

**Sülfid Molekülünün İnsan Nöroblastom Hücrelerinde (SHSY5Y) Yeni Bir Onkogen Olan
URG4/URGCP Geni Üzerinden Olası Etki Mekanizmasının Araştırılması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 113S167

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Yavuz DODURGA

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Yrd. Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

Bursiyer:

Arş. Gör. Canan EROĞLU

Ekim 2014

DENİZLİ

ÖNSÖZ

Kanser günümüzde başta gelişmiş ülkeler olmak üzere, sağlık sorunları arasında ilk sıralarda gelmektedir. Kanser oluşumuna sebep faktörlerin olan nitel ve nicel artışının yanı sıra tedaviye yönelik araştırmalarda her geçen gün hız kazanmaktadır. Nöroblastom gibi sinir sistemi kökenli tümörlerde gerek cerrahi, gerekse diğer tedavi yaklaşımlarıyla tatmin edici sonuçların alınamaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur. Nöroblastomda tümör dokusundaki birçok genetik değişikliğin prognoz üzerine etkisi gösterilmiştir.

Nöroblastom, tümör hücresinde yapılan genetik ve biyolojik incelemelerin, hastanın en iyi şekilde yönetilmesi için gerekli bilgileri bize sağlayan bir solid tümör modelidir. Tedavi kapsamında daha iyi sonuç alabilmek için çeşitli ajanların tekli veya kombine olarak uygulanarak terapötik etkinliği ve moleküler etki mekanizmaları yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu çalışmada da eski çağlardan bu yana hijyenik amaçlı günümüzde de ilaç ve besin endüstrisinde koruyucu olarak kullanılan sülfid bileşiğinin ve çeşitli kanser türlerinde etkisi araştırılmış URG4/URGCP geninin nöroblastomada tedaviye yönelik etkinliği moleküler mekanizmalarıyla araştırılmıştır. Yapılan araştırma sonuçları URG4/URGCP'nin nöroblastom tedavisinde önemli rol oynayabilecek yeni bir onkogen olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1002 program kodlu hızlı destek araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Doç.Dr. Yavuz DODURGA

(Proje Yürütücüsü)

İÇİNDEKİLER TABLOSU

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER TABLOSU.....	ii
ŞEKİLLER TABLOSU.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	3
2. GEREÇ VE YÖNTEM:.....	6
2.1.Kullanılan hücre dizini ve hücre kültürü koşulları:.....	6
2.2. Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu:.....	7
2.3.Trizol Reagent Kullanarak Hücre Kültüründen Total RNA İzolasyonu.....	7
2.4.Sülfid maruziyeti sonrasında hücre döngüsünde rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:...	8
2.5.Sülfid maruziyeti sonrasında apoptozda rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:.	10
2.6. Lowry Yöntemi.....	11
2.6.Sülfid uygulaması sonrası hücrelerdeki URG4/URGCP varlığının Western Blot ile kontrolü.....	12
2.7.Komet analizi:.....	13
2.7.1. KometAssay (Tek Hücre Elektroforezi).....	14
2.7.2.Görüntü Analizi.....	14
2.8.Sülfid maruziyeti sonrasında hücrelerin invazyon kapasitesinin belirlenmesi:.....	14
2.9.Sülfid maruziyeti sonrasında hücrelerin koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi:....	15
2.10. Genlerin Kantitasyon Değerlerinin İstatistiksel Analizleri.....	15
3.BULGULAR.....	15
3.1. Sülfidin Hücre Canlılığı ve Proliferasyonuna Etkisi.....	15
3.2.Sülfid maruziyeti sonrasında hücre döngüsünde rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:.	16
3.3. Sülfid maruziyeti sonrasında apoptozda rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:.	18
3.4. Sülfid uygulaması sonrası hücrelerdeki URG4/URGCP varlığının Western Blot ile kontrolü.....	21

3.5. Komet analizi.....	21
3.5.1. Baş - Kuyruk Uzunluğunu ve Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	22
3.5.2.Kuyruk Momenti ve Migrasyonun Belirlenmesi.....	23
3.6 Sulfid maruziyeti sonrasında hfrelerin invazyon kapasitesinin belirlenmesi.....	24
3.7. Sulfid maruziyeti sonrasında hfrelerin koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi....	24
4. TARTIşMA VE SONUÇ.....	25
5. KAYNAKLAR.....	28

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1: Lowry Protein Standart Eğrisi.....	12
Şekil 2: XTT analizi ile doza bağlı hücre canlılığı sonuçları.....	16
Şekil 3: Western blot analizi ile kontrol ve doz gruplarındaki URG4'ün protein düzeyindeki değişimi.....	21
Şekil 4: Grupların 24 saat inkübasyonunu takiben Komet analizi ile demonstratif olarak görüntüsü.K: kontrol, S: 5 mM dozda sülfid uygulanan grup.....	22
Şekil 5: Kontrol ve sülfid (5mM) dozunun 24 saat inkübasyonu takiben Komet yöntemi ile değerlendirilen değerleri a) baş uzunluğu b) baş yoğunluğu c) kuyruk yoğunluğu d) kuyruk uzunluğu *) $p < 0.001$ düzeyinde kontrolden fark.....	23
Şekil 6: Kontrol ve sülfid (5mM) dozunun 24 saat inkübasyonu takiben Komet yöntemi ile değerlendirilen değerleri a) Kuyruk Momenti b) Kuyruk Migrasyonu *) $p < 0.001$ düzeyinde kontrolden fark.....	23
Şekil 7: Sülfid maruziyeti sonrasında SHSY5Y hücrelerinin invazyon kapasiteleri.....	24
Şekil 8: Sülfid maruziyeti sonrasında SHSY5Y hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.....	25

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Real-Time PCR Koşulları.....	9
Tablo 2: Ekspresyon değişimleri incelenen hücre döngüsünde görevli olan genler.....	16
Tablo 3: Kontrol ve Doz Grupları Arasında Hücre Döngüsü Gen Ekspresyon Değişim Tablosu	18
Tablo 4: Ekspresyon değişimleri incelenen apoptozda görevli olan genler.....	19
Tablo 5: Kontrol ve Doz Grupları Arasında Apoptoz Gen Ekspresyon Değişim Tablosu.....	20

ÖZET

Nöroblastom gibi sinir sistemi kökenli tümörlerde gerek cerrahi, gerekse diğer tedavi yaklaşımlarıyla tatmin edici sonuçların alınamaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur. Nöroblastomda tümör dokusundaki birçok genetik değişikliğin prognoz üzerine etkisi gösterilmiştir. Nöroblastom, tümör hücresinde yapılan genetik ve biyolojik incelemelerin, hastanın en iyi şekilde yönetilmesi için gerekli bilgileri bize sağlayan bir solid tümör modelidir.

Sülfitin hijyenik amaçlarla kullanımı eski çağlara kadar gitmektedir. Günümüzde de ilaç ve besin endüstrisinde şekilde koruyucu olarak yaygın olarak kullanılan sülfite bileşiği, kükürt içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında vücutta endojen olarakta oluşturulmaktadır.

Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından yapılmış olan araştırmada HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen özgün-yeni bir gen tanımlanmış ve "Up-Regulated-Gene-4/Up Regulator of Cell Proliferation (URG4/URGCP)" olarak isimlendirilmiştir. Temel yapı karakterizasyonu yapılan URG4'ün tam sekansının 3.607 kb olduğu ve sitoplazma içinde 922 aminoasit içeren bir protein sentezlediği tespit edilmiştir. Ayrıca URG4'ün 7. kromozomun kısa kolunda (7p13) lokalize olduğu ve daha önce tanımlanan genler ile herhangi bir uyum/homoloji göstermediği bulunmuştur (GeneID: 55665, Entrez Nükleotid ID NM_017920). URG4'ün HepG2 hücre dizinine over-ekspresyonu sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu ve hayatiyeti arttırdığı, yumuşak agar besi yerinde koloni oluşumunu uyardığı ve immün sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Temel fonksiyona yönelik araştırma sonuçlarımız, URG4'ün hepatoselüler karsinom oluşumunda önemli rol oynayabilecek yeni bir onkogen olabileceğini göstermektedir. Grubumuz ve grubumuz dışında yapılmış olan araştırmalar da URG4'ün sadece karaciğer kanseri gelişiminde değil, mide kanseri, osteosarkom, over kanseri, prostat kanseri ve lösemi gelişiminde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma kapsamında nöroblastom gelişiminden sorumlu olabileceği düşünülen yeni bir gen olan URG4/URGCP geninin ve diğer kemoteropetik ajanlar gibi toksik olduğu bilinen ancak tedavide kullanılmayan sülfitin genetik değişiklikler üzerinde etkisinin araştırılması planlanmıştır. Projemizden elde edilen yeni veriler ışığında, nöroblastom gelişimi ile sonuçlanan karsinogenezde URG4/URGCP'nin bugüne kadar bilinmeyen kontrol mekanizmalarının açıklanmasına büyük katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu yüzden hem URG4/URGCP geni ile araştırma yapmak hem de URG4/URGCP'nin diğer genlerle olan ilişkilerinin nöroblastomda geniş çaplı değerlendirilmesinin sağlanması, her açıdan projemize özgünlük kazandırmıştır.

Anahtar Kelimeler: URG4/URGCP, Nöroblastom, Sülfite

ABSTRACT

It cannot be obtained of satisfactory results with treatment approaches both surgical and others in neural origin tumors such as neuroblastoma, has led to the need to study on details of oncogenesis of these tumors. Effects of many genetic changes in tumor tissue in neuroblastoma have been shown. Neuroblastoma is a unique solid tumor model which provides us the necessary information about genetic and biological examinations on tumor cells to manage the patient in the best way.

Using of sulfite for hygienic purpose goes back to ancient times. Sulfite compound, nowadays widely used in the pharmaceutical and food industry as a preservative, is created as an endogenous in the body during the metabolism of amino acids containing sulphur.

Satiroglu-Tufan and her colleagues have identified and characterized a novel gene, which is up-regulated in the presence of HBxAg, and named as URG4/URGCP (Up-Regulated-Gene-4/Up Regulator of Cell Proliferation). The full-length URG4 clone was 3.607 kb and encodes a polypeptide of 922 amino acids with a predicted molecular weight of 104 kDa. Analysis of the novel full-length URG4 sequence showed no homology with other previously published genes and localized in the short arm of human chromosome 7 (7p13) (GeneID: 55665, Entrez Nükleotid ID NM_017920). It has been shown that over-expression of URG4 in HepG2 cells promoted hepatocellular growth and survival in tissue culture (in the presence or absence of growth factors) and stimulated colony formation in soft agar, and accelerated tumor development in nude mice. Studies by our group and others have strongly suggested that URG4 is involved not only in hepatocellular carcinoma, but also in gastric cancer, osteosarcoma, ovarian cancer, prostate cancer and leukemia.

In this study, it is planned that investigation of effects on genetic changes of both URG4/URGCP gene which is a novel gene and thought can be responsible for the development of neuroblastoma and sulfite which is known as a toxic agent such as other chemotherapy agent but not used in chemotherapy. In the light of new data obtained from our project, we believe to greatly contribute to explaining of unknown control mechanisms of URG4/URGCP in carcinogenesis be resulted in the development of neuroblastoma. So both doing research on URG4/URGCP gene and providing of large scale evaluation relations with the other gene of URG4/URGCP on neuroblastoma, provides authenticity in every aspect to our project.

Keywords: URG4/URGCP, Neuroblastoma, Sulfite

1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Nöroblastom adrenal medulla veya sempatik gangliyonlarda normalde bulunan primordial nöral krest hücrelerinden köken alan ve çocukluk çağıının en sık ekstrakranial solid tümörüdür. Tüm çocukluk çağı kanserleri arasında %8-10'luk bir orana sahiptir. Nöroblastomda tümör dokusundaki birçok genetik değişikliğin prognozüzzerine etkisi gösterilmiştir (Siegel R.,2013 ; Gurney JG.,1996).Nöroblastom'da tümör hücrelerinde gösterilmiş genetik değişiklikler hastalığın patogenezinde ve prognozunda rol oynayabilmekte ve tümörün biyolojik yapısı hakkında bize bilgi vermektedir. Nöroblastomlu hastaların bir bölümünde bu hastalığın gelişiminde bir yatkınlık olduğu ve bu yatkınlıkta kalıtımın otozomal dominant bir yolunun bulunduğu bildirilmektedir (Brodeur GM, 2006).Biyolojik ve genetik değişiklikler, tedaviye yanıt ve prognozun önemli göstergesi olup, tanı sırasında tümörün karakterini bize belirlemektedir. Dolayısıyla nöroblastom, tümör hücresinde yapılan genetik ve biyolojik incelemelerin, hastanın en iyi şekilde yönetilmesi için gerekli bilgileri bize sağlayan bir solid tümör modelidir. Yakın gelecekte hedef, bu bilgiyi hastalara uygulanacak daha etkin ve daha az toksik tedavilere çevirmektir. Ayrıca bu genetik değişiklikler; olguların risk gruplarına ayrılması ve hedeflenmiş tedavilerin planlanması yönünden çok önemlidir. Bu genetik değişiklikler arasında allelik fazlalık/kayıp olması, onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin kaybı yanında bazı genlerin ekspresyonlarındaki değişiklik şeklinde olabilir. Nöroblastoma gibi sinir sistemi kökenli tümörlerde gerek cerrahi, gerekse diğer tedavi yaklaşımlarıyla tatmin edici sonuçların alınamaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur. (Olshan AF, 1999; Maris JM, 2002)

Sülfite molekölü hava kirliliğinin önemli bir bileşenidir.Sodyum sülfite (Na_2SO_3), sodyum hidrojen sülfite (NaHSO_3), sodyum metabisülfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), potasyum metabisülfite ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$), kalsiyum sülfite (CaSO_3), kalsiyum hidrojen sülfite (CaHSO_3) ve Potasyum hidrojen sülfite (KHSO_3) gibi çeşitli iyonlarla yaptığı tuzlar gıda ve ilaç endüstrisinde koruyucu amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır (Lester M.R 1995; Gunnison A.F., 1987).Organizmanın maruz kaldığı bu eksojen kaynaklara ilaveten, sülfite molekölü vücutta kükürt içeren amino asitlerin katabolizması esnasında endojen olarak da üretilmektedir (Gunnison A.F.,1987; Kajiyama 2000). Kaynağı ne olursa olsun toksik özellikleri iyi bilinen SO_3 'in vücutta etkin bir şekilde metabolize edilmesi gerekir. Bu işlem oksidatif olmayan (Gunnison A.F., 1987) ve oksidatif SO_3 metabolizması (Mottley C.,1982; Mottley C.,1985) olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Enzimatikoksidasyon SO_3 metabolizmasındaki temel yolaktır. Bu yolakta mitokondrial bir molibdohemoprotein olan Sülfite oksidaz (SOX) enzimi SO_3 'in zararsız bir bileşik olan inorganik sülfata (SO_4) dönüşümünü katalizler(Cohen H.J., 1971). Bu enzimin

yaşamsal önemi, 1967 yılında Mudd ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar genetik SOX enzim eksikliği olan vakalarda artmış endojen SO=3 üretimi nedeniyle şiddetli nörolojik disfonksiyon, mental gerilik ve hayatın erken döneminde ölümle karakterize bir klinik tablonun meydana geldiğini göstermişlerdir. (Mudd S.H.,1967).Yapılan çalışmalarda görsel ve somatosensoryel uyarılma potansiyellerinde latens uzamasına (Agar A.,2000; Kucukatay V.,2003) tek başına ve peroksitnitrit anyonu (ONOO⁻) ile beraber hücre canlılığı üzerine olumsuz etkilere (Reist M., 1998; Parsons, 1997) nöronlarda redükteglutatyon (GSH) içeriğinin azalmasına neden olduğunu gösteren in vitro ve in vivo yayınlar literatürde mevcuttur (Marshall K.A.,1999).Ayrıca çeşitli motor nöron hastalıkları, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda kükürt içeren amino asit metabolizmasında anormallikler saptanmış olması sülfid'innörotoksisite açısından önemini göstermektedir (Heafield M.T., 1990). Bu şekilde artmış endojensülfid'e maruz kalmanın yanı sıra, eksojen yolla hava kirliliği ve besinlerle maruz kalmanın toksik etkileri de bildirilmiştir. Bu molekülün bir insan nöroblastom hücre dizisi olan SHSY5Y hücreleri üzerine olan etkisi henüz incelenmemiştir. Bu hücrelerin canlılığı üzerine olabilecek olası etkisinin detayları bu tip kanserlerde yeni çalışmaların önünü açabilir.

Ökaryotik bir hücre de hücre döngüsü süreci siklinler ve siklin bağımlı kinazların aktiviteleriyle düzenlenir. Hücrelerin, hücre döngüsünün değişik evrelerinden sistemli bir şekilde geçmeleri siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve onların inhibitörleri tarafından denetlenir. Tümör oluşum sürecinde, hücre döngüsü olaylarının deregülasyonu ile sonuçlanan çeşitli genetik ve epigenetik değişimler meydana gelmektedir(Graham. P.,2002).Normal gelişim ve doku homeostazisi için kritik öneme sahip olan apoptozis, hücre ölümünün genlerle düzenlenmiş formudur. Şimdiye kadar ölüm reseptörü aracılı dış yolak, mitokondri aracılı iç yolak ve endoplazmikretikulum aracılı oksidatif stres yolağı gibi bir çokapoptotik yolak ortaya konulmuştur. Apoptotik hücre ölümü ekstraselüler ve intraselüler sinyallerin, mitokondriyal değişimlerin, proapoptotikproteazların, spesifikendonükleazların aktivasyonu ile DNA fragmentasyonunun dahil olduğu kompleks bir mekanizmayla başlatılabilmektedir (Susin, S.A.,2000; Uguz, C.A.,2009).

Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından yapılmış olan araştırmada (Satiroglu-Tufan N.L.2002)HBV X proteini pozitif ve negatif HepG2 hücre dizinleri model sistem olarak kullanarak "polimeraz zincir reaksiyonu seçici komplementer DNA çıkartma (PCR select cDNA subtraction)" tekniği ile HB X pozitif ve HB X negatif HepG2 hücre dizinleri arasındaki gen ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. Bu deneyler sonucunda HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen özgün-yeni bir gen, Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından "Up-Regulated-Gene-4/Uregulator of Cell Proliferation (URG4/URGCP)" olarak isimlendirilmiş ve Amerika'daki National Center for Biotechnology Information-Gen Bankasına

(NCBI-GenBank, EntrezGenelID: 55665 ve Entrez Nükleotid ID NM_017920) olarak kayıt edilmiştir (Tufan, N. L., 2002).Öncelikle PCR seçici komplementer DNA çıkartma metodu ile elde edilen ve HB X pozitif HepG2 hücre dizinindeki URG4/URGCP ekspresyonunun HB X proteini varlığında arttığı sonucu, aynı hücre dizinleri kullanılarak birbirinden farklı moleküler deneylerle tekrar doğrulanmıştır. Ekspresyon artışının farklı moleküler teknikler ve deneylerle onaylanmasından sonra, URG4/URGCP'nin tam sekansı (full-length), "RapidAmplification of 5' and 3' cDNA Ends (RACE)" yöntemi ile elde edilmiştir ve 3.607 kb'lık gen klonlanmıştır. İnsan gen bankası araştırma sonuçları, Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından elde edilen URG4/URGCP sekans sonuçları ile karşılaştırıldığında, URG4/URGCP'nin 7. kromozomun kısa kolunda lokalize olduğu (7p13) ve daha önce tanımlanan genler ile herhangi bir uyum/homoloji göstermediği bulunmuştur (Entrez Nükleotid ID NM_017920). Ayrıca URG4/URGCP'nin sitoplazma içinde 922 aminoasit içeren bir protein sentezlediği tespit edilmiştir. Çeşitli bilgisayar programları yardımıyla URG4/URGCP'nincDNA'sı kullanılarak antijenikpeptitler seçilmiş ve URG4/URGCP'ye karşı spesifik antikor geliştirilmiştir.

In vitro hücre kültür ortamında yapılan deneylerde, URG4/URGCP'nin HepG2 hücre dizinine transfekte edilip over-ekspresyonu sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu arttırdığı, yumuşak agar besi yerinde koloni oluşumunu gerçekleştirdiği ve immün sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşumunu hızlandırdığı saptanmıştır. Bütün bu deney sonuçlarında gözlemlenen özellikler onkogenlerin karakteristik fonksiyonlarından olduğundan, HBV X proteini varlığında ekspresyonu artan URG4/URGCP'ninmulti-step hepatokarsinogenezde önemli rol oynayabilecek yeni bir olası onkogen olabileceği düşünülmektedir. Grubumuz ve grubumuz dışında yapılmış olan farklı araştırmalarda da URG4/URGCP'nin sadece karaciğer kanseri gelişiminde değil, mide kanseri, osteosarkom, over kanseri, prostat kanseri ve lösemi gelişiminde de etkili olabileceği gösterilmiştir.

Song ve arkadaşları mide kanseri tanısı almış 100 olguya ait parafin bloklarından aldıkları kesitlerde URG4/URGCP ekspresyonunu ve SGC7901, MKN28, MKN45, AGS, BGC823 ve GES-1 mide kanseri hücre hatlarında ise ekspresyon analizlerini değerlendirmiştir. URG4/URGCP'nin hücre döngüsünde yer alan siklin D1 ekspresyonunu arttırdığını gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, artmış siklin D1 düzeyinin hücre döngüsünün ilerlemesine ve hücrelerin anormal çoğalmasına yönlendiğini düşündürmüştür. Yazarlar bu verilerle, URG4/URGCP'nin mide kanseri gelişiminde Siklin D1 ifadesinin regülasyonunda etkili olabilecek potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini ifade etmektedirler (Song, J.,2006). Huang ve arkadaşları osteosarkom tanısı almış 46 olgunun parafin bloklarından aldıkları kesitlerde URG4/URGCP protein ekspresyonunu değerlendirmiştir. URG4/URGCP ekspresyonunu 40 (%86,96) olguda yüksek düzeyde saptamış, rekürren ve metastaz yapan

olgular da ise ekspresyon düzeyinin arttığını belirtmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca URG4/URGCP ekspresyon düzeyi ile proliferasyon belirteci olan PCNA ile doğru orantılı olarak arttığını gözlemlemiştir. URG4/URGCP'nin osteosarkom gelişiminde kullanılabilir aday bir belirteç olabileceğini düşünmektedir (Huang, J., 2009). Bu yeni çalışmalar ışığında URG4/URGCP'nin kansinogenezde rol alabileceğini ve aynı zamanda kanser tedavisinde de umut verici bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmüştür.

Li ve arkadaşları, 116 epitelyalover kanseri vakalarında URG4/URGCP gen ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirmişlerdir. Epitelyalover kanseri olgularından URG4/URGCP ekspresyonunun benin tümörlere ve kontrole göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. URG4/URGCP ekspresyon sonuçlarının proliferasyon indeksini gösteren PCNA değerlendirmesi ile korele bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, URG4/URGCP'nin epitelyalover kanseri ilerlemesinde etkili olabileceğini ve over kanseri prognozunda yeni bir hedef olabileceğini vurgulamaktadırlar (Li W, 2012).

Dodurga ve arkadaşlarının yaptığı in vitro çalışmada, rapamisin tedavisinin DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Bu rapamisin ile indüklenen hücre döngüsünün G1 evresinde durmasına ve URGCP gen ekspresyonunun inhibisyonuna neden olabileceğini düşündürmüştür (Dodurga Y, 2012).

Proje yürütücüsünün de bulunduğu ekip tarafından yapılan çalışmada, Oymak ve arkadaşları lökomogenezde de URG4/URGCP'nin hücre döngüsü üzerinden hücreyi malin transformasyona götürebileceğini gösteren vaka sunumu çalışması da URG4/URGCP'nin sadece solid tümörlerde değil lökomogenezde de etkili olabileceğini göstermiştir (Oymak Y, 2012).

Sunmuş olduğumuz projemizde, SHSY5Y hücre dizini model sistem kullanılarak nörotoksik olduğu bilinen sülfid maruziyeti sonrasındaki kanser hücre davranışı morfolojik/moleküler düzeyde araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM:

2.1. Kullanılan hücre dizini ve hücre kültürü koşulları:

Çalışmamızda SHSY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültür kaplarına yapışarak çoğalan bu hücreler %10 fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren DMEM F12 besi yerinde 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda üretilmiştir.

Hücre dizinlerinin büyümesi için kullanılan besi yeri detay bilgileri:

- Dulbecco`'s Modified Eagle Medium (DMEM): Nutrient Mixture F-12 (Ham`s) (1:1) (

01-170-1, Biological Industries)

- %10 FBS (Fetal sığır serumu) (04-121-1B, Biological Industries)
- 0.1 mM Non-Essential Amino Acids Solution (01-340-1B, Biological Industries)
- 2 mM Glutamin (03-020-1B, Biological Industries)
- 1 mM Sodyum Piruvat (03-042-1B, Biological Industries)
- 100U/0.1mg Penisilin/Streptomisin (03-031-1C, Biological Industries)

2.2. Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu:

SHSY5Y nöroblastom hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında 1×10^4 /kuyucuk miktarında ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenmiştir. 0.1 mM-5 mM'lık çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı ile hazırlanmıştır. Kontrol kuyucuklarında sülfid gruplarına 100 µl içindeki son konsantrasyonları 0.1, 1, 5 mM dozda sülfid ilave edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonda sülfid uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)" ile araştırılmıştır. Kit içeriğinde reaktif madde olarak tetrazolium tuzu olan "XTT" içermektedir. 24, 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuğa 100 µL ortam koyulduktan sonra 50 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu eklenmiştir. Madde eklenmesinden 4 saat sonra çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

Ölçülen optik dansite değeri:

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

2.3. Trizol Reagent Kullanarak Hücre Kültüründen Total RNA İzolasyonu

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirilmesi için SHSY5Y hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirmiştir. Hücreler için 1 ml trizol hücreleri kaldırmak için eklenmiştir. Homojenat 1 ml'lik ependorf tüplere alınmış ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmış ve ardından her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra +4°C' de 15.000 g'de 20 dk santrifüj edilmiş ve renksiz olan üst faz toplanıp, ayrı ependorf tüplere alınmıştır. Toplanan üst fazın üzerine

500 µlizopropanol eklenip, pipetlenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. +4°C'de 15.000 g'de 30 dksantrifüj edildikten sonra süpernatant dikkatlice atılıp pelletin üzerine %70'lik etanol konulmuş ve +4°C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra tekrar süpernatant atılıp, pellet kısa bir süre hava ile kurutulmuştur. Son olarak pellet 40 µlRNase-DNasefree su ile çözülmüştür.

2.4.Sülfite maruziyeti sonrasında hücre döngüsünde rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:

Real-time Online RT-PCR, gen ekspresyon ürününün kantitasyonu amacıyla kullanılan hassas moleküler bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışabilmektedir. Gerçek zamanlı PCR/RT-PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, PZR ürününün mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Bu çalışmada da 96 kuyucuklu olan mikropılaka sistemi kullanılmıştır.

Sülfite maruziyeti sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, hücre döngüsünde rol alan genlerin RNA düzeyindeki ekspresyonları "Real Time Custom Panel" kullanılarak belirlenmiştir. İlgili hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış ve takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi tespit edilmiştir. Sonrasında, total RNA'lardan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (RocheDiagnostics) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili panel hücre döngüsünde rol alan genleri ve URG4/URGCP genini içerecek şekilde custom olarak belirlenmiştir. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak Gerçek Zamanlı RT-PCR ile analiz yapılabilmektedir. Ayrıca, her panelde referans-housekeeping genler- RT-PCR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değışikliği analiz etme imkânı sağlamaktadır.

Real time RT-PCR koşulları

Tablo 1: Real-Time PCR Koşulları

Denatürasyon			
Döngü Programı Verileri		Değer	
Döngü		1	
Analiz Modu		-	
Hedef Dereceleri		Segment 1	
Hedef Derece (°C)		95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		600	
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/sn)		20.0	
İkinci hedef derece (°C)		0	
Basamak derecesi (°C)		0.0	
Döngüler		0	
Kazanç modu		-	
Amplifikasyon			
Döngü Programı Verileri		Değer	
Döngü		40	
Analiz Modu		Kantitasyon	
Hedef Dereceleri		Segment 1	Segment 2
Hedef Derece (°C)		94	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		15	60
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)		20.0	20.0
İkinci Hedef Derecesi (°C)		0	0
Basamak derecesi (°C)		0.0	0.0
Döngüler		0	0
Kazanç modu		-	Tek

Soğuma	
Program Verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	40
İnkübasyon Zamanı	30
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0
İkinci Hedef Derece (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

2.5.Sülfite maruziyeti sonrasında apoptozda rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:

Sülfite maruziyeti sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, apoptozda rol alan genlerin RNA düzeyindeki ekspresyonları "Real Time Custom Panel" kullanılarak belirlenmiştir. İlgili hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış ve takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi tespit edilmiştir. Sonrasında, total RNA'lardan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (RocheDiagnostics) cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili panel apoptozda rol alan genleri ve URG4/URGCP genini içerecek şekilde custom olarak belirlenecektir. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak Gerçek Zamanlı RT-PCR ile analiz yapılabilmektedir. Ayrıca, her panelde referans–housekeeping genler- RT-PCR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değişikliği analiz etme imkânı sağlamaktadır.

2.6. Lowry Yöntemi

Protein tayininde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda peptid bağları ile Cu²⁺ arasında biüre reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve

triptofanamino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli heteropolimolibden kompleksi meydana getirir.Oluşan kompleks 600-800 nm aralığında absorpsiyon piki verir. Lowry yöntemi kullanılarak örneklerin protein düzeyleri aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

1) Ayıraç A [%2'lik Na₂C₀3 (%1 N NaOH'de çözülmüş)], Ayıraç B (%1 Na veya K-tartarat), Ayıraç C (% 0,5 CuS₀4.5H₂0), Ayıraç D (1 N folin ayıracı) olmak üzere 4 solüsyon hazırlanmış ve sırası ile ayıraç A-B-C'den 48-1-1 oranında karıştırılarak yeni bir ayıraç hazırlanmıştır.

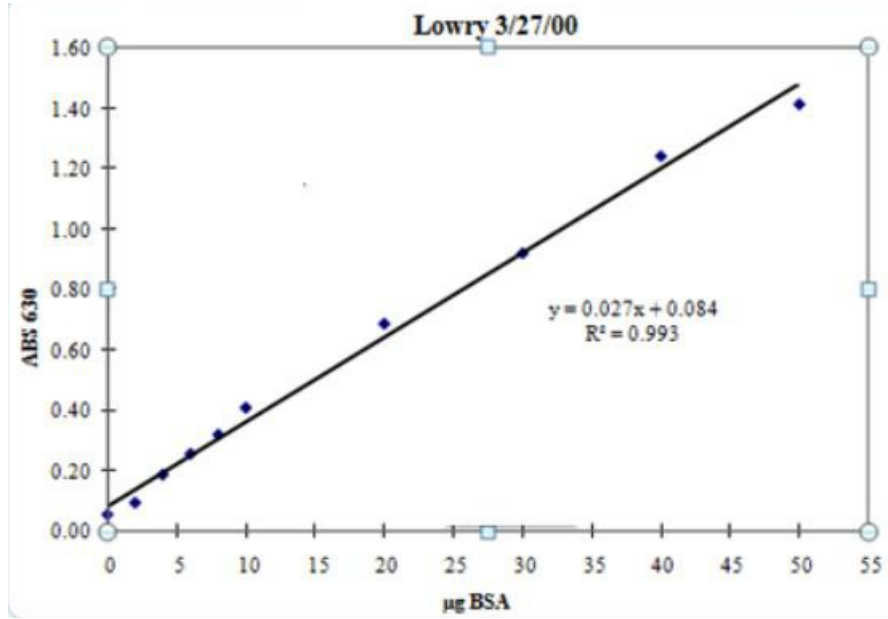
2) Ayrıca standart için BSA kullanılmış ve konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3) Yeni hazırlanan ayıraçtan 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 200 µL olacak şekilde konulmuştur.

4) Üzerine ilk kısma her standart için 2 kuyucuk olacak şekilde hazırlanan standartlardan, diğer kuyucuklara 1/5 oranında sulandırılmış numunelerden her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 50 µL koyulmuş ve karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

5) İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğun üzerine 20 µLfolin ayıracı koyularak 30 dk beklenmiş ve ELİSA okuyucu ile 630 dalga boyunda okunmuştur.

6) Örneklerin protein düzeyi, aşağıdaki şekilde verilen Standart grafik eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 1: Lowry Protein Standart Eğrisi

2.6.Sülfid uygulaması sonrası hücrelerdeki URG4/URGCP varlığının Western Blot ile kontrolü

Protein izolasyonu kısaca şu şekilde yapılmıştır:

Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 10 dakika RİPA solüsyonu (50 mMTris-HCl (pH7.4), 150 mMNaCl, 1% Nonidet, 0.5% sodiumdeoxycholate, 1% SDS, proteazininhibitörleri (1 mMphenyl-methanesulfonylfluoride (PMSF), 10 ug/ml leupeptin, 20 ug/ml aprotinin), ve fosfataz inhibitörü (0.2 mM sodiumorthovanadate) ile buz üstünde bekletilmiştir. 10.000 rpm ve 4°C'de santrifüj sonrasında hücre döküntüleri çöktürülmüş ve total protein elde edilmiştir.

İzolasyonu yapılmış olan protein örnekleri (her birinden 50 veya 100ug) SDS-PAGE'e (sodiumdodecylsulfatepolyacrylamide gel electrophoresis – 8% resolving gel-(BioRad)) tabii tutulduktan sonra PVDF membrana (Millipore) geçirilmiştir. Proteinleri içeren PVDF membran, taze hazırlanmış PBS + 5% yağsız süt tozu + 0.05% Tween-20 içinde ve oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. PBS yıkamaları sonrasında, birincil antikor olarak 1:1000 oranında anti-URG4 (kendi ürettiğimiz) veya 1:1000 – 1:5000 oranında anti-β-aktin (Rabbitpolyclonal, AbCam) ve sonrasında horseradishperoxidase (HRP) konjuge ikincil antikorlar (goat anti-rabbitIgG – AccurateChemical&Scientific Corporation) kullanılmıştır. Sonuçlar “enhancedchemiluminescence” (SuperSignalSiRNACHEMILUMINESCENTDETECTION) tekniği ile görüntülenmiştir.

2.7.Komet analizi:

DNA çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan, hasara duyarlılığı yüksek bir moleküldür. Genetik bilginin sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemli olduğundan çekirdekte DNA hasarını onaran çeşitli onarım sistemleri yer almaktadır. Ağır hasar oluştuğunda veya DNA onarım aktivitesi defektif ise replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olmaktadır. Kanser, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıkların etiyolojisinde yer alan DNA hasarı günümüzde kronik nörodejeneratif hastalıkların izlenmesinde, kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin takibinde, ksenobiyotik ve radyasyon aracılı genotoksisitenin belirlenmesinde biyolojik belirteç olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak tanıyan teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır. Tek hücre jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla “KometAssay” yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metottur. Komet yönteminin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Elde edilen veriler hem hücrede meydana gelen DNA hasarının ne kadar olduğunu belirler hemde hücrenin hangi yapıya geçtiğini ifade eder. Kometler rastgele seçilmeli ve tüm jeli temsil etmelidir. Jel sistematik bir şekilde taranmalıdır. Kenar bölgeler, hava kabarcıklarının kenarları ihmal edilmelidir. Bu bölgelerde genellikle anormal hasar görülür. Üst üste binen Kometlerin analizi bilgisayar analiz yöntemlerinin kullanımıyla mümkün değildir. Ancak, üst üste binen birçok Kometlerin kuyrukları oldukça uzundur. Eğer çok fazla sayıda üst üste binen Komet göz ardı edilirse, hasar görmemiş az kuyruklu “Komet'lere” önemli derecede eğilim oluşabilir. Bu durumda, jel hazırlanırken hücre yoğunluğunun iyi ayarlanması gerekmektedir. Araştırmacı tarafından seçilen Kometler için çeşitli flüoresan parametreleri hesaplayacak çok sayıda yazılım bulunmaktadır. Bu yazılımlar ile DNA parçaları baş ve kuyruk olarak iki ana bölüme ayrılabilen, çeşitli parametreler hesaplanabilmektedir. Bu parametreler;

HL (Baş uzunluğu, μm)

TL (Kuyruk uzunluğu, μm)

Baş Yoğunluğu (Baş kısmındaki DNA yüzdesi, % H-DNA olarak ifade edilir.)

Kuyruk Yoğunluğu (Kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi,% T-DNA olarak ifade edilir.)

Kuyruk Momenti (TM, µm olarak ifade edilir, % T-DNA ile TL'nin çarpımının 100'e bölünmesi ile edilen bir değerdir)

Kuyruk Migrasyon(Baş kısmının kenarından küçük saptanabilir fragmana

DNA göçünün uzunluğudur.)

Araştırmamızda aşağıda tarif edildiği şekilde Komet Analizi yapılmıştır.

2.7.1. Komet Assay (Tek Hücre Elektrofrezisi)

1) Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 104 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklenmiştir.

2) Gruplarda belirtilen dozlarda sülfiteklenmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir.

3) Hücreler tripsinize edilmeden teflon bir hücre kaldırıncı ile plakalardan kaldırılmıştır. 1500 g'de 5 dakika santrifuj edilmiş ve 75 µl % 0,5'lik Ca²⁺ ve Mg+içermeyen PBS (fosfat tampon tuzu) ile 37°C de hazırlanan "Lowmelting" agaroz (LMA) ile resüspanse edilmiştir.

4) Önceden % 1'lik "normal melting" agaroz (NMA) ile kaplanmış olan lam üzerine ince bir tabaka halinde dökülmüş ve 30 dk buz üzerinde beklendikten sonra 3. tabakayı oluşturan 70 µl % 0,5'lik LMA ile kaplanmış ve tekrar 10 dakika buz üzerinde beklenmiştir. Daha sonra lam hücresel proteinleri uzaklaştırmak amacıyla, pH'ı 10 olan soğuk lizis bağlama tamponu ile 60 dakika boyunca 40°C de muamele edilmiştir.

2.7.2. Görüntü Analizi

Hasarsız hücrelerin DNA'ları incelendiğinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun ve ortası parlak bir görünüm ile karşılaşılmaktadır. DNA'nın bu görünümü nonmigrasyon olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak normalde düzgün kenarlı olan DNA görüntüsü, kırıklarının çekirdek dışına göçünün nedeniyle düzensiz kenarlı bir görüntü halini alır. Bu görünüme stretch ya da lowmigration denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (Komet, yüksek migrasyon) şeklini alır. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir.

2.8.Sülfite maruziyeti sonrasında hücrelerin invazyon kapasitesinin belirlenmesi:

İlgili hücreler invazyon kapasitesi "trans-well matrigel invasionchamber"- invazyon kapları (BectonDickinson, ABD) kullanılarak 24-kuyucuklu kültür plakları içerisinde araştırılmıştır. Kısaca, invazyonkuyucuğunun alt-odacığın serum içeren kültür ortamı, matrigel membranın (8 µmporaçıklıklı) üst kısmına ise, gece boyunca serumsuz kültür ortamında bulundurulan farklı dozlarda sülfite maruziyetinde SHSY5Y hücreleri eklenmiştir. Gece boyunca inkübasyonu takiben, membranın üst kısmında kalan invazyon olmamış hücreler kulak pamuğu çubuğu ile silinerek temizlenmiştir. Membranın alt yüzeyine göç etmiş hücre miktarı ise kristal violet boyası ile boyanarak ışık mikroskobunda sayılarak değerlendirilmiştir.

2.9.Sülfite maruziyeti sonrasında hücrelerin koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi:

Sülfite maruziyeti sonrasında 6 kuyucuklu kaplara 10^3 hücre ekimi yapılmış ve 10 gün boyunca hücrelerin 2 günde bir ortamlarını değiştirmek suretiyle 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda bekletilmiştir. 10 günün sonunda hücreler soğuk metanolle -20°C 'de 10 dakika fikse olmaları sağlanmıştır. Fikse olmuş koloniler kristal violet boyası ile 15 dakika boyanmıştır. Boyanmış olan koloniler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılmış ve değerlendirilmiştir.

2.10. Genlerin Kantitasyon Değerlerinin İstatistiksel Analizleri

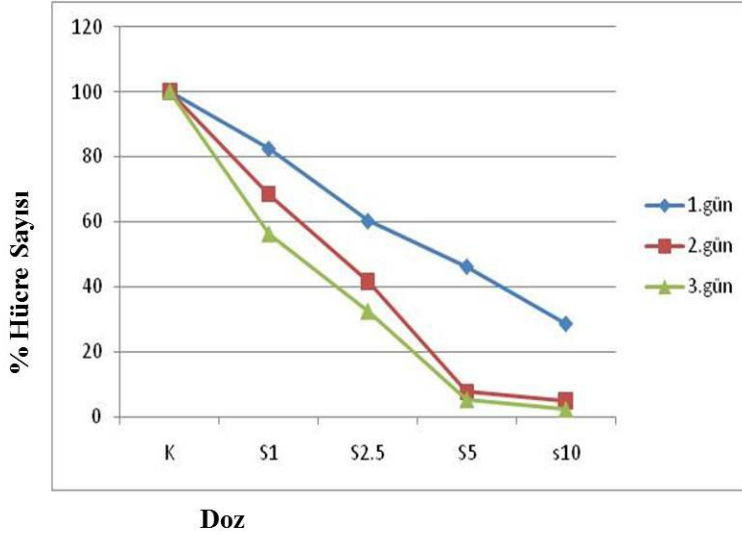
Verilerin analizi $\Delta\Delta\text{CT}$ metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantitasyonu yapıldı. Web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanıldı. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun $\pm 3\text{SD}$ karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle, gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlendi. Grupların karşılaştırılması "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.BULGULAR

3.1. Sülfite Hücre Canlılığı ve Proliferasyonuna Etkisi

Model sistem olarak insan nöroblastom hücre hattı (SHSY5Y--ATCC no: CRL-2266) kullanılmıştır. XTT metodu ile hücre proliferasyonu tespit edilmiştir(Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Biological Industries)). Kit içeriğinde reaktif madde olarak tetrazolium tuzu olan "XTT" bulunmaktadır. 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki hücrelerin sülfite maruziyetini (0.1, 1, 5 mM) takip eden 24-48-72

saatlerde aktive edilmiş XTT solüsyonu eklenmiştir. 4 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda bekletilmiştir. Deney sonucunda oluşan renk reaksiyonu 450nm'da 96 kuyucuklumikroplaka okuyucuda tespit edilmiştir. Sülfitin IC₅₀ dozu 24. saatte 5 mM olarak saptanmıştır (Şekil 1).



Şekil 2: XTT analizi ile doza bağlı hücre canlılığı sonuçları

3.2.Sülfite maruziyeti sonrasında hücre döngüsünde rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:

Gerçek zamanlı RT-PCR ile kontrol grubu ve 5mM sülfite uygulanmış doz grubu arasındaki hücre döngüsünde rol alan genlerin ve URG4/URGCP gen ekspresyonlarının nasıl değiştiği custom olarak dizayn edilen plaka ile duplika şekilde belirlenmiştir (Taqman Array 96-well plate Human Cell Cycle Material Number: 4414254). Çalışma ekspresyonları analiz edilen genler Tablo 2 de gösterilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı değişim bulunan genler Tablo3 de belirtilmiştir.

Tablo 2: Ekspresyon değişimleri incelenen hücre döngüsünde görevli olan genler

Sembol	Tanımlama	Gene Adı
ABL1	C-abl Onkogen 1, Reseptör Tirozin Kinaz	ABL/JTK7
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutasyonu	AT1/ATA
ATR	Ataxia telangiectasia ve Rad 3 ilişkili	FRP1/MEC1
BCL2	B-hücre KLL/lenfoma 2	Bcl-2

CCNB1	Siklin B1	CCNB
CCNB2	Siklin B2	HsT17299
CCNC	Siklin C	CycC
CCND1	Siklin D1	BCL1/D11S287E
CCND2	Siklin D2	KIAK0002
CCNE1	Siklin E1	CCNE
CCNF	Siklin F	FBX1/FBXO1
CCNG1	Siklin G1	CCNG
CCNG2	Siklin G2	Cyclin G2
CCNH	Siklin H	CAK/p34
CCNT1	Siklin T1	CCNT/CYCT1
CCNT2	Siklin T2	FLJ90560
CDC16	Hücre Bölünme Döngüsü 16 sislog (<i>S. cerevisiae</i>)	APC6
CDC2	Hücre Bölünme Döngüsü 2, G'den S ve G2'den M	CDC28A/CDK1
CDC20	Hücre Bölünme Döngüsü 20 homoloğu (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC20A/p55CDC
CDC25A	Hücre Bölünme Döngüsü 25 homoloğu A (<i>S. pombe</i>)	
CDC34	Hücre Bölünme Döngüsü 34 homoloğu (<i>S. cerevisiae</i>)	E2-CDC34/UBC3
CDK2	Siklin Bağımlı Kinaz 2	p33(CDK2)
CDK4	Siklin Bağımlı Kinaz 4	CMM3/PSK-J3
CDK5R1	Siklin Bağımlı Kinaz 5, Düzenleyici Altünite 1 (p35)	CDK5P35/CDK5R
CDK5RAP1	CDK5 düzenleyici altünite ile ilişkili protein 1	C20orf34/C42
CDK6	Siklin Bağımlı Kinaz 6	PLSTIRE
CDK7	Siklin Bağımlı Kinaz 7	CAK1/CDKN7
CDK8	Siklin Bağımlı Kinaz 8	K35
CDKN1A	Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörü 1A (p21, Cip1)	CAP20/CDKN1
CDKN1B	Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörü 1B (p27, Kip1)	CDKN4/KIP1
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörü 2A (melanom, p16, CDK4 inhibitörü)	ARF/CDK4I
CDKN2B	Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörü 2B (p15, CDK4 inhibitörü)	CDK4I/INK4B
CDKN2C	Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörü 2C (p18, CDK4 inhibitörü)	
CDKN2D	Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörü 2D (p19, CDK4 inhibitörü)	
CDKN3	Siklin Bağımlı Kinaz inhibitörü 3	CDI1/CIP2
CHEK1	CHK1 kontrol noktası homoloğu (<i>S. pombe</i>)	CHK1

CHEK2	CHK2 kontrol noktası homoloğu (S. pombe)	CDS1/CHK2
c-MYC	v-MYC miyelositomatosiz viral onkogen homoloğu (avian)	
E2F4	E2F transkripsiyon faktörü 4, p107/p130 bağlanma	E2F-4
HRAS	v-Ha-ras Harvey sıçan sarkoma viral onkogen homoloğu	
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homoloğu	
NRAS	Nöroblastom RAS viral (v-ras) onkogen homoloğu	
URG4	Up-Regulated-Gene-4	URG4
TP53	Tümör protein p53	LFS1/TRP53
GAPDH	Gliseraldehit -3-fosfat dehidrogenaz	G3PD/GAPD
ACTB	Beta Aktin	PS1TP5BP1
HGDC	İnsan Genomik DNA Kontaminasyonu	HIGX1A
RTC	Revers Transkripsiyon Kontrolü	RTC
PPC	Pozitif PCR Kontrol	PPC

Tablo 3: Kontrol ve Doz Grupları Arasında Hücre Döngüsü Gen Ekspresyon Değişim Tablosu

Hücre Döngüsü Gen ekspresyon değişim tablosu		
(Kontrol grubuna göre)		
Genler	Değişim	p değeri (p<0.05)
CCND1	-2,5458	0,000125
CCND2	-2,1836	0,00119
CDK4	-1,6131	0,00022
CDK6	-2,1391	0,03225
E2F4	-2,3137	0,043
RB1	-1,5917	0,0478
TP53	-2,3386	0,00226

3.3. Sülfid maruziyeti sonrasında apoptozda rol alan gen ekspresyonlarının ve URG4/URGCP gen ekspresyonunun kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PCR ile belirlenmesi:

Gerçek zamanlı RT-PCR ile kontrol grubu ve 5mM sülfid uygulanmış doz grubu arasındaki apoptozda rol alan genlerin ve URG4/URGCP gen ekspresyonlarının nasıl değiştiği kastım olarak dizayn edilen plaka ile duplike şekilde belirlenmiştir. (Taqman Array 96-well plate Human Apoptosis Material Number: 4414203). Çalışma ekspresyonları analiz edilen genler Tablo 4 de gösterilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı değişim bulunan genler Tabla 5 de belirtilmiştir.

Tablo 4: Ekspresyon değişimleri incelenen apoptozda görevli olan genler

Sembol	Tanımlama	Gene Adı
APAF1	Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1	CED4/DKFZp781B1145
BAD	BCL2-hücre ölümü antagonisti	BBC2/BCL2L8
BAG1	BCL2-İlişkili athanogen	BAG-1
BAK1	BCL2-antagonist öldürücü 1	BAK/BAK-LIKE
BAX	BCL2- X protein ilişkili	Bax zeta
BCL2	B-hücre CLL/Iemfoma 2	Bcl-2
BCLAF1	BCL2-transkripsiyon faktör ilişkili 1	BTF
BID	BH3 ölü antagonist domain ilişkili	FP497
BIRC8	Bakuloviral IAP 8 tekrar içeren	ILP-2/ILP2
BIK	BCL2-ile ilişkili öldürücü	BIP1/BP4
XIAP	X-bağlı apoptoz inhibitörü	API3/BIRC4
NOD1	Nukleotid bağlayan oligomerizasyon domaini 1	CARD4/NLRC1
CASP1	Kaspaz 1, apoptoz ilişkili sistein peptidaz 1	ICE/IL1BC
CASP10	Kaspase 10, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	ALPS2/FLICE2
CASP14	Kaspase 14, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	MGC119078
CASP2	Kaspase 2, apoptoz ilişkili sistein peptidaz 2)	CASP-2/ICH-1L
CASP3	Kaspase 3, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	CPP32/ CPP32B
CASP4	Kaspase 4, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	ICE(rel)II/ICEREL-II
CASP5	Kaspase 5, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	ICE(rel)III/ICEREL-III

CASP6	Kaspase 6, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	MCH2
CASP7	Kaspase 7, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	CMH-1/ICE-LAP3
CASP8	Kaspase 8, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	ALPS2B/CAP4
CASP9	Kaspase 9, apoptoz ilişkili sistein peptidaz	APAF-3/APAF3
CD40	CD40 molekülü, TNF reseptör süper aile üyesi 5	Bp50/CDW40
CD40LG	CD40 ligand	CD154/CD40L
DAPK1	Ölüm ilişkili protein kinaz 1	DAPK/DKFZp7811035
DFFA	DNA fragmentasyon faktörü, 45kDa, alfa polipeptit	DFF-45/DFF1
FAS	Fas (TNF reseptör süper aile üyesi 6)	ALPS1A/APO-1
RIPK2	Reseptör-etkileşimli serin-treonin kinaz 2	CARD3/CARDIAK
TNF	Tümör nekroz faktör (TNF süper aile, üye 2)	DIF/TNF-alpha
TNFRSF10A	Tümör nekroz faktör reseptör süper aile, üye 10a	APO2/CD261
TNFRSF10B	Tümör nekroz faktör reseptör süper aile, üye 10b	CD262/DR5
TNFRSF11A	Tümör nekroz faktör reseptör süper aile, üye 11b	OCIF/OPG
TNFRSF1A	Tümör nekroz faktör reseptör süper aile, üye 1A	CD120a/FPF
TNFRSF21	Tümör nekroz faktör reseptör süper aile, üye 21	BM-018/DR6
TNFRSF25	Tümör nekroz faktör reseptör süper aile, üye 25	APO-3/DDR3
CD27	CD27 molekülü	S152/T14
TNFRSF9	Tümör nekroz faktör reseptör süper aile, üye 9	4-1BB/CD137
TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2	53BP2/ASPP2
TRADD	TNFRSF1A-ilişkili ölüm domaini	Hs.89862
TRAF2	TNF reseptör ilişkili faktör 2	MGC:45012/TRAP
TRAF3	TNF reseptör ilişkili faktör 3	CAP-1/CD40bp
TRAF4	TNF reseptör ilişkili faktör 4	CART1/MLN62
GAPDH	Gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz	G3PD/GAPD
ACTB	Beta aktin	PS1TP5BP1
URG4	Up-Regulated-Gene-4	URG4
RTC	Revers Transkripsiyon Kontrolü	RTC
PPC	Pozitif PCR Kontrol	PPC

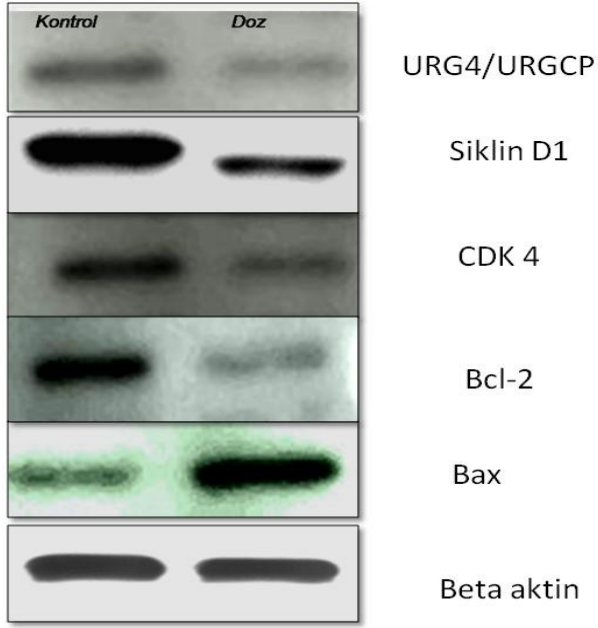
Tablo 5: Kontrol ve Doz Grupları Arasında Apoptoz Gen Ekspresyon Değişim Tablosu

Apoptoz Gen ekspresyon değişim tablosu

(Kontrol grubuna göre)		
Genler	Değişim	p değeri (p<0.05)
BAX	-8,33	0,013
BCL2	6,98	0,0024
BID	-7,225	0,000336
CASP2	2, 83	0,019
CASP3	-5,96	0,00059
CASP9	-6,691	0,00952
DIABLO	2,38	0,0448

3.4. Sülfite uygulaması sonrası hücrelerdeki URG4/URGCP varlığının Western Blot ile kontrolü

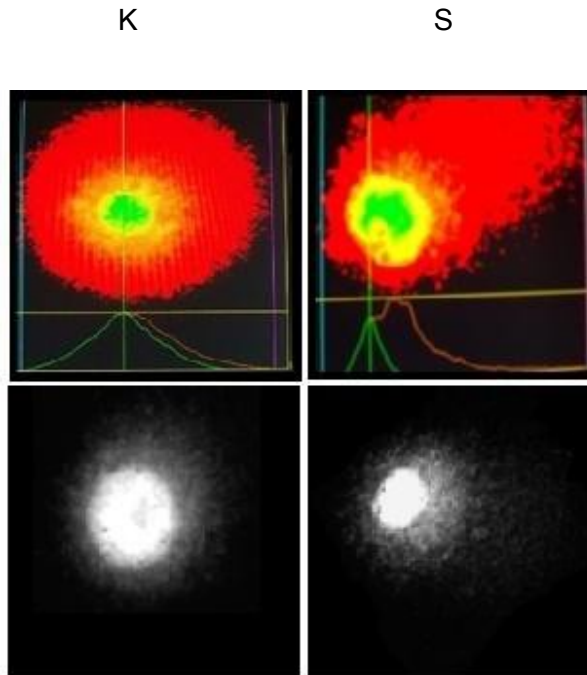
Western blot yöntemi ile URG4 dışındagen ekspresyonunda anlamlı değişim olan URG4/URGCP, CDK4,Siklin D1, Bax ve Bcl-2'nin protein düzeyindeki ekspresyon değişimleri de araştırılmıştır ve sonuçlar şekil 3' te gösterilmiştir.



Şekil 3: Western blot analizi ile kontrol ve doz gruplarındaki URG4'ün protein düzeyindeki değişimi

3.5. Komet analizi

Komet analizi ile belirlenmiş genotoksositeye ait demonstratif gösterimler şekil 4 de verilmiştir.

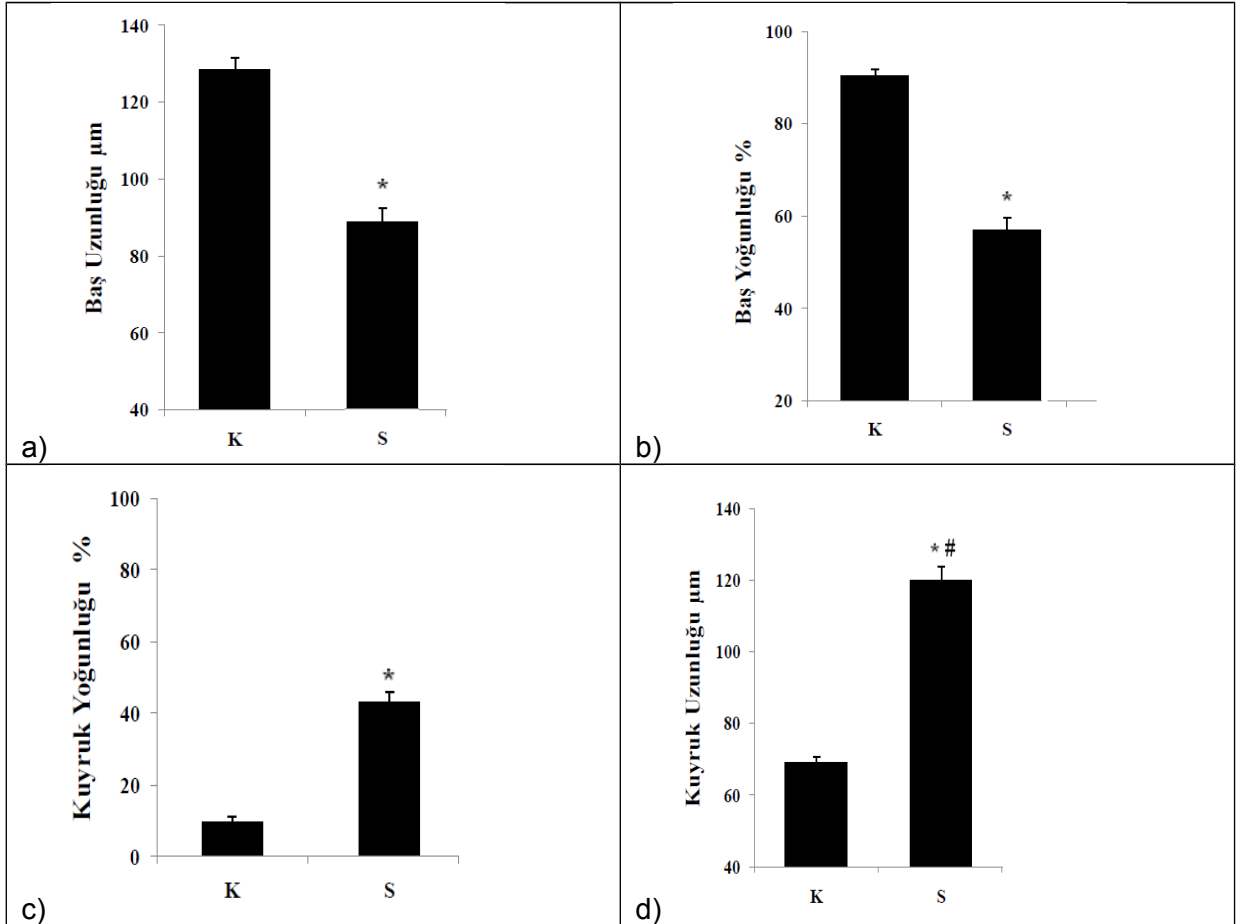


Şekil 4: Grupların 24 saat inkübasyonunu takiben Komet analizi ile demonstratif olarak görüntüsü. K: kontrol, S: 5 mM dozda sülfite uygulanmış grup.

Toksosite sonucu oluşan fragmente DNA' nın varlığını saptamak için çalışma gruplarında Komet yöntemi kullanılmıştır. Cometassay IV programı yardımı ile baş uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk migrasyonu ve kuyruk momenti parametreleri 150 hücrede ölçülerek ortalamaları alınmıştır.

3.5.1. Baş - Kuyruk Uzunluğunu ve Yoğunluğunun Belirlenmesi

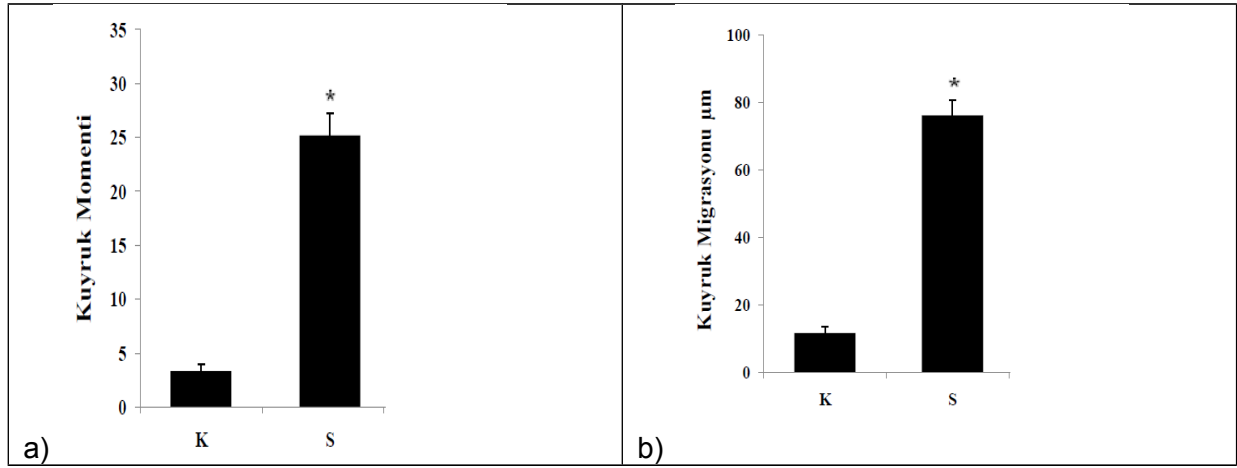
Baş uzunluğu ve yoğunluğu sülfite grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.001$). Parçalanmış genetik materyalin kuyruğa ait parametrelerinden olan uzunluğu ve yoğunluğu kontrole göre sülfite grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.001$, Şekil 5).



Şekil 5: Kontrol ve sülfid (5mM) dozunun 24 saat inkübasyonu takiben Komet yöntemi ile değerlendirilen değerleri a) baş uzunluğu b) baş yoğunluğu c) kuyruk yoğunluğu d) kuyruk uzunluğu *) $p < 0.001$ düzeyinde kontrolden fark

3.5.2.Kuyruk Momenti ve Migrasyonun Belirlenmesi

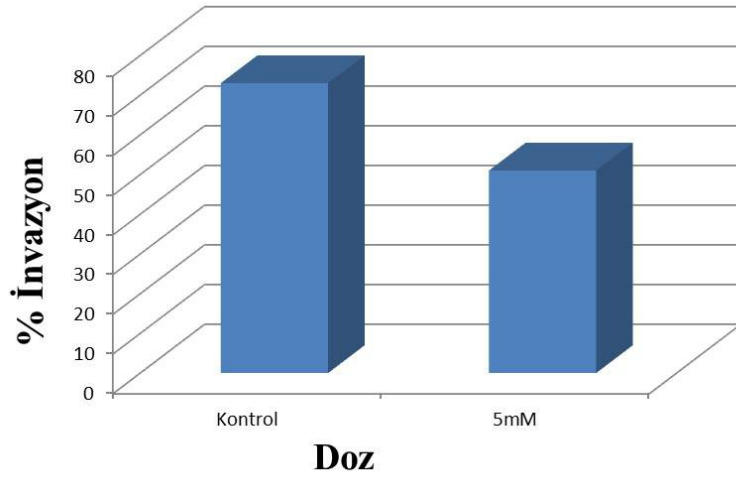
Benzer şekilde genotoksisite ölçümünün kuyruğa ait parametrelerinden kuyruk migrasyonu (Şekil 6a) ve kuyruk momentinin (Şekil 6b) kontrole göre doz grubunda istatistiksel olarak önemli oranda ($p < 0.001$) artmış olduğu izlenmiştir.



Şekil 6: Kontrol ve sülfid (5mM) dozunun 24 saat inkübasyonu takiben Komet yöntemi ile değerlendirilen değerleri a) Kuyruk Momenti b) Kuyruk Migrasyonu *) $p < 0.001$ düzeyinde kontrolden fark

3.6 Sülfid maruziyeti sonrasında hücrelerin invazyon kapasitesinin belirlenmesi

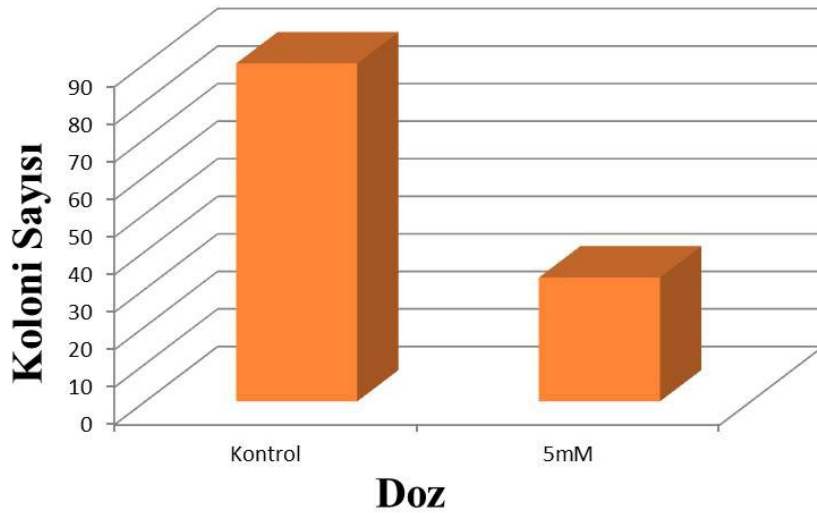
Sülfid ile muamele edilmiş SHSY5Y nöroblastom hücrelerinin invazyon kapasiteleri belirlenmiştir. Kontrol grubunun invazyon kapasitesi %73 doz grubunun invazyon kapasitesi ise %51 olarak hesaplanmıştır. İnvazyon deneyi sonucunda sülfid maruziyeti ile hücre invazyon kapasitesinin kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 7).



Şekil 7: Sülfitemaruziyeti sonrasında SHSY5Y hücrelerinin invazyonkapasiteleri

3.7. Sülfitemaruziyeti sonrasında hücrelerin koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi

Sülfitem ile muamele edilmiş SHSY5Y nöroblastom hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. Deney sonucunda kontrol grubunun ortalama koloni sayısının 90 doz grubunun ortalama koloni sayısının 33 olduğu görülmüştür. Koloni testi sonucunda sülfitem ile muamele edilmiş SHSY5Y nöroblastom hücrelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında koloni oluşturma kapasitelerinin belirgin şekilde azaldığı görülmektedir(Şekil 8).



Şekil 8: Sülfitemaruziyeti sonrasında SHSY5Y hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirmiş olduğumuz projemizde, SHSY5Y hücre dizinini model sistem kullanılarak nörotoksik olduğu bilinen sülfid maruziyeti sonrasındaki kanser hücre davranışı etki mekanizması morfolojik/moleküler düzeyde araştırılmış ve URG4'ün nöroblastoma da onkogenik fonksiyonu ve moleküler etki mekanizması ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Reist ve ark. (1998), sülfid radikallerinin DNA ve protein hasarını uyararak hücre ölümüne neden olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada da, sülfidin çeşitli koşullar altında nörotoksik ajan olarak rol alabileceğini bildirmişler fakat sülfidin nörotoksik mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi için daha çok *in vivo* çalışma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (Reist M, 1998). Schoneich ve ark. (1995), yüksek düzeyde sülfid oluşan radikalleri ile reaksiyona girerek oluşturduğu toksik etkinin hücresel bileşenlere ve proteinlere saldırması ile oluşan toksik etkiden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamız sonucunda sülfid molekülünün SHSY5Y nöroblastom hücre hattında IC₅₀ dozu 24 saat sonunda 5 mM olarak saptanmıştır (Şekil 1).

Sülfidin DNA üzerine olan genotoksik etkisi ise pek çok araştırmaya konu olmuştur. Örneğin CHO-AS52, CHL, hamster V79 gibi hücre dizilerinde ve fibroblastlarda DNA mutasyonlarına ve hasarlarına yol açtığı gösterilmiştir ve oksidan stresin nükleik asit bazlarını hasarladığı tek ve çift iplik DNA kırıklarına sebebiyet verdiği iyi bilinmektedir (Meng Z, 1999 ; Kargacin B, 1993). Çalışmamızda sülfidin genotoksik etkisini test etmek için Komet analizini kullandık. Komet yönteminin temel prensibi hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik etkisi muhtemel ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. Bu moleküller DNA spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluştururlar (Dikilitaş M ve Koçyiğit A, 2010; Dinçer Y. ve Kankaya S., 2010).

Didenko (2006) ve Fidan, DNA hasarı oluşmaya başlamış ise fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırıklarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak normalde düzgün kenarlı görüntünün DNA kırıklarının çekirdek dışına göçü nedeniyle düzensiz bir hal aldığını ve merkezden kenara doğru uzama görüldüğünü ve bu uzamanın hasar ile doğru orantılı

olduğunu belirtmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda literatürdeki DNA hasarı arttıkça DNA kırıklarının kuyruğa doğru göçüne bağlı uzayıp kuyruklu görüntü alması ile uyumlu idi (Fidan AF; Didenko V,2006). Genotoksisite sonuçlarını özetlemek gerekirse baş uzunluğu sülfid grubunda kontrole göre anlamlı olarak azalırken genotoksik etkiyi arttırıyordu. Bu bulgu ile uyumlu olarak baş yoğunluğunun da benzer bir kalıpla azaldığı izlendi. Parçalanan genetik materyalin kuyruğa ait parametreleri olan kuyruk uzunluğu, migrasyonu, yoğunluğu ve momenti ise benzer şekilde kontrole göre sülfid grubunda anlamlı olarak arttığı, istatistiksel olarak daha da önemli oranda anlamlı olduğu bulunmuştur.

Custom panelleri kullanılarak hücre döngüsü ve apoptozda görevli olan genlerin ekspresyonları ve URG4'ün değişimi araştırılmıştır. Deney sonuçlarımız, sülfid maruziyetinin URG4'ün hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve apoptozda rol alan bazı önemli gen ifadeleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Hücre döngüsü her zaman sıkı bir kontrol içerisinde ilerler. Bu kontrollerde siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve onların inhibitörleri görev alırlar. Siklinler; hücre döngüsü esnasında gerektiği zaman sentezlenen ve ardından görevini tamamladığında hızla parçalanan bir protein ailesidir. Siklin bağımlı kinazlar ise hücre döngüsü düzenleyici proteinleridir ve sadece siklinlere bağlandıklarında aktive olmaktadır (Esposito,2004 ; Evan G. 1998). Siklin bağımlı kinazlar hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli role sahiptirler. Çünkü bunların bir şekilde inaktive olması mitozun engellenmesine neden olmaktadır. Hücre döngüsü inhibitörlerinin fonksiyonları ise siklin/CDK komplekslerinin aktivitelerini sıkı bir şekilde denetlemektir. Pek çok kanser türünde proapoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasında dengesizlik oluşur. Dengenin antiapoptotik proteinler yönüne kayması kanserleşen hücrenin kontrollü olarak kendini öldürememesine neden olur. Sonuçta bazı kanser türlerinde, bu dengeyi sağlayacak yeni ilaçların geliştirilmesi tedavi seçeneği olarak görülmektedir (Fesik W.S, 2000). Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri normal şartlarda hücrelerde sessiz halde bulunurlar. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine, yol açan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8, Bid'i kırar; böylece, 15 kDa'luk bir karboksi terminal parça oluşur. Bid ayrıca diğer hücre yüzey olum reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşir. Bid karboksi terminal parçası Bak aracılı sitokrom c saliverilmesini de aktifleştirir (Petros A, 2004).

Şatıroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafında elde edilen URG4 gen dizisi sonuçları, insan genom dizisi sonuçları ile karşılaştırıldığında, URG4'ün kromozom 7p13 bölgesine lokalize olduğu ve daha önce tanımlanan genler ile herhangi bir uyum göstermediği bulunmuştur.

Ayrıca URG4'ün sitoplazma içinde 922 aminoasit içeren bir protein sentezlediği de tespit edilmiştir. Çeşitli bilgisayar programları yardımıyla URG4'ün cDNA'sı kullanılarak antijenik peptitler seçilmiş ve URG4'e karşı özellikli antikor aynı grup tarafından geliştirilmiştir.

URG4 antikorunu kullanılarak yapılan immünohistokimya deneyleri ile HBV ile enfekte olan karaciğer ve hepatoselüler karsinom olgularında aşırı miktarda URG4 protein ekspresyonu gözlemlenirken, HBV ile enfekte olmayan karaciğer dokularında çok az miktarda URG4 protein ekspresyonu saptanmıştır. Bu sonuçlar, RNA düzeyinde Northern Blot ve bununla birlikte in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan deney sonuçları ile de desteklenmiştir. Hepatoselüler karsinom olgularında URG4 ve HBV X protein ekspresyonunun aynı hücrelerde birlikte lokalize oldukları saptanmıştır. Bu aşamaya kadar elde edilen araştırma sonuçlarının tümü URG4'ün in vivo ortamda HB X proteininin doğal bir efektörü olabileceği hipotezini güçlendirmiştir. In vitro ortamda yapılan deneylerde, URG4'ün HepG2 hücre hattına transfekte edilip aşırı ekspresyonun sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulguyu destekleyen diğer çalışmalarda; yumuşak agar besi yerinde yapılan deneylerde koloni oluşumunu ve immün sistemi baskılanmış farelerde yapılan deneylerde tümör oluşumunu hızlandırdığı saptanmıştır. Yapılan tüm deneyler sonucunda elde edilen gözlemler, URG4'ün bu özelliklerinin onkogenlerin karakteristik fonksiyonlarına benzediği, HBV X proteini varlığında ekspresyonu artan URG4'ün çok basamaklı hepatoselüler kanser karsinogenezinde önemli rol oynayabilecek yeni aday onkogen olabileceğini düşündürmektedir (Huang J, 2009; Song J,2006 ; Tufan N.L, 2002 ; Tong G.D,2007). Bunun yanında yeni çalışmalar, mide kanseri ve osteosarkom olgularında da URG4'ün aday bir onkogen olabileceğini desteklemektedir. Mide kanseri ile yapılan çalışmada URG4'ün siklin D1 ekspresyonunu arttırdığı ve böylece hücre döngüsünde hızlandığı gösterilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda da sülfid maruziyeti sonrası nöroblastom hücre hattı SHSY5Y'de URG4 ifadesinin doz gruplarında baskılandığı ve bunun sonucunda siklin D1 ekspresyonunu azalttığı ve hücre döngüsünü yavaşlatıp durdurduğu gösterilmiştir. Ayrıca çalışma sonunda hücre döngüsünde görevli siklin D1, siklin D2, CDK4, CDK6 ve apoptozda görevli bax, Bcl-2,bid gibi genlerin ifadelerindeki değişim anlamlı bulunmuştur. İnvazyon ve koloni çalışmaları ile de sülfid molekülünün SHSY5Y hücrelerinde doz gruplarında kontrole göre invazyonu ve koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında nöroblastom gelişiminden sorumlu olabileceği düşünülen yeni bir gen olan URG4 geninin ve diğer kemoteropetik ajanlar gibi toksik olduğu bilinen ancak tedavide kullanılmayan sülfidin genetik değişiklikler üzerinde etkisinin

araştırılmış ve elde edilen veriler ışığında, nöroblastom gelişimi ile sonuçlanan karsinogenezde URG4/URGCP'nin bilinmeyen mekanizmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma, nöroblastom tedavisinde yapılacak daha detaylı ve ileri çalışmalara ışık tutacaktır.

5. KAYNAKLAR

Agar A.,Kucukatay V., Yargicoglu P., Aktekin B., Kipmen-Korgun D., Gumuslu S., Apaydin C 2000. The effect of sulfurdioxide inhalation on visualevoked potentials, antioxidant status and lipid peroxidation in Alloxan-induced diabetic rats. *ArchEnviron Contam Toxicol*, 39: 257-264

Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In Pizzo P, Poplack DG (eds).2006. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 933.

Cohen H.J.,Fridovich I. Hepatic Sulfite Oxidase.1971. The Nature and Function of TheHemeProstheticGroups. *J BiolChem*, 246: 367-373

Didenko VV. Methods in MolecularBiology,2006.In SituDetection of DNA Damage: Methods and Protocols. HumanaPressInc. Totowa, NJ.vol 203.

Dikilitaş M, Koçyiğit A.2010. Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ileDNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. HR.Ü.Z.F. Dergisi,14(2):77- 89.

Dinçer Y, Kankaya S.2010. DNA Hasarının Belirlenmesinde CometAssay. Türkiye Klinikleri J MedSci, 30(4):1365-73.

Dodurga Y, Avcı CB, Susluer SY, Satiroğlu Tufan NL, Gündüz C.2012. The expression of URGCP gene in prostate cancer cell lines: correlation with rapamycin. *Mol BiolRep*, 39(12):10173-7.

Earnshaw, W.C., Kromer, G.2000. Two distinct pathways leading to nuclearapoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 192: 571-580

Esposito, V., Baldi, A., Tonini, G., et al. 2004. Analysis of cell Cycle Regulator Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Clin Pathol.*; 57:58-63

Evan, G., Littlewood, T. 1998. A matter of life and cell death. *Science*; 281: 1317-21

Fesik W.S.2000. Insight into programmed cell death through structural biology. *Cell*103: 273-282.

Fidan AF, DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi 8(1);53-64.

Graham. P.,Kandouz M., Meram A., and Kenneth V. Honn.2002. Mechanisms Controlling Cell Cycle Arrest and Induction of Apoptosis after 12-Lipoxygenase Inhibition in Prostate Cancer Cells, *Cancer Research*. 62(9),2721-7.

Gunnison A.F., Jacobsen D.W .1987. Sulfite Hypersensitivity, A Critical Review. *CRCCrit Rev Toxicol*, 17 (3): 185-214.

Gunnison A.F., Sellakumar A., Currie D., Synder E.A .1987. Distrubition, Metabolism And Toxicity of Inhaled Sulfur Dioxide And Endogenously Generated Sulfite in the Respiratory Tract of Normal and Sulfite Oxidase-Deficient Rats. *J Toxicol Environl Health*, 21: 141-162

Gurney JG., Davis S., Severson RK., Fang JY., Ross JA., Robison LL..1996 Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer*,78:532-41

Heafield M.T., Fearn S., Steventon G.B., Waring R.H., Williams A.C., Sturman S.G 1990. Plasmacysteine and sulphatelevels in patientswith motor neurone, Parkinson's and Alzheimer'sdisease. *NeurosciLett*,110: 216-220.

Huang, J.,Zhu, B., Lu, L., Lian, Z., Wang, Y., Yang, X., Satiroglu-Tufan, N. L., Liu, J., Luo, Z. 2009. TheExpression of Novel Gene URG4 in Osteosarcoma: CorrelationWithPatients' Prognosis, *Pathology*; 41: 149-54.

[Kargacin B](#), [Klein CB](#), [Costa M](#).1993. Mutagenicresponses of nickeloxides and nickel sulfides in Chinese hamster V79 cell lines at thexanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus.[Mutat Res](#).Jun;300(1):63-72.)

Kajiyama H., Nojima Y., Mitsuhashi H., Ueki K., Tamura S., Sekihara T., Wakamatsu R., Yano S., Naruse T (2000). Elevated levels of serum sulfite in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 11(5): 923-7.

Kucukatay V., Agar A., Yargicoglu P., Gumuslu S., Aktekin B 2003. Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Health*, 58(1):14-22

Lester M.R 1995. Sulfite Sensitivity: Significance in Human Health. *Journal of The American College of Nutrition* 14: 229-232

Li W, Zhou N. 2012. URG4 upregulation is associated with tumor growth and poor survival in epithelial ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. Jul;286(1):209-15.

Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, et al. 2002. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res*, 62:6651-8.

Marshall K.A., Reist M., Jenner P., Halliwell B 1999. The neuronal activity of sulfite plus peroxynitrite is enhanced by glutathione depletion: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 27: 515-520.

Matthey K.K., George Rani M.D., Yu L. A. 2012. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 18(10): 2740–2753 doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1939.

Meng Z and Zhang B. 1999. Polymerase chain reaction-based deletion screening of bisulfite (sulfur dioxide)-enhanced GPT-mutants in CHO-AS52 cells. [Mutat Res](#). Mar 10;425(1):81-5.

Mottley C., Mason R.P., Chignell C.F., Sivarajah K., Eling T.E 1982. The formation of sulfur trioxide radical anion during the prostaglandin hydroperoxidase-catalyzed oxidation of bisulfite (hydrated sulfur dioxide). *J Biol Chem*, 257: 5050-5055

Mottley C., Harman L.S., Mason R.P 1985. Microsomal reduction of bisulfite (aqueous sulfur dioxide)-sulfur dioxide anion free radical formation by cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol*, 34: 3005-3008

Mottley C., Harman L.S., Mason R.P 1985. Sulfur dioxide anion free radical formation by cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol*, 34: 3005-3008

Mudd S.H.,Irreverre F., Laster L .1967. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. *Science*, 156(3782):1599-602

Olshan AF, De Roos AJ, Teschke K, et al.1999. Neuroblastoma and parental occupation. *Cancer Causes Control*, 10:539-49

Oymak Y, Dodurga Y, Turedi A, Yaman Y, Ozek G, Carti O, Gunes BT, Erbudak E, Berber E, Avci CB, Vergin C.2012. Higher Expression of the Novel Gene Upregulated Gene 4 in TwoAcuteLymphoblasticLeukemiaPatientswithPoorPrednisoloneResponse. *ActaHaematol.* Jun 6;128(2):73-76.

Parsons R.B.,Waring R.H., Ramsden D.B., Williams A.C. 1997. Toxicity of cysteine and cysteinesulphinicacidtohumanneuronalcell-lines. *J NeuroSci*,152(1): 62-6

Petros, A., M., Olejniczak, E., T., Fesik, S., W.,2004. Structural biology of the bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*1644(2-3): 83-94

Reist M., Marshall K.A., Jenner P., Halliwell B .1998. Toxic Effects of Sulphite in Combination with Peroxynitrite on NeuronalCells. *J Neurochem*, 71: 2431-2438

Reist M, Jenner P, Halliwell B. Sulphiteenhancesperoxynitrite-dependent alpha1-antiproteinase inactivation.1998. A mechanism of lung injury by sulphurdioxide? *FEBS Lett*, 423(2):231-4

Satiroglu-Tufan L., Z. Lian, J. Liu, J. Pan, P. Arbuthnot, M. Kew, M.M. Clayton, M. Zhu, M.A. Feitelson. 2002. Hepatitis Bx AntigenStimulatesExpression of a Novel Cellular Gene, URG4, thatPromotesHepatocellularGrowth and Survival. *Neoplasia*, 4(4):355-68.

Siegel R., Naishadham D., Jemal A., *Cancer Statistics,2013, A cancer Journal for Clinicians*, 63:11-30

Song, J.,Xie, H., Liang, Z., et al.2006. Enhanced Cell Survival of Gastric Cancer Cells by a Novel Gene URG4, *Neoplasia*. 8, pp. 995-1002.

Susin, S.A.,Ddaugas, E., Ravagnan,L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M.,Castantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W0., Penninger, J.,

Tong, G. D., Zhou, D. Q., He, J. S., et al. (2007). Preneoplastic Markers of Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma and Their Significance in Clinical Settings, *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.*; 15: 828-32

Tufan, N. L., Lian, Z., Liu, J., et al. 2002. Hepatitis BxAntigen Stimulates Expression of a Novel Cellular Gene, URG4, that Promotes Hepatocellular Growth and Survival, Neoplasia. 4, pp.355-368.

Uguz, C.A., Naziroglu, M., Espino, J., Bejarano, I., Gonzalez, D., Rodriguez, B.A., Pariente, A.J. 2009 Selenium Modulates Oxidative Stress Induced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase 3 and -9 Activities. *J Membran Biol*, 232:15-23

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. YAVUZ DODURGA
Proje No:	113S167
Proje Başlığı:	Sülfid Molekülünün İnsan Nöroblastom Hücrelerinde (SHSY5Y) Yeni Bir Onkogen Olan URG4/URGCP Geni Üzerinden Olası Etki Mekanizmasının Araştırılması
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	ÇIĞIR BİRAY AVCI, GÜLSEREN BAĞCI
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B. TIBBİ BİYOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/08/2013 - 15/08/2014
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29999.2
Öz:	<p>Nöroblastom gibi sinir sistemi kökenli tümörlerde gerek cerrahi, gerekse diğer tedavi yaklaşımlarıyla tatmin edici sonuçların alınamaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur. Nöroblastomda tümör dokusundaki birçok genetik değişikliğin prognoz üzerine etkisi gösterilmiştir. Nöroblastom, tümör hücresinde yapılan genetik ve biyolojik incelemelerin, hastanın en iyi şekilde yönetilmesi için gerekli bilgileri bize sağlayan bir solid tümör modelidir.</p> <p>Sülfidin hijyenik amaçlarla kullanımı eski çağlara kadar gitmektedir. Günümüzde de ilaç ve besin endüstrisinde şekilde koruyucu olarak yaygın olarak kullanılan sülfid bileşiği, kükürt içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında vücutta endojen olarakta oluşturulmaktadır. Şatiroğlu-Tufan ve arkadaşları tarafından yapılmış olan araştırmada HBV X proteini varlığında ekspresyonunda artış gözlenen özgün-yeni bir gen tanımlanmış ve ?Up-Regulated-Gene-4/Up Regulator of Cell Proliferation (URG4/URGCP)? olarak isimlendirilmiştir. Temel yapı karakterizasyonu yapılan URG4?ün tam sekansının 3.607 kb olduğu ve sitoplazma içinde 922 aminoasit içeren bir protein sentezlediği tespit edilmiştir. Ayrıca URG4?ün 7. kromozomun kısa kolunda (7p13) lokalize olduğu ve daha önce tanımlanan genler ile herhangi bir uyum/homoloji göstermediği bulunmuştur (GeneID: 55665, Entrez Nükleotid ID NM_017920). URG4?ün HepG2 hücre dizinine over-ekspresyonu sağlandığında, büyüme faktörü varlığında veya yokluğunda hücre proliferasyonunu ve hayatiyeti arttırdığı, yumuşak agar besi yerinde koloni oluşumunu uyardığı ve immün sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Temel fonksiyona yönelik araştırma sonuçlarımız, URG4?ün hepatoselüler karsinom oluşumunda önemli rol oynayabilecek yeni bir onkogen olabileceğini göstermektedir. Grubumuz ve grubumuz dışında yapılmış olan araştırmalar da URG4?ün sadece karaciğer kanseri gelişiminde değil, mide kanseri, osteosarkom, over kanseri, prostat kanseri ve lösemi gelişiminde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.</p> <p>Bu çalışma kapsamında nöroblastom gelişiminden sorumlu olabileceği düşünülen yeni bir gen olan URG4/URGCP geninin ve diğer kemoteropetik ajanlar gibi toksik olduğu bilinen ancak tedavide kullanılmayan sülfidin genetik değişiklikler üzerinde etkisinin araştırılması planlanmıştır. Projemizden elde edilen yeni veriler ışığında, nöroblastom gelişimi ile sonuçlanan karsinogenezde URG4/URGCP?nin bugüne kadar bilinmeyen kontrol mekanizmalarının açıklanmasına büyük katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu yüzden hem URG4/URGCP geni ile araştırma yapmak hem de URG4/URGCP?nin diğer genlerle olan ilişkilerinin nöroblastomda geniş çaplı değerlendirilmesinin sağlanması, her açıdan projemize özgünlük kazandırmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	URG4/URGCP, Nöroblastom, Sülfid
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır