

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN VE SIÇAN GLİAL TÜMÖR HÜCRE DİZİLERİNDE TELOMERAZ
AKTİVİTESİ VE HÜCRE YÜZEY SİYALİLASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ARŞ. GRV. DİDEM COŞAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN : PROF. DR. AYŞE BAŞARAN

2006

ESKİŞEHİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Didem COŞAN'ın DOKTORA TEZİ olarak hazırladığı "İnsan ve Sıçan Glial Tümör Hücre Dizilerinde Telomeraz Aktivitesi ve Hücre Yüzey Sialilasyonu Arasındaki İlişkinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Tarih : 11 Nisan 2006


ÜYE : Prof. Dr. Ayşe BAŞARAN



ÜYE : Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ



ÜYE : Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENCI



ÜYE : Prof. Dr. Kubilay UZUNER



ÜYE : Prof. Dr. Turgay BUDAK



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulunun 18.04.06 tarih ve 163/2006 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

“İNSAN VE SIÇAN GLİAL TÜMÖR HÜCRE DİZİLERİNDE
TELOMERAZ AKTİVİTESİ VE HÜCRE YÜZEY SİALİLASYONU ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu alıŐma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 200411015 nolu proje olarak
desteklenmiŐtir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖZET.....	x
YABANCI DİLDE ÖZET.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. GLİAL HÜCRELER VE GLİOMALAR.....	4
2.1.1. Normal Glial Hücreler.....	4
2.1.1.1. Astrositler.....	5
2.1.1.2. Oligodendrositler.....	6
2.1.1.3. Ependimal hücreler.....	6
2.1.2. Gliomalar.....	7
2.1.2.1. Astrositomalar.....	8
2.1.2.2. Oligodendrogliomalar.....	9
2.1.2.3. Ependimomalar.....	9
2.2. TELOMER VE TELOMERAZ ENZİM KOMPLEKSİ.....	9

2.2.1.Telomeraz Enzim Kompleksi.....	11
2.2.1.1. Telomeraz Proteinleri.....	12
2.2.1.1.1.Temel Protein TERT (Telomeraz Revers Transkriptaz)	12
2.2.1.1.1.1. Ea-p123 veya p123.....	13
2.2.1.1.1.2. Tt-TERT.....	14
2.2.1.1.1.3. Est2p=Ever Shorter Telomeres 2p.....	14
2.2.1.1.1.4. hTERT=Human Telomeraz Revers Transkriptaz.....	14
2.2.1.1.2. Yardımcı Proteinler.....	15
2.2.1.1.2.1. p43 proteini.....	15
2.2.1.1.2.2. p80 ve p95 proteinleri.....	15
2.2.1.1.2.3.Est1p ve Est3p (Ever shorter telomeraz 1 ve 3 protein)	15
2.2.1.1.2.4.TEP1, p23 ve hsp90.....	16
2.2.1.2.Telomeraz RNA'sı (TERC)	16
2.3. SİYALİK ASİT (N-ASETİL NÖROMİNİK ASİT) (NANA)	19
2.4. NÖRONAL HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLÜ (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE, NCAM)	24

Sayfa

2.4.1.NCAM'ın Polisialilasyonu.....	28
2.4.2.NCAM'ın Metastazla İlişkisi.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. GEREÇ.....	30
3.1.1. Hücre Dizileri.....	30
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	30
3.1.3. Aygıtlar.....	32
3.2.YÖNTEM.....	35
3.2.1. Hücre Kültürü.....	35
3.2.1.1 Sterilizasyon.....	35
3.2.1.2. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışı.....	36
3.2.1.2.1. İnsan glioma hücre dizisi (DK-MG).....	36
3.2.1.2.2. Sıçan glioma hücre dizisi (C6)	36
3.2.1.3. Stoktan hücre çıkarma, kültür aşaması ve pasajlama.....	37
3.2.1.3.1. Stoktan hücre çıkarma.....	37
3.2.1.3.2.Kültür aşaması.....	37
3.2.1.3.3. Pasajlama.....	37
3.2.1.3.4. Süpernatant eldesi.....	38
3.2.1.3.5. Tripan blue boyama yöntemi.....	39

3.2.1.3.6. Stok hücre hazırlama.....	41
3.2.2. TRAP (tandem repeat assembly program) yöntemi ile telomeraz aktivitesinin ortaya çıkarılması ve ELISA ile aktivitenin belirlenmesi.....	42
3.2.2.1. Kit İçeriği.....	42
3.2.2.2. Hücre Ekstraktının Hazırlanması.....	44
3.2.2.3. Negatif Kontrolün Hazırlanması.....	45
3.2.2.4. Pozitif Kontrolün Hazırlanması.....	45
3.2.2.5. TRAP (Telomerik Tekrarı Çoğaltma Yöntemi=Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi.....	45
3.2.2.6. PCR'ın Kontrolü.....	47
3.2.2.6.1. Poliakrilamid Jel Hazırlanması için Gerekli Solüsyonlar.....	47
3.2.2.6.2. Poliakrilamid Jel Elektrophorez Yöntemi.....	48
3.2.2.6.3. Gümüş Boyama Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar.....	48
3.2.2.6.4. Gümüş Boyama Yöntemi.....	48
3.2.2.7. Hibridizasyon ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi.....	49

	Sayfa
3.2.2.8. Hesaplama.....	52
3.2.2.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	52
3.2.3. Spektrofotometrik Ölçüm ile Siyalik asit miktarının belirlenmesi.....	52
3.2.3.1. İstatistiksel Değerlendirme.....	53
3.2.4. RT-PCR ile TERT ve TR Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	54
3.2.4.1. Total RNA Eldesi.....	54
3.2.4.2. Revers Transkriptase -PCR RT-PCR Aşaması.....	55
3.2.4.3. Agoroz Jel Elektroforezi.....	57
3.2.4.3.1. %2'lik Agoroz Jelin Hazırlanması.....	58
3.2.5. İmmunohistokimya Protokolü ile NCAM belirlenmesi.....	58
4. BULGULAR.....	61
4.1. Telomeraz Aktivitesi ve Siyalik asit.....	61
4.1.1. DK-MG ve C6 Hücre Dizilerinde Telomeraz Aktivitesi.....	62
4.1.2. DK-MG ve C6 Hücre Dizilerinde Siyalik Asit.....	65
4.2. Telomeraz Revers Transkriptaz (TERT) ve Telomeraz Enzimi (TR) Ekspresyonları.....	71

4.2.1. DK-MG Hücre Dizilerinde TERT (hTERT), TR (hTR) ve Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ekspresyonları.....	71
4.2.1.1. DK-MG Hücre Dizilerinde Telomeraz Revers Transkriptaz (hTERT) Ekspresyonu	71
4.2.1.2. DK-MG Hücre Dizilerinde Telomeraz RNA'sı (hTR) Ekspresyonu.....	72
4.2.1.3. DK-MG Hücre Dizilerinde Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) Ekspresyonu	72
4.2.2. C6 Hücre Dizilerinde TERT (rTERT), TR (rTR) ve Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ekspresyonları.....	73
4.2.2.1. C6 Hücre Dizilerinde Telomeraz Revers Transkriptaz (rTERT) Ekspresyonu	73
4.2.2.2. C6 Hücre Dizilerinde Telomeraz Revers Transkriptaz (rTR, rTERC) Ekspresyonu	74
4.2.2.3. C6 Hücre Dizilerinde Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) Ekspresyonu	74
4.3. DK-MG ve C6 Hücre Dizilerinde Nöronal Hücre Adezyon Molekülü (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM) Boyaması.....	75
5. TARTIŞMA.....	78

	Sayfa
5.1. Telomeraz Aktivitesi.....	78
5.2. Siyalik Asit (NANA).....	80
5.3. hTERT ve hTR ekspresyonları.....	81
5.4. Nöronal Hücre Adezyon Molekülü (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM).....	83
6. SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÖZET

Hücre bölünmesinin belli bir sayıdan sonra son bulması veya kesintisiz devam etmesi, telomer boy uzunluğu ve telomeraz aktivitesi ile ilişkilidir. Telomeraz enzim kompleksi bir ribonükleoprotein kompleksi olup, yapısında telomeraz RNA'sı (TR, TERC), telomeraz proteini (TERT) ve yardımcı proteinler bulunur.

Siyalik asitler, hücrelerin birbirini tanınmasında, nöron gelişiminin uyarılmasında, hücre göçü ve hücreler arası bütünlüğünün sağlanmasında görev alırlar.

Kanser metastazı ve malignansilerde telomeraz aktivitesi ve siyalik asidin normal dokulara göre artmış olarak bulunması, bu iki parametrenin tümör marker'ı olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, insan glioma (DK-MG) ve sıçan glioma (C6) hücre dizisi kültürlerinden elde edilen hücre ekstratlarında; telomeraz aktivitesi, siyalik asit düzeyi, hücre zarında nöronal hücre bağlantı molekülü NCAM'ın varlığı, telomeraz RNA'sı (TR) ve telomeraz revers transkriptaz (TERT) ekspresyonunu değerlendirerek, telomeraz aktivitesi ile siyalik asit düzeylerinin pasajdan pasaja gösterdikleri değişimleri incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda kullandığımız DK-MG hücre dizisi için RPMI, C6 hücre dizisi için DMEM/F12 besiyeri kullanılarak hücreler 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edildi. 3.,6.,9.,12 ve 15. pasajlarda TRAP yöntemi ile telomeraz aktivitesi belirlendi. Siyalik asit miktarları spektrofotometrik olarak ölçülerek tesbit edildi. Ayrıca bu örneklerde telomeraz aktivitesinin sonuçlarını desteklemek için RT-PCR yöntemi ile TERT, TR ekspresyonları ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile de hücre zarındaki NCAM gösterildi.

Çalışmamızda, DK-MG ve C6 hücre dizilerinin ilerleyen pasajlarında, her iki hücre dizisinde, telomeraz aktivitesi ve siyalik asidin birbirine paralel olarak arttığı gözlemlendi. TR ve TERT ekspresyonları pozitif olarak bulundu. NCAM, birbirlerine benzer şekilde boyandı. Kültüre edilen her iki glioma hücre dizisinin ilerleyen

pasajlarında telomeraz aktivitesi ve siyalik asidin artması, malignansi ve invazyonda olan artış ile ilişkilendirilebilir. Glial tümör hücre dizilerinin ilerleyen pasajlarında, telomeraz aktivitesinde görülen artış sürekli olmayıp iniş ve çıkışlar göstermektedir. Siyalik asit miktarı ise, telomeraz aktivitesine göre, ilerleyen pasajlarda, daha düzenli olarak artmaktadır. Bu nedenle glial tümörler için yapılan tetkiklerin yanında, telomeraz aktivitesi ve özellikle siyalik asit miktarı tesbitinin, tümörün durumunu belirlemede ve tedaviyi yönlendirmede destekleyici bir parametre olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Glioma, DK-MG hücre dizisi, C6 hücre dizisi, telomeraz aktivitesi, siyalik asit, hTERT, hTR, rTERT, rTR, NCAM

SUMMARY

Termination or non-stop continuation of the cell cycle is related to telomere length and telomerase activity. Telomerase is a ribonucleoprotein complex, and it contains telomerase RNA (TR, TERC), telomerase protein (TERT) and associated proteins.

Sialic acids play a role in the recognition of cells each other, cell migration and maintenance of inter-cellular integrity.

Telomerase activity in metastases and malignancies, and increased sialic acid levels compared with normal tissues indicate that these parameters could be used as tumor markers.

In our study, we evaluated telomerase activity, sialic acid levels, existence of neuronal cell adhesion molecule (NCAM) in cell membrane, expression of telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase in cell extracts from the human (DK-MG) and rat (C6) glioma cell lines. We purposed to investigate the alterations of telomerase activity and sialic acid levels in the cell line passages to passages.

Cells were incubated in RPMI and DMEM/F12 growth mediums for DK-MG and C6 cell lines, respectively, at 37°C in a CO₂ contained incubator. Telomerase activity was determined using TRAP method, and sialic acid level was determined using spectrophotometry, in third, 6th, 9th, 12th, and 15th passages. In addition, TERT and TR expressions using RT-PCR, NCAM in cell membrane by immuno-histochemical staining were showed to support the results of the telomerase activity.

Increased telomerase activity and sialic acid levels were observed, compared with each other in the later passages of DK-MG and C6 cell lines. TR and TERT expressions were found as positive. NCAMs were stained similarly with each other. Increased telomerase activity and sialic acid levels in the later passages of both cultured glioma cell lines may indicate malignancy and invasion. In the later passages of glioma cell lines, telomerase activity was not increased continuously and linearly, it showed

reducing and rising pattern. Sialic acid levels in the later passages showed a more regular rising than telomerase activity. We are convinced that, determination of telomerase activity and especially sialic acid with examination in glial tumors will be used in finding tumor situation and directing therapy as supporting parametres.

Key Words: Glioma, DK-MG cell line, C6 cell line, telomerase activity, sialic acid, hTERT, hTR, rTERT, rTR, NCAM

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bir nöroglia hücresi genel şekil.....	4
Şekil 2.2. A) Fibröz astrositlerin ışık mikroskobundaki görüntüsü B) Astrositlerin şematik şekilleri C) Kan-Beyin Bariyerinde astrositler....	5
Şekil 2.3. A) Nöroglia hücrelerinin beyinde yerleşimi B) Oligodentrositin şematik çizimi C) Nöron hücresi.....	6
Şekil 2.4. Kültürde astrositoma hücreleri.....	8
Şekil 2.5. Lineer kromozomda telomerler.....	10
Şekil 2.6. A) Nükleusta kromatin iplerinin lamin tabaka ile ilişki kurarak belli bir pozisyonda bulunması B) S.pompe’de mayoz bölünmenin profazında at kuyruğu oluşumunda telomer ve sentromerlerin dolayısı ile homolog kromozomların organizasyonu.....	10
Şekil 2.7. Telomeraz enzim kompleksi.....	11
Şekil 2.8. Telomeraz enzim kompleksi modeli ve avuç içi bölgesinde telomer DNA’sı ile telomeraz RNA’sının bulunuşu.....	12
Şekil 2.9. Çeşitli canlılarda TERT proteini motifleri.....	13
Şekil 2.10. Çeşitli canlılarda telomeraz esas proteinleri (TERT), yardımcı proteinler, ile telomeraz RNA’sı ve telomeraz DNA’sı ve bunlarını birbirleri ile ilişkileri.....	14
Şekil 2.11. WD40 tekrarı.....	16

Şekil	Sayfa
Şekil 2.12. Telomeraz negatif soma hücrelerinde bölünme sınırı.....	18
Şekil 2.13. Hücre zar proteinlerinin Golgi' de son aşaması.....	20
Şekil 2.14. A) Siyalik asidin moleküler yapısı B) Siyalik asidin açık formülü.....	20
Şekil 2.15. Siyalik asidin oluşumunda takip edilen yol.....	21
Şekil 2.16. Siyalik asitin metabolik yolu.....	22
Şekil 2.17. A) Nonjunctional hücre adezyonunda NCAM bağlantısı B) NCAM - NCAM bağlanması.....	24
Şekil 2.18. Farklı yapıdaki NCAM proteinleri ve hücre zarına yerleşimleri.....	26
Şekil 2.19. Periferal sinir ganglionlarının oluşumunda NCAM.....	27
Şekil 2.20. Hücre zarında NCAM-PSA bağlantısı.....	28
Şekil 4.1. Telomeraz aktivitesi ölçümü öncesinde, PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü (1 Marker, 2-4 DK-MG hücrelerinin PCR ürünleri, 5-7 C6 hücrelerinin PCR ürünleri, 8 pozitif kontrol)....	62
Şekil 4.2. DK-MG hücre dizisinde telomeraz aktivitesi.....	63
Şekil 4.3. C6 hücre dizilerinde telomeraz aktivitesi.....	64
Şekil 4.4. DK-MG ve C6 hücre dizilerinde telomeraz aktivitesi.....	65
Şekil 4.5. DK-MG hücre dizisinde siyalik asit.....	66
Şekil 4.6. C6 hücre dizisinde siyalik asit	67
Şekil 4.7. DK-MG ve C6 hücre dizilerinde siyalik asit	68

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. DK-MG hücre dizisinde pasajlara göre telomeraz aktivitesi ve siyalik asit.....	69
Şekil 4.9. C6 hücre dizisinde pasajlara göre telomeraz aktivitesi ve siyalik asit...70	70
Şekil 4.10. DK-MG hücre dizilerinde hTERT mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri A-J, başta ve sonda marker.....	71
Şekil 4.11. DK-MG hücre dizilerinde hTR mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri A-J, başta ve sonda marker.....	72
Şekil 4.12. DK-MG hücre dizilerinde GAPDH mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri A-J, başta ve sonda marker.....	73
Şekil 4.13. C6 hücre dizilerinde rTERT mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri A-J, başta ve sonda marker.....	73
Şekil 4.14. C6 hücre dizilerinde rTR mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri A-J, başta ve sonda marker.....	74
Şekil 4.15. C6 hücre dizilerinde GAPDH mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri A-J, başta ve sonda marker.....	75
Şekil 4.16. DK-MG hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtresiz A,B).....	76
Şekil 4.17. DK-MG hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtreli A,B).....	76
Şekil 4.18. DK-MG hücrelerinin NCAM boyama görüntüsü.....	76
Şekil 4.19. C6 hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtresiz A,B).....	77
Şekil 4.20. C6 hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtreli A,B).....	77
Şekil 4.21. C6 hücrelerinin NCAM boyama görüntüsü.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. TRAP kit içeriği ve kullanım amacı.....	42
Çizelge 3.2. TRAP amplifikasyon ürünü elde etme programı.....	47
Çizelge 3.3. RT-PCR amplifikasyon ürünü elde etme programı.....	57
Çizelge 4.1. DK-MG ve C6 hücre dizilerinde pasajlara göre telomeraz aktivitesi ve siyalik asit.....	61
Çizelge 4.2. DK-MG hücre dizisinde telomeraz aktivitesi çoklu karşılaştırma sonuçları.....	63
Çizelge 4.3. C6 hücre dizisinde telomeraz aktivitesi çoklu karşılaştırma sonuçları.....	64
Çizelge 4.4. DK-MG hücre dizisinde siyalik asit çoklu karşılaştırma sonuçları.....	66
Çizelge 4.5. C6 hücre dizisinde siyalik asit çoklu karşılaştırma sonuçları.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
AA	Araşidonik Asit
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BAL	Bronşioalveolar Lavage
Bç	Baz çifti
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
C6	Sıçan glioma hücre dizisi
Ca	Kalsiyum
CD56	NCAM antibody
CEA	Karsinoembriyjenik Antijen
CHD	CAM Homoloji Domain
CMP	Sitidin Mono Fosfat
CP	Ciliated Protozoa
DAG	Diaçil gliserol
DK-MG	İnsan glioma hücre dizisi
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
E.R.	Endoplazmik Retikulum

Ea-p123 veya p123	Euplates aediculatus TERT proteini
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Est1p ve Est3p	Ever shorter telomeraz 1 ve 3 protein
Est2p	Ever Shorter Telomeres 2p
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF-R	Fibroblast growth faktör reseptör
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GlcNAc	N-asetilglukozamin
GPI	Glikozil-fosfotidilinositol
Grade I	Pilositik astrositoma (WHO grade I)
Grade II	Düşük grade astrositoma (WHO grade II)
Grade III	Anaplastik astrositoma (WHO grade III)
Grade IV	Glioblastoma multiforme (WHO grade IV)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solüsyonu
HG-NHL	Non-Hodgkin's lenfomalı
HIV-I	Human Immundeficiency Virus-I
hsp90	Heat shock protein 90
hTERT	İnsan Telomeraz Revers Transkriptaz
hTR	Sıçan Telomeraz RNA'sı

Ig	İmmunoglobulin
IL-4	interlökin-4
IS-	İnternal Standart
KBB	Kan-beyin bariyeri
LDH	laktat dehidrojenazı
ManNAc	N-asetilmannozamin
MCA	musinöz benzeri karsinomla ilişkili anijen
NANA	N-Asetil Nörominik Asit
NCAM	Nöronal Hücre Adezyon Molekülü
P	Fosfat
PCR	Polimerase Chain Reaction
PSA	Polisiyalik Asit
rTERT	Sıçan Telomeraz Revers Transkriptaz
RT-PCR	Reverse-Transcriptase Polimerase Chain Reaction)
rTR	İnsan Telomeraz RNA'sı
S.S.S	Santral Sinir Sistemi
SA	Siyalik Asit
SCCAg	Squamoza Hücreli Karsinom Antijeni
TBE	Tris-Borat Tamponu
TEMED	N'N'N'N'-Tetrametyhenediamine

TEP1	Telomeraz Yardımcı Protein
TERC	Telomeraz RNA Komponenti
TERT	Telomeraz Revers Transkriptaz
TR	Telomeraz RNA'sı
TRAP	Tandem Repeat Assembly Program
Tt-TERT	Tetrahymena thermophila TERT proteini
UDP	Uridin difosfat
UTP	Uridin trifosfat
WD40	W: Tryptofan, D: Aspartik asit.
WHO	World Health Organization

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücre bölünmesinin belli bir sayıdan sonra son bulması veya kesintisiz devam etmesi, telomeraz aktivitesi ile ilişkilidir. Telomeraz enzim kompleksi bir ribonükleoprotein kompleksi olup, yapısında telomeraz RNA'sı ve telomeraz proteini bulunur (4,5,16,75,95,109,110).

Bölünen insan hücrelerinde telomeraz RNA'sı (hTR), 5'-CUAACCCUA-3' dizisi, 1,5 telomer DNA tekrarına komplementer dizi olup, telomerik DNA sentezinde kalıp ödevi görür. Telomeraz enzimi, RNA'sının bir bölümünü kullanarak, guanince (G) zengin telomer DNA tek dalını sentezleyen bir revers transkriptazdır. Telomeraz temel proteini olan TERT, bu olayda katalitik görev yapar. Telomeraz aktivitesi ile telomeraz RNA'sı ve TERT ekspresyonu arasında bir korelasyon vardır. Her ikisi de telomeraz aktivitesinin belirlenmesinde marker olarak görev yapar. İnsanda normal somatik hücrelerin boyu her hücre bölünmesinde kısalır. Bu kısalma, telomer proteinleri ve telomeraz enzimi tarafından kontrol edilir (4,5,16,75,95, 109,110)

Germ hücrelerinde (sperm), tamir gören dokularda, saç folliküllerinde, barsak kripta hücrelerinde, hematopoietik kök hücrelerde, lenfositlerde ve kanser hücrelerinde telomeraz pozitif, diğer soma hücrelerinde ise, telomeraz negatiftir. Ayrıca kanser hücrelerinin malignansi ve invazyonunda da telomeraz aktivitesinin arttığı görülmüştür. Telomeraz pozitif olan hücrelerde, her hücre bölünmesinde kaybolan telomer boyu tamir edilir. Böylece telomer boyu her zaman hücre bölünmesine yetecek uzunlukta tutulur (4,9,14,30,33,47,53,55,56,69,72,75,91,93,130).

Kanserde telomeraz aktivitesinin pozitif olduğunu gösteren birçok yayın bulunmaktadır. Pleural mezoteliomalar ile yapılan bir çalışmada, 22 mezoteliomanın 20 (%91)'sinde ve mezotelioma hücre dizilerinden elde edilen tümörlerin tümünde telomeraz pozitif, 2 benign soliter fibröz tümörde ise negatif olarak bulunmuştur (30). Tiroid dokusu ile yapılan bir çalışmada, malign paratiroid karsinom ve metastatik dokularda telomeraz aktivitesi pozitif, normal dokuda negatif olarak bulunmuştur (33). Bir diğer çalışmada, telomeraz aktivitesi, 12 servikal kanserin 10'unda, 13 endometriyal

kanserin 12'sinde, 21 ovarian kanserin 18'inde, 2 tubal kanserin 2'sinde, 1 vulvar kanserin 1'inde pozitif olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre jinekolojik malign tümörlerin %88'de telomeraz aktivitesi pozitif olarak bulunmuştur (69). 27 farklı akciğer kanser hücre dizisinde ve 7 normal akciğer dokusunda ölçüm yapılan bir başka çalışmada, 27 hücre dizisinin hepsinde telomeraz aktivitesi gözlenirken, normal dokularda görülmemiştir (72). Kanserde telomeraz aktivitesi ile birlikte TERT ve TR ekspresyonları da pozitif görülmektedir (13,67,70,76,77,80,82,128,136).

Hücrede karbohidratlar, proteinlere bağlanarak glikoproteinleri ve lipidlere bağlanarak glikolipidleri oluştururlar. Bunların her ikisi de moleküller glikokonjugatlar olarak adlandırılır. Glikokonjugatlar hücre zarında bulunur ve onların en uç bölgesine siyalik asitler bağlanır. Siyalik asitler, hücrelerin birbirini tanmasında, nöron gelişiminin uyarılmasında, hücre göçü ve hücreler arası bütünlüğün sağlanmasında görev alırlar. Beyin hücrelerinde siyalik asitler, nöronal hücre bağlantı molekülü (NCAM)'ne bağlanır. Kanserde, kanser invazyonunda ve metastazda siyalik asit miktarının normal dokulara göre artması, kanserde onun bir tümör marker'ı olarak kullanılabileceğini göstermektedir (1,4,7,11,21,24,26,29,61,100,114,120,129,139).

Kanserde siyalik asit miktarlarının arttığını gösteren birçok çalışma mevcuttur. Bunlardan; baş-boyun kanserli 52 hastada yapılan bir çalışmada, squamoz hücreli karsinom antijeninin (SCCAg) %33, karsinoembriyjenik antijenin (CEA) %28 ve laktat dehidrojenazın (LDH) %18 oranında arttığı, siyalik asit seviyesinde tesbit edilen %71 oranındaki artışın ise, bunların hepsinden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Vücuttaki siyalik asit seviyeleri selim ve habis hastalıklarda değişim göstermektedir. Nitekim aynı çalışmada kanseri nükseden hastalarda da, siyalik asit düzeylerinin %100 oranında arttığı tesbit edilmiştir (32). Yine, meme-kolon ve akciğer kanserleri ile yapılan bir çalışmada serum siyalik asit seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür (100). Siyalik asidin, musinöz benzeri karsinomla ilişkili antijenin (MCA) ve karsinoembriyjenik antijen (CEA)'nin üçünün birlikte ölçüldüğü bir çalışmada, bu parametreler yardımıyla akciğer kanserlerinin %94.9 doğrulukla saptanabildiği gösterilmiştir (62).

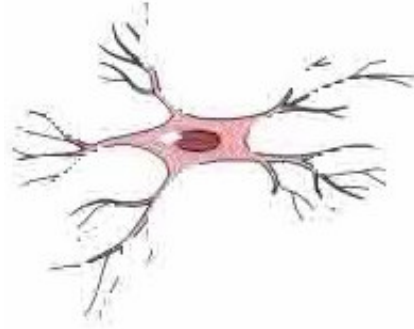
Çalışmamızda, kısaca bilgi verdiğimiz bu parametrelerin, insan glioma (DK-MG) ve sıçan glioma (C6) hücre dizi kültürlerinin ilerleyen pasajlarında, birlikte ölçülüp değerlendirildiği bir çalışmaya rastlayamadık. Bu noktadan hareketle, glioma hücre dizilerinin ilerleyen pasajlarında telomeraz aktivitesi ve siyalik asitte olan değişimleri karşılaştırarak araştırmayı amaçladık. Telomeraz aktivitesini desteklemek amacıyla TERT ile TR ekspresyonlarını belirledik. Siyalik asitlerin bağlandığı NCAM'ların varlığını da immunohistokimyasal olarak gösterdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.GLİAL HÜCRELER VE GLİOMALAR

2.1.1.Normal Glial Hücreler

Omurgalılarda nöronlar, nöroglia hücrelerinden oluşan özel bir destek dokusu içinde yuvalanmıştır. Nöroglia hücreleri uzantılı hücrelerdir, bunların yapısı nöronlara benzemekle birlikte görevleri onlardan farklıdır (**Şekil 2.1**). Bunlar sinir dokusunun dejenere olduğu yerlerde çoğalarak orayı bir yama gibi kapatır, nöronların beslenmesinde ve artık maddelerin uzaklaştırılmasında rol oynarlar. Nöronları komşu nöronlardan ayırarak, impulsların nöron boyunca düzenli iletilmesine yardımcı olur ve nöronlar arasında destek görevi görürler. Ayrıca mikrop, toksin v.b. zararlı etkenlerin nöronlara ulaşmasına engel olurlar. Tüm Santral Sinir Sistemi (S.S.S) hücreleri embriyogenez sırasında ektodermden yani nöral plaktan oluşur. Bu sistemde T1A ve O2A adı verilen ana (progenitör) hücrelerin astrosit ve oligodendrositlere farklılaştığı gösterilmiştir. T1A hücreleri S.S.S’de yapısal bir rol oynar. O2A progenitör hücreleri ise, farklılaşmanın yanında aksonal iletimde fonksiyonel bir rol oynayan özelleşmiş hücrelerin artışı da sağlar (4,106).

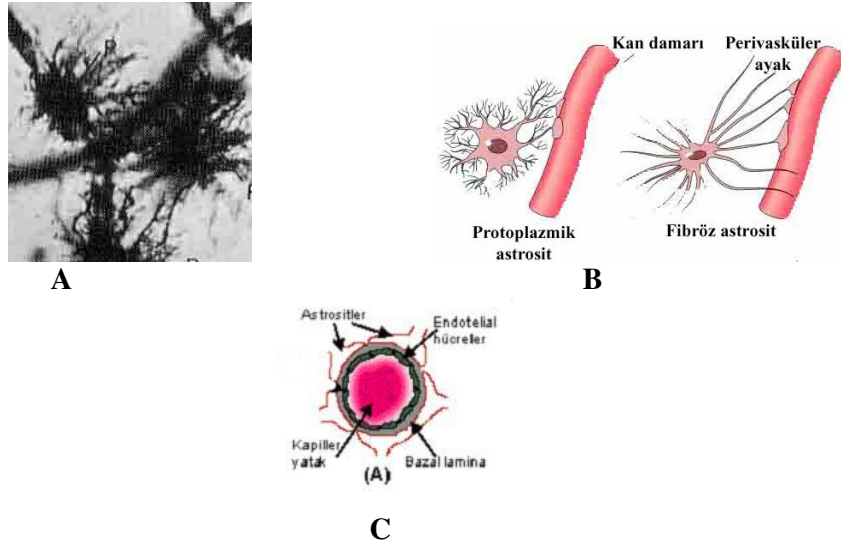


Şekil 2.1. Bir nöroglia hücresi genel şekil (37).

Nöroglial hücreler 3 grupta incelenir:

2.1.1.1. Astrositler

Astroditler çok sayıda uzantısı olan hücrelerdir. Kan beyin bariyerinin oluşmasını ve devamlılığını sağlayacak şekilde kapillerlerin etrafındaki endotelial hücrelerle ilişki kurarlar (Şekil 2.2. A,B,C, Şekil 2.3.A). Nöron ve onun uzantısı aksona biyokimyasal ve fiziksel destek yanında, nöron alıcı yüzeyinin yalıtımını sağlarlar. Kan-beyin bariyeri (KBB), beyin içine kan kimyasal yapılarının girişini kontrol eden kompleks bir sistemdir. Bu sistem kapiller yatak ile parankimal doku (sık hücreli bağ doku) arasındadır. Bu bariyere bazen ekstrasellüler-kan bariyeri adı da verilmektedir. KBB'de endotelial hücreler ve bunların bazal membranlarını astroditler çevreler. Endotelial hücreler, birbirlerine sıkıca bağlı olup, bazı iyon ve metabolitlerin geçişinde etkilidir. Bu bölgeler, yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin geçişine engel teşkil eder. Normal durumlarda, su, bazı iyon ve yağda çözünebilen yapıların geçişini sağlarken, globülin, albumin ve nörotransmitterlerin geçişini engellerler. İyon ve metabolitlerin (glikoz gibi) geçişini düzenleyen enzim sistemlerine de sahiptirler (23,106,142).

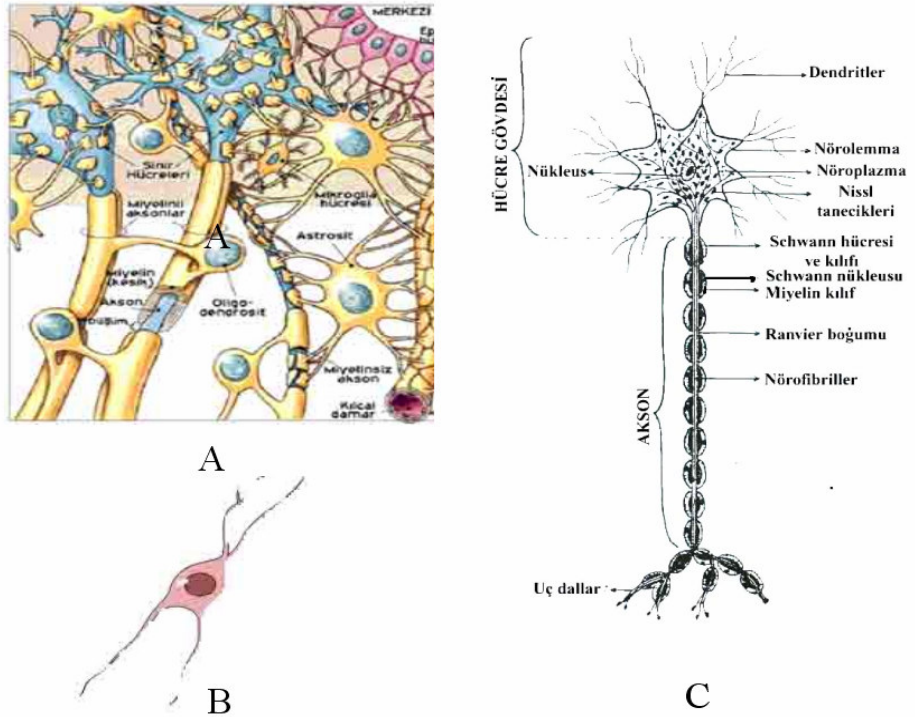


Şekil 2.2. A) Fibröz astroditlerin ışık mikroskopundaki görüntüsü (37), B) Astroditlerin şematik şekilleri (37), C) Kan-Beyin Bariyerinde astroditler (23).

Astroditler hasar görmüş beyinde, gliozis adı verilen nedbe (skar) dokusunu oluştururlar. Bu görevleri ile fibrositlere benzerler (106).

2.1.1.2.Oligodendrositler

Miyelin kılıf periferik sinirlerde Schwann hücreleri tarafından, SSS'de ise, oligodendrositler tarafından meydana getirilir. S.S.S'de bulunan miyelinin yerini tutarlar. Onları bu görevleri ile Periferik Sinir Sistemindeki (PSS) Schwann hücreleri gibi düşünebiliriz (Şekil 2.3.A,B,C) (4,106,142).



Şekil 2.3. A) Nöroglia hücrelerinin beyinde yerleşimi (142)
B) Oligodendrositin şematik çizimi (37), C) Nöron hücresi (4)

2.1.1.3.Ependimal hücreler

Serebral ventriküller ve spinal kordun santral kanalının içini tek katlı olarak döşeyen kübik şekilli hücrelerdir (Şekil 2.3.A). Beyin ventriküllerinin sınırlarında ve spinal kordun santral kanalında bulunurlar. Ventriküler ependimada ve KBB'de düzenli bir sıvı alış verişi olur. Beyindeki ependim döşeli kavitelelerin bazı bölgelerinde beyin omurilik sıvısı

(BOS) üretilir. İşte bu bölgelerdeki ependimal hücreler ile kapiller yapıların bir araya geldiği yapıya koroid pleksus adı verilir (106).

2.1.2. Gliomalar

Gliomalar, santral sinir sisteminde bulunan glial hücrelerden gelişen tümörlerdir. Gliomalar, tüm S.S.S tümörlerinin % 40'dan fazlasında tanımlanan en yaygın primer beyin tümörleridir (15).

Yüksek oranda beyin dokusunun içine sızarak beyini kuşatırlar. Gliomaların tamamının cerrahi olarak kesilip çıkarılması her zaman mümkün değildir. Bu nedenle de, genellikle tümör hızla büyür ve sık sık nüks eder. Bu aşamada hastaların tedaviye rağmen yaşam süresi ortalama 8-12 aydır. Son zamanlardaki çalışmalarla in vitro ve in vivo gliomaların invaziv davranışları anlaşılmış olmasına rağmen, yaygın infiltrasyona neden olan faktörler hala tam olarak tanımlanamamıştır (15).

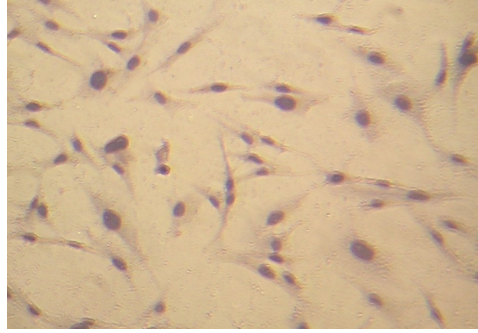
Glial hücrelerin değişik tipleri, S.S.S.'deki lokalizasyonuna, yaş, gelişim potansiyeli, invazivitenin yaygınlığı, morfolojik özellikler, progresyon (hızlı ilerleme) eğilimi ve klinik tabloya göre, farklılıklar gösterir (106).

Gliomalar agresif tümörler olup, yüksek proliferatif aktivite gösterirler. Kanserin malignansi derecesi arttıkça telomeraz aktivitesi de artmaktadır ve bu artış, çoklu genetik değişimlere ve mutasyonlara bağlıdır (15,18,91). Gliomalarda, tümör süpressör genlerde (p53, RB, Ras, p16, PTEN/MMAC), siklin dependent kinazlarda (CDK4, CDK6), growth faktör reseptörlerinde (EGFR, PDGFR) bozukluklar olduğu ve ayrıca bazı kromozomal anomaliler görüldüğü bildirilmektedir (18). Gliomaların oluşumunda en önemli etken olarak ise, p53 ve RB genlerindeki bozukluklar gösterilmiş olup, telomeraz aktivitesinin artışında da özellikle bu genlerdeki mutasyonların etkili olduğu bildirilmektedir (18).

Glial hücrelerden oluşan tümörler kendi aralarında astrositomalar, oligodendromalar ve ependimomalar olmak üzere üçe ayrılır:

2.1.2.1. Astrositomalar

Gliomaların astrositlerden köken alan tümör çeşidine **astrositoma** denir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kültürde astrositoma hücreleri.

Astrositomalar, Dünya Sağlık Teşkilatı (World Health Organization, WHO)'na göre kısaca aşağıdaki gibi sınıflanmıştır;

Grade I: Piloitik astrositoma, dev hücreli astrositoma da denir ve en yaygın olarak çocuklarda görülen tümörlerdir. Astrositlerin olduğu her yerde olabilmesine rağmen, özellikle, optik sinirler, 3. ventrikül, talamus, medial temporal lob, beyin sapı (pons) ve serebellum gibi, tipik olarak orta çizgi yapılarında lokalizedir. Piloitik astrositomlar etrafı sınırlı tümörlerdir ve nadiren etraf dokuya invaze olurlar. Bu tümörler, sıklıkla yavaş gelişirler ve malign transformasyon nadirdir (15,23,106).

Grade II: Düşük grade astrositoma grubuna fibriler ve protoplazmik astrositomalar girmektedir. Bu neoplazmlar tipik olarak gençlerde olur. Düşük grade astrositoma, beyin paranzimasını çevreleyen yayılıcı karakterdedir. Bu neoplazmlar tipik olarak gençlerde olur, astrositlerin olduğu her yerde olabilmesine rağmen özellikle serebral hemisferde lokalize olmaya eğilimlidir (15,23,106) .

Grade III: Anaplastik astrositoma, her yaşta görülebilir. Anaplastik astrositoma (WHO grade III) neoplastik fibröz ya da gemistocytic astrositler ile karakterizedir. Astrositlerin olduğu her yerde olabilir (15,23,106).

Grade IV: Glioblastoma multiforme, 55 yaşın üzerinde siktır ve tüm primer

intrakraniyal tümörlerin % 40'ını içermektedir. Malign astrositoma olarak da bilinmektedir. Astrositlerin olduğu her yerde olabilmesine rağmen, özellikle nöral dokular içinde yaygındır. Sıklıkla nekroz gösterir. Glioblastoma multiforme çok sık olarak meydana gelir ve çoğunlukla tipik olarak yetişkinlerde etkili olan malign beyin tümörleridir. Glioblastomanın en yaygın lokalizasyonu frontotemporal bölgededir, fakat parietal loblar da sıklıkla etkilenir. Glioblastomalar genellikle kontrolateral hemisfer içinde genişleyerek kospus kallosum boyunca infratadır (15,23,66,106).

2.1.2.2. Oligodendrogliomalar

Oligodendrogliomalar neoplastik oligodendrositlerden oluşan, diffüz gelişen tümörlerdir. Glioblastomaya doğru malign işleyiş olur, ancak bu malignansi diffüz astrositomalara göre daha azdır (15,23,106).

2.1.2.3. Ependimomalar

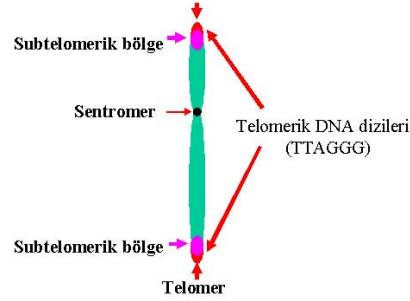
Ependimal hücrelerden gelişen ependimomalar genellikle yavaş gelişen, benign neoplazmlardır ve nadiren anaplaziye (malignleşme) giderler. Ependimomanın ilerleyişi kısmen tümör lokalizasyonuna ve anaplazinin var olup olmamasına göre değişim gösterir (15,23,106).

2.2. TELOMER VE TELOMERAZ ENZİM KOMPLEKSİ

Ökaryotik canlıların lineer kromozomlarının uçlarında bulunan telomerler, basit tandem tekrarlar halindeki DNA dizileri ve özel proteinlerden oluşan nükleoprotein yapılarıdır. Subtelomerik bölgeden itibaren 5'→3' yönünde bu tandem diziler örneğin; insan ve farede TTAGGG, Tetrahymena'da TTGGGG ve Oxytricha'da TTTTGGGG olarak belirlenmiştir (2,4,6,25,69,73,74,92,101,122,125).

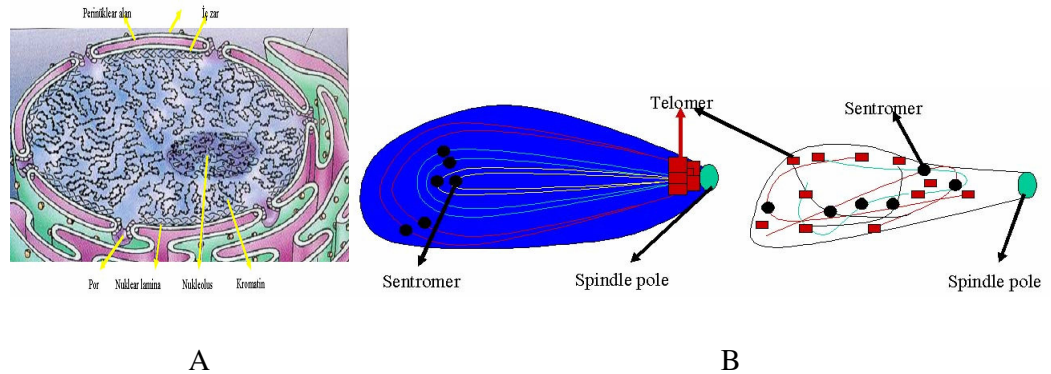
Hücre bölünmesinin belli bir sayıdan sonra son bulması veya kesintisiz devam etmesi, telomer boy uzunluğu ve telomeraz aktivitesi ile ilişkilidir. Kromozomların uçlarında bulunan telomerler, telomerik DNA ve proteinlerinden oluşur (Şekil 2.5). Telomerler, kromozomların dayanıklılığını sağlar. Bu fonksiyonlarını, kromozom uçlarında ekzonükleazların neden olabileceği kromozom yıkımı ve füzyon

olaylarını engelleyerek yaparlar. Böylece DNA replikasyonu esnasında meydana gelebilecek terminal DNA segmentlerinin kaybını önlerler (2,4,5,8,12,13,25,45,54,70,72,74,77,87,92,101,102,126).



Şekil 2.5. Lineer kromozomda telomerler (4).

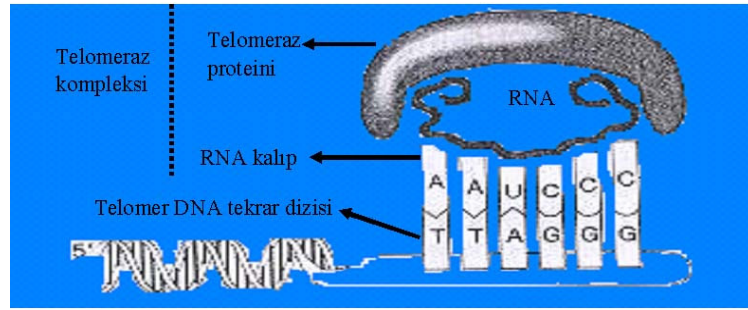
Ayrıca her kromozomun telomeri lamin B proteini ile nüklear laminaya bağlanarak, kromozomun nükleus içinde belli bir pozisyonda bulunmasını sağlar (**Şekil 2.6.A**). Kromozomların nüklear laminaya tutunup, belli bir pozisyonda kalmaları ile at kuyruğu görünümü (Horstail) ortaya çıkar (**Şekil 2.6.B**). Bu sayede hücre bölünmesi sırasında nükleusta meydana gelen dağılma (segregasyon) olaylarını kontrol ederler (4,109).



Şekil 2.6. A) Nükleusta kromatin iplerinin lamin tabaka ile ilişki kurarak belli bir pozisyonda bulunması (21). **B)** Schizosaccharomyces pombe'de mayoz bölünmenin profazında at kuyruğu oluşumunda telomer ve sentromerlerin dolayısı ile homolog kromozomların organizasyonu (109).

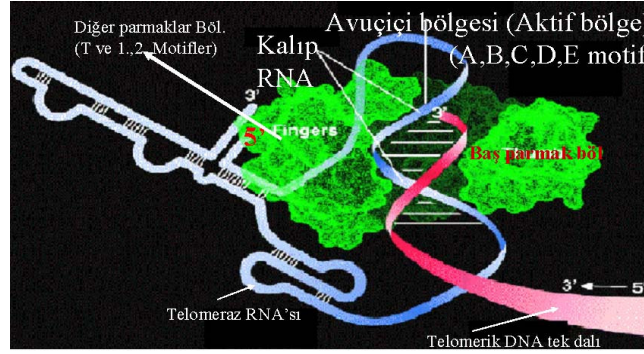
2.2.1. Telomeraz Enzim Kompleksi

Telomeraz enzim kompleksi bir ribonükleoprotein kompleksi olup yapısında, telomeraz RNA'sı ve telomeraz proteini bulunur. Telomeraz RNA'sı TR (telomeraz RNA'sı) veya TERC (telomeraz RNA komponenti) olarak isimlendirilir. Telomeraz proteini ise, katalitik görev yapan temel protein TERT (telomeraz revers transkriptaz) ve yardımcı proteinlerden ibarettir. Bölünen insan hücrelerinde telomeraz RNA'sı (hTR) 5'-CUAACCCUA-3' dizisi, 1,5 telomer DNA tekrarına komplementer dizi olup, telomerik DNA sentezinde kalıp ödevi görür. Kendisine ait RNA'sının bir bölümünü kullanarak, guanince (G) zengin telomer DNA tek dalını sentezleyen bir revers transkriptazdır (**Şekil 2.7**). Telomeraz temel proteini olan TERT, bu olayda katalitik görev yapar. Telomeraz aktivitesi ile telomeraz RNA'sı ve TERT ekspresyonu arasında bir korelasyon vardır. Her ikisi de telomeraz aktivitesinin belirlenmesinde marker olarak görev yapar. O nedenle telomeraz enzim aktivitesi, telomer boyu ve hücre çoğalması birbiriyle ilişkili kavramlardır (2,4,6,12,16,34,36,50,71,75,76, 78,89,95, 99,109,110,119,124,125,133,137,140).



Şekil 2.7. Telomeraz enzim kompleksi (73)

Yapılan çalışmalar sonucu telomeraz enzim kompleksini tanımlayan bir model oluşturulmuştur. Bu modele göre telomeraz enzim kompleksi yarı açık sağ elin iç kısmı görünümündedir (**Şekil 2.8**) (4,5,75,94).



Şekil 2.8. Telomeraz enzim kompleksi modeli ve avuç içi bölgesinde telomer DNA'sı ile telomeraz RNA'sının bulunuşu (5)

Telomeraz enzim kompleksi, telomeraz proteinleri ve telomer RNA'sından oluşur:

2.2.1.1. Telomeraz Proteinleri

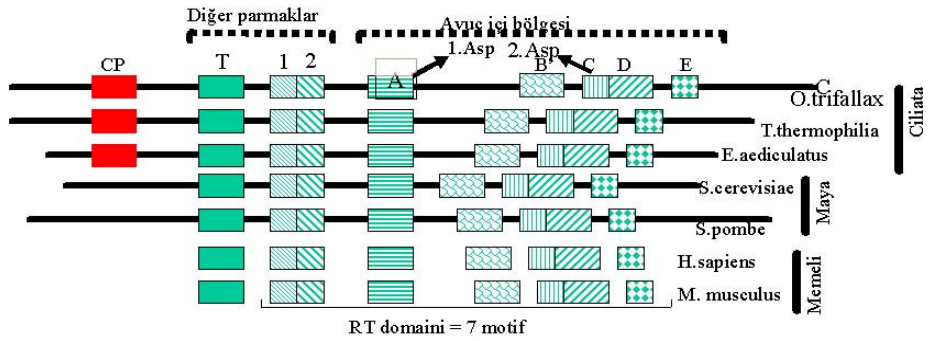
Bunlar temel protein (TERT) ve yardımcı proteinlerdir.

2.2.1.1.1-Temel Protein TERT (Telomeraz Revers Transkriptaz)

TERT, telomeraz enzim kompleksinin katalitik alt birimi olup, RNA'dan DNA sentezlenmesinde görev yapar. TERT'in, ağırlığı 103-127 kd'dur. Bugüne kadar incelenen türlerin hemen hepsinde aynı olan motifleri içermekle birlikte, aralarında bazı farklılıklar vardır. Canlı türüne göre değişik adlar alır. Örneğin; insanda hTERT, sıçanda rTERT, Tetrahymena thermophila'da Tt-TERT , Mus musculus'ta mTERT, Euplotes aediculatus'ta Ea-p123 veya p123, Saccharomyces cerevisiae'da Sc-Est2p veya Est2p gibi (4,5,9,75).

Geliştirilen modelde TERT proteini, telomeraz enziminin avuç içi, başparmak ve diğer parmaklar bölgesini kapsar. Modelin avuç içi bölgesi, **Şekil 2.9'**da görüldüğü gibi, bir RT (Revers transkriptaz) domaini, diğer parmakların bölgesi ise T motifini içerir. İncelenen organizmaların hemen hepsinde bulunan bu motiflere ilaveten, sadece ciliatalarda bir de CP (Ciliated Protozoa) motifi bulunur. RT domaini; N uçtan C uca doğru 1,2,A,B,C,D,E olmak üzere 7 motiften oluşur. RT domaininde yer alan

motiflerin taşıdığı aspartik asitlerin en önemlileri A motifinde bulunan 1 ve C motifinde bulunan 2 aspartik asittir. Telomerazın aktifleşmesinde önemli rolü olan bu aspartik asitleri kodlayan genlerden birinde olan bir mutasyon, telomeraz aktivitesini bozar. Bu konuda çalışmalar devam etmekte olup, yapılan bir çalışmada, *S.cerevisiae* RT domaininde aspartik asitlerden birini kodlayan est2 geninde oluşan bir mutasyon sonucu aspartik asitin alanine değişmesi sonucu telomeraz aktivitesinin bozulduğu tespit edilmiştir (4,5,9,75,94).

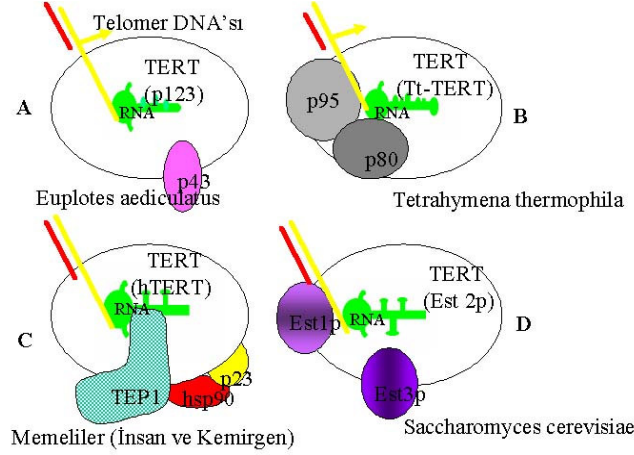


Şekil 2.9. Çeşitli canlılarda TERT proteini motifleri (4).

TERT'in yapısı ve görevi bugüne kadar incelenen organizmalarda birbirine çok benzer ise de, aralarında ufak tefek farklılıklar vardır, organizmalara göre TERT proteini:

2.2.1.1.1.1. Ea-p123 veya p123

Bir ciliat türü olan *Euplates aediculatus*'da TERT proteini p123 olarak adlandırılır, bunun ağırlığı 123 kd kadardır. Beraberinde 43 kd ağırlığında p43 yardımcı proteinini taşır. *Euplates aediculatus*'a ait p123 proteinini kodlayan gen dizisi ile, *S.cerevisiae*'da Est2p (Ever shorter telomeres) proteinini kodlayan est2 geni birbiriyle homologdur (Şekil 2.10) (9,75).



Şekil 2.10. Çeşitli canlılarda, telomeraz esas proteinleri (TERT), yardımcı proteinler, ile telomeraz RNA'sı, telomeraz DNA'sı ve bunların birbirleri ile ilişkileri (9).

2.2.1.1.1.2. Tt-TERT

Bir ciliat türü olan *Tetrahymena thermophila*'da bulunan, Tt-TERT'in yapısı da maya ve insandakine benzer, sadece fazladan ciliatlara özel CP motifini de içerirler. Bu protein hakkında fazla bilgi mevcut değildir (5,9,75) (Şekil 2.10).

2.2.1.1.1.3. Est2p=Ever Shorter Telomeres 2p

S.cerevisiae'da tanımlanan bu TERT proteini 103 kd ağırlığında olup, est2 geni tarafından kodlanır. est2 geni, kısa telomer fenotipine sahip mutantlarda belirlenen genlerden biridir (bu genler, est1, est2, est3 ve est4'dür). Telomer kısalması ve dolayısıyla hücre yaşlanmasına, est2 geninde oluşan bir delesyonun sebep olduğu tesbit edilmiştir. Çünkü; bu delesyon sonucu, aspartik asitlerden biri alanine değişmiştir (5,9,75) (Şekil 2.11).

2.2.1.1.1.4. hTERT=Human Telomeraz Revers Transkriptaz

Memelilerden insan ve kemirgenlerde belirlenen TERT, insanda (hTERT) olarak adlandırılır, hTERT'in molekül ağırlığı 127 kd'dur. İnsanda hTERT proteininin

geni 5p15.33'de lokalize olmuştur. Deneysel olarak da hTERT'in telomeraz aktivitesindeki önemi belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda telomerazı inaktif hücrelerde, hTERT sentezlenmesi sonucu telomerazın yeniden aktifleştiği görülmüştür (5,9,75,94).

2.2.1.1.2. Yardımcı Proteinler

İncelenen türlerde, telomeraz aktivitesi için yardımcı proteinlerin mutlaka gerekli olduğu tesbit edilememiştir. Bununla birlikte, yardımcı proteinlerin telomeraz enzim kompleksi elemanlarının biraraya gelmesinde ve telomer ile ilişki kurarak enzimin işlev görmesinde rol oynadıkları zannedilir (5,9,75). Bunlar;

2.2.1.1.2.1. p43 proteini:

Euplotes aediculatus'da tanımlanan bu protein hakkında fazla bilgi yoktur, sadece TERT (p123) ile ilişki kurduğu tesbit edilmiştir (5,9).

2.2.1.1.2.2. p80 ve p95 proteinleri:

Tetrahymena thermophila'da, tanımlanan bu proteinlerden;

p80; Kemirgen ve insanda bulunan TEP1'e benzer ve onun gibi sadece telomeraz RNA'sı ile ilişki kurar (5,9,75).

p95; Telomer DNA'sı ile ilişki kurar ve böylece revers transkripsiyonda telomeraz enziminin tek dala bağlanmasını sağlar (5,9,75).

2.2.1.1.2.3. Est1p ve Est3p (Ever shorter telomeraz 1 ve 3 protein)

S.cerevisiae'da tanımlanan bu proteinlerden;

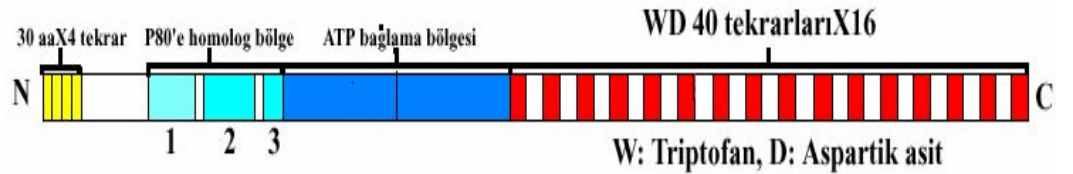
Est1p; Telomer DNA'sı ile ilişki kurarak revers transkripsiyon olayının gerçekleşebilmesi için telomerazın olaya katılmasını sağlar (5,9,75).

Est3p; 181 amino asitten oluşur. Görevi tam olarak bilinmemektedir (5,75).

2.2.1.1.2.4.TEP1, p23 ve hsp90

TEP1

İnsan ve kemirgenlerde tanımlanan bu proteinlerden TEP1; insan ve farede TP1, sıçanda TLP1 olarak adlandırılır, 290 kd ağırlığındadır. Telomeraz RNA'sı ile ilişki kuran bu yardımcı protein; amino ucunda 30 amino asitlik bir dizinin 4 tandem tekrarı, bunu takiben T.thermophila'daki p80 proteinine homolog bir bölge, ATP bağlama bölgesi ve karboksil uca yakın 16 WD40 tekrarından oluşur. [WD40 tekrarı: W:Tryptofan, D: Aspartik asit. WD dizileri yaklaşık 40 amino asitlik aralıklarla yerleştiklerinden WD40 tekrarı olarak bilinen WD amino asitleri 40 amino asitte bir olmak üzere 16 defa tekrar eder] Sıçan TLP1 proteini ile yapılan bir çalışmada, WD40 tekrar bölgesinin, telomeraz ve telomere bağlanan proteinler arasında etkileşime aracılık ettiği tesbit edilmiştir (5,58,75,96) (**Şekil 2.11**).



Şekil 2.11. WD40 tekrarı (58).

p23 ve hsp90 (heat shock protein 90) Chaperon Proteinleri

Memelilerde tanımlanan bu yardımcı proteinler, telomeraz enzimi için gerekli translasyon olayı ve telomerazın aktivitesinde yardımcı rol oynarlar. Tavşan retikülositleri ile yapılan çalışmalarda, p23 ve hsp90 proteinlerinin translasyon olayında görev yaptığı görülmüştür. İn vivo olarak da telomeraz komponentlerinin doğru olarak bir araya gelmesini sağlarlar (5,9).

2.2.1.2.Telomeraz RNA'sı (TR, TERC)

Telomeraz RNA'sı kısaca TR ya da TERC olarak isimlendirilir. İnsanda hTR ya da hTERC, sıçanda rTR ya da rTERC adını alır. Telomeraz RNA'sı (TR) veya

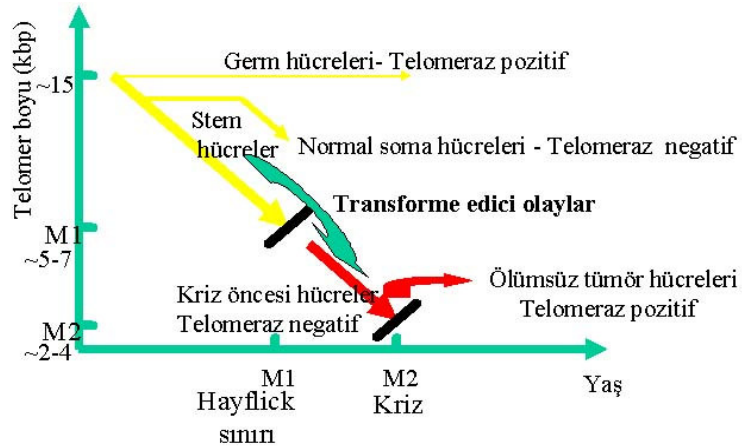
telomeraz RNA komponenti (TERC), revers transkripsiyon olayıyla RNA'dan DNA sentezlenmesini sağlar. İnsan telomeraz RNA geni, 3q21-q28'de lokalize olmuştur. Telomeraz RNA'sı, telomeraz aktivitesinde önemli rol oynar. Telomeraz RNA'sını kodlayan DNA dizisi; fare, insan, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* ve ciliatların 20'den fazla türünde klonlanmıştır (5,9,34,75,127).

Telomeraz RNA'sı, ciliatlarda 147-209 insan ve farede 450 ve mayada 1301 nükleotid boyundadır. TR, yaklaşık 1,5 telomer DNA tekrarına komplementer bir dizi (örneğin; *Tetrahymena thermophila*'da 5'-CAACCCCAA-3', fare ve insanda 5'-AAUCCC-3') içerir. Bu dizi **Şekil 2.9'**da görüldüğü gibi telomeraz modelinin avuç içi bölgesinde yer alır ve revers transkripsiyonda kalıp görevi yapar. RNA'nın diğer kısımları ise, diğer parmaklar bölgesi ve onun dışında yer alır. Tam olarak bilinmemekle birlikte, avuç içi dışında uzanan bu kısımların, ribonükleoprotein kompleksinin bir araya gelmesinde ve telomeraz aktivitesinin gerçekleşmesinde rol oynadığı zannedilmektedir (31,34,75).

Telomeraz enziminin aktivitesine bağlı olarak, telomer boyu uzar ve hücreler sınırsız çoğalır veya telomer boyu kısalmak ve çoğalma sona erer. O nedenle telomeraz enzim aktivitesi, telomer boyu ve hücre çoğalması birbiriyle ilişkili kavramlardır (4,45,48,74,77,90,92).

Germ hücrelerinde, tamir gören dokularda, saç folliküllerinde, barsak kripta hücrelerinde, hematopoietik kök hücrelerde, lenfositlerde ve kanser hücrelerinde telomeraz aktif (pozitif), diğer soma hücrelerinde ise, telomeraz inaktif (negatif) tir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, telomeraz aktivitesinin, insan normal intestinal mukozasının kök hücrelerinde ve epidermisin bazal hücrelerinde de pozitif olduğu bulunmuştur. Telomeraz pozitif olan hücrelerde, her hücre bölünmesinde kaybolan telomer boyu tamir edilir. Böylece telomer boyu her zaman hücre bölünmesine yetecek uzunlukta tutulur. Bununla birlikte tamir gören dokuların ana hücreleri ve aktive edilmiş lenfositlerin telomeraz aktivitesi diğerlerinden daha düşüktür ve belli bir süre sonra telomer boyu kısaltılmak zorundadır. Aksi halde bu hücrelerde kanserleşme olabilir (2,4,14,54,74,77,84,92,103,104,105,110,135,141).

Genç ve bölünmekte olan normal soma hücrelerinde telomeraz enzimi inaktif olduğu halde hücre bölünmesi belli bir süre devam eder (Hayflick sınırı) (**Şekil 2.12**). Çünkü bunlarda telomer boyu, hücre bölünmesine yetecek uzunluktadır (~15kbp). Fakat her bölünme sonucu telomer boyu giderek kısalır ve hücre bölünmesini sağlayamayacak duruma gelir (~5-7kbp), böylece hücre yaşlılık dönemine girer. İnsan soma hücrelerinde telomer boyu, telomeraz enzim aktivitesinin olmaması veya belirlenemeyecek kadar düşük olması nedeniyle, hücrenin olgunlaşmasına paralel olarak kısalır. Telomer boyunda bu kısalmaya bağlı olarak, bölünmenin durduğu ve dolayısıyla, hücrelerin yaşlanarak ölüme gittiği ortaya konmuştur (2,4,16,25,30,33,40,41,42,46,54,69,74,86,92,115,122,128).



Şekil 2.12. Telomeraz negatif soma hücrelerinde bölünme sınırı (4).

Kanser hücrelerinde yapılan çalışmalar, telomeraz enzim aktivitesinin hücre ölümsüzlüğü ve mitozu destekleyerek tümör dokusunun büyümesinde kritik bir role sahip olduğunu göstermiştir. Çünkü kanser hücrelerinde telomeraz kompleksi yeniden aktive olur, telomer boyu uzar ve hızlı bir hücre bölünmesi gerçekleşir. Sonunda tümör dokusu oluşur, büyür ve yayılır. Telomeraz RNA'sı ve temel protein olan TERT ekspresyonu tümör hücrelerinde yüksektir. Kanser hücrelerinde metastaz ve invazyonda telomeraz aktivitesinin arttığı görülmüştür (4,16,25,49,64,74,92,93,95,97,101,105,118,121,122,136).

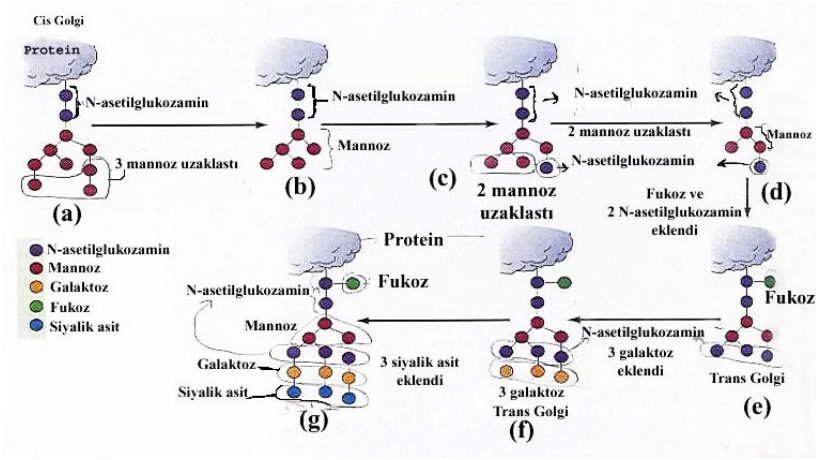
2.3. SİYALİK ASİT (N-ASETİL NÖROMİNİK ASİT) (NANA)

Siyalik asitler, ilk kez 1936 yılında üst çene altı bezi salgısından (submaksillar musinden) elde edilmiştir, 1935-1939 yılında ise, sinir dokusu glikolipitlerinden elde edilmiştir. 1968 yılında, yapısındaki siyalik asidi enzimle uzaklaştırılmış seruloplazminin (plazma glikoproteini) dolaşımdaki ömrünün kısaltıldığı ve karaciğerde biriktiği gözlenmiştir. Açıklamaya göre, karaciğerdeki bazı reseptörler galaktoza özeldir. Plazma glikoproteinindeki siyalik asidin uzaklaştırılması ile açığa çıkan alttaki galaktozu, karaciğer hücreleri tanıyıp bağlamış ve siyalik asitsiz glikoproteini kandan uzaklaştırmıştır. Bu önemli bulgu, karbohidratlara ilgiyi arttırmış, şekerlerin anlamsız maddeler olmadıkları anlaşılmasına başlamıştır. Aksine özel bilgi taşıyıcıları olarak iş gördükleri ortaya çıkmıştır. 1969 yılında kanser hücrelerinin yüzeyindeki glikokonjugatlara ait şeker zincirlerinin, normal hücrelerde bulunanlara göre çok daha fazla olduğu bulunmuştur (61).

Çalışmamızın asıl elemanı, hücre zarının glikokaliksinde yer alan siyalik asidi anlatmadan önce, glikokonjugatlar hakkında bilgi verecek olursak;

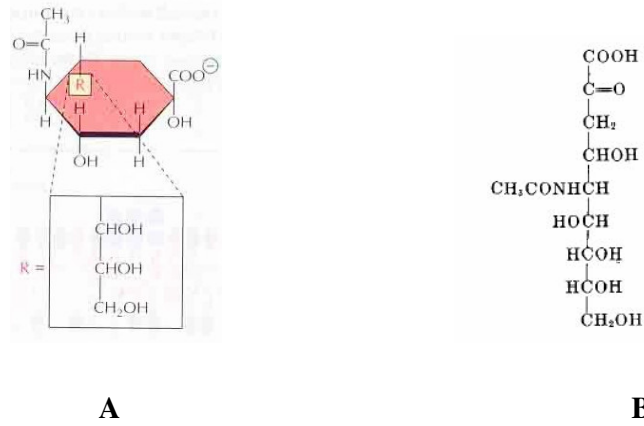
Hücrede karbohidratlar, proteinlere bağlanarak glikoproteinleri ve proteoglikanları, lipidlere bağlanarak glikolipidleri oluştururlar. Bu moleküller glikokonjugatlar olarak adlandırılır (4,44,61).

Glikolipid ve glikoproteinlere her şeker ilavesi farklı tiplerdeki transferaz enzimleri aracılığı ile olur. Örneğin galaktoz ilave eden galaktozil transferaz, glikoz ilave eden glikozil transferaz enzimleri gibi. Bir çok şeker, salgı ve zar proteinlerine bu proteinler henüz hücre zarına ulaşmadan önce Golgi veziküllerinde eklenir. Şekerlerin biyosentezinin son adımı olan **N-asetilnöraminik asit (NANA, siyalik asit)** ilavesi ise trans Golgi ve trans Golgi retikulumunda gerçekleşir (**Şekil 2.13**) (44,59,73).



Şekil 2.13. Hücre zar proteinleri glikolizasyonunun Golgi'de son aşaması (4).

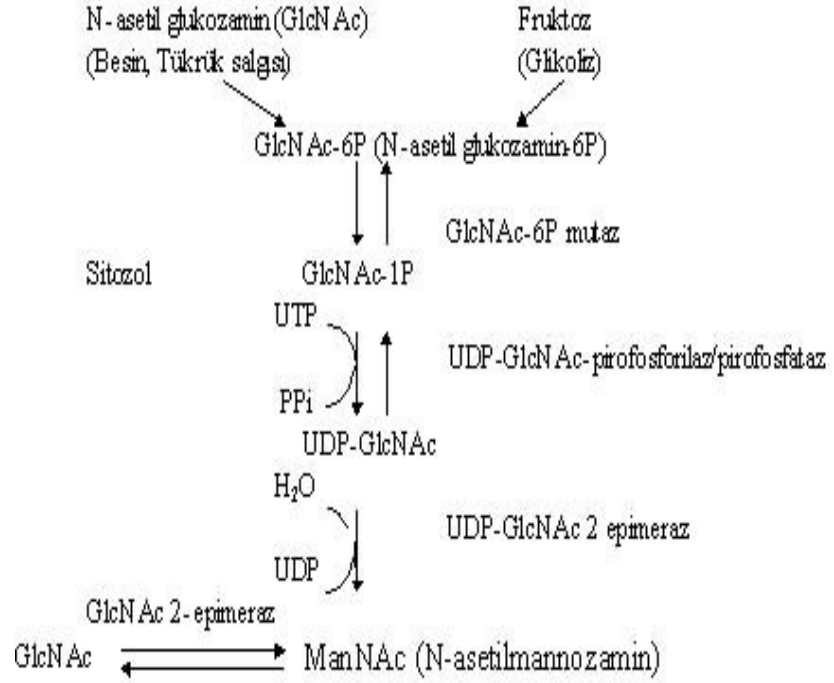
Siyalik asit 9-karbon iskeletinden oluşan monosakarittir ve karbohidrat zincirlerinin sonunda bulunur (Şekil 2.14). Siyalik asit genellikle oligosakkarit zincirlerinin terminal pozisyonunda diğer şekerlere glikozidik bağlar ile bağlanmış olarak bulunur. Bu glikozidik bağlar galaktoz ile olur (22,27,43,85,134,135,139).



Şekil 2.14. A) Siyalik asidin moleküler yapısı (1) B) Siyalik asidin açık formülü (20)

Siyalik asitler hücre zarına yerleşmeden önce hücrede bir seri yolu takip ederler. Besin yolu ile alınan N-asetilglukozamin (GlcNAc) ile fruktoz birleşerek sitozolde GlcNAc-6-P'yi oluşturur. GlcNAc-6-P-mutaz aracılığı ile GlcNAc-1-P'yi

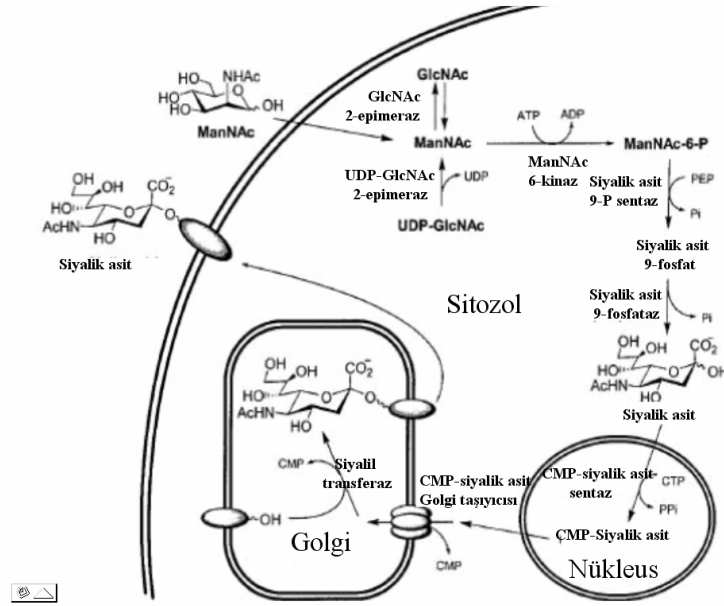
oluşturur. UDP-GlcNAc-pirofosforilaz/pirofosfataz yardımı ile UTP'den bir fosfat çıkar ve UDP-GlcNAc oluşur. Bu yapıya UDP-GlcNAc-2-epimeraz yardımı ile 1 mol su katılırken UDP ayrılır ve N-asetilmannozamin (ManNAc) oluşur (Şekil 2.15) (19,51,63,132,139).



Şekil 2.15. Sialik asidin oluşumunda takip edilen yol (hücre zarına gelinceye kadar) (63).

ManNAc sitozolde, GlcNAc 2-epimeraz yardımıyla GlcNAc'ye dönüşebilir, bu reaksiyon geri dönüşümlüdür. Oluşan bu yapı ATP'den fosfor alarak ManNAc kinaz enziminin yardımı ile ManNAc-6-P'ye dönüşür. Daha sonra sialik asit 9-P- sentaz yardımı ile sialik asit 9 fosfata ve yine aynı enzim aracılığı ile sialik asite dönüşür. Sitozolda gerçekleşen bu olayın sonunda, oluşan yapı nükleusun porlarından girerek nükleusa ulaşır. Nükleusta bulunan CMP sialik asit sentaz aracılığı ile yapıya CMP bağlanır ve CMP-sialik asit oluşur ve bu yapı nükleusun porlarından çıkarak Golgi'ye gelir. Bu molekülün Golgi'ye girebilmesi için, CMP sialik asit Golgi transporter adı verilen taşıyıcı proteine ihtiyaç vardır. Taşıyıcı proteinler taşınacak olan moleküle bağlanarak onun zarı geçebilmesi için yapısal bir değişikliğe uğrar. Bu yolla Golgi'ye

alınan yapı, sialil transferazlar aracılığı ile CMP siyalik asit molekülünden CMP çıkması ile Golgi zarında bulunan bir transmembran proteinin –OH grubunun ayrılması ile bu proteine bağlanır. Bunun sonucunda siyalik asit, glikokaliksin yapısında bulunan zar proteinlerine glikoz moleküllerinin bağlanması işleminde olduğu gibi, en uca bağlanır ve hücre zarının yapısına katılır (Şekil 2.16) (19,51,63).



Şekil 2.16. Siyalik asidin metabolik yolu. ManNAc hücre zarını difüzyon ile geçer, oluşan siyalik asit nükleusun porlarından geçer, CMP-siyalik asit Golgi taşıyıcısı ile Golgi'ye alınır, transmembran proteinlerin uç kısmına eklenmiş olarak zara yerleşir (59).

Glikokonjugatlardaki siyalik asitler, hücrelerin birbirini tanımada önemli rol oynar. Herhangi bir nedenle siyalik asitlerin yıkılması halinde, zarın glikokaliks yapısı bozulur. Bu durumda hücre yabancı hücre olarak algılanır ve fagositoz yapan hücreler tarafından yok edilir veya tanınması gereken yabancı hücreyi tanıyamaz (1,4).

Gangliositler, tüm omurgalı canlıların sinir hücrelerinde bulunan ve beyinde büyük miktarlarda siyalik asit taşıyan glikokonjugatlardır. Sinaptik uçlarda ve depolama görevi yapan hücre içi veziküllerin membranöz yapılarında da bulunur ve böylece beyinde bilginin iletimi ve depolanmasında önemli rol oynarlar. Dolayısıyla, hücrelerin

gerçek komponentlerini oluşturarak büyüme, farklılaşma, hücre-hücre etkileşimi ve sinyal iletimini içeren çeşitli hücresel fonksiyonlarda görev yaparlar. Gangliositlerin büyük kısmı hücre zarına yerleşir, bunun yanında E.R. ve mitokondride de bulunurlar. Ayrıca gangliositlerin sitozolde bulunduğu ve intermediate filamentlerle de ilişkisi olduğu bildirilmektedir. Gangliositler bir veya birkaç **siyalik asit** ihtiva eder. Bu olay gangliositte negatif yük oluşmasına neden olur. Bu negatif yük, pozitif yüklü moleküllerin zardan geçmesini sağlar (1,3,4,26,112,113,117,130).

Gangliositler zarların çoğunda az miktarda bulunmalarına rağmen, sinir hücresi zarlarında bol bulunur (toplam lipidlerin % 5 -10 u kadar). Baş gruplarındaki farklılık nedeniyle 40 dan fazla gangliosit tipi tanımlanmıştır (1,4).

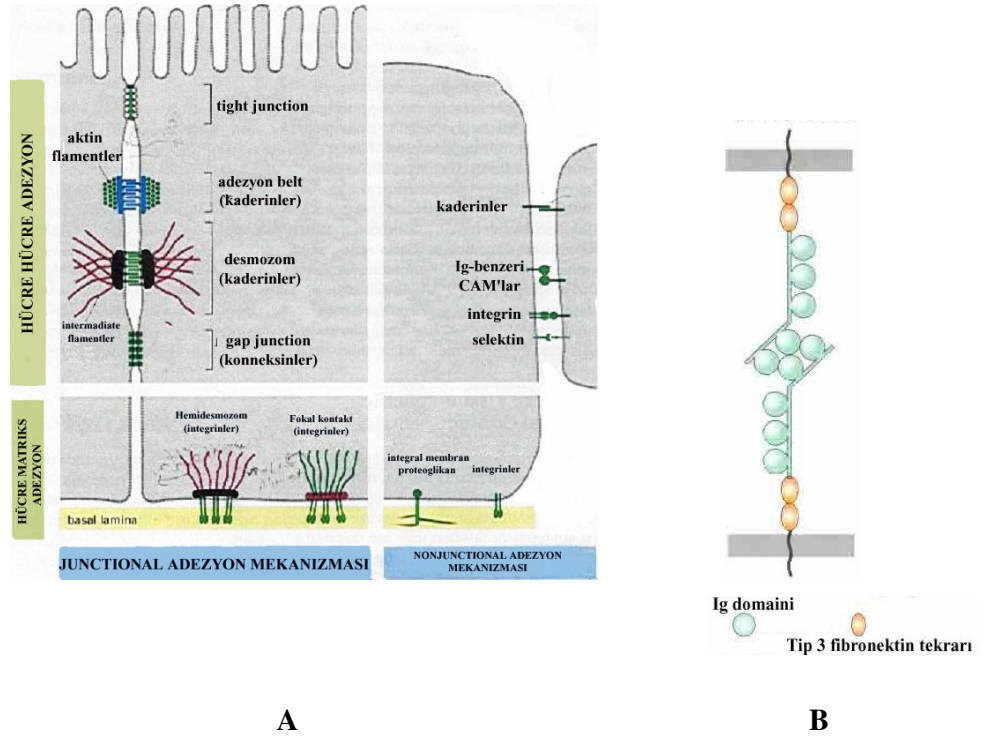
Gangliositlerdeki siyalik asitler; nöron gelişiminin uyarılması, hücre göçü, hücreler arası bütünlük ve zar bütünlüğünün sağlanmasında görev alırlar. Gangliositlerdeki siyalik asit yıkımı, zar bütünlüğünün bozulmasına, dolayısıyla hücreler arası bağlantı ve hücre bütünlüğün bozulmasına neden olur (29,114,129,139).

Siyalik asitlerin, glikoprotein konformasyonuna da etkileri vardır. İki komşu hücrenin glikokaliksindeki karbohidratların uç kısımlarına bağlı bulunan siyalik asitler, taşıdıkları negatif yükler nedeni ile birbirlerini iterek komşu hücrelerin belirli bir pozisyonda kalmalarını sağlarlar. Bu bölgelerdeki siyalik asit eksikliği, hücre adezyonunu bozar (26).

Siyalik asit konsantrasyonları, yaş, genetik hastalıklar, kanser ve enflamasyon gibi durumlarda değişir. Kanserde, kanser invazyonunda ve metastazda siyalik asit miktarının normal dokulara göre artmış olarak bulunması, kanserde onun bir tümör marker'ı olarak kullanılabileceğini göstermektedir (17,26,35,38,60,68, 112,114,120,129,138,139).

2.4. NÖRONAL HÜCRE BAĞLANTI MOLEKÜLÜ (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE: NCAM)

Hücre-hücre adezyon moleküllerinden olan NCAM'lar, omurgalılarda Ig benzeri yapılar taşıyan reseptör proteinlerdir. Ca^{+2} bağımsız hücre-hücre adezyon moleküllerinin en yaygın olanlarıdır. Bunlar antikorların yapısında bulunan Ig benzeri bölgelerden 1-7 tane taşırlar (Şekil 2.17A,B) (1,29,108).



Şekil 2.17. A) Nonjunctional hücre adezyonunda NCAM bağlantısı (1)
B) NCAM - NCAM bağlanması (79).

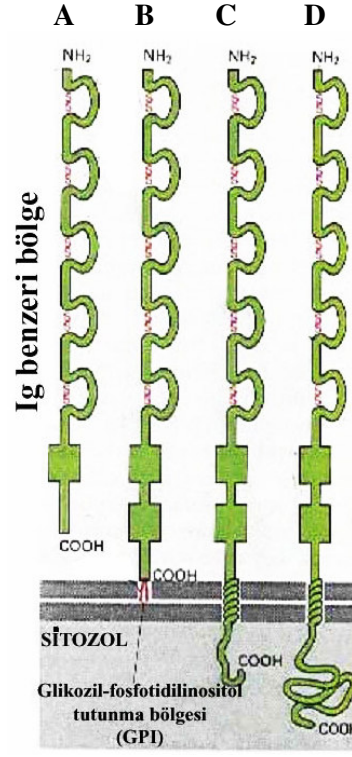
İmmunglobulin benzeri hücre bağlantı molekülleri (Ig-CAM) embriyonik gelişim boyunca, organ şekillenmesinde ihtiyaç duyulan hücrel etkileşimlere katkıda bulunurlar. Nöronlar ve glial hücreler kendine özgü Ig-CAM'ları eksprese ederler. Ig-CAM'lar nöron büyümesine yardımcı olur ve miyelin kılıfın şekillenmesini sağlarlar. Ig-CAM'ların bazıları sinyal işleyişine katılırlar (108).

Segmentasyon sonucu oluşan blastomerler belirli görevleri yapabilecek potansiyele sahiptirler. Bu potansiyelin oluşmasında, diğer tip proteinler yanında Ig benzeri bölgeler taşıyan NCAM, ICAM ve fasciclin II gibi proteinler de rol oynar. Bu tip özelleşmiş proteinler, gastrulasyon evresi başından itibaren hücrelerin gerekli yerlere göçünü sağlayarak, doku ve organların şekillenmesinde görev yaparlar (1,4).

En az 20 çeşit NCAM yapısı bilinmektedir. Bunların hepsi tek bir gen tarafından kodlanır. Bunun için bu gen bölgesinden ilk olarak öncü mRNA meydana gelir. Daha sonra, bu öncü m-RNA'dan, 20 çeşit splicing işlemi yapılarak, 20 çeşit NCAM'ı sentezleyecek 20 çeşit olgun mRNA meydana gelir. Bütün NCAM çeşitleri, bir amino (NH₂) ve bir karboksil (COOH) uç bölgesi taşır. Bunlardan amino bölgesi en uzun bölge olup ekstrasellüler sıvıda (hücreler arası sıvı) uzanır ve Ig benzeri 5 bölge içerir. Karboksil uç taşıyan bölge ise, sitozole yönelik olarak veya değişik uzunluklarda olmak üzere sitozolde bulunur (1,4).

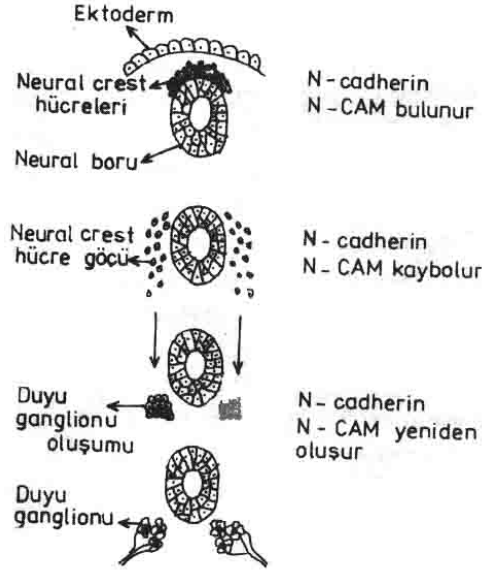
Hücreler arası sinyalleri alarak hücre göçünü ve aynı tip hücrelerin birbirini çekmesini sağlayan 4 tip NCAM proteini **Şekil 2.18**'de görüldüğü gibi, sitozole farklı şekillerde uzanır, bunlar:

1. Tip: Hücre zarıyla ilişki kurmaz. Sadece ekstrasellüler sıvıda uzanır (A).
2. Tip: NCAM'ın karboksil ucu, hücre zarındaki glikozil-fosfatidilinositol (GPI) ile hücre zarına tutunur (B).
3. Tip: NCAM'ın karboksil ucu hücre zarını geçerek sitozole girer (C).
4. Tip: NCAM'ın karboksil ucu yine hücre zarını geçer fakat sitozolün daha derinlerine yayılır (D) (4,21,29,114,139).



Şekil 2.18. Farklı yapıdaki NCAM proteinleri ve hücre zarına yerleşimleri(4).

NCAM'ın çeşitli görevlerinin yanında hücre göçünde de önemli rolü vardır. Periferel sinir ganglionlarını oluşturmak üzere göç eden ektodermal nöral krest hücrelerinde N-kaderinlerle birlikte NCAM'ın ortaya çıkması, kaybolması ve yeniden oluşması periferel sinir ganglionu oluşumunda rolü olduğunu ortaya koyar (**Şekil 2.19**). NCAM'ların hücre göçünde görev almaları yanında hücre-hücre birleştirici fonksiyonları da vardır. Bu çok çeşitli görevlerinin bir kısmı, glikolizasyon mekanizması ile siyalik asit tekrarları taşıyan değişik NCAM formlarıyla yapmaktadır. Bu formlardan bazıları siyalik asidin yüzlerce tekrarından oluşan uzun bir bölge içerirken, bazıları da siyalik asit bölgelerinin çok azını taşır (1,4,114,117).



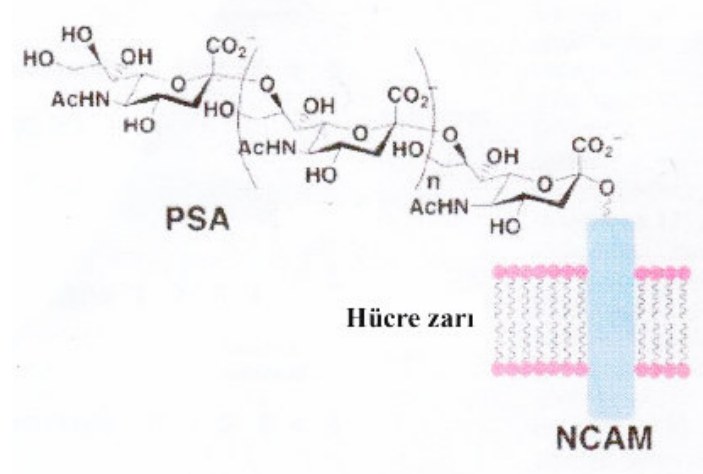
Şekil 2.19. Periferal sinir ganglionlarının oluşumunda NCAM (4).

NCAM gelişmekte olan sinir sisteminde, intrasellüler sinyal transdüksiyon yolunu aktive ederek nöron oluşumunu sağlar. Bu olayda, NCAM'ın homofilik olarak bağlanması ile intrasellüler sinyal akışı aktive olur. CAM homoloji domain (CHD) olarak bilinen molekülün aracılık etmesiyle, fibroblast growth faktör reseptör (FGF-R) ile NCAM etkileşir. Bu etkileşim sonrasında, FGF-R'ye NCAM bağlanması ile fosfolipaz C γ aktif hale geçer ve DAG lipaz aracılığı ile diaçil gliserol (DAG)'den araşidonik asit (AA) oluşumu sitümüle edilir (FGF-R→Fosfolipaz C γ → DAG → DAG lipaz →AA). AA ise, voltaj bağımlı kalsiyum kanalları boyunca kalsiyum akımını indükler. Bu sinyal akışının aktivasyonu ile homofilik NCAM bağlanması ve nöron gelişimi teşvik edilir (111,114).

Yapılan çalışmalar NCAM'ın yetişkin sinir sistemindeki rejenerasyon ve öğrenmede de önemli olduğunu göstermiştir. Farelerde yapılan çalışmalarda NCAM'ları eksik farelerin hafıza ve öğrenme yetilerinin eksildiği ve aynı zamanda öğrenme olayı gerçekleşirken NCAM yenilendiği gözlenmiştir (39,114).

2.4.1.NCAM'ın Polisialilasyonu

Birçok siyalik asidin bir araya gelmesi ile oluşan polisialik asit (PSA), omurgaluların beyinde lokalize olan NCAM'da bulunur. Siyalik asit rezidüleri polisialiltransferaz enzimleri ile α -2,8 bağlantılı olarak birbirlerine bağlanarak uzun linear homopolimerler meydana getirirler. Her PSA homopolimeri 55 kadar siyalik asit bulundurur, bazen 200'ün üstüne çıkabilir. PSA, NCAM'ın 2 asparagin amino asidine tutunur (Şekil 2.20) (4,68,81,83,114,117).



Şekil 2.20. Hücre zarında NCAM-PSA bağlantısı (81).

Nöron gelişiminin NCAM aracılığı ile uyarılması, polisialilasyon ile NCAM'ın glikozilasyonuna bağlıdır. NCAM'da PSA eksik olursa, nöronların gelişmesi için gereken uyarı yetersiz olur ve nöron gelişimi tam olarak gerçekleşmez. Ayrıca santral sinir sisteminin oluşumu sırasında, hücre göçü, aksonal büyüme ve sinyal iletiminde görev alır (4,11,39,68,88,114,116,117)

PSA-NCAM, embriyonik gelişim sırasında beyinde bol miktarda eksprese olur. Fazlalaşan PSA zincirleri uzun ve negatif şarjlı olması nedeniyle NCAM'ın hücre adezyonunu önler, böylece yapısal yeniden şekillenme başlar. Yeni doku ve organların oluşumu için, hücre-hücre bağlantıları koparak, yeni dokuların oluşmasını sağlayan hücreler uygun bölgelere göç ederler. Böylece NCAM, hücre-hücre adezyonunun

düzenleyicisi olarak görev alır. Yetişkinlerde ise, NCAM'daki PSA'lar normal hücrelerde daha sınırlı olup, santral sinir sisteminin hafızada görevli hücrelerinde bolca bulunur, beyinde rejenerasyon için gereklidir ve yenilenen hücrelerde miktarı artar. Ayrıca kanserde de, NCAM'a bağlanan PSA miktarlarının arttığı tesbit edilmiştir (11,39,114,131).

2.4.2.NCAM'ın Metastazla İlişkisi

Hücre adezyon moleküllerinden Ig süperfamilyası tümör gelişimi ve metastatik işleyişin kontrolünde kritik bir rol oynar. Böbrekte NCAM, postiskemik rejenerasyon ve renal hücre karsinomlarının yayılması boyunca bol eksprese olur. NCAM, SSS ve adrenal bezde bolca eksprese olur. Renal hücre karsinomlarının, SSS ve adrenal bez gibi NCAM'ı eksprese eden organlara metastazının daha fazla olduğu gösterilmiştir. Küçük hücreli akciğer kanseri, nöroblastoma ve Wilm's tümörünün metastazlarında, NCAM'daki PSA miktarı artmış olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalar, kanserli hücrelerde ve metastazda PSA miktarının fazla olduğunu göstermiştir. Bu nedenle de NCAM'a bağlanan PSA'ların, kanserin metastazından sorumlu faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (4,11,28,57,81,114,117,129,139).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hücre Dizileri

Çalışmamızda, insan ve sıçana ait glioma hücre dizileri kullanıldı. Bu diziler;

İnsan glioma hücre dizisi : DK-MG

Sıçan glioma hücre dizisi : C6

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Acrilamide/bisacrilamide %30 solüsyon (29:1) (Across)
- Agaroz (Sigma)
- Amonyum persülfat [(NH₄)₂SO₈] (Q-Biogene)
- Asetik asit (C₂H₄O₂) (Merck)
- Aseton (C₃H₆O) (Merck)
- Borik asit (H₃PO₄) (Carlo Erba)
- Cell freezing medium (Biological Industries)
- Distile su
- dNTP (Larova)
- Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) toz besiyeri (Sigma)
- Etanol (C₂H₅O) (Merck)
- Ethidium bromid (Across)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma)

- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries)
- Formaldehit (HCHO) (J.T. Baker)
- Formaldehit free detergent (Serva)
- Gümüş nitrat (AgNO_3) (Fluka)
- Ham's F12 Nutrient Medium (Biological Industries)
- Hanks' Balanced Salt Solüsyonu (HBSS) (Sigma)
- İmmunohystostain kiti (Zymed)
- Potasyum dihidrojen fosfat(KH_2PO_4) (Merck)
- L-glutamin (Biological Industries)
- Loading buffer (Sigma)
- Metanol (CH_4O) (Merck)
- Molecular Weight Marker (MBI Fermentas)
- N'N'N'N'-Tetrametyhylediamine (TEMED) (Fluka)
- Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck)
- Sodyum dihidrojen fosfat 2 hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- NCAM antibody (CD56) (Diagnostic Biosystems)
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Biological Industries)
- Primer dizileri (MVG-Biotech)
- Puck's Saline A (Sigma)
- Redistile su

- RPMI 1640 besiyeri (Biological Industries)
- RT (Revers transkriptaz) -PCR kiti (Qbiogene)
- Siyalik asit ölçüm kiti (Sigma)
- Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Merck)
- Sodyum hidroksit (Reidel deHaen)
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Steril distile su (Eczacıbaşı-Baxter)
- Taq DNA polimeraz (Bioron)
- Telomeraz ELISA Ölçüm Kiti TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} Kit (Roche)
- Total RNA izolasyon kiti (Biological Industries)
- Tripan Blue Solüsyonu (Sigma)
- Tripsin EDTA 1x (Biological Industries)
- Trizma base (Sigma)

3.1.3. Aygıtlar

- Binoküler mikroskop (Olympus)
- Buz makinası (Hoshizaki)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Cam kalemi

- Cam pipet (5, 10 ml) (HBG)
- Cam uzun pastör pipeti (Isolab)
- CO₂'li Etüv (Sanyo)
- Cryotüp (TTP)
- Derin dondurucu (-20°C) (Arçelik)
- Derin dondurucu (-80°C) (New Brunswick Scientific)
- Dijital fotoğraf makinası (Nicon)
- Gazlı bez
- Eldiven (Steril ameliyat eldiveni) (Beybi)
- Elektroforez (Biorad)
- Enjektör (1,5,10ml'lik) (Ayset)
- Etüv (Ecocell)
- Filtre 0.22 mikrolitre por (Orange Scientific)
- Hassas terazi (Precisa-125A)
- İverted mikroskop (Euromex)
- Jel Analiz Software (Yazılım programı)
- Kurutma kağıdı
- Lamin air kabin (Steril Kabin) (Nuair)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve)
- Mezür (50 ml'lik, 100ml'lik, 500ml'lik, 1000ml'lik) (Isolab)

- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikropipet ucu (silikonlu 1, 200, 1000 ml) (Neptune)
- Mikroplate okuyucu (ELISA) (LabSystems)
- Nitrojen tankı (MVE)
- Otoklav (Dedeoğlu)
- Otoklavlanabilen şişe (350ml, 500ml, 1000ml)(Witeg)
- Otomatik pipetler (Gilson)
- Parafilm (American National Can)
- PCR (Eppendorf)
- pH metre (NEL)
- Santrifüj tüpleri (Orange Scientific)
- Shaker (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Titramax 100)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)
- Spektrofotometre (Shimadzu)
- Steril plastik petri küçük, büyük (Orange Scientific)
- Su banyosu (Nüve)
- Thoma lamı (Assistent)
- Vial (Eppendorf)
- Vidalı kapaklı kültür flaskı (25 cm²'lik) (CellStar)
- Vorteks (IKA)

3.2.YÖNTEM

Çalışmamızda, insan glioma (DK-MG) ve sıçan glioma (C6) hücre dizileri kullanılmıştır. Deneye American Type Culture Collection (ATCC)'dan dondurulmuş halde cryotüplerde gelen DK-MG ve C6 hücre dizilerinin ilk ekiminin yapıldığı birer flask ile başlandı ve ölçümlerde kullanılacak hücre miktarına ulaşabilmek için yeterli sayıda flask elde edilinceye kadar pasajlama işlemine devam edildi. Her bir hücre grubu için 80'er flask elde edildikten sonra deneye başlandı. Bu flaskların 40'ı ölçümler için ayrılırken, diğer 40 flask sonraki pasajlarda yapılacak ölçümler için pasajlandı. İşlemler deney sonuna kadar aynı şekilde devam etti. DK-MG ve C6 hücre dizileri için ayrı ayrı yapılan 15 pasajın 3., 6., 9., 12, ve 15. pasajlarında telomeraz aktivitesi, siyalik asit miktarı, telomeraz aktivitesini destekleyici TERT ve TR ölçümleri için ayrı ayrı elde edilen üçer hücre ekstraktında, NCAM boyanması için ise, belirtilen pasajlara ait üçer flaskta değerlendirme yapılarak, pasajlar arası ve iki dizi arasındaki farklar incelendi.

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1 Sterilizasyon

Kültürde kullanılan tüm malzeme ve ajanlar sterilize edildi. Radyasyona maruz bırakılan doku kültürü plastikleri ve kullanıma hazır durumdaki steril besiyerleri ticari firmalardan elde edildi. Laboratuvarında, çok yüksek ısıya dayanıksız materyaller, 8 kg basınç ve 115°C'de 20 dk otoklavlanırken; cam malzemeler 160 °C'de 60-90 dk otoklavlandı. Sıvı ajanlar ise por büyüklüğü 0.22 µm olan mikrobiyolojik filtreden geçilerek sterilize edildi. Pipetler ve uçların sterilizasyonu eter+alkol karışımına batırılarak sağlandı. Steril kabinin temizliği %75'lik alkol ve formaldehid içermeyen (formaldehid free) deterjan ile yapıldı. Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı.

3.2.1.2. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanışı

Kültürde kullanılan 2 hücre tipine özel besiyerleri hazırlandı.

3.2.1.2.1. İnsan glioma hücre dizisi (DK-MG)

RPMI Besiyeri hazırlanışı:

RPMI (4.5 g Glukozlu ve 4 mM L-glutaminli) :73.775 ml

FBS : 20 ml

Penisilin/Streptomisin : 1 ml

NaHCO₃ (%7.5) : 5.225 ml

%7.5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) çözeltisi hazırlanışı:

7.5 g NaHCO₃ tartıldı, 100 ml steril distile suda çözüldü. Kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Besiyeri için kullanılan tüm malzemeler, steril bir şişede ve por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek hazırlandı.

3.2.1.2.2. Sıçan glioma hücre dizisi (C6)

DMEM/F12 Besiyeri hazırlanışı

DMEM 10X : 5 ml

F12 Ham's Nutrient Medium : 5 ml

FBS : 10 ml

Penisilin/Streptomisin : 1 ml

NaHCO₃ (%7.5) : 5.225 ml

Steril distile su : 73.775 ml

Besiyeri için kullanılan tüm malzemeler, steril bir şişede ve por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek hazırlandı.

3.2.1.3. Stoktan hücre çıkarma, kültür aşaması ve pasajlama

3.2.1.3.1. Stoktan hücre çıkarma

1. Hazırladığımız besiyerlerinden hücre tipine uygun olan besiyeri 25 cm²'lik kültür flasklarına 4 ml olacak şekilde kondu.
2. Stoklanmış halde gelen hücre dizilerinin bulunduğu cryotüpler 37°C'lik su banyosunda 2 dk bekletilerek eritildi.
3. Cryotüpler su banyosundan steril kabine alınırken, dışı %75'lik alkol ile temizlendi.
4. Cryotüplerin içindeki hücreler, steril cam pastör pipeti yardımı ile santrifüj tüpülerine aktarıldı.
5. 125 g'de oda ısısında 10 dk. santrifüj edildikten sonra, dipte çöken hücrelerle birlikte 0.5 ml sıvı bırakılarak, üstteki süpernatantlar atıldı.
6. Altta kalan hücreler steril cam pastör pipeti yardımıyla, içerisinde 4 ml besiyeri bulunan kültür flasklarına aktarıldı.

3.2.1.3.2. Kültür aşaması

1. Flaskın kapağı kapatılarak 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.
2. Ertesi gün kontaminasyon olup olmadığı kontrol edildi.
3. Yeterli çoğalma oluncaya kadar flasklar inverted mikroskop altında her gün kontrol edildi.

3.2.1.3.3. Pasajlama

1. Flaskların tabanı hücrelerle tamamen kaplanınca, flasklardaki tüm besiyeri steril bir pipet yardımı ile çekildi.
2. Besiyeri alınan flasklara, enjektör yardımı ile önceden 37°C su

banyosunda ısıtılmış 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 ml (hücre yoğunluğuna göre) eklenerek, flaskın tabanına hafifçe vuruldu. Bunu takiben pastör pipeti ile flasklara konan tripsin çekilerek atıldı.

3. Tripsini çekilen flasklara tekrar aynı miktarda tripsin eklendi.
4. Flasklar 5-10 dk 37°C %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.
5. Flask tabanına tutunmuş hücrelerin serbestleşmesi inverted mikroskopta gözlemlendi.
6. Serbestleşen hücreler, önceden hazırlanmış ve içerisinde 4 ml besiyeri bulunan santrifüj tüplerine steril cam pastör pipeti ile aktarıldı.
7. 125 g'de oda ısısında 10 dk. santrifüj edildikten sonra dipte çöken hücrelerle birlikte 0.5 ml sıvı bırakılarak, üstteki süpernatantlar atıldı.
8. Altta kalan hücreler, steril cam pastör pipeti yardımıyla, içerisinde 4 ml besiyeri bulunan kültür flasklarına (hücre yoğunluğuna göre 2-6 flask olabilir) eşit miktarda dağıtıldı.
9. İşlemler 5. basamaktan itibaren aynı şekilde, yeterli hücre sayısı elde edilinceye kadar tekrarlandı.

3.2.1.3.4. Süpernatant eldesi

1. Yeterli üreme sağlanan flaskın besiyeri 48. saatte alındı.
2. Besiyeri alınan flaska, enjektör yardımı ile önceden 37°C su banyosunda ısıtılmış 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 ml (hücre yoğunluğuna göre) eklendi, pastör pipeti yardımı ile bu ilk konan tripsin çekilerek atıldı.
3. Daha sonra tekrar aynı miktarda tripsin eklendi.
4. Flask 5-10 dk 37°C %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.

3. Flask tabanına tutunmuş hücrelerin serbestleşmesi inverted mikroskopta gözlemlendi.
4. Serbestleşen hücreler, hücre tipine uygun olan besiyerinden 2 ml (hücreleri kaldırma işleminde kullanılan tripsin miktarının iki katı kadar) konarak önceden hazırlanmış santrifüj tüplerine, steril pastör pipeti ile aktarıldı.
5. Santrifüj tüplerine aktarılan hücrelerin sayısı, tripan blue boyama yöntemi uygulanarak belirlendi.

3.2.1.3.5. Tripan blue boyama yöntemi

Tripan Blue hücre sayımı için tavsiye edilen çeşitli boyamalardan biridir. Bu metoda göre canlı hücreler boyanmaz, ölü hücreler boyanır.

1. Bir tüpe 0.5 ml % 0.4 Tripan Blue solüsyonu, üzerine 0.3 ml Hank's Balanced Salts (HBSS) (Dilüsyon faktör= 5) ve son olarak da süpernatant eldesinin 5. basamağında tüpe alınan hücre süspansiyonundan 0.2 ml kondu.
2. Hazırlanan tüp 5-15 dk oda ısısında beklemeye bırakıldı.
3. Sürenin sonunda, tüp içeriği pipetlenerek karıştırıldı, bu süspansiyondan pipetle bir damla alınarak thoma lamı üzerine kondu.
4. Thoma lamının ortasındaki 1 mm alandaki karelerde bulunan tüm hücreler sayıldı.
5. Mavi boyanan cansız hücreler ile hiç boyanmayan canlı hücreler ayrı ayrı sayıldı.

Not: Her bir karenin çevresinin orta hattının sol ve en üst tarafına dokunan hücreler sayıldı. Sağ ve alt alanın çevresindeki hücreler sayılmadı.

Not: Eğer hücrelerin kümeler halinde görülmesi %10'dan fazla ise, hücrelerin yayıldığından emin oluncaya kadar tüm prosedür tekrarlandı.

6. Thoma lamının her bir karesi 0.1mm^3 ya da 10^{-4} cm^3 toplam hacmi gösterir. $1\text{cm}^3 \sim 1\text{ml}$ 'ye eşit olduğu için, her ml'deki hücre konsantrasyonunu aşağıdaki hesapların kullanılması belirleyecektir:

Her ml'de bulunan toplam hücre: Ortalama her karedeki sayım X dilüsyon faktör X 10^4 (sayılan 10 karedeki).

Örn. Eğer her karede sayılan hücre sayısı ortalama 45 ise $45 \times 5 \times 10^4 = 2.25 \times 10^6$ hücre/ml.

Toplam Hücre : Her ml'de bulunan toplam hücre X orjinal sıvı hacimde kalan hücre.

Örn: 2.25×10^6 (hücre/ml) x 10 ml (orjinal hacim) = 2.25×10^7 toplam hücre

7. Hücre canlılığı (%)= Toplam canlı hücreler (boyanmamış) /toplam hücreler (boyanmış ve boyanmamış) x 100

Not: Eğer boyanmamış (canlı) hücrelerin her karedeki ortalama sayısı 37.5 ise, Toplam canlı hücre = $[37.5 \times 5 \times 10^4]$ canlı hücre / ml x 10 ml (orjinal volüm) = 1.875×10^7 , dür.

Hücre canlılığı (%) = 1.875×10^7 (canlı hücre) / 2.25×10^7 (toplam hücre) x 100 = %83 oranında canlı hücre var demektir.

Buna göre canlı hücrelerin sayısı belirlenip hücre süspansiyonundan istenen miktar kadar alındı.

3.2.1.3.6. Stok hücre hazırlama

1. Yüzeyi hücrelerle tamamen kaplanmış olan her iki hücre dizisine ait birer flaskın tüm besiyeri bir pipet yardımıyla çekildi.
2. Besiyeri alınan flaslara, enjektör yardımı ile önceden 37°C su banyosunda ısıtılmış 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 ml (hücre yoğunluğuna göre) eklendi. Bunu takiben pastör pipeti ile flaslara konan tripsin çekilerek atıldı.
3. Ardından flaslara tekrar aynı miktarda tripsin eklendi.
4. Flasklar 5-10 dk 37°C %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.
5. Flask tabanına tutunmuş hücrelerin serbestleşmesi inverted mikroskopta gözlemlendi.
6. Serbestleşen hücreler, içerisinde 4 ml stok solüsyonu bulunan önceden hazırlanmış santrifüj tüplerine steril cam pastör pipeti ile aktarıldı.
7. 125 g'de oda ısısında 10 dk. santrifüj edildikten sonra, tüplerin dibinde çöken hücrelerle birlikte 1.8 ml sıvı bırakılarak, üzerindeki süpernatant atıldı.
8. Hücrelerin içinde saklanacağı cryotüplerin üzerine, hücre tipi, pasaj numarası ve tarih yazılarak etiketlendikten sonra, bu tüplere 0.2 ml DMSO ya da cell freezing medium kondu.
9. Santrifüj edilen tüplerdeki 1.8 ml hücre süspansiyonları pipetlenerek karıştırıldı ve her biri kendine ait tüpe aktarıldı.
10. Kapağı kapatılan cryotüpler 1 saat -80°C'de tutuldu.

11. Son olarak da nitrojen tankına alındı ve tekrar kullanılıncaya kadar burada saklandı.

Stok Solüsyonunun Hazırlanışı:

Her hücre tipi için kendine özgü besiyerinden 7ml alınarak üzerine 2 ml FBS eklendi.

3.2.2. TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) yöntemi ile telomeraz aktivitesinin ortaya çıkarılması ve ELISA ile aktivitenin belirlenmesi

Örneklerde telomeraz aktivitesi PCR ve ELISA teknikleri kullanılarak birkaç aşamada tayin edildi. Bu amaçla TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche) kiti kullanıldı.

3.2.2.1. Kit İçeriği

Kit içeriği ve kullanım amacı **Çizelge 3.1**'de verildiği gibidir.

Çizelge 3.1: TRAP kit içeriği ve kullanım amacı

Solüsyon	Solüsyonun içeriği, kullanım amacı
1-Lizis solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 11 ml kullanıma hazır solüsyon.• Doku ve hücre kültüründen hücre ekstraktlarının hazırlanması için kullanılır.
2-Reaksiyon karışımı,	<ul style="list-style-type: none">• 2 x 900 µl kullanıma hazır solüsyon, 2X solüsyon.• Telomeraz substratı olan biotinle işaretlenmiş P1-TS primerini, optimize edilmiş bağlayıcı P2 primerini, nükleotidleri ve Taq polimerazı içerir.• Telomeraz aracılıklı uzama ve PCR amplifikasyonu için kullanılır.

3-İnternal standart [IS]	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µl kullanıma hazır solüsyon. • 216 bp'lik bir internal standart [IS] DNA, 0.001 amol/µl içerir. • İnternal amplifikasyon standardı olarak kullanılır. • Amplifikasyon sürecinin inhibitörlerini ortaya çıkarır.
4-Kontrol kalıp (template), düşük	<ul style="list-style-type: none"> • 35 µl, 0.001 amol/µl kullanıma hazır solüsyon • 8 telomerik tekrarlı [TS8] bir telomeraz ürünü ile aynı diziyeye sahip pozitif kontrol kalıp DNA içerir.
5-Kontrol kalıp (template),yüksek	<ul style="list-style-type: none"> • 35 µl, 0.1 amol/µl kullanıma hazır solüsyon. • 8 telomerik tekrarlı [TS8] bir telomeraz ürünü ile aynı diziyeye sahip pozitif kontrol kalıp DNA içerir.
6-Nükleazsız su	<ul style="list-style-type: none"> • 2 x 1.1 ml iki kere distile edilmiş, nükleazsız su içerir.
7-Denatürasyon solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> • 1.2 ml kullanıma hazır solüsyon. • %0.5'den daha az sodyum hidroksid içerir. • Amplifikasyon ürünlerini denatüre etmek için kullanılır.
8-Hibridizasyon solüsyonu T	<ul style="list-style-type: none"> • 7 ml kullanıma hazır solüsyon. • Telomerik tekrar dizilerine komplementer olan DIG (digoksinin) ile işaretlenmiş bir prob içerir • Telomeraz aracılıklı amplifikasyon ürünlerinin spesifik tayini için kullanılır.
9-Hibridizasyon solüsyonu IS	<ul style="list-style-type: none"> • 3.5 ml kullanıma hazır solüsyon. • İnternal standarda komplementer olan DIG (digoksinin) ile işaretlenmiş bir prob içerir. • IS'li amplifikasyon ürünlerinin spesifik tayini için kullanılır.

10-Yıkama solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> • 50 ml 10X konsantrasyonludur.
11-Anti-DIG-HRP solüsyonu (Anti-Digoksinin-Horseradish Peroksidaz)	<ul style="list-style-type: none"> • 120 mU poliklonal koyun antikoru olup, liyofilize edilerek, stabil hale getirilmiştir. • Konjugat solüsyonunu hazırlamak için kullanılır.
12-Konjugat dilüsyon solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> • 12 ml kullanıma hazır solüsyon. • Konjugat çalışma solüsyonunu hazırlamak için kullanılır.
13-TMB substrat solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> • 12 ml kullanıma hazır solüsyon • 3,3',5,5'-tetrametil benzidin içerir.
14-Stop solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> • 12 ml kullanıma hazır solüsyon. • %5'den daha az sülfirik asit içerir.
Mikrotiter plate	<ul style="list-style-type: none"> • 1 plate 12x8 gözlüdür, kullanıma hazırdır. • Önceden streptavidin ile kaplanmıştır.
Yapıştırıcı band	<ul style="list-style-type: none"> • 3 adet, inkübasyon esnasında MTP gözlerindeki buharlaşmayı engellemek için kullanılır.

3.2.2.2. Hücre Ekstraktının Hazırlanması

Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı.

1. Her örnekten alınan 2×10^5 hücre eppendorf tüpüne kondu.
2. Hücreler $3000 \times g$ ' de $4^\circ C$ 'de 5 dk. santrifüj edildi.
3. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Dipte kalan pelet üzerine 200 μl PBS (fosfat buffer) ilave edildi.

4. 3000 x g' de 4°C'de 5 dk. santrifüj edildi.
5. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
6. Pelet üzerine 200 µl lizis solüsyonu (solüsyon 1) ilave edildi. En az 3 kez buz üzerinde pipetleme yapıldı. Sonra buz üzerinde 30 dk. inkübe edildi.
7. 16000 x g' de 4°C'de 20 dk. santrifüj edildi.
8. Hücre ekstraktı (süpernatant) 175 µl'si yeni bir tüpe dikkatli bir şekilde aktarıldı.

3.2.2.3. Negatif Kontrolün Hazırlanması

1. 5 µl hücre ekstraktı (3.2.2-9) alındı.
2. Üzerine 10 µl DNaz'sız RNaz ilave edildi. Bu karışım 20 dk. 37°C'de inkübe edildi.

3.2.2.4. Pozitif Kontrolün Hazırlanması

1. Pozitif kontrol olarak, kitle verilen kullanıma hazır solüsyon 5 kullanıldı (Solüsyon 4 de kullanılabilir).

3.2.2.5. TRAP (Telomerik Tekrarı Coğaltma Yöntemi=Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi

Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı.

1. Normal Örnek Tüpünün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 3 µl örnek (3.2.2-9) ilave edildi.

- 17 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

2. Negatif Kontrol Tüpünün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 2 µl DNaz'sız RNaz ile muamele edilmiş örnek (3.2.3-2) ilave edildi.
- 18 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

3. Pozitif Kontrol Örnek Tüpünün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 1 µl kontrol kalıp (solüsyon 5) ilave edildi.
- 19 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

4. Lizis Solüsyonlu Tüpün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 1 µl lizis solüsyonu (solüsyon 1) ilave edildi.
- 19 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

Yukarıda hazırlanan PCR tüplerinin hepsi thermal cyclera yerleştirilerek, **Çizelge 3.2'**deki programa göre amplifikasyon ürünü (PCR ürünü) elde edildi.

Çizelge 3.2. TRAP amplifikasyon ürünü elde etme programı

Adım	Zaman	Sıcaklık (+)	Devir sayısı
1. Primer uzaması	30 dk.	25°C	
2. Telomeraz inaktivasyonu	5 dk.	94°C	
3. Amplifikasyon			30
Denatürasyon	30s	94°C	
Annealing	30s	50°C	
Polimerizasyon	90s	72°C	
4. Son Uzatma	10 dk.	72°C	
5. Bekletme		4°C	

3.2.2.6. PCR'in Kontrolü

3.2.2.6.1. Poliakrilamid Jel Hazırlanması için Gerekli Solüsyonlar

10x Tris-Borat Tamponu (TBE)

50 g borik asit

108 g Tris bazı

40 ml 0.5M EDTA (pH 8) (181.8 g Na₂EDTA.2H₂O + 20 g NaOH + 800ml distile su olarak hazırlandığında pH 8 oluyor).

Distile su ile 1000ml'ye tamamlandı, manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

%30'luk Poliakrilamid Jel

10 ml Acrilamid/Bisacrilamid 29:1

12.35 ml distile su

2.5 ml 10x TBE

175 µl %25'lik Amonyum persülfat

8.5 µl TEMED

Mezür içerisine kondu.

3.2.2.6.2. Poliakrilamid Jel Elektroforez Yöntemi

1. %30'luk poliakrilamid jel çözeltisi dikey jel elektroforez düzeneğine dökülerek 12 dişli tarak yerleştirildi.
2. Jel donduktan sonra kurulan düzenek, içerisinde 1x TBE tamponu bulunan dikey elektroforez tankına yerleştirildi.
3. 10 µl PCR ürünü ve 2 µl loading buffer karıştırılarak kuyucuklara yüklendi (1 kuyucuğa 12 µl marker yüklendi).
4. Yükleme işleminden sonra elektrotlar yerleştirilerek 120V'da 4 saat yürütüldü.
5. Elektroforez işlemi bitince gümüş boyama ile bantlar görünür hale getirildi.

3.2.2.6.3. Gümüş Boyama Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

%10'luk etanol çözeltisi

% 5'lik Asetik asit çözeltisi

% 0.1'lik AgNO₃ çözeltisi

%1.5'lik NaOH çözeltisi

150 µl stok formaldehit

% 0.75'lik Na₂CO₃

3.2.2.6.4. Gümüş Boyama Yöntemi

Elektroforez işleminin sonunda poliakrilamid jel aşağıda bildirilen solüsyon serilerinden geçirilerek boyandı.

%10 etanol + %5 asetik asit (v/v)	6 dk
% 0.1 AgNO ₃	15 dk
% 1.5 NaOH	30 dk
% 1.5 NaOH + formaldehit	Bantlar oluşuncaya kadar
% 0.75 Na ₂ CO ₃	Yıkama işlemi yapıldı

PCR ürünleri laboratuvarımızda Nikon marka dijital fotoğraf makinası ile görüntüledi.

3.2.2.7. Hibridizasyon ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi

1. Pozitif kontrol için 3 adet denatürasyon tüpü hazırlandı. Bu tüpler:

- ◆ IS- pozitif kontrol
- ◆ Normal- pozitif kontrol
- ◆ Lizis solüsyonu-pozitif kontrol olarak etiketlendi.

2. Her bir örnek için 3 denatürasyon tüpü hazırlandı. Bu tüpler:

- ◆ IS-örnek
- ◆ Normal-örnek
- ◆ Negatif kontrol-örnek olarak etiketlendi.

3. Her tüpe öncelikle 10 µl denatürasyon solüsyonu (solüsyon 7) ilave edildi.

4. Hazırlanan denatürasyon tüplerine sırasıyla;

- ◆ IS'li pozitif kontrol için hazırlanan denatürasyon tüpüne pozitif kontrolün amplifikasyon ürününden (3.2.5-3) 2.5 µl kondu.
- ◆ Normal pozitif kontrol için hazırlanan denatürasyon tüpüne pozitif kontrolün amplifikasyon ürününden (3.2.5-3) 2.5 µl kondu.
- ◆ Lizis solüsyonu için hazırlanan denatürasyon tüpüne lizis solüsyon amplifikasyon ürününden (3.2.5-4) 2.5 µl kondu.
- ◆ IS'li örnek için hazırlanan denatürasyon tüpüne örneğin amplifikasyon ürününden (3.2.5-1) 2.5 µl kondu.
- ◆ Örnek için hazırlanan denatürasyon tüpüne örneğin amplifikasyon ürününden (3.2.5-1) 2.5 µl kondu.
- ◆ Negatif kontrol için hazırlanan denatürasyon tüpüne negatif kontrol amplifikasyon ürününden (3.2.5-2) 2.5 µl kondu.

5. Tüm tüpler oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi.

6. Hazırlanan tüplerden, normal-pozitif kontrol, lizis solüsyonu-pozitif kontrol, normal-örnek ve negatif kontrol-örnek tüplerine 100 µl hibridizasyon solüsyonu T (solüsyon 8), IS-örnek ve IS-pozitif kontrol tüplerine ise 100 µl hibridizasyon solüsyonu IS (solüsyon 9) ilave edildi.

7. Tüpler kısa süreli olarak vortekslendi.

8. Tüplerdeki karışımlardan MTP'nin gözlerine tek tek 100 µl kondu ve buharlaşmayı önlemek için kendi yapışıcı bandı ile gözler kapatıldı.

9. MTP 37⁰C 'de shakerda 300 rpm'de 2 saat inkübe edildi.

10. MTP'deki solüsyonların tamamı dökülerek uzaklaştırıldı, ters şekilde kurutma kağıdına kuvvetlice vurularak iyice kuruması sağlandı.

11. Her bir göze 250 µl yıkama solüsyonu 1X (solüsyon 10) ilave edildi ve en az 30 sn sonra dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez yapıldı.
12. Her bir göze 100 µl Anti-DIG- HRP çalışma solüsyonu (solüsyon 11) ilave edildi.
13. MTP gözleri kendi yapışıcı bandı ile örtüldü. Oda sıcaklığında 300 rpm'de 30 dk. shakerda inkübe edildi.
14. MTP gözlerindeki solüsyonun tamamı uzaklaştırıldı.
15. Her bir göze 250 µl yıkama solüsyonu 1X (solüsyon 10) ilave edildi ve en az 30 sn sonra dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
16. Her bir göze 100 µl TMB substrat solüsyonu (solüsyon 13) ilave edildi.
17. MTP gözleri kendi yapışıcı bandı ile örtüldü ve renk gelişimi için oda sıcaklığında 300 rpm'de 10-20 dk. shakerda inkübe edildi.
18. Substrat atılmaksızın renk gelişimini durdurmak için her bir göze 100 µl stop solüsyonu (solüsyon14) ilave edildi.
19. Stop solüsyonu ilave edilince HRP- substrat etkileşimi ile maviden sarıya doğru bir renk değişimi görüldü.
20. Bir mikrotiter plate okuyucu kullanarak, stop solüsyonunun (solüsyon 14) ilavesinden sonra 30 dk. içinde 450_{nm}'de (650_{nm} referans dalga boyunda) absorbans değeri her örnek için okundu.

3.2.2.8. Hesaplama

Örneklerin telomeraz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$RTA = \frac{(A_s - A_{s,o}) / A_{s,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,0}) / A_{TS8,IS}} \times 100$$

A_s = Örneğin Absorbansı

$A_{s,o}$ = Negatif Kontrolün Absorbansı

$A_{s,IS}$ = İnternal Standartlı Örneğin Absorbansı

A_{TS8} = Kontrol Kalıbın Absorbansı

$A_{TS8,0}$ = Lizis Solüsyonunun Absorbansı

$A_{TS8,IS}$ = İnternal Standartlı Kontrol Kalıbın Absorbansı

3.2.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar istatistiksel olarak tek yönlü varyans (Oneway ANOVA) testi uygulanarak karşılaştırıldı. Çoklu karşılaştırmalar $p < 0.05$ olarak alınıp, Tukey çoklu karşılaştırma metodu ile Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından değerlendirildi.

3.2.3. Spektrofotometrik Ölçüm ile Siyalik Asit Miktarının Belirlenmesi

1. Tripan blue yöntemi ile sayılan $2 \cdot 10^6$ hücre santrifüj tüpüne alındı.
2. İçerisinde hücreler bulunan santrifüj tüpüne 0,5 ml Tris Buffer solüsyonu eklenerek 1000rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant kısmı atılarak altta pelet kısmı bırakıldı.
4. Pelete 60 µl distile su ve 20 µl sialidaz buffer eklenerek, hücreler 5 dk 90°C 'de öldürüldü ve oda ısısında soğutuldu.

5. Üzerine 1 µl α-2(3,6,8,9)-nörominidaz eklendi. 1 gece 37°C'de su banyosunda inkübe edildi.
6. Hücreler santrifüj edilerek, süpernatant başka bir tüpe ayrıldı.
7. Süpernatant tüpünün hacmi Tris Reaksiyon buffer ile 980 µl tamamlandı.
8. 1 µl N-asetilnörominik asit aldolaz eklenerek, minimum 10dk 37°C su banyosunda inkübe edildi.
9. 20 µl β-NADH solüsyonu eklendi, birkaç kez alt üst edildikten sonra, tüm içerik pipetle küvete alındı ve blanka (distile su) karşı 340nm dalga boyunda absorbands spektrofotometrede okunarak not edildi.
10. İçerik tüpe boşaltılarak üzerine 1 µl laktik asit dehidrojenaz eklendi ve birkaç kez alt üst edildi.
11. Daha sonra 37°C'de sıcak su banyosunda 10 dk inkübe edildi.
12. 340nm dalga boyunda final absorbands okundu.
13. Okunan absorbandslar aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{nmol NANA} = \frac{(\text{A340 başlangıç} - \text{A340 sonuç}) \times 1000}{6.22}$$

3.2.3.1. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar istatistiksel olarak tek yönlü varyans (Oneway ANOVA) testi uygulanarak karşılaştırıldı. Çoklu karşılaştırmalar $p < 0.05$ olarak alınıp, Tukey çoklu karşılaştırma metodu ile Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından değerlendirildi.

3.2.4.RT-PCR ile TERT ve TR Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.2.4.1. Total RNA Eldesi

1. 6×10^6 hücre 1.8 ml'lik vialde alındı.
2. Üzerine 0.5 ml denatürasyon solüsyonu eklendi.
3. Homojenat oda ısısında 5 dk bekletildi.
4. Sonra üzerine 0.5 ml ekstraksiyon solüsyonu eklendi.
5. Kapağı kapatılıp elde 15 sn kuvvetlice karıştırıldı.
6. 10 dk oda ısısında bekletildi.
7. 4°C 'de 12000 g'de 15 dk santrifüj edildi.
8. Santrifüj işleminden sonra üstte renksiz aköz faz, altta kırmızı renkli bir başka faz ve arada beyaz renkli organik faz ayrıldı. Üstte kalan renksiz aköz faz yeni bir vialde aktarıldı.
9. Yeni vialdeki renksiz fazın üzerine 0.5 ml izopropanol (4°C 'de saklanan ve soğuk olan) eklenerek RNA çöktürüldü.
10. 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra, 4°C 'de 12000 g'de 8 dk santrifüj edildi. Mahsulü arttırmak için bu aşamadan sonra örnekler -20°C 'de 1 gece bekletildi.
11. Ertesi gün üstteki süpernatant kısmı atıldı ve dipte kalan RNA peleti %75 etanol (-20°C 'de saklanan ve soğuk olan) eklenerek tüpün kapağı kapatılıp elde çalkalandı.
12. Sonra 7500 g'de 4°C 'de 5 dk santrifüj edildi.
13. Süpernatant kısmı atıldı, vial kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilip fazla sıvı kağıda emdirildi. Bu aşamadan sonra örneklerin üzerine %75 etanol eklenerek, -20°C 'de saklandı.

3.2.4.2. Revers Transkriptase –PCR (RT-PCR) Aşaması

1. -20°C'den alınan vial içindeki örnekler 4°C'de 7500 g'de 5 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant kısmı atıldı, vial kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilip fazla sıvı kağıda emdirildi.
3. RNA peleti havada 5 dk kurutuldu.
4. Kurutulan pelet üzerine 50 µl steril distile su eklendi, pipetlendi.
5. Böylece elde edilen total RNA, cDNA eldesi için yapılacak uygulamaya hazır hale geldi.

DNA sentezi

1. 0.2 ml'lik bir PCR tüpüne aşağıdaki ürün karışımı hazırlandı:

6.3 µl Total RNA (0.1-1µg)

1 µl Anchored primer (dT)25V

2.7 µl steril su DEPC muameleli

2 µl DDT 100mM

12 (toplam hacim)

2. Üzerine RT-&GOTM MasterMix 2.5xC'den 8 µl eklendi.
3. Örnekler 1 saat 42°C inkübe edildi.
4. 70°C'de 15 dk Revers transkriptaz inaktive edildi.

5. 80 µl steril su eklendi ve böylece cDNA eldesi tamamlandı (Yeni sentezlenen cDNA direkt amplifikasyonu için kullanılır ya da -20°C'de saklanır).

6. 0.2 ml'lik bir PCR tüpüne, aşağıdaki ürün karışımı hazırlandı:

5µl cDNA (cDNA sentez reaksiyonundan)

2µl 5' primer (5pmol/µl)

2µl 3' primer (5pmol/µl)

5µl Isis-&GOTM MasterMix 5xC

11µl Steril su

25µl (toplam hacim)

Primerler;

hTERT sense

5'- CGG AAG AGT GTC TGG AGC AA-3'

hTERT antisense

5'- GGA TGA AGC GGA GTC TGG A-3'

hTR sense

5'- TCT AAC CCT AAC TGA GAA GGG CGT AG-3'

hTR antisense

5'- GTT TGC TCT AGA ATG AAC GGT GGA AG-3'

rTERT forward

5'-GGT CTT CCG CAC GTT GGT TG -3'

rTERT reverse

5'-CAG CAG GTA GAG CGC ACA GT-3'

rTERC Forward

5'-GTC TAA CCC TAT TGT TAT AGC TG-3'

rTERT reverse

5'- CAG GTG CAC TTC CCA CAT CT-3'

GAPDH sense

5'-GCA GGG GGG AGC CAA AAG GG-3'

GAPDH antisense

5'-TGC CAG CCC CAG CGT CAA AG-3'

2. Her primere uygun PCR işlemleri yapılarak, RT-PCR işlemi gerçekleştirildi.
3. Yukarıda hazırlanan PCR tüplerinin hepsi thermal cyclera yerleştirilerek, **Çizelge 3.3.**' de bildirilen programlara göre amplifikasyon ürünü (PCR ürünü) elde edildi.

Çizelge 3.3. RT-PCR amplifikasyon ürünü elde etme programı

Primer	Program özellikleri	Primer uzaması	Amplifikasyon	Denatürasyon	Annealing	Polimerizasyon	Son Uzatma	Bekletme
hTERT	Zaman (sn)	60		60	60	60	240	
	Sıcaklık (C°)	94		94	58	72	72	4
	Devir sayısı		37					
hTR	Zaman (sn)	60		45	45	90	90	
	Sıcaklık (C°)	94		94	60	72	72	4
	Devir sayısı		30					
rTERT	Zaman (sn)	180		30	30	60	240	
	Sıcaklık (C°)	94		94	60	72	72	4
	Devir sayısı		34					
rTR	Zaman (sn)	180		30	30	60	240	
	Sıcaklık (C°)	94		94	60	72	72	4
	Devir sayısı		32					
GAPDH	Zaman (sn)	180		30	30	60	240	
	Sıcaklık (C°)	94		94	60	72	72	4
	Devir sayısı		27					

4. Reaksiyon ürünlerinin analizi için **agaroz jel elektroforezi** kullanıldı.

3.2.4.3. Agoroz Jel Elektroforezi

RT-PCR sonrası oluşan ürünlerin incelenmesi için %1.6 g agaroz jeli hazırlandı ve örnekler jel elektroforezi yöntemine tabi tutuldu.

3.2.4.3.1. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

1. 1.6 g agaroz tartılıp, balon joje içerisinde 1x TBE buffer ile 80 ml'ye tamamlandı.
2. Mikrodalga fırında kaynatıldı.
3. Üzerine 4 µl ethidium bromid konup karıştırıldı.
4. Jel fökülmeden önce tarak ve jel küveti temizlendi.
5. Hazırlanan jel küvete dökülerek tarak yerleştirildi.
6. Jel donduktan sonra üzeri 1xTBE buffer ile dolduruldu.
7. 12 µl PCR ürünü alınıp, 2 µl loading buffer ile karıştırılarak, jeldeki kuyucuklara yüklendi (bir kuyusuna 14 µl marker yüklendi).
8. Yükleme işleminden sonra elektrotlar yerleştirilerek 40 voltta 2 saat yürütüldü.
9. Elektroforez işlemi bitince jel, CCD kamera altında incelenerek laboratuvarımızda görüntülendi.

3.2.5.İmmunohistokimya Protokolü ile NCAM belirlenmesi

Flask yüzeyinde kültüre edilmiş hücreler, buldukları ortamda fikse edildi. Daha sonra immunohistokimyasal boyama prosedürünün aşamaları adım adım uygulandı. NCAM için uygun primer antibody ile inkübe edildi. En son preparat kapatıldı ve inverted mikroskop altında incelenerek çift kör olarak değerlendirildi.

Yapılan işlemler sırası ile;

1. Hücreler istendiğinde üst kısmı ayrılabilen immunohistokimyasal boyama için özel üretilmiş flasklara ekildi (hücrelerin flaska ekim işlemi pasajlama aşamasında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi).

2. Flaskın tabanı hücrelerle kaplandıktan sonra, flastaki besiyerinin tamamı pipet yardımı ile çekildi.
3. Besiyeri alındıktan sonra, flaskın içine hücrelerin üzerini kaplayacak miktarda (yaklaşık 3 ml) fiksasyon solüsyonu pipetlendi ve 1dk sonra solüsyon ortamdaki pipet yardımı ile uzaklaştırıldı.
4. Özel flaskın (alt kısmı lam şeklinde olan ve üst kısmı ayrılabilen flask) üst kısmı ayrıldı ve işlemler bu aşamadan sonra üzeri hücrelerle kaplı olan lam üzerinde devam etti.
5. Hücrelerin yoğun olduğu bölümü kaplayacak kadar (1 damla) bloke edici serum damlatılarak 5-10 dk. inkübe edildi.
6. Sonra hücrelerin yoğun olduğu bölümü kaplayacak kadar (1 damla) primer antikor damlatılarak, bir gece oda ısısında inkübe edildi.
7. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lamı silkeleyerek uzaklaştırıldı.
8. Alanın üzerini kaplayacak kadar biotin işaretli sekonder antikor damlatılarak 10dk inkübe edildi.
9. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lamı silkeleyerek uzaklaştırıldı.
10. Alanın üzerini kaplayacak kadar streptavidin-peroksidaz konjugatı damlatılarak 10 dk inkübe edildi.
11. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lamı silkeleyerek uzaklaştırıldı.
12. Alanın üzerini kaplayacak kadar substrat-kromojen solüsyonu (AEC) damlatılarak 1-10 dk inkübe edildi.

13. Mikroskopta gözlemleyerek, işaret alındıktan sonra distile suda çalkalandı.
14. Alanın üzerini kaplayacak kadar hematoksilen damlatılarak 2dk, çeşme suyunda 3 dk., PBS'de yaklaşık 30 saniye bekletildi.
15. Distile suda çalkalandı.
16. Preparat havada kurutulduktan sonra, PBS:gliserin (1:1) veya GVA hazır kapama ortamı ile kapatıldı.
17. Preparatlar inverted mikroskop altında incelenerek, mikroskoba bağlı Nikon marka fotoğraf makinası ile laboratuvarımızda görüntülendi.

Boyama işlemi sırasında kullanılan solüsyonların hazırlanışı ve inkübasyon işleminin tekniği aşağıda bildirilmiştir.

Fiksasyon solüsyonu: 1:1 oranında Aseton:Metanol karışımı hazırlandı, kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Fosfat Buffer (PBS) Solüsyonu: 8.79 g NaCl, 0.274 g KH₂PO₄, 1.135 g Na₂HPO₄ tartıldıktan sonra, 1000 ml distile suda eritildi. pH 7.2-7.4 olmasına dikkat edildi.

Primer antikor: NCAM boyanması için CD56 primer antikor kullanıldı.

Substrat-kromojen solüsyonu: Kitin içinde bulunan AEC kromojenine ait A, B ve C solüsyonları kullanıldı. Bir vial içerisine birer damla A, B ve C solüsyonundan damlatılıp, üzerine 1 ml distile su konarak hazırlandı ve hemen kullanıldı.

İnkübasyon: Kapaklı bir kap içerisinde yapıldı. Kaba biraz ılık su kondu. Cam çubuklar kabın tabanına uzatıldı. Cam çubukların üzerine de preparatlar sıralandı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, insan glioma (DK-MG) ve sıçan glioma (C6) hücre dizilerinde ard arda 15 pasaj yapıldı. 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlardan her bir ölçüm parametresi için ayrı ayrı elde edilen üçer hücre ekstratında; telomeraz aktivitesi, siyalik asit düzeyi, hücre zarında NCAM'ın varlığı, telomeraz aktivitesinin sonucunu desteklemek amacı ile telomeraz enzimi kompleksinden RNA (TR) ve telomeraz revers transkriptaz (TERT) ekspresyonunu değerlendirildi. Seçilen hücre dizilerinin (DK-MG ve C6) telomeraz aktivitesi ve siyalik asit düzeylerinin birbirleri ile ilişkili olarak, belirtilen pasajlarda nasıl farklılık gösterdikleri incelendi. Bu bulgular aşağıda sırayla verilecektir.

4.1. Telomeraz Aktivitesi ve Siyalik Asit

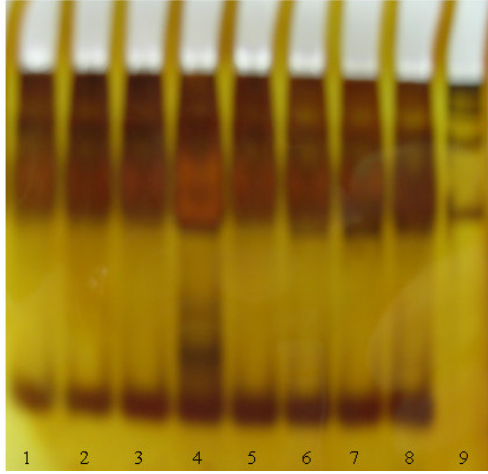
DK-MG ve C6 hücre dizilerinden elde edilen 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajların üç ayrı hücre ekstratında ölçülen, telomeraz enzim aktivitesi ve siyalik asit sonuçlarının ortalama değerleri **Çizelge 4.1**'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. DK-MG ve C6 hücre dizilerinde pasajlara göre telomeraz aktivitesi ve siyalik asit

Pasaj No	n	Telomeraz Aktivitesi		Siyalik Asit (nmol)	
		DK-MG	C6	DK-MG	C6
3	3	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,03	1,93 ± 0,27	2,50 ± 0,09
6	3	10,94 ± 2,24	4,80 ± 1,26	9,11 ± 3,90	7,40 ± 1,45
9	3	0,19 ± 0,05	0,62 ± 0,25	9,00 ± 2,41	9,33 ± 4,03
12	3	14,52 ± 3,71	0,18 ± 0,09	19,78 ± 0,16	17,40 ± 2,54
15	3	25,11 ± 6,93	21,88 ± 5,53	45,62 ± 20,39	18,81 ± 0,32

4.1.1. DK-MG ve C6 Hücre Dizilerinde Telomeraz Aktivitesi

DK-MG ve C6 hücre dizilerinden elde edilen 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlara ait üç ayrı hücre ekstraktında, telomeraz enzim aktivite ölçümü için PCR ve ELISA işlemleri yapıldı. Bu işlemde, belirtilen pasajlardan elde edilen üç ayrı örneği hazırlamak için 2×10^5 'er hücre kullanıldı. ELISA ölçümüne geçmeden önce, PCR işleminin doğruluğunu kontrol amacı ile poliakrilamid jelde gümüş nitrat boyama yapıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Telomeraz aktivitesi ölçümü öncesinde, PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü (1-3 DK-MG hücrelerinin PCR ürünleri, 4 pozitif kontrol 5-8 C6 hücrelerinin PCR ürünleri, 9 Marker).

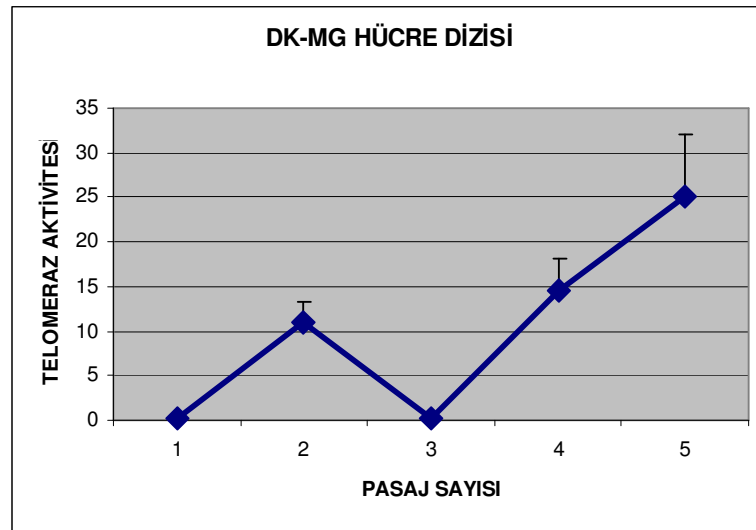
DK-MG hücre dizisinde pasajlara göre, telomeraz aktivitesinin ortalama değerleri, standart hataları ve istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 4.2'**de verildi.

Çizelge 4.2. DK-MG hücre dizisinde telomeraz aktivitesi çoklu karşılaştırma sonuçları

Pasaj No	n	Ortalama Değer ± Standart Hata	Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları				
			3	6	9	12	15
3	3	0,12 ± 0,01					
6	3	10,94 ± 2,24	*				
9	3	0,19 ± 0,05					
12	3	14,52 ± 3,71	**	*	**		
15	3	25,11 ± 6,93	***	**	***	*	

Anova Test Sonucu: $F_{(4;10)}=24,89$ $p<0.001$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

DK-MG hücre dizisinde, 3. pasaja göre 9. pasaj hariç diğer pasajlarda telomeraz aktivitesi artış gösterdi. Bu artış, 6. pasajda istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) bulundu. 3. pasaja göre 12. pasajdaki artış ise, çok farklı ($p<0.01$) ve 15. pasajdaki artış ileri düzeyde farklı ($p<0.001$) bulundu. Ayrıca, 6. pasaja göre, 12. pasajda istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) ve 15. pasajda ileri düzeyde farklı ($p<0.001$) bir artış bulundu. 9. pasaja göre, 12. pasajda istatistiksel olarak çok farklı ($p<0.01$) ve 15. pasajda ileri düzeyde farklı ($p<0.001$) bir artış gözlemlendi (Çizelge 4.2., Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. DK-MG hücre dizisinde telomeraz aktivitesinin pasajlara göre değişimi

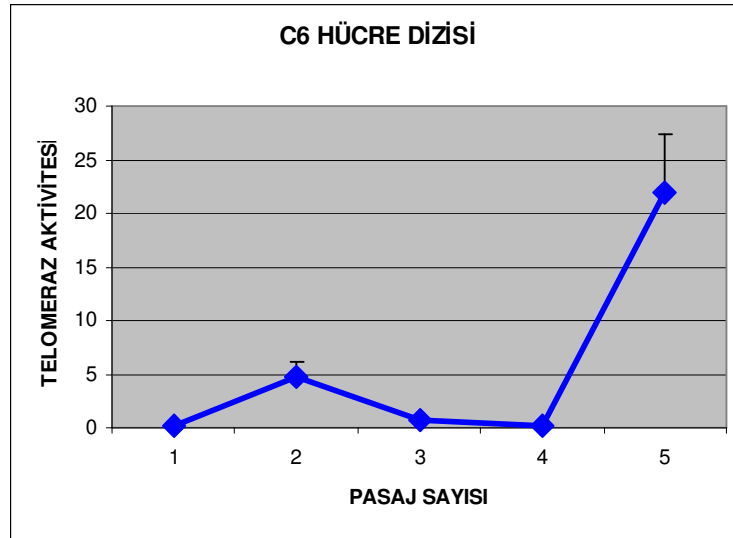
C6 hücre dizisinde pasajlara göre, telomeraz aktivitesinin ortalama değerleri, standart hataları ve istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 4.3**'de verildi.

Çizelge 4.3. C6 hücre dizisinde telomeraz aktivitesi çoklu karşılaştırma sonuçları

Pasaj No	n	Ortalama Değer ± Standart Hata	Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları				
			3	6	9	12	15
3	3	0,14 ± 0,03					
6	3	4,80 ± 1,26					
9	3	0,62 ± 0,25					
12	3	0,18 ± 0,09					
15	3	21,88 ± 5,53	***	***	***	***	

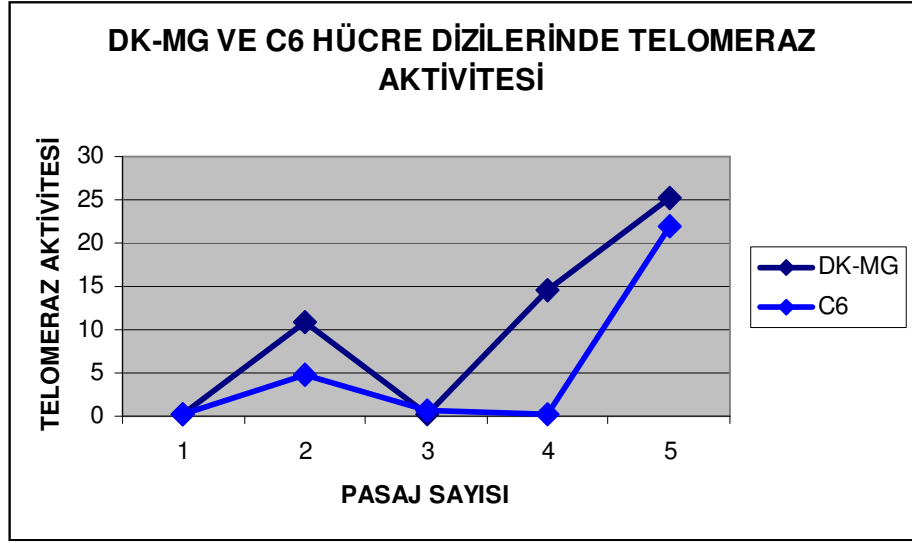
Anova Test Sonucu: $F_{(4;10)}=40,64$ $p<0.001$ *** $p<0.001$)

C6 hücre dizisi telomeraz aktivitesinde, 3. pasaja göre sadece 6. ve 15. pasajlarda görülen artış, 15. pasajda istatistiksel olarak ileri düzeyde farklı ($p<0.001$) bulundu. Ayrıca 15. pasajda tüm pasajlara göre istatistiksel olarak ileri düzeyde farklı ($p<0.001$) bir artış gözlemlendi (**Çizelge 4.3.**, **Şekil 4.3.**).



Şekil 4.3. C6 hücre dizilerinde telomeraz aktivitesinin pasajlara göre değişimi

DK-MG ve C6 hücre dizilerinin telomeraz aktivitelerini birlikte incelediğimizde, 3. pasaja göre, DK-MG hücre dizisinde 9., C6 hücre dizisinde 9. ve 12. pasajlar hariç, diğer pasajlarda artış ve her iki hücre dizisi arasında paralellik olduğu görülmektedir (Şekil 4.4., Tablo 4.1.).



Şekil 4.4. DK-MG ve C6 hücre dizilerinde telomeraz aktivitesinin pasajlara göre değişimi

4.1.2. DK-MG ve C6 Hücre Dizilerinde Siyalik Asit

DK-MG ve C6 hücre dizilerinde siyalik asit miktarlarının ölçümü, telomeraz aktivitesi ölçümlerinin yapıldığı aynı pasajlara ait hücre ekstraktlarında, Sigma Aldrich'in Sialic Acid Quantification Kiti kullanılarak belirlenmiştir. DK-MG ve C6 hücre dizilerinden elde edilen 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajların her biri için, içerisinde 2×10^6 'şar hücre bulunan üç ayrı hücre ekstraktı kullanıldı. Bu hücrelerdeki siyalik asit miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi.

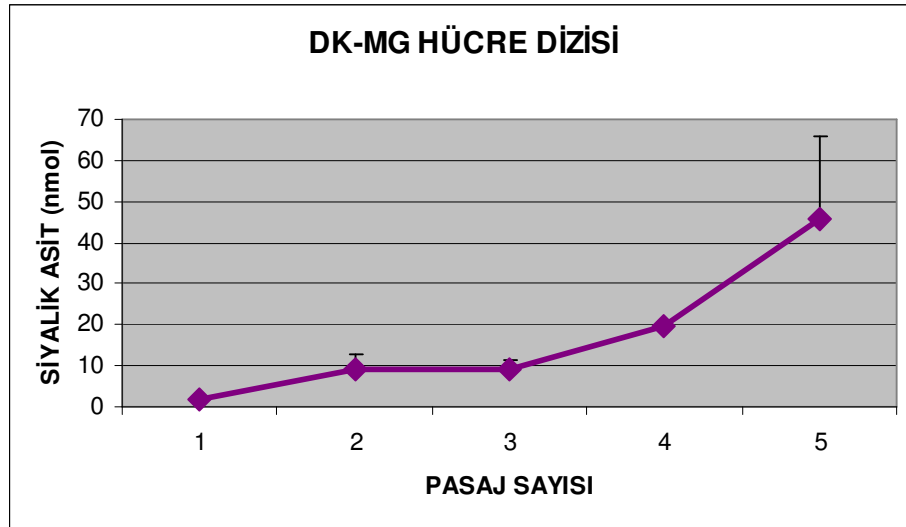
DK-MG hücre dizisinde pasajlara göre, sıyalik asit miktarlarının ortalama değerleri, standart hataları ve istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 4.4'**de verildi.

Çizelge 4.4. DK-MG hücre dizisinde sıyalik asit çoklu karşılaştırma sonuçları

Pasaj No	n	Ortalama Değer ± Standart Hata	Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları				
			3	6	9	12	15
3	3	1,93 ± 0,27					
6	3	9,11 ± 3,90					
9	3	9,00 ± 2,41					
12	3	19,78 ± 0,16					
15	3	45,62 ± 20,39	**	**	**	*	

Anova Test Sonucu: $F_{(4;10)}=10,13$ $p<0.001$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

DK-MG hücre dizisinin sıyalik asit miktarında 3. pasaja göre diğer pasajlarda artış görülmekle birlikte bu artış 15. pasajda istatistiksel olarak çok farklı ($p<0.01$) bulundu. Ayrıca 15. pasajda 6. ve 9. pasajlara göre istatistiksel olarak çok farklı ($p<0.01$), 12. pasaja göre ise farklı ($p<0.05$) bir artış gözlemlendi (**Çizelge 4.4.**, **Şekil 4.5.**).



Şekil 4.5. DK-MG hücre dizisinde sıyalik asit düzeylerinin pasajlara göre değişimi

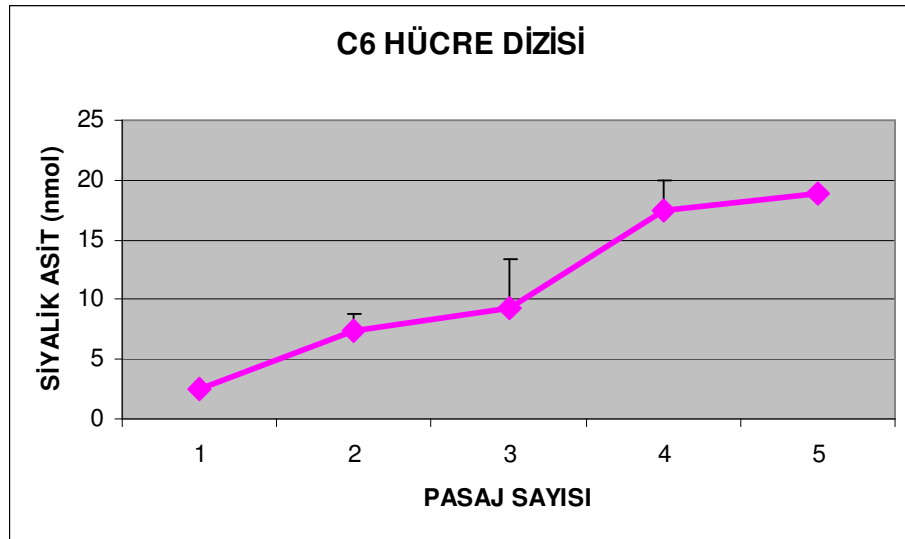
C6 hücre dizisinde pasajlara göre, sıyalik asit miktarlarının ortalama değerleri, standart hataları ve istatistiksel değerlendirmeleri **Çizelge 4.5**'de verildi.

Çizelge 4.5. C6 hücre dizisinde sıyalik asit çoklu karşılaştırma sonuçları

Pasaj No	n	Ortalama Değer ± Standart Hata	Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi Sonuçları				
			3	6	9	12	15
3	3	2,50 ± 0,09					
6	3	7,40 ± 1,45					
9	3	9,33 ± 4,03	*				
12	3	17,40 ± 2,54	***	**	*		
15	3	18,81 ± 0,32	***	**	**		

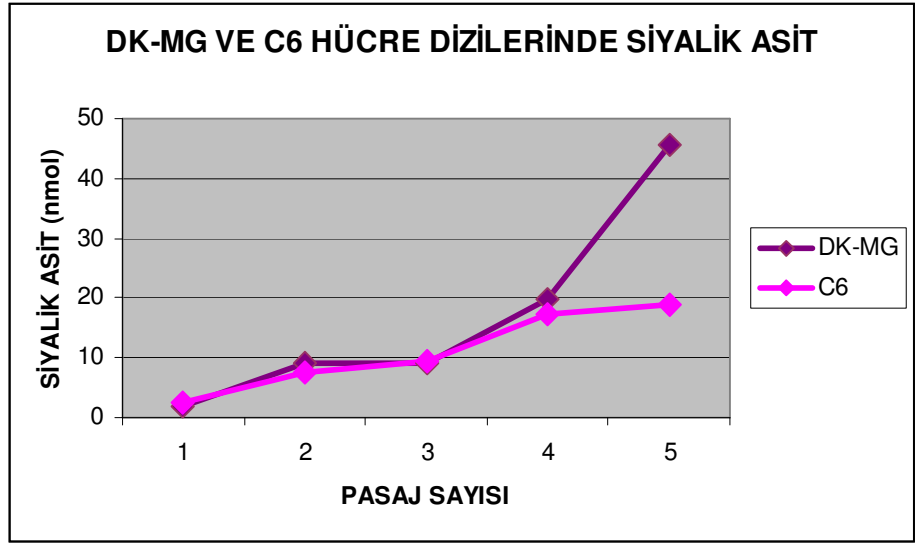
Anova Test Sonucu: $F_{(4;10)}=27,33$ $p<0.001$ (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

C6 hücre dizisinde 3. pasaja göre, 9. pasajda istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$), 12. ve 15. pasajlarda ileri düzeyde farklı ($p<0.001$) bir artış bulundu. Ayrıca 12. ve 15. pasajlarda 6. pasaja göre istatistiksel olarak çok farklı ($p<0.01$) artış gözlemlendi. 9. pasaja göre 12. pasajda farklı ($p<0.05$) ve 15. pasajda çok farklı ($p<0.01$) artış bulundu (**Çizelge 4.5.**, **Şekil 4.6.**).



Şekil 4.6. C6 hücre dizisinde sıyalik asit düzeylerinin pasajlara göre değişimi

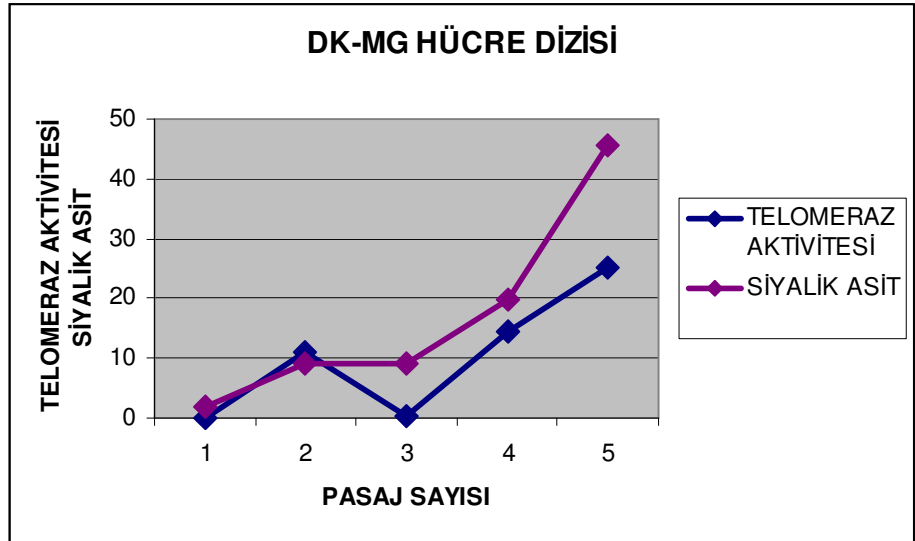
DK-MG ve C6 hücre dizilerinde telomeraz aktivitesini birlikte şekilde incelediğimizde 3. pasaja göre sonraki pasajlarda artış ve her iki dizide paralellik olduğu görülmektedir (Şekil 4.7., Tablo 4.1.).



Şekil 4.7. DK-MG ve C6 hücre dizilerinde siyalik asit düzeylerinin pasajlara göre değişimi

DK-MG ve C6 hücre dizilerindeki telomeraz aktivitesi ve sıyalik asit miktarlarını birlikte bir şekilde incelersek;

DK-MG hücre dizisinde; telomeraz aktivitesi ve sıyalik asidin son pasajlarda (12 ve 15) giderek arttığı görülmektedir. İstatistiksel olarak, telomeraz aktivitesi ve sıyalik asit artışı özellikle 15. pasajda belirginleşmiştir. Bu iki parametrenin sonuçları birbirleri ile paralellik göstermektedir (**Şekil 4.8., Tablo 4.1.**).

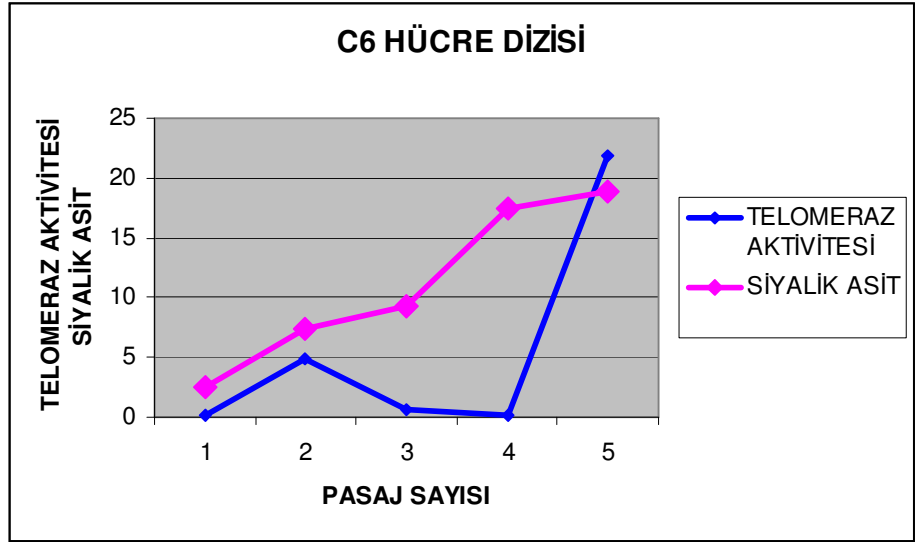


Şekil 4.8. DK-MG hücre dizisinde telomeraz aktivitesi ve sıyalik asit düzeylerinin pasajlara göre değişimi

DK-MG hücre dizisinde telomeraz aktivitesi ve sıyalik asit miktarını birlikte yorumlayacak olursak;

- telomeraz aktivitesinde pasajdan pasaja bir artış gözlenmekle birlikte, bu artış düzensiz olarak değerlendirilebilir, zira 6. pasajda ani bir artış olup, 9. pasajda düşüş ve daha sonra 15. pasaja kadar tekrar sürekli bir artış,
- sıyalik asitte ise, pasajdan pasaja düzenli olarak sürekli bir artış gözlenmektedir.

C6 hücre dizisinde; telomeraz aktivitesi ve siyalik asidin son pasajlarda arttığı görülmekle birlikte, bu durum 9. ve 12. pasajda farklılık göstermiş olup, siyalik asit artmaya devam ederken, telomeraz aktivitesi düşmektedir. Ancak genel olarak bakıldığında, aralarında paralellik olduğu söylenebilir (**Şekil 4.9., Tablo 4.1.**).



Şekil 4.9. C6 hücre dizisinde telomeraz aktivitesi ve siyalik asit düzeylerinin pasajlara göre değişimi

C6 hücre dizisinde telomeraz aktivitesi ve siyalik asit miktarını birlikte yorumlayacak olursak;

- telomeraz aktivitesinde pasajdan pasaja bir artış gözlenmekle birlikte, bu artış DK-MG hücre dizisinde olduğu gibi, düzensiz olarak değerlendirilebilir, zira 6. pasajda ani bir artış olup, 9. ve 12. pasajlarda düşüş ve 15. pasaja kadar tekrar düzenli bir artış,
- siyalik asitte ise, pasajdan pasaja düzenli olarak sürekli bir artış gözlenmektedir.

4.2. Telomeraz Revers Transkriptaz (TERT) ve Telomeraz Enzimi (TR) Ekspresyonları

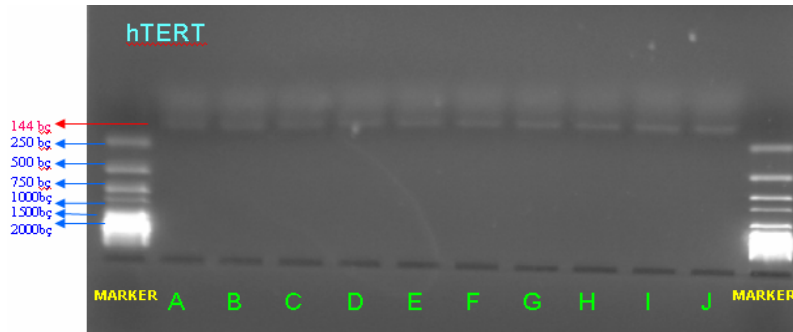
hTERT ve hTR ekspresyonlarının gözlemlenmesi için gerekli ilk aşama olan hücrelerden total RNA eldesi aşaması gerçekleştirildi. Çalışmamızda total RNA eldesi için DK-MG ve C6 hücre dizilerinin 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlarından her biri için 6×10^6 'şar hücre içeren üçer hücre ekstraktı hazırlandı.

Elde edilen RNA'lara iki aşamalı RT-PCR (reverse-transcriptase polimerase chain reaction) işlemi uygulandı. Reaksiyon ürünlerinin analizi için agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Total RNA eldesini doğrulamak amacı ile, DK-MG ve C6 hücre ekstraktlarında GAPDH primerleri kullanılarak RT-PCR işlemi yapıldı.

4.2.1. DK-MG Hücre Dizilerinde TERT (hTERT), TR (hTR) ve Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ekspresyonları

4.2.1.1. DK-MG Hücre Dizilerinde Telomeraz Revers Transkriptaz (hTERT) Ekspresyonu

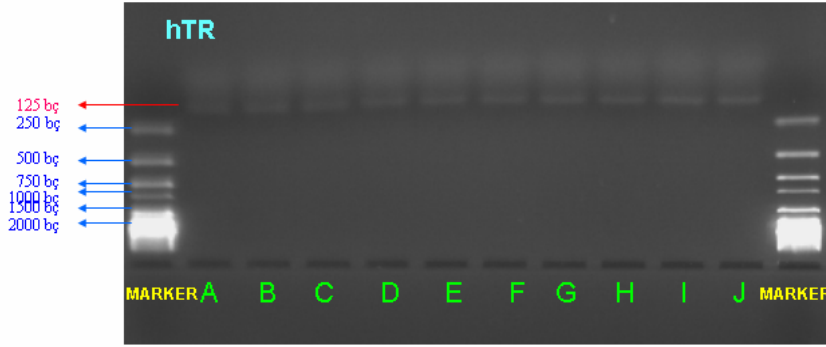
Çalışmamızda hTERT ekspresyonu 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlardan ayrı ayrı alınan üçerli örneklerin tümünde pozitif olarak bulundu. Bu ekspresyona ait bantlar **Şekil 4.10.**'da gösterilmiştir. hTERT ekspresyonuna ait bantların görüntülenebilmesi için RT-PCR işleminde amplifiye edilen bölge 144 baz çiftinden (bc) oluşmaktadır.



Şekil 4.10. DK-MG hücre dizilerinde hTERT mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri (A-J), başta ve sonda marker.

4.2.1.2. DK-MG Hücre Dizilerinde Telomeraz RNA (hTR) Ekspresyonu

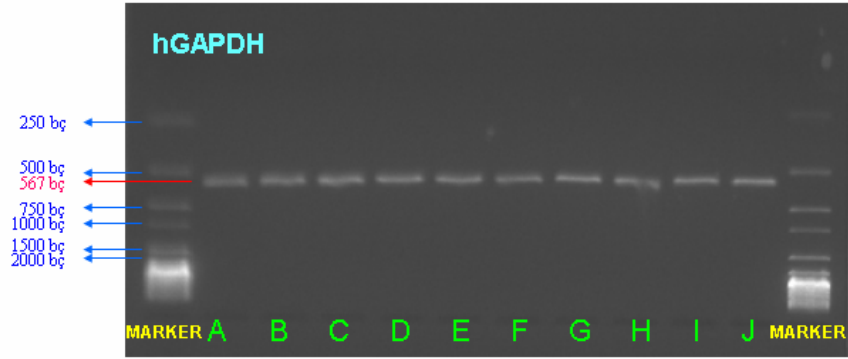
Çalışmamızda hTR ekspresyonu 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlardan ayrı ayrı alınan üçerli örneklerin tümünde pozitif olarak bulundu. Bu ekspresyona ait bantlar **Şekil 4.11.**'de gösterilmiştir. hTR ekspresyonuna ait bantların görüntülenebilmesi için RT-PCR işleminde amplifiye edilen bölge 125 baz çiftinden (bç) oluşmaktadır.



Şekil 4.11. DK-MG hücre dizilerinde hTR mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri (A-J), başta ve sonda marker.

4.2.1.3. DK-MG Hücre Dizilerinde Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) Ekspresyonu

GAPDH, RNA eldesi aşamasının doğruluğunu göstermektedir. Hücrelerde GAPDH ekspresyonu pozitif olarak görüldükten sonra hTERT ve hTR'nin ekspresyonuna geçilmiştir. Eğer GAPDH pozitif çıkmıyorsa, RNA'nın doğru elde edilemediğini ve ortamda RNA olmadığını gösterir. Çalışmamızda her bir örneğe ait RNA eldesi işleminin doğruluğunu kontrol etmek amacı ile tüm DK-MG örneklerinde GAPDH için RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. GAPDH ekspresyonu 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlardan ayrı ayrı alınan üçerli örneklerin tümünde pozitif olarak bulundu. Bu ekspresyona ait bantlar **Şekil 4.12.**'de gösterilmiştir. GAPDH ekspresyonuna ait bantların görüntülenebilmesi için RT-PCR işleminde amplifiye edilen bölge 567 baz çiftinden (bç) oluşmaktadır.

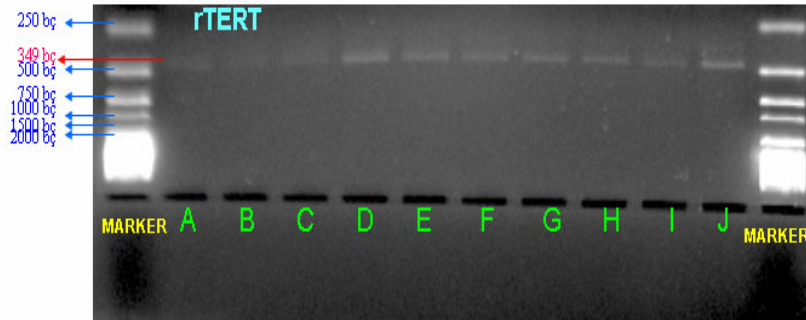


Şekil 4.12. DK-MG hücre dizilerinde GAPDH mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri (A-J), başta ve sonda marker.

4.2.2. C6 Hücre Dizilerinde TERT (rTERT), TR (rTR) ve Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ekspresyonları

4.2.2.1. C6 Hücre Dizilerinde Telomeraz Revers Transkriptaz (rTERT) Ekspresyonu

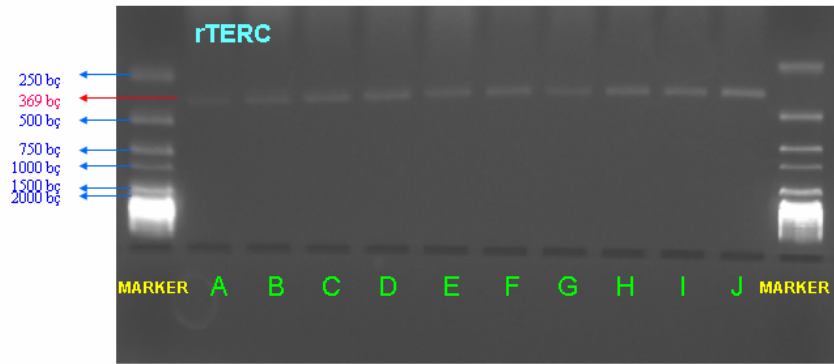
Çalışmamızda rTERT ekspresyonu 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlardan ayrı ayrı alınan üçerli örneklerin tümünde pozitif olarak bulundu. Bu ekspresyona ait bantlar **Şekil 4.13.**'de gösterilmiştir. rTERT ekspresyonuna ait bantların görüntülenebilmesi için RT-PCR işleminde amplifiye edilen bölge 349 baz çiftinden (bp) oluşmaktadır.



Şekil 4.13. C6 hücre dizilerinde rTERT mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri (A-J), başta ve sonda marker.

4.2.2.2. C6 Hücre Dizilerinde Telomeraz RNA (rTR, rTERC) Ekspresyonu

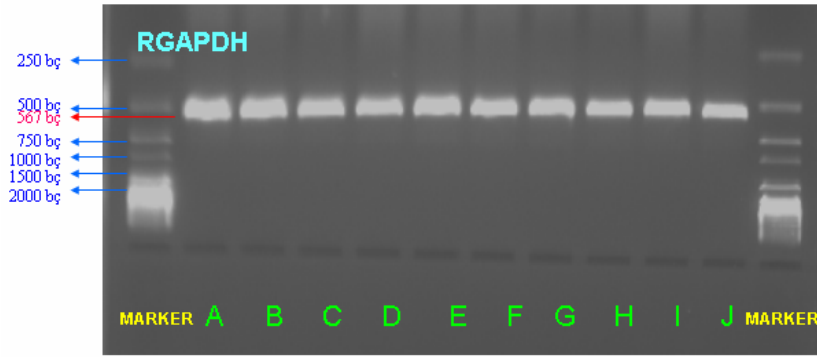
Çalışmamızda rTR ekspresyonu 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlardan ayrı ayrı alınan üçerli örneklerin tümünde pozitif olarak bulundu. Bu ekspresyona ait bantlar **Şekil 4.14.**'de gösterilmiştir. rTR ekspresyonuna ait bantların görüntülenebilmesi için RT-PCR işleminde amplifiye edilen bölge 369 baz çiftinden (bç) oluşmaktadır.



Şekil 4.14. C6 hücre dizilerinde rTR mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri (A-J), başta ve sonda marker.

4.2.2.3. C6 Hücre Dizilerinde Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) Ekspresyonu

Çalışmamızda her bir örneğe ait RNA eldesi işleminin doğruluğunu kontrol etmek amacı ile tüm C6 örneklerinde GAPDH için RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. GAPDH ekspresyonu 3., 6., 9., 12. ve 15. pasajlardan ayrı ayrı alınan üçerli örneklerin tümünde pozitif olarak bulundu. Bu ekspresyona ait bantlar **Şekil 4.15.**'de gösterilmiştir. GAPDH ekspresyonuna ait bantların görüntülenebilmesi için RT-PCR işleminde amplifiye edilen bölge 567 baz çiftinden (bç) oluşmaktadır.

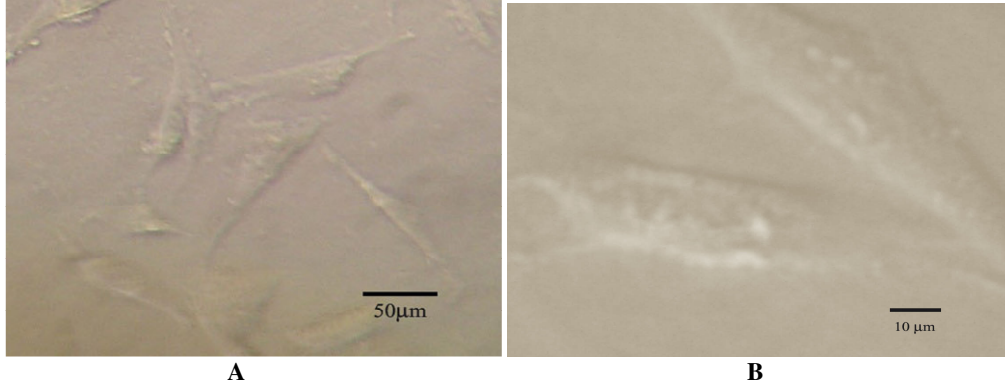


Şekil 4.15. C6 hücre dizilerinde GAPDH mRNA'sının RT-PCR amplifikasyon ürünleri (A-J), başta ve sonda marker.

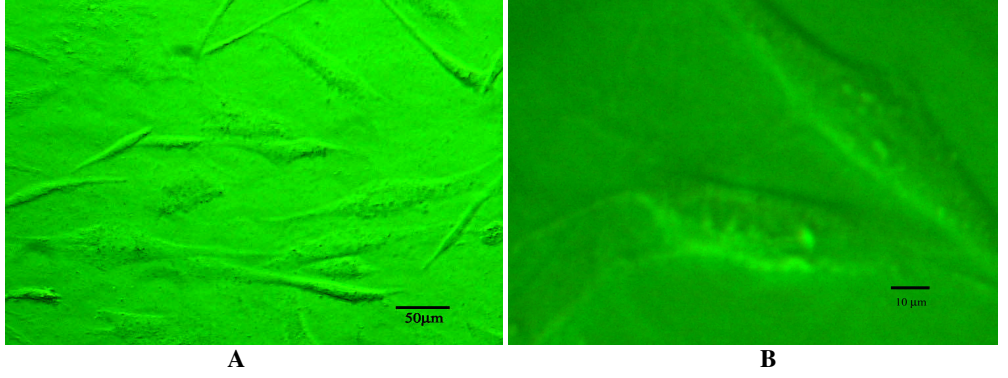
4.3. DK-MG ve C6 Hücre Dizilerinde Nöronal Hücre Adezyon Molekülü (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM) Boyaması

Çalışmamızda siyalik asidin bağlandığı NCAM molekülünü immunohistokimyasal olarak boyayarak göstermek istedik.

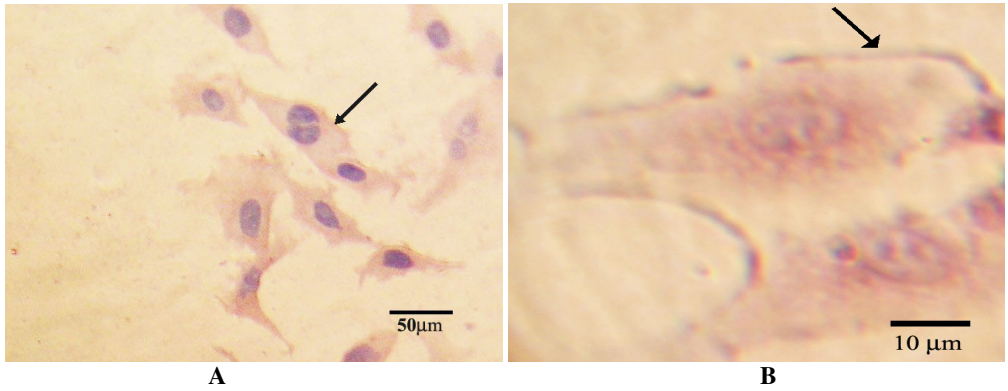
Her iki hücre dizisinin immunohistokimyasal boyama işlemi yapılmadan önceki görüntüleri alındı (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.19, Şekil 4.20) ve hücrelerde NCAM gözlenmesi için immunohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. Yapılan çift kör çalışma sonucu her iki hücre dizisine ait tüm pasajlarda hücre zarlarındaki NCAM birbirine benzer şekilde boyandı ve pasajlar arasında herhangi bir farklılık görülmedi (Şekil 4.18, Şekil 4.21).



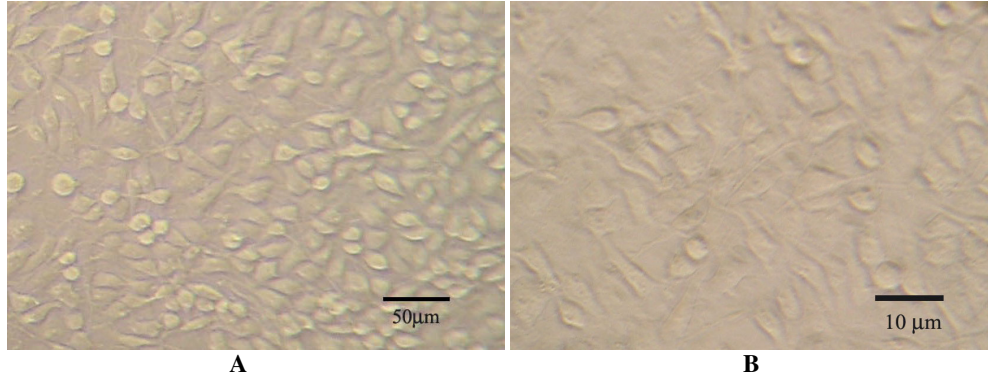
Şekil 4.16. DK-MG hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtresiz A,B)



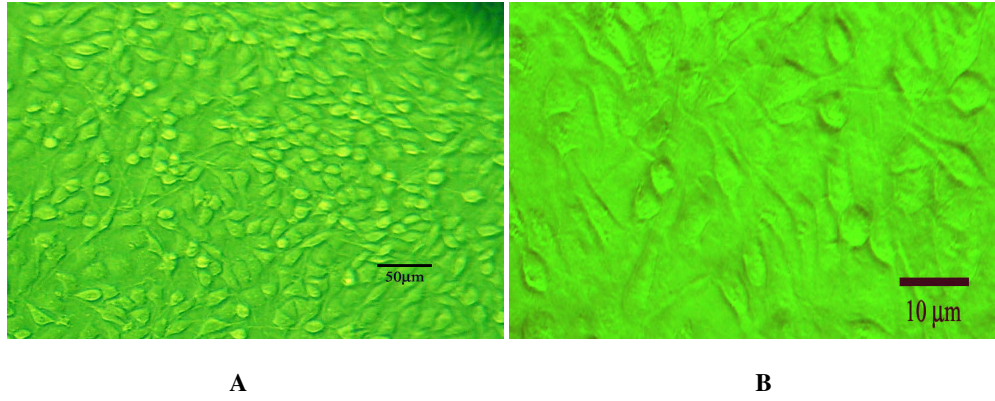
Şekil 4.17. DK-MG hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtreli A,B)



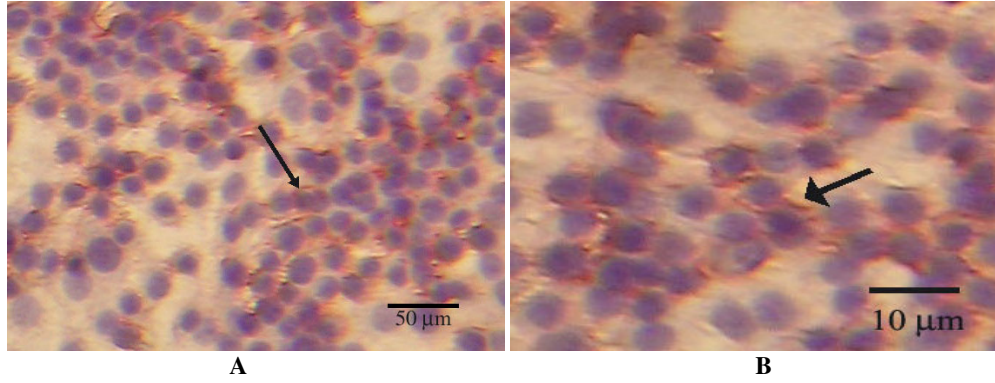
Şekil 4.18. DK-MG hücre zarında NCAM'ın immunohistokimyasal olarak belirlenen görüntüsü (A,B).



Şekil 4.19. C6 hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtresiz A,B)



Şekil 4.20. C6 hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (Filtreli A,B)



Şekil 4.21. C6 hücre zarında NCAM'ın immunohistokimyasal olarak belirlenen görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, glioma hücre dizilerinde telomeraz aktivitesi, ilerleyen pasajlarda artış gösterdi, buna paralel olarak TERT ve TR'de pozitif bulundu. Siyalik asit, telomeraz aktivitesinde olduğu gibi ilerleyen pasajlarda artış gösterdi.

5.1. Telomeraz Aktivitesi

Germ hücreleri (sperm) ve tamir gören doku, saç folikülü, barsak kripta hücresi, hemapoyetik hücre, kanser hücresi gibi soma hücreleri hariç diğer hücrelerde telomeraz aktivitesi negatiftir (2,4,14,54,74,77,84,92,103,104,105,110,135,141). Özellikle kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinin pozitif olduğunu gösteren birçok yayın mevcuttur (4,16,25,49,64,74,92,93,95,97,101,105,118,121,122,136). Kanserde malignansi derecesi ve agresifliğin artması ile telomeraz aktivitesi de artmaktadır. Nitekim bir araştırmacı, 13 malign pankreas tümör örneğinin 11 (%85)'inde telomeraz aktivitesini pozitif bulurken, 15 benign pankreas tümör örneğinin hepsinde, telomeraz aktivitesinin negatif olduğunu göstermiştir. Bunun sonucu olarak, pankreas tümörlerinde telomeraz aktivitesinin malignansiyi belirlemede, önemli bir parametre olabileceğini ileri sürmüştür (56). Malign olup olmadığına karar verilemeyen göğüs kanserli 62 hastadan, ince iğne aspirasyon yöntemi ile alınan sıvıda telomeraz aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, 62 örneğin 50'sinde telomeraz aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Bu sonuca göre yine göğüs kanserlerinin malignansisini belirlemede %81 doğrulukla, telomeraz aktivitesinin kullanılabilceği düşüncesi ortaya konmuştur (53). Yapılan bir başka çalışmada, telomeraz aktivitesi 12 servikal kanserin 10'unda, 13 endometriyal kanserin 12'sinde, 21 ovarian kanserin 18'inde, 2 tubal kanserin 2'sinde, 1 vulvar kanserin 1'inde pozitif olarak belirlenmiştir. Bu bulgularda jinekolojik malign tümörlerin %88'de pozitif olan telomeraz aktivitesinin, bu tümörlerin malignansisinin belirlenmesinde kullanılabilceğini ortaya koymaktadır (69). Ovaryum tümörlerinde telomeraz aktivitesinin incelendiği bir başka çalışmada, 25 malign ovaryum tümörünün 23 (%92)'ünde, 6 borderline malign tümörün 1 (%16.7)'inde ve 10 benign tümörün 2 (%20)'sinde tesbit edilen telomeraz aktivitesinin malignleşen tümörlerde telomeraz aktivitesinin, diğerlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir

(93). Yumuşak doku tümörlü 41 örnekte yapılan bir çalışmada, telomeraz pozitif hücrelerin sadece malign değil, aynı zamanda da agresif oldukları gösterilmiş ve bölgesel olarak tekrarlayan bu tümörlerde, telomeraz aktivitesi artışı ile metastaz arasında ilişki olduğu görülmüştür (128). Malign glioblastomalardan anaplastik astrositoma (Grade III)'da %45, glioblastome multiforme (Grade IV)'de %89 oranında telomeraz aktivitesi belirlenmiş olup, telomeraz aktivitesindeki artışın bu tümörlerin malignansi derecesini gösterdiği bildirilmiştir (65).

Dokularda yapılan çok sayıda çalışmaya karşılık hücre dizilerinde telomeraz aktivitesi daha az çalışılmıştır. Bir çalışmada, kanserli LN-18, U138MG, U87MG, LN-428, D247MG, T98G, LN-319, LN-229, A172, U251MG, U373MG, LN-308 glioma hücre dizileri ve normal astrosit TEN hücre dizisinde telomeraz aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmada telomeraz aktivitesi seçilen 12 glioma hücre dizisinde pozitif, normal hücre dizisinde ise, telomeraz olarak belirlenmiştir (130). Ölümsüz embriyonik özofageal epitelium hücre dizisi SHEE hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada, ortama herhangi bir madde verilmeden, ard arda yapılan pasajlar incelenmiş ve 31. pasajda hücrelerin farklılaşarak kanserleşmeye başladığı, 61. pasajda premalignant hücrelere dönüştüğü ve 85. pasajda güçlü invaziv potansiyel ve tam anlamı ile malign transformasyon gösterdikleri bulunmuştur. Bu çalışma ile pasajdan pasaja hücrelerde meydana gelen transformasyonun hücreleri malignansiye götürdüğü gösterilmiştir (123). Bu araştırmalara paralel olarak bizde malign kanser hücre dizisi olan glioblastoma hücre dizilerinin, ilerleyen pasajlarda tesbit ettiğimiz telomeraz aktivitesi ve siyalik asit artışına bakarak, malignansi derecesinin arttığını söyleyebiliriz. Ancak bu artış, her iki tümör hücre dizisinin ara pasajlarının bazılarında düşüş gösterdi. Bu sonucumuza uyumlu olarak, kültüre edilen LE/2, LE/6 ve WB-F344 sıçan hepatik stem benzeri epitelial hücre dizilerinden, WB-F344 hücre dizileri, kimyasallarla kanserleştirilerek 140 pasaj boyunca rastgele seçilen 8 pasajda telomeraz aktivitesi ölçülmüştür. Bu ölçümlerde telomeraz aktivitesinin sürekli artmayarak aralarda düşüşler gösterdiği tesbit edilmiştir. Telomeraz aktivitesinde dalgalanma olan pasajların tümünde TERT ve TR pozitif bulunmuştur. Telomeraz aktivitesinde kaydedilen düşüşlerin sebebi olarak, kültürdeki hücrelerde meydana gelen transformasyonlar gösterilmiştir (98).

Çalışmamızda ve farklı hücre dizilerinde yapılan diğer çalışmalarda görüldüğü gibi telomeraz aktivitesi gittikçe artmakla birlikte dalgalanmalar göstermektedir. Telomeraz aktivitesinde görülen bu dalgalanmalar glioblastoma tedavisinde kullanılması planlanan ilaç ya da bitki ekstresi etkinliğinin araştırılmasında, araştırmacıyı yanıltabilir. O nedenle bu araştırmalarda telomeraz aktivitesinin yanında başka parametrelere de bakılması daha aydınlatıcı olabilir.

5.2. Siyalik Asit (NANA)

Embriyonik gelişim sırasında, yeni doku ve organların oluşması, yetişkinlerde ise, hafızada görevli hücrelerde, yenilenen beyin hücrelerinde ve tüm kanserli hücrelerde siyalik asit miktarları yüksekken, diğer hücrelerde normal düzeydedir (4,11,21,29,39,114,129,131,139).

Gastrointestinal sistem kanserli olan 50 ve kontrol olarak kullanılan 20 sağlıklı insan serum siyalik asit düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, kanserli hastalarda siyalik asidin kontrollere göre anlamlı bir artış gösterdiği tesbit edilmiştir (10). Malign 21 ve benign 19 akciğer kanserli hastanın serum ve bronşioalveolar lavage (BAL) sıvısında siyalik asit düzeylerinin ölçüldüğü bir diğer çalışmada, serum ve BAL örneklerindeki siyalik asit düzeylerinin kontrole göre yüksek olduğu bulunmuştur (57).

Primer tümörlü 37, nüks larinks kanserli 8 hastanın kan örneğinde siyalik asit seviyelerine bakılmış, sonuçta her iki kanser tipinde de siyalik asidin arttığı ve bu artışın nüks vakalarında daha belirgin olduğu tesbit edilmiştir. Yine aynı çalışmada siyalik asit değerlerinin ameliyat öncesi yüksekken, ameliyattan 1 ay sonra düşmeye başladığı ve 3 ay sonra da kontrol değerlere yaklaştığı gözlenmiştir (100). Bir başka araştırmacı, 76'sı yeni kanser teşhisi konmuş, 113'ü nüks etmiş ve 63 sağlıklı olan kişilerden oluşturulan çalışmasında, sağlıklı grup hariç, diğer iki grupta serum siyalik asit seviyesinin arttığını bulmuştur (35).

50 kontrol ve 43 baş-boyun kanserli hasta ile yapılan bir çalışmada, kanserli hastalarda siyalik asit seviyelerinin kontrole göre arttığı, ayrıca malignlerde bu artışın daha fazla olduğu ve histolojik görünümün de bunu desteklediği tesbit edilmiştir (7).

Metastazı olan 35 ve metastazı olmayan 25 kolorektal kanserli hasta ile 20 kontrolün serum siyalik asit düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmada, metastazı olan grubun siyalik asit düzeyinin, metastazı olmayan gruba ve kontrol grubuna göre, daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir (129).

Yapılan literatür araştırmasında, çalışma materyalimiz olan C6 glioma hücre dizisinde siyalik asit ölçümü yapılan herhangi bir çalışma tesbit edilemedi. Siyalik asit ölçümü yerine, siyalik asit belirleyicisi olarak sialiltransferaz enzim aktivitesine bakılan bir çalışmada neuro-2A mouse neuroblastoma hücreleri, C6 rat glioma hücreleri ve H411e rat hepatoma hücre dizileri kullanılmıştır. Bunların hepsinde, siyalik asit düzeyinin yüksek olduğu belirlenmiştir (24). Bütün bu çalışmalardan anlaşılmaktadır ki, kanser türlerinin hepsinde, siyalik asit miktarında artış vardır.

Yaptığımız literatür taramaları bugüne kadar, glioma hücre kültüründe, siyalik asit miktarının pasajdan pasaja nasıl değiştiğini gösteren bir çalışmanın da olmadığını ortaya koymuştur. Yaptığımız bu çalışmada glial tümör hücre dizilerinin ilerleyen pasajlarında, siyalik asit miktarının giderek arttığı tesbit edilmiş ve bu artışın telomeraz aktivitesine göre daha düzenli olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlara göre kanser tedavisinde, telomerazın aktivitesi yanında, siyalik asit miktarının da tesbiti kullanılan ilaç veya bitki ekstralarının ne derece etkili olduğu konusunda yardımcı olabilir kanısındayız.

5.3. TERT ve TR ekspresyonları:

Çalışmamızda telomeraz aktivitesini desteklemek için kullandığımız TERT ve TR ekspresyonları, çeşitli tümör dokularında ve hücre dizilerinde incelenmiştir. Yapılan bu çalışmaları incelersek;

6 farklı malign glioma hücre dizisi kullanılan bir çalışmada, insan malign glioma (U87-MG, A172, T98G, U373-MG, U251MG, GB-1) ve normal fibroblastlarda (MRC5) hTERT ekspresyonu araştırılmıştır. MRC5'te hTERT ekspresyonu görülmezken, tüm malign glioma dizilerinde görülmüştür (65). Nöroblastomalı 40 hastadan alınan doku ile yapılan bir çalışmada, yüksek telomeraz aktivitesine paralel

hTERT ekspresyonu gözlenmiştir (%100). Bu araştırmada mRNA izolasyonunun doğruluğunu test etmek için, GAPDH ekspresyonu kullanılmıştır (52). Bir başka çalışmada, değişik tiplerdeki gliomalarda telomerazın rolü incelenmiştir. Çalışmada kanserli LN-18, U138MG, U87MG, LN-428, D247MG, T98G, LN-319, LN-229, A172, U251MG, U373MG, LN-308 dizileri ve normal TEN astrosit dizisi kullanılmıştır. Telomeraz aktivitesi seçilen 12 glioma hücre dizisinde görülürken, normal olan dizide değişim görülmemiş ve bu dizilerde hTERT ekspresyonu pozitif olarak bulunmuştur (130). İnsan glioblastoma hücre dizilerinde tesbit ettiğimiz hTERT sonuçları bu çalışmaların sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Beyin tümörlerinde yapılan bir başka çalışmada, 1 pilositik astrositoma (I), 7 oligo-astrositoma (II), 1 anaplastik astrositoma (III) ve 11 glioblastoma (IV)'da ve normal plasentada telomeraz enzimi pozitif bulunurken, kalp yetmezliğinden ölen bir kişinin beyin dokusunda telomeraz negatif bulunmuştur. Aynı araştırmada, telomer boyu ve hTR ekspresyonlarına da bakılarak telomerazın varlığı desteklenmiştir (91). Bizde alışmamızda insan glioblastoma hücre dizilerinde hTR'yi pozitif olarak tesbit ettik.

Çocukluk ağı lösemilerinde (8 akut lösemili hastada), telomeraz aktivitesinin yüksek bulunduğu bir çalışmada, tedavi döneminden sonra telomeraz aktivitesinin kontrollere yaklaştığı gözlenmiştir. RT-PCR yöntemi ile bakılan hTERT ve hTR ekspresyonu tedavi öncesi tüm örneklerde görülmüş, bu ekspresyonlar tedaviden sonra kaybolmuştur (82). Non-Hodgkin's lenfomalı (HG-NHL) 31 hastada hTERT, hTR (hTERC) ve telomeraz aktivitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, non Hodgkin's lenfomalarda hTERT ve hTR ekspresyonları pozitif bulmuştur (80). Bu sonuçlar çalıştığımız insan glioblastoma hücre dizilerindeki hTERT ve hTR sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Holzmann (2003) araştırmasında, sıçan kalp, testis, karaciğer, dalak, beyin böbrek, iskelet kası ve akciğer kanser hücre dizilerinde ilk defa belirlediğini söylediği, rTERT, rTR (rTERC) ve GAPDH ekspresyonlarının pozitif olduğunu bildirmektedir

(55). Biz de çalışmamızda sıçan C6 glioma hücre dizilerinde, bu çalışmada olduğu gibi rTERT, rTR ve GAPDH ekspresyonlarını pozitif olarak belirledik.

5.4. Nöronal Hücre Adezyon Molekülü (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM)

Birçok siyalik asidin bir araya gelmesi ile oluşan polisialik asit (PSA)'ler, omurgalıların beyin hücre zarına lokalize olan NCAM'lara bağlanır (1,4,11,57,68,114,117). Biz de alışmamızda DK-MG ve C6 hücre dizilerinde NCAM'ın varlığını gösterdik.

6. SONUÇ

Çalışmamızın sonucunda;

1. DK-MG ve C6 hücre dizilerinin her ikisinde de telomeraz aktivitesi ilerleyen pasajlarda dalgalı bir artış göstermiştir.
2. Her iki hücre dizisinde telomeraz aktivitesinde görülen dalgalı artış yerine siyalik asit miktarı daha düzenli bir artış göstermiştir.
3. Tüm pasajlarda TERT ve TR ekspresyonları pozitif olarak bulunmuştur.
4. Hücre zarında NCAM'ın varlığı her iki hücre dizisinde gösterilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda glial tümör hücre dizilerinin ilerleyen pasajlarında telomeraz aktivitesi ve siyalik asit miktarının giderek arttığını tesbit ettik. Şimdiye kadar ayrı ayrı değerlendirilen bu iki parametreden, özellikle siyalik asit miktarının bilinmesi ve bunların birlikte değerlendirilmesi glioma veya diğer kanser çeşitlerinin durumunu belirlemede yapılan tetkikleri destekleyecektir. Ayrıca tedavide kullanılan ya da kullanılması planlanan ilaçların veya bitki ekstralarının, tümörün seyrine uygun etkili dozunun belirlenmesinde yardımcı olacağı kanısındayız. Telomeraz aktivitesi ve siyalik asidin birlikte değerlendirildiği yeni çalışmaların yapılması bu konuyu daha da aydınlığa kavuşturacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D.: Molecular Biology of the Cell, Third edition, Garland Publishing, Inc. New York, London, 1994.
2. BANERJEE P.P., BANERJEE S., ZIRKIN B.R., BROWN T.R.: Lobe-specific telomerase activity in the adult brown Norway rat prostate and its regional distribution within the prostatic ducts. *Endocrinology*, Vol 139, no 2, 513-519, 1998.
3. BASSI R., VIANI P., GIUSSANI P., RIBONI L., TETTAMANTI G.: GM3 ganglioside inhibits endothelin-1 mediated signal transduction in C6 glioma cells. *FEBS Letters*, 507, 101-104, 2001.
4. BAŞARAN A.: Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı., Güneş&Nobel Kitabevleri, Genişletilmiş 7. Baskı, 2005.
5. BAŞARAN A: Hücresel yaşlanma ve Hücre Ölümsüzlüğünde Telomeraz Enzim Kompleksi. *Sendrom Dergisi*, Vol 14, Sayı 7, Temmuz, 2002.
6. BAŞARAN A: Telomerlerin yapısı ve fonksiyonu. *Sendrom Dergisi*, Vol 14, Sayı 9, Eylül, 2002.
7. BHATAVDEKAR J.M., PATEL D.D., VORA H.H., BALAR D.B. Squamous cell carcinoma antigen and protein-bound sialic acid in the management of head and neck cancer. *Int. J. Biol Markers*, Oct-Dec; 6(4): 237-40, 1991.
8. BİTİŞİK Ö., YAVUZ S., YASASEVER V., DALAY N.: Telomerase activity in patients with chronic myeloid leukemia and lymphoma, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, Vol 107, Nos 182, 2000.
9. BRYAN T.M., CECH T.R.: Telomerase and the maintenance of chromosome ends, *Current Opinion in Genetics & Development*, 11:318-324, 1999.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

10. CANORUÇ N., CANORUÇ F., ÖZDEN T., ŞEN C., DEĞERTEKİN H., GÖRAL V., AYYILDIZ O.: Gastrointestinal sistem kanserlerinde sialik asit ve alkalin fosfatazın serum düzeyleri ve tanıdaki önemleri. *Gastroenteroloji*, 4(4): 656-660, 1993.
11. CHARTER W.N., MAHAL L.K., KOSHLAND D.E., BERTOZZI C.R.: Differential effects of unnatural sialic acids on the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and neural behavior. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 277, No 11, Issue March 15 pp. 9255-9261, 2002.
12. CHATZANTONIOU V.D., Telomerase: Biological function and potential role in cancer management. *Pathology Oncology Research* 7(3):161-170, 2001
13. CHEN X., BONNEFOI H., PELTE M-F., LYAUTERY J., LEDDERREY C., MOVARECHI S., SCHAEFFER P., MULCAHY H.E., MEYER P., STROUN M., ANGER P.: Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, Vol 6, 3823-3826, 2000.
14. CHENG A.J., LIAO S.K., CHOW S.E., CHEN J.K., WANG T.C.V.: Differential inhibition of telomerase activity during induction of differentiation in hematopoietic, melanoma and glioma cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237, 438-444, 1997.
15. CHINTALA S.K., RAO JASTI S.R.: Invasion of human glioma: Role of extracellular matrix proteins. *Frontiers in Bioscience* 1, d324-339, 1 November 1996.
16. COLGIN M.L., REDDEL R.R.: Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9: 97-103, 1999.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

17. COLLI A., BUCCINO G., COCCIOLO M., PARRAVICINI R., MARIANI F., SCALTRINI G.: Diagnostic accuracy of sialic acid in the diagnosis of malignant ascites. *Cancer*, mar 1;63(5): 912-6, 1989.
18. COLLINS V.P.: Progression as exemplified by human astrocytic tumors, *Cancer Biology*, Vol 9, 267-276, 1999.
19. COLLINS B.E., FRALICH T.J., ITONORI S., ICHIKAWA Y., SCHNAAR R.L.: Conversion of cellular sialic acid expression from N-acetyl- to N-glycolylmannosamine pentaacetate: inhibition of myelin associated glycoprotein binding to neural cells. *Glycobiology* 10(1): 11-20, 2000.
20. COMBI D.G., ROSEMAN S.: The sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 235, No 9, Sep., 1960.
21. COOPER G.M.: *The Cell*, Dana-Farber Cancer Institute Harvard Medical School, Distributed exclusively outside North America by Oxford University Press, 1997.
22. CORFIELD A.P., HIGA H., PAULSON J.C., SCHAUER R.: The specificity of viral and bacterial sialidases for $\alpha(2-3)$ -and $\alpha(2-6)$ -linked sialic acids in glycoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 744, 121-126, 1983.
23. COŞAN E.: *Nöroşirürjide Temel Konular ve İlkeler*. Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2004.
24. COUGHLAN C.M., BREEN K.C.: The control of sialyltransferase activity in tumor-cell lines derived from different tissues is multifactorial. *FEBS Letters*, 369, 260-262, 1995.
25. COUNTER C.M., GUPTA J., HARLEY C.B., LEBER B., BACCHETTI S.: Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies, *Blood*, Vol 85, No 9 (May 1), 2315-2320, 1995.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

26. CROOK M.: The determination of plasma or serum sialic acid. Clin. Biochem. Vol.26, pp 31-38, 1993.
27. ÇOĞALGİL Ş., TAYSI S.: Sialic acid, intercellular adhesion molecule-1 and rheumatoid arthritis: a study on the erythrocyte membrane. Ege Fiz. Tıp Reh. Der., 7(1-2): 51-56, 2001.
28. DANIEL L., BOUVIER C., CHETAİLLE B., GOUVERNENT J., LUCCIONI A., ROSSI D., LECHEVALLIER E., MURACCIOLE X., COULANGE C., FIGARELLA-BRANGER D.: Neural cell adhesion molecule expression in renal cell carcinomas: relation to metastatic behavior. Human Pathology, Vol 34, No 6, June, 2003.
29. DARNELL J., LODISH H., BALTIMORE D.: Molecular Cell Biology, Scientific American Books, Inc., 1990.
30. DHAENE K., HÜBNER R., KUMAR-SINGH S., WEYN B., MARCK E.V.: Telomerase activity in human pleural mesothelioma. Thoraks, 53; 915-918, 1998.
31. DOKUDOVSKAYA S.S, PETROV A.V. DONTSOVA O.A., BOGDANOV A.A.: Telomerase is an unusual RNA-containing enzyme, Biochemistry (Moscow), 62 (11): 1411-23, 1997.
32. DREYFUSS A.I., CLARK J.R., ANDERSEN J.W.: Lipid associated sialic acid, Squamous cell carcinoma antigen, carcinoembryonic antigen, and lactic dehydrogenase levels as tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer, Nov 15;70 (10): 2499-503. 1992.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

33. FALCHETTI A., BECHERINI L., MARTINETTI V., MORELLI A., BENVENUTI S., PICARIELLO L., GENNARI L., LAMPUGNANI R., BORDI C., BRANDI M.L.: Telomerase repeat amplification protocol (TRAP): A new molecular marker for parathyroid carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265, 252-255, 1999.
34. FENG J., FUNK W.D., WONG S., WEINRICH S.L., AVILION A.A., CHIU C., ADAMS R.R., CHANG E., ALLSOPP R.C., YU J., LE S., WEST M.D., HARLEY C.B., ANDREWS W.H., GREIDER C.W., VILLEPONTEAU B.: The RNA component of human telomerase, *Science*, 269: 1236-1241, 1995.
35. FISCHER F., EGG G.: n-acetylneuraminic acid (sialic acid) as a tumor marker in head and neck cancers. *HNO*, Oct; 38(10): 361-3, 1990.
36. FU W., LU C., MATTSON M.P.: Telomerase mediates the cell survival-promoting actions of brain-derived neurotrophic factor and secreted amyloid precursor protein in developing hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 22(24): 10710-10719, December 15, 2002.
37. GARTNER L.P., HIATT J.L.: *Color Textbook of Histology*. W.B. Saunders Company, 1997.
38. GATCHEV O., RASTAM L., LINDBERG G., GULLBERG B., EKLUND G.A., TÖRNBERG S.: Tumors of the central nervous system and serum sialic acid concentration in men and women. *Br. J. Cancer* 68, 425-427, 1993.
39. GEYER H., BAHR U., LIEDTKE S., SCHACHNER M., GEYER R.: Core structures of polysialylated glycans present in neural adhesion molecule from newborn mouse brain. *Eur. J. Biochem*, 268, 6587-6599, 2001.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

40. GOMEZ-ROMAN J.J., ROMER A.F., CASTRO L.S., NIETO E.H., FERNANDEZ-LUNA J.L., VAL-BERNAL J.F.: Telomerase activity in pulmonary neuroendocrine tumors. *Am. J. Surg. Pathol* 24(3): 417-421, 2000.
41. GRANGER M.P., WRIGHT W.E., SHAY J.W.: Telomerase in cancer and aging. *Hematology*, 41, 29-40, 2002.
42. GREENBERG R.A., CHIN L., FEMINO A., LEE K.-H., GOTTLIEB G.J., SINGER R.H., GREIDER C.W., DEPINHO R.A.: Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a^{Δ2/3} cancer-prone mouse. *Cell*, Vol 97, 515-525, May 14, 1999.
43. GRONDONA J.M., PEREZ-MARTIN M., CIFUENTES M., PEREZ J., JIMENEZ A.J., PEREZ-FIGARES J.M., FERNANDEZ-LIEBREZ P.: Ependymal denudation, aqueductal obliteration and hydrocephalus after a single injection of neurominidase into the lateral ventricle of adult rats. *J. Neuropathol Exp. Neurol. Sep*; 55(9): 999-1008, 1996.
44. GÜNEŞ H.V.: Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitabevi, 1. Baskı, 2003.
45. HAHN W.C.: Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancers. *Journal of Clinical Oncology*. Vol 21, No 10 (May 15), 2034-2043, 2003.
46. HALVORSEN T.L., LEIBOWITZ G., LEVINE F.: Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Molecular and Cellular Biology*, P.1864-1870, mar, 1999.
47. HARADA K., KURISU K., SUGIYAMA K., SADATOMO T., YOSHIOKA H., HAMA S.: Telomerase activity in human brain tumors. *Basic Sciences-Neuro-Oncology*, Tuesday, 8 July, 1997.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

48. HARLEY C.B., SHERWOOD S.W.: Telomerase, checkpoints and cancer, *Cancer Surveys*, 29:263-86,1997.
49. HAYAKAWA N., NOZAWA K., OGAWA A., KATO N., YOSHIDA K., AKAMATSU K.-I, TSUCHIYA M., NAGASAKA A., YOSHIDA S.: Isothiazolone derivatives selectively inhibit telomerase from human and rat cancer cells in vitro. *Biochemistry*, 38, 11501-11507, 1999.
50. HESS J.L., HIGHSMITH W.E., Telomerase detection in body fluids. *Clin Chem* 48(1): 18-24, 2002.
51. HIGA H.H., PAULSON J.C.: Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-asetyl-, N-glycolyl-, and N-O diacetylneuraminic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 260, No 15, Issue of July 25, pp. 8838-8849, 1985.
52. HIYAMA E., HIYAMA K., YOKOYAMA T., FUKUBA I., YAMAOKA H., SHAY J.W., MATSUURA Y.: Rapid detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, Vol 5, 601-609, March 1999.
53. HIYAMA E., SAEKI T., HIYAMA K., TAKASHIMA S., SHAY J.W., MATSUURA Y., YOKOYAMA T.: Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer Cytopathology*, 90: 235-8, 2000.
54. HOLT S.E., WRIGHT W.E., SHAY J.W.: Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Molecular and Cellular Biology*, June, p 2932-2939, 1996.
55. HOLZMANN K., BERGER W., MEJRI D., CERNI C., SASGARY S.: Detection and quantification of transcripts for the catalytic subunit TERT and the RNA component of telomerase in rat tissue. *Analytical Biochemistry*. 317, 120-123, 2003.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

56. INOUE H., TSUCHIDA A., KAWASAKI Y., FUJIMATO Y., YAMASAKI S., KAJIYAMA G.: Preoperative diagnosis of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas with attention to telomerase activity. *Cancer*, 91: 35-41, 2000.
57. ISITMANGİL T., ISITMANGİL G., BUDAK Y., AYDİLEK R., ÇELENK M. K.: Comparison of serum and bronchoalveolar lavage fluid sialic acid levels between malignant and benign lung diseases. *BMC Pulmonary Medicine*, pg. 1-5, 2001.
58. IWASAKI Y, KOMANO M, ISHIKAWA A, SASAKI T, ASAHI T.: Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acids repeat (WD40 repeat), *Plant Cell Physiol*, 36(3): 505-10,1995.
59. JACOBS C.L., GOON S., YAREMA K.J., HINDERLİCH S., HANG H.C., CHAI D.H., BERZOTTI C.R.: Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry* August 2001.
60. JAQUES L.W., BROWN E.B., BARRETT J.M., BREY W.S., WELTNER W.: Sialic acid a calcium-binding carbohydrate. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 252, No.13, Issue of July 10, pp. 4533-4538, 1977.
61. KARAÇALI S.: Glikobiyoloji, güncel moleküler biyoloji. *Turk J. Vet Anim Sci*, 27, 489-495, 2003.
62. KARLIKAYA C., ERDOĞAN S., AKKOÇLU A., OKTAY G., GÜNER G., UÇAN E.S., ÇIMRİN A.H.: Akciğer kanserlerinde çoklu tümör belirleyicisi analizi. *Toraks Dergisi*, Cilt 4, Sayı 3, 248-259, 2003.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

63. KEPPLER O.T., HORSTKORTE R., PAWLITA M., SCHMIDT C., REUTTER W.: Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glikobiology* vol 11 no. 2 pp. 11R-18R, 2001.
64. KLEINSCHMIDT-DEMASTERS B.K., EVANS L.C., BOBAK J.B., LOPEZ-URIBE D., HOPPER D, SHROYER L., SHROYER K.R.: Quantitative telomerase expression in glioblastomas shows regional variation and down-regulation with therapy but no correlation with patient outcome. *Human Pathology* 31(8): 905-913, 2000.
65. KOMATA T., KONDO Y., KANZAWA T., HIROHATA S., KOGA S., SUMIYOSHI H., SRINIVASULA S. M., BARNA B.P., GERMANO I.M., TAKAKURA M., INOUE M., ALNEMRI E.S., SHAY J.W., KYO S., KONDO S.: Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit gene promoter. *Cancer Research*, 5796-5802, August 1, 2001.
66. KORNGUTH S.E., KALINKE T., ROBINS H.I., COHEN J.D., TURSKI P.: Preferential binding of radiolabeled poly-L-lysines to C6 and U87 MG glioblastomas compared with endothelial cells in vitro. *Cancer Research*, 49, 6390-6395, November 15, 1989.
67. KOYANAGI Y., KOBAYASHI D., YAJIMA T., ASANUMA K., KIMURA T., SATO T., KIDA T., YAGIHASHI A., KAMESHIMA H., WATANABE N.: Telomerase activity is down regulated via decreases in hTERT mRNA but not TEP1 mRNA or hTERC during the differentiation of leukemic cells. *Anticancer Research*, 20; 773-778, 2000.
68. KURTUL N., ARICAN A., CANTER B.: Pestisitlerin serum siyalik asit düzeyine etkisi. *Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu*. <http://www.klinikbiyobursa.org/page78.htm>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

69. KYO S., KANAYA T., ISHIKAVA H., UENO H., INOUE M.: Telomerase activity in gynecological tumors. *Clinical Cancer Research*, Vol 2, 2023-2028 December, 1996.
70. KYO S., KANAYA T., TAKAKURA M., TANAKA M., YAMASHITA A., INOUE H., INOUE M.: Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant borderline and benign tumors. *Int. J. Cancer*, 80,804-809, 1999.
71. LEE B-K., DIEBEL E., NEUKAM F.W., WILFTANG J. RIES J.: Diagnostic and prognostic relevance of expression of human telomerase subunits in oral cancer. *International Journal of Oncology*, 19, 1063-1068, 2001.
72. LEE J.C., JONG H-S., YOO C-G., HARR S.K., SHIM Y-S., KIM Y.W.: Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer*, 21, 99-103, 1998.
73. LEWIS R.: *Human genetics*, Third Edition, McGraw-Hill Companies, U.S.A.,1998.
74. LIN Y., MIYAMOTO H., FUJINAMI K., UEMURA H., HOSAKA M., IWASAKI Y., KUBOTA Y.: Telomerase activity in human bladder cancer, *Clinical Cancer Research*, Vol 2: 929-932, 1996.
75. LINGNER J., CECH T. R.: Telomerase and chromosome end maintenance, *Current Opinion in Genetics & Development*, 8:226-232, 1999.
76. LIOU M.J., CHAN E.C., LIN J.D., LIU F.H., CHAO T.C.: Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms. *Cancer Letters*, 191, 223-227, 2003.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

77. LIU B.C-S., LAROSE I., WEINSTEIN L.J., AHN M., WEINSTEIN M.H., RICHIE J.P.: Expression of telomerase subunits in normal and neoplastic prostate epithelial cells isolated by laser capture microdissection. *Cancer*, 92;1943-8, 2001.
78. LIU T., NOZAKI Y., PHAN S.H.: Regulation of Telomerase Activity in Rat Lung Fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* Vol 26, pp. 34-540, 2002.
79. LODISH H., BERK A., MATSUDARIA P., KAISER C., KRIEGER N., SCOTT M.P., ZIPURSKY S.L., DARNELL J.: *Molecular Cell Biology*. Fifth Edition, W. H. Freeman and Company, 2004.
80. MACNAMARA B., XU D., WANG W., CHEN Z., HOU M., MAZUR J., GRUBER A., PORWID-MACDONALD A.: Malignant lymphomas. Telomerase activity in regulation to pro- and anti-apoptotic protein expression in high grade non-Hodgkin's lymphomas. *Haematologica* 86: 386-393, 2001.
81. MAHAL L.K., CHARTER N.W., ANGATA K., FUKUDA M., KOSHLAND D.E., BERTOZZI C.R.: A small-molecule modulator of poly- α 2,8-sialic acid expression on cultured neurons and tumor cells. *Science*, October Vol 294, 2001.
82. MALASKA J., SKLENICKOVA M., KREJCI K., FAJKUSOVA L., BAJER M., HRSTKOVA H., FAJKUS J.: Telomerase activity and expression and telomere analysis in situ in the course of treatment of childhood leukemias. *Blood Cells, Molecules, and Disease*, 26(5), 534-539, 2000.
83. MANSSON J.-E., FREDMAN P., BIGNER D.D., MOLIN K., ROSENGREN B., FRIEDMAN H.S., SVENNERHOLM.: Characterization of new gangliosides of the lactotetraose series in murine xenografts of a human glioma cell line. *FEBS Letters*, 3692, Vol 201, No 1, May 1986.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

84. MARTIN-RIVERA L., HERRERA E., ALPAR J.P., BLASCO M.A.: Expression of Mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 10471-10476, 1998.
85. MATTOO R.L., ROSEMAN S.: Quantitive determination of sialic acid in the monosialoganglioside, GM1, by thiobarbituric acid method. Analytical Biochemistry, 246, 30-33, 1997.
86. MEHLE C., PIATYSZEK M.A., LJUNBERG B., SHAY J.W., ROOS G.: Telomerase activity in human renal cell carcinoma. Oncogene 13: 161-166, 1996.
87. MELTZER P.S., GUAN X.-Y., TRENT J.M.: Telomere capture stabilizes chromosome breakage. Nature Genetics Vol 4, July, 1993.
88. MENDEZ-OTERO R., SANTIAGO M.F.: Functional role of aglycolipid in directional movements of neurons. An Acad Bras Cienc, 73(2): 221-229, 2001.
89. MEYERSON M., COUNTER C.M., EATON E.N., ELLISEN L.W., STEINER P., CADDLE S.D., ZIAUGRA L., BEIJERBERGERN R.L., DAVIDOFF M.J., LUI Q., BACCHETTI S., HABER D.A., WEINBERG R.A.: hEST2, the putitive human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization Cell 90: 785-795, 1997.
90. MEYERSON M.: Role of telomerase in normal and cancer cells. Journal of Clinical Oncology, Vol 18, No 13 (July), 2626-2634, 2000.
91. MORII K., TANAKA R., ONDA K., TSUMANUMA I., YOSHIMURA J.: Expression of telomerase RNA, Telomerase activity, and telomere length in human gliomas. Biochemical and Biophysical Research Communications, 239, 830-834, 1997.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

92. MU X.C., BRIEN T.P., ROSS J.S., LOWRY C.V., MCKENNA B.J.: Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids, *Cancer (Cancer Cytopathol)*, 87:93-9, 1999.
93. MURAKAMI J., NAGAI N., OHAMA K., TAHARA H., IDE T.: Telomerase activity in ovarian tumors. *Cancer*, 80: 1085-92, 1997.
94. NAKAMURA T.M., MORIN G.B., CHAPMAN K.B. , WEINRICH S.L., ANDREWS W.H., LINGNER J., HARLEY C.B., CECH T.R.: Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*. 15; 277(5328):955-9, 1997.
95. NAKANO K., WATNEY E., MCDUGALL J.K.: Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer, *The American Journal of Pathology*, 153: 857-864, 1998.
96. NAKAYAMA J.I, SAITO M, NAKAMURA H, MATSUURA A, ISHIKAWA F.: TLP1: gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family, *Cell*, 88:875-84, 1997.
97. NORIHIRO S., MAEHARA N., MIZUMOTO K., NAGAI E., YASOSHIMA T., HIRATA K., TANAKA M.: Telomerase activity of cultured human pancreatic carcinoma cell lines correlates with their potential for migration and invasion. *Cancer*, 91; 496-504, 2001.
98. OH B.K., LEE C-H., PARK C., PARK Y.N.: Telomerase regulation and progressive telomere shortening of rat hepatic stem-like epithelial cell during in vitro aging. *Experimental Cell Research*, 298, 445-454, 2004.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

99. OSHIMURA M., BARRETT J.C.: Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors. *European Journal of Cancer* Vol 33, No 5, pp. 710-715, 1997.
100. ÖKTEM F., TOPRAK M., YAZICILAR O., ÖZ F., ADA M.: Larinks kanserlerinde sialik asit değişimleri. *Türk Otolarengoloji Arşivi*, 37(3-4): 98-104, 1999.
101. ÖZDEMİR F., AYDIN F., OVALI E., UÇAR F.: Telomeraz ve kanser, *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, Cilt:9, Sayı:4, 242-248, 1999.
102. ÖZDEMİR M., GÜNEŞ H.V., BAŞARAN A., DEĞİRMENCİ İ., SOLAK M., COŞAN D.: KLL ve AML'li hastalarda telomeraz aktivitesinin tayini. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5: 25-28, Ocak 2004.
103. PANDITA T.K., HALL E.J., HEI T.K., PIATYSZEK M.A., WRIGHT W.E., PIAO C.Q., PANDITA R.K., WILLEY J.C., GEARD C.R., KASTAN M.B., SHAY J.W.: Chromosome end-to-end associations and telomerase activity during cancer progression in human cells after treatment with α -particles simulating radon progeny. *Oncogene*, 13, 1423-1430, 1996.
104. PARKINSON E.K., NEWBOLD R.F., KEITH W.N.: The genetic basis of human keratinocyte immortalisation in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation. *European Journal of Cancer*, Vol 33, No 5, pp. 727-734, 1997.
105. PARRIS C.N., JEZZARD S., SILVER A., MACKIE R., MCGREGOR J.M., NEWBOLD R.F.: Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. *British Journal of Cancer*, 79 (1), 47-53, 1999.
106. PAUNU N.: Familial Glioma. *Acta Universitatis Tamperensis*, Teiskontie 35, Tampere, April, 2002.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

107. PETITOT F., LEBEAU J., DANO L., LECTARD B., ALTMAYER S., LEVALOIS C., CHEVILLARD S.: In vitro aging of rat lung cells. Down regulation of telomerase activity and continuous decrease of telomere length are not compatible with malignant transformation. *Exp Cell Res* 286: 30-39, 2003.
108. POLLARD T.D., EARNSHAW W.C.: *Cell Biology*, Elsevier Science, USA, 2002.
109. PRESCOTT J. C., BLACKBURN E. H.: Telomerase: Dr. Jekyll or Mr Hyde?, *Current Opinion in Genetics & Development*, 9:388-373, 1999.
110. PRICE M. C.: Telomeres and telomerase: broad effects on cell growth, *Current Opinion in Genetics & Development*, 9:218-224, 1999.
111. RAUVALA H: Neurite outgrowth of neuroblastoma cells: Dependence on adhesion surface-cell surface interactions. *The Journal of Cell Biology*, Vol 98, 1010-1016, March 1984.
112. RODRIGUEZ J.A., BERNABE M., RAMIREZ L.R., CREMADES M. V., MAYORALAS A.F., SAMPEDRO M.N.: Purification and structure of neurostatin, an inhibitor of astrocyte division of mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, 74, 2547-2556, 2000.
113. ROMERO E.L., PARDO M.F., PORRO S., ALONSO S.: Sialic acid measurement by a modified aminoff method: a time-saving reduction in 2-thiobarbituric acid concentration. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 35, 129-134, 1997.
114. RONN L.C.B., BEREZIN V., BOCK E.: The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing, *Int. J. Devl Neuroscience* 18, 193-199, 2000.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 115.RUBIN H.: Promise and problems in relating cellular senescence in vitro to aging in vivo. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34, 275-286, 2002.
- 116.RUTISHAUSER U.: Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interaction and tissue plasticity. *J Cell Biochem Sep 1*; 70(3): 304-12, 1998.
- 117.SAITO M., SUGIYAMA K.: Characterization of nuclear gangliosides in rat brain: concentration, composition and developmental changes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 398, No. 2, February 15 15, pp. 153-159, 2002.
- 118.SATO N., MAEHARA N., MIZUMOTO K., NAGAI E., YASOSHIMA T., HIRATA K., TANAKA M.: Telomerase activity of cultured human pancreatic carcinoma cell lines correlates with their potential for migration and invasion. *Cancer*, Vol 91, No 3, February, 1, 2001.
- 119.SEBESTA J., BROWN T., WILLIARD W., DEHART M.J., ALDOUS W., KAVOLIUS J., AZOROW K.: Does telomerase activity add to value of fine needle aspirations in evaluating thyroid nodules? *The American journal of Surgery* 181: 420-422, 2001.
- 120.SHAMBERGER R.J.: Evaluation of water soluble and lipid soluble sialic acid levels as tumor markers. *Anticancer Research*, Jul-Aug; 6(4), 717-20, 1986.
- 121.SHAY J.W., BACCHETTI S.: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33(5): 787-791, 1997
- 122.SHAY, J.W., WRIGHT, W.E.: Telomerase activity in human cancer. *Current Opinion in Oncology*, 8:66-71, 1997.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

123. SHEN Z-Y., XU L-Y, CHEN M-H., SHEN J., CAI W-J., ZENG Y.: Progressive transformation of immortalized esophageal epithelial cells. World J. Gastroenterol, 8(6), 976-981, 2002.
124. SHIBUYA K., FUJISAWA T., HOSHINO H., BABA M., SAİTOH Y., LIZASA T., et al.: Increased telomerase activity and elevated HTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. Cancer 92: 849-855, 2001.
125. SHORE, D.: Telomerase and Telomere-binding Proteins: Controlling the Endgame, TIBS, 22:233-5, 1997.
126. SMITH K.J., GERMAIN M., SKELTON H.: Perspectives in dermatopathology: telomeres and telomerase in ageing and cancer; with emphasis on cutaneous disease. J. Cutan. Pathol, 27: 2-18, 2000.
127. SODER A.I., HOARE S.F., MUIR S., GOING J.J., PARKINSON E.K., KEITH W.N.: Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. Oncogene, 14, 1013-1021, 1997.
128. TOMODA R., SETO M., TSUMUKI H., IIDA K., YAMAZAKI T., SONODA J., MATSUMINE A., UCHIDA A.: Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression are correlated with clinical aggressiveness in soft tissue tumors. American Cancer Society, 1127-1133, April 2002.
129. USLU E., BELCE A., SEYMEN P., KÖKOĞLU E.: Kolorektal kanserde metastazın serum total siyalik asit düzeyleri üzerine etkisi, Cell Mol Life Sci, Oct 59(10): 1734-43, 2002.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 130.VIETOR M., WINTER S., GROSCURTH P., NAUMANN U., WELTER M.:
On the significance of telomerase activity in human malignant glioma cells.
European Journal of Pharmacology, 27-37, 407, 2000.
- 131.VYAS A.A., SCHNAAR R.L.: Brain gangliosides: Functional ligands for
myelin stability and control of nerve regeneration. Biochemie, 83: 677-682,
2001.
- 132.WATSON D.R., JOURDIAN G.W., ROSEMAN S.: The sialic acid VIII. Sialic
acid 9-phosphate synthetase. The Journal of Biological Chemistry, Vol 241,
No 23, Issue of December 10, pp. 5627-5636, 1966.
- 133.WONG S.C.H., ONG L.L., ER C.P.N., GAO S., YU H., SO J.B.Y.: Cloning of
Rat Telomerase Catalytic Subunit Functional Domains reconstitution of
Telomerase Activity and Enzymatic Profile of Pig and Chicken Tissues. Life
Sciences 73, 2749-2740, 2001.
- 134.WONGKHAM S., BHUDHISAWASDI V., CHAU-IN S., BOONLA C.,
MUISUK K., KONGKHAM S., WONGKHAM C., BOONSIRI P.,
THUWAJIT P.: Clinical significance of serum total sialic acid in
cholangiocarcinoma. Clinica Chimica Acta 327, 139-147, 2003.
- 135.WU I., ICHIHASHI M., UEDA M.: Correlation of the expression of human
telomerase subunits with telomerase activity in normal skin and skin tumors.
American Cancer Society, July, 2033-2044, 1999.
- 136.WYNFORD-THOMAS D.: Cellular senescence and cancer. Journal of
pathology, 187:100-111, 1999.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 137.XINARIANOS G., SCOTT F.M., LILOGLOU T., PRIME W., TURNBULL L., WALSHAW M., FIELD J.K.: Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer*, 28, 37-42, 2000.
- 138.YAMAMOTO H., SAITO T., KONEKO Y., KERSEY D., YONG V.W., BREMER E.G., MKRDICHIAN E., CERULLO L., LEESTMA J., MOSKAL J.R.: α 2,3- sialyltransferase mRNA and α 2,3- linked glycoprotein sialylation are increased in malignant gliomas. *Brain Research*, Vol 755, Issue 25 April, pp. 175-179, 1997.
- 139.YAREMA K.J., GOON S., BERTOZZI C.R.: Metabolic selection of glycosylation defects in human cells. *Nature Biotechnology*, 19: 553-558, 2001.
- 140.YASUNAGA Y., NAKAMURA K., KO D., SRIVASTAVA S., MOUL J.W., SESTERHENN I.A., McLEOD D.G., RHIM J.S., A novel human cancer model for the study of prostate cancer. *Oncogene* 20: 8036-8041, 2001.
- 141.ZHANG J.X, ZHANG Z.K., SHENG H.P., TSAO S.W., LOH T.T.: Telomerase activity is not related to apoptosis in leukemic cell lines. *Life Sciences* 66(18): 1713-1723, 2000.
142. www.mcatürk.com/guncel_0310_sinirsistemimiz.htm

DİDEM COŞAN'IN ÖZGEÇMİŞİ

1971 yılında Ankara'da doğdu. İlk öğrenimini İnönü Merkez İlkokulu'nda, Orta ve Lise öğrenimini İnönü Lisesi'nde tamamladı. 1996 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 1993-1996 yılları arasında Adilna-Sanovel İlaç Firmasında Tıbbi Satış Mümessili olarak çalıştı. 1996 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Lisansüstü eğitimine başladı. 1998 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 1999 yılında Lisansüstü eğitimini tamamladı ve 2001 yılında Doktora eğitimine başladı. Halen Tıbbi Biyoloji A.D.'da Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuk annesi, İngilizce biliyor.