

**AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA VE SAĞLIKLI BİREYLERDE
GSTP1 GENİ EKZON 6 POLİMORFİZMİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Ufuk Birgün TABAN

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ISPARTA – 2005

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA VE SAĞLIKLI BİREYLERDE
GSTP1 GENİ EKZON 6 POLİMORFİZMİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

UFUK BİRGÜN TABAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ISPARTA – 2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Akciğer Kanseri Türleri	4
2.1.1. Akciğer Kanserinin Histolojik Tipleri	4
2.1.1.1. Yassı Epitel Hücreli Karsinoma	4
2.1.1.2. Adenokarsinoma	5
2.1.1.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	5
2.1.1.4. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (Büyük Hücreli Karsinoma)	5
2.2. Detoksifikasyon Mekanizması	6
2.2.1. Faz I Transformasyonları	6
2.2.2. Faz II Transformasyonları	8
2.3. GST Enzimleri ve Genleri	13
2.3.1. Glutasyon S-Transferaz Pi 1 Geni (GSTP1)	14
3. MATERYAL ve METOT	17
3.1. Kullanılan Sarf Maddeler	17
3.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları	17
3.3. Kullanılan Kitler	18
3.4. Kullanılan Cihazlar	19
3.5. Hasta Kanlarının Toplanması	20
3.6. Yüksek Tuz Konsantrasyonu Metodu ile gDNA İzolasyonu	20

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi.....	21
3.8. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu.....	22
3.9. Fermentas gDNA Purifikasyon Kiti ile gDNA İzolasyonu.....	23
3.10. PZR ile GSTP1 Ekzon 6 Bölgesinin Amplifikasyonu	24
3.11. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	25
3.12. PZR Ürünlerinin Jelden İzolasyonu	25
3.13. QIAGEN Jel Ekstraksiyon Kit Protokolü.....	26
3.14. RFLP Analizi	27
3.15. İstatistiksel Analizler.....	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	34
6. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ.....	40

ÖZET**(Akciğer Kanseri Hastalarında ve Sağlıklı Bireylerde GSTP1 Geni Ekzon 6 Polimorfizminin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması)**

Glutasyon S-transferaz enzimleri (GSTs), hücrelerde glutasyon aracılı detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleyerek hücreleri sitotoksik ve karsinojenik ajanların sebep olduğu hasarlardan korurlar. Buna bağlı olarak, GST enzimlerinin düşük oranda ifadesi veya yokluğu nedeni ile detoksifikasyon reaksiyonlarındaki azalmanın kanser hassasiyetinde büyük oranda artışa neden olduğu bildirilmektedir. Glutasyon S-transferaz p1 (GSTP1), akciğer dokusunda en fazla bulunan enzim olup çok çeşitli karsinojenik maddeyi metabolize eder. Yapılan çalışmalarda, GSTP1 enziminin yapısında, fonksiyonunda ya da ifade seviyesinde genetik polimorfizimlerin neden olduğu değişikliklerin enzimin detoksifikasyon yeteneğini etkileyeceği ve akciğer kanseri riskinin arttıracığı belirtilmektedir.

Çalışmamızda, akciğer kanseri hastalarında (30) ve sağlıklı kontrollerde (30) GSTP1 geninin polimorfik 6. ekzon bölgesi incelenerek kanser ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu bölgede görülen nokta mutasyonu (Sitozin→Timin) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizleri kullanılarak saptanmıştır.

Hastalardan sadece 27'sinin homozigot (C/C) iken 3'ünün heterozigot (C/T) olduğu gözlenmiştir. Kontrollerden ise 26'sının homozigot (C/C) ve 4'ünün heterozigot (C/T) olduğu anlaşılmıştır. Her iki grupta da homozigot (T/T) genotipine rastlanmamıştır. Bulguların istatistiksel değerlendirmesi, GSTP1 genindeki ekson 6 C/T polimorfizminin akciğer kanseri ile ilişkisi olmadığını ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Akciğer Kanseri, GSTP1, Detoksifikasyon, RFLP

ABSTRACT**(Molecular Analysis of Exon 6 Polymorphism of GSTP1 Gene in Lung Cancer Patients and Healthy Individuals)**

Glutathione S-transferases (GSTs) catalyze detoxifying reactions with glutathione and protect cellular macromolecules from damage caused by cytotoxic and carcinogenic agents. It was therefore reported that the reduced level of expression or lack of GST enzymes might increase the sensitivity for lung cancer due to decreased detoxification reactions. Glutathione S-transferase p1 (GSTP1), the most abundant GST isoform in the lung, metabolizes numerous carcinogenic compounds. In previous studies, alterations in the structure, function or expression levels of GSTP1 enzyme due to genetic polymorphisms could alter the ability to detoxify carcinogens and modulate lung cancer risk.

In our study, the polymorphic GSTP1 exon 6 region was investigated in lung cancer patients (30) and healthy controls (30) to determine its association with cancer. The C→T point mutation seen in this region was detected using the methods of PCR and RFLP.

We observed that 27 of patients had homozygous (C/C) and 3 had heterozygous (C/T) genotypes while 26 of controls were homozygous (C/C) and 4 were heterozygous (C/T). Homozygous (T/T) genotype was not found in neither groups. The statistical evaluation of the data indicated that there was no association between C/T polymorphism at exon 6 of the GSTP1 gene and lung cancer.

Key words: Lung Cancer, GSTP1, Detoxification, RFLP

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince çalışmalarımın sonuca ulaştırılmasında ve karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında benden ilgi, destek ve katkılarını esirgemeyen Danışman Hocam Değerli Yrd. Doç. Dr. F.Filiz ARI'ya,

Onlara layık bir evlat olabilmek için gösterdiğim çabanın boşa gitmediği ümidiyle; Bütün hayatım boyunca beni her konuda destekleyen ve sevgisini benden esirgemeyen sevgili babam Osman TABAN'a,

Beni şefkati ve anlayışından mahrum etmeyip bugünlere getiren sevgili annem Nilgün TABAN'a,

Yanımda olmadığı zamanlarda bile varlığını hissettiğim diğer YARIM, canım kardeşim Sema TABAN'a,

Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma Merkezi'nde birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarıma en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Ufuk Birgün TABAN

Simgeler (Kısaltmalar) Dizini

ADP	:Adenozin difosfat
ATP	:Adenozin trifosfat
BP	:Benzo(a)pirin
BPDE	:Benzo(a)piren diol epoksit
cDNA	:Revers transkriptaz enzimi ile kalıp mRNA'dan sentezlenen tek iplikli DNA molekülü
CoA	:Koenzim A
COMT	:catechol 0-metil transferaz
CYPs	:Sitokrom P-450 enzimleri
DNA	:Deoksiribonukleik asit
dNTP	:Dinükleotit trifosfat
EB Tamponu	:Elüsyon Tamponu
EDTA	:Etilendiamid tetra asetik asit
E6F	:Ekzon 6 Forwaed primeri
E6R	:Ekzon 6 Reverse Primeri
FMOs	:Flavin monooksigenaz enzimleri
gDNA	:Genomik DNA
GSH	:Redükte Glutatyon
GSTP1	: Glutatyon S- Transferaz P1 Geni
Gr	:gram
G-S-S-G	:Okside Glutatyon
GST	: Glutatyon S-Transferaz enzimleri
hGST	:homoglutatyon
KHAK	:Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
M	:DNA Marker
MgCl ₂	:Magnezyum Klorür

mL	:Mililitre
μ L	:Mikrolitre
NaCl	:Sodyum Klorür
NAD	:Nikotinamid di nükleotit
NHDAK	:Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
NNK	:Nitrozaminoketon
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PAH	:Polisiklik Aromatik hidrokarbon
PAPS	:3' fosfoadenozin-5'-fosfosülfat
PE Tamponu	:Yıkama Tamponu
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
QG Tamponu	:Stabilizasyon Tamponu
rpm	:rotate per minute
SAM	:S-adenozil metionin
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
-SH	: Sülfidril
SPSS	:Statistical Packages of Social Sciences for Windows 10.0
TBE	: Tris Borik asit EDTA Tamponu
TE	: Tris-EDTA Tamponu
UV	:Ultraviyole
V	:Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Aflatoksinin Karsinojenik Mekanizması.....	7
Şekil 2.2. Etanol Metabolizması.....	7
Şekil 2.3. Üridin-5-difosfo- α -D-glukuronik Asit (UDPGA)	8
Şekil 2.4. 3' fosfoadenozin-5'-fosfosülfat (PAPS)	9
Şekil 2.5. S-adenozil metionin (SAM).....	9
Şekil 2.6. Adrenalinin Metabolize Edilmesi	10
Şekil 2.7. Glutasyonun Yapısı	11
Şekil 2.8. Glutasyonun Oluşumu.....	12
Şekil 2.9. GST Gen Ailesi.....	14
Şekil 2.10. GSTP1 Gen Yapısı.....	15
Şekil 2.11. gDNA Örneklerinin Jel Görüntüsü.....	29
Şekil 2.12. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	30
Şekil 2.13. RFLP Yönteminde yabancı tip, heterozigot ve mutant bireylerde beklenen DNA profillerinin şematik gösterilmesi	31
Şekil 2.14. GSTP1 Ekzon 6 Allel Analizi.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. PZR Bileşenleri.....	24
Çizelge 2. PZR Koşulları.....	25
Çizelge 3. Kesim reaksiyon karışımı.....	27
Çizelge 4: Hasta ve Kontrollerde GSTP1 ekzon 6 Genotip Frekansı.....	32
Çizelge 5: Hastalarda GSTP1 Ekzon 6 Genotip Frekansı ile Cinsiyet ve Akciğer Kanseri Tipinin İlişkisi İlişkisi.....	33

1. GİRİŞ

Ölümcül kanser türleri arasında ilk sırayı alan akciğer kanserinde, sigara kullanımının yanı sıra kanserli hücrelerde görülen değişik gen anormallikleri de doğrudan kanser etkeni olabildiği gibi hastalığın seyri hakkında da bilgi veren belirleyiciler olarak kullanılmaktadır.

Memeli dokularında yaygın olarak ifade edilen Glutasyon S-transferaz'lar (GSTs), dimerik yapıdaki özel bir enzim ailesi olup, hücrelerde glutasyon aracılı detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleyerek hücreleri sitotoksik ve karsinogenik ajanların sebep olduğu hasarlardan korurlar. Buna bağlı olarak, GST enzimlerinin düşük oranda ifadesi veya yokluğu nedeni ile detoksifikasyon reaksiyonlarının gerçekleşmemesi kanser hassasiyetinin büyük oranda artmasına neden olmaktadır. GST gen ailesi enzimlerinin GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, GSTMO ve GST gibi izotipleri mevcuttur. Akciğer dokusunda en fazla ifade edilen ve kromozom 11q13 üzerinde lokalize olmuş Glutasyon S-transferaz p1 (GSTP1) enzimi varyantlarının yapısal ve fonksiyonel değişiklikler nedeniyle düşük karsinogen detoksifikasyonu etkinliğine yol açabileceği ve kanser riskini arttırabileceği belirtilmiştir (Wang 2003).

Bu çalışmada, akciğer kanseri hastalarında ve sağlıklı bireylerde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemleri ile GSTP1 geni polimorfizminin belirlenerek Isparta ve yöresi akciğer kanser vakalarıyla bağlantılarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

Karsinojenlere karşı genetik olarak tespit edilen hassasiyet, insan kanserlerinde ilk sırayı alan faktörlerden birisidir. Akciğer kanserine yol açan en önemli dış etken her ne kadar sigara ise de, genetik olgular bu tümörlerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Akciğer kanseri riski sigara dumanı ile bağlantılı olduğundan beri, akciğer kanserine karşı oluşan genetik duyarlılık sigara dumanında bulunan PAH (polisiklik aromatik hidrokarbonlar), N-nitrozaminler ve aromatik aminler gibi potansiyel karsinojenlerin aktivasyon veya detoksifikasyon metabolizmaları açısından araştırılmıştır (Hou vd., 2000). Çoğu sigara prokarsinojenleri DNA molekülünde yapısal değişiklikler meydana getirmek için metabolik aktivasyona gereksinim duyarlar. Bu yüzden aktivasyon veya detoksifikasyon reaksiyonlarında rol alan enzimleri kodlayan bazı polimorfik genler akciğer kanseri duyarlılığında bireyler arasında değişkenlik oluştururlar (To-Figueras vd., 1997). Bu bileşenler 5-200 ng/sigara olmak üzere küçük miktarlarda bulunurken, en çok rastlanan karsinojenlerden olan aldehitler, benzen ve bütadin gibi diğer uçucu organik bileşenler ise 10-1000 µg/sigara miktarında bulunmaktadır (Hecht, 2002).

Türkiye’de sigara içme oranı hala %65’in üzerindedir ve kişi başına senede ortalama 60-65 paket sigara tüketilmektedir. Türkiye’de sigara tüketimi ile akciğer kanserinin görülme oranı doğru orantılı olarak artmaktadır. Ülkemizde her yıl yaklaşık olarak 30-40 bin kişide akciğer kanseri görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, dünya çapında 15 yaş ve üstündeki erkeklerin %47’sinin, kadınlarında %12’sinin sigara kullandığını tespit etmiştir. Türkiye’de kadın-erkek cinslerine göre akciğer kanseri görülme oranı, 20 yıl önce 1/6 iken yani her 6 erkeğe karşılık bir kadında görülürken bugün bu oran 1/2 ‘ye yükselmiştir. Bu da ülkemizde kadınlar arası sigara tüketiminin çok arttığını göstermektedir. Türkiye’de erkeklerde en sık ölüme neden olan kanser türü akciğer kanseridir. Kadınlarda ise akciğer kanseri üçüncü sıradadır.

Organizmada karsinojen etkisine karşı oluşan yanıt, herhangi bir yabancı bileşik ya da ilaca karşı oluşan yanıtla benzerdir. Kimyasal indirgenmeye uğramış ve daha sonra

karbonmonoksida maruz bırakılmış mikrozom preparatlarının 450 nm’de gösterdikleri belirgin pik’in gözleendiği sırada keşfedilen ve karaciğer endoplazmik retikulum membranlarında yüksek miktarda bulunan hemoproteinlerden olan Sitokrom P-450 (CYPs) (monooksijenazlar) enzim genleri insanlarda yaklaşık olarak 50 genden oluşan çok geniş bir ailedir. Sitokrom P-450 enzimlerinin görevi; sigara dumanında bulunan benzen, benzo(a)pyrene (BP), benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE), dimetil sülfat ve dimetilnitrosamin gibi maddelerin metabolize edilerek hücreden dışarı atılmasını sağlamaktır. Bu işlem sırasında Faz I enzimleri adı verilen enzimler çevresel kimyasallara bir oksijen molekülü bağlayarak bu maddelerin epoksit türevlerine dönüşmesini sağlarlar. Daha sonra faz II enzimleri adı verilen Glutasyon transferaz, glukoronil transferaz ve sülfatazlar gibi enzimler bu moleküllerin suda çözünmesini sağlayarak hücreden dışarı atılmasını gerçekleştirir ve böylece bu maddelerden hücrenin zarar görmesine engel olurlar. Akciğer kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda faz I enzimlerinin çok hızlı çalıştığı, buna karşılık faz II enzimlerinin ise daha yavaş çalıştığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda ise epoksit türevleri hücrede birikmekte ve sabit olmayan, elektrofilik bölgeye sahip (elektronca eksik bölge) bu maddeler DNA molekülüne kovalent bağlarla bağlanarak DNA molekülünde yapısal değişiklikler meydana getirip mutasyonlara ve dolayısıyla kanser oluşumuna yol açmaktadırlar (Engin, 2001).

Hücreler, bu ara ürünleri uzaklaştıran ve DNA’yı normal yapısına dönüştüren DNA tamir mekanizmalarına sahiptir. DNA’nın tamir edilmesinde bireyler arasında kanser riskini etkileyecek farklılıklar vardır. Fakat tamir mekanizmaları her zaman verimli değildir. Bazı ara ürünler tamirden kaçır ve DNA’da kalırlar, DNA’da kalan bu ürünler yanlış kodlamaya neden olurlar. Bir onkogenin kritik bir bölgesinde mutasyon oluşursa onkogen aktif hale gelir. Çok sayıdaki bu tarz olaylar normal büyüme kontrolünü kaybetmiş hücrelerin oluşmasına ve sonuçta da kansere neden olurlar (Hecht, 2002). Örn; DNA’da deoksiganosin’in 06 pozisyonu NNK’nın (nitrozaminoketon) metabolik aktivasyonundan sonra metillendiğinde, oluşan DNA ürünü (06-metilguanin) DNA

polimeraz tarafından deoksiadenozin olarak yanlış okunur ve replikasyon boyunca timidin katılır. Sonuç ise; G-C baz çiftinin A-T baz çiftine kalıcı olarak dönüşümüdür.

2.1. Akciğer Kanseri Türleri

Akciğer kanserleri histolojik tiplerine göre sınıflandırılır. Tümör hücrelerinin ışık mikroskopu ile yapılan incelemelerde saptanan görünümüne dayanan bu sınıflandırma, özellikle uygun tedavi biçiminin seçimini yönlendirme açısından anlamlıdır. Akciğer kanserlerinin en sık görülen 4 tipi arasında adenokarsinoma, yassı epitel hücreli karsinoma, büyük hücreli karsinoma ve küçük hücreli karsinoma yer alır. Klinik tedavi ve takipte küçük hücreli karsinoma bir grup, bunun dışında kalan diğer küçük hücre dışı akciğer kanserleri de diğer bir grupta değerlendirilir (Sekido vd., 2004)

2.1.1. Akciğer Kanserinin Histolojik Tipleri

- 1) Yassı epitel hücreli (skuamöz) karsinoma
- 2) Adenokarsinoma
- 3) Küçük hücreli karsinoma
- 4) Küçük Hücre Dışı Akciğer Karsinoma (Büyük Hücreli Karsinoma)
- 5) Adenoskuamöz karsinoma
- 6) Pleomorfik, sarkomatöz yada sarkomatöz elementleri içeren karsinoma
- 7) Karsinoid tümörler
- 8) Tükrük bezi karsinomaları
- 9) Tanımlanmamış karsinomalar

2.1.1.1. Yassı Epitel Hücreli Karsinoma

Akciğer karsinomlarının en sık görülen tiplerinden biridir. Ülkemizde de, en sık görülen histolojik tiptir. Genellikle ana bronşlara yakın kısımlarda, bronş lümenine doğru

büyüyen, sert, ülserle bir nodül biçiminde ortaya çıkar. Yerleşimi akciğerin iç (mezkezi) kısımlarıdır. Lümeni tıkalıdır. Yavaş büyüme eğilimindedir. Yassı epitel hücreli karsinomaların iyi diferansiye olanlarında, keratinizasyon ve hücreler arasında tonofilamentler kolayca saptanabilmektedir.

Keratinize hücreler, parlak eozinofilik sitoplazmaları ile ayırdedilirler. Az diferansiye örneklerde yassı epitel hücreli karsinoma ile büyük hücreli karsinomanın ayrılması zordur. Bu tür örneklerde yassı epitel yönünde farklılaşmayı göstermek için elektronmikroskopi ve immünohistokimya gibi yöntemlere başvurulması gerekebilir. Bu kanser, çoğunlukla, yıllardır sigara içen kişilerde ortaya çıkar (Sekido vd., 2004).

2.1.1.2. Adenokarsinoma

Bronşiyal olarak adlandırılan tip, kadınlarda ve sigara içmeyenlerde daha sık görülür. Bu tür karsinomlar akciğerin periferal kısımlarında yerleşirler. Tümör, müsin üretebilen atipik epitel hücreleri ile dōşeli düzensiz glandüler yapılardan oluşur. Yassı epitel hücreli karsinomaya göre daha yavaş büyür. Genellikle yerleşimi akciğerin dış (periferik) kısımlarındadır. Sıklıkla lenf nodlarına ve uzak organlara yayılır (Sekido vd., 2004).

2.1.1.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Normal lenfositlerin yaklaşık iki katı büyüklükte hücrelerden oluşur. Hemen yalnızca çekirdekten oluşmuş gibi duran bu hücreler, kolayca zedelenebilir bir yapı gösterirler. Çekirdekçik genellikle belirsizdir. Elektron mikroskopla yapılan incelemelerde sitoplazmalarında nörosekretuar granüller saptanan bu hücrelerin bir başka morfolojik özelliği de, komşu hücrelerin birbirleri üzerinde iz bırakmasıdır.

2.1.1.4. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (Büyük Hücreli Karsinoma)

Diğer tiplere göre daha iri ve daha atipik çekirdekli hücrelerden oluşur. Tanımı gereği, bu tümörde keratinizasyona veya glandüler farklılaşmaya rastlanmaz. "Dev hücreli",

"iğsi hücreli" ve "berrak hücreli" tipleri tanımlanan bu tümör, adenokarsinomaların ve yassı epitel hücreli karsinomaların tanınamayacak ölçüde az farklılaşmış tiplerini içermektedir.

2.2. Detoksifikasyon Mekanizması

Ksenobiyotikler; in vivo olarak üretilmeyen fakat vücuda çevreden girebilen ve vücut tarafından metabolize edilebilen moleküllerdir. Ksenobiyotikler vücuda soluma (sigara dumanındaki aromatik hidrokarbonlar), damar yolu (çeşitli anestezipler), deri yolu ve ilaçlarla alınırlar (www.oxfordbiomed.com).

Ksenobiyotiklerin metabolizması 2 geniş kategoriye ayrılır. Bunlar faz I ve faz II transformasyonlardır. Faz I transformasyonlarında bir fonksiyonel grup oluşurken, faz II transformasyonlarında bu fonksiyonel gruplar spesifik enzimler aracılığı ile glukuronik asit, sülfat, asetat, glutatyon yada bazı aminoasitler ile konjugasyon yada metilasyon sonucu çeşitli polar metabolitlere dönüştürülürler ([www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au).)

2.2.1. Faz I Transformasyonları

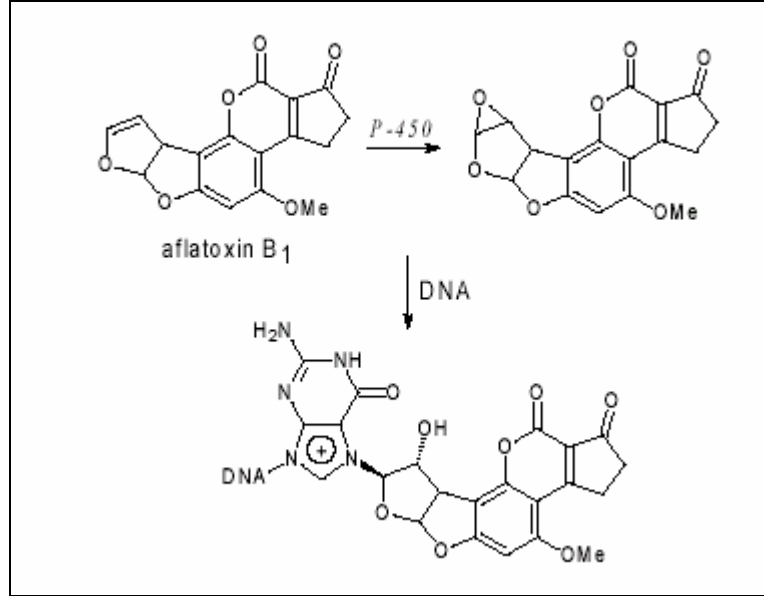
- 1) Oksidasyon
- 2) Redüksiyon
- 3) Hidroliz

Olmak üzere 3 gruba ayrılır.

Oksidasyon: Hem grubu içeren sitokrom P-450 enzimleri hidroksilasyon yada epoksidasyon yolu ile bir oksijen atomu getirir. Bu sistemde oksijen, NADP ve NADP–sitokrom P-450 redüktaz enzimi gereklidir. Oksijen atomlarından sadece bir tanesi ksenobiotiğe transfer edilirken diğeri de suya indirgenir. Çünkü bu sistem hem bir oksidant (O_2), hem de bir redüktant (NADPH) içerir.

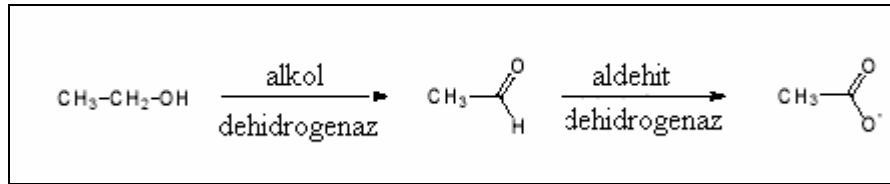
Potansiyel karsinojen olarak belirlenen bazı polisiklik aromatik bileşenlerin yapısı sitokrom P-450 tarafından oluşturulan epoksitlere benzemektedir. Bu epoksitler de

DNA'yı alkallendirerek kansere neden olurlar. Örn; Aflatoksin B₁, besinleri ve sigara dumanı ile kömürde bulunan benzo(a)pirini kontamine eden karsinojenik bir metabolittir (www.http://home.it.net.au.).



Şekil 2.1. Aflatoksinin Karsinojenik Mekanizması

Ksenobiyotiklerin oksidasyonunda rol alan diğer bir önemli enzim sınıfı flavin monooksijenazlar (FMOs)dır. Oksijen ve NADP'ye gereksinim duyarlar. Aminler ve tioller gibi nükleofilik grupların oksidasyonundan sorumludurlar. Alkollerin aldehitlere ve aldehitlerinde karboksilik asitlere olan oksidasyonu, alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenaz enzimleri tarafından yürütülür. Örn; Etil alkol metabolizması. Aldehit dehidrogenaz enzimi disülfiram tarafından inhibe edilir (www.http://home.it.net.au.).



Şekil 2.2. Etanol Metabolizması

Redüksiyon: Nitro ve azo bileşenlerin metabolizması için önemli bir reaksiyondur. Bu redüksiyonlar sitokrom P-450 ve NADPH-sitokrom P-450 redüktaz enzimleri tarafından NADPH kullanılarak katalizlenir, oksijen tarafından inhibe edilirler, bu yüzden de sadece anaerobik şartlarda meydana gelirler ([www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au)).

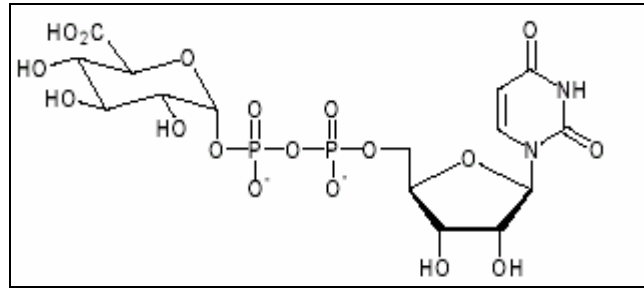
Hidroliz : Esterlerin ve amidlerin hidrolizi, karboksilik asitlerin, alkollerin ve aminlerin oluşumuna yol açar ([www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au)).

2.2.2. Faz II Transformasyonları

1. Glukuronidasyon (Glukuronik asitle konjugasyon)
2. Sülfat konjugasyonu
3. Metilasyon
4. Asetilasyon
5. Glutasyon konjugasyonu

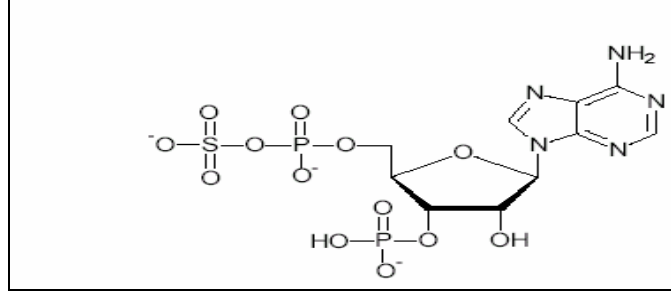
olmak üzere 5 gruba ayrılırlar.

Glukuronidasyon (Glukuronik Asitle Konjugasyon): Memelilerdeki en yaygın faz II transformasyonudur. Glukuronik grup; alkoller, karboksilik asitleri, aminleri, tioller ve aktif metil gruplarını da içeren bazı fonksiyonel gruplara dönüşebilir. Bu reaksiyonda; UDP-glukuronosiltransferaz ve üridin-5-difosfo- α -D-glukuronik asit (UDPGA) kullanılır ([www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au), To-Figueras vd., 2001).



Şekil 2.3. Üridin-5-difosfo- α -D-glukuronik Asit (UDPGA)

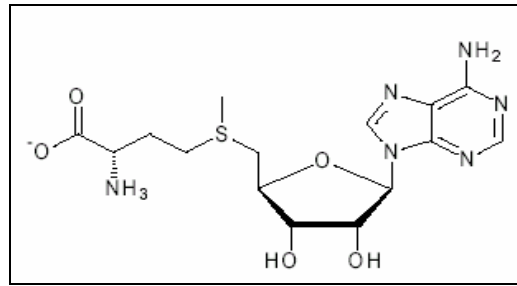
Sülfat Konjugasyonu : Alkoller ve aminler, sülfotransferaz ve sülfat grubunu sağlayan 3' fosfoadenozin-5'-fosfosülfat (PAPS) aracılığıyla sülfatlara ve sülfonamidlere dönüşürler ([www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au)).



Şekil 2.4. 3' fosfoadenozin-5'-fosfosülfat (PAPS)

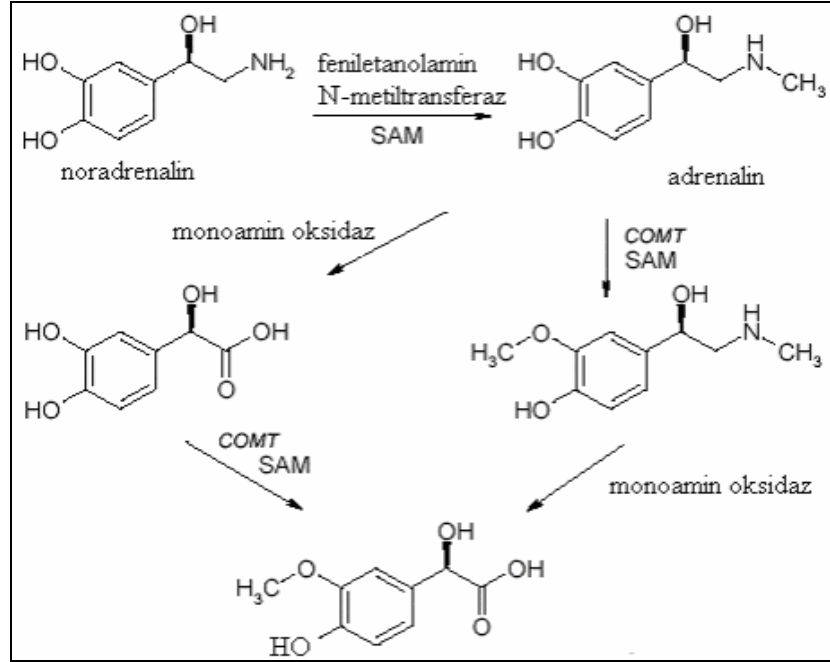
Asetilasyon : Alkoller ve aminler asetil transferaz etkisiyle asetil CoA ile asetillenirler. Bu transformasyonların oranları genetik farklılıklara bağlı olarak değişir. Örn; Mısır popülasyonu genellikle yavaş asetillenirlerken, doğu popülasyonu hızlı, USA popülasyonunun yarısı yavaş, yarısı da hızlı asetillenirler. Bu durum, metabolik döngüsü asetilasyon olan bazı ilaçlar için önemlidir ([www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au)).

Metilasyon : Endojen bileşenler için kullanılan daha az önemli bir faz II transformasyondur. Tioller, fenoller ve aminler, çeşitli metil transferaz enzimleri tarafından katalizlenen S-adenozil metionin (SAM) (Şekil.2.5) tarafından metillenirler ([www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au)).



Şekil 2.5. S-adenozil metionin (SAM)

Örnek olarak Adrenalinin SAM ve catechol 0-metil transferaz (COMT) tarafından metabolize edilmesi Şekil.2.6' da verilmiştir.

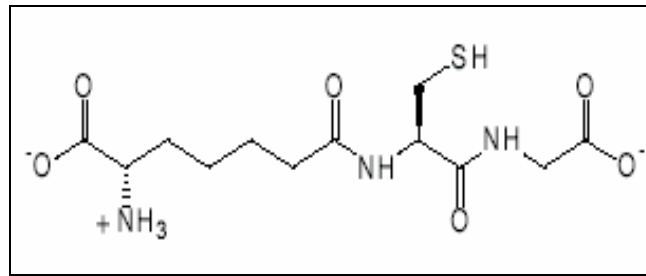


Şekil 2.6. Adrenalinin Metabolize Edilmesi

Glutasyon Konjugasyonu : Hem hayvanlarda hem de bitkilerde gözlenen en önemli faz II transformasyonlarındandır. Glutasyon ; tabiatta çok yaygın bir şekilde bulunan bu sülfürlü bileşik, 1921 yılında Hopkins tarafından keşfedilmiştir. 1935 yılında ise Harrington ve Mead tarafından δ -L-glutamil-L-sistein-glisin halinde sentez edilmiştir. Glutasyon, kısaca GSH şeklinde, redükte glutasyon olarak gösterilmektedir. Glutasyon her hücrede bulunmaktadır ve glutasyonun epoksitler, aril ve alkil halitler ile diğer elektrofilik bileşenler de dahil olmak üzere birçok substratla tepkimeye girerek hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruduğu kabul edilmektedir (Gözükara, 1989). Glutasyon S-transferaz enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar

detoksifikasyon mekanizmasında rol alarak hücrel makromolekülleri sitotoksik ve karsinojenik ajanların neden olduğu hasarlara karşı muhafaza ederler.

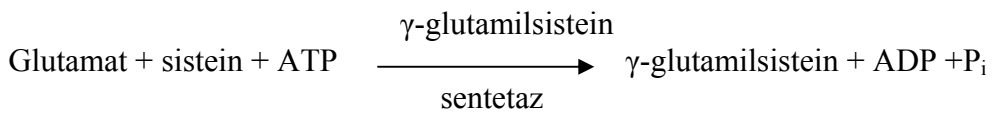
Glutatyonun bir homoloğu olan homoglutatyon (hGSH) ise bazı hayvan ve bitki türlerinde glutatyonun yerini alır. Homoglutatyonun glutatyondan farkı; son aminoasit artığının glisin yerine alanin olmasıdır. hGSH konjugasyonu, homoglutatyon S-transferaz enzimine bağlıdır (Zubay vd., 1995; Dewlin vd., 1997; To-Figueras vd., 2001).



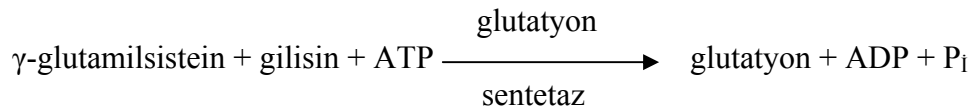
Şekil 2.7. Glutatyonun Yapısı

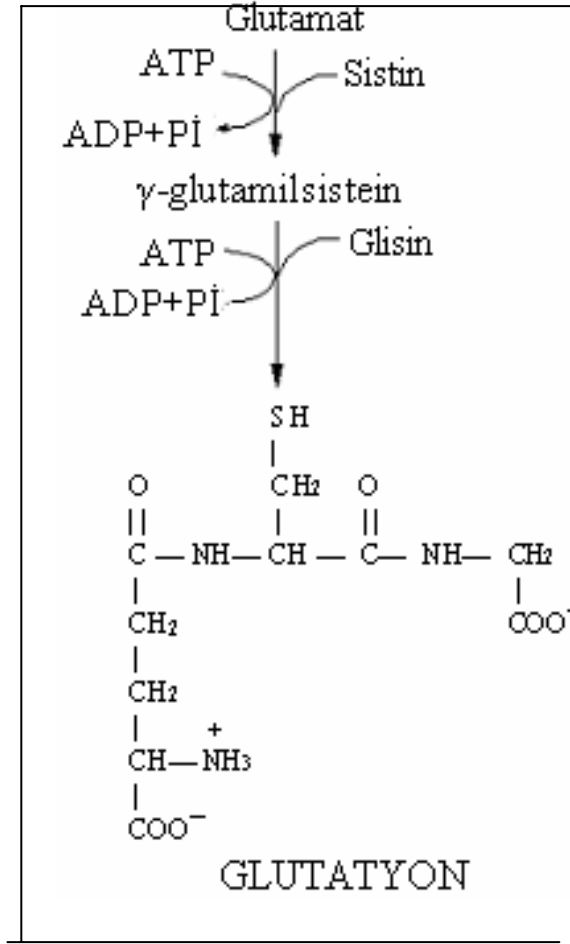
Glutatyon iki aşamada oluşur ve her aşama ATP gerektirir.

Birinci aşamada; Glutamat'ın karboksil grubu ile sisteinin α -amino grubu birleşir ve peptid bağı oluşur.



İkinci aşamada; dipeptidin karboksil grubu ile glisinin amino grubu arasında tekrar bir peptid bağı oluşur (Zubay vd., 1995, Dewlin vd., 1997).



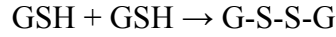


Şekil 2.8. Glutatyonun Oluşumu

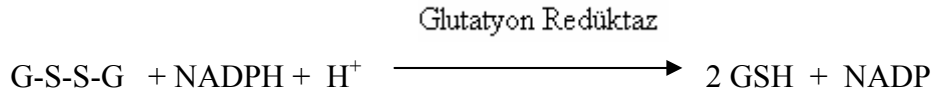
Glutatyon;

- ✓ Proteinlerin sülfidril gruplarını indirgenmiş formda tutar.
- ✓ Protein disülfid redüktaz enzimi, glutatyon ve proteinler arasındaki sülfidril disülfid değişimlerini katalizler.
- ✓ Hücre membranından aminoasit transportunu sağlar.
- ✓ Bazı enzimatik reaksiyonlar için kofaktördür.

- ✓ Glutatyonun sülfidril grubu, oksijen transportu sırasında oluşan peroksitlerin indirgenmesinde kullanılır.
- ✓ Glutatyon, peroksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonda toksik potansiyeli olan hidrojen peroksidin dekompozisyonuna katılır.
- ✓ Enzimlerin çok önemli grupları olan SH gruplarının redüklenmiş durumda kalmalarına yardım eden önemli bir intraselüler redüktördür. GSH redükleyici bir ajan olarak etkili olduğundan SH grubu okside olur ve glutatyonun diğer bir molekülü ile aşağıdaki formülde görüldüğü gibi bir disülfid köprüsü oluşturur.



- ✓ G-S-S-G gerektiğinde NADPH'ı kullanan bir reaksiyon ile glutatyon redüktaz tarafından aşağıdaki formülde görüldüğü gibi GSH'a redüklenebilir.



2.3. GST Enzimleri ve Genleri

Glutatyon S-transferaz enzimleri çok fonksiyonlu alt birimlerden oluşmuş (dimerik) ve büyük ölçüde sitozolik bir enzim ailesidir. Bu enzimlerin hem detoksifikasyon yapıcı hem de hücre içi molekülleri bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır.

GST gen ailesi, pek çok karsinojenik elektrofil detoksifiye etme kapasitesine sahip dimerik yapıdaki enzimleri kodlamaktadır. Sigara dumanında bulunan bir çok bileşenin yanı sıra polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu enzimlerin en önemli substratlarıdır.

Glutatyon S-transferaz enzimlerinin alt birimlerinin değişik xenobiyotikler (fenobarbital, transtilbenoksit, 3-metilkolantiren) ile uyarılabildiği, insan glutatyon S-transferazlarının en az 4 otozomal gen lokusu tarafından kodlandığı, farklı gen sınıflarının farklı kromozomlar üzerinde yerleştiği ve birçok organizmanın çok sayıda

glutasyon S-transferaz izoenzimini kodlayabilecek genetik kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Büyük ölçüde sitozolik olan ve değişik ksenobiyotikler tarafından uyarılabilen, hücre ve doku hasarı sürecinde plazmada metabolizması artabileceği düşünülen glutasyon S-transferaz aktivitesi ve izoenzimleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (Strange vd., 1998; 2001; Stewart vd., 2003; Choi vd., 2003).

Glutasyon S-transferaz (GST) genlerinin sınıflandırılması primer yapılarına, enzimatik özelliklerine, antikorlarla ilgili reaksiyonlarına, yapısal karakteristiklerine, kimyasal affinitelerine, aminoasit dizilerine ve enzimlerin kimyasal davranışlarına göre yapılmıştır. Buna göre GST genleri 8 sınıfa ayrılmaktadır: alpha (α), mu (μ), pi (Π), theta (θ), omega (Ω), kappa (κ), sigma (σ) ve zeta (ζ). Alpha 6. kromozomda; mu 1. kromozomda; pi 11. kromozomda; theta 22. kromozomda; omega 10. koromozomda; sigma 4. kromozomda ve zeta 14. kromozomda kodlanmaktadır (Strange vd., 1998; 2001; Choi vd., 2003; Tsai vd., 2003).

	GST							
	alpha	mu	theta	pi	zeta	sigma	kappa	omega
Kromozom	6p	1p	22q	11q	14q	4q	ND	10q
Genler	A1-A4	M1-M5	T1,T2	P1	Z1	S1	K1	O1
Alelik	evet	evet	evet	evet	evet	?	?	?

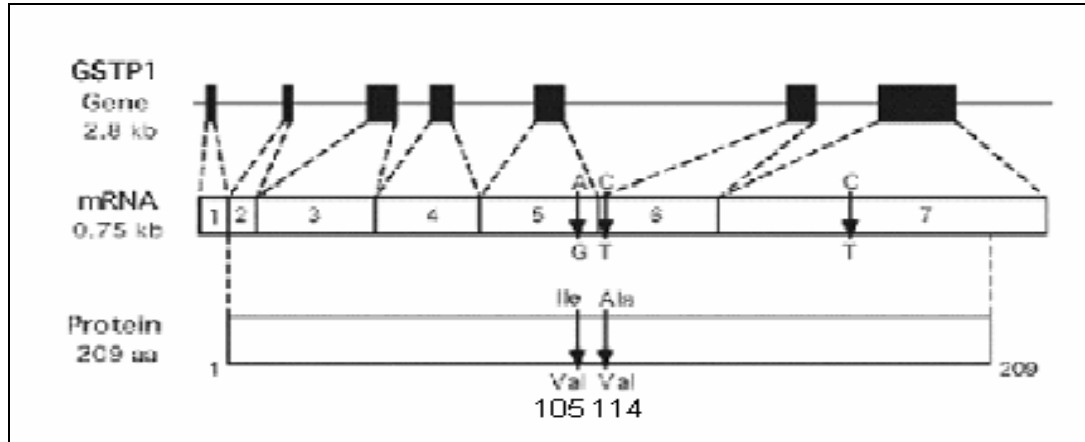
Şekil 2.9. GST Gen Ailesi

2.3.1. Glutasyon S-Transferaz Pi 1 Geni (GSTP1)

GSTP1, insanlarda farklı epitel dokularda eksprese edilen, fakat akciğer dokularında en yaygın görülen glutasyon S-transferaz enzimi genlerinden bir tanesidir. Polimorfik GSTP1 gen sınıfı üyeleri; kromozom 11q13 üzerinde, 2.8 kb uzunluğunda, 7 ekzon içeren bir sınıftır, bu genin 3 aleli [GSTP1*A (105 Ile/114 Ala), GSTP1*B (105 Val/114 Ala), GSTP1*C (105 Val/114 Val)] tanımlanmıştır. Open reading frame (okuma alanı)

bölgesi birinci ekzonun 3' ucundan başlar ve 630 bç uzunluğunda 209 aminoasitten oluşan protein sentezler. GSTP1 gen seviyesi normal dokularla kıyaslandığında hem özofagus, mide, göğüs, kolon, testis, prostat, deri, akciğer ve mesane tümörlerinde hem de akut miyeloid ve lenfoid lösemilerde yüksek miktarda bulunmuştur (Strange vd., 1998; To-Figueras vd., 2001; Reszka vd., 2001; Lewis vd., 2002; Duvoixa vd., 2003).

GSTP1, benzopirin de dahil olmak üzere sigara dumanındaki çoğu karsinojenlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Sigara dumanında bulunan aktif benzo(a)prin diol epoksite [benzo(a)prin -7 β , α -dihidrodiol-9 α ,10 α -epoksit (BPDE)] karşı yüksek düzeyde aktivite gösterirken, benzo(a)prin'in mutajenik formu olduğu düşünülen anti BPDE'nin (+)-enantiomerine karşı da aktif olduğu ve akciğer kanserinin oluşumunda etken olduğu gösterilmiştir (Stewart vd., 2003).



Şekil 2.10. GSTP1 gen yapısı

GSTP1'in yapısındaki, fonksiyonundaki veya ekspresyon seviyesindeki genetik polimorfizme uygun olan değişiklikler sonucunda oluşan düşük enzimatik aktivite, karsinojenlerin detoksifiye edilebilmelerinde ve akciğer kanseri başta olmak üzere belirli kanser tiplerinin gelişmesinde risk faktörü taşımaktadır. GSTP1'in ekzon 5 (Ile105Val) ve ekzon 6 (Ala114Val) genetik polimorfizmleri, glutatyon S-transferaz gen ürünü üzerinde redüklenmiş enzim aktivitesi ile sonuçlanan fonksiyonel bir etkiye sahiptir (Lewis vd., 2002; Duvoixa vd., 2003; Stewart vd., 2003).

cDNA dizisi üzerinde bulunan iki bölge değişkenlik gösterir ve bu bölgeler 313. nükleotitdeki (ekzon 5'un nokta mutasyonu) A→G transisyonu ve 341. nükleotitdeki (ekzon 6'nın nokta mutasyonu) C→T transisyonu ile karakterize edilir ve Ile/Val 105 ve Ala/Val 114 aminoasitlerinin elektrofilik "H" bölgelerinde kodon farklılaşması meydana getirir. Farklı GSTP1 alelleri tarafından kodlanan proteinler karsinojenlerin ve anti kanser ajanlarının metabolize edilmesinde ve bağlanmasında farklı özellikler gösterirler. Bu farklı GSTP1 genotiplerine sahip bireyler, karsinojenlerin ve mutagenik bileşenlerin azalan detoksifikasyonu sonucu akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türü için risk oluşturmaktadır. (Strange vd., 1998; To-Figueras vd., 2001; Reszka vd., 2001; Lewis vd., 2002; Duvoixa vd., 2003; Stewart vd., 2003).

GSTP1 geninin yaygın iki tipi, elektrofilik substratlara karşı farklı aktivite ve ilgi gösterirler. Valin tipinin, sigara dumanındaki 5-metilchrysene ve benzo phenanthrene'de dahil olmak üzere polisiklik aromatik hidrokarbon diol epoksitlere karşı düşük aktiviteye sahip olduğundan düşük detoksifikasyon potansiyeline sahip olduğu ve yüksek kanser riski taşıdığı gösterilmiştir. (Hernández vd., 2002; Duvoixa vd., 2003).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Sarf Maddeler

- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS %10) (Sigma L-4340)
- Amonyum Asetat (10 mM Sigma A-8920)
- Etanol (%95) (Merck-986)
- İzopropanol (%99.5) (Riedel_deHaen)
- Agaroz (Prona)
- Etidyum Bromür (Sigma E-7637)
- DNA Markır (100-1500 bç) (Biogen)
- Fenol (Sigma P-4557)
- Kloroform (Sigma)
- Syber[®] Green I (BMA)
- *AciI* ve NE Tampon3 (Biolabs)
- Fikol (Sigma)
- Bromofenolmavisi (%0.25 J.T.Baker)
- Proteinaz K (20 mg/mL Biobasic)

3.2. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları

- 10XTBE;
 - 108 gr TrisBase
 - 9,3 gr EDTA,
 - 55 gr Borik Asit tartılıp, saf dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

- Lizis Tamponu pH=8,2;
10 mM Tris-HCl,
400 mM NaCl,
2 mM EDTA içermektedir.
10 mM Tris-HCl için 250 mM Tris-HCl'den 4 ml,
400 mM NaCl için 1 M NaCl'den 40 ml,
2 mM EDTA için 1 M EDTA'dan 200 µl alınarak son hacim 100 ml'ye tamamlanır. pH=8,2'ye ayarlanır.
- TE; pH=7,5;
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA içermektedir.
10 mM Tris-HCl için 250 mM Tris-HCl'den 4 ml,
1mM EDTA için 1 M EDTA'dan 100 µl alınarak son hacim 100 ml'ye tamamlanır. pH=7,5'a ayarlanır.
- Jel Yükleme Tamponu ;
%25 Fikol
%0.25 Bromofenol Mavisi
%8 sükröz içermektedir.
2.5 gr Fikol,
0.025 gr bromofenol Mavisi,
0.8 gr sükröz alınarak 100 mL saf su eklenerek hazırlandı.

3.3. Kullanılan Kitler

PZR Kiti:

- PZR Reaksiyon Tamponu (Takara)
- dNTP Karışımı (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) (Takara)
- MgCl₂ (Takara)

- GSTP1 Forward primeri (Biogen)
- GSTP1 Reverse primeri (Biogen)
- Taq Polimeraz (Takara Taq)

gDNA İzolasyon Kiti: (Fermentas)

- Lizis Solüsyonu
- 10X Presipitasyon Solüsyonu
80 µl 10X Presipitasyon solüsyonuna 720 µl dH₂O eklenerek hazırlanır.
- NaCl (1.2 M)

Jelden PZR Ürün Saflaştırma Kiti: (Biobasic)

- Stabilizasyon Tamponu (Buffer QG)
- Yıkama Tamponu (Buffer PE)
- Elüsyon Tamponu (Buffer EB)

3.4. Kullanılan Cihazlar

- Elektroforez tankı (Biolab Minicell[®] Primo EC320 Electrophoretic Gel System)
- Güç kaynağı (Bio-Rad Power PAC 300)
- Jel görüntüleme Sistemi (Biolab UV Tech, Heidolp Potamax 120 Instruments)
- UV Kutusu (BioRad UV Transilluminator 2000)
- Derin Dondurucu - 20° (Arçelik)
- Santrifüj (Hettich Universal 32)
- Mini santrifüj (Minispinplus Eppendorf)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Buzdolabı (Beko)
- Termocycler (Techne Genius)
- Çalkalamalı İnkübatör (GallenKamp, 240v models)
- Hassas terazi

3.5. Hasta Kanlarının Toplanması

Bu çalışmada kullanılan hasta grubu Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Zehra Ulusoy Onkoloji Hastanesince klinik ve laboratuvar bulguları ile “akciğer kanseri” tanısı konulmuş ve burada tedavilerini sürdüren hastalardan oluşmaktadır. Tüm hastalar Isparta ve çevresinde doğup yaşamış olup aralarında herhangi bir akrabalık yoktur. Her iki cinsiyetten, yaşları 43 ile 80 arasında değişen 30 hastadan alınan 5-10 ml’lik kan örnekleri EDTA’lı tüplerde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de saklanmıştır.

Kontrol grubu ise kan bağıışı için S.D.Ü. Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Merkezine gelen ve her iki cinsiyetten donör olabilecek kadar sağlıklı, hiç sigara içmemiş, yaşları 40-80 arasında değişen her iki cinsiyetten 30 kişiden oluşmaktadır. Kontrol kan örnekleri de hasta grubundaki gibi alınarak muhafaza edilmiştir.

3.6. Yüksek Tuz Konsantrasyonu Metodu İle gDNA İzolasyonu

Hastalardan ve kontrollerden elde edilen kan örneklerinden gDNA eldesi yüksek tuz konsantrasyonu yöntemi kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1.gün:

- 1) Buz üzerinde çözdürülen kan örneklerinden 2 ml’si santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 8 mL soğuk steril su konuldu.
- 2) Tüp 2-3 dakika ters-yüz edilerek çalkalandı.
- 3) Oda ısısında 3000 rpm’de 15 dakika santrifüjlendi.
- 4) Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 5 mL soğuk steril su konup hızla çalkalandı.
- 5) Oda ısısında 3000 rpm’de 15 dakika santrifüjlendi.
- 6) Süpernatant atılıp 600 μL Lizis Tamponu, 30 μL proteinaz K, 40 μL SDS eklenip vortekslendi.
- 7) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de etüvde 1 gece bekletildi.

2.gün:

- 1) Cam tüplerin üzerine 600 µL amonyum asetat solüsyonu eklenip çalkalandı ve oda ısısında yaklaşık 10-15 dakika bekletildi.
- 2) 4000 rpm'de 1 saat santrifüjlendi.
- 3) Süpernatant başka bir steril cam tüpe alındı ve üzerine tüpteki miktarın 2 misli soğuk etanol eklendi. gDNA oluşumu gözlemlendi.
- 4) Cam tüpler steril ependorf tüplere aktarıldı. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek gDNA çöktürüldü.
- 5) Örnekler oda sıcaklığında yaklaşık olarak 1 saat kurumaya bırakıldı.
- 6) Örnekler 200 µL TE eklenerek gDNA çözdürüldü ve etiketlenerek -20°C'ye kaldırıldı.

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Gelidium ya da Gracilaria denen kırmızı algden elde edilmiş olan agaroz; polisakkarit bir madde olan agarın yüksek oranda saflaştırılmış bir polimer formudur. Elektroforez ise, yüklü bir partikülün (boya, küçük iyonlar, biyomakromoleküller vb.) elektriksel alanda hareketidir.

Birçok biyolojik makromolekül belirli bir yüke sahiptir ve bu özelliklerinden dolayı elektroforez yöntemi ile ayrılabilirler. DNA molekülü; yapısındaki fosfat gruplarından dolayı (-) yüklüdür ve elektriksel bir alanda agaroz jelde yürütüldüğünde büyüklüğünün logaritması ile ters orantılı olarak pozitif elektroda doğru ilerler.

Çalışmamızda da, izolasyon işlemi sonrasında gDNA'ların varlığını ortaya koymak üzere her örnekten bir miktar (10 µL) alınarak %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra incelendi.

Bunun için 0.25 gr. agaroz tartılıp 25 mL 1xTBE içerisinde çözülerek kaynatıldı. Biraz soğuması için beklendi. Bu sırada jel dökme tablasının kenarları otoklav bandı ile bantlandı. Oda sıcaklığına kadar soğutulan jel yavaşça bir kenarından tablaya döküldü. Tarak düzgün bir şekilde jel tablasının içine yerleştirildi. Jel oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Katılaşan jel içerisinden tarak çıkarıldı. Jel, içerisine 250 mL 10xTBE tampon konulmuş elektroforez tankının içerisine yerleştirildi. 10 µL gDNA örnekleri üzerine 3 µL jel yükleme solüsyonu eklendi ve örnekler jel kuyularına dolduruldu. Elektroforez işlemi 100 V'da bir saat boyunca uygulandı. Bu süre sonunda, DNA örneklerini görünür hale getirmek için nükleotitlere bağlanan floresan özellikteki Etidyum Bromür solüsyonunda jel yaklaşık olarak 10 dakika bekletildi ve DNA bantları jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Yüksek Tuz Konsantrasyonu yöntemi ile izole edilerek jelde görüntülenen ancak PZR işleminde olumsuz sonuç alınan bir kısım gDNA örnekleri ise fenol-kloroform ekstraksiyonu işlemine tabi tutuldu. Bu yöntem, DNA örneğini protein, lipid gibi kontaminasyon etkenlerinden saflaştırmak için kullanılır. Ekstraksiyon sonucunda gDNA örneğinin bir miktar kaybedilmesi riskine karşılık, bir sonraki işleme geçmeden önceki adımda kullanılan enzimleri inaktive etmek ve uzaklaştırmak amacıyla moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan, uygulanması kolay, hızlı ve yaygın bir tekniktir.

3.8. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu

1. 200 µL'lik gDNA örneklerine 300 µL TE eklenerek ekstraksiyon hacmi artırıldı.
2. Tüplere 300 µL fenol eklenip yüksek hızda vortekslendi.
3. 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek fenol çöktürüldü. gDNA içeren üst faz temiz tüpe aktarıldı.
4. 200 µL fenol ve 200 µL kloroform eklenerek tüpler yüksek hızda vortekslendi.
5. 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz temiz tüpe aktarıldı.
6. Örneklere 300 µL kloroform eklenip vortekslendi. 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Pipetleme yapılarak kloroform uzaklaştırıldı.

7. 1000 µL etanol eklendikten sonra örnekler -20°C’de gece boyunca bekletildi.
8. Bu süre sonunda örnekler 12.000 rpm’de 15-20 dakika santrifüjlendi.
9. Etanol dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra DNA peleti yaklaşık 30 dakika kurumaya bırakıldı.
10. Örnekler 30-100 µL TE’de çözündürüldü ve -20°C’de saklandı.

Fenol/kloroform ekstraksiyonu sonucunda da PZR’de olumsuz sonuç alınan bazı örneklerde ise Fermentas gDNA Purifikasyon Kiti ile kandan yeniden gDNA elde edildi.

3.9. Fermentas gDNA Purifikasyon Kiti ile gDNA İzolasyonu

1. 500 µL kan epondorf tüpüne kondu.
2. Üzerine 1000 µL soğuk steril su eklendi ve altüst edilerek karıştırıldıktan sonra 5000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi.
3. Su ile yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı ve örnekler 5000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenip süpernatant döküldü.
4. 200 µL TE ile pellet iyice pipetlenerek dağıtıldıktan sonra. 400 µL lizis tamponu eklenip altüst edildi.
5. Örnekler 65 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra 600 µL kloroform eklenip altüst edildi.
6. 10.000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenerek kloroform çöktürüldü.
7. Üst fazda kalan DNA yeni bir tüpe alınarak üzerine 800 µL presipitasyon solüsyonu eklendi ve altüst edildikten sonra örnekler 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi.
8. Süpernatant döküldü ve pellet 100 µl NaCl’de çözüldükten sonra 300 µl soğuk etanol eklenerek hafif hafif karıştırıldı ve örnekler gece boyunca – 20 °C’de bekletildi.
9. 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj sonrasında üstteki etanol dökülerek uzaklaştırıldı.
10. Örnekler %70’lik etanolle yıkandı ve 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendikten sonra etanol döküldü ve pelet kurumaya bırakıldı.
11. gDNA peletine 30-100 µL dH₂O eklenip vortekslendi. 55-60°C’de su banyosunda bekletilip çözündürüldü ve etiketlenerek -20°C’ye kaldırıldı.

3.10. PZR ile GSTP1 Ekzon 6 Bölgesinin Amplifikasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, bir DNA molekülünde yer alan gen bölgesinin uygun oligonükleotit primerler kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Bu çalışmada PZR yöntemi ile örneklerde yaklaşık 420 bç'lik GSTP1 geni ekzon 6 bölgesi Forward (E6F: 5' GGG AGC AAG CAG AGG AGA AT 3') ve Reverse (E6R: 5' CAG GTT GTA GTC AGC GAA GGA G 3') olmak üzere 2 adet primer kullanılarak Çizelge 1 ve 2'de belirtilen koşullarda ve thermal cycler cihazı kullanılarak çoğaltılmıştır.

Çizelge 1. PZR bileşenleri

Taq polimeraz	0.3 µL
Genomik DNA	5 µL
dNTP Karışımı (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	4 µL
Tampon	6 µL
MgCl ₂	3 µL
E6 Forward primeri	7.5 µL
E6 Reverse primeri	7.5 µL
Steril saf su	16.7 µL
Toplam Hacim	50 µL

Çizelge 2. PZR Koşulları

Denatürasyon; 94 °C’de 6 dakika,	1 Döngü
Taq polimeraz ilavesi; 85 °C’de 2 dakika,	
Primer Bağlanması; 60 °C’de 30 saniye,	
Polimerizasyon; 72 °C’de 2 dakika,	
95 °C’de 1 dakika	30 Döngü
60 °C’de 45 saniye	
72 °C’de 45 saniye	
72 °C’de 5 dakika	1 Döngü

3.11. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi

PZR işlemi sonunda oluşması beklenen 420 bp büyüklüğündeki DNA ürünü her bir örnek için PZR ürünlerinin bir kısmı kullanılarak agaroz jel elektrofrezinde incelenmiştir.

Bu amaçla, 6 µL ürün içine 2 µL jel yükleme solüsyonu eklendikten sonra örnekler ve ayrıca 12 µL DNA markırı (100-1500 kbç’lik) %1’lik agaroz jele yüklendi. Bir saat süreyle 100 V’luk akımda elektrofrezeye tabi tutulan jel, DNA örneklerinin gözlemlenebilmesi için Etidyum Bromür ile boyandı ve DNA bantları jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.12. PZR Ürünlerinin Jelden İzolasyonu

Agaroz jel elektroforezinde 420 bç'lik DNA'nın elde edildiği örnekler için PZR ürünlerinin kalan kısmı için yine %1'lik fakat geniş kuyulu agaroz jel hazırlandı ve PZR ürününün tümü içine 5 µL jel yükleme solüsyonu eklenerek jele yüklendi. Elektroforez 100 V'luk akım şiddetinde 1 saat boyunca uygulandı. Etidyum Bromür muamesinden sonra DNA örneklerinin görüntüsü jel görüntüleme sisteminde kaydedildi. Daha sonra , her bir örneğe ait 420 bç büyüklüğündeki DNA bantı UV kutusu üzerine yerleştirilen jelden bir jilet yardımıyla kesilerek alındı. Örnekler mikrotüplere konularak bir sonraki işleme kadar -20 °C'de saklandı.

3.13. QIAGEN Jel Ekstraksiyon Kit Protokolü

Jele gömülü olarak saklanan DNA'ların jelden izole edilmesi işlemi QIAGEN Gel Ekstraksiyon Kiti ile aşağıda verilen şekilde gerçekleştirildi (Bu protokolle 70 bç-10 kbç arasındaki DNA molekülünün saflaştırılması mümkündür):

- 1) Temiz ve keskin bir bisturi ile DNA parçası agaroz jelden kesilip çıkarıldı.
- 2) Jel parçası tartıldı. 1 hacim jel için (100mg~100µL) 3 hacim QG tamponu eklendi.
- 3) 10 dakika 50°C'de inkübe edilerek ve 2-3 dakika aralıklarla vortekslenerek jelin tamamen çözülmesi sağlandı.
- 4) Jel çözüldükten sonra karışımın renginin sarı olmasına dikkat edildi (renkte değişiklik gözlenirse pH değişmiştir ve pH=7,5 ayarlanmalıdır).
- 5) Örneğe 1 hacim izopropanol eklendi ve karıştırıldı.
- 6) Örnek QIAQuick kolonuna aktarıldıktan sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA'nın kolona bağlanması sağlandı ve çöken sıvı döküldü ve işlem tekrarlandı.
- 7) Yıkamak için kolona 750 µL PE tamponu eklendi ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra kolon tamponun tamamen uzaklaştırılması için 13.000 rpm'de 1 dakika daha santrifüjlendi.
- 8) 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılan kolon üzerine tam merkeze gelecek şekilde 30 µL EB tamponu ilave edildi. Kolon 3 dakika bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 1

dakika santrifüjlenerek DNA'nın kolondan santrifüj tüpüne alınması sağlandı ve örnekler kullanılabildiği kadar -20°C 'de saklandı.

3.14. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

Moleküler biyolojik çalışmalarda çok farklı amaçlar için kullanılan restriksiyon enzimleri, DNA'da meydana gelen bir nokta mutasyonu herhangi bir gendeki restriksiyon enzimi kesim dizisini ortadan kaldırdığında ya da oluşturduğunda mutasyon taramalarında da kullanılmaktadır ki bu metot RFLP olarak adlandırılmaktadır.

Çalışmamızda da RFLP metodu kullanılarak, 420 bç.lik GSTP1 örnekleri *Acil* restriksiyon enzimi ile muamele edilmek suretiyle daha önceki çalışmalarda ortaya konmuş olan ekson 6 polimorfik bölgesinde 341. pozisyondaki C→T mutasyonu bakımından araştırılmıştır.

Bu amaçla, saflandırılmış PZR ürünlerinin *Acil* enzimi ile kesim reaksiyonu Çizelge 3'de belirtilen şekilde hazırlandı ve örnekler gece boyunca 37°C 'de inkübe edildi.

Çizelge 3. Kesim reaksiyon karışımı

Tampon	4.4 μL
DNA	11 μL
<i>Acil</i>	3 μL
H ₂ O	25.6 μL
Toplam	44 μL

Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve DNA segmentlerinin gözlemlenmesi için Nusieve adı verilen küçük boyutlu DNA segmentlerinin tespit edilebildiği özel bir agaroz jeli kullanıldı.

Kesim reaksiyonu örnekleri üzerine 4 µL floresan Syber Green I (1:100 oranında dilue edilmiş) ve 2 µL jel yükleme solüsyonu eklenerek %3'lük Nusieve jele yüklendi. Elektroforez işlemi 100 V'da bir saat boyunca uygulandı ve DNA bantlarının profili jel görüntüleme sisteminde tespit edildi.

3.15. İstatistiksel Analizler

Deneysel çalışmalar sonunda elde edilen bulgular istatistiksel açıdan SPSS (Statistical Packages of Social Sciences for Windows 10.0) paket bilgisayar programı kullanılarak Fisher'in ki-kare testi ile değerlendirildi.

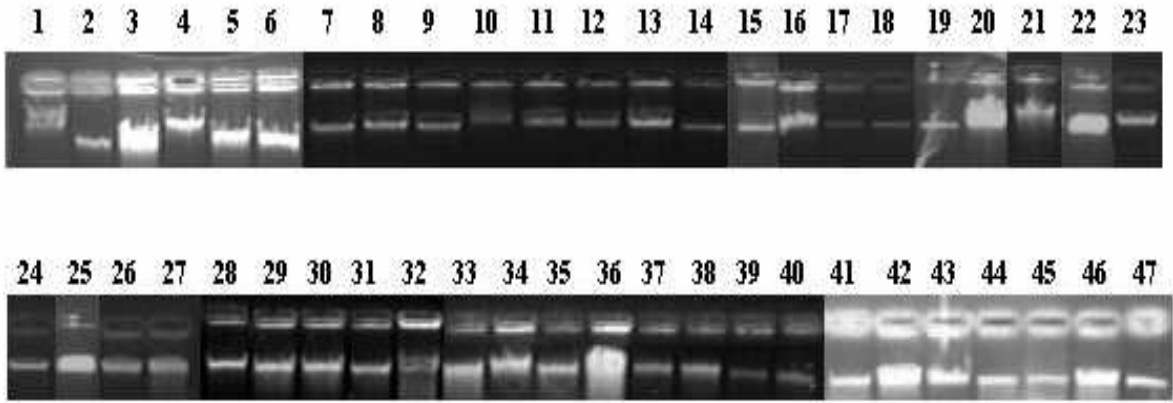
Ki-kare testleri, sayımla elde edilen nitel değişkenlerin çeşitli sınıflandırma biçimlerine göre (tek değişkenli, iki değişkenli gibi) analizini yapmak, nicel değişkenlerin alışılmış kuralların dışında bazı bilimsel amaçları gerçeklemek için özgün sınıflama biçimlerini ve frekans dağılımını ele alarak dağılım biçimine yönelik analiz etmekte kullanılır (Özdamar K., 2001).

İstatistiki analizler yapılırken kalitatif veriler ortalama, \pm standart sapma ve kantitatif değerler ise % olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 30 akciğer kanseri hastası ve 30 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 60 kişinin GSTP1 geni ekzon 6 polimorfizmi bakımından değerlendirildi.

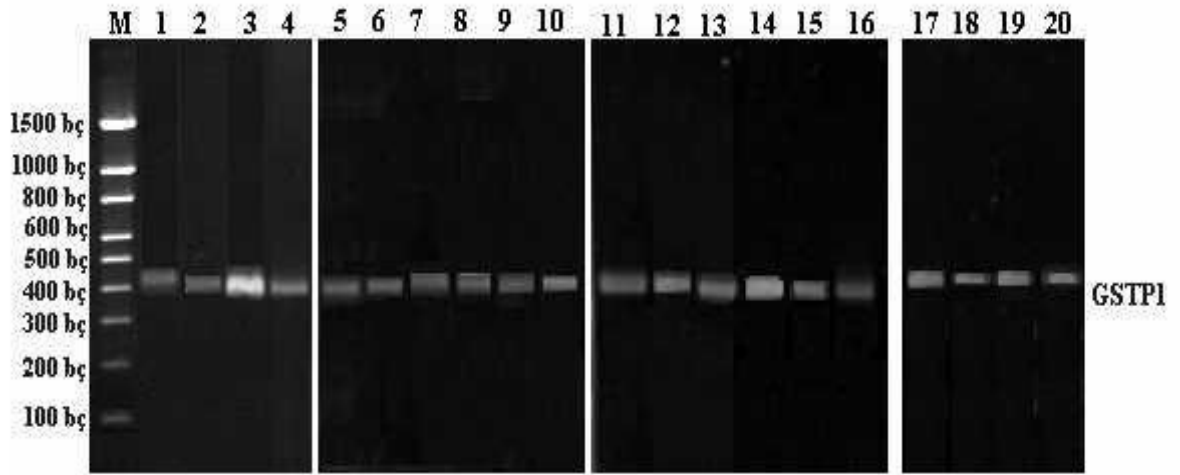
Bu amaçla ilk olarak, hasta ve sağlıklı kontrol bireylerden alınan kan örneklerinden genomik DNA (gDNA) Materyal ve Metotlar'da izah edildiği şekilde izole edilmiş, bir miktar gDNA örneği %1'lik agaroz jelde yürütülüp incelenmiş ve örneklerin kalanı kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Hasta ve kontrol örneklerinden bir kısmına ait gDNA'ların agaroz jel elektroforezi analizleri Şekil 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.11. gDNA örneklerinin jel görüntüsü

Genomik DNA varlığının tespiti yanı sıra, miktarı hakkında da bilgi veren elektroforez sonuçları örnekten örneğe DNA oranlarının değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Buna bağlı olarak, PZR deneyleri sırasında kullanılacak kalıp DNA miktarının ayarlanmasında her örneğin gDNA bant yoğunluğu dikkate alınmış ve gerektiğinde seyreltme yapılmıştır.

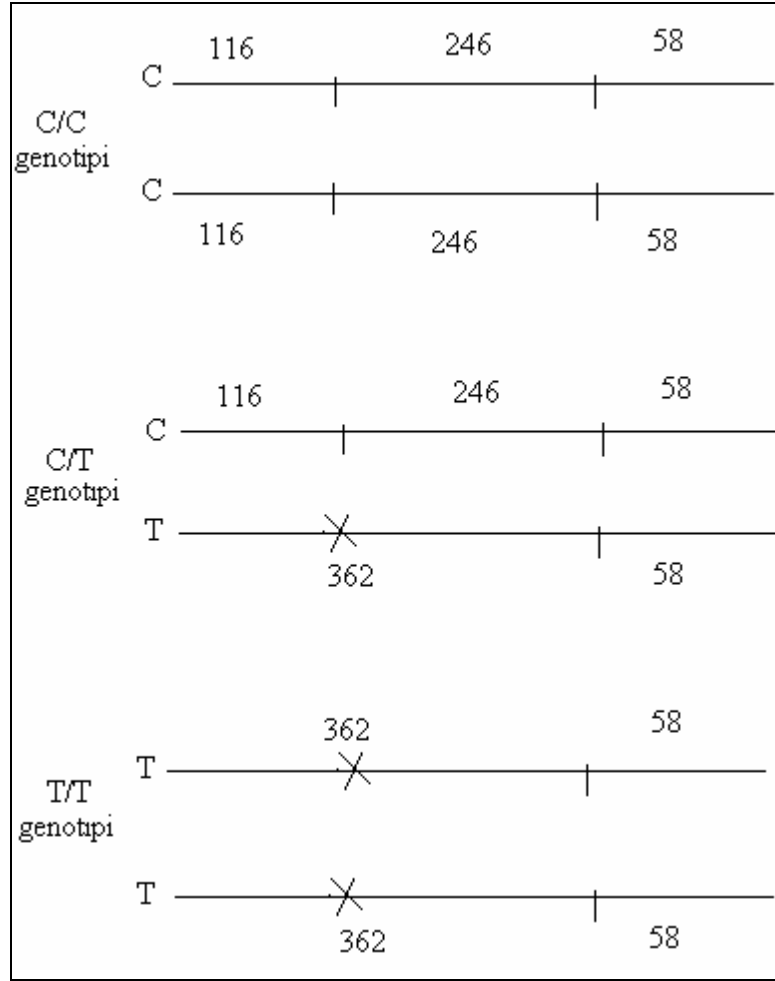
Daha sonraki aşamada, hasta ve kontrollerin gDNA örneklerinde GSTP1 geninin 420 bç.lik polimorfik ekzon 6 bölgesi PZR yöntemi kullanılarak çoğaltılmış ve PZR ürünlerinin bir kısmı Materyal ve Metodlar kısmında belirtildiği gibi %1'lik agaroz jelde yürütülüp incelenmiştir (Şekil. 2.12).



Şekil 2.12. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi
(M; DNA Marker, 1-20; hasta ve kontrollere ait 420 bç'lik DNA'lar)

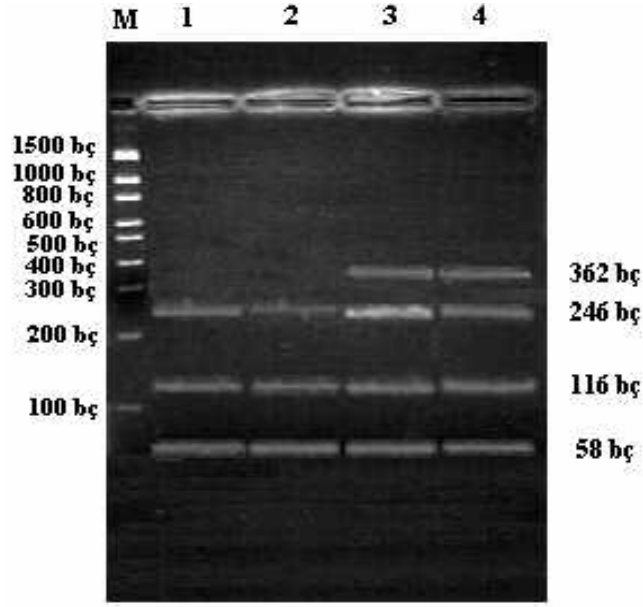
Çalışmamızda son aşama olarak, 420 bç'lik PZR ürünleri jelden ekstrakte edilerek saflaştırıldıktan sonra *Acil* enzimi ile kesilmiş ve örnekler Nusieve agaroz jelde yürütülmüştür.

RFLP analizinde Şekil 2.13'te görüldüğü şekilde, yabani tip (wild type) allel taşıyan bireylerde (C/C); 58, 116, 246 bç'lik 3 adet DNA bantı elde edilirken, heterozigot karakterli bireylerde (C/T); 58, 116, 246, 362 bç'lik 4 adet ve mutant karakterli bireylerde (T/T); 58 ve 362 bç'lik 2 adet DNA bantı elde edilmesi beklenmektedir.



Şekil.2.13. RFLP yönteminde yabani tip, heterozigot ve mutant bireylerde beklenen DNA profillerinin şematik gösterilmesi (*Acil* enzimi kesim bölgeleri düz çizgi, mutasyon sebebiyle kesilemeyen bölgeler ise çarpı işaretiyle belirtilmiştir)

Şekil 2.14'te RFLP analizi sonucunda elde edilen tipik DNA profillerinin gözlendiği örneklere ait bir jel görülmektedir. Çalışmamız kapsamında analizi gerçekleştirilen hastalardan 26 tanesinin C/C genotipli ve 4 tanesinin ise C/T genotipli olduğu saptanırken, kontrollerden 27'sinin C/C genotipi ve 3'nün de C/T genotipi taşıdığı belirlenmiştir. Öte yandan T/T genotipli bir bireye rastlanmamıştır.



Şekil.2.14. GSTP1 ekzon 6 allel analizi (M: DNA Marker, 1 ve 2: C/C genotipli, 3 ve 4: C/T genotipli örnekler)

GSTP1 geni ekzon 6 polimorfizmi 30 hasta ve 30 kontrol birey olmak üzere toplam 60 kişide araştırılmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda hastaların %13,3'ü C/T genotipi ve %86,7'i C/C genotipi taşıırken, kontrol bireylerin ise %10'unun C/T ve %90'mın da C/C genotipine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4: Hasta ve Kontrollerde GSTP1 ekzon 6 Genotip Frekansı

GRUP	GSTP1 (C/C)		GSTP1 (C/T)		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
Kontrol	27	90	3	10	30
Hasta	26	86,7	4	13,3	30
TOPLAM	53	88,3	7	11,7	60

Fisher'in Kesin Ki-Kare Testi: 0,162, P:1,000 (OR:0,722, %95 CI 0,147-355)

Çizelge 5 de görüleceği gibi hastaların % 50'si (n=15) küçük hücreli akciğer kanseri ve % 50'si (n=15) küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir. Ancak, ne küçük hücreli (KHAK), ne de küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) GSTP1 ekzon 6 polimorfizmi ile bir ilişkisinin bulunmadığı gözlenmiştir (P: 0,598).

Ayrıca hasta bireyler, GSTP1 genine ait C/C ve C/T genotipleri ve cinsiyet açısından incelendiğinde hastaların cinsiyeti ile genotipler arasında bir ilişki bulunamamıştır (P: 0,557) (Çizelge 5).

Çizelge 5: Hastalarda GSTP1 Ekzon 6 Genotip Frekansı ile Cinsiyet ve Akciğer Kanseri Tipinin İlişkisi

Özellik		GSTP1 (C/C)		GSTP1 (C/T)		Toplam		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet	Erkek	20	76,9	4	100	24	80	0,557
	Kadın	6	23,1	-	-	6	20	
Akciğer kanseri tipi	KHAC	14	93,3	1	6,7	15	100,0	0,598
	NKHAC	12	80	3	20	15	100,0	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Memeli dokularında yaygın olarak ifade edilen Glutatyon S-transferaz'lar (GSTs), bir çok dokuda geniş dağılıma sahip, çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özgülüğü olan dimerik yapıdaki özel bir enzim ailesi olup, hücrelerde glutatyon aracılı detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleyerek hücreleri sitotoksik ve karsinojenik ajanların sebep olduğu hasarlardan korurlar. Sigara dumanında bulunan bir çok bileşenin yanı sıra polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu enzimlerin en önemli substratlarıdır.

GST'ler detoksifikasyon görevini, indirgenmiş glutatyon'un -SH grubu ile çok çeşitli elektrofilik moleküllerin konjugasyonunu katalize ederek gerçekleştirir. Oluşan ürün suda çözünen merkaptürik asittir ve vücuttan idrar ile atılır. Bu nedenle, GST enzimlerinin düşük oranda üretilmesi veya yokluğuna bağlı olarak detoksifikasyon reaksiyonlarının gerçekleşmemesinin kanser hassasiyetinde büyük oranda artışa neden olduğu belirtilmektedir. (Sılığ vd., 2000; Wang 2003).

GSTP1 ise akciğer dokularında en yaygın görülen GST enzimi olup çoğu karsinojenin detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak, GSTP1 geninin de akciğer ve kanser dokularında yüksek oranda ifade edildiği rapor edilmektedir (Hayes vd., 1995).

GSTP1 geni ile ilgili olarak, cDNA dizisi üzerinde bulunan iki bölgenin değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Bu bölgeler 313. nükleotitdeki (ekzon 5'in nokta mutasyonu) A→G transisyonu ve 341. nükleotitdeki (ekzon 6'nın nokta mutasyonu) C→T transisyonu ile karakterizedir. Söz konusu baz değişimleri, GSTP1 enziminde Ile105Val ve Ala114Val değişimine sebep olmaktadır ki bu mutasyonlar proteinin elektrofilik "H" bölgesi adı verilen katalitik aktivite gösteren kısmında yer almaktadır.

GSTP1 enzimini kodlayan genin 3 alleli [GSTP1*A (105 Ile/114 Ala), GSTP1*B (105 Val/114 Ala), GSTP1*C (105 Val/114 Val)] tanımlanmıştır.

Çeşitli çalışmalarda, farklı GSTP1 alelleri tarafından kodlanan proteinlerin karsinojenlerin ve antikanser ajanlarının metabolize edilmesinde farklılıklar gösterdiği ve farklı GSTP1 genotiplerine sahip bireylerin, karsinojenlerin ve mutagenik bileşenlerin azalan detoksifikasyonu sonucu akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün gelişimi riski taşıdığı bildirilmektedir. (Strange vd., 1998; To-Figueras vd., 2001; Reszka vd., 2001; Lewis vd., 2002; Duvoixa vd., 2003; Stewart vd., 2003).

Wang ve arkadaşları çalışmalarında ekzon 5 polimorfizminin akciğer kanseri ile ilişkisi olmadığını fakat ekzon 6 polimorfizminin sigara içen genç erkek bireylerde akciğer kanseri ile bağlantılı olduğunu tespit etmiş ve ekzon 6 polimorfizmine sahip bireylerin PAH (polisiklik aromatik hidrokarbonlar) gibi potansiyel karsinojenlere ve epoksitlere karşı 7 kat daha duyarlı olduğunu bildirmiştir (2003).

Ayrıca, GSTP1 geninin ekzon 5 (Ile105Val) ve ekzon 6 (Ala114Val) polimorfizmlerinin GST aktivitesinde bireysel değişikliklere neden olup olmadığı incelenmiş ve ekzon 6'daki Ala114val polimorfizminin ekzon 5'te gözlenen Ile105Val polimorfizmine göre daha az yaygın olduğu, allel sıklığındaki ve genotipteki farklılıkların karsinojenik ajanlara karşı oluşan farklı duyarlılıklara sahip olabileceği gösterilmiştir (Watson vd., 1998; Ryberg vd., 1997).

Bunların yanında GSTP1 polimorfizmlerinin ve sigara kullanımının akciğer kanserine karşı duyarlılığı arttırmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. (To-Figueras vd., 1997; Jourenkova-Mirenova vd., 1998; Kihara vd., 1999). Bir başka çalışmada da GSTP1 ekzon 5 polimorfizminin ve diğer GST izoenzimlerinin akciğer kanseri ile bağlantılı olmadığı gözlenmiştir (Lewis vd., 2002; Stewart vd., 2003).

Çalışmamızda Isparta ve yöresi akciğer kanseri hastalarında ve kontrol bireylerde GSTP1 ekzon 6 polimorfizminin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular yabani tip olan C/C genotipinin hastalarda %86,7 ve kontrollerde %90 gibi yüksek

oranda ve heterozigot C/T genotip oranının ise hasta ve kontrol gruplarında %13,3 ve %10 gibi düşük oranda olduğunu göstermiştir.

İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda hasta ve kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmamıştır (Fisher Kesin Testi: 0,162 , P:1.000). Bu bulgu, GSTP1 ekzon 6 C/T genotipinin akciğer kanserine karşı hassasiyeti artırmadığını ifade etmektedir ve ekzon 6 polimorfizminin kanser ile ilişkili olduğu yönündeki bazı literatür bilgileriyle çelişmektedir.

Öte yandan, GSTP1 geni 341. kodonundaki C→T baz değişikliğinin önemi halen tam anlamıyla açıklanamamıştır. Şöyle ki; 114. Ala amino asitinin Val'e dönüşmesine yol açan bu değişiklik enzimin hidrofobik özellik taşıyan katalitik bölgesinde gerçekleşmektedir. Ancak Ala gibi yine hidrofobik bir amino asit olan Val'e değişimin enzimin katalitik aktivitesinde büyük ölçüde azalmaya neden olmayacağı düşünülmektedir. Bu görüş doğrultusunda, C/T ve T/T genotipli bireylerin akciğer kanserine yakalanma riskinin hayli düşük olacağı muhtemeldir.

Çalışmamız kapsamında analizi gerçekleştirilen bireylerin hiç birinde T/T genotipine rastlanmamasının gruptaki örnek sayısının az olmasından kaynaklandığı ve sayının artırılması durumunda T/T genotipine rastlanacağı tahmin edilmektedir çünkü mevcut ekzon 6 polimorfizm çalışmalarının hepsinde homozigot T/T genotipinin oranı son derece düşük olarak (%0.5-%0) kaydedilmiştir (Wang vd., 2003; Watson vd., 1998).

Sonuç olarak, bu çalışmada hasta ve kontrollerde C/T genotip oranının da oldukça düşük olması nedeniyle gerek heterozigot gerekse homozigot bireylerde kanser gelişim riskinin daha iyi değerlendirilebilmesi ve daha detaylı bilgilere ulaşılabilmesi için birey sayısının fazla olduğu kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Choi, S.C., Yun, K.J., Kim, T.H., Kim, H.J., Park, S.G., Oh, G.J., Chae, S.C., Oh, G.J., Nah, Y.H., Kim, J.J., Chung, H.T., 2003. Prognostic Potential of Glutathione S-Transferase M1 and T1 Null Genotypes for Gastric cancer Progression. *Cancer Letters*, 195(2), 169-175.

Dewlin, T.M., 1997. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss, Inc.1186, Amerika.

Duvoixa, A., Morceava, F., Delhalle, S., Schmitza, M., Schnekenburgera, M., Galteaub, M.M., Dicatoa, M., Diedrich, M., 2003. Induction of Apoptosis by Curcumin: Mediation by Glutathione S-Transferase P1-1 Inhibition. *Lung Cancer*, 42(2), 215-220, *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1475-1483.

Engin, K., Özyardımcı, N., 2001. *Akciğer Kanserinde Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar*. Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd.Şti.yayımları. 533., İstanbul.

Gözükara, E., 1989. *Biyokimya*. Ofset Repromat Ltd. Şti. 1104, Ankara.

Hayes, J.D., Pulford D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 30(6):445-600.

Hecht, S.S., 2002. Cigarette Smoking and Lung Cancer: Chemical Mechanisms and Approaches to Prevention. *Oncology*, 3, 61-69.

Hernández, A., Céspedes, W., Xamena, N., Surrallés, J., Creus, A., Galofré, P., Marcos, R., 2002. Glutathione S-Transferase Polymorphisms in Thyroid Cancer Patients. *Cancer Letter*, 190(1), 37-44.

[www.http://home.it.net.au](http://home.it.net.au).

Hou, S.M., Ryberg, D., Fált, S., Deverill, A., Tefre, T., Børresen, A.L., Haugen, A., Lambert, B., 2000. GSTM1 and NAT2 Polymorphisms in Operable and Non-Operable Lung cancer Patients. *Carcinogenesis*, 21 (1), 49-54.

Jourenkova-Mironova, N., Wikman, H., Bouchardy, C., Voho, A., Dayer, P., Benhamou, S., Hirvonen, A., 1998. Role of Glutathione S-Transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 Genotypes in Modulating Susceptibility to Smoking-Related Lung Cancer. *Pharmacogenetics*, 8(6), 495-502.

- Kihara, M., Kihara, M., Noda, K., 1999. Lung Cancer Risk of the GSTM1 Null Genotype is Mutated Genotype in Male Japanese Smokers. *Cancer Letters*, 137, 53-60.
- Lewis, S.J., Cherry, N.M., Niven, R.McL, Barber, P.V., Povey, A.C., 2002. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Polymorphisms and Lung Cancer Risk. *Cancer Letters*, 180, 165-171.
- Özdamar, K., 2001. SPSS ile Biyoistatistik, 4. baskı, s:340-343, Kaan Yay., Eskişehir.
- Reszka, E., Wasowicz, W., 2001. Significance of Genetic Polymorphisms in Glutathione S-Transferase Multigene Family and Lung Cancer Risk. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 14(2),99-113.
- Ryberg, D., Skaug, V., Hewer, A., Phillips, D.H., Harries, L.W., Wolf, C.R., OGREID, D., Ulvik, A., Vu, P., Haugen, A., 1997. Genotypes of Glutathione Transferase M1 and P1 and Their Significance for Lung DNA Adduct Levels and Cancer Risk. *Carcinogenesis*, 18(7), 1285-1289.
- Sekido, Y., Fong, K.M., Minna, J.D., 2004. *Molecular Biology of Lung Cancer. CANCER. Principles and practice of Oncology.* Devita, Jr. V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., 7th Ed. 745-57. Lippincott Williams and Wilkins, New York.
- Sılığ, Y., Çelik, V. K., Atalay, A., 2000. Daminozid Uygulamasından Sonra Elde Edilen Civcivlerde Karaciger Sitoplazmik Glutatyon-Stransferaz ve Mikrozomal Nitrozodimetilamin Demetilaz Aktivitelerindeki Degisiklikler. *Turk J Biol*, 24, 119–126.
- Stewart, V.N., Vaughan, T.L., Stapleton, P., Loo, J.V., Nicol-Blades, B., Eaton, D.L., 2003. A Population-Based Study of Glutathione S-Transferase M1, T1 and P1 Genotypes and Risk For Lung Cancer. *Lung Cancer*, 40(3), 247-258.
- Strange, R.C., Lear, J.T., Fryer, A.A., 1998. Glutathione S-Transferase Polymorphisms: Influence on Susceptibility to Cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 112, 351-364.
- Strange R.C., Jones P.W., Fryer A.A., 2000. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 112-113, 357-363.
- Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A., 2001. Glutathione-S-Transferase Family of Enzymes. *Mutation Research*, 482,21-26.
- To-Figueras, J., Gené, M., Gómez-Catalán, J., Galán, M.C., Fuentes, M., Ramón, J.M., Rodamilans, M., Huguet, E., Corbella, J., 1997. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) and T1(GSTT1) polymorphisms and Lung Cancer Risk Among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis*. 18(8), 1529-1533.

To-Figueras, J., Gené, M., Gómez-Catalán, J., Piqué, E., Borrego, N., Corbella, J., 2001. Lung Cancer Susceptibility in Relation to Combined Polymorphisms of Microsomal Epoxide Hydrolase and Glutathione S-Transferase P1. *Cancer Letters*, 173, 155-162.

Tsai, Y.Y., McGlynn, A., Hu, Y., Cassidy, A.B., Arnold, J., Engstrom, P.F., Buetow, K.H., 2003. Genetic Susceptibility and Dietary Patterns in Lung cancer. *Lung Cancer*, 41, 269-281.

Wang, J., Deng, Y., Cheng, J., Ding, J., Tokudome, S., 2003. GST Genetic Polymorphisms and Lung Adenocarcinoma Susceptibility in a Chinese Population. *Cancer Letters*, 185-193.

Wang, Y., Spitz, M.R., Schabath, M.B., Francis, A.O., Mata, H., Wu, X., 2003. Association Between Glutathione S-Transferase P-1 Polymorphisms and Lung Cancer Risk in Caucasians: a Case-Control Study. *Lung Cancer*, 40, 25-32.

Watson, M.A., Stewart, R.K., Smith, G.B.J., Massey, T.E., Bell, D.A., 1998. Human glutathione S-Transferase P1 polymorphisms: Relationship to Lung Tissue Enzyme Activity and Population Frequency. *Carcinogenesis*, 19(2), 275-280.

Zubay, G.L., Parson, W.W., Vance, D.E., 1995. *Principles of Biochemistry*. Wm.C.Brown Publishers. 863.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Ufuk Birgün TABAN
Doğum yeri :Artvin
Doğum Yılı :04.06.1979
Medeni Hali :Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise :1995-1997 Uluabatlı Hasan Anadolu Lisesi-BURSA
Lisans :1998-2002 Süleyman Demirel üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Yabancı Dil : İngilizce