Cancer. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetic. PhD Thesis. Istanbul.

Head and neck squamous cell carcinoma is the most common head and neck cancer type. Cancer cells need NADPH to reduce increased oxidative stress and preserve redox balance. NADPH performs by interacting with proteins such as Htatip2 and Nmral1. Purpose of the study is to determine altering expression level and cellular location of Htatip2 in absence of Nmral1. Furthermore, to explore the expression levels of *c-MYC* and cyclin D1, which have been shown to interact with Htatip2, in absence of Nmral1.

HTATIP2, *c-MYC* and *CCND1* gene expression levels were examined by silencing the *NMRAL1* gene with siRNA in cancerous and normal cell lines. The cellular localization of Nmral1 and Htatip2 was determined by immunocytochemistry assay. Also, mRNA and protein expressions in tumor and normal tissues of 50 patients with larynx cancer were examined.

The *NMRAL1* gene was silenced 62% in head and neck normal cell line and %74 in cancer cell line. In normal cell line, *HTATIP2* mRNA expression was decreased while *c-MYC* and *CCND1* did not change after silencing. After *NMRAL1* silencing, the amount and location of Htatip2 protein did not change in the cancer cell line but it was concentrated in the cytoplasm in the normal cell line. Low expression of *NMRAL1* was decreased cell viability by approximately 60% in both cell lines. *NMRAL1* ($p=0.001$) and *c-MYC* ($p<0.001$) mRNA expression was decreased in laryngeal tumor tissues. *c-MYC* and *CCND1* expression was decreased in 85.2% and 65.9% of patients with increased *HTATIP2* expression, respectively. *c-MYC* expression was also decreased in 85.7% of patients with decreased *NMRAL1* mRNA expression.

As a result, absence of the *NMRAL1* gene in normal head and neck cell line, the Htatip2 protein is more concentrated in the cytoplasm. This suggests that cytoplasmic functions of Htatip2 might be increased. *HTATIP2* has a suppressive effect on *c-MYC* and *CCND1* gene expression in laryngeal cancer. *NMRAL1* gene has a positive correlation with *c-MYC* but contrarily with *CCND1*. Further studies are needed to determine this predicted association.

Key Words: Head and neck cancer, NMRAL1, HTATIP2, siRNA, Western blot

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 30790

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Baş ve boyun bölgesinin anatomik ve işlevsel karmaşıklığından ötürü neoplastik sürecin iyi anlaşılması, baş ve boyun kanseri (BBK) biyolojisi açısından önem taşımaktadır. Baş ve boyun bölgesinin en sık görülen habis neoplazmaları, epitel kökenli skuamöz (yassı) hücreli baş ve boyun kanseri (SHBBK) ve papiller tiroid kanseridir. Baş ve boyun kanserlerinin neredeyse tamamını oluşturan SHBBK için en önemli risk faktörleri arasında tütün ve alkol tüketimi, viral enfeksiyonlar ve genetik yatkınlık yer almaktadır.

Tepkin oksijen ve nitrojen türevleri (RONS) olarak adlandırılan serbest radikaller, hücrede oksidatif stresi artırarak DNA'da hasar oluşturur ve kanserleşmenin başlamasına neden olur. Bir hücrede RONS düzeylerinin dengede tutulması redoks mekanizması için oldukça önemlidir. Bozulmuş RONS düzeyi ile ortaya çıkan oksidatif stres, DNA'nın bütünlüğünü koruyamaması, biyolojik yolların ve hücre metabolizmasının bozulması kanserleşme, kanser tedavisine yanıt ve sonrası tüm aşamaları etkiler.

Kanser hücrelerinde oksidatif strese karşı koymak, redoks dengesini korumak üzere NADPH üretmek için Pentoz Fosfat Yolu (PFY) etkinleştirilir. NADPH, çoğu kanser türünde artan ROS'un atılmasına ve nötralizasyonunda etkin rol oynar. NADPH'ın işlevini yerine getirebilmesi için Rossmann katlanmasına sahip HTATIP2 ve NMRAL1 gibi proteinlerle etkileşime girmesi gerekmektedir. HTATIP2 ve NMRAL1 proteinleri hücre homeostazında redoks sensörü olarak görev almaktadır. Birçok kanserde etkinliği bilinen HTATIP2 ve NMRAL1 proteinleri, DNA onarımı, doğal bağışıklık, apoptoz ve anjiogenez gibi hücresel süreçlerde görev alırlar.

Atipik SDR gen ailesinde yer alan, benzer görevleri ve ortak etkileşimleri olan *NMRAL1* ve *HTATIP2* genlerinin birbiri üzerine etkinliklerini içeren bir çalışma bulunmamaktadır. “Hücre içerisinde *NMRAL1* yokluğunda *HTATIP2*'nin ifade düzeyi nasıl etkileniyor, hücresel yerleşimi değişiyor mu? *HTATIP2* de gösterildiği gibi *NMRAL1* geni de *MYC* ve *CCND1* gen ifadeleri üzerine bir etkinlik gösteriyor mu? Bu etkinlik baş-boyun hücrelerinde *NMRAL1* geni yokluğunda, nasıl değişiyor?” sorularına cevap bulmak için bu çalışma tasarlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Vücudun baş ve boyun bölgesi, nispeten küçük bir alanda, çok sayıda hayati yapının birleşimi ile oluşan, anatomik ve histolojik olarak en karmaşık bölgelerinden biridir. Bu bölge kemik, sinir, arter, venöz, kas ve lenfatik yapıları içerir (1). Baş ve boyun bölgesinin anatomik ve işlevsel karmaşıklığından ötürü neoplastik sürecin iyi anlaşılması, baş ve boyun kanseri (BBK) biyolojisi açısından önem taşımaktadır (2,3).

2.1. Baş ve Boyun Kanser Etiyolojisi

Baş ve boyun kanserlerinin büyük çoğunluğu, ağız boşluğu, yutak, gırtlak, burun boşluğu ve sinüsler dahil olmak üzere üst aerodigestive mukozadan köken alır. Bu bölgedetükürük bezleri, tiroid ve paratiroid bezleri, yumuşak doku, kemik ve deriden de köken alan kanserler vardır. Baş ve boyun bölgesinin en sık görülen habis neoplazmaları, skuamöz (yassı) hücreli baş ve boyun kanseri (SHBBK) ve papiller tiroid kanseridir. Tükürük bezi kanserleri, yumuşak doku ve kemik sarkomları nispeten daha az görülür (2).

Baş ve boyun bölgesinin epitel kökenli habis oluşumlarının neredeyse tamamını oluşturan SHBBK için en önemli risk faktörleri tütün ve alkol tüketimidir. Vakaların yaklaşık %75'inde tütün ve alkol tüketimi görülmekte ve ikisinin etkisi birleştiğinde kanser riski artmaktadır. Tütün kullanımı gırtlak kanseri, alkol tüketimi ise yutak ve ağız boşluğu kanserleri ile ilişkili bulunmuştur (2-4).

Viral enfeksiyon BBK için etiyolojik bir etmendir. 1966'da Epstein-Barr virüs enfeksiyonu ile BBK arasındaki ilişki gösterilmiştir. İnsan papilloma virüsü (HPV) özellikle HPV alt tipi HPV16-18 başta orofaringeal kanser olmak üzere BBK'ler için güçlü bir risk etmenidir. HPV viral genlerinden E6 ve E7 tümörjenik olarak kabul edilir. Bu viral genler, TP53 ve retinoblastoma protein (RB) işlevinin baskılanması, NADPH oksidaz'ın etkinleşmesi, antioksidan proteinlerin baskılanması sonrası oksidatif stresin artmasıyla BBK oluşumunu tetikler (3,5-7).

Erkeklerde baş ve boyun kanseri görülme sıklığı kadınlardan daha yüksektir. Esrar kullanımı genç kanser hastaları için bir risk etmenidir. Uzun süreli pasif sigara tüketimi, düşük vücut kitle indeksi ve cinsel davranış (aynı cinsiyetten cinsel ilişki

öyküsü (özellikle erkeklerde) BBK'ne yakalanma riskini arttırır. Diğer etmenler ise; ileri yaş, yeşil yapraklı sebzelerin az tüketilmesi, yağ bakımından zengin diyet, tuzlanmış et tüketimi, boya-aspest-benzin dumanı-radyasyona maruz kalma olarak sıralanabilir (3,4).

Baş ve boyun kanseri gelişiminde genetik yatkınlığın da rolü bulunmaktadır. Birinci derece akraba evliliği olan ailelerde BBK riski 1,7 kat artmıştır. Tütün ve alkol metabolizmasında rol alan enzimleri kodlayan genlerdeki genetik polimorfizmler de hastalık riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser, Li-Fraumeni sendromu, Fanconi anemisi ve ataksi telenjektazi gibi kansere yatkınlık sendromları olan kişilerde SHBBK riskinde artış görülmüştür (2,3,8). Folat metabolizması, DNA onarımı ve hücre dönüğüşünde yer alan genlerdeki polimorfizmlerin de BBK gelişimi üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir (9-11). Ayrıca sitokrom p450 ve antioksidan enzim sistemleri, NADPH metabolizması bozuklukları da BBK oluşumunda etkilidir (11-14).

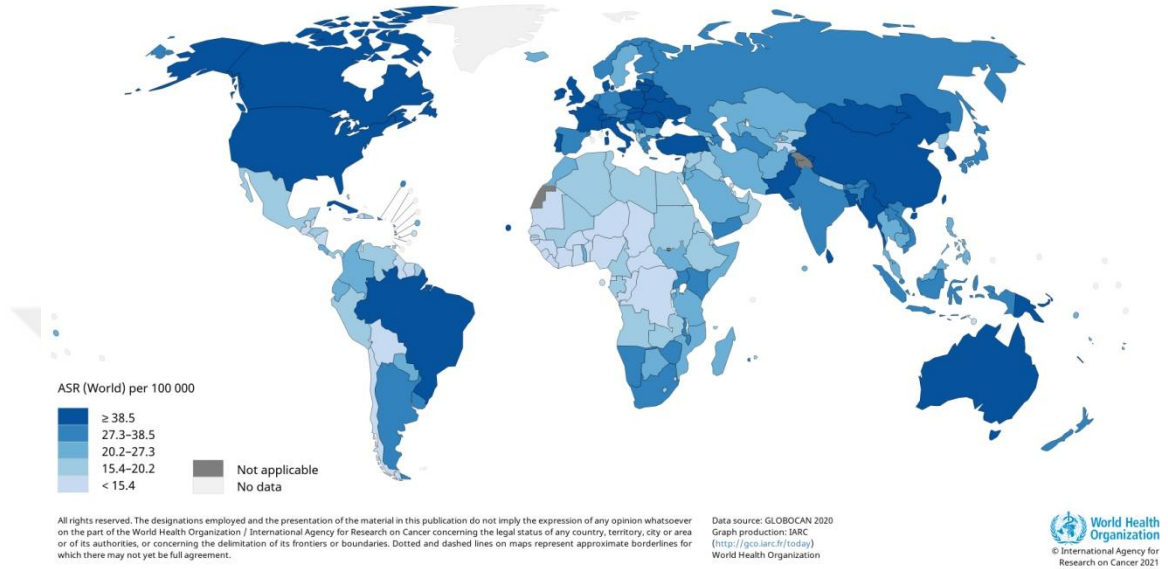
2.2. Baş ve Boyun Kanseri Epidemiyolojisi

Uluslararası kanser araştırma ajansının yayınladığı GLOBOCAN 2018 raporuna göre; 2018 yılında kadınlarda ve erkeklerde 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser kaynaklı ölüm olabileceği öngörülmüştür. Endüstriyel gelişime bağlı olarak çevre kirliliği ve insan yaşam tarzındaki değişiklikler mevcut hızıyla devam ederse, tahminlere göre 2030'a kadar, her yıl yaklaşık 13 milyon insan kanserden kaybedilecektir. Ölümün dörtte üçü Türkiye'nin de aralarında bulunduğu düşük ve orta gelirli ülkelerde görülecektir (15).

GLOBOCAN 2008 raporuna göre, her yıl 650,000 yeni kanser vakası ve 350,000 kanser kaynaklı ölüm oranı ile BBK en yaygın altıncı kanser türüdür (2,16). Ağız ve orofarenks kanserleri 10. en yaygın kanser türleri olup kansere bağlı ölümlerde yedinci sırada yer alır (3). Ağız boşluğu kanseri için yüksek riskli bölgeler Melanezya adaları ve güney-merkez Asya, batı ve güney Avrupa ve güney Afrika; gırtlak kanseri için Güney Amerika, Türkiye'nin de aralarında sayılabileceği güney ve doğu Avrupa ile batı Asya ülkeleridir (2).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020'de 20 yaş üzeri kadın ve erkeklerde BBK (gırtlak, hipofarinks, nazofarenks, orofarenks, tükürük bezleri, dudak, ağız boşluğu ve tiroid kanseri) görülme sıklığı verileri derlendiğinde; 69,8/100000 oranı ile en yüksek

Cabo Verde (Yeşil Burun Adaları) ilk sırada yer alırken Türkiye için bu değer 39/100000'dir. Sadece gırtlak kanseri açısından değerlendirildiğinde Küba en sık görülen ülke olup (13/100000), Türkiye 6,9/100000 görülme sıklığı ile yüksek ülkeler arasında yer alır (17).



Şekil 2-1:Larenks kanseri WHO insidans (17)

2.3. Kanser Biyolojisi

Tek bir hücrede meydana gelen birçok olayın birleşmiş etkisi sonucu ortaya çıkan bir bozukluk olan kanser; başlama, artma ve ilerleme olmak üzere 3 aşamada tanımlanır. Tepkin oksijen ve nitrojen türevleri (RONS) olarak adlandırılan serbest radikaller bu 3 aşamada da işlev görür ve hücrede oksidatif stresin oluşmasına neden olur. Oksidatif stresin karsinogenezdeki etkisi, ilgili radikallerin tipi ve etkinleşmesi ile doğru orantılıdır. RONS aracılığıyla oksidatif stresin DNA'da oluşturduğu hasar artar ve bir hücreden kanserleşme başlar. Artma aşamasında, hücre çoğalmasının uyarılması ve apoptozun baskılanması ile başlayan hücrelerin klonal büyümesi gerçekleşir. Oksidatif stres bu aşamada oldukça etkindir. RONS; çoğalma ve apoptoz ile ilgili genleri, belirli yazılım etmenlerinin (nükleer faktör- κ B (*NF κ B*), *NRF2*, *HIF* ve *TP53* vb.) etkinliğini düzenleyerek mutasyon taşıyan hücre klonlarının büyümesini, çoğalmasını ve onkogenezi kontrol edebilir. Bu da hücrede RONS düzeylerinin dengede tutulmasının redoks mekanizması için oldukça önemli olduğunu göstermektedir. RONS'in etkisi ile ortaya çıkan oksidatif stres sonucu, DNA'nın bütünlüğünü koruyamaması, biyolojik yolların ve hücre metabolizmasının

bozulması kanserleşme, kanser tedavisine yanıt ve sonrası tüm aşamalarda etkilidir (18-22).

Oksidatif stres ve RONS saldırıları hücre dışı veya hücre içi normal metabolizmanın yan ürünleri olarak ortaya çıkabilir. Hücre dışı etmenler, UV ışınları, γ ışınları, tütün dumanı, alkol ve kemoterapötikler; hücre içi etmenler ise aminsizleşme vepürinsizleşme gibi DNA baz hasarları, S-adenosilmetiyonin ve aldehitler gibi reaktif kimyasallardır (23,24).

2.3.1. Serbest Radikal Oluşturan Hücre İçi Uyarıcılar

RONS'ler canlı sistemler için hem yararlı hem de zararlı etkiye sahiptir. Düşük derişimlerde enfekte edici ajanlara karşı savunmada, hücresel sinyal ileti işlevinde yararlı etki gösterirken; yüksek derişimlerde lipitler, lipoproteinler, proteinler ve nükleik asit gibi hücresel yapılara zarar verir. Süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$) ve tekli oksijen ($^1O_2$), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitrik oksit (NO), nitrit dioksit (NO_2) gibi serbest radikaller DNA'yı oksitleyebilir. Bu da oksitlenmiş bazlar ve tek/çift zincir kopmaları dahil olmak üzere çeşitli DNA hasarına yol açabilir (24-26).

Çoğunlukla metabolik ve diğer biyokimyasal tepkimelerin bir sonucu olarak hücre içerisinde sürekli olarak RONS oluşur. Endojen kaynaklar arasında mitokondri, mikrozomlar, endoplazmik retikulum, peroksizomlar, nötrofil, eozinofil ve makrofajlar RONS üretir (23,25).

RONS, aerobik solunumda ATP üretiminin yan ürünleri olarak mitokondride sürekli üretilir ve tüm aerobik organizmalarda oksidatif hasarın ana kaynağı olduğu kabul edilir. Ayrıca serbest radikal oluşumunun bir diğer kaynağı ise viral enfeksiyonlara maruz kalmaktır. Oluşan serbest radikaller, kısa yarı ömürleri süresince, diğer moleküllerden bir elektron yakalamaya çalışır ve temas ettiği hücresel bileşenlerin kimyasal yapısını geri döndürülemez şekilde değiştiren bir zincirleme tepkimeye neden olur (24,26-28).

Endoplazmik retikulum; protein disülfid izomeraz, endoplazmik retikulum oksidoredüktin, NADPH oksidaz (özellikle NOX4) ve diğer mekanizmalar aracılığı ile protein katlanması sırasında ROS kaynağı olarak işlev görür. Ayrıca

peroksizomlar, yağ asitlerinin b-oksidasyonu ve flavin oksidaz etkinliği ile ROS üretir (29,30).

2.3.2. Serbest Radikal Oluşturan Hücre Dışı Uyarılar

Serbest radikal oluşumunun büyük bir kısmı endojen kaynaklı olmasına rağmen ekzojen etmenler de hücrenin redoks dengesini bozmaktadır. Genotoksik olmayan kanserojenler, ksenobiyotikler, ultrason, mikrodalga radyasyonu, ağır metaller, sigara, alkol gibi çevresel ajanlar hücrede doğrudan veya dolaylı olarak RONS oluşumunu uyarabilir (31,32).

Kemoteropötik doksorubisin; topoizomeraaz ve DNA ile karmaşık oluşturarak çift zincir kırıklarına, RONS düzeylerinin ve hücresel hasarın artmasına yol açabilir (33). Baş ve boyun kanserleri başta olmak üzere birçok kanser türünün gelişimine neden olan, nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi kanserojenler açısından zengin sigara dumanı, hücrede 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) birikmesine neden olur. Alkoliklerde de aşırı miktarda serbest radikal üretilir. Etanol, sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) tarafından önce asetaldehite dönüşür, daha sonra asetata oksitlenir. Artan CYP2E1 etkinliği, ROS üretiminin artmasına yol açar (34,35).

2.3.3. RONS'lara Karşı Antioksidan Sistemi

Enzimatik Antioksidan Sistemi

Fizyolojik koşullar altında hücreler, RONS'lerin potansiyel zehirlenme etkisini ortadan kaldırmak, oksidatif stresi azaltmak ve homeostazı korumak için, bir dizi antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir. Enzimatik antioksidan sistem bileşenleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), peroksiredoksin (PRDX), katalaz, tioredoksin, glutatyon peroksidaz ve hem oksijenaz bulunur. Bu enzimler RONS'leri nötralize etmek için birlikte çalışır. SOD'un, mitokondri ve sitoplazmada farklı izoformları bulunur. SOD, $O_2^{\cdot -}$ 'yi O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştürebilir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz ise H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye dönüştürür (26,36).

Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemi

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında hücreler tarafından üretilen tiol antioksidanlar [tioredoksin, glutatyon (GSH) ve lipoik asit], nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ın yanı sıra A, C ve E vitaminleri, doğal flavonoidler,

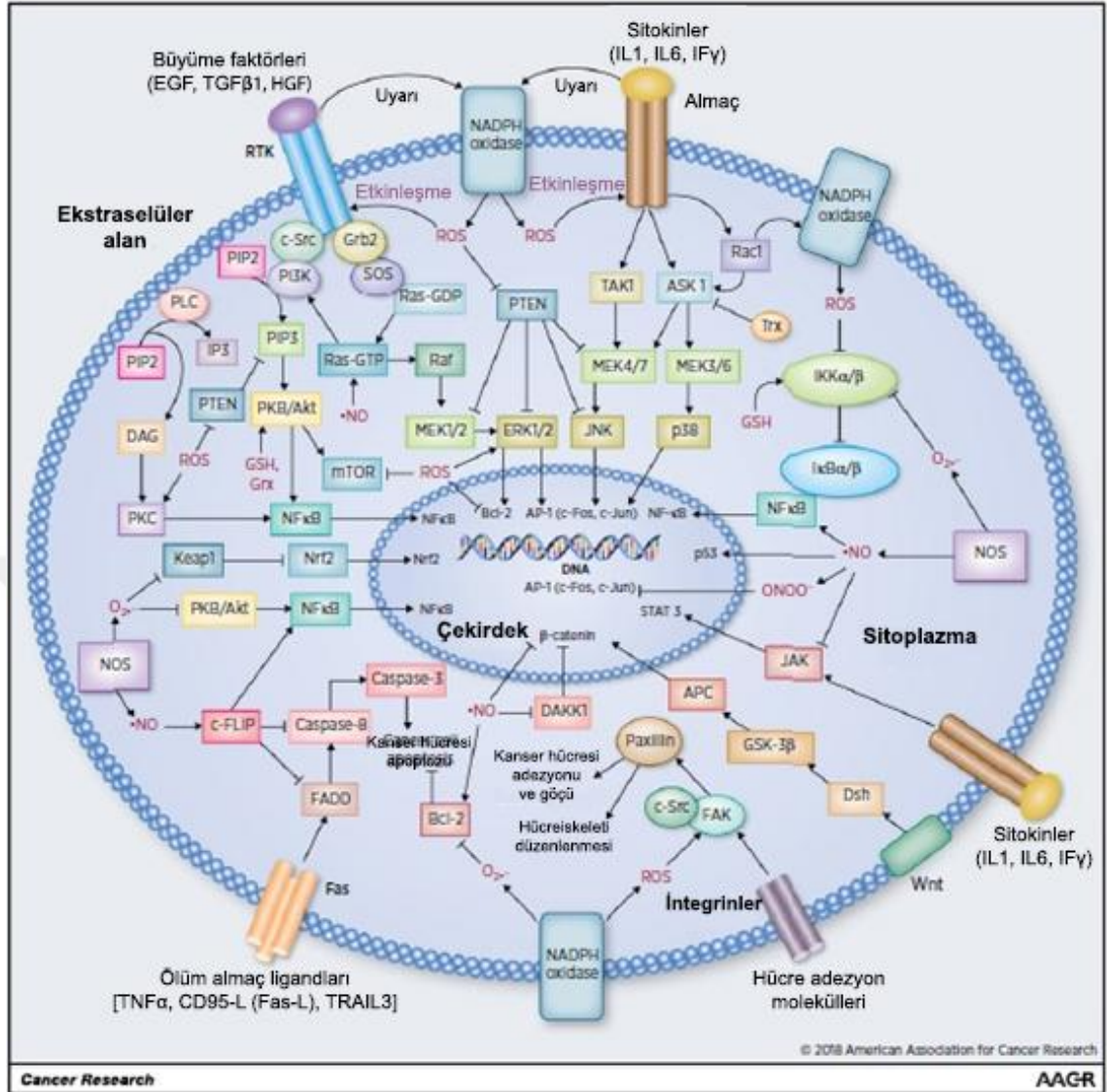
selenyum ve β -karoten gibi diyet bileşenler de bulunur (25,36). Bazı antioksidanlar hidrofobik ortamda etkin iken diğerleri hidrofilik ortamda bazıları ise hücrenin her iki ortamında da etkinlik gösterir. Örneğin; C vitamini hidrofilik ortamda süperoksit ile tepkimeye girerken, E Vitamini bunu lipofilik ortamda yapar. Ancak lipoik asit hem suda hem de yağda çözünbildiği için hücre zarının yanı sıra sitozolde de antioksidan etkisini gösterir (25).

Tioredoksin ve GSH, H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştüren peroksidazlara elektron vericisi olarak görev yaparlar. Yeniden üretilbilmeleri için de diğer bir metabolit olan NADPH'a ihtiyaç duyarlar (36). Tiol antioksidanlara ek olarak yüksek miktarda karotinoidlerin varlığı da lipitleri peroksidatif hasara karşı korur (25).

Enzimatik olmayan antioksidan sistem bileşenleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, eksikliklerinin akciğer, kolon, mide, prostat, meme, deri gibi birçok kansere ve immün sistem bozukluklarına neden olduğu gösterilmiştir (25,37-39).

2.3.4. RONS ile İlişkili Sinyal Yolları

RONS düzeyleri enzimatik olan ve olmayan antioksidan moleküller ile kontrol altında tutulur. Yukarıda sözü edilen tüm antioksidan sistem bileşenleri, RONS düzeyini dengede tutamaz ve redoks durumu bozulur ise bazı sinyal yolları yüksek RONS düzeyinden etkilenir (Şekil 2-2) (40).



Şekil 2-2: RONS'un etki ettiği kanser sinyal yolları

PI3K-AKT Sinyal Yolu

Fosfoinositid-3-kinaz PI3K/AKT yolu, büyüme etmeni (EGF, PDGF, NGF, VEGF), hormon (prostaglandin, PGE2) ve sitokin (IL-17, IL-6 ve IL-2) uyarılarına yanıt olarak, protein sentezi, hücre döngüsü, çoğalma, apoptoz, otofaji ve ilaç direnci dahil olmak üzere birçok hücresel süreçlerde görev alır. Büyüme etmenlerinin almaçlarına bağlanması ile etkinleşen PI3K, fosfatidilinositol 4,5-bifosfattan (PIP2) fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3) sentezini katalize eder. Bir sinyal molekülü olan hücre zarında bulunan PIP3, fosfoinositid bağımlı protein kinaz (PDK) ve protein kinaz B (AKT)'yi etkinleştirir. AKT, hedef genlerinin (*GSK3*, *FOXO*, *BAD*, *MTOR1* ve *TP53*) etkinleşmesini ve yazılımını uyarır (40-42). RONS, doğrudan

PI3K'yi etkinleştirebildiği gibi, PIP3 sentezini negatif olarak düzenleyen ve AKT'nin etkinleşmesini engelleyen fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) etkinliğinin ortadan kalkmasına neden olur. PTEN'in fosforillenmesini uyayarak proteolitik yıkıma zorlar (40,43).

RAS/MAPK Sinyal Yolu

Hücre dışı sinyalle ilişkili kinazlar (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK), p38 kinaz (MAPK14) ve büyük MAP kinaz 1 (BMK1)'den oluşan mitojenle etkinleşmiş protein kinaz (MAPK) yolu; hücre büyümesi, farklılaşması, gelişimi, hücre döngüsü ve hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerde önemli rol oynayan hücre içi sinyal ileti yoludur. ERK, JNK, MAPK14 ve BMK1'dan oluşan dört MAP kinaz , oksidatif stres, büyüme etmenleri (EGF, PDGF) ve sitokinler (IL-1 β , FAS ve TNF) tarafından etkinleştirilir. Büyüme etmenlerinin ve sitokinlerin almaçlarına bağlanması sonrası, GDP'ye bağlı Ras GTP'ye dönüştürülür ve bu da Ras'ı etkinleştirir. Ras etkinleşmesi ile başlayan akış ERK, JNK, MAPK14 ve BMK1'in çekirdeğe göçü ve ilgili yazılım etmenlerinin etkinleşmesi ile sonlanır. Yüksek RONS düzeylerinin oluşturduğu oksidatif stres, doğrudan veya dolaylı olarak ERK, MAPK14 ve BMK1'in etkinleşmesini başlatabilir; JNK ile etkileşime giren glutatyon S-transferaz pi'nin (GSTp) ayrılmasını uyarıp JNK'nın uzun süreli etkin kalmasını sağlar (40,44-48).

Keap1-Nrf2-ARE Sinyal Yolu

Keap1-Nrf2-ARE, hücrel redoks dengesi ve metabolizmasının sürdürülmesinde etkili bir yoldur. Hücre içi RONS düzeyi arttığında, çekirdeğe ait faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2)'nin engelleyicisi olan Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (KEAP1)'in etkileşimi bozular. Ayrılan NRF2 çekirdeğe göç eder. Oksidatif stresi önlemek için glutatyon sentetaz (GSS), glutatyon redüktaz (GR), Gpx, tioredoksin (TRX), tioredoksin redüktaz (TRR) ve peroksiredoksin (PRX)'in antioksidan yanıt veren element (ARE) dizisine bağlanır. Bu durum da antioksidan enzimlerin çevirmini sağlar (49-51).

NF- κ B Sinyal Yolu

Yazılım etmeni NF- κ B, immün yanıt, hücrel yapışma, farklılaşma, çoğalma, otofaji, yaşlanma ve apoptoz dahil bir dizi hücrel süreçte rol alır. NF- κ B

ailesi REL (c-Rel), RELA (p65), RELB, p50/p105 (NF- κ B1) ve p52/p100 (NF- κ B2) 'den oluşur. NF- κ B yolu, kanonik ve kanonik olmayan yollar üzerinden etkinleştirilebilir. Kanonik NF- κ B-etkinleştirici yol; strese ve proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak tetiklenir. Daha sonra I κ B-kinaz β 'nin (IKK- β) ve I κ B α 'nın fosforillenmesi ve I κ B α 'nın ubikütilenerek proteazomlar tarafından parçalanması gerçekleşir. Son olarak NF- κ B, hedef genlerinin yazılımlarını etkinleştirmek için çekirdeğe göç eder. Kanonik olmayan NF- κ B yolu ise B hücre etkinleştirme etmeni (BAFF), lenfotoksin β (LTp), CD40L, CD27L, insan T hücresi lösemi virüsü (HTLV) ve Epstein-Barr virüsü (EBV) tarafından etkinleştirilir (52-54).

RONs, esas olarak I κ B α 'nın fosforillenmesini baskılayarak NF- κ B yolunun etkinleşmesini sağlar. Ayrıca I κ B'nin ubikütilenmesi ve proteolitik yıkımı, ardından NF- κ B'nin etkinleşmesini bozarak etkinleşmiş NF- κ B'nin sitoplazmadan çekirdeğe geçişini düzenler. Yüksek RONS düzeyinin negatif etkisine karşın NF- κ B yolu, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GST-pi, MT3 ve FHC gibi antioksidan proteinlerin ifadesini artırarak RONS seviyelerini düzenler. NF- κ B, sitokin etkinliğinin ve immüno regülatör genlerin kontrolünde görev alır. Steroid hormonlar, antioksidanlar, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar ve proteaz inhibitörleri tarafından NF- κ B etkinliğinin baskılanması, kanser başta olmak üzere inflamatuvar yanıt içeren birçok hastalıkta bir tedavi hedefidir (40,55-57).

2.3.5. Enerji Metabolizması ve kanserde yeniden düzenlenmesi

Memeli hücrelerinin ana enerji kaynağı olan glikoz, glikoliz yoluyla sitoplazmada piruvata metabolize edilir. Daha sonra, oluşan piruvat mitokondride trikarboksilik asit döngüsüne (TKA) girerek oksidatif fosforillenme yoluyla ATP üretmek üzere yıkıma uğrar. Ancak kanser hücreleri hızlı ve kontrolsüz büyümelerini devam ettirebilmek için artan besin ihtiyacının yanında besinlerin kullanılma şeklini de değiştirir ve enerji metabolizmasını yeniden düzenler. Kanser hücrelerinde glikoliz yoluyla oluşan piruvatın çoğu sitoplazmada laktata dönüştürülerek tümör mikroçevresine salgılanır. Bu nedenle kanser hücrelerinde glikoliz ve TKA birbirinden ayrılmıştır. Yüksek oksijen varlığında bile kanser hücrelerinin seçtiği bu metabolik yol aerobik glikoliz veya warburg etkisi olarak adlandırılır (58-60).

Kanser hücrelerinde aerobik glikolizin ara ürünleri, nükleik asit, yağ asidi ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfatı (NADPH) sentezlemek üzere pentoz fosfat

yoluna (PFY) yönlendirilir. PFY, aerobik glikolizin bir kolu olup sitozolde gerçekleşir. Oksidatif ve oksidatif olmayan dal olarak iki biyokimyasal dala ayrılır. Oksidatif olmayan dal aminoasit ve nükleik asit sentezi için gerekli iken oksidatif dal nükleik asit, CO₂ ve NADPH sentezi için gereklidir (61-63).

PFY, oksidatif strese karşı koymak, redoks dengesini korumak üzere NADPH üretmek için etkinleştirilir. NADPH, çoğu kanser türünde artan RONS'un atılmasına ve nötralizasyonuna yardımcı olur (62,64). Ayrıca NADPH, yağ asitleri veya kolesterol sentezi gibi anabolik süreçlerde katalitik indirgeme gücü sağlarken; ksenobiyotik metabolizmasında da ilaç ve kimyasal zehirsizleştirme mekanizmalarında yer alır. Bunların yanında granülosit ve makrofajlar gibi immun sistem hücrelerinde “solunum patlaması” adı verilen savunma sistemi içerisinde patojenleri yok etmek için kullanılan RONS’ların üretiminden sorumludur (65).

NADPH’a bağlayabilme özelliği olan proteinlerin katlanması, Rossmann tarafından 1970 yılında tespit edilmiş ve o günden itibaren “Rossmann Katlanması” olarak adlandırılmıştır (66). Rossmann katlanma yapısı, ortada 6/7 β tabakanın her iki ucunda 3/4 α sarmaldan oluşan bir yapıdır. Bu yapısal motif, glisin bakımından zengin bir dizi ile tanımlanır, NAD(H) veya NADP(H)’ın uyumlu bir şekilde bağlanmasını sağlar. Glisin açısından zengin motifin ikinci β -sarmalından hemen sonra Adenin ribozun 2've 3' hidroksillerine bağlanan asidik bir kalıntı, NAD(H) özgüllüğünü belirler. NADP(H) bağlanmasını ise ikinci sarmaldan sonraki bazik kalıntının varlığı belirler (67).

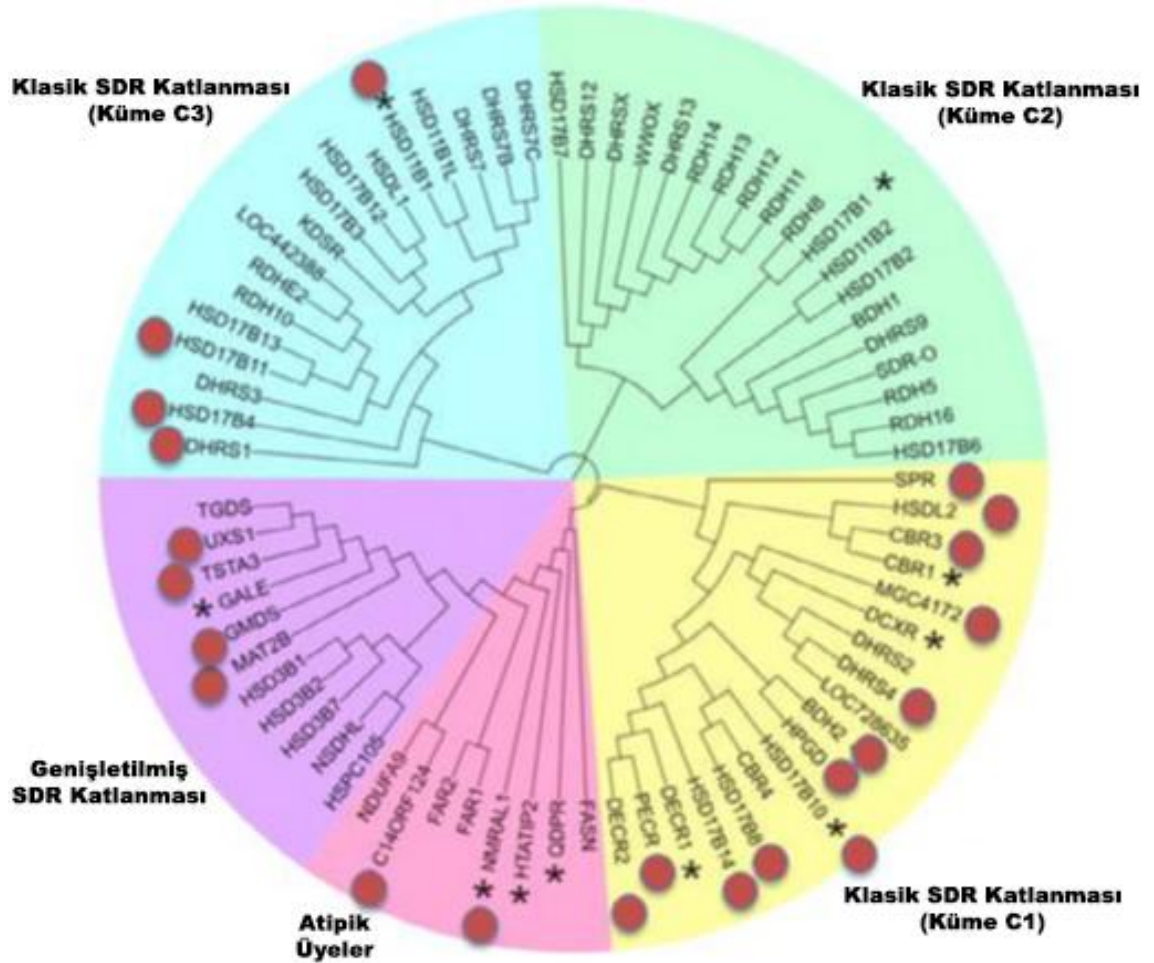
2.4. Oksidoredüktazlar ve Kısa Zincirli Dehidrogenaz/Redüktazlar (SDR) Ailesi

Oksidoredüktazlar, redoks tepkilerini katalizleyen büyük bir enzim ailesidir. Prokaryotlardan memelilere birçok organizmada geniş aileler ile temsil edilen oksidoredüktazların farklı metabolik işlevleri bulunur. Etanol ve ksenobiyotiklerin kullanımı ve zehirsizleştirilmesi, hormonların ve sinyal moleküllerinin düzenlenmesi, metabolizma/yazılımda redoks durumunun algılanması gibi hayati hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev alırlar (68).

1981 yılında maya, böcek ve memeli alkol dehidrogenazlarının farklılıklarının belirlenmesi üzerine yürütülen çalışmada farklı NADPH bağımlı dehidrogenazların varlığı keşfedilmiştir. Yapılan ileri çalışmalar ile farklı motifler, protein zincir uzunluğuna, mekanik ve yapısal özelliklerine göre NADPH bağımlı 3

oksidoredüktaz sınıfı belirlenmiştir; kısa zincirli dehidrogenaz/redüktazlar (SDR), orta zincirli dehidrogenaz/redüktazlar (ODR) ve uzun zincirli dehidrogenaz/redüktazlar (UDR) (69-72). Bu üç tip oksidoredüktaz için ortak olan, dinükleotid kofaktör bağlanma motifi olan Rossmann katlanma motifini içermeleridir (68).

Başlangıçta böcek tipi alkol dehidrojenaz ailesi olarak adlandırılan SDR'ler, en büyük protein süper ailelerinden biridir. Basit organizmalardan gelişmiş ökaryotlara kadar birçok organizmada bulunan 47.000'den fazla üyeye sahiptir. İnsanda SDR ailesi; 3 adet klasik, bir genişletilmiş ve bir de yazılımsal düzenleyicilerin yer aldığı atipik SDR'ler olarak 5 alt gruba ayrılır (Şekil 2-3). Tüm dehidrogenazların %25'ini SDR ailesi oluşturur. Kofaktör olarak NADH veya NADPH kullanır ve kofaktör bağlama bölgesi N-uç bölgesinde bulunur (73-75).



Şekil 2-3:İnsanda SDR ailesinin alt grupları (75)

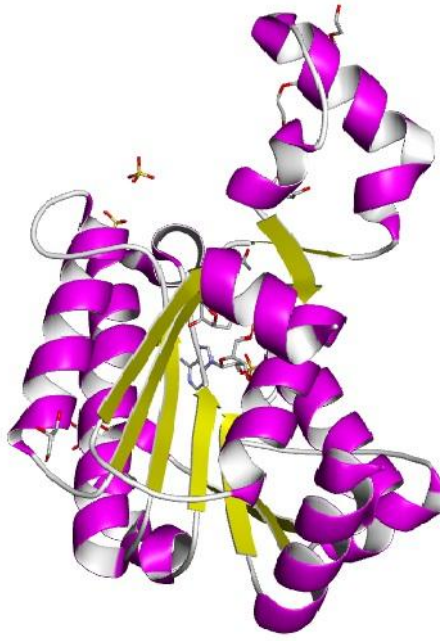
İnsanlarda, bilinen 82 SDR geni vardır. SDR genleri, şeker, nükleotid, steroid hormon, prostaglandin, retinoid, lipit metabolizması ve ksenobiyotik (ilaçlar ve kanserojenler vb.) zehirsizleştirilmesinde etkin rol oynarlar. 24 SDR geni OMIM veritabanındaki (76) genetik kusurlarla ilişkili hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, bu enzimlerin çoğu tıbbi açıdan taşımaktadır (68,73,75).

Metabolik işlevlerin yanı sıra, atipik SDR proteinlerinin, redoks durumuna veya yazılıma katılmada ve dolayısıyla metabolik yolları kontrol etmede kritik önemi sahip oldukları görülmektedir (75). Özellikle enzimatik etkinlik göstermeyen oksidoredüktazlardan olan, oldukça benzer üç boyutlu SDR katlanmasına sahip *HTATIP2* ve *NMRAL1* genlerinin hücresel işlevlerinin yazılım aşamasında (yapısal yeniden düzenlenmeler) redoks sensörü olduğu düşünülmektedir (68).

2.4.1. HTATIP2 Gen ve Protein Özellikleri

HTATIP2, HIV-1 Tat interaktif protein 2 (diğer adlandırmalar: *TIP30*, *CC3*, *SDR44U1*) olarak adlandırılan bir proteini kodlayan, 11. kromozomun p15.1 bölgesinde yer alan bir gendir (77).

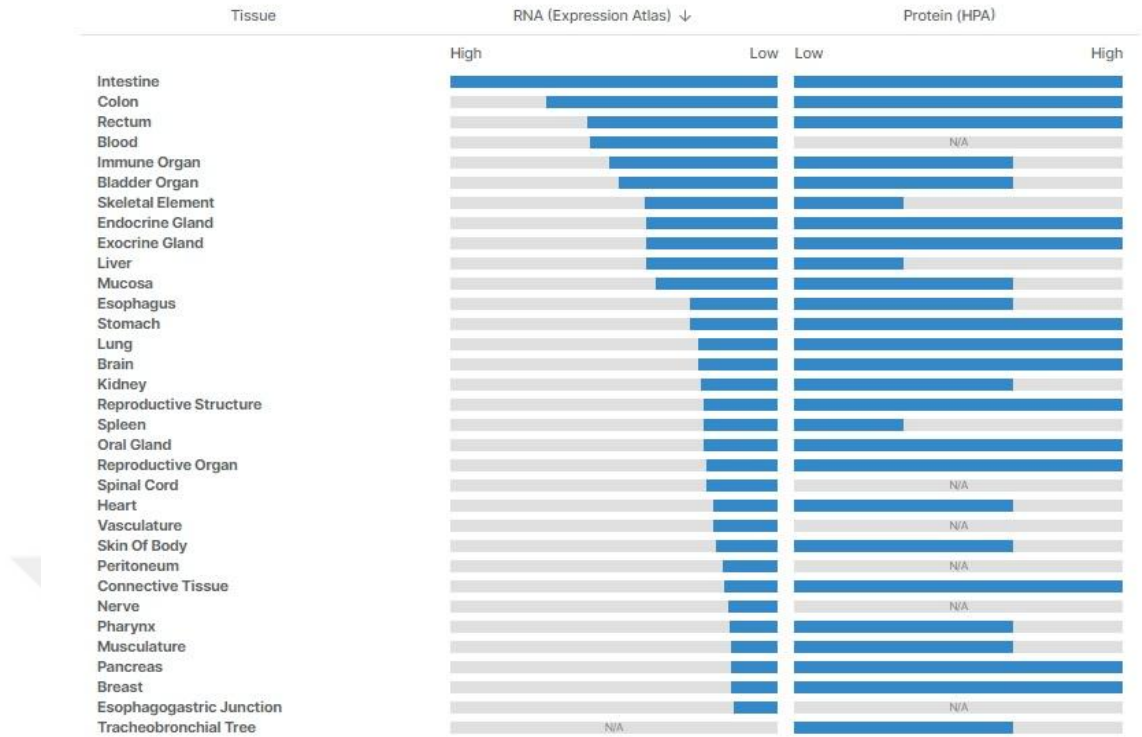
Katlanma yapısı Şekil 2-4'te gösterilen (78) *HTATIP2*, 30kDa büyüklüğünde bir proteindir. Protein hücre zarı, sitoplazma, çekirdek zarı ve çekirdekte yerleşik olarak bulunur. En yüksek RNA ve protein ifadesi bağırsakta gözlenirken; spinal kord, kan, damar sistemi, karın zarı, sinir ve özofagus-mide birleşiminde protein ifadesi yoktur. *HTATIP2*'nin diğer dokulardaki RNA ve protein ifadeleri Şekil 2-5'te gösterilmektedir (79,80).



Şekil 2-4: HTATIP2 proteininin katlanma paternini gösteren yapısı

HTATIP2 geni, yüksek ve düşük metastatik etkiye sahip küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) hücre hatları üzerinde yapılan RNA dizileme analizi ile tanımlanmıştır (81). Daha sonra, HIV-1'in kodladığı Tat proteinine bağlanabilen bir protein olduğu gösterildi (82,83). HTATIP2 proteininin, melanom, meme kanseri, nöroblastom, glioblastoma, kolon kanseri ve hepatoselüler karsinom (HCC) dahil olmak üzere bazı kanser türlerinde tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (81,84,85).

HTATIP2, proteinlerin çekirdeğe taşınımını engellemek için doğrudan importinlere bağlanarak çekirdek taşınımının negatif bir düzenleyicisi olarak hareket eder. HTATIP2'nin aşırı ifade edilmesi ile çekirdeğe taşınma yavaşlayarak ölüm sinyaline daha yüksek hassasiyet oluşur. HTATIP2'nin aşırı ifade edilmesi, östrojen almacı aracılı *MYC* yazılımını baskımlarken, HTATIP2'nin eksikliği *MYC* yazılımını artırır (86-88).



Şekil 2-5: HTATIP2'nin dokulardaki RNA ve protein ifade durumları

HTATIP2'nin Apoptozdaki Rolü

Proapoptotik etkinliğe sahip olan HTATIP2 ekzojen olarak aşırı ifade edildiğinde ulaştığı yüksek düzey apoptozu uyarırken, devamlı aynı düzeyde ifade edilmesi sitotoksik ilaçlar, g-ışınlanması ve mikrotübül zehirleri dahil olmak üzere çeşitli etmenlere yanıt olarak hücreleri apoptoza duyarlı hale getirir (81,89). HTATIP2, genom kararlılığında ve kanser büyümesini engellemede önemli rol oynayan tümör baskılayıcı yazılım etmeni TP53 ile işbirliği yaparak apoptoza dahil olur. Dolaylı ya da doğrudan TP53 ifadesini arttıran HTATIP2, HCC'de hücre içi oksidatif stresi algılayarak TP53 mRNA kararlılığını düzenleyerek apoptozu tetikler (90,91). Mide kanseri hücrelerinde, HTATIP2'nin aşırı ifade edilmesi, CDKN1B, BAX, TP53, CASP3 ve 9 ifadesinin artmasına ve CCND1, BCL-2, BCL-xL'nin ifadesinin azalmasına neden olur (92).

HTATIP2'nin Anjiogenezdeki Rolü

HTATIP2'nin tümör hücrelerinin hem makro hem de mikrovasküler kökenli anjiyogenezini azaltabildiği gösterilmiştir. Çeşitli anjiyogenik düzenleyici

moleküllerin RNA düzeylerini düzenleyerek tümör hücrelerinin anjiogenezini önler. Anjiyogenezi uyaran anjiyopoietin 1'in ifadesi belirgin şekilde azalırken, anjiyopoietin 2, BAI1 ve SPARC dahil olmak üzere bazı anjiyogenezi engelleyici proteinlerin ifadesi artar (85,93).

HTATIP2'nin Gen Transkripsiyonundaki Rolü

Bir yazılım etmeni olan HTATIP2, Tat proteini ve RNA polimeraz II ile etkileşime girerek HIV-1-tat ile etkinleşen yazılımı uyarabilir (94) HTATIP2 aracılı tümör baskılayıcı düzenleme, iki olası mekanizma ile açıklanmaktadır. İlki HTATIP2'nin çekirdekteki genlerin yazılımını doğrudan etkilemesidir. HTATIP2'nin aşırı ifade edilmesinin MYC ve osteopontin (OPN) genlerinin yazılımını doğrudan engellemesi buna bir örnektir (95,96). Diğer olası mekanizma ise HTATIP2'nin sinyal ileti yollarını değiştirerek veya bazı proteinlerin çekirdeğe taşınmasını engelleyerek sitoplazmadaki proteinlerin ifadesini dolaylı olarak etkilemesidir. HTATIP2, çekirdekte EGFR'nin düzenlenmesinde dolaylı rol oynamaktadır. Hepatositlerde HTATIP2, EGFR'nin endositik bozulumunu kontrol ederek EGFR sinyalini düzenler. Fare modelleme çalışmasında HTATIP2'nin baskılanması ile EGFR sinyalinin arttığı ve meme tümörü gelişiminin hızlandığı gösterilmiştir (97-99).

HTATIP2'nin DNA Hasarına Yanıtta Rolü

Aşırı HTATIP2, hem UV'ye maruz kalma hem de oksidatif stres sonrası DNA hasar onarımını bozduğu ve hücre sağkalımını olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Aşırı HTATIP2; *DDB2/XPE* ve *CDKN1A* genlerini baskılar, UV'ye maruz kaldıktan sonra FOS uyarılmasını önler ve DNA onarımını engeller. *DDB2*, DNA hasarının nükleotid çıkarma onarımında (NER) gerekli bir genidir. *FOS*, UV tarafından uyarılan bir erken yanıt genidir ve UV kaynaklı DNA hasarının etkin onarımı için gereklidir. Bu genlerdeki değişiklikler, HTATIP2'nin UV'ye karşı hücrel tepkileri üzerine doğrudan etkileri bulunduğunu göstermektedir (100-104)

Ayrıca *HTATIP2* geninin etkileşimde olduğu diğer genleri gösteren BioGRID ve GENEMANIA veri tabanlarına ait veriler Tablo 2-1'de gösterilmektedir (105,106).

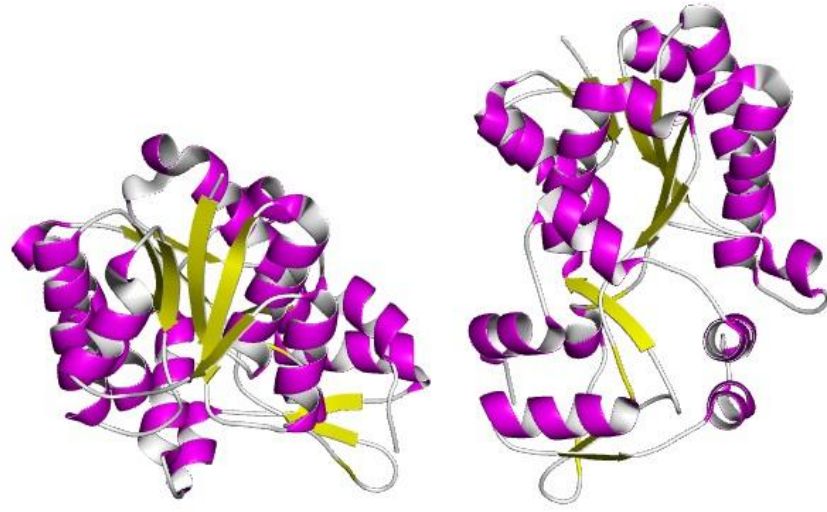
Tablo 2-1:HTATIP2 geninin etkileşimde olduğu diğer genler

<i>ABHD4</i>	<i>ACSL4</i>	<i>AKR1C3</i>	<i>AMOTL2</i>	<i>AQP6</i>	<i>ASAH1</i>	<i>ASF1A</i>	<i>BCAR1</i>	<i>BLVRB</i>
<i>BRD2</i>	<i>COQ9</i>	<i>DECR1</i>	<i>EHHADH</i>	<i>FAM134C</i>	<i>FAM209A</i>	<i>FITM2</i>	<i>GALE</i>	<i>GMDS</i>
<i>HADHA</i>	<i>HDAC6</i>	<i>HSD17B11</i>	<i>IPO5</i>	<i>IPO7</i>	<i>IPO9</i>	<i>JAGN1</i>	<i>JPH1</i>	<i>KPNB1</i>
<i>MIEF1</i>	<i>MPPE1</i>	<i>MTIF3</i>	<i>NCOA5</i>	<i>OSTF1</i>	<i>PITPNC1</i>	<i>PLIN2</i>	<i>PIR</i>	<i>PLG</i>
<i>RAB5A</i>	<i>REEP4</i>	<i>SH3GLB1</i>	<i>SLC10A6</i>	<i>TGDS</i>	<i>TMEM115</i>	<i>TMX2</i>	<i>TP53</i>	<i>TRIM25</i>
<i>UXS1</i>	<i>WRB</i>	<i>XPO4</i>						

2.4.2. NMRAL1 Gen ve Protein Özellikleri

NMRAL1, NmrA-benzeri redoks sensör 1 olarak adlandırılan proteini kodlayan (diğer adlandırmalar: *HSCARG*, *SDR48A1*), 16. kromozomun p13.3 bölgesinde yer alan ve 5 ekzondan oluşan epitel hücre canlılığı için gerekli bir genidir (107).

NMRAL1 proteini 33kDa büyüklüğünde olup katlanma yapısı Şekil 2-6'da gösterilmektedir (78). Sitoplazma ve perinükleer bölgede, ayrıca yüksek oranda çekirdekte yerleşiktir. En yüksek RNA ve protein ifadesi beyinde gözlenirken; spinal kord, kan, damar sistemi, kas sistemi, karın zarı, sinir ve özofagogastrik bileşkede ifade edilmeyen bir proteindir. *NMRAL1*'nin diğer dokulardaki RNA ve protein ifadeleri Şekil 2-7'de gösterilmektedir (79,80).



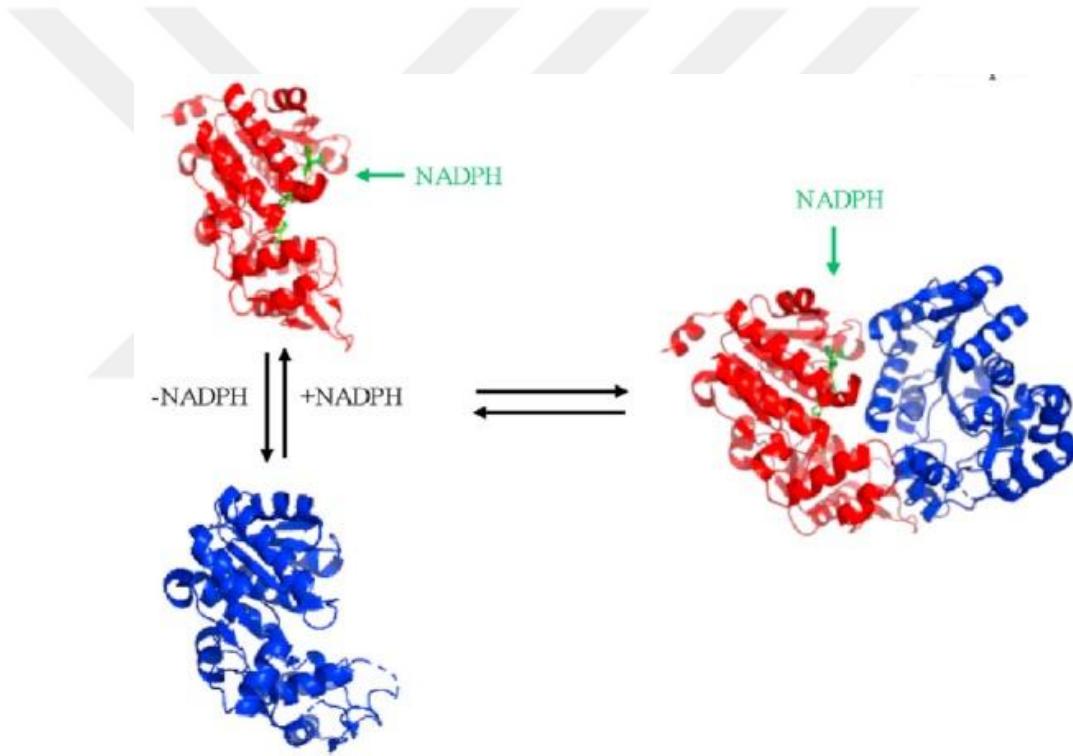
Şekil 2-6: NMRAL1 proteini katlanma yapısı



Şekil 2-7: NMRAL1'in dokulardaki RNA ve protein ifade düzeyleri

NMRAL1 hücrede; NADPH'ye bağlı monomerler, NADPH'ye bağlı olmayan monomerler, bir alt birimi NADPH'ye bağlanan ve diğerinin boş olduğu asimetrik

dimerler olmak üzere üç farklı formda bulunur (Şekil 2-8). Redoks durumuna ve hücre içi NADPH derişimine bağı olarak bu üç form arasındaki denge düzenlenir (108). NADPH derişimi düşük olduğı zaman NMRAL1 monomer olarak bulunur ve NO sentezinde görevli ASS1'i bağlar. NADPH derişimi normalin altına düştüğü zaman protein, ASS1'i bağlamayan ve bunun yerine bir NADPH molekülünü bağlayan bir dimer formundadır. Normal redoks koşullarında sitoplazma ve perinükleer bölgede bulunur. Hücre içi nitrik oksit artışı ve düşük NADPH/NADP⁺ oranlarında ise çekirdeğe göç eder. NMRAL1 geni, doğal bağışıklıkta sinyal iletilsinin negatif düzenleyicisi ve NADPH homeostazının hücre içi düzenleyicisidir (109).



Şekil 2-8: NMRAL1 proteininin hücrede bulunduğu 3 farklı formun Rossmann katlanma yapısı ile gösterimi(108).

Normal redoks durumunda, ağırlıklı olarak çekirdeği çevreleyen sitoplazmada bulunan NMRAL1 ara filamentlerle birleşir. NMRAL1'in sitoplazma ve çekirdek arası taşınımında görevli, C ucundaki 272.-278. aa kalıntılarındaki yer alan çekirdek taşınım sinyali (NES) bulunur. CRM1'in NMRAL1'in C ucundaki NES bölgesine bağlanması sonrası NMRAL1 sitoplazmada artar. NMRAL1'in çekirdeğe

taşınımı azalır. Eğer 272-299. aa'lerin kaybı olursa veya bu bölgede nokta mutasyonları meydana gelirse NMRAL1 çekirdekte hapsolür. Ayrıca NADPH üreten enzimlerdeki değişimler sonucu hücre içi NADPH/NADP oranı düşerse, NMRAL1'in yeniden dağılımı sağlanır. Pentoz fosfat yolunda, trikarbolik asit ve piruvat döngüsünde etkili olansirasıyla glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), izositrat dehidrogenaz (IDH) malik enzim NADPH'yi oksitlenmiş formundan indirger. G6PD ve IDH'nin aktiviteleri, sırasıyla endojen steroid dehidroepiandrosteron (DHEA) ve sinyal molekölü nitrik oksit (NO) tarafından engellenir. Bu nedenle, yaygın olarak kullanılan bir NO vericisi olan DHEA veya SNAP ile tedavi ve NO rejenerasyonunda hız sınırlayıcı enzim olan arginino süksinat sentetazın (ASS) aşırı ifade edilmesi, NMRAL1'in ara filamentlerden ayrılmasına ve sitoplazmadan çekirdeğe göç etmesine yol açar (110-114).

NMRAL1'in Doğal Bağışıklıkta Rolü

Doğal bağışıklığın negatif düzenleyicisi olan NMRAL1, viral enfeksiyon sonrası interferon seviyesinin düzenlenmesinde etkilidir. RNA virüsleri ile enfeksiyona yanıt olarak, retinoik asit ile uyarılan gen 1 (*RIG1*) ve melanom farklılaşması ile ilişkili gen 5 (*MDA5*) gibi almaç genlerin sitozolik viral RNA'yı tanınması sonrası Cardif-TRAF3-TBK1/IKK.-IRF3 yoluyla tip I interferon üretimi uyarılır. TRAF3'ün übikütinlenmesi, TRAF3 ve IKK arasındaki etkileşimi arttırarak yukarıdaki sinyal iletisini başlatır. NMRAL1 ise TRAF3'ten ubikuitin zincirini ayırmak için deubikuitinaz OTUB1 ile işbirliği yapar. Bu nedenle, NMRAL1 aşırı ifade edildiği zaman, IKK alımını bozar, IRF3'ün fosforillenmesi ve çekirdeğe göçünü azaltarak viral enfeksiyondan sonra IFN- β seviyesini düşmesine yol açar (115,116).

NMRAL1, p50 ve p65 alt birimlerinden oluşan bir heterodimer olan sitokin kaynaklı nükleer faktör-B (NF- κ B) etkinleşmesini baskılar. Dinlenme halindeki hücrelerde, NF- κ B ve I κ B proteinleri arasındaki etkileşim, sitoplazmada *NFKB1* ve *NFKB2* tutulumuna neden olarak her iki etmenin yazılımını engeller. Kanonik NF- κ B sinyal yolunda, hücre zarındaki almaçlar, tümör nekroz faktörleri (TNF) veya interlökin 1 (IL-1) gibi sitokinleri tanır ve übikütinlenme yoluyla sinyalleri I κ B kinaz (IKK) kompleksine iletir. NMRAL1, IKK karmaşımının (IKKa, IKK β ve NEMO) işlevini bozarak NF- κ B etkinleşmesini engeller (117,118).

NMRAL1'in Redoks Homeostazında Rolü

NMRAL1, P65'nin çekirdeğe taşınımını önleyerek NF- κ B etkinleşmesini baskılar. Bunun sonucu olarak da, NADPH oksidazın bir alt birimi olan *NCF1*'in yazılımını azaltır. NADPH oksidaz, elektronun NADPH'den oksijene taşınmasını katalize eder, bu da NADP⁺ ve RONS oluşturur. NADPH oksidaz yoluyla aşırı hücre içi RONS üretimi, aşırı NADPH tüketimi ve oksidatif hasarların birikmesine yol açar (119).

Hücrel redoks durumunu etkileyen bir diğer önemli molekül ise Nitrik oksit (NO). Sitoplazmada NO üretimi, arginin ve NADPH kullanılarak nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalizlenir. Hücrelerde NO'nun tek öncüsü arginin olduğundan NO sentezi, arginin varlığına bağlıdır. Hücre dışı sıvıdan taşınmasının yanı sıra, hücre içi arginin, NOS'un yan ürünü olan sitrülinden, argininosüksinat sentetaz ve argininosüksinat liyaz'ın ardışık eylemleri yoluyla geri dönüştürülebilir. NMRAL1, 153–189. aa kalıntıları aracılığıyla doğrudan ASS ile etkileşime girer ve ASS etkinliğini ve NO üretimini azaltır (113).

NMRAL1'in DNA Tamirinde Rolü

Çekirdekte NMRAL1, deubikütinaz USP7 ile etkileşimini korur. NMRAL1, Polcomb Baskılayıcı Kompleksin1 (PRC1)'in çekirdek bileşenlerinin übikütinasyonunu önlemek için USP7'ye bağlanır. PRC1, Lys-119'da histon H2A'nın mono-übikütinlenmesini katalize eden bir E3 ligaz karmaşımıdır. PRC1'in kendi kendine übikütinlenmesi, katalitik aktivitesi için çok önemlidir. H2A'nın übikütinlenmesi, çift zincir kırıklarına (DSB) verilen DNA hasar yanıtında hayati öneme sahiptir (120,121).

NMRAL1, DNA eşlenmesi sırasında ultraviyole (UV) radyasyonunun neden olduğu lezyonları hedefleyen translezyon sentez (TLS) yolunu da düzenler. UV radyasyonu, USP1'in bozulmasına yol açar ve USP1'in substratı PCNA üzerindeki deubikütinasyon etkilerini ortadan kaldırır. NMRAL1, PCNA ile etkileşime giren protein (PIP) kutusu aracılığıyla, 133-140. aa kalıntılarında doğrudan PCNA ile etkileşime girer. Ayrıca, NMRAL1, USP1 ve PCNA arasındaki etkileşimi artırarak PCNA'dan übikütinin uzaklaştırılmasını uyarır (122,123).

Ayrıca *NMRAL1* geninin diğer etkileşimde olduğu genleri gösteren BioGRID ve GENEMANIA veri tabanlarına ait verilerin derlemesi Tablo 2-2’de gösterilmektedir (105,106).

Tablo 2-2: NMRAL1 geninin etkileşimde olduğu diğer genler

<i>AASDHPPT</i>	<i>ABT1</i>	<i>ACOT8</i>	<i>ACTB</i>	<i>ACTN1</i>	<i>ACTN4</i>	<i>AGPAT4</i>	<i>AGPAT5</i>	<i>AIDA</i>
<i>AIMP1</i>	<i>AIMP2</i>	<i>AIP</i>	<i>AKR1B1</i>	<i>ALB</i>	<i>ALDOA</i>	<i>ANKRD54</i>	<i>ANXA2</i>	<i>ANXA5</i>
<i>APEX1</i>	<i>ARPC1B</i>	<i>ASS1</i>	<i>ATAD1</i>	<i>ATP1B3</i>	<i>AURKB</i>	<i>AZGP1</i>	<i>BCKDHB</i>	<i>BCL7A</i>
<i>BLOC1S1</i>	<i>BSG</i>	<i>C9ORF64</i>	<i>CA8</i>	<i>CAPZA1</i>	<i>CAPZA2</i>	<i>CAPZB</i>	<i>CCNYL2</i>	<i>CENPO</i>
<i>CEPT1</i>	<i>CFTR</i>	<i>CIAO1</i>	<i>CLNS1A</i>	<i>CNDP2</i>	<i>COL1A1</i>	<i>COMMD1</i>	<i>COPS5</i>	<i>COPS6</i>
<i>CORO1B</i>	<i>CORO1C</i>	<i>CREB3</i>	<i>CSNK1A1</i>	<i>DBN1</i>	<i>DCAF15</i>	<i>DCAF7</i>	<i>DNAJA1</i>	<i>DNAJC7</i>
<i>DNAJC9</i>	<i>DNPH1</i>	<i>DYNC2LI1</i>	<i>EEF1A1</i>	<i>EEF1A2</i>	<i>EEF1D</i>	<i>EFHD2</i>	<i>EIF2S1</i>	<i>EIF3I</i>
<i>ELAVL1</i>	<i>EMD</i>	<i>EXOSC7</i>	<i>FBL</i>	<i>FDPS</i>	<i>FKBP1A</i>	<i>FOXJ1</i>	<i>GALK1</i>	<i>GAPDH</i>
<i>GAPDHS</i>	<i>GGCT</i>	<i>GNAI1</i>	<i>GNAI2</i>	<i>GNAI3</i>	<i>GNAS</i>	<i>GNB1</i>	<i>GNB1L</i>	<i>GNB2</i>
<i>GNB4</i>	<i>GNHPR</i>	<i>GTF2H4</i>	<i>HESX1</i>	<i>HIST1H1D</i>	<i>HMOX2</i>	<i>HNRNPA0</i>	<i>HNRNPA1</i>	<i>HNRNPA3</i>
<i>HNRNPA2B1</i>	<i>HNRNPDL</i>	<i>HNRNPH1</i>	<i>HNRNPH3</i>	<i>HNRNPK</i>	<i>HSD17B4</i>	<i>HSDL1</i>	<i>HSPA1B</i>	<i>HSPA8</i>
<i>HSPD1</i>	<i>HTRA2</i>	<i>IBA57</i>	<i>IGAKV2-40</i>	<i>IKBKE</i>	<i>IKBKG</i>	<i>IMP4</i>	<i>IRS4</i>	<i>JADE3</i>
<i>KCNJ14</i>	<i>KDELR1</i>	<i>KRT1</i>	<i>KRT10</i>	<i>KRT16</i>	<i>KRT2</i>	<i>KRT5</i>	<i>KRT9</i>	<i>LDHA</i>
<i>LDHB</i>	<i>LMNA</i>	<i>LRRC59</i>	<i>MARC1</i>	<i>MDH1</i>	<i>MDH2</i>	<i>MED4</i>	<i>MFSD3</i>	<i>MGST3</i>
<i>MIEN1</i>	<i>MTHFD2</i>	<i>MLST8</i>	<i>NACA</i>	<i>NDUFA9</i>	<i>NGDN</i>	<i>NIFK</i>	<i>NPM1</i>	<i>NT5C3A</i>
<i>NUP35</i>	<i>OCIAD1</i>	<i>OSGEP</i>	<i>OTUB1</i>	<i>OTUB2</i>	<i>P4HA1</i>	<i>PCBP1</i>	<i>PCBP2</i>	<i>PCDHGA6</i>
<i>PCNA</i>	<i>PDHB</i>	<i>PDLIM1</i>	<i>PDLIM4</i>	<i>PHB2</i>	<i>PEX26</i>	<i>PLEC</i>	<i>POLDIP2</i>	<i>POLR2C</i>
<i>POTEF</i>	<i>POTEJ</i>	<i>PPA1</i>	<i>PPP1CA</i>	<i>PPP1CB</i>	<i>PPP1CC</i>	<i>PRDX1</i>	<i>PRPS1</i>	<i>PSMD14</i>
<i>RAD51</i>	<i>RDH13</i>	<i>RFC5</i>	<i>RPL14</i>	<i>RPL5</i>	<i>RPL6</i>	<i>SCAMP3</i>	<i>SEC13</i>	<i>SFXN1</i>

<i>SGTA</i>	<i>SLC25A11</i>	<i>SLC25A3</i>	<i>SLC25A32</i>	<i>SLC25A5</i>	<i>SLC25A6</i>	<i>SLC35E1</i>	<i>SMN1</i>	<i>SNX11</i>
<i>STUB1</i>	<i>TALDO1</i>	<i>TBR1</i>	<i>TCEAL2</i>	<i>THOC6</i>	<i>TMEM33</i>	<i>TOMM40</i>	<i>TRAF3</i>	<i>TRIM25</i>
<i>TRUB1</i>	<i>U2AF1</i>	<i>UCHL1</i>	<i>USP1</i>	<i>USP12</i>	<i>USP7</i>	<i>VDAC1</i>	<i>VDAC2</i>	<i>WDR48</i>

Literatürde aynı gen ailesinde yer alan, benzer görevleri ve ortak etkileşimleri olan *NMRAL1* ve *HTATIP2* genlerinin ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. “Hücre içerisinde *NMRAL1* yokluğunda *HTATIP2*’nin ifade düzeyi nasıl etkileniyor, hücresel yerleşimi değişiyor mu? *HTATIP2* de gösterildiği gibi *NMRAL1* geni de *MYC* ve *CCND1* gen ifadeleri üzerine bir etkinlik gösteriyor mu? Bu etkinlik baş-boyun hücrelerinde *NMRAL1* geni yokluğunda, nasıl değişiyor?” sorularına cevap bulmak için bu çalışma tasarlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Materyal

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 02.03.2016 tarihli ve 82637 sayılı toplantısında etik açıdan uygun bulunan, asgari bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılan hastalar ile gerçekleştirildi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda larenks kanseri tanısı ile ameliyat edilen 51 hastanın tümör doku parçaları 1,5ml'lik tüplere konularak deneysel çalışmalar yapılana kadar -80°C'de bekletildi. Deneysel çalışmaların tümü İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Agaroz (Sigma-Almanya)

Akrilamid (Sigma-Almanya)

Amonyum Persülfat (Applichem-ABD)

Asetik Asit (Sigma-Almanya)

Beta Merkaptotanol (Applichem-ABD)

Bisakrilamid (Sigma-Almanya)

Bovin Serum Albumin (Santa Cruz-ABD)

Bromofenol Mavisi (Sigma-Almanya)

Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Almanya)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Etanol Absolut (Merck-Almanya)

Fosfat Tamponlu Salin (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Gliserol (Sigma-Almanya)

Glisin (Santa Cruz-ABD)

Hidroklorik Asit (Merck-Almanya)
Hidrokortizon (Sigma-Almanya)
İsopropanol (Merck-Almanya)
PBS (Santa Cruz-ABD)
Penisilin-Streptomisin (Thermo Fisher Scientific)
Potasyum Klorur (Santa Cruz-ABD)
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma-Almanya)
TEMED (Applichem-ABD)
Tripın Mavisi (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
Tris Bazı (Santa Cruz-ABD)
Tween20 (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
Yağsız Süttozu (Santa Cruz-ABD)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

-20°C Derin Dondurucu (Beko, Türkiye)
-80°C Derin Dondurucu (Sanyo, Japonya)
Azot Tankı (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
İblot2 Blotlama Cihazı (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
Çalkalayıcı (Janke&Kunkel, Almanya)
Dikey Elektroforez Sistemi (E-C Apparatus Corporation EC120 Mini Vertical Gel System) (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
Dikey Laminar Akış Steril Kabin (Esco Scientific, Bangladeş)
CO₂'li İnkübatör (HeraCell, Almanya)
Etüv (Hybaid, İngiltere)
Gerçek Zamanlı Termal Döngü Cihazı (Roche)
Hassas Terazi (Shimadzu)
Homojenizatör (Next Advance)

Işık Mikroskobu (Olympus, Almanya)

Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (Micro Chemi 4.2- DNR Bio-Imaging System) (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica, Italy)

Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Otoklav (Hirayama, Japonya)

Otomatik Pipetler (Eppendorf, Birleşik Arap Emirlikleri)

pH Metre (Mettler Toledo, ABD)

Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, Almanya)

Vorteks (Janke&Kunkel)

LightCycler 480-II Gerçek Zamanlı PZR Cihazı (Roche, İsviçre)

3.1.4. Tampon ve Çözeltiler

3.1.4.1. HET-1A ve SCC-15 Hücre Hatları için Besiyeri

DMEM-F12 medyumuna;

- 400 ng/ml hidrokortizon,
- %10 fetal bovin serum (FBS) ve
- 100 U/ml penisilin-streptomisin karışımı eklendi.

3.1.4.2. Hücre Kültürü için Kaplama Medyumu

BEBM bazal medyumuna;

- 0,01 mg/ml fibronektin,
- 0,03 mg/ml kollajen
- 0,01 mg/ml bovin serum albumin (BSA) eklendi.

3.1.4.3. Antibiyotiksiz Kültür Medyumu

DMEM-F12 medyumuna;

- 400 ng/ml hidrokortizon ve
- %10 fetal bovin serum (FBS) eklendi.

- **2X Antibiyotikli Kùltür Medyumu**
- 800 ng/ml hidrokorizon,
- %20 fetal bovin serum (FBS) ve
- 200 U/ml penisilin-streptomisin karışımı eklendi.

3.1.4.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi Tamponları

Yükleme Tamponu: 1M Tris

Gliserin

%10 SDS

%0,1 Bromofenol Mavisi

Beta Merkaptöetanol

Yürütme Tamponu : 224 mM Tris

1.79 M Glisin

31mM SDS

3.1.4.5. Kullanılan Jeller

SDS-Poliakrilamid Jel:

Ayırıcı Jel İçin : 1,5M Tris (pH:8,8)

%10 SDS

%30 Akrilamid + %0,8 Bisakrilamid

%10 APS

TEMED

dH20

Yığınlama Jeli İçin : 1M Tris (pH:6,8)

%10 SDS

%30 Akrilamid + %0,8 Bisakrilamid

%10 APS

TEMED

dH₂O

3.1.4.6. Western Blot Tamponları

Bloklama Tamponu: 1X PBS

%1 Tween 20

%5 Yağsız Süttozu

Yıkama Tamponu : 1X PBS

%1 Tween 20

3.1.5. Kullanılan Antikorlar ve Protein Standartları

Nmral1-Tavşan poliklonal antikor (Novus)

Htatıp2-Tavşan poliklonal antikor (Novus)

Beta aktin-Fare monoklonal antikor (Santa Cruz)

Keçi anti-tavşan ikincil antikor (ABCAM)

Keçi anti-fare ikincil antikor (Santa Cruz)

MagicMark™ XP Western Protein Standart – Novex (Thermo Fisher Scientific)

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standart- Novex (Thermo Fisher Scientific)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre hattı deneyleri, normal yemek borusu HET1A (ATCC, ABD) ve skuamöz hücreli dil kanseri SCC-15 (ATCC, ABD) hücre hatları kullanılarak gerçekleştirildi.

Hücrelerin açılması: Kriyotüp içerisinde gelen hücreler 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda çözüldü. Hem HET1A hem de SCC15 hücre kültürü çalışmalarında DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific, ABD) kültür medyumunu kullanıldı. DMEM-F12, 30 dk 37°C'deki inkübatörde bekletildikten sonra 6 ml medyum 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve kriyotüpün tüm içeriği (yaklaşık 1ml) medyum üzerine eklendi. Tüp 125xg'de 5 dk santrifüjlendikten sonra üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı.

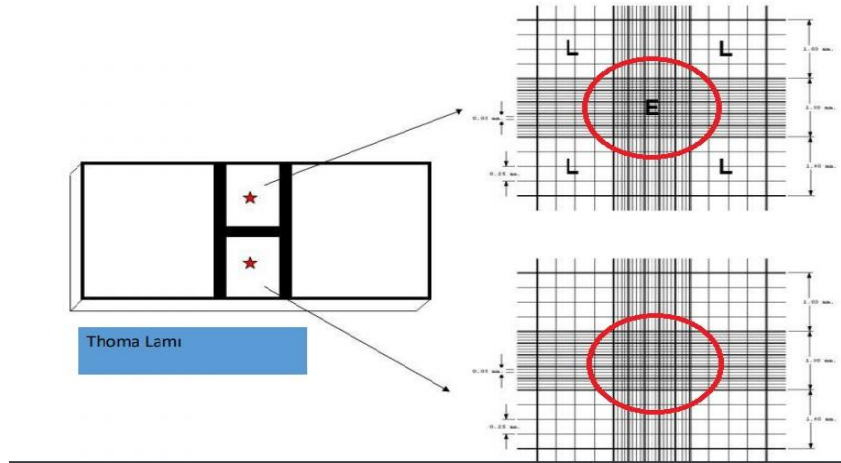
Hücre peleti üzerine 1 ml DMEM-F12 eklendi ve hücreler medyum içerisinde çözdürüldü. Daha önceden 10 ml DMEM-F12 ilave edilmiş 25 cm²'lik kültür flasklarına hücrelerin ekim yapıldı. Normal hücrelerin ekimi kaplama yapılmış olan flasklara yapıldı. Flasklar 37°C'deki %5 CO²'li etüve konuldu.

Pasajlama: Işık mikroskobu ile yeterli sayıda hücreye ulaşıldığı zaman pasajlama yapıldı. DMEM-F12, kültür ortamından uzaklaştırıldı, hücrelerin yapışmış olduğu flask tabanından kaldırılmasını sağlamak için 3ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flask 4-5 dk boyunca 37°C'deki %5 CO²'li etüvde bekletildi. Flask tabanına tutunmuş hücreleri de kaldırmak amacıyla kazıma işlemi yapıldı ve hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Tripsin-EDTA çözeltisinin etkinliğini kaldırmak için tüpe 1:1 oranında DMEM-F12 eklendi ve 125xg'de 5 dk santrifüjlendikten sonra üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı. Hücre peleti üzerine 1 ml DMEM-F12 eklendi ve tüpün içeriği 2 ayrı 25 cm²'lik kültür flaskına aktarıldı. Pasajlama işlemi sonrası flasklar 37°C'deki %5 CO²'li etüvde bekletilerek hücrelerin çoğaltılmasına devam edildi. siRNA çalışması yapılana kadar hücreler en az 5 pasajlama işlemi yapılarak yedeklenmesi için kriyotüplerde dondurulup sıvı azot içerisinde saklandı.

Dondurma: Pasajlama sonunda toplanan hücre peletleri üzerine 950 µl DMEM-F12 eklendi, kriyotüplere alındı ve üzerine 50 µl Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek sıvı azot içerisinde saklandı.

3.2.2. Hücrelerin Sayımı ve 6 Kuyulu Plakalara Ekimi

5.pasajda yeterli sayıya ulaşan hücreler flasktan kaldırıldı ve 1ml DMEM-F12 içerisinde çözüldü. 10µl DMEM-F12-hücre karışımı alınarak başka bir 1,5 ml'lik tüp içerisine aktarıldı. Üzerine 10µl tripan mavisi eklenerek homojen karışması sağlandı. 20µl olan karışımın 10µl'si thoma lamının üst alanına, kalan 10µl'si alt alanına konularak üzeri hava kabarcığı oluşmayacak şekilde lamel ile kapatıldı. Thoma lamı üzerinde hücre sayımı yapılan alanlar Şekil 3-1'de gösterildi.



Şekil 3-1: Thoma lamı üzerinde hücre sayımı için kullanılan alanların gösterimi (kırmızı).

Hücre sayımında kullanılan formül aşağıda gösterilmektedir.

$$1\text{ml'de hücre sayısı} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times 10^4 \times 1000}{2}$$

6 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 2×10^5 hücre ekilecek şekilde hesaplama yapıldıktan sonra siRNA deneyine geçildi.

3.2.3. *NMRAL1* siRNA uygulaması

HET-1A ve SCC-15 hücre hatlarında *NMRAL1* geninin susturulması için *NMRAL1* (HSCARG) siRNA (sc-93304, Santa Cruz) kullanıldı.

6 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 1X antibiyotiksiz DMEM-F12'den 2ml eklendi ve her bir kuyuya kuyu başı 2×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde 18-24 saat bekletildi. Hücreler %50-70 doluluk oranına ulaşıldığında *NMRAL1* siRNA işlemi başlatıldı. siRNA A ve B çözeltileri hazırlandı.

A çözeltisi için;

1,5 ul'lık santrifüj tüpüne 100 ul Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, kat. no:31985062) transfeksiyon medyumunu eklenip üzerine 5 ul (50pmol) *NMRAL1*-siRNA (h) (Santa Cruz Biotechnology, sc-150010)'sı eklendi. A çözeltisi, *NMRAL1* siRNA ve kontrol siRNA (Thermo Fisher Scientific-kat no.12935112) örnekleri için ayrı ayrı hazırlandı.

B çözeltisi için;

1,5 ul'lik santrifüj tüpüne 100 ul Opti-MEM transfeksiyon medyumunu eklenip üzerine uygulanacak olan siRNA miktarı kadar Lipofektamin 2000 (Thermo Fisher Scientific, kat. No: 11668030) transfeksiyon reaktifi eklendi. B çözeltisi, hem NMRAL1 siRNA hem de kontrol siRNA için ayrı ayrı hazırlandı.

Çözeltiler hazırlandıktan sonra A çözeltisi, B çözeltisi üzerine eklendi, oda ısısında 35 dk bekletildi. Total 1 ml olan transfeksiyon karışımları, *NMRAL1* siRNA ve kontrol siRNA uygulamaları yapılacak olan uygun plaka kuyularına eklendi. Hücreler 37°C'deki %5 CO²'li etüvde 6 saat bekletildi. Hücrelerin üzerine transfeksiyon karışımı uzaklaştırılmadan 1 ml antibiyotik içeren 2X DMEM-F12 eklendi. Hücreler 37°C'deki %5 CO²'li etüvde 18 saat süre ile bekletildi. 18. saat tamamlandıktan sonra medyum uzaklaştırıldı, tripsin-EDTA karışımı ile hücreler kaldırıldı. Sayım işlemi yapıldıktan sonra RNA ve protein izolasyonu için hücreler ayrıldı.

3.2.4. RNA İzolasyonu

Lareks kanseri tanısı alan 51 hastaya ait tümör doku örneklerinde *NMRAL1* ve *HTATIP2* mRNA ifadesi için ilk olarak PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak total RNA elde edildi.

30-50mg doku üzerine 500µl parçalama tamponu, 5µl β-merkaptoetanol ve parçalama boncukları eklendikten sonra homojenizatör cihazında 10 dk. süre ile homojenleştirme işlemi yapıldı. Elde edilen lizat 2 600 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı alınarak üzerine %70'lik soğuk etanol eklendi. Karışım filtreli tüpe aktarıldı, 12 000 x g'de 30 sn. santrifüj edildi. Filtre başka bir toplama tüpüne alındı. 500µl birinci yıkama tamponu eklendi ve 12 000 x g'de 30 sn. santrifüj edildi. toplama tüpündeki yıkama tamponu uzaklaştırıldı. 700µl ikinci yıkama tamponu eklendi ve tekrar 12 000 x g'de 30 sn. santrifüj edildi. Bu işlem daha temiz RNA eldesi için 2 kez tekrarlandı. Yıkama işlemlerinden sonra filtrede yıkama solüsyonu kalmaması için 12 000 x g'de 2 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Filtredeki RNA üzerine 80µl RNaz içermeyen su eklenip 5 dk. oda ısısında bekletildi, 12 000 x g'de 2 dk. santrifüj edildi. 1,5ml'lik yeni bir tüpe alınan total RNA'nın cDNA sentezi öncesi Nanodrop Spektrofotometre (Thermofisher Scientific, ABD) ile saflık ve yoğunluk ölçümü yapıldı.

3.2.5. cDNA Çevrimi

cDNA çevrim tepkimesi RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA çevriminde kullanılan çözeltilerin derişimleri, hacimleri ve tepkime koşulları Tablo 3-1’te gösterildi.

Tablo 3-1: cDNA çevriminde kullanılan solüsyonların derişim, hacim ve tepkime

koşulları				
Çözeltiler	İlk Derişim	Hacim	Son Derişim	Cihaz Protokol
Rastgele Primer	100µM	1µl	5µM	12µl’lik karışımın
Kalıp RNA	-	Toplam hacim 12µl’ye tamamlanacak şekilde	400ng	80°C’de 3 dk.
Nükleaz içermeyen su	-			inkübasyonu, buz üzerinde 5 dk. bekletme
Tepkime Tamponu	5X	4µl	1X	Karışımın
dNTP	10mM	2µl	1mM	37°C’de 90 dk. ve 94°C’de 2 dk.
RNaz Baskılayıcı	20U/µl	1µl	1U/µl	inkübasyonu
Ters Transkriptaz	200U/µl	1µl	10U/µl	

3.2.6. *NMRAL1* ve *HTATIP2* Genlerinin İfade Analizleri

Larenks kanserli hastaların tümör dokularında *NMRAL1* ve *HTATIP2* gen ifadeleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (GZ-PZT) yöntemi ile Lightcycler 480-II (Roche, İSVİÇRE) cihazı kullanılarak analiz edildi. GZ-PZT deneyi için PowerUP™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD) içeren karışım kullanıldı. Normalizasyon için *B2M* geni kullanıldı. Tepkimede kullanılan primer listesi Tablo 3-2’de yer almaktadır.

Tablo 3-2: *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC*, *CCND1* ve *B2M* genlerinin GZ-PZT için Primer Dizisi

Gen	Primer Dizisi
<i>NMRAL1</i>	5'-ACACTCCTGGAAGATGGGACAT-3' 5'-CTCTCCCAGTAATTGGTCACGA-3'
<i>HTATIP2</i>	5'-GTCACGCTCATTGGCCGGA-3' 5'-TCTGGTGGTACCCAGGCAACA-3'
<i>MYC</i>	5'-GCTGCTTAGACGCTGGATTT-3' 5'-TAACGTTGAGGGGGGCATCG-3'
<i>CCND1</i>	5'-GCTGTGCATCTACACCGACA-3' 5'-TTGAGCTTGTTTACCAGGAG-3'
<i>B2M</i>	5'-CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG-3' 5'-GCTTACATGTCTCGATCCCACTTAA-3'

GZ-PZT'nde kullanılan karışımlar ve tepkime koşulları Tablo 3-3 ve4 Tablo 3-4'te gösterilmektedir.

Tablo 3-3: GZ-PZT'nde kullanılan karışım içeriği

	İlk Derişim	Hacim	Son Derişim
Power Up SYBR Green Master Mix	2X	7,5µl	1X
Nükleaz İçermeyen Su	-	2,5µl	-
İleri Primer	10µM	0,5µl	200nM
Geri Primer	10µM	0,5µl	200nM
cDNA	-	3µl	-
Toplam Hacim	-	15µl	-

Tablo 3-4: *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC*, *CCND1* ve *B2M* genlerinin GZ-PZT koşulları

Analiz Modu	Döngü Sayısı	Hedef Sıcaklık	Süre	Ölçüm Sayısı
Çift Zincir Ayrılması				
Yok	1	95 °C	15dk	Yok
Çoğalma				
Miktar Ölçümü	40	Bozunma 95°C	15sn	Yok
		Bağlanma 61°C	30sn	Tek
		Uzama 72°C		Yok
Soğuma				
Yok	1	50 °C	10sn	Yok
Erime				
Erime Eğrisi	1	95 °C	-	Kesintisiz

3.2.7. Dokudan Sitoplazma ve Çekirdek Proteini Eldesi

NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin western blot analizlerinin yapılabilmesi için Nuclear Extraction Kit (Chemicon International – ABD) kullanıldı.

Her bir hastanın tümör dokusundan 0,1 gr doku tartılarak PBS ile yıkandı. Doku üzerine 100 µl 10X sitoplazmik parçalayıcı tampon, 900 µl distile su, 0,5 µl DTT (1:2000), 1 µl proteaz engelleyici (1:1000) ve parçalama boncukları eklendi. Homojenizatör cihazında 10dk. süre ile homojenleştirme işlemi gerçekleştirildi. 8.000 x g'de 20 dk (4°C) santrifüj edildi. Üst kısım sitoplazma proteini olarak yeni bir 1,5ml'lik tüpe alınarak -80°C'ye kaldırıldı. Tüp dibinde kalan pellet üzerine 1X çekirdek parçalama tamponu, DTT (1:2000), proteaz engeleyici (1:1000) eklendi. 4°C'de çalkalayıcı üzerinde 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 16.000 x g'de 5 dk

(4°C) santrifüj edildi. Üst kısım çekirdek proteini olarak yeni bir 1,5ml'lik tüpe alınarak -80°C'ye kaldırıldı.

Western blot deneyi öncesi protein miktar tayini, Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak Qubit Florometre cihazında yapıldı.

3.2.8. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroförez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ayırıcı ve yığınlama jeli olmak üzere iki fazdan oluşur. %4 ve %10'luk yoğunluklarda hazırlanan jeller, düzeneğe dökülüp polimerleşmeye bırakıldı. Hastaların sitoplazma ve çekirdek proteinleri her bir kuyuya eşit miktarda (100 µg protein) yükleme yapılacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan 100 µg protein üzerine 10 µl yükleme tamponu eklendi. Proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarını oluşturan bağların bozulması için ısı döngü cihazında 95°C 10 dk. bekletilip hızla buz üzerine alındı. Elektroförez tankına jel düzeneği yerleştirildikten sonra tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Her bir jelin ilk kuyusuna protein standart karışımı yüklendikten sonra diğer kuyulara 25 µl hasta örnekleri yüklendi. Jel 165V, 120 mA'de bir saat yürütüldü ve jeller düzenekten çıkarıldı. Proteinlerin membrana aktarımı için blotlama işlemine geçildi.

3.2.9. Western Blot

Blotlama işlemi iBlot 2 cihazında, nitroselüloz membranlar kullanılarak yarı-kuru blotlama tekniği ile gerçekleştirildi. Aktarım protokolü 20V'ta 1 dk, 23V'ta 4 dk ve 25V'ta 2 dk olmak üzere toplam 13 dk olarak belirlendi. Aktarım sonrası membranlar PBST içerisinde +4°C'de saklandı.

Bloklama işlemi: Membran %5'lik yağsız süt tozu içeren PBST karışımından oluşan bloklama tamponu içerisinde 1,5 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Membran 3 kez PBST tamponu ile 10dk süre ile yıkandıktan sonra birincil antikor uygulama aşamasına geçildi.

Birincil antikor uygulaması: Membran %3'lük yağsız süt tozu ile PBST karışımı içerisine 1:1000 dilüsyonda NMRAL1 antikor (NBP1-56439, NOVUS)/ HTATIP2 antikor (NBP2-20646, NOVUS)/ β-aktin antikor (Santa Cruz, sc-130656) eklenerek gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Membran 3 kez PBST tamponu ile 10dk süre ile yıkandıktan sonra ikincil antikor uygulama aşamasına geçildi.

İkincil antikor uygulaması: Membran %3'lük yağsız süt tozu ile PBST karışımı içerisinde; NMRAL1 ve HTATIP2 uygulanan membranlar için 1:5000 dilüsyonda keçi anti-tavşan antikoru (Santa Cruz, sc-2004), β -aktin uygulanan membranlar için 1:5000 dilüsyonda keçi anti-fare antikoru (Santa Cruz, sc-2005) eklenerek oda ısısında 2 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Membran 3 kez PBST tamponu ile 10dk süre ile yıkandıktan sonra görüntüleme aşamasına geçildi.

Görüntüleme: Membran, Enhanced chemiluminescence (ECL) çözeltisi (Thermo Fisher Scientific) ile 5 dk karanlık ortamda muamele edildikten sonra kemilüminesans görüntüleme cihazı'nda (Micro Chemi 4.2- DNR Bio-Imaging System) görüntülendi. Elde edilen görüntüler "ImageJ" programına aktararak protein bantlarının yoğunlukları belirlendi.

3.2.10. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)

siRNA ile *NMRAL1* geninin susturma deneylerinde HET-1A normal hücre hattı ve SSC-15 kanser hücre hattı hücrelerinin hücre canlılığına olan etkisinin araştırılması amacıyla MTT analizi yapıldı.

MTT analizi için, 96 kuyulu tabakalara yaklaşık 1000 hücre ekildi. Kanser ve normal hücrelerin ekili olduğu kuyulara *NMRAL1* siRNA uygulaması ve kontrol siRNA uygulaması (her biri farklı kuyularda olacak şekilde) yapıldı. Hem kanser hem normal için birer kuyu negatif kontrol olarak siRNA uygulaması yapılmadan bırakıldı. Deney 4 kez tekrar edildi.

siRNA uygulamasından sonraki 18.saatte medyum uzaklaştırmadan hücrelerin üzerine 10 μ l MTT çözeltisi eklendi. Ardından 37°C'de %5 CO₂'lik etüvde 4 saat bekletildi.

4 saat sonunda tüm kuyulara 50 μ l DMSO eklendi ve mikropipet yardımıyla iyice karıştırıldı ve ardından 37°C'de %5 CO₂'lik etüvde 10 dk bekletildi. ELISA okuyucuda 540 nm'de absorbans değerlerinin ölçümü için cihaz okutması yapıldı ve absorbans değerleri not edildi.

3.2.11. İmmünsitokimya (ICC)

Her bir kuyusuna 2.10⁵ tane hücre gelecek şekilde 6 kuyulu plakalara uygun lameli kullanılarak ekim yapıldı. *NMRAL1* siRNA'sı uygulaması sonrasında,

NMRAL1 siRNA'sı, kontrol siRNA uygulanmış ve siRNA uygulanmamış hücrelerde *NMRAL1* ve *HTATIP2* proteinlerinin hücre içindeki yerlerinin ve yoğunluklarının belirlenmesi için immünsitokimya deney basamaklarına geçildi.

Lam üzerine alınan hücreler fikse edilmek üzere 10 dk boyunca soğuk metanole maruz bırakıldı. Ardından sırasıyla 30 dk ve 15 dk toluolde bekletildi. Preparatlar azalan alkol serilerinden (100-100-96-96-70) 5 dk süreyle geçirilip distile suyla yine 5dk boyunca yıkama işlemi yapıldı.

Antijen iyileştirime amacıyla preparatlara 3 kere 5 dk süreyle sitrat tamponu uygulandı. Ardından 10 dk süreyle mikrodalgaya alınan preparatlar 15 dk boyunca soğumaya bırakıldı ve 5 dk distile su ve sonrasında 5 dk PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Preparatlara hidrojen peroksit ile 10 dk bloklaması sağlandıktan sonra 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı ve 20 dk süreyle bloklama solüsyonu uygulandı.

Bloklamanın ardından 1µg/ml olacak şekilde *NMRAL1* ve *HTATIP2* birincil antikorları uygulandı ve 1 gece oda ısısında bekletildi.

Birincil antikor uygulanan preparatların ertesi gün 3 kere 5 dk PBS ile yıkandıktan sonra 20 dk süreyle biotin işaretli ikincil antikor uygulandı. Tekrar 3 kere 5 dk PBS ile preparatlar yıkandıktan sonra 22 dk süreyle streptavidin uygulandı ve son kez 3 kere 5 dk PBS ile yıkama gerçekleştirildikten sonra preparatlara AEC kromojeni uygulanarak ışık mikroskopunda 2-6 dakika aralığında reaksiyon gerçekleşmesi gözlemlendi.

Reaksiyonun görüldüğü preparatlar distile suya alınıp 10 dk süreyle Mayer's hematoksileni uygulandı. Ardından 3'er dakika boyunca çeşme suyu-PBS-distile su şeklide muamele edildi ve son uygulanan distile su 2 kez değiştirildikten sonra preparatlar gliserin jel kullanılarak kapatıldı.

3.2.12. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

GZ-PZT yöntemi ile elde edilen eşik değerler (Ct – Cycle Threshold) LightCycler Software ile analiz edildi. Tümör doku örneklerindeki *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* gen ifadelerinin *B2M* referans geni ile karşılaştırılması $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile yapıldı (124). Bu yöntemin formülü aşağıda verilmiştir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{Tümör Doku (Hedef Gen Ct} - \text{Kontrol Gen Ct)} - \text{Normal Doku (Hedef Gen Ct} - \text{Kontrol Gen Ct)}]}$$

Verilerin istatistiksel olarak hesaplanması IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) yazılımı ile yapıldı. İstatistiksel değerlendirme aşamasında elde ettiğimiz verilerin öncelikle normal dağılım gösterip göstermediğini anlamak amacıyla Shapiro-Wilk Normalite Testi uygulanmıştır. Normalite testi sonucunda $p > 0,05$ olan veri setlerinin normal dağılım gösterdiği, p 'nin $0,05$ 'ten küçük olduğu veri setlerinin ise normal dağılım göstermediği kabul edilerek istatistiksel testleri geçilmiştir. Normal dağılım gösteren veri setlerinde Paired Sample T-Test ve Pearson Correlation kullanılmış olup, normal dağılım göstermeyen veri setlerinde sırasıyla bu iki testin parametrik olmayan alternatifleri olan Wilcoxon Signed Rank Test ve Spearman Correlation testleri uygulanmıştır. Çok fazla sayıda bağımsız grupların bulunduğu veri setlerinin analizinin istatistiksel değerlendirmesi ise Chi-square testi ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

NMRAL1, *HTATIP2*, *C-MYC* ve *CCND1* ifade düzeyleri, baş-boyun kanserinin önemli bir bölümünü oluşturan larenks kanser dokularında araştırılmıştır. *NMRAL1* ve *HTATIP2* protein ifade çalışmaları, *NMRAL1*'in normal dokuda protein ifadesi olmadığı için sadece tümör dokuları ile yapılmıştır.

4.1. Klinik ve Patolojik Analiz

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda larenks kanseri tanısı alan 51 hastanın tümör ve normal dokusu kullanıldı. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri Tablo 4-1 verilmiştir.

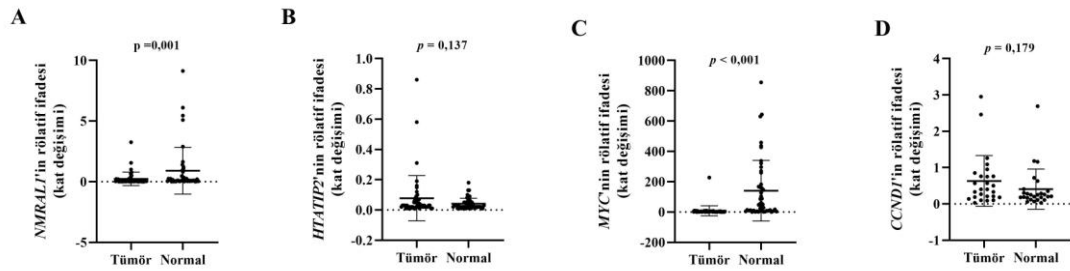
Tablo 4-1: Larenks kanserli hastaların klinik ve patolojik özellikleri

	Klinik Veri	Hasta Sayısı	Oranı (%)
Yaş	≤50	3	5,9
	>50	48	94,1
Sigara	Var	43	84,3
	Yok	5	9,8
	Bilgi Yok	3	5,9
Alkol	Var	9	17,6
	Yok	39	76,5
	Bilgi Yok	3	5,9
Tümör Yeri	Glottik	20	40
	Subraglottik	26	52
	Transglottik	4	8
Grade	1	4	7,8
	2	33	64,7

	3	12	23,5
	Bilgi Yok	2	3,9
Kan Damarı İnvazyon	Var	21	41,2
	Yok	30	58,8
Lenfatik İnvazyon	Var	42	82,4
	Yok	9	17,6
Perinöral İnvazyon	Var	20	39,2
	Yok	31	60,8
Kartilaj İnvazyon	Var	32	62,7
	Yok	19	37,3

4.2. *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* Genlerinin İfade Düzeyleri

Larenks kanserli hastaların dokusunda *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* genlerinin ifade analizleri GZ-PZT ile yapıldı. Gen ifade çalışmasının her bir hastaya ait CT değerleri Ek Tablo E1, Tablo E2, Tablo E3 ve Tablo E4'te yer almaktadır.



Şekil 4-1: Larenks kanserli hastalarda *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* gen ifade sonuçları.

Larenks kanserinde *NMRAL1* mRNA ifadesinin hastaların %72'sinde ($p=0,001$), *MYC*'in hastaların %85,1'inde ($p<0,001$) anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi. *HTATIP2* mRNA ifadesi hastaların %56'sında ($p=0,137$) ortalama 1,24 kat ve *CCND1* ifadesi hastaların %30,8'inde ortalama 1,55 kat ($p=0,179$) artmış

olarak bulundu. Her iki gen için de bu artışın anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4-1, Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Larenks kanserli hastalarda *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* mRNA ifadesi ve kat değişimleri

Gen	Tümör ΔCT ortalama (SS)	Normal ΔCT ortalama (SS)	$\Delta\Delta CT$ ortalama (SS)	$2^{-\Delta\Delta CT}$	p value
<i>NMRAL1</i>	3,53 (3,05)	1,77 (3,00)	1,69 (3,11)	0,31	*0,001
<i>HTATIP2</i>	4,43 (2,16)	4,96 (1,58)	-0,31 (1,94)	1,24	**0,137
<i>MYC</i>	-1,29 (1,80)	-5,66 (4,81)	4,36 (5,46)	0,05	*<0,001
<i>CCND1</i>	1,39 (1,55)	2,02 (1,40)	-0,63 (2,34)	1,55	**0,179

*İstatistiksel değerlendirme Wilcoxon Signed Ranks Test kullanılarak yapılmıştır

**İstatistiksel değerlendirme Paired Samples T Test kullanılarak yapılmıştır.

NMRAL1 mRNA ifadesinin *HTATIP2* mRNA ifadesi ile anlamlı oranda aynı yönlü korelasyon gösterdiği ($p=0,046$), *MYC* ve *CCND1* ile korelasyonun anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo 4-3). *HTATIP2* mRNA ifadesi, hastaların %61,3'ünde *MYC* ile ve %67,8'inde *CCND1* ile zıt yönlü bir ilişki gösterdi. Ancak bu ters korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo 4-4).

Tablo 4-3: *NMRAL1* gen ifadesinin *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* ifadeleri ile karşılaştırılması

		<i>NMRAL1</i>		
		Azalmış n(%)	Artmış n(%)	*p değeri
<i>HTATIP2</i>	Azalmış n(%)	19 (38)	3 (6)	0,046
	Artmış n(%)	17 (34)	11 (22)	
<i>MYC</i>	Azalmış n(%)	30 (63,8)	10 (21,3)	0,923
	Değişmemiş n(%)	0 (0)	1 (2,1)	
	Artmış n(%)	5 (10,6)	1 (2,1)	
<i>CCND1</i>	Azalmış n(%)	4 (15,4)	4 (15,4)	0,237
	Değişmemiş n(%)	1 (3,8)	0 (0)	
	Artmış n(%)	13 (50)	4 (15,4)	

*İstatistiksel değerlendirmeler Spearman's Rho Korelasyon Test kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 4-4: *HTATIP2* gen ifadesinin *MYC* ve *CCND1* ifadeleri ile karşılaştırılması

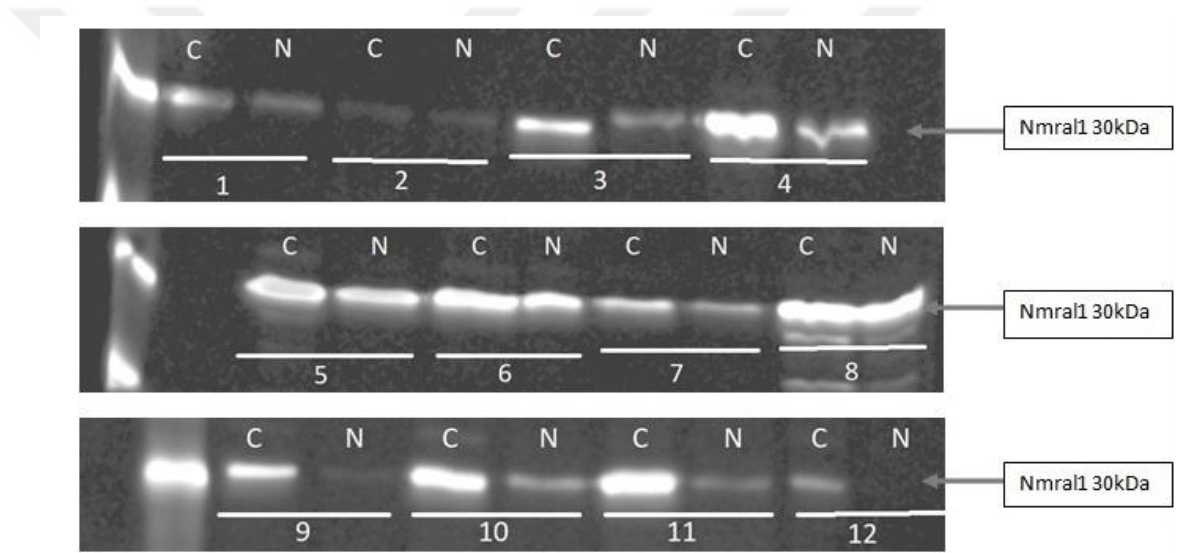
		<i>HTATIP2</i>		
		Azalmış n(%)	Artmış n(%)	*p değeri
<i>MYC</i>	Azalmış n(%)	17 (36,2)	23 (48,9)	0,945
	Değişmemiş n(%)	0 (0)	1 (2,1)	
	Artmış n(%)	3 (6,4)	3 (6,4)	
<i>CCND1</i>	Azalmış n(%)	2 (7,7)	6 (23,1)	0,275
	Değişmemiş n(%)	1 (3,8)	0 (0)	
	Artmış n(%)	9 (34,6)	8 (30,8)	

*İstatistiksel değerlendirmeler Spearman's Rho Korelasyon Test kullanılarak yapılmıştır.

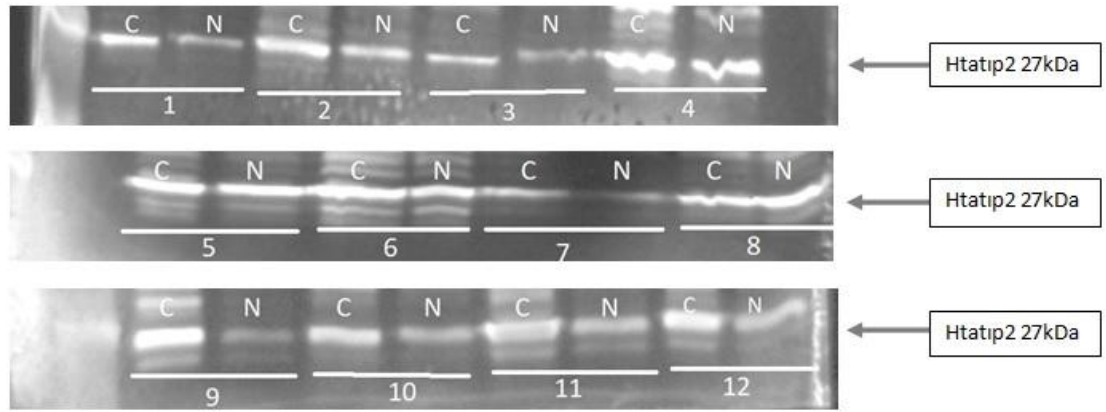
4.3. NMRAL1 ve HTATIP2 Protein İfade Düzeyleri

Western blot ile larenks kanserli hastaların tümör dokularında NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin sitoplazma ve çekirdek düzeyleri incelendi. Protein ifade çalışmasında 6 hastanın alınan dokuları yeterli olmadığından her iki protein çalışmasının değerlendirmesi 45 hasta üzerinden yapıldı. NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin farklı hastalarda western blot görüntüsü Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te gösterilmektedir.

45 hastanın tümör dokusunda NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin bant yoğunlukları belirlendi. Her iki proteinin sitoplazma ve çekirdek dağılımları Tablo 4-5'da gösterilmektedir.



Şekil 4-2:Larenks kanserli 12 hastanın tümör dokusuna ait NMRAL1 western blot görüntüsü



Şekil 4-3:Larenks kanserli 12 hastanın tümör dokusuna ait HTATIP2 western blot görüntüsü

Tablo 4-5:Larenks kanserli 45 hastanın sitoplazma ve çekirdekte NMRAL1 ve HTATIP2 protein düzeyleri

		Ortalama (%)	Standart Sapma (%)	*p Değeri
NMRAL1	Sitoplazma	51080,5 (80,59)	18726,5 (17,08)	<0,001
	Çekirdek	16016,02 (19,41)	16269,02 (17,08)	
HTATIP2	Sitoplazma	42786,75 (67,29)	16659,15 (17,48)	0,019
	Çekirdek	22579,88 (32,71)	15614,92 (17,48)	

*İstatistiksel değerlendirme Wilcoxon Rank Test kullanılarak yapılmıştır.

Larenks kanserli dokularda NMRAL1 proteininin %80,59'u sitoplazma, %19,41'i çekirdekte olduğu saptandı. HTATIP2 proteininin ise %67,29 sitoplazma, %32,71 çekirdek yerleşimlidir. Larenks kanseri tümör dokularında β -actin normalizasyonu sonrasında, NMRAL1 ve HTATIP2'nin sitoplazmada bulunan protein miktarı ile çekirdek protein miktarı kıyaslandığında sitoplazmada yüksek oranda bulunmaları istatistiksel olarak anlamlıdır (sırası ile $p < 0,001$; $p = 0,019$) (Tablo 4-5). NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin birbirine göre durumlarına baktığımızda tümör doku sitoplazmasında NMRAL1 proteini HTATIP2'den 1,59 kat

daha fazla bulunmaktadır ($p=0,002$). Çekirdekte ise her ikisinin düzeyinin eşit (0,93 kat) olduğunu saptadık ($p=0,014$).

Larenks kanserli hastalarda *NMRAL1*'in mRNA ve protein ifade sonuçlarının kıyaslanması Tablo 4-6'da, *HTATIP2* ise Tablo 4-7'de verilmiştir. *NMRAL1* ve *HTATIP2*'nin mRNA ve protein ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır.

Tablo 4-6:Larenks kanserli hastalarda *NMRAL1*'in mRNA ve protein ifade dağılımı

		mRNA İfade		*p değeri
		Azalmış n(%)	Artmış n(%)	
Protein İfade	Azalmış n(%)	16 (35,6)	5 (11,1)	0,693
	Artmış n(%)	17 (37,8)	7 (15,6)	

*İstatistiksel değerlendirmeler Spearman's Rho Korelasyon Testi kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 4-7:Larenks kanserli hastalarda *HTATIP2*'nin mRNA ve protein ifade dağılımı

		mRNA İfade		*p değeri
		Azalmış n(%)	Artmış n(%)	
Protein İfade	Azalmış n(%)	8 (17,8)	12 (26,7)	0,789
	Artmış n(%)	9 (20)	16 (35,6)	

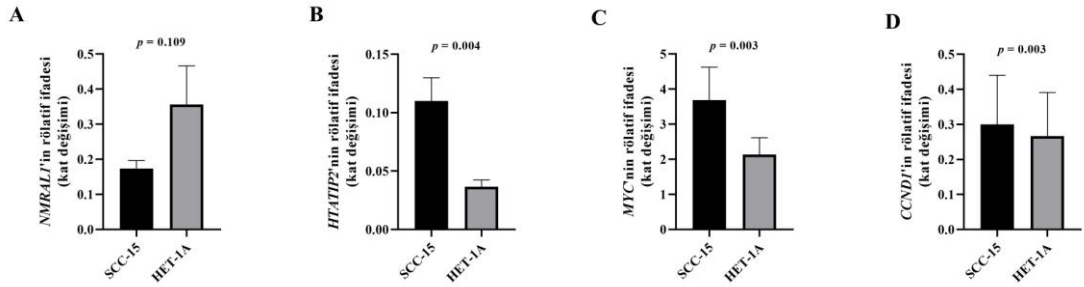
*İstatistiksel değerlendirmeler Spearman's Rho Korelasyon Testi kullanılarak yapılmıştır.

4.4. *NMRAL1* siRNA Sonuçları

mRNA İfade Sonuçları

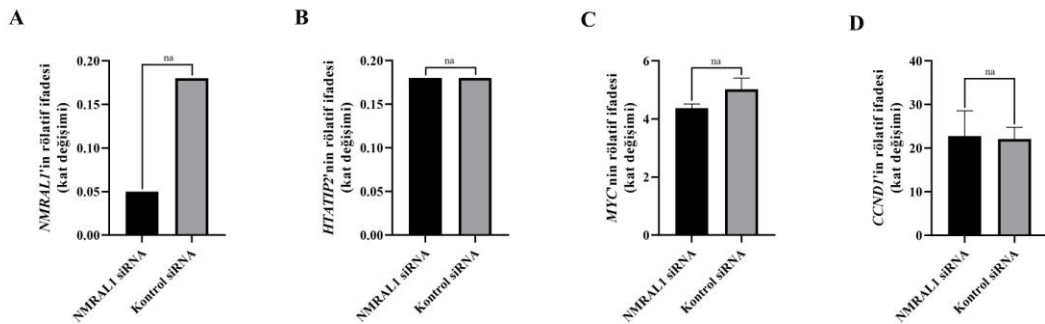
NMRAL1 gen ifadesi hem HET-1A (özofagus normal squamöz hücre hattı) hem de SCC-15 (dil squamöz kanser hücre hattı) hücrelerinde susturuldu. Susturma deneyi öncesi HET-1A ve SCC-15 hücre hatlarında *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* gen ifadeleri GZ-PZT ile bakıldı. Analiz sonuçlarına bakıldığında SCC-15 hücre hattında *NMRAL1* gen ifadesinin yaklaşık %50 oranında (0,48 kat) azalırken

HTATIP2 ifadesinin ise 3 kat, *MYC* ve *CCND1*'in de anlamlı oranda arttığı tespit edildi (Şekil 4-4).

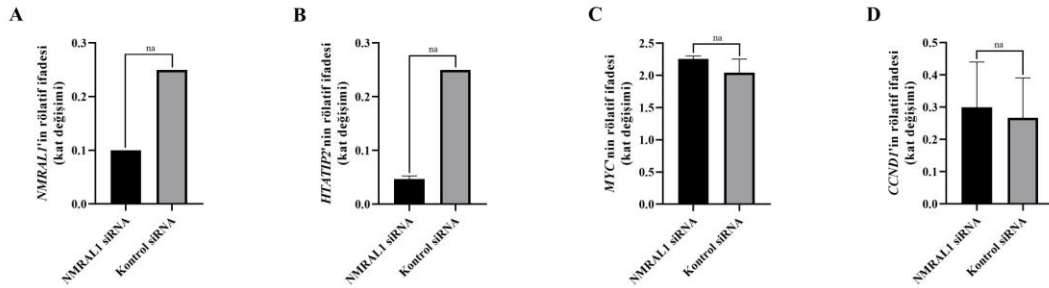


Şekil 4-4: SCC-15 ve HET-1A hücre hatlarında *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* gen ifade sonuçları

Kanserli ve normal hücre hatlarında *NMRAL1* geninin siRNA ile susturulması sonrası *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* gen ifade düzeylerine GZ-PZT yöntemi ile bakıldı. İfade sonuçları Şekil 4-5 ve Şekil 4-6'da gösterilmektedir. *NMRAL1* ifadesinin HET-1A hücre hattında kit kontrol siRNA'sı uygulanan HET-1A hücrelerine kıyasla %62 oranında azaldığı belirlendi. Kanser hücre hattı olan SCC-15'te ise bu azalmanın %74 oranı ile daha yüksek olduğu tespit edildi. *NMRAL1* geninin susturulması sonrasında *HTATIP2* gen ifadesi SCC-15'te değişim göstermezken HET-1A'da %82 oranında azalma gösterdi. *MYC* ve *CCND1* gen ifadelerinin susturma sonrası hem normal hücre hattında hem de kanser hücre hattında değişkenlik göstermediği belirlendi.



Şekil 4-5: *NMRAL1* siRNA uygulaması sonrası SCC-15 hücre hatlarında *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* mRNA ifade sonuçları



Şekil 4-6: *NMRAL1* siRNA uygulaması sonrası HET-1A hücre hatlarında *NMRAL1*, *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* mRNA ifade sonuçları

Protein İfade Sonuçları

NMRAL1 geninin siRNA ile susturulması sonrası *NMRAL1* ve *HTATIP2* protein varlığı ve hücre içi yerleşiminin belirlenmesi için immünsitokimya (ICC) yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda ICC ile immünreaktivite değerlendirmesi; negatif, zayıf (+), orta (++), güçlü (+++) olarak yapılmıştır.

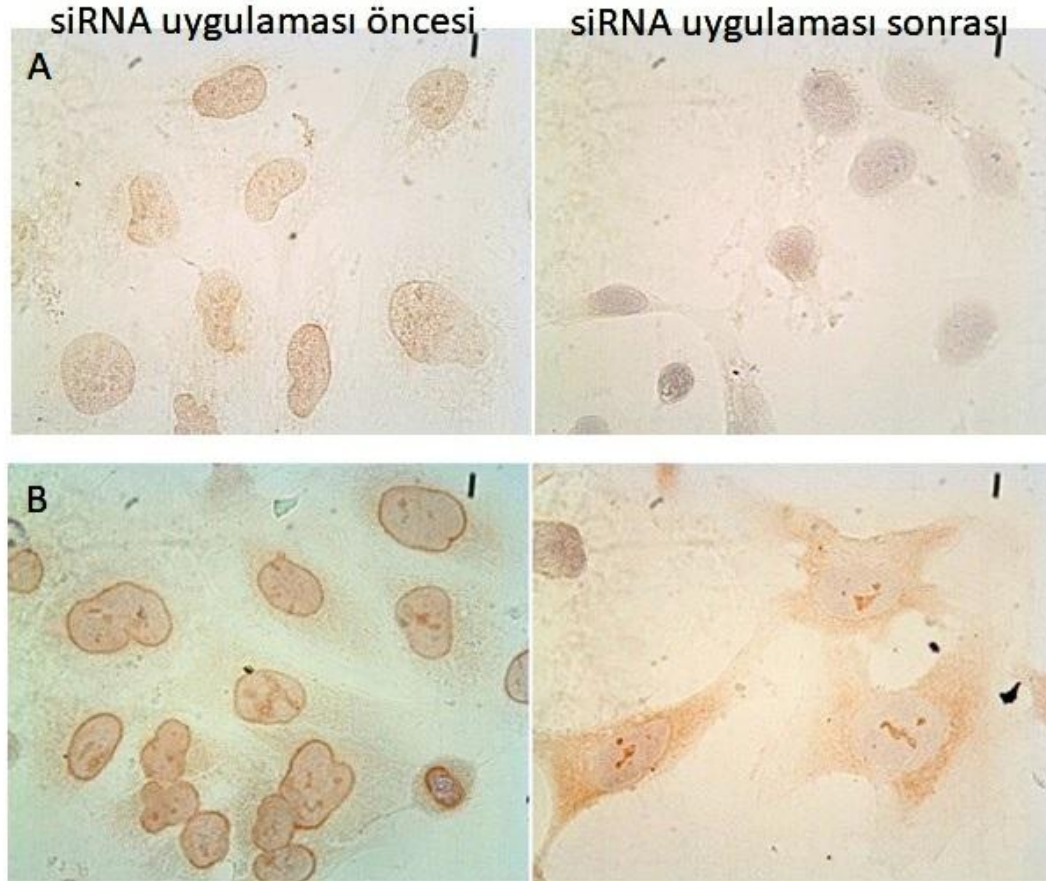
-HET-1A hücre hattında ICC boyama bulguları

HET-1A hücrelerinde, *NMRAL1* proteini orta (++) ve *HTATIP2* proteini güçlü (+++) immünreaktivite gösterdi.

NMRAL1 proteinini hücresel yerleşim açısından değerlendirdiğimizde; hücre membranı negatif (-), sitoplazma negatif (-)/zayıf (+), perinükleer bölgede güçlü (+++) ve çekirdekte orta (++) düzeyde pozitif immünreaktivite gösterdi (Şekil 4-7A). HET-1A hücreleri üzerine *NMRAL1* siRNA uygulama sonrası (uygulama sonrası *NMRAL1* mRNA ifadesi %62 azaldı) hem sitoplazma hem de çekirdekte *NMRAL1* protein düzeyindeki azalma Şekil 4-7A'da gösterilmektedir.

HET-1A hücrelerinde *HTATIP2* proteini hücresel yerleşimi açısından değerlendirdiğimizde; hücre membranı negatif (-), sitoplazma orta (++) , peri nükleer bölge ve çekirdek zarı güçlü (+++) ve çekirdek orta (++) düzeyde pozitif immünreaktivite gösterdi (Şekil 4-7B). HET-1A hücreleri üzerine *NMRAL1* siRNA uygulama sonrası (uygulama sonrası *HTATIP2* mRNA ifadesi %82 azaldı) *HTATIP2* protein varlığı ve yerleşimini değerlendirdiğimizde güçlü immünreaktivitenin değişmediği ancak hücresel yerleşimin değiştiği gözlemlendi. Güçlü (+++) immün pozitiflik gösteren çekirdek zarı *NMRAL1* siRNA uygulaması sonrası orta (++)

düzeyde pozitiflik gösterdi. Çekirdekte değişim orta (++)/ zayıf (+), sitoplazmada orta (++) olan immün pozitiflik *NMRAL1* siRNA uygulaması sonrası güçlü (+++) olarak belirlendi (Şekil 4-7B) (Tablo 4-8). Bu değişime göre; HTATIP2 proteininin normal hücre HET-1A'da *NMRAL1* siRNA susturması sonrası, kanser hücresi SCC-15'teki hücresel yerleşime benzer immünreaktivite gösterdiği sonucuna varılmaktadır (Şekil 4-8B).



Şekil 4-7:HET-1A hücre hattında *NMRAL1* ve HTATIP2 proteinlerinin ICC yöntemi sonrası ışık mikroskobu görüntüsü (40X10 büyütme). A: *NMRAL1* proteini, B: HTATIP2 proteini.

-SCC-15 hücre hattında ICC boyama bulguları

SCC-15 hücrelerinde, *NMRAL1* proteini sitoplazma ve çekirdekte güçlü (+++) ve HTATIP2 proteini güçlü (+++)/ orta (++) immünreaktivite gösterdi. *NMRAL1* protein varlığının sağlıklı HET-1A hücrelerine kıyasla kanser hücresi SCC-15'te daha yüksek olduğu gözlemlendi. HET-1A ve SCC-15 hücreleri arasında HTATIP2 protein varlığı açısından farklılık olmadığı ancak hücresel yerleşim açısından farklılık gösterdiği belirlendi.

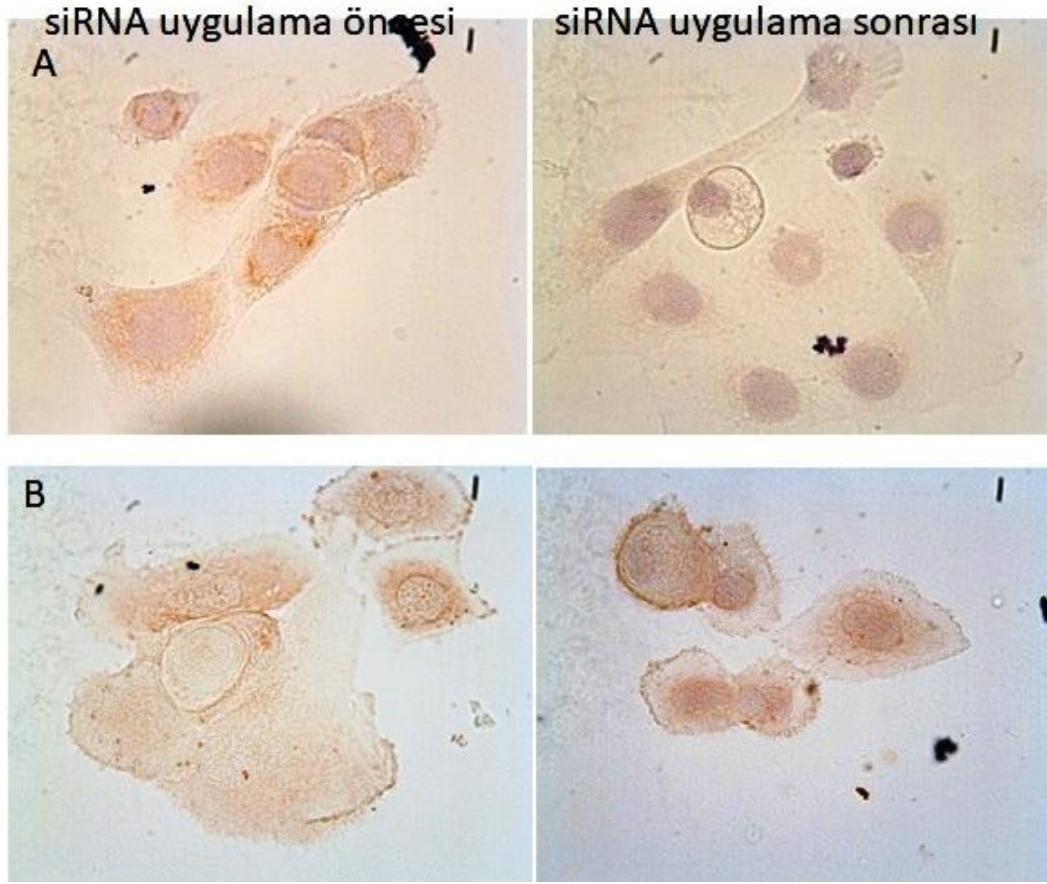
NMRAL1 proteinini hücresel yerleşim açısından değerlendirdiğimizde; membran negatif (-), sitoplazma orta (++) , perinükleer bölgede güçlü (+++) ve çekirdekte orta (++)/ zayıf (+) düzeyde pozitif immünreaktivite gösterdi (Şekil 4-8A). SCC15 hücreleri üzerine *NMRAL1* siRNA uygulama sonrası (uygulama sonrası *NMRAL1* mRNA ifadesi %74 azaldı) *NMRAL1* protein düzeyindeki azalma Şekil 4-8A ve Tablo 4-8’te gösterilmektedir.

Tablo 4-8: HET-1A ve SCC-15 hücre hatlarında *NMRAL1* siRNA öncesi ve sonrası *NMRAL1* proteininin hücresel değişimi

		<i>NMRAL1</i> siRNA öncesi	<i>NMRAL1</i> siRNA sonrası
HET-1A	Membran	-	-
	Sitoplazma	-/+	-/+
	Çekirdek zarı	+++	+
	Çekirdek	++	+
SCC-15	Membran	-	-
	Sitoplazma	++	++/+
	Çekirdek zarı	+++	+
	Çekirdek	++/+	+

SCC-15 hücrelerinde HTATIP2 proteini hücresel yerleşimi açısından değerlendirdiğimizde; membran orta (++)/ zayıf (+), sitoplazma güçlü (+++), çekirdek zarı orta (++) ve çekirdek orta (++) düzeyde pozitif immünreaktivite gösterdi (Şekil 4-8B). SCC-15 hücreleri üzerine *NMRAL1* siRNA uygulama sonrası (uygulama sonrası *HTATIP2* mRNA ifadesi değişmedi) HTATIP2 protein varlığı ve yerleşimini değerlendirdiğimizde güçlü immünreaktivitenin değişmediği ancak hücresel yerleşimin değişmediği gözlemlendi. Sitoplazmada güçlü (+++) olan immün pozitiflik *NMRAL1* siRNA uygulaması sonrası da güçlü (+++) olarak belirlendi Orta (++) immün pozitiflik gösteren çekirdek ve çekirdek zarı *NMRAL1* siRNA uygulaması sonrası da orta (++) düzeyde pozitiflik gösterdi (Şekil 4-8B) (Tablo 4-9). Bu değişim ile HTATIP2 proteininin kanser hücresi SCC-15’de *NMRAL1* siRNA

uygulama öncesi ve sonrası benzer immünreaktivite gösterdiği sonucuna varılmaktadır.



Şekil 4-8: SCC-15 hücre hattında NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin ICC yöntemi sonrası ışık mikroskobu görüntüsü (40X10 büyütme). A: NMRAL1 proteini, B: HTATIP2 proteini

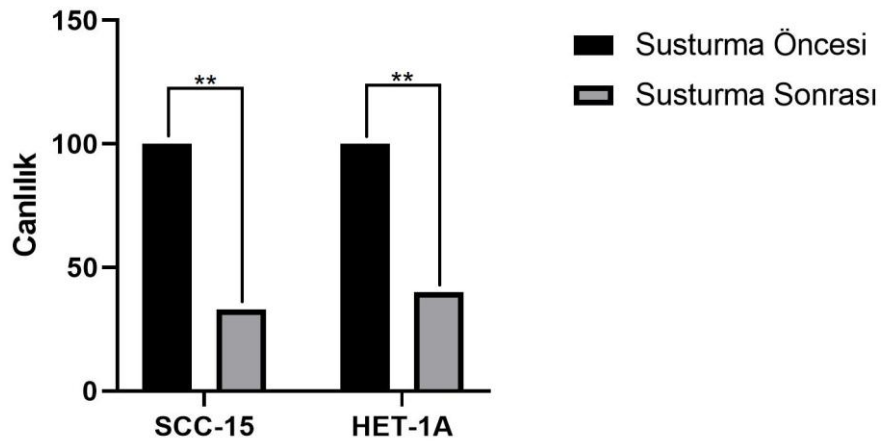
Tablo 4-9: HET-1A ve SCC-15 hücre hatlarında *NMRAL1* siRNA öncesi ve sonrası HTATIP2 proteininin hücresel dağılımı

		<i>NMRAL1</i> siRNA öncesi	<i>NMRAL1</i> siRNA sonrası
HET-1A	Membran	-	-
	Sitoplazma	++	+++
	Çekirdek zarı	+++	++
	Çekirdek	++	++ / +
SCC-15	Membran	++ / +	++ / +
	Sitoplazma	+++	+++
	Çekirdek zarı	++	++
	Çekirdek	++	++

*İmmünreaktivite: Negatif (-), Zayıf (+), Orta (++) , Güçlü (+++).

4.5. SCC-15 ve HET-1A hücrelerinde Hücre Canlılık Test Sonuçları (MTT Assay)

NMRAL1 geninin siRNA ile susturulması ardından SCC-15 ve HET-1A hücrelerinde hücre canlılığının tespiti için 4 tekrar MTT assay yapıldı. Mikroplate okuyucuda uygun dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldükten sonra elde edilen sonuçlar Tablo 4-10 üzerinde gösterildi.



Şekil 4-9: *NMRAL1* siRNA uygulaması sonrası SCC-15 ve HET-1A hücrelerinde hücre canlılık test (MTT assay) sonuçları

NMRAL1 siRNA uygulaması sonrası hücresel canlılık test sonuç ortalamaları SCC-15'te; kontrol siRNA'yla kıyaslandığında canlılığın %67 azaldığı gözlemlendi. HET-1A'da kontrol siRNA'ya göre canlılık %60 oranında azaldı. Bu azalmalar her iki hücre grubu içinde anlamlı olarak belirlendi (Şekil 4-9).



5. TARTIŞMA

Ağız boşluğu, yutak ve gırtlak gibi skuamöz hücreli baş-boyun kanserleri, özellikle Orta Doğu, Asya ve Afrika ülkelerinde yüksek hasta sayısı ve ölüm oranıyla sıklıkla gözlenen kanserlerdir. En önemli risk faktörleri sigara-alkol kullanımı ve HPV enfeksiyonlarıdır (125,126). Ayrıca erkeklerin baş-boyun kanserine yakalanma olasılığı kadınlara kıyasla yüksektir ve yaş ilerledikçe görülme olasılığı artar (3).

Baş-boyun kanserleri diğer solid tümörlerde olduğu gibi tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin anormal ifadesi ile ortaya çıkmaktadır. DNA onarımı, hücre dönüğüşünde yer alan genlerdeki değişimler, enerji metabolizması ve oksidatif stresi düzenleyen sitokrom p450 ve antioksidan enzim sistemleri, NADPH metabolizması bozuklukları da baş-boyun kanseri oluşumunda önemlidir (11,12,14).

Hücrede antioksidan sistem bileşenleri oksidatif strese yol açan RONS düzeylerini dengede tutamaz, redoks dengesi bozulursa birçok sinyal yolağı (PI3K-AKT, RAS/MAPK, Keap-Nrf2-ARE ve NF- κ B vb. gibi) yüksek RONS düzeyinden etkilenir. Hücreler oksidatif strese karşı koymak ve hücredeki redoks dengesini korumak için NADPH'a ihtiyaç duyarlar. NADPH çoğu kanser türünde artan ROS'un atılması ve nötralizasyonundan sorumludur (40,62,64). NADPH bağlayabilme özelliği olan (Rossmann katlanmasına sahip), redoks sensörü olarak görev yapan ve yazılıma katılarak metabolik yolları kontrol etmede kritik öneme sahip atipik SDR proteinleri bulunmaktadır. Enzimatik özellik göstermeyen ve çok benzer 3 boyutlu yapıları ile atipik SDR proteinlerinin başında NMRAL1 ve HTATIP2 gelmektedir (66,68,75). NMRAL1 ve HTATIP2 proteinlerinin NADPH bağlama özellikleri biyolojik etkinlikleri için önemlidir. Her iki protein de transkripsiyon faktörlerinin etkinliklerini düzenler ve hücre redoks durumuna göre sitoplazma ve çekirdeğe göç ederler (110). Bu iki proteinin STRING veritabanına göre etkileşimde oldukları ortak proteinler de mevcuttur. Bu proteinler; NADH:ubikinon oksidoredüktaz ailesi üyelerinden *NDUFS1*, *NDUFS2*, *NDUFS3*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFA8*, *NDUFAB1*, *NDUFV1*, *NDUFV2*'dir (127). Bu proteinlerin akciğer (128), böbrek (129), gırtlak (130), kolorektal (131), mesane (132), prostat (133), testis (134) ve rahim ağzı (135) kanserleri ile ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada redoks durumuna (NADPH/NADP oranı)

göre hücrel yerleşimleri belirlenen, transkripsiyonel düzenleyici özelliği olan *NMRAL1*'in yokluğunda *HTATIP2*'nin sitoplazmaya geçişinin arttığı ve sitoplazmik redoks düzenleyici fonksiyonunun transkripsiyonel düzenleyici fonksiyonuna kıyasla arttığı düşünülmektedir.

NMRAL1 mRNA ifadesi alzheimer (136), nörodejeneratif hastalıklar (137) ve meme kanserinde (138) düşük, eritrosit farklılaşmasında (kanda) (139) yüksek olduğu gösterilmiştir. The Cancer Genome Atlas (TCGA) RNA sekans verilerine göre baş-boyun kanserinde *NMRAL1* ifadesinin düşük (80) olduğu, The International Cancer Genome Consortium (ICGC) RNA sekans veri derlendiğinde de ifadesinin değişmediği bildirilmiştir (140). Çalışmamızda *NMRAL1* mRNA ifadesinin normal hücre hattına kıyasla baş-boyun kanseri hücre hattında ve larenks kanserli dokularda azaldığı belirlendi (Şekil 4-1, Şekil 4-4).

İlk olarak tümör baskılayıcı olarak tanımlanan *HTATIP2*, tümör büyümesi, angiogenezi, metastazı ve kemorezistans gibi tümörün ilerlemesine neden olan biyolojik süreçlerde yer alır (91,141-143). *HTATIP2*'nin tümör baskılayıcı işlevi, melanoma, meme kanseri, nöroblastom, glioblastoma, kolon kanseri ve hepatoselüler karsinom (HCC) dahil olmak üzere bazı kanser hücrelerinde gösterilmiştir (81,84,85). Tümör baskılayıcı özelliğinin tersine prostat kanserli hücre hatları ile yapılan bir çalışmada ifadesinin arttığı ve onkogen gibi davrandığı, yumurtalık kanserinde de ifadesinin anlamlı oranda arttığı bildirilmiştir (144). Chen ve ark. PrognoScan veritabanına ait mikroarray verilerini kullanarak yapmış oldukları meta analiz sonucunda, akciğer kanserli dokularda *HTATIP2* mRNA düzeyinin arttığı bulunmuştur (145). The International Cancer Genome Consortium (ICGC) RNA sekans verilerine göre *HTATIP2* mRNA ifadesi baş-boyun kanserli dokularda sağlıklı mukozaya kıyasla 1,7 kat artmıştır (79,140). The Cancer Genome Atlas (TCGA) RNA sekans verilerine göre de baş-boyun kanserinde *HTATIP2* ifadesinin *NMRAL1* gibi düşük olduğu bildirilmiştir (80). *HTATIP2* mRNA ifadesi baş-boyun kanseri hücre hattında ve larenks kanserli dokularda normale kıyasla artmaktaydı (Şekil 4-1, Şekil 4-4). Prostat kanseri hücre hatları ve yumurtalık kanserinde gözlenen *Htatip2*'nin onkogenik özelliği baş-boyun kanserinde de görülmektedir.

Çalışmamızda yüksek *NMRAL1* mRNA ifadesi olan normal baş-boyun hücre hattında *NMRAL1* gen susturması sonrası, *HTATIP2* mRNA ifadesi de azalmaktadır

(Şekil 4-6). Ancak bu azalma, protein düzeyinde azalma olarak değil hücresel yer değiştirme olarak gözlemlendi. Perinükleer bölge ve çekirdek zarında yoğun olarak bulunan HTATIP2 proteininin, *NMRAL1* gen susturması sonrası perinükleer bölge ve çekirdek zarında azalıp sitoplazmada miktarın arttığı belirlendi (Şekil 4-7, Tablo 4-9). HTATIP2'nin NADPH bağlı formu çekirdek taşıma reseptörlerinin alt birimine bağlanarak HTATIP2'nin çekirdeğe taşınımını baskıladığı bilinmektedir (109). Bulgularımız NADPH bağlayan *NMRAL1* proteininin azalması sonucu sitoplazmada NADPH bağlama görevini HTATIP2'nin üstlendiğini, HET-1A hücre hattında da HTATIP2-NADPH kompleksinin çekirdeğe HTATIP2 taşınımını azalttığını düşündürmektedir.

Normal redoks büyüme koşulları altında sitoplazma ve perinükleer bölgede lokalize olan *NMRAL1* proteininin farklı kanser türlerinde hücresel yerleşimi değişim göstermektedir. *NMRAL1* proteini HEK293T ve HeLa hücrelerinde NF-KB'yi inhibe etmek, oksidatif strese yanıt olarak nükleositoplazmik taşınmaya maruz kalmaktadır (111,146). Protein ifade düzeylerine baktığımızda *NMRAL1* proteininin meme kanserinde tümör oluşumunu teşvik ettiği, TCGA veri tabanı verileri derlendiğinde invaziv meme karsinomu yanında çok çeşitli kanser dokularında ifadesinin yüksek olduğu belirtilmiştir (147). Çalışmamızda mRNA ifadesinin aksine *NMRAL1* protein düzeyi, baş-boyun kanser hücre hattında artmış olarak bulundu. *NMRAL1* proteini baş-boyun kanserli hücre hattında tüm hücresel alanlarda (membran hariç) baş-boyun normal hücre hattına kıyasla daha yüksek orandaydı (özellikle çekirdeği çevreleyen sitoplazmada) (Şekil 4-5).

NMRAL1 proteini artan nitrik oksit (NO) ve azalmış NADPH/NADP⁺ oranında oksidatif strese yanıt olarak çekirdeğe göç etmektedir (109). 2019 yılında farede meme tümörleri ile yapılan bir çalışmada *NMRAL1* protein düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Ancak eski ve yeni oluşmuş tümörlerde *NMRAL1*'in hücresel yerleşiminin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Eski, kan damarlarından ayrı ve geniş bir alanda olan tümörde hipoksiye bağlı olarak proteinin sitoplazmada yoğun ve çekirdekte zayıf olduğu belirtilmiştir. Yeni oluşmuş tümörde ise mikroçevredeki oksidatif stresten kaynaklı çekirdek taşınımının çok fazla olduğu belirtilmiştir (148). Çalışmamızda baş-boyun normal dokuda *NMRAL1* ifadesi olmadığından tümör ile kıyası yapılamadı. Ancak *NMRAL1* proteininin %80'i sitoplazma %20'si çekirdek

yerleşimliydi (Tablo 4-5, Şekil 4-2). Larenks kanserli hastalarımızın çoğu ileri evrede olduğundan Glicksberg BS. ve arkadaşlarının meme tümörleri için söylediği gibi eski tümörlerde hipoksiye bağlı olarak NMRAL1 proteini sitoplazmada yoğunluk göstermiş olabilir. %20 gibi bir oranın çekirdekte olması; böbrek, meme ve rahim ağzı kanserlerinde olduğu gibi larenks kanserli dokularda artmış NF-KB sinyalinin zararlı etkilerinden hücreyi korumak, NF-KB aktivitesini düzenlemek ve kanserde artmış olan oksidatif stresi azaltmak için çekirdeğe göç etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

HTATIP2'nin protein yerleşimine bakıldığında; meme kanseri ve kolorektal kanserli dokuda sadece sitoplazmada, karaciğer kanseri ve rahim ağzı kanseri hücre hatlarında çoğunlukla sitoplazmada (özellikle ER'de) az miktarda çekirdekte yerleşimli olduğu bildirilmiştir (84,86,149). Whitman S. ve arkadaşları küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında yüksek oranda hücre zarı ve çekirdekte bulunduğunu, ancak serbest halde sitoplazmada bulunmadığını göstermişlerdir (89). Çalışmamızda baş-boyun kanseri hücre hattında sitoplazma ve hücre zarında normal hücreye göre daha çok HTATIP2 protein sinyali belirlendi (Şekil 4-7, Şekil 4-8). Çekirdek zarı ve çekirdekte farklılık gözlenmedi. HTATIP2 proteini kanser hücre hattında olduğu gibi larenks kanserli dokularda da çekirdeğe kıyasla yüksek oranda sitoplazma yerleşimliydi (Tablo 4-5, Şekil 4-3). 2014 yılında larenks kanserli 105 hasta dokusunda yapılan çalışmada HTATIP2 proteininin kanserli dokuların %56,2'sinde yüksek ifade olduğu, hem kanserli hem de normal dokularda sitoplazmik yerleşimli olduğu immunohistokimyasal yöntemle belirlenmiştir (143). Çalışmamızda larenks kanserli 45 hastanın western blot sonuçlarına göre HTATIP2 proteini sitoplazma ve çekirdek yerleşimli olduğu belirlendi. Larenks kanserli dokularda HTATIP2 proteinin %32,36'sının çekirdekte yer alması, diğer kanserlerde bazı genlerin (*TP53*, *MYC*, *CCND1*, *EGFR*, *CTNNB1* vb.) yazılımını düzenlediği (90,95,98,102) gibi baş-boyun kanserlerinde de bazı genlerin yazılımını düzenlediği sonucuna varılabilir.

Diğer kanserlerde *HTATIP2* geni ile *MYC* ve *CCND1* genlerinin negatif korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Biz de çalışmamızda HTATIP2 ve NMRAL1'in sitoplazmik fonksiyon benzerlikleri yanında HTATIP2'nin transkripsiyonel

düzenleyici olarak *MYC* ve *CCND1* üzerindeki etkisinin *NMRAL1* geni ile de gözlenip gözlenmediğini belirledik.

Meme kanseri (95) ve yumurtalık kanseri hücreleri (150) ile yapılan çalışmalarda *HTATIP2* gen ifadesinin *MYC* gen ifadesi üzerine negatif etkisi olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda kanser hücre hattı SCC-15'te *HTATIP2*, *MYC* ve *CCND1* gen ifadeleri artarken, *NMRAL1* gen ifadeleri azalmaktadır (Şekil 4-4). *NMRAL1*'in siRNA ile susturulması sonrası, hem kanser hem de normal baş-boyun hücre hattında *MYC* ve *CCND1* mRNA ifadelerinin değişmediği gözlemlendi (Şekil 4-5, Şekil 4-6). Hücre hatlarında ilgili genler arasında gözlenmeyen korelasyonu doku düzeyinde incelediğimizde, larenks kanserli hastaların % 61,3'ünde *HTATIP2* ve *MYC* arasında zıt yönlü bir ilişki olduğu belirlendi (Tablo 4-4). Larenks kanserinde *HTATIP2* mRNA ifadesi artan hastaların ise %85,2'sinde *MYC* ifadesi azalmaktaydı. Meme ve karaciğer kanserlerinde gözlenen zıt ilişkinin larenks kanserinde de gözlemlendiği ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Larenks kanserli hastaların %65,9'unda *NMRAL1* ile *MYC* arasındaki aynı yönlü ilişki gözlenmekteydi (Tablo 4-3). *NMRAL1* ifadesi azalan larenks kanserli hastaların %85,7'sinde *MYC* ifadesi de azalmaktaydı. Ancak *NMRAL1* ile pozitif yönlü korelasyon olması *MYC* geninin kanser hücre enerji metabolizmasında (glikoz ve oksidatif fosforilasyon) (151,152) görevli genlerin düzenlenmesindeki rolü *NMRAL1* geni üzerinden olabilir. Ya da kanser hücre çoğalmasında etkili onkogen *MYC*'in transkripsiyonel düzenleyicilerinden biri de NF-KB yolağıdır (153). *NMRAL1* geninin NF-KB yolağı üzerine negatif etkisi (111,117,146) *MYC* genini etkiliyor olabilir.

2009 yılında mide kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmada *HTATIP2* ifade artışının *CCND1* ifadesini baskıladığı ve hücre döngüsü kontrolünü etkilediği bildirilmiştir (92). Larenks kanserli dokularda *HTATIP2* ve *CCND1* ifadelerini kıyasladığımızda, hastaların %65,9'unda zıt yönlü bir ilişki olduğu görülmektedir. Ancak zıt yönlü bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4-4). Yine aynı şekilde hastaların %65,4'ünde *NMRAL1* ve *CCND1* ifadeleri arasında zıt yönlü bir ilişki gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4-3).

NMRAL1 siRNA uygulama sonrası kanser hücrelerinde ortalama % 67, sağlıklı hücrelerde ise ortalama %60 oranında hücresel canlılığın azaldığı gözlemlendi (Şekil 4-9). Zheng X. ve ark. HeLa hücreleri, Zhao Y. ve ark. böbrek kanseri hücre hattında yaptıkları çalışmalarda, *NMRAL1*'in aşırı ifadesinin hücre canlılığını artırdığı, RNAi ile ifadesi düşürüldüğünde de hücre canlılığının anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir. *NMRAL1* azalmasını takiben NO düzeyi artar, hücreleri apoptoza karşı koruyan GSH düzeyi azalır ve apoptoz tetiklenir. Hücre sitoplazmasında NADPH/NADP seviyesi düştüğünde hücre redoks durumu bozulur, *NMRAL1* azalır. Hücrede redoks durumunun bozulması, NO düzey değişimleri apoptoz ve hücre canlılığı ile ilgilidir (110,113). Çalışmamızdaki hem kanser hemde sağlıklı hücrelerde canlılığın düşmesi *NMRAL1* azalmasına bağlı NO yükselmesi ve redoks durumunun bozulması ile ilgili olabilir.

Sonuç olarak; HET-1A normal hücrede *NMRAL1* geninin susturulması ile *HTATIP2*'nin sitoplazmada miktarının artması, bu iki genin hücrede (özellikle sitoplazmada) doğrudan birbiri üzerine etkisi olduğunu ve ilişkinin sitoplazmada benzer olan NADPH bağlama özellikleri ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. *NMRAL1* yokluğu her iki baş-boyun hücre grubunda hücre canlılığını azaltmaktadır. Hücre canlılığının azalması, NADPH/NADP düzeyinin düşmesi sonucu redoks durumunun bozulması ve NO seviyeleri ile ilişkilidir. Elde ettiğimiz verilerin desteklemek için; eş zamanlı olarak hücre içi NADPH ve RONS (özellikle NO) düzeyleri bakılmasının, farklı sağlıklı ve kanser hücre hatları ile de doğrulamasının yapılması gerekmektedir. Ayrıca çalışmamız meme ve karaciğer kanserinde *HTATIP2*'nin negatif korelasyon gösterdiği *MYC* ve *CCND1* genlerinin larenks kanserinde *HTATIP2* ve *NMRAL1* genleriyle ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır. Larenks kanserinde de *HTATIP2* geni *MYC* ve *CCND1* ile negatif korelasyon göstermekteydi. Ancak *NMRAL1* geni *HTATIP2* ile benzer olarak *CCND1* ile negatif yönlü ancak *HTATIP2*'nin tersine *MYC* ile pozitif yönlü bir ilişki göstermekteydi. İlk defa tanımlanan *NMRAL1* ile *MYC* ilişkisinin NF-KB yolağı veya enerji metabolizması üzerinden; *HTATIP2*-*CCND1* ilişkisinde olduğu gibi *NMRAL1*-*CCND1* ilişkisinin de hücre döngüsünün düzenlenmesini etkileyerek olduğunu düşünmekteyiz. Öngörülen bu ilişkileri belirlemek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Koroulakis A, Jamal Z, Agarwal M. *Anatomy, Head and Neck, Lymph Nodes* İçinde, editor. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020. pp.
2. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; **371**(9625), 1695-1709. doi:10.1016/s0140-6736(08)60728-x
3. Mehanna H, Paleri V, West CM, Nutting C. Head and neck cancer--Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *Bmj* 2010; **341**, c4684. doi:10.1136/bmj.c4684
4. Koroulakis A, Agarwal M. *Laryngeal Cancer* İçinde, editor. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020. pp.
5. Marullo R, Werner E, Zhang H, Chen GZ, Shin DM, Doetsch PW. HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* 2015; **36**(11), 1397-1406. doi:10.1093/carcin/bgv126
6. Williams VM, Filippova M, Filippov V, Payne KJ, Duerksen-Hughes P. Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol* 2014; **88**(12), 6751-6761. doi:10.1128/jvi.03355-13
7. Liu Y, Tergaonkar V, Krishna S, Androphy EJ. Human papillomavirus type 16 E6-enhanced susceptibility of L929 cells to tumor necrosis factor alpha correlates with increased accumulation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; **274**(35), 24819-24827. doi:10.1074/jbc.274.35.24819
8. Conway DI, Hashibe M, Boffetta P, Wunsch-Filho V, Muscat J, La Vecchia C ve ark. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncol* 2009; **45**(9), 743-746. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.02.007
9. Fan J, Ye J, Kamphorst JJ, Shlomi T, Thompson CB, Rabinowitz JD. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* 2014; **510**(7504), 298-302. doi:10.1038/nature13236
10. Birgander R, Sjölander A, Zhou Z, Fan C, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphisms and haplotypes in nasopharyngeal cancer. *Hum Hered* 1996; **46**(1), 49-54. doi:10.1159/000154325
11. Tedeschi PM, Markert EK, Gounder M, Lin H, Dvorzhinski D, Dolfi SC ve ark. Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells. *Cell Death Dis* 2013; **4**(10), e877. doi:10.1038/cddis.2013.393
12. Albano E, Tomasi A, Persson JO, Terelius Y, Gorla-Gatti L, Ingelman-Sundberg M ve ark. Role of ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1) in catalysing the free radical activation of aliphatic alcohols. *Biochem Pharmacol* 1991; **41**(12), 1895-1902. doi:10.1016/0006-2952(91)90129-s
13. Landi MT, Bertazzi PA, Shields PG, Clark G, Lucier GW, Garte SJ ve ark. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics* 1994; **4**(5), 242-246. doi:10.1097/00008571-199410000-00002

14. Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Harries LW, Wolf CR, Jones PW ve ark. The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Pharmacogenetics* 1998; **8**(1), 1-6. doi:10.1097/00008571-199802000-00001
15. The L. GLOBOCAN 2018: counting the toll of cancer. *Lancet* 2018; **392**(10152), 985. doi:10.1016/s0140-6736(18)32252-9
16. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; **127**(12), 2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
17. WHO Cancer Today - IARC. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=5_14_1_4_6_3_2_32&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=4&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D
18. Pilzecker B, Buoninfante OA, Jacobs H. DNA damage tolerance in stem cells, ageing, mutagenesis, disease and cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 2019; **47**(14), 7163-7181. doi:10.1093/nar/gkz531
19. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
20. Cui X. Reactive oxygen species: the achilles' heel of cancer cells? *Antioxid Redox Signal* 2012; **16**(11), 1212-1214. doi:10.1089/ars.2012.4532
21. Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 1998; **7**(1), 9-16.
22. Katakwar P, Metgud R, Naik S, Mittal R. Oxidative stress marker in oral cancer: A review. *J Cancer Res Ther* 2016; **12**(2), 438-446. doi:10.4103/0973-1482.151935
23. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004; **19**(3), 169-185. doi:10.1093/mutage/geh025
24. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011; **711**(1-2), 193-201. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016
25. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; **160**(1), 1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
26. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; **61**(4), 290-302. doi:10.1016/j.addr.2009.02.005
27. Georgakilas AG, Mosley WG, Georgakila S, Ziech D, Panayiotidis MI. Viral-induced human carcinogenesis: an oxidative stress perspective. *Mol Biosyst* 2010; **6**(7), 1162-1172. doi:10.1039/b923958h
28. Sardaro N, Della Vella F, Incalza MA, D DIS, Lucchese A, Contaldo M ve ark. Oxidative Stress and Oral Mucosal Diseases: An Overview. *In Vivo* 2019; **33**(2), 289-296. doi:10.21873/invivo.11474
29. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW ve ark. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion.

- Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(47), 18525-18530. doi:10.1073/pnas.0809677105
30. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1763**(12), 1755-1766. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.09.006
31. Choudhary SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncol* 2014; **50**(1), 10-18. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.09.011
32. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; **82**(2), 291-295. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024
33. Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y ve ark. Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* 2007; **67**(18), 8839-8846. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-1649
34. Stich HF, Anders F. The involvement of reactive oxygen species in oral cancers of betel quid/tobacco chewers. *Mutat Res* 1989; **214**(1), 47-61. doi:10.1016/0027-5107(89)90197-8
35. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**(8), 599-612. doi:10.1038/nrc2191
36. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2016; **81**, 163-175. doi:10.1101/sqb.2016.81.030791
37. Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Rissanen A, Aromaa A, Heinonen OP ve ark. Dietary antioxidants and the risk of lung cancer. *Am J Epidemiol* 1991; **134**(5), 471-479. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a116118
38. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; **333**(1), 19-39. doi:10.1016/s0009-8981(03)00200-6
39. Clark LC, Combs GF, Jr., Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J ve ark. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Jama* 1996; **276**(24), 1957-1963.
40. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y ve ark. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**, 4350965. doi:10.1155/2016/4350965
41. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 2001; **114**(Pt 8), 1439-1445.
42. Ahn IE, Ju JH, Lee SY, Park JS, Oh HJ, Kim HR ve ark. Upregulation of stromal cell-derived factor by IL-17 and IL-18 via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Scand J Immunol* 2012; **76**(4), 433-439. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02745.x
43. Leslie NR, Downes CP. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal* 2002; **14**(4), 285-295. doi:10.1016/s0898-6568(01)00234-0
44. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**(9), 1619-1633. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.012
45. Davies C, Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochem Soc Trans* 2012; **40**(1), 85-89. doi:10.1042/bst20110641

46. Castro-Caldas M, Carvalho AN, Rodrigues E, Henderson C, Wolf CR, Gama MJ. Glutathione S-transferase pi mediates MPTP-induced c-Jun N-terminal kinase activation in the nigrostriatal pathway. *Mol Neurobiol* 2012; **45**(3), 466-477. doi:10.1007/s12035-012-8266-9
47. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 2010; **429**(3), 403-417. doi:10.1042/bj20100323
48. Hayashi M, Fearn C, Eliceiri B, Yang Y, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis. *Cancer Res* 2005; **65**(17), 7699-7706. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-4540
49. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; **47**, 89-116. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046
50. Jung KA, Kwak MK. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 2010; **15**(10), 7266-7291. doi:10.3390/molecules15107266
51. Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004; **37**(2), 139-143. doi:10.5483/bmbrep.2004.37.2.139
52. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; **25**(6), 280-288. doi:10.1016/j.it.2004.03.008
53. Baldwin AS. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- κ B: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev* 2012; **246**(1), 327-345. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01095.x
54. Gloire G, Piette J. Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxid Redox Signal* 2009; **11**(9), 2209-2222. doi:10.1089/ars.2009.2463
55. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2003; **278**(26), 24233-24241. doi:10.1074/jbc.M212389200
56. Li Q, Engelhardt JF. Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 2006; **281**(3), 1495-1505. doi:10.1074/jbc.M511153200
57. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; **107**(2), 135-142. doi:10.1172/jci11914
58. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett* 2015; **356**(2 Pt A), 156-164. doi:10.1016/j.canlet.2014.04.001
59. Kouidhi S, Elgaai AB, Chouaib S. Impact of Metabolism on T-Cell Differentiation and Function and Cross Talk with Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 2017; **8**, 270. doi:10.3389/fimmu.2017.00270
60. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123**(3191), 309-314. doi:10.1126/science.123.3191.309

61. Ramos-Martinez JJ. The regulation of the pentose phosphate pathway: Remember Krebs. *Arch Biochem Biophys* 2017; **614**, 50-52. doi:10.1016/j.abb.2016.12.012
62. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* 2014; **39**(8), 347-354. doi:10.1016/j.tibs.2014.06.005
63. Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol Lett* 2019; **17**(5), 4213-4221. doi:10.3892/ol.2019.10112
64. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; **461**(7267), 1071-1078. doi:10.1038/nature08467
65. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 2008; **18**(1), 54-61. doi:10.1016/j.gde.2008.02.003
66. Adams MJ, Ford GC, Koekoek R, Lentz PJ, McPherson A, Jr., Rossmann MG ve ark. Structure of lactate dehydrogenase at 2-8 Å resolution. *Nature* 1970; **227**(5263), 1098-1103. doi:10.1038/2271098a0
67. Lesk AM. NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* 1995; **5**(6), 775-783. doi:10.1016/0959-440x(95)80010-7
68. Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**(24), 3895-3906. doi:10.1007/s00018-008-8588-y
69. Jörnvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J ve ark. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 1995; **34**(18), 6003-6013. doi:10.1021/bi00018a001
70. Nordling E, Jörnvall H, Persson B. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur J Biochem* 2002; **269**(17), 4267-4276. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03114.x
71. Persson B, Jeffery J, Jörnvall H. Different segment similarities in long-chain dehydrogenases. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **177**(1), 218-223. doi:10.1016/0006-291x(91)91970-n
72. Jörnvall H, Persson M, Jeffery J. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**(7), 4226-4230. doi:10.1073/pnas.78.7.4226
73. Kallberg Y, Oppermann U, Persson B. Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *Febs j* 2010; **277**(10), 2375-2386. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07656.x
74. Persson B, Kallberg Y. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* 2013; **202**(1-3), 111-115. doi:10.1016/j.cbi.2012.11.009
75. Bhatia C, Oerum S, Bray J, Kavanagh KL, Shafqat N, Yue W ve ark. Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure-activity relationships. *Chem Biol Interact* 2015; **234**, 114-125. doi:10.1016/j.cbi.2014.12.013
76. *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://www.omim.org/>
77. *Ensembl (GRCh38.p13)*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı:

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000109854;r=11:20363685-20383782

78. *Protein Data Bank Japan (PDBj)*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://pdbj.org/search/pdb?query=htatip2>

79. *EMBL-EBI Expression Atlas*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: https://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ensg00000109854?bs=%7B%22homo%20sapiens%22%3A%5B%22ORGANISM_PART%22%5D%7D&ds=%7B%22kingdom%22%3A%5B%22animals%22%5D%7D#baseline

80. *Human Protein Atlas (HPA)*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109854-HTATIP2>

81. Shtivelman E. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1997; **14**(18), 2167-2173. doi:10.1038/sj.onc.1201059

82. Jones KA, Peterlin BM. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**, 717-743. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.003441

83. Xiao H, Tao Y, Greenblatt J, Roeder RG. A cofactor, TIP30, specifically enhances HIV-1 Tat-activated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(5), 2146-2151. doi:10.1073/pnas.95.5.2146

84. Ito M, Jiang C, Krumm K, Zhang X, Pecha J, Zhao J ve ark. TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis. *Cancer Res* 2003; **63**(24), 8763-8767.

85. NicAmhlaoibh R, Shtivelman E. Metastasis suppressor CC3 inhibits angiogenic properties of tumor cells in vitro. *Oncogene* 2001; **20**(2), 270-275. doi:10.1038/sj.onc.1204075

86. King FW, Shtivelman E. Inhibition of nuclear import by the proapoptotic protein CC3. *Mol Cell Biol* 2004; **24**(16), 7091-7101. doi:10.1128/mcb.24.16.7091-7101.2004

87. Nass SJ, Dickson RB. Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997; **44**(1), 1-22. doi:10.1023/a:1005858611585

88. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(10), 764-776. doi:10.1038/nrc904

89. Whitman S, Wang X, Shalaby R, Shtivelman E. Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; **20**(2), 583-593. doi:10.1128/mcb.20.2.583-593.2000

90. Zhao J, Chen J, Lu B, Dong L, Wang H, Bi C ve ark. TIP30 induces apoptosis under oxidative stress through stabilization of p53 messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; **68**(11), 4133-4141. doi:10.1158/0008-5472.Can-08-0432

91. Lee SH, Ju SK, Lee TY, Huh SH, Han KH. TIP30 directly binds p53 tumor suppressor protein in vitro. *Mol Cells* 2012; **34**(5), 495-500. doi:10.1007/s10059-012-0232-x

92. Li X, Zhang Y, Cao S, Chen X, Lu Y, Jin H ve ark. Reduction of TIP30 correlates with poor prognosis of gastric cancer patients and its restoration drastically inhibits tumor growth and metastasis. *Int J Cancer* 2009; **124**(3), 713-721. doi:10.1002/ijc.23967

93. Tong X, Li K, Luo Z, Lu B, Liu X, Wang T ve ark. Decreased TIP30 expression promotes tumor metastasis in lung cancer. *Am J Pathol* 2009; **174**(5), 1931-1939. doi:10.2353/ajpath.2009.080846
94. Xiao H, Palhan V, Yang Y, Roeder RG. TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes. *Embo j* 2000; **19**(5), 956-963. doi:10.1093/emboj/19.5.956
95. Jiang C, Ito M, Piening V, Bruck K, Roeder RG, Xiao H. TIP30 interacts with an estrogen receptor alpha-interacting coactivator CIA and regulates c-myc transcription. *J Biol Chem* 2004; **279**(26), 27781-27789. doi:10.1074/jbc.M401809200
96. Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1552**(2), 61-85. doi:10.1016/s0304-419x(01)00037-3
97. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY ve ark. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001; **3**(9), 802-808. doi:10.1038/ncb0901-802
98. Zhang C, Li A, Zhang X, Xiao H. A novel TIP30 protein complex regulates EGF receptor signaling and endocytic degradation. *J Biol Chem* 2011; **286**(11), 9373-9381. doi:10.1074/jbc.M110.207720
99. Zhang C, Mori M, Gao S, Li A, Hoshino I, Aupperlee MD ve ark. Tip30 deletion in MMTV-Neu mice leads to enhanced EGFR signaling and development of estrogen receptor-positive and progesterone receptor-negative mammary tumors. *Cancer Res* 2010; **70**(24), 10224-10233. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-3057
100. Fong S, King F, Shtivelman E. CC3/TIP30 affects DNA damage repair. *BMC Cell Biol* 2010; **11**, 23. doi:10.1186/1471-2121-11-23
101. Shiyanov P, Nag A, Raychaudhuri P. Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *J Biol Chem* 1999; **274**(50), 35309-35312. doi:10.1074/jbc.274.50.35309
102. Gillis LD, Leidal AM, Hill R, Lee PW. p21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. *Cell Cycle* 2009; **8**(2), 253-256. doi:10.4161/cc.8.2.7550
103. Haas S, Kaina B. c-Fos is involved in the cellular defence against the genotoxic effect of UV radiation. *Carcinogenesis* 1995; **16**(5), 985-991. doi:10.1093/carcin/16.5.985
104. Christmann M, Tomicic MT, Aasland D, Kaina B. A role for UV-light-induced c-Fos: Stimulation of nucleotide excision repair and protection against sustained JNK activation and apoptosis. *Carcinogenesis* 2007; **28**(1), 183-190. doi:10.1093/carcin/bgl119
105. *BioGRID Versiyon 4.4.201*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://thebiogrid.org/115804/table/homo-sapiens/htatip2.html>
106. *GeneMANIA*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://genemania.org/search/homo-sapiens/HTATIP2/>
107. *Ensembl (GRCh38.p13)* [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000153406;r=16:4461691-4495763
108. Zang W, Zheng X. Structure and functions of cellular redox sensor HSCARG/NMRAL1, a linkage among redox status, innate immunity, DNA damage

- response, and cancer. *Free Radic Biol Med* 2020; **160**, 768-774. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.016
109. UniProt. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9HBL8>
110. Zheng X, Dai X, Zhao Y, Chen Q, Lu F, Yao D ve ark. Restructuring of the dinucleotide-binding fold in an NADP(H) sensor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(21), 8809-8814. doi:10.1073/pnas.0700480104
111. Zhang M, Hu B, Li T, Peng Y, Guan J, Lai S ve ark. A CRM1-dependent nuclear export signal controls nucleocytoplasmic translocation of HSCARG, which regulates NF- κ B activity. *Traffic* 2012; **13**(6), 790-799. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01346.x
112. Merritt TJ, Kuczynski C, Sezgin E, Zhu CT, Kumagai S, Eanes WF. Quantifying interactions within the NADP(H) enzyme network in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2009; **182**(2), 565-574. doi:10.1534/genetics.109.100677
113. Zhao Y, Zhang J, Li H, Li Y, Ren J, Luo M ve ark. An NADPH sensor protein (HSCARG) down-regulates nitric oxide synthesis by association with argininosuccinate synthetase and is essential for epithelial cell viability. *J Biol Chem* 2008; **283**(16), 11004-11013. doi:10.1074/jbc.M708697200
114. Yang ES, Richter C, Chun JS, Huh TL, Kang SS, Park JW. Inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**(7), 927-937. doi:10.1016/s0891-5849(02)00981-4
115. Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G ve ark. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *Embo j* 2006; **25**(14), 3257-3263. doi:10.1038/sj.emboj.7601220
116. Peng Y, Xu R, Zheng X. HSCARG negatively regulates the cellular antiviral RIG-I like receptor signaling pathway by inhibiting TRAF3 ubiquitination via recruiting OTUB1. *PLoS Pathog* 2014; **10**(4), e1004041. doi:10.1371/journal.ppat.1004041
117. Gan Q, Li T, Hu B, Lian M, Zheng X. HSCARG inhibits activation of NF- κ B by interacting with IkappaB kinase-beta. *J Cell Sci* 2009; **122**(Pt 22), 4081-4088. doi:10.1242/jcs.054007
118. Li T, Guan J, Li S, Zhang X, Zheng X. HSCARG downregulates NF- κ B signaling by interacting with USP7 and inhibiting NEMO ubiquitination. *Cell Death Dis* 2014; **5**(5), e1229. doi:10.1038/cddis.2014.197
119. Xiao W, Peng Y, Liu Y, Li Z, Li S, Zheng X. HSCARG inhibits NADPH oxidase activity through regulation of the expression of p47phox. *PLoS One* 2013; **8**(3), e59301. doi:10.1371/journal.pone.0059301
120. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS ve ark. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 2004; **431**(7010), 873-878. doi:10.1038/nature02985
121. Hu B, Li S, Zhang X, Zheng X. HSCARG, a novel regulator of H2A ubiquitination by downregulating PRC1 ubiquitin E3 ligase activity, is essential for cell proliferation. *Nucleic Acids Res* 2014; **42**(9), 5582-5593. doi:10.1093/nar/gku230
122. Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, Galardy PJ, Cohn MA, Haas W ve ark. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol* 2006; **8**(4), 339-347. doi:10.1038/ncb1378

123. Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**(3), 141-152. doi:10.1038/nrm3289
124. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; **3**(6), 1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
125. Petti S, Masood M, Scully C. The magnitude of tobacco smoking-betel quid chewing-alcohol drinking interaction effect on oral cancer in South-East Asia. A meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2013; **8**(11), e78999. doi:10.1371/journal.pone.0078999
126. Quadri MFA, Tadakamadla SK, John T. Smokeless tobacco and oral cancer in the Middle East and North Africa: A systematic review and meta-analysis. *Tob Induc Dis* 2019; **17**, 56. doi:10.18332/tid/110259
127. *STRING Versiyon 11.5*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bJ6IusY8BnXp&sessionId=bCnMLjXMBgdl>
128. Su CY, Chang YC, Yang CJ, Huang MS, Hsiao M. The opposite prognostic effect of NDUFS1 and NDUFS8 in lung cancer reflects the oncojanus role of mitochondrial complex I. *Sci Rep* 2016; **6**, 31357. doi:10.1038/srep31357
129. Ellinger J, Poss M, Brüggemann M, Gromes A, Schmidt D, Ellinger N ve ark. Systematic Expression Analysis of Mitochondrial Complex I Identifies NDUFS1 as a Biomarker in Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2017; **15**(4), e551-e562. doi:10.1016/j.clgc.2016.11.010
130. Branco CS, Duong A, Machado AK, Scola G, Andreazza AC, Salvador M. Modulation of Mitochondrial and Epigenetic Targets by Polyphenols-rich Extract from *Araucaria angustifolia* in Larynx Carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2019; **19**(1), 130-139. doi:10.2174/1871520618666180816142821
131. Peng WF, Bai F, Shao K, Shen LS, Li HH, Huang S. The key genes underlying pathophysiology association between the type 2-diabetic and colorectal cancer. *J Cell Physiol* 2018; **233**(11), 8551-8557. doi:10.1002/jcp.26440
132. Xu X, Wang X, Fu B, Meng L, Lang B. Differentially expressed genes and microRNAs in bladder carcinoma cell line 5637 and T24 detected by RNA sequencing. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**(10), 12678-12687.
133. Zhang H, Shao Y, Chen W, Chen X. Identifying Mitochondrial-Related Genes NDUFA10 and NDUFV2 as Prognostic Markers for Prostate Cancer through Biclustering. *Biomed Res Int* 2021; **2021**, 5512624. doi:10.1155/2021/5512624
134. Richie JP. Re: New Insights on the Mechanisms Affecting Fertility in Men with Non-Seminoma Testicular Cancer before Cancer Therapy. *J Urol* 2019; **202**(1), 35. doi:10.1097/ju.0000000000000253
135. Wu P, Yang S, Singh S, Qin F, Kumar S, Wang L ve ark. The Landscape and Implications of Chimeric RNAs in Cervical Cancer. *EBioMedicine* 2018; **37**, 158-167. doi:10.1016/j.ebiom.2018.10.059
136. Taher N, McKenzie C, Garrett R, Baker M, Fox N, Isaacs GD. Amyloid- β alters the DNA methylation status of cell-fate genes in an Alzheimer's disease model. *J Alzheimers Dis* 2014; **38**(4), 831-844. doi:10.3233/jad-131061
137. Richetto J, Massart R, Weber-Stadlbauer U, Szyf M, Riva MA, Meyer U. Genome-wide DNA Methylation Changes in a Mouse Model of Infection-Mediated Neurodevelopmental Disorders. *Biol Psychiatry* 2017; **81**(3), 265-276. doi:10.1016/j.biopsych.2016.08.010

138. Kim D, Shivakumar M, Han S, Sinclair MS, Lee YJ, Zheng Y ve ark. Population-dependent Intron Retention and DNA Methylation in Breast Cancer. *Mol Cancer Res* 2018; **16**(3), 461-469. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-17-0227
139. Yu Y, Mo Y, Ebenezer D, Bhattacharyya S, Liu H, Sundaravel S ve ark. High resolution methylome analysis reveals widespread functional hypomethylation during adult human erythropoiesis. *J Biol Chem* 2013; **288**(13), 8805-8814. doi:10.1074/jbc.M112.423756
140. ICGC Data Portal 6.3.1. [web page on the internet] Erişim Tarihi 08.10.2021, Erişim site adı: <https://dcc.icgc.org/genes/ENSG00000153406>
141. Shuai S, Yan X, Zhang J, Kang S, Chen F, Luo R ve ark. TIP30 nuclear translocation negatively regulates EGF-dependent cyclin D1 transcription in human lung adenocarcinoma. *Cancer Lett* 2014; **354**(1), 200-209. doi:10.1016/j.canlet.2014.08.008
142. Zhu M, Yin F, Fan X, Jing W, Chen R, Liu L ve ark. Decreased TIP30 promotes Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition and tumor-initiating properties in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2015; **34**(11), 1420-1431. doi:10.1038/onc.2014.73
143. Zhu M, Yin F, Yang L, Chen S, Chen R, Zhou X ve ark. Contribution of TIP30 to chemoresistance in laryngeal carcinoma. *Cell Death Dis* 2014; **5**(10), e1468. doi:10.1038/cddis.2014.424
144. Yu X, Li Z, Wu WK. TIP30: A Novel Tumor-Suppressor Gene. *Oncol Res* 2014; **22**(5-6), 339-348. doi:10.3727/096504015x14424348426116
145. Chen CJ, Chou PA, Huang MS, Liu YP. Low TIP30 Protein Expression is Associated with a High Risk of Metastasis and Poor Prognosis for Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Med* 2019; **8**(1). doi:10.3390/jcm8010083
146. Lian M, Zheng X. HSCARG regulates NF-kappaB activation by promoting the ubiquitination of RelA or COMMD1. *J Biol Chem* 2009; **284**(27), 17998-18006. doi:10.1074/jbc.M809752200
147. Zang W, Yang C, Li T, Liao L, Zheng X. Cellular redox sensor HSCARG negatively regulates the translesion synthesis pathway and exacerbates mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; **116**(51), 25624-25633. doi:10.1073/pnas.1910250116
148. Glicksberg BS, Amadori L, Akers NK, Sukhvasi K, Franzén O, Li L ve ark. Integrative analysis of loss-of-function variants in clinical and genomic data reveals novel genes associated with cardiovascular traits. *BMC Med Genomics* 2019; **12**(Suppl 6), 108. doi:10.1186/s12920-019-0542-3
149. Zhang DH, Wong LL, Tai LK, Koay ES, Hewitt RE. Overexpression of CC3/TIP30 is associated with HER-2/neu status in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; **131**(9), 603-608. doi:10.1007/s00432-005-0674-z
150. Chen V, Shtivelman E. CC3/TIP30 regulates metabolic adaptation of tumor cells to glucose limitation. *Cell Cycle* 2010; **9**(24), 4941-4953. doi:10.4161/cc.9.24.14230
151. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 2009; **15**(21), 6479-6483. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-09-0889
152. Dang CV. Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res* 2010; **70**(3), 859-862. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-3556

153. La Rosa FA, Pierce JW, Sonenshein GE. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 1994; **14**(2), 1039-1044. doi:10.1128/mcb.14.2.1039-1044.1994



Tablo E1: Larenks kanserli hastaların *NMRAL1* gen ifade sonuçları

Hasta No	<i>NMRAL1</i> Tümör CT	<i>NMRAL1</i> Normal CT	<i>B2M</i> Tümör CT	<i>B2M</i> Normal CT	Tümör Δ CT	Normal Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
1	25,74	26,79	23,64	22,2	2,1	4,59	-2,49	5,62
2	26,73	25,66	22,03	27,19	4,7	-1,53	6,23	0,01
3	26	24,47	21,55	24,38	4,45	0,09	4,36	0,05
4	26,67	27,86	20,52	24,48	6,15	3,38	2,77	0,15
5	25,55	22,98	24,94	25,33	0,61	-2,35	2,96	0,13
6	23,39	22,93	18,54	19,59	4,85	3,34	1,51	0,35
7	23,42	26,52	20,56	26,81	2,86	-0,29	3,15	0,11
8	24,54	24,83	19,62	22,16	4,92	2,67	2,25	0,21
9	24,1	25,95	17,51	21,46	6,59	4,49	2,1	0,23
10	22,95	25,96	16,04	23,2	6,91	2,76	4,15	0,06
11	24,99	25,59	19,44	19,72	5,55	5,87	-0,32	1,25
12	26,91	26,96	21,95	23,74	4,96	3,22	1,74	0,30
13	24,16	26,32	18,71	21,59	5,45	4,73	0,72	0,61
14	26,76	27,75	22,63	21,97	4,13	5,78	-1,65	3,14
15	24,73	26,14	20,95	23	3,78	3,14	0,64	0,64
16	24,85	26,52	24,48	24,46	0,37	2,06	-1,69	3,23
17	23,26	25,14	18,19	27,59	5,07	-2,45	7,52	0,01
18	25,1	25,91	21,35	24,54	3,75	1,37	2,38	0,19
19	25,29	25,68	20,41	25,8	4,88	-0,12	5	0,03
20	24,19	24,26	18,25	22,29	5,94	1,97	3,97	0,06
21	25,83	25,94	20,63	23,61	5,2	2,33	2,87	0,14
22	25,12	24,75	19,39	22,8	5,73	1,95	3,78	0,07

23	25,42	26,58	26,06	29,19	-0,64	-2,61	1,97	0,26
24	24,6	25,63	19,31	21,67	5,29	3,96	1,33	0,40
25	23,38	25,71	16,59	19,68	6,79	6,03	0,76	0,59
26	24,69	25,62	22,71	21,34	1,98	4,28	-2,3	4,92
27	24,45	26,39	20,8	20,69	3,65	5,7	-2,05	4,14
28	24	23,87	18,75	23,56	5,25	0,31	4,94	0,03
29	23,38	23,34	18,98	17,8	4,4	5,54	-1,14	2,20
30	27,15	28,15	25,8	23,36	1,35	4,79	-3,44	10,85
31	23,43	25,22	18,02	20,88	5,41	4,34	1,07	0,48
32	23,5	24,48	15,55	21,18	7,95	3,3	4,65	0,04
33	27,92	28,24	32,68	29,61	-4,76	-1,37	-3,39	10,48
34	26,24	28,61	22,7	25,36	3,54	3,25	0,29	0,82
35	25,59	26,54	23,24	20,29	2,35	6,25	-3,9	14,93
36	24,35	25,95	17,16	26,44	7,19	-0,49	7,68	0,00
37	22,35	24,89	15,6	20,7	6,75	4,19	2,56	0,17
38	28,44	27	23,64	31,65	4,8	-4,65	9,45	0,00
39	26,95	27,69	24,74	26,07	2,21	1,62	0,59	0,66
40	26,5	25,35	32,39	27,72	-5,89	-2,37	-3,52	11,47
41	26,15	27,91	21,66	24,87	4,49	3,04	1,45	0,37
42	24,69	26,93	19,06	23,45	5,63	3,48	2,15	0,23
43	27,19	27,13	25,98	31,95	1,21	-4,82	6,03	0,02
44	27,74	26	27,74	29,19	0	-3,19	3,19	0,11
45	27,28	27,71	24,05	26,62	3,23	1,09	2,14	0,23
46	25,04	25,38	25,2	28,53	-0,16	-3,15	2,99	0,13
47	23,7	27,93	27,07	29,57	-3,37	-1,64	-1,73	3,32

48	23,72	23,82	25,42	24,53	-1,7	-0,71	-0,99	1,99
49	23,94	26,45	22,96	23,11	0,98	3,34	-2,36	5,13
50	27,34	25,8	21,4	23,74	5,94	2,06	3,88	0,07

Tablo E2: Larenks kanserli hastaların *HTATIP2* gen ifade sonuçları

Hasta No	<i>HTATIP2</i> Tümör CT	<i>HTATIP2</i> Normal CT	<i>B2M</i> Tümör CT	<i>B2M</i> Normal CT	Tümör Δ CT	Normal Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
1	27,67	28	23,64	22,2	4,03	5,47	-1,44	2,71
2	26,8	32,51	22,03	27,19	4,77	5,32	-0,55	1,46
3	25,51	30,36	21,55	24,38	3,96	5,98	-2,02	4,06
4	24,98	31,43	20,52	24,48	4,46	6,95	-2,49	5,62
5	27,58	31,24	24,94	25,33	2,64	5,91	-3,27	9,65
6	23,91	22,5	18,54	19,59	5,37	2,91	2,46	0,18
7	22,23	32,59	20,56	26,81	1,67	5,78	-4,11	17,27
8	24,28	27,74	19,62	22,16	4,66	5,58	-0,92	1,89
9	23,2	26,85	17,51	21,46	5,69	5,39	0,3	0,81
10	23,22	26,9	16,04	23,2	7,18	3,7	3,48	0,09
11	24,85	26,76	19,44	19,72	5,41	7,04	-1,63	3,10
12	27,6	28,21	21,95	23,74	5,65	4,47	1,18	0,44
13	23,92	25,9	18,71	21,59	5,21	4,31	0,9	0,54
14	26,85	26,75	22,63	21,97	4,22	4,78	-0,56	1,47
15	26	28,47	20,95	23	5,05	5,47	-0,42	1,34
16	27,86	28,75	24,48	24,46	3,38	4,29	-0,91	1,88
17	20,95	32,6	18,19	27,59	2,76	5,01	-2,25	4,76

18	27,56	29,58	21,35	24,54	6,21	5,04	1,17	0,44
19	25,5	32,26	20,41	25,8	5,09	6,46	-1,37	2,58
20	23,75	29,82	18,25	22,29	5,5	7,53	-2,03	4,08
21	26,37	29,54	20,63	23,61	5,74	5,93	-0,19	1,14
22	25,63	27,21	19,39	22,8	6,24	4,41	1,83	0,28
23	25,91	26,75	26,06	29,19	-0,15	-2,44	2,29	0,20
24	25,06	27,54	19,31	21,67	5,75	5,87	-0,12	1,09
25	23,45	24,3	16,59	19,68	6,86	4,62	2,24	0,21
26	27,67	26,78	22,71	21,34	4,96	5,44	-0,48	1,39
27	23,22	26,26	20,8	20,69	2,42	5,57	-3,15	8,88
28	23,74	31,14	18,75	23,56	4,99	7,58	-2,59	6,02
29	22,47	24,49	18,98	17,8	3,49	6,69	-3,2	9,19
30	31,99	28,24	25,8	23,36	6,19	4,88	1,31	0,40
31	21,94	25,94	18,02	20,88	3,92	5,06	-1,14	2,20
32	21,92	26,14	15,55	21,18	6,37	4,96	1,41	0,38
33	37,97	32,11	32,68	29,61	5,29	2,5	2,79	0,14
34	28,63	29,4	22,7	25,36	5,93	4,04	1,89	0,27
35	27,09	26,4	23,24	20,29	3,85	6,11	-2,26	4,79
36	22,17	31,22	17,16	26,44	5,01	4,78	0,23	0,85
37	22,06	26,65	15,6	20,7	6,46	5,95	0,51	0,70
38	28,79	37,26	23,64	31,65	5,15	5,61	-0,46	1,38
39	30,42	29,64	24,74	26,07	5,68	3,57	2,11	0,23
40	26,97	33,73	32,39	27,72	-5,42	6,01	-11,43	2759,13
41	26,1	29,73	21,66	24,87	4,44	4,86	-0,42	1,34
42	24,78	27,85	19,06	23,45	5,72	4,4	1,32	0,40

43	32,37	37,9	25,98	31,95	6,39	5,95	0,44	0,74
44	30,84	35,45	27,74	29,19	3,1	6,26	-3,16	8,94
45	29,92	29,96	24,05	26,62	5,87	3,34	2,53	0,17
46	28,76	31,53	25,2	28,53	3,56	3	0,56	0,68
47	27,86	33,57	27,07	29,57	0,79	4	-3,21	9,25
48	25,64	27,96	25,42	24,53	0,22	3,43	-3,21	9,25
49	27,9	27,87	22,96	23,11	4,94	4,76	0,18	0,88
50	26,13	27,2	21,4	23,74	4,73	3,46	1,27	0,41

Tablo E3: Larenks kanserli hastaların MYC gen ifade sonuçları

Hasta No	MYC Tumor CT	MYC Normal CT	G6PD Tumor CT	G6PD Normal CT	Tumor ΔCT	Normal ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1	25,17	25,54	25,44	26,08	-0,27	-0,54	0,27	0,83
2	23,79	31,99	26,85	33,98	-3,06	-1,99	-1,07	2,10
3	21,31	23,97	23,39	27,62	-2,08	-3,65	1,57	0,34
4	22,76	26,74	24,13	29,83	-1,37	-3,09	1,72	0,30
5	22,53	24,9	25,02	28,03	-2,49	-3,13	0,64	0,64
6	21,25	22,61	21,59	22,38	-0,34	0,23	-0,57	1,48
7	20,56	26,85	20,58	29,59	-0,02	-2,74	2,72	0,15
8	21,84	22,47	21,76	27,29	0,08	-4,82	4,9	0,03
9	19,28	36,87	21,49	30,83	-2,21	6,04	-8,25	304,44
10	20,38	20,18	18,51	25,83	1,87	-5,65	7,52	0,01
11	22,52	22,62	23,21	30,95	-0,69	-8,33	7,64	0,01
12	22,9	26,59	26,11	29,99	-3,21	-3,4	0,19	0,88

13	28,8	20,03	25,04	26,49	3,76	-6,46	10,22	0,00
14	23,64	20,29	24,9	28,37	-1,26	-8,08	6,82	0,01
15	21,72	21,99	24,9	29,5	-3,18	-7,51	4,33	0,05
16	24,33	20,87	23,98	29,27	0,35	-8,4	8,75	0,00
17	19,75	25,93	20,73	34,7	-0,98	-8,77	7,79	0,00
18	24,99	22,12	27,13	30,96	-2,14	-8,84	6,7	0,01
19	23,93	29,19	24,03	30,36	-0,1	-1,17	1,07	0,48
20	23,03	26,54	23,94	30,67	-0,91	-4,13	3,22	0,11
21	24,74	25,01	23,7	28,77	1,04	-3,76	4,8	0,04
22	21,47	22,93	23,97	31,67	-2,5	-8,74	6,24	0,01
23	23,17	24,98	24,71	32,37	-1,54	-7,39	5,85	0,02
24	23,28	21,18	22,93	28,48	0,35	-7,3	7,65	0,00
25	20,75	23,26	23,72	28,82	-2,97	-5,56	2,59	0,17
26	21,3	22,58	24,44	25,6	-3,14	-3,02	-0,12	1,09
27	20,6	23,63	22,37	32,96	-1,77	-9,33	7,56	0,01
28	21,77	25,93	24,55	30,53	-2,78	-4,6	1,82	0,28
29	18,86	22,11	21,17	22,16	-2,31	-0,05	-2,26	4,79
30	29,88	19,99	29,84	29,29	0,04	-9,3	9,34	0,00
31	20,95	20,82	22,38	27,52	-1,43	-6,7	5,27	0,03
32	19,84	20,96	22,46	26,91	-2,62	-5,95	3,33	0,10
33	27,85	Pik yok	26,09	30,04	1,76	-30,04	31,8	0,00
34	22,66	23,67	24,49	26,86	-1,83	-3,19	1,36	0,39
35	19,9	27,07	20,63	30,93	-0,73	-3,86	3,13	0,11
36	18,39	17,57	20,87	25,78	-2,48	-8,21	5,73	0,02
37	24,21	31,22	23,06	36,37	1,15	-5,15	6,3	0,01

38	22,94	21,76	24,86	27,45	-1,92	-5,69	3,77	0,07
39	22,47	25,11	22,62	27,44	-0,15	-2,33	2,18	0,22
40	21,18	21,99	22,82	28,42	-1,64	-6,43	4,79	0,04
41	24,42	29,06	26,93	31,37	-2,51	-2,31	-0,2	1,15
42	25,82	22,96	33,65	30,31	-7,83	-7,35	-0,48	1,39
43	22,58	23,64	25,47	30,82	-2,89	-7,18	4,29	0,05
44	23,33	24,06	24,32	33,8	-0,99	-9,74	8,75	0,00
45	23,34	21,55	24,74	28,53	-1,4	-6,98	5,58	0,02
46	24,56	23,59	25,88	26,87	-1,32	-3,28	1,96	0,26
47	26,18	21,59	26,38	29,61	-0,2	-8,02	7,82	0,00

Tablo E4: Larenks kanserli hastaların *CCND1* gen ifade sonuçları

Hasta No	<i>CCND1</i> Tümör CT	<i>CCND1</i> Normal CT	<i>G6PD</i> Tümör CT	<i>G6PD</i> Normal CT	Tümör Δ CT	Normal Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
1	27,68	25,84	25,44	26,08	2,24	-0,24	2,48	0,18
2	32	34,64	26,85	33,98	5,15	0,66	4,49	0,04
3	23,78	28,9	23,39	27,62	0,39	1,28	-0,89	1,85
4	23,19	24,9	21,59	22,38	1,6	2,52	-0,92	1,89
5	21,91	31,35	20,58	29,59	1,33	1,76	-0,43	1,35
6	25,04	28,79	21,76	27,29	3,28	1,5	1,78	0,29
7	21,9	30,61	21,49	30,83	0,41	-0,22	0,63	0,65
8	18,59	28,31	18,51	25,83	0,08	2,48	-2,4	5,28
9	24,83	33,45	23,21	30,95	1,62	2,5	-0,88	1,84
10	26,03	28,26	25,04	26,49	0,99	1,77	-0,78	1,72

11	25,72	28,85	24,9	28,37	0,82	0,48	0,34	0,79
12	27,35	32,33	23,98	29,27	3,37	3,06	0,31	0,81
13	25,57	32,94	27,13	30,96	-1,56	1,98	-3,54	11,63
14	24,74	32,97	23,94	30,67	0,8	2,3	-1,5	2,83
15	25,06	31,22	23,72	28,82	1,34	2,4	-1,06	2,08
16	24,64	31,53	22,37	32,96	2,27	-1,43	3,7	0,08
17	24,22	32,35	24,55	30,53	-0,33	1,82	-2,15	4,44
18	24,57	24,43	21,17	22,16	3,4	2,27	1,13	0,46
19	32,34	32,5	29,84	29,29	2,5	3,21	-0,71	1,64
20	24,29	30,73	22,38	27,52	1,91	3,21	-1,3	2,46
21	22,33	31,85	22,46	26,91	-0,13	4,94	-5,07	33,59
22	28,49	32,37	26,09	30,04	2,4	2,33	0,07	0,95
23	24,73	28,85	24,49	26,86	0,24	1,99	-1,75	3,36
24	23,45	32,89	20,63	30,93	2,82	1,96	0,86	0,55
25	21,27	29,87	20,87	25,78	0,4	4,09	-3,69	12,91
26	21,52	32,34	22,82	28,42	-1,3	3,92	-5,22	37,27

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NMRAL1 PROTEİNİNİN HTATIP2 ÜZERİNE ETKİSİ VE BAŞ-BOYUN KANSERİNDE BİYOBELİRTEÇ OLARAK İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 3	% 3	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	www.hindawi.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	katalog.marmara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	downloads.hindawi.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.science.gov İnternet Kaynağı	<% 1
9	fedorabg.bg.ac.rs İnternet Kaynağı	<% 1