



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR TÜRK POPULASYONUNDA BEYİN KANSERİ VE *AXIN2* GEN
POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

EMİNE GÜLŞEN GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ERGÜN PINARBAŞI

SİVAS
2009

BİR TÜRK POPULASYONUNDA BEYİN KANSERİ VE
AXIN2 GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI

EMİNE GÜLŞEN GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2009

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR TÜRK POPÜLASYONUNDA BEYİN KANSERİ VE *AXIN2* GEN
POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

EMİNE GÜLŞEN GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. ERGÜN PINARBAŞI

SİVAS
2009

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK	
Üye	Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Serdal ARSLAN	

ONAY

Bu tez çalışması, 21 / 01 / 2009 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tijen TEMİZKAYA
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Sevgili Eşime.....

ÖZET

BİR TÜRK POPULASYONUNDA BEYİN KANSERİ VE *AXIN2* GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine Gülşen GÜNEŞ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI

2009, 63 sayfa

Çalışmamızda *Axin2* geninin sekiz farklı bölgesinde görülen, Ekzon1 148C>T ve 432T>C, İntron2 956+16A>G, Ekzon5 1365G>A ve 1386C>T, İntron5 1712+19G>T, Ekzon7 2062C>T ve İntron7 2141+73G>A polimorfizmleri beyin tümörü oluşumu arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada beyin tümörü tanısı konmuş 100 birey hasta grubu olarak, herhangi bir kanser tanısı konmamış sağlıklı 100 birey de kontrol grubu olarak incelemeye alınmıştır. *Axin2* geninin genotipleme çalışmaları genomik DNA'lara PCR ve PCR'a dayalı RFLP yöntemleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan istatistiksel hesaplamalar sonucunda, Ekzon5 1386C>T polimorfizmi ile beyin tümörü oluşma riski arasında önemli bir ilişki bulunmuş ($p=0,022$, $p<0,05$) fakat diğer bölgelerdeki polimorfizmler ile beyin tümörü riski oluşma arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bunun yanı sıra, Ekzon1 148 C>T bölgesinde CT genotipi taşıyan erkeklerin kadınlara göre beyin tümörüne karşı koruyucu özellik kazandıkları, Ekzon1 432 T>C polimorfizm bölgesinde TC genotipi taşıyan hipofiz adenomalı bireylerin diğer hastalara göre beyin tümörüne 8 kat daha yatkın oldukları, İntron2 956+16A>G polimorfizm bölgesinde AA ya da GG genotiplerinden birini taşıyan menengiomalı bireylerin diğer hasta bireylere göre beyin tümörüne daha az yatkın oldukları, Ekzon5 1386C>T polimorfizm bölgesinde TT genotipi taşıyan menengiomalı bireylerin beyin tümörüne 6.75 kat daha yatkın oldukları ve İntron5 1712+19G>T polimorfizm bölgesinde GT genotipli olan hipofiz adenomalı

bireylerin diğ er hastalara g ore beyin tümörüne daha az yatkın oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Axin2*, beyin tümörü, polimorfizm.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN BRAIN CANCER AND *AXIN2* GENE POLYMORPHISM IN A TURKISH POPULATION

Emine Gülşen GÜNEŞ

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI

2009, 63 pages

In our study we aimed whether or not Ekzon1 148C>T, Ekzon1 432T>C, İntron2 956+16A>G, Ekzon5 1365G>A, Ekzon5 1386C>T, İntron5 1712+19G>T, Ekzon7 2062C>T and İntron7 2141+73G>A polymorphisms of *Axin2* gene is related to brain cancer development. In this study, 100 people with brain tumor as the patient group and 100 healthy people as the control group are examined. Genotyping of Ekzon1 148C>T, Ekzon1 432T>C, İntron2 956+16A>G, Ekzon5 1365G>A, Ekzon5 1386C>T, İntron5 1712+19G>T, Ekzon7 2062C>T and İntron7 2141+73G>A polymorphisms of *Axin2* gene has been performed by PCR and RFLP methods using isolated genomic DNA.

After the statistical calculations, a significant relationship ($p=0,022$, $p<0,05$) has been found between Exon5 1386C>T polymorphism and brain tumor development risk, but no significant relationship has been found between the polymorphism in other regions and the brain tumor development risk. Additionally, it has been found that; compared to female, male with CT genotype in Exon1 148C>T region developed protection for brain cancer; individuals have pituitary adenoma with TC genotype in Exon1 432T>C polymorphism region have brain cancer tendency 8 times more than other patients; individuals with menengioma having AA or GG genotypes in Intron2 956+16A>G polymorphism region have less tendency to brain cancer than others; individuals have menengioma with TT genotype in Exon5 1386C>T polymorphism region have brain cancer tendency 6,75 times more than others; and individuals have pituitary adenoma with GT genotype in

Intron5 1712+19G>T polymorphism region have less tendency to brain cancer compared to other patients.

Key words: Axin2, brain tumor, polymorphism.

TEŞEKKÜR

Akademik hayatıma başladığım andan itibaren desteğini esirgemeyen ve bilimsel düşünme yetisi kazanmamı sağlayan danışman hocam Prof .Dr. Ergün PINARBAŞI'na,

Katkı ve desteklerinden dolayı Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a, Anabilim Dalımız öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN' a ve çalışma arkadaşım Arş. Gör. Gonca DÖNMEZ'e teşekkür ederim.

İstatistiksel konularda bilgi birikimlerinden faydalandığım Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Hafize SEZER ve Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a teşekkür ederim.

Bana her konuda sabrı ve sevgisi ile destek olan, canım eşim Metin GÜNEŞ'e ve aileme desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 <i>Axin2</i> Geni	2
2.1.1 <i>Axin2</i> Geninin Yapısı ve Fonksiyonları	2
2.1.2 <i>Axin2</i> Geninin Katıldığı Yolaklar	5
2.1.2.1 Wnt Yolağı	5
2.1.2.2 TGFβ Yolağı	6
2.1.2.3 SAPK/JNK Yolağı	7
2.2 Primer Beyin Tümörleri	8
2.2.1 Giriş	8
2.2.2 Primer Beyin Tümörünün Epidemiyolojisi	9
2.2.2.1 İnsidansı	9
2.2.2.2 Mortalite ve Hayatta Kalım Oranı	10
2.2.2.3 İnsidans ve Mortalitedeki Eğilim	10
2.2.2.4 Yaş, Cinsiyet ve Etnik Köken Farklılıkları	11
2.2.3 Moleküler Genetik Farklılıkları ile Histolojik Karakterlerine Göre Tümör Tipleri	12
2.2.4 Risk Faktörleri	14
2.2.4.1 Genetik Yatkınlık ve Ailesel Birikim	14
2.2.4.2 İyonize ve Non-iyonize Radyasyon	17
2.2.4.3 Yaşam Stili Faktörleri	18
2.2.5 Moleküler Biyolojik Çalışmalarda Primer Beyin Tümörü	19
2.3 Polimorfizm Tanımı ve Genetik Polimorfizm	19
2.3.1 Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)	20
2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	20
2.3.3 Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	22
3 GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1 Kullanılan Cihazlar	24
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.3 Kullanılan Plastik Malzemeler	25
3.4 Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	26
3.4.1 Genomik DNA Eldesinde Kullanılan Çözeltiler	26
3.4.2 Primerler	27
3.5 Çalışma Grubu	28
3.6 Örneklerin Alınması	29
3.7 DNA İzolasyonu	29

3.8	Genotiplleme	30
3.9	Jel Elektroforezi	33
3.9.1	Jelin Hazırlanması	33
3.9.2	Jelde DNA'nın Yürütülmesi	33
3.10	İstatistiksel Analiz	33
4	BULGULAR	34
4.1	<i>Axin2</i> Geni Polimorfizmlerinin RFLP Yöntemi ile Değerlendirilmesi	34
4.2	Beyin Tümörlü Hastalar ile Sağlıklı Bireylerin Özellikleri	38
4.3	Beyin Tümörlü Hastalar ile Sağlıklı Bireylerin <i>Axin2</i> Genotipleri	39
4.3.1	<i>Axin2</i> Ekzon1 148C>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	39
4.3.2	<i>Axin2</i> Ekzon1 432T>C Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	41
4.3.3	<i>Axin2</i> İntron2 956+16A>G Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	41
4.3.4	<i>Axin2</i> Ekzon5 1365G>A Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	42
4.3.5	<i>Axin2</i> Ekzon5 1386C>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	42
4.3.6	<i>Axin2</i> İntron5 1712+19G>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	43
4.3.7	<i>Axin2</i> Ekzon7 2062C>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	43
4.3.8	<i>Axin2</i> İntron7 2141+73G>A Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	44
4.4	<i>Axin2</i> Polimorfik Genotipleri ile Beyin Tümörü Hastalarının Klinik-Patolojik Özellikleri Arasındaki İlişki	44
5	TARTIŞMA ve SONUÇ	49
	KAYNAKLAR	54
	EKLER	
	EK-1 Yerel Etik Kurulu Kararı	59
	EK-2 Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Bilgi Formu	61
	ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	<i>Axin1</i> geni	3
Şekil 2.2	<i>Axin2</i> geni	4
Şekil 2.3	Axin proteininin görev aldığı sinyal iletim yolları	7
Şekil 4.1	<i>Axin2</i> polimorfizmlerinin RFLP sonrası agaroz jeldeki görüntüsü	35
Şekil 4.2	<i>Axin2</i> polimorfizmlerinin RFLP sonrası agaroz jeldeki görüntüsü	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Menengisler ya da Nöroepitellerin primer beyin tümörleri için potansiyel risk faktörleri ve geçerli bulgular	15
Çizelge 2.1 (devamı) Menengisler ya da Nöroepitellerin primer beyin tümörleri için potansiyel risk faktörleri ve geçerli bulgular	16
Çizelge 2.1 (devamı) Menengisler ya da Nöroepitellerin primer beyin tümörleri için potansiyel risk faktörleri ve geçerli bulgular	17
Çizelge 3.1 <i>Axin2</i> genine ait primer dizileri, yapışma sıcaklıklar, kesim enzimleri ile kesim sonrası elde edilen fragment uzunlukları	31
Çizelge 3.2 Tüm bölgeler için PCR tepkime karışımları	32
Çizelge 3.3 Tüm bölgeler için kullanılan PCR programları	32
Çizelge 4.1 Beyin tümörlü hasta bireyler ile sağlıklı bireylerin istatistiksel değerleri	38
Çizelge 4.2 <i>Axin2</i> gen polimorfizminin tüm bölgelerde istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler	40
Çizelge 4.3 <i>Axin2</i> polimorfik genotipleri ile beyin tümörlü hastaların klinik-patalojik özelliklerinin istatistiksel sonuçları	46
Çizelge 4.3 (devamı) <i>Axin2</i> polimorfik genotipleri ile beyin tümörlü hastaların klinik-patalojik özelliklerinin istatistiksel sonuçları	47

KISALTMALAR DİZİNİ

⁰ C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
a.a.	Amino asit
APC	Adenomatöz polipozis koli
AST	Astrositoma
bç	Baz çifti
CI	Güven aralığı
dk	Dakika
DVL	Dishevelled (Wnt yolağının bir bileşeni)
EDTA	Etilen diamin tetraasetikasit
HA	Hipofiz adenoma
kb	Kilobaz
ME	Menengioma
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
OR	Risk faktörü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
sn	Saniye
SA	Sigara alışkanlığı
SNP	Tek nükleotid ploimorfizmi
TBE	Tris-Borat EDTA tamponu
TT	Tümör tipi
UV	Ultraviyole (morötesi)
V	Volt

1. GİRİŞ

Tümör baskılayıcı genler ve onların kontrol ettikleri sinyal yolları hücre proliferasyonu, farklılaşma ve kanserde önemli roller üstlenirler. Bu genlerin aktivasyon ya da inaktivasyonuna yol açan mutasyonların tümör gelişimi ile ilintili olduğu yapılan birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Axis inhibisyon proteini 2 (Axin2) de bu tümör baskılayıcı genlerden biridir. Gen, insan kromozomunun 17q24 bölgesinde konuşlanmış 2.5 kb uzunluğundadır. 10 tane ekzondan oluşan gen, 843 amino asitlik (aa) bir protein şifreler. Gen ürünü Wnt/ β -katenin sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir ve tümör baskılayıcı olarak bu sinyal yolağında görev alarak birçok kanserde gözlenen Wnt sinyalinin deregülasyonunu sınırlar. Wnt yolağı omurgalı gelişimi, hücre çoğalması, farklılaşma ve karsinogenezde rol alan önemli yolaklardan biridir. Bu yolağın bileşenlerinde görülen mutasyonlar kolon, melanoma, medullablastoma, hepatosellüler karsinoma ve uterus gibi çok çeşitli kanser türlerine yol açmaktadır. Bu yolağın bileşenlerinden biri olan Axin proteini oluşan Adenomatöz Polipozis Koli (APC) kompleksinde skaffold proteini olarak görev alır ve β -katenin fosforilasyonunu GSK-3 β ve CK1a aracılığıyla teşvik eder. Bu düzenleyici evre β katenin degradasyonuna kadar uzanır ve proteinin sitoplazmada düşük konsantrasyonda kalmasını sağlar. Amino asit disizi % 45 benzerlik gösteren iki tane *Axin* geni vardır ve herikisi de β -kateninin down-regülasyonundan sorumludur. Her iki genin de benzer işlevleri olmasına karşın Wnt aktivasyonu ile yalnızca Axin2 düzeyi yükselmektedir. Dolayısıyla bu genlerde meydana gelen bir değişim kanser gelişimi için tetikleyici bir rol oynayabilir. Polimorfizm de genlerde görülen değişimlerdir. Genel olarak polimorfizm aynı türün bireyleri arasında iki ya da daha fazla farklı formun var olması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Polimorfizm biyo-çeşitlilik, genetik varyasyon ve adaptasyon ile ilişkili bir çeşitli değişkenliktir. Evrimsel bir sürecin sonucu olan polimorfizm kalıtılabilir ve seçim yoluyla değiştirilebilir. Bunun yanı sıra, moleküler biyoloji alanında yapılan polimorfizm çalışmaları sonucunda elde edilen bulguların, birçok hastalığa yatkınlığın belirlenmesindeki önemleri büyüktür. Polimorfizm ve çeşitli kanserler arasında ilişkinin olduğunu gösteren birçok araştırma vardır (De Roos A J. 2003).

Biz de çalışmamızda Türk popülasyonunda Wnt/ β -katenin yolağında önemli olduğu düşünülen *Axin2* geninin 8 farklı bölgesindeki polimorfizmler ile beyin tümörü arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

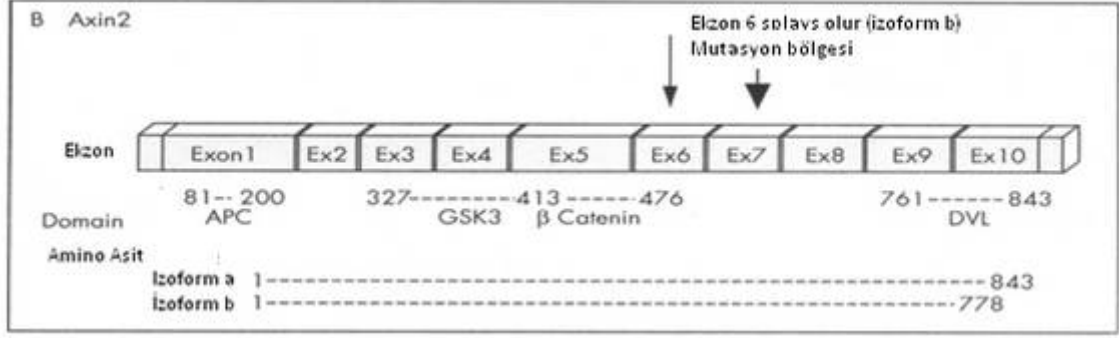
2.1. Axin2 Geni

2.1.1. Axin2 Geninin Yapısı ve Fonksiyonları

Axin ilk önce farede tanımlanmış ve “*fused*” ya da “*fu*” olarak adlandırılmış bir gen ürünüdür, daha sonra ise Axin (Aksis inhibisyon proteini) olarak yeniden isimlendirilmiştir (Kanzaki H ve ark., 2006; Salahshor S ve Woodgett J. R. 2005). Axin embriyonik gelişim süresince axis oluşumunun kontrolünde kritik bir role sahiptir. Wnt sinyal iletimi aktivitesi, omurgalılarda dorsal-ventral duplikasyonu belirlemekte ve Axin de bu sinyal iletim yolağında negatif düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Axin'in, Wnt sinyal iletim yolağının negatif düzenleyicisi olması düşüncesinden yola çıkılarak yapılan çalışmalarda bir tümör baskılayıcı gen olduğu ortaya konulmuş ve en az üç farklı sinyal oluşum yolağında görev aldığı belirlenmiştir, SAPK (Stress-activated protein kinase), TGF β (transforming growth factor β), ve Wnt sinyal iletim yolları (Şekil 2.4) (Salahshor S and Woodgett J R. 2005).

Axin proteinleri Axin1 ve Axin2 olarak iki çeşittir. Axin1 (Axin) ve Axin2 (Axil, conductin) protein ve nükleotid düzeyinde %45 benzerliğe sahiptir. Bu genlerin aynı zamanda kodlanmış kısımları da benzer fonksiyonlara sahiptir. İnsan Axin1 geni;

- ✓ 16p13.3 kromozomal bölgede haritalanmıştır.
- ✓ Faredeki homoloğu ile %87 benzerlik göstermektedir.
- ✓ Wnt yolağındaki β -katenin yıkım kompleksinin esas bileşenidir.
- ✓ Axin1'in konsantrasyonu bu yolakta diğer bileşenlerin yıkım konsantrasyonundan 1000 kez daha küçük olmasıyla Axin1 bu yolağın sınırlayıcı faktörüdür.
- ✓ Bu yolakta sürekli exprese olur.
- ✓ Axin1'in a izoformu 862 aa iken, b izoformu
exon 8'in splaysingi nedeniyle 826 aa'tir.

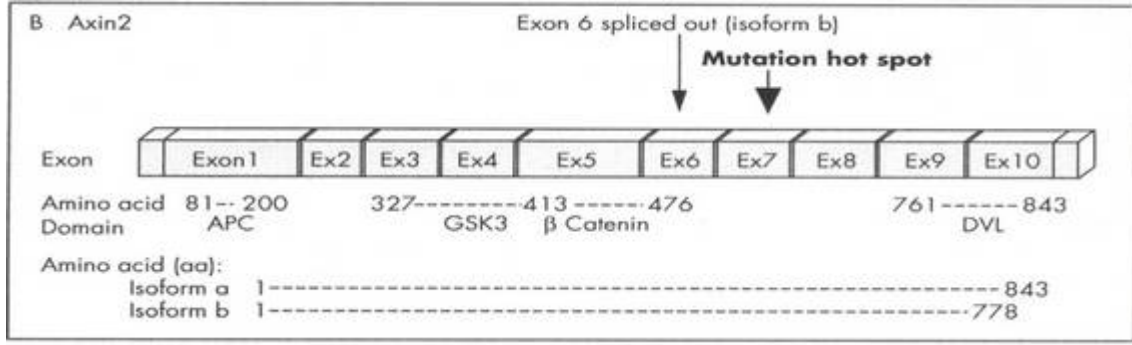


Şekil 2.1 Axin1 geni

- ✓ Bu splays bölge farklı türler arasında korunmuştur.
- ✓ N-terminalde APC'ye bağlanma domaini olan RGS (G-protein sinyal regülatörü) domaini vardır.
- ✓ Proteinin merkezinde GSK3 β ve β -katenin bağlama domainleri bulunur..
- ✓ C-terminali Dishevelled'in DIX domaini ile etkileşen bir domain içerir.
- ✓ Ayrıca β -kateninin şaperonu olarak da rol oynar.

İnsan Axin2 geni;

- ✓ Axin1'in homologudur.
- ✓ Wnt/ β - katenin yolağının negatif regülatörüdür.
- ✓ Axin2, 2.5 kb'a denk gelen 10 exon ve 843 aa içerir.
- ✓ a ve b şeklinde iki izoformu vardır. b izoformunda 65 aa'lık bir bölge içeren exon 6 splays olmuştur.



Şekil 2.2 *Axin2* geni

- ✓ *Axin2* geni insanlarda 17q24'te bulunur.
- ✓ *Axin2* de *Axin1* gibi APC, GSK3β ve β-katenin bağlama domaini içerir.
- ✓ Bazı tümör türlerinde örneğin meme kanserlerinde bu bölgede heterozigotluk kaybının olduğu bilinmektedir.
- ✓ *Axin2* mutasyonu nedeniyle kolorektal kanserlerde β-katenin düzeyinde artış gözlenmiştir.
- ✓ Artmış β-katenin konsantasyonuna yanıt olarak hücrede *Axin2* exprese olur.

Axin2 proteini β-katenin degradasyonu için gerekli olan bileşenler için bağlanma domainleri içerir. APC'ye bağlanan 81-200 amino asitleri arasında bulunan N-terminal G-proteini sinyal iletimi domaini, proteinin ortasında sırası ile 327-413 ve 413-476. amino asitleri arasında yer alan GSK3β ve β-katenin için ayrı bağlanma domainleri, ve bir dishevelled'in Axin dimerizasyonuna aracılık eden bir bölümüne bağlanan ve 761-843 amino asitleri arasında bulunan C-terminal (DIX) domaini içerir. Moleküler düzeyde Axin/conductin β-katenin'in fosforilasyonunda ihtiyaç duyulan tüm bileşenleri birbirine yaklaştıran bir skaffold protein gibi görev yapar (Behrens J ve ark. 1998; Ikeda S., ve ark., 1998).

Axin2 genindeki değişimler farklı tümör tiplerinde belirlenmiştir. Mutasyonların çoğu APC ve β-katenin bağlanma domainlerinde yer almaktadır. Ayrıca, kolon,

yumurtalık, endometrium, adenokarsinoma, ve hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında *Axin* dizi değişimleri bulunmuştur. Birçok çalışma çeşitli tümör tiplerinde *Axin*'in rol aldığını göstermiştir. Meme kanseri, nöroblastoma ve diğer tümörlerde kromozom 17q24'de *Axin2* geninin yer aldığı bölgede heterozigotluk kaybı gözlenmiştir. İnsan *Axin2* bu nedenle, çoklu tümör tiplerinde gerekli olan çok güçlü bir adaydır (Salahshor S ve Woodgett J. R. 2005, Mai M, ve ark., 1999).

Son yapılan çalışmalar *Axin2* geninin bazı bölgelerinde meydana gelen değişimlerin akciğer kanseri, medullablastoma, kolon kanseri, ailesel diş gelişimsizliği, karaciğer kanseri, ve Alzheimer hastalığı gibi birçok alanda yatkınlığa neden olduğunu ileri sürmektedir. Örneğin bu çalışmalardan birinde *Axin* geninin 148. nükleotidinde meydana gelen bir polimorfizmin Japon toplumunda akciğer kanserine yatkınlık oluşturduğu belirlenmiştir (Kanzaki H. 2006).

2.1.2. *Axin2* Geninin Katıldığı Yolaklar

2.1.2.1.Wnt Yolağı

Wnt yolağı hücre çoğalması, farklılaşma ve hareketi ile gelişme ve morfogenez için hücrenin kullandığı en önemli yolaklardan biridir. Protein fosforilasyonundaki değişimler Wnt sinyal iletim yolağının düzenlenmesini sağlayan ana bileşendir (Satoh S. ve ark., 2000, Akiyama T., 2000, Wodarz A. and Nusse R, 1998). Wnt yolağının ana bileşenleri *Axin*, adenomatoz polipozis koli, glikojen sentaz kinaz ($GSK3-GSK\beta$ ve $GSK\alpha$) ve beta katenin fosfoproteinlerdir ve fosforilasyonla aktiviteleri düzenlenir. Uyarılmamış hücrelerde $GSK\alpha$ ve β sitoplazmik beta katenini fosforile eder ve beta transdusin tekrarları içeren bir protein olan E3 ubikülin ligaz için tanıma motifinin oluşmasını sağlar. Ubikütilenen beta katenin hızlı bir biçimde 26S proteozom tarafından parçalanır dolayısıyla beta kateninin sitoplazmik düzeyi düşük tutulur. Salınan Wnt ligandları hücre yüzeyindeki frizzled reseptörlerine bağlandığında henüz tam olarak anlaşılamayan bir mekanizma ile Dishevelled (DVL) proteinini aktive eder. Aktive olan DVL beta katenine bağlanır ve $GSK\alpha$ ve β tarafından beta kateninin fosforilasyonunu önler. Böylece beta katenin parçalanmaz, birikir ve çekirdeğe girer ve orada TCF (T-hücre reseptörü)/lenf enhanser bağlanma faktörü 1 (LEF) olarak bilinen transkripsiyon faktörü ile etkileşir. Bu etkileşim çeşitli hedef genlerin (c-jun, c-myc, siklin D1) tetiklenmesine aracılık eder. Çeşitli yayınlar *Axin*'in bu etkileşimde skaffold protein olarak işlev gördüğünü ileri sürmektedir (Bellamy CO., ve ark., 1995). *Axin* wnt

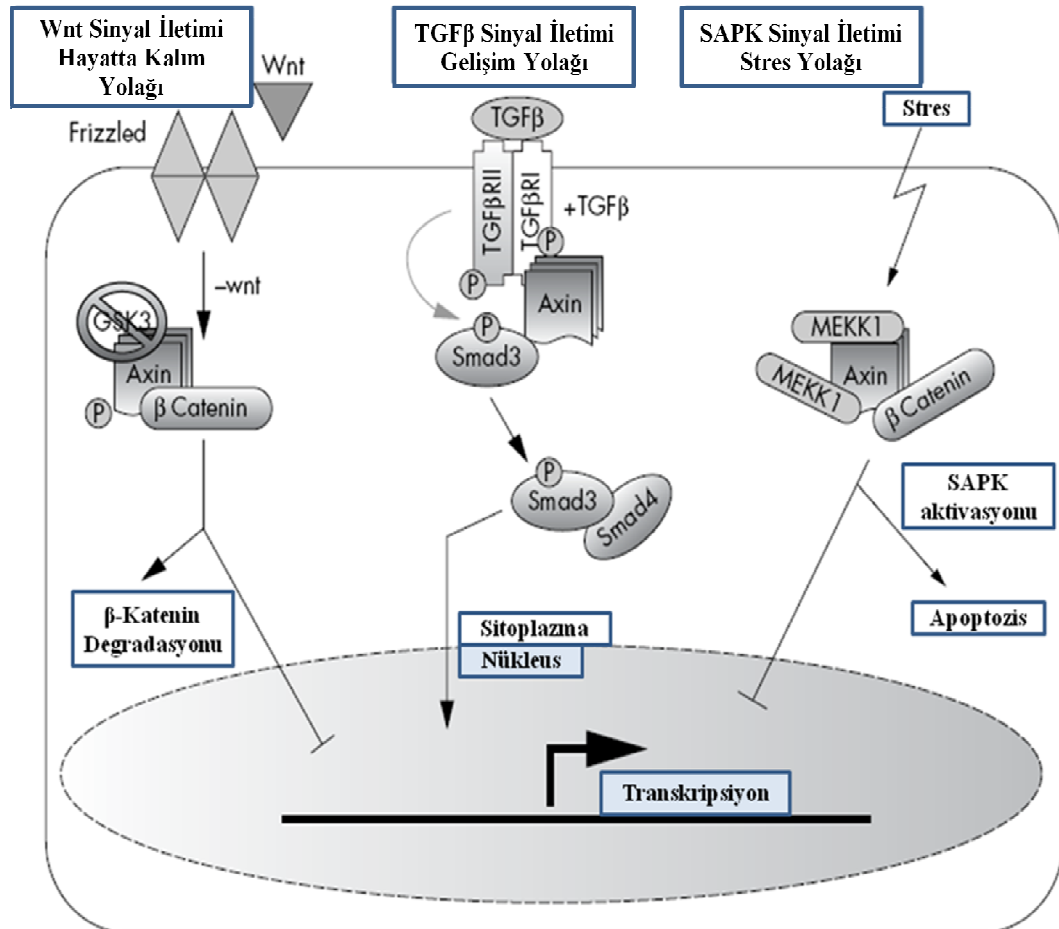
yolağında işe karışan birçok proteine direk bağlanmakta ve dolayısıyla da beta kateninin fosforilasyonu için gerekli APC, GSK gibi proteinlerin kompleks oluşturmalarını, onların bağlanacağı bir yer sunarak sağlamaktadır. Burada beta katenin önemli bir rol alır ve çeşitli kanser türlerinde anormal bir ekspresyon ve yerleşim gösterir. Son yıllarda kanonikal olarak da adlandırılan Wnt yolağı bileşenlerinin tümör oluşumu ile ilintili olduğu düşünülerek birçok araştırmanın üzerinde odaklanmasına neden olmuştur. Beta katenin miktarı hücrede sıkı biçimde APC-Axin-GSK parçalayıcı kompleks tarafından denetlenir. Bu komplekste yer alan APC kolorektal kanserlerin %70inde mutasyona uğramaktadır. Beta katenin ve Wnt bu yolağın pozitif düzenleyicileri olarak görev yaptığından protoonkogen olarak, APC ve Axin ise bu yolağın negatif efektörleri olduğundan tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmışlardır (Ikeda S. ve ark. 1998, Ikeda S ve ark., 2000).

2.1.2.2. TGF β Yolağı

Wnt yolağına benzer biçimde TGF β yolağı da Wnt ile uyumlu biçimde hücre çoğalması, farklılaşma, hücre göçü ve apoptozis gibi çeşitli hücreyel olayları düzenler. TGF β da karsinogenezde rol alır (Massague J, 1998). TGF- β reseptörleri TGF efektörleri olan Smad proteinlerini fosforile eder. Fosforile olan Smadlar daha sonra çekirdeğe girerek hedef genlerinin transkripsiyonunu sağlarlar. Axin'in Smad3 için adaptör rolü oynayarak TGF β yolağını düzenlediği belirlenmiştir. Axin1 ve Axin2'nin Smad3 ile, C-terminalinde bulunan ve beta katenin ile DVL'in bağlandığı domainlerin arasında bulunan bir domain aracılığıyla fiziksel olarak etkileşime girdiği belirlenmiştir. DVLnin Axin'e bağlanması Axin aracılı beta katenin downregülasyonunu sağlamaktadır. Hem DVL hem de smad3 Axinin aynı bölgesine bağlanmasına karşın biyokimyasal çalışmalar ikisinin Axin'e bağlanmak üzere yarışma içerisinde olmadığını göstermiştir. (Heldin C H. ve ark. 1997, Jass J R. ve ark. 1998). Reseptör aktivasyonu ile Axin'e bağlı smad3 TGF β reseptör 1 tarafından fosforile edilir ve Axinle oluşturduğu kompleksten ayrılır. TGF β antionkogenik faktörlerden biridir ve Wnt yolağında çekirdekdeki beta katenin sinaylini inhibe eder. Bu özelliği nedeniyle (bir yandan wnt yolağının negatif regülatörü ve TGF β yolağının pozitif regülatörü) ikili bir rol üstlenir. Bu iki yolaktaki düzensizlikler insan kanser hücrelerinde sıklıkla gözlenir (Furuhashi M. ve ark., 2001).

2.1.2.3. SAPK/JNK Yolağı

SAPK/JNK (stresle aktive protein kinaz/JUN N-terminal kinaz) sinyal iletim yolağı strese bağı olarak hücrede aktive olur. Bu yolak normal fizyolojik süreçlerde de görev alır. Bunlar arasında doku morfogenezi, hücre çoğalması, hücre yaşamını sürdürme ve hücre ölümü sayılabilir (Leppa S., ve ark. 1998). Hücre tipi ya da aktive olan yolağı bağı olarak bu yolak hücrenin hayatta kalmasını ya da apoptozisin gerçekleşmesine aracılık eder. Hücrede Axin miktarının artışı bu yolağı aktive eder ve MEKK (mitojen aktive protein/ekstrasellüler regüle kinaz kinaz kinaz) aktivasyonu ile apoptozisi tetikler. Axin üzerindeki MEKK etkileşim domaini APC ve GSK3 bağlanma bölgeleri tarafından çevrelenmiştir. Axin'in C-terminal domaini bir oligomerizasyon domaini içerir ve bu domain SAPK aktivasyonu için gereklidir. Axin'in apoptozisi indüklemesinde etkisi SAPK/JUN aktivasyonu ve β -katenin destabilizasyonu ile gerçekleşir. Axin-MEKK interaksyonunu takiben SAPK/JNK aktivasyonu apoptozise dirençli olan kanser hücrelerinde Axin1 mutasyonu ile beraber tanımlanmıştır (Schaeffer HJ., ve ark. 1999, Clevers H., 2000, Aaltonen LA., 2000).



Şekil 2.3 Axin proteininin görev aldığı sinyal iletim yolları

Axin gen ailesinin çeşitli türlerde varlığı gösterilmiştir. *Axin1* (basit olarak *axin*) ve *Axin2* (*Axil* ya da *conductin*) nükleotit düzeyinde %45'lik bir benzerlik gösterirler ve kodladıkları proteinler fonksiyonel olarak benzer gözükmektedir. *Axin* geni insan, rat, fare, tavuk, ve *Xenopus*'da korunmuş bir gendir (Hedgepeth C. M. ve ark.. 1999).

Axin1 geninin insan homologu kromozom 16p13.3'de haritalanmıştır. Fare embriyogenezi süresince devamlı olarak eksprese olan *Axin1* β -katenin degradasyon kompleksinin esas olarak eksprese olan bileşenidir ve düşük düzeylerdeki Wnt sinyal iletimi aktivitesinin korunmasında esastır. *Axin1*'in 862 amino asitlik polipeptidi kodlayan "a" ve 826 amino asitlik polipeptidi kodlayan "b" izoformu olmak üzere iki izoformu vardır (Salahshor S. ve Woodgett J. R. 2005).

Sınırlı biçimde eksprese olan *Axin2* β -katenin ile olan etkileşimi nedeniyle tanımlanmıştır. *Axin2* artan β -katenin konsantrasyonlarına yanıt olarak artan düzeyde eksprese edilir ve Wnt sinyalinin süresini ve şiddetini sınırlayıcı olarak iş görmektedir. Moleküler çalışmalar, *Axin2* geni'nin insanlarda kromozom 17q23-24'de yer aldığını, cDNA'sının 2529 bp okuma çerçevesi içerdiğini ve toplam 10 ekzona sahip olan 843 amino asitlik bir proteini kodladığını göstermiştir. Ayrıca insan *Axin2*, rat ve fare homologları ile karşılaştırıldığında %89'luk bir amino asid benzerliği gösterir (Salahshor S. and Woodgett JR., 2005, Mai M., ve ark. 1999, Yamamoto H.,ve ark.. 1998, Wiechens N., ve ark. 2004).

2.2. Primer Beyin Tümörleri

2.2.1. Giriş

Beyin tümörleri tüm kanserler (%1.4) ve kanserle ilgili ölümler (%2.4) arasında çok küçük bir paya sahiptir. Bununla birlikte bu tümörlerin çoğu ölümcül olup, ölümcül olmayanları da beyin fonksiyonlarına zarar verdiğinden günlük yaşamı kötü şekilde etkilemektedir. Amerikan Kanser Birliği'nin (The American Cancer Society (2006)) bir araştırmasına göre, 18,820 bireye malign beyin tümörü tanısı konmuş ve bu bireylerin 12,820 aynı yıl beyin tümörü dolayısıyla ölmüştür. Beyin tümörleri genel kanser nedeniyle ölümler arasında 10. sırada yer alırken 20-39 yaş arası kadınlarda 5. sırada yer almaktadır. Ayrıca 20 yaş altı gençlerde ölüm nedeni olarak beyin tümörleri lösemiden sonra 2. sırada yer almaktadır (Jemal ve ark., 2005).

Yüksek ölüm oranı nedeniyle özellikle glioblastoma tanısı konmuş hastalar arasında beyin tümörleri önemli bir ölüm sebebidir ve bu durum etiyolojisinin

anlaşılmasındaki ilgiyi daha da pekiştirmektedir. Epidemiyolojik alışmaları güçlendirmek mmkndr. Birincisi, beyin tümörü tipleri ile demografik karakteristiklerine göre, beyin tümörünün insidans ve mortalitesinin tanımlayıcı çalışmalarını yapmak (rneğin, yaş, cinsiyet ve coğrafik özellikler gibi). İkincisi, beyin tümörü olan insanların özelliklerini belirlemek ve sağlıklı bireylerin özelliklerini analitik olarak karşılaştırmaktır. Ayrıca, epidemiyolojik analizler beyin tümörlerinin moleküler olarak sınıflandırılması, hastalığın oluşum sürecindeki genetik rolün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

2.2.2. Primer Beyin Tümörünün Epidemiyolojisi

Amerikada beyin tümörleri verileri üzerine oluşturulmuş iki büyük program vardır. İlki National Cancer Enstitute' nn bir programı olan Surveillance Epidemiolgy and End Results (SEER, <http://seer.cancer.gov>), ikincisi ise Central Brain Tumor Registry of the United State (CBTRUS, <http://cbtrus.org>) programıdır. Her iki kuruluşta farklı veri tipleri ile önemlilik arz etmektedir. SEER programı malign primer beyin tümörleri üzerinde veriye sahipken, CBTRUS her iki türdeki yani hem malign hemde benign beyin tümörleri konusunda veri sahibidir. Her iki programda da Amerika'daki beyin tümörlerinin mortalite ve insidansına ulaşmak mümkündür.

2.2.2.1. İnsidansı

Yakın zamanda CBTRUS' in yaptığı bir çalışmada (1998-2002 yılları arasında toplanan veriler) tüm primer malign ve benign beyin tümörleri ile merkezi sinir sistemi (Central Nervous System, CNS) tümörleri yılda 100,000 kişi de 14,800 kişi de görülmüştür. Bu tablo daha detaylı incelendiğinde yılda 100,000 kişi de 7438' ine malign beyin tümörü tanısı konumuştur. SEER programının yakın zamandaki bir raporuna göre ise (1994-2003 yılları arasında toplanmış veriler) yıllık primer malign beyin tümörü ve CNS tümörlerinin insidansı 100,000 kişi de 6400 kişidir. Erkeklerde bu oran (7600 kişi), kadınlara göre (5300 kişi) daha yüksektir. CBTRUS programının pediatrik beyin tümörleri için veri tabanları da oldukça geniştir. 0-19 yaş arası çocuklar için primer malign ve benign beyin tümörleri ile CNS beyin tümörlerinin insidansı yılda 100,000 kişi de 4280 kişidir. Aynı şekilde erkekler arasında (yılda 4490 kişi) kadınlara göre (4040 kişi) da yaygındır (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.2.2.2. Mortalite ve Hayatta kalım Oranı

The American Society'nin bir raporuna göre 2006 yılındaki bir raporuna göre 12,820 ölümün primer malign ve CNS beyin tümörlerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu değerin yılda 100,000 kişide 4600 değerine tekabül ettiği SEER programınca rapor edilmiştir (2000 yılındaki U.S. popülasyonu baz alınarak).

SEER programının beş yıl boyunca kaydettiği datalara göre hayatta kalım oranı erkeklerde %33,2 kadınlarda ise %36'dır. Bu oran yaşla birlikte dikkat çekici bir şekilde azalmaktadır. 20 yaş altındaki çocuklarda hayatta kalma oranı yaklaşık %65'tir. Bu değer 45-54 yaş arası yetişkinlerde dramatik bir şekilde düşer (%28,1), bu oran 75 yaş ve üzeri yetişkinlerde sadece ve sadece %4 tür. Beyin kanseri türlerinden biri olan glioblastoma bütün yaş gruplarında 2-5 yıllık süre ile takip edildiğinde hayatta kalma oranı en az olandır (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

İki yıllık hayatta kalım oranı 45 yaş öncesi tanı konanlar için yaklaşık %30 dur ve bu oran yaşın artmasıyla dramatik olarak azalmaktadır, 75 yaş ve üzeri yetişkinlerde ise oran %2 den daha azdır. Glioblastomalı ve diğer histolojik tiplerdeki beyin tümörü olan hastaların beş yıllık hayatta kalım oranları özellikle yaşlılarda çok kötüdür. Her ne kadar hayatta kalım oranları iç açıcı olamasa da , malign beyin tümörü ve CNS tümörünün yaşam boyu olma riski çok düşüktür, erkekler için %0,67, kadınlar için %0,51, ölüm riski ise erkeklerde %0,49 kadınlarda ise %0,39 dur (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.2.2.3. İnsidans ve Mortalitedeki Eğilim

Beyin tümörlerindeki insidans ve mortalite oranı 1960'ın sonlarından itibaren artmıştır. Yaşlılar arasında mortalite ve insidanstaki bu artış neredeyse iki katı kadardır. İnsidans ve mortalite çocuklarda da artmıştır, yaygınlığı küçük olsa da %35 oranındadır. Bu konudaki raporların artmasının nedeni bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans (MR) gibi tanıdaki teknolojik gelişmelerin olmasıdır. Diğer bir artış nedeni de, uzun bir ortalama yaşam ümidi, tıbbi uygulamalardaki değişime ve gelişmeler ve beyin cerrahlarının üstün yetenekleridir. Beyin tümörlü çocuklarda insidan ve mortalitesinin artmasının nedeni, bu oranı arttıracak durumlara maruz kalmalarıdır. Bununla birlikte birkaç çevresel faktörde beyin tümörü insidansında geçici eğilimler ile ilgilidir. Ayrıca beyin kanserindeki eğilimlere yönelik çalışmalar ile oranları kıyaslarken üç ana faktöre dikkat edilmelidir; referans popülasyonunun yaş ayarlamasına, malign olmayan beyin tümörlerinin de dikkate alınmasına ve metodolojik farklılıklara. Bütün bu faktörler

analizin yönünü büyük oranda etkileyecektir (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.2.2.4. Yaş, Cinsiyet ve Etnik Köken Farklılıkları

Yaş

CBTRUS programına göre tüm primer beyin tümörleri için başlangıç yaşı 53 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte glioblastoma ve menengioma için ortalama başlangıç yaşı olarak yetişkinler arasında 62 yaş ile ikinci sırada yer almaktadır. Daha da önemlisi yaş etkisi tümörün histolojik tipi ve bulunduğu bölgeyi önemli derecede değiştirir. Örneğin, glioblastoma ve astrositoma insidansı 65 ve 74 yaşlarında pik yapıp sonra azalırken menengiomada artan yaşla birlikte insidansda artan bir süreklilik vardır. Çünkü bazı kanserler, geç yaşların hastalığı olarak bilinir. Ancak beyin tümörlerinin epidemiyolojisindeki ilginç bir özellik de genç yaştaki çocuklarda primitif nöroektodermal tümörleri (PNEG) ve medulloblastomaların insidansının pik yapmış olmasıdır.

Cinsiyet

Çoğu beyin tümörleri ile ilgili epidemiyolojik bulgular, nöroepitel tümörlerin erkekler arasında, menengial tümörlerin ise kadınlar arasında yaygın olduğu konusunda birbirleri ile uyumludur (Counsell and Grant, 1998, Surawics ve ark., 1999). Örneğin, glioma insidansı erkeklerde %40 olarak kadınlardan daha yüksek iken, menengioma insidansı %80 olarak çok yüksektir. Biyolojik ve sosyal faktörler cinsiyet oranlarındaki farklılıkları etkileyebilir. Ancak tanı olarak bu etkiler belirlenmemekle beraber, bu faktörlerin beyin tümörü etiyolojisi kapsamında bulunduğu göz ardı edilmemelidir.

Etnik Köken

Beyin tümörü insidanslarında etnik ve coğrafik varyansları, yeterli sağlık koşullarının olmadığı bazı popülasyonlarda yorumlamak zordur ve bu nedenle varolan raporlarda da tutarsızlıklar mevcuttur. Risk faktörleri içindeki kültürel, etnik ve coğrafik farklılıklar tümör insidansındaki farklılıkları etkileyebilir. Japonya'daki malign beyin tümörü insidansı kuzey Avrupanın yarısından azdır. Amerika'da ise gliomaların büyük bir kısmı beyazlarda siyahlardan daha fazladır. Menengiomalarda ise, durum neredeyse eşittir. Bu farklılıklar siyah ve beyazlar arasındaki tanı uygulamaları ya da sağlık bakımları açısından bir farklılık olmasından dolayı değildir (Surawics ve ark., 1999). Amerika ile dünya geneli arasında beyin tümörü insidansı arasındaki coğrafik değişiklikler, yüksek risk ile düşük risk bölgeleri arasındaki değişikliğin 4-5 katı kadardır. Tersine, akciğer kanserinde görülen coğrafik farklılık etkisi 20 kat,

melanomada ise 150 kattır (Inskip ve ark., 1995).

Amerika'daki Kanserden Ölüm Oranının Atlasına göre (Devasa ve ark., 1999), 1970 ile 1994 yılları arasında malign beyin tümöründen en yüksek ölüm oranı güney ve orta batı ile pasifik kuzeybatı beyazlarında olurken, en düşük oran ise İngiltere ve güneybatıdadır (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Ciddi çalışmalar Amerika doğumlu olanlar ile yabancı uyruklu Amerika'lılar arasında kanser riskinin farklı olduğunu göstermiştir (Wrensch ve ark., 2002). Örneğin, Amerika'da doğmuş bir kadın ve erkeğin beyin kanseri, mide kanseri ve enfeksiyondan ölüm riski, yabancı uyruklu bir Amerikalıya göre daha düşüktür. Bu şunu da göstermiştir, İspanyol olmayan beyazlarda, beyin malignansilerindeki insidansını beyaz ispanyollar, siyahlar, çinliler, japonlar ve filipinlilere göre daha yüksek yapar. Tümörlerin moleküler alt yapısında etnik değişikliklerin de olduğuna dair kanıtlar vardır (Wrensch ve ark., 2002). Bir çalışmada beyazların beyaz olmayanlara göre p53 gen mutasyonlu astrositik gliomaya 3 kat daha yatkın olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada Japon hastaların menengiomalı beyaz hastalara göre daha fazla p16^{ink4a} genindeki mutasyon ve delesyonlara sahip oldukları bulunmuştur.

2.2.3. Moleküler Genetik Farklılıkları İle Histolojik Karakteristiklerine Göre Tümör Tipleri

Histolojik karakteristikleri ve bulunduğu bölgeye göre sınıflandırılan beyin tümörleri invazyona ve kötü huylu olmalarına göre de sınıflandırılırlar.

Glioma (Astrositik Tümörler)

Astrositik beyin tümörleri, morfolojik karakteristiklerine, CNS içindeki lokasyonuna, büyüme potansiyeline, invazyon genişliği ve ilerleme yönüne, yaş ve cinsiyet dağılımlarına göre farklı neoplazmaların geniş bir aralığını kapsar. Astrositomlarda ciddi kromozomal bozukluklar olduğu kaydedilmiştir. Astrositik tümörlerin %40'ında p53 geni mutasyonu rapor edilmiş ve özellikle genç yetişkinlerde çocuklardan daha fazla oranda görülmüştür. p16 geninin her iki kopyasının delesyonu ve yeniden düzenlenmeleri ileri safhalardaki astrositomlarda yaygındır. 10'ncu kromozom delesyonları da yine ileri safhadaki astrositomlarda görülür (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Oligodendrioglioma

Oligodendrioglioma tipik olarak serebrumda oluşur ve yetişkinlerde, çocuklardan daha çok, kadınlarda ise erkeklerden daha yaygın görülür. Bu tümörler serebrospinal sıvı yolu ile metastaz yapar ve prognozu ve hayatta kalım oranı diğer gliomlara göre genel olarak daha iyidir. Oligodendriogliomlar, kromozom1, 9, 19, ve 22’de karakteristik bölge kayıpları sergiler. Bu tümörlerde p16 geninde homozigot delesyon, 10’ncu kromozomda heterozigotluk kaybı ve epidermal growth faktörde de amplifikasyonlar görülür (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Ganglioma

Gangliomlar sadece cerrahi müdahale ile büyük oranda tedavi edilirler. CNS gangliomları çocuklarda yetişkinlerden daha sık görülür. Fakat, cinsiyet ya da etnik farklılık insidansı etkilemez. Çoğu olgular 30 yaş altı bireylerde görülür. TSC2 (Tuberous Sclerosis 2) geninde görülen mutasyon bireyde sporadik gangliomların oluşumuna zemin hazırlayabilir. Ayrıca kromozom 7 ve 9’daki genetik değişimler bu tümörlerle ilgilidir (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Medullablastoma

Medullablastomlar tüm beyin tümörleri arasında %3-5 iken çocukluk çağı beyin tümörlerinde %25 oranında görülür. Yetişkinlerde de görülür ancak 3-8 yaş arası çocuklarda görüldüğü kadar değildir. Bu tümörler ile ilgili delesyonlar 17p’de ve daha az sıklıkla 2p, 6q, 10q, 11p ve 16q’dadır.

Ependioma

Ependiomlar özellikle 20 yaştan daha küçük çocuklarda görülür. 3 yaş öncesi çocukluk çağında %30 oranında görülür ve çocukluk dönemi ependiomlar yetişkinlik dönemindeki ependiomlardan daha agresiftir.

Menengioma

Meninkslerin iyi huylu tümörleri tüm beyin tümörlerinin %10-20 kadardır. Menengiomlar adaletli bir yaş dağılımına sahiptir. Orta yaş grubunda pik yapar. Ancak çocuklarda çok nadir görülür (%2’den daha az). Menengiomlar kadınlarda erkeklerden 2 kat daha sık görülür. Büyük oranda kromozom 1 üzerindeki delesyonlar ile ilgilidir.

Daha az oranda 6q, 9q ve 17p kromozomlarında delesyonlar ve p53 genindeki mutasyonlar ile ilgilidir.

Schwanom

Schwanomlar tipik olarak kafatası ile ilgili sinirlerin tümörleridir ve primer beyin tümörlerinin %8'ni oluşturur. Bu tümörler kadınlarda erkeklerden iki kat daha fazla yaygındır ve çoğunlukla orta yaşlı hastalarda görülürler. Birkaç schwanomada 1p kromozomunda kayıplar, 11q kromozomunda ise kazanımlar saptanmıştır(Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Chordoma

Nadir görülen neoplazmlardır. 30 ve 50'li yaşlardaki hastalarda baskın görülür ve erkeklerde baskınlığı azalır. Bu tümörlerin genetik araştırmaları azdır. Bununla birlikte bazı çalışmalarda tümör baskılayıcı genlerde ya da genlerdeki hata onarımında dengesizlik olduğu görülmüştür(Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.2.4. Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmaların sayılarının artmasına rağmen primer beyin tümörlerinin risk faktörlerinin doğası ve önemi hakkında ortak bir görüş yoktur. Fakat, çalışmaların çoğu gliomalarla ilgili olup menengiomlarla ilgili çalışmalar da mevcuttur(Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.2.4.1. Genetik Yatkınlık ve Ailesel Birikim

Primer beyin tümörleri ve diğer kanserlerin patogenezi açıklamak için genetiklerinin yapılarının incelenmesi önemli rol oynar. Kanserlerde genetik değişimlerin birikimleri sonucunda geliştiğini ve bu değişimler ile immün sistemin yıkım mekanizmasından kaçıp hücrelerin dengeli kontrol mekanizmalarından çıkarak hücre sayılarının normal dışı arttığına inanılır. Kalıtsal ya da sonradan edinilmiş değişimlerin (örneğin, hücre hayat döngüsünü kontrol eden p53 genindeki gibi) kanser oluşumuna sebep olduğuna dair işaretler vardır. Beyin tümörlerinin oluşumunda gözlenen genetik ve ailesel faktörler daha önceki çalışmalarda gözden geçirilmiştir (Bondy ve ark., 1994; Minn ve ark., 2002; Wrensch ve ark., 2002). Biyolojik olasılıkların

gerçekleşmesi ve ciddi sonuçları nedeniyle belirli genlerin primer beyin tümörüne katkı sağlayabileceği genel anlamda kabul görmüştür.

Çizelge 2.1 Menengisler ya da Nöroepitellerin primer beyin tümörleri için potansiyel risk faktörleri ve geçerli bulgular

<i>Risk Faktörü</i>	<i>Geçerli Bulguların Özetleri</i>
Genetik yatkınlık ve ailesel birikim: kalıtsal sendromlar ve beyin tümörlerinin ailesel öyküsü (tuberous sclerosis, nörofibromatozis tip1 ve 2, nevoid bazal hücre karsinoma sendromu, Li-Fraumeni ailesel kanser sendromu [kalıtsal p53 mutasyonları]); DNA onarımındaki önemli polimorfizmler, hücre döngüsü regülasyonu, karsinojen metabolizasyonu ve immün fonksiyon genleri	• P53 ya da diğer hücre döngüsü düzenleyen genlerin (örneğin, p16, RB, MDM2) mutasyonları ailelerdeki artmış risk için muhtemel sorumlulardır • Çokça maruz kalınan çevresel etkiler ve gen çevre etkileşimleri ailelerdeki artmış risk için olasıdır • Bu genlerdeki polimorfizmler (örneğin, glutatyon-S transferaz, sitokrom p450, N-asetiltransferaz, ERCC1 ve ERCC2) çok büyük olasılıkla ailelerdeki risk artışından sorumludur
İyonize ve non-iyonize radyasyon: iyonize radyasyon (tedavi ya da tanı amaçlı), elektromanyetik alanlar ve mobil telefonlar	• Düşük doz tedavi amaçlı radyasyonların gliomalar, menenjiomalar ve sinir kılıf tümörleri için risk faktörü olduğu kesinleşmiştir • Tanı amaçlı radyasyona maruz kalmak karmaşık sonuçlara yol açar. • Elektromanyetik alan çalışmaları karmaşık sonuçlara sahiptir • Mobil telefon çalışmalarında önemli bir ilişki görülmemiştir. Bununla birlikte, uzun süreli kullanımın etkisi üzerine son zamanlarda yapılan çalışmalar devam etmektedir

Çizelge 2.1(devamı) Menengisler ya da Nöroepitellerin primer beyin tümörleri için potansiyel risk faktörleri ve geçerli bulgular

<i>Risk Faktörü</i>	<i>Geçerli Bulguların Özetleri</i>
Mesleki maruz kalımlar: sentetik kauçuk ve polivinil klorit fabrikaları, petrol rafineri ve üretim yerleri, lisanslı pestisit uygulamaları, zirai işyerleri ve ebeveynlerin iş yerlerindeki maruz kalımları	• Beyin tümörü riski ile mesleki hastalıklar arasında bir bağlantı tespit edilememiştir • Belirli endüstriyel alanlarda çalışanlarda artan beyin tümörü mortalitesi görülmüş fakat bulgular istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir • Prenatal ve postnatal maruz kalımlarda riskin arttığına dair hiçbir kanıt görülmemiştir
Yaşam stili faktörleri: beslenme, sigara ve alkol kullanımı	• N-nitrozo bileşiklerinin, sebze ve meyvelerdeki vitamin zenginliğinin azalması beyin tümörü riskini artırır • Sigara içimi üzerine yapılan çalışmalarda bir sonuca varılamamıştır • Prenatal alkole maruz kalımının beyin tümörü riski açısından çok az ya da hiç etkisi yoktur • Şarap ve bira yetişkinlerde beyin tümörüne karşı çok hafif düzeyde koruyucu etki yaratır

Çizelge 2.1(devamı) Menengisler ya da Nöroepitellerin primer beyin tümörleri için potansiyel risk faktörleri ve geçerli bulgular

<i>Risk Faktörü</i>	<i>Geçerli Bulguların Özetleri</i>
Tıbbi öykü ve ilaç kullanımı: baş travması ve nöbetler; ilaç kullanımı	• Baştaki bir travmanın akustik nörom ve menengioma riskini arttırdığı şüphelidir • Baş ağrısı, uyku ve ağrı ilaçları beyin tümörlerine karşı koruyucu olabilir • Diüretikler ve antihistaminikler menengioma için riski arttırabilir • Diğer hapların etkisi saptanamamıştır
Enfeksiyon ajanları ve immünolojik yanıt: grip, zona, BK ve JC virüsleri; toksoplazma gondii; allerjiler	• Bazı virüsler beyin tümörü riskini arttırır • Varisella zona virüsü ve allerjiler beyin tümörüne karşı olası bir koruyuculuk sağlayabilir
Kaynaklar: Bondy ve ark., 1994; Berleur ve Cordier, 1995; Wrensch ve ark., 1997, 2002; Minn ve ark., 2002.	

2.2.4.2. İyonize ve Non-iyonize Radyasyon

İyonize radyasyon

Tedavi amaçlı iyonize radyasyon beyin tümörleri için sadece çevresel bir risk faktörü olarak tespit edilmiştir. Çoğu çalışmada radyasyona maruz kalmanın glioma oluşum riskini az oranda arttıracığı tespit edilmiştir. Nükleer tesisler ve nükleer madde üretiminin beyin tümörü riskini çok az oranda etkilediği, ancak spesifik olarak radyasyon ya da kimyasallara maruz kalımın etkilemediği çoğu çalışmada tespit edilmiştir. Ancak pilotlar arasında beyin tümörü kaynaklı ölümlerdeki artışın çok yüksek rakımlardaki radyasyonun potansiyel rolü nedeniyle olması konusundaki raporlar diğer çalışmalarla örtüşmemektedir.

Elektromanyetik alanlar

İkamet edilen yere göre elektromanyetik alanların sağlık üzerine potansiyel etkisi konusunda yapılan çalışmalarda, yaşadıkları evleri yüksek elektromanyetik alana maruz kalan çocuklarda lösemi ve beyin tümörü riskinin arttığı görülmüştür. Elektromanyetik alanlar ile beyin tümörü arasındaki ilişkinin ne nedeni kanıtlanmış, ne de elektromanyetik alanların beyin tümörü üzerinde risk oluşturmalarının aksi ispatlanmıştır (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Mobil telefonlar

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda beyin tümörü riski ile analog cep telefonlarının kullanımı arasında önemli ya da kayda değer herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Bunun yanı sıra, dijital cep telefonlarının da risk oluşturup oluşturmadığı henüz belirlenmemiştir (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Mesleki Maruz Kalımlar

İnsanlar çalıştıkları iş yerlerinde geniş bir kanserojenik potansiyele sahip kimyasal, fiziksel ya da biyolojik ajanlara maruz kalabilirler. Özel işyerlerinde bu ajanlara maruz kalan beyin tümörlü bireyler olmasına rağmen güçlü bir aralarında bir bağlantı olup olmadığı şüphelidir (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

Ebeveynlerin Mesleki Maruz Kalımları

Ebeveynlerin meslek hastalıklarına maruz kalması çocuklarda kanser riskini arttırabilir. Gebelikten önce babanın DNA'sındaki değişim ya da prenatal dönemde anenin maruz kalımı, direkt olarak fetus gelişimini etkiler. Bununla birlikte post natal ya da fetal bebeklerde önemli kanıt bulunmaz iken, prenatal ve postnatal çalışmaların sonuçları birbirleri ile uyuşmamaktadır (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.2.4.3. Yaşam Stili Faktörleri

Beslenme

N-nitrozo bileşiklerinin beyindeki karsinojenik etkilerinin potansiyel mekanizmaları tespit edilmiştir. Çocukluktaki beyin tümörleri prenatal ya da postnatal dönemde bu bileşiklere maruz kalımlar nedeniyledir. Prenatal ya da erken çocukluk

döneminde maruz kalınması yetişkinliğin başlarında tümörlerin oluşum riskini arttırması mümkündür. Fakat, bugün tümör gelişimi hakkında çok fazla şey bilinmemektedir.

Sigara ve alkol kullanımı

Kanser ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar çoğunlukla sigara ve alkol gibi karsinojenik maddelerin kullanımı ile ilgilidir. Sigara başlıca çevresel kaynaklı karsinojen olmasına rağmen, yetişkin ya da çocukluk dönemi beyin tümörü ve sigara içme alışkanlıklarına göre yapılan çalışmalarda genellikle önemli bir kanıta rastlanmamıştır (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.2.5. Moleküler Biyolojik Çalışmalarda Primer Beyin Tümörü

Potansiyel prognostik ve diagnostik belirteç olarak çalışılanların başında gelen en yaygın sitogenetik ya da moleküler belirteçler kromozomların 1p kolları, 19q delesyon bölgeleri ve O⁶-metilguanin–DNA metiltransferaz (MGMT) promotor metilasyon bölgesi ve epidermal growth faktör reseptör (EGFR) gen amplifikasyon ya da over ekspresyondur. Diğer potansiyel belirteçler ise, kromozomların 9p ve 10q delesyon bölgeleri ve EGFRvIII, PTEN, TP53 ve P16^{INK4a} amplifikasyonu, overekspresyonu ya da mutasyonudur (Sawaya R. ve Alfred Yung WK., 2007).

2.3. Polimorfizm Tanımı ve Genetik Polimorfizm

Poli ve morfizmos kelimelerinden oluşan polimorfizm, eski Yunanca’da “çok şekillilik” anlamı taşıyan bir sözcüktür.

Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesidir.

Popülasyon genetikçileri, bir gen lokusu için, nadir alleller en az %1 frekansına sahip ve bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görülürlerse polimorfik olarak tanımlarlar. Popülasyon genetiği açısından belli bir frekansa gereksinim olmasına karşın, moleküler biyoloji açısından, frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görülen varyant, polimorfik olarak adlandırılmaktadır.

Polimorfizmler, türlerin bulundukları ortama adaptasyonlarını kolaylaştırarak, evrimsel süreçte ayakta kalabilmelerine olanak verir.

Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) ya da DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir.

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats: değişken ardışık tekrarlar), SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism: tek iplikçik yapısal çeşitlilik), Allel Spesifik Oligonükleotid (ASO) gibi laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (Lülecı G. ve ark., 1995).

2.3.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

Adından da anlaşılacağı gibi bu polimorfizm tipinden tek bir nükleotid sorumludur. SNP'lerin çoğu, tek bir nükleotidin bir başka nükleotidle yer değiştirmesi şeklindedir. Ancak SNP tanımı, tek bir nükleotidin insersiyon ya da delesyonunu da içerir (Basit Indel Delesyonları). Bazı SNP'ler ise kesim bölgelerinde değişimlere yol açar (Kesim Bölge Polimorfizmleri, RSP: Restriction Site Polymorphism). İnsan genomunun yaklaşık %1,5'i, kodlayan DNA dizileri içerir ve SNP'lerin çoğu intron ve intergenik diziler gibi kodlama yapmayan DNA bölgelerinde şekillenir (Akgün E., 2007).

2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ilgilenilen spesifik DNA dizilerinin, iki oligonükleotid primeri kullanılarak enzimatik olarak sentezlendiği bir *in-vitro* moleküler biyoloji tekniğidir. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA bölgelerinin sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilmesi ve çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlaması, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur. Yöntem 1983 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş ve Mullis, bu keşfinden dolayı kimya dalında Nobel ödülünü kazanmıştır (Mullis KB. ve Faloona FA., 1987).

Günümüzde polimeraz zincir reaksiyonu, kalıtsal hastalıkların saptanması, bulaşıcı hastalıkların tanısı, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayini), tarım (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evrim çalışmaları (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi) ve DNA computing (silikon kökenli bilgisayar teknolojileri yerine DNA molekülü ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak yapılan bir hesaplama türü) gibi oldukça geniş bir alanda kullanılmaktadır.

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenilen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, bir çift sentetik oligonükleotid primeri kullanılarak, bu iki primerin 5' uçları ile sınırlandırılmış olan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle birleşirler. Bir PCR döngüsü sırasıyla, DNA çift zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denaturation), sentetik oligonükleotid primerlerin hedef DNA bölgesine bağlanması (annealing) ve primerlerin yeni DNA zincirini oluşturacak şekilde uzaması (extension) aşamalarından meydana gelir. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar. Böylece, 20 döngülük bir PCR sonucunda tek bir hedef diziden yaklaşık bir milyon kopya (2^{20}) oluşturulur. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana bileşen vardır:

1. Çoğaltılmak istenen DNA fragmentini (tek bir gen, genin bir bölümü ya da DNA'daki kodlamayan bir dizi) içeren kalıp DNA
2. Çoğaltılacak bölgenin başlangıç ve bitiş bölgesini belirleyecek olan iki adet oligonükleotid primeri
3. *Taq* Polimeraz ya da başka bir ısıya dayanıklı polimeraz enzimi
4. DNA polimerazın kalıp DNA'dan sentezleyeceği yeni zincir için kullanacağı Deoksiribonükleotid-trifosfatlar (dNTP)
5. Kullanılan DNA polimeraz için uygun bir kimyasal çevre sağlayacak olan tampon karışımı

PCR işlemi, reaksiyonun her bir adımında gereksinim duyulan ısıtma ve soğutma işlemlerini gerçekleştiren ve Isı Döngü Cihazı (Thermal Cycler) adı verilen bir makinede gerçekleştirilir.

PCR verimini etkileyen önemli bir faktör, DNA polimeraz enzimidir. Başlangıçta, PCR reaksiyonu için *E. coli*'nin DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti kullanıldı (Mullis KB and Faloona FA., 1987). Ancak bu enzim her PCR döngüsünün başlangıcında, iki DNA zincirinin ayrılması için gerekli olan yüksek ısıda inaktive olmaktaydı. Bu yüzden yüksek ısıya dayanabilen termostabil DNA polimeraz arayışına gidildi. Şu anda termostabil enzimlerden en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen *Taq* DNA polimerazdır. Normalde enzim miktarı 25-30 PCR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir (enzimin yarılanma ömrü yaklaşık 30 döngüdür). *Taq* DNA polimerazın bir dezavantajı da 3'-5' proofreading ekzonükleaz aktivitesinin olmamasıdır. Bu yüzden enzim yaklaşık olarak her 10.000 bazda bir hata yapmaktadır. Eğer bu hata, reaksiyonun erken evrelerinde meydana gelirse elde edilen PCR ürününün büyük bir kısmı bu durumdan etkilenebilecektir. Verimliliği azaltan bir diğer faktörde yoğunluğu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışmasıdır.

2.3.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Kesim enzimleri, bakteriyel virüslerin meydana getirdiği enfeksiyonlara karşı savunma ajanları gibi işlev gören prokaryotik proteinlerdir. Bu enzimin keşfine yol açan ilk gözlemler, bazı bakteri soylarının “konakçı kontrolündeki sınırlama” (*host-controlled restriction*) olarak anılan bir fenomen olan bakteriyofaj enfeksiyonlarına bağışıklığın gösterildiği zaman olan 1950'lerin başlarında yapılmıştır. Bu enzimler bakterilerde doğal olarak bulunur ve bakterileri, yabancı kaynaklardan gelen (örneğin bakteriyofajlar) DNA'yı spesifik tanıma bölgelerinden keserek korurlar. Kendi DNA'sında bulunan spesifik tanıma bölgeleri mutasyonla modifiye edildiğinden, konakçı bakteri DNA'sı bu kesim işleminden korunur. Restriksiyon endonükleazların, tip I, II ve III olarak üç ayrı sınıfı bulunmaktadır. Bunlar işlev olarak birbirinden çok az farklılık göstermektedir. Diğer yandan, tip II restriksiyon endonükleazlar gen klonlanmasında oldukça önemli olan kesici enzimlerdir. Tip II restriksiyon endonükleazlar genellikle 4, 5 ya da 6 baz çifti (bç) uzunluğunda olan spesifik bir

nükleotid dizisini tanır ve bu dizilerdeki metillenmemiş çift-zincirli DNA molekülünü keserler.

RFLP, bir restriksiyon endonükleaz ile DNA'nın kesilmesi üzerine dayandırılmış bir yöntemdir. Genetik hastalıkların moleküler genetik tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. Enzimin tanıma dizisinde birkaç nükleotid değişimi varsa, farklı kaynaklardan alınan DNA, bazı kesim enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta DNA fragmentleri meydana gelir. Bu nedenle bu metod **Restriksiyon Fragment uzunluk (Length) Polimorfizmi** olarak adlandırılmaktadır. Tüm RFLP deneyleri, bir ya da daha fazla kesim enzim ile DNA'yı kesmeyi kapsar. Kesilen DNA parçaları doğrudan boyama ya da otoradyografi kullanılarak jel elektroforezi aracılığıyla büyüklüklerine göre ayrılır. Küçük fragmentler büyük fragmentlere oranla jel elektroforezinde daha hızlı hareket eder. Jel  zerine yüklenecek olan baz uzunlukları bilinen bir standart ile kalibrasyon eğrisi yapılarak bilinmeyen DNA parçasının moleküler ağırlığı hesaplanabilir. Bireysel DNA'lar arasındaki farklılıkların (polimorfizm) kaynağı, bölgeye özgü enzimin tanıma bölgesi içinde meydana gelen baz yer değiştirmeleri ya da inversiyon, insersiyon ve delesyonlar gibi yeniden dizi düzenlemeleridir. Böyle değişiklikler her bir birey için karakteristik bir  rneği meydana getirir ve bu durum bize, bireyler arasındaki genetik polimorfizmi değerlendirmemize olanak sağlar (Klug WS, 2003). RFLP analizi ile bir enzimi kodlayan gen bölgesindeki allel polimorfizmi tespit edilerek homozigot ve heterozigot allellerin sıklığı hesaplanabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Masaüstü Makro Santrifüj (Mistral 1000 MSE)
- Hassas Tartı (Denver Instrumen Company)
- Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- pH Metre (Metle Toledo MP 2200)
- Mikrodalga fırını (BEKO MD 1500)
- Mikropipetler -10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl- (Gilson)
- Fanlı Ekonomik İnkübatör (Gallenkamp)
- Thermal Cycler (Gen Amplifikasyon PCR sistem 9700 Applied Biosystems)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC 1000-90)
- Elektroforez Tankı (Whatman Biometra)
- Jel Görüntüleme (Vilber Lourmat Photodocumentation and Video Graphic Printer UP-895CE)
- UV Translimunator (UVP)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris bazı (Sigma)
- Asetik asit (E-Merck)
- EDTA (Sigma)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- Proteinaz K (Fermentas)
- Amonyum Asetat (E-Merck)
- %96'lık Absolü Alkol (Riedel- de Haen)
- Primer sentezleri (Iontek)
- dNTP miksi (Fermentas)

- MgCl₂ (Fermentas)
- PCR tamponu (Fermentas)
- *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas)
- Rsa I Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- B⁺ tamponu (Fermentas)
- Agaroz (Sigma)
- Formamid (Sigma)
- Xylene Cyanol (Sigma)
- Bromfenol Blue (Bio Basic Inc.)
- Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)
- Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas)

3.3. Kullanılan Plastik Malzemeler

Tüm deneyler, sterilize edilmiş kilitlenebilir polipropilen test tüplerinde gerçekleştirildi. Sıvılar, sterilize edilmiş pipet uçları kullanılan otomatik pipetlerle transfer edildi. 1 ml'den daha büyük hacimdeki sıvılar için tek kullanımlık plastik pipetler kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm tüpler ve pipet uçları, buhar otoklavlanmasıyla (121°C'de 30 dakika) sterilize edildi.

Mikro santrifüj Tüpleri	Axygen
0,2 ml	
1,5 ml	
2,0 ml	
Test Tüpleri	LP's
15 ml	
50 ml	
Pipet Uçları	Axygen
0,5–10µl Beyaz	
1–200µl Sarı	
100–1000 µl Mavi	
Plastik Pipetler	Stripette

3.4. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

3.4.1. Genomik DNA Eldesinde Kullanılan Çözeltiler

Nüklei Lysis Tamponu: 10mM Tris-HCl 1.576g, 400mM NaCl 23.4g ve 2mM Na₂EDTA 0.7g 1000ml bidistile su içerisinde çözündürülerek pH: 8.2'ye ayarlandı. Otoklavda steril edilerek +4°C' de saklandı.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10g SDS 100ml bidistile suda çözündürülerek %10'luk çözelti hazırlandı. Sterilizasyon işlemi filtreden geçirilerek yapıldı.

Proteinaz K Dilüsyon Tamponu: Sıvı olarak 20mg/ml hazırlanmış çözeltisi kullanıldı.

TE Tamponu (Tris-HCl, EDTA): 10 mM Tris-HCl 0.394g, 1mM Na₂EDTA 0.093g 250ml bidistile suda çözündürülerek otoklavda steril edildi.

Amonyum Asetat: 10M 148g amonyum asetat 200ml bidistile su içinde çözündürülerek hazırlandı. Bu çözeltinin steril edilmesine gerek yoktur.

TAE Tamponu: 50X TAE için; Tris 242 gr, EDTA 37,2 gr, Glasial Asetik Asit 57,2 ml, 1000 ml bidistile su içerisinde çözülerek pH: 7,8'e ayarlandı.

Yükleme Tamponu (Loading Dye)

Formamid (%95)	9.5 ml
Xylen Cyanol (%0.5)	0.05 gr
Bromfenol Blue (%0.5)	0.05 gr

Bu üç kimyasal 15 ml'lik konik santrifüj tüpü içerisine konularak vortekste karıştırıldı. Kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

dNTP solüsyonu: 100 mM stok. Adenin, Timin, Guanin, Sitozin nükleotidlerinin her birinden 2.5 µl alınarak 90 µl bidistile su ile karıştırıldı. 2.5 mM'lık 100 µl dNTP çalışma çözeltisi hazırlandı.

3.4.2. Primerler

***Axin2* Ekzon1 148C>T ;**

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 128,8 pmol'lük stok primer çözeltisinden 3,9 µl alınarak 46,1 µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 119,6 pmol'lük stok primer çözeltisinden 4,2 µl alınarak 45,8 µl bidistile suya eklendi.

***Axin2* Ekzon1 432T>C ;**

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 165,1 pmol'lük stok primer çözeltisinden 3µl alınarak 47µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 131,8 pmol'lük stok primer çözeltisinden 3,8 µl alınarak 46,2 µl bidistile suya eklendi.

***Axin2* Intron2 956+16 A>G ;**

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 107,3 pmol'lük stok primer çözeltisinden 4,7µl alınarak 45,3 µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 128,6 pmol'lük stok primer çözeltisinden 3,9 µl alınarak 46,1 µl bidistile suya eklendi.

***Axin2* Ekzon5 1365 G>A ;**

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 118,7 pmol'lük stok primer çözeltisinden 4,2 µl alınarak 45,8 µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 138,5 pmol'lük stok primer çözeltisinden 3,6 µl alınarak 46,4 µl bidistile suya eklendi.

***Axin2* Ekzon5 1386 C>T ;**

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 141,1 pmol'lük stok primer çözeltisinden 3,5 µl alınarak 46,5 µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 172 pmol'lük stok primer çözeltisinden 2,9 µl alınarak 47,1 µl bidistile suya eklendi.

Axin2 Intron5 1712+19 G>T ;

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 181,7 pmol'lük stok primer çözeltisinden 2,8 µl alınarak 47,2 µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 100,7 pmol'lük stok primer çözeltisinden 5 µl alınarak 45 µl bidistile suya eklendi.

Axin2 Ekzon7 2062 C>T ;

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 173,5 pmol'lük stok primer çözeltisinden 2,9 µl alınarak 47,1 µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 123,3 pmol'lük stok primer çözeltisinden 4,1 µl alınarak 45,9 µl bidistile suya eklendi.

Axin2 Intron7 2141+73 G>T ;

Forward primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 121,8 pmol'lük stok primer çözeltisinden 4,1 µl alınarak 45,9 µl bidistile suya eklendi.

Reverse primeri: 10 pmol 50µl çalışma solüsyonu hazırlamak için, 162,7 pmol'lük stok primer çözeltisinden 3,1 µl alınarak 46,9 µl bidistile suya eklendi.

3.5. Çalışma Grubu

Hasta Grubu

Beyin tümörü için çalışma grubu, daha önce Biyokimya Anabilim Dalı tarafından yapılmış olan projeler kapsamında, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nöroşirürji Kliniğine başvuran beyin tümörü tanısı konan ve tedaviye başlanılmamış, olan Türk anne ve babadan doğmuş 100 hastadan oluşturuldu. Hastalar arasında cinsiyet, yaş veya kanserin histopatolojik tipi ile derecesi yönünden bir kısıtlama yapılmamış ve tüm hastalar çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir. Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır (**Ek-1**).

Kontrol Grubu

Kontrol grubu daha önce Biyokimya Anabilim Dalı tarafından yapılmış olan projeler kapsamında, Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran, daha önce herhangi bir kanser tanısı konmamış, Türk anne ve babadan doğmuş 100 bireyden oluşturuldu. Çalışmaya dahil edilen tüm hasta ve kontroller için **Ek-2**'de verilen soru formu karşılıklı konuşarak soru-cevap şeklinde doldurulmuştur.

3.6. Örneklerin Alınması

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine başvurup beyin tümörü tanısı konan hastalara ve kontrol grubunu oluşturan bireylere yapılacak çalışma hakkında gereken açıklamalar yapılmış, izin belgesini imzalamaları sağlanmıştır. Özgeçmişleri hakkında gerekli bilgilerin bulunduğu formları doldurmaları sağlandıktan sonra, 5 ml venöz kan, sitrat içeren steril tüplere konulmuştur.

3.7. DNA İzolasyonu

Yapılmış projeler kapsamında 100'er hasta ve 100'er bireyden oluşan kontrol gruplarının DNA'ları daha önceden "*Yüksek Tuz Konsantrasyonu ile DNA İzolasyonu*" yöntemiyle izole edilmiştir (Giner V., ve ark. 2001).

Yüksek Tuz Konsantrasyonu ile DNA İzolasyonu

- Hasta ve kontrol gruplarından alınarak EDTA'lı steril tüplere konan 5 ml venöz kanın üzerine, kanın üç katı oranında olacak şekilde (kan ve bidistile toplamı 15 ml olacak şekilde) steril edilmiş, daha önceden soğutulmuş +4°C'deki bidistile su eklenir.
- Tüplerdeki kanın su ile karışmasını sağlamak için tüp birkaç kez hafif bir şekilde elde çalkalanır.
- 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek kanın elemanlarının çökmesi sağlanır.
- Santrifüj işlemi sonrasında tüplerin üzerinde oluşan süpernatant atılarak dipte kalan çökelti üzerine yine üç katı hacimde olacak şekilde bidistile su konularak aynı devir ve sürede santrifüj yapılır.

- Bu işlem dört kez daha tekrarlanır.
- Son yapılan santrifüjden sonra tüplerin üst kısmında kalan süpernatant atıldı. Altta kalan çökelti üzerine hücre içeriğinin serbest kalabilmesi için hücre zarını yıkmak ve genomik DNA'yı proteinlerden arındırmak için 100 µl %10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat), 30µl proteinaz K (10mg/ml) ve 1500 µl Nuclei Lysis tamponu eklenerek ve bir gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletilir.
- Ertesi gün etüvden çıkarılan tüplerin içerisine 1000 µl, 10 M Amonyum Asetat eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletilir ve ardından tüpler 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
- Üstte kalan süpernatant, dipte kalan çökelti karışmayacak şekilde yeni bir tüpe aktarılır.
- Yeni bir tüpe alınan süpernatantın iki katı oranda olacak şekilde üzerine absölü alkol eklenir.
- Hafifçe ileri-geri çalkalandığında genomik DNA gözlendi. DNA, ince bir pipet ucu yardımıyla sıvı içerisinden alınır.
- Daha önce etiketlenen 1,5 ml'lik steril ependorf tüplerine konulan 250 µl TE tamponu içerisine, elde edilen DNA konulur. DNA'nın tampon içerisinde çözünmesi için bir gece oda ısısında bekletilir. Elde edilen DNA örnekleri, genotipleme işlemine kadar -20°C'de saklanır.

3.8. Genotipleme

Axin2 genin sekiz farklı bölgesinin polimorfizmi için PCR ve RFLP yöntemleri kullanıldı. PCR-RFLP yöntemi her bölgeye ait gerekli olan primer dizileri, yapışma sıcaklıkları, kesim enzimleri ve kesim sonrası elde edilen genotiplere özgü fragment uzunlukları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

PCR için kullanılan solüsyonlar ve miktarları Çizelge 3.2'de, PCR programları ise Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.1 *Axin2* genine ait primer dizileri, annealing sıcaklıklar, restriction enzimleri ile kesim sonrası elde edilen fragment uzunlukları

Polymorfizm ¹	Primer		Fragment uzunluğu (bp)	Yapışma sıcaklığı (°C)	Kesim enzim
	Forward	Reverse			
c.148C>T	CCACGCCGATTGCTGAGAGG	TTCCGCCTGGTGTGGAAGAGACA <u>T</u>	242	63,2	<i>Mph1103I</i>
c.432T>C	CCTGGAGAGGGAGAAATGC	CATCACCGACTGGATCTCG	253	50,9	<i>Esp3I</i>
c.956+16A>G	GGGTTTCTGGTGAGGGTCAGT	CAAGCAAGCCCACGGAAGG	228	65,6	<i>MlsI</i>
c.1365A>G	ACGTCTTCCCTTTCAGGATG	GGTACTGCGAATGGTGGTG	248	55,6	<i>MspI</i>
c.1386C>T	TGCGTAGGGAGCCGAATGTTG	GTGGTCCGGGGAGCGGGAT <u>C</u>	294	63,2	<i>TaqI</i>
c.1712+19G>T	CACCACCCTACATCCACCAC	GCTCCCACCTCACACCTG	249	61,2	<i>CpoI</i>
c.2062C>T	TCCTTCTGTTTTCTCTCTGCTCATTCC	AGCGTGTTGGGTGGGGT <u>C</u>	209	61,0	<i>TaqI</i>
c.2141+73G>A	GTGTCGAAGCCCCCAAAG	CTTGATCCTCCATCTCACAGC	370	63,2	<i>BseRI</i>

- | | | |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|
| 1. c.148C>T | allele C: 218 + 24 | allele T: 242 |
| 2. c.432T>C | allele T: 253 | allele C: 145 + 108 |
| 3. c.956+16A>G | allele A: 205 + 23 | allele G: 228 |
| 4. c.1365G>A | allele G: 100 + 80 + 36 + 32 | allele A: 116 + 100 + 32 |
| 5. c.1386C>T | allele C: 294 | allele T: 274 + 20 |
| 6. c.1712+19G>T | allele G: 184 + 65 | allele T: 249 |
| 7. c.2062C>T | allele C: 209 | allele T: 191 + 18 |
| 8. c.2141+73G>A | allele G: 370 | allele A: 260 + 110 |

Çizelge 3.2 Tüm bölgeler için PCR tepkime karışımları

Solüsyonlar	Konsantrasyon	Miktar
Taq DNA polimeraz tamponu	1X	5 µl
dNTP karışımı	2 mM	5 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl
Forward primeri	10 pmol	2 µl
Reverse primeri	10 pmol	2 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0.5 µl
dH ₂ O	-	32 µl
DNA	50 ng/µl	0,5 µl

Çizelge 3.3 Tüm bölgeler için kullanılan PCR programları

Polimorfizm	Başlangıç Denatürasyon (1 döngü)	Tepkime döngüsü (35 döngü)			Son Sentez Aşaması (1 döngü)
		Denatürasyon aşaması	Yapışma aşaması	Sentez (Uzama) aşaması	
Exon1 148C>T	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 30sn	63,2 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 7 dk
Exon1 432T>C	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 30sn	50,9 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 7 dk
Intron2 956+16A>G	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 30sn	65,6 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 7 dk
Exon5 1365G>A	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 30sn	55,6 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 7 dk
Exon5 1386C>T	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 30sn	63,2 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 7 dk
Intron5 1712+19G>T	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 30sn	61,2 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 7 dk
Exon7 2062C>T	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 45sn	61,0 °C'de 45 sn	72 °C'de 30 sn	72 °C'de 7 dk
Intron7 2141+73G>A	94 °C'de 3 dk	94 °C'de 30sn	63,2 °C'de 1 dk	72 °C'de 1 dk	72 °C'de 7 dk

Elde edilen her bir bölgenin PCR ürünleri, o bölgeye özgü polimorfizmi saptamak amacıyla RFLP yöntemine tabii tutuldu. Bunun için 17 µl PCR ürünü, 2 µl 10X restriksiyon endonükleaz tamponu ve 5U ilgili restriksiyon endonükleaz enzimi toplam 20 µl'lik hacimde karıştırıldı ve enzim için uygun sıcaklıkta (TaqI 65 °C diğerleri 37 °C) 3 saat inkübe edildi.

3.9. Jel Elektroforezi:

PCR sonrası elde edilen ürünler %1.5, RFLP sonrasında elde edilen ürünler %2.5 yoğunluktaki agaroz jel elektroforezinde koşturuldu.

3.9.1. Jelin Hazırlanması

PCR ürünleri için %2'lik, RFLP ürünleri için ise %3'lük agaroz jel hazırlanmıştır. 100 ml'lik bir elektroforez tankı için %2'lik jelde 2 gr agaroz 100 ml X1'lik TAE çözeltisine konularak (X1'lik TAE için; X50'lik TAE den 2 ml alınıp 98 ml su ile 100 ml2 ye tamamlanır) mikro dalga fırında berraklaşınca kadar kaynatıldı. Berraklaşan jel el yakmayacak kadar soğutulduktan sonra 15 µl kadar etidyum bromür eklendi ve karıştırılarak jel tankına döküldü. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek jel tarakları tanka yerleştirilip jelin polimerleşmesi beklendi. Jel tamamen polimerleştiğinde taraklar çıkarılarak yükleme kuyucukları hazırlandı.

3.9.2. Jelde DNA'nın Yürütülmesi

5µl PCR ürününe 2 µl yükleme tamponu eklenerek ürünler kuyucuklara yüklendi. PCR ürünlerinin büyüklüklerini karşılaştırmalı olarak belirlemek için 50 baz çiftlik belirteçler kullanıldı. Jele yüklenen PCR ürünleri 100 voltta 60 dakika, restriksiyon endonükleaz enzimi kesim ürünleri ise 100 voltta 90 dakika koşturuldu ve UV altında görüntülendi.

3.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda; hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaş ortalamalarının karşılaştırılması için Independent-Samples T testi, hasta ve kontrol grupları arasındaki sigara ve alkol kullanımı, ailede kanser öyküsü ve genotip frekanslarının değerlendirilmesi için ise χ^2 testi kullanıldı. İstatistiksel analiz, SPSS 16.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Ayrıca ham risk oranları (OR:Odds Ratio) ve güvenlik aralıkları (CI: %95 Confidense Interval) χ^2 testi kullanılarak tespit edildi. Düzeltilmiş risk oranları için ise yaş, cinsiyet ve sigara kullanımı etkenleri göz önünde bulundurularak Logistik regresyon yapıldı. Hasta ve kontrol gruplarının Hardy-Weinberg dağılımına uygunluk gösterip göstermediği kontrol edildi (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.shtml>).

4. BULGULAR

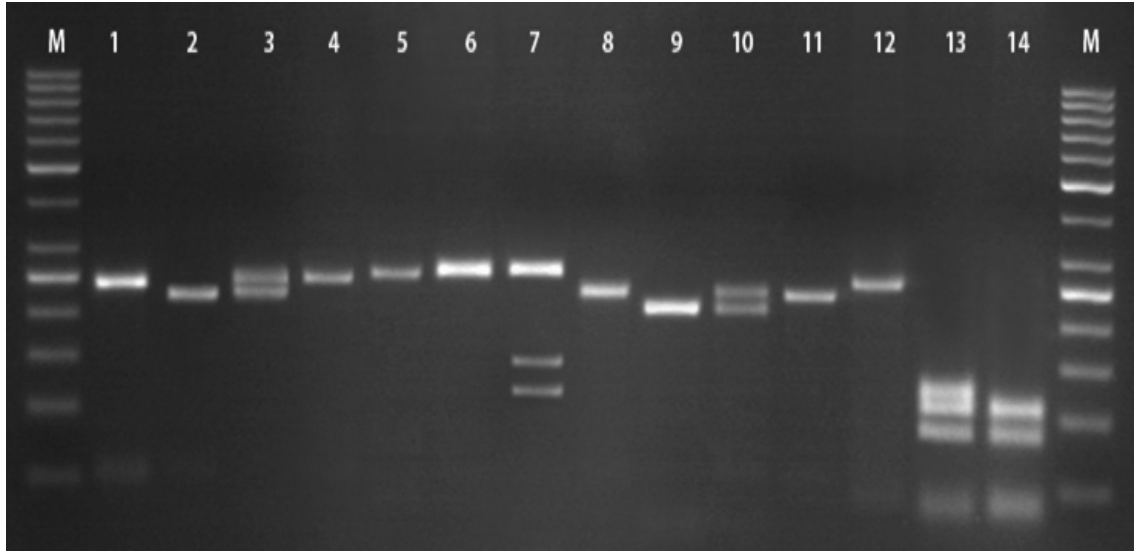
4.1. *Axin2* Geni Polimorfizmlerinin RFLP Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Axin2 geni 1. ekzonu 148C>T polimorfizminin belirlenmesi için ilk önce, bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 242 bp'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 148. bazını içermektedir. *Mph*1103I restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 148. pozisyonda C (sitozin) bazının bulunması, bu bölgede *Mph*1103I için bir kesim bölgesi oluştururken, aynı pozisyonda T (timin) bazının olması sonucunda tanıma bölgesi oluşmamaktadır. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot CC alleli için 218 ve 24 bp'lik iki fragment, homozigot TT alleli için 242 bp'lik tek bir fragment ve heterozigot CT alleli için ise 242, 218 ve 24 bp'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.1, 1-4.sütunlar).

Axin2 geni 1. ekzonu 432T>C polimorfizminin belirlenmesinde bölge, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra 253 bp'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 432. bazını içermektedir. *Esp*3I restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 432. pozisyonda T (timin) bazının bulunması, bu bölgede *Esp*3I için bir kesim bölgesi oluşturmazken, aynı pozisyonda C (sitozin) bazının olması sonucunda bir tane tanıma bölgesi oluşur. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot TT alleli için 253 bp'lik bir fragment, heterozigot TC alleli için ise 253, 145 ve 108 bp'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.1, 5-7.sütunlar).

Axin2 geni 2. intronu 956+16A>G polimorfizminin belirlenmesi için bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 228 bp'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi *M*lI restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında homozigot GG alleli için 228 bp'lik bir fragment, homozigot AA alleli için 205 ve 23 bp'lik iki fragment ve heterozigot AG alleli için ise 228, 205 ve 23 bp'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.1, 8-11.sütunlar).

Axin2 geni 5. ekzonu 1365A>G polimorfizminin belirlenmesi için bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 248 bp'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 1365. bazını içerir. *Msp*I restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 1365. pozisyonda A (adenin) bazının bulunması, bu bölgede *Msp*I için iki kesim bölgesi oluştururken, aynı pozisyonda G (guanin) bazının olması sonucunda üç tane tanıma bölgesi oluşur. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot GG alleli için 100, 80, 36 ve 32 bp'lik dört fragment ve heterozigot AG alleli



Şekil 4.1. *Axin2* polimorfizmlerinin RFLP sonrası agaroz jeldeki görüntüsü (Sütunlar: 1-4 148C>T, 5-7 432 T>C, 8-11 956 A>G, 12-14 1365 G>A) **M:** Marker (belirteç), Gene Ruler™ 50 bp (baz çifti) DNA Ladder, **1:** PCR sonucu elde edilen 242 bp uzunluğundaki fragment, **2:** PCR ürününün *Mph1103I* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 218 ve 24 bp'lik homozigot CC alleli, **3:** PCR ürününün *Mph1103I* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 242, 218 ve 24 bp'lik heterozigot CT alleli, **4:** PCR ürününün *Mph1103I* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 242 bp'lik homozigot TT alleli, **5:** PCR sonucu elde edilen 253 bp uzunluğundaki fragment, **6:** PCR ürününün *Esp3I* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 253 bp'lik homozigot TT alleli, **7:** PCR ürününün *Esp3I* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 253, 145 ve 108 bp'lik heterozigot TC alleli, **8:** PCR sonucu elde edilen 228 bp uzunluğundaki fragment, **9:** PCR ürününün *MlsI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 205 ve 23 bp'lik homozigot AA alleli, **10:** PCR ürününün *MlsI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 228, 205 ve 23 bp'lik heterozigot AG alleli, **11:** PCR ürününün *MlsI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 228 bp'lik heterozigot GG alleli, **12:** PCR sonucu elde edilen 248 bp uzunluğundaki fragment, **13:** PCR ürününün *MspI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 116, 100, 80, 36 ve 32 bp'lik homozigot GA alleli, **14:** PCR ürününün *MspI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 100, 80, 36 ve 32 bp'lik heterozigot GG alleli.

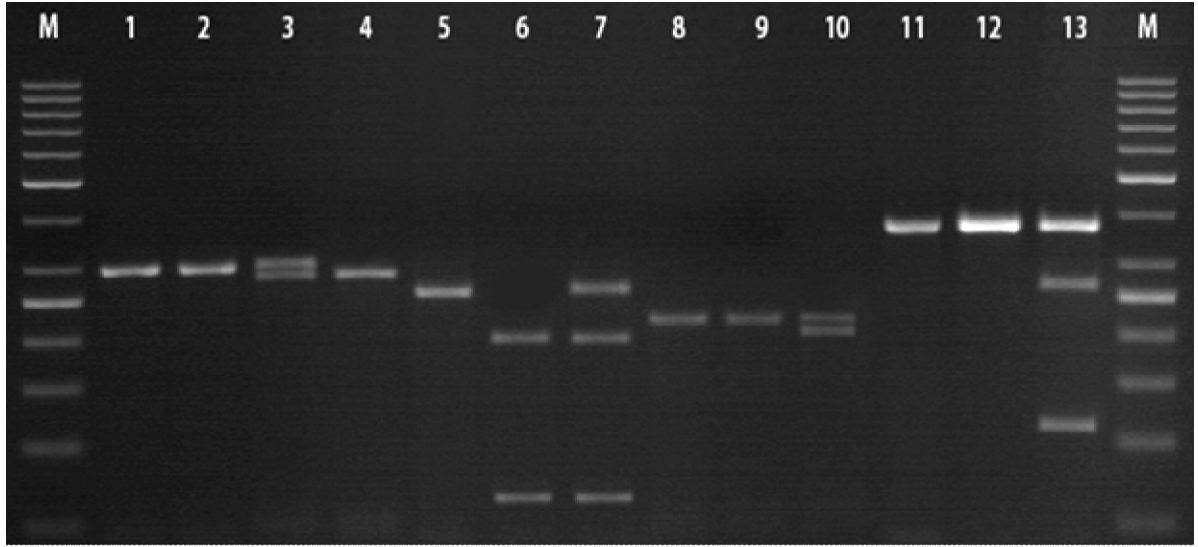
için ise 116, 100, 80, 36 ve 32 bç'lik olmak üzere beş fragment elde edildi (Şekil 4.1, 12-14. sütunlar).

Axin2 geni 5. ekzonu 1386C>T polimorfizminin belirlenmesi için bölge, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 294 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 1386. bazını içerir. *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 1386. pozisyonda C (sitozin) bazının bulunması, bu bölgede *TaqI* için bir kesim bölgesi oluşturmazken, aynı pozisyonda T (timin) bazının olması sonucunda bir tane tanıma bölgesi oluşur. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot CC alleli için 294 bç'lik bir fragment, homozigot TT alleli için 274 ve 20 bç'lik iki fragment ve heterozigot CT alleli için ise 294, 274 ve 20 bç'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.2, sütun 1-4).

Axin2 geni 5. intronu 1712+19G>T polimorfizminin belirlenmesi için öncelikle bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 249 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi *CpoI* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında homozigot TT alleli için 249 bç'lik bir fragment, homozigot GG alleli için 184 ve 65 bç'lik iki fragment ve heterozigot GT alleli için ise 249, 184 ve 65 bç'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.2, sütun 5-7).

Axin2 geni 7. ekzonu 2062C>T polimorfizminin belirlenmesi için öncelikle bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 209 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında homozigot CC alleli için 209 bç'lik bir fragment, homozigot TT alleli için 191 ve 18 bç'lik iki fragment ve heterozigot CT alleli için ise 209, 191 ve 18 bç'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.2, sütun 8-10).

Axin2 geni 7. intronu 2141+73G>A polimorfizminin belirlenmesi için öncelikle bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 370 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi *BseRI* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında homozigot GG alleli için 370 bç'lik bir fragment, homozigot AA alleli için 260 ve 110 bç'lik iki fragment ve heterozigot GA alleli için ise 370, 260 ve 110 bç'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.2, sütun 11-13).



Şekil 4.2. *Axin2* polimorfizmlerinin RFLP sonrası agaroz jeldeki görüntüsü (Sütunlar:1-4 1386 C>T, 5-7 1712 T>G, 8-10 2062 C>T, 11-13 2141 G>A) **M:** Marker (belirteç), Gene Ruler™ 50 bç (baz çifti) DNA Ladder, **1:** PCR sonucu elde edilen 294 bç uzunluğundaki fragment, **2:** PCR ürününün *TaqI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 294 bç'lik homozigot CC alleli., **3:** PCR ürününün *TaqI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 294, 274 ve 20 bç'lik heterozigot CT alleli., **4:** PCR ürününün *TaqI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot 274 ve 20 bç'lik TT alleli., **5:** PCR sonucu elde edilen 249 bç uzunluğundaki fragment, **6:** PCR ürününün *CpoI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot 184 ve 65 bç'lik GG alleli., **7:** PCR ürününün *CpoI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 249, 184 ve 65 bç'lik heterozigot GT alleli., **8:** PCR sonucu elde edilen 209 bç uzunluğundaki fragment, **9:** PCR ürününün *TaqI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 209 bç'lik homozigot CC alleli., **10:** PCR ürününün *TaqI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 209, 191 ve 18 bç'lik heterozigot CT alleli., **11:** PCR sonucu elde edilen 370 bç uzunluğundaki fragment, **12:** PCR ürününün *BseRI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 370 bç'lik homozigot GG alleli., **13:** PCR ürününün *BseRI* kesim enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen 370, 260 ve 100 bç'lik heterozigot GA alleli.

4.2. Beyin Tümörlü Hastalar ile Sağlıklı Bireylerin Özellikleri

Bu çalışma, 100 sağlıklı kontrol ve 100 beyin tümörü hastası toplam 200 birey ile yapıldı. Bu bireylere ait özellikler Çizelge 4.1 de verilmektedir. Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında yaş ve cinsiyet ($p=0,089$) açısından gruplar arasında önemli bir fark gözlenmezken ($p>0.05$), sigara kullanımı açısından hasta bireylerin daha çok sigara tükettiği ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p=0,181$).

Çizelge 4.1 Beyin tümörlü hasta bireyler ile sağlıklı bireylerin istatistiksel değerleri

	Hasta (n=100) n (%)	Kontrol (n=100) n (%)	p değeri*
Cinsiyet			0,089
Erkek	58 (58)	46 (46)	
Kadın	42 (42)	54 (54)	
Yaş (yaş ort. st. sapma)	58,66 8,039	57,01 7,89	
Sigara Alışkanlığı			0,181
İçmeyen	61 (61)	70 (70)	
İçen	39 (39)	30 (30)	
Alkol kullanımı			0,052
İçmeyen	92 (92)	98 (98)	
İçen	8 (8)	2 (2)	
Ailede Kanser durumu			0,060
Kanser yok	89 (89)	96 (96)	
Kanser var	11 (11)	4 (4)	

* p değeri Khi-kare testi ile hesaplanmıştır.

Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet açısından fark olmadığı “p” değerinin (0,089) 0,050 den büyük olmasından görülmektedir. Hastaların yaş ortalaması 58,66 8,039, sağlıklı bireylerin yaş ortalaması ise 57,01 7,89 olarak hesaplanmış ve yine gruplar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Gruplar arasında sigara alışkanlığı ve alkol kullanımı açısından önemli bir fark gözlenmezken, ailede kanser durumu açısından da gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,050$)

4.3. Beyin Tümörlü Hastalar ile Sağlıklı Bireylerin Axin2 Genotipleri

4.3.1. Axin2 Ekzon1 148 C>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak

Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda CC, CT ve TT genotiplerinin frekansları sırasıyla %32, %52 ve %16 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki C alleli frekansı 0.58, T alleli frekansı ise 0.42 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.25$). Beyin tümörü hasta grubunda CC, CT ve TT genotip dağılımları da sırasıyla %39, %45 ve %16 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki C alleli frekansı 0.62 ve T alleli frekansı ise 0.38 olarak hesaplanmış ve Hardy-Weinberg eşitliğine uyduğu görülmüştür ($X^2= 0.45$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında CT, TT ve CT+TT genotiplerine ait “p” değerleri sırasıyla 0,274, 0,643 ve 0,301 olarak belirlenmiş ve bu genotiplere ait OR (%95CI) değerleri sırasıyla 0,71 (%95CI: 0,38-1,31), 0,82 (%95CI: 0,35-1,89) ve 0,73 (%95CI: 0,41-1,31) olarak hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0,05$). Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin sigara kullanımı yaş ve cinsiyet gibi özelliklerinin genotip dağılımlarına etkisi incelendiğinde elde edilen düzeltilmiş OR değerleri CT, TT ve CT+TT genotipleri için sırasıyla 0,68 (%95CI: 0,36-1,28), 0,61 (%95CI: 0,25-1,51) ve 0,69 (%95CI: 0,38-1,25) olarak hesaplanmıştır. Bu veriler göz önüne alındığında beyin tümörü gelişiminde ilgili genotiplerin bir risk faktörü oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.2 *Axin2* gen polimorfizminin tüm bölgelerde istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler

Axin2 genotipi	Hasta n (%)	Kontrol n(%)	p değeri	OR (%95 CI)	
				Ham	Düzeltilmiş
148 C/T					
CC	39 (39)	32 (32)	1		
CT	45 (45)	52 (52)	0,274	0,71 (0,38-1,31)	0,68 (0,36-1,28)
TT	16 (16)	16 (16)	0,643	0,82 (0,35-1,89)	0,61 (0,25-1,51)
CT+TT	61 (61)	68 (68)	0,301	0,73 (0,41-1,31)	0,69(0,38-1,25)
Allel Frekansları					
C	123 (61,5)	116 (58)			
T	77 (38,5)	84 (42)			
432T/C					
TT	93 (93)	95 (95)	1		
TC	7 (7)	5 (5)	0,352	1,80 (0,51-6,37)	1,84 (0,51-6,57)
CC	0	0			
Allel Frekansları					
T	193 (96,5)	195 (97,5)			
C	7 (3,5)	5 (2,5)			
956+16A/G					
AA	70 (70)	64 (64)	1		
AG	25 (25)	28 (28)	0,532	0,81 (0,43-1,54)	0,81 (0,41-1,56)
GG	5 (5)	8 (8)	0,343	0,57 (0,17-1,83)	0,62 (0,19-2,02)
AG+GG	30 (30)	36 (36)	0,367	0,76 (0,42-1,37)	0,77 (0,41-1,41)
Allel Frekansları					
A	165 (82,5)	156 (78)			
G	35 (17,5)	44 (22)			
1365A/G					
GG	91 (91)	88 (88)	1		
GA	9 (9)	12 (12)	0,489	0,72 (0,29-1,80)	0,73 (0,29-1,86)
AA	0	0			
Allel Frekansları					
G	191 (95,5)	188 (94)			
A	9 (4,5)	12 (6)			
1386 C/T					
CC	36 (36)	42(42)	1		
CT	44 (44)	50 (50)	0,932	1,02(0,56-1,87)	0,97(0,52-1,79)
TT	20 (20)	8 (8)	0,022	2,91 (1,14-7,41)	2,92 (1,14-7,47)
CT+TT	64 (64)	58 (58)	0,384	1,28 (0,72-2,27)	1,24 (0,69-2,21)
Allel Frekansları					
C	116 (58)	134 (67)			
T	84 (42)	66 (33)			
1712+19G/T					
TT	91 (91)	96 (96)	1		
GT	9 (9)	4 (4)	0,152	2,37 (0,70-7,97)	2,00(0,58-6,93)
GG	0	0			
Allel Frekansları					
T	191 (95,5)	196 (98)			
G	9 (4,5)	4 (2)			
2062 C/T					
CC	87 (87)	86 (86)	1		
CT	13 (13)	14 (14)	0,836	0,91 (0,40-2,06)	0,86 (0,37-1,96)
TT	0	0			
Allel Frekansları					
C	187 (93,5)	186 (93)			
T	13 (6,5)	14 (7)			
2141+73 G/A					
GG	82 (82)	80 (80)	1		
GA	18 (18)	20 (20)	0,718	0,87 (0,43-1,78)	0,80 (0,38-1,65)
AA	0	0			
Allel Frekansları					
G	182 (91)	180 (90)			
A	18 (9)	20 (10)			

4.3.2. Axin2 Ekzon1 432 T>C Polimorfizminin İstatistiksel Olarak

Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda TT ve TC genotiplerinin frekansları sırasıyla %95 ve %5 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki T alleli frekansı 0.98, C alleli frekansı ise 0.02 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.07$). Beyin tümörü hasta grubunda TT ve TC genotiplerinin frekansları sırasıyla %93 ve %7 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki T alleli frekansı 0.97, C alleli frekansı ise 0.03 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.13$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında TC genotipine ait p değeri 0,352 olarak belirlenmiş ve bu değere ait OR ve düzeltilmiş OR değerleri sırasıyla (%95CI) 1,80 (%95CI: 0,51-6,37) ve 1,84 (%95CI: 0,51-6,57) şeklinde hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0,05$).

4.3.3. Axin2 İntron2 956+16 A>G Polimorfizminin İstatistiksel Olarak

Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda AA, AG ve GG genotiplerinin frekansları sırasıyla %64, %28 ve %8 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki A alleli frekansı 0.78, G alleli frekansı ise 0.22 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 3.39$). Beyin tümörü hasta grubunda AA, AG ve GG genotiplerinin frekansları sırasıyla %70, %25 ve %5 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki A alleli frekansı 0.83, G alleli frekansı ise 0.17 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 1.80$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında AG, GG ve AG+GG genotiplerine ait p değerleri sırasıyla 0,532, 0,343 ve 0,367 olarak belirlenmiş ve bu genotiplere ait OR (%95CI) değerleri sırasıyla 0,81 (%95CI: 0,43-1,54), 0,57 (%95CI: 0,17-1,83) ve 0,76 (%95CI: 0,42-1,37) olarak hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0,05$). Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin sigara kullanımı yaş ve cinsiyet gibi özelliklerinin genotip dağılımlarına etkisi incelendiğinde elde edilen düzeltilmiş OR değerleri AG, GG ve AG+GG genotipleri için sırasıyla 0,81 (%95CI: 0,41-1,56), 0,62 (%95CI: 0,19-2,02) ve 0,77 (%95CI: 0,41-1,41) olarak hesaplanmıştır. Bu veriler göz önüne alındığında beyin tümörü gelişiminde ilgili genotiplerin bir risk faktörü oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

4.3.4. *Axin2* Ekzon5 1365 G>A Polimorfizminin İstatistiksel Olarak

Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda GG ve GA genotiplerinin frekansları sırasıyla %88 ve %12 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki G alleli frekansı 0.94, A alleli frekansı ise 0.12 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.41$). Beyin tümörü hasta grubunda GG ve GA genotiplerinin frekansları sırasıyla %91 ve %9 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki G alleli frekansı 0.96, A alleli frekansı ise 0.04 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.22$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında GA genotipine ait p değeri 0.489 olarak belirlenmiş ve bu değere ait OR ve düzeltilmiş OR değerleri sırasıyla (%95CI) değeri 0.72 (%95CI: 0.29-1.80) ve 0.73 (%95CI: 0.29-1.86) şeklinde hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0.05$).

4.3.5. *Axin2* Ekzon5 1386 C>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak

Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda CC, CT ve TT genotiplerinin frekansları sırasıyla %42, %50 ve %8 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki C alleli frekansı 0.67, T alleli frekansı ise 0.33 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 1.71$). Beyin tümörü hasta grubunda CC, CT ve TT genotip dağılımları da sırasıyla %36, %44 ve %20 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki C alleli frekansı 0.58 ve T alleli frekansı ise 0.42 olarak hesaplanmış ve Hardy-Weinberg eşitliğine uyduğu görülmüştür ($X^2= 0.94$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında CT, TT ve CT+TT genotiplerine ait p değerleri sırasıyla 0.932, **0,022** ve 0.384 olarak belirlenmiş ve bu genotiplere ait OR değerleri sırasıyla 1.02 (%95 CI: 0.56-1.87), 2.91 (%95 CI: 0.14-7.41) ve 1.28 (%95CI: 0.72-2.27) olarak hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0.05$). Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin sigara kullanımı yaş ve cinsiyet gibi özelliklerinin genotip dağılımlarına etkisi incelendiğinde elde edilen düzeltilmiş OR değerleri CT, TT ve CT+TT genotipleri için sırasıyla 0.97 (%95CI: 0.52-1.79), **2,92 (%95CI: 1,14-7,47)** ve 1.24

(%95CI: 0,69-2,21) olarak hesaplanmıştır. Bu veriler göz önüne alındığında Ekzon5 1386 bölgesinde TT genotipi beyin tümörü oluşumu arasında önemli bir ilişki vardır diğer genotiplerin ise bir risk faktörü oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

4.3.6. Axin2 İtron5 1712+19 G>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda TT ve GT genotiplerinin frekansları sırasıyla %96 ve %4 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki T alleli frekansı 0.98, A alleli frekansı ise 0.02 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.04$). Beyin tümörü hasta grubunda TT ve GT genotiplerinin frekansları sırasıyla %91 ve %9 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki T alleli frekansı 0.96, G alleli frekansı ise 0.04 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.22$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında GT genotipine ait p değeri 0,152 olarak belirlenmiş ve bu değere ait OR ve düzeltilmiş OR değerleri sırasıyla (%95CI) 2,37 (%95CI: 0,70-7,97) ve 2,00 (%95CI: 0,58-6,93) şeklinde hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0,05$).

4.3.7. Axin2 Ekzon7 2062 C>T Polimorfizminin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda CC ve CT genotiplerinin frekansları sırasıyla %86 ve %14 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki C alleli frekansı 0.93, A alleli frekansı ise 0.07 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.57$). Beyin tümörü hasta grubunda CC ve CT genotiplerinin frekansları sırasıyla %87 ve %13 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki C alleli frekansı 0.94, T alleli frekansı ise 0.06 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.48$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında CT genotipine ait p değeri 0,836 olarak belirlenmiş ve bu değere ait OR ve düzeltilmiş OR değerleri sırasıyla (%95CI) 0,91 (%95CI: 0,40-2,06) ve 0,86 (%95CI: 0,37-1,96) şeklinde hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0,05$).

4.3.8. Axin2 İtron7 2141+73 G>A Polimorfizminin İstatistiksel Olarak

Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda GG ve GA genotiplerinin frekansları sırasıyla %80 ve %20 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki G alleli frekansı 0.90, A alleli frekansı ise 0.10 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 1.23$). Beyin tümörü hasta grubunda GG ve GA genotiplerinin frekansları sırasıyla %82 ve %18 olarak bulunmuştur. Bu gruptaki G alleli frekansı 0.91, A alleli frekansı ise 0.09 olarak hesaplanmış ve bu değerlerin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk gösterdiği belirlenmiştir ($X^2= 0.98$). Genotip dağılımları açısından iki grup karşılaştırıldığında GA genotipine ait p değeri 0,718 olarak belirlenmiş ve bu değere ait OR ve düzeltilmiş OR değerleri sırasıyla 0,87 (%95 CI: 0,43-1,78) ve 0,80 (%95 CI: 0,38-1,65) şeklinde hesaplanmıştır. Veriler incelendiğinde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p> 0,05$).

4.4. Axin2 Polimorfik Genotipleri ile Beyin Tümörü Hastalarının Klinik-Patalojik Özellikleri Arasındaki İlişki

Axin2 genine ait sekiz bölgede yaptığımız SNP (Single Nucleotid Polimorphism-Tek Nükleotid Polimorfizmi) çalışmaları sonucu, beyin tümörü hastalarının genotip dağılımları ve bu genotiplere sahip bireylerin cinsiyeti ve sigara alışkanlıkları gibi özellikleri ile tümörün histolojik hücre tiplerine ait değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Exon1 148 C>T polimorfizmi beyin tümörlü hastalarda cinsiyet yönünden incelendiğinde CC, CT, TT ve CT+TT genotip dağılımlarına bağlı olarak %95 güven aralığı sınırlarında OR değerleri sırasıyla 0,17 (0,38-1,31), 0,82 (0,35-1,89), 0,73 (0,41-1,31) olarak hesaplanmış olup güven aralığı 1 değerini içmediğinden önemli bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Aynı şekilde cinsiyet, sigara alışkanlığı ve tümör tipi yönünden incelendiğinde de %95 güven aralığı sınırlarının 1 değerini içermesi dolayısıyla 148 T>C polimorfizmi ile belirtilen etkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığı gözlenmiştir.

Exon1 432 T>C polimorfizmi beyin tümörlü hastalarda cinsiyet ve sigara alışkanlığı yönünden incelendiğinde TT, TC genotip dağılımına bağlı olarak %95 güven aralığı sınırlarında OR değerleri sırasıyla 3,33 (0,36-30,89), 1,30 (0,25-6,83) ve 1,56 (0,33-7,29), 2,41 (0,23-24,47) olarak hesaplanmış olup güven aralığı 1 değerini içmediğinden önemli bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Tümör tipi yönünden

incelendiğinde de hipofiz adenomalı bireylerde OR değeri 8,00 (1,21-52,80) olarak hesaplanmış olup güven aralığı 1 değerini içerdiğinden TC genotipinin bu tümör tipine 8 kat daha fazla yatkınlık oluşturduğu saptanmıştır. Diğer tümör tipleri ile 432 C>T polimorfizmi ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığı gözlenmiştir.

Intron2 956 A>G polimorfizmi beyin tümörlü hastalarda cinsiyet ve sigara alışkanlığı yönünden incelendiğinde AA, AG, GG ve AG+GG genotip dağılımlarına bağlı olarak OR değerleri hesaplandığında güven aralığı 1 değerini içerdiğinden 956 A>G polimorfizm ile bu etkenlerin arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Aynı şekilde tümör tipi yönünden incelendiğinde AG genotipli menengiomalı bireylere ait OR değeri 0,27 (0,07-0,98), AG genotipli hipofiz adenomalı bireylere ait OR değeri 0,88 (0,81-0,96), AG+GG genotipli menengiomalı bireylere ait OR değeri 0,28 (0,09-0,88) olarak hesaplanmıştır. Bu OR değerlerinin %95 güven aralıkları 1 den küçük olduğundan aralarında anlamlı bir ilişki olup AG, GG ve AG+GG genotipleri bu tümör tiplerinin oluşma riskini azaltmaktadır.

Çizelge 4.3 *Axin2* polimorfik genotipleri ile beyin tümörlü hastaların klinik-patalojik özelliklerinin istatistiksel sonuçları

Bölge			Genotip					OR (%95 CI)		
			CC	CT	TT	CT+TT	Top.	CT	TT	CT+TT
148	Grup	Kontrol	32	52	16	68	100			
		Hasta	39	45	16	61	100	0,17 (0,38-1,31)	0,82 (0,35-1,89)	0,73 (0,41-1,31)
	Cinsiyet	Erkek	24	21	13	34	58	0,37 (0,14-0,92)	0,66 (0,21-2,00)	0,44 (0,18-1,04)
		Kadın	15	24	3	27	42	1,92 (0,54-3,06)	0,60 (0,13-2,70)	1,45 (0,49-2,64)
	SA	İçmeyen	24	28	9	37	61	0,81 (0,38-1,71)	1,04 (0,35-3,06)	0,85 (0,42-1,74)
		İçen	15	17	7	24	39	0,49 (0,16-1,53)	0,46 (0,11-1,85)	0,48 (0,16-1,41)
	TT	HA	5	1	2	3	8	0,12 (0,01-1,10)	0,80 (0,14-4,58)	0,28 (0,06-1,25)
		AST	17	21	5	26	43	0,76 (0,35-1,65)	0,58 (0,18-1,88)	0,72 (0,34-1,51)
		ME	8	14	7	21	29	1,07 (0,40-2,85)	1,75 (0,53-5,68)	1,23 (0,49-3,08)
			TT	TC	TC					
432	Grup	Kontrol	96	4			100			
		Hasta	93	7			100	1,80 (0,51-6,37)		
	Cinsiyet	Erkek	54	4			58	3,33(0,36-30,89)		
		Kadın	39	3			42	1,30 (0,25-6,83)		
	SA	İçmeyen	57	4			61	1,56 (0,33-7,29)		
		İçen	36	3			39	2,41 (0,23-24,47)		
	TT	HA	6	2			8	8,00 (1,21-52,80)		
		AST	40	3			43	1,80 (0,38-8,41)		
		ME	28	1			29	0,85 (0,09-7,98)		
			AA	AG	GG	AG+GG		AG	GG	AG+GG
956	Grup	Kontrol	64	28	8	36	100			
		Hasta	70	25	5	30	100	0,81 (0,43-1,54)	0,57 (0,17-1,83)	0,76 (0,42-1,37)
	Cinsiyet	Erkek	41	15	2	17	58	0,78 (0,32-1,86)	0,73 (0,09-5,49)	0,77 (0,33-1,78)
		Kadın	29	10	3	13	42	0,83 (0,32-2,16)	0,58 (0,13-2,55)	0,76 (0,32-1,79)
	SA	İçmeyen	39	19	3	22	61	0,86 (0,41-1,83)	0,52 (0,12-2,24)	0,79 (0,39-1,61)
		İçen	31	6	2	8	39	0,89 (0,24-3,27)	0,74 (0,09-5,66)	0,84 (0,26-2,67)
	TT	HA	5	3	0	3	8	1,37 (0,30-6,13)	0,88 (0,81-0,96)	1,06 (0,24-4,72)
		AST	30	11	2	13	43	0,83 (0,36-1,90)	0,53 (0,10-2,66)	0,77 (0,35-1,66)
		ME	25	3	1	4	29	0,27 (0,07-0,98)	0,32 (0,03-2,69)	0,28 (0,09-0,88)
			GG	GA	GA					
1365	Grup	Kontrol	88	12			100			
		Hasta	91	9			100	0,72 (0,29-1,80)		
	Cinsiyet	Erkek	53	5			58	0,52 (0,15-1,78)		
		Kadın	38	4			42	1,03 (0,25-4,10)		
	SA	İçmeyen	54	7			61	0,87(0,30-2,51)		
		İçen	37	2			39	0,48 (0,76-3,11)		
	TT	HA	7	1			8	1,04 (0,11-9,27)		
		AST	38	5			43	0,96 (0,31-2,92)		
		ME	28	1			29	0,26 (0,03-2,10)		

SA: Sigara alışkanlığı
TT: Tümör tipi
HA: Hipofiz Adenoma
AST: Astrositoma
ME: Menengioma

Çizelge 4.3(devamı) *Axin2* polimorfik genotipleri ile beyin tümörlü hastaların klinik-patalojik özelliklerinin istatistiksel sonuçları

Bölge	Genotip							OR (%95 CI)		
			CC	CT	TT	CC+TT	Top.	CT	TT	CT+TT
1386	Grup	Kontrol	42	50	8	58	100			
		Hasta	36	44	20	64	100	1,02 (0,56-1,87)	2,91 (1,14-7,41)	1,28 (0,72-2,27)
	Cinsiyet	Erkek	17	29	12	41	58	1,42 (0,61-3,30)	7,05 (1,38-36,04)	1,85 (0,82-4,17)
		Kadın	19	15	8	23	42	0,66 (0,27-1,61)	1,54 (0,45-5,24)	0,83 (0,36-1,88)
	SA	İçmeyen	23	25	13	38	61	1,02 (0,48-2,15)	2,92 (0,96-8,84)	1,31 (0,65-2,64)
		İçen	13	19	7	26	39	0,94 (0,33-2,66)	2,96 (0,50-17,29)	1,15 (0,42-3,13)
	TT	HA	3	4	1	5	8	1,12 (0,23-5,28)	1,75 (0,16-19,02)	1,20 (0,27-5,33)
		AST	16	19	8	27	43	0,99 (0,45-2,17)	2,62 (0,84-8,18)	1,22 (0,58-2,54)
		ME	7	13	9	22	29	1,56 (0,57-4,26)	6,75 (1,94-23,41)	2,27 (0,89-5,81)
1712			GG	GT				GT		
	Grup	Kontrol	96	4			100			
		Hasta	91	9			100	2,37 (0,70-7,97)		
	Cinsiyet	Erkek	51	7			58	3,02 (0,59-15,29)		
		Kadın	40	2			42	1,30 (0,17-9,63)		
	SA	İçmeyen	57	4			61	2,38 (0,42-13,50)		
		İçen	34	5			39	2,05 (0,37-11,43)		
	TT	HA	8	0			8	0,96 (0,92-0,99)		
		AST	40	3			43	1,80 (0,38-8,41)		
ME		27	2			29	1,77 (0,30-10,23)			
2062			CC	CT				CT		
	Grup	Kontrol	86	14			100			
		Hasta	87	13			100	0,91 (0,40-2,06)		
	Cinsiyet	Erkek	48	10			58	2,18 (0,63-7,49)		
		Kadın	39	3			42	0,33 (0,08-1, 31)		
	SA	İçmeyen	55	6			61	0,84 (0,27-2,58)		
		İçen	32	7			39	0,87 (0,26-2,94)		
	TT	HA	6	2			8	2,04 (0,37-11,17)		
		AST	36	7			43	1,19 (0,44-3,20)		
ME		26	3			29	0,90 (0,18-2,65)			
2141			GG	GA				GA		
	Grup	Kontrol	80	20			100			
		Hasta	82	18			100	0,87 (0,43-1,78)		
	Cinsiyet	Erkek	45	13			58	1,37 (0,51-3,65)		
		Kadın	37	5			42	0,47 (0,15-1,46)		
	SA	İçmeyen	54	7			61	0,43 (0,16-1,14)		
		İçen	28	11			39	2,55 (0,72-9,02)		
	TT	HA	6	2			8	1,33 (0,25-7,10)		
		AST	34	9			43	1,05 (0,43-2,58)		
ME		25	4			29	0,64 (0,20-2,04)			

SA: Sigara alışkanlığı
TT: Tümör tipi
HA: Hipofiz Adenoma
AST: Astrositoma
ME: Menengioma

Exon5 1365 G>A polimorfizmi beyin tümörlü hastalarda cinsiyet, sigara alışkanlığı ve tümör tipi yönünden incelendiğinde GG ve GA genotip dağılımlarına bağlı olarak OR değerleri hesaplandığında güven aralığı 1 değerini içerdiği ve 956 A>G polimorfizm ile bu etkenlerin arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır.

Exon5 1386 C>T polimorfizmi beyin tümörlü hastalarda cinsiyet yönünden incelendiğinde CC, CT, CT+TT genotip dağılımlarına bağlı olarak OR değerleri hesaplandığında güven aralığı 1 değerini içerdiğinden 1386 C>T polimorfizm ile bu etkenlerin arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Ancak TT genotipli erkek bireylerde OR değeri 7,05 (1,38-36,04) şeklinde hesaplanmış olup, bu genotipin erkeklerde beyin tümörü oluşma riskini 7 kat arttırdığı sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde tümör tipi yönünden incelendiğinde yine TT genotipli menengiomalı bireylere ait OR değeri 6,75 (1,94-23,41) hesaplanmış olup, TT genotipinin menengioma oluşum riskini 6,75 kat arttırmaktadır. Diğer tümör tiplerinin OR değerlerinin %95 güven aralıkları 1 içerdiğinden istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Intron5 1712 G>T polimorfizmi beyin tümörlü hastalarda cinsiyet ve sigara alışkanlığı yönünden incelendiğinde GG ve GT genotip dağılımlarına bağlı OR değerleri hesaplandığında güven aralığı 1 değerini içerdiğinden 1712 G>T polimorfizm ile bu etkenlerin arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Ancak tümör tipi yönünden incelendiğinde GT genotipli hipofiz adenomalı bireylerde OR değeri 0,96 (0,92-0,99) şeklinde hesaplanmış olup, bu genotipin bu tip bir beyin tümörü oluşum riskini azalttığı sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde diğer tümör tiplerinin OR değerlerinin %95 güven aralıkları 1 içerdiğinden istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Beyin tümörlü hastalarda Exon7 2062 C>T ve Intron7 G>A polimorfizimleri cinsiyet, sigara alışkanlığı ve tümör tipi yönünden incelendiğinde genotiplere bağlı olarak hesaplanan OR değerlerinin güven aralıkları 1 içerdiğinden ilgili genotiplerle sayılan etkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada *Axin2* genine ait sekiz bölgedeki polimorfizmin beyin tümörü gelişiminde risk faktörü olup olmadığı bir Türk populasyonunda araştırıldı. Bu bölgeler *Axin2* geninde daha önceden saptanmış olan polimorfik bölgelerden bazılarıdır. Çalışmamızda *Axin2* geni ile beyin tümörü arasında önemli ilişkiler belirlendi.

Öncelikle, beyin tümürlü hastalar ile kontrol grubundaki sağlıklı bireyler cinsiyet yönünden karşılaştırıldı. Hasta ve kontrol grubundaki erkek bireylerin oranı sırasıyla %58 ve %46, kadın bireylerin oranı ise %42 ve %54'tür. İstatistiksel olarak bu oranlar değerlendirildiğinde gruplar arasında önemli bir fark yoktur ($p=0.089$, $p>0.05$). Gruplar yaş açısından değerlendirildiğinde, hasta grubunun yaş ortalaması 58.66 ± 8.039 iken kontrol grubunun 57.01 ± 7.89 olarak hesaplanmış ve yaş ortalamaları yönünden de gruplar arasında bir farkın olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde sigara ve alkol alışkanlığı ile ailede kanser öyküsü açısından da gruplar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Khi kare testi sonuçları sırasıyla $p=0.181$, $p=0.052$ ve $p=0.060$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerden de anlaşılabileceği gibi gruplar arasında cinsiyet, yaş, sigara alışkanlığı, alkol kullanımı ve ailede kanser öyküsü yönünden önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki amaç *Axin2* geni polimorfizminin beyin tümörü üzerine etkisini incelemek olduğundan, gruplar arasında diğer parametreler açısından da fark olmaması konusundaki gereklilik verilerimizin istatistiksel sonuçları ile de örtüşmektedir.

Axin2 geninin sekiz ayrı bölgesindeki polimorfik durumlar hasta ve kontrol grupları arasında tek tek incelenmiş ve istatistiksel sonuçlar da Çizelge 4.2'de görülmektedir. Yalnızca Ekzon5 1386 C>T polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grupları arasında önemli bir fark saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunda CC alleli sırasıyla %36 ve %42, CT alleli %44 ve %50, TT alleli %20 ve %8, CT+TT alleleri ise %64 ve %58 oranlarındadır. C allelinin frekansı hasta ve kontrol gruplarında %58 ve %67 iken T allelinin frekansı ise %42 ve %33'dür. Khi kare testi ile bu verilere bağlı olarak elde edilen p değeri 0.022'dir. *Axin2* genindeki Ekzon5 1386 C>T polimorfizmi açısından önemli bir fark vardır. Bu p değerine ait OR değeri ise (%95 güven aralığında) 2.91 (1.14-7.41) olarak hesaplanmıştır. Yaş, cinsiyet ve sigara kullanımının etkisi de hesaba katılarak Logistik regresyon yapıldığında elde edilen OR değeri ise, 2.92 (1.14-7.47) şeklinde hesaplanmıştır. Buradan da anlaşılabileceği gibi Khi kare testi ile elde edilen OR değeri ile Logistik regresyon değeri arasında çok fazla bir değişim

olmamıştır. Ancak, *Axin2* geni 1386 C>T polimorfizminin sağlıklı bireylere göre beyin tümörü olan bireylerde 2.92 kat daha sık görüldüğü ve bu polimorfizmin beyin tümörüne yatkınlık oluşturduğu söylenebilir. *Axin2* geninin kalan yedi bölgesinde de aynı şekilde Khi kare testi ve Logistik regresyon yapılmış olup elde edilen sonuçlar incelendiğinde beyin tümörü ile polimorfik genotipler arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki gözlenmemiştir.

Çalışmamızda verileri, hasta ve kontrol grupları arasında genotip açısından değerlendirdikten sonra sadece hasta grubundaki kadınlar ile erkekleri, sigara içmeyenler ile içenleri ve hastaların beyin tümörü tiplerine göre genotipler açısından da değerlendirilmesi yapılmıştır. Elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak önemlilik taşıyan dikkat çekici sonuçlar bulunmaktadır. *Axin2* Ekzon1 148 C>T bölgesinde CT genotipi taşıyan erkeklerin kadınlara göre beyin tümörüne karşı koruyucu özellik kazanmış olduğu (%95 güven aralığında OR: 0.37 (0.14-0.92)); Ekzon1 432 T>C polimorfizm bölgesinde TC genotipi taşıyan hipofiz adenomalı bireylerin diğer hastalara göre beyin tümörüne 8 kat daha yatkın olduğu (OR: 8.00 (1.21-52.80)); İntron2 956 +16 A>G polimorfizm bölgesinde AA ya da GG genotiplerinden birini taşıyan menengiomalı bireylerin diğer hasta bireylere göre beyin tümörüne daha az yatkın oldukları (AG genotipi için OR: 0.27 (0.007-0.98), AG+GG genotipi için OR: 0.28 (0.09-0.88)), GG genotipli hipofiz adenomalı bireylerin beyin tümörüne karşı bu genotip ile beyin tümörüne daha az yatkın oldukları (OR: 0.88 (0.81-0.96)); Ekzon5 1386 C>T polimorfizm bölgesinde TT genotipi taşıyan menengiomalı bireylerin beyin tümörüne 6.75 kat daha yatkın oldukları (OR: 6.75 (1.94-23.41)); İntron5 1712 +19 G>T polimorfizm bölgesinde GT genotipli olan hipofiz adenomalı bireylerin diğer hastalara göre beyin tümörüne daha az yatkın oldukları (OR: 0.96 (0.92-0.99)) saptanmıştır.

Axin2 proteininin yapısı ve işlevi ile ilgili birçok çalışma vardır. *Axin* proteinine ait birkaç motif tanımlanmıştır. APC bağlanma motifi ile ilgili olan *Axin2* bölgesi G-protein sinyali ailesi (RGS) regülatör proteinlerine büyük homoloji göstermektedir. *Axin*, APC, β -katenin, GSK3 β ve diğer birkaç protein Wnt yolağını kontrol etmektedir. Hem *Axin* hem de APC, β -katenin düzenlenmesinde önemli proteinlerdir APC üzerinde proteini kısa bırakan mutasyonları çeşitli kanserlerde *Axin* bağlanmasını önlediği ve karsinogenezde önemli olduğu ileri sürülmüştür. RGS domaini (81.-200. amino asitler arası) *Axin*'in tümör baskılayıcı özelliğinde önemli bir yere sahiptir (Ikeda S., 1998).

Axin2 gen mutasyonlarının ve polimorfizmlerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Costa ve arkadaşları EGF+61 polimorfizmi ve glioma riski arasındaki bağlantıyı inceledikleri çalışmada bu polimorfizmin glioma, glioblastoma ve oligodendrioglioma gelişimine yatkınlık oluşturduğu sonucuna ulaşmışlardır. (Costa BM., ve ark.. 2007). Mdm2 SNP309 polimorfizmi tek başına ve TP53 R72P polimorfizmi ile birlikte oligodendrioglioma tümörlerinde incelenmiş ancak bu iki polimorfizmin tek başına ya da birlikte bir yatkınlık oluşturmadığı sonucuna varılmıştır (Idbaih A., ve ark.. 2008). Yine buna benzer bir çalışmada telomeraz geni hTERT polimorfizmi malign gliomalarda araştırılmış ve MNS16A kısa allelinin glioma hastalarında daha sık görüldüğü belirlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır (Carpentier C., ve ark.. 2007).

Medullablastoma çocuklardaki en yaygın malign beyin tümörünü temsil eder ve çoğu sporadik olarak görülür. Ancak insidansları Turcot's ve Gorlin's sendromlarında yükselmiştir. MB'lı Turcot hastalarında germ-line APC geni mutasyonları Gorlin's de ise PTCH geninde mutasyon görülür. APC gen ürünü beta katenin degradasyonunu kontrol eden çok proteinli kompleksin bir bileşenidir ve bu kompleksde yer alan Axin ise skaffold proteinidir. Sporadik MB'larda APC mutasyonu nadir görülürken beta katenin mutasyonları daha sık görülür. MB'larda *Axin1*'in de mutasyona uğrayıp uğramadığını belirlemek üzere yapılan çalışmalarda, ekzon1 (Pro255Ser) somatik mutasyonu ve 7 tane büyük delesyon olduğu belirlenmiştir. Bu durum *Axin* geninin MB'larda tümör baskılayıcı gen olarak rol aldığını göstermektedir (Dahmen RP., ve ark.. 2001).

Glioma kompleks bir hastalıktır ve tek bir gendeki bozukluk sonucu ortaya çıkmadığı da kesindir. Folat metabolizması genlerindeki polimorfizm menengioma ve gliomalarda incelenmiş ve 5,10 metilentetrahidrofolat düzeyini arttıran genotiplerin yatkınlık oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. (Bethke L., ve ark.. 2008). Yapılan başka bir çalışmada meningiomalarda APC geni heterozigotluk kaybı gözlenmiştir (Pecina-Slaus N., ve ark.. 2008). Kuzey Çin'de yapılan başka bir araştırmada ise erişkin astrositoma ve matriks metalloproteinaz genlerinin promotor bölgelerindeki polimorfizmler incelenmiş ve MMP1-1607 1G/1G genotipi ve MMP-1 1G-MMP-3 6A haplotiplerinin astrositoma gelişiminde koruyucu rol oynadığı ileri sürülmüştür (Lu Z., ve ark.. 2007). Almanya'da medullablastoma vakalarında yapılan bir çalışma sonucunda, sporadik medulloblastoma patogenezinde *Axin2* gen değişimlerinin gerekli olduğu ve Ekzon5 ve Ekzon8 de gerçekleşen mutasyonların onkogenik aktivasyona

neden olabileceği saptanmıştır (Koch A., ve ark.. 2007). Koch ve arkadaşları tarafından yapılan sporadik hepatoblastoma patogenezinde *Axin2* mutasyonlarının tarandığı çalışmada Ekzon9'da somatik nokta mutasyonu, Ekzon8-9 da delesyon ve ayrıca Ekzon5'in 455. ve 462. kodonlarında yer alan tek nükleotid polimorfizmleri saptanmıştır (Koch A., ve ark.. 2004). Kanzaki ve arkadaşları tarafından akciğer kanseri ve *Axin2* gen polimorfizmi ilişkisinin araştırıldığı çalışmada ise *Axin2* geni Ekzon1 50. kodonundaki tek nükleotid polimorfizminin akciğer kanser riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Kanzaki H., ve ark.. 2006). Polonya'da yapılan başka bir çalışmada ise *Axin2* ekzonları ve ekzon-intron sınırlarında gerçekleşen tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmış ve İntron2 956+16A>G ve Ekzon7 2062C>T polimorfizmlerinin dış agenezi riskini arttırdığı saptanmıştır (Mostowska A., ve ark.. 2006). 50. kodon da yer alan Ekzon1 148C>T polimorfizmi *Axin2*'nin RGS domainine oldukça yakın bir bölgededir ve bu nedenle *Axin*'e proteinlerin bağlanmasını etkiliyor olabilir ancak yaptığımız çalışmada, beyin tümörlü hastalarda herhangi bir değişimin olmadığını gözlemledik. Belkide bu kanser türlerinde çalışılan grubun sayısını arttırarak daha net bir tablonun ortaya çıkması sağlanabilir. Japon popülasyonunda akciğer kanseri ve Ekzon1 148C>T polimorfizmi arasında bulunan anlamı ilişki bizim elde ettiğimiz sonuçları destekler nitelikte değildir.

Yapılan başka bir çalışmada *Axin2* İntron2 956+16G allelinin dış gelişmesini önlediği belirlenmiştir. Bu intronik varyantın Ekzon2 dizisi içerisinde zayıf bir donör spays bölge oluşturduğu ileri sürülmektedir (Mostowska A., 2006). Biz çalışmamızda beyin tümörü hastalarında bir etkisi olmadığını belirledik.

Çalışmamızın bir diğer kısmında araştırılan Ekzon5 1386C>T polimorfizmi *Axin* proteininin β -katenin bağlanma domaininde bulunmaktadır. Birçok çalışma β -kateninin hücre çoğalmasında gerekli olan birçok hedef genin transkripsiyonel transaktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla β -kateninde gerçekleşebilen bir mutasyon karsinogeneizde etkili ise bu proteinin düzenlemesinde rol alan ve *Axin2* proteininin kritik bir rolü olduğu degradasyon kompleksi bileşenlerindeki mutasyon ya da polimorfizmlerin de beyin tümörü hastalarında etken olabileceği düşünülebilir. Bu düşünceden yola çıkarak çalışmamızda *Axin2* proteininin β -kateninin bağlanma bölgesindeki Ekzon5 1386 C>T polimorfizmi araştırılmış ve beyin tümörü hastalarında TT genotipinin risk faktörü olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar göz önüne alındığında *Axin2* geni 1386. bazında gerçekleşen tek nükleotid polimorfizminin beyin tümörüne yakınlık açısından önemli olduğu düşünülebilir.

Beyin tümörü ile yaptığımız çalışmalarda hipofiz adenoma ve menengioma türlerinde *Axin2* geni 432T>C, 956+16G>A, 1386C>T ve 1712 G>T polimorfizimlerinin istatistiksel olarak önemli olduğu sonucu görülse de hasta sayıları yetersiz olduğu için kesin bir kanıya varılamamıştır. Bu tümör tiplerinde hasta sayıları arttırılarak daha ikna edici sonuçların alınabileceği düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak bu çalışma bir Türk popülasyonunda beyin tümörü ve *Axin2* geni polimorfizmi arasındaki ilişkinin ortaya konulduğu ilk ön çalışmadır. Özellikle hasta grubu genişletilerek farklı popülasyonlarda *Axin2* geni polimorfik bölgelerinin çalışılması bu varsayımımızın geçerliliğini ortaya koyabilir.

KAYNAKLAR

- Akgün E., (2007). Bir Türk Populasyonundaki Primer Hipertansiyonlu Bireylerde *Cyp11b2* Geninin Promotor Bölgesindeki -344T/C Polimorfizminin Araştırılması, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 86s
- Akiyama T., (2000). Wnt/ β -catenin signaling. Cytokine & Growth Factor Reviews 11 (4), 273 – 282.
- Aldape KD, Okcu MF, Bondy ML, Wrensch M., (2003). Molecular epidemiology of glioblastoma. Cancer J. 9:99–106.
- American Cancer Society (2006). Cancer Facts and Figures, Atlanta, GA: American Cancer Society.
- Autrup H., (1990). Carcinogen metabolism in cultured human tissues and cells. Carcinogenesis 11, 707–712.
- Barker N, Clevers H., (2000). Catenins, Wnt signaling and cancer. Bioessays. 22(11):961-5.
- Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W., (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. Science 280:596–599.
- Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH., (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. Semin Cancer Biol. 6(1):3-16.
- Berleur MP, Cordier S., (1995). The role of chemical, physical, or viral exposures and health factors in neurocarcinogenesis: implications for epidemiologic studies of brain tumors. Cancer Causes Control 6:240–256.
- Bethke L, Webb E, Murray A, Schoemaker M, Feychting M, Lönn S, Ahlbom A, Malmer B, Henriksson R, Auvinen A, Kiuru A, Salminen T, Johansen C, Christensen HC, Muir K, McKinney P, Hepworth S, Dimitropoulou P, Lophatananon A, Swerdlow A, Houlston R., (2008). Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 17(5):1195-202.
- Bondy M, Wiencke J, Wrensch M, Kyritsis AP., (1994). Genetics of primary brain tumors: a review. J Neurooncol 18:69–81.
- Carpentier C, Lejeune J, Gros F, Everhard S, Marie Y, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M., (2007). Association of telomerase gene hTERT polymorphism and malignant gliomas. J Neurooncol. 84(3):249-53.
- Causes and Risk Factors. ABTA (American Brain Tumor Association) resmi sitesi (info@abta.org.), 4, 18–20.
- Central Brain Tumor Registry of the United States (2005). Statistical Hinsdale, IL: CBTRUS;. Available at: <http://www.cbtrus.org/reports/reports.html>.
- Chen P, Aldape K, Wiencke JK, Kelsey KT, Miike R, Davis RL, Liu J, Kesler-Diaz A, Takahashi M, Wrensch M., (2001). Ethnicity delineates different genetic pathways in malignant glioma. Cancer Research 61, 3949–3954.
- Cocco P, Heineman EF, Dosemeci M., (1999). Occupational risk factors for cancer of the Central Nervous System (CNS) among U.S. women. American Journal of Industrial Medicine 36, 70–74.
- Costa BM, Ferreira P, Costa S, Canedo P, Oliveira P, Silva A, Pardal F, Suriano G, Machado JC, Lopes JM, Reis RM., (2007). Association between functional EGF+61 polymorphism and glioma risk. Clin Cancer Res. 13(9):2621-6.

- Counsell CE, Grant R., (1998). Incidence studies of primary and secondary intracranial tumors: a systematic review of their methodology and results. *J Neurooncol* 37:241–250.
- Dahmen RP, Koch A, Denkhau D, Tonn JC, Sörensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsch T., (2001). Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* 61(19):7039-43.
- Davis FG, McCarthy BJ., (2001). Current epidemiological trends and surveillance issues in brain tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 1:395–401.
- Davis FG, McCarthy BJ., (2000). Epidemiology of brain tumors. *Curr Opin Neurol* 13:635–640.
- De Roos AJ, Rothman N, Brown M, A.Bell, D., S.Pittman, G., R.Shapiro, W., G.Selker, R., A.Fine, H., M.Black, P., D.Inskip, P., (2006). Variation in genes relevant to aromatic hydrocarbon metabolism and the risk of adult brain tumors. *Neuro-oncol.* 8(2):145-55.
- De Roos AJ, Rothman N, Inskip, P.D., Linet, M.S., Shapiro, W.R., Selker, R.G., Fine, H.A., Black, P.M., Pittman, G.S., Bell, D.A., (2003). Genetic polymorphisms in GSTM 1, P1, T1, and CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 12, 14–22.
- Devesa SS, Grauman DG, Blot WJ, Pennello G, Hoover RN, Fraumeni JF Jr., (1999). *Atlas of Cancer Mortality in the United States, 1950–1994*. Washington, DC: National Institutes of Health, National Cancer Institute.
- El-Zein R, Bondy M, Wrensch M., (2002) Epidemiology of brain tumors. In: Ali-Osman F, ed. *Contemporary Cancer Research: Brain Tumors*. Totowa, NJ: Humana Press 3-18.
- Ferlin, N., (2005). The Epidemiology, Biology and Genetics of Human Astrocytic Tumours. *Oncology-pathology*. Karolinska Institutet.
- Furuhashi M, Yagi K, Yamamoto H, Furukawa Y, Shimada S, Nakamura Y, Kikuchi A, Miyazono K, Kato M., (2001). Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 21(15):5132-41.
- Giner V, Corella D, Chaves FJ, Pascual JM, Portoles O, Marin P, Lozano JV, Armengod ME, Redon J., (2001). Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and essential hypertension in the Spanish population. *Med Clin (Barc).* 3;117(14):525-9
- Grossman, S.A., Osman, M., Hruban, R., Piantadosi, S., (1999). Central nervous system cancers in first-degree relatives and spouses. *Cancer Investigation* 17, 299– 308.
- Gurney JG, Kadan-Lottick N., (2001). Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol* 13:160–166.
- Hassett C, Omiecinski CJ, Aicher L, Sidhu JS., (1994). Human mEH: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Human Molecular Genetic* 3, 421–428.
- Hedgepeth CM, Deardorff MA, and Klein PS., (1999). Xenopus axin interacts with glycogen synthase kinase-3 beta and is expressed in the anterior midbrain. *Mech. Dev.* 80, 147–151.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P., (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390(6659):465-71.

- Idbaih A, Boisselier B, Marie Y, Sanson M, El Hallani S, Crinière E, Fourtassi M, Paris S, Carpentier C, Rousseau A, Mokhtari K, Combadière C, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY., (2008). Influence of MDM2 SNP309 alone or in combination with the TP53 R72P polymorphism in oligodendroglial tumors. *Brain Res.* 1198:16-20.
- Ikeda S, Kishida M, Matsuura Y, Usui H, Kikuchi A., (2000). GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene.* 19(4):537-45.
- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and beta-catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* 17:1371–1384.
- Inskip PD, Linet MS, Heineman EF., (1995). Etiology of brain tumors in adults. *Epidemiol Rev* 17:382–414.
- Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford-Smith G, Young J, Leggett B., (1998). Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut.* 42(5):673-9.
- Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, (2005). *CA Cancer J Clin* 55:10–30.
- Jemal,A., Tiwari,R.C., Murray,T., Ghafoor,A., Samuels,A., Ward,E., Feuer,E.J. and Thun,M.J. (2004) Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.*, 54, 8–29.
- Kanzaki H, Ouchida M, Hanafusa H, Yano M, Suzuki H, Aoe M, Imai K, Shimizu N, Nakachi K, Shimizu K., (2006). Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *International Journal of molecular medicine.* 18, 279-284.
- Klug WS, Cummings MR., (Çeviri editörü: Öner C.), (2003). *Genetik Kavramlar.* Palme yayıncılık Altıncı baskı, ISBN: 0-13-081626-4, Sayfa: 515-17.
- Koch A, Hrychuk A, Hartmann W, Waha A, Mikeska T, Schüller U, Sörensen N, Berthold F, Goodyer CG, Wiestler OD, Birchmeier W, Behrens J, Pietsch T., (2007). Mutations of the Wnt antagonist AXIN2 (Conduction) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas. *Int J Cancer* 121(2):284-91.
- Koch A, Weber N, Hartmann W, Waha A, Denkhaus D, Behrens J, Birchmeier W, von Schweinitz D, Pietsch T., (2004). Mutations and elevated transcriptional activity of Conduction (AXIN2) in hepatoblastomas. *J Pathol.* 204:546-554.
- Lee M, Wrensch M, Miike R., (1997). Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA). *Cancer Causes and Control* 8, 13–24.
- Leppä S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D., (1998). Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J.* 17(15):4404-13.
- Lonn S, Ahlbom A, Hall P, Feychting M., (2004). Mobile phone use and the risk of acoustic neuromas. *Epidemiology* 15:653–659.
- Lu Z, Cao Y, Wang Y, Zhang Q, Zhang X, Wang S, Li Y, Xie H, Jiao B, Zhang J., (2007). Polymorphisms in the matrix metalloproteinase-1, 3, and 9 promoters and susceptibility to adult astrocytoma in northern China. *J Neurooncol.* 85(1):65-73.
- Lusis E, Gutmann DH., (2004). Meningioma: an update. *Curr Opin Neurol* 17:687–692.
- Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö., (1995). *Renkli Genetik Atlası* ISBN: 975-420-035-1.
- Mai M, Qian C, Yokomizo A, et al. (1999). Cloning of the human homolog of conductin (AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23–q24. *Genomics* 5:341–4.

- Massagué J., (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-91.
- Minn Y, Wrensch M, Bondy ML., (2002). Epidemiology of primary brain tumors. In: Prados M, ed. *Atlas of Clinical Oncology: Brain Cancer*. Hamilton, Ontario: BC Decker 1–15.
- Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP., (2006). Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphism a risk factor for selective tooth agenesis. *J Hum Genet* 51:262-266.
- Mullis KB, Faloona FA., (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335–350.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA., (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51(Pt1):263– 273.
- National Cancer Institute (NCI) sitesi, (2009). U.S. National Institute of Health (Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü). www.cancer.gov.
- Pećina-Slaus N, Nikuseva Martić T, Tomas D, Beros V, Zeljko M, Cupić H., (2008). Meningiomas exhibit loss of heterozygosity of the APC gene. *J Neurooncol.* 87(1):63-70.
- Preston-Martin S, Mack W., (1996). Neoplasms of the nervous system. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press 1231–1281.
- Roth S, Johansson M, Loukola A, Peltomäki P, Järvinen H, Mecklin JP, Aaltonen LA., (2000). Mutation analysis of SMAD2, SMAD3, and SMAD4 genes in hereditary non-polyposis colorectal. *J Med Genet.* 37(4):298-300.
- Salahshor S, Woodgett JR., (2005). The link between axin and carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* 58: 225-236.
- Satoh S., (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature Genetics* 24, 245 – 250.
- Sav A., (2006). Beyin tümörlerinin tanı ve evrelemesinde genetik yöntemler. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 16, 2–5.
- Sawaya R. and Alfred Yung WK.,(2007). *Tumors Of The Brain And Spine*, Springer, 2-21.
- Schaeffer HJ, Weber MJ., (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 19(4):2435-44.
- Schulz W. A., (2005). *Molecular Biology of Human Cancers*. Springer, 383-402.
- Silvera SA, Miller AB, Rohan TE., (2006). Cigarette smoking and risk of glioma: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer* 118, 1848–51.
- Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG., (1999). Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990–1994. *Neurooncology* 1:14–25.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Kanseri Savaş Dairesi istatistikleri.
- Wiechens N, Heinle K, Englmeier L, et al., (2004). Nucleo–cytoplasmic shuttling of Axin, a negative regulator of the Wnt–beta-catenin pathway. *J Biol Chem* 279:5263–7.
- Williams JA., (2001) Single nucleotide polymorphisms, metabolic activation and environmental carcinogenesis: why molecular epidemiologists should think about enzyme expression. *Carcinogenesis* 22, 209–214.
- Wodarz A, Nusse R., (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:59-88.

- Wrensch M, Bondy ML, Wiencke J, et al., (1993). Environmental risk factors for primary malignant brain tumors: a review. *J Neurooncology* 17:47–64.
- Wrensch M, Lee M, Miike R, et al., (1997). Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *Am J Epidemiol* 145:581–593.
- Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS., (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neurooncology* 4:278–299.
- Wrensch M, Fisher JL, Schwartzbaum JA, Bondy M, Berger M, Aldape KD., (2005). The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurgical Focus* 19, 1–6.
- Yamamoto H, Kishida S, Uochi T, et al., (1998). Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Mol. Cell Biol.* 18, 2867–75.

EK-1
YEREL ETİK KURULU KARARI



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

SAYI : B.30.2.CUM.O.1H.00.00/
KONU :

09 / 12 / 2003

Karar No :4

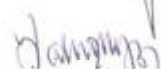
Etik Kurul Kararı : 2003 / 4

Yürütücülüğünü Yrd.Doç.Dr.Hatice PINARBAŞI'nın yapacağı ;
“ CYP2E1, CYP1A1 ve GST1'in genetik poliformizmi ile primer beyin tümörü riski arasındaki ilişkinin incelenmesi ”adlı Araştırma Görevlisi Dr.Yavuz SİLİĞ ve Yrd.Doç.Dr.Mustafa GÜRELİK' e ait Grup Projesinin Yerel Etik Kurul Kararında uygun olduğuna ;

Karar Verilmiştir.

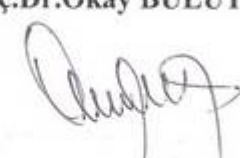

Prof.Dr.A.Oktay İŞİK

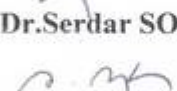

Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ


Prof.Dr.Fahrettin GÖZE


Prof.Dr.Öge ÇETİNKAYA


Doç.Dr.Tijen KAYA


Doç.Dr.Okay BULUT


Doç.Dr.Serdar SOYDAN

EK-2

HASTA VE SAĞLIKLI BİREYLERE AİT BİLGİ FORMU

No :		
Tarih :		
Adı Soyadı :		
Cinsiyeti :		
Adres :		
Tel Ev :		
Cep :		
Doğum yeri :		
Doğum tarihi :		
Dedelerinin Doğum yeri :		
Mesleği :		
Mesleğinin özellikleri		
Sigara :	Evet	Hayır
Ne kadar zamandır içiyor		
Günlük kaç tane içiyor		
Alkol	Evet	Hayır
Ne kadar zamandır içiyor		
Günlük ne kadar içiyor		
Histopatolojik Tanı		
Ailede Ca Hikayesi		

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine Gülşen GÜNEŞ
Doğum Yeri ve Yılı : Sivas -06.04.1981
Medeni Hali : Evli
İş Adresi : Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 58140 Sivas/Türkiye.
İş Telefonu : 0 (346) 219 10 10 – 1066
e-mail : eggunes@cumhuriyet.edu.tr

Öğrenim Durumu:

1998-2000: Atatürk Üni. Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya
Bölümü (Lisans)
2000-2002: Cumhuriyet Üni. Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya
Bölümü (Lisans)
2002-2004 G.O.P. Üni Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya
Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)
2006- 2009: C. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı (Yüksek Lisans).

Akademik Görevler:

2006- ... : C. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Araştırma Görevlisi