

**T.C.**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MESANE KANSERİ İLE KU70/80 POLİMORFİZMİNİN**  
**İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Gülçin YAVUZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2844-YL-11 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez. No: 78**

**2012-İSPARTA**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Danışmanlığımı üstlenen engin bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na,

Göstermiş olduğu desteği için değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a,

Bilgi ve deneyimlerini paylaştığı Tıbbi Biyoloji bölümü hocam Sayın Doç. Dr. Efkan UZ'a,

Yüksek Lisans eğitim boyunca her zaman yanımda olduklarını hissettiğim Tıbbi Biyoloji asistan arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Ayşe YİĞİT'e, Sayın Arş. Gör. Dilek AŞCI ÇELİK'e, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca benimle aynı kaderi paylaşan ve yanımda olan sevgili arkadaşım Pınar Polat'a,

Tıbbi Genetik Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sıtkı ÖZTAŞ'a,

Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Alim KOŞAR ve asistanlarına,

İstatistik analizlerimde bilgi ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na

Histoloji ve Embriyoloji Asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Hakan DARICI ve Arş. Gör. Meltem ÖZGÖÇMEN'e

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen ve bana hayatımın her döneminde olduğu gibi bu dönemde de anlayış gösteren sevgili aileme, Bu süreçte zamanını benimle paylaşan nişanlım Engin TÜREL'e sonsuz teşekkürler ederim.

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası .....	i
Önsöz .....	ii
İçindekiler .....	iii
Simge ve Kısaltmalar Dizini .....	v
Şekiller Dizini .....	vi
Resimler Dizini .....	vii
Tablolar Dizini.....	viii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Mesane Kanseri Gelişimi.....	3
2.2. Mesane Kanseri Gelişiminde Prognostik Faktörler .....	3
2.2.1. Tümör çapı.....	3
2.2.2. Tümör sayısı .....	4
2.2.3. Tümör morfolojisi .....	4
2.2.4. Tümör lokalizasyonu .....	4
2.2.5. Evre.....	4
2.2.6. Grade (Derece) .....	6
2.2.7. Vasküler veya lenfatik invazyon .....	6
2.2.8. Tümörle birlikte “Carsinoma instu-CIS” varlığı .....	6
2.2.9. ABO(H) izoantijenitesinin kaybı.....	6
2.2.10. Epidermal growth faktör pozitifliği (EGF) .....	7
2.2.11. Kan grubu .....	7
2.2.12. Yaş ve Cinsiyet.....	7
2.2.13. DNA Ploidy .....	8
2.2.14. Gen Mutasyonları .....	8
2.2.15. Sigara.....	8
2.3. Mesane Kanseri Ve Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki .....	9
2.4. Mesane Kanseri Ve Ku Proteini İlişkisi.....	10
2.4.1. Ku Proteini.....	10
2.4.2. Ku Proteininin Önemli Yapısal Ve Biyokimyasal Karakteristikleri ..	11
2.4.2.1. Ku’nun yapısal özellikleri .....	11
2.4.2.2. Ku protein biyokimyası.....	12
2.4.2.2.1. Dimerizasyon .....	12
2.4.2.2.2. Hücre içi rolü .....	12
2.4.2.2.3. DNA tamir özellikleri .....	13
2.4.2.2.4. DNA-PKcs biyokimyası .....	15
2.4.3. Ku Proteininin Normal Hücrelerdeki Rolü.....	15
2.4.3.1. DNA çift zincir kırık tamiri (DSBR) .....	15
2.4.3.2. Telomer korunması .....	17

2.4.3.3. Antiapoptosis .....	17
2.4.3.4. Gen transkripsiyonunun düzenlenmesi .....	18
2.4.4. Ku Proteininin Kanserdeki Rolü .....	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>20</b>
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	20
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	21
3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu .....	22
3.4. Dokudan DNA İzolasyonu .....	23
3.5. <i>Ku70/80</i> Polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması .....	24
3.5.1. <i>Ku70</i> ve <i>Ku80</i> Promotor Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri .....	24
3.5.2. PCR Koşulları .....	24
3.5.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü .....	26
3.5.4. Enzim Kesim Reaksiyonu .....	26
3.5.5. Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü .....	27
3.5.6. İstatistiksel Analizler .....	29
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
4.1. <i>Ku70</i> -1310C/G Polimorfizmi Sonuçları .....	30
4.2. <i>Ku80</i> -1401G/T polimorfizmi .....	34
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>40</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>43</b>
<b>7. ÖZET .....</b>	<b>44</b>
<b>8. ABSTRACT .....</b>	<b>45</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>53</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Rb</b>	: Retinoblastoma geni
<b>P53</b>	: Tümör supressör protein 53
<b>CDK</b>	: Cyclin Dependent Kinase – Siklin Bağımlı Kinaz
<b>INK 4</b>	: (CDK) İnhibitör Gen Ailesi
<b>OGG1</b>	: Oxoguanin Glycosylase 1
<b>ERCC1</b>	: Excision Repair Cross-Complementation Group 1
<b>XPC</b>	: Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C
<b>RAD</b>	: Ras-Associated with Diabets
<b>NHEJ</b>	: Non-Homolog End Joining – Homolog olmayan uçların birleşimi
<b>HR</b>	: Homolog recombination – Homolog Rekombinasyon
<b>XRCC</b>	: X-ray Repair Cross Complement
<b>V(D)J</b>	: Variable Diverse Joining gen segmenti
<b>DNA-PK</b>	: DNA Protein Kinaz
<b>DNA-PKcs</b>	: DNA Protein Kinaz Katalitik subunit
<b>NLS</b>	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
<b>MM</b>	: Multiple Myeloma
<b>SP1</b>	: Specifity Protein 1
<b>NBS1</b>	: Nijmegen Breakage Syndrome1
<b>MRE11</b>	: Meiotic Recombination11
<b>BRCA</b>	: Breast Cancer Gene – Meme Kanseri Geni
<b>DSBs</b>	: Double Strand Breaks – Çift Zincir Kırıkları
<b>DSBR</b>	: Double Strand Break Repair – Çift Zincir Kırıkları Tamiri
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lymphoma gene – Bcl-2 lenfoma geni
<b>BAX</b>	: Bcl-2 ilişkili X protein

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b> DNA-PK ve Ku heterodimerin DNA kırık uca bağlanması ve tamir mekanizması .....	14
<b>Şekil 2:</b> Non- Homolog End Joining (NHEJ) ve Homolog Rekombinasyon .....	16
<b>Şekil 3:</b> <i>Ku70</i> restriksiyon enzim kesim şematik örneklemeesi .....	28
<b>Şekil 4:</b> <i>Ku70</i> restriksiyon enzim kesim şematik örneklemeesi .....	28
<b>Şekil 5:</b> <i>Ku70 -1310C/G (rs2267437)</i> Polimorfizmi için (dbSNP) rs2267437 numaralı nükleotit değişimi gösterimi .....	30
<b>Şekil 5.1:</b> <i>Ku70</i> geninin promotor bölgesi üzerinde amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi .....	31
<b>Şekil 6:</b> Normal doku, tümörlü doku ve kan örneklerinde gözlenen <i>Ku70-1310C/G</i> SNP için genotip frekansları .....	32
<b>Şekil 7:</b> <i>Ku80 -1401G/T (rs828907)</i> Polimorfizmi için (dbSNP) rs828907 numaralı nükleotit değişimi gösterimi. ....	34
<b>Şekil 7.1:</b> <i>Ku80</i> geninin promotor bölgesi üzerinde amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. ....	34
<b>Şekil 8:</b> Normal doku, tümörlü doku ve kan örneklerinde gözlenen <i>Ku80 -1401G/T</i> SNP için genotip frekansları .....	36

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1:</b> <i>Ku70 -1310C/G</i> Polimorfizmine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü .....	31
<b>Resim 2:</b> <i>Ku80 -1401G/T</i> Polimorfizmine Ait Jel Elektroforez Görüntüsü .....	35

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Mesane Kanseri 2002 TNM Sınıflandırması. ....	5
<b>Tablo 2:</b> Dünyada görülen mesane kanseri vakalarına ait yaş istatistikleri .....	7
<b>Tablo 3:</b> Ku70 ve Ku80 için master mix hazırlanması .....	25
<b>Tablo 4:</b> <i>Ku70 -1310C/G</i> polimorfizmi için PCR Şartları .....	25
<b>Tablo 5:</b> <i>Ku80 -1401G/T</i> polimorfizmi için PCR şartları .....	26
<b>Tablo 6:</b> Restriksiyon Enzimi Karışımının Hazırlanışı .....	27
<b>Tablo 7:</b> <i>Ku 70</i> genotip frekansları .....	32
<b>Tablo 8:</b> <i>Ku 70</i> allel frekansları .....	33
<b>Tablo 9:</b> <i>Ku70 -1310C/G</i> SNP için Hardy-Weinberg dengesi ve ilişkilendirme testi .....	33
<b>Tablo 10:</b> <i>Ku80</i> genotip frekansları .....	36
<b>Tablo 11:</b> <i>Ku80</i> allel frekansları .....	37
<b>Tablo 12:</b> <i>Ku80 -1401G/T</i> SNP için Hardy-Weinberg dengesi ve ilişkilendirme testi .....	37
<b>Tablo 13:</b> <i>Ku70 -1310C/G</i> SNP Normal dokuya ait allel frekansları ve yaş ortalamaları .....	38
<b>Tablo 14:</b> <i>Ku70 -1310C/G</i> SNP Tümör dokuya ait allel frekansları ve yaş ortalamaları .....	38
<b>Tablo 15:</b> <i>Ku80 -1401G/T</i> SNP Normal dokuya ait allel frekansları ve yaş ortalaması .....	38
<b>Tablo 16:</b> <i>Ku80 -1401G/T</i> SNP Tümör dokuya ait allel frekansları ve yaş ortalamaları .....	39



## 1. GİRİŞ

Normal hücre bölünme süreci regülatör proteinler olarak görev yapan siklinler, siklin bağımlı kinaz (CDKI) inhibitörleri ve tümör supressor proteinlerin aktivitesi ile gerçekleşen bir seri fazdan ve bu fazların kontrolünden sorumlu kontrol noktalarından oluşmaktadır.

Siklinler, CDK kompleksleri ve CDKI molekülleri, hücre döngüsü, farklılaşma, DNA onarımı ve apoptozis sistemlerinin düzenlenmesiyle ilgili genlerin ifade edilmesini denetlemektedir (Ekmekçi ve ark. 2008).

Hücre çoğalması ve hücre siklusunun ilerlemesi büyümenin kontrolünde rolü olan bu genlerin ekspresyonu ile bağlantılıdır. Hücre siklusunun düzenlenmesinde oluşabilecek hatalar hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasına neden olur. Kanser gelişiminde tümör baskılayıcı fonksiyon, DNA onarımı ve apoptozis kritik yollardır. Genetik olarak hücre siklusunda görevli proteinlerde meydana gelebilecek bir mutasyon ya da polimorfizm ilgili genin ekspresyonunu değiştirerek kanserli hücre proliferasyonuna yol açabilir.

DNA onarımında görev alan *OGG1*, *ERCC1*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XPC*, *XPB*, *XPD*, *XPF*, *BRCA2*, *MRE11*, *NBS1*, *Ku70/80*, *LIG4*, *RAD* vb. genlerin polimorfizmleri, proteinlerin işlevini ve bireylerin hasarlı DNA'yı onarma kapasitesini değiştirebilmektedir. Eksik onarım kapasitesi de genetik kararsızlığa ve dolayısıyla kanser oluşumuna neden olabilmektedir (Goode et al. 2002). Ancak, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler tek başlarına kanser risk çeşitliliğini açıklamak için yeterli değildir. Kanserle ilişkili somatik mutasyonların birikiminin sadece DNA onarımındaki kusurdan değil, hücre ölüm mekanizmasının hasarlı hücreleri elimine etme yeteneğinin azalması ile de ilgili olduğu belirtilmektedir (İmyanitov et al. 2005). DNA onarımı, genomik kararsızlık ve apoptozis birbirleriyle etkileşen olaylar olduğundan, her biri kanserin patofizyolojisinde önemli role sahiptir.

Toplumda polimorfizmlere mutasyonlardan daha sık olarak rastlanmaktadır. İnsan genomunda binlerce aday polimorfik genin bulunması ve genomunda bu farklılıkları taşıyan bireylerin kanser gelişimine olan duyarlılıklarını etkileyebilecek olması pek çok araştırmacıyı bu çalışma alanına sürüklemektedir. İnsan genom projesi

çalışmalarıyla tüm genomdaki genlerin ve nükleotit dizilerinin belirlenmesinden sonra, genlerin ifade edilme düzeyleri ve ifade edilen gen ürünlerinin yapı ve işlevindeki farklılıklarını belirleme çalışmaları hız kazanmıştır (Ekmekçi ve ark. 2008).

Bu tez çalışması ile *XRCC1/XRCC3* genlerinin alt birimi olarak ifade edilen *Ku70/80*'in promotor bölgesinde yer alan sırasıyla *-1310C/G (rs2267437)* ve *-1401G/T (rs828907)* polimorfizmlerinin mesane kanseri ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mesane Kanseri Gelişimi

Kanser hücrelerinin bilinen en temel özelliklerinden biri klonal orijinli olmaları yani tek bir hücreden çoğalmalarıdır. Hücre çoğalmasına paralel olarak tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu sayıca giderek artar ve bu topluluktaki diğer hücrelerde mutasyon gelişir. Bazı mutasyonlar hücrelere daha hızlı çoğalma gibi avantajlar kazandırır ve tümör klonu içinde baskın hale geçerler. Bu hücrelerin bazılarının daha hızlı çoğalma, invazyon, metastaz gibi özellikler kazanmasıyla avantajlı yeni bir hücre klonu ortaya çıktığından bu işlem 'klonal seçim' olarak adlandırılır. Klonal seçim tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak 'malign' özellik kazanırlar.

Tüm kanser tiplerinin yaklaşık %90'ı epitel hücrelerden türevlenen karsinomlardan oluşmaktadır. Mesane tümörlerinin histopatolojik olarak; yaklaşık %90'ını transizyonel hücreli karsinoma (TCC), %5-7'sini skuamoz hücreli karsinoma, %1-2'sini adenokarsinoma, %1-2'sini de nondifferansiye karsinoma ve mikst tümörler oluşturmaktadır (Penbegül 2006).

Mesane kanseri, World Health Organization 2008 istatistiklerine göre Dünya genelinde en sık görülen kanser türleri arasında 9. sıradadır (<http://www-dep.iarc.fr/>). Mesane kanseri erkeklerde tüm kanser türleri arasında 7. sırada yer alırken, kadınlarda 17. sıradadır (Colombel et al., 2008). T.C.Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı 2005 verilerine göre ise mesane kanseri 100.000'de 9.59 insidans ile Türkiye'de en sık görülen kanserler arasında 6. sıradadır (<http://www.ketem.org/istatistik.php>).

### 2.2. Mesane Kanseri Gelişiminde Prognostik Faktörler

#### 2.2.1. Tümör çapı

Yapılan araştırmalarda farklı tümör çapları irdelenmiş olmasına rağmen, tümör çapında meydana gelen artışın genellikle nüks riskini arttırdığı sonucuna varılmıştır (Dalesio et al., 1983, Heney 1992, Kiemeny et al., 1993).

### **2.2.2. Tümör sayısı**

Yapılan bir çalışmada Non-invaziv papillar karsinom (Ta) tek tümörlü hastalarda nüks oranı %51 iken, Ta multipl tümörlerde bu oranın %91'e çıktığı görülmüştür. Ayrıca tek tümörlerde ilk nükse kadar geçen süre multipl tümörlere oranla daha uzundur (Prout et al., 1992).

### **2.2.3. Tümör morfolojisi**

Mesane tümörleri papiller, solid, infiltratif, mikst veya intraepitelyal gelişim paterni gösterebilir. Yeni tanı konulmuş tümörlerin %75-80'i papiller, %10-15'i solid, geri kalanı da mikst yapıdadır (Anafarta et al., 2007).

### **2.2.4. Tümör lokalizasyonu**

Tümörün yerleşimi farklılıklar gösterir ve mesanenin herhangi bir yerinde gelişebilir. Transizyonel hücreli karsinom; %37 yan duvarlardan, %18 posterior duvardan, %12 trigondan, %11 mesane boynundan, %10 üreter orifislerinden, %8 kubbeden ve %4 anterior duvardan gelişir. Genellikle kubbedeki tümörler yüksek dereceli, lateral duvar ve üreter orifisinde lokalize tümörler ise düşük derecelidir. Mesane boynundaki tümörler mesanenin diğer bölgelerindeki tümörlere göre daha kötü prognoz gösterirler (Stephenson 1990).

### **2.2.5. Evre**

Her tümör olgusunda olduğu gibi, mesane tümörlerinde de tedavi şeklinin belirlenmesinde evrelendirme son derece önemlidir. İlk yapılan transuretral rezeksiyon sonrası tümör derinliğinin belirlenmesi; evrelendirmenin en önemli basamağını ve temelini oluşturmaktadır (Penbegül 2006). Evrelendirme için günümüzde "Union International Contre le Cancer" (UICC) tarafından yapılan 2002 TNM sınıflandırması geniş kabul görmüştür.

**Tablo 1:** Mesane Kanseri 2002 TNM Sınıflandırması.

([http://www.uroweb.org/fileadmin/user\\_upload/Guidelines/05%20TaT1%20Bladder%20Cancer.pdf](http://www.uroweb.org/fileadmin/user_upload/Guidelines/05%20TaT1%20Bladder%20Cancer.pdf))

<b>T – PRİMER TÜMÖR</b>	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait kanıt yok
Ta	Non-invaziv papiller karsinom
Tis	Karsinoma in situ: “flat” tümör
T1	Tümör epitel altı dokuyu tutmuş
T2	Tümör kas dokusunu tutmuş
T2a	Tümör yuzeyel kas dokusunu tutmuş (iç yarı)
T2b	Tümör derin kas dokusunu tutmuş (dış yarı)
T3	Tümör perivezikal dokuyu tutmuş
T3a	Mikroskopik olarak
T3b	Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle)
T4	Prostat, uterus, vajina, pelvik duvar, abdominal duvar gibi yapıları tutmuş
T4a	Tümör prostat, uterus veya vajinayı tutmuş
T4b	Tümör pelvik duvar veya abdominal duvarı tutmuş
<b>N – LENF NODLARI</b>	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek bir lenf nodunda 2cm veya daha küçük metastazlar
N2	Tek bir lenf nodunda 2 cm den büyük, 5cm den küçük metastazlar, ya da multipl lenf nodlarında 5cm den büyük olmayan metastazlar
N3	Bir lenf nodunda 5 cm den büyük metastazlar
<b>M – UZAK METASTAZLAR</b>	
MX	Uzak metastazlar değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastazlar

### **2.2.6. Grade (Derece)**

Mesane tümörleri histolojik özelliklerine göre sınıflandırılırken biyolojik davranışı dikkate alan derecelendirme sistemi ile derecelendirilirler. Mesane tümörlerinde derecelendirme normal epitele benzerliği esas alınarak tümörün epitelyal paternine ve hücresel özelliklerine göre yapılır (Penbegül 2006). Mesanenin ürotelyal hücreli neoplazileri, 1998 yılında “World Health Organization ve International Society of Urological Pathology”(WHO/ISUP) tarafından alınan ortak bir kararla yeniden derecelendirilmiştir. Bu derecelendirmeye göre; iyi diferansiye (grade1) ve orta diferansiye (grade2) tümörler düşük dereceli (low grade) ürotelyal karsinom olarak adlandırılmıştır. Kötü diferansiye (grade 3) tümörler ise yüksek dereceli (high grade) tümörler olarak adlandırılmıştır (Epstein et al., 1998).

### **2.2.7. Vasküler veya lenfatik invazyon**

Vasküler veya lenfatik invazyon varlığı kötü prognozu gösteren bir faktördür. Vasküler veya lenfatik invazyon en çok yüksek dereceli T1 tümörlerde prognozu etkileyen önemli faktörlerdir. Palmieri et al. (2010), lenfovasküler invazyon ile evre ve derece arasında anlamlı ilişki bulunduğunu ve metastatik yayılımın başlangıcı olduğunu ifade etmiştir.

### **2.2.8. Tümörle birlikte “Carsinoma instu-CIS” varlığı**

Yüksek dereceli yüzeysel tümörü olan hastaların %25 veya daha fazlasında “CIS” görülür ve bunların %40 ile %83’u ilerleyerek invaziv mesane kanserine dönüşür. Tümör sınırında “CIS” varlığı nüks olasılığını arttırmaktadır (Penbegül 2006).

### **2.2.9. ABO(H) izoantijenitesinin kaybı**

Kan grubu antijenleri, eritrositlerin membran lipit veya proteinlerine bağlı bulunan karbonhidrat yapılı antijenlerdir. Bu antijenler normal ürotelyumda %75–80 oranında maturasyon ve diferansiyasyonla ilişkili olarak eksprese edilmektedir (Sheinfeld 1992). Evre ve derece arttıkça tümör dokusundaki hücre yüzeyi ABO(H) izoantijenitesinin negatifliği artmakta, pozitiflik ne kadar fazla ise tümör evre ve derecesi o oranda düşmektedir (Das and Glashan 1988).

### 2.2.10. Epidermal growth faktör pozitifliği (EGF)

EGF; ektoderm, mezoderm ve endoderm gibi üç embriyonik dokudan köken alan geniş bir grup hücrenin çoğalmasına neden olur. EGF reseptörleri normal mesane epitelinin bazal tabakasında ve mesane kanser hücrelerinin tüm tabakalarında saptanabilir (Penbegül 2006). Mason et al. (2009), EGF reseptörlerinde meydana gelen tek nükleotit polimorfizmlerinin mesane kanseri ile ilişkili olabileceğini ifade etmiştir.

### 2.2.11. Kan grubu

Kan grubu A olan mesane tümörlü hastalarda, daha düşük derece ve evreye rastlanmakta iken, 0 grubundaki hastaların evre ve derecelerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Danielli 1987).

### 2.2.12. Yaş ve Cinsiyet

Yaş tümör nüksünde, önemli bir prognostik faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeni tanı alan hastaların yaklaşık %90'ı 60 yaş ve üstünde olup; 35 yaşın altında nadir görülmektedir (Aslan ve Mammadov 2010).

Ayrıca Aslan ve Mammadov (2010) çalışmalarında kadın hastalarda daha agresif tümör özellikleri gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Genç hastalarda yüksek evre ve gradeli, yüksek riskli hastalık daha sık gözlenmiştir.

**Tablo 2:** Dünyada görülen mesane kanseri vakalarına ait yaş istatistikleri ([http://bladdercancersupport.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=577&Itemid=100094](http://bladdercancersupport.org/index.php?option=com_content&view=article&id=577&Itemid=100094))

Yaş	%
0-20	0.1
35-44	1.8
45-54	7.5
55-64	17.9
65-74	27.4
75-84	1
85-	12.8

### 2.2.13. DNA Ploidy

DNA Ploidy; tümör rekurrensinde önemli bir gösterge olup, evre ve derece ile DNA içeriği arasında pozitif korelasyon vardır. Evre ve derece arttıkça anöplöid DNA oranında artış görülmektedir. Anöplöidi; Hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmaması (Nondisjunction) veya anafazda geri kalması (Anaphase lagging) gibi sebeplerle temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere denir. Anöplöid tümörlerde rekurrens oranı %98 iken, diploid DNA'lı tümörlerde bu oran %25' te kalmaktadır (Penbegül 2006).

### 2.2.14. Gen Mutasyonları

Kromozomların spesifik lokalizasyonlarında mutasyon sonucu allelik genlerin kaybı tümör rekurrens ve progresyonuna neden olmaktadır. 9q kromozomunun heterozigotluğunun kaybına tüm evrelerdeki mesane tümörlerinde rastlanır. Bu konuda yapılan çalışmalarda 9p12 ile 9qter arasındaki bölgede oluşan kromozom kayıpların yüzeysel mesane kanserlerinde daha sık görüldüğü ortaya çıkmış olsa da 9. kromozomda kayıp, hem yüzeysel hem de invaziv mesane tümöründe oldukça sık gözlenmektedir

([http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237\\_tur\\_p189-260.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p189-260.pdf)).

Başka bazı kromozom anormalliklerinin de mesane tümörleri ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bunlar izokromozom 5p,17p delesyonu ve trizomi 15'dir. Benzer şekilde kromozom 13 üzerinde yer alan *Rb* geninde (13q14) ortaya çıkan mutasyonlar hücre siklusu kontrol kaybı ile sonuçlanır. Retinoblastoma tümör baskılayıcı geninin primer mesane kanserlerinin %20-30'unda kaybı vardır ve özellikle ileri evre ve dereceli tümörlerde görülür (Zhang et al., 1997).

### 2.2.15. Sigara

Mesane tümörü etiyojisinde önemli bir etken olmasının yanında önemli bir prognostik faktördür. Thompson et al. (1993), sigara ile evre, derece, tümör çapı ve tümör sayısı arasında ilişki olduğunu ifade edilirken, Reitonen et al. (1994), yapmış oldukları çalışmada aynı parametrelerle sigara arasında ilişki gözlemlemediklerini belirtmişlerdir.



Zhang et al. (1997), yapmış oldukları bir çalışmada sigara kullanımı ile 9. kromozomun uzun kolundaki kayıp arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir. 9p21 kromozomal bölgesi hücre döngüsü G1 fazında siklin ve siklin bağımlı kinazları inhibe etmek suretiyle düzenleyici olarak görev yapan *p15INK4b* ve *p16INK4a* genlerini içerir (Quesnel 1998). 9p21 bölgesinde kodlanan hücre döngüsünde negatif düzenleyici olarak görev yapan ve tümör baskılayıcı proteinler olarak değerlendirilen bu proteinlerin üretimi her iki allelde ortaya çıkan kayıplar sonucu durmakta ve malign dönüşün oluşabilmektedir.

### **2.3. Mesane Kanseri Ve Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki**

İnsanlardaki kalıtsal genetik kusurlar (mutasyonlar), kimyasalları aktive eden ve detoksifiye eden enzimlerin yapısını ve ifade edilme düzeyini (karsinojen metabolizmasını) etkileyen kişisel genetik farklılıklar, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişiklikler, kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir.

Polimorfizm, aynı türün farklı bireyleri arasında iki veya daha fazla farklı dizinin varlığıdır. DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar sonucu meydana geldikleri düşünülür. İnsan DNA'sında gen diziliminin %99.9'u birbirine benzemektedir. İnsanlar arasındaki genetik çeşitlilik %0.1'lik farklılıktan ileri gelmektedir.

Polimorfizmlere mutasyonlardan daha sık rastlanır. İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, tek nükleotit polimorfizmleridir (SNP) Tek nükleotit polimorfizmleri, belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişiklikleridir. Tüm genetik varyasyonların %90'ını oluşturur. İnsan genomunda 10-30 milyon SNP olduğu tahmin edilmektedir. İki farklı birey arasında 1250 bp'de bir farklılık olduğu tahmin edilir. Belirli bir popülasyonda sıklığı genellikle %1'den fazladır.

Tek nükleotit polimorfizmleri, regülatör sekansları değiştirmekte ve gen ekspresyonunu dolaylı yoldan etkilemektedir. İnsan popülasyonları arasındaki genetik farklılıklar nedeniyle bazı popülasyonlar, bazı hastalıklara daha duyarlıdır (Stefan et al., 2009). Popülasyonlar arasında görülen genetik farklılıklar, hastalıklara karşı duyarlılık, direnç ve hastalık prognozunu etkileyebilmektedir.

Mesane kanseri ile ilgili yapılmış bir çok çalışmada hücre bölünme prosesinde temel basamaklardan biri olan DNA tamir mekanizması ve bu mekanizmanın işleyişini sağlayan DNA tamir genleri üzerinde yoğunlaşmış ve DNA tamir genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin genlerin işleyişini ve ekspresyon seviyesini değiştirerek çeşitli kanserlerin oluşumuna yol açabileceği belirtilmiştir (Stefan et al., 2009, Mariana et al., 2009, Wang et al.,2009).

## **2.4. Mesane Kanseri Ve Ku Proteini İlişkisi**

### **2.4.1. Ku Proteini**

Ökaryotik hücrelerde DNA çift zincir kırıkları tamirinde Non- Homologous End Joining (NHEJ) ve Homolog Recombination (HR) olmak üzere iki ana yol vardır (Pierce et al., 2001).

NHEJ, DNA tamir mekanizmasındaki görevi yanı sıra erken lenfosit gelişiminde V(D)J gibi spesifik alanlardaki kırıkları da tamir edebilmektedir. NHEJ, DNA bağımlı protein kinazın şifrelenen komponentlerinden (X-ray cross complementing) *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7* ile işlev görür (Thacker et al., 2004). NHEJ mekanizmasının basamaklarında Ku heterodimer, DNA-PK katalitik subuniti ve *XRCC4*/DNA ligaz IV kompleksi de görev alır. (Jones et al., 2001) NHEJ, hücre bölünmesi boyunca DNA zincir kırıkları tamirinde bir mekanizma oluşturur ve mitotik hücrelerin G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub> ve erken S fazında önemlidir (Thacker et al., 2004).

HR ise geç S fazı ve G<sub>2</sub> fazında, DNA duplikasyonu tamamlandığında işlev görür. HR'nin alternatif bir rolü daha vardır ve bu da germ hücrelerinde mayoz sırasında homolog kromozomlar arasında gerçekleşen krossingover olayının düzenlenmesidir. (Thacker et al., 2004).

NHEJ ve HR tamir mekanizmalarında görev alan Ku, *XRCC* gen ailesi tarafından ifade edilen Ku<sub>70</sub> ve Ku<sub>80</sub> olmak üzere iki altbirimden oluşan heterodimerik bir proteindir.

Ku proteini, ökaryotlarda heterodimerik DNA-binding kompleksinden oluşur. Bu kompleks 20 yıl önce Japon sklorederma-polimiyozit overlap sendromu olarak adlandırılan otoimmün hastalığa sahip bireylerde major antibodi hedefi olarak bulunmuştur (Gullo et al., 2006).

*Ku70* geni 22.kromozomun uzun kolunda (22q11-q13) ve *Ku80* geni 2. kromozomun uzun kolunda (2q35) lokalizedir.

Ku'nun en iyi bilinen ve en önemli rolü DNA tamiridir. Yakın zamanda yapılmış çalışmalar Ku'yu Homolog Recombination (HR) ve Non-homolog End Joining (NHEJ) mekanizmalardaki nükleer bir protein olarak tanımlamaktadır (Korabiowska et al., 2004). Hücredeki fonksiyonel Ku proteinleri genomik stabiliteyi korumada, ayrıca hücre ve organizma canlılığını sürdürmede görevlidir. DNA tamirindeki hayati rolünün yanı sıra, Ku başka hücresel proseslerde de görev alır. Bunlar; telomer onarımı, antijen reseptör gen düzenlenmesi, spesifik gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, antiapoptozis, ısı-şok proteinleri cevabı ve hücre döngüsünde G2 ve M fazlarının düzenlenmesi görevleridir (Gullo et al., 2006)

## **2.4.2. Ku Proteininin Önemli Yapısal Ve Biyokimyasal Karakteristikleri**

### **2.4.2.1. Ku'nun yapısal özellikleri**

Sekans yapısal uyumları sadece %14 benzerlik göstermesine rağmen genel olarak yapıca Ku 70 ve 80 benzer moleküllerdir (Gullo et al., 2006). Her iki alt birim de, aminoterminal  $\alpha/\beta$  domain, santral  $\beta$ -fiçı domain ve helikal karboksi terminal (C-terminal) koldan oluşan 3 etki alanından oluşur (Jones et al., 2001). C-terminal ve  $\alpha/\beta$  domainleri DNA tamir kompleksini oluşturan proteinlere bağlanırlar.  $\beta$ -fiçı domain ise nonspesifik olarak DNA şeker fosfat omurgasına bağlanır (Gullo et al., 2006).

Her iki subunitin C-terminal zincir kolları 2 önemli etkileşime sahiptir.

1- Bir diğer alt birimin  $\beta$ -fiçı domainine karşılık gelen kısma bağlanır.

2- C-terminal zincirin bir başka bölgesi aracılığı ile DNA bağımlı protein kinazın katalitik alt birimi olarak bilinen 460-kDa ağırlığındaki serin-treonin protein kinaz ile etkileşirler (Koike et al., 1999). Bundan dolayı  $\alpha/\beta$  domaini DNA tamir kompleksinin oluşumu için önemlidir.  $\beta$ -fiçı domaini DNA bağlanması için ve C-terminal zinciri bir diğer subunitin  $\beta$ -fiçı domaini ile etkileşimi için önemlidir ve bu yolla heterodimerizasyon ve DNA-Protein kinaz katalitik alt birimi ile fonksiyon düzenlenmesini sağlar (Zhang et al., 2001).

Fonksiyonel olarak aktif Ku70/Ku80 heterodimer belli bir dereceye kadar simetrik olup sepet tarzı bir yapısı var. DNA tamiri esnasında; DNA, her iki alt birimin spesifik domain tarafından oluşturulan Ku70/80 heterodimer açıklıkları boyunca iplik şeklinde geçirilir (Cary et al., 1997). Bununla birlikte Ku70/Ku80 heterodimerleri DNA tamirinde kendi başlarına görev almaz fakat DNA-PKcs ile aktif rol kazanırlar. DNA-PKcs ve Ku70/Ku80 heterodimeri DNA tamir holoenzim kompleksi olan ve DNA-PK olarak adlandırılan yapıyı meydana getirirler (Gullo et al., 2006)

#### **2.4.2.2. Ku protein biyokimyası**

##### **2.4.2.2.1. Dimerizasyon**

Ku 70 ve Ku 80 proteinleri heterodimerizasyonu her iki Ku alt birimi sabitlenmesi, Ku'nun düzenleyici fonksiyonunu yerine getirilmesi için önemlidir. Ku heterodimerizasyonunda oluşan bir hata bir diğer Ku alt birimi seviyesinin düşmesine sebep olur (Gu et al., 1997). Singleton et al. (1997), xrs-6 hücreleri ile yapmış oldukları çalışmada Ku80 protein kaybının Ku70 fonksiyon kaybıyla ilişkili olduğunu belirtmiştir.

##### **2.4.2.2.2. Hücre içi rolü**

Ku proteinleri nükleer proteinler olup, primer olarak nükleus transkripsiyonel aktif bölgelerde lokalize olmuşlardır. Aslında Ku proteinleri nükleer matriks oluşumlarıdır ve çoğunlukla nükleoplazmada dağınık olarak bulunurlar. Genel olarak nükleer proteinler kendine özgü nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerir ve nükleer membranda NLS reseptörleri aracılığı ile nükleusa aktarılırlar. Ku 70 ve Ku 80 proteinlerinin NLS reseptör yapıları farklı olduğu için, Ku 70 ve Ku 80 nükleer transportun düzenlenmesinde farklı NLS reseptörleri görev almaktadır (Gullo et al., 2006). Koike et al. (1999), Ku80 alt biriminin kendine özgü NLS reseptörünü kullanmak suretiyle Ku70 translokasyonundan bağımsız olarak nükleusa transloke olabildiğini belirtmiştir.

Ku proteinlerinin hücre içinde ektranükleer alanlara yer değiştirdiği de gösterilmiştir. Koike et al. (1999), Ku 70/80 heterodimerin mitoz boyunca geç

telofaz evresi boyunca sitoplazmada bulunduğunu, fakat hücre G1 fazına girdiği anda çekirdeğe döndüğünü rapor etmiştir. Ku70 /80 heterodimerinin ayrılışı ve G1 fazında Ku 70'in nükleusa dönüşü Ku80'e göre bazı hücrelerde daha önde olabilmektedir. Bu bilgiler Ku70 ve Ku 80'nin daima birlikte düzenlenmediğini ve nükleer translokasyonun memeli hücrelerinde bağımsız olarak gerçekleşebileceğini desteklemektedir.

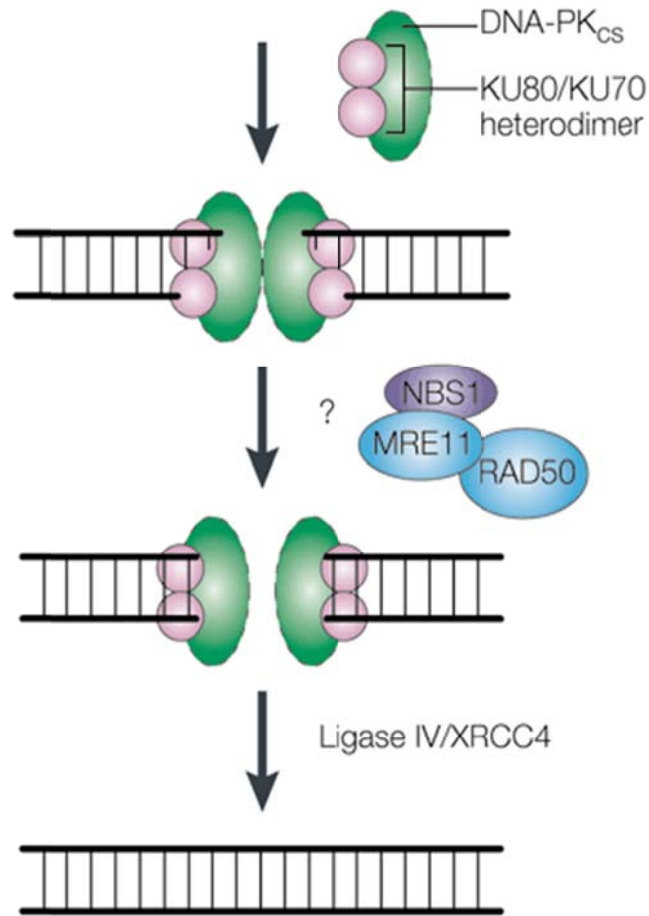
Yapısal olarak, Ku proteinleri plazma membranında sinyal yoluna katılmazlarken hidrofobik bölgeye katıldıkları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar, Ku proteinleri anormal lokalizasyonu farklı fonksiyonlara aracılık edebileceğini göstermiştir. Örneğin sitoplazmadan hücre yüzeyine taşınan Ku 80 proteini Multiple myeloma (MM) hücrelerinde CD40 ligandı için hücre adezyon molekülü olarak fonksiyon görür. Özellikle tümör hücrelerinin kemik iliği stroma hücrelerine homotipik ve heterotipik adezyonu, MM hücrelerin fibronektine sitoadezyonu artmış Ku80 ekspresyonu ile sağlanır. Ayrıca İnterlökin-6 (IL-6)'nın artan sekresyonu, insan MM hücreleri için potansiyel büyüme ve hayati faktör olup Ku 80 aracılığı ile CD40'ın sitoadezyonu tümör hücrelerini Kemik iliği stroma hücreleri (BMSC)'ne veya fibronektine aktive eder. IL-6 BMSC2'den köken aldığı için ve MM olan hastalarda MM hücrelerinden daha düşük oranda olduğu için, bu veriler hücre zarı Ku80 proteininin MM hücre büyümesi için otokrin ve parakrin olarak önemli rol oynadığını doğrulamaktadır (Teoh et al., 1998). Buna ilaveten, Ku 80 somatostatin reseptörü gibi davranmaktadır. DNA tamir proteini olan Ku 80'nin hücre yüzeyine lokalizasyonu otoimmün ve romatik hastalıklarda otoantibodi fazlalığını açıklamaktadır (Gullo et al., 2006)

#### **2.4.2.2.3. DNA tamir özellikleri**

DNA tamir mekanizmasında Ku heterodimer yapısı ile birlikte rol alan moleküller, DNA-PKcs, *NBS1*(Nijmegen breakage syndrome 1), *MRE11*(Meiotic recombination 11), *RAD50*, *XRCC4*, DNA ligaz IV ve *artemistir* (Dik et al., 2001) Bu moleküllerden Ku70/80 heterodimeri ve DNA-PKcs, hasarlı DNA ucuna bağlanan ve DNA tamirini başlatan DNA-PK (DNA-dependent protein kinaz) molekülünü oluşturur (Meek et al., 2004). *RAD50* molekülü homolog rekombinasyonda önemli rol oynar. NBS1 ve MRE11 moleküllerinin ise diğer tamir

proteinlerinin kırık uçlara bağlanmasında rolü olduğu düşünülmektedir (Park et al., 2011).

Ku proteinleri ve DNA-PKcs DNA sonuna bağımsız olarak bağlansa da, Ku70/Ku80 heterodimeri DNA-PKcs'in aktivasyonunu sağlayarak fonksiyon görür. Ku proteinleri DNA-PKcs'in DNA'ya bağlanma kapasitesini yaklaşık 100 kez artırırken aynı zamanda bağlanma etkisini de artırarak DNA tamirine olanak tanırırlar. DNA tamiri esnasında Ku proteini kırık DNA ucunu kavrayarak kapatır ve DNA ligaz ve XRCC4'den oluşan protein kompleksi aracılığı ile tamir fonksiyonunu yerine getirir (Walker et al., 2001).



**Şekil 1:** DNA-PK ve Ku heterodimerin DNA kırık uca bağlanması ve tamir mekanizması ([http://www.nature.com/nrg/journal/v2/n3/fig\\_tab/nrg0301\\_196a\\_F5.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v2/n3/fig_tab/nrg0301_196a_F5.html))

#### 2.4.2.2.4. DNA-PKcs biyokimyası

Aktif serin-treonin protein kinaz subuniti DNA-PK'nın katalitik subunitidir. İnvitro çalışmalar DNA-PKcs, nükleer protein, DNA-bağlanma proteini, p53, c-fos, SP1, XRCC4 ve Ku gibi düzenleyici proteinleri fosforillediğini kanıtlamıştır. Bu gözlemler DNA-PK'nın tamir mekanizmasındaki rolünden başka transkripsiyon, replikasyon ve rekombinasyonda da görev aldığını desteklemektedir (Gullo et al., 2006).

#### 2.4.3. Ku Proteininin Normal Hücrelerdeki Rolü

Ku proteinleri temel rolü DNA tamiridir ve bunun yanı sıra telomer korunması, antiapoptosis, tümör baskılama, spesifik gen transkripsiyonunun düzenlenmesi gibi bir çok hücrel proseste rol oynamaktadır. Ayrıca Ku proteinleri DNA- bağımlı helikaz aktivitesi ve ATPaz aktivitesinden de sorumludur (Gullo et al., 2006).

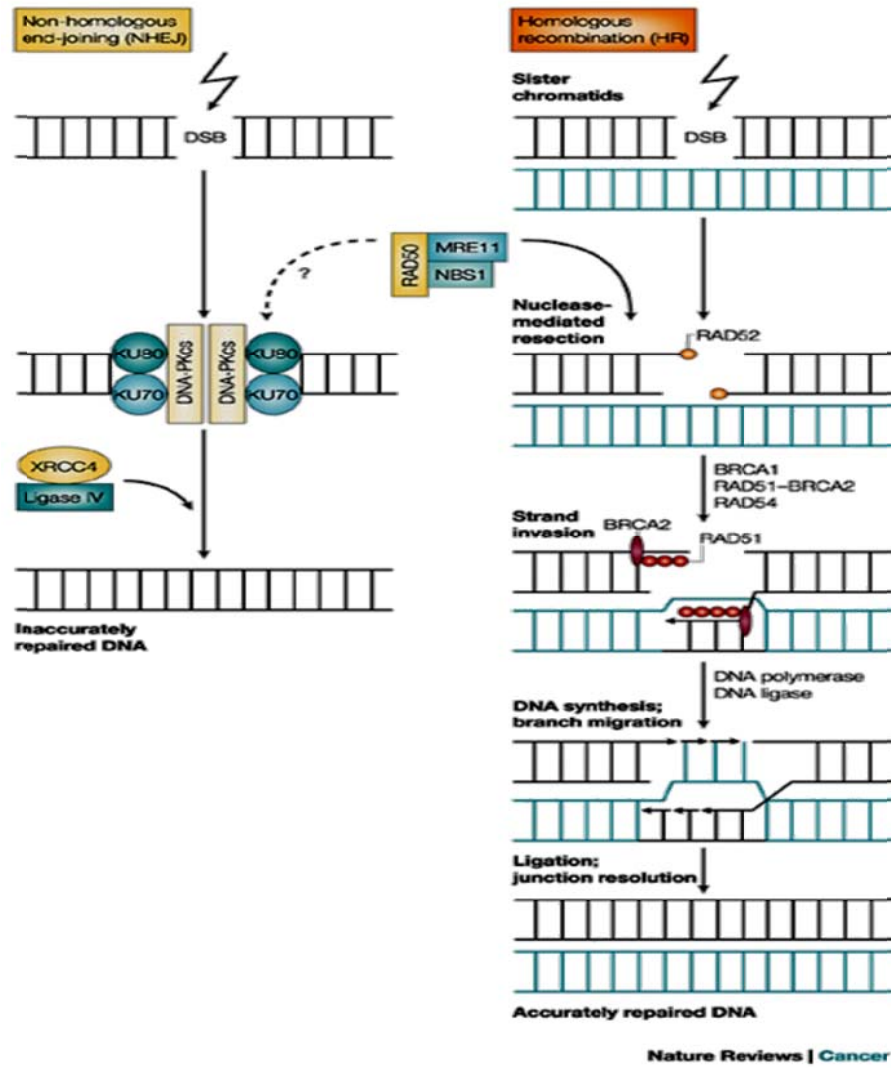
##### 2.4.3.1. DNA çift zincir kırık tamiri (DSBR)

DNA çift zincir kırıkları, DNA sarmalının her iki zincirinde yer alan fosfodiester bağının parçalanması sonucunda meydana gelir (Dynam and Yoo, 1998).

Ökaryotik hücrelerde, DNA çift zincir tamir mekanizmasında Homolog rekombinasyon (HR) ve Serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (Non-Homolog end Joining, NHEJ) olmak üzere iki major yol vardır.

- **NHEJ** mekanizmasında, Ku70/80 heterodimer yapı DNA kırık uçlarına bağlanır ve DNA-PKcs ile birleşerek 5'-3' ekzonükleaz ve latent ekzonükleaz olan Artemis'i çağırarak aktive eder.
- Nükleaz aktivitesi ile kırılan uçlar birleştirme için hazır hale gelir.
- Ligasyon, DNA Ligaz IV- XRCC4 kompleksi (ligaz IV, XRCC4, Cernunnos-XLF) ile gerçekleşir.
- **HR** yolunda ise, hasarlı DNA hasarsız homolog DNA ile yer değiştirir. Sağlam DNA'daki dizi bilgisi bir genel rekombinasyon mekanizması ile çift zincir kırığı olan bölgeye taşınır. Reaksiyon eşleşen DNA dizilerini tanıyıp bir araya getiren rekombinasyon proteinleri olan RAD ve BRCA genleri tarafından yönetilir.

- MRE11-RAD50-NBS1 kompleksinin nükleaz aktivitesi ile kırık uçlar degradasyona uğrar.
- RAD 52 proteini 3' uçlara bağlanır.
- RAD 51- BRCA 2 kompleksi, rekombinasyon oluşturmak üzere kardeş kromatid zincirinin hasar bölgesine invazyonunu sağlar.
- Bu zincir kalıp olarak kullanılarak sentez yapılır ve hasar onarılır ( DNA polimeraz – DNA ligaz ) (Watson 2008).



**Şekil 2:** Non- Homolog End Joining (NHEJ) ve Homolog Rekombinasyon (HR) (Shiloh 2003).



#### **2.4.3.2. Telomer Korunması**

Ku70/Ku80 heterodimeri, DNA ucunu nükleolitik atak ve nükleotit kaybından, özellikle telomerde DNA DNA çift zincir kırık alanlarını (DSBS) korur. Telomer tamiri boyunca Ku proteinleri telomerik sekanslara bağlanır ve telomeraz aracılığı ile DNA komplementer zincirin sentezlenmesini kolaylaştırır (Hsu et al., 1999). Aslında Ku70/80 heterodimeri, insan telomeraz ters transkriptaz enzimi ile ilişkili bulunmuştur ki bu enzim telomerik tekrar sekansının eklenmesi için önemlidir (Samper et al., 2000).

Ku70/Ku80 heterodimerinin telomere lokalizasyonu telomerik hasarların hücrede artan DNA-PKcs eksiklikleri ile ilişkili olmasına rağmen, DNA-PKcs'den bağımsızdır ve Ku ile telomer korunması arasında direk bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Fabrizio d'Adda di Fagagna et al., 2001, Hsu et al., 1999).

Birçok primer hücre tipiyle yapılan çalışmalar Ku 70 ve Ku80 proteinlerinin telomer tamirinin farklı gelişim aşamalarında olmasını önlediğini ortaya koymuştur (Fabrizio d'Adda di Fagagna et al., 2001). Bu da telomer uzunluğunun azaldığını, bozulma ve tek zincirli DNA rekombinasyonunun arttığını göstermiştir.

Samper et al. (2000), memeli hücrelerinde Ku80 eksikliğinin telomer kısalması ile ilişkili olmadığını belirtmiştir.

#### **2.4.3.3. Antiapoptosis**

BAX, üzerinde en fazla çalışma yapılmış proapoptotik bcl-2 ailesi üyesidir. P53'e yanıt olarak kopyalanarak aktive olur. Aktive olduğunda mitokondriyal zar da dimerize olur. Bu dimer hali sitokrom c'nin mitokondriden salınımı için kolaylaştırıcı bir kanaldır. Bcl-2 BAX'a bağlanarak ve BAX tarafından başlatılan geçirgenliği bloke ederek işlevini görür (Penbegül 2006).

Ku70 pro-apoptotik protein olan BAX'a bağlanarak BAX'ın mitokondri aracılı apoptozis fonksiyonunu önler. Bu apoptotik fonksiyon Ku 70 karboksi-terminal domaini ile gerçekleşir ve Ku 80'in tamamlayıcı etkisine gerek duymaz (Sawada et al., 2003). Li et al. (1998), Ku70 eksikliği olan farelerin T hücre tümör gelişimi gösterdiğini ve Ku70'in tümör baskılayıcı fonksiyonu olduğunu ifade etmiştir. Gullo et al. (2006), Ku proteininin tümör gelişimine veya tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olabileceğini ifade etmişlerdir.

#### 2.4.3.4. Gen Transkripsiyonunun Düzenlenmesi

Ku proteinlerinin transkripsiyon faktörleri gibi fonksiyon gördüğü ve promotor bölgeye sekans spesifik olarak bağlandığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Örneğin; Ku 80 promotora bağlanır ve ısı-şok proteinleri genlerinde, glukoz düzenleyici peptit 78 ve 94'ü düzenler (Li et al., 1995, Liu and Lee 1991).

Ku70/80 heterodimeri halka tarzı yapıya sahiptir ve Ku-DNA bağlanma mekanizması, hasarlı DNA formuna bağlanmak üzere oluşmuştur. Örneğin Ku70 proteininin promotor sekansa bağlanması SAP domainin karboksi-terminal ucu aracılığı ile meydana gelir (Gullo et al., 2006). Buna ilaveten, Ku proteinlerinde sekans spesifik DNA bağlanması olmadan protein-protein interaksyonları ile transkripsiyonel düzenlemeyi gerçekleştirebilmektedir (Mo and Dynan, 2002).

#### 2.4.4. Ku Proteininin Kanserdeki Rolü

Memeli genomu DNA hasarıyla sonuçlanan birçok risk ile karşı karşıyadır. DNA çift zincir kırıkları (DSB) tamir edilmediği takdirde hücre ölümüne ve kromozomal anormalliklere sebep olur. DSBR eksikliğinde hücreler, hücrel homeostasis için gerekli faktörlerin dengesizliğine yol açan gen amplifikasyonları gösterir. Ayrıca gen amplifikasyonları onkogenlerin aktivasyonuna öncülük eder ve bunlar hücrel transformasyon ve tümör gelişimi için baskın mekanizmalardır. Memeli hücreleri, DSBR için HR ve NHEJ olmak üzere iki yola bağlıdır ve bu yollardan birinde meydana gelecek hata genomik instabilite, immun eksiklik ve tümör oluşumu ile sonuçlanabilir.

Ku proteini çıkarılmış farelerle yapılan çalışmalar, Ku proteininin DSBR'deki rolünü kanıtlamıştır. Ku ve DSBR'ın fonksiyonel görünümünü anlamak için fareler, stres faktörlerini düzenleyen iyonize radyasyon, radyomimetik kimyasallar gibi etkenlere maruz bırakılmış ve *Ku 80*<sup>-/-</sup>, *Ku70*<sup>-/-</sup> ve DNA-PKcs<sup>-/-</sup> hücre dizilerine sahip homozigot mutant fareler kullanılmıştır (Gullo et al., 2006, Kurimasa et al., 1998).

Çalışmalar sonucunda *Ku70*, *Ku80* ve DNA-PKcs eksikliği olan farelerin hipersensivite, immun eksiklik büyüme geriliği ve kromozomal aberasyonlar gösterdikleri belirtilmiştir (Nussenzweig et al., 1997). DNA çift zincir kırıkları tamir mekanizmasında rol alan XRCC4 ve DNA-ligaz IV moleküllerinin eksikliği ise *p53*

bağımlı apoptozis kaynaklı nöronal dejenerasyona sebep olması nedeniyle yaşamla bağdaşmamıştır (Li et al., 2001).

Yaneva and Jhiang (1991), Ku80'in yüksek proliferasyon potansiyeli olan dokuda çok miktarda eksprese edildiğini ve hücreler bölünmek için uyarıldığında ekspresyonun arttığını vurgulamıştır. Bu veri, *Ku80*<sup>-/-</sup> hücrelerin bu dönem süresince hasarlı DNA tamirinde etkili olduğunu veya Ku80 fonksiyonunun proliferasyon hücrelerde DNA-PKcs ile olan ilgisinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir.

DNA tamirindeki rolünün yanı sıra Ku, DSB ve lenfosit hücrelerin düzenlenme işleminde ve olgun B hücrelerinde Ig sınıfı switch rekombinasyonu ile ilgili olan VDJ rekombinasyonunda önemli rol oynar. Ig ve TCR( T cell reseptör gene) genlerinde lenfosit maturasyonu boyunca V(D)J segmentlerindeki rekombinasyon antijenik yapının geniş bir çeşitlilik göstermesini sağlar ki bu da yabancı antijenlere adaptif immun cevap için çok önemlidir (Cassellas et al., 1998).

Ku70 ve Ku 80 yoksun hayvanlardan alınan lenfositler  $\gamma$ -irradiyasyona maruziyette farklılıklar gösterir.  $\gamma$ -irradiyasyon tipik olarak rekombinasyonu etkilemek suretiyle lenfositleri gelişmeye zorlar. Ku70 ve Ku80 eksikliği olan farelerde rekombinasyonun defektli olduğunu gösterir. Sonuç olarak, lenfosit rekombinasyon ve proliferasyonunun DNA hasar ve tamiri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Gullo et al., 2006, Cassellas et al., 1998).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Servisinden 2010-2011 tarihleri arasında mesane kanseri tanısı almış 38 hastanın kanlarından 2cc alınmış ve EDTA'lı tüplerde +4°C'de saklanmıştır. Yine bu bireylere ait tümörlü ve normal mesane doku örnekleri ise yaklaşık 25 mg olarak ayrı ayrı alınıp steril şişelerde -20 °C'de saklanmıştır.

#### 3.1. Kullanılan Araç Ve Gereçler

- PCR tüpü (Corning 3745)
- Eppendorf Tüpü (Corning 3622)
- Mavi Pipet Ucu (Boeco 1-200-80-2)
- Sarı Pipet Ucu (Boeco 1-110-81-1)
- DNA Saklama Kutusu (Biosigma N40.4111)
- Tüp Sporu (LP N40.4005)
- UV spektrofotometre (Shimadzu UV 1700, Japan)
- Mikrosantrifüj (Heraus Biofuge D-37520, Germany)
- Otoklav (Hirayama HVE-50 Japan)
- Etüv (Binder, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik-8188 NF, Türkiye)
- Derin Dondurucu (Beko 8460 T, Türkiye)
- Kar Makinası (Hoshizaki FM-120EE, EU)
- Bidistile Su Cihazı (Millipore Simlicity 185, France)
- Su Banyosu (Termal Labaratuvar Aletleri 820-3, Türkiye)
- Laminar Hava Kabini (ESCO, Türkiye)
- Vorteks (Nüve NM 110, Türkiye)
- Termal Cycler (Peqlab Primus 96, Germany)
- Hassas Terazı (Shimadzu AX200, Japan)
- Mikrodalga Fırın (Beko MD 1505, China)
- Manyetik Karıştırıcı (IKA RH-KT/C, Brazil)
- Elektroforez Tankı (Scie-plas V-GEL, UK)

- Elektroforez Güç Kaynağı (Consort EV215, Belgium)
- Transsilüminatör (Ultra Lum. Inc., Türkiye)
- PCR cihazı

### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EDTA (Sigma E-5134)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Etidyum Bromid (Sigma E-1510)
- Pure Gene Blood Core Kit B (Qiagene 1042606 )
- Pure Link Genomik DNA Kit (İnvitrogen K1820-02)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas FE-EP0402)
- Agaroz (Serva 11380)
- dNTP Mix (Promega U1515)
- 10xPCR Buffer (Fermantes EP0402)
- Bidistile Su (Sigma W-3500)
- Molecular weight marker DNA (Promega G 2101)
- Restriksiyon enzimi
  - Ku70 -1310C/G* polimorfizmi için *HhaI* (Fermantes)
  - Ku80 -1401G/T* polimorfizmi için *BfaI* (Fermantes)
- Primerler
  - Ku70 -1310C/G* polimorfizmi için;
    - Forward Primer: 5' CTT CAG ACC ACT CTC TTC TC 3'
    - Reverse Primer: 5' TCA CTT CAC AGT AGT CGT TG 3'
  - Ku80 -1401G/T* polimorfizmi için;
    - Forward Primer: 5' TAG CTG ACA ACC TCA ACA GAT 3'
    - Reverse Primer: 5' ATT CAG AGG TGC TCA TAG AG 3'

### 3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

1. 1,5 ml'lik endorf tüplere RBC Lysis solüsyonundan 900 µl eklendi ve üzerine 300 ml kan örnekleri konuldu.
2. Tüpler oda sıcaklığında berrak vişneçürüğü rengi olana kadar 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında tüpler en az iki kez alt üst edildi.
3. 13.000 rpm'de tüpler 1 dakika santrifüj edildi ve beyaz kan hücrelerinin tüpün dibine çökmesi sağlandı.
4. Yaklaşık 10 µl pellet kalana kadar süpernatant atıldı ve tüpler kurutma kâğıdına ters çevrilerek kalan süpernatantın akması sağlandı.
5. Dipte kalan pelletin dağılması için şiddetli vorteks yapıldı.
6. Tüplere 300 µl Cell Lysis solüsyonu pipetaj yapılarak eklendi ve 10 saniye şiddetli vorteks yapıldı.
7. Tüplere 100 µl Protein Precipitation solüsyonu ilave edildi ve homojen bir görünüm elde edilene kadar şiddetli vorteks yapıldı.
8. 13000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi ve tüplerin dip kısmında çöken koyu kahve renkli sıkı protein kısım ve üst kısmında süpernatant oluşumu sağlandı.
9. Temiz endorf tüplere 300 µl izopropanol konularak hazırlandı.
10. Dipteki protein çökeltisinin karışmamasına özen gösterilerek süpernatant alındı ve 300 µl izopropanol içeren tüplere aktarıldı.
11. Tüpler DNA görünür hale gelene kadar alt üst edildi ve DNA'nın çökmesi amacıyla 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Süpernatant alındı ve tüpler kurutma kâğıdına ters çevrilerek kalan sıvının akması sağlandı.
13. 300 µl %70'lik alkol tüplere eklendi ve birkaç kez alt üst edilerek DNA'nın 14. yıkanması sağlandı. Tüpler 1300 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. Süpernatant alındı ve tüpler kurutma kâğıdına ters çevrilerek kalan alkolün akması sağlandı.
16. Alkolün tamamen tüplerden uzaklaştırılması amacıyla tüpler etüvde 5-10 dakika bekletildi.
17. Tüplere, miktarı DNA büyüklüğüne göre belirlenen DNA Hydration solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında bir gece inkübe edildi.

18. Örnekler, PCR aşamasında kullanılmak üzere tüplerin kapakları parafilmlelenip etiketlenerek +4°C’de saklandı.

### **3.4. Dokudan DNA İzolasyonu**

1. İzolasyon işlemine başlamadan önce sıcak su banyosu 55°C’ ye ayarlandı.
2. Steril mikrosantrifüj tüpe doku bisturi yardımıyla parçalandıktan sonra tüplere yerleştirildi.
3. Tüplere 180 µl PureLink Genomic Digestion Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklendi ve şiddetli vorteks yapıldı.
4. Tüplerin içindeki doku parçaları homojen hale getirilmek amacıyla 55°C su banyosunda bir gece bekletildi.
5. Bu sindirim işleminden sonra tüplerde alına doku örneklerine ait homojen olmayan herhangi bir parça kalmış olma ihtimaline karşı lizat maksimum hızda oda sıcaklığında 4 dakika santrifüjlendi.
6. Süpernatant yeni steril mikrosantrifüj tüpe transfer edildi.
7. Lizata 20 µl RNase A eklendi, vorteks yapıldı ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve vortekslendi.
9. Lizata 200 µl %96’ lık etanol eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
10. PureLink Spin Column içerisine hazırlanan lizat eklendi ve 13000 rpm’de 2 dakika santrifüjlendi.
11. PureLink Spin Column alt kısmındaki tüpler değiştirilerek yıkama işlemine geçildi.
12. 500 µl Wash Buffer 1 PureLink Spin Column’a eklendi ve 13000 rpm de 1.5 dakika santrifüj edildi.
13. 500 µl Wash Buffer 2 PureLink Spin Column’a eklendi ve 13000 rpm de 1.5 dakika santrifüj edildi.
14. PureLink Spin Column filtreli kısmı yeni steril ependorf tüpe yerleştirildi.
15. 100 µl PureLink Genomic Elution Buffer PureLink Spin Column filtreli kısma eklendi, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra maksimum hızda 2 dakika santrifüjlendi.
16. Ependorf tüplerde doku örneklerine ait saf genomik DNA elde edildi.

### **3.5. *Ku70/80* Polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması**

#### **3.5.1. *Ku70* ve *Ku80* Promotor Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Kullanılan Primer Dizileri**

*Ku70/80* polimorfizmlerinin gözlemlendiği bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmıştır.

##### ***Ku70 -1310C/G* polimorfizmi için**

**Forward Primer:** 5' CTT CAG ACC ACT CTC TTC TC 3'

**Reverse Primer:** 5' TCA CTT CAC AGT AGT CGT TG 3'

##### ***Ku80 -1401G/T* polimorfizmi için**

**Forward Primer:** 5' TAG CTG ACA ACC TCA ACA GAT 3'

**Reverse Primer:** 5' ATT CAG AGG TGC TCA TAG AG 3'

#### **3.5.2. PCR Koşulları**

Toplam PCR hacmi 25 µl olacak şekilde tablo 4'deki bileşenler sırası ile 0.5 ml'lik tüplere ilave edildi. PCR karışımının hazırlanma işlemleri buz üzerinde ve steril kabin içerisinde yapıldı.

*Ku70* Forward primer, 24,1 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 241,3 µl dH<sub>2</sub>O eklendi ve 100 pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH<sub>2</sub>O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10pmol/ µl primer hazırlandı.

*Ku70* Reverse primer, 32,5 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 352,3 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. 100 pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH<sub>2</sub>O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10pmol/ µl primer hazırlandı.

*Ku80* Forward primer, 13,6 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 136,4 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. 100 pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH<sub>2</sub>O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10pmol/ µl primer hazırlandı.

*Ku80* Reverse primer, 36,3 nmol olarak lyofilize formda gönderilmiştir. Üzerine 363,3 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. 100 pmol stok primer elde edildi. 90 µl dH<sub>2</sub>O üzerine 10 µl stok primerden eklenerek 10pmol/ µl primer hazırlandı.



Her bir dNTP'den 50 µl alınarak üzerine 800 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek dNTP karışımı hazırlandı. Tablo 4'te bir bireye ait PCR master miksi için hesaplama örneği verilmiştir.

**Tablo 3:** *Ku70* ve *Ku80* için master mix hazırlanması

	1x
<b>10x Buffer</b>	<b>2,5 µl</b>
<b>dNTP mix</b>	<b>2 µl</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>1,5 µl</b>
<b>Forward Primer (10pmol)</b>	<b>1,25 µl</b>
<b>Reverse Primer (10 pmol)</b>	<b>1,25 µl</b>
<b>Taq DNA polimeraz (5U/µl)</b>	<b>0,5 µl</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	<b>6 µl</b>
<b>DNA ( 30 ng)</b>	<b>10 µl</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>25 µl</b>

Taq polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konulan bileşenlerin iyice karışması için pipetaj yapıldı. 0,2 ml'lik PCR tüplerine 15 µl reaksiyon karışımı dağıtılarak, her bir tüpe 10 µl DNA ilave edildi. Tüpler hızlı santrifüj yapıldıktan sonra PCR cihazına yerleştirildi. PCR basamakları tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 4:** *Ku70 -1310C/G* polimorfizmi için PCR Şartları

<b>Initialization step (İlk denatürasyon)</b>	95 °C	5 dakika	
<b>Denaturation step (Denatürasyon)</b>	95 °C	45 saniye	30 siklus
<b>Annealing step (Primer Bağlanma)</b>	57 °C	45 saniye	
<b>Extension step (Uzama)</b>	72 °C	45 saniye	
<b>Final elongation (Son uzama)</b>	72 °C	10 dakika	

**Tablo 5:** *Ku80 -1401G/T* polimorfizmi için PCR şartları

<b>Initialization step</b> (İlk denatürasyon)	94 °C	5 dakika	
<b>Denaturation step</b> (Denatürasyon)	94 °C	30 saniye	35 siklus
<b>Annealing step</b> (Primer Bağlanma)	55 °C	30 saniye	
<b>Extension step</b> (Uzama)	72 °C	30 saniye	
<b>Final elongation</b> (Son uzama)	72 °C	10 dakika	

### 3.5.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü

PCR ürünlerinin amplifikasyonunu kontrol etmek amacı ile PCR tüpünden alınan 10 µl örnek 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jelde 100 voltta 30 dakika yürütüldü. PCR Ürünü oluşumu gözlenen örnekler +4 °C' de enzim kesim reaksiyonu için saklandı. Amplifikasyonun gerçekleşmediği örneklerde ise yeniden PCR yapıldı. Bazı kuyucuklarda ise DNA gözlenemediğinden ilgili numuneler için yeniden DNA izolasyonu ve PCR yapıldı.

### 3.5.4. Enzim Kesim Reaksiyonu

*Ku70 -1310C/G* polimorfizm bölgesi için *HhaI* restriksiyon enzimi,

*Ku80 -1401G/T* polimorfizm bölgesi için *BfaI* restriksiyon enzimi kullanılarak kesim reaksiyonları gerçekleştirildi.

**Tablo 6:** Restriksiyon Enzimi Karışımının Hazırlanışı

	1x
PCR ürünü	5 µl
dH <sub>2</sub> O	9 µl
10x Tango Buffer	1 µl
Restriksiyon Enzimi	0,75 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>15,75 µl</b>

Restriksiyon enzim karışımından her bir birey için 10,75 µl elde edildi. Enzim kesimi için toplam hasta sayısı kadar hazırlanan Ku70 enzim kesim karışımı vortekslendi ve ardından hızlı santrifüj yapıldı. Aynı işlemler Ku80 enzim karışımı elde etmek için de yapıldı. Her bir tüpe 10,75'er µl restriksiyon enzim karışımından dağıtıldı. Kan, normal ve tümör doku örneklerinden elde edilen 5'er µl PCR ürünü bu karışım üzerine ayrı ayrı eklendi ve hızlı santrifüjlenerek etüvde 37C°'de 2-3 saat inkübe edildi.

### 3.5.5. Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

%3'lük agaroz jel hazırlandı ve restriksiyon enzimi ile kesilen PCR ürününden yaklaşık 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak karıştırılıp agaroz jeldeki kuyucuklara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri, DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, transsliminatör cihazında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

### ***Ku70 -1310 C/G Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi***

PCR ürünü: 438 bp










Restriksiyon Enzimi: *HhaI* (GCG-C)

Enzim kesimi Sonucu:

CC homozigot Normal: 390 + 48 bp

GC heterozigot: 390 + 291 + 99 +48 bp

GG homozigot Polimorfik: 291 + 99 + 48 bp

	CC	GC	GG
390 bp			
291 bp			
99 bp			
48 bp			

**Şekil 3:** *Ku70* restriksiyon enzim kesim şematik örneklemesi.

#### ***Ku80* -1401 G/T Polimorfizminin Enzim Kesimi Sonrası Değerlendirilmesi**

PCR ürünü: 252 bp

Restriksiyon Enzimi: *Bfal* (C-TAG)

GG homozigot Normal: 252 bp

GT heterozigot: 252 + 171 + 81 bp

TT homozigot Polimorfikler: 171 + 81 bp

	GG	GT	TT
252 bp			
171 bp			
81 bp			

**Şekil 4:** *Ku80* restriksiyon enzim kesimi şematik örnekleme.

### 3.5.6. İstatistiksel Analizler

Allel ve genotip frekansları (pearson  $\chi^2$  istatistik), O.R. ve p değerleri dominant ve resesif genetik modeller FINETTI programı (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) kullanılarak analizi yapıldı (Strom 2009). Ayrıca test edilen grupların Hardy-Weinberg dengesi ve Armitage's trend test (ATT) FINETTI programı kullanılarak belirlendi. ATT allellerden ziyade genotipleri dikkate alır ve örneklemin eşleşmesinden kaynaklanan muhtemel biasdan kaçınılmasını sağlar (Sasieni 1997). Ayrıca bütün hastalık allellerinin olduğu kodominant hastalık modeli bağımsızdır ve hastalık riskine aynı derecede katkıda bulunur.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada, mesane kanseri ile *Ku70* ve *Ku80* genlerine ait polimorfizmler arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Üroloji Polikliniğinde Mesane Kanseri tanısı konmuş 38 hastadan alınan tümörlü dokular ve bu tümörlü dokulara komşu sağlıklı mesane dokuları ile aynı kişilere ait venöz kan örneklerinden PCR-RFLP yöntemi ile *Ku70* -1310C/G ve *Ku80* -1401G/T polimorfizmlerinin allel ve genotipik tayinleri yapılmıştır.

Çalışmamızda hasta grubumuzun 4 bayan ve 34 erkek bireyden oluştuğu ve genel yaş ortalamalarının 65,7 olduğu tespit edilmiştir. Çalışma grubunun %71'inin sigara, %34'ünün de alkol kullandığı hastalar tarafından ifade edilmiştir.

Allel frekansları belirlenen *Ku70* ve *Ku80* genotipleri istatistiki olarak da Hardy-Weinberg Dengesi ve İlişkilendirme Testi ile değerlendirildi.

### 4.1. *Ku70* -1310C/G Polimorfizmi Bulguları

Mesane Kanseri tanısı konmuş 38 bireye ait *Ku70* geninin promotor bölgesinde yer alan -1310C/G polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltılmış ve *HhaI* restriksiyon enzimi kullanılarak amplifikasyon ürününün kesimi gerçekleştirilmiştir.

GGCCCAAGTCTCCCCACCTCGGCCAG[C/G]CGCCACCCTCTGGCCTGG  
CTCCCGC

**Şekil 5:** *Ku70* -1310C/G (*rs2267437*) Polimorfizmi için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresinden short genetic variations databaseden (dbSNP) *rs2267437* numaralı nükleotit değişimi gösterimi.

```
CTTCAGACCACTCTCTTCTCCACTCGGCTTTTCTTCCATCCTCCTGGC
CATGTGTCTCCCCGTGAGTCGTGGCCCAAGTCTCCCCACCTCGGCCAG
CCGCCACCCTCTGGCCTGGCTCCCGCCCTCCTGCCACCTGGCCCCTT
CCCCCTACCCAGCATGATGGGGCTGAGCCGCCGGGCCAGGCCTTTGG
ACAGGTCGTACACGTAGAGCTTCACCGGATAGAGATTCGGCGGCTCCA
TTGGGACCCGTGGCGACGGCGGCCACGACGGCCCTCGGGCACCCGGC
AGCGCTTGGACCTTCCCGTACCCGACGGGAGTGCGAAGCGGAGGGAG
AGGGGGGGACCGAGCCCGGGCCCCGGGCTGAGGGGTGGGGGAGAGGC
CGCCCTGCGCTGCTCGCGCCCCCACACCCGCTACCGGCAACGACTAC
TGTGAGGTGA
```

**Sekil 5.1:** *Ku70* geninin promotor bölgesi üzerinde amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın harfler primer dizilerini, altı çizili harfler restriksiyon enzimi kesim bölgelerini ifade etmektedir.

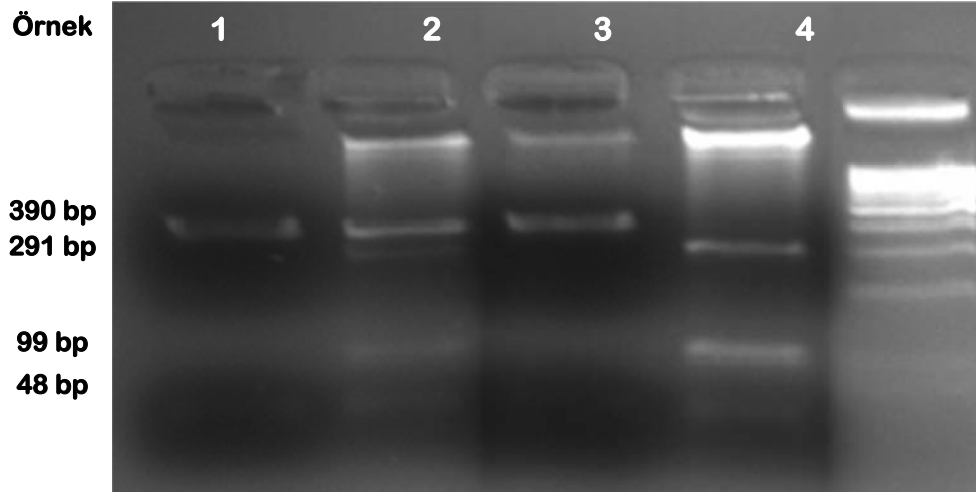
PCR ürünü: 438 bp

Restriksiyon Enzimi: *HhaI* (GCG-C)

CC homozigot Normal: 390 + 48 bp

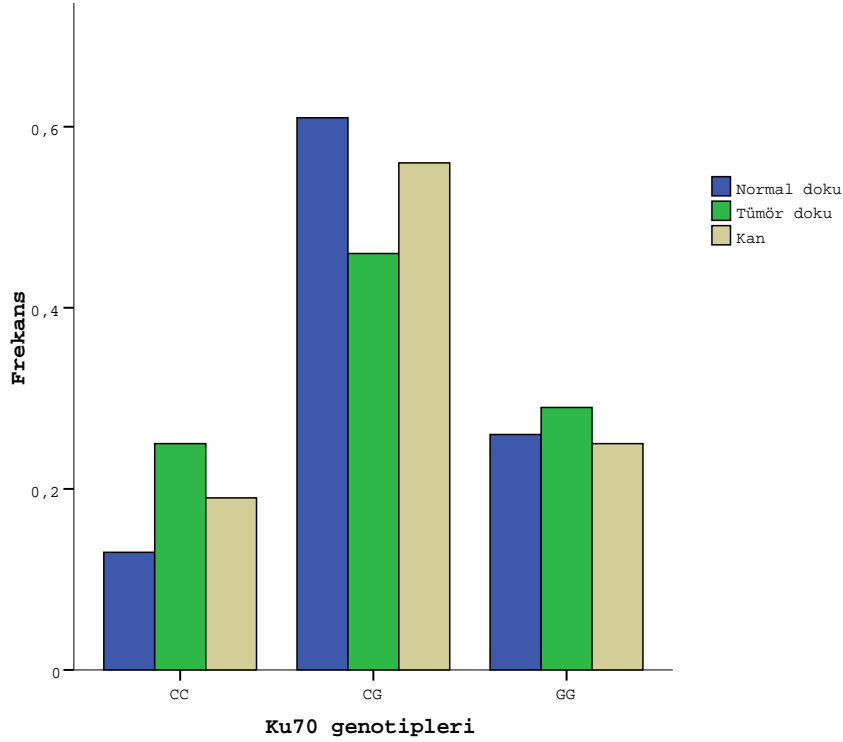
GC heterozigot: 390 + 291 + 99 +48 bp

GG homozigot Polimorfik: 291 + 99 +48 bp



**Resim 1:** *Ku70 -1310C/G* Polimorfizmine Ait Jel Elektrofrez Görüntüsü

Laboratuvar çalışmaları sonucunda, *Ku70 -1310C/G* polimorfizmi açısından elde edilen veriler ışığında her bir bireye ait tümörlü doku, normal doku ve kan örnekleri allel frekansı ve genotipleri açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.



**Şekil 6:** Normal doku, tümörlü doku ve kan örneklerinde gözlenen *Ku70-1310C/G* SNP için genotip frekansları

**Tablo 7:** *Ku70 -1310C/G* SNP için genotip frekansları

	Normal doku	Tümör doku	Kan	Normal doku	Tümör doku	Kan
Genotip	N			Gözlenen frekans (%)		
CC	3	6	3	13,0	60,9	36,5
CG	14	11	9	25,0	45,8	29,2
GG	6	7	4	18,8	56,3	25,0

*Ku70 -1310C/G* SNP için genotip ve allel frekansları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Normal Dokular, Tümörlü Dokular ve Kan örnekleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.



**Tablo 8: Ku70 -I310C/G SNP için allel frekansları**

Risk alleli	Risk alleli frekansı		Risk alleli OR* (%95 C.I)		p değeri	
	Normal doku	Tümör doku	Normal / Tümör	Tümör / Kan	Normal / Tümör	Normal / Kan
C	0,44	0,48	1.19 (0.53-2.69)	1.14 (0.46-2.84)	0.95 (0.39-2.34)	0,767
G	0,57	0,52	0.83 (0.37-1.88)	0.87 (0.35-2.15)	1.04 (0.42-2.55)	0,927

\*OR: Odds Ratio

**Tablo 9: Ku70 -I310C/G SNP için Hardy-Weinberg dengesi ve ilişkilendirme testi**

Hardy-Weinberg dengesi		İlişkilendirme (Association) testi (%95 C.I)		Armitage's trend testi
Doku Tipi		Risk Alleli		
Normal doku (n=23)	Tümör doku (n=24)	[CC <-> GG]	[CC <-> AG+GG]	
p=0,40	p=0,69	O.R.=0.58 C.I.=[0.10-3.40] p=0.54	O.R.= 0.45 C.I.=[0.09-2.06] p=0.29	O.R.=0,80 P= 0,65
Normal doku (n=23)	Kan (n=16)			
p=0,40	p=1,00	O.R.=0.66 C.I.=[0.08-5.12] p=0.69	O.R.= 0.65 C.I.=[0.11-3.72] p=0.62708	O.R.= 0.83 p=0.74
Tümör doku (n=23)	Kan (n=16)			
p=0,69	p=1,00	O.R.=1.14 C.I.=[0.17-7.28] p=0.88	O.R.= 1.4 C.I.=[0.30-6.86] p=0.64	O.R.= 1.05 p=0.92

*Ku70 -1310 C/G* SNP için Hardy-Winberg Dengesi ve İlişkilendirme testine göre Normal Doku ve Tümörlü Dokular, Normal Dokular ve Kan örnekleri, Tümörlü Dokular ve Kan örnekleri risk allelleri açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ancak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

#### 4.2. *Ku80 -1401G/T* Polimorfizmi Bulguları

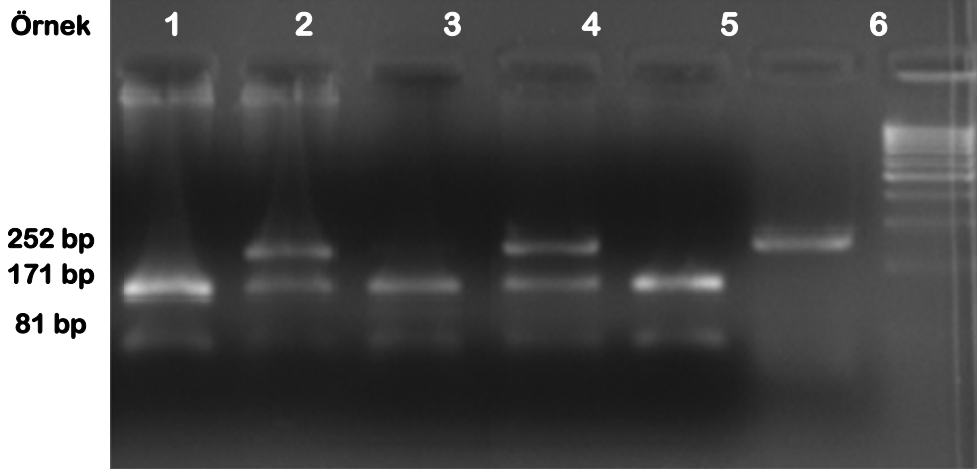
Mesane Kanseri tanısı konmuş 38 bireye ait *Ku80* geninin promotor bölgesinde yer alan *-1401G/T* polimorfizmini belirleyebilmek için ilgili bölge PCR ile çoğaltılmış ve *BfaI* restriksiyon enzimi kullanılarak amplifikasyon ürününün kesimi gerçekleştirilmiştir.

```
TGGAAATCTTACCCGCAGGGAAGGGC[G/T]AGTGTCCGTGCCTGCCTGCCTGCC  
T
```

**Şekil 7:** *Ku80 -1401G/T (rs828907)* Polimorfizmi için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresinden short genetic variations databaseden (dbSNP) rs828907 numaralı nükleotit değişimi gösterimi.

```
TAGCTGACAACCTCACAGATCTTCCCCGCCCTTCTGCCGAGCTGATCTTTCT  
CTTGGAAATCTTACCCGCAGGGAAGGGCGAGTGTCCGTGCCTGCCTGCCTGCC  
TGCTGCAGCCCGCGCAAAGCTGAGCGGCCAGGGCGCTGCTGTTTAAAGT  
ATTATTAATAATAATATTTTCAGCTTTAAGTAACTCCTTGAGTTTGAATCAAAA  
GCTGGAAGAACCTCCTGGGCTCTATGAGCACCTCTGAAT
```

**Şekil 7.1:** *Ku80* geninin promotor bölgesi üzerinde amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi. Kalın harfler primer dizilerini, altı çizili harfler restriksiyon enzimi kesim bölgesini ifade etmektedir



**Resim 2:** *Ku80 -1401G/T* Polimorfizmine Ait Jel Elektrofrez Görüntüsü

PCR ürünü: 252 bp

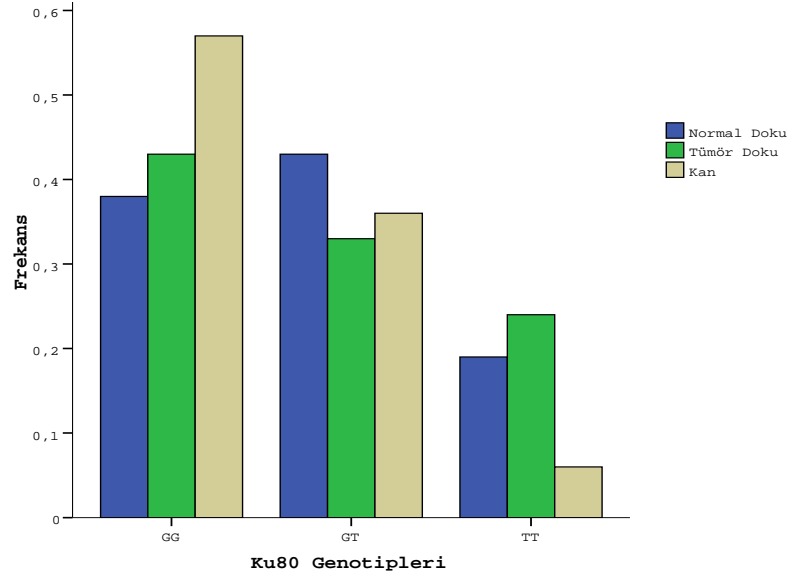
Restriksiyon Enzimi: *BfaI* (C-TAG)

GG homozigot Normal: 252 bp

GT heterozigot: 252 + 171 + 81 bp

TT homozigot Polimorfikler: 171 + 81 bp

Laboratuvar çalışmaları sonucunda, *Ku80 -1401G/T* polimorfizmi açısından elde edilen veriler ışığında her bir bireye ait tümörlü doku, normal doku ve kan örnekleri allel frekansı ve genotipleri açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.



**Şekil 8:** Normal doku, tümürlü doku ve kan örneklerinde gözlenen *Ku80* genotip frekansları

**Tablo 10:** *Ku80 -1401G/T* SNP genotip frekansları

	Normal doku	Tümör doku	Kan	Normal doku	Tümör doku	Kan
Genotip	N			Gözlenen frekans (%)		
GG	14	16	9	37,8	43,2	18,9
GT	16	12	6	43,2	32,4	24,3
TT	7	9	1	56,3	37,5	6,3

*Ku80 -1401G/T* SNP için genotip ve allel frekansları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Normal Dokular, Tümürlü Dokular ve Kan örnekleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

**Tablo 11:** *Ku80 -1401G/T* SNP allel frekansları

Risk alleli	Risk alleli frekansı			Risk alleli OR* (%95 C.I)			P değeri		
	Normal doku	Tümör doku	Kan	Norma/ Tümör	Tümör / Kan	Tümör / Kan	Norma/ Tümör	Normal / Kan	Tümör / Kan
G	0,60	0,60	0,75	1.00 (0.51- 1.92)	2.04 (0.81- 5.15)	2.04 (0.81- 5.15)	1,000	0,126	0,126
T	0,41	0,41	0,25	1.00 (0.51- 1.92)	0.48 (0.19- 1.23)	0.48 (0.19- 1.23)			

\*OR: Odds Ratio

**Tablo 12:** *Ku80 -1401G/T* SNP için Hardy-Weinberg dengesi ve ilişkilendirme testi

Hardy-Weinberg dengesi		İlişkilendirme (association) testi (%95 C.I)		
		Risk Alleli		Armitage's trend testi
Normal doku (n=37)	Tümör doku (n=37)	[GG <-> TT]	[GG <-> GT+TT]	
p=0,51	p=0,05	O.R= 1.12 C.I.=[0.33-3.81] p=0.84	O.R.= 0.79 C.I.=[0.31-2.02] p=0.63	O.R.= 1.02 p=1.00
Normal doku (n=37)	Kan (n=16)			
p=0,51	p=1,00	O.R= 0.22 C.I.=[0.02-2.12] p=0.16	O.R.= 0.47 C.I.=[0.14-1.55] p=0.21	O.R.= 0.49 p=0.14
Tümör doku (n=37)	Kan (n=16)			
p=0,05	p=1,00	O.R= 0.19 C.I.=[0.02-1.82] p=0.12	O.R.= 0.59 C.I.=[0.18-1.93] p=0.38	O.R.= 0.52 p=0.17

*Ku80 -1401 G/T* SNP için Hardy-Winberg Dengesi ve İlişkilendirme testine göre Normal Doku ve Tümörlü Dokular, Normal Dokular ve Kan örnekleri, Tümörlü Dokular ve Kan örnekleri risk allelleri açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ancak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

Yaşlarının aritmetik ortalamasını 65,7 olarak bulduğumuz hasta grubuz, *Ku70* ve *Ku80* genotipleri ile bu genotipe sahip bireylerin yaşları açısından tek yönlü varyans analizi tekniğinden (One Way ANNOVA) yararlanılarak değerlendirilmiştir.

Değerlendirmeler neticesinde, genotipler ile bu genotiplere sahip bireylerin yaşları arasında bir ilişki bulunamamıştır.

**Tablo 13:** *Ku70 -1310C/G* SNP Normal dokuya ait genotip frekansları ve yaş ortalamaları

Variable	KU70	N	N*	Mean	SEMean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Yaş	CC	3	0	66,67	5,17	8,96	61,00	62,00	77,00
	CG	14	0	64,79	3,41	12,77	35,00	65,50	80,00
	GG	6	0	68,17	1,62	3,97	63,00	68,50	72,00

Yapılan varyans analizi sonucunda Normal dokuda *Ku70* genine ait genotipleri bulunduran hasta gruplarının yaş ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 14:** *Ku70 -1310C/G* SNP Tümör dokuya ait genotip frekansları ve yaş ortalamaları

Variable	KU70	N	N*	Mean	SEMean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Yaş	CC	3	0	66,67	5,17	8,96	61,00	62,00	77,00
	CG	14	0	64,79	3,41	12,77	35,00	65,50	80,00
	GG	6	0	68,17	1,62	3,97	63,00	68,50	72,00

Tümörlü dokuda *Ku70* genine ait genotipleri bulunduran hasta gruplarının yaş ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 15:** *Ku80 -1401G/T* SNP Normal dokuya ait genotip frekansları ve yaş ortalaması

	Normal								
Variable	KU80	N	N*	Mean	SEMean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Yaş	GG	14	0	72,43	1,70	6,35	61,00	73,00	80,00
	GT	16	0	63,88	3,70	14,79	35,00	65,50	80,00
	TT	7	0	66,14	2,39	6,34	54,00	67,00	72,00

Normal dokuda *Ku80* genine ait genotipleri bulunduran hasta gruplarının yaş ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 16:** *Ku80* -1401G/T SNP Tümör dokuya ait genotip frekansları ve yaş ortalamaları

	Tümör								
Variable	KU80	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Yaş	GG	16	0	68,63	3,04	12,16	35,00	71,50	80,00
	GT	12	0	68,17	3,30	11,42	41,00	73,50	78,00
	TT	9	0	64,78	3,46	10,39	42,00	65,00	80,00

Tümörlü dokuda *Ku80* genine ait genotipleri bulunduran hasta gruplarının yaş ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA

DNA tamir genlerinde meydana gelen polimorfizmler aminoasit dizisinde değişikliğe ve DNA tamir kapasitesinde hasara sebep olup çeşitli kanserlere neden olabilmektedir. Çeşitli DNA hasarları proteinlerin görevli olduğu birden fazla yolla tamir edilir. Birçok çalışmada DNA tamir genlerinin polimorfizmlerinin mesane kanseri riskine etkisi araştırılmışsa da henüz ilişkisi kesin olarak belirtilememiştir. Ku proteini memeli hücrelerinde DNA çift zincir kırıkları tamirinde major role sahiptir. Yapılan çalışmalarda *Ku70* ve *Ku80*'in promotor bölgesinde meydana gelebilecek polimorfizmlerinin çeşitli kanser türleri ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bau et al. (2008), 1998-2007 yılları arasında oral kanser tanısı almış 380 hasta ve bu grupla yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu aynı sayıda sağlıklı kontrol grubu ile yapmış oldukları çalışmada *Ku70 T-991C*, *C-57G* ve *A-31G* polimorfizmleri ile oral kanser arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. C alleli taşıyan bireylerin (T/C ve C/C) T/T (wild) genotipe oranla 2,14 kat oral kanser riski taşıdıkları belirtilmiştir. *C-57G* ve *A-31G* polimorfizmleri için ise alelik frekans ve oral kanseri ilişkisi hastalar ve kontrol grubunda anlamlı bir fark göstermemiştir.

Bir başka çalışmada, mide kanseri ve *Ku70 T-991C*, *C-57G* ve *A-31G* polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmış. Çalışmaya 136 mide kanserli hasta ve 560 kontrol grubu dahil edilmiştir. TC ve CC genotipli bireylerin TT genotipe oranla anlamlı derecede mide kanseri riski bulundurduğu belirtilmiştir (Yang et al., 2011).

He et al. (2011), *Ku70 -1310C/G* polimorfizmi ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamışlar. 293 Meme kanserli hasta ve 301 kontrol grubu ile yapmış oldukları çalışmada CG ve GG allel frekansına sahip bireyler CC homozigot allele karşılaştırıldıklarında daha yüksek risk taşıdıkları belirtilmiştir (p= 0,038).

Biz çalışmamızda *Ku70 -1310C/G* ve *Ku80 -1401G/T* polimorfizmleri ile mesane kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık. Türkiye'de yapılmış polimorfizm çalışmalarına ait literatür araştırmalarımız sonucu *Ku70* ve *Ku80* genleri ile ilgili olarak daha önce herhangi bir çalışmanın yapılmamış olduğunu tespit ettik. Kanser çalışmaları açısından bir değerlendirme yaptığımızdaysa, yayınlanmış çalışmaların hiç birinde hasta gruplarının tümör dokularına karşı kendi normal dokuları ve kan



örneklerinin kontrol grubu olarak kullanılmadığını gördük. Bu özellikleri nedeniyle çalışmamızın bilimsel açıdan farklı olduğu kanaatindeyiz.

Çalışmamızda istatistiksel olarak genotip ve allel frekansları açısından; tümörlü ve normal dokular ile kan örneklerinin karşılaştırılması yapılmış ancak *Ku70 -1310 C/G* polimorfizmi için risk alleli olan *guanin* ve *Ku80 -1401G/T* polimorfizmi için risk alleli olan *timin* için anlamlı sonuçlar elde edilememiştir ( $p > 0.05$ ). Çalışmamıza dahil edilen 38 mesane kanseri hastanın *Ku70* ve *Ku80* genlerine ait genotipleri incelendiğinde *Ku70 -1310C/G* polimorfizmi için; Tümörlü dokularda risk alleli olan G'nin bulunma oranı % 50 olarak, *Ku80 -1401G/T* polimorfizmi için; risk alleli olan T'nin bulunma oranı % 58 olarak tespit edilmiştir. Bu durum incelenen literatürleri desteklemektedir.

Wang et al. (2009) 1270 meme kanserli vaka ile yaptıkları çalışmada *Ku80 G-1401T* polimorfizmi ile meme kanseri ilişkisinin T allel frekansı için anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Li et al. (2011) 241 mide kanserli hasta ve onlarla yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu 273 kontrol grubu ile yapmış oldukları çalışmada, *Ku80 G-1401T* polimorfizmi ve mide kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. GG, GT ve TT genotip frekansları mide kanseri vakalarda %65,6, %22,8 ve %11,6 iken kontrol gruplarında bu oranlar %75,8, %17,6 ve % 6,6 olarak değişmektedir. Sonuç olarak T alleli bulunduran mide kanserli hastalarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bir oran sözkonusudur.

Willems et al. (2009) yapmış oldukları çalışmada ailesel olmayan meme kanseri ile *Ku70* promotor bölgesinde meydana gelen *C-1310G* tek nükleotit polimorfizmi ilişkisini araştırmışlardır. 206 hasta ve 171 kontrol bireyden oluşan çalışma grubunda sonuç değerlendirildiğinde; endojen östrojen seviyesi yüksek meme kanserli hasta grubunda CG allelinin anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.

Sanyal ve arkadaşları, (2004) DNA tamir genlerinden *XPC*, *XPD*, *XPG*, *XRCC1*, *XRCC3*, *NBS1*, *Siklin D*, *MTHFR*, *H-ras*, *GSTT1* ile geniş çaplı bir çalışma yapmış ve bu genlerde meydana gelen polimorfizmler ile mesane kanseri riskini araştırmıştır. Bu çalışmada *XPC* geninde ekzon 15 A/C polimorfizminin mesane kanseri vakalarında anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir. *H-ras* geni ekzon

*I T/C* polimorfizminin ise mesane kanser riskini azalttığı, *XPG* ve *NBS1* genleri tek nükleotit polimorfizmlerinin mesane kanseri ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir.

Mesane kanseri ile ilişkili olabileceği düşünülen polimorfizm çalışmalarından biri de DNA çift zincir kırıkları ve çapraz bağlanmalarının homolog rekombinasyon (HR) onarımına katılan *XRCC3* geni ile yapılmıştır. *XRCC3*'in ekzon 7 (Thr241Met,T/C) 241 kodon Thr/Met polimorfizmi araştırılmış ve mesane kanseri ile arasında anlamlılık olduğu ve sigara kullanımının risk faktörü olmadığı ifade edilmiştir (Matullo et al. 2001). Stern et al. (2002) ise aynı polimorfizm bölgesi için yapmış oldukları çalışmada *XRCC3* kodon 241 polimorfizminin ve sigara içimi etkileşimi ile mesane kanseri arasındaki ilişki derecesini istatistiksel açıdan zayıf anlamlı olduğunu ifade etmektedirler.

Yapmayı hedeflediğimiz ileriki çalışmalarımızda, hasta sayısını polimorfizmlerin istatistiksel açıdan daha rahat değerlendirilebileceği sayılara arttırılarak *Ku70* ve *Ku80* genlerinde ve DNA tamir mekanizmasında görev alan diğer genlerde meydana gelebilecek polimorfizmler ve mutasyonlar açısından değerlendirmeyi hedeflemekteyiz. Aynı hasta grubu ile çalışmaya devam edilmesi neticesinde anlamlı sonuçların elde edilebileceği kanaatindeyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Isparta yöresinde yaşayan mesane kanseri tanısı konmuş 38 bireyle yapılan çalışmamız neticesinde *Ku70 -1310C/G* ve *Ku80 -1401G/T* polimorfizmlerinin hastalık fenotipi ile ilişki olmadığı tespit edilmiştir.

İlişki bulunamamasındaki birincil sebebin materyal sayısının azlığı olduğu düşünülmektedir.

Materyal sayısı artırılarak ileriki çalışmalarda *Ku70/80* genlerine ait bu ve diğer polimorfizmlerin çalışılması hedeflenmektedir.

Ayrıca DNA tamir mekanizmasından sorumlu diğer genlere ait polimorfizmler ve mutasyonlar açısından çalışıldığında anlamlı sonuçların elde edilebileceği tahmin edilmektedir.

Türk toplumunda ilk kez çalışılan *Ku70 -1310C/G* ve *Ku80 -1401G/T* polimorfizmlerinin anlamlı sonuç elde edilememesine rağmen bilimsel açıdan önemli olduğu kanaatindeyiz.

## ÖZET

### Mesane Kanseri ile Ku70/80 Polimorfizminin İlişkisinin Araştırılması

Mesane kanseri, dünya genelinde en sık görülen kanser türleri arasında erkeklerde 7. kadınlarda 17. genel olarak bakıldığında 9. sıradadır. Mesane kanseri ile ilgili yapılmış birçok çalışmada hücre bölünme prosesinde temel basamaklardan biri olan DNA tamir mekanizması ve bu mekanizmanın işleyişini sağlayan DNA tamir genleri üzerinde yoğunlaşmıştır. DNA tamir genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin genlerin işleyişini ve ekspresyon seviyesini değiştirerek çeşitli kanserlerin oluşumuna yol açabileceği belirtilmiştir.

DNA çift zincir kırıkları, DNA sarmalının her iki zincirinde yer alan fosfodiester bağının parçalanması sonucunda meydana gelir. Ökaryotik hücrelerde, DNA çift zincir tamir mekanizmasında homolog rekombinasyon (HR) ve serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (Non-Homolog end Joining, NHEJ) olmak üzere iki major yol vardır.

NHEJ ve HR tamir mekanizmalarında görev alan Ku, XRCC gen ailesi tarafından ifade edilen Ku70 ve Ku 80 olmak üzere iki alt birimden oluşan heterodimerik bir proteindir.

Biz de çalışmamızda mesane kanserli hastalarda *Ku70* ve *Ku80* genlerindeki polimorfizmleri araştırmayı amaçladık. Bu amaçla Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Üroloji Polikliniğince mesane kanseri tanısı konmuş 38 hastada tümörlü dokular ve bu tümörlü dokulara komşu sağlıklı mesane dokuları ile aynı kişilere ait venöz kan örnekleri alındı. Örneklerden izole edilen DNA'larda PCR-RFLP yöntemi ile *Ku70 -1310C/G* ve *Ku80 -1401G/T* polimorfizmlerinin allel ve genotipik tayinleri yapıldı.

Araştırmamız sonucunda Türk toplumunda ilk kez çalışılan *Ku70 -1310C/G* ve *Ku80 -1401G/T* polimorfizmleri ile hastalık fenotipi arasında ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Bulgularımız mesane kanseri oluşumunda rolü olabilecek bir etkeni elediğinden sonuçların bilimsel açıdan önemli olduğu kanaatindeyiz. DNA tamir mekanizmasından sorumlu diğer genlere ait polimorfizmler ve mutasyonlar da çalışıldığında anlamlı sonuçların elde edilebileceği tahmin edilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** DNA tamir mekanizması, *Ku70*, *Ku80*, polimorfizm mesane kanseri

## ABSTRACT

### Investigation of Association with Bladder Cancer and Ku 70/80 Polymorphism

Bladder cancer is the 7<sup>th</sup> most common cancer among men 17<sup>th</sup> most common among women and 9<sup>th</sup> most common in general around the world. Several studies focus on the DNA repair mechanism and DNA repair genes, which is one of the fundamental steps of cell division process. Polymorphisms of DNA repair genes may lead changes in expression levels and functions of these genes thereby causing cancer.

Breaking of phosphodiester bonds in both chains of DNA causes DNA double strand breaks. The two major ways of double chain repair mechanisms are homologous recombination (HR) and Non-Homolog end Joining (NHEJ).

Ku is a heterodimeric protein expressed by *XRCC* gene family and consist of two subunits as Ku70 and Ku80, which plays role in NHEJ and HR repair mechanisms.

We aimed to investigate polymorphisms of *Ku70* and *Ku80* genes among patients with bladder cancer. We obtained tumorous, adjacent healthy bladder tissues and blood samples from 38 bladder cancer patients diagnosed by Suleyman Demirel University, Uroloji Department. We examined the association between the genetic polymorphisms *Ku70* -1310C/G and *Ku80* -1401G/T from isolated DNA samples from three sources via PCR-RFLP method.

Our study, which is performed for the first time in Turkish population, showed no association between the *Ku70* -1310C/G and *Ku80* -1401G/T polymorphisms and bladder cancer. We concluded our results are scientifically important because of the elimination of two factors which can play role in bladder cancer. We think there could be relations between other polymorphisms and mutations of DNA repair mechanisms and cancer.

**Keywords:** DNA repair mechanism, *Ku70*, *Ku80*, polymorphism, bladder cancer

## KAYNAKLAR

Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, Temel Üroloji. 3. Baskı, Ankara, *Güneş Tıp Kitabevleri*, 2007; 740-742, 855-856.

Aslan G, Mammadov E. Mesane Kanserinde Yaş Ve Cinsiyetin Klinik-Patolojik Sonuçlar Üzerindeki Belirleyici Rolü. *DEÜ TIP FAKÜLTESİ DERGİSİ* 2010;24(3):119-123.

Bau DT, Tseng HC, Wang CH, Chiu CF, Hua CH, Wu CN, Liang SY, Wang CL, Tsai CW, Tsai MH. Oral cancer and genetic polymorphism of DNA double strand break gene Ku70 in Taiwan. *Oral Oncol.* 2008;44(11):1047-51.

Cary RB, Peterson SR, Wang J, Bear DG, Bradbury EM, Chen DJ. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(9):4267-72.

Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, Pelanda R, Reichlin A, Suh H, Qin XF, Besmer E, Kenter A, Rajewsky K, Nussenzweig MC. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J.* 1998;17;2404–2411.

Colombel M, Soloway M, Akaza H, Bo`hle A, Palou J, Buckley R, Lamm D, Brausi M, Witjes J. A, Persad R. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Urology Supplements* 2008;7: 618-626.

d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP. Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol.* 2001;11(15):1192-6.

Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, De Pauw M, Robinson M, Denis L, Smith P, Viggiano G. Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organization for Research on Treatment of Cancer: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *J Urol* 1983;129(4):730-3.

Dalesio O, Schulman CC, Sylvester R, De Pauw M, Robinson M, Denis L, Smith P, Viggiano G. Prognostic factors in superficial bladder tumors. A study of the European Organization for Research on Treatment of Cancer: Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group. *J Urol.* 1983;129(4):730-3.

- Das G, Glashan RW. Correlation of urine cytology with ABO(H) antigenicity in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol.* 1988;41(5):538-9.
- Dik C. van Gent, Jan HJ, Kanaar H, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics* 2001;2:196-206.
- Dynan WS, Yoo S. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(7):1551-9.
- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(12):1435-48.
- Gloria C, Yang S, Kim D, Nussenzweig A, Ouyang H, Wei J, Burgman P, Li L. Suppression of heat-induced hsp70 expression by the 70-kDa subunit of the human Ku autoantigen. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 1995;92:4512-4516.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 ;11(12):1513-30.
- Gu Y, Seidl GA, Rathbun GA, Zhu C, Manis JP, Van der SN, Davidson L, Cheng HL, Sekiguchi JM, Frank K, Stanhope-Baker P, Schlissel MS, Roth DB, Alt FW. Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 1997;7:653-665.
- Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(15):8076-81.
- Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1765(2):223-34.
- He W, Luo S, Huang T, Ren J, Wu X, Shao J, Zhu Q. The Ku70 -1310C/G promoter polymorphism is associated with breast cancer susceptibility in Chinese Han population. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):577-83.
- Heney N.M. Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long-term disease course. *Urol Clin North Am.* 1992;19(3):429-33.

- Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(22):12454-8.
- Imyanitov E, Hanson K, Zhivotovsky B. Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition. *Cell Death Differ.* 2005;12(8):1004-7.
- Jones JM, Gellert M, Yang W. A Ku bridge over broken DNA. *Structure* 2001;9(10):881-4.
- Kiemeny LA, Witjes JA, Verbeek AL, Heijbroek RP, Debruyne FM. The clinical epidemiology of superficial bladder cancer. Dutch South-East Cooperative Urological Group. *Br J Cancer* 1993;67(4):806-12.
- Koike M, Awaji T, Kataoka M, Tsujimoto G, Kartasova T, Koike A, Shiomi T. Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis. *J. Cell Sci* 1999;112:4031-039.
- Koike M, Awaji T, Kataoka M, Tsujimoto G, Kartasova T, Koike A, Shiomi T. Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis. *J Cell Sci.* 1999;112:4031-9.
- Koike M, Ikuta T, Miyasaka T, Shiomi T. Ku80 can translocate to the nucleus independent of the translocation of Ku70 using its own nuclear localization signal. *Oncogene* 1999;18;7495–7505.
- Korabiowska M, Quentin T, Schlott T, Bauer H, Kunze E. Down-regulation of Ku 70 and Ku 80 mRNA expression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder related to tumor progression. *World J Urol.* 2004;22(6):431-40.
- Li G.C, Ouyang H, Li H, Nagasawa H, Little J.B, Chen D.J, Clifton Ling C, Fuks Z, Cordon-Cardo C. Ku70: A Candidate Tumor Suppressor Gene for Murine T Cell Lymphoma. *Molecular Cell, Vol.* 1998;2:1-8.
- Li GC, Ouyang H, Li X, Nagasawa H, Little JB, Chen DJ, Ling CC, Fuks Z, Cordon-Cardo C. Ku70: a candidate tumor suppressor gene for murine T cell lymphoma. *Mol Cell.* 1998;2(1):1-8.
- Li GC, Yang SH, Kim D, Nussenzweig A, Ouyang H, Wei J, Burgman P, Li L. Suppression of heat-induced hsp70 expression by the 70-kDa subunit of the human Ku autoantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1995;92;4512–4516.



- Li JQ, Chen J, Liu NN, Yang L, Zeng Y, Wang B, Wang XR. Ku80 gene G-1401T promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2011;17(16):2131-6.
- Li JQ, Chen J, Liu NN, Yang L, Zeng Y, Wang B, Wang XR. Ku80 gene G-1401T promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2011;17(16):2131-6.
- Liu ES, Lee AS. Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5425-31.
- Mason RA, Morlock EV, Karagas MR, Kelsey KT, Marsit CJ, Schned AR, Andrew AS. EGFR pathway polymorphisms and bladder cancer susceptibility and prognosis. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1155-60.
- Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, Piazza A, Vineis P. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* 2001;92(4):562-7.
- Mo X, Dynan WS. Subnuclear Localization of Ku Protein: Functional Association with RNA Polymerase II Elongation Sites. *Molecular and Cellular Biology* 2002;22(22):8088-8099.
- Nussenzweig A, Sokol K, Burgman P, Li L, Li GC. Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13588-93.
- Ouesnel B. Cyclin/CDK inhibitors of the 9p21 chromosomal region and hematological malignancies. *Bulletin du Cancer* 1998; 85(9):754-54.
- P. D. Sasieni, "From genotypes to genes: doubling the sample size," *Biometrics*, vol. 53, no. 4, pp. 1253–1261, 1997.
- Palmieri F, Brunocilla E, Bertaccini A, Guidi M, Pernetto R, Morselli-Labate AM, Martorana G. Prognostic value of lymphovascular invasion in bladder cancer in patients treated with radical cystectomy. *Anticancer Res.* 2010;30(7):2973-6.
- Park YB, Chae J, Kim YC, Cho Y. Crystal structure of human mre11: understanding tumorigenic mutations. *Structure* 2011;19(11):1591-602.

- Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, Jasin M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* 2001;15(24):3237-42.
- Prout GR, Barton BA, Griffin PP, Friedell GH. Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. *J Urol* 1992;148(5):1413-9.
- Raitanen MP, Nieminen P, Tammela TL. Impact of tumour grade, stage, number and size, and smoking and sex, on survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1995;76(4):470-4.
- Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, van Buul PP, Blasco MA. Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep.* 2000;1(3):244-52.
- Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, Steineck G, Norming U, Wijkström H, Larsson P, Kumar R, Hemminki K. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2004;25(5):729-34.
- Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman D.A, Matsuyama S. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nature Cell Biology* 2003;5(4):320-9.
- Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA, Matsuyama S. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol.* 2003;5(4):320-9.
- Sheinfeld J, Reuter VE, Fair WR, Cordon-Cardo C. Expression of blood group antigens in bladder cancer: current concepts. *Semin Surg Oncol.* 1992;8(5):308-15.
- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:155-168.
- Singleton BK, Priestley A, Steingrimsdottir H, Gell D, Blunt T, Jackson SP, Lehmann SA, Jeggo PA. Molecular and Biochemical characterization of xrs mutants defective in Ku80, *Mol. Cell. Biol.* 1997;17;1264–1273.
- Singleton BK, Priestley A, Steingrimsdottir H, Gell D, Blunt T, Jackson SP, Lehmann AR, Jeggo PA. Molecular and biochemical characterization of xrs mutants defective in Ku80. *Mol Cell Biol.* 1997;17(3):1264-73.

- Stephenson WT, Holmes FF, Noble MJ, Gerald KB. Analysis of bladder carcinoma by subsite. Cystoscopic location may have prognostic value. *Cancer* 1990;66(7):1630-5.
- Stern MC, Umbach DM, Lunn RM, Taylor JA. DNA repair gene XRCC3 codon 241 polymorphism, its interaction with smoking and XRCC1 polymorphisms, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(9):939-43.
- Strom, T.M.W. (2009) Case-control studies. <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>
- Teoh G, Urashima M, Greenfield EA, Nguyen KA, Lee JF, Chauhan D, Ogata A, Treon SP, Anderson KC. The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells. *J Clin Invest.* 1998;101(6):1379-88.
- Thacker J, Zdzienicka MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst).* 2004 ;3(8):1081-90.
- Thompson RA, Campbell EW, Kramer HC, Jacobs SC, Naslund MJ. Late invasive recurrence despite long-term surveillance for superficial bladder cancer. *J Urol* 1993; 149(5):1010-1.
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 2001;412(6847):607-14.
- Wang HC, Liu CS, Chiu CF, Chiang SY, Wang CH, Wang RF, Lin CC, Tsai RY, Bau DT. Significant association of DNA repair gene Ku80 genotypes with breast cancer susceptibility in Taiwan. *Anticancer Res.* 2009;29(12):5251-4.
- Watson JD, Baker TA, Stephan PB, Gann A, Levine M, Losick R. Molecular Biology of the Gene. Sixth Edition. *Cold Spring Harbor, Newyork* 2007;275-277.
- Willems P, De Ruyck K, Van den Broecke R, Makar A, Perletti G, Thierens H, Vral A. A polymorphism in the promoter region of Ku70/XRCC6, associated with breast cancer risk and oestrogen exposure. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(9):1159-68.
- Yaneva M, Jhiang S. Expression of the Ku protein during cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1991;1090(2):181-187.
- Yaneva M, Jhiang S. Expression of the Ku protein during cell proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1090(2):181-7.

Yang MD, Wang HC, Chang WS, Tsai CW, Bau DT. Genetic polymorphisms of DNA double strand break gene Ku70 and gastric cancer in Taiwan. *BMC Cancer*. 2011;11:174.

Yang MD, Wang HC, Chang WS, Tsai CW, Bau DT. Genetic polymorphisms of DNA double strand break gene Ku70 and gastric cancer in Taiwan. *BMC Cancer* 2011;11:174.

Zhang ZF, Shu XM, Cordon-Cardo C, Orlow I, Lu ML, Millon TV, Cao PQ, Connolly-Jenks C, Dalbagni G, Lianes P, Lacombe L, Reuter VE, Scher H. Cigarette smoking and chromosome 9 alterations in bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997;6(5):321-6.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** GÜLÇİN YAVUZ

**Doğum Tarihi:** 18/08/1986

**Doğum Yeri:** İzmit

### **Eğitim Durumu:**

**2008- ... Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi**

**2008 -2009 Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Yüksek Lisans Bilimsel Hazırlık Programı Dahilinde Tıp Fakültesi**

**Dönem 2**

**2004-2008 Süleyman Demirel Üniversitesi**

**Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans Eğitimi**

**2001-2004 Burdur Anadolu Lisesi**

**Kongreler: 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi**

**Yabancı Dil: İngilizce**