

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

**İNSAN Xq21-Yp11.2 LOKUSUNUN AKCİĞER KANSERİ
İLE İLGİSİ VE MOLEKÜLER ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVİLAY BARAK

Balıkesir, Ağustos-2009

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

İNSAN Xq21-Yp11.2 LOKUSUNUN AKCIĞER KANSERİ İLE İLGİSİ VE
MOLEKÜLER ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEVİLAY BARAK

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Sınav Tarihi: 20.08.2009

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yard.Doç.Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ-Danışman)

Balıkesir, Ağustos-2009

ÖZET

İNSAN Xq21-Yp11.2 LOKUSUNUN AKCİĞER KANSERİ İLE İLGİSİ VE MOLEKÜLER ANALİZİ

SEVİLAY AZPARLAK BARAK

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2009

Bu çalışmada insan cinsiyet kromozomlarında bulunan; biri X diğeri Y kromozomuna ait iki alelden oluşan bir lokusun polimorfizmiyle akciğer kanseri ilişkisi araştırılmış ve bu bölgenin moleküler analizi yapılmıştır.

İlk bulgulara göre, daha önce yapılmış bir çalışmada anlamlı ve şaşırtıcı derecede yüksek olan korelasyonun, bu çalışma kapsamında yapılan analizler sonucunda yüksek olmadığı ancak beklenmedik derecede değişken olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan DNA bölgesinin özellikle sağ ve sol kenarlarının çalışılan insan gruplarına göre oldukça farklı polimorfizme sahip olduğu tahmin edilmiş ve bu yüzden ilk çalışılan insan grubunda %100'e yakın başarı oranına sahip bir primer çifti optimize edilmiş olmasına rağmen daha sonraki çalışmalarda en az 4 primer çifti daha dizayn edilmiş ve kullanılmıştır. Bu anlamda oldukça ilginç olan bu DNA bölgesinin yaklaşık 250 nükleotit ilerisinde bir transpozonun bulunduğu yapılan biyoinformatik analiz sonucu ortaya çıkmış ve bu transpozon biyoinformatik yönden analiz edilmiştir.

Bu çalışmanın en önemli sonuçlarından birisi, iki farklı alelden oluşan bu lokusun, analiz edilen hiç bir bireyde kanserle korelasyon gösteren alel açısından homozigot durumda bulunmaması, dolayısıyla muhtemel bir letal genotipin tespit edilmiş olmasıdır. Bu tahminin testi için bu lokustaki her iki alel ayrı ayrı klonlanmış ve insan hücre hatlarına aktarılarak muhtemel promoter/enhanser potansiyelinin araştırılması için çalışmalar başlatılmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Xq21, Yp11.2, akciğer kanseri, tek nükleotit polimorfizmi, transpozon, letal genotip.

ABSTRACT

MOLECULAR ANALYSIS OF HUMAN Xq21-Yp11.2 LOCUS WITH REGARD TO POLYMORPHISM AND LUNG CANCER CORRELATION

SEVİLAY AZPARLAK BARAK

Bahkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Ms. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Ekrem DÜNDAR)

Bahkesir, 2009

In this study, polymorphism of human Xq21 / Yp11.2 locus was determined and a molecular analysis with regard to lung cancer was conducted.

A surprisingly high correlation between the polymorphism of this locus and lung cancer that was observed based on initial results, was disappeared when the subject group was expanded to different study groups. The left and right border of the DNA sequence was predicted to be highly polymorphic and hence a primer pair optimised with around 100% success did not work for different study groups. Therefore at least 4 more primer pairs were used to complete the polymorphism analysis of the aimed groups. About 250 nucleotides ahead of this highly unusual DNA sequence, a transposon was identified through bioinformatic analysis.

One of the most important results of this study was the absence of a homozygous genotype consisting of the cancer correlated allele, in all the individuals studied, which suggested a possible lethal genotype. To explore this possibility, both alleles of the locus were cloned, and investigations to test promoter / enhancer potentials of this sequence were started.

KEYWORDS: Xq21, Yp11.2, lung cancer, single nucleotide polymorphism, transposon, lethal genotype.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET..... | ii |
| ABSTRACT..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | iv |
| KISALTMALAR | viii |
| ŞEKİL LİSTESİ | viii |
| TABLolar LİSTESİ | ix |
| ÖNSÖZ | x |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Akciğer Kanseri..... | 1 |
| 1.2 Epidemiyoloji | 2 |
| 1.3 Akciğer Kanseri Ne Kadar Sıklıkta Ortaya Çıkar? | 3 |
| 1.4 Akciğer Kanserinden Korunma..... | 4 |
| 1.5 Akciğer Kanserinin Risk Faktörleri | 5 |
| 1.6 Sigara..... | 6 |
| 1.7 Endüstriyel ve Çevresel Maruziyet | 7 |
| 1.7.1 Meslek | 7 |
| 1.7.2 Radon | 8 |
| 1.7.3 Virüsler | 8 |
| 1.7.4 Skar Gelişimi – Fibrozis | 9 |
| 1.7.5 Beslenme | 9 |
| 1.7.6 Genetik Yatkınlık..... | 10 |
| 1.8 Akciğer Kanserinin Evrelendirilmesi | 10 |
| 1.9 Histopatolojik Sınıflama | 12 |
| 1.9.2 Bronkojenik karsinom..... | 13 |
| 1.9.3 Nöroendokrin Tümörler | 13 |
| 1.9.4 Diğer ve Mezenkimal Tümörler..... | 14 |
| 1.10 Akciğer Kanserinde Görülen Moleküler Anomaliler | 14 |

| | |
|---|----|
| 1.11 X-Y Kromozomları ve Kanser..... | 15 |
| 2 GEREÇ VE YÖNTEM | 21 |
| 2.1 Kullanılan Kimyasallar..... | 21 |
| 2.2 Kullanılan Örnekler..... | 21 |
| 2.3 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması..... | 21 |
| 2.4 Kandan Genomik DNA İzolasyonu | 22 |
| 2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)..... | 23 |
| 2.6 Primerlerin Dizaynı | 24 |
| 2.6.1 Primerlerin Kullanıma Hazırlanması | 24 |
| 2.6.2 Xq21 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları | 25 |
| 2.6.3 XY664 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları | 27 |
| 2.6.4 XY927 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları | 28 |
| 2.6.5 XY929 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları | 29 |
| 2.6.6 XY889 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları | 30 |
| 2.7 Agaroz Jel Elektroforezi..... | 30 |
| 2.7.1 PCR ürünlerinin agaroz jelden saflaştırılması | 31 |
| 2.8 Genotip Tespiti..... | 31 |
| 2.9 DNA Dizilerinin Biyoinformatik Analizi..... | 32 |
| 2.10 X ve Y Alellerinin Klonlama Çalışmaları | 33 |
| 2.10.1 Kompetan <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i> GM 2163) Hücrelerinin Hazırlanması..... | 33 |
| 2.10.2 Kompetan <i>E.coli</i> Hazırlarken Kullanılan Besi Ortamları..... | 33 |
| 2.10.2.1 Ampisilinli LB. Agar Hazırlanması | 33 |
| 2.10.2.2 Ampisilinli (Amp+) LB Hazırlanması..... | 34 |
| 2.10.2.3 Ampisilinsiz (Amp-) L.B. Hazırlanması | 34 |
| 2.11 Ligasyon..... | 34 |
| 2.12 Transformasyon..... | 35 |
| 2.13 Bakteri Stoklarının Saklanması | 36 |
| 2.14 Plazmit İzolasyonu | 36 |
| 2.15 Restriksiyon Endonükleaz (RE) Enzim Kesimi | 36 |
| 2.16 Promoter Analizi | 37 |
| 2.16.1 Kompetan <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i> DH5 α) Hücrelerinin Hazırlanması | 37 |
| 2.16.2 Ligasyon..... | 37 |
| 2.16.3 Transformasyon..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 3 BULGULAR..... | 39 |
| 3.1 PCR Sonuçları..... | 39 |
| 3.1.1 Xq21 Primeri ile Çoğaltılan PCR Sonuçları | 39 |
| 3.1.2 XY664 Primeri ile Çoğaltılan PCR Sonuçları | 40 |
| 3.1.3 XY927 Primer Seti ile Çoğaltılan PCR Sonuçları | 40 |
| 3.1.4 XY929 Primer Seti ile Çoğaltılan PCR Sonuçları | 41 |
| 3.1.5 XY889 Primer Seti ile Çoğaltılan PCR Sonuçları | 41 |
| 3.2 Biyoinformatik Analiz..... | 48 |
| 3.2.1 DNA dizileme..... | 48 |
| 3.2.2 Genotip tespiti..... | 48 |
| 4 TARTIŞMA | 58 |
| 5 KAYNAKLAR..... | 64 |

KISALTMALAR

Kısaltma

bp
DNA
dNTP
E.coli
EDTA
EtBr
GAPDH
gDNA
Kb
MSY

NRY

PAR

PCR
SDS
SNP

Taq
TBE
TE
U
UV
Xq21
Yp11.2

Açıklama

Base pair (Baz çifti)
Deoksiribonükleik asit
Deoksiribonükleosid trifosfat
Escherichia coli
Etilendiamintetrasetik asit
Etidyum bromür
Gliseraldehit 3- fosfatazdehidrogen
Genomik DNA
Kilobaz
Male-Specific Region of the Y
Y 'nin Erkek Özgül Bölgesi
Non-Recombining Region
Rekombine Olmayan Bölge
Pseudo Auotosomol Region
(Yalancı Otozomal Bölge)
Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Sodyum dodesi sülfat
Single Nucleotide Polymorphism
(Tek Nükleotit Polimorfizmi)
Thermus aquaticus
Tris borat etilendiamintetraasetik
Tris-EDTA
Enzim Ünitesi
Ultra-viole
X kromozomunun 21 nolu bölgesi
Y kromozomunun 11.2 nolu bölgesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1 Akciğer kanserinin oluşumunda rol alan faktörler..... | 6 |
| Şekil 2.1. DNA dizileme kromatogramlarında heterozigot noktalara ait eğrilerin görünümü. | 32 |
| Şekil 2.2. Klonlama çalışmasında kullanılan pJET 1.2 blunt vektör haritası | 35 |
| Şekil 2.3. PGL2 Basic vektör haritası | 38 |
| Şekil 3.1. Çalışılan DNA bölgesini çoğaltmak için dizayn edilen primerlerin dizi üzerindeki yerleri | 40 |
| Şekil 3.2. XY664 primerleri ile yapılan PCR sonuçları..... | 40 |
| Şekil 3.3. Sağlıklı bireylerde XY927 primeri ile yapılan PCR sonuçları | 41 |
| Şekil 3.4. Sağlıklı bireylerde XY927 primeri ile yapılan PCR sonuçları | 41 |
| Şekil 3.5. XY889 primer setinin çalışılan DNA bölgesi üzerindeki yeri..... | 42 |
| Şekil 3.6. Sağlıklı bireylerde XY889 primeri ile yapılan PCR sonuçları | 42 |
| Şekil 3.7. Kanserli bireylerde XY889 primeri ile yapılan PCR sonuçları | 43 |
| Şekil 3.8. DNA bölgesinde bulunan 7 SNP | 49 |
| Şekil 3.9 kanserli ve sağlıklı bireylerde (G/T) polimorfizminin kromotogram sonucu..... | 49 |
| Şekil 3.10. Çalışılan haplotipin T alelinin bütün dizilerin değerlendirilmesiyle elde edilen sağlıklı ve kanserli hastalarda bulunma sıklığı. | 50 |
| Şekil 3.11. Polimorfizmi çalışılan dizideki SNP bölgeleri ve bu bölgelerde bulunan düzenleyici elementler. | 51 |
| Şekil 3.12. Genel tarama sonucu çalışılan DNA bölgesi ve kısa DNA dizilerin dağılımı | 52 |
| Şekil 3.13. NCBI Genome View grafiği üzerinde kısa DNA dizilerin yerleri | 53 |
| Şekil 3.14. AT dinükleotit tekrarları | 54 |
| Şekil 3.15 NCBI ORF Finder blast analizi sonucu..... | 55 |
| Şekil 3.16. Muhtemel transpozon dizisi..... | 55 |
| Şekil 3.17. Muhtemel transpozonun tekrarlı DNA veri tabanında yapılan blast analiz sonuçları..... | 56 |

TABLULAR LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 2.1. Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları ... | 23 |
| Tablo 2.2. PCR Döngü Koşulları | 24 |
| Tablo 2.3. Xq21 primerinin nükleotit dizileri, molarite ve çalışma solüsyon hesapları | 25 |
| Tablo 2.4. Protokol 1 için PCR Komponentleri ve Konsantrasyonları..... | 26 |
| Tablo 2.5. Protokol 2 için PCR Komponentleri ve Konsantrasyonları..... | 26 |
| Tablo 2.6. Protokol 3 için PCR Komponentleri ve Konsantrasyonları..... | 27 |
| Tablo 2.7. XY664 primerinin nükleotid dizileri, molaritesi ve çalışma solüsyon hesapları | 28 |
| Tablo 2.8. Protokol 1, 2 ve 3 için PCR Komponentleri ve Konsantrasyonları | 28 |
| Tablo 2.9. XY927 primerinin nükleotit dizileri, molaritesi ve çalışma solüsyon hesapları | 29 |
| Tablo 2.10. XY929 Primerinin Nükleotit Dizileri, Molaritesi ve Çalışma Solüsyon Hesapları | 29 |
| Tablo 2.11. XY889 primerinin nükleotit dizileri, molaritesi ve çalışma solüsyon hesapları | 30 |
| Tablo 2.12. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı | 31 |
| Tablo 2.13. Yapışkan uçlu ligasyon için reaksiyon bileşenleri ve miktarları | 35 |
| Tablo 2.14. Restriksiyon Endonükleaz enzim kesim reaksiyon bileşenleri ve miktarları..... | 37 |
| Tablo 2.15. Küt Uçlu Ligasyon İçin Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları | 38 |
| Tablo 3.1. Hasta bireylerde uygulanan primer setleriyle elde edilen PCR sonuçları..... | 44 |
| Tablo3.2. Sağlıklı bireylerde uygulanan primer setleriyle elde edilen PCR sonuçları..... | 46 |
| Tablo 3.3. Tekrarlayan DNA veritabanında blast analiz sonuçları | 54 |

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimi süresince daima eğitici, öğretici, yol gösterici olup hiçbir zaman hoşgörüsünü esirgemeyen, çalışma etiğini örnek aldığım ve yetişmemde büyük emeği geçen tez danışmanım, Saygıdeğer Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a şükranlarımı bir borç bilirim.

Eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, fikirleriyle bana güç veren, içten tutum ve davranışları ile rehber olan değerli hocalarım Doç. Dr. Feray KÖÇKAR başta olmak üzere Araş. Gör. Hatice YILDIRIM'a, Araş. Gör. Sümeyye AYDOĞAN'a

Çalışmalarımın deneysel kısmını gerçekleştirdiğim, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde çalışmamda katkıları bulunan başta merkez müdürü Prof. Dr. Gülendam TÜMEN'e ve tüm personeline,

Yogun çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, beni destekleyen ve aynı çalışma grubunda yer almaktan mutlu olduğum canım arkadaşlarım Öznur SUAKAR'a, Evrim ÇELEBİ'ye Şakir Akgün'e, Araş. Gör. Görkem DENİZ'e,

Kısa zamanda hayata dair çok şeyi paylaştığım haftanın 7 günü istesemde istemesemde hep birlikte olduğum canlarım Feyzullah TOKAY ve Esra SOLMAZ'a,

Hayatımın zorlu dönemlerinde her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım, sevgilerini esirgemeyen başta Ayşe SERTKAYA olmak üzere SERTKAYA ve KOYLAN ailelerine,

Beni bugünlere getiren, güçlü karakteri ile örnek aldığım, bir parçamı sürekli yanında hissettiğim, varolma sebebim canım ANNEM'e,

Çalışmalarım boyunca sabrı ve anlayışı ile beni yalnız bırakmayan eşim Cihan BARAK'a,

En içten sevgi ve saygılarımı sunarım,

Sizleri çok seviyorum...

Sevilay AZPARLAK BARAK

Balıkesir, 2009

1.GİRİŞ

1.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, akciğer dokusunun malignant transformasyonu (kötücül değişime uğraması) ve yayılması (metastaz) nedeniyle oluşan kanser türüdür. Yapısal olarak normal akciğer dokusundan olan hücrelerin kontrol dışı çoğalarak akciğer içinde bir kitle (tümör) oluşturmasıdır. Bu kontrolsüz çoğalma, hücrelerin çevredeki dokuları istila etmeleri veya akciğer dışındaki organlara yayılmaları ile sonuçlanabilmektedir.

Akciğer kanseri, kanser ölümleri arasında en sık görülen ve en fazla ölüm oranı olan kanser türüdür [1]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür [2] ve tüm dünyada her yıl yaklaşık 1.3 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır [3].

Ölüm oranı oldukça yüksek olan bu kanser türünde vakaların % 85'inin sigara kullanmış ya da kullanmakta olan bireylerde ortaya çıktığı göz önüne alınarak sigara kullanımının akciğer kanseri gelişiminde en büyük etken olduğu bilinmektedir [4]. Akciğer kanserinin en sık nedeni uzun süreli olarak tütün dumanına maruz kalmakla beraber [5], tüm akciğer kanserli hastaların %15'e ulaşan bir oranı sigara içmeyenlerden oluşmaktadır [6]. Akciğer kanseri birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu nedenler arasında genetik faktörler [7, 8], radon gazı [7], asbest [8] ve hava kirliliği [8, 9], yaş-cinsiyet-ırk ve coğrafi dağılım [10] gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır.

Akciğer kanserinin birçok histolojik alt tipi olmasına karşın, klinikte genellikle *küçük hücreli* ve *küçük hücreli dışı* akciğer kanseri olmak üzere iki başlıkta incelenir, çünkü tedavide izlenecek yolu bu gruplandırma belirler. Küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi tercih edilirken, küçük hücreli dışı kanserlerde ilk tercih cerrahidir [11].

Diğer kanser türlerine kıyasla akciğer kanserinin prognozu kötüdür. Akciğer kanserinin görülme oranı yaşla artar, genelde 50-70 yaşlarında görülür [12, 13]. Akciğer kanserinin erken evrelerinde beş yıllık sağ kalım %60 - 70 iken, ileri evre olgularda bu oran %5'in altına düşmektedir. Tüm alt tipler ve evreler göz önüne alındığında, tedavi ile beş yıllık sağ kalım oranı %14'tür [14].

1.2 Epidemiyoloji

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalıkken, sigara kullanımındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve günümüzde en sık görülen kanser tipi haline gelmiştir [15]. ABD'de 1290'da 956 akciğer kanseri vakası bildirilmişken, 1950 yılına gelindiğinde artık önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmeye başlanmıştır [16].

Sigara içiciliğinin yaygınlaşmasından önce oldukça nadir görülen bir hastalık olan akciğer kanseri doğru dürüst tanınan bir hastalık değildi. 1878 yılında otopsi materyallerinde yapılan bir çalışmada, tüm kanser türleri içinde kötü huylu (malign) akciğer kanseri vakaların sadece %1'ini oluşturmuş, fakat 1900'lerin başında %10-15'lere yükselmiştir [17]. 1912 yılında dünya çapında tıbbi literatüre geçen sadece 374 vaka vardır [18, 19]. Otopsi raporlarının derlenmesi yoluyla yapılan bir gözden geçirmede akciğer kanseri vakaları 1852'de %0.3 iken, 1952'de %5.66'ya yükseldiği gözlemlenmiştir [20].

Akciğer kanseri, günümüzde her iki cinsiyette de kanserden ölümlerin başında yer almaktadır. Erkeklerde akciğer kanseri riski kadınlardan yüksektir ancak 1950'den itibaren kadınlarda görülme riski %500 artmıştır [21]. Ulusal Halk Sağlığı tarafından sigaraya karşı yürütülen kampanyaların başlamasıyla akciğer kanseri vakalarında azalma olmuştur. Özellikle genç nesilde sigara kullanımının az olması

sayesinde ABD'de 1980'lerde erkeklerde 87/100000 olan vaka, 1991'de 80/100000'e düşmüştür [16]. Ancak gelişmekte olan ülkelerde her yaş grubunda akciğer kanseri oranı artmaya devam etmektedir. Dünyada 1975-1990 yılları arasında akciğer kanseri vakalarında ölüm oranı erkeklerde %66, kadınlarda %110 artmıştır [22]. Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'da erkeklerde kanser 1980'lerde doruğa ulaşmış ve o zamandan itibaren azalmaktadır. Buna karşın Doğu ve Güney Avrupa ülkelerinde, Japonya ve Çin'de ve çoğu gelişmiş ülkedeki kadınlarda vakalar artmakta veya daha yeni yavaşlamaktadır. Gelişmekte olan ülkelere ait veriler seyrek olmakla beraber Asya, Afrika ve Latin Amerika ülkelerinde artmaya devam etmesi beklenmektedir [23].

Akciğer kanserinin gelişiminde %90 oranında sorumlu olan sigaranın [13, 24] 1929 yılında Almanya 'da Fritz Lickint adındaki bir hekim, akciğer kanseri ve sigara arasında bir ilişki olduğunu ilk kez öne sürmüştür [17]. 1950'lerde yayınlanan İngiliz doktorların bir çalışması ile akciğer kanseri ve sigara arasındaki ilişki ilk kez epidemiyolojik verilerle kanıtlanmıştır [25]. Bunların sonucunda 1964 yılında Birleşik Devletler Askeri Başhekimisi (*Surgeon General of the United States*) tarafından sigara içicilerine sigarayı bırakmaları gerektiği önerilmiştir [26].

Akciğer kanseri için ilk başarılı pnömonektomi 1933 [27] yılında gerçekleştirilmiştir ve pnömonektomi cerrahi tedavi seçeneği olarak kullanılmaya başlanmıştır [28]. Bununla beraber kanser evrelendirmesi ve cerrahi tekniklerdeki gelişmelerle, lenf nodu diseksiyonu ile beraber lobektomi bugün için daha iyi bir tedavi seçeneğidir [29, 30].

1.3 Akciğer Kanseri Ne Kadar Sıklıkta Ortaya Çıkar?

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalıkken, sigara kullanımındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve günümüzde en sık görülen kanser tipi haline gelmiştir [15]. Tüm kanser türleri arasında en ölümcül kanser türü olan akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür [1]. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 1.3 milyon ölüme neden olmaktadır [3]. Bununla beraber

ABD'de hem kadın hem de erkeklerde ölüme sebep olan kanser türleri arasında 1. Sıradadır [31].

Kanser ölümlerinin başında gelen akciğer kanseri [32], ABD 'de kadınlarda meme kanseri, yumurtalık ve yumurtalık tüpü kanseri toplamından daha yaygındır [33].

Ölüm oranı oldukça yüksek olan bu kanser türünde dünya genelinde sigara içme alışkanlıklarındaki değişmeye bağlı olarak histolojik alt tiplerinin oranında değişiklik yaşanmış ve sigara kullanımının zamanla artmasının sonucunda kadınlarda görülme sıklığında artma gözlenmiştir [34]. Tarihsel olarak çoğunlukla erkeklerde görülen bu kanser türü zaman içinde meydana gelen sosyolojik değişiklikler sonucunda, kadınların da sigara kullanma alışkanlıklarının artması sonucunda kadınlarda bu kanser türünün görülme sıklığı artmıştır [33].

Gelişmiş ülkelerde önceleri kanserden ölümlerin %34'ünden akciğer kanserleri sorumlu iken, günümüzde %28'inden sorumludur. Bu azalmaların nedeni gelişmiş ülkelerde sigara kullanımında belirgin azalma ve sigara içeriğinde yapılan değişikliklere bağlanmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde sigara kullanımında azalma olmaması bilakis artması sonucunda hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanser ölümleri içinde önemli yerini korumakta ve belirgin artış gözlenmektedir [35].

Türkiye'de akciğer kanserinden ölüm oranı kesin olarak bilinmemekle beraber, her yıl tütün ile ilgili hastalıklardan 35000 kişinin kaybedildiği düşünülürse, yaklaşık 25000 kişinin akciğer kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir [36].

1.4 Akciğer Kanserinden Korunma

Tütün ürünlerinin içilmesinin sona erdirilmesi akciğer kanserine karşı mücadelenin en başta gelen amacıdır, sigarayı bırakma da bu süreçte önemli bir koruyucu önlemdir. Gençleri hedefleyici koruyucu programlar bu girişimlerde özellikle çok önemlidir [37].

Kamusal mekanlarda (lokanta ve işyerleri gibi) pasif sigara içiciliğini azaltmayı amaçlayan politik müdahaleler çoğu Batı ülkelerinde sıkça uygulanmıştır. Bu yönde ilk adımı 1998'de kamu alanlarında sigara içimini yasaklayan ABD'deki Kaliforniya eyaleti atmıştır. AB ülkeleri arasında da 2004'te İrlanda bu yönde ilk harekete geçmiştir. Türkiye'de devlet dairelerinde sigara içimi 1997'de yasaklanmış, 2008'de ise tüm kapalı mekanlarda (bar, kahve ve lokantalar için kanun 2009 Haziran'ından sonra uygulamaya girdi) ve bazı açık mekanlarda (cami, hastane bahçeleri, stadyumlar) yasaklandı. Butan'da 2005 yılından beri sigara içmek tamamen yasaklanmıştır [38].

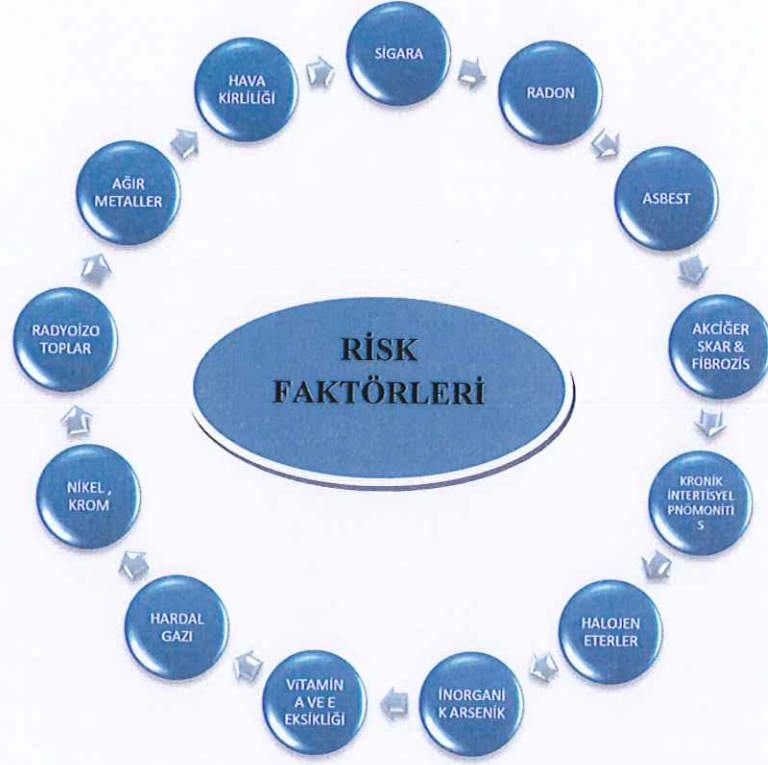
Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO), gençlerin sigaraya başlamasının önüne geçmek için tüm ülkelerde sigara reklamlarının yasaklanması için çağrıda bulunmuştur. WHO, bu tür yasaklamaların uygulamaya girdiği yerlerde tütün kullanımının %16 azaldığını belirlemiştir [39].

1998'de ABD'de 46 eyalet, sigara içen kişilere sağladıkları sağlık hizmetlerinin bedelini, dört büyük ABD sigara şirketlerine ödetmek için açtıkları davanın karar aşamasından önce taraflar arasında anlaşmaya varıldı [40]. Anlaşma sonucunda, sigara şirketlerinden şikayetçi olunmayacak ve bu şirketler gelecekte tütün kullanımından kaynaklanan tazminat davalarından muafiyet elde edeceklerdir. Buna karşın sigara şirketleri pazarlama etkinliklerini sınırlamayı kabul ettiler ve bu 46 eyalete yıllık bir ödeme yapmayı kabul ettiler. *ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Center for Disease Control and Prevention, CDC)* toplanan bu fonların %15'inin sigara içimiyle ilişkili hastalıklara karşı koruyucu sağlık harcamalarına ayrılmasını önermişse de, çoğu eyalet bu oranın çok altında para harcamaktadır [40].

1.5 Akciğer Kanserinin Risk Faktörleri

Sigara içiminden başka kanser riskini arttıran etmenler de vardır. Endüstriyel ürünler (uranyum, radyasyon, asbest), hava kirliliği, beslenme eksiklikleri kanserin oluşmasında rol alan faktörlerdendir [41]. Son araştırmaların ışığında, akciğer kanseri riskini arttıran en önemli faktör kanserojen maddelerin uzun süre boyunca

solunumundan kaynaklanmaktadır. Akciğer kanserinin oluşumunda rol alan faktörler Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Akciğer kanserinin oluşumunda rol alan faktörler [41]

1.6 Sigara

Akciğer kanseri gelişiminden %90 oranında sigara sorumludur. Sigara içenlerde akciğer kanseri riski içmeyenlerden 24-36 kat daha fazladır. Bununla beraber akciğer kanseri, sigara içmeyenlerde de görülebilmektedir. Pasif sigara içiminde risk %3.5'tur [42]. Türkiye'de sigara içme oranı kadınlarda %24, erkeklerde %63'tür [42]. Akciğer kanserli erkeklerin %10 ve kadınların ise %20-25'inde gelişen kanser sigara ile ilişkili değildir [43].

Gelişmiş ülkelerde sigara içme oranı kadınlarda %20-40, erkeklerde %30-40 iken gelişmekte olan ülkelerde bu oranlar sırasıyla %2-10 ve %40-60'tır [44]. Türkiye'de yapılan çalışmalarda akciğer kanserli kadınların %17'sinin, erkeklerin ise %94'ünün sigara içtikleri bildirilmiştir [35]. Pasif sigara içiciliği (sigara içilen ortamda bulunularak sigara dumanına maruz kalma) de sigara kullanmak gibi akciğer kanseri açısından risk faktörüdür.

Kanser gelişme riski; sigara içme süresi, günde içilen sigara sayısı, erken başlama yaşı, derin çekme (inhalasyon), katran ("tar") miktarı ile artar, kullanımı kesme süresi ile azalır [35, 45]. Bayanlara kıyasla erkekler, sigara içmeye daha erken yaşta başlamakta, daha çok ve daha uzun süre sigara kullanmakta, dumanı daha derin çekmekte ve daha katranlı sigara satın almaktadırlar [42]. Sigara içicilerinde akciğer kanserine yakalanma riski, sigara içiminin süresine ve bir günde içilen sigara sayısına bağlı olarak değişebilmektedir [4]. Sigara kullanımı özellikle yılda 20 paketi geçtikten sonra göreceli risk belirgin olarak artış gösterir. Sigara dışında puro içenlerde risk 3 kat, pipo kullananlarda ise 8 kat artmaktadır. Filtreli ya da düşük katran içeren "*light*" sigaraları içenlerde kanser riski azalmamaktadır [45]. Sigara ve diğer tütün ürünlerinin kullanım miktarı ve süresi arttıkça akciğer kanseri (ve başka kanserlerin) gelişme ihtimali artmakta, bırakılması durumunda da zamanla azalmaktadır. Akciğer kanseri gelişme riski sigarayı bırakmayı takiben 10-20 yıl içinde hiç içmeyenlerin düzeyine yaklaşmaktadır [35].

1.7 Endüstriyel ve Çevresel Maruziyet

1.7.1 Meslek

Endüstri ve madencilik gibi bazı mesleklerde (gemi yapımı, yapı malzemeleri, çanak-çömlek, matbaa) çalışanlarda akciğer kanseri daha sık görülmektedir. Başlıca mesleki karsinojenler arasında; asbest, arsenik, alüminyum, bis – krometil eter, krom, hidrokarbonlar (polisiklik aromatik karbonlar gibi), hardal gazı, nikel ve nikel bileşenleri, radyasyon, radon, vinil, klorid, berilyum, kadmiyum ve formaldehit sayılabilir [35, 45]. Dünyada yaygın olarak bulunan (tremolit içeren ak toprak ve zeolit) ve geniş endüstriyel kullanımı olan (gemi, izolasyon, otomotiv

sanayi gibi) asbest bunların en önemlisidir ve başta mezotelyoma olmak üzere akciğer kanserlerine neden olabilmektedir [46]. Asbest işçilerinde akciğer kanseri riski 6-10 kat, sigara içen işçilerde ise 50-100 kat artmaktadır [47]. İngiltere'de, asbest akciğer kanserinden ölen erkeklerin %2-3'ünün sorumlusudur [48].

Sigara dumanı kanser oluşumu sürecinde çevre kirliliği maddeleri ile etkileşmektedir. Bu durum sigara içen uranyum ve asbest işçilerinde çarpıcı bir şekilde izlenir. Öyle ki; akciğer kanseri riski, sigara içen asbest işçilerinde 92 kat, sigara içmeyen asbest işçilerinde sadece 5 kat fazladır [35].

1.7.2 Radon

Radon, toprakta doğal olarak bulunan, kokusuz radyoaktif bir gazdır ve Uranyumun parçalanma ürünüdür [49]. Radon gazı, ABD'de akciğer kanserinin ikinci en sık (%10) nedenidir ve her yıl 6000-360000 akciğer kanserli kişinin ölümünden sorumludur. Solukla alındığında radon gazı akciğer epiteli veya diğer hücreleri ile etkileşip kansere neden olur. Toprakta doğal olarak bulunur ve iyi havalandırılmayan ev ve işyerlerinin altındaki topraktaki miktarına bağlı olarak kapalı mekandaki havadaki radon miktarı yüksek olabilir. Üst sınır 4 pCi/L olup 8 pCi/L'nin üstüne çıktığında kanser riski artmaktadır. Yoğun radon etkisi altında kanser riski 20 kat artmaktadır. Sigara ile radonun etkileşimi sinerjiktir ve kanser riski 1.3-1.8 oranındadır [50]. Zemin kat eski binalarda yaşayanlarda sık rastlanır, bu nedenle metro ve tünel işçileri gibi meslek gruplarında risk taşır.

1.7.3 Virüsler

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda virüslerin akciğer kanserine yol açabildiği gösterilmiştir [43, 51]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, insanlarda da virüslerin akciğer kanseri için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda risk faktörü olduğu ileri sürülen virüsler arasında; İnsan papilloma virüs [52], John Cunningham virüs [53], simian virüs 40 ve sitomegalovirüs [54] sayılabilir.

1.7.4 Skar Gelişimi – Fibrozis

Silisyum maruziyeti ile ortaya çıkan silikozis gibi akciğer hastalıkları ve akciğer dokusunda fibrosiz ile seyreden hastalıklar yara izi dokusunun kanserojen etkisi nedeniyle tümör oluşturma ihtimalini arttırır [45]. Akciğer skar alanlarında ve yaygın akciğer fibrozisi olan hastalarda akciğer kanseri geliştiği bildirilmiştir. Skar yakınında mikroskopik olarak epitelyal dokuda aşırı büyüme saptanmıştır. Skar zemininde kanser gelişiminin süreci henüz tam olarak bilinmemektedir. Skar ve fibrozis sonucu gelişen damarlaşma eksikliği ve dokuda oksijen yetersizliği epitelyum metaplazisine yol açtığı ve kanser oluşumunu hazırladığı düşünülmektedir. Skar alanlarında yüksek akciğer adenokarsinomi vakaları bildirilmiştir. Çalışmalarda akciğer kanserinin sarkoidozlu hastalarda 3 kat fazla geliştiği, tüberkülozlu hastalarda üst loblarda kanserin de birlikte bulunabildiği ve yaklaşık 8 kat fazla görüldüğü [50], bronşiolo-alveoler tip kanserlerin aileden gelme kistik akciğer hastalığı ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir [35].

1.7.5 Beslenme

Akciğer kanserinde beslenmenin etkili olduğu ileri sürülmektedir. Birçok epidemiyolojik çalışmada besinle sebze alımının akciğer ve diğer kanser risklerini orta derecede düşürdüğü gösterilmiştir. Bunları takip eden araştırmalarda retinol veya vitamin A içeren retinoidlerin öncülü olan beta karoten, akciğer kanseri riskini düşürmektedir [50]. Sigara içenlerde serum beta karoten düzeyleri, içmeyenlerden düşük bulunmuştur. Bu düşüklük, beta karotenlerin, sigaranın absorpsiyon ve metabolizma üzerindeki etkisi nedeniyle diyetle daha düşük alımına bağlanmıştır. Retinoidlerin birçok çalışmada antikarsinojenik etkileri gösterilmiştir. Ayrıca vitamin A eksikliği solunum sistemi epitelinde, skuamöz metaplaziye neden olmaktadır. Yani normaldeki solunum sistemini döşeyen epitel hücreleri özelliklerini kaybedip yassı hücrelere dönüşür. Vitamin A fakiri diyetle beslenenlerde, vitamin A zengini beslenenlere kıyasla akciğer kanser riski 4.6 kat daha fazla bulunmuştur. Vitamin C ve selenyum eksikliği, siyah çay ve kolesterol de sorumlu tutulmuştur. Bunun yanı sıra yeşil çay tüketimi de koruyucu etki gösterir [50].

1.7.6 Genetik Yatkınlık

Akciğer kanserinin dünyada farklılıklar göstermesi sigara kullanımının tek başına etkili olmadığını, genetik özelliklerin de akciğer kanserinde etkin olduğunu göstermektedir [21]. Ailesinde öyküsü olan kişilerde yaş, cinsiyet, sigara ve çevresel maruziyet ile ilgili düzeltmeler yapıldıktan sonra akciğer kanseri riski aile öyküsü olmayan kişilere göre 1.3 – 7.2 kat daha fazla bulunmuştur [55]. Birinci derece akrabalarında akciğer kanseri olan kişilerde kanser geliştirme riski 2-4 kat artmaktadır. Aile öyküsünde akciğer kanseri bulunan kadınlarda risk 5-7 kat artmaktadır. Aile öyküsünde akciğer kanseri bulunmasının yanında sigara içme öyküsü de varsa risk 30 kat artmakta, aile öyküsü olmaksızın sadece sigara öyküsü varsa 15 kata kadar artmaktadır [35]. Ancak bunun tamamen genetik faktörlere bağlı olmadığı, akrabaların aynı ortamda bulunmasının da etkisi olduğu düşünülmektedir.

Kronik karsinojen maruziyeti sonucunda genetik yapıda hasar oluşmaktadır. Hücreyi kanserleşmeye götüren hasarın temelinde hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki değişiklik yatar. Ailesel yatkınlığa neden olan genetik değişiklikler özellikle kanserojenlerin aktivasyonunda ve detoksifikasyonunda rol alan enzimlerden sorumlu olan genlerde ortaya çıkmaktadır [56, 57]. Ancak akciğer kanserine neden olabilecek herhangi bir gen ortaklığı tespit edilememiştir [58].

1.8 Akciğer Kanserinin Evrelendirilmesi

Kanserli hastaların tedavilerini planlayabilmek için hastaların prognoz özelliklerine göre gruplandırılmasına gerek duyulmuştur ve bunun sonucunda bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. Akciğer kanseri için birincil tümörün büyüklüğü ve yayımına, bölgesel lenf bezi tutulumuna, uzak metastaz varlığına dayanan TNM evrelendirmesi yapılmıştır [59]. Sonraki yıllarda daha sağlıklı evrelendirme yapabilmek amacıyla TNM sisteminin yeniden geliştirilmesi ile skuamöz, büyük hücreli ve adenokarsinomlu (Küçük hücreli dışı, *Non-small cell*, NSCLC) hastalar yapılacak tedavi ve prognoz yönünden Evre IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ve IV şeklinde sınıflandırılmaktadır. Küçük hücreli kanserli hastalarda TNM sistemi yerine VALG (*Veterans Administration Lung Cancer Group*) tarafından önerilen evreleme sistemi kullanılmaktadır. Buna göre hastalığın konumu göğüs kafesinin

yanısında (bir hemitoraksta) ise "sınırlı" ve hemitoraksın dışında daha yaygın ise "yaygın" olarak evrelendirilmektedir. Bununla beraber TNM evreleme sistemi küçük hücreli hastalarda da kullanılabilir [35].

Akciğer kanserlerinde evreleme [35]

- **Evre 1:** Tümör, sadece akciğerin küçük bir bölümünde görülme halidir.
 - Evre 1A: Kanser sadece bir akciğerdedir.
 - Evre 1B: Kanser ya (a) akciğer içinde büyür, ya (b) akciğerin ana bronşa yayılır, ya da (c) akciğeri kaplayan plevranın iç tabakasına yayılır.
- **Evre 2:** Hastalık, en yakın lenf bezelerine atlamış durumdadır.
 - Evre 2A: Kanser, göğüste bulunduğu taraftaki lenf bezlerine yayılır
 - Evre 2B:Kanser ya Evre 1B'deki gibidir ve aynı taraftaki lenf bezlerine yayılmıştır veya kanser lenf bezlerine yayılmamıştır ama şunlardan bir veya daha fazlasına yayılmıştır: (a) Göğüs duvarına (b)Diyaframa, veya (c) akciğerler arasındaki plevraya, (d) kalbin etrafındaki zara ve/veya (e) ana bronşa.
- **Evre 3:** Tümör, plevra veya iki akciğer arasındaki mediasten deneni boşluğa veya buradaki bezelere yayılmışsa bu durum 3. evredir.
 - Evre 3A: Kanser kendisiyle aynı taraftaki lenf bezlerine yayılmıştır. Ayrıca şunlardan bir veya daha fazlasına da yayılmış olabilir: (a) Göğüs duvarına (b) Diyaframa, veya (c) akciğerler arasındaki plevraya , (d) kalbin etrafındaki zara (perikardium) ve/veya (e) ana bronşa.
 - Evre 3B: Kanser köprücük kemiğinin üstündeki lenf bezlerine veya göğsün karşı tarafındaki lenf bezlerine yayılmıştır ve,veya şunlardan biri veya daha fazlasına yayılmıştır: (b kalbe , (c) aşağı vena kava ve aorta , (d) göğüs duvarına, (e) diyaframa , (f)trakeaya, (g) sternum ve yutağa. Kanser ayrıca plevra tabakaları arasındaki sıvıya da yayılmış olabilir.
- **Evre 4:** Karaciğer, kemik, böbrek üstü bezi gibi uzak organlara yayılmış durumudur.

1.9 Histopatolojik Sınıflama

Epitel hücrelerden köken alan tümörlere karsinom denilmektedir. Akciğer kanserlerinin büyük bir çoğunluğu karsinomdur. Akciğer karsinomları iki ana gruba ayrılır: *küçük hücreli dışı* (%80.4) ve *küçük hücreli* (%16.8) [60]. Histolojik kriterleri baz alan bu sınıflama, klinik yaklaşım ve hastalığın prognozu açısından önemlidir. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının tek bir grupta toplanmasının nedeni, bu gruptaki karsinom tiplerinin prognozlar ve tedavi yaklaşımlarının benzer olmasıdır. Başlıca üç alt tipi şunlardır: *Skvamöz hücreli karsinom*, *adenokarsinom* ve *büyük hücreli karsinom*.

Birincil akciğer kanserinde tümör tipinin bilinmesi tedavi yönteminin seçilmesi ve prognoz açısından önemlidir [61]. Erkeklerde en sık epidermoid kanser (skvamöz hücreli karsinom) görülürken, kadınlarda en sık görülen tümör adenokarsinomdur [62]. Adenokarsinom daha çok çevresel yerleşimlidir. Skvamöz hücreli karsinom ise tipik olarak santral bronş yerleşimli olduğu için hilus ve mediasten civarında izlenir. Büyük hücreli karsinom genellikle periferik yerleşimlidir. Küçük hücreli karsinom, proksimal hava yollarındaki yerleşimi ile yine hilus ve mediasten bölgesinde yerleşir ve olguların %78'inde santral yerleşimli radyolojik lezyon ile karşımıza çıkar [63]. Santral tümörler sıklıkla küçük hücreli veya skvamöz hücreli, periferik tümörler ise adenokarsinom veya büyük hücreli tiptedir [35].

Akciğer kanser tipleri [35]

- Bronkojenik karsinom %90-95
- Nöroendokrin tümörler %5
- Mezenkimal tümörler %2
- Metastatik tümörler

1.9.2 Bronkojenik karsinom

Bronkojenik karsinom, bronş epitelinden kaynaklanır. Her iki cinste de en ölümcül malignitedir. Erkeklerde daha sık görülmektedir. 4 alt tipi vardır. Bunlar *Skvamöz hücreli karsinom*, *Adenokarsinom*, *Küçük hücreli karsinom* ve *Büyük hücreli karsinom* 'dur:

- **Skvamöz Hücreli Karsinom:** Erkeklerde daha sık görülür. Sigara kullanımı ile yakın ilişkilidir. Büyük boyutta, merkezî (santral) yerleşimlidir. Metastaz biraz geç olur.
- **Adenokarsinom:** Kadınlarda ve sigara içmeyenlerde daha sık görülen tiptir. Daha küçük boyutta ve periferal yerleşimlidir. Spesifiye edilemeyen ve bronkioalveolar alt tipleri vardır.
 - **Bronkioalveolar Karsinom:** Tümör hücreleri alveolar septayı döşer, temel alveolar yapı korunur. Nadir görülen bir tip olup, daha çok sigara içmeyenler ve kadınlarda görülür [64].
- **Küçük Hücreli Karsinom:** Bu grup tümör hücrelerinin çoğu nörosekretuar granül içerir. En saldırgan gruptur. Bununla beraber kemoterapiye yanıt iyidir. Küçük hücreli akciğer kanseri, daha saldırgan seyirli bir tümör olup, uzak metastaz oranı daha yüksektir. Bu tümör grubu sıklıkla kemoterapi ve/veya radyoterapi ile tedavi edilir [65].
- **Büyük Hücreli Karsinom:** Anaplastiktir. Farklılaşma yoktur.

1.9.3 Nöroendokrin Tümörler

- **Tümörlet:** İyi huylu nöroendokrin tümördür. Endokrin hücrelerin yerleşik (lokalize) çoğalması veya küçük karsinoid kabul edilir.
 - **Karsinoid Tümör:** Santral, periferal, atipik tipleri vardır.

1.9.4 Diğer ve Mezenkimal Tümörler

Hamartom, inflamatuvar pseudotümör, kondrom, lipom, teratom, leyomyom, endometriozis gibi tümörler örnek verilebilir. Bunlar iyi huylu tümörlerdir.

1.10 Akciğer Kanserinde Görülen Moleküler Anomaliler

Sağlıklı bir akciğer hücresinin malign hale dönüşümüne birçok genetik değişim neden olabilir [66]. Akciğer kanserinin başlaması ve ilerlemesi, hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünde rol oynayan ras, myc, bcl-2, erbB-2 gibi onkogenlerin fazla ifadelenmesi ya da p53, RB, p16 gibi tümör baskılayıcı genlerin eksikliği ile ilişkilidir [67]. Tümörojenik sürecin anlaşılmasında, tümör hücrelerini tetikleyen genlerin karakterize edilmesi ve belirlenmesi önemlidir [68]. Geçtiğimiz 20 yıl boyunca akciğer kanseri gelişiminde rol oynayan genleri tanımlamak için oldukça fazla çaba sarf edilmesine rağmen, mutasyon taşıdığı tespit edilen genlerin sayısı akciğer kanserine neden olan genlerin tahmini sayısına kıyasla çok sınırlı kalmakta, bu da akciğer kanseri tedavilerindeki ilerlemeleri yavaşlatmaktadır [69].

Akciğer kanserinin altında yatan çeşitli sebepler arasında tümör supressor genlerdeki (TSG) mutasyonlar ve değişiklikleri içeren faktörler vardır [70]. Bu yüzden moleküler teşhisler yardımı ile bazı akciğer kanser tiplerinin tanısı yapılabilir [71]. p53, RB ve p16 genleri akciğer kanserlerinde kromozom delesyonları için başlıca hedef olarak kabul edilir ve bunlar bir çok sitogenetik ve moleküler çalışmalarla belirlenebilmektedir [72]. Örneğin insan 3. kromozomunun kısa kolu akciğer tümörlerinin oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülen bir bölge (3p21.3) içermektedir [73]. Bu bölge akciğer ve göğsün premalignant lezyonlarında ve kanser hücre hatlarında genetik haritalama aracılığı ile tanımlanmıştır ve homozigot delesyonları kapsadığı tespit edilmiştir [70]. Yaklaşık 630 kb'lık homozigot delesyon taşıyan bu bölgede birden fazla TSG tanımlanmıştır [74] dolayısıyla bu bölgenin kaybının tespiti akciğer kanserine yatkınlık için kullanılacak bir ipucu olabilecektir.

Akciğer kanserinde kromozomal delesyonlar LOH (heterozigotluğun kaybı) ve HD (homozigot delesyon) şeklinde karşımıza çıkmaktadır. HD'a uğrayan aday

tumor suppressor genlerden bazıları DUTT1, FHIT, GNA12, Sema IV, 3pK, BAP1, MTAP, SMAD2, SMAD4, ve p53 genleridir [72]. LOH şeklinde olan kromozomol delesyonlara uğrayan genlere örnek olarak p73, VHL, PRLTS, HIC1 verilebilir [72]. 3p21.3 bölgesinde LOH'un yaygın olması ve akciğer kanser gelişiminde erken safhalarda rastlanması, bu bölgenin akciğer kanseriyle alakalı tümör baskılayıcı genleri bulundurduğuna işaret etmektedir [75].

1.11 X –Y Kromozomları ve Kanser

İnsanoğlunun kökeninin araştırılmasında DNA molekülü yapıtaşı olma özelliğiyle büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle, DNA zincirlerinden oluşan kromozomlar, özellikle cinsiyeti belirleyen kromozomlar, bilimsel araştırmalar için en önemli materyallerdir.

Kromozomlar, kadın ve erkeklerde 1'den 22'ye kadar aynı şekilde numaralandırılır. Bunlar otozomlar olarak isimlendirilir. 23'üncü çift kromozomlar kadın ve erkeklerde farklıdır ve bunlar cinsiyet kromozomları olarak isimlendirilir. Birisi X kromozomu, diğeri ise Y kromozomu olmak üzere iki çeşit cinsiyet kromozomu vardır [76]. X ve Y kromozomlarının birbirlerinden farklı genetik yapıları bulunmaktadır. Y kromozomu çoğu sperm üretiminden ve erkekliği tanımlayıcı diğer özellikleri oluşturmada sorumlu genlerden ibaret bir kromozomdur. Gen zengini X kromozomu ise renk körlüğü, kas gelişimi sorunları ve iki yüzden fazla zihinsel bozukluk gibi mutasyonlarla ilişkili olduğu tahmin edilen yaklaşık üç yüz genetik hastalığa ve bozukluğa karşı erkekleri savunmasız hale getirdiği için insan vücudundaki 23 kromozom arasında üzerinde en çok çalışılmıştır [77].

Kadınlar her bir ebeveynlerinden gelmek üzere toplam iki X kromozomuna sahipken, erkekler annelerinden gelen bir X ve babalarından gelen bir Y kromozomunu taşımaktadır. Dişi bireyler X kromozomlarından iki kopyaya sahip olmaları nedeniyle, X-e bağlı gen ürünlerini de iki kat fazla üretme potansiyeline sahiptir. X-Kromozom inaktivasyon (XCI) ile dişi bireylerin embriyonik gelişimin erken dönemlerinde iki X kromozomundan bir tanesinin gen ekspresyonu

engellenerek inaktif hale getirilir. Böylece, sadece bir X kromozomuna sahip erkeklerle, iki X kromozomuna sahip dişiler arasındaki X kromozomu dengesi sağlanmış olur. Bu durum yapısal olarak ilk kez 1949'da Murrey Barr tarafından tespit edilmiştir [78]. 1961 yılında Mary Lyon bu cisimciklerin inaktif X kromozomları olduğunu ortaya koymuştur [79].

Düzensiz X kromozom inaktivasyonu (Skewed X Chromosome Inactivation: (SXCI) ile ilgili birkaç tane mekanizma öne sürülmüştür ve bu mekanizmaların önemi hakkında çok az bilgi mevcuttur. SXCI'nın yumurtalık kanseri ve BRCA1 mutasyonları ile bağlantılı olabildiği bilinmektedir [80, 81]. Kristiansen ve ark. [82] genç göğüs kanserli bireylerin kan hücrelerinde yapılan çalışmada SXCI sıklığının artmasına paralel olarak erken dönemde göğüs kanserinin gelişimi ile alakalı olabileceği öne sürülmüştür. Son yapılan çalışmalarda 60 yaş ve daha yaşlı olan kadınlarda, genç bireylere oranla SXCI frekansının daha yüksek olduğu saptanmıştır [83]. Kadınlarda kan hücrelerindeki SXCI, erken dönemde akciğer kanserinin gelişimi ile alakalıdır. Akciğer kanseri de dahil olmak üzere bazı kanser tiplerine yatkınlığın saptanmasında kadınlarda X kromozomu inaktivasyonunun izlenmesi yararlı olabilecektir [83].

Buller ve ark [80] raporlarında, BRCA1 mutasyonlarında ve ovaryum kanserlerinde kadınların somatik dokusundaki X-kromozom inaktivasyonunun rastgele olmadığını buldular. Bu araştırmacıların ilginç önermesine göre; rastgele olmayan inaktivasyonlar gözlemlendiğinde, X kromozomunda aday tümör baskılayıcı genlerin var olabileceğini ve bu nedenle kanser gelişiminin gözlemlendiği saptanmıştır [81, 83].

Yaklaşık olarak 6 µm uzunluğunda olan X kromozomunda 155270560 nükleotid, 1529 gen bulunmaktadır [84, 85]. X kromozomunun yapısal düzensizlikleri sonucunda; Wiskott-Aldrich, Alport sendromu, Becker's müsküler distrofi, Sentronükleer miyopati, Charcot-Lowry sendromu, Duchenne müsküler distrofi, Fabry hastalığı, Kırılgan X sendromu, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği, Hemofili, Menkes hastalığı, Ornitin transkarbamilaz yetmezliği, Rett sendromu, Spinal ve bulbar müsküler atrofi, X 'e bağlı agammaglobulinemi (Bruton

hastalığı), X 'e bağlı sideroblastik anemi, Leber heredity optik nöropati gibi birçok hastalıklar meydana gelmektedir [81, 86, 87].

Wiskott-Aldrich sendromu immün yetersizlikle karakterize X'e bağlı resesif bir bozukluktur ve bu hastalıkta küçük kan pulcuklarıyla birlikte trombositopeni ve ekzema mevcuttur. Wiskott-Aldrich sendromundaki genetik bozukluğun Xp11.23'te olduğu gösterilmiştir. Wiskott-Aldrich sendromlu hastalarda hayatın 30 yılı içerisinde malignite gelişme riski yaklaşık %100'dür [88].

Lösemili hastalarda Avrupa kapsamında standart erkek-kız vaka oranları ortalama 1.22'dir. Bu bulgu özellikle çocukluk çağı lösemilerde çok belirgin olup hastalık erkeklerde yaklaşık %20 oranında daha fazla görülmektedir [89]. Vianna ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonuç bölümünde çocukluk çağı kanserlerinin ve özellikle Hodgkin hastalığının erkeklerde daha fazla görülmesinin bir nedeni olarak, erkeklerde belirsiz seyreden (X kromozomunda) çekinik gen taşıyıcılığının daha fazla olabileceği görüşü belirtilmiştir [90].

İnsan Y kromozomu yaklaşık 60 milyon civarında nükleotid içermesine karşın, diğer kromozomlara oranla gen sayısı en az kromozomdur [91, 92]. Y kromozomu yapısal olarak X'den küçüktür [93]. Y kromozomu haploid genomun %2-3'ünü oluşturur. Kısa (Yp) ve (Yq) koldan oluşan akrosentrik bir kromozomdur [94, 95]. Y kromozomu erkek karakteristik özelliklerinin genetik belirleyicisi olarak rol oynamaktadır [96]. Y kromozomunda Pseudotozomal bölgeler (PAR), Ökromatik bölge, Heterokromatik bölge olmak üzere üç bölge tanımlanmıştır. Heterokromatik bölgede fazla oranda tekrar dizileri bulunmaktadır. Ökromatik bölge ise sayı olarak daha fazla tekrar dizileri olmasına rağmen cinsiyet belirlenmesi, gonadoblastoma, boy kontrolü, Turner stigmata ve spermatogenez ile ilgili genleri içermektedir [94, 95, 97]. Kromozomun Yp ucuna yerleşen PAR1 2.6Mbp, Yq ucuna yerleşen PAR2 ise 0.4Mbp nükleotid içermektedir [98]. Bu bölgelerin X kromozomu üzerinde homologları bulunmaktadır. Mayoz sırasında Y kromozomunun sadece bu bölgeleri rekombinasyona uğramaktadırlar [95, 97]. Y kromozomunun bu bölgeleri (PAR1, PAR2) dışında kalan %95'lik kısmı rekombinasyona uğramamaktadır [94, 99, 100, 101]. Bu bölge Y'nin rekombinasyona uğramayan bölgesi (NRY; non-recombining region of the Y

chromosome) olarak bilinmektedir [102]. Son yıllarda araştırmacılar bu bölgeyi Y'nin erkek özgül bölgesi (MSY: male-specific region of the Y) olarak adlandırmaktadır [99, 101, 102].

Yaklaşık olarak 23 milyon baz çiftinden oluşan MSY üç bölüme ayrılmıştır [92, 102]. Bunlar; X-transpoze bölge, X-dejenere bölge ve amplikonik bölgedir. MSY'nin % 15'ini kapsayan X-transpoze bölge evrim sürecinden X kromozomundan köken almıştır. X-transpoze bölge X kromozomunda bulunan Xq21 bölgesine % 99 oranında benzemektedir [103]. Bu bölgede 2 gen bulunmaktadır [102].

X-dejeneratif bölge MSY'nin % 20'sini kapsamaktadır. X-dejeneratif bölge, evrimsel süreçte dejenerasyona uğramış dizilerin varlığıyla işlevsel özellikleri kaybolan birçok psödogenin de bulunduğu 27 tek kopya genleri içermektedir. X-transpoze bölgede bulunanlar dahil olmak üzere tüm bu genler X kromozomundaki benzerleri ile homoloji gösterir. 27 genetik birimden 14 tanesi transkripsiyona uğrama yeteneğine sahip olup, her birisi tek kopya olarak bulunur [102].

Y kromozomunun kısa kolunun PAR bölgesinin yakınında, erkek cinsiyet gelişimini kontrol eden cinsiyet belirleyen Y bölgesi (SRY: sex-determining region of the Y) adı verilen önemli bir gen bulunmaktadır. SRY embriyonun farklılaşmamış gonadal dokusundan testislerin oluşturulmasını başlatan testis –belirleyici faktörünü (TDF: testis-determining factor) şifrelemektedir [104]. Memelilerde seks kromozomları SRY geninin memeli X kromozomu üzerindeki yapısal bir homolog olan SOX3 geninin farklılaşması ile ortaya çıkar [104, 105]. Karşılaştırmalı zincir analizleri SRY ve SOX3'ün progenitor genden geldiğini, buna karşılık daha fazla evrim geçirmiş olan SRY'nin erkek belirleyici fonksiyon kazandığı ve bunu sürdürdüğünü göstermiştir [104].

Bazı erkek bireylerin iki X kromozomuna sahip olup, Y kromozomu taşımaması gözlenen bir durumdur. Bu erkek bireylerin Y kromozomunun SRY bölgesi X kromozomunun yapısına katılmıştır. Aynı durum bayanlarda da gözlenmektedir. Bir X ve bir Y kromozomu taşıyan dişi bireylerde Y kromozomunda bulunan SRY bölgesi kayıptır [106].

Kısaca erkeklerde SRY bölgesinin Y kromozomundan X'e transfer olduğu, dişilerde ise bu bölgenin delesyonları veya mutasyonları saptanmıştır [107]. Cinsiyet kromozom bileşimlerinin, beklenen cinsiyet fenotipine uymayan nadir bazı bireylerde, SRY genine ait DNA dizilerinin varlığının veya yokluğunun tanımlanabilmesi, SRY'nin erkek cinsiyet belirlenmesinden sorumlu gen olduğunu ortaya koymuştur [102]

MSY'nin %30'unu üçüncü bölge olan amplikon bölge oluşturmaktadır. Amplikon bölgede genel olarak testislerin gelişimi ile alakalı genler bulunmaktadır. Bölgenin amplikon adı verilen direk tekrarlayan dizilere [94] sahip olmasından dolayı Amplikon bölge adı verilmiştir [102]. Bu bölgede birçoğu çok kopyalı olarak temsil edilen, 9 gen ailesine bölünmüş 60 transkripsiyon birimi bulunmaktadır [106]. Her ailenin üyesi %98'den fazla benzer DNA dizilerine sahiptir. Örnek olarak DAZ gen grubu; PRY, BPY2, TTY2, CDY ve RBM 'nin kopyalarını içermektedir [108].

Ailelerinde Y kromozomu mikrodelesyonu olmamasına rağmen Y kromozomu delesyonu olan kişilerde, Y kromozom instabilitesinde ve hatta testiküler kanser oluşumunda genetik etiolojideki farklılıkların rol aldığı düşünülmektedir [109, 110].

Testisin skrotuma inişindeki yetersizlik, erkek üreme sisteminin en sık rastlanılan kongenital rahatsızlıktır. Kriptorşizm olarak adlandırılan bu hastalık, testiküler kanser gelişimine ve sperm sayısında azalma ile infertiliteye sebep olmaktadır [111, 112]. Normal spermatogenez için Y kromozomunun uzun kolunda bulunan ökromatik bölgedeki (Yq11) gen gereklidir. Y kromozomundaki mikrodelesyonlar, primer testikülopatilerin önemli bir genetik nedenidir [113]. Güncel olarak kriptorşizmin Y kromozomu mikrodelesyonun bir sonucu olarak gelişebileceği öne sürülmüş bunun ötesinde birçok çalışmada Y kromozom mikrodelesyonu ve kriptorşizm olguları da rapor edilmiştir [108].

Böbrek hücreli kanserin (BHK); Papiller BHK, Kromofob BHK, Papiller Adenom, Onkositom olmak üzere 4 patolojik türünde sıklıkla Y kromozomu kaybı gözlenmiştir [114, 115].

Kronik Myeloid Lösemi (KML), multipotent kök hücrelerin neoplastik transformasyonundan ortaya çıkan klonal myeloproliferatif bir hastalıktır. Kronik myeloid lösemi (KML), olgularının %95'inde oluşan kromozom 9 ve 22 arasındaki resiprokal translokasyon t(9;22)(q34;q11.2) sonucunda meydana gelen Philadelphia (Ph) kromozomuyla tanımlanmaktadır [116]. Hastalık blastik faza ilerlediğinde vakaların yaklaşık %85'inde ek kromozomal anormallikler geliştiği bilinmektedir. Yaygın kromozomal anormallikler; trizomi 8, ekstra Ph, (+Ph), izokromozom 17q, trizomi 19, trizomi 20, Y kromozom kaybı, trizomi 17, monozomi 7, +21'dir [117].

X ve Y kromozomunun çeşitli kanser türlerinin oluşumunda ya da gelişmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Günümüzde bütün dünyada kanser ile bağlantılı genlerin tam yerlerini saptamak, karakterize etmek ve canlı sistemlerdeki işlevleri üzerinde araştırmalarda bulunmak için büyük miktarlarda çaba ve kaynak harcanırken akciğer kanseri gibi ölümcül bir hastalığa sebep olduğu tahmin edilen bir DNA bölgesinin bu bağlamda analiz edilmesi elzem olarak değerlendirilmelidir. X (Xq21) ve Y (Yp11.2) kromozomları üzerinde bulunan ve akciğer kanserojen genleri üzerine yapılan bir ön çalışma sonucu akciğer kanseriyle çok yüksek korelasyon (ve diğer yaygın kanser tipleriyle de çeşitli oranlarda korelasyon) gösteren bu bölgenin herhangi bir kanserle olan ilişkisi üzerine bir çalışmaya veya bu bölgeye ait her hangi bir karakterizasyon çalışmasına literatürde rastlanmamıştır

Çalışmamız kapsamında bir akciğer kanserojen aday geninin (TUSC2) en büyük ekzonuna %90 oranında benzeyen, mRNA'sı bulunmayan ve yapılan bir ön çalışmada akciğer kanseri ile yüksek oranda korelasyon gösteren Xq21-Yp11.2 lokusunun daha büyük populasyonlarda korelasyonun belirlenmesi ve bu lokusun moleküler analizinin yapılması hedeflenmiştir.

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma, MBI Fermentas, Applichem, Carlo Erba, Amresco, Merck ve QIAGEN firmaları tarafından sağlanmıştır.

2.2 Kullanılan Örnekler

Çalışmada kullanılan kan örnekleri Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi ve Balıkesir Özel Hastanesinden temin edilmiştir. Araştırmada kontrol grubu 20 – 40 yaş aralığındaki 159 bireylerden oluşmaktadır. Bu bireyler her iki cinsiyete ait olup, kanser ve sigara geçmişi bulunmayan kişilerden oluşmaktadır. Kanser hastalarına ait kan örnekleri ise 20-65 yaş aralığında kanser teşhisi konmuş 137 gönüllü hastadan temin edilmiştir. Kan örnekleri genomik DNA (gDNA) izole edilinceye kadar EDTA'lı tüplerde 20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.3 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce ependorf tüpleri, PCR tüpleri, pipet uçları, cam malzemeler 121°C'de 20 dakika süreyle 1 atm basınçta otoklavlanarak steril edildi. Pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri ve cam malzemeler etüvde 80°C'de 1 saat bekletilerek kurutuldu. Pipet ve çalışılan yüzey %70'lik alkol ile temizlendi.

2.4 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Kanserli hastalardan ve sağlıklı bireylerden temin edilen kan örneklerinden genomik DNA (gDNA) izolasyonu hem klasik yöntem (manuel) hem de kit ile denenmiştir. Qiagen firmasına ait DNeasy Blood Mini Kiti (Katalog No: 51104) bazı örneklerde daha yüksek verimli PCR sonuçları vermesi açısından tercih edilmiştir. Bu durumda gDNA izolasyonu, kitin kullanma kılavuzu takip edilerek yapılmıştır. Manuel gDNA izolasyonu zaman alıcı olmasına rağmen bazı örneklerde kite nazaran daha verimli PCR sonuçları verdiği için ve çok fazla gDNA'ya ihtiyaç olan durumlarda (bazı örneklerde PCR başarılı sonuçlar vermediğinde) çok çeşitli faktörleri test etmek gerektiği için kullanılmıştır. Böyle durumlarda manuel yöntem daha ucuz olduğu için tercih edilmiştir.

Manuel metod olarak Miller ve arkadaşlarının [118] tarif ettiği yöntem küçük değişikliklerle aşağıdaki şekilde uygulandı: 500 µL EDTA'lı kan örneği 2 µL'lik eppendorf tüplerine konuldu. Üzerine 1300 µL distile su pipetle eklendi. 5 dakika iyice vorteks yardımı ile çalkalandı. 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice pipetle çekilerek atıldı. Çökelti üzerine 1000 µL distile su eklendi ve 1 dakika vorteks yardımı ile iyice çalkalandı. 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki sıvı dikkatlice pipetle çekilerek atıldı. Çökelti üzerine 250 µL çekirdek lizis tamponu (Tablo 2.1), 20 µL %10'luk SDS (Tablo 2.1) ve 20 µL Proteinaz K (10mg/mL) eklendi ve tüp alt-üst edilerek karıştırıldı. Eppendorf tüpü 72°C'deki su banyosunda 10 dakika bekletildi. Eppendorf tüpe 175 µL doyurulmuş amonyum asetat (Tablo 2.1) eklendi ve 1 dakika alt-üst edildi. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant başka bir eppendorf tüpüne dikkatlice pipet yardımı ile aktarıldı. Üzerine 1000 µL %95'lik etanol eklendi. Eppendorf tüpü yavaşça alt-üst edildi. DNA'nın belirmesi gözlemlendi. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvının tamamı pipet yardımı ile atıldı. Çökelti üzerine 250 µL %75'lik etanol ilave edilerek çökelti yıkandı. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvının tümü pipetle çekilerek atıldı. Çökelti eppendorf tüplerin ağzı açılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek kurutuldu. Üzerine 200 µL TE eklenerek gDNA gerektiren uygulamalar için kullanıma hazır hale getirildi.

Tablo 2.1. Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları
(Tris-base 10mM, NaCl 400mM, Na₂EDTA 2Mm)

| ÇÖZELTİ | KOMPOZİSYONU, ÖZELLİKLERİ VE HAZIRLANIŞI |
|--|---|
| Doyurulmuş Amoyum Asetat (NH₄Ac) | 22.2g NH ₂ Ac distile su ile 30 mL'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda yaklaşık 40°C'de çözüldü. Filtrasyon yoluyla steril edildi. +4°C'de saklandı. |
| Çekirdek Lizis Tamponu (pH 8.2) | 100 µL Tris-base, 4Ml NaCl, 40 µL Na ₂ EDTA, 5860 µL distile suda çözüldü. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. +4°C'de saklandı. |
| %10'luk SDS | 10 g SDS 100 mL olacak şekilde ıltılmış distile su ile tamamlandı. |
| Etil Alkol (%75'lik ve %95'lik) | Mutlak alkole sırasıyla 25 mL ve 5 mL steril su eklendi. |

2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler yerli şirketler aracılığıyla Integrated DNA Technologies (A.B.D.) firmasından temin edildi. PCR'da kullanılacak malzemeler çalışma esnasında buz üzerinde muhafaza edildi. PCR hazırlanırken komponentleri taşıyan tüpler açılmadan önce santrifüj yapıldı. Böylece eldiven ve pipetlerin kontaminasyonuna engel olundu. PCR son reaksiyon hacmi 50 µL olacak şekilde bileşenler bir PCR tüpüne konuldu. Reaksiyon tüpüne en son DNA konuldu. Reaksiyon tüpüne DNA eklenirken hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. PCR tüpüne konan komponentlerin iyice karışması için çok kısa

santrifüj yapıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi. Tablo 2.2'deki PCR döngü koşulları seçilerek reaksiyon başlatıldı.

Tablo 1.2. PCR Döngü Koşulları

| PCR DÖNGÜ KOŞULLARI | | |
|---------------------|-----------|----------|
| 94°C | 5 dakika | 1 devir |
| 94°C | 20 saniye | 35 devir |
| 55°C | 20 saniye | |
| 72°C | 40 saniye | |
| 72°C | 10 dakika | 1 devir |
| +4°C | 18 saat | |

Bazı bireylerde PCR sonuçları optimize edilmiş primerlere rağmen negatif alındığı için yeni primerler dizayn edildi. Bu yüzden aynı gDNA örneği ile farklı primerler kullanılarak farklı PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

2.6 Primerlerin Dizaynı

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılmak üzere spesifik primerler, Primer3 web tabanlı biyoinformatik programı [119] kullanılarak dizayn edildi. Primerler dizayn sırasına göre Xq21, XY664, XY927, XY929 ve XY889 olarak adlandırıldı.

2.6.1 Primerlerin Kullanıma Hazırlanması

Liyofilize olarak teslim alınan primerler 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı. 1 mL TE veya steril saf su eklendi ve pipetaj yapıldı. Hazırlanan primerlerden 200 µL'lik istenilen konsantrasyonda (çoğunlukla 5 µM) çalışma solüsyonları hazırlandı.

2.6.2 Xq21 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları

Daha önceki çalışmalarda optimize edilmiş Xq21 primerlerinin nükleotit dizileri, molarite ve konsantrasyon hesapları Tablo 2.3'de görülmektedir. PCR reaksiyonu için hazır hale gelen primerlerle yapılan PCR komponentleri ve konsantrasyonları Tablo 2.4'te gösterilmiştir. Daha önce optimize edilip başarılı sonuçlar veren Xq21 primerleri (Tablo 2.3) ile yeni bireylerde (sağlıklı ve kanserli) yapılan tüm PCR sonuçları negatif çıktı. PCR protokolü ve ilgili faktörler değiştirilerek yapılan tekrarlar da sonuç değişmedi. Değiştirilen PCR protokolleri Tablo 2.5 ve Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Xq21 Primerinin Nükleotit Dizileri, Molarite ve Çalışma Solüsyon Hesapları

| | Xq21 primeri-L | Xq21 primeri-R |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Nükleotid Dizileri | GTGTGGCTTCCATTAAGGG | TCAGACTCTGCCATGACATC |
| Molaritesi | 28.8 μ M | 25 μ M |
| Çalışma Solüsyonu | 9.9 μ L stok + 190.1 μ L TE | 9.02 μ L stok + 190.98 μ L TE |

Tablo 2.4. Protokol 1 için PCR Bileşenlerine Konsantrasyonları

| PCR Bileşenleri(Protokol 1) | Konsantrasyon |
|---|----------------------|
| 6 µL NH ₂ SO ₄ Tampon | 10X |
| 5 µL primer L | 10 pmol/ µL |
| 5 µL primer R | 10 pmol/ µL |
| 3 µL MgCl ₂ | 25 mM |
| 4 µL dNTP | 2.5 mM |
| 2 µL DMSO | - |
| 3 µL kalıp DNA | - |
| 0.6 µL Taq polimeraz | 5 ünite |
| 23.4 µL dH ₂ O | - |

Tablo 2.5. Protokol 2 için PCR Bileşenlerine Konsantrasyonları

| PCR Bileşenleri (Protokol 2) | Konsantrasyon |
|---|----------------------|
| 5 µL NH ₂ SO ₄ Tampon | 10X |
| 5 µL primer L | 10 pmol/ µL |
| 5 µL primer R | 10 pmol/ µL |
| 3 µL MgCl ₂ | 25 mM |
| 4 µL dNTP | 2.5 mM |
| 2 µL DMSO | - |
| 8 µL kalıp DNA | - |
| 0.5 µL Taq polimeraz | 5 ünite |
| 17.5 µL dH ₂ O | - |

Tablo 2.6. Protokol 3 için PCR Bileşenleri ve Konsantrasyonları

| PCR Bileşenleri (Protokol 3) | Konsantrasyon |
|---|----------------------|
| 5 µL NH ₂ SO ₄ Tampon | 10X |
| 5 µL primer L | 10 pmol/ µL |
| 5 µL primer R | 10 pmol/ µL |
| 3 µL MgCl ₂ | 25mM |
| 4µL dNTP | 2.5mM |
| 2µL DMSO | - |
| 12.5µL kalıp DNA | - |
| 0.5µL Taq polimeraz | 5 ünite |
| 13µL dH ₂ O | - |

Xq21 primer seti yeni birey gruplarında (sağlıklı veya kanserli) hiç bir şekilde ürün vermeyince XY664, XY927 ve XY929 adlı yeni primer setleri dizayn edildi.

2.6.3 XY664 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları

XY664 primerinin çalışma solüsyonu Tablo 2.7'de belirtildiği gibi hazırlandı. PCR reaksiyonu için hazır hale gelen XY664 primer seti ile yapılan PCR protokolü ve ilgili faktörler değiştirilerek yapılan PCR'larda kullanılan protokoller Tablo 2 8'de gösterilmiştir.

Tablo 2.7. XY664 primerinin nükleotid dizileri, molaritesi ve çalışma solüsyon hesapları

| | XY664 primeri-L | XY664 primeri-R |
|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Nükleotid Dizileri | CAAGGTTTGCCTTCTTCCAG | CCATGACATCATCGTGGACT |
| Molaritesi | 25 µM | 25 µM |
| Çalışma Solüsyonu | 37.72 µL stok + 165,28 µL TE | 33.22 µL stok + 166,78µL TE |

Tablo 2.8. Protokol 1, 2 ve 3 için PCR Bileşenlerive Konsantrasyonları

| PCR PROTOKOL 1 | PCR PROTOKOL 2 | PCR PROTOKOL 3 |
|--|---|---|
| 6 µLNH ₄ SO ₄ Tampon | 5 µL NH ₄ SO ₄ Tampon | 5 µL NH ₄ SO ₄ Tampon |
| 5 µL primer L | 5 µL primer L | 5 µL primer L |
| 5 µL primer R | 5 µL primer R | 5 µL primer R |
| 3 µL MgCl ₂ | 3 µL MgCl ₂ | 3 µL MgCl ₂ |
| 4 µL dNTP | 4 µL dNTP | 4 µL dNTP |
| 2 µL DMSO | 2 µL DMSO | 2 µL DMSO |
| 3 µL kalıp DNA | 8 µL kalıp DNA | 12.5 µL kalıp DNA |
| 0.6 µL Taq polimeraz | 0.5 µL Taq polimeraz | 0.5 µL Taq polimeraz |
| 23.4 µL dH ₂ O | 17.5 µL dH ₂ O | 13 µL dH ₂ O |

2.6.4 XY927 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları

XY927 primerinin çalışma solüsyonu Tablo 2.9'da belirtildiği gibi hazırlandı. PCR reaksiyonu için hazır hale gelen XY927 primer seti ile yapılan PCR protokolü ve ilgili faktörler değiştirilerek yapılan PCR'larda kullanılan protokoller Tablo 2 8'de gösterilmiştir.

Tablo 2.9. XY927 primerinin nükleotit dizileri, molaritesi ve çalışma solüsyon hesapları

| | XY927 primeri-L | XY927 primeri-R |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Nükleotid Dizileri | CAAGGTTTGCCTTCTTCCAG | CCATGACATCATCGTGGACT |
| Molaritesi | 25 µM | 25 µM |
| Çalışma Solüsyonu | 19.23 µL stok + 80.77 µL TE | 16.18 µL stok + 83.82 µL TE |

2.6.5 XY929 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları

XY929 primerinin çalışma solüsyonu Tablo 2.10'da belirtildiği gibi hazırlandı. PCR reaksiyonu için hazır hale gelen XY929 primer seti ile yapılan PCR protokolü ve ilgili faktörler değiştirilerek yapılan PCR'larda kullanılan protokoller Tablo 2 8'de gösterilmiştir.

Tablo 2.10. XY929 Primerinin Nükleotit Dizileri, Molaritesi ve Çalışma Solüsyon Hesapları

| | XY929 primeri-L | XY929 primeri-R |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Nükleotid Dizileri | CAAGGTTTGCCTTCTTCCA G | CCATGACATCATCGTGGACT |
| Molaritesi | 25 µM | 25 µM |
| Çalışma Solüsyonu | 15.20 µL stok + 84.70 µL TE | 17.36 µL stok + 82.64 µL TE |

2.6.6 XY889 Primeri İle İlgili PCR Optimizasyonları

XY889 primerinin çalışma solüsyonu Tablo 2.11'de belirtildiği gibi hazırlandı. PCR reaksiyonu için hazır hale gelen XY889 primeri seti ile yapılan PCR protokolü Tablo 2.8'de gösterilmiştir.

Tablo 2.11. XY889 primerinin nükleotit dizileri, molaritesi ve çalışma solüsyon hesapları

| | XY889 primeri-L | XY889 primeri-R |
|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Nükleotid Dizileri | GTGAGTGGTTCAGTCCT GTGATATT | GGACTATTTACAAACCTTCATA TTCCTTT |
| Molaritesi | 29 μ M | 27 μ M |
| Çalışma Solüsyon | 34.4 μ L stok + 165.6 μ L TE | 36.7 μ L stok + 163.3 μ L TE |

2.7 Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jel elektrofrez için yerli firmalar aracılığıyla temin edilen Atto marka (Tokyo, Japonya) elektrofrez sistemi kullanıldı. Agaroz Appllichem firmasından, TBE için gerekli olan Tris-base Sigma firmasından, Borik Asit Carlo Erba firmasından temin edildi. Bu çözeltiler ve kompozisyonları Tablo 2.12'de verilmiştir. Görüntülenmesi gereken gDNA örnekleri ve PCR ürünleri için %0.8'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 0.4g agaroz üzerine 50 mL 0,5xTBE tamponu eklenip mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım soğuduktan sonra içerisine 0.5 μ L EtBr (Etidyum bromid) ilave edilerek önceden tarakları yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra taraklar çekilerek çıkartıldı. Böylece örnek yükleme kuyucukları oluşturuldu. Elektrofrez tankına yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar 0.5xTBE tamponu ile dolduruldu. Örneklerden (gDNA -PCR ürünü) 5 μ L alıp 1 μ L yükleme boyası ile karıştırıp jele yüklendikten sonra 120V sabit voltajla yaklaşık 50 dakika yürütüldü. Yürütülen

örnekler UV ışığı altında izlenerek jel görüntüleme sistemi (UVP, Gel-Doc-H Imaging System) ile veya kişisel fotoğraf makinasıyla görüntülenerek bilgisayara aktarıldı.

Tablo 2.12. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

| Çözelti | Kompozisyonu ve Hazırlanışı |
|------------------------|---|
| 5XTBE tamponu pH 8 | 54g Tris-Base, 27.5g Borik Asit tartılıp 20 mL 0.5M EDTA eklendi. (pH 8) Üzeri distile su ile 1 litreye tamamlandı. |
| Yükleme Boyası(6X) | GeneRuler™ DNA Ladders (Fermentas Katalog No: SM0313) |
| DNA belirteci (marker) | 1kb, GeneRuler™ DNA Ladders (Fermentas Katalog No: SM0333) |

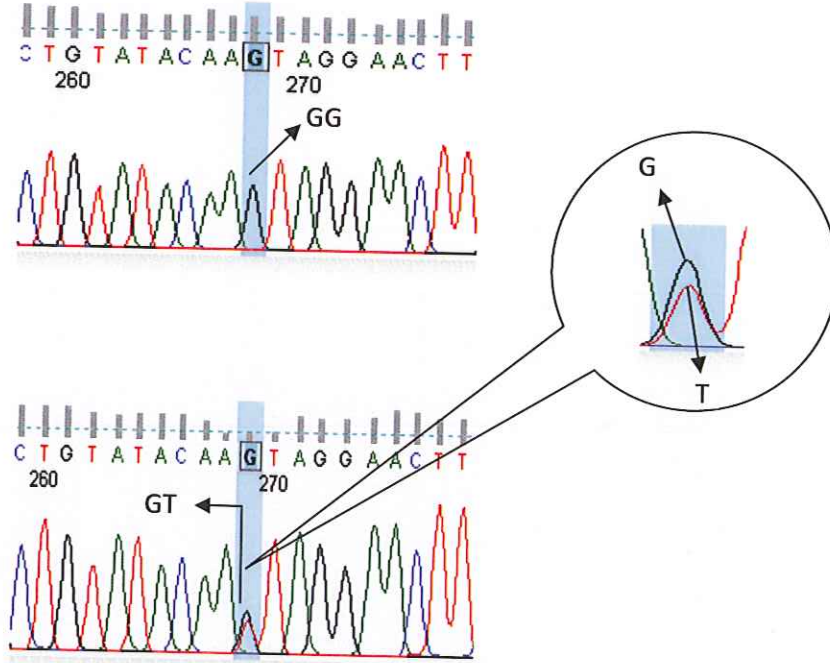
2.7.1 PCR ürünlerinin agaroz jelden saflaştırılması

Jel elektroforezinde yürütülen ürünler dizilemeye gönderilmeden önce jelden saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Jelden geri kazanım yoluyla saflaştırma QIAquick gel extraction Kit (Qiagen katalog no: 27104) protokolü takip edilerek yapıldı. Dizilemeden gelen sonuçlar BioEdit programı [120] ve NCBI web sayfası kullanılarak analiz edildi.

2.8 Genotip Tespiti

Bireylerin incelenen SNP'ler açısından homozigot veya heterozigot oldukları kromatogramlara bakılarak tespit edildi. SNP'lerin yeri ve aleller belli olduğu için kromatogramda bu nükleotitlerin olduğu bölgede her iki alele (nükleotit) ait eğri (pik) olduğunda heterozigot, sadece bir nükleotite ait eğrinin bulunduğu durumlarda

ise homozigot olarak değerlendirildi. Şekil 2.1’de homozigot ve heterozigot durumlara örnek verilmiştir.



Şekil 2.1. DNA dizileme kromatogramlarında heterozigot noktalara ait eğrilerin görünümü. Üst panel: GG genotipli birey. Alt panel: GT genotipli birey. Her bireyin genotipi birbirini destekleyen en az 2 bağımsız dizileme sonucu tespit edilmiştir.

2.9 DNA Dizilerinin Biyoinformatik Analizi

Sağlıklı ve kanser hastası bireylerden elde edilen yaklaşık 1250 nükleotitlik Xq21 bölgesi DNA dizileri BioEdit programının Sequence Alignment ve ClustalW (nükleotit polimorfizmini tespit ve görüntülemek için) alt programları ile analiz edildi. SNP korelasyonu çalışılan bölgenin yaklaşık 250 nükleotit ilerisinde bulunan ve 5, 14, 15, 21, 22 hariç bütün kromozomlarda bir homologu olan (Şekil 3.13) yaklaşık 300 nükleotit uzunluğundaki dizinin analizi web tabanlı transpozon veritabanı (<http://www.repeatmasker.org>) yardımıyla yapıldı.

2.10 X ve Y Alellerinin Klonlama Çalışmaları

2.10.1 Kompetan *Escherichia coli* (*E. coli* GM 2163) Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetan *E.coli* hücreleri liyofilize halde Fermentas'dan temin edilmiştir. *E.coli* GM 2163 kompotent hücresi (F⁻ dam-13::Tn9 (Cam') dcm-6 hsdR2 (r_k⁻m_k⁺) leuB6 hisG4 thi-1 aracC14 lacy1 galK2 galT22 XYIA5 mtl-1 rpsL136 (Str^r) fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1) sıvı LB ile çözüldü. Ampisilinsiz LB agara tek koloni düşecek şekilde ekildi. 1 gece 37°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrası tek koloniler steril bir öze ile alınıp 10 mL Ampisilinsiz (Amp-) LB'ye inoküle edildi. 37°C'de 1 gece çalkalayıcı etüvde bekletildi. 250 mL'lik erlen içine 100 mL ampisilinsiz LB eklendi ve ön kültürden 5 mL inoküle edildi. 37°C'de çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. Belirli aralıklarla OD 600 nm dalga boyunda 0.4 absorbans değerine ulaşması beklendi. Daha sonraki işlemler hücreleri kompetan hale getirmek için buzda yapıldı.(CaCl₂ ve Gliserol soğuk olmalı)

100 mL bakteri solusyonu 50 mL'lik 2 falkona alındı. 3000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Supernatant atıldı. 25 mL soğuk 0.1M CaCl₂ eklendi ve yavaşça çözüldü. 25 dakika buzda bekletildi. Tekrar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant uzaklaştırıldı. 10 mL 0.1M CaCl₂ ile tekrar çözüldü. 1-4 saat arası buzda bekletildi. 10 mL steril %40'lık gliserol eklenerek karıştırıldı ve önceden buzda bekletilmiş ependorflara aktararak - 80°C dondurucuda saklandı [121].

2.10.2 Kompetan *E.coli* Hazırlarken Kullanılan Besi Ortamları

2.10.2.1 Ampisilinli LB. Agar Hazırlanması

2.5g Tripton, 1.25g Yeast agar, 2.5g NaCl 200 mL dH₂O içerisinde çözüldü. 3.75g Agar agar eklendi. Son hacim 500 mL'ye tamamlandı ve otoklavlandı. 50°C'ye geldiğinde Ampisilin eklenerek petrilere döküldü.

2.10.2.2 Ampisilinli (Amp+) LB Hazırlanması

2.5g Tripton, 1.25g Yeast agar, 2.5g NaCl 500 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve otoklavlandı. 50°C'ye geldiğinde Ampisilin eklenerek soğuması beklendi. +4°C'de saklandı.

2.10.2.3 Ampisilinsiz (Amp-) L.B. Hazırlanması

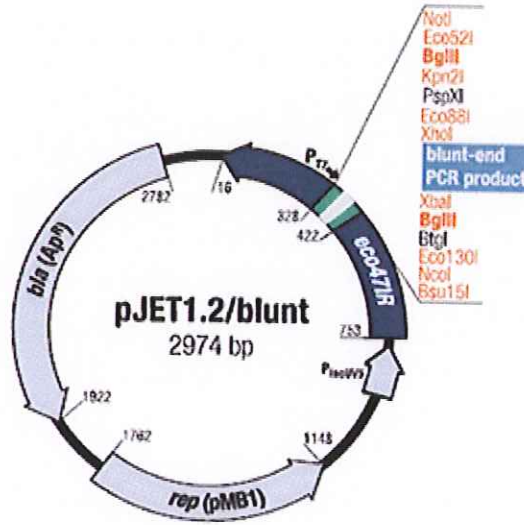
2.5g. Tripton, 1.25g Yeast agar, 2.5g NaCl 500 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve otoklavlandı.

2.11 Ligasyon

PCR ürünleri temizlendikten sonra CloneJet™PCR Cloning Kit (Fermentas #K1231) kullanılarak Pjet1.2/blunt Cloning vektöre aktarıldı. Ligasyon için kullanılan vektör küt uçlu DNA parçalarının insersiyonu için kullanılmaktadır. Buna karşın çalışılan DNA bölgesinin çoğaltımında kullanılan Taq Polimeraz yapışkan uç oluşturmaktadır. Bu sebeple kitin yapışkan uç klonlama protokolu takip edilerek blunting reaksiyon ile küt uçlu hale getirildi. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 2.13'de gösterilmiştir. 200 µL'lik eppendorf tüplerine 10 µL 2X reaction buffer, 5 µL dH₂O, 1 µL DNA blunting enzim ve 2 µL PCR ürünü konuldu. 3-5 saniye vorteks yapıldı. Thermal cyler cihazında 70°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hemen buza alındı. Ardından tüplere 1 µL pJet 1.2/blunt cloning vector (Şekil 2.2'de restriksiyon haritası gösterilmiştir) ve 1 µL T4 DNA ligase eklendi. Ligasyon, 22°C sıcaklıkta, 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin ardından transformasyon gerçekleştirildi.

Tablo 2.13. Yapışkan uçlu ligasyon için reaksiyon bileşenleri ve miktarları

| BİLEŞEN | MİKTAR |
|---|--------|
| 2X Reaction Buffer | 10 µL |
| PCR product | 2 µL |
| DNA blunting enzyme | 1 µL |
| dH ₂ O | 5 µL |
| pJet 1.2/blunt cloning vector (50ng/µL) | 1 µL |
| T4 DNA ligase (5u/µL) | 1 µL |



Şekil 2.2. Klonlama çalışmasında kullanılan pJET 1.2 blunt vektör haritası
(www.fermentas.com)

2.12 Transformasyon

Transformasyon için *E.coli* GM2163 kompetan hücreleri kullanıldı. Kompetan hücreler -80°C dolabından çıkarılıp buz üzerine alındı. Steril bir falcon tüp içerisine önce 5 µL ligasyon ürünü sonrada 50 µL kompetan hücre eklendi. Tüpün alt kısmına hafifçe vurularak karışması sağlandı. Buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Isı şoku için 42°C'de 90 saniye bekletildi. Ardından buz üzerine alınarak burada da 2 dakika bekletildi. 950 µL Ampisilinsiz (Amp-) LB eklendikten sonra

37°C sıcaklıkta 150 rpm'de 1.5 saat çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı. Bulanıklaşma gözlemlendi. Tek koloni düşecek şekilde 2 petriye 500 µL olacak şekilde ekildi. Petriler oda sıcaklığında 20 dakika düz olarak bekletildikten sonra ters çevrilerek 37°C sıcaklıkta 1 gece inkübasyonda bekletildi.

2.13 Bakteri Stoklarının Saklanması

Petrilerde büyüyen koloniler numaralandırılarak sıvı Ampisilinli LB'ye inoküle edildi. 37°C'de 1 gece çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı. Bakteriler kültürde üredikten sonra 1.5 µL'lik ependorflarda 850 µL kültür üzerine 150 µL gliserol eklenerek hazırlanan stoklar – 80°C dondurucu içerisinde muhafaza edildi.

2.14 Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için GeneJet™ Plazmid Miniprep Kit (Fermentas #K0501) kullanıldı. 4 adet ependorfa 1 µL olacak şekilde kültür aktarıldı. 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 250 µL resuspension solusyonu eklenerek 1 tüp olacak şekilde çözüldü. 250 µL Lysis solusyonu eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karışması sağlandı. Ardından hızlı şekilde konması gereken 350 µL Neutralizasyon solusyonu eklenerek hemen alt üst edildi. 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Supernatant kolona aktarılıp 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. 500 µL yıkama solusyonu eklenip 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı. 50 µL EB'de çözülerek plazmit izolasyonu tamamlandı.

2.15 Restriksiyon Endonükleaz (RE) Enzim Kesimi

Plazmitler *Bgl II* (Fermentas #ER0081) restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim reaksiyonu Tablo 2.14'de gösterilmiştir. Kesim 37°C sıcaklıkta 30 dakikada gerçekleşti. Reaksiyon ürünleri 1 kb DNA ladder (Fermentas) ile birlikte %0.8'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılıp ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra U.V. altında incelendi. İstenilen bantların yeri tespit edilerek UV transilluminator sayesinde agaroz jelden kesildi. *DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen)* kullanılarak

istenilen DNA parçası jelden kazanıldı. Son olarak kazanılan DNA'nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. Promoter analizi için kullanılacak PGL2 Basic vektör için klonlamaya hazır hale getirildi. İnsert taşıyan plazmitlerin X ve Y allellerinden hangisini taşıdığı belirlenmesi açısından dizilemeye gönderilmesi için hazırlandı.

Tablo 2.14. Restriksiyon Endonükleaz enzim kesim reaksiyon bileşenleri ve miktarları

| BİLEŞEN | MİKTAR |
|------------------------|--------|
| plazmit | 7 µL |
| 10X FastDigest® buffer | 1 µL |
| <i>Bgl II</i> | 2 µL |
| TOPLAM | 10 µL |

2.16 Promoter Analizi

2.16.1 Kompetan *Escherichia coli* (*E. coli* DH5α) Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli DH5α (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1endA1 gyrA96 thr-1 r1 A1) kompetan hücreleri, *E. coli* GM 2163 kompetent hücrelerinde uygulanan metot ile bölüm 2.10.1'de belirtildiği gibi hazırlandı [121].

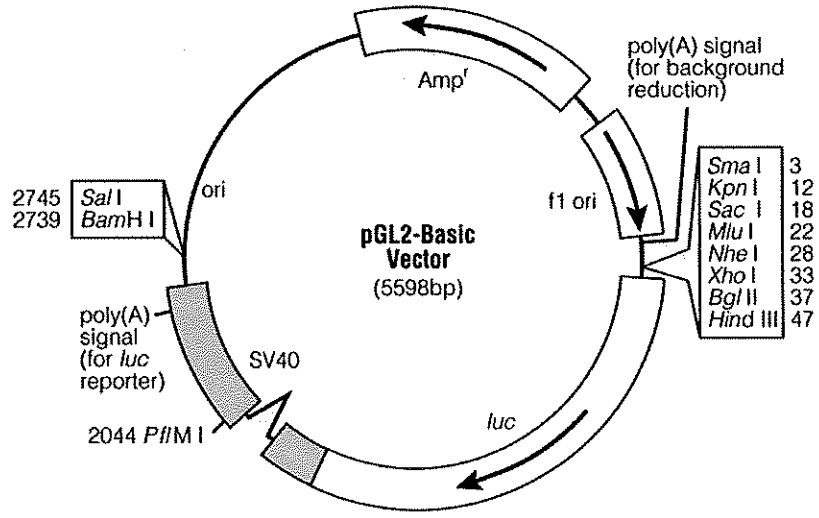
2.16.2 Ligasyon

X ve Y allellerini taşıyan DNA parçaları PGL2 Basic lusiferaz vektörüne klonlandı. Bunun için vektör ligasyon öncesi plazmit haritası dikkate alınarak *Bgl II* (Fermentas #ER0081) restriksiyon enzimi ile bölüm 2.15'de belirtildiği gibi kesildi. PGL2 Basic vektör haritası Şekil 2.3'de gösterilmiştir. X ve Y allellerini taşıyan küt uçlu DNA parçalarından 8 µL, aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş olan PGL2 Basic lusiferaz vektöründen 1 µL, T4 DNA ligaz enzimi 1 µL ve 2X reaksiyon tamponundan 10 µL eklenerek toplam hacim 20 µL olacak şekilde ligasyon

reaksiyonu kuruldu. 30 dakika 22°C'de inkübe edildi. Küt uçlu ligasyon için reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 2.15'te gösterilmiştir.

Tablo 2.15. Küt Uçlu Ligasyon İçin Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları

| BİLEŞEN | MİKTAR |
|-----------------------|--------|
| 2X Reaction Buffer | 10 µL |
| Küt uçlu DNA parçası | 8 µL |
| PGL2 Basic Vector | 1 µL |
| T4 DNA ligase (5u/µL) | 1 µL |



Şekil 2.3. PGL2 Basic vektör haritası

2.16.3 Transformasyon

Ligasyon sonrası hazırlanan vektörler, DH5α kompetan hücrelerine bölüm 2.12'de belirtildiği gibi transforme edildi. 1 gece 37°C'de inkübe edildikten sonra elde edilen kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Restriksiyon kesimi ile plazmitlerin rekombinant olup olmadıkları (insert içerip içermedikleri) doğrulandı.

3 BULGULAR

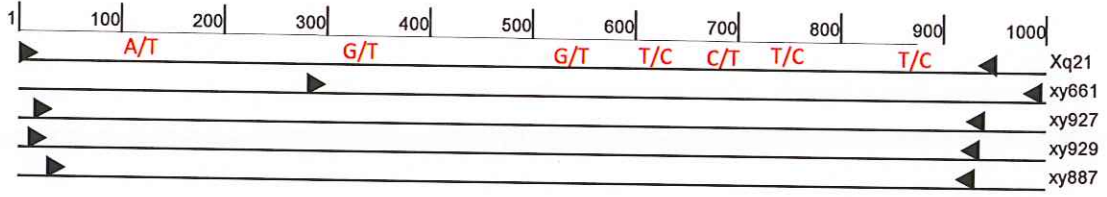
3.1 PCR Sonuçları

3.1.1 Xq21 Primeri ile Çoğaltılan PCR Sonuçları

Xq21 primeri ile çalışılan DNA bölgesinin çoğaltılması için bölüm 2.6.2’de belirtildiği gibi PCR koşulları uygulandı. Sağlıklı ve kanserli bireylerde yapılan PCR sonuçları negatif çıktı. PCR sonuçları Tablo 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir. Bölüm 2.6.2’de belirtildiği gibi PCR protokolü ve ilgili faktörler değiştirilerek yapılan PCR reaksiyonlarında da sonuç değişmedi.

Önceki çalışmalarda sağlıklı ve kanserli fark etmeksizin yaklaşık 60 bireyde başarılı sonuçlar verecek şekilde optimize edilmiş Xq21 adlı primer seti yeni temin edilen gDNA örneklerinde bütün çabalara rağmen çok düşük başarı oranı sergiledi. Bu çabalar içinde primerlerin yeniden ve üç bağımsız firmadan (RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. – Ankara, GenMark – ABD, IDTDNA– ABD) sipariş edilmesi, her seferinde insan genomunda sıklıkla kontrol olarak kullanılan glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) geninden yaklaşık 600 nükleotit çoğaltan primer setinin [122] pozitif kontrol olarak kullanılması da bulunmaktadır.

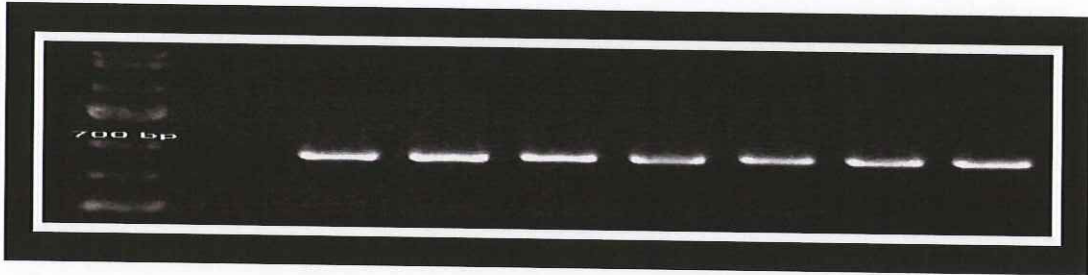
Xq21 primer seti sağlıklı veya kanserli birey gruplarında hiç bir şekilde ürün vermeyince XY664, XY927 ve XY929 adlı yeni primer setleri dizayn edildi. Bu primerlerin dizi üzerindeki yerleri Şekil 3.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışılan DNA bölgesini çoğaltmak için dizayn edilen primerlerin dizi üzerindeki yerleri. 1'den 1000'e kadar olan sayılar nükleotit numaralarını ve 7 SNP'nin dizi üzerindeki yerleri göstermektedir. Her satırdaki 2 uçgen primerlerin yerini göstermektedir. En sağ sütunda primer çiftlerinin adı yer almaktadır.

3.1.2 XY664 Primeri ile Çoğaltılan PCR Sonuçları

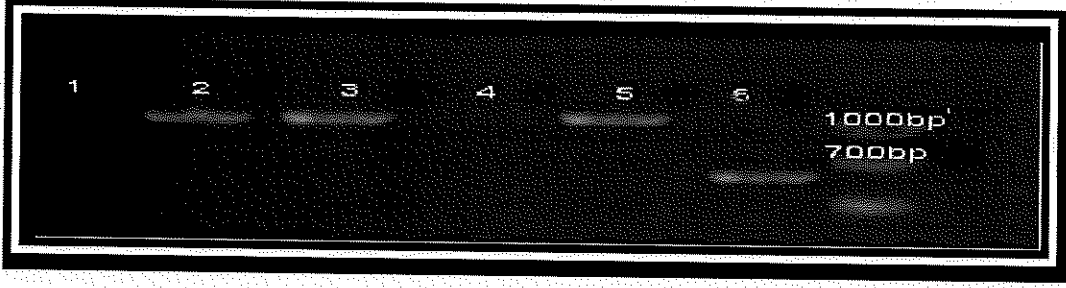
XY664 primer seti ile bölüm 2.6.3'de belirtildiği gibi PCR koşulları uygulandı. Çalışılan tüm bireylerde (Sağlıklı ve Kansersiz) sonuçlar pozitif çıktı. %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülen XY664 primeri ile yapılan PCR sonuçları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. XY664 primerleri ile yapılan PCR sonuçları

3.1.3 XY927 Primer Seti ile Çoğaltılan PCR Sonuçları

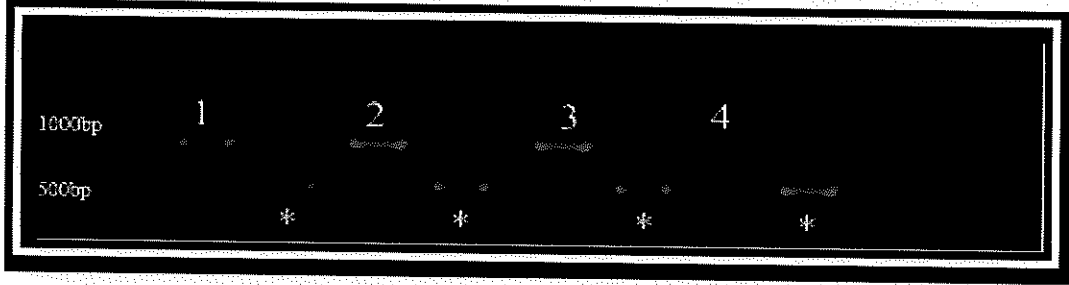
XY927 primer seti ile bölüm 2.6.4'de belirtildiği gibi PCR koşulları uygulandı. Çalışılan bireylerin bir kısmında pozitif sonuç alınırken bir kısmında da negatif sonuç alındı. Negatif sonuç alınan bireylerde bölüm 2.6.2'de belirtildiği gibi PCR protokolü ve ilgili faktörler değiştirilerek yapılan PCR reaksiyonlarında da sonuç değişmedi. 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR sonuçları Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Sağlıklı bireylerde XY927 primeri ile yapılan PCR sonuçları (1-5; XY927, 6; GAPDH)

3.1.4 XY929 Primer Seti ile Çoğaltılan PCR Sonuçları

XY929 primer seti ile bölüm 2.6.5'te belirtildiği gibi PCR koşulları uygulandı. XY927 primeri ile yapılan PCR'da negatif sonuç veren bireyler XY929 primeri ile pozitif sonuç verdiği gözlemlendi. Aynı şekilde XY927 primeri ile yapılan PCR'da pozitif sonuç veren bireyler XY929 primeri ile negatif sonuç verdi. %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülen PCR sonuçları Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

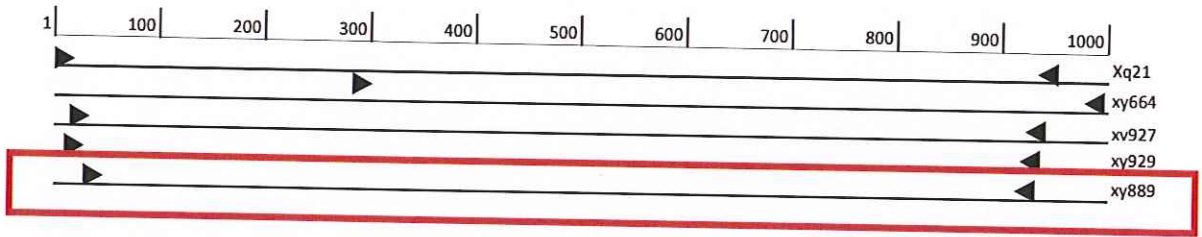


Şekil 3.4. Sağlıklı bireylerde XY927 primeri ile yapılan PCR sonuçları (1-4; XY927, *; GAPDH)

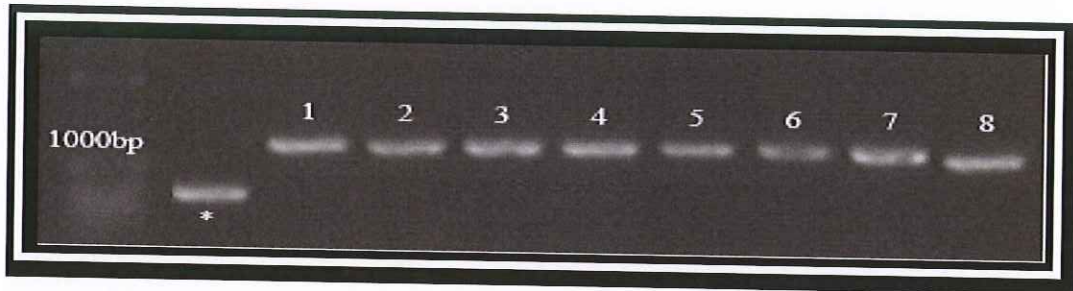
3.1.5 XY889 Primer Seti ile Çoğaltılan PCR Sonuçları

Primer setlerinden XY664 primerleri ile yapılan PCR sonuçları çoğunlukla pozitif çıkarken, XY927 ve XY929 primer setlerinden biri bir birey için başarılı sonuç verip diğer primer setinin aynı birey için negatif sonuç verdiği (veya tersi durum) gözlemlendi.

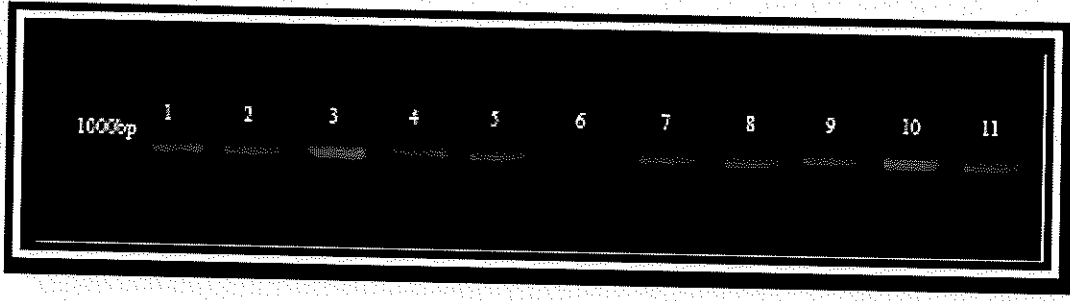
XY927 ve XY929 primer setleri çoğaltılan bölgenin uç kesimlerinde, XY664 primer seti ise orta kesimlerinde olduğu için uç kesimlerin çok polimorfik olmasının bu tutarsız sonuçlara yol açtığı tahmin edilerek polimorfik bölgelerde başarılı olma ihtimalini artırmak için nükleotit sayısı standand primerlerinkinden (20 nükleotit) daha fazla olan (5'primer 25 nükleotit, 3'primer 29 nükleotit) bir primer seti (XY889) dizayn edildi (Tablo 2.11). Primer setlerinin çalışılan DNA üzerindeki yeri Şekil 3.5'te gösterilmiştir. XY889 primer seti ile bölüm 2.6.6'da belirtildiği gibi PCR koşulları uygulandı. Bu yeni ve daha uzun olan primer seti ile yapılan bütün PCR reaksiyonları başarılı oldu. Bundan sonra eksik olan bütün DNA dizilemeleri gerçekleştirildi. %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde PCR sonuçları Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. XY889 Primer Setinin Çalışılan DNA Bölgesi Üzerindeki Yeri



Şekil 3.6. Sağlıklı bireylerde XY889 primeri ile yapılan PCR sonuçları (1-8; XY889, *; GAPDH)



Şekil 3.7. Kanserli bireylerde XY889 primeri ile yapılan PCR sonuçları (1-11; XY889,)

Bu denemeler sonucunda her primer setiyle yapılan PCR reaksiyon sonuçları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Hasta bireylerde uygulanan primer setleriyle elde edilen PCR sonuçları. Ürün elde edilen PCR reaksiyonları için “pozitif”, ürün olmayanlar için de “-“ işareti kullanılmıştır. Hasta bireyler akciğer kanserli olup örnek temin sırasına göre Ak1, Ak2 şeklinde adlandırılmıştır.

| Hasta Bireyler | Primer Seti | | | | | |
|----------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Xq21 | XY664 | XY927 | XY929 | GAPDH | XY889 |
| Ak1 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak2 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak3 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak4 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak5 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak6 | pozitif | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak7 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak8 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak9 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak10 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak11 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak12 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak13 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak14 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak15 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak16 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak17 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak18 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak19 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak20 | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak21 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak22 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |
| Ak23 | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak24 | - | pozitif | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak25 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif | pozitif |

Tablo 3.1'in devamı

| Hasta Bireyler | Primer Seti | | | | | |
|-------------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Xq21 | XY664 | XY927 | XY929 | GAPDH | XY889 |
| Ak26 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak27 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak28 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak29 | – | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak30 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak31 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak32 | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak33 | – | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak34 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak35 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak36 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak37 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak38 | – | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak39 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak40 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak41 | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak42 | – | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak43 | – | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak44 | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak45 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak46 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak47 | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak48 | – | pozitif | – | pozitif | pozitif | pozitif |
| Ak49 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |
| Ak50 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif | pozitif |

Tablo3.2. Sağlıklı bireylerde uygulanan primer setleriyle elde edilen PCR sonuçları. Tablonun kolay takip edilebilmesi için ürün elde edilen PCR reaksiyonları için “pozitif”, ürün olmayanlar için de “-” işareti kullanılmıştır. Sağlıklı bireylerden elde edilen kan örnekleri temin sırasına göre SB1, SB2 ... şeklinde adlandırılmıştır.

| Sağlıklı Birey | Primer Seti | | | | |
|-------------------|-------------|---------|---------|---------|---------|
| | Xq21 | XY929 | XY664 | XY927 | XY889 |
| SB1 | - | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB2 | - | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB3 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB4 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB5 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB6 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB7 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB8 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB9 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB10 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB11 | - | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB12 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB13 | - | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB14 | - | - | pozitif | pozitif | pozitif |
| SB15 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB16 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB17 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB18 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB19 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB20 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB21 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB22 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB23 | - | - | pozitif | - | pozitif |
| SB24 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |
| SB25 | - | pozitif | pozitif | - | pozitif |

Tablo 3.2'nin devamı

| Sağlık Bireyler | Primer seti | | | | |
|--------------------|-------------|---------|---------|-------|---------|
| | Xq21 | XY929 | XY664 | XY927 | XY889 |
| SB26 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB27 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB28 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB29 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB30 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB31 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB32 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB33 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB34 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB35 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB36 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB37 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB38 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB39 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB40 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB41 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB42 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB43 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB44 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB45 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB46 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB47 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB48 | – | – | pozitif | – | pozitif |
| SB49 | – | pozitif | pozitif | – | pozitif |
| SB50 | – | – | pozitif | – | pozitif |

3.2 Biyoinformatik Analiz

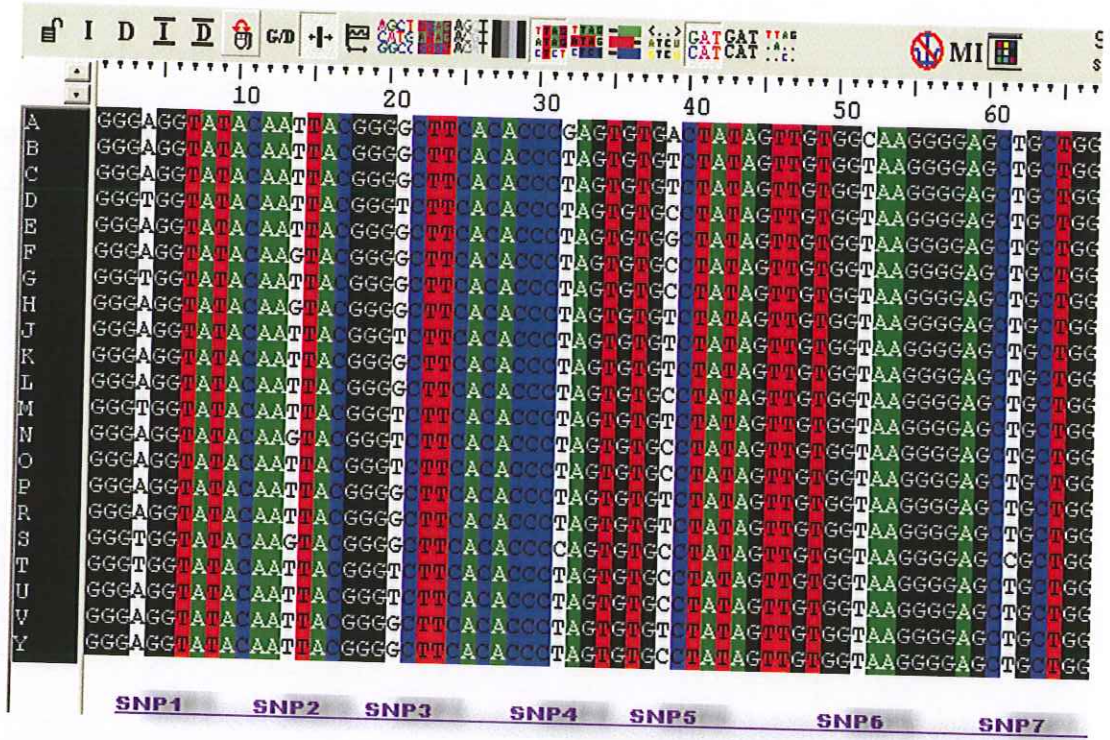
3.2.1 DNA dizileme

PCR ürünleri dizileme yapan ticari kurumların (RefGen, Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. Ankara) tavsiye ettiği konsantrasyon ve miktarlara getirildikten sonra dizilemeye yollandı.

3.2.2 Genotip Tespiti

Dizilemeden gelen sonuçların BioEdit programının ClustalW alt programı ve FinchTV programı (Geospiza, Inc.) kullanılarak analiz edilmesiyle SNP'ler tespit edildi. Şekil 3.8'de dizi üzerinde bulunan 7 SNP nin yerleri gösterilmektedir. Bireylerin incelenen SNP'ler açısından bölüm 2.8'de belirtildiği gibi homozigot veya heterozigot oldukları kromatogramlara bakılarak tespit edildi.

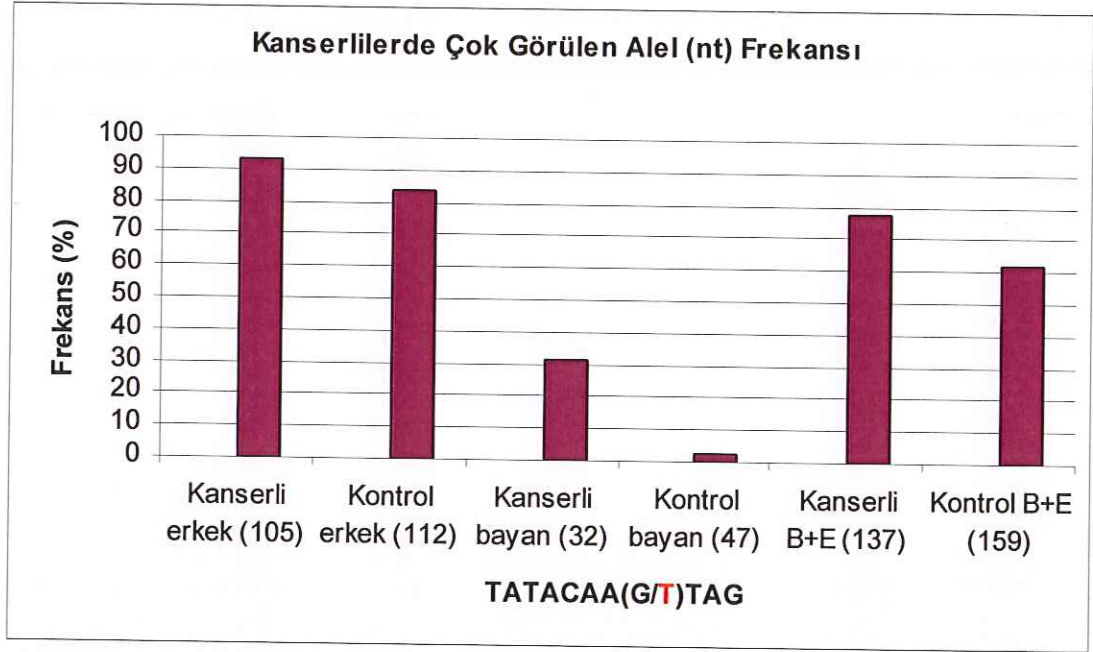
Çalışılan DNA bölgesinde bulunan SNP'lerin tek bir haplotip oluşturduğu tespit edildiğinden bir bireyin hangi alleli taşıdığını bulmak için belirtilen 7 SNP bölgesinden herhangi birine bakmak yeterli olmuştur. Şekil 3.8'de dizi üzerinde 7 SNP gösterilmiştir. Haplotipin kanserli ve sağlıklı insanlarda bulunma sıklığına göre akciğer kanseri ile korelasyonu tespit edilmiştir. Şekil 3.9'da kanserli ve sağlıklı bireylerde (G/T) polimorfizminin kromogram sonucu gösterilmiştir. Şekil 3.10'da haplotipin akciğer kanseri ile korelasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.8. DNA bölgesinde bulunan 7 SNP

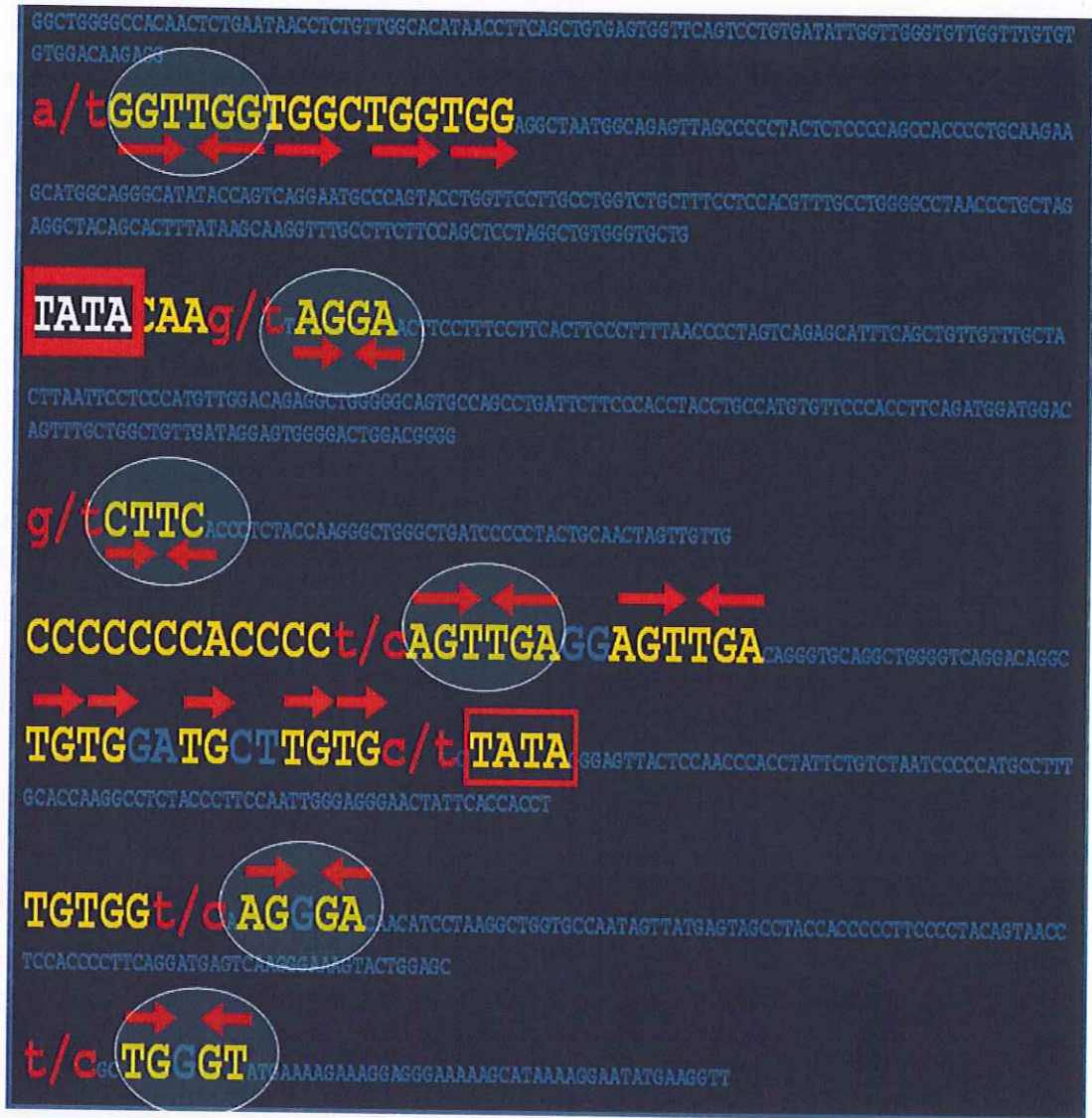


Şekil 3.9. Kanserli ve sağlıklı bireylerde (G/T) polimorfizminin kromotogram sonucu



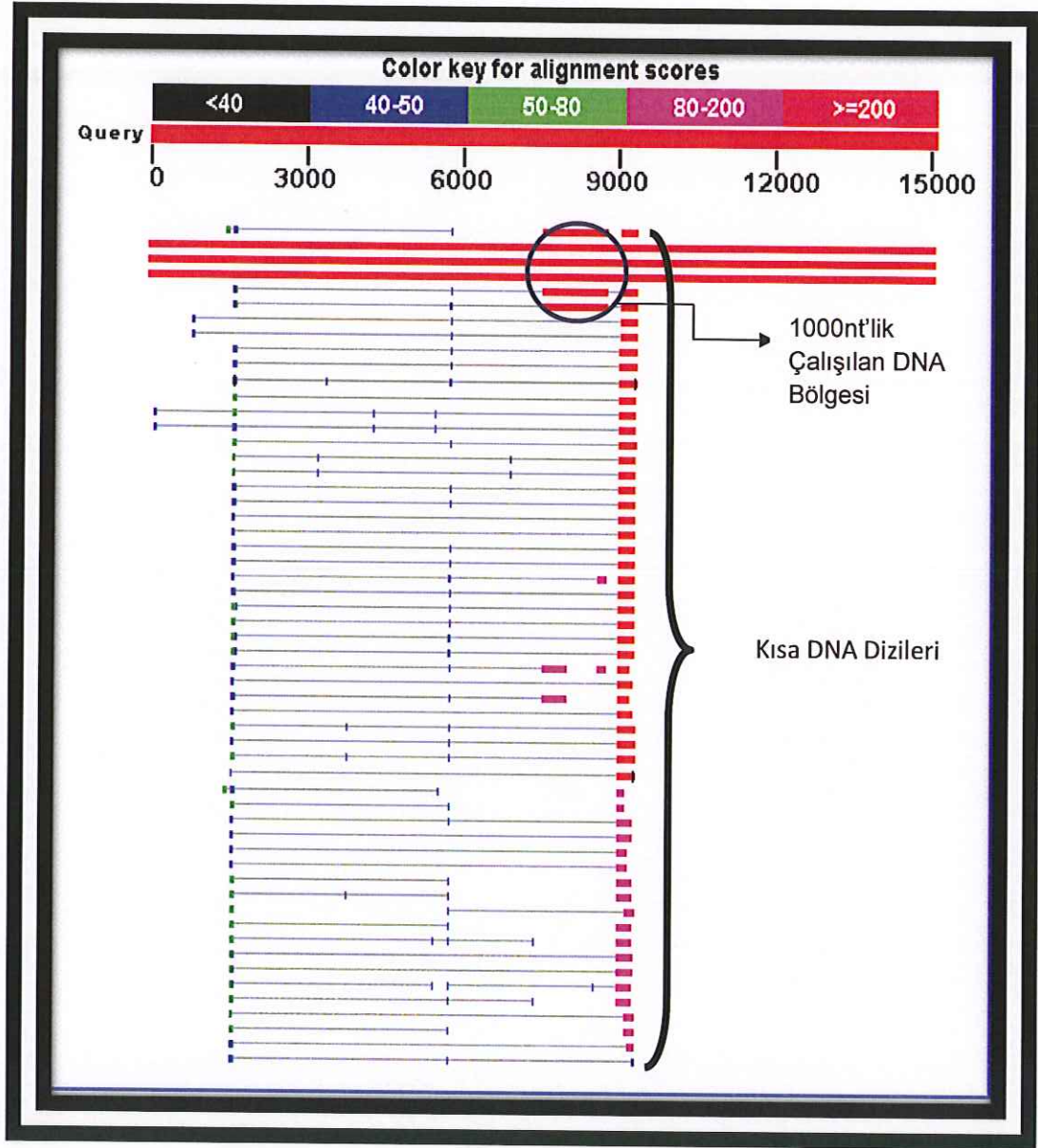
Şekil 3.10. Çalışılan haplotipin T alelinin bütün dizilerin değerlendirilmesiyle elde edilen sağlıklı ve kanserli hastalarda bulunma sıklığı. Parantez içindeki rakamlar birey sayısını belirtmektedir.

Çalışılan DNA bölgesi incelendiğinde SNP bölgeleri ve bu bölgelerin yakınında bulunan ikili / üçlü ters tekrarlar (inverted repeats) veya düz tekrarlar (direct repeats) gibi düzenleyici elementer bulunduğu görülmektedir. Şekil 3.11’de NCBI sayfasında Blast analizi sonucu elde edilen grafik görülmektedir.



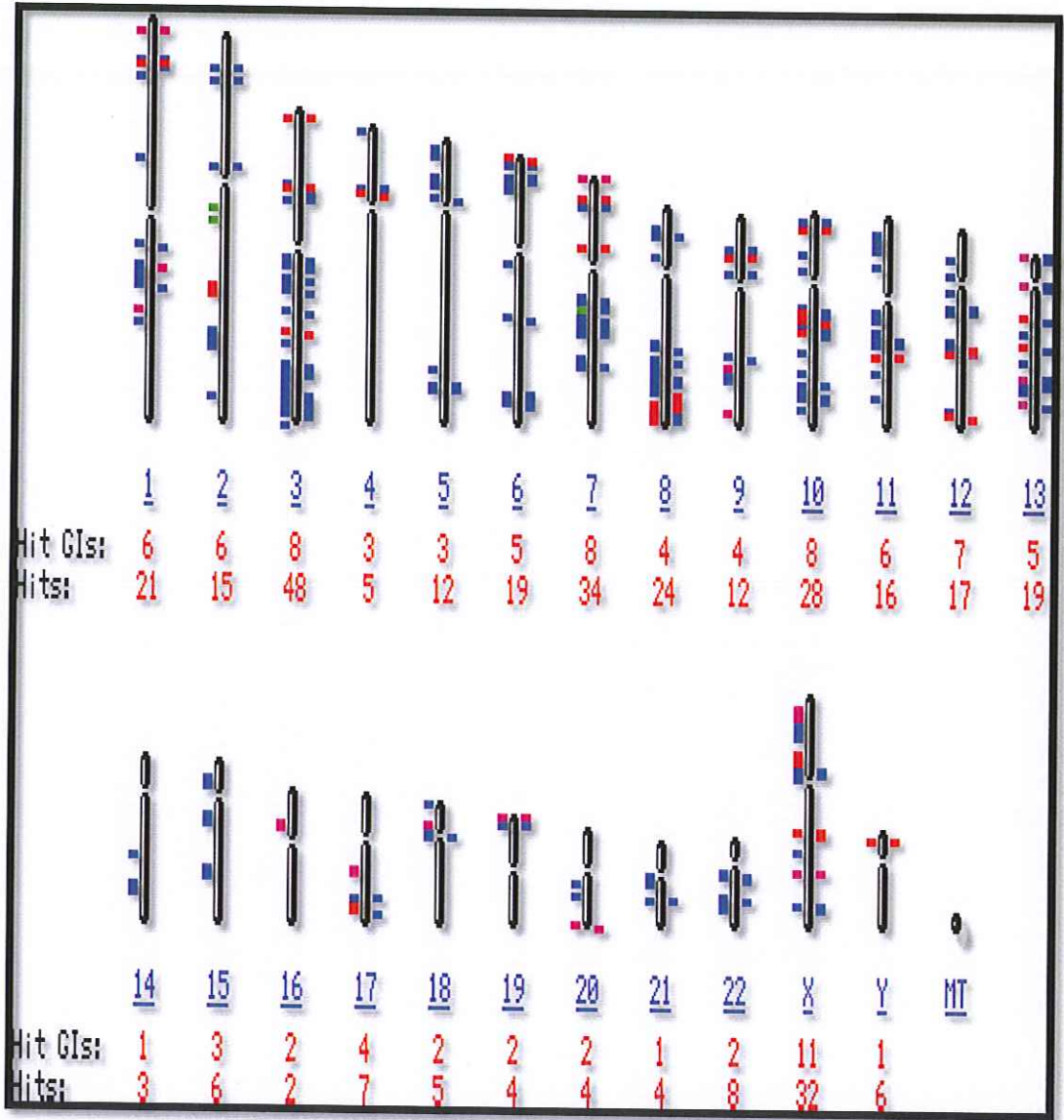
Şekil 3.11. Polimorfizmi çalışılan dizideki SNP bölgeleri ve bu bölgelerde bulunan düzenleyici elementler. SNP bölgelerindeki alellerden X kromozomuna ait olanlar “/” işaretinden önce, Y kromozomuna ait olanlara “/” işaretinden sonra yazılmıştır. Tahmini TATA kutuları diktörtgen içine alınmıştır (tahmini CAAT kutusuna bitişik olan TATA kutusu kalın diktörtgen içine alınmıştır). Her SNP’den sonra tespit edilen direk (aynı yönlü oklar) veya ters (zıt yönlü oklar) tekrarlar oval içerisine alınmıştır.

Çalışılan DNA bölgesinin 7000 nükleotid sağ ve sol tarafını kapsayan yaklaşık 15000 nükleotidlik bölge NCBI blast analizi ile incelendi. İncelenen bölgenin yaklaşık 250 nükleotit ilerisinde kısa DNA dizisinin bulunduğu gözlemlendi. Şekil 3.12’de NCBI blast analizi sonucu gösterilmektedir.



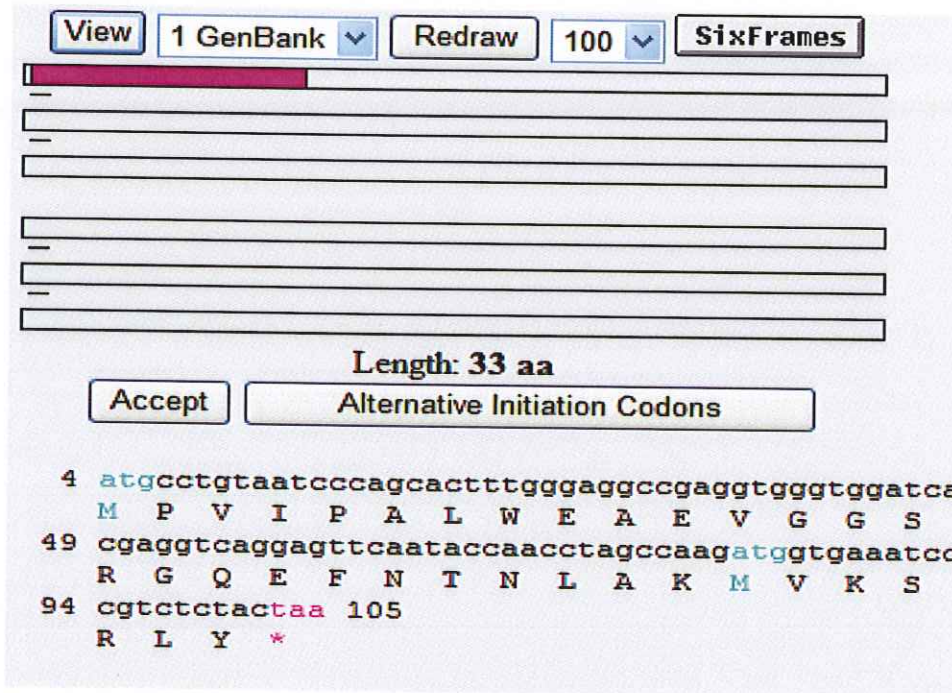
Şekil 3.12. Genel tarama (Blast Search) sonucu çalışılan DNA bölgesi ve kısa DNA dizilerin dağılımı

Yapılan taramada kısa DNA dizisinin çok sayıda görülmesi üzerine bu kısa DNA dizisinin kromozomlar üzerindeki yer veya yerlerini belirlemek amacıyla NCBI-Genome View grafiği incelendi. Şekil 3.13'te kısa DNA dizisinin kromozomlar üzerindeki yerleri NCBI-Genome View grafiği üzerinde gösterilmiştir. 5, 14, 15, 21, 22. kromozomlar hariç kalan tüm kromozomlarda en az bir kopyasının bulunduğu tespit edildi.



Şekil 3.13. NCBI Genome View grafiği üzerinde kısa DNA dizilerin yerleri (Kırmızı çizgi – pembe çizgi: kısa DNA dizileri)

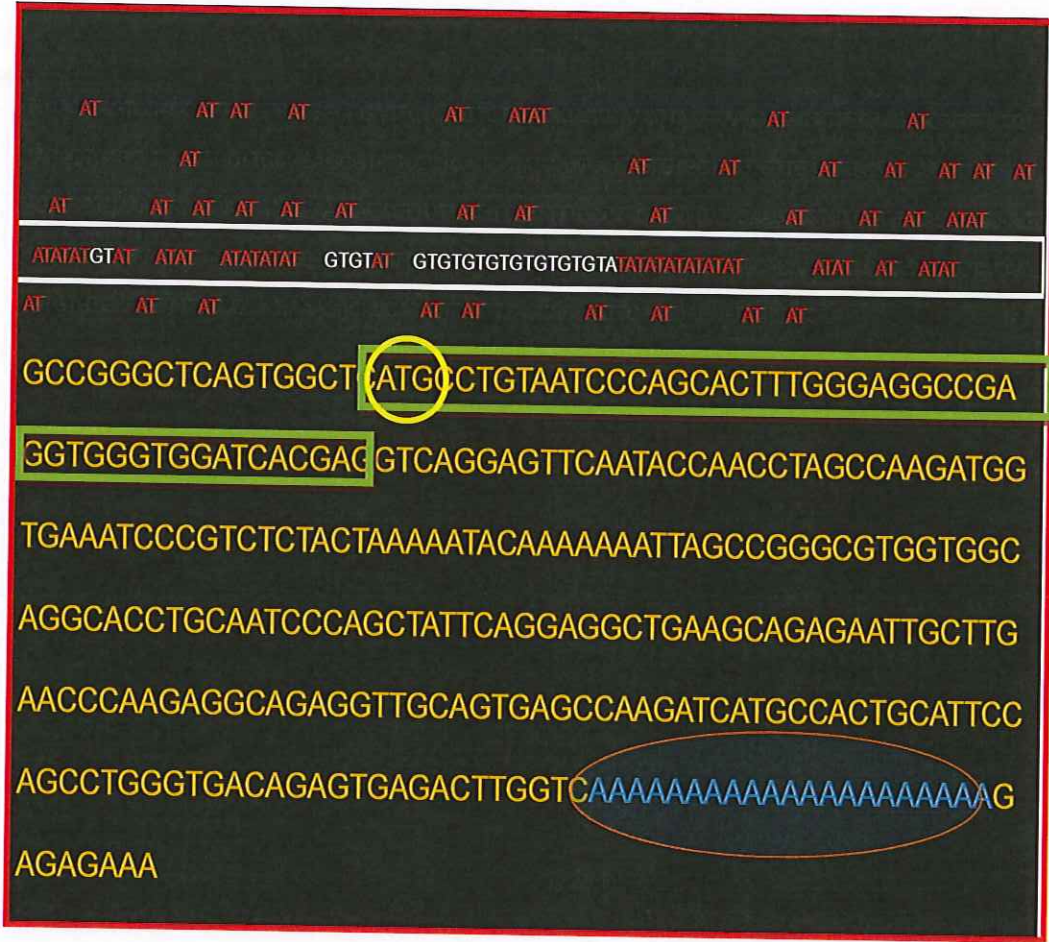
Biyoinformatik analizle incelenen kısa DNA dizisi ile çalışılan DNA bölgesi arasında (DNA bölgesinden yaklaşık 50 nükleotit ilerde) AT dinükleotit tekrarlarının olduğu görüldü. Şekil 3.14’te AT dinükleotit tekrarları gösterilmiştir. Tekrarlayan DNA veritabanında (www.repeatmasker.org) blast analizi yapıldığında bu tekrarların, “C (TA)_nSimple_repeat” adında bir basit tekrar elementine yaklaşık %87 aynılık gösterdiği tespit edildi.



Şekil 3.15. NCBI ORF Finder blast analiz sonucu

NCBI ORF Finder very bankasında yapılan blast analizi sonucu 300 bazlık dizi içerisinde bir ORF(Open Reading Frame, Açık Okuma Çerçevesi) bölgesi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.15'te ORF blast sonucu gösterilmiştir.

Bu basit tekrardan yaklaşık 180 nükleotit ileride yaklaşık 300 nükleotit uzunluğunda ve 5, 14, 15, 21, 22 hariç bütün kromozomlarda bir benzeri olan kısa DNA dizisinin NCBI-Blast analizi sonucunda herhangi bir fonksiyonel elemente veya gene benzerliği bulunamadı. Ancak 5'tarafında bu basit tekrarı bulundurması,ORF'ye sahip olması ve 3'ucundaki poli A kuyruğundan yola çıkarak tekrarlı DNA veri tabanında (www.repeatmasker.org) blast yapıldığında AluSx#SINE/Al adında bir tekrarlayan elemente (transpozona) yaklaşık %95 oranında aynılık gösterdiği tespit edildi. Şekil 3.16'da muhtemel transpozon dizisi, Şekil 3.17'de tekrarlı DNA veri tabanında yapılan blast analiz sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.16. Muhtemel transpozon dizisi (Kırmızı renk: AT dinükleoti tekrarları, yeşil renk: ORF, Mavi renk: Poli-A kuyruğu)

<http://www.repeatmasker.org>

file name: RM2sequpload_1240753382
sequences: 1
total length: 321 bp (321 bp excl N/X-runs)
GC level: 48.29 %
bases masked: 307 bp (95.64 %)

| | number of elements* | length occupied | Percentage of sequence |
|--------|---------------------|-----------------|------------------------|
| SINEs: | 1 | 307bp | 95.64 % |
| ALUs: | 1 | 307bp | 95.64 % |

AluSx#SINE/Al

Şekil 3.17. Muhtemel transpozonun tekrarlı DNA veri tabanında yapılan blast analiz sonuçları

4 TARTIŞMA

Bilimsel çalışmalar, insanın genetik yapısı ile sağlıklı yaşama potansiyeli arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bu ilişkinin en çarpıcı örnekleri bazı genlerdeki kalıtsal mutasyonlar sonucu ortaya çıkan hastalıklardır. Özellikle son yıllarda görülme sıklığı artan ve yaş, cinsiyet, etnik köken farkı gözetmeden herkesi etkileyebilen bir sağlık problemi haline gelen kanser olgusunun genetik nedenlere bağlı olduğu artık bilinmektedir. Kanser araştırmacıları ve onkologlar kanseri genetik, çevre ve yaşam tarzı (alkol, sigara) gibi birden fazla etkenin rol oynayabildiği çok faktörlü bir hastalık olarak tanımlamaktadır [123].

Kanser, belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu gen ifadesinin miktarında ve zamanlamasında meydana gelen değişiklikler veya genlerde polimorfizm sonucu ortaya çıkan hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur [124]. Kanser hücrelerinde oluşan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde ya da tek bir nükleotid düzeyindeki değişiklikler olup sonuçta gen ürünlerinin ya da aktivitelerinin değişimine neden olabilmektedir [124, 125]. Kanser hücresinde meydana gelen bu genetik değişiklikler, konakçı faktörleri ve tümör konakçı etkileşimi sonucunda tümöral kitle oluşur [125].

Allel çeşitliliği, toplumların genetik çeşitliliği olarak sayılmaktadır. Genellikle polimorfizm ve heterozigotluk genetik çeşitliliği tanımlamak için kullanılır. Tek nükleotit değişimlerini (varyasyonları, polimorfizmleri) içeren genler, toplumda %1'den daha fazla sıklıkta bulunan allel genler olarak tanımlanır [126]. İnsan genom dizilim çalışmaları her insan genomunda DNA'nın %99.9 benzerlik gösterdiğini kanıtlamıştır [127]. Geriye kalan %0.1'lik fark, bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur. Tek nükleotit değişimleri insan genomunda en çok bulunan (ortalama her 1000 nt'te bir) DNA dizi değişimleridir [128]. Diğer genetik polimorfizm tipleri; değişik uzunlukta ikili ya da üçlü nükleotit tekrarları ve DNA'da eksilme ya da artmaları içerir [129]. İster döngü düzenleyici molekül

isterse yüzlerce hücresel işlevden birinden sorumlu olan herhangi bir genin kodlayıcı bölgesindeki değişiklik, genin ürünü olan fenotipi etkiler. Genin ifadesi ise çoğunlukla genin promotor ya da enhancer gibi düzenleyici bölgeleri (cis elementlerdeki) ve bu bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörleri ve diğer yardımcı düzenleyici moleküllerle kontrol edilir [130].

En çok görülen polimorfizmler genomik DNA üzerindeki tek baz çiftinin değişmesi olan tek nükleotid polimorfizimleridir. Gen polimorfizm ardışıklığı kişiden kişiye değişmektedir. Verilere göre tek nükleotit polimorfizmi ortalama 1331 bazda 1 kez görülmektedir. Dolayısıyla bir kişi;

“3.2 milyar baz x 1 farklılık / 1331 baz =2.4 milyon baz”

oranında heterozigottur. Bu oranlar bireyler ve populasyonlar arasında değiştiği gibi, kromozomlar ve lokuslar arasında da değişmektedir. İki X kromozomunu, Y kromozomunu ve iki otozomal kromozomu farklı kişilerde karşılaştırdığımızda X, Y ve otozomal kromozomlarında sırasıyla her 2132, 6625, 1307 bazda bir tek nükleotit değişiminin görüldüğü karşımıza çıkmaktadır [131].

Akciğer kanserinde farklı gen polimorfizmlerinin etkileri araştırılmıştır. TGB β 1 polimorfizmi akciğer adenokarsinomunda kontrol grubuna göre daha sık izlenmiştir [132]. (TNF α) polimorfizmlerinden 308 A allelinin kanser gelişmesi ve ilerlemesinde, 238 A allelinin akciğer karsinomundan korunmada rolleri olduğu bildirilmiştir [133]. GSTP1 gen polimorfizminde ileri evre KHDAK olgularının sağkalım sürelerinde anlamlı artış saptanmıştır [56]. Siklin D1 A870G gen polimorfizmi sigaranın indüklediği akciğer kanser riskini de etkileyebilmektedir [134]. CDKI ailesi üyelerinden p16INK4A (CDKN2A) geninde tanımlanan A148T varyantı erken yaşta gelişen meme, malign melanom ve akciğer kanserleri ile ilişkilendirilmiştir [135]. Bir çalışmada DNA onarım mekanizmalarından biri olan nükleotit kesme-çıkarma onarımında görev alan XPC (Asp312Asn) ve XPD (Lys751Gln) genlerinin polimorfizmleri ile akciğer kanseri arasında bir ilişki bulunmuştur [136].

X kromozomunun farklı tipteki insan tümörlerinin malignite oluşumunda ve dolayısıyla kanser oluşumunda rolü olduğu ve bundan sorumlu çok fazla genin olduğu bilinmektedir [137]. X kromozomu kayıplarının akciğer, ovaryum, testis, sinir sistemini de içeren geniş skaladaki tümörler ile melanomlarda sitogenetik olarak bulunduğu kaydedilmiştir [138, 139]. Ayrıca meme, ovaryum, serviks ve papillar renal hücre karsinomlarında, X kromozomundaki kazanç ve delesyonların tümör gelişimi ve metastaz oluşumunda etkili olduğu da kaydedilmiştir [139]. Y kromozomu delesyonlarının da prostat kanseri, erkek meme kanseri ve pankreatik adenokarsinomlarda rolleri olduğu bildirilmiştir. Y kromozomu kayıplarının da akciğer kanserinde ve diğer bazı kanser tiplerinde sık gözlenen bir durum olduğu bildirilmiştir [140, 141]. Tüm bu çalışmalar ve mevcut çalışmamızda X ve Y kromozomlarındaki bu tür yapısal ve sayısal bozuklukların akciğer kanseri ile ilişkili tutulması, özellikle bu kromozomları hemizigot olarak taşıyan erkeklerde, bu kromozomlar üzerinde tümör oluşumu ile ilişkili genlerin bulunabileceğini göstermektedir [142, 143].

Çalışmamızda, X kromozomunun Xq21 bölgesinde Y kromozomunun da Yp11.2 bölgesinde bulunan yaklaşık 1500 nükleotit uzunluğundaki DNA dizisinin biyoinformatik ve moleküler analizi yapılmıştır.

Yapılan ön çalışmada mRNA'sı olmayan ve akciğer kanseri ile yüksek korelasyon gösteren bu bölgenin daha büyük popülasyonlardaki polimorfizmi ve akciğer kanseri ile korelasyonu analiz edilmiştir.

Xq21-Yp11.2 lokusundaki DNA dizisinin bir akciğer kanserojen aday geninin (TUSC2, Tumor Suppressor Candidate 2) en büyük ekzonuna %90 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. DNA bölgesinin blast analizinde çalışılan diziye ait bir mRNA veya EST (Expressed Sequence Tag) kaydına rastlanmamıştır. Bu durum 3. kromozomda (3p21.3) TUSC2 geninde bulunan DNA parçasının bir retrotranspozisyon sonucu X veya Y kromozomuna yerleşmiş olduğunu göstermektedir. RNA transkriptine (mRNA) benzeyen inaktif genomik sekanslara işlenen yalancı gen (processed pseudogene) adı verilmektedir DNA bölgesinin TUSC2 geninin mRNA'sına %90 benzerliğinin bulunması işlenen yalancı gen olduğunu göstermektedir [144]. X ve Y üzerinde ayrı ayrı alellerinin olması ve bu

alellerin sadece çalışmada belirtilen SNP'ler açısından farklı olması dikkat çekicidir. Daha önce bu bölgede yapılmış çalışmada bu SNP'lerin oluşturduğu iki haplotipten (alelden) biri (Y'de olanı) kanserli hastalarda daha çok görülmüştür.

Türk populasyonu üzerinde yapılan çalışmamızda 137 kanserli, 160 sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Örneklerden izole edilen genomik DNA'lar ile çalışılan dizinin çoğaltılması için PCR yapılmıştır. Daha önceki çalışmada sorunsuz PCR çoğaltması (amplifikasyon) yapacak şekilde optimize edilen Xq21 adlı primer setinin (Tablo 2.3) farklı bireylerden temin edilen genomik DNA örneklerinde bütün çaba ve kontrollü deneylere rağmen başarısız olması son derece beklenmedik bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Çünkü birbirinden bağımsız 60 kişide başarılı sonuç veren bir primer setinin başka bir grupta sıfır pozitif sonuç vermesi normal değildir. Ancak anormal de olsa böyle bir durum bir polimorfizm nedeniyle mümkün olabilir. Bu ihtimal üzerine XY664, XY927 ve XY929 olmak üzere 3 farklı primer seti dizayn edilmiştir (Şekil 3.1). XY664 adlı primer seti ile yapılan PCR tüm bireylerde (kanserli ve sağlıklı) başarılı sonuç vermiştir. XY927 ve XY929 primer setleri ile yapılan PCR reaksiyonları birbirleri ile değişken sonuç göstermiştir. XY927 primer seti ile yapılan PCR reaksiyonları pozitif sonuç verirken, aynı bireyin XY929 primer seti ile yapılan PCR reaksiyonları negatif sonuç vermiştir ya da tam tersi durum gözlenmiştir. Bunun üzerine yüksek polimorfizm varsayılarak (25 nükleotitten ve 29 nükleotitten oluşan) dizayn edilen XY889 primer setinin (Tablo 2.11) tamamen başarılı olması bu tahmini doğrulamış ve bu dizinin insan popülasyonlarına göre keskin değişimler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç DNA dizilerinin analizinde de ortaya çıkmıştır.

Daha önce yapılmış çalışmada DNA dizisinde bulunan haplotipin akciğer kanseri ile yüksek korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Y kromozomunda bulunan alel akciğer kanserli bireylerde sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek oranda bulunmuştur. Rastgele seçilen 12 sağlıklı erkek bireyden 8'i GG (G: sağlıklılarda daha çok görülen allel) genotipli, 4'ü de GT (T: kanserlilerde ve Y kromozomunda daha çok görülen allel) genotipli; 30 kanserli erkekte sadece 2 adet GG genotipine karşın 28 adet GT genotipi tespit edilmiştir. Yaptığımız daha kapsamlı çalışmada ise 50 sağlıklı erkek bireyin neredeyse tamamının (49/50) GT genotipine sahip olduğu

görülmüştür. Elde ettiğimiz DNA dizilerini daha önce yapılmış olan çalışma ile kıyasladığımızda korelasyonda ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir.

32 kanserli bayan, 105 kanserli erkek, 47 sağlıklı bayan ve 112 sağlıklı erkek olmak üzere toplam 296 bireyin dizisi arasında hiç bir tane TT (T: kanserli hastalarda ve Y kromozomunda daha çok görülen allel) genotipine rastlanmamış olması dikkat çekicidir. Bu durum T allelinin Y kromozomuna ait olması ile açıklanamaz. Çünkü 217 erkek bireyin 13 tanesinde GG genotipi tespit edilmiştir. 13 erkekte GG genotipinin bulunması bize X ve Y arasında bu bölge için parça değişimi (krossing over) olduğunu göstermiştir. Y kromozomunun rekombine olmayan bölgesinde krossing-over olduğu gözlenmesi son derece önemli bir sonuçtur. 217 erkek bireyde bir tane bile TT genotipinin rastlanmaması T allelinin letal olma ihtimalini ortaya koymaktadır.

DNA dizisi analiz edildiğinde promotor elementleri (TATA, CAAT) taşıdığı ve bu elementlerin SNP bölgelerinin yanında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu dizinin yine her SNP'den sonra en az bir adet ters tekrar taşıdığı ve SNP'lerin sağında veya solunda başka direk veya ters tekrarların olduğu da gözlemlenmiştir (Şekil 3.10). Bu elementlere promotor/enhansır dizilerinde sık rastlandığı bilinmektedir. Çalışılan DNA dizisine ait bir mRNA molekülü bulunmamasının yanı sıra promotor elementlerinin ve bu dizinin bir düzenleyici element ya da küçük RNA kodlayan bir bölge olma ihtimalini artırmıştır.

Bu dizinin deneysel olarak promotor ve enhansır potansiyellerinin araştırılması için gerekli çalışmalar başlatılmış ve şu an itibariyle X ve Y alellerinin lusiferaz ekspresyon vektörlerine klonlanması gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamalarda, elde edilen rekombinant vektörler tek tek insan hücre hatlarına aktarılacak ve lusiferaz aktivitelerinin (promotor aktivitelerinin) olup olmadığı tespit edilecektir. Bunun yanı sıra promotor analizi sonuçlarında T alelini taşıyan hücre hattının olumsuz etkilenmesi gibi muhtemel bir sonucun alınması durumunda letal alel hipotezinin ve dolayısıyla bu lokustaki polimorfizmin en azından akciğer kanseriyle alakası olduğunun destekleneceği söylenebilir.

Çalışılan DNA bölgesinin yaklaşık 50 nükleotit ilerisinde ve yaklaşık 86 nükleotit uzunluğundaki AT dinükleotit tekrarının, tekrarlayan DNA veritabanıyla (www.repeatmasker.org) karşılaştırıldığında “C (TA)_n#Simple_repeat” adında bir basit tekrar elementine yaklaşık %87 aynılık gösterdiği tespit edildi.(Tablo 3.3) Bu basit tekrardan yaklaşık 180 nükleotit ileride ise (çalışılan diziden yaklaşık 250 nükleotit ileride), yaklaşık 300 nükleotit uzunluğunda ve 5, 14, 15, 21, 22 hariç bütün kromozomlarda bir benzeri olan DNA dizisinin NCBI-Blast analizi sonucunda herhangi bir fonksiyonel elemente veya gene benzerliği bulunamadı. Ancak 5’ tarafında bu basit tekrarı bulundurması ve 3’ ucundaki poli A kuyruğundan yola çıkarak tekrarlı DNA veri tabanında (www.repeatmasker.org) blast yapıldığında AluSx#SINE/Al adında bir tekrarlayan elemente (transpozona) yaklaşık %95.64 oranında aynılık gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.15).

Bu çalışma sonucunda başta akciğer kanseri olmak üzere yaygın kanser tipleriyle korelasyon gösterdiği tespit edilen bir DNA dizisinin insan popülasyonlarına bağlı değişken bir polimorfizme sahip olduğu, kanserli bireylerde daha sık görülen alelin homozigot durumda muhtemelen letal olduğu, bu lokusun biyoinformatik açıdan transpozon, promotor ve / veya enhansır olma potansiyeli bulunduğu tespit edilmiş ve promotor/enhansır özelliği olup olmadığını tespit etmek için insan hücre hatlarında lusiferaz aktivite testi yapmak için gerekli deneyler başlatılmıştır.

4.1 Bu Çalışmanın Devamında Yapılması Gerekenler

Xq21-Yp11.2 lokusunun promotor potansiyelinin ve letal allel hipotezinin araştırılması amacıyla deneysel olarak başlatılan çalışmalarının tamamlanacaktır. Elde edilen veriler biyoinformatik ve moleküler analiz sonuçları ile karşılaştırılacaktır.

5 KAYNAKLAR

- [1] Koo, L. C., and Ho, J. H., "Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers", *International Journal Of Epidemiology*, 19 Suppl 1, S14 (1990).
- [2] "World Health Organization", *The World Health Report*, (2004)
- [3] " *Cancer*", *World Health Organization*, July (2008)
- [4] Hecht, S. S., "Tobacco smoke carcinogens and lung cancer", *Journal Of The National Cancer Institute*, 91, 1194 (1999).
- [5] Manuals., T. M., "*Lung Carcinoma: Tumors of the Lungs* ", (2007)
- [6] Thun, M. J., Hannan, L. M., Adams-Campbell, L. L., Boffetta, P., Buring, J. E., Feskanich, D., Flanders, W. D., Jee, S. H., Katanoda, K., Kolonel, L. N., Lee, I. M., Marugame, T., Palmer, J. R., Riboli, E., Sobue, T., Avila-Tang, E., Wilkens, L. R., and Samet, J. M., "Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies", *Plos Medicine*, 5, e185 (2008).
- [7] Catelinois, O., Rogel, A., Laurier, D., Billon, S., Hemon, D., Verger, P., and Tirmarche, M., "Lung cancer attributable to indoor radon exposure in france: impact of the risk models and uncertainty analysis", *Environmental Health Perspectives*, 114, 1361 (2006).
- [8] Lange, P., and Balk, S., "Asbestos-induced lung diseases", *Ugeskrift For Laeger*, 152, 3520 (1990).
- [9] Coyle, Y. M., Minahjuddin, A. T., Hynan, L. S., and Minna, J. D., "An ecological study of the association of metal air pollutants with lung cancer incidence in Texas", *Journal Of Thoracic Oncology: Official Publication Of The International Association For The Study Of Lung Cancer*, 1, 654 (2006).
- [10] BALCI, K., "Akciger Kanseri. Göğüs Hastalıkları", *Atlas Kitabevi- Konya (Dagıtım: Nobel Tıp Kitabevleri)*, 267-305, Bölüm 19 (1993).

- [11] Vaporciyan AA, N. J., Lee JS ve ark, "cancer medicine", *Hamilton, B.C.Decker Inc1227*, (2000).
- [12] Sherman, S., and Guidot, C. E., "The feasibility of thoracotomy for lung cancer in the elderly", *JAMA: The Journal Of The American Medical Association*, 258, 927 (1987).
- [13] Halilçolar H, T. D., Ertuğrul G ve ark. Epidemiyoloji. Akkoçlu A, Öztürk C, "Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım", *Toraks Kitapları, Bilimsel Tıp Yayınevi; Ankara,Sayı:1, 7-14,(1999)*
- [14] JD, M., " *Harrison's Principles of Internal Medicine*", McGraw-Hill, (2004)
- [15] Spiro, S. G., and Porter, J. C., "Lung cancer-where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment", *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 166, 1166, (2002).
- [16] Vaporciyan AA, K. M., Stevens CW, Komaki R, Jack A. Roth JA, "Cancer of the Lung (ch.92)", *in Cancer Medicine*, (2003)
- [17] Witschi, H., "A short history of lung cancer", *Toxicological Sciences: An Official Journal Of The Society Of Toxicology*, 64, 4 (2001).
- [18] Spiro, S. G., and Silvestri, G. A., "One hundred years of lung cancer", *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 172, 523 (2005).
- [19] "Primary Malignant Growths of the Lungs and Bronchi", *J Am Med Assoc*, LIX 2334, (1912)
- [20] FW, G., "History of cigarette smoking and lung cancer,smokinglungs.com., (2007)
- [21] Osann, K. E., "Epidemiology of lung cancer", *Current Opinion In Pulmonary Medicine*, 4, 198 (1998).
- [22] Shibuya, K., Mathers, C. D., Boschi-Pinto, C., Lopez, A. D., and Murray, C. J., "Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000", *BMC Cancer*, 2, 37 (2002).
- [23] Youlden, D. R., Cramb, S. M., and Baade, P. D., "The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends", *Journal Of Thoracic Oncology: Official Publication Of The International Association For The Study Of Lung Cancer*, 3, 819 (2008)

- [24] Sasco, A. J., Secretan, M. B., and Straif, K., "Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence", *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 45 Suppl 2, S3 (2004)
- [25] Doll, R., and Hill, A. B., "Lung cancer and other causes of death in relation to smoking; a second report on the mortality of British doctors", *British Medical Journal*, 2, 1071 (1956)
- [26] Welfare, U. D. o. H. E. a., "*Smoking and health: report of the advisory committee to the Surgeon General of the Public Health Service*, Washington", *US Government Printing Office*, (1964)
- [27] "Office of the Home Secretary, *Biographical Memoirs*. National Academy of Sciences.", (1976)
- [28] Silvestri, G. A., and Spiro, S. G., "Carcinoma of the bronchus 60 years later", *Thorax*, 61, 1023 (2006)
- [29] Scott, W. J., Howington, J., and Movsas, B., "Treatment of stage II non-small cell lung cancer", *Chest*, 123, 188S (2003)
- [30] Smythe, W. R., "Treatment of stage I non-small cell lung carcinoma", *Chest*, 123, 181S (2003).
- [31] Jemal, A., Tiwari, R. C., Murray, T., Ghafour, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E. J., and Thun, M. J., "Cancer statistics, 2004", *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 54, 8 (2004)
- [32] Murray, C. J., and Lopez, A. D., "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study", *Lancet*, 349, 1498 (1997)
- [33] "*National Lung Cancer Partnership: Lung Cancer in American Women*"
- [34] "Köktürk N, Yeğın D, Ulukavak Çiftçi T, Bilgin Mullaoglu S, Öztürk C. *Akciğer Kanserlerinde Epidemiyolojik Özellikler Yıllar İçinde Değişim Gösteriyor mu? Türk toraks dergisi*, Cilt 5, Sayı 3, Sayfa(lar) 137-142, (2004)
- [35] "Akkoçlu, Atilla. *Akciğer kanserleri*. Türk Toraks Derneği"
- [36] "Hazar, Armağan. *Akciğer kanserli hastalarda malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyi ölçümü ile oksidan-antioksidan dengenin araştırılması*. Uzmanlık tezi, (2006)

- [37] Vineis, P., Hoek, G., Krzyzanowski, M., Vigna-Taglianti, F., Veglia, F. Airoldi, L., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F. Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Palli, D., Krogh, V., Tumino R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Lund, E. E., Agudo A., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Cirera, L., Quiros, J. R. Berglund, G., Manjer, J., Forsberg, B., Day, N. E., Key, T. J., Kaaks, R. Saracci, R., and Riboli, E., "Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study", *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 6, 7 (2007)
- [38] "Pandey G. *Bhutan's smokers face public ban*" BBC,(2005)
- [39] "UN health agency calls for total ban on tobacco advertising to protect young. United Nations News service
- [40] "A Decade of Broken Promises: The 1998 State Tobacco Settlement Ten Years Later. Campaign for Tobacco-Free Kids,(1998)
- [41] Wang, S. S., and Samet, J. M., "Tobacco smoking and cancer: the promise of molecular epidemiology", *Salud Publica De Macxico*, 39, 331 (1997)
- [42] "Akkoçlu A, Öztürk C. ,"Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım" ,Ankara: Ankara:Bilimsel Tıp Yayınevi; s 17-26, (1999)
- [43] Palmarini, M., and Fan, H., "Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma,an animal model for lung cancer", *Journal OfThe National Cancer Institute*, 93, 1603 ,(2001)
- [44] "İtil, O., Haydaroğlu, A."Akciğer Kanserinde Epidemiolojisi ve Etiolojisi" Akciğer Kanserleri, Tanı ve Tedavi, İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 15-34, (2001)
- [45] "Göksel, Tuncay. ,"Akciğer kanseri",Türk Toraks Derneği yayınları.
- [46] "Bilgel, N., Engin, K., Özyardımcı, N., "Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi", 6.Uludağ Onkoloji Sempozyumu Kitabı ve Konsensus Raporu, Bursa Uludağ Üniversitesi Yayınları,35-38, (2001)
- [47] "Barış, İ.,"Asbestos and Erionite Related Chest Diseases",Ankara, Semih Ofset Mat.62-109, (1987).
- [48] Darnton, A. J., McElvenny, D. M., and Hodgson, J. T., "Estimating the number of asbestos-related lung cancer deaths in Great Britain from 1980 to 2000", *The Annals Of Occupational Hygiene*, 50, 29 (2006)

- [49] "<http://www.kanser.org/toplum/akanseri.php?content=2#content>".
- [50] "<http://www.toraks.org.tr/text.php3?id=494>".
- [51] Leroux, C., Girard, N., Cottin, V., Greenland, T., Mornex, J. F., and Archer, F., "Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep", *Veterinary Research*, 38, 211 (2007)
- [52] Cheng, Y. W., Chiou, H. L., Sheu, G. T., Hsieh, L. L., Chen, J. T., Chen, C. Y., Su, J. M., and Lee, H., "The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women", *Cancer Research*, 61, 2799 (2001)
- [53] Zheng, H., Abdel Aziz, H. O., Nakanishi, Y., Masuda, S., Saito, H., Tsuneyama, K., and Takano, Y., "Oncogenic role of JC virus in lung cancer", *The Journal Of Pathology*, 212, 306, (2007)
- [54] Giuliani, L., Jaxmar, T., Casadio, C., Gariglio, M., Manna, A., D'Antonio, D., Syrjanen, K., Favalli, C., and Ciotti, M., "Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma", *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 57, 273 (2007).
- [55] Schwartz, A. G., and Ruckdeschel, J. C., "Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease", *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 173, 16 (2006).
- [56] Houlston, R. S., "Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication Of The American Association For Cancer Research, Cosponsored By The American Society Of Preventive Oncology*, 8, 675 (1999)
- [57] Brundage, M. D., Davies, D., and Mackillop, W. J., "Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress", *Chest*, 122, 1037 (2002)
- [58] Hill, M. G., "Pulmonary disease and disorders" Postmus PE. Epidemiology of lung cancer In: Fishman AP, ed., New York, :1707-1717, (1998)
- [59] "HASTÜRK S, YÜKSEL M., "Akciger Kanseri" (1. basım). Bölüm1-2; sayfa: 4_86. Bilmedya Grup, (2000)

- [60] Travis, W. D., Travis, L. B., and Devesa, S. S., "Lung cancer", *Cancer*, 75, 191 (1995)
- [61] "Arinç S, Saltürk C, Ertuğrul M, Sulu E, Tuncer L, Nergis S, Selvi U. *Primer akciğer kanserinde bronkoskopik biyopsi ve torakotomi materyalleri arasında hücre tipi uyumu*. *Tuberk Toraks*;55(4):378-82, (2007)
- [62] "Köktürk N, Yeğın D, Ulukavak Çiftçi T, Bilgin Mullaoglu S, Öztürk C. *"Akciğer Kanserlerinde Epidemiyolojik Özellikler Yıllar İçinde Değişim Gösteriyor mu?"*, *Türk toraks dergisi*, Cilt 5, Sayı 3, Sayfa(lar) 137-142,(2004)
- [63] "Köktürk N, Ulukavak Çiftçi T, Yeğın D, Bilgin Mullaoglu S, Habeşoglu MA, Öztürk C. *"Akciğer Kanserli Olgularımızda Semptomatolojik, Radyolojik ve Endoskopik Bulguların Histopatolojik Bulgularla Birlikte Değerlendirilmesi"*, *Türk toraks dergisi*, Cilt 5, Sayı 3, Sayfa(lar) 143-147, (2004)
- [64] "Raz DJ, He B, Rosell R, Jablons DM., " *Bronchioloalveolar carcinoma: a review*", *Clin Lung Cancer*;7(5):313-22, 2006
- [65] "Arinç S, Saltürk C, Ertuğrul M, Sulu E, Tuncer L, Nergis S, Selvi U., " *Primer akciğer kanserinde bronkoskopik biyopsi ve torakotomi materyalleri arasında hücre tipi uyumu*", *Tuberk Toraks*;55(4):378-82,(2007)
- [66] Ho, W. L., Chang, J. W., Tseng, R. C., Chen, J. T., Chen, C. Y., Jou, Y. S., and Wang, Y. C., "Loss of heterozygosity at loci of candidate tumor suppressor genes in microdissected primary non-small cell lung cancer", *Cancer Detection And Prevention*, 26, 343, (2002).
- [67] "Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Mşmma JD., " Lung cancer, Principles and Practice", Second Edition. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins:s 74-77. 367-371,(2000)
- [68] Westbrook, T. F., Martin, E. S., Schlabach, M. R., Leng, Y., Liang, A. C., Feng, B., Zhao, J. J., Roberts, T. M., Mandel, G., Hannon, G. J., Depinho, R. A., Chin, L., and Elledge, S. J., "A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST", *Cell*, 121, 837 (2005)
- [69] Sanchez-Cespedes, M., "Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis", *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 40, 111 (2003)

- [70] Ito, I., Ji, L., Tanaka, F., Saito, Y., Gopalan, B., Branch, C. D., Xu, K., Atkinson, E. N., Bekele, B. N., Stephens, L. C., Minna, J. D., Roth, J. A., and Ramesh, R., "Liposomal vector mediated delivery of the 3p FUS1 gene demonstrates potent antitumor activity against human lung cancer in vivo", *Cancer Gene Therapy*, 11, 733 (2004)
- [71] Uramoto, H., Sugio, K., Oyama, T., Nakata, S., Ono, K., Yoshimastu, T., Morita, M., and Yasumoto, K., "Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance", *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 49, 55 (2005)
- [72] Kohno, T., and Yokota, J., "How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis?", *Carcinogenesis*, 20, 1403 (1999)
- [73] Toyooka, S., Ouchida, M., Jitsumori, Y., Tsukuda, K., Sakai, A., Nakamura, A., Shimizu, N., and Shimizu, K., "HD-PTP: A novel protein tyrosine phosphatase gene on human chromosome 3p21.3", *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 278, 671 (2000)
- [74] Kanzaki, H., Hanafusa, H., Yamamoto, H., Yasuda, Y., Imai, K., Yano, M., Aoe, M., Shimizu, N., Nakachi, K., Ouchida, M., and Shimizu, K., "Single nucleotide polymorphism at codon 133 of the RASSF1 gene is preferentially associated with human lung adenocarcinoma risk", *Cancer Letters*, 238, 128 (2006)
- [75] Zhang, S., Shao, K., Zhang, C. Y., Zhou, F., Wang, W., Xiong, M. H., and He, J., "[Analysis of suppressive role of RASSF1A gene at 3p21.3 in lung cancer cell line A549]", *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 85, 908 (2005)
- [76] <http://www.eurogentest.org/patient/info/public/unit6/patientsLeafletsTurkish/chromosomeTranslocationsTurkish.xhtml>
- [77] Shell, E. R., "X RATED.. (cover story)", *Discover*, 26, 42 (2005)
- [78] Barr, M. L., and Bertram, E. G., "A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis", *Nature*, 163, 676 (1949)
- [79] Lyon, M. F., "Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.)", *Nature*, 190, 372, (1961)

- [80] Buller, R. E., Sood, A. K., Lallas, T., Buekers, T., and Skilling, J. S., "Association between nonrandom X-chromosome inactivation and BRCA1 mutation in germline DNA of patients with ovarian cancer", *Journal Of The National Cancer Institute*, 91, 339, (1999)
- [81] Brown, C. J., "Skewed X-chromosome inactivation: cause or consequence?", *Journal Of The National Cancer Institute*, 91, 304 (1999)
- [82] Kristiansen, M., Langer, D, A., Knudsen, G. P., Weber, B. L., Dale, A. L., and Orstavik, K. H., "High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients", *Journal Of Medical Genetics*, 39, 30 ,(2002)
- [83] Li, G., Su, Q., Liu, G. Q., Gong, L., Zhang, W., Zhu, S. J., Zhang, H. L., and Feng, Y. M., "Skewed X chromosome inactivation of blood cells is associated with early development of lung cancer in females", *Oncology Reports*, 16, 859, (2006)
- [84] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=X>
- [85] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=search&term=human%20x%20chromosome>
- [86] ERDEMİR, A., "Genetic Diseases In Need Of Genetic Councelling and their Importance In Medical Ethics", *T Klin Tibbi Etik* 6, 73 ,(1998)
- [87] Haluk AKIN, H. Y., İbrahim TEKEDERELİ, "X-Linked Mental Retardation: A Case Report", *Firat Medicine*, 12, 135 ,(2007)
- [88] Sullivan, K. E., Mullen, C. A., Blaese, R. M., and Winkelstein, J. A., "A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome", *The Journal Of Pediatrics*, 125, 876 (1994)
- [89] Linet, M. S., Wacholder, S., and Zahm, S. H., "Interpreting epidemiologic research: lessons from studies of childhood cancer", *Pediatrics*, 112, 218 (2003)
- [90] Vianna, N. J., and Polan, A. K., "Immunity in Hodgkin's disease: importance of age at exposure", *Annals Of Internal Medicine*, 89, 550 (1978)
- [91] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=search&term=human%20y%20chromosome>
- [92] Ali, S., and Hasnain, S. E., "Genomics of the human Y-chromosome. 1. Association with male infertility", *Gene*, 321, 25 ,(2003)

- [93] Jegalian, K., Lahn, B., "Why the Y is So Weird, Scientific American" 42-47, (2001),
- [94] Quintana-Murci, L., Krausz, C., and McElreavey, K., "The human Y chromosome: function, evolution and disease", *Forensic Science International*, 118, 169 ,(2001)
- [95] Foresta, C., Moro, E., and Ferlin, A., "Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis", *Endocrine Reviews*, 22, 226 (2001)
- [96] Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Shen, P., Mirazn Lahr, M., Foley, R. A., Oefner, P. J., and Cavalli-Sforza, L. L., "The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations", *Annals Of Human Genetics*, 65, 43 (2001)
- [97] McElreavey, K., Krausz, C., Patrat, C., and Fellous, M., "Male infertility and microdeletions of the Y chromosome", *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*, 30, 405 (2002)
- [98] Rappold, G. A., "The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes", *Human Genetics*, 92, 315 (1993)
- [99] Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S. F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfig, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S. P., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Rozen, S., and Page, D. C., "The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes", *Nature*, 423, 825 ,(2003)
- [100] Tilford, C. A., Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L. G., Rosenberg, M., McPherson, J. D., Wylie, K., Sekhon, M., Kucaba, T. A., Waterston, R. H., and Page, D. C., "A physical map of the human Y chromosome", *Nature*, 409, 943 (2001)
- [101] Delbridge, M. L., and Graves, J. A., "Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes", *Reviews Of Reproduction*, 4, 101, (1999)
- [102] Lahn, B. T., and Page, D. C., "Functional coherence of the human Y chromosome", *Science (New York, N.Y.)*, 278, 675, (1997)

- [103] Sargent, C. A., Briggs, H., Chalmers, I. J., Lambson, B., Walker, E., and Affara, N. A., "The sequence organization of Yp/proximal Xq homologous regions of the human sex chromosomes is highly conserved", *Genomics*, 32, 200,(1996)
- [104] Foster, J. W., and Graves, J. A., "An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene", *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 91, 1927, (1994)
- [105] Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R., "A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2", *Development*, 122, 509 (1996)
- [106] Marshall Graves, J. A., "Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view", *Biology Of Reproduction*, 63, 667 (2000)
- [107] Sinclair, A. H., "New genes for boys", *American Journal Of Human Genetics*, 57, 998 (1995)
- [108] Kunej, T., Zorn, B., and Peterlin, B., "Y chromosome microdeletions in infertile men with cryptorchidism", *Fertility And Sterility*, 79 Suppl 3, 1559 (2003).
- [109] Bianchi, N. O., Richard, S. M., and Pavicic, W., "Y chromosome instability in testicular cancer", *Mutation Research*, 612, 172 (2006)
- [110] Lutke Holzik, M. F., Storm, K., Sijmons, R. H., D'Hollander, M., Arts, E. G., Verstraaten, M. L., Sleijfer, D. T., and Hoekstra, H. J., "Absence of constitutional Y chromosome AZF deletions in patients with testicular germ cell tumors", *Urology*, 65, 196 (2005)
- [111] Giwercman, A., von der Maase, H., and Skakkebaek, N. E., "Epidemiological and clinical aspects of carcinoma in situ of the testis", *European Urology*, 23, 104, (1993)
- [112] Benson, R. C., Jr., Beard, C. M., Kelalis, P. P., and Kurland, L. T., "Malignant potential of the cryptorchid testis", *Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic*, 66, 372 (1991)
- [113] Tiepolo, L., and Zuffardi, O., "Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm", *Human Genetics*, 34, 119 (1976)

- [114] Kovacs, G., Fuzesi, L., Emanuel, A., and Kung, H. F., "Cytogenetics of papillary renal cell tumors", *Genes, Chromosomes & Cancer*, 3, 249, (1991)
- [115] Brown, J. A., Takahashi, S., Alcaraz, A., Borell, T. J., Anderl, K. L., Qian, J., Persons, D. L., Bostwick, D. G., Lieber, M. M., and Jenkins, R. B., "Fluorescence in situ hybridization analysis of renal oncocytoma reveals frequent loss of chromosomes Y and 1", *The Journal Of Urology*, 156, 31 (1996)
- [116] Kabarowski, J. H., and Witte, O. N., "Consequences of BCR-ABL expression within the hematopoietic stem cell in chronic myeloid leukemia", *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 18, 399 (2000)
- [117] Abe, R., Raza, A., Preisler, H. D., Tebbi, C. K., and Sandberg, A. A., "Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. LIV. Near-tetraploidy in acute leukemia", *Cancer Genetics And Cytogenetics*, 14, 45 (1985)
- [118] Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F., "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells", *Nucleic Acids Research*, 16, 1215 (1988)
- [119] Rozen, S., and Skaletsky, H. J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, in *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Krawetz, S., and Misener, S., Eds., Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365 (2000)
- [120] Hall, T. A., "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", in *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, Vol. 41, pp. 95, (1999)
- [121] Nikolov, D. B., and Burley, S. K., "RNA polymerase II transcription initiation: a structural view", *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 94, 15 (1997)
- [122] Barber, D. R., Harmer, D.W., Coleman, R.A., "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.", *Physiol Genomics*, 21, 389 (2005)
- [123] Winer, E., Gralow, J., Diller, L., Karlan, B., Loehrer, P., Pierce, L., Demetri, G., Ganz, P., Kramer, B., Kris, M., Markman, M., Mayer, R., Pfister, D., Raghavan, D., Ramsey, S., Reaman, G., Sandler, H., Sawaya, R., Schuchter, L., Sweetenham, J., Vahdat, L., and Schilsky, R. L., "Clinical cancer advances 2008: major research advances in cancer treatment, prevention, and

screening--a report from the American Society of Clinical Oncology", *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology*, 27, 812 (2009)

- [124] Klug, S.W., Cummings, R.M., "Genetik Kavramlar", Öner, C., 2, Palme Yayıncılık, Ankara, (2002)
- [125] Köktürk, N., Kırısoglu, C.E., Öztürk, C., "Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi", *Solunum*, 5, 127, (2003)
- [126] Risch, N. J., "Searching for genetic determinants in the new millennium", *Nature*, 405, 847 (2000)
- [127] Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chisoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al., "Initial sequencing and analysis of the human genome", *Nature*, 409, 860 (2001)
- [128] Carlson, C. S., Eberle, M. A., Rieder, M. J., Smith, J. D., Kruglyak, L., and Nickerson, D. A., "Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans", *Nature Genetics*, 33, 518 (2003)
- [129] Cariou, A., Chiche, J. D., Charpentier, J., Dhainaut, J. F., and Mira, J. P., "The era of genomics: impact on sepsis clinical trial design", *Critical Care Medicine*, 30, S341 (2002)

- [130] Sefton, B. M., "Overview of protein phosphorylation", *Current Protocols In Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [Et Al.], Chapter 14, Unit 14.1* (2001)
- [131] Miller, R. D., Taillon-Miller, P., and Kwok, P. Y., "Regions of low single-nucleotide polymorphism incidence in human and orangutan xq: deserts and recent coalescences", *Genomics*, 71, 78 (2001)
- [132] Kang, H. G., Chae, M. H., Park, J. M., Kim, E. J., Park, J. H., Kam, S., Cha, S. I., Kim, C. H., Park, R. W., Park, S. H., Kim, Y. L., Kim, I. S., Jung, T. H., and Park, J. Y., "Polymorphisms in TGF-beta1 gene and the risk of lung cancer", *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 52, 1 (2006)
- [133] Lu, C., Spitz, M. R., Zhao, H., Dong, Q., Truong, M., Chang, J. Y., Blumenschein, G. R., Jr., Hong, W. K., and Wu, X., "Association between glutathione S-transferase pi polymorphisms and survival in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma", *Cancer*, 106, 441 (2006)
- [134] Gautschi, O., Hugli, B., Ziegler, A., Bigosch, C., Bowers, N. L., Ratschiller, D., Jermann, M., Stahel, R. A., Heighway, J., and Betticher, D. C., "Cyclin D1 (CCND1) A870G gene polymorphism modulates smoking-induced lung cancer risk and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients", *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 51, 303 (2006)
- [135] Debniak, T., Scott, R. J., Huzarski, T., Byrski, T., Rozmiarek, A., Debniak, B., GÅ³rski, B., Cybulski, C., Medrek, K., Mierzejewski, M., Masojc, B., Matyjasik, J., ZÅ,owocka, E., Teodorczyk, U., Lener, M., Klujczo-Grabowska, E., Nej-WoÅ,osiak, K., Jaworowska, E., Oszutowska, D., SzymaÅ,ska, A., SzymaÅ,ska, J., Castaneda, J., van de Wetering, T., Suchy, J., Kurzawski, G., Oszurek, O., Narod, S., and Lubinski, J., "CDKN2A common variant and multi-organ cancer risk--a population-based study", *International Journal Of Cancer. Journal International Du Cancer*, 118, 3180 (2006)
- [136] LApez-Cima, M. F., GonzAlez-Arriaga, P., GarcÍa-Castro, L., Pascual, T., MarrÍn, M. G., Puente, X. S., and TardÍn, A., "Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of northern Spain", *BMC Cancer*, 7, 162 (2007)
- [137] Ross, M. T., Grafham, D. V., Coffey, A. J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G. R., Burrows, C., Bird, C. P., Frankish, A., Lovell, F. L., Howe, K. L., Ashurst, J. L., Fulton, R. S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M. C., Hurles, M. E., Andrews, T. D., Scott, C. E., Searle, S., Ramsay, J.,

- Whittaker, A., Deadman, R., Carter, N. P., Hunt, S. E., Chen, R., Cree, A., Gunaratne, P., Havlak, P., Hodgson, A., Metzker, M. L., Richards, S., Scott, G., Steffen, D., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Ainscough, R., Ambrose, K. D., Ansari-Lari, M. A., Aradhya, S., Ashwell, R. I. S., Babbage, A. K., Bagguley, C. L., Ballabio, A., Banerjee, R., Barker, G. E., Barlow, K. F., Barrett, I. P., Bates, K. N., Beare, D. M., Beasley, H., Beasley, O., Beck, A., Bethel, G., Blechschmidt, K., Brady, N., Bray-Allen, S., Bridgeman, A. M., Brown, A. J., Brown, M. J., Bonnin, D., Bruford, E. A., Buhay, C., Burch, P., Burford, D., Burgess, J., Burrill, W., Burton, J., Bye, J. M., Carder, C., Carrel, L., Chako, J., Chapman, J. C., Chavez, D., Chen, E., Chen, G., Chen, Y., Chen, Z., Chinault, C., Ciccodicola, A., Clark, S. Y., Clarke, G., Clee, C. M., Clegg, S., Clerc-Blankenburg, K., Clifford, K., Cobley, V., Cole, C. G., Conquer, J. S., Corby, N., Connor, R. E., David, R., Davies, J., Davis, C., Davis, J., Delgado, O., DeShazo, D., et al., "The DNA sequence of the human X chromosome", *Nature*, 434, 325 (2005)
- [138] El-Naggar, A. K., Dinh, M., Tucker, S. L., Swanson, D., Steck, K., and Vielh, P., "Numerical chromosomal changes in DNA hypodiploid solid tumors: restricted loss and gain of certain chromosomes", *Cytometry*, 37, 107 (1999)
- [139] Bottarelli, L., Azzoni, C., Necchi, F., Lagrasta, C., Tamburini, E., D'Adda, T., Pizzi, S., Sarli, L., Rindi, G., and Bordi, C., "Sex chromosome alterations associate with tumor progression in sporadic colorectal carcinomas", *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research*, 13, 4365 (2007)
- [140] Wada, M., Yokota, J., Mizoguchi, H., Terada, M., and Sugimura, T., "Y chromosome abnormality in human stomach and lung cancer", *Japanese Journal Of Cancer Research: Gann*, 78, 780 (1987)
- [141] Hunter, S., Gramlich, T., Abbott, K., and Varma, V., "Y chromosome loss in esophageal carcinoma: an in situ hybridization study", *Genes, Chromosomes & Cancer*, 8, 172 (1993)
- [142] Dave, B. J., Risin, S. A., Spitz, M. R., and Pathak, S., "Fluorescent in situ hybridization analysis in blood lymphocytes of lung cancer patients", *Anticancer Research*, 16, 1187 (1996)
- [143] Yamaki, H., Sasano, H., Ohashi, Y., Shizawa, S., Shineha, R., Satomi, S., and Nagura, H., "Alteration of X and Y chromosomes in human esophageal squamous cell carcinoma", *Anticancer Research*, 21, 985 (2001)

- [144] Richardson, M. P., Braybrook, C., Tham, M., Moore, G. E., and Stanier, P., "Molecular cloning and characterization of a highly conserved human 67-kDa laminin receptor pseudogene mapping to Xq21.3", *Gene*, 206, 145 (1998)