

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**KANSERDE HINT1 GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Çağla EMİRAL**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Sevgi YARDIM AKAYDIN

ANKARA  
Ekim 2012

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

**KANSERDE HINT1 GEN EKSPRESYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Çağla EMİRAL**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Sevgi YARDIM AKAYDIN

ANKARA  
10.10.2012


T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Ecz.) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/10/2012



Prof.Dr.H.Bolkan ŞİMŞEK  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Sevgi AKAYDIN  
Gazi Üniversitesi



Prof.Dr.Bensu KARAHALİL  
Gazi Üniversitesi

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	iv
Tablolar	v
Semboller ve Kısaltmalar	vi
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Kanser	3
2.1.1. Hücre Döngüsü	5
2.1.2. Kanser Hücresinin Özellikleri	6
2.1.3. Tümör Oluşumunun Moleküler Mekanizması	7
2.1.3.1. Proto-onkogenler	7
2.1.3.2. Anti-onkogenler	8
2.2. HIT (Histidin Triad) Proteinleri	10
2.2.1. HINT (Histidine Triad Nucleotide Binding Protein)	12
2.2.1.1. HINT1	13
2.2.1.2. HINT2	13
2.2.1.3. HINT3	14
2.2.2. Aprataxin	14
2.2.3. DcpS (Scavenger mRNA decapping enzim)	16
2.2.4. FHIT (Kırılgan HIT Proteini)	16
2.2.5. Galaktoz-1-fosfat-üridil transferaz (GALT)	19
2.3. HINT1	20
2.3.1. HINT1 Dimerinin Yapısı	21
2.3.2. HINT1'in Kanser İle İlişkisi: Onkogen ve Anti-onkogen Etkisi	23
2.3.3. HINT1'in Moleküler Mekanizmaları	24
2.3.3.1. HINT1-AP-1 İlişkisi	25
2.3.3.2. HINT1-Cdk-7-KIN28 İlişkisi	26
2.3.3.3. HINT1- <i>mi</i> İlişkisi	27
2.3.3.4. HINT1-USF2 İlişkisi	27
2.3.3.5. HINT1 – NF-κB İlişkisi	28
2.3.3.6. HINT1-TCF-β-katenin/Pontin ve Reptin İlişkisi	28
2.4. Anti-onkogenler ve Reaktif Oksijen Türleri	29
2.4.1. Süperoksit Dismutazlar (SOD'lar)	32
2.4.1.1. SOD1	33
2.4.1.2. SOD2	34
2.4.1.3. SOD3	35
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>36</b>
3.1. Hasta Grubunun Tanımı ve Özellikleri	36
3.2. Materyal	37
3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	37
3.2.3. Kullanılan Biyolojik Materyal	38

3.3. Deneysel Prosedür	38
3.3.1. Doku Örneklerinde Kantitatif Real-Time RT-PCR (qRT-PCR/Gerçek Zamanlı RT-PCR) ile HINT1 Gen Ekspresyonlarının Analizi	38
3.3.1.1. Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu	39
3.3.1.2. RNA Örneklerinden RT-PCR ile cDNA Sentezi	40
3.3.1.3. Kantitatif Real-Time PCR Analizi	41
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler	43
<b>4. BULGULAR</b>	<b>44</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>58</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>65</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>66</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>68</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>70</b>
<b>10. EKLER</b>	<b>83</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>85</b>

## ŞEKİLLER

Şekil 1.	Türkiye’de görülen kanser oranının yıllara göre artışı.	4
Şekil 2.	Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser türü ve yüzdeleri.	4
Şekil 3.	Hücre döngüsü ve hücre döngüsünün bölümleri.	5
Şekil 4.	Nükleotid bağlı HIT proteinlerinin üç boyutlu yapıları.	11
Şekil 5.	İnsanlarda bulunan HIT süperailisinin alt üyeleri.	12
Şekil 6.	Kırılgan HIT proteini FHIT tarafından apoptoz oluşmasının altında yatan mekanizma.	18
Şekil 7.	HIT süperailisinin üç şubesinin prototip üyeleri için substratlar ve ileri reaksiyon şemaları.	20
Şekil 8.	HINT1, HINT2, HINT3 ve FHIT proteinlerinin aminoasit sıralarının dizilimi.	21
Şekil 9.	echINT homoloji modeli.	22
	(A) insan HINT1 ve echINT arasındaki sekans uyumu yüksek homoloji gösterirken korunmuş bölgeler kalın harfle gösterilmiştir.	22
	(B) dimerik hHINT1 kristal yapısı (mavi, PDB kod: 1AV5) (17) ve echINT (sarı) homoloji modeli üst üste.	22
	(C) bir monomer hHINT1 ve echINT modeli üst üste.	22
	(D) hHINT1 ve echINT arasında değiştirilmiş C-terminal bölgeleri.	22
Şekil 10.	HINT1’in adenikasyon mekanizması.	25
Şekil 11.	Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar.	32
Şekil 12	İnsan SOD1 enziminin kristalografik yapısı.	33

## TABLolar

Tablo 1.	Hasta grubunun demografik özellikleri.	36
Tablo 2.	Hasta gruplarının rutin biyokimya değerleri.	37
Tablo 3.	cDNA sentezi için gerekli reaksiyon karışımında 1 RNA örneği için kullanılan çözelti miktarı.	41
Tablo 4.	Her mikropłaka kuyucuđu için gereken PCR reaksiyon karışım oranları.	42
Tablo 5.	Hasta grubunda HINT1 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları	45
Tablo 6.	Kanserli dokularda HINT1 gen ekspresyonunun tümörlü ve normal dokulardaki oranlarının karşılaştırılması.	46
Tablo 7.	Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri.	46
Tablo 8.	Yaş durumlarına ve kanser tiplerine göre hasta gruplarının normal doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan ve tümörlü doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan numunelerinin ortalama değerleri.	47
Tablo 9.	Yaş gruplarına göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri.	48
Tablo 10.	Evrelerine ve kanser tiplerine göre hasta gruplarının normal doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan ve tümörlü doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan numunelerinin ortalama değerleri.	49
Tablo 11.	Hastalığın evresine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri.	50
Tablo 12.	Cinsiyetlere ve kanser tiplerine göre hasta gruplarının normal doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan ve tümörlü doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan numunelerinin ortalama değerleri.	52
Tablo 13.	Cinsiyete göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri	53
Tablo 14.	Hasta grubunda SOD1 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları.	54
Tablo 15.	Kanserli dokularda SOD1 gen ekspresyonunun tümörlü ve normal dokulardaki oranlarının karşılaştırılması.	55
Tablo 16.	Hasta grubunda HINT1 ve SOD1 genlerinin normal ve tümör doku ekspresyonlarının karşılaştırılması.	49
Tablo 17.	Hasta gruplarına göre normal doku ve tümör dokularındaki HINT1 ve SOD1 arasındaki korelasyonlar.	50

## SİMGELER VE KISALTMALAR

" $\phi$ "	Hidrofobik aminoasit
HIT	Histidin Triad Süperfamilyası
HINT	Histidine Triad Nucleotide Binding Protein
FHIT	Fragile Histidin Triad Protein
DcpS	Scavenger mRNA decapping enzim
GalT	Galaktoz-1-fosfat üridililtransferaz
PKCI-1	Protein Kinaz C İnhibitör-1
CDK	Siklin bağımlı kinaz
p53	Tümör protein 53
$\alpha$	Alfa
ApnA	Diadenozin polifosfat
$\beta$	Beta
cDNA	Tamamlayıcı DNA
ROS	Reaktif oksijen türleri
His	Histidin
ecHINT	Escherichia coli HINT
Å	Armstrong
AMP-SO <sub>4</sub>	Adenozin mono fosfat-sülfat
USF 2	Upstream stimulatory factor 2
MITF	Mikroftalmi transkripsiyon faktörü
LysRS	Lisil-tRNA sentetaz
HINT <sup>+/+</sup>	+/+ genotipine sahip HINT geni
HINT <sup>+/-</sup>	+/- genotipine sahip HINT geni
HINT <sup>-/-</sup>	-/-genotipine sahip HINT geni
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
<i>mi</i>	Mikroftalmi
Fc $\epsilon$ RI	Yüksek afiniteli IgE reseptörü
TCF	T hücre transkripsiyon faktörü
$\beta$ -catenin	CTNNB1 geni tarafından kodlanan protein
Wnt	Wnt gen grubunun kodladığı protein. Hücre çekirdeğinin içinde DNA'nın ekspresyonu için yüzey reseptörlerinden gelen sinyalleri geçiren bir protein ağıdır
SW480	İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı
U/L	Mikron/litre

rpm	Dakikadaki devir sayısı
$\mu$ L	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
mM	miliMolar
HCl	Hidroklorik asit
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
HEPES	4 - (2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
KOH	Potasyum hidroksit
dATP	Deoksi Adenozin trifosfat
dCTP	Deoksi Sitidin trifosfat
dGTP	Deoksi Guanin trifosfat
dTTP	Deoksi Timidin trifosfat
DTT	Ditiyotretol
RT-PCR	Real Time- Polimer zincir reaksiyonu
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat

## 1. GİRİŞ

Genetik bir hastalık olan kanser, hücrelerdeki genetik değişiklikler sonucu oluşur ve yeni nesillere kalıtsal olarak aktarılabilir. Kanser doğrudan ve aniden ortaya çıkan bir durum değildir. Normal bir hücrenin önce kanseröz duruma geçmesi, daha sonra metastatik yayılım yapacak şekilde dönüşüm geçirmesi gerekir.

Bir tümör hücresinin en önemli özelliklerinden biri gen ifadesindeki değişikliktir. Bu değişiklik normal olan komşu hücrelerden daha fazla çoğalmaya sebep olmaktadır. Hücre çoğalmasını kontrol eden gen grupları ise proto-onkogenler ve anti-onkogenlerdir. Gen ifadesinin bozulması ile kontrolsüz çoğalan hücreler tümör dokunun oluşumuna neden olmaktadır.

HIT bölgesine sahip proteinler, Histidin aminoasitlerinin, hidrofobik("φ") aminoasitlerle birbirine bağlanmasıyla meydana gelen, His-φ-His-φ-His-φ-φ motifini paylaşan bir enzim üst ailesini oluştururlar. Hayatın tüm formlarında bulunan HIT proteinleri ve hayvanlarda ve mantarlarda bulunan FHIT (kırılgan histidin triad) proteinleri HIT süper ailesinin iki ana dalını temsil eder. Bu iki ana dalın haricinde; Aprataksin, DcpS (Scavenger mRNA decapping enzim) ve GALT (Galaktoz-1-fosfat üridililtransferaz) da bu süperailede yer almaktadır.

İnsan genomu HINT1, HINT2 ve HINT3 gen ürünlerini kodlayan 3 ayrı gene sahiptir. HINT1 (Histidin üçlü nükleotid bağlayan protein 1), 126 aminoasitli, sitozolik bir proteindir. İlk defa 1990 yılında bir protein kinaz C inhibitörü olarak belirtilmiş ve ilk literatürlerde Protein Kinase C Inhibitor-1 (PKCI-1) olarak isimlendirilmişse de HINT1'in PKC

inhibitörü rolü artık şüpheyle karşılanmaktadır ve bu yüzden PKC1-1 yerine HINT1 olarak isimlendirilmektedir.

HINT1'in özel tümör supresör gen ifadesi, kanser hücrelerinin içerisine, bu genlerin ilgili promotör alanlarındaki belirli sitidin kalıntısı metilasyonu aracılığıyla ve kromatin yapısını değiştiren modifikasyonlar aracılığıyla yerleşmektedir. Daha önceden yapılmış olan bazı çalışmalarda HINT1 geni silinmiş farelerin analizi, HINT1'in bir tümör supresör olarak davrandığını ortaya koymuştur. Bunun gibi yapılan birçok çalışmada da HINT1 geni ile kanser hücreleri arasında ilişki saptanmıştır.

Antioksidan ve diğer hücre redoks durumunu modüle edici enzim sistemleri, tüm intrasellüler ve hatta ekstrasellüler kompartımanlardaki ROT'a karşı birinci derece savunma olarak etki ederler. Bu enzimlerin en önemlileri, süperoksit dismutazlar, glutatyon peroksidaz, katalaz ve peroksiredoksinlerdir. SOD'lar ilk tanımlanan antioksidan enzimlerdir. SOD'lar arasında Cu, Zn süperoksit dismutaz (SOD1) yaygın olarak dağılmaktadır ve toplam SOD'un % 90'ını kapsamaktadır. Bu her yerde bulunan ve aktivite için Cu ve Zn gerektiren enzim, büyük fizyolojik önemi ve terapötik bir potansiyele sahiptir.

Bu çalışmada HINT1 gen ekspresyonunun kanserle ilişkisi, HINT1'in SOD1 ile korelasyonu ve HINT1'in bir antioksidan olup olmadığı araştırılmıştır. Türkiye'de yaygın olan kanser türlerinden kolorektal, mide ve meme kanserli tümör dokularında HINT1 gen ekspresyon analizi incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

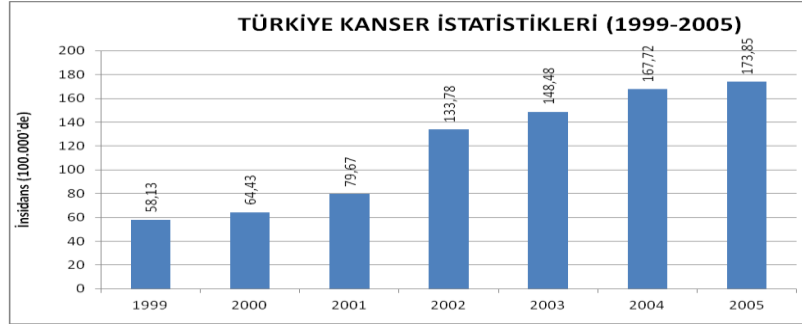
Genetik bir hastalık olan kanser, hücrelerdeki genetik değişiklikler sonucu oluşur ve yeni nesillere kalıtsal olarak aktarılabilir<sup>1</sup>.

Kanser, dünyada kalp hastalıklarından sonra ikinci derecede büyük sağlık problemlerinden birisidir ve her yıl ölümlerin yaklaşık %25'inin sebebini oluşturmaktadır<sup>2</sup>. Kansere ilgili ilk çalışmalara 1911 yılında Rockefeller Medikal Araştırma Enstitüsü olarak bilinen New York City Rockefeller Üniversitesinde başlanmıştır<sup>3</sup>.

Kanser klinikte görülen en yaygın ve ciddi hastalıklardan biridir. Yapılan istatistiksel çalışmalar kanserin toplumların yaklaşık üçte birinden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin yüzde yirmiden fazlasından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık yüzde onundan fazlasını kanser tedavileri harcamalarının oluşturduğunu göstermiştir. Kanser tedavi edilmediğinde ölümlerle sonuçlanmaktadır. Kanser araştırmalarında erken tanı ve tedavi son derece önemli olup, kansere yakalanma riski yüksek olan bireylerin kanser gelişiminden önce saptanabilmesi büyük önem taşımaktadır<sup>4</sup>.

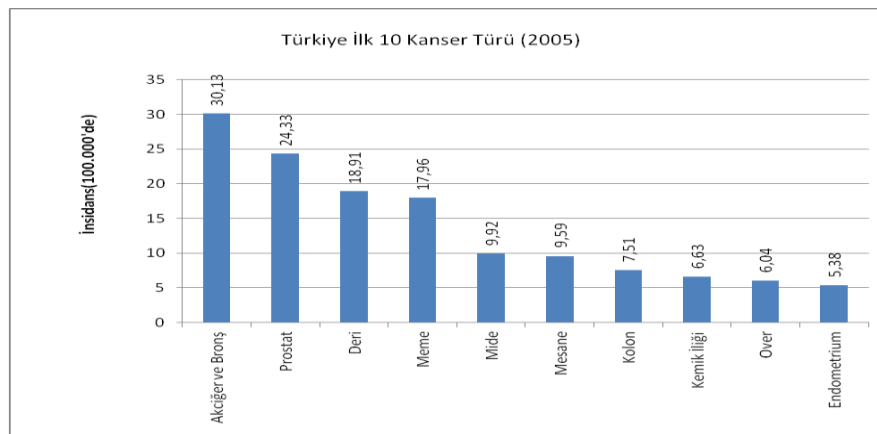
İnsanda oluşan kanserlerin elliden fazla farklı tipleri bulunmaktadır; bunların yaklaşık %54'ünü akciğer-bronş, kolon-rektum, meme, prostat ve uterus kanseri vakaları oluşturur. Mesane, kolon-rektum, akciğer-bronş ve prostat kanserlerinin erkeklerde daha sıklıkla görüldüğü, kadınlarda ise; meme, akciğer-bronş, kolon-rektum ve rahim kanserlerinin yüksek sıklıkla görüldüğü rapor edilmiştir<sup>5</sup>.

Son yıllarda, kanser vakalarındaki artış, geçmiş yıllara göre oldukça dikkat çekicidir (Şekil 1)<sup>6</sup>.



Şekil1. Türkiye’de görülen kanser oranının yıllara göre artışı<sup>6</sup>.

Türkiye’de en sık görülen kanser türü akciğer ve bronş kanseri olmakla birlikte bunu prostat ve deri kanseri izlemektedir (Şekil 2). Cinsiyet ayrımı gözetmeksizin ele alındığında bu verilere ulaşılırken, cinsiyetler farklı olduğunda farklı kanser türlerinde yoğunluk olduğu gözlenmektedir<sup>6</sup>.

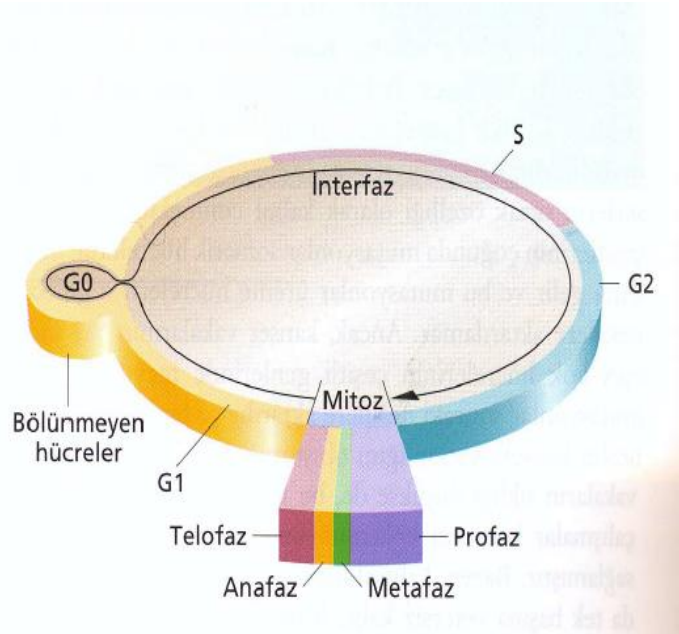


Şekil 2. Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser türü ve yüzdeleri<sup>6</sup>.

Erkeklerde akciğer kanseri birinci sırada yer alırken, bunu sırasıyla prostat ve deri kanseri izlemektedir. Kadınlarda en sık meme kanseri gözlenirken bunu sırasıyla deri ve tiroid kanseri izlemektedir<sup>6</sup>.

### 2.1.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsünün süreci, mitoz (M fazı) sırasında iki nükleusa kromozom dağılımı için gerekli olan DNA replikasyon (S fazı) işleviyle devam etmektedir. Bu işlevin arasına boşluk olarak anılan G1 ve G2 adı verilen iki basamak katılmıştır. G1,S ve G2 hep birlikte hücre döngüsünün interfaz bölümünü oluşturmaktadır. G1 basamağı mitozdan hemen sonra başlar; ribozomlar, enzimler, membran türevi organeller gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılır. S fazında, DNA replikasyonu her kromozomun kopyasını yaparak kromozom sayısını ikiye katlanmasını sağlar. G2 fazı, büyümenin ve sentezin ikinci dönemi olarak mitozun başlamasına öncülük eder<sup>4</sup>.



**Şekil 3. Hücre döngüsü ve hücre döngüsünün bölümleri<sup>4</sup>.**

Hücre çoğalması ve bunun kontrolü ile ilgili çalışmalarda G1 evresinin önemi büyüktür. G1'in geç bir noktasında bütün hücreler iki yoldan birini izler. Hücreler ya döngüden çıkarak G0 evresindeki bir dinlenme evresine girer ya da DNA sentezini başlatarak döngüyü tamamlar. G0'a giren hücreler canlı ve metabolik olarak aktif kalırlar fakat çoğalmazlar. Kanseri hücreleri belirgin bir şekilde G0'a girmekten kaçınırlar ve burayı çok hızlı bir şekilde geçerler<sup>4</sup>.

Hücre döngüsünde üç kontrol noktası bulunmaktadır. Bunlar G1/S, G2/M ve M kontrol noktalarıdır<sup>4</sup>.

### 2.1.2. Kanseri Hücresinin Özellikleri

Kanseri hücreleri üç nitelik ile karakterize edilir. Bunlar; büyümenin denetiminde azalma veya ortadan kalkma, yerel dokuları işgal, vücudun diğer bölümlerine yayılma veya metastazdır<sup>7</sup>.

Kanseri, hücrelerin sürekli olarak çoğalmasıyla karakterize olan bir düzen bozukluğudur. Sürekli çoğalan hücrelere karşılık hücre kaybı aynı oranda olmadığı için hücreler birikmeye başlarlar. Bu biriken hücreler invazyon yaparlar ve organizmanın organlarını hasara uğratırlar. Kanseri hücreleri normal hücrelerden daha kısa ömürlü olmalarına karşın, yeni hücre oluşumunun hızlı olması nedeniyle hücreler devamlı birikirler. Bu dengesizlik, hem kanseri hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığındandır. Bu biriken kütlelere kanseri veya tümör adı verilmektedir<sup>8</sup>.

Tümörlerden oluşturulmuş hücre kültürlerinde normal dokulardan oluşturulmuş hücre kültürlerinden farklı özellikler gözlenir. Bu

hücre kültürü için transforme olmuş tanımı kullanılır. Transforme bir hücre daha az kısıtlı şartlarda büyür, genellikle sert bir zemine tutunma ihtiyacı duymaz, bu nedenle yuvarlak şekilli görülür. Serum ihtiyaçları azalmıştır ve zeminde tek tabaka oluşturmak yerine fokus adı verilen kitlesel bir yapı gösterirler. Uygun deney hayvanlarına enjekte edildiklerinde tümörleri indüklerler. Böylece hücrelere transformasyon ve ölümsüzlük özelliği sağlayan zincirleme değişiklikler tümörlerin oluşturulmasına olanak tanır<sup>9</sup>.

### 2.1.3. Tümör Oluşumunun Moleküler Mekanizması

Bir tümör hücrelerinin en önemli özelliği gen ekspresyonundaki değişikliktir. Bu değişiklik normal hücrelerden daha fazla üreme avantajı sağlamaktadır. Bu durum hücreye kontrolsüz üreme özelliği kazandırmaktadır. Bu sebeple kanser; normal hücre özelliklerini değiştiren genlerin ekspresyonundaki değişikliklere neden olan mutasyonlar sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Normal üreme kontrolünü düzenlediği ortaya konulan farklı 2 tipte gen grubu bulunur. Bunlar; proto-onkogenler ve anti-onkogenler (tümör supresör genler)'dir. Bu genlerin ekspresyonunun bozulması üreme kontrolünün kaybına sebep olabilmektedir<sup>10</sup>.

2.1.3.1. Proto-onkogenler: Hücre üremesini kontrol eden genlerdir. Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar sonucu bu genler onkogenlere dönüşmektedir. Onkogenlerin normal hücre fonksiyonu ise, hücre proliferasyonunu hızlandırmaktır. Hiperaktivite durumlarında kansere sebep olurlar<sup>11</sup>.

Günümüzde proto-onkogenlerin; üreme faktörlerini, hücre yüzey reseptörleri ve onların ligandlarını, hücre yüzey reseptörlerinden nükleusa üremeyi stimüle eden sinyalleri taşıyan sinyal moleküllerini

(intraseküller sinyal yolağı bileşenleri), gen ekspresyon oranını kontrol eden nükleer transkripsiyon faktörlerini, hücre siklusunun ilerlemesi, DNA bağlayan proteinler, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptotik hücre oluşumunun moleküler kontrolüne katılan molekülleri ve hücre siklusu yolağındaki bileşenler gibi normal hücre üremesinin regülasyonu için gerekli proteinleri kodladıkları bilinmektedir<sup>10,12</sup>.

Proto-onkogenlere örnek olarak, hücre siklusu regülatörleri, Int-2 (fibroblast büyüme faktörü reseptörü), sis (trombositlerden salınan büyüme faktörü reseptörü), fms (koloni uyarıcı faktör reseptörü tip 1), erb-B (epidermal büyüme faktörü reseptörü) ve ras proto-onkogenleri verilebilir<sup>13</sup>.

2.1.3.2. Anti-onkogenler (tümör supresör genler): Hücre proliferasyonunu inhibe eden veya geciktiren genlerdir. Bu genler, inaktive olduklarında kansere sebep olmaktadır<sup>11</sup>.

Tümör supresör genler, normal olarak hücre bölünmesini baskılayan bir grup gendir. Her iki allelde işlev kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör büyümesine neden olur. Normal allelin varlığı tümör gelişimini baskılar. Bir etki oluşması için işlev kaybı her iki alleli de etkilemelidir (yani tümör süpressör genlerin mutasyonları, hücresel düzeyde resesiftir). Bunun için iki hatta bazen daha fazla mutasyonel olay gerekir<sup>10,11,14,15,16</sup>.

Genetik düzensizlik, premalignant hücreyi atmadan malignan hücreyi üretir. Bu düzensizlik mikro seviyede (DNA sekansında) olduğu kadar, makro seviyede (kromozom) olabilir. Kromozomlarda oluşan tekrar düzenleme, aktif olmayan (sessiz) onkogenleri aktifleyebilir veya

tümör supresör genleri içeren bölgeleri silebilir. DNA' daki mutasyon, onkojenleri aktive edebilir veya tümör supresör genleri inaktive edebilir<sup>3</sup>.

Proliferasyonu doğrudan baskılayan tümör supresör genlere “bekçi” (gatekeeper) tipi genler denmektedir. Bekçiler hücre siklusunu denetlerler, hücreyi apoptozise yönlendiren genler de bu gruptadır. Örneğin p53 her iki özelliğe de sahip önemli bir tümör supresör genidir. Tümör supresör genlerde ortaya çıkan işlev kaybettirici mutasyonlar da hücreye çoğalma yönünde bir üstünlük sağlar. Hücre çoğalmasını doğrudan baskılayan bekçi tipi tümör supresör genlerden başka, dolaylı etki gösterenler de vardır. Bunlara da “bakıcı” (caretaker) tipi tümör supresör genler denir. Bakıcılar genomun bütünlüğünden sorumlu DNA onarım genleridir ve mutasyon oluşumunu engellerler. Bu genler işlev kaybettirici bir mutasyona uğradığında, genom boyunca mutasyonlar ortaya çıkmaya başlar, yani genomik instabilite (kararsızlık) gelişir. Genomik instabilite bekçi tipi tümör supresör genlerin ve protoonkogenlerin mutasyona uğramasıyla sonuçlanabilir. Bazı germline (yumurta veya spermde oluşan mutasyon) tümör supresör gen mutasyonları kalıtsal kanserlerle ilişkilidir. Bunlar sporadik kanserlerde de mutasyona uğrayabilirler<sup>17</sup>.

Anti-onkogenler, onkogenlerin önemli bir ailesi olan siklinleri ve siklin-bağımlı kinazları (CDK) içerir. CDK'lar hücre siklusunda önemli kontrol noktalarında görev alırlar ve hücre proliferasyon oranını belirlerler. Tümör supresörlere örnek olarak Retinoblastoma geni (Rb), Antijen Sunucu Hücre geni (ASH, kolon kanseri), Wilm's tümör proteini geni (WT1, böbrekte), Meme kanseri duyarlılık geni tip 1 ve 2 (BRCA1 ve BRCA2, meme kanseri), CDK4 inhibitör, INK4 ailesinden tümör protein 16 (p16) geni (INK4A tarafından kodlanır), tümör protein 53 (p53, birçok dokuda bulunabilmektedir) ve HINT1 örnek olarak verilebilir<sup>12</sup>.

## 2.2. HIT (Histidin Triad) Proteinleri

Histidin triad (HIT) proteinleri, ismini C-terminalinin yanında var olan His- $\phi$ -His- $\phi$ -His- $\phi$ - $\phi$  motifinden alan bir protein ya da enzim üst ailesidir. Burada " $\phi$ " sembolü, hidrofobik olan herhangi bir aminoasiti sembolize etmektedir<sup>18</sup>. Enzimatik aktivitelerine göre düşünülduğünde HIT proteinleri nükleotid fosforamidat hidrolazlar, dinükleotid hidrolazlar ve nükleotidilil transferazlar olarak sınıflandırılabilir. HIT proteinleri, nükleotidleri His- $\phi$ -His- $\phi$ -His- $\phi$ - $\phi$  motifinin aktif kısımları substratın  $\alpha$ -fosfatı ile karşı karşıya gelecek şekilde bağlarlar<sup>19</sup>. HIT proteinlerinin evrimsel süreçte korunmuş olması, temel ve belki de yaşamsal fonksiyonlar gerçekleştirdiklerini gösterir<sup>18</sup>.

Histidin triad (HIT) proteinleri yakın zamana kadar sadece histidin dizi motiflerini paylaşan proteinlerin bir süper ailesiydi. Histidin triad nükleotid bağlayan protein (HINT)'in nükleotid bağlayan formlarının kristal yapıları, HIT proteinlerinin korunmuş bölgelerinin özel, dimerik, 10-dizili iki eşit pürin nükleotid bağlanma bölgesi oluşturan kayık yapılarından meydana geldiğini göstermiştir. Hayatın tüm formlarında bulunan HINT ile ilişkili proteinler ve hayvanlarda ve mantarlarda bulunan kırılğan histidin triad (FHIT) ile ilişkili proteinler HIT süper ailesinin iki ana dalını temsil eder (Şekil 4)<sup>20</sup>.

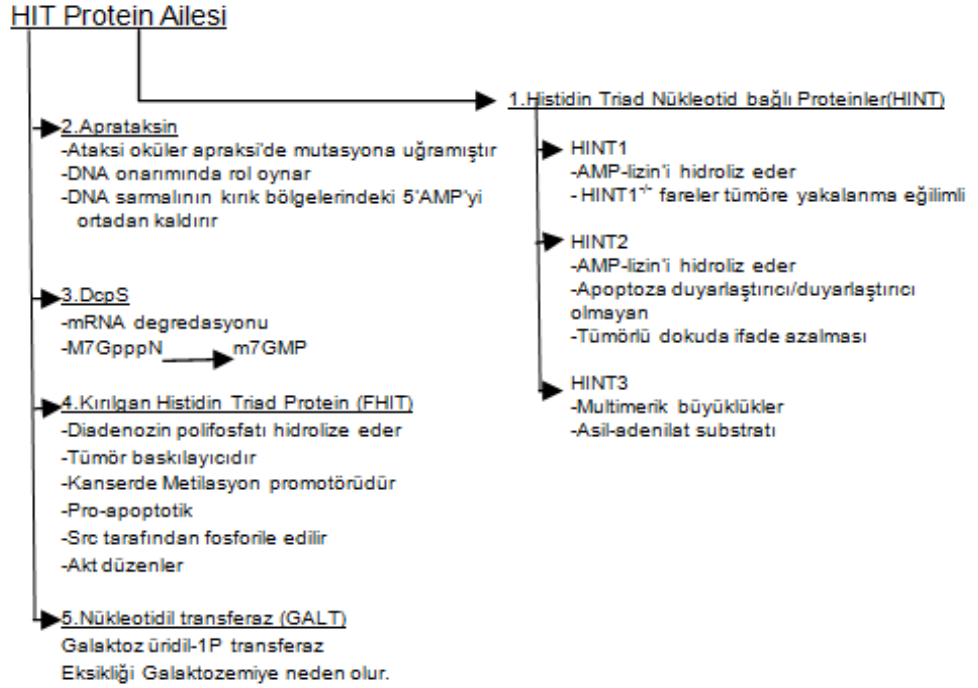


**Şekil 4. Nükleotid bağı HIT proteinlerinin üç boyutlu yapıları. Üstteki dimer HINT-GMP'dir. Alttaki dimer hidroliz edilemez bir ApppA analogu ile bağı FHIT'tir (Kayık yapılı protein katları, ilk olarak GALT'te gözlenmiştir, içlerinde iki alfa-helezonu barındıran 10 sarmallı  $\beta$ -düzlemleri tarafından oluşturulmuşlardır). Kayık yapılar, halihazırda her bir protein dimerinin yandan görünüşlerinde değerlendirilebilir (Üstteki HINT, alttaki FHIT)<sup>20</sup>.**

HIT üst ailesinde yer alan proteinlerin 35 den fazlası, bakteriler, arkeler, mayalar, bitkiler, yuvarlak solucanlar, Drosophila ve memelileri de içeren 29 türde görülmüştür. İnsan genomunda 7 HIT proteini (HINT1, HINT2, HINT3, Aprataksin, DcpS, FHIT, GALT) kodlanmıştır.

Bunlar 5 dalda sınıflandırılabilir: HINT (Histidine triad nucleotide binding protein), Aprataksin, DcpS (Scavenger mRNA

decapping enzim), FHIT (Fragile Histidine Triad Binding Protein) ve GALT (Galaktoz-1-fosfat-üridililtransferaz). Şekil 4'de bu proteinlerin fonksiyonları özetlenmiştir (Şekil 5)<sup>21</sup>.



**Şekil 5. İnsanlarda bulunan HIT süperailisinin alt üyeleri<sup>21</sup>.**

### 2.2.1. HINT (Histidine Triad Nucleotide Bağlı Protein)

Histidine triad nükleotid bağlı protein (HINT), ilk olarak tavşan kalbinden izole edilen dimerik pürin bir nükleotid bağlı proteindir ve HIT (histidine triad) ailesinin bir üyesidir. HINT nükleotid komplekslerinin kristal yapıları, HIT üst ailesindeki korunmuş kalıntıların nükleotid bağlamaya aracılık ettiğini ve HIT motifinin fosfat bağlama döngüsünün bir parçası olduğunu göstermektedir<sup>22</sup>.

HINT proteinleri, HIT üst ailesinin birinci şubesini oluşturur. Tam sıralanmış tüm genomlarda en az bir HINT mevcuttur. İnsan genomu HINT1, HINT2 ve HINT3 gen ürünlerini kodlayan 3 ayrı gene sahiptir<sup>23</sup>.

#### 2.2.1.1. HINT 1

Çalışmamızın konusu olması nedeniyle HINT1 geni ileride daha geniş biçimde anlatılacaktır.

#### 2.2.1.2. HINT 2

HINT1 ile %61 oranında benzerlik taşıyan bir protein olan HINT2, bir karaciğer taraması sonucunda tanımlanmıştır<sup>24</sup>.

Her ne kadar bir  $\alpha$ -sarmalı içinde de olsa diziliminde potansiyel bir HINT fosforilasyon bölgesi (122TAK-Karışık kökenli kinaz) olması, HINT2'nin bir PKC substratı olup olmadığının test edilmesine sebep olmuştur. PKC aktivitesine yönelik bir çalışmada, afinitesi olmayan HINT2'nin histon veya miyelin temel proteinine ait PKC'nin fosforilasyonunu inhibe etmediği görüldü. Bu sonuçla HINT2'nin bir PKC inhibitörü olduğu varsayımı elenmiş oldu<sup>24</sup>.

Korunmuş N-terminal uzantı ve toplam sıralama temel alındığında, HINT2 homologları, yalnızca memelilerde bulunur ve balıklar ve kuşlar gibi diğer omurgalılarda bulunmaz<sup>23</sup>.

HINT2'nin dokulardaki ekspresyonu real-time kantitatif PCR yöntemi ile ve immunoblot analiz ile belirlenmiştir. HINT2 mRNA'sı ve proteini karaciğer ve pankreasta baskın olarak bulunurken, analiz edilen diğer insan dokularında da bu oranda olmamakla beraber görülmüştür.

İmmunositokimya, izole mitokondrilerin immunoblot analizi ve HINT2-GFP(yeşil floresan proteini) transfeksiyon çalışmaları ile belirlenen HINT2'nin bir mitokondriyal protein olduğunu ve memeli HINT2'sinin mitokondride lokalize olan ilk HINT proteinlerinden biri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, HINT2'nin apoptoza karşı duyarlı olduğunu ve insan hepatoselüler karsinomada ekspresyonunun aşağı yönlü regüle olduğunu göstermektedir<sup>24</sup>.

HINT2'nin adenozin fosforamidaz aktivite gösterdiği ve HINT1'den farklı olarak ATP sentezi ve adenozin metabolizması için gerekli olan mitokondride yerleşik olduğu bulgusu bu HINT proteinlerinin fizyolojik rolü konusundaki çalışmaları genişletmektedir<sup>23</sup>.

### 2.2.1.3. HINT3

Üçüncü bir insan HINT geni de 6q22.33'de bulunan HINT3 genidir. HINT3'ün N ve C terminallerinde sırasıyla 31 ve 25 aminoasitlik uzantılara sahip olduğu 182 aminoasitlik bir proteini kodladığı ve hem sitozolik hem de çekirdek bölümlerinde yer aldığı varsayılmaktadır. HINT3 multimerik oligomerlere dahil edilebilir ve substrat olarak daha çok nükleozit fosforamidatlar üzerindeki açıl-adenilatları tercih eder<sup>25</sup>. Günümüzde, HINT3'ün tümör oluşumu ve ilerlemesindeki rolü üzerinde çalışma bulunmamaktadır<sup>23</sup>.

### 2.2.2. Aprataksin (APTX)

Aprataksin, bir çinko parmak motifi içeren ve Ataksi Okülomotor Apraksi Sendromu'nda mutasyona uğrayan HINT ailesi üyesidir<sup>19</sup>. Ataksi okülomotor apraksi sendromu (AOA) erken başlangıçlı,

ilerleyici bir nörolojik hastalıktır<sup>26</sup>. APTX, çift örgülü formlarda görülen ve nükleolusta bulunan Aprataksini kodlar<sup>21</sup>.

2001 yılında yapılan bağlantı analizi APTX geninin 9. kromozom'da yer aldığını, semptomları çift sarmal DNA kırıkları ve genom instabilitesi ile karakterize olan ataxia telangiectasi'ye benzeyen nörolojik bir bozukluk olan ataksi-okular apraksi hastalarında mutasyona uğradığını göstermiştir<sup>27,28</sup>. Bir HIT motifine ek olarak Aprataksin'in, DNA'ya bağlanabilen bir C-uçlu çinko parmak alanı içerdiği varsayılmaktadır<sup>21,29</sup>. Üçüncü bir domen, çatal başı domeni, APTX' in ana örgü formunda bulunur ve bu domen ligaz kofaktörleri, XRCC (x-ray cross-complementing) proteinleri ile etkileşimleri düzenler. Daha önce HINT branşı hidrolazlarının bir üyesi olarak sınıflandırılmış olmakla birlikte<sup>19</sup>, daha yeni bir filogenetik analizde APTX' in HIT üst ailesinin ayrı bir branşında yer aldığı gösterilmiştir<sup>21</sup>.

İnsan APTX'i iki parça formda ekspresedir<sup>28</sup>. Küçük parça, C-terminalinde belirgin bir çinko parmak motifi ve 168 amino asitlik bir polipeptid içerdiği tahmin edilen Hint domeninden kodlanır. Bu bölüm adenozin 5'-monofosforamidaz aktiviteyi taşıdığı ve dimerize ettiği düşünülen domendir<sup>22,30,31</sup>.

APTX'in büyük parça formu N terminalinde küçük parça formuna oranla genişletilmiş 174 aminoasittir. APTX'in N-terminalinin 6'dan 102'ye kadar olan kökleri, 5'-DNA kinaz, 3'-fosfataz aktiviteli ve C-terminalinden bu domene yerleşik bir enzim olan insan polinükleotid kinazının (PNK) N-terminali ile %41 oranında benzerdir<sup>32,33</sup>. PNK ve APTX' in bir N-terminal domenini paylaştığı gözlemi, APTX'in tek zincir kırılmasındaki tamirde rol aldığı fikrini vermektedir<sup>28</sup>.

### 2.2.3. DcpS (Scavenger mRNA decapping enzim)

DcpS sitoplazma ve nukleusta bulunan bir HIT proteindir. 3'→5' mRNA eksonükleaz yıkım yolu küçük, 5'-şapkalı (mRNA'nın 5'-ucuna 7-metilguanozin 5'→5' trifosfat bağı ile eklenir) mRNA'lar (m7GpppN) üretir. Bunlar daha sonra scavenger mRNA decapping enzim (DcpS) tarafından başka metabolizmalara substrat olur<sup>34,35</sup>. m7GpppG'nin DcpS tarafından hidroliz edilmesi m7GMP ve GDP'yi meydana getirir. Geniş bir yapı-aktivite ilişkisi çalışması metile edilmiş bazın ligandın esansiyel bir özelliği olduğunu ve primidin bazları içeren şapka analoglarının substrat olarak kullanılmadığını göstermiştir<sup>36</sup>. DcpS'nin düzeyi stres sinyalleriyle artar, bu da boşa çıkan mRNA transkriptlerinin üretimiyle (mRNA degradasyonu) sonuçlanır. G1/S geçişinde hücre döngü ilerlemesinin düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan deltalaktoferrin DcpS transkripsiyonunu aktive eder<sup>37</sup>.

DcpS'nin fonksiyonlarında bir azalmanın, mRNA uçlarının birleştirilmesinde bir fonksiyon bozukluğuna ve bozulmaya neden olabildiği öne sürülmektedir<sup>38</sup>. İnsan hastalıklarında DcpS'ye ilişkin en son bilgi DcpS'nin C5-quinazolinlerin bir moleküler hedefi olduğudur. DcpS'lerin C5-quinazolinler tarafından inhibe edilmesi, spinal musküler atrofiye neden olan SMN2 (survival motor neuron) geninde bir artma ve bozulmuş proteinin düzeyleri ile beraber görülür<sup>39</sup>.

### 2.2.4. FHIT (Kırılgan HIT proteini)

Yaklaşık otuz yıl önce, normalde yaşlılara özgü bir hastalık olan renal hücre karsinoması, 3 ve 8 nolu kromozomlarının kısa kollarında kalıtsal olarak dengeli kromozomal translokasyonu olan bir ailede sıkça gözlemlendi<sup>40</sup>. Kanser, translokasyon taşıyıcıları arasında erken dönemde,

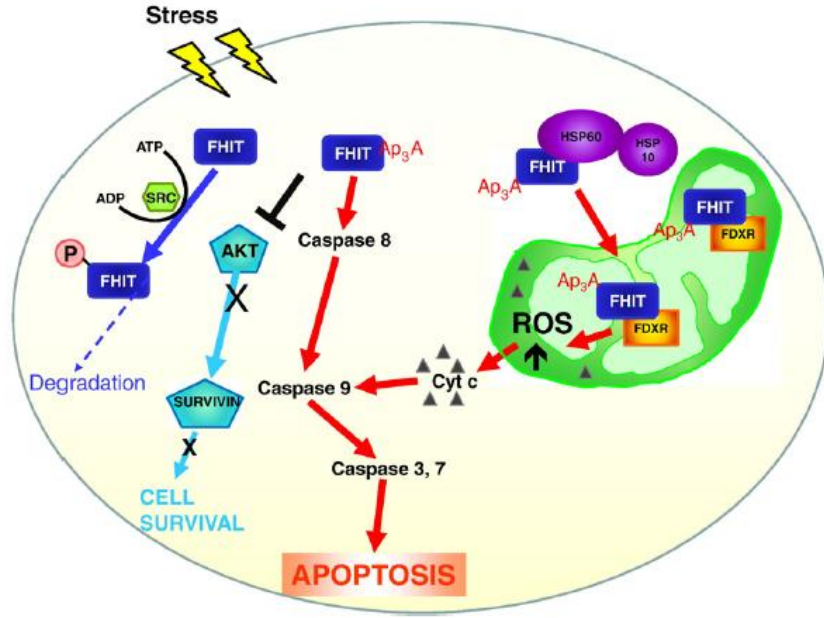
her iki böbreğin birçok bölgesinde oluşmuştur ve kromozom 3'ün kısa kolunda genetik bilgi kaybıyla birlikte görülmüştür. Gastrointestinal bölgede<sup>41</sup>, akciğerlerde<sup>42</sup> ve diğer dokularda mRNA translokasyonunun sık delesyonlar vasıtasıyla bozulduğu tespit edildi. Tahmin edilen protein, kırılğan bölgeden kodlandığı ve bir HIT proteini olduğu için FHIT olarak adlandırılmıştır<sup>41</sup>.

FHIT geni insan genomunun 3. Kromozomunun kırılğan bölgesinde yer almaktadır, genelde kanserlerde değişim göstermiş ve kanser türevi hücre hatlarında inaktiftir<sup>43</sup>. FHIT proteini HIT motifi taşır ve bir tümör supresördür. Akciğer, özofagus, mide, böbrek ve serviks kanserleri gibi birçok insan tümöründe FHIT ya yoktur ya da azalmıştır<sup>42,44</sup>. Akciğer, serviks ve memenin preneoplastik lezyonlarında delesyonlar gözlenmiştir<sup>45</sup>. FHIT<sup>-/-</sup> fareler hayatta kalmakla beraber kontrol farelerine oranla daha fazla tümör gelişimi gösterirler<sup>46</sup>. Bir inaktif FHIT aleli taşıyan fareler (FHIT<sup>+/-</sup>) kimyasal tümör indüksiyonuna yüksek oranda yatkındırlar<sup>47</sup>.

FHIT şubesi diadenozin polifosfat hidrolaz aktivite gösteren iki enzimden<sup>48,49</sup> ve benzer aktivite gösterdiği düşünülen bir proteinden oluşur. Diadenozin polifosfat hidrolazlar A(5')ppp(5')A gibi 3 ila 5 fosfatlık zincirle esterleşmiş adenozin ya da guanozin nükleozitlerine sahip dinükleotid polifosfatlara yapışır ve AMP+ADP'yi (ya da AppppG yapışması AMP+GTP'yi) ortaya çıkarır<sup>50</sup>.

Hücre stresine tepki olarak, diadenozin polifosfat seviyeleri artar. ApnA'lar FHIT ve ApnA oluşumu için substratlardır. FHIT apoptoz için gereklidir. FHIT apoptozu kaspaz 8'in aktifleşmesiyle tetiklenen sitoplazmik yolla gerçekleştirir. FHIT aynı zamanda Hsp60/10 (Mitokondrial ısı şok proteinleri) şaperon kompleksine de bağlanabilir. Bu

da bağlanan proteini mitokondriye yönlendirir. Orada ferrodoksin redüktaz'ı stabilize eder (Fdxr). Mitokondri apoptotik yoluna bağlanan reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. FHIT aynı zamanda PI3 K-Akt-Survivin (Endotel hücrelerdeki sinyalizasyon kaskadı) sinyallerini pasifize eder. Src kinaz FHIT'i Tyr 114'te (Tirozin 114) fosforile eder. Tyr114 FHIT'i proteozomal bozulma için hedeflemektedir (Şekil 6)<sup>23</sup>.



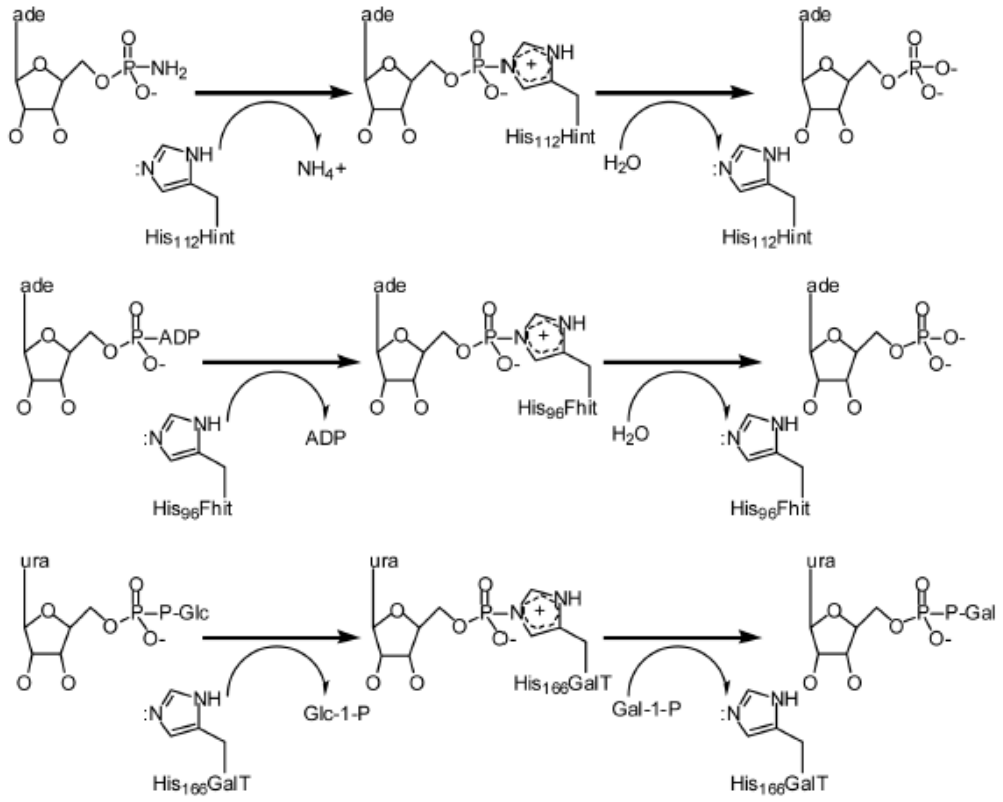
**Şekil 6.** Kırılgan HIT proteini FHIT tarafından apoptoz oluşmasının altında yatan mekanizma<sup>23</sup>.

3p14.2'deki insan FHIT geni birçok insan tümöründe bozuktur<sup>41,42,51</sup>. FHIT, fonksiyonunu kaybetmesi halinde neoplazilerin ilerlemesinin başlamasına katkıda bulunabilecek bir tümör supresör gen adayıdır. FHIT'in HIT protein süperalesinin bir üyesi olarak tanımlanması<sup>41</sup> ve sonra diadenozin polifosfatlara bağlandığının ortaya çıkması<sup>49</sup> sırasında temel nükleotid bağlama ve hidrolaz aktivitesinin moleküler temelleri anlaşılmamıştır.

### 2.2.5. Galaktoz-1-fosfat üridililtransferaz (GALT)

Karaciğer enzimi Galaktoz-1-fosfat üridililtransferaz (GALT) UDP (Üridin difosfat) glukozdaki UMP'nin (Üridin monofosfat) galaktoz-1-fosfata transferini katalizler. Buradan da UDP-galaktoz ve glukoz-1-fosfat açığa çıkar. GALT, HIT üst ailesinin ayrı bir branşını temsil eder. Hidrolazdan ziyade transferaz olarak işlev görür. Buradaki nükleotid transferi UMP ve His kalıntıları (His- $\phi$ -His- $\phi$ -Gln- $\phi$ - $\phi$  modifiye HIT motifinden) arasında oluşan kovalent bir ortamda ilerler. GALT genindeki mutasyonlar başarısızlık, katarakt ve mental retardasyonla karakterize olan galaktozemiye neden olur<sup>19</sup>. Diğer HIT proteinlerinden farklı olarak GALT karbohidrat metabolizmasında tanımlanmış bir role sahiptir ve tümörigenezde bir rolü yoktur<sup>23</sup>.

Galaktoz kullanımı için Leloir metabolik yolundaki ( $\beta$ -D-Galaktoz'un, glukoz-1-Fosfat'a çevrilmesi için metabolik yol) ikinci basamak, UDP-galaktoz oluşturmak için galaktoz-1-fosfat'ın UMP'ye transferini gerektirir<sup>52</sup>. Şekil 6'da gösterildiği gibi, reaksiyon GALT ile katalizlenir. GALT, His166 ile kovalent bir UMP ortamı oluşturmak için glukoz-1-fosfat salarak UDP-glukoz tüketir ve daha sonra UDP-galaktoz oluşturmak için galaktoz-1-fosfat ile reaksiyona girer (Şekil 7)<sup>53,54</sup>.



**Şekil 7. HIT süperailisinin üç şubesinin prototip üyeleri için substratlar ve ileri reaksiyon şemaları<sup>19</sup>.**

GALT geni mutasyonu olan insanlar galaktosemiklerin en geniş sınıfıdır ve ilk önce yaşamın ilk günlerinde büyüme geriliği ile tanımlanırlar. Galaktozsuz bir diyetle girmelerine rağmen uzun vadede GALT galaktosemikleri katarakt ve zekaya ilişkin sorunlar yaşarlar<sup>55</sup>.

### 2.3. HINT 1 (Histidine Nucleotide Binding Protein 1)

HINT1 (Histidine Triad Nucleotide-bağlayan protein 1), 126 aminoasitli (Şekil 7), sitozolik bir proteindir. İlk defa 1990 yılında bir protein kinaz C inhibitörü (PKCİ)<sup>56</sup> olarak belirtilmiş ve ilk literatürlerde Protein Kinase C Inhibitor-1 (PKCİ-1) olarak isimlendirilmiştir<sup>57,58</sup>. HINT1'in PKC ile



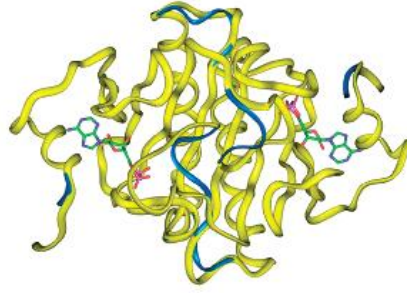
sarmallardır. Herbir monomerin  $\alpha_2$ 'si olan ve  $\beta_3$ 'ü lineer bir sırayla takip eden uzun heliksler dimer arayüzünde birleşik haldedir ve kıvrımlı, 10-sarmallı  $\beta$ -tabakasının oluşturduğu yarı silindirin iç kısmındadır. HINT dimerinin yapısı, ligandsız PKCI için tanımlanan yapıya uyar<sup>60</sup>.

hHint: MADEIAKAQVARPGGDTIFGKIIRKEIPAKIIFEDDRCLAFHDISPQAPT  
echinT: MAEE-----TIFSKIIRREIPSDIVYQDDLVTAFRDISPQAPT

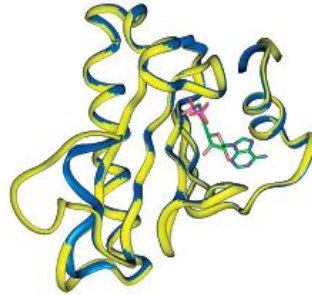
hHint: HFLVIPKKHISQISVAEDDDESLGHLMIVGKKCAADLGLNK-GYRMVVN  
echinT: HILIPNLIPTVNDVSAEHEQALGRMITVAAKIAEQEGIAEDGYRLIMN

hHint: EGSDDGGQSVYHVHLHVLGGRQMHWP  
echinT: TNRHGGQEVYHIEMHLLGGRPLGPMLAHKGL

A



B



C

Human Hint1 120 – Q M H W P P G -126  
*E. coli* hinT 109 – P L G P M L A H K G L -119

D

Şekil 9. echINT homoloji modeli. (A) insan HINT1 ve echINT arasındaki sekans uyumu yüksek homoloji gösterirken korunmuş bölgeler kalın harfle gösterilmiştir. (B) dimerik hHINT1 kristal yapısı (mavi, PDB kod: 1AV5) (17) ve echINT (sarı) homoloji modeli üst üste. (C) bir monomer hHINT1 ve echINT modeli üst üste. (D) hHINT1 ve echINT arasında değiştirilmiş C-terminal bölgeleri<sup>61</sup>.

Brenner ve arkadaşları HINT1'in, birçok ökaryotik organizmada AMP-SO<sub>4</sub> ve amonyaktan sentezlenen bir hücre içi çözünen olan adenozin 5'-monofosforamidat'ı (AMP-NH<sub>2</sub>) hidroliz edebildiğini keşfetmişlerdir<sup>62,63,64</sup>. Bu monofosforamidaz aktivite HIT bölgesindeki ikinci "His" kalıntısına bağlıdır<sup>62</sup>.

### 2.3.2. HINT1'in Kanser İle İlişkisi : Onkogen ve Anti-onkogen Etkisi

Yapılan farklı çalışmalarda HINT1 geninin kanserle ilişkisi araştırılmıştır.

Kanserojen DMBA'ya maruz kalan HINT1 geni eksik farelerde hem meme hem de over tümörlerinin oluşumuna yatkınlık olduğu gözlenmiştir. HINT<sup>+/-</sup> ve HINT<sup>-/-</sup> farelerde, HINT<sup>+/+</sup> farelere kıyasla meme tümörleri daha hızlı gelişmiştir. Bu tümörlerin görülme sıklığı ve genel görülme çokluğu HINT<sup>+/-</sup> ve HINT<sup>-/-</sup> farelerde HINT<sup>+/+</sup> farelere oranla belirgin olarak daha fazladır. DMBA kullanılarak yapılan karsinogenez çalışmasında elde edilen bulgular önceki çalışmalarla birleştirildiğinde, kanserojen DMBA'nın HINT<sup>-/-</sup> farelerde gastrik tümörlerin indüksiyonunu belirgin derecede arttırdığı gözlenmiştir. Bu da HINT1'in birden fazla dokuda tümör yatkınlığını etkileyen yeni bir tümör supresör gen olduğunu kanıtlamaktadır.

HINT1'in tümör supresör etkileri kimyasal karsinojenler ile sınırlı değildir. Diğer bazı araştırmacılar HINT1<sup>-/-</sup> farelerde spontan tümör artışı bulamamıştır<sup>65</sup>. Fakat bu durum, çalışmadaki farelerin kısa süre izlenmesi ve sayılarının yetersiz olmasından ve/veya farelerin farklı bir genetik geçmişe sahip olmalarından kaynaklanıyor olabilir. İnsanlarda küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hatlarında yapılan

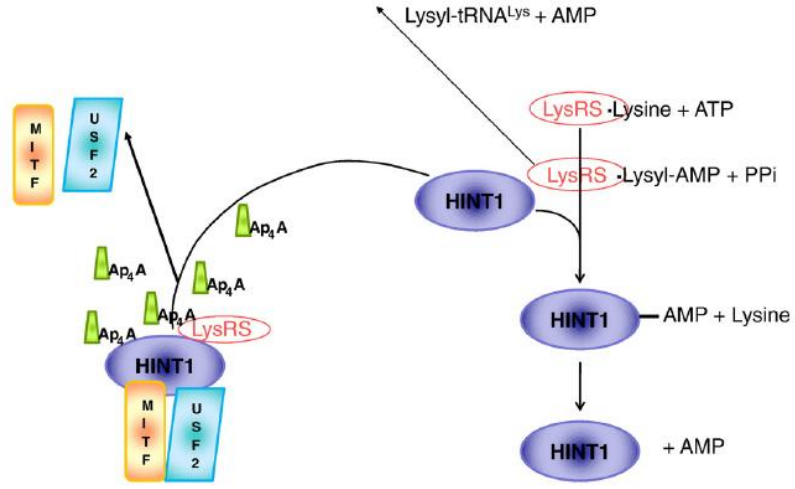
bir çalışma tarafından desteklenen çalışmalar HINT1'in birden fazla doku için yeni bir tümör supresör olduğunu desteklemektedir<sup>66</sup>.

Spesifik tümör supresör genlerin ifadesi, genellikle bu genlerin promoter bölgelerine karşılık gelen spesifik sitidin kalıntılarının metilasyonu yoluyla ve ayrıca kromatin yapısını değiştiren diğer modifikasyonlar ile kanser hücrelerinde engellenirler<sup>67,68,69</sup>.

DeneySEL bulguların çoğu tümörjenez işareti veren yolları etkileyebilen regülasyon ve transkripsiyonda HINT1'e bir rol biçmektedir<sup>23</sup>.

### 2.3.3. HINT1'in Moleküler Etki Mekanizmaları

HINT1 proteininin gen transkripsiyonunu kontrol eden çeşitli yollarda bir inhibitör rolü olduğuna dair biriken kanıtlar vardır. Böylece, çeşitli hücre sistemlerinde HINT1 siklin-bağımlı kinaz 7 (CDK7)<sup>70</sup>, MITF olarak da bilinen transkripsiyon faktörü mikroftalmi (Mi)<sup>71</sup>, transkripsiyon faktörü USF2<sup>72</sup>, Pontin/Reptin/ $\beta$ -katenin/TCF4 kompleksi<sup>58</sup> ve nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)<sup>73</sup> ile etkileşebilir ve aktivitelerini inhibe edebilir. Ayrıca SW480 kolon kanser hücrelerinde HINT1'in bir iskele protein olan SH3 (POSH)-JNK2 kompleksi ile etkileşime girdiği ve böylece, AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesini inhibe ettiği gösterildi (Şekil 10)<sup>74</sup>.



**Şekil 10.** HINT1'in adenikasyon mekanizması. HINT1 mikroftalmi transkripsiyon faktörü (MITF) ve upstream stimulatory factor 2 (USF2) gibi transkripsiyon faktörlerini lisil-tRNA sentetazlı (LysRS) bir ortamda inhibe edebilir. Lys RS, bir aminoasil AMP ortamında aminoasil tRNA sentezler ve Ap4A'nın oluşumunu katalizler. HINT1 bu kompleksten Ap4A'ya bağlanarak ayrışır. HIT domeni His kalıntısı substrata, LysRS tarafından oluşturulmuş lisil AMP'ye, bağlanır. Böylece bir adenilleşmiş enzim ortamı oluşur. HINT1 lisil AMP'yi hidroliz eder<sup>23</sup>.

### 2.3.3.1. HINT1 - AP-1 İlişkisi

HINT1'in aktivatör protein-1 (AP-1) transkripsiyon faktör kompleksi üzerindeki muhtemel etkileri incelenmiştir. Çünkü AP-1 hücre proliferasyonunu tetikleyen birtakım genlerin transkripsiyonunu artırıcı etkiye sahiptir. AP-1 dimerik kompleksi c-Jun (c-Fos ile kompleks oluşturan bir proto-onkogen), c-fos (Fos geni tarafından kodlanan protein), Fra (Fos ilişkili antijen) ve ATF (Aktivatör Transkripsiyon Faktörü) protein ailelerinden örnekler içerir<sup>75,76</sup>.

AP-1 aktivitesi genelde kanser hücrelerinde artış gösterir ve onkojenik etkilerini hücre proliferasyonunda, anjiyogenezde ve tümör istilasında yer alan genleri düzenleyerek gösterir. AP-1 aktivitesinin inhibisyonu değişik kanser hücreleri tiplerinin hücre gelişimi inhibisyonu ile ilişkilidir. c-Jun proteini, c-fos veya Fra ile homodimerler veya

heterodimerler oluşturabilir. Bu dimerler TGACTCA DNA hedef sekansına yüksek oranda benzerlik içerirler, böylece birçok genin promotör bölgelerindeki AP-1 aktivitesini düzenlerler<sup>74</sup>.

POSH ve JNK proteinleri, AP-1 faaliyetinin gerilemesine ilişkin olarak HINT1'in hedefi gibi görünmektedir<sup>74</sup>. JNK ile yukarı yönlü sinyal etkileşiminde POSH proteini iskele görevi görür, dolayısıyla JNK'nin aktivasyonunu, c-Jun'un sonraki fosforilasyonunu ve JNK faaliyetlerinin aktivasyonunu artırır<sup>77</sup>. HINT1'in, POSH(SH3)-JNK2 kompleksi ile etkileşime girmek suretiyle, AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesini inhibe ettiği gösterildi<sup>74</sup>.

Son çalışmalar POSH'un başka bir işlevini de ortaya çıkarmıştır. Bu işleviyle protein hepatosit gelişim faktörüyle (Hrs) düzenlenen tirozin kinaz substratı ile hücrelerde kolokelize olur. POSH'un RING domeni spesifik olarak Hrs'nin kararlılığını düzenler, JNK1'in kararlılığını ise düzenlemez. Bu mekanizma bir ubiquitin proteazomal indirgeme yolağıyla gerçekleşir<sup>78</sup>. POSH doğrudan HINT1'in moleküler aksiyon mekanizmasıyla da ilintili olabilir<sup>74</sup>.

#### 2.3.3.2. HINT1 - CDK-7 - KIN28 ilişkisi

HINT1, bazal transkripsiyon faktörü (TFIIH) ve siklin bağlı kinaz (CDK7) etkileşim yolu ile fiziksel olarak ilişkilendirilmektedir<sup>62,70</sup>. HINT'in memeli hücrelerinde hücre içi lokalizasyonu hakkındaki önceki raporlar CDK7'nin tamamen çekirdeksel bir protein<sup>79</sup> olmasına rağmen LM217 insan fibroblast hücrelerinde<sup>80</sup> sistoleketal lokalizasyonda veya bazofilik lösemik hücrelerin<sup>71</sup> içinde çekirdek ve stoplazmik lokalizasyonda olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda, CDK7'nin hücrede çokça bulunması, Hint'in nükleusa kısmen relokalizasyonuna neden olmuştur. Fiziksel birleşim siklin H bağlanmasından veya CDK7 kinaz aktivitesinden bağımsızdır. Ayrıca, *S. cerevisiae*'de HINT1 (mayalarda HNT1 olarak da yazılır) ve KIN28'in sıcaklığa duyarlı aleli arasındaki birleşme ve parçalanma çok uzun süreli hücre morfolojisine ve azalmış koloni formasyonuna neden olmuştur. Bu da KIN28 ile HINT1 arasında genetik bir etkileşim olduğunu gösterir. HINT1'in CDK7 ve KIN28 ile fiziksel ve genetik etkileşimleri bu sınıftan olan histidin triad proteinlerinin CDK7 ve Kin28 işlevlerinin düzenlenmesinde rol aldıklarını göstermektedir<sup>70</sup>.

#### 2.3.3.3. HINT1-*mi* ilişkisi

Mikroftalmi (*mi*) mast hücrelerinde ve melanositlerde gelişimin ve işlevselliğin düzenlenmesinde başlıca role sahip bir transkripsiyon faktörüdür (MITF). *mi*'nin diğer proteinlerle birleşmesi, *mi*-aracılığıyla olan transkripsiyonel aktivasyonun düzenlenmesinde kritik bir basamaktır. Protein 1 etkileşimli protein kinaz C (PKC1-1/HINT1) 'nin çift hibrit ekranlama da spesifik olarak *mi* ile ilişkili olduğu bulunmuştur. *mi*'nin ratların bazofilik lösemik hücrelerinden ya da fare melanositlerinden immünopresipitasyonun, HINT1 ile spesifik bir birlikte immünopresipitasyon sonucu verir. HINT1, MITF proteinine direkt bağlanmak suretiyle aktivitesini inhibe eder<sup>71</sup>.

#### 2.3.3.4. HINT1 - USF2 ilişkisi

USF2 genellikle hücre proliferasyonunu inhibe eden bir transkripsiyon faktörü olarak kabul edilmekle birlikte, hücre proliferasyonu stimüle siklin B1, CDK1 ve CDK4 de dahil olmak üzere bazı genleri de pozitif olarak regüle edebilir<sup>81,82</sup>. Ayrıca, USF2'nin homolog eksikliği,

farelerde hem doğumda hem de postnatal gelişim boyunca azalmış vücut büyüklüğüne neden olur<sup>83</sup>. Bu nedenle, bazı hücre tiplerinde USF2 hücrel proliferasyon üzerindeki pozitif etki gösterebilir. HINT'in USF2'nin transkripsiyonel aktivitesinde supresör olarak görev yaptığını düşünülmüştür<sup>72</sup>.

#### 2.3.3.5. HINT1 – NF-κB İlişkisi

Transkripsiyon faktörü NF-κB tümör gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır<sup>84</sup>. NF-κB\_transkripsiyon faktörünün etkinliğinin aktivasyonu, I-κB'nin bozulması ve NF-κB 'nin nükleer translokasyonuna bağlıdır<sup>84</sup>. Tedavi edilmemiş HepG2 hücrelerinden hazırlanmış nükleer ve sitoplazmik ekstraların Western blot analizi, NF-κB p65 proteinin yapısal aktivasyonu için kanıt sağlayarak hem nükleer hem de sitoplazmada mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar HINT1'in sitoplazmik iskele protein I-κB'nin stabilitesini korumak ve böylece p65'in nükleer translokasyonunu bloke etmek suretiyle NF-KB transkripsiyon faktörü aktivitesini inhibe ettiğine dair kanıtlar sunmaktadır<sup>73</sup>.

#### 2.3.3.6. HINT1 – TCF- β-katenin/Pontin ve Reptin İlişkisi

Weiske ve Huber HINT1 ve β-katenin partnerleri pontin ve reptin arasında bir etkileşim gözlemlemişlerdir. İşlevsel deneylerde, HINT1, TCF-β-katenin transkripsiyonel aktivitesinde negatif regülasyon etkisi göstermiştir. Böylece axin2 ve siklin D1 gibi Wnt sinyal yolağının hedef genlerinin ekspresyonunu baskılar<sup>58</sup>.

Pontin ve Reptin önceki çalışmalarda antagonist β-katenin transkripsiyonel aktivitesini modüle eden nükleer β-katenin etkileşim

ortakları olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, histidin üçlü proteinlerinin evrimsel korunmuş ailesinin bir üyesi olan HINT1, Pontin ve Reptin'in yeni bir etkileşim ortağı olarak karakterize edildi. Deneysel çalışmalar, HINT1'in doğrudan Pontin ve Reptin'e bağlandığını göstermektedir<sup>58</sup>.

Diğer taraftan, Pontin ve Reptin, HINT1'in N-terminal ucu'na bağlanır. Dahası, Pontin ve Reptin etkileşimi ile HINT1, LEF-1/TCF- $\beta$ -katenin transkripsiyon kompleksi ile ilişkilendirilir. Bu bağlamda, daha önce yapılan gen deneylerinde de gösterildiği gibi, HINT1, Wnt-transfekte edilmiş hücrelerde ve SW480 kolon karsinomu hücrelerinde TCF- $\beta$ -katenin transkripsiyonel aktivitesinin negatif bir regülatör olarak hareket eder. Pontin/Reptin kompleksinin bozulması, TCF- $\beta$ -katenin aracılı transkripsiyon üzerinde, HINT1'in düzenleyici etkisine aracılık ettiğini göstermektedir. Bu veriler son zamanlarda HINT1 geni silinmiş farelerin analizi ile öne sürülen HINT1 tümör supresör fonksiyonunu açıklamak için moleküler bir mekanizma sağlar<sup>58</sup>.

#### **2.4. Anti-onkogenler ve Reaktif Oksijen Türleri**

Reaktif oksijen türleri (ROT), genellikle tüm aerobik organizmalarda ve çoğunlukla da aerobik solunumun bir sonucu olarak üretilen yüksek derecede reaktif moleküller veya moleküler parçalardır. Bu terim, süperoksit anyon ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi en dıştaki orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden bir molekül olarak tanımlanan çeşitli reaktif oksijen metabolitlerini kapsar<sup>85</sup>. ROT terimi hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi bazı non-radikalleri de kapsar<sup>86</sup>.

Hücresel ortam faktörlerine bağlı olarak farklı ROT türlerinde yaşam süresi oldukça farklılıklar gösterir, örneğin ·OH'nin yaşam süresi 1ns den kısarken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'inki saatler sürebilir<sup>86</sup>. Yüksek reaktivitenin yanı sıra, ROT'un bir başka önemli özelliği de yeni radikallerin oluşumuna neden olan radikal olmayanlar ile reaksiyona girebilme eğiliminde olmalarıdır. ROT terimi ayrıca peroksinitrit gibi nitrik oksit-kaynaklı reaktif molekülleri de kapsayacak şekilde alınabilir<sup>87</sup>.

Bu moleküller birçok fizyolojik olayda önemli rol oynar; bununla birlikte, ROT-supresör sistem kapasitesi ROT miktarını aşarsa oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres, birçok etken tarafından kontrol edilen prooksidan ve antioksidan faktörler arasındaki dengesizliği anlatan bir durumdur ve hücresel hasara yol açabilir. Bu dengelenemeyen redoks durumu, DNA, lipit ve proteinler de dahil olmak üzere, tüm hücresel makromoleküllerin hasarını indüklemek için yeterince etkilidir. ROT günümüzde kanser başlangıcına, belirlenmesine ve ilerlemesine katılan önemli bir kanserojen sınıf olarak kabul edilmektedir<sup>88</sup>.

ROT lar metabolizmanın yalnızca toksik yan ürünleri değil, aynı zamanda hücre sinyalleşmesinde esansiyel ikincil habercilerdir ve proliferasyon, hücre döngüsünün durdurulması ve hücre ölümünü de içeren birçok hücresel sürece katılır<sup>89</sup>. Aşırı ROT oluşumu konusundaki klasik görüşe karşın, birçok ROT, normal aerobik metabolizma tarafından düşük bir seviyede üretilir ve sinyal iletimi süreçlerinin redoks-bağımlı düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Redoks regülasyonunun moleküler mekanizmasını çoklu seviyelerde anlayabilmek için ROT'un hücre içi homeostazına aracılık eden regülatör molekül ve mekanizmaları ve ROT'un sinyal iletimindeki rollerini karakterize etmek çok önemlidir. ROT'un kontrollü üretimi ve regülatör hedefleri hakkında olduğu kadar ROT sinyalleşmesi ile diğer sinyal kaskadları arasındaki etkileşim

hakkında daha iyi bilgi birikimi, ilgili hastalıkların moleküler temellerini anlamak için kavramsal çerçeve sağlar<sup>90</sup>.

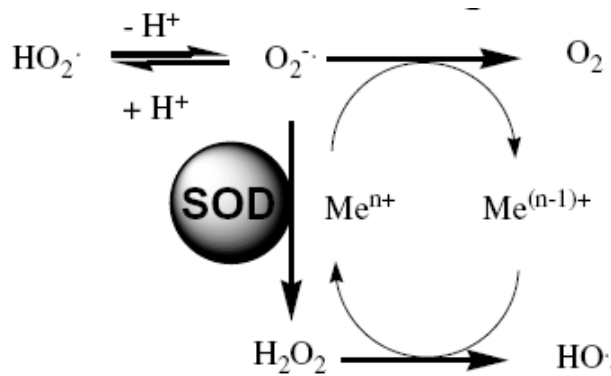
Tümör supresör genler, tümörlerin büyümesini kısıtlayan ve birçok hücrel aktiviteyi regüle eden koruyucu işlevlere sahiptir<sup>91</sup>. Tümör supresör genler değişime uğradığında hücreler, kansere yol açan bir durum olan kontrol dışı büyüme gösterebilirler. Tümör supresör gen p53 insan kanserlerinde<sup>92</sup> en sık mutasyona uğramış olan genler ve aktivasyonu stresin yoğunluğuna ve doku ve hücrenin şartlarına bağlı olarak çeşitli hücrel sonuçlar doğurur<sup>93,94</sup>. p53, "hücrenin koruyucusu" olarak adlandırılır çünkü çeşitli sinyallere cevap olarak hücre döngüsünün durdurulması, hücrel yaşlanma ve apoptozisi düzenlemek için çok sayıda geni transkriptive veya transreprese eder<sup>92</sup>. P53 aynı zamanda, antioksidan rol oynadığı oksidatif strese cevap olarak da aktive edilir<sup>95</sup>.

ROT ve p53 arasında ki bağlantı birçok çalışmada rapor edilmiştir ve bunların sinyalleşme yolları arasında etkileşim ortaya atılmıştır. p53, prooksidan ve antioksidan rollere sahip bir tümör supresördür. P53'e ek olarak, oksidatif stres cevaplarında FoxO (Forkhead box O) transkripsiyon faktörleri de aktive olur ve hücre döngüsünün durdurulması, hücre ölümü ve stres uyarısından korunmayı içeren hücrel işlevlerin düzenlenmesinde anahtar oyunculardır. ROT sinyalleşmesi FoxO'yu, G1 fazındaki hücre siklusu kontrol noktalarını regüle etmede merkezi olan ve hücre farklılaşmasında bir role sahip olan RB (retinoblastoma) yolağına bağlar<sup>96</sup>. Oksidatif strese cevap olarak, retinoblastoma yolu DNA hasarına karşı kontrol noktalarını aktive etmek için çok önemli hale gelir. Meme kanseri duyarlılık genleri BRCA1 ve BRCA2 oksidatif strese karşı korumaya dahil olurlar, her iki genin de DNA onarımı, hücre döngüsünün ilerlemesinin düzenlenmesi ve genomik bütünlükte bekçi olarak rolleri vardır<sup>97</sup>.

### 2.4.1. Süperoksit Dismutazlar (SOD'lar)

Antioksidan ve diğer hücre redoks durumunu modüle edici enzim sistemleri, tüm intrasellüler ve hatta ekstrasellüler kompartımanlardaki ROT'a karşı birinci derece savunma olarak etki ederler. Bu enzimlerin en önemlileri, süperoksit dismutazlar, glutatyon peroksidaz, katalaz ve peroksiredoksinlerdir. Karsinogenezde hücrenin redoks durumunu modüle eden enzimlerin spesifik rolü, ROT detoksifikasyonundaki rollerinin bir dereceye kadar örtüşmesi ve aynı zamanda pek çok fizyolojik işlemlere karışmalarından dolayı hala belirsizdir<sup>87</sup>.

SOD'lar ilk tanımlanan antioksidan enzimlerdir<sup>98</sup>. İnsan hücrelerinde üç farklı tip SOD ifade edilmiştir; ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunan bakır, çinko SOD (Cu, Zn SOD, SOD1 geni tarafından kodlanır), mitokondriyal mangan SOD (MnSOD, SOD2 geni tarafından kodlanır) ve hücre dışı SOD (EC-SOD, SOD3 geni tarafından kodlanır). Bu SOD'ların hepsi de iki  $O_2^{\cdot-}$  nunu moleküler oksijene ayrıştırabilmektedir (Şekil 10)<sup>87</sup>:



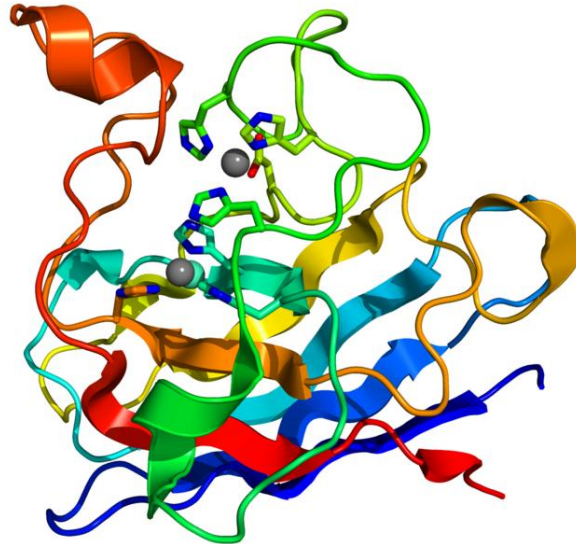
**Şekil 11. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar (Me; SOD ailesi yapısında bulunan metaller)<sup>99</sup>.**

SOD'dan başka bir enzim bu reaksiyon ile ilgili olarak aktiviteye sahip değildir. Bu SOD'un bilinen tek faaliyettir. SOD1, SOD2 ve SOD3 hücrenin farklı bölümlerinde yer aldıkları için serbest radikal detoksifikasyonunda birbirlerinin yerini alamazlar.

SOD'lar, özellikle Cu, Zn SOD, amiyotrofik lateral skleroz (FALS), Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, dang humması, kanser, Down sendromu, katarakt ve çeşitli nörolojik bozukluklar gibi çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır<sup>100</sup>.

#### 2.4.1.1. SOD1

SOD'lar arasında Cu, Zn süperoksit dismutaz (SOD1) yaygın olarak dağılmaktadır ve toplam SOD'un % 90'ını kapsamaktadır. Bu her yerde bulunan ve aktivite için Cu ve Zn gerektiren enzim, büyük fizyolojik öneme ve terapötik bir potansiyele sahiptir<sup>100</sup>. (Şekil.11)



**Şekil 12.** İnsan SOD1 enziminin kristalografik yapısı (N-terminal= mavi, C-terminal = kırmızı) bakır (mavi-yeşil küre) ve çinko (gri küreler) ile kompleks<sup>101</sup>.

SOD1, beş ekzonun kodladığı 153 aminoasitten oluşan 32,000 Da ağırlığında küçük bir enzimdir. SOD1 iki eş alt birimden oluşan bir homodimerdir; dimerler arası hidrofobik bağlar bu yapıyı sağlamlaştırır. Enzimin katalitik merkezi olan ekzon 3 ve 5 bölgesine  $Cu^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  metalleri yerleşmiştir. Ve bu bölgeler oldukça korunmuş aminoasit dizileri içerirler.  $Cu^{2+}$ 'nin enzimatik,  $Zn^{2+}$ 'nin yapısal işlevi vardır<sup>99</sup>.

SOD1, sağlıklı insan akciğerinde bronş epitelinde, karaciğer, eritrosit, beyin ve nöronda yüksek seviyelerde bulunur<sup>102</sup>.

Yapılan çalışmalar sonucu insan SOD1 geninin promotor bölgesinin NF1, Sp1, AP1, AP2, GRE, HSF ve NF $\kappa$ B gibi pek çok transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerine sahip olduğu bulunmuştur<sup>103</sup>.

Mekanik, kimyasal, biyolojik mesajcılar, UVB ve X radyasyonu, ağır metaller,  $H_2O_2$ , ozon, nitrik oksit, araşidonik oksit, ksenokimyasallar ekspresyon miktarını artırırken, tip II alveolar epitel hücrelerinde ve akciğer fibroblastlarında hipoksiye maruz kalmak, antikanser ilaçlar ekspresyon miktarını baskılamaktadır<sup>99</sup>.

#### 2.4.1.2. SOD2

Memelilerde en önemli antioksidan enzim olarak MnSOD kabul edilmektedir. MnSOD'un büyük bölümü, oksidatif stresin en belirgin olduğu ve oksijenin çoğunlukla tüketildiği yer olan mitokondrial matrikste bulunur. Yapılan çalışmalarda, MnSOD yoksun farelerde, şiddetli metabolik asidoz, nöron ve kardiyak miyosit dejenerasyonu ve dilate kardiyomyopatiden kaynaklı prenatal ölüm meydana gelmiştir<sup>87</sup>.

İn vitro ve in vivo çalışmalar genellikle karsinogenezde MnSOD rolü ile ilgili oldukça farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Sonuçların çoğunda tümör ilerlemesinde MnSOD'un koruyucu bir rol aldığı bildirilmiştir<sup>87</sup>.

#### 2.4.1.3. SOD3

SOD3, süperoksit dismutaz gen ailesinin en son bulunan üyesidir. Hücre içinde sentezlenir ve hücreler arası boşluklara taşınır. Burada diğer SOD üyeleri gibi süperoksit radikallerini yok edici olarak görev yapar<sup>99</sup>.

SOD3 geni ürününün beyin, akciğer ve diğer dokuları oksidatif strese karşı koruduğu düşünülmektedir. Protein sentezlendikten sonra hücreler arası alana iletilir. Ancak proteinin C terminaline yakın bir kısmı protein hücre dışına salgılanmadan önce kesime uğrar. Burada heparan sülfat proteoglikan ve kollojen ile etkileşerek hücre yüzeyine ve hücreler arası boşluğa glikozillenmiş bir homotetramer olarak yerleşir<sup>99</sup>.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1.Hasta Grubunun Tanımı ve Özellikleri

Hasta grubu, T.C.Sağlık Bakanlığı Dr.Abdurrahman Yurtarslan Ankara Onkoloji ve Eğitim Araştırma Hastanesi'nden biyopsi ile kesin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanseri teşhisi konmuş, herhangi bir tedavi almamış ve tedavi amacıyla opere edilerek dokularının çıkarılmasına karar verilmiş olan 17'si kadın 9'u erkek olmak üzere toplam 26 (13 kolon, 7 meme, 6 mide kanseri) hastadan oluşturuldu.

Çalışmamızda karşılaştırmalar, kanserli hastaların tümör dokuları ve kendi sağlıklı dokuları arasında yapıldı. Kanser hastalarından alınan doku örnekleri rezeksiyon amacıyla alınan dokulardan seçildi. Tablo 1'de hasta grubunun demografik özellikleri, Tablo 2'de rutin biyokimya değerleri yer almaktadır.

**Tablo 1. Hasta grubunun demografik özellikleri**

Değişken	Hasta Grubu (n=26)
<b>Yaş (Standart Sapma)</b>	55.48 (10.41)
<b>Cinsiyet</b>	
Kadın (%)	17 (63.0)
Erkek (%)	9 (37.0)
<b>Menopoz Durumu</b>	
Premenopoz (%)	5 (29.4)
Postmenopoz (%)	12 (70.6)
<b>Kanser türü</b>	
Kolorektal (%)	13 (48.1)
Meme (%)	7 (26.0)
Mide (%)	6 (22.2)
<b>Kanser Evresi*</b>	
Total Hasta- Evre I, II,III,IV	7,7,7,5
Kolon- Evre I, II,III,IV	5,2,3,3
Meme- Evre I, II,III	1,5,1
Mide- Evre I,III, IV	2,2,2

\*Evreleme American Joint Committee on Cancer kriterlerine göre yapılmıştır.

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

**Tablo 2. Hasta grubunun rutin biyokimya değerleri**

Parametre	Hasta Grubu (n=26)	Referans Değerler
Glukoz (mg/dL)	132.28±48.26	70-110 mg/dL
Ürik asit (mg/dL)	3.27±1.13	2.6-7.2 mg/dL
Total protein (g/dL)	5.48±0.75	6.4-8.3 mg/dL
Albümin (g/dL)	3.04±0.56	3.5-5.2 mg/dL
BUN (mg/dL)	13.67±5.63	7-26 mg/dL
GGT (U/L)	27.96±18.51	9-64 U/L
AST (SGOT) (U/L)	23.46±14.20	0-45 U/L
ALT (SGPT) (U/L)	16.73±14.89	0-45 U/L

### **3.2. Materyal**

#### **3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- RNaz inhibitörü çözelti: RNase Zap
- RNA koruyucu çözelti: RNASafer
- RNA izolasyon çözeltisi: Roche Tripure Isolation Reagent
- Kloroform: Merck
- İzopropanol: Merck
- Etanol: Merck
- cDNA sentez kiti: Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit
- Real-Time PCR enzim kiti: Roche LightCycler 480 Probes Master Kit
- Nükleaz içermeyen su

#### **3.2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar**

- Buzdolabı: Bosch
- Derin dondurucu (-20°C): Bosch

- Derin dondurucu (-80°C): New Brunswick Scientific U410 Premium
- Otomatik pipetler: Eppendorf, Hirschmann, Axygen-Axypet, Pipetus
- Santrifüj cihazı: Jouan MR-1822, Hettich Mikro 200R
- Mini santrifüj cihazı: Grant-Bio PCV-3000
- Isıticılı manyetik karıştırıcı: FALC F-60
- Mikroplaka santrifüj: Kubota PlateSpinII
- Bariyerli pipet uçları: Neptune Barrier Tip, Greiner Bio-one Filter Tip
- Homojenizatör: Roche MagNA Lyser
- Homojenizasyon tüpleri: MagNA Lyser Green Beads
- Biyogüvenlik Kabini: Esco Class II BSC Airstream Max
- Rotator: Biosan Multi RS 60
- PCR cihazı: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
- Real-Time PCR cihazı: Roche Light Cyclers 480II

### 3.2.3.Kullanılan Biyolojik Materyal

Kanserli hasta grubundan alınan tümör doku örneklerinde ve aynı hasta grubundan alınan sağlıklı doku örneklerinde HINT1 ve SOD1 gen ekspresyon analizleri yapıldı.

Her bir doku örneği, alındıktan sonraki 30 dakika içinde aseptik koşullarda küçük parçalara ayrılarak içinde 1 mL RNASafer çözeltisi bulunan eppendorf tüpler içinde, -80°C'de ölçümlere kadar saklandı.

## **3.3.Deneysel Prosedür**

### 3.3.1.Doku Örneklerinde Kantitatif Real-Time RT-PCR (qRT-PCR/Gerçek Zamanlı RT-PCR) ile HINT1 Gen Ekspresyonlarının Analizi

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

### 3.3.1.1.Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu

#### *Kullanılan Çözeltiler*

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

#### *Örneklerin Hazırlanışı*

Çalışma ortamı ile kullanılan alet ve cihazlar RNase Zap çözeltisi ile temizlendi. Her bir homojenizasyon tüpüne 1 mL Tripure izolasyon reajanı koyuldu. RNASafer içerisinde donmuş olarak bulunan yaklaşık 100 mg'lık doku örnekleri çözüldü ve bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış doku örnekleri homojenizasyon tüplerine alındı. Tüpler homojenizatörde 6,000 rpm'de 50 saniye çevrildi. Örnekler önce 4°C'de 2 dakika, daha sonra oda ısısında 5 dakika bekletildi. Her bir parçalanmış doku örneğine 200 µL kloroform eklenerek 5 dakika oda ısısında bekletildi ve daha sonra 4°C'de 12,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 3 faza ayrıldı. En üstteki aköz ve renksiz

RNA fazından 500 µL nükleaz içermeyen eppendorf tüplere alındı. Her bir örneğe 500 µL izopropanol eklendi. Oda ısısında 10 dakika rotatorda çevrilerek inkübe edildi. Örnekler daha sonra 4°C'de 15,000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak oluşan RNA pelletinin üzerine 1 mL %75'lik etanol eklenip vorteksledi. Örnekler 4°C'de 10,000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. 57°C'de ısıtıcı blokta etanol uçuruldu. Kalan RNA pelletine 50 µL nükleaz içermeyen su eklenerek pipetaj yapıldı. Ardından 57°C'de ısıtıcı blokta 15 dakika inkübe edilerek RNA pelleti çözüldü. Tüpler 3,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. RNA çözeltileri daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklamaya alındı. RNA izolasyonu üretici firmanın yönergesine uygun olarak yapıldı<sup>104</sup>.

### 3.3.1.2.RNA Örneklerinden RT-PCR ile cDNA Sentezi

*Kullanılan Çözeltiler (Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit)*

- Ters transkriptaz (200 mM potasyum fosfat, 2 mM ditiyotritol, %0.2 triton X-100 (v/v), %50 gliserol (v/v) içeren tampon içinde, pH yaklaşık 7.2)
- Reaksiyon Tamponu [250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, pH yaklaşık 8.5 (25°C)]
- 40 U/µL koruyucu RNaz inhibitör [20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 8 mM ditiyotritol, %50 gliserol (v/v), pH 7.6 (4°C) tamponu içinde]
- Deoksinükleotit karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP-Her biri 10 mM)
- 600 µM random heksamer primeri
- 0.1 M ditiyotritol (DTT)

### *Örneklerin Hazırlanışı*

Doku ekstraktlarından total RNA izole edildikten sonra buradan RT-PCR ile cDNA elde edilmesi işlemine geçildi. Bunun için

4°C'de nükleaz içermeyen her bir eppendorf tüpüne 2 µL random heksamer primer çözeltisi koyuldu. RNA örnekleri çözülüp her birinden 9,4 µL eppendorf tüplere eklendi. 65°C'de 10 dakika PCR cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnek tüpleri doğrudan buza yerleştirildi. Bu arada 1,5 mL'lik eppendorf tüpte reaksiyon karışımı, her bir RNA örneği için Tablo 3'te verilen miktarlardan hesaplanarak hazırlandı.

**Tablo 3. cDNA sentezi için gerekli reaksiyon karışımında 1 RNA örneği için kullanılan çözelti miktarları**

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

Daha önce inkübe edilen her bir örnek tüpü üzerine hazırlanan bu karışımdan 8.6 µL eklendi. Örnekler PCR cihazında 55°C'de 30 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklamaya alındı. cDNA sentezi üretici firmanın yönergesine uygun olarak yapıldı<sup>104</sup>.

### 3.3.1.3.Kantitatif Real-Time PCR Analizi

*Kullanılan Çözeltiler (Roche LightCycler 480 Probes Master Kit)*

-Enzim karışımı [tampon, MgCl<sub>2</sub>, dNTP (deoksiribonükleotit trifosfat), FastStart Taq DNA Polymerase enzimi içeren LightCycler 480 Probes Master]

-Primer, prob

-Nükleaz içermeyen su

*Örneklerin Hazırlanışı*

Elde edilen cDNA örneklerinden hareketle real-time PCR ile amplifikasyon işlemine geçildi. Bu işlemlerle HINT1 ve SOD1 gen ekspresyonlarının düzeylerinin ölçülebilmesi için kit üretici firmanın tasarladığı her bir gene özgü ileri ve geri primerler ile bu primerlere uygun problar kullanıldı ve yine üretici firmanın deney protokolü uygulandı<sup>104</sup>.

Reaksiyon karışımları her bir cDNA örneği için ayrı tüplerde ve her bir mikrolaka kuyucuğu için Tablo 4'te verilen miktarlardan hesaplanarak 4°C'de hazırlandı. Negatif kontrol olarak nükleaz içermeyen su kullanıldı. Mikroplakaların üzeri folyo ile kaplanarak mikrolaka santrifüjünde 3,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Deney protokolü üretici firmanın yönergeseine uygun olarak yapıldı<sup>104</sup>.

**Tablo 4. Her bir mikrolaka kuyucuğu için gereken PCR reaksiyon karışım oranı**

cDNA	Enzim Karışımı	Su	Primer, Prob	Toplam
5 µL	10 µL	4 µL	1 µL	20 µL

Gen amplifikasyonu için kit üreticisinin önerdiği aşağıdaki PCR programı kullanıldı.

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

Bağlı ekspresyon, hedef genin tümör doku örneklerinde ve normal doku örneklerinde (kalibratör örnek) referans bir gene göre

kantifikasyonunun [rölatif kantifikasyon (RK)] hesaplanmasıyla belirlendi. Çalışmada referans gen olarak **β-aktin** kullanıldı. RK değeri,

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

---

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

formülünden hesaplandı<sup>105</sup>. Bu yöntemle referans gen kullanılarak  $\Delta C_T$  değeri hesaplandı.  $C_T$  (eşik döngüsü), gen amplifikasyonunun lineer bölgeye ulaşması için gerekli PCR döngü sayısını ifade etmektedir<sup>105</sup>. Hedef ve referans genler arasındaki  $C_T$  değerleri farkından ( $\Delta C_T$ ), tümör dokusundaki ve normal dokudaki hedef gen ekspresyonları (oransal olarak) referans gen ekspresyonlarına kıyasla hesaplandı.

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

### 3.4. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 11.5 paket programı (SPSS Inc, USA) kullanılarak yapılmıştır. Her bir genin her bir hasta için ekspresyon oranları referans gen olarak kullanılan  $\beta$ -aktin ile kıyaslanarak bulunmuştur ve bunların birbirine olan oranı rölatif kantifikasyon değerlerini vermektedir. Normal doku tümörlü doku karşılaştırmasını yapabilmek için Compared-t testi ve Wilcoxon Signed Ranks testi (küçük gruplar için) kullanılmıştır. Parametreler arasındaki korelasyonların incelenmesinde Pearson korelasyon testi kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamıza toplamda 26 hasta dahil edilmiştir. Ekspresyon değerlerine bakılarak yapılan değerlendirmede, 26 hastanın 14'ünde (14/26, %54) tümörlü dokudaki HINT1 ekspresyon oranının normal dokuya göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Kolorektal kanseri olan 13 hastanın tümörlü dokusunun 8'inde ( 8/13 %62), meme kanseri olan 7 hastanın tümörlü dokusunun 3'ünde (3/7, %43) ve mide kanseri olan 6 hastanın tümörlü dokusunun ise 3'ünde (3/6, %50) HINT1 ekspresyon oranının normal dokuya oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Tablo 5'de hastaların tümör gruplarına göre HINT1 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve rölatif kantifikasyon (RK) değerleri verilmiştir.

**Tablo 5. Hasta grubunda HINT1 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları**

<b>HINT1</b>						
<b>Hasta No</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Yaş</b>	<b>Evre</b>	<b>Normal Doku Ekspresyonu</b>	<b>Tümör Doku Ekspresyonu</b>	<b>RK Ekspresyon Oranı</b>
<b>Kolorektal</b>						
1	Erkek	50	1	0.211	0.170	0.808
2	Erkek	63	1	0.401	0.147	0.365
3	Erkek	55	1	0.515	0.016	0.319
4	Kadın	59	1	0.097	3.862	39.514
5	Kadın	48	1	0.153	0.267	1.743
6	Erkek	63	2	0.084	0.134	1.576
7	Kadın	53	2	0.769	0.449	0.584
8	Kadın	53	3	0.047	0.249	5.260
9	Kadın	57	3	0.060	0.033	0.549
10	Kadın	48	3	0.323	0.011	0.034
11	Erkek	68	4	1,069	0.107	0.100
12	Kadın	70	4	0.0169	0.271	16.098
13	Kadın	51	4	0.627	0.352	0.561
<b>Mide</b>						
1	Erkek	61	1	0.148	0.107	0.721
2	Kadın	68	1	0.052	0.029	0.562
3	Erkek	66	3	0.030	0.360	12.116
4	Erkek	62	3	0.475	0.186	0.391
5	Erkek	46	4	0.034	0.076	2.236
6	Kadın	51	4	0.015	0.055	3.696
<b>Meme</b>						
1	Kadın	44	1	0.086	0.241	2.809
2	Kadın	31	2	0.009	0.105	11.329
3	Kadın	39	2	0.023	0.788	34.652
4	Kadın	53	2	0.031	0.026	0.846
5	Kadın	57	2	0.032	0.080	2.465
6	Kadın	74	2	0.037	0.021	0.576
7	Kadın	67	3	0.056	0.036	0.636

1'in altındaki RK değerlerinin, normal doku ekspresyon oranının tümör dokusundan daha yüksek olduğunu ifade ettiği göz önüne alındığında, Tablo 6.'daki verilere ulaşılmaktadır.

**Tablo 6. Kanserli dokularda HINT1 gen ekspresyonunun tümörlü ve normal dokulardaki oranlarının karşılaştırılması**

HINT1 Tümör Doku Ekspresyonu<Normal Doku Ekspresyonu Karşılaştırılması							
	Cinsiyet			Yaş		Evre	
	Toplam (n) (%)	Kadın n (%)	Erkek n (%)	≤60 n (%)	>60 n (%)	Erken Faz n (%)	İleri Faz n (%)
<b>Total Hasta</b>	14/26(%54)	8/17(%47)	6/9(%67)	7/16(%44)	7/10(%70)	8/15 (%53)	6/11(%55)
<b>Kolorektal</b>	8/13(%62)	4/8(%50)	4/5(%80)	6/9(%67)	2/4(%50)	4/7(%57)	4/6(%67)
<b>Meme</b>	3/7(%43)	3/7(%43)	-	1/5(%20)	2/2(%100)	2/6(%33)	1/1(%100)
<b>Mide</b>	3/6(%50)	1/2(%50)	2/4(%50)	0/2(0)	3/4(%75)	2/2(%100)	1/4(%25)

Kanser tiplerine göre normal ve tümörlü dokuların ortalama ekspresyon oranlarına bakıldığında ise tabloda görüldüğü gibi genel olarak HINT1'in tümör doku ekspresyonları total hasta grubunda ve kolorektal kanserli hastalarda daha düşük görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 7).

**Tablo 7. Total ve kanser tiplerine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri.**

	HINT1			
	n	Normal Doku Ekspresyonu	Tümör Dokusu Ekspresyonu	p
<b>Total hasta</b>	26	0.21 ± 0.28	0.31 ± 0.74	0.507
<b>Kolorektal kanser</b>	13	0.34 ± 0.33	0.47 ± 1.02	0.688
<b>Mide kanseri</b>	6	0.13 ± 0.18	0.14 ± 0.12	0.909
<b>Meme kanseri</b>	7	0.04 ± 0.03	0.19 ± 0.28	0.217

Hasta grubunu yaşa göre değerlendirdiğimizde, 60 yaş ve altı hastaların 8'inde (7/16, %44) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü

dokularda daha düşük bulunmuştur. 61 yaş ve üstü hastaların ise 6'sında (7/10, %70) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda normal dokulara oranla düşük bulunmuştur.

**Tablo 8. Yaş durumlarına ve kanser tiplerine göre hasta gruplarının normal doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan ve tümörlü doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan numunelerinin ortalama değerleri.**

	N	Normal doku ekspresyonu	Tümör doku ekspresyonu
<b>Total grup</b>	26		
Yaş ≤60	16		
N>T	7/16 (%44)	0.362±0.284*	0.151±0.181
T>N	9/16 (%56)	0.055±0.048	0.635±1.231
Yaş >60	10		
N>T	7/10 (%70)	0.320±0.375	0.090±0.064
T>N	3/10 (%30)	0.044±0.036	0.255±0.114
<b>Kolorektal kanseri</b>	13		
Yaş ≤60	9		
N>T	6/9 (%67)	0.417±0.267*	0.172±0.189
T>N	3/9 (%33)	0.099±0.053	1.459±2.081
Yaş >60	4		
N>T	2/4 (%50)	0.735±0.472	0.127±0.028
T>N	2/4 (%50)	0.051±0.048	0.203±0.097
<b>Meme kanseri</b>	7		
Yaş ≤60	5		
N>T	1/5 (%20)	0.031	0.026
T>N	4/5 (%80)	0.038±0.034	0.303±0.331
Yaş >60	2		
N>T	2/2 (%100)	0.047±0.014	0.029±0.010
T>N	-	-	-
<b>Mide kanseri</b>	6		
Yaş ≤60	2		
N>T	-	-	-
T>N	2/2 (%100)	0.024±0.013	0.065±0.015
Yaş >60	4		
N>T	3/4 (%75)	0.225±0.222	0.107±0.078
T>N	1/4 (%25)	0.030	0.360

\* p<0.05 Tümör doku ekspresyonu ile karşılaştırıldığında

Total hasta grubuna bakıldığında 60 yaş ve altı olan hastaların normal dokulardaki HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokudan daha yüksek olanların istatistiksel değerlerine bakıldığında anlamlı bir oran görülmektedir. Aynı şekilde kolorektal kanserli 60 yaş ve altı hastaların istatistiksel değerlendirmesi anlamlı bir sonuç vermektedir (p<0.05). Diğer

hasta gruplarında yaşa göre yapılan istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 8).

Mide kanserli 60 yaş ve altı 2 hastada (2/2, %100) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda yüksek çıkarken, 61 yaş üstü 4 hastanın ise 3'ünde (3/4, %75) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha düşük çıkmıştır.

Kolorektal kanserli 60 yaş ve altı 9 hastanın 6'sında (6/9, %67) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda düşük çıkarken, 61 yaş üstü 2 hastada (2/4, %50) düşük çıkmıştır. Meme kanserli 60 yaş ve altı 2 hastada (2/2, %100) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda yüksek çıkarken, 61 yaş üstü 4 hastanın ise 3'ünde (3/4, %75) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha düşük çıkmıştır.

**Tablo 9. Yaş gruplarına göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri.**

	n	HINT1		P
		Normal Doku Ekspresyonu	Tümör Dokusu Ekspresyonu	
<b>Total Hasta</b>				
≤60	16	0.19 ± 0.24	0.42 ± 0.94	0.356
>60	10	0.24 ± 0.33	0.14 ± 0.11	0.414
<b>Kolorektal Kanser</b>				
≤60	9	0.31 ± 0.27	0.60 ± 1.23	0.441
>60	4	0.39 ± 0.48	0.16 ± 0.07	0.465
<b>Meme Kanseri</b>				
≤60	5	0.04 ± 0.03	0.25 ± 0.31	0.441
>60	2	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	*
<b>Mide Kanseri</b>				
≤60	2	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01	*
>60	4	0.18 ± 0.21	0.17 ± 0.14	0.715

\* Veri sayısı az olduğu için değerlendirilemedi.

Yaşa göre yapılan değerlendirmede, ortalama değerlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ( $p>0.05$ ) (Tablo 9).

Total hasta grubu, kanser evrelerine göre incelendiğinde, erken fazdaki 15 hastanın 8'sinde (8/15, %53) HINT1'in tümörlü dokudaki oranı, normal dokuya oranla düşük çıkmıştır. İleri fazdaki 11 hastanın ise 6'sında (6/11, %55) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokuda normal dokuya göre daha düşük gözlenmiştir.

**Tablo 10. Evrelerine ve kanser tiplerine göre hasta gruplarının normal doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan ve tümörlü doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan numunelerinin ortalama değerleri.**

	n	Normal doku ekspresyonu	Tümör doku ekspresyonu
<b>Total grup</b>	26		
Erken faz	15		
N>T	8/15(%53)	0.271±0.268*	0.121±0.145
T>N	7/15 (%47)	0.069±0.051	0.782±1.380
İleri faz	11		
N>T	6/11 (%55)	0.435±0.384	0.121±0.130
T>N	5/11 (%45)	0.029±0.013**	0.202±0.132
<b>Kolorektal kanseri</b>	13		
Erken faz	7		
N>T	4/7 (%57)	0.474±0.233	0.196±0.182
T>N	3/7 (%43)	0.112±0.036	1.421±2.116
İleri faz	6		
N>T	4/6 (%67)	0.520±0.433	0.126±0.156
T>N	2/6 (%33)	0.032±0.022	0.260±0.016
<b>Meme kanseri</b>	7		
Erken faz	6		
N>T	2/6 (%33)	0.034±0.004	0.024±0.003
T>N	4/6 (%67)	0.038±0.034	0.303±0.331
İleri faz	1		
N>T	1/1 (%100)	0.056	0.036
T>N	-	-	-
<b>Mide kanseri</b>	6		
Erken faz	2		
N>T	2/2 (%100)	0.100±0.068	0.068±0.055
T>N	-	-	-
İleri faz	4		
N>T	1/4 (%25)	0.475	0.186
T>N	3/4 (%75)	0.026±0.010	0.163±0.170

\*  $p=0.056$  Tümör doku ekspresyonu ile karşılaştırıldığında

\*\*  $p<0.05$  Tümör doku ekspresyonu ile karşılaştırıldığında

Evrelere göre yapılan değerlendirmede ileri fazdaki tümör dokularında HINT1 ekspresyon oranı normal dokulara göre yüksek olan hastaların istatistiksel değerlendirilmesinde anlamlı bir sonuç elde edilmiştir (p<0.05). Diğer hasta gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir (p>0.05) (Tablo 10).

Kanser tiplerine göre farklı evrelerdeki tümörlü dokuların HINT1 ekspresyon oranları gözleendiğinde kolorektal kanserli erken fazdaki 7 hastanın 4'ünde ( 4/7, %57) HINT1 ekspresyon oranı düşük gözlenirken, ileri fazdaki 6 hastanın 4'ünde (4/6, %67) düşüktür.

**Tablo 11. Hastalığın evresine göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri.**

	n	HINT1		P
		Normal Doku Ekspresyonu	Tümör Dokusu Ekspresyonu	
<b>Total Hasta</b>				
Erken Faz	15	0.18 ± 0.22	0.43 ± 0.97	0.349
İleri Faz	11	0.25 ± 0.35	0.16 ± 0.13	0.416
<b>Kolorektal Kanser</b>				
Erken Faz	7	0.32 ± 0.26	0.72 ± 1.39	0.505
İleri Faz	6	0.36 ± 0.42	0.17 ± 0.140	0.353
<b>Meme Kanseri</b>				
Erken Faz	6	0.04 ± 0.03	0.21 ± 0.29	0.210
İleri Faz		0.06	0.04	
<b>Mide Kanseri</b>				
Erken Faz	2	0.10 ± 0.07	0.07 ± 0.06	*
İleri Faz	4	0.14 ± 0.22	0.17 ± 0.14	0.824

\* Veri sayısı az olduğu için değerlendirilemedi.

Meme kanserli erken fazdaki 6 hastanın 2'sinde (2/6, %33) HINT1 ekspresyon oranı düşük gözlenmiştir. İleri fazda 1 hasta olması nedeniyle karşılaştırma yapılamamıştır.

Mide kanserli erken fazdaki 2 hastada tümörlü dokuda HINT1 ekspresyon yüksekliği gözlenmezken, ileri fazdaki 4 hastanın 1'inde (1/4, %25) tümörlü dokudaki HINT1 ekspresyon oranı normal dokuya göre düşük olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte, ortalama değerlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ( $p>0.05$ ) (Tablo 11).

Hasta grubunu cinsiyet göre değerlendirdiğimizde ise, kadın hastaların 8'inde (8/17, %47) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda daha düşük bulunmuştur. Erkek hastaların ise 6'sında (6/9, %67) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda normal dokulara oranla düşük bulunmuştur.

Kolorektal kanserli hastalarda 8 kadın hastanın 4'ünde (4/8, %50), 5 erkek hastanın ise 4'ünde (4/5, %80) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda normal dokulara oranla düşük çıkmıştır. Meme kanserli 7 kadın hastanın 3'ünde (3/7, %43) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda düşük çıkmıştır.

Cinsiyetlere göre grupların istatistiksel değerlendirmesinde, normal dokudaki HINT1 ekspresyon oranı yüksek olan total gruptaki kadın hastalarda ve kolorektal kanserli kadın hastalarda anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ( $p<0.05$ ). Diğer gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 12)

**Tablo 12. Cinsiyetlere ve kanser tiplerine göre hasta gruplarının normal doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan ve tümörlü doku HINT1 gen ekspresyonları daha fazla olan numunelerinin ortalama değerleri.**

	n	Normal doku ekspresyonu	Tümör doku ekspresyonu
<b>Total grup</b>	26		
Kadın	17		
N>T	8/17 (%47)	0.224±0.298*	0.120±0.175
T>N	9/17 (%53)	0.053±0.049	0.658±1.221
Erkek	9		
N>T	6/9 (%67)	0.470±0.327**	0.122±0.061
T>N	3/9 (%33)	0.049±0.031	0.190±0.150
<b>Kolorektal kanseri</b>	13		
Kadın	8		
N>T	4/8 (%50)	0.445±0.317*	0.211±0.222
T>N	4/8 (%50)	0.079±0.060	1.162±1.800
Erkek	5		
N>T	4/5 (%80)	0.549±0.369	0.110±0.068
T>N	1/5 (%20)	0.085	0.134
<b>Meme kanseri</b>	7		
Kadın	7		
N>T	3/7 (%43)	0.041±0.013	0.028±0.007
T>N	4/7 (%57)	0.038±0.034	0.303±0.331
<b>Mide kanseri</b>	6		
Kadın	2		
N>T	1/2 (%50)	0.052	0.029
T>N	1/2 (%50)	0.015	0.055
Erkek	4		
N>T	2/4 (%50)	0.311±0.231	0.146±0.056
T>N	2/4 (%50)	0.032±0.029	0.218±0.003

\* p<0.05 Tümör doku ekspresyonu ile karşılaştırıldığında

\*\* p=0.057 Tümör doku ekspresyonu ile karşılaştırıldığında

Mide kanserli 2 kadın hastanın 1'inde (1/2, %50), 4 erkek hastanın ise 2'sinde (2/4, %50) HINT1 ekspresyon oranı tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha düşük çıkmıştır. Cinsiyete göre yapılan değerlendirmede, ortalama değerlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (p>0.05) (Tablo 13).

**Tablo 13. Cinsiyete göre hastaların normal ve tümör dokularında saptanan HINT1 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri.**

<b>HINT1</b>				
	<b>n</b>	<b>Normal Doku Ekspresyonu</b>	<b>Tümör Dokusu Ekspresyonu</b>	<b>P</b>
<b>Total Hasta</b>				
Kadın	17	0.14 ± 0.22	0.40 ± 0.91	0.349
Erkek	9	0.33 ± 0.33	0.15 ± 0.10	0.416
<b>Kolorektal Kanser</b>				
Kadın	8	0.26 ± 0.29	0.69 ± 1.29	0.505
Erkek	5	0.46 ± 0.38	0.12 ± 0.06	0.353
<b>Meme Kanseri</b>				
Kadın	7	0.04 ± 0.03	0.19 ± 0.028	0.210
<b>Mide Kanseri</b>				
Kadın	2	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.02	*
Erkek	4	0.17 ± 0.21	0.18 ± 0.13	0.180

\* Veri sayısı az olduğu için değerlendirilemedi.

Tablo 14.de hastaların tümör gruplarına göre SOD1 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve rölatif kantifikasyon (RK) değerleri verilmiştir.

**Tablo 14. Hasta grubunda SOD1 geninin normal ve tümör dokularında saptanan ekspresyon değerleri ve oranları.**

<b>SOD1</b>						
<b>Hasta No</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Yaş</b>	<b>Evre</b>	<b>Normal Doku Ekspresyonu</b>	<b>Tümör Doku Ekspresyonu</b>	<b>RK Ekspresyon Oranı</b>
<b>Kolorektal</b>						
1	Erkek	50	1	0.384	0.085	0.222
2	Erkek	63	1	0.440	0.364	0.828
3	Erkek	55	1	0.626	0.048	0.077
4	Kadın	59	1	0.190	2.851	14.992
5	Kadın	48	1	0.804	1.080	1.343
6	Erkek	63	2	0.151	0.282	1.876
7	Kadın	53	2	0.662	0.191	0.288
8	Kadın	53	3	0.218	0.405	1.861
9	Kadın	57	3	0.103	0.127	1.234
10	Kadın	48	3	0.435	0.026	0.060
11	Erkek	68	4	0.737	0.646	0.878
12	Kadın	70	4	0.027	0.615	22.913
13	Kadın	51	4	0.763	0.920	1.205
<b>Mide</b>						
1	Erkek	61	1	0.295	0.307	1.039
2	Kadın	68	1	0.351	0.201	0.572
3	Erkek	66	3	0.248	0.305	1.227
4	Erkek	62	3	0.868	7.896	9.101
5	Erkek	46	4	0.135	0.035	0.260
6	Kadın	51	4	0.039	0.125	3.226
<b>Meme</b>						
1	Kadın	44	1	0.095	0.758	7.988
2	Kadın	31	2	0.030	0.616	20.541
3	Kadın	39	2	0.231	0.877	3.798
4	Kadın	53	2	0.076	0.108	1.419
5	Kadın	57	2	0.032	0.517	15.975
6	Kadın	74	2	0.187	0.071	0.382
7	Kadın	67	3	0.502	0.254	0.505

Ekspresyon değerlerine bakılarak yapılan değerlendirmede, 26 hastanın 10'unda (10/26, %39) tümörlü dokudaki SOD1 ekspresyon oranının normal dokuya göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Kolorektal kanseri olan 13 hastanın tümörlü dokusunun 6'sında (6/13 %46), meme kanseri olan 7 hastanın tümörlü dokusunun ise 2'sinde (2/7, %29) ve mide kanseri olan 6 hastanın tümörlü dokusunun 2'sinde (2/6, %33) SOD1 ekspresyon oranının normal dokuya oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Tabloda RK değeri 1'in altında olan hastaların normal doku SOD1 ekspresyon oranı daha yüksek bulunmuştur. Bu doğrultuda sonuçlar incelendiğinde Tablo 15.'deki verilere ulaşılmaktadır.

**Tablo 15. Kanserli dokularda SOD1 gen ekspresyonunun tümörlü ve normal dokulardaki oranlarının karşılaştırılması.**

SOD1 Tümör Doku Ekspresyonu<Normal Doku Ekspresyonu Karşılaştırılması							
	Cinsiyet			Yaş		Evre	
	Toplam (n) (%)	Kadın n (%)	Erkek n (%)	≤60 n (%)	>60 n (%)	Erken Faz n (%)	İleri Faz n (%)
<b>Total Hasta</b>	10/26(%38)	5/17(%29)	5/9(%56)	5/16(%31)	5/10(%50)	6/15(%40)	4/11(%36)
<b>Kolorektal</b>	6/13(%46)	2/8(%25)	4/5(%80)	4/9(%44)	2/4(%50)	4/7(%57)	2/6(%33)
<b>Meme</b>	2/7(%29)	2/7(%29)	-	1/5(%20)	1/2(%50)	1/6(%17)	1/1(%100)
<b>Mide</b>	2/6(%33)	1/2(%50)	1/4(%25)	0/2(0)	2/4(%50)	1/2(%50)	1/4(%25)

Hastalarda HINT1 ve SOD1 genlerinin normal ve tümör doku ekspresyonlarını incelediğimizde 26 hastanın 20'sinde aynı anda azalma ya da artma görülmüştür. Bu sayı kolorektal kanserde 11/13 iken, mide kanserinde 3/6 ve meme kanserinde 6/7 olarak bulunmuştur. (Tablo 16)

**Tablo 16. Hasta grubunda HINT1 ve SOD1 genlerinin normal ve tümör doku ekspresyonlarının karşılaştırılması.**

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Evre	HINT1 (+/-)	SOD1 (+/-)
<b>Kolorektal</b>					
1	Erkek	50	1	-	-
2	Erkek	63	1	-	-
3	Erkek	55	1	-	-
4	Kadın	59	1	+	+
5	Kadın	48	1	+	+
6	Erkek	63	2	+	+
7	Kadın	53	2	-	-
8	Kadın	53	3	+	+
9	Kadın	57	3	-	+
10	Kadın	48	3	-	-
11	Erkek	68	4	-	-
12	Kadın	70	4	+	+
13	Kadın	51	4	-	+
<b>Mide</b>					
1	Erkek	61	1	-	0
2	Kadın	68	1	-	-
3	Erkek	66	3	+	+
4	Erkek	62	3	-	+
5	Erkek	46	4	+	-
6	Kadın	51	4	+	+
<b>Meme</b>					
1	Kadın	44	1	+	+
2	Kadın	31	2	+	+
3	Kadın	39	2	+	+
4	Kadın	53	2	-	+
5	Kadın	57	2	+	+
6	Kadın	74	2	-	-
7	Kadın	67	3	-	-

+ / - Tümör doku ekspresyonu fazla / az  
0 Ekspresyon değişmedi

## Korelasyonlar

Meme kanseri grubu hariç, total hasta, mide ve kolorektal kanser gruplarında normal doku HINT1 ve SOD1 ekspresyonu arasında yüksek pozitif korelasyonlar gözlenmiştir (Tablo 12). Tümör dokularındaki ekspresyon oranlarına bakıldığında, kolorektal kanserinde ve meme kanserinde HINT1 ve SOD1 arasında pozitif korelasyonlar gözlenmiştir (Tablo 17).

**Tablo 17. Hasta gruplarına göre normal doku ve tümör dokularındaki HINT1 ve SOD1 arasındaki korelasyonlar.**

	HINT1 Normal Doku Ekspresyonu	HINT1 Tümör Doku Ekspresyonu
<b>Total Hasta</b>		
<b>SOD1 Normal Doku Ekspresyonu</b>	<b>0.768</b> <b>0.0001</b>	--
<b>SOD1 Tümör Doku Ekspresyonu</b>	--	0.295 0.144
<b>Kolorektal Kanseri</b>		
<b>SOD1 Normal Doku Ekspresyonu</b>	<b>0.753</b> <b>0.003</b>	--
<b>SOD1 Tümör Doku Ekspresyonu</b>	--	<b>0.919</b> <b>0.0001</b>
<b>Mide Kanseri</b>		
<b>SOD1 Normal Doku Ekspresyonu</b>	<b>0.945</b> <b>0.004</b>	--
<b>SOD1 Tümör Doku Ekspresyonu</b>	--	0.220 0.676
<b>Meme Kanseri</b>		
<b>SOD1 Normal Doku Ekspresyonu</b>	0.280 0.543	--
<b>SOD1 Tümör Doku Ekspresyonu</b>	--	<b>0.758</b> <b>0.048</b>

## 5. TARTIŞMA

Histidin üçlü nükleotid bağlayıcı protein (HINT1), her yerde bulunabilen, bir nükleozid monofosfat ve ayrılan bir amin grubu arasındaki fosforamidat bağı hidrolizini katalize eden bir purin nükleozid fosforamidazdır<sup>63,106</sup>. HINT'lerin fosforamidaz enzim aktivitesinin, antiviral ve anti-kanser fosforamidat pronükleotidler için biyoaktif etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür<sup>106,107</sup>. Son zamanlarda, aminoaçil-AMP ve açil-AMP, HINT'ler için birinci potansiyel doğal substratlar olarak gösterilmiştir<sup>108,109</sup>.

HINT1 proteini, beş alt-familyadan oluşan evrimsel olarak korunmuş HIT protein süper ailesine aittir<sup>19</sup>. Önceki çalışmalarda, HINT1 yoksun farelerde kimyasal kanserojen madde ile indüklenen mide tümörleri<sup>110</sup>, meme tümörleri<sup>111</sup> ve yumurtalık tümörleri oluşumuna<sup>112</sup> duyarlılıkta belirgin bir artış olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, yaşlanma ile, Hint1 yoksun farelerde spontan olarak çeşitli tümörlerin oluşumunda bir artış gözlenmiştir<sup>111</sup>.

Sığır HINT1'i 1990 yılından beri bilinmesine rağmen<sup>57</sup>, HINT sadece hücresel fonksiyonu kötü tanımlanmış HIT'in alt familyası olarak kabul edilmekteydi. Farelerde yapılan çalışmalar, HINT1'in bir tümör supresör olarak işlev gösterdiğine dair kanıtlar sağlamıştır<sup>111,110</sup>, ancak HINT1'in tümör oluşumunu baskılama mekanizması açık değildir. Memeli HINT1 protein-protein etkileşimi çalışmaları göstermektedir ki, onun transkripsiyon düzenleyici rolü ya direkt olarak temel transkripsiyonel makineye<sup>71</sup> ya da çekirdek içindeki transkripsiyon faktörlerinin spesifik komplekslerine bağlanmak suretiyle<sup>73,112</sup> ortaya çıkar.

HINT1 proteininin gen transkripsiyonunu kontrol eden çeşitli yollarda bir inhibitör rolü olduğuna dair biriken kanıtlar vardır. Böylece, çeşitli hücre sistemlerinde HINT1 siklin-bağımlı kinaz 7 (CDK7)<sup>70</sup>, MITF olarak da bilinen transkripsiyon faktörü mikroftalmi (Mi)<sup>71</sup>, transkripsiyon faktörü USF2<sup>72</sup> ve Pontin/Reptin/ $\beta$ -katenin/TCF4 kompleksi<sup>58</sup>, nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)<sup>73</sup> ile etkileşebilir ve aktivitelerini inhibe edebilir. Ayrıca SW480 kolon kanser hücrelerinde HINT1'in bir iskele protein olan SH3 (POSH)-JNK2 kompleksi ile etkileşime girdiği ve böylece, AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesini inhibe ettiği gösterildi<sup>74</sup>.

Yapılan çalışmalar ışığında, çalışmamızda bir tümör supressör gen olarak ifade edilen HINT1'in değişik kanser türlerindeki normal doku-tümör doku ekspresyon oranlarını incelediğimizde, total olarak hastaların yaklaşık %54'ünde tümör doku ekspresyonu daha düşük bulunmuştur. Kolorektal kanseri olan 13 hastanın tümörlü dokusunun 8'inde ( 8/13 %61.54), meme kanseri olan 7 hastanın tümörlü dokusunun ise 3'ünde (3/7, %42.86) ve mide kanseri olan 6 hastanın tümörlü dokusunun 3'ünde (3/6, %50) HINT1 ekspresyon oranının normal dokuya oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, PKCI (HINT1) ifadenmesindeki bir eksikliğin fare embriyonik fibroblast hücrelerinde ölümsüzleşmeyi artırabileceği ve aynı zamanda iyonize radyasyona karşı dirençli hale getirilebileceği gösterilmiştir. Bundan başka, bu eksikliğin farelerin karsinojen-indüklü tümör oluşumuna duyarlılığını artıracakı belirtilmiştir. Çalışmada, kimyasal karsinogene (N-nitrozometilbenzilamin, NMBA) maruz bırakılmış PKCI<sup>-/-</sup> farelerin %58'inde tümör oluşumu gözlenirken, PKCI<sup>+/+</sup> farelerde bu oran %36 civarındadır<sup>110</sup>.

Yapılan başka bir deneyde ise farklı HINT1 genotiplerine sahip farelerde kanser oluşumu incelenmiştir. DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antrasen) verilmiş farelerde, HINT1<sup>+/-</sup> 25 farenin 7'sinde (%28.0), HINT1<sup>-/-</sup> 37 farenin 10'unda (%27.0), HINT1<sup>+/+</sup> 38 farenin 2'sinde (%5.3) meme tümörü saptanmıştır. Farklı dokular incelendiğinde ise, HINT1<sup>+/-</sup> farelerin %20.0'sinde, HINT1<sup>-/-</sup> farelerin %21.6'sında, HINT1<sup>+/+</sup> farelerin %2.6'sında over tümörüne rastlanmıştır. Bu veriler HINT<sup>+/+</sup> farelerde diğer genotiplere oranla kansere yakalanma olasılığının daha az olduğunu göstermiştir. Total tümürlü dokular ele alındığında ise HINT1<sup>+/-</sup> ve HINT1<sup>-/-</sup> farelerde sırasıyla %52.0 ve %67.6 oranları görülürken, HINT1<sup>+/+</sup> farelerde bu oran %15.8'dir<sup>111</sup>.

Tümöre neden olan NCI-H522 ve NCI-H358 hücreleri üzerinde HINT geninin tümör baskılama etkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, tümöre sebep olan bu 2 hücre dizisi deney farelerine transfekte edilmiştir. NCI-H358 hücreleri transfekte edildiği bilinen hayvanlara pLXSN-HINT1 ya da sadece PLXSN tümörleri deneyin 4 haftası boyunca geliştirilmiştir. PLXSN tümörleri, Moloney kemirgen lösemi virüsü ve Moloney fare sarkom virüsü türevi elemanlar içeren ve retroviral gen üretimi ve ifadesi için türetilmiş bir virüs çeşididir. Gözlem süresince sadece pLXSN'e sahip farelerde tümörün büyümesi devam etmiş, fakat pLXSN-HINT/PKCI1 transfekte edilen farelerin tümör gelişiminde anlamlı ölçüde yavaşlama gözlenmiştir. Bu iki enjekte grubun tümör miktarları arasında oldukça dikkat çeken fark gözlenmiştir<sup>67</sup>.

Huang ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, çalışmamıza benzer şekilde mide kanserli 34 hastanın tümör ve normal dokusundaki HINT1 mRNA ve protein ekspresyonları incelenmiştir. Çalışma sonucunda, hastaların %59'unda tümör dokusu mRNA ekspresyonu düşük bulunurken, %39'unda tümör dokusu HINT1 protein ekspresyonu düşük bulunmuştur<sup>113</sup>.

Total hasta grubuna bakıldığında, kadın hastaların %41'inde HINT1 gen ekspresyon oranında azalma gözlenirken erkek hastaların %67'sinde bu oranda azalma gözlenmiştir. Erkek hastalardaki bu azalma kolorektal kanserde (%80) belirgindi. Huang ve arkadaşlarının çalışmasında, mide kanserli erkek hastaların yaklaşık %38'inde HINT1 tümör doku ekspresyonu düşük bulunurken, kadınlarda bu oran yaklaşık %41 olarak ifade edilmiştir<sup>113</sup>. Bizim çalışmamızda bu oran her iki cinsiyette de %50 olmakla birlikte mide kanserli hasta sayısının az olması yorum yapmayı güçleştirmektedir.

Çalışmamızda yer alan 60 yaş ve altı hastaların %37.5'inde HINT1 ekspresyon oranı azalırken, 61 yaş üstü hastaların %70'inde HINT1 gen ekspresyon oranında azalma gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada, Huang ve arkadaşları, mide kanserli hastaların aynı yaş gruplarının sırasıyla %41 ve %38'inde HINT1 gen ekspresyon oranında azalma göstermişlerdir<sup>113</sup>.

Yine evrelere göre değerlendirme yapıldığında, her 2 çalışmada da erken fazda HINT1 ekspresyon oranlarında benzer sonuçlar elde edilmiştir (yaklaşık %50). Çalışmamızda ileri fazdaki hastaların %45'inde HINT1 ekspresyon oranlarında azalma gözlenirken, Huang ve arkadaşlarının çalışmasında bu oran %37 olarak bulunmuştur<sup>113</sup>.

Tümör supresör genler DNA hasarının onarımı, hücre döngüsü durdurma, mitojenik sinyalizasyon, hücre farklılaşması, göçü ve programlı hücre ölümü de dahil olmak üzere farklı hücresel faaliyetleri düzenlerler. p53, FoxO, retinoblastoma (RB), p21, p16, ve meme kanseri duyarlılık genleri 1 ve 2 (BRCA1 ve BRCA2) gibi tümör supresör genler, onların yolakları ve reaktif oksijen türleri (ROT) arasındaki bağlantılar ve etkileşim nedeniyle pro-oksidan ya da antioksidan olarak

değerlendirilebilmektedir. Çok sayıda çalışma sonuçları, oksidatif strese cevap olarak bazı iyi bilinen antioksidan genlerin ekspresyonunu aktive eden tümör supresör proteinlerin bir antioksidan rolü olduğunu göstermiştir. Öte yandan, son çalışmalar proapoptotik genlerin transkripsiyonunu artırmak suretiyle hücrel ROT'u arttırdığı için p53'ün bir pro-oksidan rolünü ortaya koymuştur<sup>114</sup>.

Bakır/çinko süperoksit dismutaz 1 (SOD1) süperoksit radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumada yaşamsal bir önemi olan başlıca hücrel savunma enzimlerinden biridir. Enzim, süperoksit radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eder. SOD sadece in vitro olarak Fenton reaksiyonunu önlemekle kalmaz, aynı zamanda süperoksit olmadan, in vivo DNA hasar oluşumuna doğrudan karışan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toksisitesine karşı da koruyucudur. Süperoksitler üretimi ve/veya uzaklaştırılmasının hem hücrel hem de organizma seviyesinde kritik homeostatik çeşitli mekanizmalarda önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Biyolojik makromoleküllerin fazla oksijen radikalinin zararlı etkileri için hedefler olmalarından dolayı, bu artan süperoksitlerin başlangıçta SOD tarafından yok edilmesi gerektiği kabul edilmektedir.

Araştırma sonuçları, kanser gelişimi sırasında tümör hücrelerinin sitoplazmada bulunan SOD1 tarafından sağlanan antioksidatif savunmanın stabil bir seviyede olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, artmış bir SOD1 protein düzeyi, daha önce Yoo ve arkadaşları tarafından teyit edildiği gibi yüksek düzeyde bir ROT'a tepki olabilir<sup>115</sup>. Bu tümör hücrelerinde bulunan ROT'un SOD1 proteininin ekspresyonunu stimüle ettiğini, ama aynı zamanda kısmen SOD1 aktivitesini redüklediğini gösterebilir. Lipid peroksidasyon düzeyinin düşük olmasına rağmen, ROT'un önceki çalışmalarda da<sup>116,117</sup> gösterildiği gibi tümör hücresinde, antioksidan savunma etkisi bulunmaktadır. Bu, SOD1'in düşük aktivitesine

rağmen hücrel yapıları oksidatif strese karşı savunmasının mümkün olabileceğini düşündürmektedir<sup>118</sup>.

Çalışmamızda, bir tümör süpresör gen olduğu öne sürülen HINT1'in bilinen diğer antioksidanlarla ilişkisini incelemek amacıyla SOD'lar arasında en yaygın olan SOD1 geninin ekspresyonlarını inceledik. Buna göre, hastaların %38.46'sında tümörlü dokudaki SOD1 ekspresyon oranının normal dokuya göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Kolorektal kanseri olan 13 hastanın %46.15'inde, meme kanseri olan 7 hastanın %28.57'sinde ve mide kanseri olan 6 hastanın %33.33'ünde tümör doku SOD1 ekspresyon oranının normal dokuya oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Genellikle SOD1 ile ilgili yapılan çalışmalar, enzim polimorfizmi ile ilgili olup, SOD1'in tümör ve normal dokudaki gen ekspresyonlarını gösteren fazla çalışma bulunamamıştır. Bununla birlikte yapılan çalışmalardan birinde, akciğer kanserli hastalarda tümör dokusunda SOD1 'in aşırı eksprese edildiği ve yüksek SOD1 düzeyli hücrelerin tümörjenez sırasında selektif bir avantaja sahip oldukları öne sürülmüştür<sup>119</sup>.

Meme kanserli hastalarda yapılan bir başka çalışmada, östrojene-duyarlı gen ekspresyonunun düzenlenmesinde SOD1'in yeni bir rolü keşfedilmiş ve SOD1'deki 17 beta-östrodiol- ve KO<sub>2</sub> (Potasyum süperoksit) indüklü artışın, meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasında ve meme tümörlerinin ilerlemesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür<sup>120</sup>.

Çalışmamızda, bir tümör supressör gen olarak kabul edilen HINT1'in değişik kanserlerdeki normal doku ve tümör dokusu gen ekspresyon oranlarını incelemenin yanısıra, onun SOD1 gibi yaygın ve iyi bilinen bir antioksidan ile olan ilişkilerini de inceledik. Bunun sonucunda, 26 hastanın 20'sinde HINT1 ve SOD1'in artış ve azalışlarında paralellik

olduğunu gözlemledik. Normal doku ve tümör doku ekspresyonları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, total hasta grubunda ve mide kanserinde normal dokuda HINT1 ve SOD1 arasında yüksek korelasyon gözlenirken, tümör dokusunda korelasyon gözlemedik. Kolorektal kanserde, hem normal hem tümör dokusunda HINT1 ve SOD1 arasında korelasyon gözledik. Meme kanserinde ise yalnızca tümör dokusunda ve istatistiksel olarak anlamlı ancak, zayıf bir korelasyon gözledik. HINT1 gen ekspresyonunun SOD1 ile göstermiş olduğu paralellik ve aralarındaki pozitif korelasyon, onun bir antioksidan olarak da rol oynayabileceğini düşündürür.

## 6. SONUÇLAR

- Çalışmamız insanlarda görülen kanser türlerinde HINT1 gen ekspresyonunu inceleyen az sayıdaki çalışmalardan biridir. Özellikle meme kanseri ve kolorektal kanserde bu genin ekspresyonunu inceleyen çalışma bulunmamaktadır.
- Bir tümör supressör gen olarak normal doku ekspresyonlarının yüksek, tümör doku ekspresyonu düşük olması beklenen HINT1'in kanserde normal doku-tümör doku ekspresyon oranlarını incelediğimizde, total olarak hastaların yaklaşık %54'ünde tümör doku ekspresyonu daha düşük bulunmuştur.
- Kanser evrelerine göre HINT1 gen ekspresyonunda farklılıklar gözlenmezken, özellikle erkek hastalarda tümör doku gen ekspresyonları düşük bulunmuştur.
- Kolorektal kanseri olan hastaların yaklaşık %62'sinin HINT1 tümör doku ekspresyonunun düşük olması, bu kanser türünde HINT1 gen ekspresyonu çalışmalarının detaylı olarak incelenmesi gerektiğini göstermektedir.
- HINT1 gen ekspresyonunun SOD1 geni ile göstermiş olduğu paralellik ve aralarındaki pozitif yüksek korelasyonlar, özellikle kolorektal kanserde, onun bir antioksidan olarak düşünülebileceğini öne sürer.
- Tümör supresör genler ve ROT yolaklarının ortak düzenleyicileri rasyonel tedavi hedefleri olabilir.

## 7. ÖZET

Evrimsel açıdan yüksek oranda korunmuş olan HIT protein süper ailesinin üyesi Histidin Triad Nükleotid bağlayıcı protein1 (HINT1), memeli dokuları dahil çeşitli türlerde yaygın olarak eksprese edilen bir gen dir. HINT1'in önemli bir tümör supresör gen olduğuyla ilgili giderek artan sayıda çalışma olmasına rağmen, onun tümör baskılama konusundaki etkinliği ve mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızın başlıca amacı HINT1'in değişik kanserlerdeki gen ekspresyon oranlarındaki değişiklikleri incelemektir. Biz ayrıca onun antioksidan özelliği olup olmadığını da incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda, RT-PCR yöntemiyle kolorektal, mide ve meme kanserlerinde HINT1'in ve SOD1' in normal ve tümör dokularında gen ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. HINT1'in ekspresyon değerleri, toplam 26 hastanın 14'ünde (%53.85), kolorektal kanseri olan 13 hastanın 8'inde (%61.54), meme kanseri olan 7 hastanın 3'ünde (%42.86) ve mide kanseri olan 6 hastanın 3'ünde (%50) tümör dokusunda normal dokuya oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, HINT1'in tümörlü doku ortalama ekspresyon düzeyleri normal dokulardakinden istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Tümör dokularındaki SOD1 ekspresyon değerlerinin, ilginç olarak, toplam 26 hastanın 10'unda (10/26, %38.46), kolorektal kanseri olan 13 hastanın 6'sında (%46.15), meme kanseri olan 7 hastanın 2'sinde (%28.57) ve mide kanseri olan 6 hastanın 2'sinde (%33.33) normal dokuya göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Total kanser hastalarının normal dokularında ( $R=0.768$ ,  $p<0.0001$ ), kolorektal kanser hastalarının hem normal ( $R=0.753$ ,  $p<0.005$ ) hem de tümör dokularında ( $R=0.768$ ,  $p<0.0001$ ), ve mide kanseri hastalarının normal dokularında ( $R=0.945$ ,  $p<0.0001$ ) HINT1 ve SOD1 gen ekspresyonları arasında yüksek korelasyon olduğunu gözledik. Meme kanserli hastaların, sadece tümör dokusunda ( $R=0.758$ ,  $p<0.05$ ) HINT1 ve SOD1 gen ekspresyonları arasında zayıf pozitif bir korelasyon vardı.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, diğer kanserlerde olmasa da, kolorektal kanserli hastaların çoğunda tümör dokusunda azalan HINT1 gen ekspresyonları, bu kanser türünde HINT1'in tümör supressör özelliğini destekler niteliktedir. Ayrıca iyi bilinen bir antioksidan olan SOD1 ile HINT1 arasındaki yüksek korelasyon, HINT1'in bir tümör supressör gen olmasının yanı sıra, p53 gibi bir antioksidan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** HINT1, SOD1, kanser, gen ekspresyonu

## 8. SUMMARY

Histidine triad nucleotide-binding protein (HINT1), a member of the evolutionary highly conserved HIT protein superfamily, is ubiquitously expressed in diverse species including mammalian tissues. Although an increasing number of studies show that HINT1 is an important tumor suppressor gene, its effectiveness and mechanism of tumor suppression is still unclear. The main purpose of this study was to investigate the changes of HINT1 gene expression rates in various cancers types. We also aimed to study its antioxidant properties by comparing with SOD1, is a well-known antioxidant. The gene expression levels of HINT1 and SOD1 were measured by RT-PCR method in normal and tumor tissues in colon, gastric, and breast cancers. HINT1 expression values were observed to be lower in tumor tissues of 14 of the total 26 patients (%53.85), 8 of 13 patients with colorectal cancer (%61.54), 3 of the 7 patients with breast cancer (%42.86), and 3 of 6 patients with gastric cancer (%50) than in normal tissues . However, the mean levels of HINT1 expression in tumor tissue were higher, but not statistically significant, than those in normal tissues. However, the mean levels of HINT1 expression in tumor tissue were higher, but not statistically significant, than those in normal tissues. Interestingly, SOD1 expression values were found to be lower in tumor tissues of 10 of the total 26 patients (%38.46), 6 of 13 patients with colorectal cancer (%46.15), 2 of the 7 patients with breast cancer (%28.57), and 3 of 6 patients with gastric cancer (%33.33) than in normal tissues. We observed high positive correlations between HINT1 and SOD1 gene expressions in normal tissues ( $R=0.768$ ,  $p<0.0001$ ) of total cancer patients, in both normal ( $R=0.753$ ,  $p<0.005$ ) and tumour tissues ( $R=0.919$ ,  $p<0.0001$ ) of colorectal cancer patients, and in normal tissues ( $R=0.945$ ,  $p<0.005$ ) of gastric cancer patients. There was a weak positive correlation between HINT1 and SOD1 gene expressions in tumour tissue ( $R=0.758$ ,  $p<0.05$ ) of patients with breast cancer. According to the results obtained in

this study, the decreasing HINT1 gene expressions in tumor tissue in the majority of patients with colorectal cancer support tumor suppressor effect of HINT1 in this type of cancer, but not in other cancers. In addition, high correlation between SOD1, well-known antioxidant enzyme, and HINT1 show to be able to evaluate as an antioxidant rather than a tumour suppressor gene.

**Keywords:** HINT1, SOD1, cancer, gene expression

## 9. KAYNAKLAR

1. Devita TV, Hellman S, Rosenberg AS. Cancer Principle&Practice of Oncology. Sixth Edition. Philapelpia, USA: Lippincott Williams&Wilkins; 2001.
2. Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevantion of cancer. Science 1991; 254:1131-1138.
3. Yılmaz E, Altunok V. Kanser ve p53 geni. Avkae Der. 2011; 1: 19-23
4. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. Thompson&Thompson Tıbbi Genetik. Aktaş D (Çev), 6. Baskı. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2005
5. Landis SH, Murray T, Bolden S, et.al. Cancer statistcs. CA Cancer J Clin 1998; 48: 6
6. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri. Erişim tarihi: 15.09.2012  
<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/kanser-istatistikleri.html>
7. Murray RK, Granner DK, Mayes AP, Rodwell WV. Harper'ın Biyokimyası. Dikmen N, Özgünen T. (Çev), Yirmidördüncü baskı. İstanbul; Barış Kitabevi; 1996.
8. TP53. Erişim tarihi: 16.09.2012.  
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>
9. Pazarbaşı A, Kasap M. Kanser genetiği. Çukurova Üni.Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D. Arşiv. 2003; 12: 328
10. Sutherland RL. Molecular basis of carcinogenesis. In: Bishop JF, ed. Cancer Facts: A Concise OncologyText. London, UK: CRC Press, 1999.
11. Willett WC, Hunter D, Colditz GA. Causes of Cancer. In: Graham A, Hingham MA, eds. Cancer Prevention. The Causes and Prevention of Cancer. Dordrecht, The Nerherlands: Kluwer Academic Publishers 2000. p.161-172.
12. Lalloo F (ed). Genetis for Oncologists: The Molecular Genetic Basis of Oncologic Disorders. Oxford: Remedica Publishing, 2002.

13. Kanser Biyolojisi ve Onkogenler: Ana bilgi. Erişim Tarihi: 16.09.2012  
<http://www.stoma-seite.de/SiklusApoptozisKanser.pdf>
14. Greenberg PD. Mechanism of tumor immunology. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, eds. Medical Immunology. 10th ed. New York, NY: McGraw-Hill 2001: 568;57
15. Dzivenu OK, O'Donnell-Tormey P, O'Donnell-Tormey J. Cancer and the immune system: the vital connection. Cancer Research Institute, Resources and Publications 2009.  
<http://www.cancerresearch.org/Resources.aspx?id=572>
16. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nature Immunol 2002. p.991-998.
17. Çefle K. Kanser genetiği. Klinik Gelişim 2009; 22; 3: 50-59
18. Serapin B. The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes yeast and mammals. DNA sequence 1992; 3: 177-179.
19. Brenner C. Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the Histidine Triad Superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. Biochemistry 2002; 41: 9003-9014.
20. Brenner C, Bieganowski P, Pace HC, Huebner K. The Histidine Triad superfamily of nucleotide binding proteins. Journal of Cellular Physiology 1999; 181: 179–187.
21. Kijas AW, Harris JL, Harris JM, Lavin MF. Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities. J Biol Chem 2006; 281: 13939–13948.
22. Brenner C, Garrison P, Gilmour J, Peisach D, Ringe D, Petsko GA and Lowenstein JM. Crystal structures of HINT demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. Nat Struct Biol 1997; March; 4(3): 231–238.

23. Martin J, St-Pierre MV, Dufour JF. Hit proteins, mitochondria and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1807: 626–632.
24. Martin J, Mahnino F, Schmidt K, Piguet AC, et.al. Hint2 a mitochondrial apoptotic sensitizer down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*; 2006; June 130(7): 2179–2188.
25. Chou TF, Cheng J, Tikh IB, Wagner CR. Evidence that human histidine triad nucleotide binding protein 3 (Hint3) is a distinct branch of the Histidine Triad (HIT) superfamily. *Journal of Molecular Biology* 2007;373 November 2: 978-989.
26. Aicardi J, Barbosa C, Andermann E, Andermann F, Morcos R, Ghanem Q, Fukuyama Y, Awaya Y, Moe P. Ataxia-ocular motor apraxia: a syndrome mimicking ataxia-telangiectasia. *Ann. Neurol* 1988; 24: 497–502.
27. Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat. Genet.* 2001; 29: 184–188.
28. Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonca P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T, Watanabe M, Ikeda Y, Aoki M, Nagata T, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat. Genet.* 2001; 29: 189–193.
29. Rass U, Ahel I, West SC. Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways. *J. Biol. Chem.* 2007; March 30: 9469 –9474.
30. Pedone PV, Ghirlando R, Clore GM, Gronenborn AM, Felsenfeld G, Omichinski JG. The single Cys2-His2 zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 2822–2826.

31. Omichinski JG, Pedone PV, Felsenfeld G, Gronenborn AM, Clore GM. The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode. *Nat. Struct. Biol* 1997; 4: 122–132.
32. Jilani A, Ramotar D, Slack C, Ong C, Yang XM, Scherer SW, Lasko DD. Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem.* 1999; Aug 20; 274(34): 24176-86.
33. Karimi-Busheri F, Daly G, Robins P, Canas B, Pappin DJ, Sgouros J, Miller GG, Fakhrai H, Davis EM, Le Beau MM, Weinfeld M. Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem.* 1999; Aug 20; 274(34): 24187-94.
34. Liu H, Rodgers ND, Jiao X, Kiledjian M. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* 2002; 21: 4699–4708.
35. Kwasnicka DA, Krakowiak A, Thacker C, Brenner C, Vincent SR. Coordinate Expression of NADPH-dependent Flavin Reductase, Fre-1, and Hint-related 7meGMP-directed hydrolase, DCS-1. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 39051–39058.
36. Darzynkiewicz ZM, Bojarska E, Stepinski J, Jemielity J, Jankowska-Anyszka M, Davis RE, Darzynkiewicz E.. Affinity of Dinucleotide Cap Analogues for Human Decapping Scavenger (hDcpS). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 2007; 26: 1349–1352.
37. Mariller C, Hardiville S, Hoedt E, Benaissa M, Mazurier J, Pierce A. Proteomic approach to the identification of novel delta-lactoferrin target genes: Characterization of DcpS, an mRNA scavenger decapping enzyme. *Biochimie* 2009; 91: 109–122.
38. Bail S, Kiledjian M. DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes? *RNA Biol.* 2008; 5: 216–219.
39. Singh J, Salcius M, Liu SW, Staker BL, Mishra R, Thurmond J, Michaud G, Mattoon DR, Printen J, Christensen J, Bjornsson JM, Pollok BA,

- Kiledjian M, Stewart L, Jarecki J, Gurney ME. DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem. Biol.* 2008; 3: 711–722.
40. Cohen AJ, Li FP, Berg S, Marchetto DJ, Tsai S, Jacobs SC, Brown RS. Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1979; 301: 592–595.
  41. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 4: 587–597.
  42. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorini U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM. 1996. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85: 17–26.
  43. Inoue H, Ishii H, Alder H, Snyder E, Druck T, Huebner K, Croce CM. Sequence of the FRA3B common fragile region: implications for the mechanism of FHIT deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997 Dec 23; 94(26): 14584–14589.
  44. Croce CM, Sozzi G, Huebner K. Role of FHIT in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 1618–1624.
  45. Sozzi G, Huebner K, Croce CM. FHIT in human cancer. *Adv. Cancer Res.* 1998; 74: 141–166.
  46. Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, Mancini R, Druck T, Valtieri M, Rudiger T, McCue PA, Croce CM, Huebner K. The tumor spectrum in FHIT-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*; 2001; 98: 10250–10255.
  47. Fong LY, Fidanza V, Zanesi N, Lock LF, Siracusa LD, Mancini R, Siprashvili Z, Ottey M, Martin SE, Druck T, McCue PA, Croce CM, Huebner K. Muir-Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*; 2000; 97:4742–4747.
  48. Huang Y, Garrison PN, Barnes LD. Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5',5-P<sub>1</sub>,P<sub>4</sub>-tetrphosphate (Ap<sub>4</sub>A)

- asymmetrical hydrolase: sequence similarity with the histidine triad (HIT) protein family. *Biochem. J.* 1995; 312: 925–932.
49. Barnes LD, et al. FHIT, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P-1,P-3- triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 1996; 35: 11529–11535.
  50. McLennan AG. Ap4A and other dinucleoside polyphosphatases. Boca Raton, Florida: CRC Press 1992. p.229-274.
  51. Geurts JMW, Schoenmakers EFPM, Roijer E, Stenman G, Van de Ven WJM. Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer Research.* 1997; 57: 13–17.
  52. Frey PA. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 1996; 10(4): 461–470.
  53. Wong LJ, Frey PA. Galactose 1-phosphate uridylyltransferase. Isolation of a uridylyl-enzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 2322–2324.
  54. Kim J, Ruzicka F, Frey PA. Remodeling hexose-1-phosphate uridylyltransferase: mechanism-inspired mutation into a new enzyme, UDP-hexose synthase. *Biochemistry* 1990; 29: 10590–10593.
  55. Elsas LJ, Lai K. The molecular biology of galactosemia. *Genet. Med.* 1998; 1: 40-48.
  56. Pearson JD, DeWald DB, Mathews WR, Mozier NM, Zurcher-Neely HA, Heinrikson RL, Morris MA, McCubbin WD, McDonald JR, Fraser ED, et al. Amino acid sequence and characterization of a protein inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 4583–4591.
  57. Brzoska PM, Chen H, Zhu Y, Levin NA, Disatnik MH, Mochly-Rosen D, Murnane JP, Christman MF. The product of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC, interacts with a protein kinase C substrate and inhibitor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 7824–7828.

58. Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF- $\beta$ -catenin-mediated transcription J. Cell Sci. 2005; 118: 3117–3129.
59. Bai G, Feng B, Wang JB, Pozharski E, Shapiro M. Studies on ligand binding to histidine triad nucleotide binding protein 1. Bioorg. Med. Chem. 2010; 18: 6756–6762.
60. Lima C, Klein MG, Weinstein IB, Hendrickson WA. Three-dimensional structure of human protein kinase C interacting protein 1, a member of the HIT family of proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 5357–5362.
61. Chou TF, Sham YY, Wagner CR. Impact of the C-Terminal Loop of Histidine Triad Nucleotide Binding Protein1 (HINT1) on substrate specificity. Biochemistry. 2007; 46: 13074-13079.
62. Bieganowski P, Garrison PN, Hodawadekar SC, Faye G, Barnes LD, Brenner C. Adenosine Monophosphoramidase activity of Hint and Hnt1 supports function of Kin28 Ccl1 and Tfb3. J. Biol. Chem. 2002; 277: 10852–10860.
63. Fankhauser H, Berkowitz GA, Schiff JA. A nucleotide with the properties of adenosine 5' phosphoramidate from Chlorella cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981; 101: 524–532.
64. Fankhauser H, Schiff JA, Garber LJ. Purification and properties of adenylyl sulphate:ammonia adenylyltransferase from Chlorella catalysing the formation of adenosine 5' -phosphoramidate from adenosine 5' -phosphosulphate and ammonia. Biochem. J. 1981; 195: 545–560.
65. Korsisaari N, Rossi DJ, Luukko K, Huebner K, Henkemeyer M, Makela TP. The Histidine Triad Protein Hint Is Not Required for Murine Development or Cdk7 Function Mol. Cell. Biol. 2003 Jun; 23(11): 3929-3935.
66. Yuan BZ, Jefferson AM, Popescu NC and Reynolds SH. Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2 $\phi$ -deoxycytidine. Neoplasia 6, 2004; 04: 412-429.

67. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 9821–9826.
68. Gonzalez MV, Pello MF, Ablanado P, Suarez C, Alvarez V, Coto E. Chromosome 3p loss of heterozygosity and mutation analysis of the FHIT and h-cat genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol*. 1998; 51: 520–524.
69. Clifford SC, Prowse AH, Affara NA, Buys CH, Maher ER. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 22: 200–209.
70. Korsisaari N, Makela TP. Interactions of Cdk7 and Kin28 with Hint/PKCI-1 and Hntl histidine triad proteins. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 34837–34840.
71. Razin E, Zhang ZC, Nechushtan H, Frenkel S, Lee YN, Arudchandran R, Rivera J. Suppression of microphthalmia transcriptional activity by its association with protein kinase C-interacting protein1 in mast cells. *J Biol Chem*. 1999; 274: 34272–6.
72. Lee YN, Razin E. Nonconventional involvement of LysRS in the molecular mechanism of USF2 transcriptional activity in FcepsilonRI-activated mast cells. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 8904–12.
73. Wang L, Li H, Zhang Y, Santella RM, Weinstein IB. Hint1 Inhibits B-Catenin/TCF4, USF2 And NFκB Activity in Human Hepatoma Cells. *Int J Cancer* 2009 April 1; 124(7): 1526–1534.
74. Wang L, Zhang Y, Li H, Xu Z, Santella RM, Weinstein IB. Hint1 inhibits growth and activator protein-1 activity in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 2007; 67: 4700–8.
75. Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*. 1988; 55: 917–924.

76. Zerial M, Toschi L, Ryseck RP, Schuermann M, Muller R, Bravo R. The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* 1989; 8: 805–813.
77. Xu Z, Kukekov NV, Greene LA. POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *EMBO J.* 2003; 22: 252–261.
78. Kim GH, Park E, Kong YY, Han JK. Novel function of POSH, a JNK scaffold, as an E3 ubiquitin ligase for the Hrs stability on early endosomes. *Cell Signal.* 2006; 18: 553–563.
79. Tassan JP, Schultz SJ, Bartek J and Nigg EA. Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J. Cell Biol.* 1994; 127: 467–478.
80. Brzoska PM, Chen H, Levin NA, Kuo WL, Collins C, Fu KK, Gray JW and Christman MF. Cloning, mapping, and in vivo localization of a human member of the PKCI-1 protein family (PRKCNH1) *Genomics.* 1996; 36: 151–156.
81. Cogswell JP, Godlevski MM, Bonham M, Bisi J, Babiss L. Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 2782–90.
82. Pawar SA, Szentirmay MN, Hermeking H, Sawadogo M. Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc. *Oncogene* 2004; 23: 6125–35.
83. Sirito M, Lin Q, Deng JM, Behringer RR, Sawadogo M. Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 3758–63.
84. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301–10.
85. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17–29.

86. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell. Biochem* 2004; 266: 37–56.
87. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81–103.
88. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, et al. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998;106(Suppl 1): 289–95.
89. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 2002; 192:1–15.
90. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 813–824.
91. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; 116: 235–246.
92. Liu G, Chen X. Regulation of the p53 transcriptional activity. *J. Cell. Biochem.* 2006; 97: 448–458.
93. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 431–442.
94. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18: 6145–6157.
95. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 2005; 11: 1306–1313.
96. Wiman KG. The retinoblastoma gene role in cell-cycle control and cell differentiation. *FASEB J.* 1993; 7: 841–845.
97. Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. BRCA1 gene in breast cancer. *J. Cell. Physiol.* 2003; 196: 19–41.
98. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049–6055.

99. Yılmaz M. Süperoksit dismutaz genlerinin amyotrofik lateral skleroz hastalığının oluşumundaki rolünün anlaşılması. Yük. Lis. Tezi. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
100. Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase - Applications and relevance to human diseases. *Medical Science Monitor* 2002; 8(9): 210-215.
101. Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB, Holloway SP, Strange RW, Doucette PA, Valentine JS, Tiwari A, Hayward LJ, Padua S, Cohlberg JA, Hasnain SS, Hart PJ. Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2008, 283 (23): 16169–77.
102. Jarvinen K. Antioxidant enzymes and related mechanisms in malignant pleural mesothelioma. Finnish Institute of Occupational Health Department of Industrial Hygiene and Toxicology. Helsinki; University of Oulu: 2001.
103. Kim HT, Kim YH, Nam JW, Lee HJ, Rho HM, Jung G. Study of 5'- flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; Jun 30; 201(3): 1526-33.
104. Roche Real Time PCR Methods. Erişim Tarihi: 01.10.2012  
[http://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/pcr\\_man/chapter\\_7.pdf](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/pcr_man/chapter_7.pdf)
105. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): 2002-2007.
106. Chou TF, Bieganowski P, Shilinski K, Cheng J, Brenner C and Wagner CR. 31P NMR and genetic analysis establish hinT as the only Escherchia coli purine nucleoside phosphoramidase and as essential for growth under high salt conditions, *J. Bio. Chem.* 2005; 280: 15356-15361
107. Wagner CR, Iyer VV and McIntee EJ. Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides, *Med. Res. ReV.* 2000; 20: 417-451
108. Chou TF and Wagner CR. Lysyl-tRNA synthetase generated lysyl-adenylate is a substrate for histidine triad nucleotide binding proteins, *J. Bio. Chem.* 2007; 282: 4719-4727.

109. Chou TF, Tikh IB, Horta BA, Ghosh B, de Alencastro RB and Wagner CR. Engineered Monomeric Human Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1 Hydrolyzes Fluorogenic Acyl -Adenylate and Lysyl-tRNA Synthetase-generated Lysyl-Adenylate, *J. Bio. Chem.* 2007; 282: 15137-15147.
110. Li H, Zhang Y, Su T, Santella RM, Weinstein IB. Hint1 is a haplo-insufficient tumor suppressor in mice. *Oncogene* 2006;25:713–21.
111. Yuan, B. Z., Jefferson, A. M., Popescu, N. C., and Reynolds, S. H. (2004) Aberrant gene expression in human non small cell lung carcinoma cells exposed to demethylating agent 5-aza-2 $\phi$ -deoxycytidine, *Neoplasia* 6, 412-429.
112. Lee YN, Nechushtan H, Figov N and Razin E. The function of lysyl-tRNA synthetase and Ap4A as signaling regulators of MITF activity in Fc $\gamma$ RI-activated mast cells, *Immunity* 2004; 20: 145-151.
113. Huang H, Wei X, Su X, Qiao F, Xu Z, Gu D, Fan H, Chen J. Clinical significance of expression of Hint1 and potential epigenetic mechanism in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2011 Jun;38(6):1557-64.
114. Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med.* 2012; Jan 1;52(1): 7-18. Epub 2011 Oct 6.
115. Yoo HY, Chang MS, Rho HM. The activation of rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem* 1999; 274: 23887–23892.
116. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase. Mox1. *Nature* 1999; 401: 79–82.
117. Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 169–174.

118. Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czeczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochimica Polonica* 2009; 56 (4): 663-670
119. Somwar R, Erdjument-Bromage H, Larsson E, Shum D, Lockwood WW, Yang G, Sander C, Ouerfelli O, Tempst PJ, Djaballah H, Varmus HE. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is a target for a small molecule identified in a screen for inhibitors of the growth of lung adenocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; Sep 27;108(39): 16375-80. Epub 2011 Sep 19.
120. Rao AK, Ziegler YS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on estrogen responsiveness and oxidative stress in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2008; May;22(5): 1113-24. Epub 2008 Feb 7.

## 10. EKLER

### Etik Kurul Raporu

T.C.  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ**  
**KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
22/11/2012	22	2012/356

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN'nın sorumluluğunda yürütülen "Kolon, Meme ve Mide Kanserlerinde HINT1 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 01/11/2012 ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy çokluğu ile karar verilmiştir.

İmza  
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN  
Başkan

İmza  
Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU KILINÇ  
Başkan Yrd.

(Karara Katılmadı)  
Yrd. Doç. Dr. Gülçin YAPICI  
Raportör

İmza  
Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ  
Üye

İmza  
Doç. Dr. İrfan AYAN  
Üye

İmza  
Prof. Dr. Aylin ERTEKİN YAZICI  
Üye

İmza  
Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN  
Üye

İmza  
Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN  
Üye

(Katılmadı)  
Doç. Dr. Sabire YURTSEVER  
Üye

(Katılmadı)  
Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE  
Üye


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

İmza  
Yrd. Doç. Dr. Nalan TİFTİK  
Üye

İmza  
Uzm. Dr. Kırılcım EREN ERDOĞAN  
Üye

İmza  
Hürrem Betül LEVENT ERDAL  
Üye

İmza  
Lale DAĞLI  
Üye

  
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN  
Başkan  
ASLI GİBİDİR

T.C  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
	GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMACILARIN ÖZGEÇMİŞİ	<input checked="" type="checkbox"/>	
	ANKET FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>	
	4 ADET LİTERATÜR	<input checked="" type="checkbox"/>	
	Karar No: <u>2012-256</u>	Tarih: <u>22.11.2012</u>	
Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

MERSİN ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
<b>BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:</b>	Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN	Farmakoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Farmakoloji Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU KILINÇ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Gülçin YAPICI	Halk Sağlığı	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Halk Sağlığı Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof. Dr. Lütfü TAMER GÜMÜŞ	Biyokimya	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İrfan AYAN	Ortopedi ve Travmatoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Ortopedi ve Travmatoloji Ab.D.	E	K	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Aylin ERTEKİN YAZICI	Psikiyatri	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Psikiyatri Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN	Mikrobiyoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN	Biyostatistik	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sabire YURTSEVER	İç Hastalıkları Hemşireliği	MEÜ Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü İç Hastalıkları Hemşireliği Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE	Biyomühendislik	MEÜ Tıp Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Oya ÖGENLER	Tıp Tarihi ve Etik	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıp Tarihi ve Etik Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. Nalan TIFTİK	Farmakoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji Ab.D.	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Kıvılcım Eren ERDOĞAN	Patoloji	Mersin Devlet Hastanesi	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yüksek Şehir Plancısı Hürrem Betül LEVENT <u>SEDAL</u>	Şehir ve Bölge Planlama/uluslararası Proje Yönetimi	Mersin Ticaret ve Sanayi Odası Projesi Müdürlüğü	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Avukat Lale DAĞLI	Hukuk	Serbest	E	K	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\* :Toplantıda Bulunma

## TEŐEKKÖR

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ayrıca çalışma disiplini, hoşgörsü, sabrı, etik ve insancıl davranışlarını yaşamım boyunca kendime örneğ alacağım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevgi YARDIM AKAYDIN'a, tez çalışmam süresince katkılarını esirgemeyen Araş. Gör. Emel ÇALIŐKAN CAN ve Araş. Gör. Ece MİSER SALİHOĞLU'na ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgilerini benden esirgemeyen başta bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Bolkan ŞİMŞEK olmak üzere tüm Biyokimya Anabilim Dalı bölüm hocalarıma ve bu süreçte inançları ve göstermiş oldukları sabır ve destek için tüm aileme içten duygularla teőekkürlerimi sunarım.

Çağla EMİRAL

## 11.ÖZGEÇMİŞ

Çağla  
EMİRAL  
Zonguldak 1986

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D.  
Lisans: Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü  
Lise: Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi  
İlköğretim: Zonguldak Yayla İlköğretim Okulu

Yabancı Dil: İngilizce