

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERLİ HASTALARDA CYP19 GENİ
KODON 39 Trp/Arg POLİMORFİZMİNİN VE GENOTİP
DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Evrim GÜRTUNÇ

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Mülkiye KASAP

ADANA/27.08.2007

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERLİ HASTALARDA CYP19 GENİ
KODON 39 Trp/Arg POLİMORFİZMİNİN VE GENOTİP
DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Evrim GÜRTUNÇ

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Mülkiye KASAP

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2006YL2 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez no:

ADANA/27.08.2007

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Meme Kanseri Hastalarda CYP19 Geni Kodon 39 Trp/Arg Polimorfizminin ve Genotip Dağılımının Araştırılması” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27.08.2007

Prof. Dr. Mülkiye KASAP
Çukurova Üniversitesi

Prof. Dr. Halil KASAP
Çukurova Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Gürhan SAKMAN
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulununtarih vesayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışmalarımızda bize destek veren ve çalışma materyalinin sağlanmasında yardımcı olan Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Cem Kaan PARSAK'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Gerek laboratuvar, gerekse ders aşamasında her türlü desteklerini esirgemedikleri için, Uz. Dr. Ayfer PAZARBAŐI'na ve Öğr. Gör. Dr. Ali İrfan GÜZEL'e teşekkür ediyorum.

Beni bu günlere getiren aileme manevi desteklerini her zaman hissettirdikleri için çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa Numarası
Kabul ve Onay	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGE ve TABLOLAR DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. CYP19 Geni	4
2.1.1. Aromataz	5
2.2. Östrojen Biyosentezi	6
2.3. Meme Kanseri	10
2.3.1. Kalıtsal ve Sporadik Meme Kanserinin Genetik Farklılıkları	13
2.3.1.1. Kalıtsal Meme Kanseri	14
2.3.1.2. Sporadik Meme Kanseri	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gereç	17
3.1.1. Biyolojik Materyal	17
3.1.2. Kimyasal Maddeler	17
3.1.3. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	18
3.2. Yöntem	18
3.2.1. DNA İzolasyonu	19
3.2.1.1. Doymuş Tuz Çözeltisiyle Çöktürme	19
3.2.1.2. İzolasyon Kiti (E.Z.N.A. Blood DNA Isolation Kit) ile DNA	20

	Eldesi	
3.2.2.	Genotiplendirme	21
3.2.2.1.	Gen Bölgesinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primerler	21
3.2.2.2.	PCR Amplifikasyonu	23
3.2.2.3.	PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Yorumlanması	25
3.2.2.4.	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR Ürünlerinin Kesimi ve Görüntülenmesi	26
4.	BULGULAR	29
5.	TARTIŞMA	35
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	36
7.	KAYNAKLAR	37
8.	EKLER	42
EK.1	Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Yöntemler	42
1.1.	Eritrosit Lizis Tamponu	42
1.2.	Fizyolojik Tampon	42
1.3.	TE-9	43
1.4.	SDS Solüsyonu	43
1.5.	NaCl Solüsyonu	43
1.6.	TE Tamponu	43
EK.2	DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Ölçülmesi	43
EK.3	PCR Amplifikasyonu	44
3.1.	Multipleks PCR	44
EK.4	Agaroz Jel Elektroforezi	45
4.1.	1X TBE Tamponu	48
4.2.	Ethidium Bromid (EtBr) Solüsyonu	48
4.3.	6X yükleme tamponu	49
EK.5	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi	49
5.1.	Acil Restriksiyon Endonükleaz Enzimi	50
9.	ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	CYP19 geninin genomik organizasyonu ve dokuya özgü promotorların gen üzerindeki lokalizasyonları.	4
Şekil 2.	Alternatif kesim (alternative splicing). Genin birden fazla transkript oluşturma sonucu aynı genden farklı proteinlerin sentezlenmesi.	5
Şekil 3.	Östrojenik aktivite gösteren bileşikler.	6
Şekil 4.	Östrojen biyosentezi ve biyosentezde rol alan genler.	8
Şekil 5.	Östrojen metabolizması.	9
Şekil 6.	Meme kanseri oluşumuna ve ilerleyişine katılan faktörler ile açıklanabilecek olası çok aşamalı karsinogenez modeli.	12
Şekil 7.	Meme kanserinin sınıflandırılması ve görülme sıklıkları.	14
Şekil 8.	Hasta DNA'larından (H1-H20) elde edilen 427bp. uzunluğundaki amplifikasyon ürünleri (common bölge).	30
Şekil 9.	Hasta DNA'larından (H1-H4), 264bp. uzunluğundaki C alleli ve 200bp. uzunluğundaki T allele ait primerler kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünleri.	31
Şekil 10.	Hasta DNA'larından (H21-H29) elde edilen amplifikasyon ürünleri. TT, TC ve CC genotiplerine ait 4 primer birlikte kullanılarak yapılan multipleks PCR görüntüleri.	31
Şekil 11.	Kontrol grubu (K1-K8) DNA'larından elde edilen amplifikasyon ürünleri. TT, TC ve CC genotiplerine ait 4 primer birlikte kullanılarak yapılan multipleks PCR görüntüleri.	32
Şekil 12.	PCR ürünlerinin (H4, H11, H19, H21, H30, H46, H49, H58, H61, H64) Aci I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri.	33
Şekil 13.	PCR ürünlerinin (H65, H69, H72, H74, H75, K1, K2, K3, K4, K5) Aci I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.	Çeşitli ülkelerde ve dünyada kadınlarda en sık görülen ve en çok ölüme neden olan kanser türleri	10
Çizelge 2.	CYP19 geninin 427 bç'lik common bölgesi için kullanılan primerler ve amplifikasyon bölgesini gösteren nükleotid dizisi. Dizide common bölge koyu harflerle, primerler ise altı çizili olarak gösterilmiştir.	21
Çizelge 3.	T alleli amplifikasyonu için kullanılan primerler ve 200 bç'lik amplifikasyon bölgesini gösteren nükleotid dizisi. Dizide amplifikasyon bölgesi koyu harflerle, primerler altı çizili, kodon 39 büyük harflerle gösterilmiştir.	22
Çizelge 4.	C alleli amplifikasyonu için kullanılan primerler ve 264 bç'lik amplifikasyon bölgesini gösteren nükleotid dizisi. Dizide amplifikasyon bölgesi koyu harflerle, primerler altı çizili, kodon 39 büyük harflerle gösterilmiştir.	22
Çizelge 5.	Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu (Multipleks PCR)	23
Çizelge 6.	Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu	24
Çizelge 7.	Amplifikasyon sonunda beklenen ampikon büyüklükleri	26
Çizelge 8.	Acil enziminin gerçekleştirdiği kesimin reaksiyon koşulları ve kesim bölgesi	27
Çizelge 9.	Acil enziminin gerçekleştirdiği kesimin common bölge üzerinde gösterimi. Dizide common bölge koyu harflerle, kesim bölgesi büyük harflerle gösterilmiştir.	27
Çizelge 10.	Kesim sonucu farklı genotiplerde beklenen bant büyüklükleri	28
Çizelge 11.	Hasta ve kontrol grubunda yaş, sigara, alkol kullanımı dağılımı ve yüzdeleri.	29
Çizelge 12.	Kontrol ve hasta gruplarının yaş, klinik özellik ve genotip dağılımı	34
Çizelge 13.	Agoroz konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri.	46
Çizelge 14.	Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimi, özellikler ve çalışma şartları	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
Arg	Arjinin
bç	Baz çifti
C	Sitozin
°C	Derece santigrat
Cys	Sistein
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
E1	Östron
E2	17β-östradiol
E3	Östriol
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	Etidium Bromid
G	Guanin
Glu	Glutamat
H	Hasta
K	Kontrol
Kb	Kilo baz
mg	Miligram
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mRNA	Elçi Ribo Nükleik Asit
µg	Mikrogram
NaCl	Sodyum Klorür
OD	Optik Yoğunluk

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

PAHs	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCR	Polimeraz Zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribo Nükleik Asit
Q	Kromozomun uzun kolu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-Edta
Tm	Erime ısısı
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
U	Ünite

ÖZET

MEME KANSERLİ HASTALARDA CYP19 GENİ KODON 39 Trp/Arg POLİMORFİZMİNİN VE GENOTİP DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI

Meme kanseri, meme hücrelerinin anormal çoğalma gösterdikleri genetik bir hastalıktır.

Meme kanseri için risk faktörlerinin çoğu östrojen seviyesindeki artışa ya da östrojene uzun süre maruz kalma ile ilişkilidir. Östrojen biyosentezinde ve östrojenin metabolitlerine ve ürünlerine dönüşümünde rol alan polimorfik genler, sporadik meme kanseri gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar.

15q21.2'de lokalize olmuş CYP19 geni, östrojen biyosentezinde önemli rolü olan, androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizleyen, aromataz enzimini kodlar. Bu gendeki herhangi bir genetik değişiklik, aromataz aktivitesinde ve östrojen seviyesinde değişikliğe yol açabilir. CYP19 geninde meme kanseriyle ilişkili olduğu düşünülen pek çok polimorfizm araştırılmaktadır.

Bu çalışma meme kanseri riski ile CYP19 geni Kodon 39 Trp/Arg polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere planlanmıştır. Çalışmamızda meme kanseri tanısı konularak ameliyat edilmiş olan hastalar deney grubunu, kanser tanısı almamış olanlar kontrol grubunu oluşturmuştur. Bu kişilerin kanlarından DNA izole edildikten sonra bir çifti C (Arg) alleli için diğer çifti T (Trp) alleli için olmak üzere 2 çift primer ile PCR gerçekleştirilmiş ve genotipleme yapılmıştır. Japon kadınlarda yapılan çalışmada varyant Arg allelinin homozigot ve heterozigot taşıyıcılarının özellikle premenapozal kadınlar arasında önemli oranda artmış meme kanseri riski sergiledikleri bildirilmiştir. Ancak çalışmamızda hem kontrol grubunda hem de hasta grubunda ve özellikle aile öyküsü olan hastalarda da TT genotipi gözlenmektedir.

Anahtar Sözcükler: Aromataz, CYP19 geni, Meme kanseri, Östrojen biyosentezi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF POLIMORPHISM OF CODON 39 Trp/Arg, GENE CYP19 AND GENOTYPE DISTRIBUTION AMONG PATIENTS WITH BREAST CANCER

Breast cancer is a genetic disease where breast cells proliferate abnormally.

Most of the risk factors for breast cancer relate to the increased level or prolonged exposure to estrogen. The polymorphic genes, involved in estrogen biosynthesis and conversion of the estrogen metabolites and products, play an important role in the development of sporadic breast cancer.

CYP19 gene, localized at chromosome 15q21.2, encodes aromatase, an important enzyme for estrogen biosynthesis, catalyses the conversion of androgens to estrogens. Any genetic variation at this gene, may alter the aromatase activity and estrogen level. Many gene polymorphisms of CYP19 gene are under inspection, as it is thought to be related to breast cancer potentially.

This study was planned to investigate the relationship between breast cancer risk and CYP19 gene codon 39 Trp/Arg polymorphism. Here experimental groups were chosen among the patients who had been surgically operated and histologically confirmed and the controls were not prognosed as breast cancer. After DNA isolation, genotyping was conducted by PCR using two pairs of primers; one pair for T allele (Trp), and one pair for C allele (Arg). It was reported that in Japanese women homozygous and heterozygous carriers of the variant Arg allele showed a significantly increased risk for breast cancer among premenopausal stages. In our study only TT genotype was found in both control and experimental groups.

Key words: Aromatase, CYP19 gene, Breast cancer, Estrogen biosynthesis.

1. GİRİŞ

Meme kanseri, meme dokusunda, normal hücre davranışını düzenleyen mekanizmaların bozulması ve buna bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması sonucu oluşan bir hastalıktır^{1,2}.

Tüm meme kanseri vakalarının %70-80'ini oluşturan sporadik meme kanseri için risk faktörlerinin çoğu östrojen seviyesindeki artışla ya da östrojene uzun süre maruz kalma ile ilişkilidir^{1,2,3}.

Sporadik kanserlerle yapılan çalışmalarda en çok üzerinde durulan nokta kanser oluşumunda eksojen ve endojen karsinojenler ve bunların sebep olduğu genetik değişikliklerdir. Kanser gelişimine katkıda bulunan bir diğer özellik ise düşük penetranslı genlerdeki polimorfizmler ve mutasyonlara bağlı olarak oluşan genetik değişikliklerdir. Örneğin, östrojen biyosentezi ve metabolizmasında rol alan genler, meme kanserinin gelişimi için, düşük penetranslı kanser yatkınlık genleridir. Bu genlerde meydana gelen polimorfizmler, tıbbi ve yaşamsal faktörlerle birlikte sporadik meme kanseri için yüksek risk oluşturmaktadırlar^{1,3,4}.

Östrojen biyosentezinde ve östrojenin metabolitlerine ve ürünlerine dönüşümünde rol alan polimorfik genler, meme kanserine bireysel yatkınlıkla yakından ilişkilidir. Bu genlerden CYP19, sporadik meme kanserinin moleküler yapısının anlaşılması için en çok araştırılan genlerdendir^{1,2,4,5,6}.

15. kromozom üzerinde lokalize olan CYP19 geni, normal meme epitel hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmasının düzenlenmesinde rol alan östrojen hormonunun biyosentezinde, C19 androjenlerinin C18 östrojenlerine dönüşümünü katalizleyen sitokrom P450 aromataz enzimini kodlar, bu enzim östrojen biyosentezinde son basamaklarda rol oynar. Bu lokustaki genetik varyasyon, genin ve aromatazın aktivitesini değiştirir^{3,4,6}.

Artmış seviyedeki östrojene uzun süre maruz kalmak, meme kanserinde önemli bir risk faktörü olduğu için, östrojen biyosentezinde önemli rolü olan CYP19 geninin, meme kanserine bireysel yatkınlıkla yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir⁴.

CYP19 geninde, meme kanseriyle ilişkisi olduğu düşünülen ve en çok çalışılan mutasyonlar; intron 4 ve intron 5'de polimorfik (TTTA)_n tekrarları, Trp³⁹Arg, Arg²⁶⁴Cys, Arg⁴³⁵Cys, Cys⁴³⁷Tyr ve Arg³⁶⁵Glu mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar aromataz aktivitesinde değişikliğe neden olan, genin farklı allellerinin meydana

gelmesine sebep olmakta ve böylece östrojen biyosentez yolunda ve östrojen seviyesinde farklılıklara yol açmaktadırlar^{6,7,8,9,10,11}.

Günümüzde meme kanseri gelişiminin genetik modelinde hala belirsizlikler bulunmaktadır. Bir insanda, tek bir kanser hücresinde birkaç yüz genin ekspresyonunun değiştiği tahmin edilmekte olup hangi mutasyonların kanserin ilk basamaklarını oluşturduğunu belirlemek oldukça zordur. Hücresel düzeyde kanserin gelişimi çok basamaklı bir olaydır. Klinik ve histopatolojik olarak meme kanserinde tümörün oluşumundan metastaza kadar çeşitli basamaklar tanımlanmıştır^{1,5,12}.

CYP19'daki kodon 39 Trp/Arg polimorfizminin, sadece Japon kadınlarında araştırılmış ve varyant Arg allelinin, geç yaşta gebelik yaşamış ve premenapozal evredeki, homozigot ve heterozigot taşıyıcılarda meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir⁹. Türkiye'de ve hatta diğer ülkelerde de bu polimorfizm açısından meme kanserli hastalarda bir genotiplendirmeye rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, meme kanseri riski ile CYP19 geni kodon 39 Trp/Arg polimorfizmi arasındaki ilişkinin belirlenmesi, genotip dağılımının araştırılması ve allel sıklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

Meme kanseri, meme hücrelerinin anormal çoğalma gösterdikleri genetik bir hastalıktır. Tek bir hastalık gibi görünse de, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalıktır ve hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir. Çevreyle, yaşam biçimiyle ve kalıtımla ilişkilidir^{1,3,5,12}.

Meme kanseri gelişiminin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Başlaması, protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanan genetik değişiklikler başta olmak üzere genetik hasarlarla olmaktadır. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu bu çok basamaklı gelişimde muhtemelen erken meydana gelen olaylardır. Bunları daha sonra kontrolsüz hücre bölünmesi ve/veya programlanmış hücre ölümünün bozulması takip eder^{1,3,5}.

Çok basamaklı tümör gelişiminin klasik modelinde, ilk olarak normal bir epitel hücre premalignant atipik hücreye dönüşür. Daha sonra klonal büyüme ve gelişme sonucu premalignant lezyon oluşur. Bir süre sonra lezyon invaziv hale gelir. Vücuda yayılmaya başlar, immün sistemin etkisinden kurtulduktan sonra metastaz yapar. İnvaziv meme kanserine doğru ilerlemeyi haber veren biyolojik ve genetik anormalliklerin tanımlanması ile ilerleme olmadan tanının konulmasını amaçlanmaktadır^{1,3,12}.

Mutasyona uğramış formları meme kanseri riskini arttıran genlere meme kanseri yatkınlık genleri adı verilir. Bu genlerin farklı allelleri kanserin ailevi formlarında olduğu gibi sporadik kanserlerde de önemli rol oynayabilir. Meme kanserine yatkınlık steroid hormonların ve karsinojenlerin metabolizmasında rol alan genlerdeki (CYP19, CYP17, NAT1, NAT2) polimorfizm çeşitliliği ile de ilişkilidir. Meme kanseriyle doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili çok sayıda gen tanımlanmıştır^{3,4,5,13}.

Kadın meme kanserlerinde bilinen asıl risk faktörleri, artmış seviyelerdeki östrojene uzun süre maruz kalmayla ilişkilidir. Endojen ya da ekzojen östrojenlerin neden olduğu artmış hücre bölünmesi, hücre sayısını ve dolayısıyla mutasyonların gerçekleşme olasılığını arttırmaktadır. Son çalışmalarda östrojen biyosentezinde (CYP17, CYP19, 17 β -HSD) ve östrojenin metabolitlerine ve ürünlerine dönüşümünde

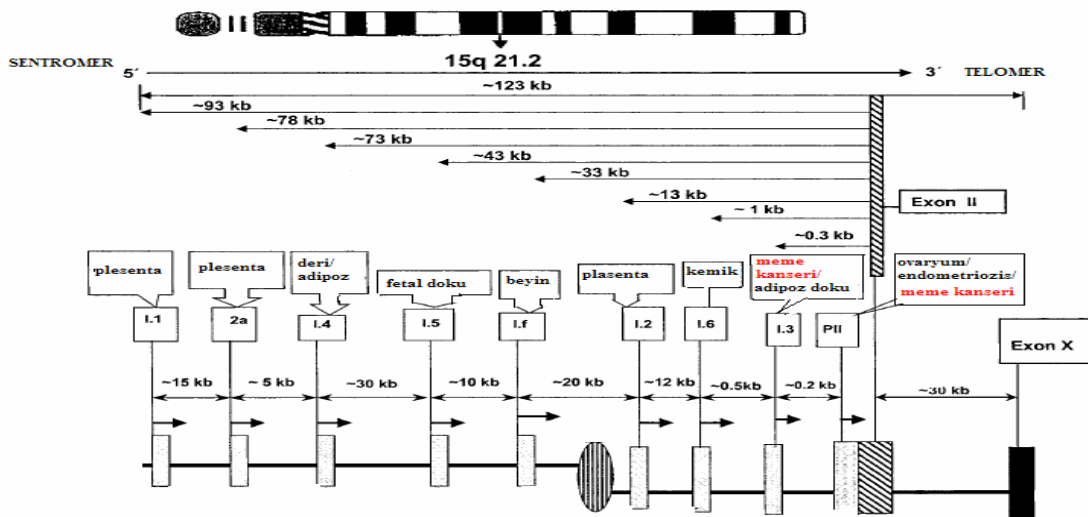
(COMT, CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1) rol alan polimorfik genlerin, meme kanserine bireysel yakınlıkla yakından ilişkisi olduğu üzerinde durulmaktadır⁴.

2.1. CYP19 GENİ

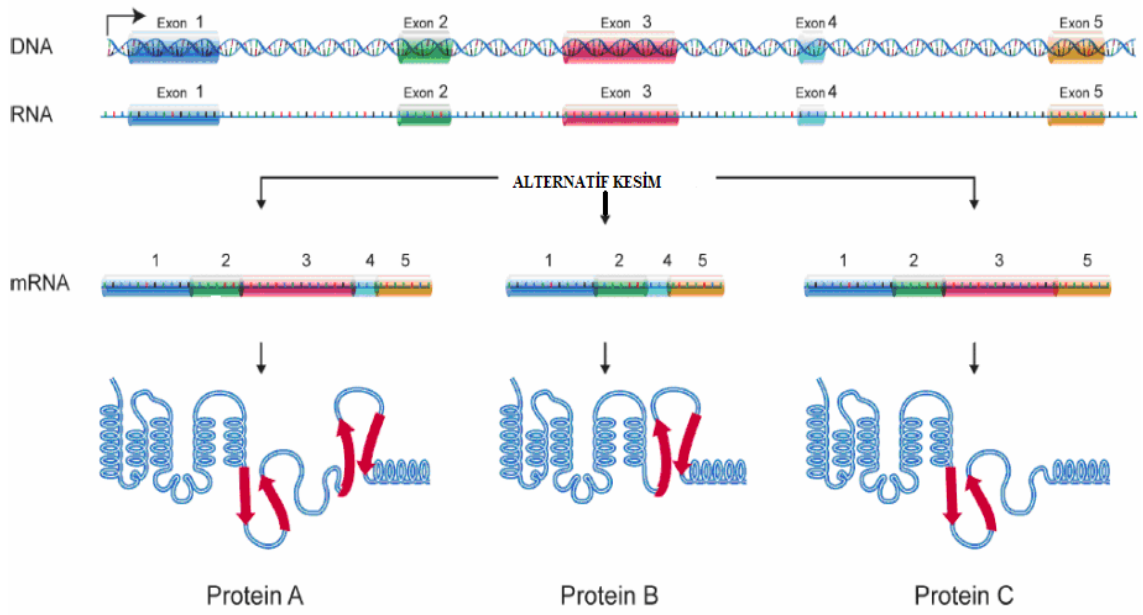
CYP19 geni 15. kromozomun uzun kolu üzerine (15q21.2) yerleşmiştir. Östrojen biyosentezinde önemli rolü olan aromataz enzimini kodlar. Yaklaşık 120 kb. büyüklüğündedir ve 10 ekzondan oluşmaktadır. Gende farklı dokularda aktif olan birden fazla promotör bulunmaktadır. Gendeki mutasyonlara bağlı olarak aktif olan promotörler ve alternatif kesim sayesinde gen ürününde ya da miktarında değişiklik meydana gelmektedir^{14,15,16,17,18}(Şekil 1).

Alternative kesim (alternative splicing) , bir gen üzerinde protein kodlayan ekzonların mRNA'ya aktarıldıktan sonra mRNA'nın değişik şekillerde farklı proteinler oluşturabilmesine imkan sağlayan mekanizmadır. Aynı gen birden fazla transkript oluşturabilir, böylece farklı proteinler sentezleyebilir ve bu da protein çeşitliliğine yol açar¹⁹ (Şekil 2).

CYP 19 geninin I.3 ve PII promotörleri normal meme dokusunda minimal düzeyde aktifken, meme kanseri dokusunda yüksek derecede aktiftirler^{14,15,17}.



Şekil 1: CYP19 geninin genomik organizasyonu ve dokuya özgü promotörlerin gen üzerindeki lokalizasyonları¹⁴.



Şekil 2: Alternatif kesim (alternative splicing). Genin birden fazla transkript oluşturması sonucu aynı genden farklı proteinlerin sentezlenmesi¹⁹.

CYP 19 genindeki herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm genin ürünü olan aromataz aktivitesinde değişikliğe neden olabilir ve buna bağlı olarak da östrojen seviyesinde değişikliklere neden olabilir^{3,4,6}.

CYP 19 geni, kodon 39 Trp/Arg polimorfizmi yeni tanımlanmış bir polimorfizm olup sadece Japon toplumunda araştırılmış ve bu polimorfizmin meme kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır⁹.

2.1.1. Aromataz

Aromataz enzim kompleksi, sitokrom P450 enzimi süper ailesinin bir üyesidir. Ovaryum, plasenta, adipoz doku, karaciğer, kas, beyin, normal meme ve meme tümörü dokusunda sentezlenir. Transkripsiyonu sitokinler, siklik nükleotidler, gonadotropinler, glukokortikoidler ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir^{20,21}.

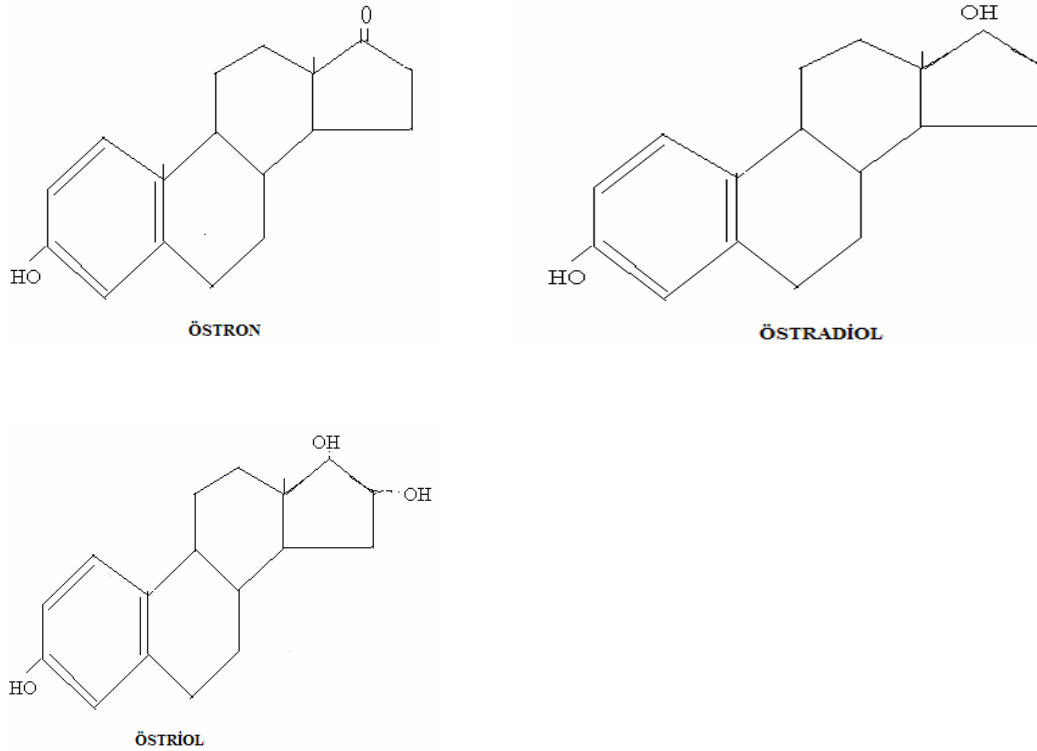
Postmenapozal dönemde sentezlenen östrojenlerin büyük bir kısmı yağ dokuda aromataz enzim kompleksi aktivitesi ile androjenlerin periferal aromatazasyonu sonucu oluşur. Aromataz aktivitesinin, karsinoma hücrelerini çevreleyen adipoz stroma

hücrelerinde daha fazla eksprese olduğu kanıtlanmıştır. Bu da enzimatik aromatisasyonun tümör hücreleri için östrojen kaynağı olarak önemli olduğunu göstermektedir^{22,23,24,25}.

2.2. ÖSTROJEN BİYOSENTEZİ

Östrojen, normal meme epitel hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmasının düzenlenmesinde, hamilelikte ve eşeysel değişikliklerin meydana gelmesinde önemli rolü olan steroid yapıda bir hormondur^{4,26,27,28}.

Östrojenik aktivite gösteren; östron (E1), 17 β -östradiol (E2) ve östriol (E3) olmak üzere üç bileşik izole edilmiştir. Östrojen hormonlarının birinci halkası doymamış (3 çift bağlı) olan bir monometilsteran halkası olup bunun 4. halkasının 17. karbonunda da bir O = ya da – OH grubu bulunur (Şekil 3)^{28,29}.

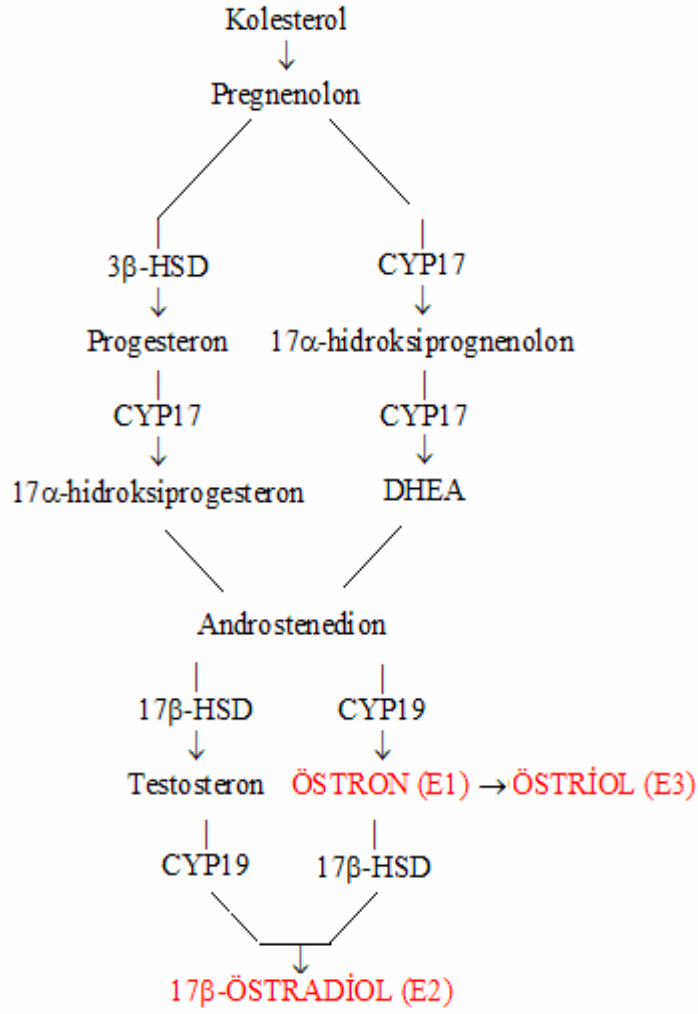


Şekil 3: Östrojenik aktivite gösteren bileşikler²⁹.

Bu bileşikler içinde en etkili olanı ovaryumda sentez edilen 17β -östradioldür. Seksüel olgunluğa erişmiş bir kadının kanında en fazla 17β -östrodiol bulunmaktadır. Östron, postmenaposal dönemde kanda bulunan temel östrojendir. Diğer östrojenlerin metaboliti olan ve hamilelikte plasentada üretilen östriol'e ise hamilelikte kan ve idrarda yüksek düzeyde rastlanmaktadır²⁹.

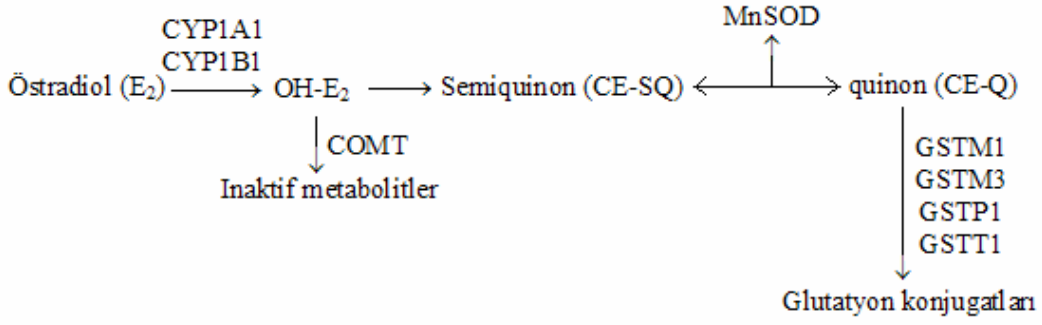
Premenapozal ve hamilelik dışı dönemde östrojenlerin temel üretim yeri ovaryumdur. Postmenapozal dönemde ise sentezlenen östrojenlerin büyük bir kısmı yağ dokuda aromataz aktivitesi ile androjenlerin periferal aromatisasyonu sonucu oluşmaktadır. Östrojenlerin biyosentezi ise kolesterolden östrojene kadar bir seri basamaktan oluşur. Biyosentezde CYP17, CYP19 ve 17β -HSD gen ürünleri önemli rol oynamaktadır (Şekil 4). Östrojenlerin yapımında kullanılan ön maddeyi testosteron ve androstenedion oluşturur. Östrojenlerin androjenlerden başlıca farkları östrojenlerin 18 C'lu bileşikler olmalarıdır. Ayrıca diğer bir farklılıkları da A halkasının östrojenlerde aromatik olması ve 10. C'da dikey vaziyette bir metil grubunun bulunmaması teşkil etmektedir. Östrojenlerde 3. karbon atomunda da fenolik bir grup vardır^{4,26,29,30}.

Doğal olarak başlıca östrojenler, östron, alfa ve beta östradiollerden ve östriollerden oluşurlar^{27,28,31}.



Şekil 4: Östrojen biyosentezi ve biyosentezde rol alan genler⁴.

Östrojen metabolizmasında ise östradiol, östrona çevrilmekte, östron hidroksilasyona uğramaktadır. Östrojenlerin metabolizmasının son aşamasında oluşan östrojen konjugatlarının %80 kadarı idrarla, geri kalanı safra ile barsaklara atılmaktadır. Metabolizmada COMT, CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1 gen ürünleri önemli rol oynamaktadır^{4,31} (Şekil 5).



Şekil 5: Östrojen metabolizması⁴.

Gelişmekte olan invaziv meme kanserinde, östrojen etkisinin sürdürülmesinin en önemli ve kayda değer risk faktörü olduğu ispatlanmıştır. Meme epitelyum hücrelerinin östrojene uzun süre maruz kalmalarının çoğalmayı uyardığı bunun da tesadüfi genetik hasarların birikmesine neden olabileceği ya da östrojenin direkt DNA hasarına neden olabilecek tümör başlatıcı olarak rol alabileceği düşünülmektedir^{4,28,30}.

Yaşamsal faktörler ve östrojen ilişkisi incelendiğinde, bu faktörlere bağlı olarak uzun süre ya da artmış seviyelerdeki östrojene maruz kalmanın sporadik meme kanserine yakalanma olasılığını arttırdığı görülmektedir. Bu faktörler;

1- Erken menarş ve geç menopo, fertil çağı uzatmaktadır. Buna bağlı olarak meme epitelyumu östrojene uzun süre maruz kalmaktadır. Menopo yaş göz önüne alındığında, geciken her 1 yıl için meme kanserine yakalanma olasılığı yaklaşık %3 artmaktadır.

2- Östrojenler deri altı yağ dokusundaki aromataz aktivitesi ve androjenlerin periferal aromatisasyonu ile oluşmaktadır. Buna bağlı olarak obezite dolaşımdaki androjenlerden östrojenlerin oluşumunu arttırmaktadır.

3- Sigaranın meme kanseri üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar tartışmalı sonuçlar vermiştir. Tütün içindeki bazı maddelerin anti östrojenik etkili olduğu, nikotinin CYP19 enzimini inhibe ettiği bulunmuş, sigara içenlerin içmeyenlere göre menopo yaşının daha erken olduğu iddia edilmiştir. Ancak sigaranın içerdiği PAHs, meme hücreleri için karsinojenik bir maddedir ayrıca sigara bilinen yaklaşık 30 karsinojenik maddeyi de içermekte ve kanser riskini yükseltmektedir.

4- Alkol de meme kanseri riskini arttıran faktörlerdendir. Alkol tüketen kadınlarda östrojen seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir.

Bunların dışında pek çok yaşamsal faktör östrojen üzerindeki etkisiyle meme kanseri oluşumunda rol almaktadır^{1,4,5,12,32}.

2.3. MEME KANSERİ

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen ve en çok ölüme neden olan kanser türüdür^{1,2,12,13,32} (Çizelge 1).

Dünyada her yıl 10 milyon kanser olgusunun varlığı bilinmektedir. Bu olguların yaklaşık 1 milyonu meme kanseridir ve bunların da yaklaşık 400.000 kadarı ölüme sonuculanmaktadır. Türkiye’de, sağlıklı bir istatistik bulunmamasına rağmen, her yıl 30 bin kadının meme kanserine yakalandığı tahmin edilmektedir. Hastalığın diğer bir özelliği, görülme sıklığının artıyor olmasıdır. Hastalığın gösterdiği bu artış, tüm gelişmiş batı ülkelerinde de gözlenmektedir^{12,13,32}.

Çizelge 1: Çeşitli ülkelerde ve dünyada kadınlarda en sık görülen ve en çok ölüme neden olan kanser türleri¹².

ÜLKELER	OLGU	ÖLÜM
Türkiye	Meme Over Mide	Meme Mide Over
ABD	Meme Akciğer Kolon/Rektum	Akciğer Meme Kolon/Rektum
İngiltere	Meme Kolon/Rektum Akciğer	Meme Akciğer Kolon/Rektum
Mısır	Meme Serviks Mesane	Meme Serviks Mesane
Kamboçya	Serviks Meme Karaciğer	Serviks Karaciğer Akciğer
DÜNYA	Meme Serviks Kolon/Rektum	Meme Akciğer Serviks

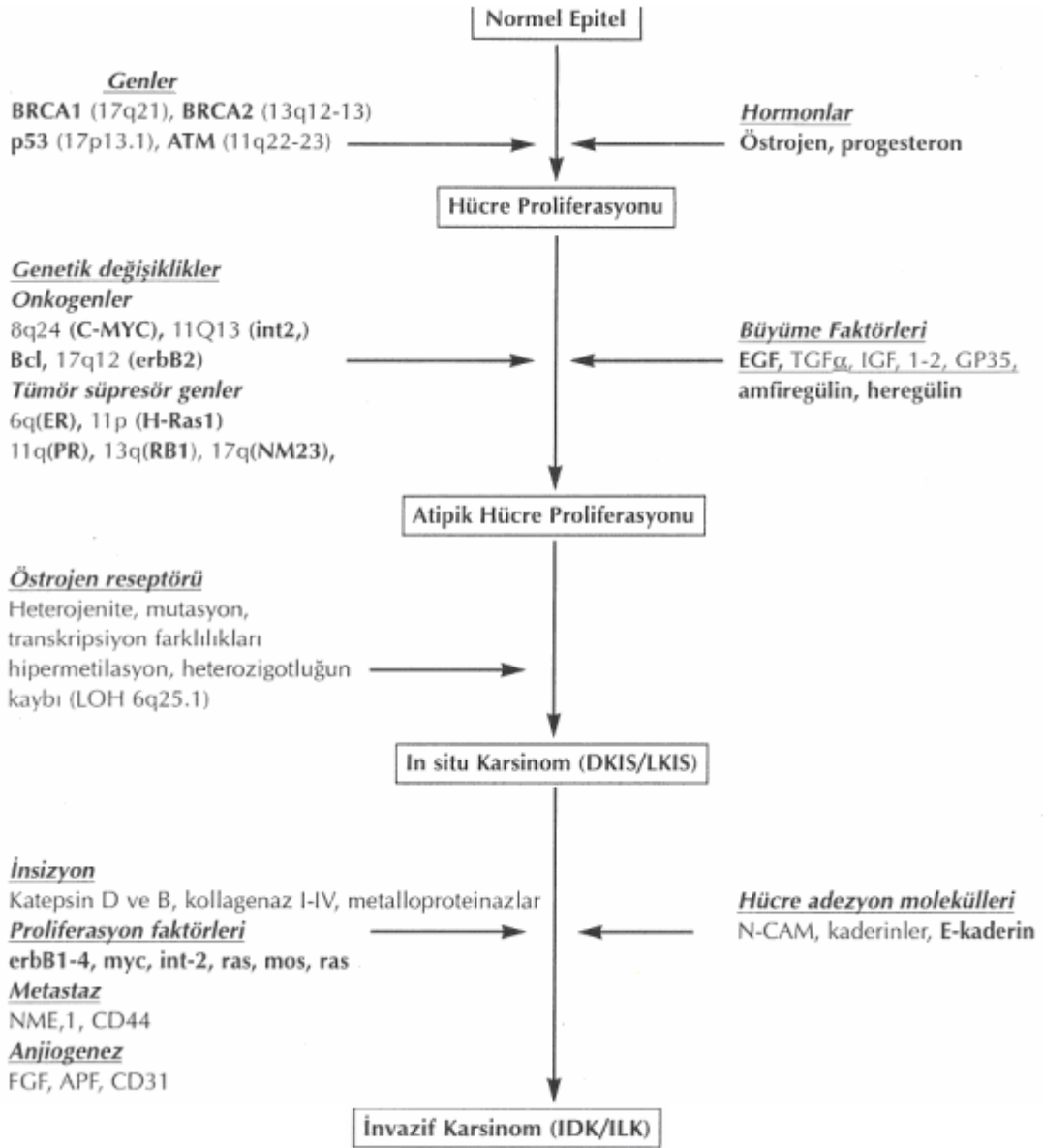
Hücresel düzeyde kanserin gelişimi çok basamaklı bir olaydır. Klinik ve histopatolojik olarak meme kanserinde tümörün oluşumundan metastaza kadar çeşitli basamaklar tanımlanmıştır^{1,2,12,13,32}.

Birinci basamak tümörün başlaması olup tek bir hücrenin anormal bölünmesine sebep olan genetik değişikliktir. Hücre bölünmesi daha sonra klonal olarak türemiş tümör hücre popülasyonunun artmasına sebep olur^{1,3,12,13}.

İkinci basamak, klinik olarak yüksek meme kanseri riskini işaret eden atipik hücre proliferasyonuna geçiştir. Atipik hücre proliferasyonu ile meme kanseri riskinde artışa neden olan histolojik yapılar tanımlanmaktadır^{1,3,12}.

Üçüncü basamak malignansinin sitolojik özelliklerini gösteren ancak stromal invazyonun henüz gözlenmediği in situ karsinom'un gelişimidir. Daha sonra hücrelerin artışıyla stromal invazyonun gerçekleşmesi sonucu invaziv tümör oluşur. (Şekil 6). Kan ve lenf kanalları aracılığıyla bu hücrelerin yayılması da metastaza neden olur^{1,3,12}.

Her basamakta, hücreye, kanser hücresi olma yolunda özellikler kazandıran önemli genetik olayların gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu değişiklikler sonucu tümör oluşumuna ya da ilerlemesine neden olan genlerin ekspresyonunda ya da gen ürünlerinin fonksiyonunda değişiklik meydana gelebilir^{1,3,13}.



Şekil 6: Meme kanseri oluşumuna ve ilerleyişine katılan faktörler ile açıklanabilecek olası çok aşamalı karsinogenez modeli¹².

Meme kanserinin %5-10'u kalıtsal geçiş gösterir. Kalıtsal meme kanserlerinin %90'ında BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu görülmektedir. Meme kanserinde ileri yaş ve ilk doğum yaşı önemli risk faktörleridir. Daha önce meme kanseri geçirmiş ya da aile yakınları arasında meme kanserine yakalanmış bireyler bulunan kadınların, meme kanserine yakalanma olasılığı, diğer kadınlara göre çok daha yüksektir^{33,34,35}.

Hiçbir kanser türünün kesin sebebi ya da sebepleri bilinmemektedir. Kişiyi bazı kanser türlerine yatkın hale getiren genler, kanser oluşumuna yol açan virüsler, radyasyona maruz kalma, çeşitli kimyasal maddeler kanser sebepleri arasında sayılmaktadır. Bağışıklık sistemindeki bozulmalar, çeşitli çevresel faktörler, beslenme tarzı da kanser oluşumunda rol oynamaktadır^{5,12,32}.

Meme kanserinde cerrahi tedavi, ilaç tedavisi ve radyoterapiden yararlanılmaktadır. Henüz meme kanserini kesin önleyen bir yöntem yoktur. Günümüzde bilinen tek yöntem, erken tanıdır. Erken tanı sayesinde, meme kanserinin getirdiği sorunlar büyük oranda çözülebilmektedir. Bu sayede hastalığın yaptığı hasar en aza indirilebilir, yaşam süresi ve kalitesi önemli ölçüde arttırılabilir¹².

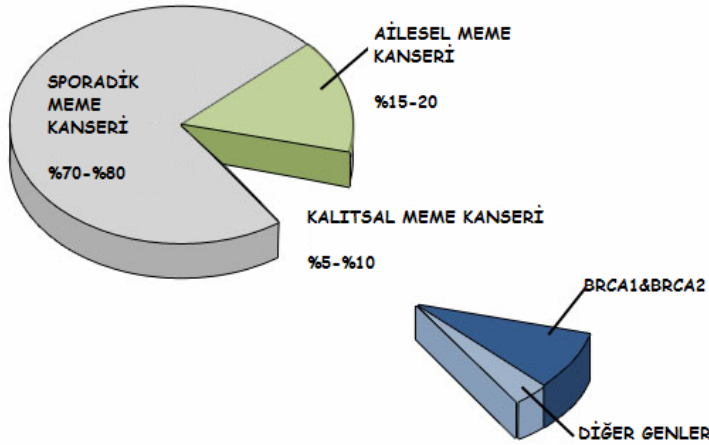
Kanser tedavisine ümit veren yeni bir yaklaşım kanser hücrelerine direkt etkiden ziyade anjiogenez gelişimini engelleyerek tümör büyümesini engelleyen ilaçların kullanılmasıdır. Bu ilaçlar spesifik olarak yeni kan damarlarının oluşumunu engeller normal hücrelere standart kanser ilaçlarından daha az toksiktir. Anjiogenezi ya da kanserin oluşum mekanizmasını engelleyen ya da durduran ilaçların ya da özellikle tümör büyümesini sağlayan onkogenleri hedef alan ilaçların geliştirilmesi, gen tedavileri, immünoterapi ve kanser aşılı kanser tedavisi için ümit veren yaklaşımlardır. Gen tedavisiyle, kansere sebep olan genetik bozukluğun onarımı, immünoterapiyle, vücudun kendi bağışıklık sistemini kullanarak kanser hücrelerini öldürmesi hedeflenmekte, kanser aşılı ve akıllı ilaçlarla ise, sağlıklı dokuları etkilemeden, asıl hedef olan kanserli dokuya en yüksek miktarda ilaç ulaştırılması amaçlanmaktadır^{5,32,36}.

2.3.1. Kalıtsal ve Sporadik Meme Kanserinin Genetik Farklılıkları

Kanser vakalarının çok az bir kısmı, eşey hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelir ve sonraki nesillere aktarılır (kalıtsal kanserler). Ancak kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleriyle gelecek nesillere aktarılamaz (sporadik kanserler)^{3,4,5,37}.

Tüm meme kanseri vakalarının az bir kısmını oluşturan(%5-10) kalıtsal meme kanseri, meme kanserine ırsi olarak hassasiyet olması olarak da nitelendirilebilir. Kalıtsal meme kanserinin aksine sporadik meme kanserine yüksek sıklıkta (%70-80) rastlanmaktadır, mutasyon somatik hücrelerde meydana gelir, ve bu kişilerin ailelerinde

kanser riskinin görülme olasılığı tıbbi ve yaşamsal faktörlerin de etkisi altındadır. Sporadik meme kanserlerindeki risk faktörlerinin çoğunlukla hormonal olduğu düşünülmektedir. Yüksek penetranslı kanser yatkınlık genlerindeki mutasyonların etkili olduğu kalıtsal meme kanserinin aksine, sporadik meme kanserinde düşük penetranslı kanser yatkınlık genlerindeki mutasyonlar ve yaşamsal risk faktörlerinin etkili olduğu gözlenmektedir. Eğer düşük penetranslı kanser yatkınlık genlerinin sebep olduğu meme kanseri aynı ailede birden fazla kişide görülüyorsa ailesel meme kanseri adı verilen üçüncü bir sınıftan bahsedilebilir (Şekil 7). Bu ailelerde meme kanseri, aynı çevresel ajanlara maruz kalma sonucu ya da şans eseri olarak da gelişmiş olabilir^{3,4,5,37}.



Şekil 7: Meme kanserinin sınıflandırılması ve görülme sıklıkları³⁸.

2.3.1.1. Kalıtsal Meme Kanseri

Kalıtsal meme kanseri, net bir şekilde nesilden nesile aktarılan ve az sıklıkta görülen kanser türüdür. Meme kanserine irsi olarak hassasiyet olması olarak da nitelendirilebilir. Kalıtsal meme kanseri özellikle BRCA1 ve BRCA2 başta olmak üzere p53, PTEN, CHEK2 gibi yüksek penetranslı kanser yatkınlık genlerinin bir allelinde meydana gelen mutasyonun nesilden nesile aktarılmasıyla oluşur^{39,40,41}.

Kalıtsal meme kanserlerinde en sık rastlanan BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, kalıtsal meme kanseri vakalarının çok büyük bir kısmının nedeni olmalarına rağmen,

toplam meme kanseri vakalarının sadece %5'inden sorumludur. BRCA1 ve BRCA2 kalıtsal meme kanserinin oluşumunda etkili en önemli iki tümör süpresör genidir. Tümör süpresör genler, hücre döngüsü bölümlerinin birbirine geçişini baskılar ya da inaktive eder ve hücre bölünmesini durdurur. Eğer bu genler kalıcı olarak inaktive edilirse ya da mutasyonlarla ortadan kaldırılırlarsa, hücre bölünmesinin kontrolü kaybolur ve hücre kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmaya başlar⁴⁰.

BRCA1 olarak adlandırılan gen kalıtsal meme kanserinde rol oynadığı bulunan ilk genidir. BRCA1'deki mutasyonlar, meme kanserine yatkın olma ile ilişkilidir ve bu yatkınlık otozomal dominant olarak kalıtılır. BRCA1 geni, 1994 yılında tanımlanmış, 17. kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olmuş (17q.21) bir tümör süpresör genidir. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde, DNA tamir mekanizmalarında, apoptozda rol alır^{42,43}.

BRCA1 geninde, proteininin fonksiyon kaybına neden olan çok fazla sayıda mutasyon tanımlanmıştır. 11. ekzon en geniş ekzon olup BRCA1 proteininin %60 kadarını oluşturmaktadır. Mutant bir BRCA1 geni taşıyan kadınlarda meme kanseri gelişme riski yüksektir. Aynı zamanda bu mutasyonu taşıyan bireyler yumurtalık ve prostat kanseri bakımından da yüksek riske sahiptirler^{42,43,44}.

BRCA2 geni 1995 yılında tanımlanmış, 13. kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olmuş (13q12.3) bir tümör süpresör genidir. Otozomal dominant olarak kalıtılır. Genom bütünlüğünün sürdürülmesinde ve DNA tamir mekanizmalarında rol alır^{39,41}.

2.3.1.2. Sporadik Meme Kanseri

Kalıtsal meme kanserinin aksine yüksek sıklıkta görülen sporadik meme kanserinde, mutasyon somatik hücrelerde meydana gelir, bu kişilerde ve ailelerinde kanser riskinin görülme olasılığı irsi değil, tıbbi, yaşamsal çevresel faktörlerin etkisi altındadır^{3,4,5,37}.

Sporadik meme kanserlerindeki risk faktörlerinin çoğunlukla hormonal olduğu düşünülmektedir. Yüksek penetranslı kanser yatkınlık genlerindeki mutasyonların etkili olduğu kalıtsal meme kanserinin tersine, sporadik meme kanseri vakalarının oluşumuna endojen, yaşamsal risk faktörleriyle birlikte düşük penetranslı kanser yatkınlık genlerindeki mutasyonlar neden olmaktadır^{4,37}.

Kadınlarda görülen sporadik meme kanserinin bilinen başlıca risk faktörleri, östrojen seviyesindeki artış ya da östrojene uzun süre maruz kalma ile ilişkilidir. Östrojen biyosentezinde (CYP17, CYP19, 17 β -HSD) ve östrojenin metabolitlerine ve ürünlerine dönüşümünde (COMT, CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1) rol alan polimorfik genler, meme kanserine bireysel yatkınlıkla yakından ilişkilidir^{4,8,45,46,47,48,49,50}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Biyolojik Materyal

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalına başvurmuş, yaşları 24 ile 70 arasında değişen, 100 kadından alınmıştır. Hasta grubunu, patolojik olarak doğrulanmış meme kanserli 75 hastadan alınan kan örnekleri oluşturmuştur. Hasta grubundan 25 kişide ailesel/kalıtısal meme kanseri görülmektedir. Kontrol grubunu ise herhangi bir meme kanseri tanısı konmamış ve ailesinde meme kanseri görülmemiş 25 kadından alınan kan örnekleri oluşturmuştur.

Kan örnekleri EDTA'lı tüplerde, buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir:

1. AmpliTaq Gold DNA Polimeraz (Applied Biosystems)
2. Magnezyum Klorür (MgCl₂) (Applied Biosystems)
3. EDTA (Fermentas)
4. Proteinaz K (Fermentas)
5. Sukroz (Fermentas)
6. Sodyum klorid (NaCl) (Merck)
7. Sodyum dedosil sülfat (SDS) (Fermentas)
8. Saf etanol (Riedel-de Haen)
9. Tris baz (Fermentas)
10. PCR tamponu (Fermentas)
11. Deoksinükleosit trifosfat seti (Roche)
12. Primerler (Metabion)
13. Acil restriksiyon enzimi (Biolabs)
14. Acil restriksiyon enzimi tamponu (Biolabs)
15. Etidium bromür (EtBr) (Fermentas)
16. Brom fenol mavisi (Fermentas)

17. Agaroz (Promega)
18. Marker DNA (Fermentas)
19. DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez ile ilgili diğerk kimyasal maddeler (Sigma ve Merck)

3.1.3. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

Aşağıda listesi verilen ve bu çalışmada kullanılan cihazlar ve teknik malzemeler, araştırmanın yapıldığı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında bulunmaktadır.

1. Santrifüjler (Soğutmalı Universal 16R ve Soğutmasız Techne force 16)
- 2 Thermal cyclers (Eppendorf Mastercycler)
3. Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
4. Hassas terazi (Sartorius)
5. Su banyoları (Grant, Electromas)
6. Otoklav (Trans)
7. Etüv (Dedeoğlu, Memert)
8. Vorteks (Nüve NM 110)
9. pH metre (İnolab)
10. Otomatik pipetler (Biohit, Socorex, Pipetman)
11. Buzdolabı (Arçelik)
12. Derin dondurucu (Siemens, Bosch)
13. Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı (Biogen, Biolab, Maxicell)
14. Steril kabin (Kojair KR- 125 Safety)
15. Mezürler

3.2. YÖNTEM

Bu alışma için önce hasta ve kontrol grubunu oluşturacak kişiler belirlendi ve bu kişilerden hastalığın oluşumuna ve gelişimine katkısı olduğu düşünölen yaşamsal faktörler (yaş, aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımı) ile ilgili bilgiler alındı. Daha sonra belirlenen kişilerden kan örnekleri alındı, numaralandırıldı, hem doymuş tuz çözeltisi ile çöktürme yöntemi hem de izolasyon kiti kullanılarak iki yöntemle DNA izolasyonu yapıldı. İzole

edilen DNA'lerden PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi, PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edildi ve elde edilen ürünler kullanılarak genotiplendirme yapıldı.

3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için 2 yöntem kullanıldı.

3.2.1.1. Doymuş Tuz Çözeltilisiyle Çöktürme⁵¹

1. Eppendorf tüp içerisine 600 µl kan ve 1000 µl eritrosit lizis tamponu (EK 1.1) eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak bir iki kez karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
2. 4500 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Tekrar 1000 µl eritrosit lizis tamponu eklenip 4500 rpm'de tekrar 5 dak santrifüj edildi. Süpernatant atılarak lökosit pelleti elde edildi.
3. Lökosit pelleti üzerine 1000 µl fizyolojik tampon (EK 1.2) ilave edildi ve 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. (Eğer pellet yeterince temiz değilse bu işlem bir kez daha tekrar edildi.)
4. Pellet üzerine 300 µl TE-9 tamponu (EK 1.3) eklenerek pellet çözündürüldü. Üzerine 100 µl SDS (EK 1.4) ve 20 µl Proteinaz K eklendi. Tüp karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi.
5. 65 °C'de 2 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl 6M tuz solüsyonu (EK 1.5) eklendi. Tüp karıştırıldı 13500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Tekrar 13500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi ve temiz bir tüpe alınan süpernatant üzerine 1000 µl saf etanol eklenerek DNA'nın yoğunlaşması gözlemlendi.
8. Tüp 13500 rpm'de santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı, süpernatant atıldı.
9. Pellet üzerine 1000 µl %70'lik etanol eklendi. Santrifüj edildi. Pellet çöktürüldü. Süpernatant atıldı.
10. Tüp temiz bir kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek etanolün uçması sağlandı.

11. Pellet üzerine 100 µl TE tamponu (EK 1.6) eklendi, 65 °C'de 15 dakika bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlandı.
12. DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü (EK 2) ve DNA'lar kısa sürede kullanım için +4°C'ye, uzun sürede kullanım için -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.1.2. İzolasyon Kiti (E.Z.N.A. Blood DNA Isolation Kit) ile DNA Eldesi

DNA izolasyon kitinin, doymuş tuz çözeltisiyle çöktürme yöntemine göre avantajı daha az miktarda kan kullanılarak çok daha kısa sürede DNA'nın izole edilmesidir. Kit özel olarak formüle edilmiş tampon sistemi ile DNA'ların spin-kolona tutunmasını sağlamaktadır. DNA'lar kolona tutunurken, hemoglobin, hücresel artıklar ve diğer proteinler yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılmaktadır.

1. Elüsyon tamponundan örnek başına 220 µl olacak şekilde bir tüp içine alındı ve 70 °C'de, kullanılıncaya kadar bekletildi.
2. 1.5 ml'lik steril tüpe 250 µl kan, 250 µl BL tamponu, 20 µl proteaz enzimi eklendi. 10-15 saniye vortekslendi. 45 °C'de 20 dakika bekletildi. (Kan miktarı az ise elüsyon tamponu ile 250 µl'ye tamamlanabilir.)
3. Tüplere 260 µl saf etanol ilave edildi, 10 –15 saniye vortekslendi.
4. Tüp içeriği 2ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Kolon yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirildi, üzerine 500 µl HB tamponu ilave edildi. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Tüp içindeki sıvı döküldü, kolon üzerine 650 µl yıkama tamponu ilave edildi. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Altteki tüpler atıldı, kolon yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirildi, tekrar 650 µl yıkama tamponu eklendi. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Kolon 1.5 ml'lik tüpe yerleştirildi, üzerine 100 µl elüsyon tamponu eklendi. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Tüpler değiştirilmeden tekrar 100 µl elüsyon tamponu eklendi, 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Kolonlar atıldı, tüp içinde kullanıma hazır DNA solüsyonu kaldı.

11. DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüldü ve DNA'lar kısa sürede kullanım için +4°C'de, uzun sürede kullanım için -20°C'de saklandı.

3.2.2. Genotiplendirme

3.2.2.1. Gen Bölgesinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Primerler

İnternet taramaları sonucu CYP19 geninin baz dizisi elde edildi. Genin tamamı 1384 baz çiftidir. Tarama sonucu, incelenecek olan 39. kodonun da içinde bulunduğu 427 baz çifti uzunluğundaki gen dizisinin (common bölge) amplifikasyonu için, daha sonra kodon 39'daki Trp/Arg polimorfizminin belirlenmesi için uygun primerler tespit edildi.

427 bç'lik common bölgenin amplifikasyonu için Çizelge 2'de verilen baz dizisi üzerinde de gösterilmiş olan aşağıdaki primerler kullanılmıştır;

Forward primer (F1): 5'-ATCTGTA^TCTGTACAGCACC-3'

Reverse primer (R2): 5'-CTCCAAGTCCTCATT^TTGCT-3'

Çizelge 2: CYP19 geninin 427 bç'lik common bölgesi için kullanılan primerler ve amplifikasyon bölgesini gösteren nükleotid dizisi. Dizide common bölge koyu harflerle, primerler ise altı çizili olarak gösterilmiştir.

5'.....
901 cctaaatgtc tgatcacatt ataaaacagt aagtgaatct gtactgtaca gcaccctctg
961 aagcaacagg agctatagat gaacctt^tta ggggattctg taatttttct gtc^cctttga
1021 tttccacagg actctaaatt gcccctctg aggtcaagga acacaagatg gttttggaaa
1081 tgctgaacc gatacattat aacatcacca gcatcgtgcc tgaagccatg cctgctgcca
1141 ccatgccagt cctgctcctc actggccttt ttctcttggt gtggaattat gagggcacat
1201 cctcaatacc aggtaagtca gtcatttatt tctgtatcta aggagattat ttacttggga
1261 ttttgg^ttcca tcatgg^ttaa gaaaaattt gcaaaaagga caaaaagcaa acctggaaag
1321 atctctgaag actatgtctg tg^ttagcaaa tgaggacttg gag^aaaatttc agaccaatta
.....3'

39. kodon T allelinin amplifikasyonu için Çizelge 3’de verilen baz dizisi üzerinde de gösterilmiş olan aşağıdaki primerler kullanılmıştır;

TT Genotipi (kodon 39=TGG → Triptofan):

Forward primer (F2): 5’-GGCCTTTTTCTCTTGGTGT-3’

Reverse primer (R2): 5’-CTCCAAGTCCTCATTTGCT-3’

Çizelge 3: T alleli amplifikasyonu için kullanılan primerler ve 200 bç’lik amplifikasyon bölgesini gösteren nükleotid dizisi. Dizide amplifikasyon bölgesi koyu harflerle, primerler altı çizili, kodon 39 büyük harflerle gösterilmiştir.

5’.....
1141 ccatgccagt cctgctctc act**ggccttt** ttctcttggg **gTGGaattat** gagggcacat
1201 cctcaatacc aggtaagtca gtcatttatt tctgtatcta aggagattat ttacttggga
1261 ttttgggtcca tcatggtaaa gaaaaatttt gcaaaaagga caaaaagcaa acctggaaag
1321 atctctgaag actatgtctg tgtagcaaa tgaggacttg gagaaatttc agaccaatta
.....3’

39. kodon C alleli amplifikasyonu için, Çizelge 4’de verilen baz dizisi üzerinde de gösterilmiş olan aşağıdaki primerler kullanılmıştır;

CC Genotipi (kodon 39=CGG → Arjinin):

Forward primer (F1): 5’-ATCTGTACTGTACAGCACC-3’

Reverse primer (R1): 5’-ATGTGCCCTCATAATTCCG-3’

Çizelge 4: C alleli amplifikasyonu için kullanılan primerler ve 264 bç’lik amplifikasyon bölgesini gösteren nükleotid dizisi. Dizide amplifikasyon bölgesi koyu harflerle, primerler altı çizili, kodon 39 büyük harflerle gösterilmiştir.

5’.....
901 cctaaatgtc tgatcacatt ataaaacagt aagtgaatct gtactgtaca gcaccctctg
961 aagcaacagg agctatagat gaacctttta ggggattctg taatttttct gtccctttga
1021 tttccacagg actctaaatt gccccctctg aggtcaagga acacaagatg gttttggaaa
1081 tgctgaacc gatacattat aacatcacca gcatcgtgcc tgaagccatg cctgctgcca
1141 ccatgccagt cctgctctc actggccttt ttctcttggg gCGGaattat gagggcacat
.....3’

3.2.2.2. PCR Amplifikasyonu (EK 3):

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşullarının saptanması çeşitli denemelerle belirlendi. Her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutularak, optimal amplifikasyon koşulları sağlanana kadar, amplifikasyonda kullanılan tüm kimyasal malzemelerin farklı konsantrasyonları ve PCR programının farklı ısı döngüleri denendi ve optimal koşullar sağlanınca 2 ayrı PCR programı uygulandı.

1) Çalıştığımız common bölgenin, T allelinin ve C allelinin primerleri birarada kullanılarak multiplex PCR (EK 3.1) yapıldı (Çizelge 5).

Çizelge 5: Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu (multipleks PCR).

PCR bileşeni	Final Konsantrasyon	25 µl reaksiyon karışımındaki miktar
Primer F1 (100 pmol)	100 pmol	0.25 µl
Primer R1 (100 pmol)	100 pmol	0.25 µl
Primer F2 (100 pmol)	100 pmol	0.25 µl
Primer R2 (100 pmol)	100 pmol	0.25 µl
MgCl ₂	2 Mm	2 µl
10X PCR Tamponu	1X PCR tamponu	2.5 µl
dNTP	0.2 mM	0.2 µl
Taq Polimeraz	1.25 U	0.25 µl
Genomik DNA	0.25 µg	1 µl
Bidistile su	-	18.05 µl
Toplam		25 µl

2) Common bölgenin, T allelinin ve C allelinin primerleri 3 ayrı tüpte çalışılarak PCR yapıldı (Çizelge 6).

Çizelge 6: Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu.

PCR Bileşenleri	Final Kons.	Common Bölge PCR bileşenleri	T alleli PCR bileşenleri	C alleli PCR bileşenleri
Primer F1 (100 pmol)	100 pmol	0.25 µl	-	0.25 µl
Primer R1 (100 pmol)	100 pmol	-	-	0.25 µl
Primer F2 (100 pmol)	100 pmol	-	0.25 µl	-
Primer R2 (100 pmol)	100 pmol	0.25 µl	0.25 µl	-
MgCl ₂	2 mM	2 µl	2 µl	2 µl
10X PCR Tamponu	1X	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
dNTP	0.2 mM	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
Taq Polimeraz	1.25 U	0.25 µl	0.25 µl	0.25 µl
Genomik DNA	0.25 µg	1 µl	1 µl	1 µl
Bidistile su		18.55 µl	18.55 µl	18.55 µl
Toplam		25 µl	25 µl	25 µl

İki yöntemle de elde edilen DNA'lara aynı PCR programı uygulandı;

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri:

- 1- Ön Denatürasyon : 95 °C'de 10 dk.
- 2- Denatürasyon : 95 °C'de 1 dk.
Yapışma : 54 °C'de 1 dk.
Sentez : 72 °C'de 1 dk.
Toplam döngü : 30
- 3- Final Sentez : 72 °C'de 5 dk.

Elde edilen PCR ürünleri +4 °C'de muhafaza edildi.

PCR reaksiyonlarının hazırlanmasında sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlendi:

- Reaksiyonda kullanılacak DNA'lar ve çözeltiler kullanımdan hemen önce -20 °C'den alınıp çözdürüldü.
- %70'lik alkolle temizlenmiş laminar flow kabini içinde üzerlerine örnek numarası yazılarak 200 µl'lik PCR tüpleri hazırlandı.
- Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler kısa bir süre vorteks ile karıştırıldı ve santrifüj edildi.
- Daha önceden hesaplanan miktarlarda MgCl₂, tampon, dNTP, primerler ve Taq Polimeraz 200 µl'lik bir PCR tüpüne eklenerek PCR karışımı hazırlandı.
- PCR karışımı kısa bir süre vortekslendi ve santrifüj edildi.
- Buz üzerinde, numaralandırılmış her bir PCR tüpüne, daha önceden hesaplanmış miktarlarda PCR karışımı, DNA ve bidistile steril su eklendi.
- Tüpler kısa bir süre vortekslendi ve santrifüj edildi.
- Tüpler thermal cycler'a yerleştirildi ve önceden kaydedilmiş program başlatıldı.
- Program tamamlandıktan sonra PCR ürünleri +4 °C'de saklandı.

3.2.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (EK 4) ve Yorumlanması:

%2'lik agaroz jel hazırlamak için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

- 1- 0,72 gr. agaroz tartıldı, dikkatli bir şekilde erlen içine döküldü.
- 2- Üzerine 36 ml. 1X TBE tamponu (EK 4.1) eklendi ve mikrodalga fırında yaklaşık 1 dakika tutularak agaroz eritildi.
- 3- Agaroz eridikten sonra erlen içine, stok EtBr solüsyonundan (EK 4.2) 3 µl eklendi.
- 4- Erlen el yakmayacak sıcaklığa gelene kadar (50-55°C) bekletildi.
- 5- Jel kabı ve jel tarafları saf suyla yıkandı, gazlı bezle kurulandı.
- 6- Jel kabının içine örnek sayısına göre taraflar yerleştirildi ve erlen içindeki jel karışımı hava kabarcığı oluşturmadan dikkatli bir şekilde jel kabına döküldü.
- 7- Yaklaşık 30 dakika beklenecek jelin polimerize olması sağlandı.
- 8- Jel, elektroforez kabına alınarak üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edildi.
- 9- Kuyu oluşturması için yerleştirilmiş tarak jel zedelenmeden yavaşça çıkarıldı.
- 10- İlk kuyuya bant büyüklüklerini karşılaştırmak için 5 µl marker DNA, ikinci kuyuya kontaminasyon olup olmadığını anlamak amacıyla DNA içermeyen PCR karışımı eklendi.

11- Diğer kuyulara sırayla 1 µl yükleme tamponu (EK 4.3) ile karıştırılmış olan hasta rneklarine ait 5 µl PCR rnleri uygulandı.

12- Elektroforez tankının kapağı kapatıldı ve yaklaşık 45 dakika akım uygulandı.

13- Süre sonunda jel tankın içinden alınarak Uvitec görüntüleme cihazının içine yerleştirildi ve görüntü incelendi (izelge 7).

Çizelge 7: Amplifikasyon sonunda beklenen ampikon büyüklükleri

	Amplikonun Büyüklüğü
CYP19 C (Arg) alleli	264 b.
CYP19 T (Trp) alleli	200 b.
CYP19 Common bant	427 b.

Primerler için birden fazla tanıma bölgesi olması, DNA'nın saf olmaması yada hazırlanan PCR karışımındaki çözeltilerden birinde kontaminasyon olması gibi durumlarda PCR gerçekleşemeyebilir. Bu nedenle bant görülemeyebilir yada çok sayıda nonspesifik bant gözlenebilir. Agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun istenen özelliklerde olmadığı tespit edilen ve amplifikasyona göre genotiplendirme yapılamayan rneklar için sadece common bölge primerleri kullanılarak PCR tekrar edildi ve PCR rnleri kesim (RFLP) reaksiyonuna tabi tutularak değerlendirme yapıldı.

3.2.2.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR rnlerinin Kesimi ve Görüntülenmesi (EK 5):

PCR amplifikasyonu yapılan ve agaroz jelde görüntülenen toplam 100 örnekten, 20 hastada, net bant görülemediği için genotiplendirme yapılamadı. Bu amplifikasyonlar için tekrar PCR yapıldı, PCR rnleri kesim (RFLP) reaksiyonuna tabi tutuldu ve agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jel üzerindeki bantlara göre değerlendirme yapıldı. Enzim miktarı sınırlı olduğu için sadece bu örneklere kesim işlemi uygulandı.

PCR ürünü için de literatür taraması sonucu elde edilen polimorfizm noktası tanıma dizisi olan Acil endonükleazı (EK 5.1), Gene Runner programının 3.05 versiyonu kullanılarak belirlendi. Normal diziyi kesmeyen, mutasyonlu diziyi kesen endonükleazın gerçekleştirdiği kesim reaksiyonu koşulları çizelge 8’de, kesim bölgesi çizelge 9’de gösterilmiştir. Acil enziminin çalışıp çalışmadığı öncelikle pUC 18 plazmidi kullanılarak denendi ve bu plazmidi kestiği gözlemlendi. Kesimin gerçekleşmesi enzimin çalıştığını gösterdi.

Çizelge 8: Acil enziminin gerçekleştirdiği kesimin reaksiyon koşulları ve kesim bölgesi

10 µl reaksiyon karışımındaki miktar	
Acil Restriksiyon enzimi	1 µl
Acil Restriksiyon enzimi tamponu	0.25 µl
PCR ürünü	5 µl
Bidistile su	3.75 µl
Reaksiyon hacmi	10 µl
Reaksiyon ısısı	37 °C
Reaksiyon süresi	2 saat
Kesim bölgesi	G↓CGG CGC↑C

Çizelge 9: Acil enziminin gerçekleştirdiği kesimin common bölge üzerinde gösterimi. Dizide common bölge koyu harflerle, kesim bölgesi büyük harflerle gösterilmiştir.

```

5'.....
901  cctaaatgtc  tgatcacatt  ataaaacagt  aagtgaatct  gtactgtaca  gcaccctctg
961  aagcaacagg  agctatagat  gaaccttta  ggggattctg  taatttttct  gtccctttga
1021 tttccacagg  actctaaatt  gccccctctg  aggtcaagga  acacaagatg  gttttgaaa
1081 tgctgaacc  gatacattat  aacatcacca  gcatcgtgcc  tgaagccatg  cctgctgcca

1141 ccatgccagt  cctgctcctc  actggccttt  ttctcttggt  GCGGaattat  gagggcacat
                                           CGCC
1201 cctcaatacc  aggtaagtca  gtcatttatt  tctgtatcta  aggagattat  ttacttggga
1261 ttttggtcca  tcatggtaaa  gaaaaatttt  gcaaaaagga  caaaaagcaa  acctggaaa
1321 atctctgaag  actatgtctg  tgtagcaaa  tgaggacttg  gagaaatttc  agaccaatta
.....3'

```

Kesim reaksiyonu bileşenleri kesim tüplerine hesaplanan miktarlarda eklendi. Tüpler 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda enzimin inaktivasyonu için tüpler 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda yaklaşık 15 dakika bekletildi. 5 µl kesim ürünü, 1 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılıp %2'lik agaroz jelde yürütülerek, görüntüleme sisteminde görüntülendi (Çizelge 10).

Çizelge 10: Kesim sonucu farklı genotiplerde beklenen bant büyüklükleri

Beklenen bant büyüklükleri			
Genotip	TT	CC	TC
Bant büyüklükleri	427 bç.	245 bç. 182 bç.	427 bç. 245 bç. 182 bç.

Marker'la, kesim sonucu gözlenen bant sayıları ve büyüklükleri karşılaştırılarak jel görüntüleri yorumlandı, ve genotiplendirme yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda meme kanserli 75 hastadan (59 premenopozal + 16 postmenopozal) ve herhangi bir kanser tanısı konmamış 25 hastadan (20 premenopozal + 5 postmenopozal) elde edilen genomik DNA'lar kullanıldı.

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylere ait, hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde etkili olduğu düşünülen, menopozal durum, yaş, aile öyküsü, sigara kullanımı, alkol kullanımı hakkında elde edilen bilgiler çizelge 11'de verilmiştir.

Çizelge 11: Hasta ve kontrol grubunda menopozal durum, yaş, aile öyküsü, sigara, alkol kullanımı dağılımı ve yüzdeleri.

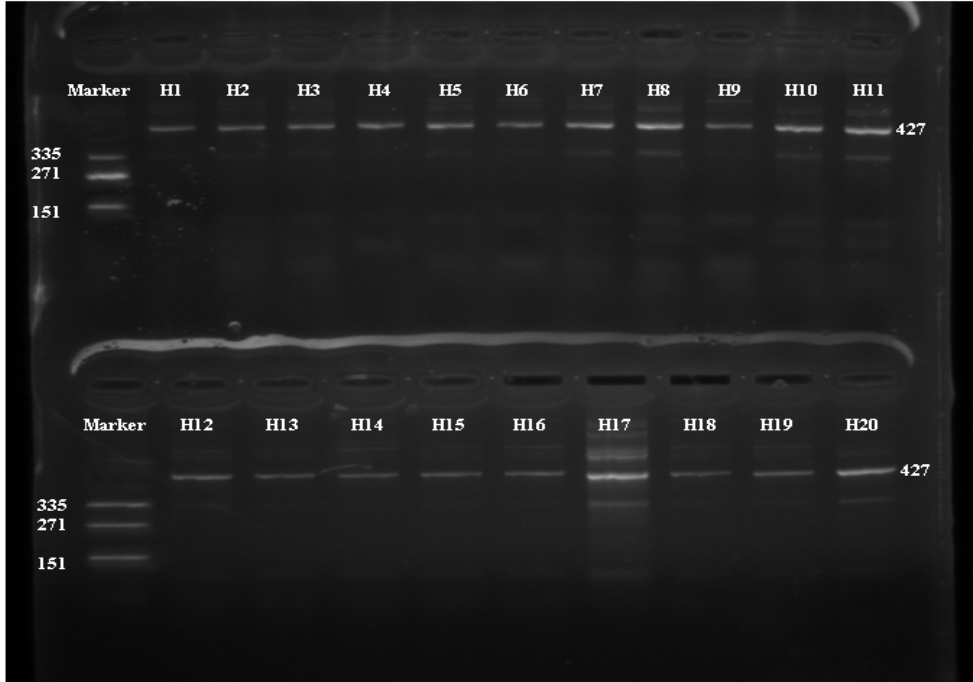
	Menopozal durum (Yaş Aralığı)		Aile öyküsü		Sigara		Alkol	
	Premen.	Postmen.	Evet	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Hasta Grubu (75)	59 %78.6 (28-49)	16 %21.3 (44-73)	25 %33.3	50 %66.6	49 %65.3	26 %34.6	11 %14.6	64 %85.3
Kontrol Grubu (25)	20 %84 (21-45)	5 %16 (41-68)	0	25	18 %72	7 %28	16 %64	9 %36
Toplam (100)	79	21	25	75	67	33	27	73

Çalışmamızda deney grubunu 28-49 yaş aralığında olan premenopozal ve 44-73 yaş aralığında olan postmenopozal evredeki hastalar, kontrol grubunu ise 21-45 yaş aralığında olan premenopozal ve 41-68 yaş aralığında olan postmenopozal evredeki bireyler oluşturdu. Hasta grubunun %78.6'sı, kontrol grubunun %84'ü premenopozal evredeki kişilerden oluştu. Hasta ve kontrol grubunda sigara kullanımına bakıldığında, hasta grubunda 49 (%65.3) sigara kullanan kişiye karşılık, 26 (%34.6) kullanmayan ve kontrol grubunda 18 (%72) sigara kullanan kişiye karşılık 7 (%28) kullanmayan kişi olduğu tespit edildi. Gruplar alkol kullanma durumuna göre değerlendirildiğinde hasta grubunda 11 (%14,6) alkol kullanana karşılık, 64 (%85.3) kullanmayan ve kontrol

grubunda 16 (%64) alkol kullanana karşılık 9 (%36) kullanmayan kişi olduğu tespit edildi (Çizelge 11).

Deney ve kontrol grubundaki tüm örneklerden izole edilen uygun saflıktaki ve ve miktardaki DNA'lerden PCR yapılarak amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı ve değerlendirildi (Şekil 8, 9, 10, 11, 12). Ancak burada jel görüntülerinden bazı örnekler verilmiştir.

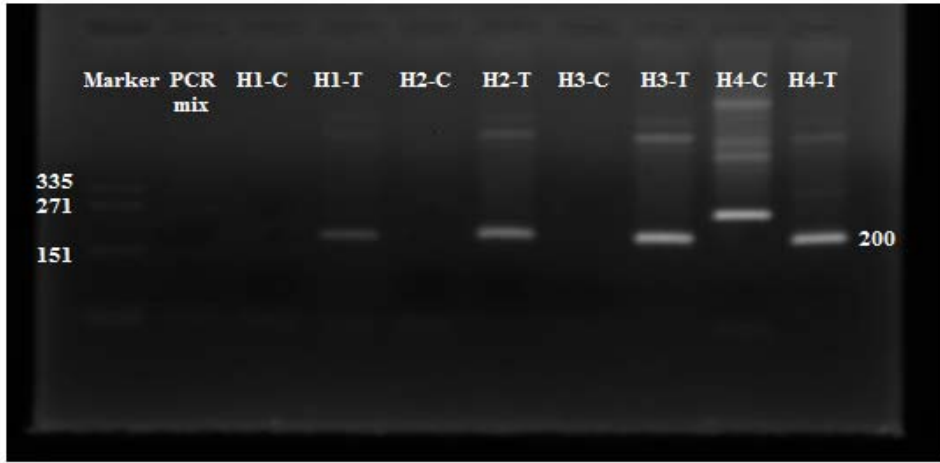
Araştırdığımız kodon 39 Trp/Arg polimorfizminin içinde bulunduğu 427 bç. uzunluğundaki gen bölgesi (common bölge) uygun primerler kullanılarak çoğaltılıp, agaroz jelde yürütülerek tüm hasta (Şekil 8) ve kontrol grubunda görüntülendi.



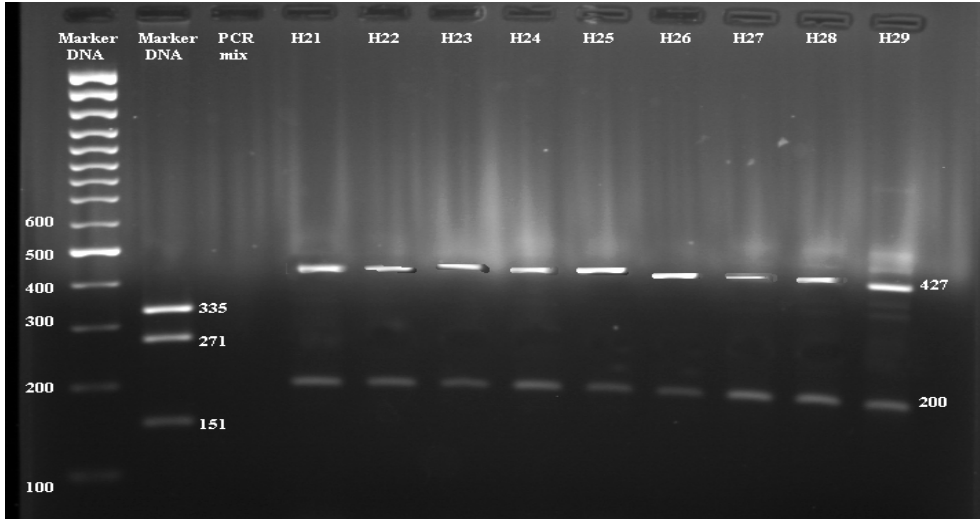
Şekil 8: Hasta DNA'larından (H1-H20) elde edilen 427 bç. uzunluğundaki amplifikasyon ürünleri (common bölge).

427 bç. uzunluğundaki bu polimorfik bölge tespit edildikten sonra, önce T alleleline ve C alleleline özgü primerler ayrı ayrı kullanılarak PCR görüntüleri elde edildi (Şekil 9). Daha sonra aynı işlem tüm primerler bir arada kullanılarak multipleks PCR yöntemiyle de görüntülendi (Şekil 10,11).

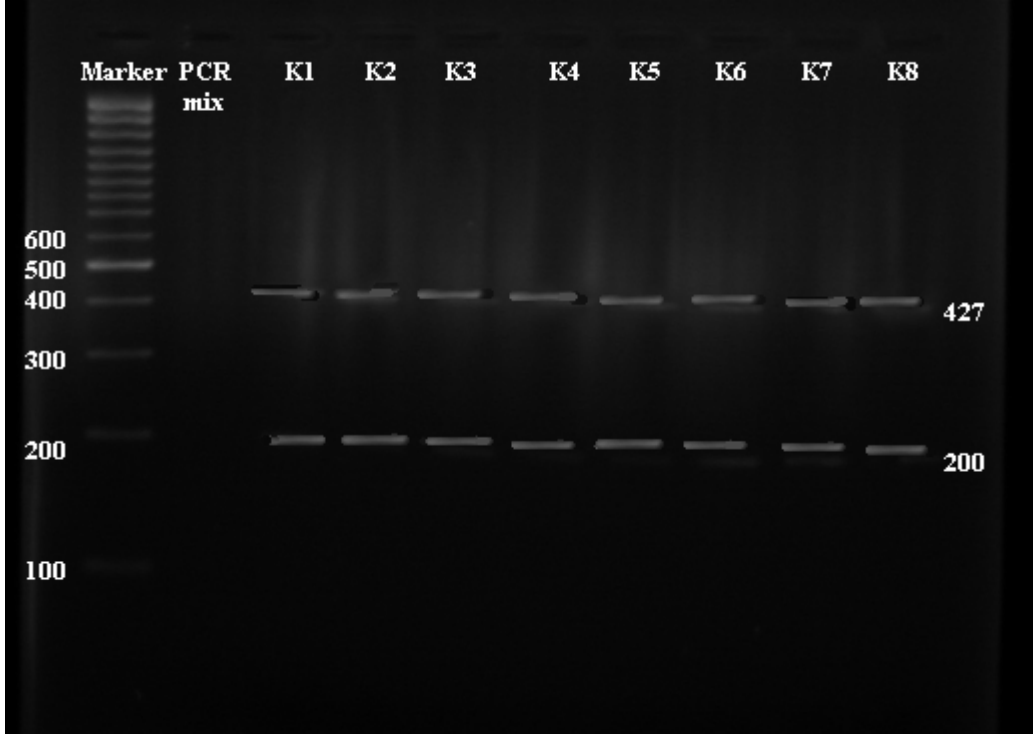
Şekil 9 incelendiğinde kullanılan 4 hastanın hepsinde T alleleine ait 200 bç'lik bandın varlığı gözlenmekte, sadece bir hastada (H4) C alleleine ait bandın bulunması gereken yere yakın bir bölgede bir bandın varlığı dikkat çekmektedir. Şekil 10 ve 11'de tüm primerler bir arada kullanıldığı için hem 427 bç'lik gen bölgesine ait band hem de 200 bç'lik T alleleine ait band gözlenmekte ancak C alleleine ait 264 bç. uzunluğundaki band gözlenmemektedir.



Şekil 9: Hasta DNA'larından, (H1-H4) 264bç. uzunluğundaki C alleli ve 200bç. uzunluğundaki T alleleine ait primerler kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünleri.



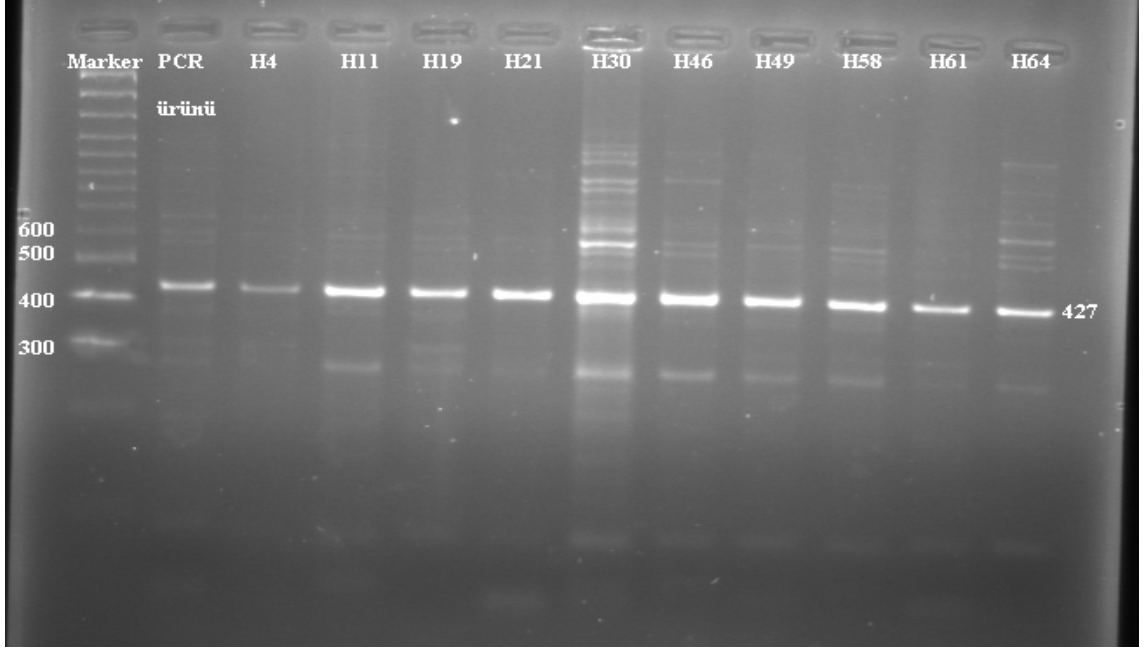
Şekil 10: Hasta DNA'larından (H21-H29) elde edilen amplifikasyon ürünleri. TT, TC ve CC genotiplerine ait 4 primer birlikte kullanılarak yapılan multipleks PCR görüntüleri.



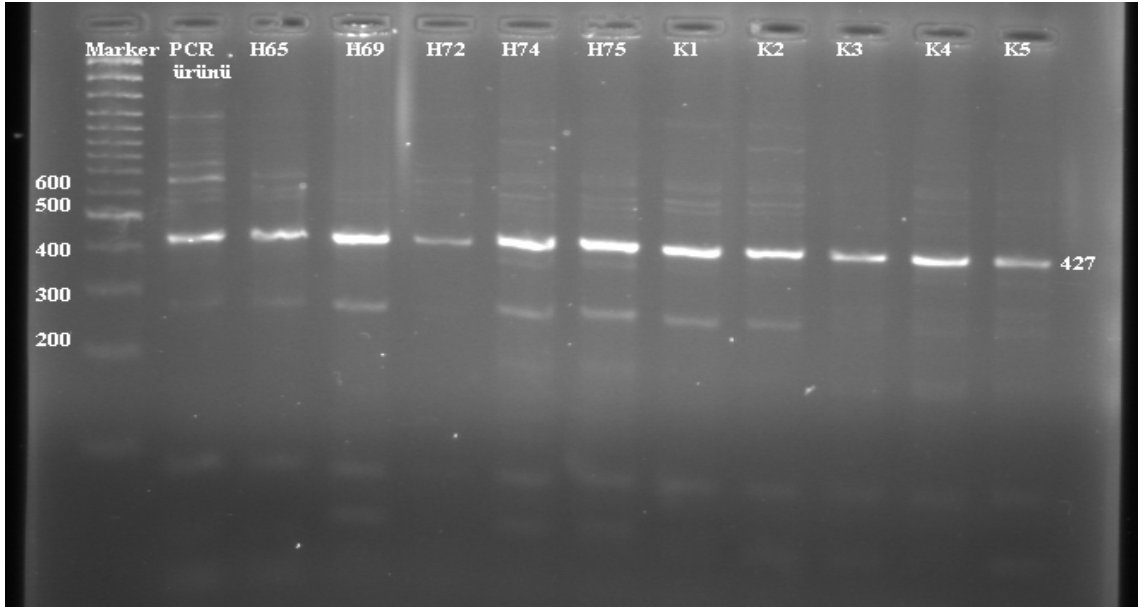
Şekil 11: Kontrol grubu (K1-K8) DNA'larından elde edilen amplifikasyon ürünleri. TT, TC ve CC genotiplerine ait 4 primer birlikte kullanılarak yapılan multipleks PCR görüntüleri.

PCR amplifikasyonu yapılan ve agaroz jelde görüntülenen toplam 75 hastadan 20 hastada, common bölge (427 bç.) ve T alleleine ait bantlar (200 bç.) belirgin olarak görüntülenirken 20 hastada belirgin olmayan bantların (non-spesific) görülmesi diğer bir yöntemle (RFLP) doğrulama yapılmasını zorunlu kılmıştır. Bu 20 hasta için PCR ürünleri RFLP yöntemi ile Aci I restriksiyon enzimi kullanılarak kesim reaksiyonuna tabi tutuldu ve agaroz jel elektroforezinde yürütülerek tekrar değerlendirme yapıldı, PCR ürünleri RFLP reaksiyonuna tabi tutuldu ve C allelinin (264 bç.) varlığını gösteren bir kesim gerçekleşmedi (Şekil 12,13).

Çalışmamızda elimizde bulunan enzim miktarı sınırlı olduğundan RFLP işlemi sadece kontrol grubundan 10, hasta grubundan 20 bireye uygulanabildiği görülmüştür. Şekil 12 ve 13 hasta ve kontrollere ait kesim reaksiyonu sonrası jel görüntülerinden örnekleri oluşturmaktadır.



Şekil 12: PCR ürünlerinin (H4, H11, H19, H21, H30, H46, H49, H58, H61, H64) Aci I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri.



Şekil 13: PCR ürünlerinin (H65, H69, H72, H74, H75, K1, K2, K3, K4, K5) Aci I restriksiyon enzimiyle elde edilen kesim ürünleri.

Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin incelenmesi sonucu tüm bireylerin TT genotipine sahip olduğu saptanmıştır (Çizelge 12) ve çizelge 11'deki özellikler, klinik evre ve genotipleme sonucuna göre hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çizelge 12. Kontrol ve hasta gruplarının yaş, klinik özellik ve genotip dağılımı

	GENOTİP			KLİNİK EVRE
	CC	TC	TT	
HASTA 59 premenopozal + 16 postmenopozal	-	-	75	II (37) III (14) I (22) IV(2)
KONTROL 20 premenopozal + 5 postmenopozal	-	-	25	-
TOPLAM	0	0	100	

5. TARTIŞMA

Bu çalışma meme kanser riski ile CYP19 geni kodon39 Trp/Arg polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere planlanmıştır. Yaptığımız literatür taraması, meme kanserli kadınlarda CYP19'daki kodon 39 Trp/Arg polimorfizminin sadece Japon kadınlarında araştırılmış olduğunu ve varyant Arg allelinin, geç yaşta gebelik yaşamış ve premenopozal evredeki, homozigot ve heterozigot taşıyıcılarda meme kanseri riskini arttırdığını göstermiştir⁹. Türkiye'de ve hatta diğer ülkelerde de bu polimorfizm açısından meme kanserli hastalarda bir genotiplendirmeye rastlanmamıştır. Bu çalışma, kodon 39 Trp/Arg polimorfizminin Türk meme kanserli kadınların genotiplendirilmesi ve allel sıklıklarının belirlenmesi açısından ilk çalışma olması nedeniyle önem arz etmektedir.

Japonya'da yapılan çalışmada premenopozal evredeki 103 meme kanserli kadında, %89,6 TT, %12 TC,CC genotipine, 124 postmenopozal evredeki kadında %93,2 TT, %9 TC,CC genotipine rastlanmıştır. Kontrol grubunda ise toplam 561 kişide %93 TT, % 7 TT,TC genotipine rastlanmıştır⁹.

Yaptığımız çalışmada TT genotipinin hem kontrol grubunda hem de hasta grubunda gözlenmesi ve özellikle aile öyküsü olan hastalarda da görülmesi oldukça ilgi çekicidir. Japon araştırmacıların araştırmadaki kontrol grubuna göre azalmış TT ve artmış TC,CC oranının aksine çalışmamızda her iki grupta da TT genotipi bulgumuz Japon araştırmacıların sonuçları ile uyuşmamaktadır. Tüm genotiplerin TT bulunması çizelge 11'deki yaşamsal koşulların genotipe etkisi hakkında yorum yapmayı güçleştirmektedir.

CYP19 geninde en fazla çalışılmış polimorfizm, intron 4 [TTTA]_n polimorfik tetranükleotit tekrar polimorfizmidir^{52,53,54,55,56}. Bu polimorfizmle ilgili pek çok çalışma yapılmış ve etnik gruplara göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kodon 39 Trp/Arg polimorfizmi ile ilgili yapılmış çalışmalar ve elde edilen sonuçlar oldukça sınırlı sayıdadır. Çalıştığımız hasta sayısı dikkate alındığında bulgularımızın Türk hastalarına ait bir profil oluşturamayacağı açıktır. Bu nedenle sayının çoğaltılarak belki etnik farklılıkların da dahil edildiği çalışmalar Türk popülasyonuna ait bir genotipleme yapılmasını mümkün kılacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda TT genotipinin hem kontrol grubunda hem de hasta grubunda gözlenmesi ve özellikle aile öyküsü olan hastalarda da görülmesi oldukça ilgi çekicidir. Japon araştırmacıların çalışmasındaki kontrol grubuna göre azalmış TT ve artmış TC, CC oranının aksine çalışmamızda her iki grupta da TT genotipi bulgumuz Japon araştırmacıların sonuçları ile uyuşmamaktadır.

CYP19 geninde araştırılan diğer polimorfizmlerde, etnik gruplara ve popülasyonlara bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Araştırdığımız polimorfizm sadece Japon toplumunda çalışıldığı için diğer polimorfizmlerde olduğu gibi popülasyonlara bağlı olarak farklı sonuç elde edilebileceğini ayrıca çalışılan sayımızın toplumumuza ait genotip yapı hakkında kesin bir sonuç bildirmek için yetersiz olduğunu ve hasta sayısının artırılması gerektiğini düşünüyoruz. Ayrıca hasta yaşı, menopoz durumu, hormon replasman tedavisi, ilk gebelik yaşı gibi bazı yaşamsal faktörlere daha dikkatle yaklaşarak farklı gruplar oluşturulmasının daha anlamlı sonuçlara ulaşmamızı sağlayabileceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. **Berardo MD, Allred DC, O'Connell P.** Breast Cancer. *Principles of molecular medicine*, **1998**; 31: 625- 632.
2. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>
(Erişim: 21.01.2007)
3. **Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM.** Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, **2004**; 49:34-43.
4. **Mitrunen K, Hirvonen A.** Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research*, **2003**;544: 9-41.
5. **Kotnis A, Sarin R, Mulherkar R.** Genotype, phenotype and cancer: Role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility. *J. Biosci*, **2005**; 30:93-102.
6. **Healey CS, Dunning AM, Drocher F, Teare D, Pharoah PDP, Luben RN, Easton DF, Ponder BAJ.** Polymorphisms in the human aromatase cytochrome P450 gene (CYP19) and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2000; 21:189-193.
7. **Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, Egawa C, Noguchi S.** Breast cancer risk associated with polymorphism in CYP19 in japanese women. *Int J. Cancer*, **2000**; 89: 325-328.
8. **Probst-Hensch NM, Ingles SA, Diep AT, Haile RW, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE.** Aromatase and breast cancer susceptibility. *Endocr. Relat. Cancer*, **1999**; 6:165-173.
9. **Hirose K, Matsuo K, Toyama T, Iwata H, Hamajima N, Tajima K.** The CYP19 Gene Codon 39 Trp/Arg Polymorphism Increases Breast Cancer Risk in Subsets of Premenopausal Japanese. *Cancer Epidemiology*, **2004**, 13: 1407-1411.
10. <http://prevent.richis.org/what/20030710a/a001.pdf>
(Erişim: 15.02.2007)
11. <http://srs.ngic.re.kr/srs/>
(Erişim: 29.01.2007)

12. **Ünal G, Ünal H.** Meme Hastalıkları. *Nobel Tıp Kitabevleri*, **2001**.
13. <http://www.cancerindex.org/geneweb/X0401.htm>
(Erişim: 15.09.2006)
14. **Sebastian S, Bulun SE.** A Highly Complex Organization of the Human CYP19 (Aromatase) Gene Revealed by the Human Genome Project. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2006**; 86: 4600-4602.
15. **Toda K, Terashima M, Kawamoto T, Sumimoto H, Yokoyama Y, Kuribayashi I, Mitsuuchi Y, Maeda T, Yamamoto Y, Sagara Y.** Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Eur J Biochem*, **1990**; 193: 559-565.
16. **Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER.** Use of Alternative Promoters to Express the Aromatase Cytochrome P450 (CYP19) Gene in Breast Adipose Tissues of Cancer-Free and Breast Cancer Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2006**; 81: 3843-3849.
17. **Harada N, Utsumi T, Takagi Y.** Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P450 gene by alternative use of multiple exons I and promoters, and switching of tissue-specific exons I in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1993**; 90:11312-11316.
18. **Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER.** Tissue-specific and hormonally-controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem*. 1993; 268:19463-19470.
19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/alternative_splicing.html
(Erişim: 02.04.2007)
20. **Simpson ER.** Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. *Semin Reprod Med*. **2004**; 22:11-23.
21. **Chen S, Zhou D, Okubo T, Kao YC, Yang C.** Breast tumour aromatase: functional role and transcriptional regulation. *Endocr. Relat. Cancer*, **1999**; 6:149–156.
22. **Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Lorence SG, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR, Bulun SE.** Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. *Endocrine Reviews*, **2006**; 15: 342-355.
23. **Miller WR.** Aromatase and the Breast: Regulation and Clinical Aspects. *Maturitas*, **2006**; 54: 335-341
24. **Miller WR, Mullen P, Sourdain P, Watson C, Dixon JM, Telford J.** Regulation of aromatase activity within the breast. *J Steroid Biochem*, **1997**; 61:193–202.

25. **Bulun SE, Simpson ER.** Regulation of aromatase expression in human tissues. *Breast Cancer Res. Treat.*; **1994**; 30:19–29.
26. **Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L.** Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*, **1993**;15:17-35.
27. **Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Kimura M, Ohuchi N, Sasano H.** In situ production of estrogens in human breast carcinoma. *Breast Cancer*, **2002**; 9: 296-302.
28. **Simpson ER, Jones M, Davis S, Rubin G.** Local estrogen synthesis in the breast - role in cancer development. *J. Soc. Gynecolog. Invest*, **2000**; 7:518-521.
29. <http://www.3dchem.com/moremolecules.asp?ID=242&othername=Estrogens>
(Erişim: 06.06.2007)
30. **Yager JD, Liehr JG.** Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1996**; 36:203-232.
31. **Onat T, Emerk K, Sözmen EY.** *İnsan Biyokimyası*. Ankara. Palme Yayıncılık, **2002**
32. <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/postervekitapciklar/kitapciklar/Kanser.pdf>
(Erişim: 08.06.2006)
33. **Venkitaraman AR.** Cancer Susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, **2002**; 108:171-182.
34. **Welch SH, King MC.** BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*, **2001**; 10(7): 705-713.
35. **Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID.** BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, **2003**; 196: 19-41.
36. **Klug WS, Cummings MR.** Genetik Kavramlar. Ankara. *Palme Yayıncılık*, **2003**.
37. <http://www.gbmc.org/genetics/harveygenetics/cancer/sporadfamilhered.cfm>
(Erişim: 25.02.2006)
38. <http://www.uccc.info/cancercenter/content/breast/default.asp?index=BreastCancer>
(Erişim: 05.03.2006)
39. **Welsh PL, Owens KN, King MC.** Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends in Genetics*, **2000**;16: 69-74.

40. **Manguoglu AE, Lüleci G, Özçelik T, Çolak T, Schayek H, Akaydin M, Friedman E.** Germline Mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* Genes in Turkish Breast/Ovarian Cancer Patients. *Human Mutation*, **2003**; 21: 444-451.
41. **Yoshida K, Yoshio M.** Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*, **2004**; 95: 866-871.
42. **Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID.** BRCA1 gene in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, **2003**; 196: 19-41.
43. **Deng CX.** BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research*, **2006**; 34:1416-1426.
44. **Starita LM, Parvin JD.** The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Current Opinion Cell Biology*, **2003**; 15:345-350.
45. **Kristensen VN, Haraldsen EK, Anderson KB, Lonning PE, Erikstein B, Karesen R, Gabrielsen OS, Dale AL.** CYP17 and breast cancer risk. **1999**; 4:451-459.
46. **Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Kang D, Vainio H, Uusitupa M, Hirvonen A.** Polymorphic Catechol-O-methyltransferase gene and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology*, **2001**; 10:635-640.
47. **Mason LF, Sharp L, Cotton SC, Little J.** Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A Huge Review. *American Journal of Epidemiology*, **2005**; 161:901-915
48. **Zheng W, Xie DW, Jin F, Cheng JR, Dai Q, Wen WQ, Shu XO, Gao YT.** Genetic Polymorphism of Cytochrome P450-1B1 and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology*, **2000**; 9:147-150.
49. **Millikan R, Pittman G, Tse CK, Savitz DA, Newman B, Bell D.** Glutathione S-Transferases M1, T1, and P1 and Breast Cancer. *Cancer Epidemiology*, **2000**; 9:567-573.
50. **Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Uusitupa M, Hirvonen A.** Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, **2001**; 22:827-829.
51. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(3): 125.
52. **Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, De Vivo I, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Hunter DJ.** A tetranucleotide repeat polymorphism in CYP19 and breast cancer risk. *Int J Cancer.*, **2000**; 15: 204-210.

53. **Dick IM, Devine A, Prince RL.** Association of an aromatase TTTA repeat polymorphism with circulating estrogen, bone structure, and biochemistry in older women. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2005**; 288: 989-995.
54. **Baghaei F, Rosmond R, Westberg L, Hellstrand M, Eriksson E, Holm G, Bjorntorp P.** The CYP19 gene and associations with androgens and abdominal obesity in premenopausal women. *Obes Res.*, **2003**;11: 578-85.
55. **Ribeiro FS, de Amorim LM, de Almeida Simao T, Mendonca GA, de Moura Gallo CV, Pinto LF.** CYP19 (TTTA)_n polymorphism and breast cancer risk in Brazilian women. *Toxicol Lett.*, **2006**; 20: 90-95.
56. **Okobia MN, Bunker CH, Zmuda JM, Ezeome ER, Anyanwu SN, Uche EE, Ojukwu J, Kuller LH, Ferrell RE.** Simple tandem repeat (TTTA)_n polymorphism in CYP19 (aromatase) gene and breast cancer risk in Nigerian women. *J Carcinog.*, **2006**; 9: 5-12.
57. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, **1989**; 2nd Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
58. **Aksoy K, Kayrın L, Tuli A, Attila G, İnal TC, Yalın E.** Tanıda DNA Teknikleri Yaz Okulu IV Kitapçık. **2000**
59. Deneysel Biyokimya II Laboratuar Notları, Hacettepe Üniv. **2005**.
60. <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/123.pdf>
(Erişim: 11.06.2007)
61. <http://arbl.cvms.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>
(Erişim: 19.03.2007)
62. http://www.mvm.ed.ac.uk/LittleFrance/HSNotes/GN01_ETHIDIUMBROMIDE.pdf
(Erişim: 05.04.2007)

8. EKLER

EK.1 Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Yöntemler

Kullanılan kimyasalların ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning”⁵⁷ esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülünden yararlanılmıştır.

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (V)

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V)

1.1. Eritrosit Lizis Tamponu

- 0,32 M Sukroz
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 5 mM MgCl₂
- %1 TritonX100

İstenen hacim için gerekli miktarlar hesaplandı, tartıldı, temiz bir şişede distile su ile istenen hacme tamamlandı, otoklavda steril edildi, +4 C’de buzdolabında saklandı.

1.2. Fizyolojik Tampon

- 0,075 M NaCl
- 0,025 M EDTA

İstenen hacim için gerekli miktarlar hesaplandı, tartıldı, temiz bir şişede distile su ile istenen hacme tamamlandı, pH 7.5’e ayarlandı, otoklavda steril edildi, +4 C’de buzdolabında saklandı.

1.3. TE-9 Tamponu

- 500 mM Tris base
- 20 mM EDTA pH 9,0
- 10 mM NaCl

İstenen hacim için gerekli miktarlar hesaplandı, tartıldı, temiz bir şişede distile su ile istenen hacme tamamlandı, otoklavda steril edildi, +4 C'de buzdolabında saklandı.

1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) Solüsyonu

- %10 SDS

20 ml için 2 gr SDS tartıldı, 20 ml saf su ile bir şişe içerisinde iyice karıştırıldı, otoklavda steril edildi, +4 C'de buzdolabında veya oda ısısında saklandı.

1.5. 6M NaCl Solüsyonu

- 35,06 g NaCl

35,06 gr. NaCl temiz bir şişeye alındı, 100 ml. distile su eklenerek çözülmesi sağlandı, otoklavda steril edildi, oda ısısında saklandı.

1.6. TE Tamponu

- 10 mM Tris pH 8.0
- 0.1 mM EDTA pH 8.0

İstenen hacim için gerekli miktarlar hesaplandı, tartıldı, temiz bir şişede distile su ile istenen hacme tamamlandı, otoklavda steril edildi, +4 C'de buzdolabında saklandı.

EK.2 DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Ölçülmesi

PCR ve RFLP gibi reaksiyonlar çalışırken, DNA'yı çözdüğümüz sıvı ortam içerisindeki DNA konsantrasyonu ve saflık derecesini bilmemiz önemlidir. Bunun belirlenmesi UV (Ultra Viyole) spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga

boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbands değeri 50 µg/ml, tek iplikli DNA için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml' lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir⁵⁸.

UV absorbandsı DNA'nın saflık değerini kontrol etmek amacıyla da kullanılabilir. Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm'deki absorbands oranı $A_{260nm}/A_{280nm}=1.8$ 'dir. Bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. Bu değerden düşük değerler protein kontaminasyonu, büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir^{58,59}.

EK.3 PCR Amplifikasyonu

PCR, in vitro ortamda ve uygun koşullar altında DNA'nın belirli bir bölgesinin primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bir çeşit in vitro klonlama olarak da tanımlanan PCR; 94°C-98°C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37°C-65°C aralığında gerçekleştirilen yapışma (primerlerin bağlanması) ve 72°C'de gerçekleştirilen sentez aşamalarından oluşur ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır.

Bir PCR reaksiyonu için gerekli olan bileşenler;

- Amplifiye edilecek bölge için kalıp görevi yapacak **kalıp Genomik DNA**
- Sadece amplifiye edilecek olan hedef bölgenin sınırlarını belirleyen sentetik **Primerler**
- Polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan, termofilik bakterilerden izole edildiği için yüksek sıcaklıklara dayanıklı **DNA Polimeraz Enzimi**
- Polimerizasyon için gerekli olan enerji ve nükleotid kaynağını oluşturacak **dNTP'ler (Deoksinükleotid Trifosfatlar)**
- Reaksiyon koşullarının optimum şartlara getirilmesini sağlayan (Uygun pH, Mg⁺²) sağlayan **Tampon Karışımı** gereklidir.

EK 3.1. Multipleks PCR

Multipleks PCR yöntemi, gen üzerindeki farklı hedef bölgeler için özgül olan primerlerin aynı anda, aynı reaksiyon tüpü içinde kullanılarak çok sayıda hedef bölgenin aynı anda çoğaltılabildiği bir PCR yöntemidir.

EK.4 Agaroz Jel Elektroforezi

Bir su yosunundan elde edilen agaroz, D-Galaktoz ve 3,6-anhidro L-Galaktoz birimlerinin lineer polimerleridir^{59,60,61}.

Agaroz jel elektroforezinde, sulu bir çözelti içinde, yoğunluğu agarozun konsantrasyonu ile belirlenen jele yüklenen yüklü parçacıklar, uygulanan elektrik alanının etkisi ile jel içinde bir yükten diğerine göç eder. Agaroz jeldeki örnekler yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir.

A) Agaroz Jelde DNA'nın Hareket Hızını Etkileyen Faktörler:

a) DNA'nın Molekül Büyüklüğü: Lineer çift iplikli DNA molekülleri bir elektrik alanında bir bütün halinde hareket etme eğilimindedir. Çift zincirli doğrusal DNA moleküllerinin jeldeki hızı, baz çifti sayısının logaritması ile ters orantılıdır. Büyük moleküller, sürtünmenin büyük olması ve jeldeki porlar arasında daha zor yol bularak ilerlemelerinden ötürü, daha yavaş hareket ederler ve katettikleri yolu küçük moleküllere oranla daha fazla ısıtırlar^{60,61}.

b) Agaroz Konsantrasyonu: Belirli büyüklükteki doğrusal bir DNA molekülü, değişik agaroz konsantrasyonlarındaki jellerde farklı hızlarla ilerlerler. DNA'nın elektroforetik hareketliliğinin logaritması (μ) ile jel konsantrasyonu (Υ) arasında bir ilişki vardır.

$$\text{Log}\mu = \text{Log}\mu_0 - K_r \Upsilon$$

μ_0 : DNA'nın serbest elektroforetik hareketi ve

K_r : Gecikme sabitesi (Jelin özelliklerine, büyüklüğüne ve göç eden molekülün göç şekline bağlı sabit bir sayıdır)

Dolayısıyla değişik konsantrasyonlardaki jellerin kullanılmasıyla çok farklı boyutlardaki DNA moleküllerini ayırmak mümkündür^{60,61}.

Çizelge 13. Agoroz konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri^{60,61}

Agaroz mik. (%)	DNA (kb)	DNA (bç)
0.3	5-60	100- 1000
0.6	1-20	80- 500
0.7	0.8-10	60- 400
0.9	0.5-7	40- 200
1.2	0.4-6	10- 100
1.5	0.2-4	
2.0	0.1-2	

c) DNA'nın Konformasyonu: Aynı molekül ağırlığında süperhelikal dairesel (form I), çentikli dairesel (form II), ve doğrusal DNA molekülleri, agaroz jellerde farklı hızlarla ilerler. Bu üç formun bağıl hızları temelde jelin agaroz konsantrasyonuna bağlı olmakla birlikte, uygulanan akımın gücü, tamponun iyonik gücü, süperhelikal dairesel DNA'daki kıvrımların sayısı da hızı etkileyen faktörler arasındadır. Aynı şartlar altında form I DNA, form II DNA'dan daha hızlı göç eder^{60,61}.

d) Uygulanan Voltaj: Düşük voltajlarda doğrusal DNA parçalarının hareket hızları, uygulanan voltajla doğru orantılıdır. Bununla birlikte, elektriksel alanın gücü arttıkça büyük molekül ağırlıklı DNA parçalarının hareketi farklı ölçülerde artar. Bundan ötürü voltajın artmasıyla agaroz jeldeki etkili ayırım aralığı azalır. Büyüklükleri 2 kb'dan daha fazla olan DNA parçalarını en iyi şekilde ayırabilmek için agaroz jeller 5 volt / cm'den fazla olmayan akımla yürütülmelidir^{60,61}.

e) Elektrik akımının yönü:

50-100 kb'dan daha büyük DNA molekülleri elektrik akımının yönü sabit kalırsa agaroz jelde aynı yönde göç ederler. Bununla birlikte elektrik akımının yönü periyodik olarak değiştirilerek DNA moleküllerinin zorunlu olarak yönlerini değiştirmesi sağlanır. Daha büyük olan DNA moleküllerinin yeni akım yönüne uyum sağlamaları daha uzun

zaman alır. Pulsed-field jel elektroforezi ekstrem büyüklükteki DNA molekülü popülasyonunu ayırmak için kullanılabilir^{60,61}.

f) Baz Bileşimi ve Sıcaklık : DNA moleküllerinin agaroz jellerdeki davranışları baz bileşimleri ve jelin yürütüldüğü sıcaklık derecesi tarafından çok fazla etkilenmez. Dolayısıyla değişik boylardaki DNA moleküllerinin agaroz jeldeki bağıl hareketi 4-30°C arasında değişmez. Jeller genellikle oda sıcaklığında yürütülür. Bununla birlikte, %0.5'den az agaroz içeren jeller ve düşük kaynama ısılı agaroz jeller daha narindir ve zarar görmemeleri için elektroforezlerinin 4 °C 'da yürütülmesi daha uygundur^{60,61}.

g) İnterkalasyon Yapan Ajanların Varlığı: Agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'nın gözlenmesi için kullanılan floresan karakterdeki etidiyum bromür boyası, doğrusal DNA moleküllerinin elektroforetik hareketini % 15 oranında azaltır. Boya, baz çiftlerinin arasına girerek lineer ve çentikli sirküler DNA moleküllerini boyuna uzatarak onları daha rijit hale getirir^{60,61}.

h) Elektroforez Tamponunun Bileşimi: DNA'nın elektroforetik hareketi, elektroforez tamponunun bileşimi ve iyonik gücü tarafından etkilenir. İyonların yokluğunda (örn. hata sonucu jele tampon eklenmemesi durumunda) elektriksel iletkenlik minimum düzeydedir ve DNA'nın hareketi çok yavaştır. Çok yüksek iyonik güçteki tamponun kullanılması halinde (örn. yanlışlıkla 10x elektroforez tamponu kullanıldığında), elektriksel iletim çok fazladır ve çok fazla ısı açığa çıkar. En kötü durum jelin erimesi ve DNA'nın denatüre olmasıdır. Doğal çift zincirli DNA'lar için değişik tamponlar kullanılabilir. Bunlar arasında EDTA (pH 8.0), pH 7.5-8.5 olan yaklaşık 50 mM konsantrasyondaki Tris-asetat (TAE), Tris-borat (TBE) ya da Tris-fosfat (TPE) kullanılabilir. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeltiler halinde hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanır. Düşük iyon kapasitesine ait elektroforez tamponları elektriksel iletkenlikleri de daha düşük olduğundan uzun süreli (gece boyu) elektroforez işlemlerinde az ısınmaktadır. Bu nedenle düşük akım kullanılarak gerçekleştirilen uzun süreli elektroforez işlemlerinde tercih edilir. Yüksek iyon kapasitesine sahip elektroforez tamponları ise çabuk ısındıklarından kısa süreli elektroforez işlemlerinde kullanılır^{60,61}.

B) Agaroz Jelin Hazırlanması:

Agaroz hazırlanmasında jel kalınlığı dikkate alınarak jel döküm tablasının boyutları ölçülür ve jel hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gerekli olan agaroz tartılır ve erlen içine koyulur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu ilave edilir ve mikrodalga fırında eritilir. Çok kısa süreli bir kaynama yeterlidir. Daha sonra jel üzerine son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde stok EtBr solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50 °C'ye geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür, kuyucuk oluşturmak için tarak eklenir ve yaklaşık 30 dk beklenecek şekilde polimerize olması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzerini kapatacak şekilde 1X TBE tamponu eklenir. Yerleştirilen tarak dikkatli bir şekilde çıkartılır. Jel örneklerin yüklenmesi ve elektroforez için hazırdır.

4.1. 1X TBE Tamponu

- 108 g Tris-base (0,9 M)
- 55 g Borik asid (0,9 M)
- 8,3 g EDTA pH 8,0 (20mM)

Bileşenler tartıldı, temiz bir şişeye alındı, distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlandı, çözülmesi sağlandı, manyetik karıştırıcıda çözülerek pH 8,0'e ayarlandı, otoklavda sterilizasyonu yapıldı ve 10X TBE Tamponu elde edildi. 1 hacim 10X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek 1X TBE tamponu elde edildi. Oda ısında saklandı.

4.2. EtBr (Ethidium Bromid) Solüsyonu

- 0,1 g etidyum bromid
- 10 ml distile su

0,1 g etidyum bromid dikkatli bir şekilde tartılır ve 10 ml. distile su içinde çözülür. Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak +4 C°'de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

Agaroz jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmenin en uygun yolu, floresan özellikteki EtBr boyasını kullanmaktır. Bu boya DNA'nın bazları arasına interkalasyon yapabilen, düzlemsel yapıya sahip halkasal bir grup içerir. DNA tarafından absorblanan 254

nm dalga boyundaki UV ışığı boya molekülüne aktarılır. DNA'ya bağlı boyanın kendisi de 302-366 nm arasındaki ışınları absorblar. Çevreye geri yayılan enerji, görünür ışık bölgesindeki (590 nm dalga boyunda) kırmızı-turuncu ışıktır. Böylece jeldeki DNA bandı görünür hale gelir. Etidium bromür hem tek ve çift zincirli DNA'yı hem de RNA'yı gözlemek için kullanılabilir. Ancak bu boyanın tek zincirli nükleik asit moleküllerine karşı ilgisi daha azdır. Boyama işleminden sonra jel yüzeyi çok koyu boyanmışsa, bantları net olarak görebilmek için jel bir plastik kap içindeki suya daldırılır ve fazla boyadan arındırılır. EtBr kuvvetli bir mutajen ve oldukça toksiktir. Bu boyayı içeren çözeltilerle çalışırken, eldiven giyilmelidir ve çok dikkatli çalışılmalıdır⁶².

4.3. 6X Yükleme Tamponu

100 ml hazırlamak için;

- 40 gr Sukroz
- 0.25 gr Bromfenol mavisi

Belirtilen miktarlarda sukroz ve bromfenol mavisi tartılır, üzerine 100 ml distile su ilave edilerek vorteksle iyice karıştırılır. Ependorf tüplere paylaştırılarak 4⁰C'de saklanır.

PCR ürünü 6X Yükleme Tamponu ile 1/5 oranında karıştırılır.

EK.5 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

RFLP yönteminin esası, mutant yada normal dizi, restriksiyon enzimlerinden biri için hedef kesim bölgesi oluşturuyorsa bu bölgede kesimin varlığına bakılarak mutasyon olup olmadığının belirlenmesi esasına dayanır.

Kesimden sonra örnekler jelde analiz edilir. Eğer restriksiyon endonukleaz enzimi için kesim bölgesi yaratan bir dizi söz konusu ise kesim yapıldığı için birden fazla bant, aksi durumda ise tek bant görülecektir.

5.1. Acil Restriksiyon Endonükleaz Enzimi

Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimi, özellikler ve çalışma şartları çizelge 12’de verilmiştir.

Çizelge 14. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimi, özellikler ve çalışma şartları

	Acil Restriksiyon Enzimi
Kaynağı	Arthrobacter citreus
Kesim bölgesi	G↓CGG CGC↑C
İnkübasyon tamponu	10X NEBuffer 3
Çalışma sıcaklığı	37 °C
Saklama sıcaklığı	-20 °C
İnaktivasyonu	65 °C’de 20 dak.
Firma	BioLabs

9. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini İsmet İnönü İlkokulunda, orta okul ve lise öğrenimini Özel Adana Lisesinde tamamladı. 2000 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Şubat 2007 - Mayıs 2007 tarihleri arasında Ankara Maya Tüp Bebek ve Kadın Sağlığı Merkezi Embriyoloji laboratuvarında, Mayıs 2007 - Ağustos 2007 tarihleri arasında Ankara Gen-Lab Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinde Biyolog olarak görev yaptı.