

**AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA VE SAĞLIKLI BİREYLERDE
GSTM1 GEN DELESYONUNUN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

Mümin POLAT

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ISPARTA – 2005

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ HASTALARINDA VE SAĞLIKLI BİREYLERDE
GSTM1 GEN DELESYONUNUN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

MÜMİN POLAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ISPARTA – 2005

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Detoksifikasyon Mekanizması.....	5
2. KAYNAK BİLGİSİ	10
2.1. Glutasyon-S Transferaz (GST) Enzimlerinin Sınıflandırılması	13
2.2. GST'lerin Genetiği	13
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Örnek Seçimi	17
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Solüsyonlar.....	17
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	18
3.2. Metot	18
3.2.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu	19
3.2.2. PZR Yöntemi	23
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	26
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
6. KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ÖZET**(Akciğer Kanseri Hastalarında ve Sağlıklı Bireylerde GSTM1 Gen Delesyonunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Araştırılması)**

Detoksifikasyon mekanizmasında rol oynayan GST enzimlerini kodlayan genlerdeki polimorfizm, karsinojenlerin detoksifikasyon etkinliğinde bireysel farklılıklara sebep olmasından dolayı özellikle akciğer kanseri riski ile yakından ilişkilidir.

Bu çalışmada akciğer kanseri hastaları ve sağlıklı bireylerden sağlanan kan örneklerinden elde edilen genomik DNA'lar PZR yöntemi ile amplifiye edilerek GSTM1 geninin varlığı veya delesyonu ortaya konmuştur. GSTM1 delesyon genotipine akciğer kanseri hastalarında % 46.7, kontrol grubunda ise % 16.6 oranında rastlanmış ve sonuçlar GSTM1 gen delesyonunun akciğer kanseri ilişkili olduğunu göstermiştir (Fisher'in Ki-kare analizi; 4.80, P:0.0251).

Anahtar Kelimeler : GSTM1, Akciğer Kanseri, Detoksifikasyon, PZR

ABSTRACT**(Investigation of GSTM1 Gene Deletion Using the Method of PCR In Lung Cancer Patients and Healthy People)**

Polymorphisms of the GST genes encoding for the xenobiotic metabolizing enzymes result in individual variations in the efficiency of detoxification of environmental carcinogens, and have been extensively associated with variable risk for lung cancer.

In this study, genomic DNA's obtained from the blood samples of the lung cancer patients and healthy people were amplified by PCR method to detect the presence or deletion of GSTM1 gene. The frequency of GSTM1 deletion genotype was 46.7 % in lung cancer patients and 16.6 % in controls. According to the Fisher's chi square test results, GSTM1 deletion is associated with lung cancer development (Fisher's chi square test 4.80, P: 0.0251).

Key Words : GSTM1, Lung Cancer, Detoxification, PCR

TEŞEKKÜR

Çalıőmanın sonuca ulaőtırılmasında ve karşılaşılan güçlüklerin aőtılmasında yön gösterici olan tez danışmanım Yard. Doç. Dr. Fatma Filiz ARI'ya, elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde bilgisini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. A. Nesimi KIŐIOĐLU'na, deneysel çalışmalar sırasında her türlü yardımını gördüğüm Birgün TABAN'a ve en büyük destekçim, hayat arkadaşım Banu POLAT'a içtenlikle teşekkür ederim.

Simgeler (Kısaltmalar) Dizini

DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
gDNA	: Genomik DNA
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz enzimleri
GSTM1	: Glutasyon S- Transferaz M1 Geni
GSTP1	: Glutasyon S- Transferaz P1 Geni
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
-SH	: Sülfidril
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SPSS	: Statistical Packages of Social Sciences
TBE	: Tris Borik asit EDTA Tamponu
TE	: Tris-EDTA Tamponu
UV	: Ultraviyole

Şekiller Dizini

	Sayfa
Şekil 1	Karsinojenik Etkinin Basamakları.....4
Şekil 2	Ksenobiyotik Metabolizması6
Şekil 3	Glutasyonun Moleküler Yapısı7
Şekil 4	Glutasyon Metabolizması9
Şekil 5	Merkaptürik Asit Oluşum Mekanizması11
Şekil 6	GST Gen Ailesi14
Şekil 7	İnsan 1. Kromozomu ve GSTM1 Lokusu15
Şekil 8	Mü Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar ve GSTM1 Geni Ekson ve İntron Bölgeleri.....16
Şekil 9	Kandan İzole Edilen gDNA'ların Jel Elektroforez Görüntüsü28
Şekil 10	PZR Sonuçlarının Jel Elektroforezi ile Değerlendirilmesi.....28

Çizelgeler Dizini

	Sayfa
Çizelge 1	Kanser Tipleri ve Bunlara Bağlı Ölüm Oranları.....3
Çizelge 2	Hormonlar ve Bazı Bileşiklerin GST'lara Bağlanma Özellikleri 12
Çizelge 3	İnsan GST Enzimlerinin Sınıflandırılması13
Çizelge 4	PZR Koşulları24
Çizelge 5	PZR İçin Kullanılan İçerik25
Çizelge 6	Hasta ve Kontrollerde GSTM1 Genotip Frekansları.....29
Çizelge 7	Hastaların GSTM1 Genotip Frekansları İle Cinsiyet ve Akciğer Kanseri Tipleri Arasındaki İlişki29
Çizelge 8	Farklı Toplumlarda GSTM1 (-) Genotip Frekansı.....31

1. GİRİŞ

Organ ve dokular oluşurken hücreler belirli bir düzen içinde, belirli iş bölümleri yaparak bir araya gelirler. Bu hücreler yine belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar, belirli bir hızda yıkılırlar (Kutluk ve Kars, 1994). Kendisi bir ekosistem olan vücutta, işbirliği içerisinde bir araya gelen bu hücrelerin herhangi birisinde gerçekleşen ve diğer hücrelerin aleyhine olacak bir mutasyon tüm işbirliğini tehlikeye sokabilmekte, bu şekildeki bir mutasyon sonucunda somatik hücre popülasyonu içerisinde başlayan rekabet ve doğal seleksiyon kanser için bir başlangıç teşkil edebilmektedir. Kanser, dokunun nispeten kendi (otonom olarak) normal dışı büyümesi olarak tarif edilebilir. Kanser bir hücreden başlar ve komşu hücreleri harcama pahasına kontrolsüzce gelişir ve sonunda tüm hücreli birliğin hasara uğratarak ölüme sebep olur.

İnsan vücudunu oluşturan milyarlarca hücrenin her biri, ne zaman çoğalacağını ve nasıl gelişeceğini bildiren karmaşık bir programı taşımakta ve bunu okuyabilmektedir. Hastalıkların bir çoğu, bu programı okuma fonksiyonunun bozulduğu zaman ortaya çıkmaktadır. Buradan hareketle kanser hücresinin bazı genel özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- Kanser hücresi, kendi normal büyüme ve bölünmesini düzenleme mekanizması bozulmuş ve yeni karakterleri kazanmış bir hücredir.
- Kanser hücreleri hızla çoğalan fakat farklılaşmalarını tamamlayamamış hücrelerdir; bu tür hücreler transforme olmuş hücreler olarak isimlendirilirler. Transforme olmuş bir hücre popülasyonu, genellikle genlerinde yıkıcı değişimler olan bir tek hücrenin bölünmesi sonucunda meydana gelir. Bu nedendir ki, kanser her zaman için bir hücre ile başlar.
- Genellikle hayvansal hücrelerin plazma zarının yüzeyinde bulunan glikoproteinler, glikolipitler ve polisakkaritler hücreye biyokimyasal bir kimlik kazandırır ve onlar genetik kontrol altında bulunurlar. Bu moleküllerin görevlerinden bir tanesi, hücre reseptörleri olarak iş görmek ve bu arada kontakt inhibisyonu sağlamaktır. Bir hücrede kontakt inhibisyon özelliği ortadan kalkınca,

daha açık bir ifadeyle, hücre yeni hücre yüzeyi karakterleri kazanınca sürekli olarak çoğalır; yani kanser hücresine dönüşür.

Kanser hücresinin en belirgin özelliği kontrol dışı çoğalmasıdır. Bu şekilde sürekli olarak çoğalan hücreler, bir tümör veya neoplazma oluştururlar. Neoplazma kontrolsüz büyüyen anormal hücre yığındır. Neoplastik hücreler bir kitle (yığın) halinde kaldıkları sürece onlara iyi huylu tümör adı verilir. İyi huylu tümörler, genellikle cerrahi uygulama ile uzaklaştırılarak tam bir tedavi sağlanabilir. Eğer bir tümörü oluşturan hücreler, meydana geldikleri dokunun etrafını kuşatma yeteneğini kazanmışlarsa, o malignant (habis) tümör olarak isimlendirilir. Bu primer tümörden ayrılan hücreler, lenf ve kan dolaşımı ile vücudun diğer kısımlarına da taşınırlar. Vücuda dağılan bu hücreler kendilerine uygun lokasyonlar bulduklarında oraya yerleşir ve ikincil tümörleri geliştirirler. Kanser bir organdan diğerine yayılması olayı metastaz olarak ifade edilir. Kanser metastazlarının cerrahi müdahale ile kökünden sökülüp atılması oldukça zordur (Bahçeci, 1999).

Kanserler, meydana geldikleri hücre ve dokuların çeşidine göre gruplandırılır. Epitelial hücrelerden meydana gelen kanserler karsinoma, bağ doku veya kas hücrelerinden meydana gelen kanserler sarkoma olarak isimlendirilir.

İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ı karsinomalardır. Çünkü, vücutta hücre çoğalmasının (bölünmesinin) büyük bir bölümü epitelial dokuda olur ve ayrıca epitelial dokular kanser oluşumuna sebep olan fiziksel ve kimyasal ajanların etkilerine en fazla maruz kalan dokulardır.

Yapılan geniş bir mortalite araştırmasına göre, kanser mortalite trendinin kanser tiplerine bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Epitelyal kanserler % 18 oranında görülürken hemopoeietik ve immün sistem kanserleri % 9, merkezi sinir sistemi ve göz kanserleri % 2, bağ doku, kas ve damar kanserleri % 1 oranında görülmektedir. (Çizelge1).

Eğer anormal bir hücre bir tümörün oluşumuna sebep oluyorsa, bu anormalliğin yavru hücrelere de geçmesi gerekir. Yani, söz konusu anormallik kalıtsal olmalıdır. Kanser aydınlatılması olayında çözülmesi gereken ilk problem; kalıtsal aberasyonun bir genetik değişime, yani hücre DNA'sının baz dizilişinde ortaya

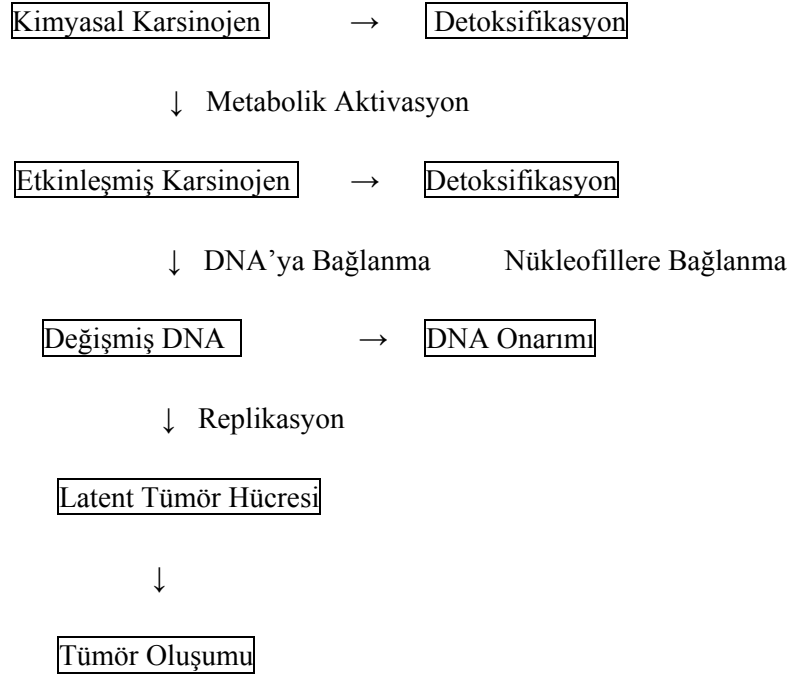
çıkan bir değişime veya epigenetik bir değişime, yani DNA'nın baz dizilişini değişmeksizin gen işleyişi modelinde meydana gelen bir değişime bağlı olup olmadığının ortaya konulmasıdır.

Çizelge1: Kanser Tipleri ve Buna Bağlı Ölüm Oranları (Bahçeci, 1999)

1. Epitelyal Kanserler	% 81
Ağız Boşluğu ve Farinks	% 2
Kolon ve Rektum	% 13
Pankreas	% 5
Mide	% 3
Karaciğer ve Safra Sistemi	% 2
<i>Akciğer</i>	% 28
Göğüs	% 9
Deri (Malign Melanoma)	% 3
Üreme Kanalı (toplam)	% 10
Boşaltım Organları (Toplam)	% 4
Diğer Epitelyal Kanserler	% 2
2. Hemopoeietik ve İmmün Sistem Kanserleri	% 9
3. Merkezi Sinir Sistemi ve Göz Kanserleri	% 2
4. Bağ doku, Kas ve Damar Kanserleri	% 1
5. Diğer bütün Kanserler	% 7

Bir çok kanser çeşidinin genetik bir değişim sonucu başladığını gösteren bulgular elde edilmiş ve mutasyona sebep olan bir çok ajanın, aynı zamanda kansere de sebep olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (Şekil 1).

Kanser sebebi olan maddelere ‘‘Karsinojen’’ denilmektedir. Karsinojen madde, radyasyon gibi fiziksel, polisiklik hidrokarbon gibi kimyasal yada virüs gibi biyolojik ajan olabilir. Bu gibi bir ajana maruz kalma kansere sebep olabilir. Karsinojenler, DNA üzerine genotoksik etki yapabilirler (radyasyon gibi), hücre proliferasyonunda artışa yol açabilirler (hormonlar gibi), yada her iki etkiyi birden gösterebilirler (sigara dumanı gibi) (Chan ve Sell, 1994; Henderson ve ark., 1991).



Şekil 1: Karsinojenik Etkinin Basamakları

Karsinogenez (kansere oluşumu) ile mutajenez (mutasyon oluşumu) arasındaki bu ilişki üç grup ajan bakımından net bir şekilde ortaya konmuştur. Bunların birincisi kimyasal ajanlardır.

Kimyasal ajanlar (kömürün yanma ürünleri, benzen, naftilaminler, asbest, vinil klorür, krom, katkı maddeleri ve bazı ilaçlar), DNA'nın nükleotit dizilişinde bazı lokal değişimlere sebep olur. İkincisi, fiziksel ajanlardır. X- ışınları ve ultraviyole (UV) ışınları gibi iyonize olan radyasyon, tipik olarak kromozom kırılmalarına ve translokasyonlara yol açar. Üçüncüsü ise biyolojik karsinojenlerdir (virüs). Virüsler

hücreye yabancı DNA'yı sokarak kansere sebep olurlar. İnsanlar gerek ilaçlar, gerek gıdalardaki katkı maddeleri, gerekse çevre kirliliğine neden olan maddeler şeklinde olmak üzere giderek artan bir biçimde çeşitli yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) etkisinde kalmaktadırlar (Murray ve ark., 1990).

Ölümcül kanser türleri arasında ilk sırayı alan akciğer kanserinde (Çizelge 1), sigara kullanımının yanı sıra radyasyon, asbest gibi çeşitli karsinojenlere maruz kalış, önemli risk faktörleri arasında yer alır. Bu çevresel faktörlere ek olarak, kanserli hücrelerde görülen değişik gen anormallikleri de doğrudan kanser etkeni olabildiği gibi hastalığın seyri hakkında da bilgi verici markırlar olarak kullanılmaktadır.

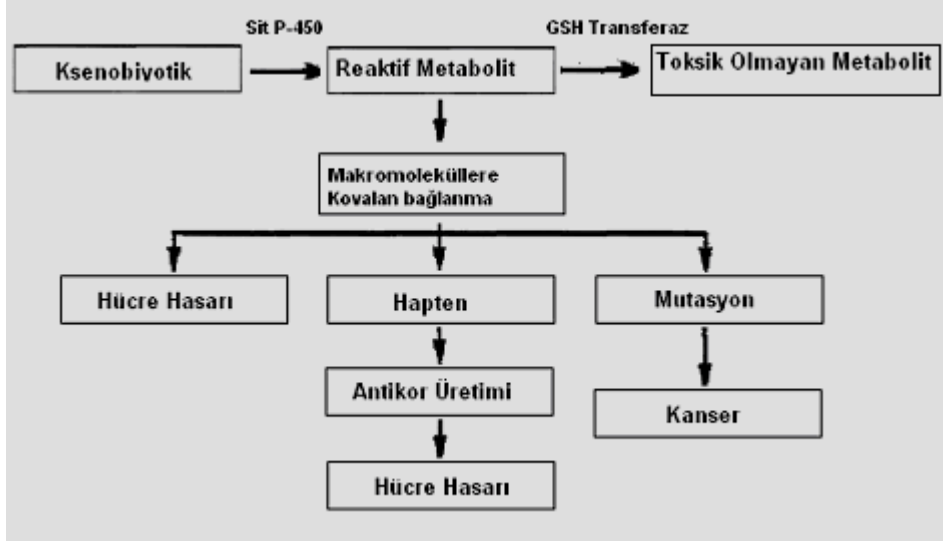
1.1. Detoksifikasyon Mekanizması

Karsinojenik etkilerden hücrenin korunmasında detoksifikasyon mekanizmalarının büyük önemi vardır. Detoksifikasyon (biotransformasyon), ksenobiyotikler (toksik maddeler, metabolitler, epoksidler) gibi zararlı maddelerin çeşitli enzim ya da moleküller yardımı ile zararsız hale getirilerek vücuttan dışarı atılımını sağlama mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalarda görev alan enzimler ya da moleküller de bu hayati olguyu desteklemektedirler (Şekil 2).

Detoksifikasyon (Biotransformasyon) mekanizması iki ana grupta toplanabilir:

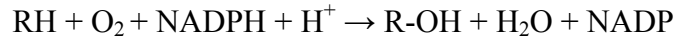
1. Faz I reaksiyonları; yükseltgenme ve hidroliz olaylarını,
2. Faz II reaksiyonları; konjugasyon olaylarını içerir.

Ksenobiyotik mekanizmasındaki bu iki fazın baştan sona amacı, bu maddelerin sudaki çözünürlüklerini arttırmak ve idrar veya safra ile vücuttan atılmalarını kolaylaştırmaktır. Birinci fazda lipofilik ksenobiyotikler genelde daha polar türevlerine dönüştürürler ve ikinci faz reaksiyonları ile bu polar metabolitler glukuronik asit, sülfat, glutatyon gibi endojen maddelerle konjugasyona uğrayıp vücuttan atılırlar (Vural, 1996; Kayaalp, 1994).



Şekil 2 : Ksenobiyotik metabolizmasının hücre hasarı, immünolojik hasar veya kanser ile nasıl sonuçlanabileceğini gösteren basitleştirilmiş şema. Bir ksenobiyotiğin reaktif metabolite dönüşümü bir seri sitokrom P-450 tarafından ve reaktif metabolitin (örneğin bir epoksid) toksik olmayan bir metabolite dönüşümü ise ya GSH transferaz ya da epoksid hidrolaz tarafından kataliz edilir (Murray ve ark., 1990).

Faz I ile ilişkili temel reaksiyon hidroksilasyondur. Sorumlu enzimler monooksijenazlar veya sitokrom P-450 türleridir ve bunlar tarafından katalizlenen reaksiyon şöyledir;



Reaksiyondaki RH; çok geniş bir ilaçlar grubunu, karsinojenleri, çevre kirliliğine etken olan nedenleri ve steroidler gibi bazı bileşikler simgeler. Pek çok durumda her ne kadar P-450 türlerine ait endojen substratlar tanımlanmamış ise de, bu enzimlerin sadece ekzogen bileşikler ile baş etmek üzere gelişmiş olmaları da pek olası değildir.

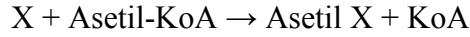
Faz II ile ilişkili olarak ise en az 5 tip reaksiyon vardır. Bunlar; Glukuronidasyon, Sulfasyon, Glutatyon ile konjugasyon, Asetilasyon ve Metilasyondur.

Glukuronidasyon: Ksenobiyotiklerin glukuronitleştiği reaksiyonlar temelde birbirine benzerler. 2 -asetil amino fluoren (bir karsinojen), anilin, benzoik asid, meprobomat fenol ve steroidler gibi pek çok moleküller glukuronatlar şeklinde atılıma uğrarlar. Glukuronid, substratların oksijen, azot veya kükürt gruplarına

bağlanabilir. Glukuronidasyon en sık gerçekleşen konjugasyon reaksiyonlarından biridir.

Sülfasyon: Bazı alkoller, aril aminler ve fenoller sulfatlanırlar. Bunlar ve diğer biyolojik sülfasyon reaksiyonlarında (ör: steroid, glikozaminoglikanlar, glikolipidler, gliko-proteinlerin sülfasyonu) sülfat donörü adenozin 3' fosfat 5' fosfosulfattır. Bu bileşiğe aktif sülfat denir.

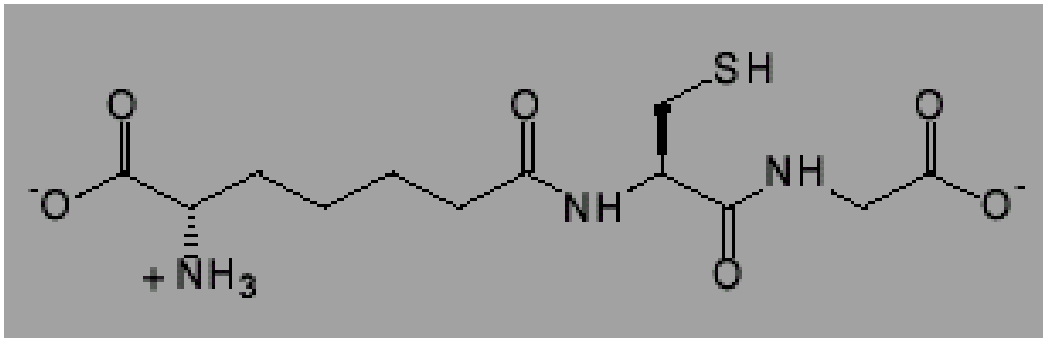
Asetilasyon: En önemli Faz II reaksiyonlarından birisi de asetilasyondur.



X burada bir ksenobiyotiği temsil eder. Asetil-KoA (aktif asetat) ise asetil donörüdür. Asetilasyon özellikle karaciğer olmak üzere muhtelif dokuların sitosollerinde mevcut asetiltransferazlar tarafından katalizlenir. Tüberküloz tedavisinde kullanılan bir ilaç olan izoniyazid de asetilasyona uğrar.

Metilasyon: En nadir görülen Faz II reaksiyonu metilasyondur. Ksenobiyotiklerin çok azı metil donörü olarak S-adenozil metiyonin kullanan metil transferazlar ile metilasyona uğrarlar.

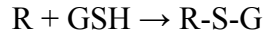
Glutasyon ile Konjugasyon: Glutasyon (γ glutamil sisteinil glisin) molekülü; glutamik asit, sistein ve glisinden oluşur ve genelde GSH olarak kısaltılır; -SH sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alış veriş yapan kısmıdır (Şekil 3).



Şekil 3: Glutasyonun Moleküler Yapısı

Karsinogenik etkilerden korunmada glutatyonun önemli bir rolü vardır. Reaktif ara metabolitleri olan epoksidler ve diğer bazı toksik bileşikler dokularda nükleofilik endojen bileşiklerle özellikle glutatyon ile konjuge edilerek inaktif duruma getirilirler. Glutatyon molekülündeki sülfidril grubu güçlü bir nükleofilik grup gibi hareket eder, epoksid veya bazı toksik bileşiklerin veya metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları nötralize yani detoksifiye eder.

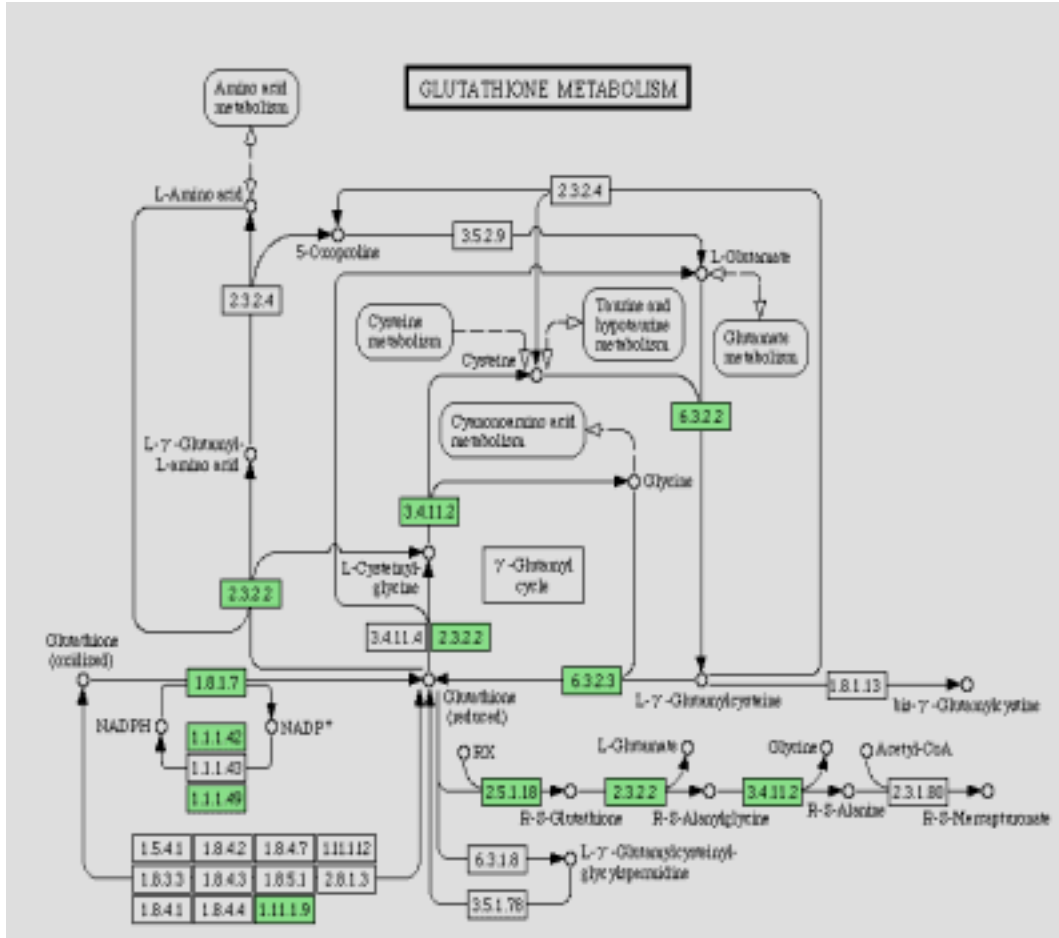
Potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik ksenobiyotikler aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi nükleofilik GSH ile konjuge olurlar.



Burada R elektrofilik ksenobiyotiktir. Bu reaksiyonları katalize eden enzimlere glutatyon S-transferazlar (GST) denir ve bunlar karaciğer sitosolünde yüksek, diğer dokularda daha düşük miktarlarda bulunurlar. Eğer toksik potansiyeli olan ksenobiyotikler GSH ile konjugasyona uğramasalar; DNA, RNA veya hücre proteini ile kovalan olarak birleşmekte serbest olacaklar ve sonuçta ciddi hücre hasarlarına yol açabileceklerdi. Bundan dolayı GSH, bazı ilaçlar ve karsinogenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır.

Glutatyon konjugeleri vücuttan atılmadan önce daha ileri metabolizasyona uğrarlar (Şekil 4). Glutatyona ait glutamil ve glisin grupları spesifik enzimler tarafından uzaklaştırılırlar ve geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna bir asetil grubu (asetil KoA'dan sağlanan) eklenir. Sonuçta meydana gelen bileşik idrarla atılma uğrayan L-asetil sisteinin konjugesi olan merkapturik asittir (Murray ve ark., 1990).

Bireyler arasında görülen bazı kanser türlerine yatkınlığın artması veya azalmasının temelinde yatan neden ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda (biotransformasyon) rol oynayan enzimlerin gösterdiği genetik polimorfizmdir (Fryer ve ark., 1993, Nakachi ve ark., 1993; Malats ve ark., 2000; Pemble ve ark., 1993).



Şekil 4: Glutasyon Metabolizması (Kyoung-Ho ve ark., 2003)

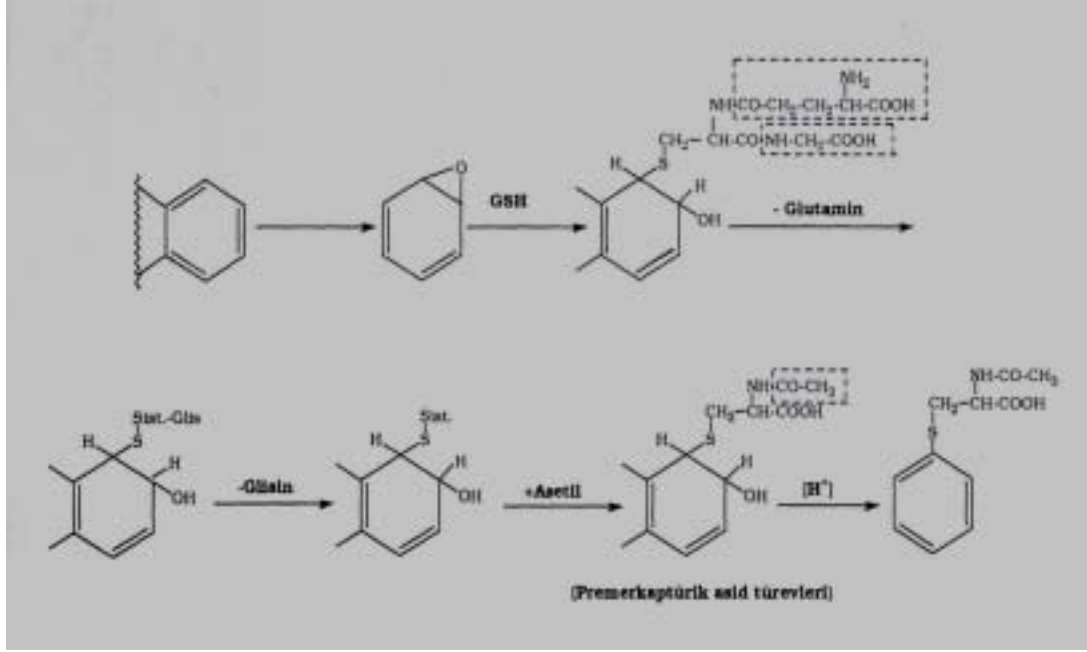
2. KAYNAK BİLGİSİ

Memeli dokularında yaygın olarak ifade edilen Glutasyon S-Transferaz enzimleri (GST) özel bir enzim ailesi olup, hücrelerde glutasyon aracılı detoksifikasyon reaksiyonlarını katalizleyerek hücreleri sitotoksik ve karsinojenik ajanların sebep olduğu hasarlardan korurlar. Buna bağlı olarak, GST enzimlerinin düşük oranda ifadesi ya da yokluğu nedeni ile detoksifikasyon reaksiyonlarının gerçekleşmemesi kanser hassasiyetinin büyük oranda artmasına neden olmaktadır.

Homodimerik veya heterodimerik enzimler olan GST'lerin araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bunların hayati öneminin göstergesidir. Bu enzimler katalitik olan ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır (Habig ve ark., 1974; Mannervik, 1985; Morgenstern ve ark., 1987; Simons ve Jagt, 1977). Bu gruba aromatik bileşikler ve poliansatüre yağ asitleri de eklenebilir (Mannervik, 1985). Muhtemel endojen substrat grupları arasında; kinonlar, organik hidroperoksitler, epoksitler, araşidonik asit türevleri ve alkenler (alfa-beta ansatüre karbonit bileşikleri) sayılabilir.

Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutasyon (GSH)'daki sisteine ait (-SH) grubu ile bağlayarak onların elektrofilik özelliklerini nötralize ederler ve ürünün suda daha fazla çözünür hale gelmesine neden olurlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri düzeyde metabolize olurlar. Ksenobiyotiklerin klasik atılım ürünleri olan merkaptürik asitler organizmadan safra ile atılırlar (Şekil 5).

Bu yol GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu göstermektedir. Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimlerin hücre içinde sınırlı çözünürlüğe sahip moleküller için hem depo hemde taşıma rolü üstlendiklerini göstermektedir (Habig ve ark., 1974; Mannervik, 1985; Pickett, 1989; Mc Quaid ve ark., 1988; Simons ve Jagt, 1977; Trakshel ve Maines, 1988).



Şekil 5: Merkaptürük asit oluşum mekanizması (Rodwell, 1985; Ünsal, 1990)

Sıçan karaciğerinde bilirübini, karsinojenleri ve azotlu bileşikleri bağlayan bir protein tanımlanmış ve "ligandin" veya "Y" ve "Z" proteinleri olarak isimlendirilmiştir (Ketterer ve ark., 1987; Tu ve ark., 1987). Yapılan çalışmalar sonucunda, ligandinin 1974 yılında Habig ve arkadaşları tarafından tanımlanan sıçan GST 1-1 (GST- γ) izoenzimi ile aynı protein olduğu anlaşılmıştır (Habig ve ark., 1974). Bilirübinle yapılan çalışmalar GST'lerin hücre dışından içeriye bilirübin girişini artırmadığını ancak hücre içinden dışarıya bilirübin çıkışını azalttığını göstermiştir. Bu şekliyle bir depo proteini gibi davranmaktadır. Bilirübin gibi bir çok pigment (hematin, bromsülfaftalein, indosiyenin gren gibi), kolik asitler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler (Marcus ve ark., 1978; Sato ve ark., 1987).

GST'lerin sitozolde yüksek miktarda bulunması; albuminin kan dolaşımında üstlendiği rolü bu proteinlerin hücre içinde yerine getirdiği hipotezini doğurmuştur (Eimoto ve ark., 1988). Deneylerde "hem" molekülünün son sentez basamağının bulunduğu mitokondri iç zararından dışarıya hareketini GST'lerin kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Husby ve ark., 1981; Senjo ve ark., 1985). GST'lerle yapılan bağlanma çalışmalarında steroid ve hormonları bağladıkları anlaşılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2: Hormonlar ve bazı bileşiklerin GST'lere bağlanma özellikleri (Vatansev, 1995)

HORMONLAR	AFFİNİTE**
Triiyodotironin (T3)	++++
Tetraiyodotironin(T4)	++++
Kortikasteron	++++
Hidrokortizon	+++
Deksametazon	++++
Prednizalon	+++
Aldesteron	+++
Progesteron	++++
Andesteron	++++
Testesteron	+++
Dietilstilbesteron	++
17β-estradiol	++
Estron	++
Dehidroepiandrosteron	+++
Kolestrel	--
2.3-benzantresen	++++
Naftoflavon	++
Akridin oranj	++++
Fenantren	+++
1.2.5-dihidroksi vitamin D3	++
Difenilhidantoin	--
Klofibrat	--
Bilirubin	++++
İndometazin	++

** : Relatif affiniteler(++++)= $K_d < 0,000001M$; (++++)= $0,000001 < K_d < 0,00001M$; $K_d > 0,001M$ olan bileşiklerin bağlanmadığı kabul edilmiştir.

Hormonların çekirdeğe nakli görevini de yerine getirdiği düşünülmüşse de bu olayın fizyolojik sonuçları ve anlamı henüz tam açık değildir (Husby ve ark., 1981; Senjo ve ark., 1985). Bu fonksiyonlarına ilaveten GST'ler çok sayıda başka görevlere de sahiptirler. Lökotrien C4'ün sentezi, lökotrien C sentaz aracılığı ile lökotrien A4'ün GSH ile bağlanması sonucu olur. Bu reaksiyon GST'ler tarafından da katalizlenebilmektedir (Federici ve ark., 1985; Suzuki ve ark., 1991).

2.1. Glutasyon-S Transferaz (GST) Enzimlerinin Sınıflandırılması

E.C: 2.5.1.18 olarak kodlanan GST enzimleri çok fonksiyonlu iki alt birimden oluşmuş dimerik bir enzim ailesidir (Booth ve ark., 1961; Carmichael ve ark., 1988; Nazar ve ark., 1993; Nitsu ve ark., 1989). Memelilerdeki sitosolik GST enzimleri; Alfa, Mü, Pi, Teta olmak üzere dört ana sınıfa ayrılmıştır. Bunların dışında membrana bağlı şekilde lökotrien C₄ sentaz ve mikrozomal GST olarak adlandırılan iki GST daha bulunmaktadır (Çizelge 3).

GST'ler asidik, bazik ve nötral olmalarına göre de 3 gruba ayrılırlar (Board, 1981; Faulder ve ark., 1987);

GST μ → Nötral,
 GST α , β , γ , δ ve ϵ → Bazik
 GST π → Asidik özellik gösterir.

Çizelge 3: İnsan GST Enzimlerinin Sınıflandırılması (Chan ve Sell, 1994)

ENZİM	SINIF	LOKUS	KROMOZOM
GST A1-1	Alfa	GSTA 1	6p12
GST A1-2	Alfa	GSTA2	6p12
GST M 1a-1a	Mü	GSTM1	1p13
GST M1b-1b	Mü	GSTM1	1p13
GST M2-2	Mü	GSTM2	1p13
GST M3-3	Mü	GSTM3	1p13
GST M4-4	Mü	GSTM4	1p13
GST M5-5	Mü	GSTM5	1p13
GST P1-1	Pi	GSTP1	11q13
GST T1-1	Teta	GSTT1	
GST T2-2	Teta	GSTT2	
Mikrosomal		GST12	12
Lökötrien C4		Lökötrien C4	
Sentaz		Sentaz	

2.2. GST'lerin Genetiği

Canlıların pek çok fizyolojik fonksiyonu yapabilmesi için çok sayıda GST izoenzimi kodlayabilecek genetik kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir. Çok sayıda gen olması ve alt birimlerinin hibritleşmesi izoenzim oluşumunun nedenleri olarak

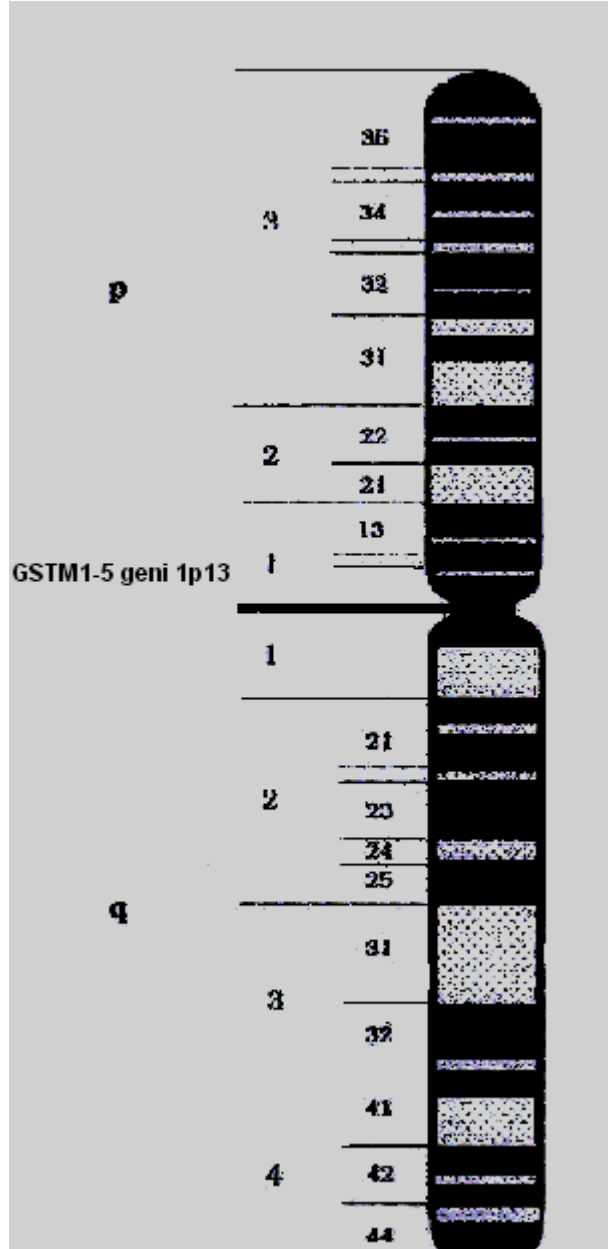
bilinmektedir (Mannervik, 1985). GST alt birimlerinin fenobarbital, 3-metilkolantren, transtilben oksit gibi ksenobiyotikler ile uyarılabildiği ve dokuya has düzenlemelerin incelenmesinde faydalı bir sistem olduğu bildirilmektedir (Pickett, 1989). GST enzimlerini kodlayan genlerin sınıflandırılması primer 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. kromozomda; sigma 4. kromozomda ve zeta 14. kromozomda kodlanmaktadır (Strange ve ark., 2001; Choi ve ark., 2003; Tsai ve ark., 2003) (Şekil 6).

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	?	?	?

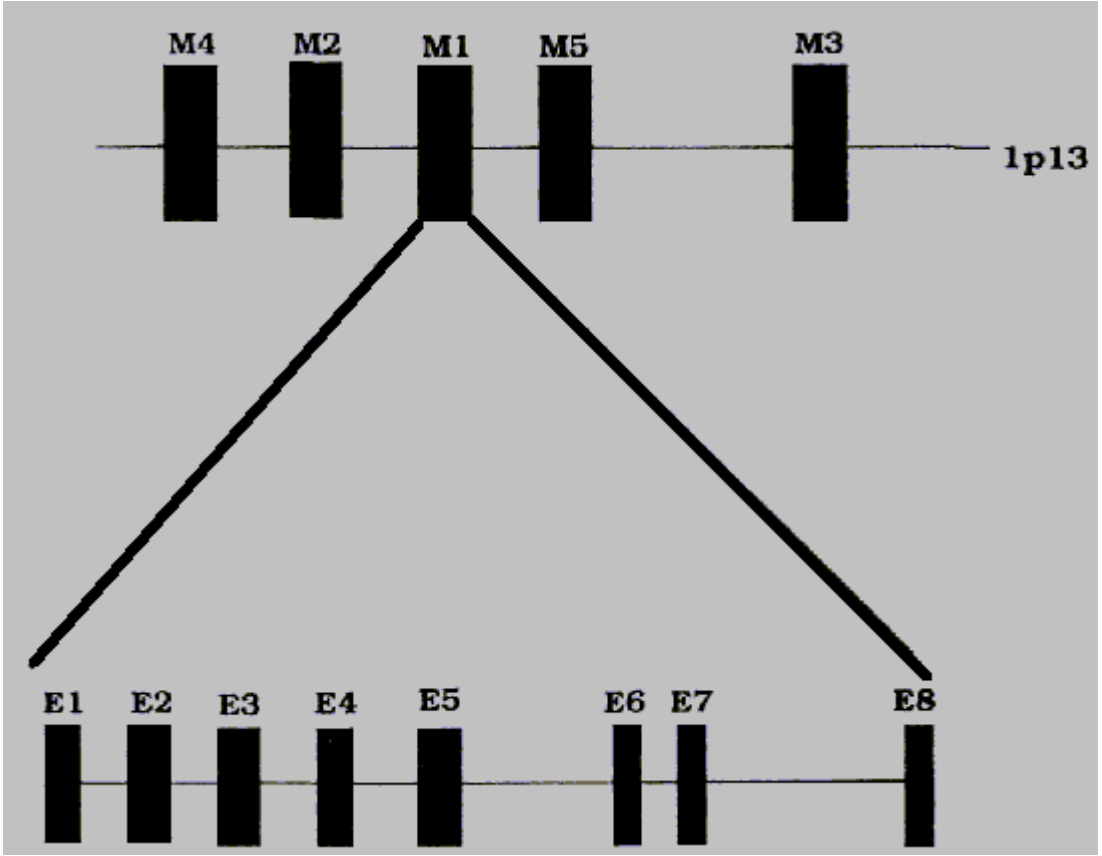
Şekil 6: GST Gen Ailesi

Mü sınıfı GST'ler (GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 ve GSTM5) polisiklik aromatik hidrokarbonların epoksid türevlerine karşı gösterdikleri yüksek katalitik aktivite nedeniyle ilgi çekmişlerdir. Bu enzimleri kodlayan genler birinci kromozom üzerindedirler (Pearson ve ark., 1993) (Şekil 7).

1p13'de bulunan ve genetik polimorfizm gösteren Mü sınıfı GSTM1 geni, sekiz ekson ve yedi introndan oluşmaktadır (Şekil 8).



Şekil 7 : İnsan 1. Kromozomu ve GSTM1-GSTM5 Lokusu (Öke, 1996)



Şekil 8: Mü Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar ve GSTM1 geni ekson ve intron bölgeleri (Öke, 1996).

Çalışmamızda, GST izoenzimlerinden GSTM1 gen delesyonunun Isparta yöresi akciğer kanseri vakalarında ve sağlıklı bireylerde görülme sıklığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Örnek Seçimi

Bu çalışmada kullanılan hasta grubu kanları; Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Zehra Ulusoy Onkoloji Hastanesince klinik ve laboratuvar bulguları ile “akciğer kanseri” tanısı konulmuş ve burada tedavilerini sürdüren hastalardan izinleri alınarak toplanmıştır. Her iki cinsiyetten, yaşları 43 ile 80 arasında değişen 30 hastadan 5-10 ml’lik kan örnekleri EDTA’lı tüplere alınarak kullanılana kadar -20°C ’de saklanmıştır.

Kontrol grubu kan örnekleri; 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 30 kişiden alınmıştır. Tüm hastalar ve sağlıklı bireyler Isparta ve çevresinde doğup yaşamış olup aralarında herhangi bir akrabalık yoktur.

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Solüsyonlar

- Agaroz (Prona)
- Amonyum Asetat (Sigma A-8920)
- Etanol (%95) (Merck-986)
- Ethidium Bromür (Sigma E-7637)
- Fenol (Sigma P-4557)
- İzopropanol (%99.5) (Riedel_deHaen)
- Jel yükleme solüsyonu (Biobasic, Biogen)
- Kloroform (Sigma)
- Lizis Tamponu (10 mM Tris-HCl, 400 mMNaCl, 2mM EDTA; pH=8.2)
- Presipitasyon Solüsyonu (80 µl presipitasyon solüsyonu stok, 720 µl dH₂O-Fermentas)
- Proteinaz K (Biobasic)

- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma L-4340)
- Sodyum Klorür (Sigma S-5881)
- TBE (Tris buffer EDTA; 10.8 g Tris Base, 9.3 g EDTA, 55 g Borik Asit)
- TE (pH=7,5, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (Beko)
- Derin Dondurucu - 20° (Arçelik)
- Elektroforez tankı (Biolab Minicell Primo EC320 Electrophoretic Gel System)
- Etüv (Wtcbinder)
- Güç kaynağı (Biolab Power PAC 300)
- Jel görüntüleme Sistemi (Biolab UV, Tech, Heidolp Potamax 120 Instruments)
- Mini santrifüj (Minispinplus Ependorph)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich Universal 32)
- Steril Kabin (Telstar CV-100)
- PZR Cihazı (Termosaykır) (Techne Genius)
- Vorteks (Velp Scientifica)

3.2. Metot

Çalışmada kullanılan yöntemler kısaca şöyledir; Akciğer kanseri hastaları ve sağlıklı kontrol bireylerden alınan kan örneklerinden genomik DNA izole edildi. Elde edilen genomik DNA'lar jelde yürütüldü ve daha sonra görüntülendi (Bkz. Şekil 9). Buna bağlı olarak da PZR içeriğinde kullanılması gereken gDNA miktarları belirlendi. Bu DNA'lardan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile GSTM1 gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi ve jel elektroforez analizi ile bu PZR ürünleri kontrol edildi.

Çalışmada PZR'nun sorunsuz gerçekleştiğini belirlemek için internal kontrol olarak GSTP1 genine bakıldı. GSTM1 geni 273 bp iken GSTP1 geni 420 bp uzunluğunda olduğundan elde edilen bantlar kolaylıkla ayırt edilerek PZR ürünlerinin tanımlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.1. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Hastalardan ve kontrol gruplarından 5 mL venöz kan örneği EDTA'lı tüplere alındı. Kanın lökosit kısmından yüksek tuz konsantrasyonu yöntemi kullanılarak DNA izole edildi. İzolasyon protokolü aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır;

1.gün:

- 2 ml kan santrifüj tüpüne alındı. 8 mL soğuk steril su konuldu.
- Elde aşağı yukarı 2-3 dakika çalkalandı.
- Oda ısısında 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 5 mL soğuk steril su konup hızla çalkalandı.
- Oda ısısında 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant atılıp 600 µL Lizis Tamponu (pH=8.2, 10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2mM EDTA), 30 µL proteinaz K (20 mg/mL), 40 µL SDS (%10) eklenip vortekslendi.
- 37 °C'de etüvde 1 gece bekletildi.

2.gün:

- Cam tüplerin üzerine 600 µL amonyum asetat (10 M) eklenip çalkalandı. Oda ısısında yaklaşık 10-15dakika bekletildi.
- 4000 rpm'de 1 saat santrifüjlendi.

- Süpernatant başka bir cam tüpe alındı ve üzerine tüpteki miktarın 2 misli soğuk etanol eklendi. DNA'nın solüsyondan ayrılması ve çökmesi gözlemlendi.
- Cam tüplerin içeriği ephendorf tüplere aktarıldı ve 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek DNA çöktürüldü.
- Örnekler oda sıcaklığında yaklaşık olarak 1 saat kurumaya bırakıldı.
- Örnekler 200 µL TE eklendikten sonra -20 °C'de saklandı.

TE (Tris-EDTA) Tampon İçeriği

- Tris-HCl 20 mM
- EDTA 1 mM

Lizis Tamponu Hazırlanması

- Tris-HCl10 mM
- NaCl100 mM
- EDTA2mM eklendi ve pH = 8.2'ye ayarlandı.

Standart izolasyon yöntemleri ile elde edilen genomik DNA örneklerinden bazılarında PZR ile amplifikasyon işlemi gerçekleştirilemedi. Bu genomik DNA'lar fenol-kloroform yöntemiyle saflaştırıldı. Fenol-kloroform ekstraksiyonu; DNA'yı kontamine eden protein, lipit, nükleik asit karışımlarını uzaklaştırdığından genomik DNA'yı daha saf hale getirmek için başvurulan klasik bir yöntemdir.

Bu işlem sırasında bu organik bileşikler proteinlerle kompleks oluştururlar ve bu kompleksler de fenol-kloroform karışımının alt fazda, DNA'nın ise üstteki sıvı fazda toplanmasını sağlar. Protein kontaminasyonunu engellemek için üst kısımdaki süpernatant, interfaza zarar vermeden dikkatlice uzaklaştırılmalıdır.

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. Uygulanan prosedür şu şekildedir;

Fenol Kloroform Ekstraksiyon Protokolü:

- 1) 1,5 mL'lik ependorf tüpündeki DNA örneğine 0,5 mL seviyesine kadar TE (Tris-EDTA) (pH = 7,5) eklendi.
- 2) DNA solüsyonuna örnekle eşit hacimde (500 µL) fenol eklenerek 5-10 saniye vortekslendi. 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendikten sonra üstte kalan ve DNA içeren fazın yaklaşık olarak %90'ı yeni temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Ara tabakada oluşan kirliliğin alınmamasına dikkat edildi.
- 3) DNA solüsyonuna 300 µL fenol + 300 µL kloroform eklendi. 5-10 saniye vortekslendikten sonra 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında oluşan üst faz yeni temiz bir ependorf tüpüne alındı. Fenol + kloroform işlemi örneğin temizlendiğinden emin olunana kadar tekrarlandı.
- 4) DNA solüsyonuna, fenol kalıntısını temizlemek için 500 µL kloroform eklendi. 5-10 saniye vortekslendikten sonra 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında oluşan 2 farklı fazdan bu kez altta kalan sıvı faza hızlı bir şekilde ulaşıp dikkatlice pipetlenerek kloroform uzaklaştırıldı.
- 5) DNA örneklerine 1.000 µL soğuk %95'lik etanol eklendi. Tüpler alt üst edilmek suretiyle DNA oluşumu gözlemlendi.
- 6) Tüpler -20 °C'de en az 2 saat bekletildikten sonra 12.000 rpm'de 15-20 dakika santrifüjlendi. DNA'nın dibe çöküp çökmediğine dikkat edilerek etanol döküldü ve tüpler kurumaya bırakıldı.
- 8) Kuruduktan sonra DNA pelletinin miktarına göre 30-100 µL TE ilave edilerek DNA'nın çözülmesi sağlandı ve örnekler kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklandı.

Standart izolasyon yöntemiyle izole edilen ve Fenol- kloroform ekstraksiyonu ile muamele edilen gDNA'lardan PZR ile sonuç alınamayanlar için ticari kit ile yeniden

gDNA izolasyonu yoluna gidildi. Fermentas gDNA Purifikasyon Kiti ile izolasyon protokolü şu şekildedir;

Fermentas gDNA purifikasyon Kiti ile gDNA İzolasyonu

1. 500 µl taze kan ephendorf tüpüne kondu.
2. Üstüne 1.000 µl soğuk steril su eklendi ve altüst edilerek karıştırıldı.
3. 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüjden sonra örnekler tekrar 500 µl su eklenerek altüst edildi.
5. 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip süpernatant döküldü.
6. Pellete 200 µl TE (pH=7,5, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) eklendi. Pellet resüspanse edilerek dağıtıldı.
7. 400 µl lizis tamponu (pH=8,2 10 mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM EDTA) eklenip altüst edildi.
8. Örnekler 65 °C'de 10 dakika bekletildi.
9. Örnekler 600 µl kloroform eklenip altüst edildi.
10. 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek kloroform çöktürüldü.
11. Üst fazda kalan DNA yeni bir tüpe alınarak üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu (80 µl presipitasyon solüsyonu stok, 720 µl dH₂O) eklendi ve altüst edildi.
12. Örnekler 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
13. Santrifüj sonrasında süpernatant döküldü ve pellet 1.2 M 100 µl NaCl'de çözüldü.
14. 300 µl soğuk etanol eklenerek hafif hafif karıştırıldı.
15. Örnekler 1 gece – 20 °C'de bekletildi.
16. Ertesi gün örnekler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
17. Santrifüj sonrasında üstteki etanol uzaklaştırıldı.
18. Örnekler eklenen yoğun NaCl'den dolayı tuz birikmesi olduğu için %70'lik etanolle yıkandı.
19. 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında etanol döküldü ve uçuruldu.

20. Çöken örneklere 100-200 µl dH₂O eklenip vortekslendi. 55-60 °C'de su banyosunda bekletilip gDNA'nın tamamen çözünmesinden sonra etiketlenerek -20 °C'de saklandı.

Presipitasyon Solüsyonu Hazırlanması

- Presipitasyon solüsyonu stok (Fermentas kit) 80 µl
- dH₂O 720 µl

3.2.2. PZR Yöntemi

PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi, DNA polimeraz enzimi ve 1 çift oligonükleotit primeri kullanarak kalıp DNA'dan hedef gen bölgesinin invitro olarak çoğaltılması (amplifikasyon) esasına dayanır. PZR'nin her bir döngüsünde 3 temel basamak vardır ve 30 döngü sonunda hedef DNA bölgesinin milyonlarca kopyası elde edilebilir.

Birinci basamak, amplifikasyon için DNA'nın denatürasyonudur. Amplifiye edilen DNA saf olmayabilir ve çok çeşitli kaynaklardan, örneğin genomik DNA'dan, kurumuş kan ve semen gibi adli tıpta önemi olan maddelerden, tıbbi kayıtlar için saklanmış kuru örneklerden, tek bir saç telinden, mumya kalıntılarında ve fosillerden gelmiş olabilir. Bu kaynaklardan elde edilen çift zincirli DNA, yaklaşık 90°C'de ısıtılmak suretiyle yaklaşık 5 dakikalık süre içerisinde denatüre edilerek tek zincirli duruma getirilir.

İkinci basamak, primer sekansların tek zincirli haldeki kalıp DNA'lara bağlanması aşamasıdır. Bu primerler sentetik oligonükleotitlerdir ve PZR tekniğinde 2 farklı primer kullanılır. Bunların her biri, DNA'nın iki zincirinden yalnızca bir tanesine komplementer olarak düzenlendiği için onların 3' uçları da birbirine zıt yönde uzanır.

Üçüncü basamak, kalıp DNA'ya bağlanan primerlerin uzatılmasıyla gerçekleştirilen gerçek amplifikasyondur. Bu, DNA polimeraz enziminin reaksiyon karışımına

eklenmesiyle gerçekleştirilir. 30 döngü sonucunda hedef DNA'nın miktarı milyonlarca kez çoğaltılmış olur. PZR işlemi termosaykır olarak isimlendirilen bir cihaz ile otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. Bu cihaz önceden programlanarak istenilen miktarlarda amplifiye edilmiş DNA'nın üretilmesini sağlamaktadır (Bahçeci, 1999). Bu çalışmada uygulanan PZR koşulları çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4 : 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 1dakika	30 Döngü
60 °C'de 45 saniye	
72 °C'de 45 saniye	
72 °C'de 5 dakika	1 Döngü

PZR'da Kullanılan Sarf Malzemeler

- GSTM1 Forward primeri (Biobasic, Biogen)
- GSTM1 Reverse primeri (Biobasic, Biogen)
- GSTP1 Forward primeri (Biobasic, Biogen)
- GSTP1 Reverse primeri (Biobasic, Biogen)
- MgCl₂ (Biogen)
- DNA Markır (100-1500 bç) (Biogen)
- Taq Polimeraz (Biogen)
- dNTP karışımı (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) (Biogen)

Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği ise izelge 5’de özetlenmiştir.

Çizelge 5 : PZR için kullanılan içerik

Steril saf su	19.7 μ L
Tampon (Extag)	5 μ L
dNTP karışımı (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) (Extag)	4 μ L
GSTM1 Forward primeri (10 μ M)	4 μ L
GSTM1 Reverse primeri (10 μ M)	4 μ L
GSTP1 Forward primeri (10 μ M)	4 μ L
GSTP1 Reverse primeri (10 μ M)	4 μ L
Genomik DNA	5 μ L
Taq polimeraz (Extag)	0.3 μ L
Toplam Hacim	50 μ L

Çalışmamızda internal kontrol olarak 420 kb uzunluğundaki GSTP1 gen bölgesi amplifiye edilmiştir. Tüm bireylerde mevcut olan bu genin amplifikasyonu ile PZR’nin sorunsuz olarak gerçekleştiği ortaya konmuştur. Bu amaçla GSTP1 gen bölgesine uygun E6F ve E6R olmak üzere 2 adet primer kullanılmıştır. GSTP1 için kullanılan primerlerin nükleotit dizilimi aşağıda verilmiştir:

E6F: 5' GGG AGC AAG CAG AGG AGA AT 3'

E6R: 5' CAG GTT GTA GTC AGC GAA GGA G 3'

GSTM1 geninin uzunluğu ise 273 kb olup elektroforez sonrası internal kontrol GSTP1 geninden rahatlıkla ayırt edilebilmiştir. GSTM1 gen bölgesine uygun E4F ve E5R olmak üzere 2 adet primer kullanılmıştır. GSTM1 için kullanılan primerlerin nükleotit dizilimi aşağıda verilmiştir;

E4F: 5' CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG 3'

E5R: 5' CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC 3'

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünleri olan GSTM1 ve GSTP1 genlerine ait DNA segmentleri agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Elektroforez, elektriksel ortamda örneklerin moleküler ağırlıklarına göre araştırılması esasına dayanır. DNA molekülleri yapısında bulunan fosfat grubundan dolayı negatif (-) yüklüdür. Bu yüzden elektroforez sırasında pozitif (+) kutba doğru ilerler.

Agaroz; agarın yüksek oranda saflaştırılmış, kahverengi alglerden elde edilen bir polimer formudur. DNA molekülü elektriksel bir ortamda agaroz jelde yürütüldüğünde büyüklüğünün logaritması ile ters orantılı olarak yürür ve jelde küçük parçalar büyük parçalara göre daha hızlı hareket eder.

Agaroz Jel Hazırlanması

Çalışmamızda elektroforez için %1'lik agaroz jel kullanıldı. %1'lik agaroz jel için; 0.3 gr. Agaroz tartıldı, 25 mL TBE (tris buffer EDTA) içerisinde çözülerek kaynatıldı (Raven ve Johnson, 1996).

Tank Tamponu (TBE)

Agaroz jel elektroforezi çalışmalarında tank tamponu olarak Tris-Borik asit- EDTA (TBE) kullanılmıştır. Bu tampon konsantre stok (5xTBE) olarak hazırlanmış, çalışmalar için 1 x TBE tamponu olarak kullanılmıştır.

5 x TBE Tamponu İçeriği şu şekilde oluşturulmuştur;

- Trizma Baz 54 g
- Borik Asit 27.5 g
- EDTA (0.25 M) 8mL
- Distile Su 1000 mL

Örnek Yükleme Tamponu

Örneklerin agaroz jeldeki kuyucuklara aktarılabilmesi için örnek yükleme tamponu kullanılmıştır.

1 x Örnek Yükleme Tamponu Bileşimi Şöyledir;

- Bromfenol Mavisi % 0.25
- Gliserol (suda) % 30

Örnek yükleme tamponu hazırlandıktan sonra mikro tüpe bir miktar alınıp 4°C’de ve geri kalanı da -20°C’de saklanmıştır.

15 µL PZR ürününe 4 µL jel yükleme tamponu eklenerek örnekler jele yüklenmiştir. Çalışmamızda sırasında, elektroforez tankı güç kaynağına bağlanmış ve 100 V akım şiddetinde 60-70 dakika boyunca örnekler yürütülmüştür. Bu süre sonunda, agaroz jeldeki DNA bantlarını görünür hale getirmek için nükleotitlere bağlanan Etidyum Bromür’de yaklaşık olarak 10 dakika bekletilerek boyanmaları sağlanmıştır. PZR sonucu oluşan ürünler, aynı jele yüklenen marker DNA (1 kb ladder) ile karıştırılarak değerlendirilmiştir. DNA bantları jel görüntüleme sisteminde analiz edilmiştir.

Etidyum Bromür Stok Çözeltisi

Jele yüklenip yürütülen DNA moleküllerinin görüntülenmesinde etidyum bromür kullanılmıştır. DNA moleküllerinin oluşturduğu bantlar etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole (UV) ışık altında floresan görüntü vermektedir. Etidyum bromür stok çözeltisi 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve 4°C’de saklanmıştır. Jel yürütüldükten sonra 1 mg/mL etidyum bromür içeren suda 10 dakika bekletilerek boyandıktan sonra UV ışık altında görüntü elde edilmiştir.

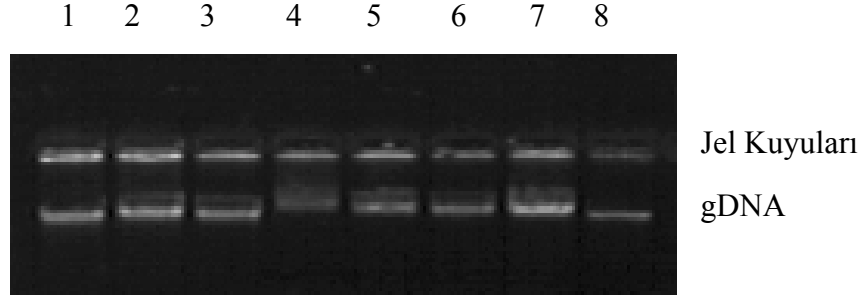
İstatistiksel Değerlendirmeler

GSTM1 genotipi ile ilgili 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, 2001).

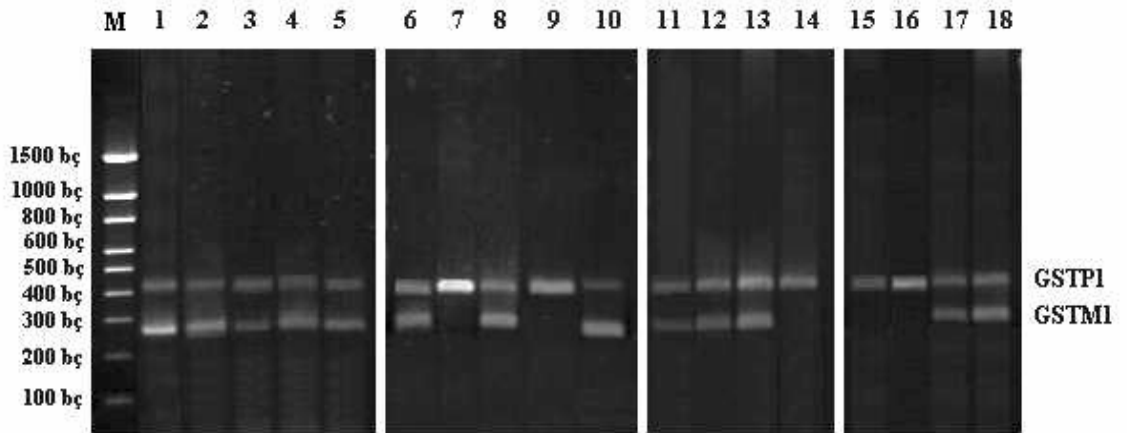
4. BULGULAR

Çalışmamızda 30 akciğer kanseri hastası ve 30 sağlıklı birey GSTM1 geni varlığı bakımından değerlendirildi. Öncelikle hasta ve kontrol birey kanlarından (lökositten yüksek konsantrasyon tuz yöntemi ile) gDNA izole edildi (Şekil 9).



Şekil 9 : gDNA'ların jel elektroforez görüntüsü; 1-8; hasta ve kontrol örnekleri

Her iki grup kanlarından izole edilen bu gDNA'lar ile multipleks PZR yapıldı ve GSTP1 geni internal kontrol olarak kullanıldı. PZR ile amplifiye edilen GSTM1 geninin varlığı veya delesyonu jel elektroforezi sonrasında UV görüntüleme sistemi kullanılarak belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10: PZR sonuçlarının jel elektroforezi ile değerlendirilmesi; M: 100-1500 bç'lik DNA markır, 1-18: hasta ve kontrol örneklerinde 273 bç'lik GSTM1 ve 420 bç'lik GSTP1 PZR ürünleri.

Jel analizi bulgularına göre; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 17, 18 numaralı örneklerin genotipleri GSTM1 (+) iken 7, 9, 14, 15, 16 numaralı örneklerin genotipleri GSTM1(-) (delesyon) olarak belirlenmiştir. İnternal kontrol geni olarak

PZR'ye dahil edilen 420 bç'lik GSTP1 geni tüm örneklerde tespit edilmiş olup polimeraz zincir reaksiyonlarının sorunsuz ve güvenilir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.

İstatistiksel analizler sonucunda, GSTM1 (-) genotipine akciğer kanseri hastalarında % 46.7 (n=14), kontrol grubunda ise % 16.66 (n=6) oranında rastlanmıştır. GSTM1 (+) genotipi frekansı hastalarda % 53.3 (n=16) iken kontrol bireylerde % 83.34 (n=24)'tür (Çizelge 6).

Çizelge 6: Hasta ve Kontrollerde GSTM1 Genotip Frekansları

GRUP	GSTM1 (-)		GSTM1 (+)		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı
Kontrol	5	16.66	25	83,34	30
Hasta	14	46,7	16	53,3	30
TOPLAM	19	31.67	41	68.33	60

Fisher'in Kesin Ki-Kare Testi: 4,80, P:0,0251 (OR: 0.228, CI: 0.068-0.758)

Hastaların GSTM1 genotip frekansları ile akciğer kanseri tipleri arasındaki ilişki incelendiğinde; gerek küçük hücreli akciğer kanseri ile gerekse de küçük hücreli dışı akciğer kanserinin GSTM1 delesyonu ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (P:0.642). Hastaların cinsiyeti ile GSTM1 delesyonu arasında da bir ilişki bulunmamıştır (P:0.261) (Çizelge 7).

Çizelge 7: Hastaların GSTM1 Genotip Frekansları İle Cinsiyet ve Akciğer Kanseri Tipleri Arasındaki İlişki

Özellik		GSTM1 (-)		GSTM1 (+)		Toplam		P
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet	Erkek	10	41,7	14	58,3	24	100,0	0,261
	Kadın	4	66,7	2	33,3	6	100,0	
Akciğer kanseri tipi	KHAK	7	46,7	8	53,3	15	100,0	0,642
	KHDAK	7	46,7	8	53,3	15	100,0	

KHAK : Küçük Hücreli Akciğer Kanseri, KHDAK : Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glutasyon S-transferaz enzim sistemi, bir çok ksenobiyotik ve endojenik maddenin biyotransformasyonu ve detoksifikasyonunda rol alan çok fonksiyonlu bir enzim ailesinden oluşmuştur.

Kompleks bir sistem olan detoksifikasyon mekanizması ayrıntılı olarak incelendiğinde; toksik etkiden korunmanın, o maddenin aktif metaboliti ile detoksifikasyonu arasındaki dengeye bağlı olduğu anlaşılmıştır. Aktif metabolit oluşumu ile detoksifikasyonun hızları arasında denge mevcut olduğu sürece hücre hasarı görülmez. Bu dengenin bozulması halinde yani; aktif metabolit oluşumu artar ve/veya detoksifikasyon kapasitesi azalırsa toksik etki görülür (Vural, 1996).

Detoksifikasyon mekanizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genlerdeki genetik polimorfizmin karsinojenlerin detoksifikasyon etkinliğinde bireysel farklılıklara sebep olduğu ve bu durumun özellikle akciğer kanseri ile yakından ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

Polisiklik aromatik hidrokarbonların detoksifikasyonunda rol oynayan GSTM1 geni GST gen ailesinin mu sınıfına ait bir gen olup polimorfik özellik göstermektedir.

GSTM1 geninin GSTM1*A, GSTM1*B ve GSTM1*0 olmak üzere üç alleli mevcuttur. GSTM1*0 delesyon allelidir ve bu allel bakımından homozigot bireyler aktif bir protein üretemezler. Öte yandan, GSTM1*A alleli GSTM1 A proteinini ve GSTM1*B alleli GSTM1 B proteinini kodlar. Bu proteinler fonksiyonel olarak benzer olup aktif enzim oluşumu için homo ve hetero – dimerler şeklinde bir araya gelerek detoksifikasyonda görev alırlar.

Bu gen bölgesinin önemi, polimorfik özellik göstermesi ve GSTM1*0 fenotipine çoğu populasyonda yüksek sıklıkta (% 40-60) rastlanmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca GSTM1*0 homozigotluğu, kanser de dahil olmak üzere bazı patolojilerin gelişimi ile ilişkilendirilmektedir.

GSTM1 (-) genotipine sahip bireylerin, epoksid türevlerinin toksik etkilerine karşı daha duyarlı oldukları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, epoksid ve türevlerine maruz kalan GSTM1 (-) genotipli bireylerde daha fazla sitogenetik hasar (Wiencke ve ark., 1990; Van Poppel ve ark., 1992), DNA eklentisi oluşumunda artış (Liu ve ark., 1991) ve bunların sonucunda özellikle akciğer ve mesane kanseri olmak üzere bazı kanser türlerine yatkınlığın arttığı belirlenmiştir.

GSTM1 polimorfizmi dünya genelinde ve ülkemizde araştırılmıştır. Bu çalışmalarda; Avrupa popülasyonunun % 45'inde, tüm insan popülasyonunun ise % 50'sinde homozigot delesyon (GSTM1 (-)) allelinin mevcudiyeti belirlenmiştir (Lin ve ark., 1994, Kihara ve ark., 1994, Zhong ve ark., 1993). Ülkemizde yapılan bir çalışmada; Türk toplumunda GSTM0 genotipinin % 47 oranında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 8). Çalışmamızda ise GSTM1 (-) genotipi frekansı hastalarda % 46.7 iken kontrol bireylerinde % 16.6 olarak saptanmıştır (Çizelge 5). Tespit ettiğimiz GSTM1 (-) oranı, özellikle sağlıklı birey bazında oldukça düşüktür.

Çizelge 8: Farklı Toplumlarda GSTM1 (-) Genotip Frekansı

Ülke	GSTM1 (-) Sıklığı (%)	Kaynak
Brezilya	% 48.6	Hatagima ve ark., 2000
Japonya	% 48.2	Harada ve ark., 1992
Çin	% 58.3	Board ve ark., 1990
Fransa	% 42.9	Laisney ve ark., 1984
İngiltere	% 54.5	Heagerty ve ark., 1996
Türkiye	% 47	Öke, 1996

GSTM1 geninin homozigot delesyonunun (GSTM1 (-)), hemen her tip akciğer kanserine karşı hassasiyeti arttırdığı bildirilmiştir (Jo-Figureas ve ark.,1997, Hou ve ark., 2000, Lewis ve ark., 2002, Pınarbaşı ve ark., 2003, Ioanna ve ark., 2003, Nazar-Stewart ve ark., 2003, Schneider ve ark., 2004, Vineis ve ark., 2004, Belogubova ve ark., 2004,). Ayrıca polimorfik genlerin metabolik polimorfizm ve akciğer kanseri riskiyle ilişkili rolleri geniş ölçüde incelenmiştir. Pek çok araştırmada, metabolize edici enzimlere ait polimorfik GST'ler gibi genlerin, akciğer kanserinde özellikle sigara tüketenlerde önemli olduğunu gösterilmiştir (Zhong ve ark., 1993; Alexandrie ve ark., 1994; Garcia ve ark., 1997; Brockmoller ve ark.,

1993). Mc Williams ve arkadaşları da gerçekleştirdikleri meta analiz çalışmasında; GSTM1 enziminin olmamasının akciğer kanseri gelişmesi için bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuşlardır (Mc Williams ve ark., 1995).

Buna karşın, GSTM1 delesyonunun akciğer kanserine yol açmayacağını ifade eden çalışmalar da mevcuttur (Deakin ve ark., 1996; London ve Daly, 1995; Guembarovski ve ark., 2002; Yang ve ark., 2004; Chan-Yeung ve ark., 2004). Wang ve ark. ve Salazar ve ark. ayrı ayrı gerçekleştirdikleri çalışmalarda GSTM1(-) delesyonunun tek başına akciğer kanseri gelişimine etkisi olmadığını ancak GSTM1 (-) ve GSTP1 (-) genotipli bireylerde bu riskin arttığını ortaya koymuşlardır (Wang ve ark., 2003; Salazar ve ark., 2003).

GSTM gen ailesinin detoksifikasyon mekanizmasındaki öneminin detaylı bir şekilde araştırılması ile bu genlere olan ilgi artmıştır. Diğer kanser türleri ve birçok hastalıklar ile GSTM1 (-) genotipinin ilişkileri son yıllarda yoğun olarak çalışılmıştır. Özellikle mesane kanseri, prostat kanseri, kolon kanseri, hepatoselüler karsinoma gibi birçok hastalık GSTM1 yönünden değerlendirilmiştir.

Mesane kanserine yakalanma riskinin sigara içen ve GSTM1 (-) genotipli kişilerde daha fazla olduğu ortaya konulmuştur (Hirvonen, 1995; Lin ve ark., 1994; Kihara ve ark., 1994). Bununla birlikte Karagas ve ark., (2005) 354 mesane kanseri hastası ve 542 sağlıklı birey üzerinden yaptıkları çalışmada GSTM1 (-) genotipine sahip bayanlarda mesane kanseri gelişimine hassasiyetin olduğu belirlenmiştir. Aynı hassasiyetin erkek hastalarda olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalar ile birlikte GSTM1 (-) genotipine sahip bireylerde mesane kanseri gelişme riskinin GSTM (+) bireylere oranla fazla olduğu belirtilmektedir.

Son yıllarda GSTM1 geninin delesyonunun prostat kanseri gelişimine etkisi olup olmadığı konusu yoğunlukla çalışılmaktadır Mittal ve ark., (2004) Hindistan'da 103 prostat kanseri hasta ve 117 sağlıklı birey ile gerçekleştirdikleri çalışmada ise GSTM1 (-) genotipinin prostat kanseri gelişimine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Öte yandan GSTM1 (-) genotipli bireyler ile kolon kanseri (Loktionov ve ark., 2001, Ho-Shin ve ark., 2002), astım (Freidrin ve ark., 2002), sistemik lupus eritromatozus (Bae ve ark., 2005), hepatoselüler karsinoma (Jian ve ark., 2000) hastalıklarının gelişimi arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Kanserli hücrelerde görülen değişik gen anormallikleri doğrudan kanser etkeni olabilir. Bununla birlikte mevcut bilgiler ışığında riskli bireylerin belirlenmesinde GSTM1 geninin tek başına bir tümör belirleyicisi ya da teşhis parametresi olarak değerlendirilmesinin söz konusu olamayacağı anlaşılmaktadır. Öte yandan bu genin delesyonunun bazı kanser türlerine yatkınlığı arttırdığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda, GST izoenzimlerinden GSTM1 (-) genotipinin Isparta yöresi akciğer kanseri hastalarında ve sağlıklı kontrol bireylerinde görülme sıklığının araştırılması amaçlanmış, elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler GSTM1 gen delesyonunun akciğer kanseri gelişimine yol açabileceğini ortaya koymuştur.

6. KAYNAKLAR

Alexandrie, A.K., Sundberg, M.I., Seidegard, J., Tornling, G., Rannug, A., 1994, Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis*; 15:1785-1790.

Bae, S.C., Kim, S.J., Sung, M.K., 2002. "Impaired antioxidant status and decreased dietary intake of antioxidant in patients with systemic lupus erythematosus" *Rheumatol Int.* 22: 238-243.

Bahçeci, Z., 1999. "Moleküler Biyoloji", s:180-204, Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir.

Belogubova, E.V., Togo, A.L., Karpova, M.B., Kuligina, E.S., Buslov, K.G., Ulibina, J.M., Lemehov, V.G., Romanenko, S.M., Shutkin, V.A., Hanson, K.P., Hirvonen, A.I., Evgeny, N., 2004. A Novel Approach for Assessment of Cancer Predisposing Roles of GSTM1 and GSTT1 Genes: Use of Putatively Cancer Resistant Elderly Tumor-free Smokers As the Referents. *Lung Cancer*, 43(3): 259-266.

Board, P.G., 1981, Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man, *Am.J.Hum.Genet.* 33:36-43.

Board, P.G., Coggan, M., Johnston, P., Ross, V., Suzuki, T., Webb, G., 1990. "Genetic heterogeneity of human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmacol. Ther.* 48: 357-369.

Booth, J., Boyland, E. And Sims, P., 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79: 516-524.

Brockmoller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Nitz, M., Roots, I., 1993, Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class Mu isoenzymes μ and ρ in lung cancer patients and controls. *Cancer Res*; 53: 1004-1011.

Carmichael, J., Forrester, L. M., Lewis, A. D., Hayes, J. D., Hayes, P. C. And wolf, C. R., 1988. Glutathione S-transferase isoenzymes and glutathione peroxidase activity in normal and tumor samples from human lung carcinogenesis. 9(9):1617-1621.

Chan, D. W. and Sell, S., 1994. Tumor Markers. In: "Tietz Textbook of Clinical Chemistry 2th Edition, Ed:Burtis, C. A. and Ashwood, E. R., s:897-927, W. B. Soundes Company, Philadelphia.

Chan-Yeung, M., Tan-Un, K.C., Tsang, M.S.M., Kenneth, W.T.H., Siu Pang, H., James, C.M.C., Lam, H., Wah, K., 2004. "Lung cancer susceptibility and polymorphisms of glutathione S-transferase genes in Hong Kong", *Lung Cancer* 45(2):155, 6p.

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.

Deakin, M., Elder, J., Hendrickse, C., Peckam, D., Baldwin, D., Pantin, C., Wild, N., Leopard, P., Bell, D.A., Jones, P., Duncan, H., Brannigan, K., Allderson, J., Fryer, A., Strange, R.C. 1996. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*, 17:881-884

Eimoto, H., Tsutsumi, M., Nakajima, A., Yamamoto, K., Takashima, Y., Maruyama, H. and Konishi, Y., 1988. Expression of the glutathione S-transferase placental form in human lung carcinomas. *Carcinogenesis*, 9(12): 2325-2327.

Faulder, C.G., Hirrel, P.A., Hume, R. And Strange, R.C., 1987. Studies of the development of basic, neutral and acidic isoenzymes of glutathione S-transferase in human liver, adrenal, kidney and spleen., *Biochem.J.*, 241:221-228.

Federici, G., Di Ilio, C., Sacchetta, P., Polidoro, G. and Bannister, J.V., 1985. The isolation, characterisation and kinetics of glutathione S-transferase from human platelets. *Int. J. Biochem.*, 17(5):653-656.

Freidrin, M.B., Brage, E.Y., Ogorodova, L.M., Puzyrev, V.P., 2002. "Polymorphism of the Glutathione S-transferase genes (GSTT1, GSTM1) in West Siberian patients with atopic bronchial asthma", *Molecular Biology*, 36(4).

Fryer, A. A., Zhao, L., Allderse, J., Baggild, M.D., Perret, C. W., Clayton, R. N., Jones, D. W., Strange, R. C., 1993. The glutathione S-transferases: polymerase chain reaction studies of the GSTM1 genotype in patients with pituitary adenomas. *Carcinogenesis* 14(4): 563-566.

Garcia-Closas, M., Kelsey, K.T., Wiencke, J.K., Xu, X., Wain, J.C., Christiani, D.C., 1997. A case control study of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1, cigarette smoking and lung cancer susceptibility (Massachusetts, USA), *Cancer Causes control*; 8:544-553.

Guembarovski, R.L., D'Arche, L.P.G., Colus, I.M.S., 2002. "Glutathione S-transferase Mu (GSTM1) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a healthy Brazilian population", *Genetics and Molecular Biology*, 25(4), 357-360.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gattmaitan, Z., Arias, I.M. and Jakoby, W.B., 1974. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin a major binding protein of liver. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 71:3879-3882.

Harada, S., Misawa, S., Nakamura, T., Tanaka, N., Ueno, E., Nozoe, M., 1992. "Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. *Hum Genet.* 90: 62-64.

Hatagima, A., Klauto-Guimares, M.N., Da Silva, F.P., Cabello, P.H., 2000. "Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations", *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 709-713.

Heagerty, A.H.M., Smith, A., English, J., Lear, J., Perkins, W., Bowers, B., Jones, P., Gilford, J., Aldersea, J., Fryer, A.A., Strange, R.C., 1996. "Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas: significant interactions between glutathione S-transferase GSTM1 genotypes skin type and male gender. *B. J. Cancer* 73: 44-48.

Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C., 1991. Toward the primery prevention of cancer. *Science*, 24:1131-1138.

Hirvonen, A., 1995. "Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J. Occup. Environ. Med.* 37: 37-41.

Ho-Shin, J., Ku, J.L., Shin, K.H., Shin, Y.K., Kang, S.B., Park, J.G., 2002. "Glutathione S-transferase M1 associated with cancer occurrence in Korean HNPCC families carrying the hMLH1/hMSH2 mutation", *Oncology Reports* 10: 483-486.

Hou, S., Ryberg, D., Falt, S., Deverill, A., Tefre, T., Borresen, A., Haugen, A., Lambert, B., 2000. GSTM1 and NAT2 polymorphisms in operable and non-operable lung cancer patients, *Carcinogenesis*, 21: 49-54.

Husby, P., Srail, K. and Ketterer, B., 1981. Effect of ligandin on the efflux of co-deuteroporphyrin from isolated rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100:651-655.

Ioanna, A.D., Miyakis, S., Georgatou, N., Spandidos, D.A., 2003. "Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk", *Oncology reports* 10: 1829-1835.

Jian, C.B., Fu, M.S., Li, S., Jian, R.W., Xiao, H.W., Gong, C.C., Jin, B.W., 2000. "Susceptibility to hepatocellular carcinoma associated with null genotypes of GSTM1 and GSTT1" *World J. Gastroentero*, 6(2): 228-230.

Jo-Figuras, M., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Galan, M.C., Fuentes, M., Raman, M., Rodamilans, M., Huguet, E., Corbella, J., 1997. "Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterranean", *Carcinogenesis*, 18: 1529-1533.

Karagas, M.R., Sunyeong, P., Warren, A., Hamilton, J., Nelson, H.H., Mott, L.A., Kelsey, K.T., 2005. "Gender, smoking, glutathione S-transferase variants and bladder cancer incidence: a population-based study", *Cancer Letters*; 219(1), p63, 7p.

Kayaalp, S. O., 1994. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi farmakoloji 1. Cilt, Güneş Yayınevi.

Ketterer, B., Tan, K.H., Meyer, D.J. and Coles, B., 1987. Glutathione transferases: A possible role in the detoxication of DNA and lipid hydroperoxides. In: "Glutathione S-transferases and carcinogenesis", Ed: Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds. P:149-163. Taylor and Francis, London

- Kihara, M., Kihara, M., Noda, K., 1994. "Lung cancer risk of GSTM1 null genotype in dependent on the extent of tobacco smoke exposure. *Carcinogenesis* 15: 415-418.
- Kutluk, T., Kars, A., 1994. "Kanser konusunda genel bilgiler", *Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları*, 6.Baskı, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- Kyoung-Ho, L., Soo-Hun, C., Yun-Chul, H., Kwan-Hee, L., Ho-Jang, K., İinmi, C., Daehee, K., 2003. "Urinary PAH Metabolites influenced by genetic polymorphisms of GSTM1 in male hospital incinerator workers", *J. Occup Health*; 45: 168-171.
- Laisney, V., Van Cong, N., Gross, M.S., Frezal, J., 1984. "Human genes for glutathione S-transferases. *Hum. Genet.* 68: 221-227.
- Lewis, S.J., Cherry, N.M., Niven, R.M., Barber, P.V., Povey, A.C., 2002. "GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk", *Cancer Letters*; 180(2), p165, 7p.
- Lin, H.J., Han, C.Y., Bernstein, D.A., Hsiao W., Lin, B.K., Hardy, S., 1994. "Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 15: 1077-1081.
- Liu, Y.H., Taylor, J., Linko, P., Lucier, G.W. and Thompson, C.L., 1991. "Glutathione S-transferase μ in human lymphocyte and liver: role in modulating formation of carcinogen-derived DNA adducts. *Carcinogenesis* 12, 2269-2275.
- Loktionov, A., Watson, M.A., Gunter, M., Stebbins, W.S.L., Speakman, C.T.M., Bingham, S.A., 2001. "Glutathione S-T-transferase gene polymorphism in colocteral cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulating factor" *Carcinogenesis* 22(7), 1053-1060.
- London, S.J., Daly, A.K., 1995. "Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk among African-Americans" *Journal of the National Cancer Institue*, 87(16), p1246, 8p.
- London, S.J., Juan, J.M., Chung, F.L., Gao, Y.T., Coetzee, G.A., Ross, R.K., Yu, M.C., 2000. "Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China" *Lancet*, 356, 724-729.
- Malats, N., Camus-Radon, A.M., Nyberg, F., Ahrens, W., Contantinescu, V., Mukeria, A., Benhamou, S., Batura-Gabryel, H., Bruske-Hohlfeld, I., Simonata, L., Menezes, A., Lea, S., Lang, M., Boffeta, P., 2000. "Lung cancer risk in nonsmokers and GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphism", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; 9:827-833.
- Mannervik, B., 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.* 57:357-417.

Marcus, C.J., Habig, W.H. and Jakoby, W.B., 1978. Glutathione transferase from human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 188(2):287-293.

Mc Quaid, S., O'Brein, A., Butler, M.R. and Humphries, P., 1988. Transcriptional activation of glutathione S-transferase π gene in human ureteric and bladder carcinomas. *Cancer letters*. 39:209-216.

Mc Williams, J.E., Sanderson, B.J.S., Haris, E.L., Richert-Boe, K.E., Henner, W.D., 1995. Glutathione S-transferase M1 deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Preven*;4: 589-594.

Mittal, R.D., Srivastava, D.S.L., Mandhani, A., Kumar, A., Mittal, B., 2004. "Polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes in prostate cancer: a study from North India", *Indian Journal of Cancer*, 41(3).

Morgenstern, R., Hakan, W. And Joseph, W.D., 1987. Mechanisms of activation of the microsomal glutathione transferase. In: "Glutathione S-transferases and carcinogenesis", Ed: Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds. s:29-37. Taylor and Francis, London.

Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W., 1990. Harper'in *Biyokimyası*, syf.; 811-817, Çev.: Menteş G., Ersöz B., Barış Kitabevi, İstanbul.

Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S., Kawajiri, K., 1993. Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.*, 53: 2994-2999.

Nazar, S. V., Arno, G. M., David, L. E., Emily, W., Sigrid, K. H., Zhong-Tai, L., Pat, S. And Noel, S. W., 1993. Glutathione S-transferases., *Cancer Research*. 53: 2313-2318.

Nazar-Stewart, V., Vaughan, T.L., Stapleton, P., Van Loo, J., 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, 12p.

Nitsu, Y., Takahashi, Y., Saito, T., Hirata, Y., Arisato, N., Maruyama, H., Kogho, Y. And Listowsky, I., 1989. Serum Glutathione S-transferase- π as a tumor marker for gastrointestinal malignancies. *Cancer* 63: 317-323.

Öke, B., 1996. "GSTM1 Genotip Frekansının Türk Toplumundaki Dağılımının Belirlenmesi", Y. Lisans tezi, İ.Ü. Saç. Bil. Ens. Biyokimya AD., İstanbul.

Özdamar, K., 2001. SPSS ile Biyoistatistik, 4. baskı, s:340-343, Kaan Yay., Eskişehir.

Pearson R.W., Vorachek, R.W., Xu, S., Berger, R., Hort, I., Vannais, D., Peterson, D., 1993. Identification of class Mu glutathione transferases genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13., *Am.J.Hum.Genet.*, 53: 220-233.

Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J., Hollier, E., Bolt, H. M., Ketterer, B., Taylor, J. B., 1993. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1) :

cDNA cloning and characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.*, 300: 271-276.

Pickett, C.B., 1989. Glutathione S-transferases: Gene Structure, regulation, and biological function., *Annu.Rev. Biochem.*, 58:743-764.

Pinarbasi, H., Silig, Y., Cetinkaya, O., Seyfikli, Z., Pinarbasi, E., 2003. "Strong association between the GSTM1-null genotype and lung cancer in a Turkish population", *Cancer Genetics & Cytogenetics*; 146(2): 125, 5p.

Raven H P., Johnson B G., 1996. *Biology*, s: 693-699, Mcgraw-Hill, Boston.

Rodwell, V.W., 1985. General properties of enzymes, in "Harper's Review of Biochemistry", 20th Edition, s: 52-64.USA.

Salazar, N.C., Carlos, H.S, Salama, A., Salama, A.S., Zwischenberger, J.B., William, W.A., 2003. "Combined effect of MPO, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on chromosome aberrations and lung cancer risk" *International Journal of Hygiene & Environmental Health*, 206(6): 473, 11p.

Sato, K., Kimihiko, S., Ichiro, H., Shigeki, T., Yassuhi, S., Yuhko, S., Noburu, T., Yukio, I. And Akio, K., 1987. Placental glutathione S-transferase as a marker for preneoplastic tissues. In: "Glutathione S-transferases and carcinogenesis", Ed:Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds. s:127-137. Taylor and Francis, London.

Schneider, J., Bernges, U., Philipp, M., Woitowitz, H.J., 2004. "GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking", *Cancer Letters*, 208(1): 65, 10p.

Senjo, M., Ishibashi, T. And Imar, Y., 1985. Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrom b5 from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260:9191-9196.

Simons, P.C. and Jagt, D.L.V.,1977. Purification of GST from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry.*, 82:334-341.

Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A., 2001. "Glutathione-S-Transferase Family of Enzymes". *Mutation Research*, 482: 21-26.

Suzuki, T., Shaw, D.C. and Board, P.G., 1991. Purification and characterization of acidic Glutathione S-transferase 6 from human brain. *Biochem. J.*274:405-408.

Trakshel, G.M. and Maines, M.D., 1988. Characterization of glutathione S-transferases in rat kidney. *Biochem.J.*252:127-136.

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.

Tu, C.P.D., Hui-Chen, J.L. and Chanma, C.R., 1987. The rat glutathione S-transferases supergene family: Molecular basis of gene multiplicity. In: "Glutathione

S-transferases and carcinogenesis”, Ed:Hayes, D.J., Mantle, T.J., Pickett, C.B., eds. s:87-109. Taylor and Francis, London.

Ünsal, İ., 1990. Koyun karaciğeri glutatyon S-transferazının saflaştırılması ve izoenzimlerinin tanımlanması., Doktora tezi, Ankara.

Van Poppel, G., De Vogel, N., Van Balderen, P.J. and Kok, F.J., 1992. “Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme μ . Carcinogenesis, 13:303-305.

Vatansev, H., 1995. Çeşitli kanser vakalarında serum glutatyon S-transferaz (GST) izoenzimlerinin araştırılması, S.Ü. Doktora tezi, s:24-25, Konya.

Vineis, P., Veglia, F., Anttila, S., Benhamou, S., Clapper, M.L., Dozla, V.R., Hirvonen, D., Kremers, A., Loic, P.L.M., Pastorelli, R., Agneta, R., Romkes, M., Schoket, B., Strange, R.C., Garte, S., Taioli, E., 2004. “CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene-gene interactions. Biomarkers, 9(3):298, 8p.

Vural, N., 1996. Toksikoloji, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73.

Wang, J., Deng, Y., Cheng, J., Ding, J., Tokudeme, S., 2003. “GST genetic polymorphisms and lung adenocarcinoma susceptibility in a Chinese population”, Cancer Letters, 201(2):185, 9p.

Wiencke, J.K., Wrensch, M.R., Müike, R., Zuo, Z.F., Kelsey, K.T., 1997. “Population-based study of glutathione S-transferase mu gene deletion in adult glioma cases and controls. Carcinogenesis 18: 1431-1433.

Yang, X.R., Wacholder, S.X., Zhaoyi, D., Michael, C., Gold, V., Brown, B., Stone, L.M., Fraumeni, J.F., Caparaso, N.E., 2004 “CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in relation to lung cancer risk in Chinese women”, Cancer Letters; 214(2): 197, 8p.

Zhong, S., Spurr, N.K., Hayes, J.D., Wolf, C.R., 1993. Deduced amino acid sequence, gene structure and chromosomal location of a novel human class Mu glutathione S-transferase; GSTM14. Biochem J. 291:41-50.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mümin POLAT

Doğum Yeri : Antalya

Doğum Yılı : 1979

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise 1993-1996 : Antalya Gazi Lisesi

Lisans 1996-2000 : S.D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi :

2000-2002 : Sözleşmeli Biyolog; S.D.Ü. Temel ve Uygulamalı Araştırma ve Uygulama Merkezi,

2002- : Okutman; S.D.Ü. Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Merkezi (Birim Sorumlusu).