

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**İNSAN X KROMOZOMU (Xq21) POLİMORFİZMİNİN BAZI  
KANSER TİPLERİYLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nurten ÇANAKÇI**

**Balıkesir, Temmuz–2007**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

İNSAN X KROMOZOMU (Xq21) POLİMORFİZMİNİN BAZI  
KANSER TİPLERİYLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurten ÇANAKÇI

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 23.07.2007

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (Danışman-BAÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Doç. Dr. Raif KURTARAN (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2007

## ÖZET

### İNSAN X KROMOZOMU (Xq21) POLİMORFİZMİNİN BAZI KANSER TİPLERİYLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

Nurten ÇANAKÇI

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Ekrem DÜNDAR)

Balıkesir, 2007

İnsan genomunun DNA dizisinin tamamlanmasıyla bir çok aday genle birlikte kanserojen aday genler de tahmin edilmiş ancak tahminlerin teyidi için gereken deneysel çalışmalar henüz tamamlanmamıştır.

Bu tez kapsamında, Balıkesir ve Bursa hastanelerinden farklı kanser tiplerine sahip 12 birey, ve 9 sağlıklı bireyden, TUSC2'ye oldukça yüksek benzerlik ihtiva eden X kromozomu bölgesi (TXq21 olarak kısaltılmıştır) PCR ile elde edilerek DNA dizisi seviyesinde karşılaştırılmıştır.

Sağlıklı ve çeşitli kanser hastası bireylerden elde edilen TXq21 DNA dizileri, BioEdit programının Sequence Alignment, Contig Assembly Program (CAP, doğru dizi tespiti için), DNADist, DNAPars (benzerlik derecesi ve yakınlık uzaklık ağacının tespiti için), ve ClustalW (nükleotit polimorfizmini tespit ve görüntülemek için) alt programları kullanılarak analiz edilmiştir.

BioEdit programının, DNADist ve DNAPars (benzerlik derecesi ve yakınlık uzaklık ağacının tespiti) alt programlarının analizi sonucunda ortaya çıkan genetik ağaçta kanserli bireylerin tek dalda toplandığı bariz şekilde ortaya çıkmıştır ve TXq21 bölgesinin hemen hemen bütün kanserli bireylerde bir takım farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir.

BioEdit programının, ClustalW (nükleotit polimorfizmini tespit ve görüntülemek için) alt programıyla yapılan analizde ise kanserli ve sağlıklı bireyler arasında bir polimorfik bölge (SNP, single nucleotide polymorphism) saptanmıştır. Bu polimorfik bölge incelenen bütün kanser tipleriyle çeşitli düzeylerde, ancak akciğer kanseriyle oldukça yüksek korelasyon göstermiş olup, erken teşhiste kullanılabilecek bir potansiyel göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Kanser, TUSC2, TUSC4, Xq21.

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF THE CORRELATION BETWEEN HUMAN X CHROMOSOME (Xq21) AND SOME CANCER TYPES**

**Nurten ÇANAKÇI**

**Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology**

**(Msc. Thesis / Supervisor: Asc. Prof. Ekrem DÜNDAR)**

**Balıkesir-Turkey, 2007**

With the completion of human genome sequence, candidate carcinogen genes along with many putative genes, have also been identified. The experimental work needed to confirm the function of these genes, however, have not been completed yet.

With this thesis, TXq21 (TUSC2 like Xq21 region) DNA sequences from 9 healthy individuals and 12 cancer patients from Balıkesir and Bursa hospitals have been amplified via PCR and compared using bioinformatics software.

TXq21 DNA sequences obtained this way were analyzed through Sequence Alignment, Contig Assembly Program (for contig construction), DNA Dist, DNAPars (for similarity degrees), and ClustalW (for alignment to view polymorphism) accessory applications of BioEdit program.

Analysis using DNADist and DNAPars of BioEdit (for constructing similarity and distance trees) revealed that most of the cancer patients were grouped together clearly separating out from the healthy individuals.

The analysis run with ClustalW (to align the sequences and to determine the polymorphic regions) of BioEdit revealed an SNP (single nucleotide polymorphism) between healthy individuals (non cancer patients) and cancer patients. This SNP has a correlation to various extends for all cancer types studied, but a very high correlation for lung cancer. With this respect, this SNP has a good potential to be a quick test for early diagnosis of various cancer types, prime of that being the lung cancer.

**Key Words:** Cancer, TUSC2, TUSC4, Xq21

## İÇİNDEKİLER

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORD	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Nedir?	1
1.2. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri	1
1.2.1. Klonal Orijin.	2
1.2.2. Sınırsız Sayıda Çoğalma (İmmortalite)	2
1.2.3. Genetik Dengesizlik	3
1.2.4. Temas İnhibisyonun ve Alt Tabakaya Tutunarak Büyüme Özelliklerinin Kaybı	3
1.2.5. Çoğalmanın Büyüme Faktörlerinden ve Besin Kaynaklarından Bağımsız Olarak Devamlı Artışı	3
1.2.6. Metastaz	4
1.3. Hücre Döngüsü Ve Kontrol Noktaları	4
1.4. Apoptozis	5
1.4.1. Apoptozisin Genetik Kontrolü	6
1.4.1.2. Antiapoptotik Proteinler (Protoonkogenler)	6
1.4.1.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler	7
1.5. Kanser Oluşturan Etmenler	7
1.5.1. Kalıtsal Faktörler	8
1.5.2. Yaş	8
1.5.3. Cinsiyet Ve Hormonlar	9
1.5.4. Çevresel Faktörler	9
1.5.5. Virüsler	10
1.5.6. Kimyasal Maddeler	11
1.5.7. Besinler	13
1.6. Türkiye’de Ve Dünyada Kanser	13
1.7. Akciğer Kanseri	14
1.7.1. Akciğer Kanser Etmenleri	17
1.8. 3p21 Kromozom Bölgesi Ve Önemi	18

1.9. Tumor Supressor Candidate 2, (Tümör baskılayıcı aday gen 2, TUSC2) Ve Tumor Supressor Candidate 4 (Tümör baskılayıcı aday gen 4, TUSC4) genleri	19
1.10. TUSC2, Xq21 Ve Y Kromozomunun Par Bölgesi	20
1.11. X Kromozomu Ve Kanser	20
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	23
2.2. Kullanılan Örnekler	23
2.3. Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	23
2.4. Kandan Genomik DNA İzolasyonu	23
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	25
2.5.1. PCR Optimizasyonu	26
2.5.1.1. Primerlerin Dizaynı	26
2.5.1.2. Primerlerin Sulandırılması (Çözündürülmesi)	26
2.5.1.3. TUSC4 İle İlgili PCR Optimizasyonları	27
2.5.1.4. TUSC2 İle İlgili PCR Optimizasyonları	28
2.5.1.5. Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) İle İlgili Optimizasyonlar	30
2.5.1.6. Xq21 Kontrol Primerleri (X-Kontrol) İle İlgili Optimizasyonlar	31
2.5.1.7. TUSC2'ye Benzer Xq21 Bölgesi (TXq21) Primer Optimizasyonu	32
2.6. DNA'nın Analizi	34
2.6.1. Spektral Yöntem	34
2.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi	34
2.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	36
2.8. DNA Dizilerinin Biyoinformatik Analizi	36
3. BULGULAR	37
3.1. PCR Sonuçları	37
3.1.1. TUSC4 Sonuçları	37
3.1.2. TUSC2 Sonuçları	37
3.1.3. TUSC2- Pozitif Kontrol (GAPDH) Sonuçları	38
3.1.4. TXq21 Bölgesinin, TUSC2 Ve GAPDH İle Karşılaştırmalı PCR Sonuçları	39
3.1.5. TXq21 Bölgesinin PCR Ürünleri Sonuçları	39
3.2. Biyoinformatik Araştırmalar	40
3.2.1. DNA Dizileme	40
3.2.2. NCBI BLAST Analizi	40
3.2.3. BioEdit Programı Kullanılarak, Benzerlik Derecesi Ve Yakınlık Uzaklık Ağacının Tespiti	41
3.2.4. TXq21 Polimorfizm Analizi	43
3.2.5. Dizilerdeki Polimorfizm Tespiti	43
4. SONUÇLAR Ve TARTIŞMA	45
4.1. Bu Çalışmanın Devamında Yapılması Gerekenler	50
5. KAYNAKÇA	51

## KISALTMALAR

<b>Kısaltma</b>	<b>Açıklama</b>
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Ethylendiamintetrasedik asit
Kb	Kilobaz
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodium dodesi sülfat
U	Enzim Ünitesi
UV	Ultra-viole
bp	Base pair ( Baz çifti)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
EtBr	Etidyum bromür
gDNA	Genomik DNA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris borat etilendiamintetraasetik
TE	Tris-EDTA
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHAOK	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
TUSC2	Tumor Supressor Candidate 2 (Tümör Baskılayıcı Aday Gen 2)
TUSC4	Tumor Supressor Candidate 4 (Tümör Baskılayıcı Aday Gen 4)
Xq21	X kromozomunun 21 nolu bölgesi
TXq21	TUSC2'ye benzeyen Xq21 bölgesi
PAR	Pseudo Auotosomol Region (Yalancı Otozomal Bölge)
SNP	Single nucleotide polymorphism, Tek Nükleotit Polimorfizmi
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. TUSC2 ve TUSC4'ün lokalizasyon	19
Şekil 3.1. TUSC4 PCR ürünleri	37
Şekil 3.2. TUSC2 PCR ürünleri	37
Şekil 3.3. Sağlıklı bireylerde TUSC2-GAPDH agaroz jel görüntüsü	38
Şekil 3.4. Hasta bireylerde TUSC2-GAPDH agaroz jel görüntüsü	38
Şekil 3.5. Xq21 bölgesinin hasta bireylerdeki TUSC2, TXq21, X-Kontrol ve GAPDH primerleriyle çoğaltılmış PCR sonuçları	39
Şekil 3.6. Sağlıklı kişilerde TXq21 (Xq21:15322289-15323215 ) bölgesinin agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 3.7. Sağlıklı kişilerde TXq21 (Xq21:15322289-15323215 ) bölgesinin agaroz jel görüntüsü	40
Şekil 3.8. Xq21, TUSC2 ve Y kromozomu PAR bölgesinin BLAST programıyla [102] elde edilen benzerliği	41
Şekil 3.9. Hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki benzerlik ve yakınlık derecesi	42
Şekil 3.10. Hasta ve sağlıklı bireylerde c- > a polimorfizmi. Akciğer Kanserinin diğer kanserlere oranla gösterdiği yüksek korelasyon.	43
Şekil 3.11. Hasta ve sağlıklı bireylerde c- > a polimorfizmi. Çeşitli kanser tiplerinin sağlıklılara kıyasla gösterdiği korelasyon.	44



## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1. Akciğer Kanserinde görülen başlıca genetik değişiklikler	16
Çizelge 2.1. Genomik DNA (gDNA) izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri.	24
Çizelge 2.2. PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler	26
Çizelge 2.3. Primerler konsantrasyonlarının hesaplamaları	27
Çizelge 2.4. TUSC4 primerlerinin nükleotit dizileri, T <sub>m</sub> ve % GC değerleri	27
Çizelge 2.5. TUSC4 primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları	28
Çizelge 2.6. Primerler konsantrasyonlarının hesaplamaları	28
Çizelge 2.7. TUSC2 nükleotit dizileri, T <sub>m</sub> ve %GC değerleri	29
Çizelge 2.8. TUSC2 primerleri ile yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları	29
Çizelge 2.9. Primer konsantrasyonunun hesaplamaları	30
Çizelge 2.10. GAPDH nükleotit dizileri, T <sub>m</sub> ve %GC değerleri	30
Çizelge 2.11. GAPDH primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları	31
Çizelge 2.12. Primerler konsantrasyonlarının hesaplamaları	31
Çizelge 2.13. X-Kontrol nükleotit dizileri, T <sub>m</sub> ve %GC değerleri	32
Çizelge 2.14. X kromozom primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları	32
Çizelge 2.15. Primer konsantrasyonlarının hesaplamaları	33
Çizelge 2.16. TUSCm (Xq21) nükleotit dizileri, T <sub>m</sub> ve %GC değerleri	33
Çizelge 2.17. TXq21 primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları	34
Çizelge 2.18. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Maddelerin Temin Yeri ve Markaları.	35
Çizelge 2.19. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler	35

## ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca beni her konuda destekleyen, yönlendiren, ilgi ve yardımlarını esirgemeyerek bilgilerini paylaşan danışman hocam Yard.Doç. Dr.Ekrem DÜNDAR'a,

Çalışmam için gerekli, laboratuvar imkanlarını sağlayan Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi (BÜTAM) Müdürlüğü'ne ve merkezdeki tüm çalışanlara,

Ders ve deneyler aşamasında, deneyimlerini ve laboratuvar malzemelerini paylaşan Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a ve Araş. Gör. Hatice YILDIRIM'a,

Çalışmada kullandığım kanların temininde yardımcı olan Balıkesir Bal-Tıp Laboratuvarına, Özel Çağın Hastanesine, Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesine, Öznur SUAKAR ve Sabiha PARLAK'a,

Çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, yorulduğum anlarda her zaman yanımda olan; Araş. Gör. Görkem DENİZ'e, Meltem AYDIN'a, Evrim ÇELEBİ'ye, Pınar AYTAR'a

Laboratuvar çalışmalarımı yürütürken deneyimlerinden yararlandığım hocalarıma birçok anıyı paylaştığımız sevgili arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında benim için güç kaynağı olan, beni sınırsız destekleyen ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen biricik aileme,

Her zaman en yakınımda hissettiğim, yüksek lisansın tüm yorucu ve sıkıntılı anlarında beni sabırla destekleyen nişanlım Çağrı ZAMUR'a

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2007

Nurten ÇANAKÇI

## **1. GİRİŞ**

### **1.1. Kanser Nedir?**

Kanser kelime anlamı olarak İngilizce'de "yengeç" anlamına gelmektedir. Yengeç, düşmanını kısırdıktan sonra uzun, dişli kollarıyla sıkıca tutar ve yavaş yavaş kemirerek yer. Tedavi edilmediği takdirde, insanı giderek zayıflatıp halsiz düşüren ve sonunda öldüren bu hastalığa, bu nedenle "kanser" adı verilmiştir [1].

Kanser, belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ve zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan, hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur [2]. Kanser hücrelerinde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde (kromozom kayıpları, kromozomların yeniden düzenlenmesi) ya da tek bir nükleotid düzeyindeki (tek ya da çoklu baz değişiklikleri ya da DNA promotor bölge metilasyonu) değişiklikler olup sonuçta gen ürünlerinin ya da aktivitelerinin değişimine neden olabilmektedir [2, 3]. Kanser hücresinde meydana gelen bu genetik değişiklikler (onkogenler, tümör baskılayıcı genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur [3]

### **1.2. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri**

Kanser, hücrelerin sürekli olarak birikmesi ile karakterize edilen bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir. Bu hücreler istila yoluyla organizmanın organlarını hasara uğratırlar. Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki sonuç da hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik (aşırı hücre birikimi), hem kanser hücrelerindeki genetik

anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından dolayıdır [4].

### **1.2.1. Klonal Orijin**

Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Bazı kanserler birden fazla sayıda kötü huylu klonlardan doğar. Bu klonlar, dokunun birden fazla sayıda hücresinin karsinogene maruz kalmasıyla ya da bazı genlerdeki kalıtsal bozukluklar sonucu oluşurlar [4].

### **1.2.2. Sınırsız Sayıda Çoğalma (İmmortalite)**

Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler (çoğalırlar) ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluştururlar [5]. Kromozom uçları olan telomerler immortalitenin mekanizmalarından biridir. Hücre farklılaşırken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler [6]. Bu enzim normal olarak hücreler farklılaşırken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Tamamıyla farklılaşmış bir hücre istirahat durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır (immortal kalır) [4]. Kontrolsüz çoğalan ve kitle meydana getiren hücre topluluğu da, belirli bir süre sonra köken aldığı organın çalışmasını bozar. Bu kanser hücreleri yalnızca köken aldıkları doku ve organlarda kalmaz, komşu organ ve dokulara da yayılırlar. Kan ya da lenf sistemine karışarak uzak organlara da gidebilirler [7].

### **1.2.3. Genetik Dengesizlik**

Genetik dengesizlik (genetic instability), DNA tamirindeki ve DNA “yanlış baz eşleşme”lerini tanımadaki hatalardan dolayı ortaya çıkar ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar [4]. Genomik kararsızlık, kanser gelişiminin incelenmesinin temelinde ve tümör oluşumunda oldukça önemlidir [8]. Kanser hücreleri çoğalma kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların ayrıca yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar [4]. Aynı zamanda karyotipik olarak sayısal ve yapısal düzensizliklerde ortaya çıkar [9].

### **1.2.4. Temas İnhibisyonunun Ve Alt Tabakaya Tutunarak Büyüme Özelliklerinin Kaybı**

Kültür ortamında büyüyen normal hücreler, hücrelerin normalde yapıştığı substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde doldurduklarında bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını ihtiva etse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarıkatı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye (büyümeye) devam edebilirler. Hatta hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyüme devam edebilirler [7].

### **1.2.5. Çoğalmanın Büyüme Faktörlerinden Ve Besin Kaynaklarından Bağımsız Olarak Devamlı Artışı**

Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyüme devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler.

### 1.2.6. Metastaz

Kanserin, birincil (primer) odakla aralarında bir devamlılık olmaksızın vücudun başka doku ve organlarına yayılması olayıdır. Yayılım kabiliyeti olan kanser hücreleri kan ve lenf damarlarına veya vücut boşluklarına girerek vücudun başka organ ve dokularına yayılır ve oralarda yeni tümör odakları oluşturur [10].

Metastaz, iyi huylu tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Genel olarak büyük, kötü diferansiye ve hızlı büyüyen malign tümörlerin metastaz yapma kabiliyetleri yüksektir. Ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücre proteinlerinin kaybı ya da anormalliklerinden, hücreler arası interaksyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metaloproteaz gibi bazı enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır [4].

### 1.3. Hücre Döngüsü Ve Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü, çok iyi şekilde düzenlenmiş hücresel bölünmenin bazı fazlarını ve hücresel çoğalmayı kapsamaktadır [6]. Hücrenin bölünerek çoğalması için iki önemli sürece gereksinim vardır. Bunlardan bir tanesi, genetik yapının (DNA) kendisini kopyalayarak iki eş DNA molekülü oluşturması (Sentez-S fazı) ve bu çift genomu hücre bölünmesiyle yarıya indirilmesi (Mitoz- M fazı). M ve S fazları arasında G1, S ve M fazları arasında da G2 fazları bulunur [6, 7].

Birçok yetişkin dokulardaki hücreler bölünmeyen durumdadır. Bu faz hücre döngüsünün *Go fazı* olarak adlandırılır. Go durumundaki hücrelerin G1 fazına geçmesi bir takım özel olayları gerektirir. Bu olaylar hücreyi DNA sentezine teşvik eder ve bu safha “restriction point” (R) olarak bilinmektedir [11]. *G1 fazında* (ara faz), özel hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1

fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir [4]. *S fazında*(DNA sentezi fazı), DNA replikasyonu her kromozomun kopyasını yaparak kromozom sayısının ikiye katlanmasını sağlar [2]. *G2 fazında* ise DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder. Hücre mitozun başlamasına hazırlık zincirini içerir [2, 4]. *M fazında (mitosis)* protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozu takiben oluşan yeni hücreler ya Go ya da G1 fazına girerler [11].

Bölünmekte olan bir hücrenin G1, G2 ve M fazlarını geçmesinde belli düzenleme noktaları vardır. Bu düzenlemelerin bazıları protein fosforilasyonunu içerir. Protein kinaz (PK) olarak bilinen proteinlerin hücre döngüsünün S ve M fazlarındaki kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir. Bu enzimler hücre döngüsünde kompleks olaylara katılan çeşitli proteinlerin fosforilasyonuna yol açarak onların aktivitelerini düzenler.

Çeşitli büyüme faktörleri de Go/G1'de yarışma ve/veya ilerletme faktörü olarak rol oynarlar ve hücrelerin durağan durumdan bölünme durumuna geçmesini kontrol ederler [11]. Aynı zamanda hücre döngüsünde tümör baskılayıcı genler tarafından kontrol edilen ve kontrol noktası olarak adlandırılan yerler (G1/S ve G2/M) vardır, karsinojenler tarafından bu genler sıklıkla inaktive edilmesinden kaynaklı olarak hücre siklusu ile kanser genetiği birbiri ile çok yakından ilişkilidir [2, 6]. Bu nedenle kanser kontrol edilemeyen hücre çoğalmasıyla karakterizedir [12].

#### **1.4. Apoptozis**

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir.

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanıldığında hücre ölümü ile ilgili morfolojik değişiklikler serisi olarak tanımlanmıştır [13]. Köken olarak "apo-TOE-sis" den gelir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. Hücre çoğalması nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir [14]. Apoptozis, normal dokuların dengesi ve gelişimi için çok gereklidir [15]. Apoptozis ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. 1993 yılında Cohen [16] yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus (Göğüs boşluğu içinde yer alan iki parçadan oluşan bir organdır. Lenfosit, T lenfosit veya sadece "T hücreleri" timus'ta büyür, eğitilir ve olgunlaşır ve bağışıklık sisteminde üstlendikleri görevleri yerine getirmek üzere yeniden kana karışırlar) hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir [14].

#### **1.4.1. Apoptozisin Genetik Kontrolü**

##### **1.4.1.2. Antiapoptotik Proteinler (Protoonkogenler)**

Protoonkogenler, normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir [2, 14]. Protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar [14, 17, 18]. Protoonkogenler, hücre içi sinyal iletilicileri, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörleri olmak üzere beş kategoriye ayrılır [3]. Protoonkogenler, mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel regülasyon bozukluğu ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına ve sonuçta da kanserle ilişkili olarak kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olurlar [3, 7]. Aktive olan protoonkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir [3, 7]. 1969'da Huebner ve Tadora ilk olarak kanser gelişiminde onkogenlerin rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir [3]. Genel olarak kanserde birden fazla onkogen



anormal olarak aktiftir [4]. Kanselerde onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin keşfi ile kromozomal değişiklikler daha dikkat çeken ve kritik bir duruma gelmiştir [19]. Protoonkogenlerin aktifleşmesinde radyasyon, sigara dumanı ve katranındaki maddeler, kimyasal ajanlar ve virüsler gibi mutajen olan dış faktörlerin rolü bulunmaktadır [20]. Sigara kullanımı ile akciğer kanseri, radyasyon ile de; kan kanseri ve cilt kanseri arasındaki direk ilişkiler bilinmektedir [21].

### **1.4.1.3. Tümör Baskılayıcı Genler**

Kanser oluşumundan sorumlu diğer bir grup gen ise "tümör baskılayıcı genler"dir [22]. Bu genler adından da anlaşılacağı üzere tümör oluşturabilecek hücrelerin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayarak ve dengeleyerek kanser oluşumunu engellemektedir [7, 11, 14]. Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalması ve büyümesini yavaşlatan proteinleri kodlar. Ancak bu genin mutasyona uğramasına ya da eksikliğine bağlı olarak hücre kontrolü kaybolur ve hücre kanserleşir [4, 7]. Son yıllarda yapılan çalışmalar da tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar ve fonksiyon kayıplarının insan kanserleri ile sonuçlanabileceğini göstermiştir [23, 24]. Kanser gelişimi için tümör-baskılayıcı genlerin allellerinin her ikisinin de mutasyona uğraması gerekir [2].

Değişikliklerin hedefi olarak genler iki sınıfa ayrılır. Bunlar onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenik alleller kansere yol açan mutasyonlar taşırlar, tümör baskılayıcı genler ise (hücrel çoğalmayı kontrol altında tutan genler) inaktive olduklarında kansere yol açan genler olarak bilinirler [25, 26].

## **1.5. Kanser Oluşturan Etmenler**

Kanserin kesin sebebi ya da sebepleri bilinmemektedir. Kanserden sorumlu olan genler, çevresel faktörler, kanser oluşumuna yol açan virüsler, radyasyona maruz kalma düzeyi, meslekle ilgili olarak fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalma, bağışıklık sistemindeki bozulmalar, çeşitli kimyasal maddeler, güneş ışığına maruz kalma ile diğer tütün kullanımı gibi kişisel alışkanlıklar kanser sebepleri

arasında sayılmaktadır. Tüm kanserlerin en az %50'sinin çevresel etmenlerle uyarıldığı tahmin edilmektedir. X ışınlarına maruz kalma, ultraviyole ışını, virüsler ve ilaçlar gibi kimyasal maddeler kanser gelişiminde belirgin roller oynamaktadır [2].

Kanserleşen hücrelerdeki temel bozukluğun genlerdeki farklılaşmayla başladığı düşünülmektedir. Genlerdeki bozukluklar doğuştan olabileceği gibi, sonradan meydana gelen bir etkiyle de olabilir. Genlerde mutasyon denilen bozulmalar hücrenin normal kontrol mekanizmalarını bozup kontrolsüz çoğalmasına yol açmaktadır. Örneğin, hücrelerin büyümesini kontrol eden p53 geni hücrede yoksa ya da bu gen hasar gördüyse, anormal hücre büyümesi baskılanamaz ve hücre kontrolsüz çoğalarak kansere yol açar [7].

### **1.5.1. Kalıtsal Faktörler**

Kanserlerin yaklaşık %20'sinin kalıtsal nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Tüm meme kanserlerinin %5- 10'u ailevi geçişe bağlıdır. Ailevi meme kanserlerinin %90'ında, BRCA1 ve BRCA2 geninde bozukluk vardır. Ailesinde meme kanseri olmayan kişilerde bile bu iki genin bozuk olması, meme kanserine yol açmaktadır. Kalıtımın önemli olduğu diğer bir kanser türü de bağırsak kanseridir. Ebeveynlerde bağırsak polipi ya da kanseri olan kişilerin bağırsak kanserine yakalanma riski diğer insanlara göre daha fazladır. Babasında prostat kanseri olan erkeklerin de ileride prostat kanserine yakalanma riski de yüksektir [7].

### **1.5.2. Yaş**

Her yaş grubunda tümör görülebilmekle beraber, kanserler daha ziyade 55 yaşın üzerindeki insanlarda ortaya çıkmaktadır [27]. Erişkinlerde tümörler sıklıkla vücudun dış ve iç yüzeylerini döşeyen epitel ve yaşlanmakla birlikte bazı değişikliklere uğrayan organlardan (örneğin erkeklerde prostat, kadınlarda meme, rahim) köken alır. Çocuklarda ise tümörler çoğunlukla hızla gelişme gösteren doku

ve organlardan köken alır. Örneğin, kemik iliği, kemik, olgunlaşmamış sinirsel elemanlar gibi [28].

### **1.5.3. Cinsiyet Ve Hormonlar**

Bazı tümörlere erkeklerde, bazılarında ise kadınlarda daha çok rastlanılır. Bu durum daha ziyade cinsiyet hormonları ile ilişkili görünmekle beraber, alışkanlıklar, meslek ve çevre koşulları, immunolojik ve genetik faktörler de etkin olabilir [29].

Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar, insanlarda bazı tür tümörlerin hormon tedavisine cevap vermesi ve yine tümör tedavisinde endojen hormon kaynaklarının ortadan kaldırılması (overlerin, testislerin çıkarılması gibi) operasyonlarının uygulanması, hormonlar ile bu hormonların hedef olduğu organ kanserleri arasında bir ilişki olduğunu yeterince vurgulamaktadır [30].

### **1.5.4. Çevresel Faktörler**

Ultraviyole ışınları (U.V.) ve iyonizan radyasyonun (X ve gamma ışınları, alfa ve beta parçacıkları, protonlar, nötronlar) somatik mutasyona sebep olarak insan ve deney hayvanlarında tümör oluşturduğu tespit edilmiştir [31]. Radyasyon önemli bir kanser nedenidir. Radyasyonun cinsi, dozu, maruz kalma süresi ve kişiye ait faktörlerin (yaş, hormonal durum, immunité vs.) de rolü vardır [32]. DNA zincirinde kırılmalara, böylece kromozom yapısında bozulmalara yol açmaktadır. Radyasyona maruz kalan hücrelerde, anormal kromozom yapıları görülmektedir. Kromozom parçaları yer değiştirip birbiri üzerine binebilmektedir. Bunun sonucunda hücrede anormal proteinler oluşmaya başlar ve hücrelerin normal kontrol mekanizmaları devre dışı kalır [7, 32]. Radyasyona maruz kalan hücrelerde kanserleşmenin meydana gelmesi için gereken dönem birkaç yıldan, 30-40 yıla kadar değişir [33].

Başlıca radyasyon kaynaklarından biri de, morötesi ışınlar yayan Güneş'tir. Tüm cilt kanserlerinin %90'ından fazlasına, Güneş'in bu zararlı ışını yol açtığı tahmin edilmektedir. Son yıllarda ozon tabakasındaki delinmeler nedeniyle

yeryüzüne ulaşan morötesi ışınların miktarı artmıştır. Bu da, cilt kanserlerinin son yıllarda artmasının önemli bir nedeni olarak gösterilmektedir [7].

Radyasyonla oluşan kanserler arasında birinci sırayı lösemiler (kan kanseri) almaktadır. İkinci sırada meme, akciğer ve tükürük bezi kanserleri gelmektedir. Deri, kemik ve gastrointestinal yol nispeten dirençlidir. Tedavi amacıyla kullanılan radyasyonun bile kanser etkili olabildiği gösterilmiştir [33].

### 1.5.5. Virüsler

Çeşitli virüsler de kansere yol açmaktadır. Örneğin *Epstein-Barr* virüsü (EBV), Burkitt Lenfoma ve lenfoepitelyoma denen burun ve boğaz bölgesini etkileyen kanserlere yol açar. B tipi sarılığa yol açan hepatit B virüsü (HBV) ve Hepatit C karaciğer kanseri yapabilmektedir. İnsan papilloma virüsü (HPV) kadınlarda rahim kanserine yol açar. *Human T-cell leukemia/lymphoma virus* (HTLV-1), bu virüsle enfeksiyon olmak kişilerde lenfoma ve lösemi kanser riskini arttırmaktadır. *Human immunodeficiency virus* (HIV), bilindiği üzere AIDS'e sebep olmaktadır. HIV ile enfekte olan kişilerde kanser riski çok fazla artmaktadır. Enfekte olan kişiler genellikle, lenfoma kanserine ve nadir olarak da Kaposi's sarkoma ya yakalanır [7, 34].

Bu virüsler, kapsüllerinin içerisinde DNA taşır; hücre içerisine girdikten sonra kendi DNA'larını hücrenin DNA'sına entegre eder ve kendilerini kopyalar. Bu entegrasyon, hücrenin DNA yapısını etkilediği için normal hücre çoğalmasını da etkiler [7]. Herpes Simpleks Virüs ve Human Papilloma Virüs (HPV) sigaraya bağlı kanserler ile ilişkilidir. Serviks kanserlerinin % 90'ında HPV enfeksiyonu gösterilmiştir. Pek çok çalışmada baş-boyun ve akciğer kanserlerinde de düşük oranda HPV enfeksiyonu gösterilmiştir [3, 34]. Bazı virüsler ise, genetik şifre olarak RNA taşır. Bu virüsler hücre içerisine girdikten sonra "ters transkriptaz" denilen bir enzim sayesinde hücrenin virüs DNA'sı üretmesini sağlarlar. Bu DNA, daha sonra hücre DNA'sıyla birleşir. Hücredeki genler arasına entegre olan bu virüs bilgileri, bazen hücrelerin anormal çoğalmasına yol açar. Onkogen adı verilen bu genlerle

enfekte olan hücreler kanserleşir [35]. HTLV-1 gibi bazı virüsler, bu tür kanser yapıcı onkogenleri taşır ve hücreye bulaştırır. Onkogenler yalnızca virüslerde yoktur. Hücrenin içindedeki sessiz duran onkogenler vardır. Bunlar hücre DNA yapısındaki bozulmalara yani mutasyonlara bağlı olarak, aktif hale geçip hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açarlar. Bazen hücreyi enfekte eden virüsler de bu onkogenleri aktif hale geçirebilirler. Aktif hale geçen onkogen hücrede çeşitli büyüme ve çoğalma proteinlerinin yapımını artırır [7].

Koyunlarda yapılan çalışmalarda, akciğer kanserinin retrovirüsler tarafından oluşturulabileceği ortaya çıkmasına rağmen insan akciğer kanserlerinin retrovirüsten kaynaklı olup olmadığı konusunda henüz bir kesinlik yoktur [36].

#### **1.5.6. Kimyasal Maddeler**

Kimyasal karsinojen maddelerle ilgili olarak ilk çalışmalar 1775'de, bir İngiliz cerrahı olan POTT' un, baca temizleyicilerinde gözlenen deri kanserlerinin baca kurumuna (katrana) bağlı olduğunu ileri sürmesi ile başlanmıştır. 1932 yılında, katran içerisindeki birçok kimyasal maddeden yüksek dereceli karsinojen etkiye sahip bir hidrokarbon olan benzopiren izole edilmiştir. Daha sonra ise değişik kaynaklardan yüzlerce kimyasal madde bulunmuştur [37].

Çeşitli kimyasal maddelerin kanser oluşumundaki rolünü belirlemek için yoğun çalışmalar devam etmektedir. Kimyasal karsinojenlerin başlıcaları şunlardır:

- Alkilleştirici maddeler
- Polisiklik ve heterosiklik aromatik hidrokarbonlar
- Aromatik aminler, amidler, azot boyaları
- Bitki ve mikrobiyal ürünler
- Diğerleri (Örneğin; Vinil klorit gibi endüstriyel ürünler, krom, nikel, asbest gibi inorganik maddeler, bazı ilaçlar) [38].

Sigara içilmesi ile başta akciğer kanseri olmak üzere bazı kanser türleri arasındaki ilişkiler bilinmektedir [21]. Nikotin bağımlılığı akciğer kanser gelişiminde potansiyel olarak en önemli genetik faktördür [39]. Sigara halen önlenemez sağlık durumu bozukluğu ve erken ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır [40].

Sigaranın içerisinde hem kanser sürecini başlatan hem de hızlandıran maddeler bulunmaktadır. Sigara, her üç kanser ölümünün birinden sorumlu iken akciğer kanserinde kadınlarda % 77.4' ünden, erkeklerde ise % 85-90'ından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir [41]. Bunlara ek olarak sigara tüketimi ağız, gırtlak, yemek borusu, mide, pankreas, böbrek ve mesane kanserlerine de yol açmaktadır [27].

Sigaranın katranı aracılığıyla bünyeye karışan yaklaşık 4000 çeşit kimyasal ajanın hücredeki çeşitli moleküllerin yapısını bozması ve biyokimyasal mekanizmalarda aksamalara neden olması pek çok çalışma ile ortaya konmuştur. Hatta bunlar içinde kanserojen olanlar bile (örneğin; benzopryn, 2- toludin, akrilonitril, 4-aminobiyofenil, benzen, hidrazin, arsenik, kromium ve kadmiyum) saptanmıştır [42].

Alkolün içerisinde de kanseri hızlandıran maddeler vardır. Alkol, ağız, gırtlak ve yemek borusu kanserine yol açan maddelerden biridir [7, 43]. Sigara ve alkol birlikte tüketiliyorsa, akciğer ve yemek borusu kanseri riski büyük ölçüde artmaktadır. Yalnızca sigara ya da yalnızca alkol kullanan kişilerde bile yemek borusu kanseri görülme oranı, kullanmayanlara göre 6 kat daha fazladır. Hem alkol hem sigara kullananlardaysa bu risk kullanmayanlara göre 40 kat daha fazla olmaktadır [7]. Sigara içilmesi ile başta akciğer kanseri olmak üzere bazı kanser türleri arasındaki ilişkiler bilinmektedir [21].

Birçok çalışma asbestos, benzen, benzidin, kadmiyum, nikel veya vinil kloride maruz kalmanın akciğer kanser nedeni olduğunu göstermektedir [34].

Arsenik genotoksik etkilidir ve özellikle karaciğer, mesane, deri ve akciğer kanserlerine yol açmaktadır [44].

### **1.5.7. Besinler**

Aldığımız gıdalar da kanser oluşumunda etkilidir. Hangi gıdaların kesin olarak kanserle ilişkili olduğu bilinmemektedir. Yağlı yiyeceklerden ve fazla proteinden kaçınmanın, kanser riskini azalttığı düşünülmektedir. Aşırı et yemenin, özellikle bağırsak kanseri riskini artırdığını gösteren bulgular vardır. Meyve ve sebze bakımından zengin diyetlerse, kanser riskini azaltmaktadır. Diğer bir görüş de, gıdaların bağışıklık sistemini etkileyerek kanseri engellediği ya da başlattığıdır [45].

## **1.6. Türkiyede Ve Dünyada Kanser**

Geçen 20 yıldan fazla süredir çeşitli kansere bağlı genlerin karakterizasyonu ve tanımlanması ile insan kanserinin moleküler patojenitesinin anlaşılmasına karşı önemli gelişmeler olmuştur [24]. Kanser etiyojisinde genetik ve çevresel faktörlerin çok büyük önem taşıdıkları bilinmektedir [46, 47]. Kanser görülme sıklığı coğrafi bölgelere ve etnik gruplara göre değişkenlik göstermektedir [46]. Gelişen ülkelerde akciğer kanseri, kanser ölümlerinin başında gelen nedendir. Her yıl 1.2 milyon kişiye akciğer kanseri teşhisi konulup, 1.1 milyon kişi de bu hastalık nedeni ile ölmektedir [6]. Dünyada en sık kanser ölüm oranı Lüksemburg'da 100.000 de 311, en düşük kanser ölüm oranının rapor edildiği ülkeyse 100.000 de 38'le El Salvador'dur [48]. Kanser, Türkiye'de 1982 yılında 1593 sayılı Umumi Hıfzısıhha Kanunu'nun 57. Maddesi gereğince "bildirimi zorunlu hastalıklar listesi"ne alınmış olmasına rağmen ülkemizde gerçek kanserli sayısı hiç bilinmemektedir [49]. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre ülkemizde kalp hastalıklarından sonra en sık ölüm sebebi kanserdir [50]. Ülkemizde, 1-14 yaş arası çocuk ölümlerinde kanser beşinci sıradadır [7]

1993 yılında Sağlık kuruluşlarından Kanserle Savaş Dairesi'ne bildirim yapılan kanser vakalarının incelenmesi sonucunda 23100 kanser vakasının 22079'u

değerlendirilmiş (çift veri girişi ayıklandıktan sonra) ve ülkemizde kanser oranı yüz binde 36.7 olarak tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalara göre yüz binde 100-150 olması gerektiği hesaplanan Türkiye genelinde beklenen kanser oranına ulaşamamıştır [49]. Türkiye'de kanser görülme sıklığı, en az yüz binde 100 olarak hesaplanmaktadır. Bu da yılda en az 75 bin yeni kanser hastası anlamına gelmektedir [7]. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre en sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer, mide, lenfoma, gırtlak, lösemi ve deri, kadınlarda da meme, rahim, mide, akciğer, lösemi ve lenfomadır. Ülkemizde kanser ölümleri en çok 55-65 yaş aralığındadır. Akciğer ve meme kanserinden ölümler, yıllar içerisinde artış gösterirken, mide kanserinden olan ölümlerse gün geçtikçe azalmaktadır [7, 49].

### **1.7. Akciğer Kanseri**

Bazı genlerin, özellikle de karsinojen metabolizması ile ilişkili genlerdeki kalıtsal polimorfizmin çeşitli çevresel etkenler ile değişimi sonucu bireyde akciğer kanseri gelişme olasılığının arttığı gösterilmiştir [3]. Akciğer kanserleri baskın onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerin çeşitli genetik veya epigenetik değişikliklerini içeren çok aşamalı bir süreçten sonra gelişir [51]. Tümör baskılayıcı genin fonksiyon kaybı insan akciğer kanserinde kritik bir adımdır [52, 53]. Akciğer kanseri ile ilgili aktivite gösteren onkogenlerin 6 familyası vardır: En önemlileri Ras (H-ras, K-ras, N-ras) ve Myc (N-myc, C-myc, L-myc)'dir [20]. Klinik olarak akciğer kanseri gelişene kadar 10-20 adet genetik hasarın oluşması gerektiği bilinmektedir [3, 24]. Akciğer kanseri oluşumunda başlıca genetik olaylar şöyle sıralanabilir:

- I. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu
- II. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu
- III. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- IV. DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- V. Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler [3, 20].



Sigara içmek akciğer kanserini tetikleyen en büyük nedenlerinden biri olarak bilinir ve vakaların yaklaşık %90'sı sigara ile bağlantılıdır. Günde içilen sigara miktarı, yaş ve cinsiyet ile akciğer kanseri riski arasında doğru bir orantı vardır [54]. Sigaranın kanserojen etkisi akciğer kanserine neden olan genlerle ilgili birçok değişiklikten kaynaklanan tümör oluşumuyla ortaya çıkar [55]. Ancak akciğer kanserlerinin %10'uysa hiç sigara içmeyen kişilerde görülebilmektedir ve %1'lik kısmının ise pasif sigara dumanının neden olduğu bulunmuştur [46]. Akciğer kanseri, bilindiği üzere oldukça öldürücü bir hastalıktır. Bu hastalığa yakalananların ancak %15 kadarı 5 yıl yaşayabilmektedir [7, 54]. Moleküler teşhisler yardımı ile akciğer kanserinin objektif ve sistematik tanısı kesin olarak yapılabilir [56]. Ancak akciğer kanserli hastaların %70'inden fazlasında kanser teşhisi, hastalık çok ilerlemiş durumda iken konulabilmektedir. Bu nedenle, hastalık teşhisi konulduktan sonra hastaların tedavi edilmesine fırsat kalmadan hastalar çok kısa süre içerisinde hayatlarını kaybetmektedirler [57].

Akciğer kanserlerinin %90-95'i bronş yüzey epitelyumundan ve bronş mukoza salgı bezlerinden kaynaklanır [58]. Akciğer kanseri 2 tip histolojik gruba ayrılır [49]. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK, SCLC, %7-25) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK, NSCLC, %5-15). Çizelge 1.1'de akciğer kanserinde KHAK ve KHOAK'da görülen başlıca genetik değişiklikler gösterilmiştir. Küçük hücreli karsinoma büyük çekirdekli lenfositlere göre daha geniş hücrelere sahiptir. Sitoplazmik oranları ve çok ince bölünmüş kromatinleri ve önemsiz nukleuslara sahiptirler. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK) büyük hücrelerden oluşur ve farklılaşmamış hücreler diğer tiplerin kriterlerine uymazlar [59]. KHOAK'nin tedavide ve tanımlanma hususunda yardımcı olacağı için alt tiplerine ayrılma gereği duyulmuştur [60]. Bu sebepten dolayı adenokarsinom (%10-25), skuamöz hücreli kanser (%40-60), büyük hücreli akciğer kanseri şeklinde olmak üzere 3 büyük alt gruba ayrılmıştır [57, 58, 61]. Adenokarsinoma, salgı bezi veya musin salgılarında görülür. Skuamöz hücreli kanser, keratin formasyonu gösterir ve hücreler arası köprülerde görülür [59]. Bu 4 tip klinik özellikler, tedaviye cevap ve hastalığın seyri hakkında tahminde (prognosis) farklılık gösterir. Fakat bu tiplerin dağılımı sigara içenler ve içmeyenler arasında değişir [54]. Akciğer kanserinin histolojik tiplerinde skuamöz hücreli

kanser ve küçük hücreli karsinomalar, adenokarsinomaya oranla sigara içimi ile bağlantılı olarak daha sık ortaya çıkmaktadır [62, 63]. Fakat adenokarsinoma sigara içen ve içmeyen kişiler fark etmeden, kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmektedir. Hiç sigara içmeyen akciğer kanserli hastalarda adenokarsinoma en sık gözlenen histolojik tümör tipidir [64-66]

**Çizelge 1.1.** Akciğer Kanserinde görülen başlıca genetik değişiklikler

	<b>KHAK</b>	<b>KHOAK</b>
Kromozom 3p (LOH)	++++	+++
Kromozom 5q(LOH)	+++	++
p6 mutasyon	-	++
p53 mutasyon	+++	++
Rb mutasyon	+++	+
L-myc amplifikasyonu	+	-
N-myc amplifikasyonu	+	-
c-myc amplifikasyonu	+	+

KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri, KHOAK: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, LOH: Heterozigozite kaybı, Rb: Retinoblastoma, ++++: Çok fazla ekspresyon, +++: Fazla ekspresyon, ++: Orta dereceli ekspresyon, +: Az ekspresyon, -: ekspresyon yok [67].

Türkiye’deki akciğer kanser olgularının % 90.4’ ü erkek, % 9.6’sı kadındır ve % 79.5’ini küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK / NSCLC) teşkil ederken % 20.5’i de küçük hücreli akciğer kanseridir (KHAK / SCLC) [68]. Ülkemizde akciğer kanserleri içinde adenokarsinomların oranı artış eğilimindedir [66, 69, 70]. Epidermoid karsinom, küçük ve büyük hücreli karsinom sayısı erkeklerde, 1980’lerin ortalarından itibaren düşmeye başlamıştır. Kadınlarda ise tüm histolojik tiplerdeki akciğer kanseri sayısında artış mevcuttur [71].

1912’de tıp kitabında William Ostler, ‘akciğerde tümör oluşumunun gözlenmesi nadirdir’ demiştir [72]. Oysa günümüzde akciğer kanseri, dünyada ve

Türkiye’de kansere bağlı ölümlerin en başında gelmektedir [73-75]. Gelişmiş ülkelerde akciğer kanserine bağlı ölüm oranları azalmaktayken gelişmemiş ülkelere gün geçtikçe artmaktadır [76, 77]. Dünya çapında akciğer kanserinden ölüm sebepleri erkeklerde ilk sırada, kadınlarda da göğüs kanserinin ardından gelmektedir [53, 78].

Avrupa ve Amerika’da yapılan çalışmalara göre erkeklerde, Kuzey Amerika’da ve Avrupa’nın Doğusunda akciğer kanseri en yüksek oranlarda iken kadınlarda bu yüksek oran Güney Amerika’da ve Avrupa’nın Güney ve Batısında yaygın olarak görülmektedir. Avrupa’da 2000 yılında yaklaşık olarak 375000 akciğer kanser hastasının 303000’i erkek, 72000’i kadın olarak tahmin edilmektedir. Ölümle sonuçlananların sayısı ise yaklaşık olarak 347000 (280000 erkek, 67000 kadın ) dir [79].

Ülkemizde ise akciğer kanseri erkekler arasında % 26.3 ile birinci ölüm nedeni iken kadınlarda % 4.5 ile dördüncü ölüm nedeni arasındadır ve akciğer kanseri vakalarına 56.2 ile 60.9 yaşları arasında daha sık rastlanmaktadır. Fakat son yapılan çalışmalarda akciğer kanser hastalarının %10-15’inin 50 yaş altında olduğu saptanmıştır [66].

### **1.7.1. Akciğer Kanseri Etmenleri**

Sitogenetik ve karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon çalışmaları, tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenlerin değişikliklerinin akciğer kanserinin meydana gelmesinde ve ilerlemesinde önemli olduğunu göstermiştir [80]. En büyük sebep sigara içmek olup kadınların %75’inde ve erkeklerin %90’ında akciğer kanserinden sorumludur [6]. Hem aktif hemde pasif sigara içiciliği akciğer kanserinin gelişiminde önemli risk faktörüdür [81]. Endüstriyel ve çevresel alandaki ağır metaller, petrol kimyasalları gibi karsinogenler de akciğer kanseri nedenidir [36].

20. yy. başlarında yüksek oranda radon gazı ve radyoaktif gazlara maruz kalma ile akciğer kanseri arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir [82]. 1943 yılında

Alman bilim adamları asbestosu akciğer kanseri etkeni olarak açıklamışlardır [38].

### **1.8. 3p21 Kromozom Bölgesi Ve Önemi**

3p21 deki kromozom kayıpları akciğer, mide tümörleri ve göğüs kanserlerini içeren farklı tümör tiplerinde geniş çapta tanımlanmıştır. Ayrıca birçok tümör tipinde kromozom 3'te sıklıkla ortaya çıkan kayıplar nedeniyle bu bölgenin bir veya birden fazla sayıda tümör baskılayıcı gen içerdiği güçlü kanıtlarla vurgulanmıştır [25, 51, 83]. Yapılan çalışmalar sonucunda insan kromozom 3p21.3 bölgesinin 120kb'lık homozigot delesyon bölgelerinde bir grup (CACNA2DA, PL6, 101F6, NPRL2, BLU, RASSF1, FUS1, HYAL2 ve HYAL1) aday tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır [51]. Kromozom 3'ün kısa kolundaki delesyonlar akciğer kanserinde en sık gözlenen genetik değişikliklerdir. Bu 3p kromozomundaki genlerin keşfi kısmi olarak teşhis ve tedavi için yararlı olabilir. Çünkü 3p kromozom değişiklikleri akciğer kanserinin erken safhalarında ortaya çıkmaktadır [84]. Aynı zamanda akciğer kanserinde sıklıkla, 1p, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 18q ve 21q kromozomlarında da delesyonlara rastlanmaktadır. Son zamanlarda Girard ve arkadaşları [85] 399 tane microsatellit marker kullanarak genom çapında yaptığı araştırmada 36 akciğer kanser hücre hattında LOH saptamıştır [20]. Bu rapora göre 1p, 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10p, 10q, 13q, 15q, 17p, 18q, 19p, Xp and Xq kromozomal bölgeleri sıklıkla delesyona uğramaktadır. 2p23, 8q24, 18q11 ve Xq22 kromozomlarında yeni bulunan homozigot delesyonlarda bu kromozomal bölgelerde de yeni tümör baskılayıcı genlerin var olabileceğini vurgulamaktadır [86].

KHAK'nin %90'ından fazlasında ve KHOAK'nin % 50-80 arasında incelendiğinde kromozom 3'de kısmi allelik kayıplar gözlemlenmiştir. 3p delesyonları göğüs, böbrek, baş, boyun, içeren çeşitli kanserlerde de gözlemlenmiştir [52, 84].

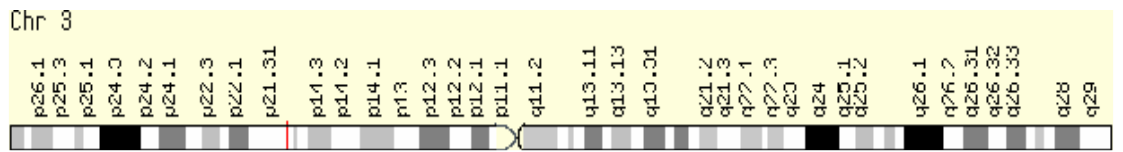
KHAK'de, p53 ve Rb tumor baskılayıcı genlerin inaktive olduğu gösterilirken, p53 ve p16 sıklıkla KHOAK'de inaktive olmaktadır [87, 88].

Bu nedenle 3p tümör baskılayıcı genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu

akciğer kanserinin tedavi ve teşhisinde yeni hedeflerin geliştirilmesinde ilk adım olacaktır. Bu bölgedeki tümör baskılayıcı gen aramaları 20 yılı aşkın süredir çok geniş araştırmalarla devam etmektedir ve çok kısa süre içinde bu bölgede ki birçok genin haritalanması ve karakterizasyonu tamamlanmış olacaktır [52].

### 1.9. TUSC2 (Tumor Supressor Candidate 2: Tümör Baskılayıcı Aday Gen 2) ve TUSC4 (Tumor Supressor Candidate 4: Tümör Baskılayıcı Aday Gen 4) Genleri

TUSC2 ve TUSC4'ün biyoinformatik araçlarla yapılan ilk analiz sonucunda akciğer kanserine neden olduğu tahmin edilen tümör baskılayıcı aday genlerinden olduğu tespit edilmiştir. TUSC2 ve TUSC4 genleri şekil 1.1'de görüldüğü gibi 3.kromozomun p21.3 bandında yerleşmiş haldedir. TUSC2, 3.3 kilobaz (kb) uzunluğunda 3 ekzondan oluşmakta olup, mRNA büyüklüğü de 1691 baz uzunluğundadır. FUS1 gen ailesinin içinde bulunmaktadır [89]. TUSC4 geni ise, 3.3 kilobaz (kb) uzunluğunda ve 11 ekzondan oluşmaktadır. mRNA 1441 baz uzunluğundadır. BLAST analizine göre TUSC2 3.3kb büyüklüğündeki fare (*Mus musculus*) Fus1 genine, TUSC4 ise sıçan (*Rattus norvegicus*) Tusc4 proteinine benzemektedir [90].



Şekil 1.1. TUSC2 ve TUSC4'ün lokalizasyonu [91].

### 1.10. Tusc2, Xq21 Ve Y Kromozomunun Par Bölgesi

Y kromozomunun her iki ucunda psödootozomal bölgeler (pseudoautosomal regions:PARs) olarak adlandırılan bölgeler vardır. Bu bölgeler X kromozomu ile homoloji göstermekte ve mayoz sırasında X kromozomu ile bağlantı kurarak yeniden düzenlenmektedir [2].

Şekil 3.8’de görüldüğü gibi Y kromozomu PAR bölgesi, TUSC2 geni, Xq21’in (15322289.nt – 15323215.nt) birbirine olan benzerliğinin % 80’den fazla olduğu saptanmıştır. Xq21 (15322289.nt – 15323215.nt) ve TUSC2 gen bölgesinin birbiri ile %92’lik bir benzerlik göstermektedir. X kromozomunun, 15322289.nt – 15323215.nt arasında biyoinformatik araçlar yardımı ile tarama yapıldığında bu bölgede henüz tanımlanmış bir gen olmadığı karşımıza çıkmaktadır. TUSC2 gen bölgesi ile bu bölgenin birbirine çok yüksek oranda benzemesi sonucunda bu bölgenin de kanserleşme sürecinde aday geni içerebileceği veya TUSC2 geninin bu noktaya transpozisyon sonucu bağlanmış olma ihtimalinin söz konusu olduğu düşünülmektedir.

### 1.11. X Kromozomu Ve Kanser

İnsan genomunda yaklaşık 2.85 milyar baz çifti ve 23 çift kromozom vardır. Bu kromozomlara dağılmış, yaklaşık 20-25 bin tane protein kodlayan gen mevcuttur [92]. Genler, organizmadaki işlevsel moleküller olan proteinleri kodlarlar. Bütün genomun ancak yaklaşık %2’sini oluşturan genlerin içerdiği dizim hataları (mutasyonlar), organizmalarda yapı ya da işlev bozukluklarına, bir başka deyişle hastalıklara neden olabilirler.

Her iki eşeye ait hücrelerde eşit sayıda otozomların olmasına karşın, normal bir kadında iki X, normal bir erkekte sadece bir X olması özgün bir durumdur. Dişi bireyler, X kromozomlarından iki kopyaya sahip olmalarından dolayı, X’e bağlı gen ürünlerini de iki kat fazla üretme potansiyeline sahiptirler [2]. X kromozom inaktivasyonu (XCI), memeli erkek XY ve kadın XX arasında, X-bağlantılı genlerin

dozlarına karşılık ortaya çıkan bir süreçtir ve XCI bölgesi asıl kontrol birimidir. Bu süreç kadınlarda embriyonik gelişimin erken dönemlerinde iki X kromozomundan bir tanesinde transkripsiyonel engellemeden oluşmaktadır [93].

Düzensiz X kromozom inaktivasyonu (Skewed X Chromosome Inactivation: SXCI) ile ilgili birkaç tane mekanizma öne sürülmüştür ve bu mekanizmaların önemi hakkında çok az bilgi mevcuttur. 1999 yılında Buller ve ark. [94] SXCI'nın yumurtalık kanseri ve BRCA1 mutasyonları ile bağlantılı olabileceği gösterilmiştir [95]. Kristiansen ve ark. [96] genç göğüs kanserli bireylerin kan hücrelerinde yapılan çalışmada SXCI sıklığının artmasına paralel olarak erken dönemde göğüs kanserinin gelişimi ile alakalı olabileceği öne sürülmüştür. Son yapılan çalışmalarda 60 yaş ve daha yaşlı olan kadınlarda, genç bireylere oranla SXCI frekansının daha yüksek olduğu saptanmıştır [97].

Kadınlarda kan hücrelerindeki SXCI, erken dönemde akciğer kanserinin gelişimi ile alakalıdır. Akciğer kanseride dahil olmak üzere bazı kanser tiplerine yatkınlığın saptanmasında kadınlarda X kromozomu inaktivasyonunun izlenmesi yararlı olabilecektir [95]

Buller ve ark.[94] raporların da, BRCA1 mutasyonlarında ve ovaryum kanserlerinde kadınların somatik dokusundaki X-kromozom inaktivasyonunun rastgele olmadığını buldular. Bu araştırmacıların. ilginç önermesine göre, rastgele olmayan inaktivasyonlar gözlemlendiğinde, X kromozomunda aday tümör baskılayıcı genlerin var olabileceğini ve bu nedenle kanser gelişiminin gözlemlendiği saptanmıştır [95, 97].

Erkek bireyler ise çekinik (resesif) kalıtsal hastalıklara yakalanma açısından daha şanssızdırlar. Tek X kromozomu taşımaları, o kromozomdaki bir gendeki bozukluğun hastalık olarak kendini göstermesine yol açar. Örneğin, Duchenne tipi kas hastalığı (Duchenne Muscular Distrophy: DMD) 3300 erkek çocuğun birinde görülmesine karşın, bu hastalık kızlarda yok denecek kadar azdır. Anne ve taşıyıcı kız kardeşlerin oğullarında hastalığın çıkma olasılığı %50'dir. X kromozomu geçişli başka genetik hastalıklara / bozukluklara örnek olarak hemofili (kanın

pıhtılaşmaması ) ve renk körlüğünü örnek olarak verilebilir [98].

Mart 2001'de, NCBI'daki SNP veribankasında (dbSNP) X bağlantılı SNPs sayısının 1844 tane olduğu saptanmıştır. Bu dizilerin orjini (kökeni) analiz edildiğinde 141 tane ekspres olan diziden 99 tanesi farklı gene karşılık gelmiştir [93].



## **2. MATERYALLER VE METODLAR**

### **2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar**

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar, Merck, Sigma, Fermentas, Carlo Erba, Applichem ve Biobasic'ten yerli firmalar aracılığıyla temin edilmiştir.

### **2.2. Kullanılan Örnekler**

Araştırmada, kontrol grubunu 21 – 79 yaş aralığında ki 9 birey oluşturmaktadır. Bu bireyler her iki cinsiyetten, kanser geçmişi bulunmayanlardan ve kanser teşhisi konulmayanlardan oluşmaktadır. Kanser hastalarına ait kan örnekleri ise 19 – 69 yaş aralığında kanser teşhisi konmuş 12 gönüllü bireyden temin edildi.

### **2.3. Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması**

Bu çalışmada kullanılan ependorf tüpleri, PCR tüpleri, pipet uçları, cam malzemeler, çözeltiler (SDS hariç) ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C'de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edildi. Çalışmaya başlamadan önce pipetler ve çalışılan yüzey %70'lik alkol ile temizlendi.

### **2.4. Kandan Genomik DNA İzolasyonu**

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kanlardan genomik DNA (gDNA) izolasyonu için Miller ve arkadaşları [99] tarafından geliştirilen metot bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Bu metoda göre, 400 µL EDTA'lı kan 1,5 mL'lik ependorf tüpüne kondu, üzerine 1000 µL distile su pipetle eklendi ve 5 dakika iyice

vorteks yardımı ile çalkalandı. 10 dakika 3500 rpm’de santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice pipetle çekilerek atıldı. Çökelti üzerine 1000 µL distile su eklendi ve iyice çalkalandı. 10 dakika 3500rpm’de santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice pipetle çekilerek atıldı. Çökelti üzerine 250 µL çekirdek lizis tamponu (Çizelge 2.1), 20 µL % 10’luk SDS ve 20 µL Proteinaz K (10 mg / mL) eklendi ve tüp alt-üst edilerek karıştırıldı. Eppendorf tüp 72 °C’deki su banyosunda 10 dakika bekletildi. Eppendorf tüpe 175 µL doymuş amonyum asetat (Çizelge 2.1) eklendi ve 60 saniye vorteks yardımı ile çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 4500 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı steril bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 2 katı oranında saf veya %95’lik etanol eklendi. Eppendorf tüp yavaşça alt-üst edildi. DNA’nın belirmesi gözlemlendi. 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvının tümü pipetle atıldı ve çökelti üzerine 250 µL % 75’lik etanol ilave edilerek çökelti yıkandı. 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvının tümü pipetle atıldı, çökelti havada 45-60 dakika kurutuldu ve üzerine 50 µL distile su eklenerek çökelti çözüldü.

Çizelge 2.1. Genomik DNA (gDNA) izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri.

<b>Çözelti</b>	<b>Kompozisyonu, Özellikleri ve Hazırlanışı</b>
Doymuş Amonyum Asetat (NH <sub>4</sub> Ac)	22.2 g NH <sub>4</sub> Ac, distile su ile 30 mL’ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda yaklaşık 40 °C’de çözüldü. Filtrasyon yardımı ile steril edildi. +4 °C’de saklandı.
Çekirdek Lizis Tamponu (pH. 8.2)	100 µL Tris Base(10 mM), 4 mL NaCl (400 mM) 40 µL Na <sub>2</sub> EDTA (2 mM) 5860 µL distile suda çözüldü. 121°C’de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. +4 °C’de saklandı.
Proteinaz K	18 mg/mL stok enzimden 566 µl alındı ve üzerine 444µl.distile su eklendi. (10 mg/ mL)
Etil alkol	% 70 ve % 100 lük. Belirtilen oranda steril su eklendi.

Aynı zamanda yukarıdaki DNA izolasyon metodunun yanı sıra Qiagen firmasına ait DNeasy Blood Mini Kit (Katalog No: 51104) daha hızlı ve kaliteli sonuç verme ihtimalinden dolayı kullanıldı ve izolasyon, kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapıldı.

## 2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler yerli şirketler aracılığıyla Integrated DNA Technologies (A.B.D.) firmasından temin edildi. PCR’da kullanılacak malzemeler çalışma esnasında buz üzerinde muhafaza edildi. PCR son reaksiyon hacmi 50 µL olacak şekilde Tablo 2’deki bileşenler bir PCR tüpüne konuldu. PCR tüpüne konan bileşenlerin iyice karışması için çok kısa bir süre (1-2 saniye) santrifüjleme yapıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi. Aşağıdaki PCR döngü koşulları seçilerek reaksiyon başlatıldı.

94 °C	5 dakika	1 devir
94 °C	45 saniye	┌ 35 döngü
50 °C	45 saniye	
72 °C	2 dakika	└
72 °C	15 dakika	1 devir
+4 °C	30 saat	

Aynı gDNA’yla farklı primerler kullanılarak farklı PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR reaksiyonlarının standard koşullarda 1.5 kb’lık ürün verecek şekilde dizayn edilen primerlerle çok düşük verimle çalıştığı 1 kb’lık primerlerle daha yüksek verimle çalıştığı tespit edildi.

Çizelge 2.2. PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler

Tampon(NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> )
MgCl <sub>2</sub>
dNTP
Primer L
Primer R
gDNA
Tag polimeraz
Distile su

### 2.5.1. PCR Optimizasyonu

#### 2.5.1.1. Primerlerin Dizaynı

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılmak üzere, TUSC4 geni, TUSC2 geni, ve Xq21 bölgesi için spesifik primerler, primer3 biyoinformatik programı [100] kullanılarak dizayn edildi ve NCBI web sayfasında blast programıyla [101] kontrolleri yapıldı.

#### 2.5.1.2. Primerlerin Sulandırılması (Çözündürülmesi)

Primerler laboratuvara gelir gelmez veya -20 °C dolabından çıkartıldıktan sonra yaklaşık 15 sn. 12000 rpm' de santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı. 1 mL. TE eklenerek 2 dakika alt-üst edildikten sonra 15 sn. vorteks yapılarak sulandırıldı ve kullanılmaya hazır hale getirildi. 1 mL TE içinde sulandırılmış olan primerler toplam satın alınan nmol miktarı kadar µM konsantrasyonda ki ilk stok çözeltileri haline dönüştürüldü. 200 µL'lik 5 µM'lık çalışma solusyonları Çizelge 2.5, 2.8, 2.11 ve 2.14'de gösterilen konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı. Aşağıdaki çizelgelerde (Çizelge 2.4, 2.7, 2.10, 2.13) PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve Tm değerleri görülmektedir.

PCR reaksiyonunda kullanmak için tüm primerler, 50 µL’de 0.5 µM olacak şekilde hazırlandı ve son hacmi 50 µL olan PCR reaksiyonu için 5 µL primer eklendi. PCR reaksiyonları için TUSC4 (Çizelge: 2.4), TUSC2 (Çizelge: 2.7), GAPDH (Çizelge: 2.8), X (Çizelge:2.13), TXq21 (Xq21), (Çizelge:2.16) genleri ile ilgili olarak PCR konsantrasyon ve bileşenlerinin hesaplamaları gösterilmiştir.

### 2.5.1.3. TUSC4 İle İlgili PCR Optimizasyonları

TUSC4 çoğaltımı (amplifikasyonu) için primerlerin hazırlanması Çizelge 1.4’de belirtildiği gibi yapıldı. Çizelge 1.4, TUSC4 primerlerinin nükleotit dizileri, Tm değerleri ve yüzde GC oranlarını göstermektedir.

Çizelge 2.3. Primerler konsantrasyonlarının hesaplamaları stok.

Primer (TUSC4)	İlk Stok Molaritesi	Çalışma solusyonu
TUSC4 (1350bp)-L	26.20 µM	38 µL stok + 162 µL TE
TUSC4 (1350bp)-R	35.40 µM	34 µL stok + 166 µL TE
TUSC4 (1kb)-L	32.40 µM	31 µL stok + 169 µL TE
TUSC4 (1kb)-R	29.40 µM	34 µL stok primer + 166µL TE

Çizelge 2.4 ’de görüldüğü gibi primer çiftlerinin Tm değerleri birbirine oldukça yakın olarak dizayn edildi. Böylece bağlanma (annealing) aşamasındaki veriminin her iki primer için çok yakın olması sağlandı

Çizelge 2.4. TUSC4 primerlerinin nükleotit dizileri, Tm ve % GC değerleri

Primerler	Nükleotit dizileri ( 5’- 3’ )	Tm	%GC
TUSC4(1350bp)-L	TCGAGGCTGTCTCTGACAAG	59.28 C°	55.00
TUSC4(1350bp)-R	GCTGTTTGAAATGGATGTCTTT	58.24 C°	36.36
TUSC4(1kb)-L	CTGGGACCCAAGATCACCTA	59.92 C°	55.00
TUSC4(1kb)-R	CATAGCTGTGGCAGCCTGTA	60.03 C°	55.00

TUSC4 gen bölgesini çoğaltmak için Çizelge 2.5’ da belirtildiği oranda PCR bileşenleri kullanıldı.

Çizelge 2.5. TUSC4 primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

<b>Bileşenler</b>	<b>Konsantrasyon</b>
6 µL NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> Tampon	10 X
3 µL MgCl <sub>2</sub>	25 mM
4 µL dNTP	2.5 mM (her biri)
5 µL sol (5’) primer (L)	10 pmol /µL
5 µL sağ (3’) primer (R)	10 pmol /µL
0.6 µL taq polimeraz	5 unite / µL
3 µL kalıp DNA	20 – 100 ng / µL
23.4 µL distile diiyonize (dd) su	-

#### 2.5.1.4. TUSC2 İle İlgili PCR Optimizasyonları

TUSC2 gen bölgesini çoğaltmak için primerlerin hazırlanması Çizelge 2.6’da belirtildiği gibi yapıldı.

Çizelge 2.6. Primerler konsantrasyonlarının hesaplamaları.

<b>Primer</b>	<b>Stok Molaritesi</b>	<b>Çalışma solusyonu</b>
TUSC2(1600bp)-L	27.3 µM	37 µL stok + 163 µL TE
TUSC2(1600bp)-R	24.2 µM	41 µL stok + 159 µL TE
TUSC2(1kb)-L	28.6 µM	35 µL stok + 165 µL TE
TUSC2(1kb)-R	29.3 µM	34 µL stok + 166 µL TE

Çizelge 2.7' de TUSC2 genine özel olarak dizayn edilmiş olan 1.6 kb ve 1 kb ürün veren primerlerin nükleotit dizileri, T<sub>m</sub> ve %GC değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. TUSC2 nükleotit dizileri, T<sub>m</sub> ve %GC değerleri.

<b>Primerler</b>	<b>Nükleotit dizileri( 5' - 3' )</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>% GC</b>
TUSC2(1650bp)-L	CTGGGGCAGGTTATGGTAGT	58.93	55.00
TUSC2(1650bp)-R	TTGAAATTGAACAAATAACACAACAG	59.43	26.92
TUSC2(1kb)-L	GTGTGGCTTCCATTGAGGAG	60.66	55.00
TUSC2(1kb)-R	TCAGACTCTGCCACGACATC	59.99	55.00

TUSC2 geninin çoğaltılması için hazırlanan PCR reaksiyon bileşenleri Çizelge: 1.9' da görülmektedir.

Çizelge 2.8. TUSC2 primerleri ile yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

<b>Bileşenler</b>	<b>Konsantrasyon</b>
6 µL NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> Tampon	10 X
3 µL MgCl <sub>2</sub>	25 mM
4 µL dNTP	2.5 mM (her biri)
5 µL sol (5') primer (L)	10 pmol/µL
5 µL sağ (3') primer (R)	10 pmol/µL
0.5 µL taq polimeraz	5 ünite / µL
3 µL kalıp DNA	20 – 100 ng /µL
23.4 µL distile diiyonize (dd) su	-

### 2.5.1.5. Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) İle İlgili Optimizasyonlar

PCR reaksiyonlarında GAPDH her hücre ve dokuda sürekli eşit seviyede ekspres olduğu için pozitif kontrol olarak kullanıldı [102]. GAPDH primerlerinin Çizelge 2.9’da görüldüğü gibi primerlerin konsantrasyonları hesaplanarak çalışma solusyonu elde edildi.

Çizelge 2.9. Primer konsantrasyonunun hesaplamaları.

Primer	Molaritesi	Çalışma solusyonu
GAPDH-7335	5 µM	38.02 µL primer +162µL TE
GAPDH-7336	5 µM	42.9 µL primer + 157 µL TE

GAPDH primerlerinin özelliklerine göre (Çizelge 2.10) PCR reaksiyonları için en uygun bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir.

Çizelge 2.10. GAPDH nükleotit dizileri, Tm ve %GC değerleri.

Primerler	Nükleotit dizileri ( 5'- 3' )	Tm	%GC Değeri
GAPDH-7335	CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG	57.38	48.00
GAPDH-7336	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG	61.05	56.52

GAPDH primerleri ile yapılan PCR reaksiyonlarında en verimli sonuç Çizelge 2.11’de belirtilen bileşenlerin konsantrasyon miktarları kullanılarak alındı.



Çizelge 2.11. GAPDH primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

<b>Bileşenler</b>	<b>Konsantrasyon</b>
6 µL NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> Tampon	10 X
3 µL MgCl <sub>2</sub>	25 mM
4 µL dNTP	2.5 mM (her biri)
5 µL sol (5') primer (L)	10 pmol/µL
5 µL sağ (5') primer (R)	10 pmol/µL
0.6 µL taq polimeraz	5 ünite
3 µL kalıp DNA	-
23.4 distile diiyonize (dd) su	-

GAPDH, TUSC2 ile birlikte PCR'da pozitif kontrol olarak kullanıldı.

#### 2.5.1.6. Xq21 Kontrol Primerleri (X-Kontrol) İle İlgili Optimizasyonlar

TUSC2'ye benzeyen Xq21 bölgesine (TXq21 olarak kısaltılmıştır) ilaveten Xq21 bölgesine spesifik 1500bp uzunluğunda bir çift kontrol primeri daha dizayn edildi. Bu primerler Çizelge 2.12'deki gibi hazırlandı.

Çizelge 2.12. Primerler konsantrasyonlarının hesaplamaları.

<b>Primer ( X )</b>	<b>Molaritesi</b>	<b>Çalışma solusyonu</b>
X-Kontrol- Forward	5 µM	30µL primer + 170 µL TE
X-Kontrol- Reverse	5 µM	28 µL primer + 172 µL TE

X-Kontrol primerlerine ait T<sub>m</sub>, %GC ve nükleotit dizileri Çizelge 2.13'de görülmektedir ve bu değerler PCR reaksiyonlarındaki döngülerin tasarlanmasında oldukça önemlidir.

Çizelge 2.13. X-Kontrol nükleotit dizileri, Tm ve %GC değerleri.

<b>Primerler</b>	<b>Nükleotit dizileri ( 5'- 3' )</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC Değeri</b>
X-Kontrol Forward	TGGATTTCCCTGTGATCCTC	54.08	50.00
X-Kontrol -Reverse	TTCATACCCAGCAGCTCCA	56.12	52.63

X-Kontrol kromozom bölgesini çoğaltmak için Çizelge 2.14' de belirtildiği oranda PCR bileşenleri kullanıldı

Çizelge 2.14. X kromozom primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

<b>Bileşenler</b>	<b>Konsantrasyon</b>
6 µL NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> Tampon	10 X
3 µL MgCl <sub>2</sub>	25 mM
4 µL dNTP	2,5 mM (her biri)
5 µL sol (5') primer (L)	10 pmol/µL
5 µL sağ (5') primer (R)	10 pmol/µL
0.6 µL taq polimeraz	5 ünite
3µL kalıp DNA	-
23.4 distile diiyonize (dd) su	-

#### 2.5.1.7. TUSC2'ye Benzer Xq21 Bölgesi (TXq21) Primer Optimizasyonu

X kromozomunun, Xq21: 15322289-15323215 nükleotit dizileri arasında bulunan bölgedeki 1 kb uzunluğunda DNA parçasını (TXq21) çoğaltabilmek amacı ile tasarlanan primerlerin konsantrasyonları Çizelge 2.15'da belirtilen şekilde hazırlandı.

Çizelge 2.15. Primer konsantrasyonlarının hesaplamaları.

<b>Primer (TXq21 )</b>	<b>Molaritesi</b>	<b>Çalışma solusyonu</b>
1000 bç lik L primeri	25.1 µM	36.7 µL primer +163.3 µL TE
1000 bç lik R primeri	30.7 µM	36.7 µL primer + 163.3 µL TE

PCR reaksiyonları sonucunda en verimli sonucu almak için primerler Çizelge 2.16'deki özellikleri dikkate alınarak tasarlandı.

Çizelge 2.16. TUSCm (Xq21) nükleotit dizileri, Tm ve %GC değerleri.

<b>Primerler</b>	<b>Nükleotit dizileri ( 5'- 3')</b>	<b>Tm</b>	<b>%GC Değeri</b>
TXq21-L	GTGTGGCTTCCATTAAGGAG	53.30	50.00
TXq21-R	TCAGACTCTGCCATGACATC	54.22	50.00

TXq21 bölgesine spesifik olarak hazırlanan ve PCR reaksiyonlarına uygun hale getirilen primerler Çizelge 2.17'de ki bileşen ve konsantrasyonlar kullanılarak çoğaltıldı.

Çizelge 2.17. TXq21 primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

<b>Bileşenler</b>	<b>Konsantrasyon</b>
6 µL NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> Tampon	10 X
3 µL MgCl <sub>2</sub>	25 mM
4 µL dNTP	2.5 mM (her biri)
5 µL sol (5') primer (L)	10 pmol /µL
5 µL sağ (5') primer (R)	10 pmol /µL
0.6 µL taq polimeraz	5 ünite
3 µL kalıp DNA	-
23.4 distile diiyonize (dd) su	-

## 2.6. DNA'nın Analizi

### 2.6.1. Spektral Yöntem

İzole edilen genomik DNA'ların UV spektrometrede 260 (A<sub>260</sub>) nm ve 280 (A<sub>280</sub>) nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Ölçüm işlemi kuvars küvetlerle yapılmıştır. Çalışmamda kullandığım DNA molekülleri için, 1 OD'nin 50µg/ml'ye karşılık geldiği bilinmektedir. Spektrometrik sonuçlara göre çift zincirli DNA molekülünün miktar tayini, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [103].

$$\text{DNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{seyreltme oranı} \times 50$$

DNA'nın saflığı ise, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> oranı ile hesaplanmıştır. Saf DNA için bu değer 1.8 dir.

### 2.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Görüntülenmesi gereken gDNA örnekleri ve PCR ile çoğaltılmış DNA molekülleri % 0.8' lik agaroz jel elektrofrezinde yürütüldü. Bunun için kullanılan tankın büyüklüğüne göre tartılan agaroz (0.4 gram) ve 50 mL 0,5 X TBE (Tris-Borat-

EDTA) erlenmayer içine konuldu, mikrodalga fırın yardımıyla kaynatılarak çözülmesi sağlandı. Karışım 45-50 °C'ye geldiğinde içine 1 µL 10 mg/mL EtBr (Etidyum bromid) eklendi. Daha önceden tank içine yerleştirilen ve yükleme yapabilmek için kuyucukları oluşturan taraklar hareket ettirilmeden karışım tank içine döküldü. Yaklaşık 30-35 dakika jelin polimerleşmesi beklendi ve polimerleşme sağlanınca taraklar dikkatlice çıkarıldı.

gDNA örnekleri, 2 µL gDNA, 5 µL distile su, 2 µL yükleme boyası olacak şekilde karıştırılarak jele yüklendi. PCR ile çoğaltılmış DNA örnekleri ise, 5 µL PCR ürünü, 1 µL yükleme boyası (6X) şeklinde jele yüklenerek 80 Voltta 30-35 dakika yürütüldü. Yürütülen örnekler UV ışığı altında izlenerek jel görüntüleme sistemi (UVP, Gel Doc-H Imaging System, İngiltere) ile bilgisayara aktarıldı

Çizelge 2.18. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Maddelerin Temin Yeri ve Markaları.

Elektroforez Sistemi	Atto(Tokyo, Japonya)
Agaroz	Appllichem (Almanya)
Tris-Base	Sigma (Almanya)
Borik Asit	Carlo Erba (İtalya)
Jel Görüntüleme Sistemi	UVP Gel Doc-H Imaging System, İngiltere)
Mikrodalga fırın	Arçelik, Türkiye
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya

Çizelge 2.19 : Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler.

5X TBE tamponu pH 8	54g Tris Base, 27.5g Borik Asit, 20 mL 0.5M EDTA (pH 8) tartıldı. Üzeri distile su ile 1 litreye tamamlandı.
Yükleme Boyası	GeneRuler™ DNA Ladders (Fermentas Katalog No: SM0313)
DNA belirteci (marker)	1kb, GeneRuler™ DNA Ladders (Fermentas Katalog No: SM0333)

## **2.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması**

PCR ile çoğaltılmış ve jel elektroforezinde yürütülen ürünler dizi analizine gönderilmeden önce jel ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Jel ekstraksiyonu QIAquick gel extraction Kit (Qiagen, Almanya) protokolü takip edilerek yapıldı. Dizi analizinden gelen sonuçlar BioEdit programı [104] ve NCBI web sayfası kullanılarak analiz edildi

## **2.8. DNA Dizilerinin Biyoinformatik Analizi**

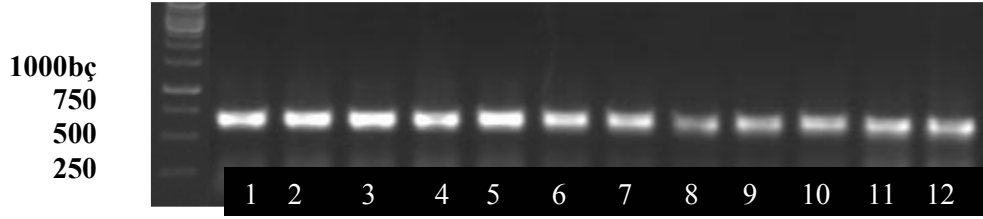
Sağlıklı ve kanser hastası bireylerden elde edilen 1 kb'lık Xq21 bölgesi DNA dizileri, BioEdit programının Sequence Alignment ve Contig Assembly Program (CAP, doğru dizi tespiti için), DNADist ve DNAPars (benzerlik derecesi ve yakınlık uzaklık ağacının tespiti için), ve ClustalW (nükleotit polimorfizmini tespit ve görüntülemek için) alt programları kullanılarak analiz edil

### 3. BULGULAR

#### 3.1. PCR Sonuçları

##### 3.1.1. TUSC4 Sonuçları

TUSC4'ün sağlıklı kişilerde amplifikasyonu için bölüm 2.5.1.3.'de belirtildiği gibi primerler hazırlandı. Uygun koşullarda (bkz. Materyaller ve Metotlar) PCR döngüsü gerçekleştirildi. PCR ürünleri %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (şekil: 3.1).



Şekil 3.1. TUSC4 PCR ürünleri.

##### 3.1.2. TUSC2 Sonuçları

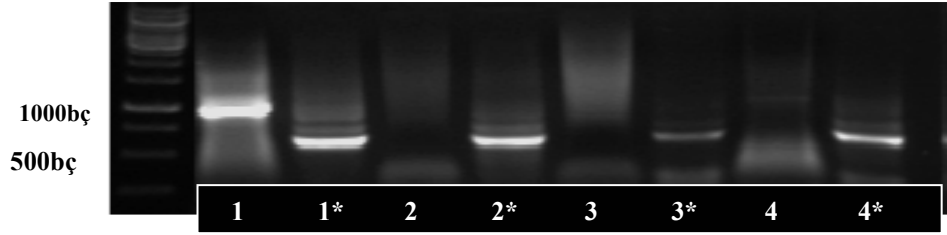
TUSC2 amplifikasyonu için bölüm 2.5.1.4' de belirtilen şekilde PCR döngüsü için en uygun koşullar hazırlandı ve PCR ürünleri %0.8' lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil: 3.2).



Şekil 3.2. TUSC2 PCR ürünleri

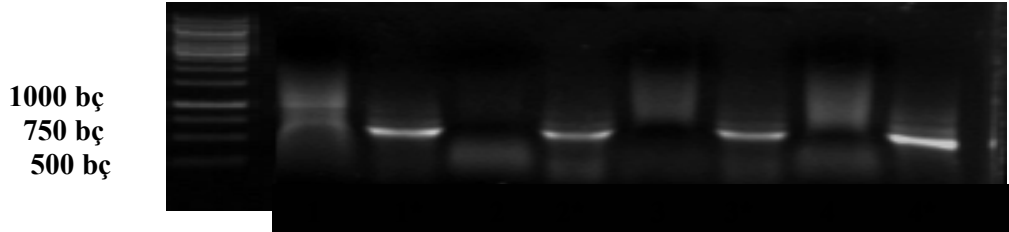
### 3.1.3. TUSC2- Pozitif Kontrol (GAPDH) Sonuçları

GAPDH kullanılmak üzere yapılan PCR optimizasyonları bölüm 2.5.1.5’de gösterilmektedir. Şekil 3.3’ de sağlıklı kişilerdeki TUSC2 geninin ve GAPDH geninin PCR ürünlerinin % 0.8’ lik agaroz jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.3. Sağlıklı bireylerde TUSC2-GAPDH agaroz jel görüntüsü (1, 2, 3, 4; TUSC2, 1\*, 2\*, 3\*, 4\*, GAPDH)

Şekil 3.4’de, % 0.8’lik agaroz jelde kanserli bireylerin TUSC2 ve GAPDH genlerinin PCR ürünleri görülmektedir.

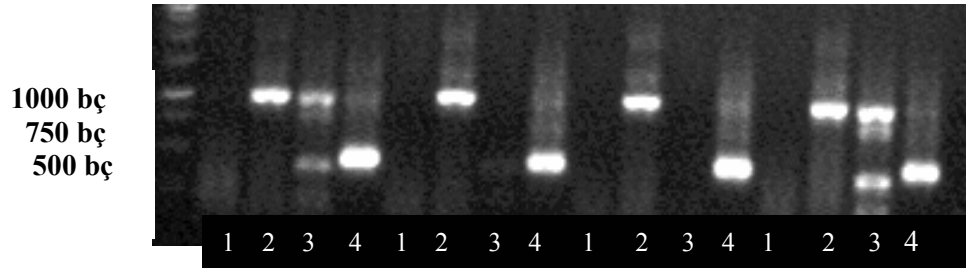


Şekil 3.4. Hasta bireylerde TUSC2-GAPDH agaroz jel görüntüsü (1, 2, 3, 4; TUSC2, 1\*, 2\*, 3\*, 4\*, GAPDH)



### 3.1.4. TXq21 Bölgesinin, TUSC2 ve GAPDH İle Karşılaştırmalı PCR Sonuçları

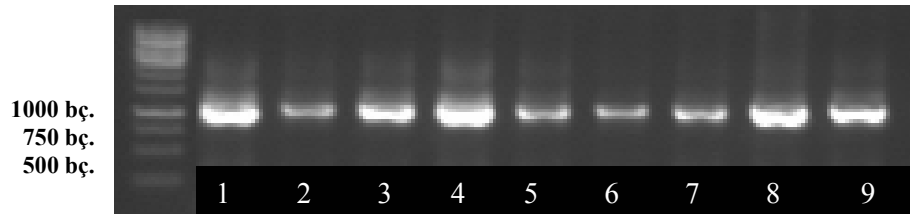
TXq21 bölgesinin çoğaltılması için bölüm 2.5.1.6' da belirtildiği gibi PCR koşulları uygulandı. % 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde Xq21 gen bölgesinin PCR ürünü şekil 3.5'de görülmektedir.



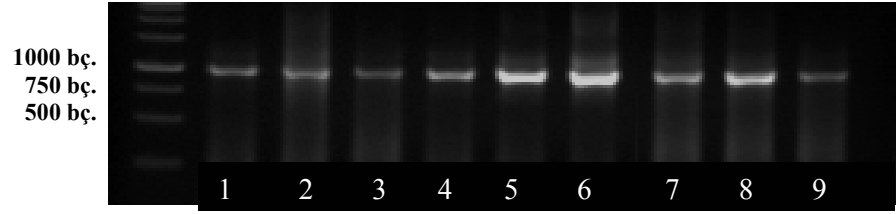
Şekil 3.5. Xq21 bölgesinin hasta bireylerdeki TUSC2, TXq21, Kontrol ve GAPDH primerleriyle çoğaltılmış PCR sonuçları. (1; TUSC2, 2; TXq21, 3; X-Kontrol , 4; GAPDH)

### 3.1.5. TXq21 Bölgesinin PCR Ürünleri Sonuçları

Sağlıklı (şekil:3.6) ve hasta (şekil:3.7) bireylerde TXq21 bölgesinin (Xq21:15322289-15323215) çoğaltılması için uygun PCR koşulları kullanıldı ve PCR ürünleri %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü.



Şekil 3.6. Sağlıklı kişilerde TXq21 (Xq21:1532228-15323215)bölgesinin agaroz jel görüntüsü.



Şekil 3.7. Sağlıklı kişilerde TXq21 (Xq21:15322289-15323215 ) bölgesinin agaroz jel görüntüsü.

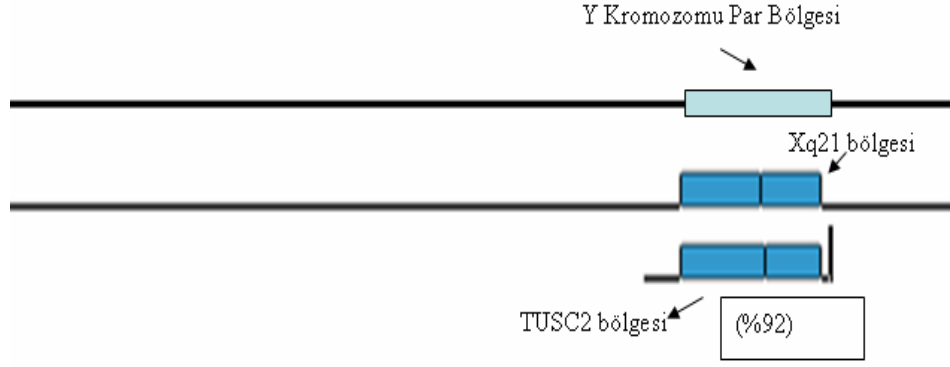
### 3.2. Biyoinformatik Analiz

#### 3.2.1. DNA Dizileme

PCR ile çoğaltılan TXq21 (Xq21:15322289-15323215) ürünleri dizileme yapan ticari kurumların tavsiye ettiği konsantrasyon ve miktarlara getirildikten sonra dizilemeye yollandı.

#### 3.2.2. NCBI BLAST Analizi

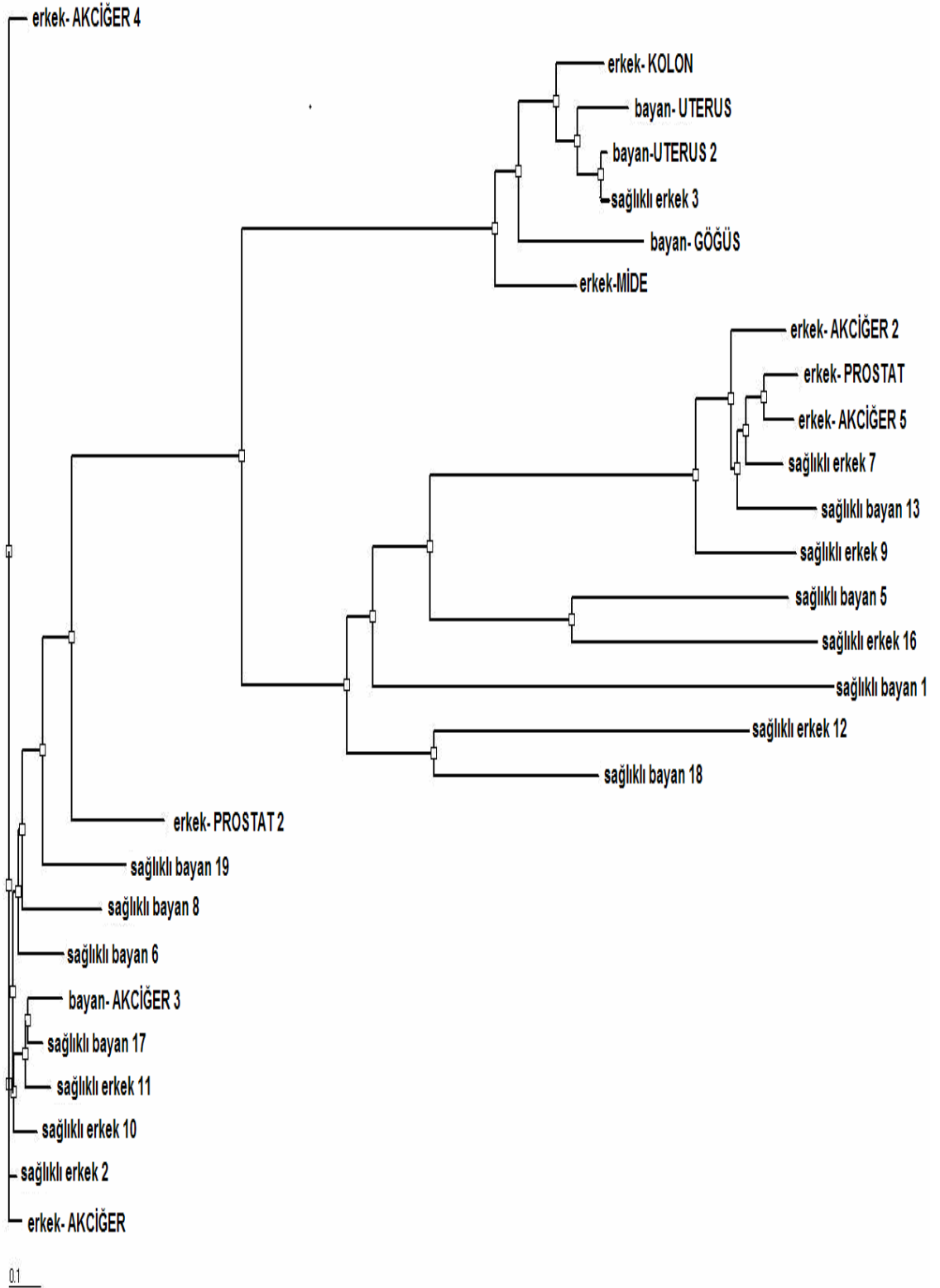
Dizileme yapan şirketlerden gelen sonuçlar kromatogramları ile karşılaştırılarak kontrol edildikten sonra otomatik olarak tespit edilemeyen ya da şüpheli görünen nükleotitlerin (N'lerin) en az iki bağımsız kromatogramına bakılarak doğru nükleotitin dizide yer alması sağlandı. Gelen diziler NCBI web sayfasında BLAST analizi [101] yapılarak şekil 3.8'de görüldüğü gibi hangi gen bölgesi ile benzerlik gösterdiği saptandı.



Şekil 3.8. Xq21, TUSC2 ve Y kromozomu PAR bölgesinin BLAST programıyla [101] elde edilen benzerliği.

### 3.2.3. BioEdit Programı Kullanılarak, Benzerlik Derecesi Ve Yakınlık Uzaklık Ağacının Tespiti

Öncelikle elde edilen ham diziler DNA Dist ve DNA Pars ağaç programlarıyla hep birlikte benzerlik analizine tabi tutulduğunda kanserli bireylerden elde edilen dizilerin bariz bir şekilde ayrıldığı tespit edildi (Şekil 3. 9). Ağaçta görüldüğü gibi 2 uterus kanserli, bir göğüs kanserli, bir kolon kanserli ve bir mide kanserli birey bariz bir şekilde diğer dizilerden ayrılmıştır. Akciğer kanserli bireyler de ayrılmalarına rağmen sağlıklılar arasına dağılmışlardır.



Şekil 3.9. Hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki benzerlik ve yakınlık derecesi.

### 3.2.4. TXq21 Polimorfizm Analizi

Gelen diziler primer sol (5') ve primer sağ (3') şeklinde okunarak dizisi belirlenmiş şekilde geldi. DNA Dist ve DNA Pars programlarıyla ortaya çıkan kanserli bireylerin bariz şekilde ayrılma durumu sonucunda bu ayrılmanın nükleotit bazında gözlenebilir olduğunu anlayabilmek amacıyla BioEdit programının ClustalW alt programıyla diziler hizalanarak şekil 3.10 ve şekil 3.11'de görülen polimorfik bölgelerin tespiti sağlandı.

### 3.2.5. Dizilerdeki Polimorfizm Tespiti

Bölüm 3.2.1'deki gibi dizileri ClustalW yaptıktan sonra karşılaştırmalı dizi analizi sonuçlarında şekil 3.10 ve 3.11'deki polimorfizmler tespit edildi.

Mide Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Mide Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Akciğer Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Uterus Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Uterus Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Prostat Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Prostat Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Saglikli	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Saglikli	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Saglikli	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Saglikli	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Saglikli	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Saglikli	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Akciğer Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Akciğer Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Akciğer Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC
Akciğer Kanseri	TAGGGGGATCAGCCCAGCCCTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCCGTCCAGTCCCCAC

\*

Şekil 3.10. Hasta ve sağlıklı bireylerde c -> a polimorfizmi. Akciğer Kanserinin diğer kanserlere oranla gösterdiği yüksek korelasyon.

Saglikli	CTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCGTCCAGTCTCCACTC
Saglikli	CTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCGTCCAGTCCCACATC
Saglikli	CTTGGTAGAGGGTGAAGCCCCGTCCAGTCCCACATC
Akciger Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGAAGACCCCGTCCAGTCCCACATC
Uterus Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGA <sup>AA</sup> ANCCCGT <sup>N</sup> CAGT <sup>C</sup> NCCACTC
Uterus Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGAAG <sup>N</sup> CCCGTCCAGT <sup>NN</sup> CCACTC
Akciger Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGAAGACCC <sup>T</sup> GTCCAGTCCCACATC
Kolon Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGAAG <sup>N</sup> CCCGTCCAGTCCCACATC
Mide Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGAAGACCC <sup>NG</sup> TCCAGT <sup>C</sup> NCCACTC
Akciger Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGAAGACCC <sup>T</sup> GTCCAGT <sup>C</sup> NCCACTC
Prostat Kanseri	CTTGGTAGAGGGTGAAG <sup>A</sup> CC <sup>NG</sup> TCCAGT <sup>C</sup> TCCACTC

Şekil 3.11. Hasta ve sağlıklı bireylerde c-> a polimorfizmi. Çeşitli kanser tiplerinin sağlıklılara kıyasla gösterdiği korelasyon.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kanser çoğu kez tek bir hastalık gibi görünse de, gerçekte tüm doku ve organları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Kanser genetik olabileceği düşüncesi ilk defa 20. yüzyılın başlarında ortaya atıldı ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynadı.

Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir. Genomik değişiklikler kanserle ilişkilidir. Örneğin; tek nükleotit değişimi gibi küçük ölçekli veya kromozom kazanımı ya da kaybı, viral genomun hücre genomuna katılımı, kromozomun yeniden düzenlenmesi gibi büyük ölçekli değişiklikler kanserle ilişkili genomik değişikliklerdir [2].

İnsanlarda en yaygın tek nükleotit değişimi A ve G arasında olmaktadır. İnsanda tek nükleotit değişimlerinin dağılımı incelediğinde %63 A/G (ve T/C), %17 A/C (ve T/G), %8 CG, %4 AT ve %8 insersiyon ve delesyonlar saptanmıştır [105]. Diğer organizmalarla insanı karşılaştırdığımız zaman tek nükleotit değişiminin sonucunda bireyler arasında çok az varyasyon oluştuğunu gözlemlemekteyiz [106]. Bir kişideki kromozom ile diğer kişideki aynı kromozomu karşılaştırdığımız zaman aradaki fark tahmini olarak  $7.51 \times 10^{-4}$  olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu rakam da bize ortalama 1.330 baz da bir, tek nükleotit değişiminin ortaya çıktığını göstermektedir. İki X kromozomunu ve iki Y kromozomunu farklı kişilerde karşılaştırdığımız da X ve Y kromozomlarında sırasıyla her 2.132 ve 6.625 baz da bir tek nükleotit değişiminin görüldüğü karşımıza çıkmaktadır [105].

Kanser gerek ülkemiz gerekse dünya çapında ölümcül bir hastalık olması nedeniyle ciddi bir sağlık problemidir. Kanser oranlarında her geçen gün artış olmasına rağmen, tedavide yeterli gelişmeler ortaya çıkmamıştır [107].

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerinin en önde gelenidir. Bununla birlikte hastalığın gelişimi ve süresi hakkındaki tahminler yanıltıcı ve eksik kalmaktadır. Son yirmi yıl boyunca akciğer kanseri gelişiminde rol oynayan genleri tanımlamak için oldukça fazla çaba sarfedilmektedir. Bu yoğun çalışmalara rağmen mutasyon taşıdığı belirlenen genlerin sayısı akciğer kanserine neden olduğu tahmin edilen genlerin sayısına kıyasla oldukça azdır. Bu da akciğer kanser tedavilerindeki ilerlemeler yavaşlatmaktadır [26].

Moleküler teşhisler yardımı ile akciğer kanserinin objektif ve sistematik tanısı kesin olarak yapılabilir [56]. p53, RB, ve p16 genleri akciğer kanserlerinde kromozom delesyonları için başlıca hedef olarak kabul edilir ve bunlar bir çok sitogenetik ve moleküler çalışmalarla belirlenebilmektedir [24, 86]. Bununla birlikte, birçok solid tümör için moleküler belirteçlerin standartları henüz tanımlanmamıştır [56]. İnsan 3. kromozomunun kısa kolu akciğer tümörlerinin oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülen bir bölge (3p21.3) içermektedir [25, 110]. Bu bölge akciğer ve göğsün premalignant lezyonlarında ve kanser hücre hatlarında genetik haritalama aracılığı ile tanımlanmıştır ve homozigot delesyonları kapsadığı tespit edilmiştir [106, 111]. Yaklaşık 630 kb'lık homozigot delesyon taşıyan bu bölgede birden fazla TSG tanımlanmıştır [24, 25].

Akciğer kanserinde kromozomol delesyonlar LOH (heterozigotluğun kaybı) ve HD (homozigot delesyon) şeklinde karşımıza çıkmaktadır. HD'a uğrayan aday tumor suppressor genlerden bazıları DUTT1, FHIT, GNA12, Sema IV, 3pK, BAP1, MTAP, SMAD2, SMAD4, ve p53 genleridir [24, 111]. LOH şeklinde olan kromozomol delesyonlara uğrayan genlere örnek olarak ta p73, VHL, PRLTS, HIC1 verilebilir [24]. 3p21.3 bölgesinde LOH'un yaygın olması ve akciğer kanser gelişiminde erken safhalarda rastlanması, bu bölgenin akciğer kanseriyle alakalı tumor baskılayıcı genleri bulundurduğunu teyid etmektedir [51]. Bu bölgede yer alan BLU, NPRL2/Gene21, FUS1, HYAL1, FUS2, SEMA3B gibi genlerde iki veya daha fazla sayıda aminoasit dizi değişikliği mutasyonları saptanmıştır [109].

3p21.3 kromozom bölgesinde yer aldığı saptanan TUSC4 ve TUSC2 genleri de akciğer kanserinde aday tümör baskılayıcı gen olarak adlandırılmaktadır. Yapılan



PCR analizleri sonucunda TUSC4'ün, Türk popülasyonunda sağlıklı bireylerde de (genomda) olmama ihtimalinin söz konusu olduğu düşünülmektedir.

Yine PCR analizi yardımıyla TUSC2 ile yapılan geniş çaplı genom taraması sonucunda, ülkemiz popülasyonunda sağlıklı TUSC2'nin de (ve dolayısıyla muhtemelen 3p21.3 bölgesinin de) sağlıklı bireylerde delesyona uğramış olma ihtimalinden söz edebiliriz. Bunun teyid edilmesi için TUSC2 ve TUSC4'e ilaveten bu bölgede yer alan genlerle yapılacak PCR ve Southern Blot analizlerine ihtiyaç vardır.

Biyoinformatik araçlar yardımıyla, [110] (GENE ID:11334) TUSC2 geninin TXq21 (Xq21:15322289-15323215) gen bölgesine %92 oranında benzediği tespit edildi. Bu benzerliğin yanı sıra bu bölgede şimdiye kadar tanımlanmış bir gen olmamasının, ve hem bu bölge hem de TUSC2 geni hakkında kansere yatkınlık ile ilgili bilgi verme ihtimalinden dolayı bu bölgenin Türk popülasyonunda kanser teşhisi konmuş hasta, ve sağlıklı bireylerde polimorfizmi saptandı.

Bir aleldeki bazı tek nükleotit değişimleri büyük sağlık problemlerine veya tek gen hastalıklarına neden olabilmektedir. İnsandaki birçok hastalık NCBI databankındaki OMIM'de karakterize edilmiştir. Mesela kistik fibrozis çok nadir olarak görülen fakat ciddi bir hastalıktır ve kromozom 7'deki (OMIM number: 602421 ) CTFR geninin mutasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Fakat kalp hastalıkları ve kanser gibi yaygın olan hastalıklar genetiksel olarak oldukça karmaşıktır ve birden fazla sayıda gendeki allelerin katılımı ile hastalık ortaya çıkmaktadır [111]. Ancak çalışmamızda, dizi analizinden gelen sonuçlar kapsamında, bulunan bazı polimorfik bölgelerde kanserli ve sağlıklı bireyleri karşılaştırdığımız zaman bazı kanser tiplerinde bireylerin %80'inden fazlasında aynı bölgenin tek nükleotit değişimi gösterdiği saptandı.

9 adet sağlıklı birey ve 12 adet çeşitli kanser hastasından Materyaller ve Metotlar'da bahsedilen primerlerle çoğaltılan TXq21 dizileriyle BioEdit programındaki DNADist ve DNAPars alt programları kullanılarak benzerlik ve yakınlık derecelerinin gözlemlendiği ağaç elde edildi. Şekil 3.9'da görüldüğü gibi

kanserli bireylerin sağlıklı bireylerden belirgin şekilde ayrılması TXq21 bölgesinde polimorfizm olduğunu ve bu polimorfizmin de kanserle alakası olduğunu işaret etmektedir. Fakat şekil 3.9’da görülen belirgin ayrılığın yanı sıra, bazı kanserli diziler sağlıklılar arasında yer almıştır. Şekil 3.9’da görüldüğü gibi bir araya toplanan beş kanserli bireyin arasında hem kadın hemde erkek bireylerin olması her iki cinsiyette de riskin eşit derecede olduğunu göstermektedir. Kanserli bireyler arasında bulunan sağlıklı kişilerin de muhtemelen kanser riski taşıdığı söylenebilir.

Şekil 3.9’da akciğer kanserli bireylere dikkat edildiğinde sağlıklılar arasına dağılmış olduğu gözlemlenmektedir ve bu da sağlıklı bireylerde akciğer kanserine yatkınlığının var olma ihtimalinin söz konusu olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda akciğer kanserli bireylerde yine kendi arasında ayrılmışlardır.

Şekil 3.9’da ortaya çıkan kanserli ve sağlıklı bireyler arasındaki farklılığın daha net bir şekilde anlaşılması için diziler ClustalW alt programıyla hizalandığında (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11) elde edilen polimorfik bölgelerin analizi sonucunda kanserli bireylerle polimorfik bölgelerin çok güçlü korelasyonu görülmektedir.

Şekil 3.10’daki polimorfik nükleotit sağlıklı bireylerde % 15 A iken (5/33) akciğer kanserli bireylerde %90’ın üzerindedir (11 bireyden 10’unda A). Bu durum bize TXq21 bölgesindeki bu noktanın akciğer kanserinin ortaya çıkmasındaki sebep veya sonuçlardan biri olabileceğini işaret etmektedir. Diğer kanser tiplerinde akciğer kanseri kadar yüksek korelasyon olmamasına rağmen bu bölgedeki polimorfizmin bu tür kanserlerle çeşitli düzeylerde alakalı olduğu kesinlikle söylenebilir ki bu durumun daha yüksek sayıda taramalarla ortaya çıkarılması gerekmektedir.

DNA dizileme yöntemi referans bir metod olarak kabul ediliyorsa da, çoğaltılan DNA’nın direk dizilenmesi bir gendeki mutasyonların rutin olarak taranmasında yakın zamana kadar kullanılmamıştır. Manual dizi analizinin, pahalı olması, zaman kaybına yol açması ve yoğun laboratuvar işlemleri gerektirmesi nedeniyle heterojenite gösteren genlerdeki mutasyon belirleme amaçlı kullanımı zorlaştırmıştır. Ancak diğer tarama metodları da yoğun laboratuvar iş gücü gerektirmekte ve zaman almaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin mutasyon tarama oranı

oldukça değişkindir ve asla %100'e ulaşmamaktadır. Günümüzde dizileme reaksiyonları tamamen otomatize edilmiş kapiler elektroforez yöntemiyle yapıldığından daha basitleşmiş, zaman kaybı ve kişisel hatalar asgari düzeye indirgenmiştir ve böylece otomatik DNA dizileme cihazları kullanılarak dizi analizi daha çok kullanılabilir hale gelmiştir [112]. Bu durum aynı zamanda ticari olarak DNA dizileme fiyatlarının düşmesine ve çok sayıda DNA örneğinin dizi karşılaştırmasının mümkün olmasına yol açmıştır. Bu bağlamda belirli bir gen veya DNA bölgesinin kanserde rolü olup olmadığını araştırmak için kanserli ve sağlıklı insanlardan çoğaltılan DNA dizilerinin restriksiyon enzimleriyle tek tek denenerek polimorfik bölgelerinin tespit edilmesi ve bundan sonra bu polimorfik bölgelerin yine tek tek kanserle korelasyonunun araştırılması yerine, tercih ettiğimiz dizileme yöntemiyle bütün dizi içindeki polimorfik bölgelerin tek seferde tespit edilmesi ve aynı zamanda karşılaştırılması mümkün olmuştur. Ayrıca bütün dizinin elde edilmesiyle restriksiyon bölgesi olmayan polimorfik bölgelerin de tespiti ve karşılaştırılması mümkün olmaktadır. Örnek olarak restriksiyon enzim yöntemiyle TXq21 içinde yer alan (a/g)ggg(g/t) polimorfizmi tespit edilemeyecekti çünkü bu bölgedeki polimorfik nükleotitleri ayırabilecek bir restriksiyon enzimi şu an mevcut değildir (bu bölgeyi kesen enzimler vardır ancak polimorfik bölgede tek bir nükleotit şartı aramayan enzimlerdir).

Şekil 3.8'de görülen bu yüksek benzerlik oranı yorumlandığında, TUSC2'nin bizim çoğaltığımız gen bölgesi (TXq21) yüksek ihtimalle retrotranspozisyon yolu ile Xq21'in 15322289-15323215 nt.leri arasına yerleşmiş olma ihtimali söz konusudur ve Xq21'in bu bölgesi de crossing over ile Y kromozomunun PAR bölgesine yerleşmiş olabilir çünkü bu bölge aynı zamanda Y kromozomunun PAR bölgesiyle de % 80'in üzerinde benzerlik göstermektedir. Aslında bilindiği gibi retrotranspozisyonlar, genellikle yalancı (fonksiyonsuz) genler oluştururlar. İncelenen gen bölgesinin tahminlerimizdeki gibi retrotranspozisyon sonucu oluştu ise (bugüne kadar keşfedilmemiş bir mRNA'sı olmadığı halde) bu bölgenin hem kanserleşmede rol oynayan aday bölge olabilmesi hem de retrotranspozisyon sonucu bu denli ciddi bir işlev yapıyor olması oldukça ilginçtir.

#### 4.1. Bu Çalışmanın Devamında Yapılması Gerekenler

Genom çapında TUSC2 ve TUSC4 genlerini hem sağlıklılarda hem de hastalarda netleştirmek için tarama yapılan birey sayısının artırılması ve Southern blot analizleri ile desteklenmesi.

TXq21 polimorfizminin bayanlarda X kromozomunun tek allelinde mi yoksa her iki allelinde mi ortaya çıktığını saptayabilmek için restriksiyon analizlerinin yapılması.

TXq21 ve TUSC2 gen bölgesi hakkında daha detaylı bilgi sahibi olabilmemiz için Y kromozomunun PAR bölgesinde karşılık gelen dizinin biyoinformatik araçlar ve deneysel olarak analiz edilmesi ve incelenmesi.

Kanser hastalarında, kandan genomik DNA izolasyonunun yanı sıra tümör dokusundan da DNA izolasyonu yaparak TXq21 polimorfizmini saptamak.

Her ne kadar yalancı gen statüsünde görünse de bu çalışma ile kanserle yüksek korelasyonu tespit edilen bu bölgenin (TXq21) promotor veya enhansır olma ihtimali söz konusudur. Bu yüzden bu bölgenin ilgili moleküler mühendislik araçlarıyla promotor ve enhansır aktivite testine tabi tutulması aydınlatıcı bilgiler üretebilir.

## 5. KAYNAKÇA

- [1] Sarasin, A., "An Overview of the Mechanisms of Mutagenesis and Carcinogenesis", *Mutation Research*, **544**, (2003) 99.
- [2] Klug, S.W., Cummings, R.M., Genetik Kavramlar, Öner, C., **2**, Palme Yayıncılık, Ankara, (2002).
- [3] Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C., "Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi", *Solunum*, **5**, (2003) 127.
- [4] Lowitz, B.B., Casciato, A.D, "Cancer Biology and Oncogens" , *Medical Oncology and Principles Of Cancer Biology*, (2003) .
- [5] Bignold, L.P., "Variation, Evolution, Immortality and Genetic Instabilities in Tumour Cells", *Cancer Letters*, (**Baskıda**).
- [6] Lantuejoul, S. and Brambilla, E., "Prognostic Biomarkers in Non-Small-Cell Lung Carcinoma", *Current Diagnostic Pathology*, **12**, (2006) 418.
- [7] Şenel, F. and Çirakoğlu, B., "Kanserle Savaş", *Bilim Teknik*, **3**, (2003)18.
- [8] Crul, M., Megyesi, J., "The Role of Genetic Instability in Tumor Growth: Challenge of a Concept." *American Journal of Pathology.*, **160**, (2002) 753.
- [9] Zaman, A., Acar, A., Acar, O., "Meningiomlardaki Kromozomal Anomaliler", *Türk Nöroşirürji Dergisi*, **11**, (2001) 15.
- [10] Barrett, J.C., Tsutsui, T., Oshimura, M., "In Genetic Mechanisms in Carcinogenesis and Tumor Progression", *Cancer Research*, **3**, (2001) 97.
- [11] Güneş, H., "Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri", *Tr. J. of Biology*, **23**, (1999) 283.
- [12] Işık, N., Erkan, L. et al., "Akciğer Kanserlerinde C-ErbB-2 Onkogen Ekspresyonu ve Bunun Prognostik Faktörlerle Karşılaştırılması", *Solunum*, **7**, (2005) 51.
- [13] Keer, J.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics", *British Journal of Cancer*, **26**, (1972) 239.
- [14] Yılmaz, İ., Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile

değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, İstanbul, (2005).

[15] Bellamy, C.O.C., Malcomson, R.D.G., Harrison, D.J. and Wyllie, A.H., "Cell Death in Health Disease: The Regulation of Apoptosis", *Seminars in Cancer and Biology*, **6**, (1995) 3.

[16] Cohen, J.J., "Apoptosis: The Physiological Pathway of Cell Death", *Hosp Pract*, **15**, (1993) 35.

[17] Miller, D.M., Blume, S., Borst, M., Gee, J. et al, "Oncogenes, Malignant Transformation, and Modern Medicine", *American Journal Medicine Science*, **300**, (1990) 59.

[18] Akins, P.T., Liu, P.K., Hsu, Y.C., "Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia", *Stroke*, **27**, (1996) 1682.

[19] Lindgren, V., Rowley, J.D., "Comparable Complex Rearrangements Involving 8;21 and 9;22 Translocations in Leukaemia", *Nature*, **266**, (1977) 744.

[20] Doğan, A., Küçük hücre dışı akciğer kanserli olgularda radyoterapinin serum vasküler endotelial büyüme faktörü ve periferik kan trombosit düzeyleri üzerine etkisi, Uzmanlık Tezi, T.C Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyasyon Onkolojisi Kliniği, İstanbul (2006)

[21] Akbaş, E. and Budak, T.S., "Sigara İçen Radyoloji Teknisyenlerinde Trimethoprimin Kromozomal Düzensizlikler Üzerine Etkileri", *Tr. J. of Biology*, **22**, (1998) 99.

[22] Wodarz, D. and Komarova, N., "Can Loss of Apoptosis Protect Against Cancer?", *Trends in Genetics*, **23**, (2007) 232.

[23] Chena, H. and Suzuki, M. "Aberrant Methylation of Fbn2 in Human Non-Small Cell Lung Cancer", *Lung Cancer*, **50**, (2005) 43.

[24] Kohno, T. and Yokota, J., "How Many Tumor Suppressor Are Involved in Human Lung Carcinogenesis", *Carcinogenesis*, **20**, (1999) 1403.

[25] Silva, A.J., Silva, M. J., Barradas, M. et al., "Analysis of the Candidate Tumor Suppressor Ris-1 in Primary Human Breast Carcinomas", *Mutation Research*, **594**, (2006) 78.

[26] Sanchez-Cespedes, M., "Dissecting the Genetic Alterations Involved in Lung Carcinogenesis", *Lung Cancer*, **40**, (2003) 111.

[27] Hegmann, K.T., Fraser, A.M., Keaney, R.P., Moser S.E., et al., "The Effect of Age at Smoking Initiation on Lung Cancer Risk", *Epidemiology*, **4**, (1993) 4444.

- [28] Mitelman, F.E.A., "Chromosomes, Genes, and Cancer", *American Cancer Society*, **44**, (1994) 133.
- [29] Dresler, C.M., Fratelli, C., Babb, J., Everly, L., "Gender Difference in Genetic Susceptibility for Lung Cancer", *Lung Cancer*, **20**, (2000) 153.
- [30] Dabbs, D.J., Landreneau, R.J., Liu, Y., Raab, S.S., "Detection of Estrogen Receptor by Immunohistochemistry in Pulmonary Adenocarcinoma", *Ann Thorac Surgery*, **73**, (2002) 403.
- [31] Wang, Y., Zhang, Z., Yan, Y., Lemon, W.J., "Chemically Induced Model for Squamous Cell Carcinoma of the Lung in Mice: Histopathology and Strain Susceptibility", *Cancer Research*, **64**, (2004)1647.
- [32] American Institute for Cancer Research, "Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective", *World Cancer Research Fundamental*, **15**, (1997) 130.
- [33] Lubin, J.H., Boice, J.D., "Lung Cancer Risk from Residential Radon: Meta Analysis Ofeight Epidemiologic Studies", *J.Natl.Cancer Inst.*, **89**, (1997) 49.
- [34] U.S. Department Of Health And Human Services , "What You Need to Know About Cancer", *National Cancer Institutes* , (2006).
- [35] Syrjanen, K.J., "Hpv Infections and Lung Cancer", *J Clinical Pathology*, **55**, (2002) 885.
- [36] DeMartini, J.C., Rosadio, R.H. et al, "Experimental Coinduction of Type D Retrovirus-Associated Pulmonary Carcinoma and Lentivirus-Associated Lymphoid Interstitial Pneumonia in Lambs", *J Natl Cancer Inst*, **79**, (1987) 167.
- [37] <http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1215/unite06.pdf>. (08.07.2007)
- [38] Bartrip, P.W., "History of Asbestos Related Disease", *Postgrad Medical Journal*, **80**, (2004) 72.
- [39] Lerman, C., Caporaso, N., Main, D. et al, "Depression and Self-Medication with Nicotine: The Modifying Influence of the Dopamine D4 Receptor Gene", *Psychol*, **17**, (1998) 56.
- [40] Fidan, F., Sezer, M. et al, "Öğretmenlerin Sigara İçme Durumu ve Sigara Yaşığı Karşısındaki Tutumları", *Toraks Dergisi*, **7**, (2006) 196.
- [41] Arınç, S., Ertuğrul, M. et al, "Primer Akciğer Kanserinde Bronoskopi Bulgularının Sigara Alışkanlığı ile İlişkisi", *Toraks Dergisi*, **8**, (2007) 6.
- [42] Akbaş, E., Çelik, A., Derici, E., Söylemez, F., "The Investigation of Cigarette Smoking on the Lymphocyte Life Time and Genotoxic Effects", *Geritatri*, **4**, (2001) 15.

[43] Lee, C.H., Wuc, D.H. et al, "Carcinogenetic İmpact of Alcohol İntake on Squamous Cell Carcinoma Risk of the Oesophagus in Relation to Tobacco Smoking", *European Journal Of Cancer*, **43**, (2007) 1188.

[44] Rose, M., Lewis, J., Langford, N., Baxter, M., Origgi, S., Barber, M., , "Arsenic in Seaweed-Forms, Concentration and Dietary Exposure", *Food and Chemical Toxicology*, **45**, (2007) 1263.

[45] Mclarty, J.W., Holiday, D.B., Girard, W.M., "Beta-Carotene, Vitamin A and Lung Cancer Chemoprevention: Results of an Intermediate Endpoint Study." *American Journal Clinical Nutrient.*, **62**, (1995) 1431.

[46] Tanyeli, A., Kılınç, Y. ,Erkman, H. et al, "Çukurova Bölgesinde Çocukluk Çağı Malignensileri", *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **20**, (1995) 157.

[47] Parkin, D.M., "Global Cancer Statistics in the Year 2000." *Lancet Oncology*, **2**, (2001) 533.

[48] Bozkurt, H., "Bazı Cisplatin Türevlerinin Sitotoksitesinin ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2004)

[49] Şengelen, M., "Türkiye'de Kanser İstatistikleri", Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (2002).

[50] Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, "Kanser Bildirimlerinin Değerlendirilmesi 1993-1994", Ankara, (1997).

[51] Ji, L. and Nishizaki, M., "Expression of Several Genes in the Human Chromosome 3p21.3 Homozygous Deletion Region by an Adenovirus Vector Results in Tumor Suppressor Activities in Vitro and in Vivo1", *Cancer Research*, **62**, (2002) 2715.

[52] Juliana, J.O., Razfar, A., and Idolina, D., "3p21.3 Tumor Suppressor Gene H37/Luca15/Rbm5 Inhibits Growth of Human Lung Cancer Cells Through Cell Cycle Arrest and Apoptosis", *Cancer Research*, **66**, (2006) 301.

[53] Ito, J.L., Tanaka, F., Saito,Y., Gopalan, B., "Liposomal Vector Mediated Delivery of the 3p Fus1 Gene Demonstrates Potent Antitumor Activity Against Human Lung Cancer in Vivo", *Cancer Gene Therapy*, **11**, (2004) 733.

[54] Tyczynski, J.E., Bray, F., Parkin, D.M., "Lung Cancer in Europe in 2000: Epidemiology, Prevention, and Early Detection", *Oncology*, **4**, (2003) 45.

[55] Anna, D., Charis, R., "Cytogenetic and Molecular Aspects of Lung Cancer", *Cancer Letters*, **239**, (2005) 148.



- [56] Uramoto, H., "Expression of Endoplasmic Reticulum Molecular Chaperone Grp78 in Human Lung Cancer and Its Clinical Significance", *Lung Cancer*, **49**, (2005) 55.
- [57] Mattern; J., "Characteristics of long-term survivors of untreated lung cancer", *Lung Cancer*, **36**, (2002) 178.
- [58] Mutluay, İ.S. and Fırat, S., "Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Bir Hastada Tonsil Metastazi", *Akciğer Arşivi*, **2**, (2002) 94.
- [59] Churg, A., "Lung Cancer Cell Type and Occupational Exposure." *Epidemiology of lung cancer.*, **1**, (1994) 413.
- [60] Hirsch, F.R., Matthews, MJ, Aisner S, et al., Changing Concepts and Terminology, "Histopathologic Classification of Small Cell Lung Cancer" *Cancer*, **3**, (1988) 973.
- [61] Kohno, T. and Yokota, J., "How Many Tumor Suppressor Genes Are Involved in Human Lung Carcinogenesis", *Carcinogenesis*, **20**, (1999) 1403.
- [62] Simonato, L., Agudo, A., Ahrens, W., et al., "Lung Cancer and Cigarette Smoking in Europe: An Update of Risk Estimates and an Assessment of Inter-Country Heterogeneity", *International Journal Cancer*, **91**, (2001) 876.
- [63] Jedrychowski, W., Becher, H., Wahrendorf, J., et al, "Effect of Tobacco Smoking on Various Histological Types of Lung Cancer", *Journal Cancer Research Clinical Oncology*, **118**, (1992) 276.
- [64] Muscat, J.E., Wynder, E.L., "Lung Cancer Pathology in Smokers, Ex-Smokers and Never Smokers", *Cancer Letters*, **88**, (1995) 1.
- [65] Boffetta, P., Jarvholm, B., Brennan, P., Nyren, O., "İncidence of Lung Cancer in a Large Cohort of Non-Smoking Men from Sweden", *İnt J Cancer*, **94**, (2001) 591.
- [66] Elçi, O.C. and Akpınar, M., "The Trend of Small Cell Lung Cancer among Young Men", *Lung Cancer*, **(Baskıda)**.
- [67] Eişen, T., "The Biology of Lung Cancer", *Lung Cancer: European Respiratory Monograph*, **3**, (2001) 61.
- [68] Göksel, T., Akkoçlu, A. P., "Pattern of Lung Cancer in Turkey, 1994-1998", *Respiration*, **69**, (2002) 207.
- [69] Yaman, M., Arı, O., and Sipahioğlu, B., "Primer Bronş Kanserinde Son On Yılda Görülen Değişiklikler", *Solunum*, **18**, (1993) 737.

- [70] Yılmaz, A. and Özvaran, K., "Akciğer Kanseri Olgularında Tümör Tipi Dağılımı ve Bazı Epidemiyolojik Özellikler Değişiyor Mu?(1992-1998)", *Toraks Dergisi*, **2**, (2001) 6.
- [71] Travis, J., "New Test Spots Cancer Cells in Blood", *Science News*, **153**, (1998) 244.
- [72] Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., "Cancer Statistics, 2004", *Cancer J Clin*, **54**, (2004) 8.
- [73] Aliustaoğlu, M., Gümüş, M., Yumuk, F., Ekenel, M., Karamanoğlu, A., Şengöz, M., Turhal, N.S., "P-13 the Survival Characteristics of the Stage 3 and 4 Non Small Cell Lung Cancer Patients in Marmara University Hospital in İstanbul, Turkey", *Lung Cancer*, **41**, (2003) 94.
- [74] Linda, E., Bröker, M., Giuseppe, G., "The Role of New Agents in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer", *T. European Journal of Cancer*, **38**, (2002) 2347.
- [75] Sari, M., Serin, G.M., Inanlı, S., Kaya, H.C., "Condylar metastasis involving dislocation presenting as the initial manifestation of squamous lung cancer", *Oral Oncology Extra (Baskıda)*.
- [76] Prescott, E, Osler, M, Hein, H.E., et al., "Gender and smoking-related risk of lung cancer", *Epidemiology*, **9**, (1998) 79.
- [77] Payne, S., "“Smoke Like a Man, Die Like a Man?”: A Review of the Relationship between Gender, Sex and Lung Cancer", *Social Science and Medicine*, **53**, (2001) 1067.
- [78] Demir, A., "The Role of Cyp1A1, Msp1 Gene Polymorphisms on Lung Cancer Development in Turkey", *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, **53**, (2005) 5.
- [79] Tyczynski, J.E., Bray, F., Parkin, D.M., "Lung Cancer in Europe in 2000: Epidemiology, Prevention, and Early Detection", *Lancet Oncol*, **4**, (2003) 45.
- [80] Chang, W.E. and Ho, W.L., "Loss of Heterozygosity at Loci of Candidate Tumor Suppressor Genes in Microdissected Primary Non-Small Cell Lung Cancer", *Cancer Detection and Prevention*, **26**, (2002) 343.
- [81] Raimondia, S., Boffetta, B., "Metabolic Gene Polymorphisms and Lung Cancer Risk in Non-Smokers an Update of the Gsec Study", *Mutation Research*, **592**, (2005) 45.
- [82] Jedrychowski W, Becher H, Wahrendorf J, et al., "Effect of tobacco smoking on various histological types of lung cancer", *J Cancer Res Clin Oncol*, **118**, (1992) 276.

- [83] Kondo, M., Ji.L., et al., "Overexpression of Candidate Tumor Suppressor Gene Fus1 Isolated from the 3p21.3 Homozygous Deletion Region Leads to G1 Arrest and Growth Inhibition of Lung Cancer Cells", *Oncogene*, **20**, (2001) 6258.
- [84] Juliana, J.O. and Alison, R., "A Candidate Tumor Suppressor Gene, H37, from the Human Lung Cancer Tumor Suppressor Locus 3p21.3", *Cancer Research*, **62**, (2002) 3207.
- [85] Girard, L., et al, "Genome-Wide Allelotyping of Lung Cancer Identifies New Regions of Allelic Loss, Differences between Small Cell Lung Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer, and Loci Clustering", *Cancer Research*, **60**, (2000) 4894.
- [86] Ana, Q. and Liu, Y., et al, "Deletion of Tumor Suppressor Genes in Chinese Non-Small Cell Lung Cancer", *Cancer Letters*, **184**, (2002) 189.
- [87] Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., "P53: A Frequent Target for Genetic Abnormalities in Lung Cancer", *Science Direct*, **246**, (1989) 491.
- [88] Harbour, J.W., Lai, S.L., Whang-Peng, J., et al, "Abnormalities in Structure and Expression of the Human Retinoblastoma Gene in SCLC", *Science*, **241**, (1988) 353.
- [89] <http://www.dsi.univparis5.fr/genatlas/symbol=TUSC2>, (09.07.2007).
- [90] <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/symbol=TUSC4>, (09.07.2007).
- [91] <http://www.genecards.org/cgi-bin/card.gene=TUSC2>, (09.07.2007).
- [92] International Human Genome Sequencing Consortium, "Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome", *Nature*, **431**, (2004) 915.
- [93] Luciana, R., Vasques, L., Pereira, V., "Allele-Specific X-Linked Gene Activity in Normal Human Cells Assayed by Expressed Single Nucleotide Polymorphisms", *DNA Research*, **8**, (2001)173.
- [94] Buller, R.E., Sood, A.K., Lallas, T., Buekers, T., "Association between Non-Random X-Chromosome Inactivation and BRCA1 Mutation in Germline DNA of Patients with Ovarian Cancer", *J Natl Cancer Inst*, **91**, (1999) 339.
- [95] Carolyn, J.B., "Skewed X-Chromosome Inactivation: Cause or Consequence?", *Journal of the National Cancer Institute*, **14**, (1999) 91.
- [96] Kristiansen, M., Langerod, A., Knudsen, G.P., Weber, B.L., "High Frequency of Skewed X Inactivation in Young Breast Cancer Patients", *J Med Genet*, **39**, (2002) 30.

[97] Gang, L., Qin, S., Gui, L., "Skewed X Chromosome Inactivation of Blood Cells is Associated with Early Development of Lung Cancer in Females", *Oncology Reports*, **16**, (2006) 859.

[98] Tolun, A., "Kalıtsal Genetik Hastalıklar", *Bilim ve Teknik*, (2002).

[99] Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.S., "Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells", *Nucleic Acid Research*, **16**, (1988) 1215.

[100] Rozen S, Skaletsky HJ, "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers", *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Edit. Krawetz S, Misener S., Totowa, N.J., Humana Press, (2000) 365.

[101] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., Lipman, D.J., "Basic Local Alignment Search Tool", *Journal of Molecular Biology*, **215**, (1990) 403.

[102] Barber, D.R., Harmer, D.W., Coleman, R.A., "GAPDH as a Housekeeping Gene: Analysis of GAPDH mRNA Expression in a Panel of 72 Human Tissues", *Physiol Genomics*, **21**, (2005) 389.

[103] Temizkan, G., Arda, N., "Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler", İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), **2**, Nobel Tıp Kitapevi, Ankara, (2004).

[104] Hall, T.A., "Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analyses Program for Windows 95/98/Nt", *Nucleic Acids Symp Ser*, (1999) 95.

[105] Miller, R.D., Kwok, P.Y., "Regions of Low Single-Nucleotide Polymorphism Incidence in Human and Orangutan Xq: Deserts and Recent Coalescences", *Genomics*, **71**, (2001) 78.

[106] Marzano, R., Corrado, G., et al, "Analysis of Chromosomes 3, 7, X and the EGFR Gene in Uterine Cervical Cancer Progression", *European Journal Of Cancer*, **40**, (2004) 1624.

[107] Güran, Ş., "Kanserden Korunma", *Gülhane Tıp Dergisi*, **47**, (2005) 324.

[108] Toyooka, S. and Ouchida, M., "HD-PTP: A Novel Protein Tyrosine Phosphatase Gene on Human Chromosome 3p21.3", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **278**, (2000) 671.

[109] Lerman, M.I., "The 630-Kb Lung Cancer Homozygous Deletion Region on Human Chromosome 3p21.3: Identification and Evaluation of the

Resident Candidate Tumor Suppressor Genes.Tumor Suppressor Gene Consortium", *Cancer Research*, **60**, (2000) 6116.

[110] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (09.07.2007).

[111] <http://snp.wustl.edu/learn-snps.html>, (09.07.2007).

[112] Çilingir, O., Müslümanoğlu, O.H., "Factor IX Gene Mutations in Turkish Haemophiliacs", *The Medical Journal of Kocatepe*, **6**, (2005) 1.