

# Kolon Tümör Vak'alarında Aminoasil-tRNA Sentetaz Aktivitesinin İncelenmesi

DETERMINATION OF AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES IN COLON TUMOUR CELLS

Melike AVŞAR\*, S Ayşe ÖZER\*, Erol AVŞAR\*\*, Beyazıt ÇIRAKOĞLU\*\*\*

\* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD,

\*\* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji BD,

\*\*\* TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, İSTANBUL

## ÖZET

Aminoasil-tRNA sentetazlar (AARS) protein biyosentezinde anahtar rolü oynayan bir enzim ailesidir. Bütün organizmalarda genetik bilginin ifadesi (ekspresyonu) için aminoasitlerin kendine özgü transfer RNA (tRNA)'larla bağlanması bu enzimlerce sağlanmaktadır.

Tümör hücrelerinin belirgin özelliklerinden biri yoğun protein sentezidir. Bu durum AARS'ın hücre içi miktarında ya da etkinliğinde bir artış olmasıyla açıklanabilir. Bu bağlamda tümör hücrelerinde AARS aktivitesinin incelenmesinin kontrolsüz hücre çoğalmasına bir gösterge olacağı düşünülebilir.

Bu amaçla rapor edilen çalışmada kolon kanseri tanısı konmuş 9 hastanın normal ve tümör dokularında metiyonil-tRNA sentetaz enziminin etkisi karşılaştırılmış ve tümör dokularındaki spesifik aktivite (1061,30/mgP) normal dokulara göre (25,60/mgP) anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

Elde edilen spesifik aktivite değerleri ile patoloji bulguları karşılaştırıldığında anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aminoasil-tRNA sentetaz,  
Kolon kanseri, Spesifik aktivite

T Klin Gastroenterohepatol 1995; 6: 169-171

Aminoasil-tRNA sentetazlar tüm canlılarda protein sentezinin başlangıç aşamasında aminoasitlerin kendilerine özgü transfer RNA'lara (tRNA) bağlanmalarını sağlayan enzimlerdir (1,2).

Bu çalışmada amaç aminoasil-tRNA sentetaz enzimlerinin spesifik etkinliklerini kolon normal ve tümör

Geliş Tarihi: 13.4.1995

Yazışma Adresi: Arş.Gör.Melike AVŞAR  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Genetik ABD, İSTANBUL

T Klin J Gastroenterohepatol 1995, 6

## SUMMARY

Aminoacyl-tRNA synthetases (AARS) are enzymes that play an active role prior to protein biosynthesis in binding of amino acids to their cognate tRNA's for the correct expression of the genetic code.

The increase of protein synthesis in tumour cells is proportional to the activity of AARS. This can be explained by the increase in the amount or activity of AARS. It is believed that the determination of AARS activity in tumour cells may be an indicator for the uncontrolled cell division.

In this study, the activity of methionyl tRNA synthetase has been compared in normal and tumorous tissues of 9 colon cancer patients. The specific activity of tumorous tissues (1061, 3U/mgP) was found to be significantly higher ( $p < 0.001$ ) than that of normal tissues (25.6 U/mgP).

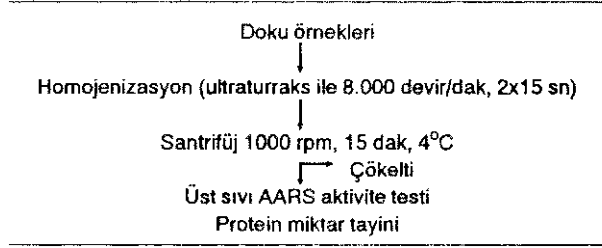
Results revealed the correlation between the specific activities and pathology of the cells.

**Key Words:** Aminoacyl-tRNA synthetase,  
Colon cancer, Specific activity

T Klin J Gastroenterohepatol 1995; 6: 169-171

dokularında karşılaştırmaktır. Tümör hücrelerinin başta gelen özelliklerinden birinin de kontrolsüz çoğalma ve buna bağlı olarak protein sentezinin yüksek düzeyde olmasıdır. Bunu da bu oluşumda yer alan proteinlerin ya miktarlarında önemli bir artışın olması ya da özgün etkinliklerinin yükselmesi sağlar (3-6).

Çalışmada ökaryotik proteinlerin başlangıç aminoasiti olan metiyonine özgü metiyonil-tRNA sentetazın kolon kanserli hastaların normal ve tümör dokularındaki özgün etkinlikleri karşılaştırılmış ve bu değerler kanser olgularında bir kriter olup olmayacağı tartışılmıştır.

**Tablo 1.** Doku örneklerinin hazırlanması ve AARS aktivite testi

## MATERYEL VE METOD

### 1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan doku örnekleri (Marmara Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji ABD) kolon kanseri oldukları önceden belirlenmiş hastaların ameliyat sırasında çıkarılan kolon parçasının hem tümörlü kısmından hem de normal doku kısmından elde edildi. Taze olarak elde edilen doku örnekleri derhal buz içerisine alınıp daha sonra hassas terazide tartıldı. Buz içinde makasla küçük parçalar haline getirildi. Kiyılmış doku örneklerinin üzerine ağırlıklarının iki katı olacak şekilde homojenizasyon tamponu [100 mM Tris-HCl (Sigma), pH 8.0, 10 mM 2-Merkaptoetanol (p-MET) (Sigma), 1 mM disodyumetilendiamintetraasetik asit, (EDTA) (Sigma), %5 gliserol (Sigma), %1 Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Sigma)] konarak homojenizasyona tabi tutuldu. Kiyılmış doku örnekleri ultraturaks'te 8.000 devir/dakikada (2x15 sn) homojenize edildi (7,8). Örnekler 4°C'ta 10.000 devir/dak hızıyla 15 dak santrifüjlendi. Üst sıvı alınarak AARS aktivite testi uygulandı.

**Tablo 2.** Deneklerin sağlıklı ve tümörlü olgularda metiyonil-tRNA spesifik aktivite değerleri ve patolojik analiz sonuçları

Hasta	Spesifik Aktivite U/mgP	Patolojik Sonuç (Dükes)
H1	Tümör: 682.5 Normal: 54	B
H2	Tümör: 1232 Normal: 44	C2
H3	Tümör: 1067 Normal: 10	B2
H4	Tümör: 1185.3 Normal: 26.6	C1
H5	Tümör: 940.5 Normal: 35.9	C2
H6	Tümör: 1563.8 Normal: 16.6	B1
H7	Tümör: 490.3 Normal: 8.2	B1
H8	Tümör: 1277 Normal: 16.9	C
H9	Tümör: 1113.9 Normal: 22.9	B

### 2. AARS Aktivite Testi

Kolon kanserli hastaların tümör ve normal dokulardan elde edilen üst sıvı aminoasil-tRNA sentetaz düzeyi açısından değerlendirildi (9-12). Metiyonil-tRNA sentetaz için optimize edilen standart ortam şartları kullanıldı. Reaksiyon karışımı son hacmi 0.1 ml olacak şekilde test tampon [200 mM imidazol (Sigma), 2 M potasyum klorür (Sigma), 1 M magnezyum klorür (Sigma)] 30 mM ATP, 10 mM DTE, maya tRNA'sı (Boehringer), <sup>14</sup>C işaretli metiyonin (Amersham) varlığında reaksiyon gerçekleştirildi. 37°C'ta 20 dak. inkübe edildi. Reaksiyon %5'lik TCA (Sigma) ile durduruldu. Nitroselüloz filtrele emdirilen örnekler kurutulduktan sonra sıvı sintilasyon sayacında okundu.

### BULGULAR

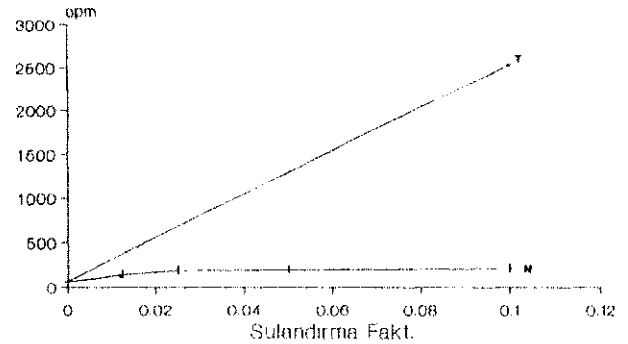
Çalışmalarda elde edilen sonuçlar Tablo 2'de özetlenmiştir. Buna göre tümör dokusundan elde edilen metiyonil-tRNA sentetazın spesifik aktivitesi normal dokununkine oranla yaklaşık 42 kat daha fazla görünmektedir. Bu beklenen yüksek spesifik aktivite değerlerinin elde edilmesi patolojik bulgularla uyum göstermiştir. Tümör dokulardaki spesifik aktivite değeri artıkkça patolojik Dükes sınıflamasındaki evrelerde de artma gözlenmiştir.

### TARTIŞMA

Aminoasil-tRNA sentetazlar (AARS) protein biyosentezinde anahtar rolü oynayan bir enzim sınıfıdır (2,7,8). Genetik bilginin ifadesi (ekspresyonu) için doğru aminoasitlerin kendine özgü tRNA'larla bağlanması gerekmektedir. Bu birleşmenin gerçekleşmesini aminoasil-tRNA sentetaz enzimleri sağlamaktadır.

Tümör hücrelerinde protein sentezinin artmış olması AARS aktivitesi ile doğru orantılıdır. Bu durum, AARS'ın miktarında ya da etkinliğinde bir artışın olmasıyla açıklanabilir (9-12). Tümör hücrelerinde AARS aktivitesinin incelenmesinin kontrolsüz hücre çoğalmasına bir gösterge olacağı düşünülmektedir (1,2,6).

AARS enzim aktivitesindeki değişikliklerin transforme olmuş dokularda (hepatomalarda gösterildiği gibi) önemli bir belirteç olduğu bildirilmiştir (13).

**Şekil 1.** 1 No'lu hastanın kolonundan alınan tümör ve normal doku örneklerinden elde edilen AARS aktivite sonuçları.

T: Tümör Doku, N: Normal Doku

Yaptığımız çalışmada kolon kanserli dokuz hastanın tümör ve normal dokularında metiyonin-tRNA sentezinin seçilmesinin nedeni; metiyoninin protein sentezinde başlangıç aminoasitinin olmasıdır. Tümör hücrelerinde protein sentezi artmış olacağından bu sentezde büyük rolü olan AARS enzim sınıfının miktarında veya aktivitesinde bir artış olması düşünülebilir.

Çalışmada kullanılan dokuz hastanın patolojik bulguları ile aktivite değerleri karşılaştırıldığında ise iki hasta dışında spesifik aktivite değerleri ile patolojik sınıflama olan Duker arasında bir korelasyon saptanmıştır. Çalışılan yedi hastanın patolojik bulguları Duker sınıflamasına göre B ve C evrelerindedir. Bu testlerde beklenen yüksek spesifik aktivite değerlerinin elde edilmesi, patolojik bulgularla uyum içinde olduğunu göstermiştir. İki hastada ise patolojik bulgular ile spesifik aktivite değerleri arasında bir uyum gözlenmemiştir. Bu durum ameliyattan homojenizasyona kadar geçen süre içinde gerçekleşen aksamalardan kaynaklanabileceği varsayılmıştır.

Tümör dokulardaki spesifik aktivite değeri arttıkça patolojik Duker sınıflamasındaki değerlerde de artma gözlenmiştir. Ancak, spesifik aktivitedeki bu artışın Duker sınıflaması ile paralellik göstermesine karşın, alt sınıflandırma için yeterli hassasiyette olmadığı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Söll D, Schimmel PR. Aminoacyl-tRNA synthetases. The Enzymes 1974; 10:489-538.
2. Schimmel PR, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthetases: General features and recognition of transfer RNAs. Ann Rev Biochem 1979; 48:601-48.
3. Ghosh G, Pelka H, Schulman LH, Brnie S. Activation of methionine by Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase. Biochemistry 1991; 30:9569-75.
4. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. Science 1987; 235:305-11.
5. Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science 1979; 204:587-93.
6. Ekmekçi A, Erbaş D. Kanser Moleküler Mekanizması . Ankara 1991.
7. Mirande M, Çirakoğlu B, Waller JP. Seven mammalian aminoacyl-tRNA synthetases associated with In the same complex are functionally. Independent. Eur J Biochem 1983; 131:163-70.
8. Wolfson AD, Motorin Yu A, Orlovskii AF, Gladilin KL. Isolation polypeptide composition, and properties of a complex of aminoacyl-tRNA synthetases from the rabbit liver. Biokhimiya 1987; 52:1593-9.
9. Meinel T, Mechulam Y, Dardel F, Schmitter JM, Hountondji C, Brunie S, Dessen P, Fayat G, Blanquet S. Methionyl-tRNA synthetase from E.Coli Biochimie 1990; 72:625-32.
10. Çirakoğlu B, Waller JP. Leucyl-tRNA and lysyl-tRNA synthetases, derived from the high Mr complex of sheep liver, are hydrophobic proteins. Eur J Biochem 1985; 151:101-10.
11. Çirakoğlu B, Waller JP. Multiple forms of arginyl and lysyl-tRNA synthetases in rat liver a re-evaluation. Biochimica et Biophysica 1985; 329:173-9.
12. Englisch-Peters S, Conley J, Plumbridge J, Leptak C, Soil D, Rogers MJ. Mutant enzymes and tRNAs as probes of the glutaminyl-tRNA synthetase: tRNA interaction. Biochimie 1991; 73:1501-8.
13. Knudson AG. Genetics of human cancer. Annu Rev Genet 1986; 20:231-51.