

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİDE ANTRUM MUKOZA ÖRNEKLERİNDE SİTOKROM P450 GEN
EKSPRESYONUNUN mRNA DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ**

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog Pakize Cantürk

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zeki TOPÇU

İZMİR
2008

TEŐEKKÜR

Tezin hazırlanması esnasında emeği, güveni ve üstün sabrı için danışmanım Prof. Dr. Zeki Topçu' ya,
Deneylere katkılarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Vildan Caner' e
Klinik örneklerin toplanmasında yardımlarından dolayı Prof. Dr. Salih Ulus Akarca ve Uzm. Dr. Nevin Oruç' a,
İstatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Mehmet Zencir' e,
Tezin hazırlanma sürecindeki yardımlarından dolayı Sevil Zencir' e,
Desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım...

İzmir, 2008

Pakize Cantürk

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİDE ANTRUM MUKOZA ÖRNEKLERİNDE SİTOKROM P450 GEN
EKSPRESYONUNUN mRNA DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ**

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog Pakize CANTÜRK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Zeki TOPÇU

İZMİR

2008

İÇİNDEKİLER

Tablolar dizini.....	vi
Resim ve şekiller dizini.....	vii

BÖLÜM I

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1.1. Sitokrom P450 sistemi	1
1.2. GENEL BİLGİLER.....	2
1.2.1. Sitokrom P450 yapısı ve gen ekspresyonu.....	2
1.2.2. Midede sitokrom P450 gen ekspresyonu.....	6
1.3 CYP Aileleri.....	7
1.3.1.CYP1 Ailesi	7
1.3.1.1. CYP1A1 Alt ailesi.....	7
1.3.1.2.CYP1A2 Alt ailesi.....	8
1.3.2. CYP2 Ailesi.....	8
1.3.2.1. CYP2A Alt ailesi	8
1.3.2.2. CYP2B Alt ailesi	9
1.3.2.3. CYP2C Alt ailesi	10
1.3.2.4. CYP2D Alt ailesi	10
1.3.2.5. CYP2E Alt ailesi	11
1.3.3. CYP3 Ailesi.....	12
1.3.3.1. CYP3A Alt ailesi	12

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	14
2.2. Kullanılan cihaz ve aletler.....	14
2.3. Araştırma materyali.....	15
2.4. Laboratuvar çalışmaları.....	17
2.4.1. RNA İzolasyonu ve miktar tayini.....	17
2.4.2. <i>CYP 450</i> Geni PCR amplifikasyonu.....	18
2.4.2.1 cDNA Sentez basamakları.....	18
2.4.2.2. cDNA örnekleri için PCR reaksiyonu.....	19
2.4.3. PCR Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	20
2.4.4. REAL-TIME PCR.....	20

BÖLÜM III

3.1. BULGULAR.....	23
3.1.1. <i>CYP450</i> izoformlarının ekspresyonuna bağlı olarak gen frekans tabloları.....	35
3.1.2. Cinsiyete bağlı olarak <i>CYP450</i> izoformlarının ekspresyonu.....	35
3.1.3. Sigara içme alışkanlığının <i>CYP450</i> izoformlarının ekspresyonu üzerine etkisi.....	36
3.1.4. Alkol alışkanlığının <i>CYP450</i> izoformlarının ekspresyonu üzerine etkisi.....	37
3.1.5. Üreaz varlığının <i>CYP450</i> izoformlarının ekspresyonu üzerine etkisi.....	38
3.1.6. Yaşın <i>CYP450</i> izoformlarının ekspresyonu üzerine etkisi.....	39
3.1.7. Mide kanserinin <i>CYP450</i> izoformlarının ekspresyonu üzerine etkisi.....	40

BÖLÜM IV

4.1. TARTIŞMA.....	42
--------------------	----

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
------------------------	----

BÖLÜM VI

ÖZET.....	49
-----------	----

ABSTRACT.....	50
---------------	----

BÖLÜM VII

YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	51
-----------------------------	----

ÖZGEÇMİŞ.....	63
---------------	----

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. CYP Aileleri ve fonksiyonları.....	4
Tablo 2. Sitokrom P450 geninin eksprese edildiği belirlenen organlar.....	6
Tablo 3. Çalışmada yer alan bireylerin yaş, cinsiyet ve tanı özellikleri	16
Tablo 4. Spesifik CYP450 amlifikasyonu için kullanılan primer dizileri.....	19
Tablo 5. Real Time PCR Bileşenleri.....	21
Tablo 6. Genel PCR Programı.....	21
Tablo 7. İzofomlar için kullanılan özgün amplifikasyon reaksiyon koşulları.....	22
Tablo 8. CYP450 izofomlarının midede mRNA düzeyinde ekspresyonu.....	34
Tablo 9. Eksprese olan <i>CYP</i> izofomlarının frekans tablosu.....	35
Tablo 10. <i>CYP</i> izofomlarının cinsiyete bağlı istatistik değerleri.....	36
Tablo 11. <i>CYP</i> izofomlarının sigaraya bağlı istatistik değerleri.....	37
Tablo 12. <i>CYP</i> izofomlarının alkole bağlı istatistik değerleri.....	38
Tablo 13. <i>CYP</i> izofomlarının üreaza bağlı istatistik değerleri.....	39
Tablo 14. <i>CYP</i> izofomlarının yaşa bağlı istatistik değerleri.....	40
Tablo 15. <i>CYP</i> izofomlarının kansere bağlı istatistik değerleri.....	41

RESİM VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. CYP2D6 yapısı.....	3
Şekil 2. β -Globin primeri ile PCR amplifikasyonu.....	23
Şekil 3. CYP1A1 primeri ile PCR amplifikasyonu.....	24
Şekil 4. CYP1A2 primeri ile PCR amplifikasyonu.....	24
Şekil 5. CYP2A6 primeri ile PCR amplifikasyonu.....	24
Şekil 6. CYP2B6 primeri ile PCR amplifikasyonu.....	25
Şekil 7. CYP2D6 primeri ile PCR amplifikasyonu.....	25
Şekil 8. CYP2E1 primeri ile PCR amplifikasyonu.....	25
Şekil 9a. CYP1A1 için amplifikasyon eğrisi.....	26
b. CYP1A1 için erime eğrisi analizi.....	26
Şekil 10a. CYP1A2 için amplifikasyon eğrisi	27
b. CYP1A2 için erime eğrisi analizi.....	27
Şekil 11a. CYP2A6 için amplifikasyon eğrisi	28
b. CYP2A6 için erime eğrisi analizi.....	28
Şekil 12a. CYP2B6 için amplifikasyon eğrisi	29
b. CYP2B6 için erime eğrisi analizi.....	29
Şekil 13a. CYP2C için amplifikasyon eğrisi	30
b. CYP2C için erime eğrisi analizi.....	30
Şekil 14a. CYP2D6 için amplifikasyon eğrisi	31
b. CYP2D6 için erime eğrisi	31
Şekil 15a. CYP2E1 için amplifikasyon eğrisi	32
b. CYP2E1 için erime eğrisi analizi	32
Şekil 16a. CYP3A5 için amplifikasyon eğrisi.....	33
b. CYP3A5 için erime eğrisi analizi.....	33
Şekil 17 CYP2A6 kantitasyon grafiği.....	34

BÖLÜM I

1.1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1.1. SİTOKROM (CYP) P450 SİSTEMİ

İlaç etkileşimleri, aslında bir ilacın metabolik etkinliğinin bir başka ilaç tarafından değiştirilmesi sonucu meydana gelen farmakokinetik bir süreçtir. Bu süreçte yer alan temel sistem olan sitokrom P450 izoenzim sistemi, barsaklar, böbrekler, akciğer ve beyinde de bulunmakla birlikte; çoğunlukla karaciğerde hepatositlerin endoplazmik retikulumlarında bulunmaktadır. CYP enzimlerinin ekspresyonu, karakterizasyonu, fonksiyonu ve dokulardaki regülasyonu uzun zamandan beri ilgi çekmektedir. 1958 yılında Klinberg tarafından keşfedilmişlerdir (25). Sitokrom (CYP)P450 sistemi terimi, yapısında demir içeren protein grubunu tanımlamak üzere kullanılmaktadır. Dörtüzyüç elli sayısı, demir içeren bu grubun karbonmonoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığa ait dalga boyunun nanometre cinsinden değerini göstermektedir (25). CYP450 izoenzim sistemi steroidler, hormonlar, prostoglandinler, lipidler ve yağ asitleri gibi birçok endojen maddenin metabolizmasında ve özellikle oral olarak alınan ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonunda görevlidirler.

Birçok ilaç, kendine özgü CYP enzimleri aracılığıyla metabolize edilirler. Bu sebeple bu enzimlerin, hastaların farmakoterapiye cevaplarını belirlemede çok önemli bir rolleri vardır. Genellikle etkileri ilaçların etkinliğini azaltmak yönündedir ancak bazı durumlarda ilaçların etkinliğini artırmakta ya da ön ilaçların aktivasyonunu etkilemektedirler (25).

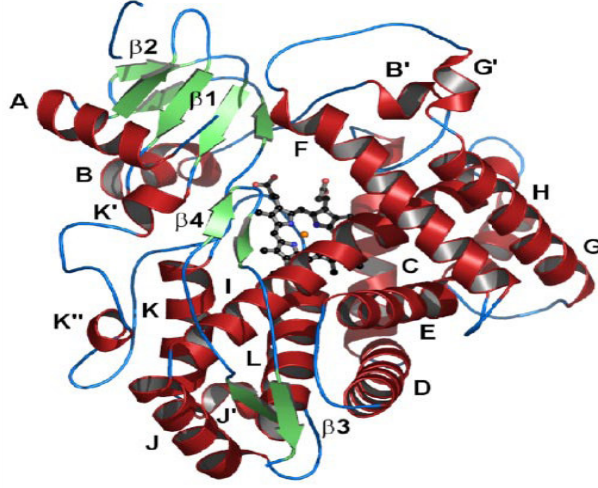
CYP450 enzimlerinin hepatik ve ekstra hepatik dokularda, hedef dokuyla ilgili ksenobiyotik bileşiklerin metabolik aktivasyonunda çoğunlukla belirleyici bir rolleri vardır (14). *CYP450* gen ekspresyonu birçok organda çalışılmış olmasına rağmen bazılarının katalitik aktiviteleri ve fonksiyonları hala bilinmemektedir. CYP'lerin izoformlarının midede oynadığı potansiyel rolü araştırmamızdaki amacımız; midede *CYP450* gen ekspresyonu ile ilgili çalışmaların zor ve kısıtlı oluşundan dolayı ilaç metabolizmasındaki etkinliğinin tam olarak bilinmemesidir.

1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. CYP P450 YAPISI VE GEN EKSPRESYONU

Bütün CYP yapıları genel olarak aynı elementlerden oluşur ve proteinleri heliksler şeklinde katlanırlar. Kofaktör heme bir globin kıvrımı ile bağlanır. Protein helikslerinin A ve L arasındaki bölgeleri iyi korunmuştur. I ve L heliksleri demir grubuyla temas halindedir. B ve I helikslerinin substrata bağlı kısımları ve bu bölgelerdeki mutasyonlar, yönlü mutageniz çalışmalarında belirgin etkiler olduklarını göstermiştir. Substrata F heliksi ile temas eden bir diğer bölgenin, mutasyonların katalitik seçiciliğini etkilediği gösterilmiştir.

En çok korunan bölgeler, sistein içermekte ve demire tiyolat ligandı oluşmasını sağlamaktadır (25). Şekil 1'de CYP2D6 yapısında α -heliksler kırmızı, β -iplikleri yeşil ile, demir grubu ise ortada gösterilmiştir (83).



Şekil 1. CYP2D6 yapısı.

Spesifik CYP enzimleri (E.C. 1.14.14.1), rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları ile cDNA klonları şeklinde karakterize edilebilmiştir (85). CYP enzimlerinin tümü birkaç istisna dışında tek bir süper aileye aittirler ve bir ailedeki bütün enzimler aminoasit dizilimi yönünden en az % 40 bir benzerlik gösteriyorsa aynı aile içine alınmaktadırlar. Benzerlik oranı % 60' tan daha fazla olanlar ise alt grup ailelere alınmaktadırlar. CYP' ten sonra gelen ilk numaraya göre; 1-50 arası aileler memeli ve böceklerin, 50-99 bitkilerin ve mantarların, 100 ve üzeri ise bakterilerin genlerini tanımlamaktadır. Alt aile bir harf ile belirtilir ve en son numara ise enzimi kodlayan genin numarasıdır (25). Örnek olarak CYP2A6 ele alındığında sınıflandırma anahtarı:

- 1) 2-Ailenin ilk numarasıdır.
- 2) A-Alt aile harf ile belirtilmiştir.
- 3) 6-Son rakam geni ifade etmektedir.

Bu enzimler evrim basamağı kapsamında Steroidogenik CYP enzimleri ve Ksenobiotik CYP enzimleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Steroidogenik yapıda

olanlar filogenetik olarak daha eskidirler, tek hücreli canlılarda da bulunmaktadır. Hücre duvarının devamlılığının sürdürülmesi ve steroidlerin sentezinden sorumlu olan bu enzimler mitokondrilerde bulunmaktadır. Ksenobiotik CYP enzimleri, bir milyar yıl sonra bitki-hayvan farklılaşması döneminde steroidogenik CYP enzimlerinden türemiştir. Ksenobiotik CYP enzimleri hücrede endoplazmik retikulumda yerleşmişlerdir ve ksenobiotik adı bu enzimlere, vücuda giren yabancı maddelerin metabolizmasında görevli olmaları nedeniyle verilmiştir (25). Tablo 1’ de CYP aileleri ve fonksiyonları gösterilmektedir (34).

Tablo 1. CYP Aileleri ve fonksiyonları

CYP Aileleri	Fonksiyonları
CYP1	Ksenobiotik Metabolizması
CYP2	Ksenobiyotik Metabolizması Araşidonik Asit Metabolizması
CYP3	Ksenobiyotik ve Steroid Metabolizması
CYP4	Yağ Asiti Hidroksilasyonu
CYP5	Tromboksan Sentezi
CYP7	Kolesterol 7- Hidroksilasyonu
CYP8	Prostasiklin Sentezi Kolesterol yan-zincir Kırılması
CYP11	Steroid 11-Hidroksilasyonu Aldosteron Sentezi
CYP17	Steroid 17- Hidroksilasyonu
CYP19	Androjen Aromatizasyonu
CYP21	Steroid 21- Hidroksilasyonu
CYP24	Steroid 24- Hidroksilasyonu
CYP26	Retinoik Asit Hidroksilasyonu
CYP27	Steroid 27- Hidroksilasyonu
CYP46	Kolesterol 24- Hidroksilasyonu
CYP51	Sterol Biyosentezi

İnsanlarda bulunan 53 CYP formunun yarısı ilk üç aileye (CYP1, CYP2, CYP3) mensupturlar (65). Özellikle insan genom projesi ile daha önce bilinmeyen CYP'lerin sekansları açıklığa kavuşturulmasına rağmen bu enzimlerin bazılarının katalitik aktiviteleri ve fonksiyonları hala bilinmemektedir. CYP'lerin çoğunluğu karaciğerde eksprese olurken bir kısmı, ekstrahepatik dokularda da ancak karaciğere oranla daha düşük oranda eksprese olmaktadır (75). Sadece ekstrahepatik dokularda eksprese olan bazı CYP formları ise yabancı bileşiklerin metabolizmasında görev almaktadırlar. Ekspresyonun karaciğerde daha fazla olması; sindirilen besinlerin ilk uğradığı organ olmasına bağlanmaktadır. Akciğerler ve deri gibi diğer dokularda da eksojen kaynaklı bileşiklere savunma görevi yaptıkları için CYP ekspresyonu gerçekleşmektedir (34).

İlk üç CYP ailesi (CYP1, CYP2, CYP3) ksenobiyotiklerin metabolize edilmesinde aktiftirler. Bazıları ayrıca steroid hormonlar, araşidonik asit gibi endojen bileşiklerin metabolizmasında da aktiftirler (3,18).

Günümüze kadar *CYP450* gen ekspresyonu çeşitli organlarda çalışılmıştır; genel olarak vücuda giren endojen ve eksojen kaynaklı bileşiklerin ilk uğrakları olduklarından solunum ve sindirim organlarında *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2A6*, *CYP2A13*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP2F1*, *CYP2J2*, *CYP2S1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP4B1* ekspresyonu belirgin olarak gözlenmiştir (14). Tablo 2'de CYP450 geninin eksprese edildiği belirlenen organlar gösterilmektedir (14).

Tablo 2. CYP P450 geninin eksprese edildiği belirlenen organlar.

Doku/Organ	Sitokrom P450 Geni Ekspresyonu
Nazal mukosa	2A6, 2A13, 2B6, 2C, 2J2, 3A
Trake	2A6, 2A13, 2B6, 2S1
Akciğer	1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C18, 2D6, 2E1, 2F1, 2J2, 2S1, 3A4, 3A5, 4B1
Özafagus	1A1, 1A2, 2A, 2E1, 2J2, 3A5
Mide	1A1, 1A2, 2C, 2J2, 2S1, 3A4
İnce bağırsak	1A1, 1B1, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 2S1, 3A4, 3A5
Kolon	1A1, 1A2, 1B1, 2J2, 3A4, 3A5

1.2.2. MİDEDE CYP P450 GEN EKSPRESYONU

Mide epitelyum dokusunun absorbe etme özelliğinden çok sekresyonunun fazla oluşu ve *CYP*' lerin diğer dokulara nispeten daha az eksprese oluşları nedeniyle midede *CYP450* gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalar, elde edilen bulguları tanımlamada ve bu genlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde güçlük çıkarmaktadır. Ayrıca mukus bariyeri, kimyasal ajanlara karşı koruyucu bir görev üstlenmektedir (98). Son zamanlarda ortaya atılan yeni bir görüşe göre, *CYP*' lerin mide kanserinde oynadığı bu potansiyel rolün, özellikle midede intestinal metaplazi bölgesinin varlığında daha belirgin olduğudur. İntestinal metaplazi yağ geçirgenliği fazla bir bölgedir. Birçok karsinogen ve *CYP* substratının lipofilik olduğu düşünülürse, bu maddelerin emilimi artmakta ve dolayısıyla *CYP*' lerin ekspresyonunun da artması beklenmektedir (100). İmmunohistokimya, immunoblot ve reverse transkripsiyon (RT) PCR ile yapılan çalışmalarda intestinal ilişkili kanser durumlarında sadece intestinal metaplazi varlığında *CYP3A4* genine rastlanmıştır (98, 109). Gastrik fundik

gland bölgelerde immunoblot yöntemi ile *CYP2C* ekspresyonu gözlenmiştir. Benzer sonuçlar immunoblot ve RT-PCR problemleri kullanılarak *CYP1A1* ve *IA2* için de belirlenmiştir. Başka bir çalışma da, RT-PCR analizi ve western blot yöntemi ile mide dokusunda intestinal metaplazi varlığında *CYP1A1* ve *CYP1A2* ekspresyonunun olduğunu göstermiştir (98).

1.3. CYP AİLELERİ

1.3.1.CYP1 AİLESİ

CYP1A1, *CYP1A2*, *CYP1B1* genleri CYP1 ailesine aittir. Bu ailede psödogen yoktur (64). Hepsi AHR-ARNT (aril hidrokarbon reseptör-aril hidrokarbon reseptör nükleer translokotör) yolağında transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedirler. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) ve 2, 3, 7, 8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) ile uyarılmaktadırlar (86). Sigara da uyarıcı bir etkidir (104, 110).

Uyarılmalarında ve eksprese edilmelerinde hücre spesifikliği göstermektedirler. Hepsi PAH metabolizmasının DNA'ya bağlanma aşamasında aktiftirler. Eğer hasar meydana gelir ve tamir edilmezse neoplazmik transformasyonlar oluşmaktadır. Bu yüzden kimyasal kaynaklı kanserlerle ilişkilendirilmektedirler (90).

1.3.1.1. CYP1A1 ALT AİLESİ

CYP1A1 majör bir ekstrahepatik CYP enzimidir (75). Birçok karsinojenin toksiditesini özellikle PAH' ların, DNA' ya bağlanma formlarını oluşturmasına yardımcı olarak, aktive edip düzenlemektedirler (90). *CYP1A1*' in prekarsinojenlerin aktivasyonunda etkin rolünün olması nedeniyle *CYP1A1* geni polimorfizmleri,

kimyasal uyarıcı kanserlerle ilişkilendirilebilirler (76). CYP1A1 proteini diğer AHR-regulasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunda etkisizdir (12).

1.3.1.2.CYP1A2 ALT AİLESİ

CYP1A2 ekspresyonu ekstrahepatik dokularda sıklıkla belirlenemediği için karaciğere spesifik olduğu kabul edilmektedir (75). Karaciğerde eksprese olan CYP'lerin %13' üni oluşturmaktadır (35, 89). PAH, nitrozamin, aflotoksinB₁, aril aminleri aktive ederek DNA' ya bağlanmalarını sağlayacak formların oluşturulmasını sağlayıp mutasyonlar ortaya çıkmasına yardımcı olur (1, 30, 31, 56, 91). CYP1A2 klozapin, teofilin, takrin gibi birçok ilacın metabolizmasında katalizör rolü oynamaktadır (50).

1.3.2. CYP2 AİLESİ

CYP2 ailesi, heterojen enzimlerden oluşmaktadır. CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP2F ve CYP2J alt ailelerini içerir. CYP2B6, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1 ve CYP2J2 diğer alt ailelere kıyasla fonksiyonel olan üyelerdir. CYP1 ailesi regulasyonda rol oynamasına karşın CYP2 ailesi regulasyonda rol oynamaz. Substrat ve doku spesifikliği gösterir (64).

1.3.2.1. CYP2A ALT AİLESİ

CYP2A alt ailesi *CYP2A6*, *CYP2A7*, *CYP2A13* genlerini içermektedir. Ayrıca 19. kromozomun CYP2A-2B-2F gen grubunda iki psödogeni vardır (33). *CYP2A* ilişkili protein ekspresyonunun fetal nazal mukozada gerçekleştiği saptanmıştır (21, 22, 95). *CYP2A6*, *in vivo* ve *in vitro* nikotin metabolizmasındaki etkin rolü nedeniyle özellikle son yıllarda giderek daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır (44, 57, 63, 108).

Karaciğerde CYP2A6 proteininin eksprese olduğu belirlenmiş ve *CYP2A6*'nın karaciğerde eksprese olan CYP'lerin % 4'ünü oluşturduğu saptanmıştır (35, 89). *CYP2A6* gen delesyonları akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir (60). Kumarin, *CYP2A6 in vitro* aktivitesinin belirlenmesi amacıyla prob olarak kullanılmıştır (6, 37, 78). *CYP2A6*'nın regülasyon mekanizması hakkında henüz çok az şey bilinmektedir (77). *CYP2A6*, *in vivo* koşullarda fenobarbital ve diğer antiepileptik ilaçlarla uyarılabilmektedir (94). İnsan hepatositlerinde *in vivo* koşullarda *CYP2A6*, phenobarbital ve rifampicin ile uyarılabilmektedir (11, 79). *CYP2A7* proteini hem grubuna bağlanamaması nedeniyle fonksiyonel değildir (106). *CYP2A13* mRNA'sının ise insan akciğerinde ve fetal nazal mukozada eksprese olduğu saptanmıştır (23, 47, 96).

1.3.2.2. CYP2B ALT AİLESİ

CYP2B genleri 19. kromozomun *CYP2A-2B-2F* gen bölgesinde bulunurlar (33). *CYP2B6* geni insan karaciğerinde eksprese olan minör bir gruptur, total hepatik CYP'lerin %1-2'sini oluşturur (35, 59, 89). Ekspresyonu doku spesifik olarak regüle edilmektedir. Oysaki akciğer ve böbrekte ekspresyonu farklı bir varyasyondur (9, 17, 64). Bu varyant, daha önceleri *CYP2B7* olarak kabul edilmiştir. 6-aminokrisen (59), metoksikolor (13), NNK (7) ve siklofosfamidin (4) *CYP2B6*'nın substratlarıdır. *CYP2B6* ayrıca primer hepatositlerde fenobarbital ve rifampisin ile uyarılmaktadır (4, 17, 69, 79). Bu uyarılmanın medyatörü Constitutively Active Receptor (CAR) adı verilen nüklear reseptörü (97) ve büyük olasılıkla Pregnane X Receptor (PXR) reseptördür (69). *CYP2B* alt ailesi, *CYP2B7P* psödogenini içermektedir (64).

1.3.2.3. CYP2C ALT AİLESİ

İnsan CYP2C alt ailesi 10 numaralı kromozom üzerinde yer alan dört homolog gen içermektedir; *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19* (26, 64). İnsan karaciğerinde eksprese olan CYP'lerin % 20' sini oluştururlar (36, 89). Primer hepatosit hücrelerinde, CYP2C mRNA ve proteini fenobarbital ve rifampisin ile uyarılmaktadır (5, 62). PXR ve CAR primer insan hepatositlerinde CYP2C8 ve CYP2C9' un uyarılmasında etkindir (70). Bu verilerin yanı sıra, yapılan diğer bazı çalışmalara göre CYP2C9 ve CYP2C19 için mRNA ve protein düzeyinde uyarılma gözlenmemiştir (79, 84). Rifampisin ve barbituratlarının CYP2C proteinlerini uyardıkları ve *in vivo* aktiviteleriyle ilişkili oldukları belirlenmiştir (73, 101, 113). Diazem, omeprazol, mephenitoin, tolbutamid ve varfarin birçok nonsteriodal anti-inflammatuar ilaçlar CYP2C'nin farmasötik substratlarıdır (24, 71). CYP2C8 için taksol, CYP2C9 için tolbutamid, CYP2C19 için mephenitoin spesifik substratlardır.

1.3.2.4. CYP2D ALT AİLESİ

CYP2D alt ailesi sadece bir gene ve bir psödogene sahiptir (64). CYP2D6 poor metabolizer (PM) fenotipi metabolik etkinlik bakımından zayıftır ve çeşitli farmasötik metabolizmalarında etkindir; trisiklik antidepresanlar, haloperidol, metaprolol, propranolol, kodein ve dekstrometorfan bu farmasötiklere örnek olarak verilebilir (71). Yaklaşık 30 kadar farklı defektif *CYP2D6* allelinin olduğu belirlenmiştir; bunlardan altısı % 95-99 oranında PM fenotipindedirler. *CYP2D6* gen duplikasyonları metabolizmayı hızlandıran ultra-rapid metabolizer fenotipinde artışa sebep olmaktadır (38). Ultra-rapid metabolizer fenotipine sahip olan bireylerin metabolizması yüksektir ve trisiklik antidepresanlar gibi CYP2D6 substratlarının ilaç metabolizmasını düşürür (10). *CYP2D6* polimorfizmlerinin, Parkinson hastalığı

ve akciğer kanseri ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür ve PM tiplerin bir bakıma akciğer kanserinden korunduğu görülmüştür (82). CYP2D6, total karaciğer CYP'lerinin %2' sini oluşturmaktadır ve proteini duodenum ve beyinde de tespit edilmiştir (35, 72, 89).

1.3.2.5. CYP2E ALT AİLESİ

CYP2E1 bu alt aileye ait olan tek gendir (64). *CYP2E1* enzimi, etanol metabolizmasındaki rolü ve kimyasal karsinojenlerin aktivatörü olmaları nedeniyle geniş çapta araştırılmaktadır (54). Ayrıca, tütündeki en önemli nitrosamin olan Nitrosamine4-(methylnitrosamino)-1-(3-pridyl)-1-butanone (NNK) dışında, bazı spesifik nitrosaminleri de aktive etmektedir (32, 48, 107). Substratlarının büyük çoğunluğunu küçük hidrofobik bileşikler oluşturmaktadır (81). Bu bileşiklerden bazıları; parasetamol, klorzoksan, enfluran ve halothandır (24).

Karaciğerde eksprese olduğu bilinen CYP'lerin %7' sini *CYP2E1* oluşturmaktadır (35, 89). Ayrıca, akciğer ve beyinde de eksprese olduğu bilinmektedir (76).*CYP2E1*'in regülasyonu oldukça kompleks; transkripsiyon öncesi ve sonrası regülasyonu birbirinden farklıdır (92). Transkripsiyonel regülasyonunu minor bir rol oynaması bakımından diğer CYP formlarından farklıdır. *CYP2E1* substratları aynı zamanda *CYP2E1* uyarıcı ajanlardır; örnek olarak aseton, ethanol, piridin, pirazol ve isoniazid verilebilir (81). *CYP2E1* prokarsinojenleri aktive ettiği gibi doku zedelenmesine yol açan serbest radikaller de oluşturur ve bu radikaller substrat varlığından etkilenmezler (54).

1.3.3. CYP3A AİLESİ

CYP3 ailesi sadece bir alt aile içerir (64). Bu aile *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* ve *CYP3A43* genlerini içermektedir. CYP3A enzimleri 'overlapping' katalitik aktiviteye sahiptir ve ekspresyonları dokuya göre farklılık göstermektedir. Özellikle CYP3A4 genel olarak karaciğerde, CYP3A5 ekstrahepatik dokularda eksprese olurken, CYP3A7 genel olarak fetal karaciğerinde eksprese olmaktadır. CYP3A4 ve CYP3A7 PXR metabolizması ile regüle edilirken, CYP3A5 glukokortikoid reseptörü aracılığıyla kontrol edilmektedir (99).

1.3.3.1. CYP3A ALT AİLELERİ

CYP3A4 enzimi karaciğerdeki ilaç metabolize eden CYP'lerden en önemlisidir, hepatic CYP enzimleri % 30-40 oranında CYP3A4 içermektedir (35, 89). Ayrıca, ince bağırsakta da eksprese edildiği tespit edilmiştir (46). CYP metabolizması ile metabolize olan ilaçların % 50' sinin CYP3A4 aracılığıyla metabolize edildiği tahmin edilmektedir (2). Bu enzim için substratları arasında bazı ilaçlar da yer almaktadır; örneğin quinidin, nifedipin, diltiazem, lidokaine, lovastatin, eritromisin, siklosporin, triazolam, midazolam ve testosteron, progesteron, androstenedion gibi endojen kaynaklar bu ilaçlar arasındadır (71). Midazolam ve eritromisin CYP3A4 aktivitesi için *in vivo* koşullarda prob olarak kullanılmıştır (99). CYP3A4 ayrıca, aflatoksin B1 (1), PAHs, NNK (32) ve 6-aminokirisen (108) gibi prokarsinojenleri aktive etmektedir. CYP3A4 karaciğerde, *in vivo* olarak rifampisin ve barbituratları ile uyarılmaktadır (20, 73). CYP3A4'ün induksiyonu genel olarak PXR (novel orphan receptor) ile sağlanmaktadır (52, 61).

CYP3A5 polimorfik olarak insan karaciğerinde eksprese olmaktadır (105) ancak akciğerde (45), kolonda (17), böbrekte (28, 87), özofagusta (51) da eksprese olduğunun belirlenmesi bu genin ekstrahepatik olarak ta eksprese edildiğini göstermektedir. Ayrıca hassas protein-mRNA ölçüm metodları ile yapılan deneyler, *CYP3A5*'in çalışılan her karaciğer örneğinde bulunduğunu göstermiştir (16, 39). İki *CYP3A5* psödogeni bulunmaktadır (64).

CYP3A4 ile *CYP3A5* karşılaştırıldığında, hemen hemen aynı substrat gereksinimi göstermektedir ve turnover oranları farklıdır (1, 108). *CYP3A5* mRNA'sı insan primer hepatosit hücrelerinde rifampisin ve fenobarbital ile uyarılmaktadır (80). *CYP3A7* genel olarak insan fetal karaciğerinde eksprese olmakla birlikte (43) ayrıca *CYP3A7* mRNA'larının yetişkin karaciğerinde de ekspresyonu saptanmıştır (29, 88). *CYP3A7* testosteron 6-hidroksilasyonu dahil olmak üzere diğer *CYP3A* enzimlerine benzer katalitik aktiviteye sahiptir (40, 41, 42). *CYP3A7* insan primer hepatosit hücrelerinde rifampicin ile uyarılmaktadır (27). Bu uyarılma PXR yoluyla sağlanmaktadır (68).

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Etanol (Merk, Darmstadt, Germany)

Trizma baz (Sigma, Steinheim, Germany)

EDTA.H₂O (AppliChem, Darmstadt, Germany)

Agaroz (Basica LE, Prona, EU)

Borik asit (Sigma, Steinheim, Germany)

Etidyum bromür (Sigma, Steinheim, Germany)

2.2. KULLANILAN CİHAZ VE ALETLER

Mikropipet (Thermo, Halbrook NY, USA)

Derin dondurucu – 86 °C (Nuair, Minneapolis, USA)

Derin dondurucu – 20 °C (Arçelik, İstanbul, Türkiye)

Derin dondurucu +4 °C (Arçelik, İstanbul, Türkiye)

İnkubatör (Lab-line, Iowa, USA)

Quant-iT RNA ölçüm cihazı (Invitrogen, California, USA)

Thermal cycler ısı bloğu (Techne, Minnesota, USA)

Tissue Lyser doku homojenizatörü (Qiagen, Retsch, Haan, Germany)

Tungsten bilye (Qiagen, Hilden, Germany)

Elektroforez güç kaynağı (Thermo, Massachusetts, USA)

UV Görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Paris, France)

Ultra Santrifuj (Hettich, Kirchlengern, Germany)

Otoklav (Hirayama, Saitama, Japan)

2.3. ARAŞTIRMA MATERYALİ

Çalışmamızda araştırma materyali olarak insan mide dokusu kullanılmıştır. Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Gastroenteroloji Bölümü' ne mide rahatsızlıkları nedeniyle başvuran yaş ortalaması 51 ± 3 olan 14 kişiden endoskopi yöntemi ile 10-100 mg mide biyopsi antrum doku örnekleri alınarak önceden hazırlanan 250 µL RNA Later TM(Takara-bio, Japan) solüsyonu içerisine aktarıldı. Çalışmada yer alan bireylerin yaş, cinsiyet ve tanı özellikleri Tablo 3' te verilmiştir.

Örneklerin hiçbirisinde intestinal metaplazi gözlenmedi. Kanseri veya gastrit tanısı konulan biyopsi örnekleri, endoskopi işleminin hemen ardından sıvı azot tankına transfer edildi ve deneysel aşamalarda kullanılmak üzere -86°C ' de muhafaza edildi.

Tablo 3. Çalışmada yer alan bireylerin yaş, cinsiyet ve tanı özellikleri

Lab Kodu	Yaş	Cinsiyet *	Sigara	Alkol	Üreaz	Bilinen Hastalık	Tanı
Z3	70	K	-	-	-	Non-Hodgkin Lenfoma	Epitelyal tümör, adenokarsinom
Z4	73	E	-	-	-	-	Epitelyal tümör
Z5	64	E	+	-	-	-	Epitelyal tümör, adenokarsinom
Z6	57	E	+	+	-	Karaciğer Metastazi GI Tümör (GIST)	Epitelyal malign tümör, adenokarsinom
Z10	38	K	-	-	-	-	Epitelyal malign tümör
Z11	50	E	+	+	-	-	Epitelyal tümör
Z12	63	E	-	-	-	-	Epitelyal malign tümör
Z19	44	E	-	-	-	Dispepsi	Epitelyal malign tümör
Z13	47	E	+	+	-	Hipertansiyon	Kronik gastrit
Z14	35	K	-	-	-	Dispepsi	Atrofik gastrit
Z15	43	K	-	-	-	Hipertansiyon-Gastrit	Eritematoz pangastrit
Z16	23	K	-	-	-	Ailede mide kanseri	Gastrit
Z17	55	K	-	-	+	-	Kronik gastrit
Z18	56	K	-	-	+	Anemi	Kronik gastrit

*K: kadın, E: erkek bireylere karşılık gelmektedir.

2.4. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI

2.4.1. RNA İZOLASYONU VE MİKTAR TAYİNİ

Deneysel işlemlere başlamadan önce çalışılacak alan ve pipetler uygun ajanlarla temizlenerek dezenfekte edildi. Deneyler sırasında 121°C 40 dakika süresince steril edilen materyaller kullanıldı.

Mide dokularından RNA izolasyonu ‘Roche High Pure RNA İzolasyon Kiti’ kullanıldı (Mannheim, Germany). 250 µL RNA Later TM (Takara Bio, Japan) solüsyonu içerisindeki doku örneğine, örneğin son hacmine eşit olacak şekilde (350 µL) liziz/bağlanma tamponu eklenip daha sonra Tissue Lyser (Qiagen, Retsch, Haan, Germany) cihazı yardımıyla homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi için her bir doku örneğini içeren eppendorf tüplerine paslanmaz çelikten yapılmış olan tungsten bilyelerden (Qiagen, Hilden, Germany) 3 adet yerleştirildi. Homojenizasyon işleminden sonra üretici firmanın RNA izolasyonu için önerdiği işlem basamakları doğrultusunda RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonu için deneysel işlem basamakları şu şekilde hazırlandı; homojenizataı içeren ependorf tüpleri 13000 rpm’ de 2 dakika (dk) santrifüjlenerek süpernatant yeni steril tüplere transfer edildi. Süpernatant üzerine örnek hacmi ile eşit olacak miktarda %70’ lik etanol eklendi. Bütün karışım (700 µL) zaman geçirmeden filtre tüpüne transfer edildi ve 13000 rpm’ de 30 saniye (sn) santrifüj edildi ve kolonda toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Her bir örnek için 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I çalışma solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Kolona 500 µL yıkama solüsyonu I ilave edildi ve 10000 rpm’ de 30 sn santrifüj edildi ve kolonda toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 500 µL yıkama solüsyonu II ilave edildi ve 10000 rpm’ de 30 sn santrifüj edildi ve kolonda toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 300 µL yıkama

solusyonu II ilave edildi ve 13000 rpm' de 2 dk santrifüj edildi ve kolonda toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Kolon yeni, steril ependorf tüpüne transfer edildi ve üzerine 50 µL Elusyon Tamponu eklenerek 13000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra 30 µL Elusyon tamponu eklenerek işlem tekrarlandı. Elusyon işlemi sonunda elde edilen RNA örnekleri bir sonraki deneysel aşamaya kadar -86°C' de muhafaza edildi. RNA miktar tayini için mide antrum doku örnekleri öncelikle 250 µL RNA Later™ (Takara Bio, Japan) solüsyonu dahil olmak üzere toplam ortalama 200 mg olarak ölçüldü. Daha sonra RNA izolasyonu yapılarak elde edilen RNA miktarı Quant-iT (Invitrogen, California, USA) cihazıyla belirlendi. RNA miktarı 14 örnek için ortalama 430 ng/ml olarak ölçüldü. 20 µL PCR mixinde ortalama 4,3 ng RNA kullanıldı.

2.4.2. *CYP 450* PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) AMPLİFİKASYONU

2.4.2.1. cDNA SENTEZ BASAMAKLARI

RNA örneklerinden cDNA sentezi 'New England Biolabs cDNA Synthesis Kiti' (New England Biolabs, Inc. Massachusetts USA) kullanılarak üretici firmanın önerdiği işlem basamağına uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu işlem basamağına göre; her örnek için 0.2 mL hacimli steril PCR tüplerine 9,5-10 µL RNA, 4 µL dNTP mixi, 2 µL oligodT primeri eklendi. Bu işemin ardından örnekler ilk olarak 70 °C' de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra her bir örnek için 2 µL 10xBuffer (New England Biolabs, Inc. USA) 1 µL RNase inhibitörü ve 1 µL Reverse Transcriptase (Ters Transkriptaz) enzimi eklenerek örnek hacmi dH₂O ile 20 µL'ye tamamlandı. Örnekler 42 °C'de 1 saat inkübe edildi ve ardından 95 °C' de 5 dk inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlandı. Elde edilen cDNA örnekleri deneysel işlem aşamalarına kadar -20 °C' de muhafaza edildi.

2.4.2.2. cDNA ÖRNEKLERİ İÇİN PCR REAKSİYONU

cDNA örneklerinin amplifikasyonu için Thermal Cycler ısı bloğu (Techne, Minnesota, USA) kullanıldı. Çalışmada kullanılan PCR işlem basamağına göre; 0.1 µg cDNA, 1 unit *Taq* DNA polimeraz ve her bir primerden 20 pmol kullanılarak yürütüldü. Uygun genin amplifikasyonu için kullanılan PCR koşulları şu şekilde uygulandı; 94 °C' de 2 dk ilk denatürasyon işleminden sonra 94 °C' de 30 sn, 57 °C' de 30 sn ve 72 °C' de 45 sn'den oluşan döngünün 30 kez tekrarlanması ile amplifikasyon tamamlandı. *CYP450* amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri ve ürünlerin moleküler ağırlıkları Tablo 4' te verilmiştir.

Tablo 4. Spesifik *CYP450* amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

cDNA örnekleri için kullanılan primer dizileri	Moleküler ağırlık(bp)	Referans
CYP1A1F TCC AGA GAC AAC AGG TAA AAC A CYP1A1R AGG AAG GGC AGA GGA ATG TGA T	371	80
CYP1A2F CTTTGACAAGAACAGTGTCCG CYP1A2R AGTGTCCAGCTCCTTCTGGAT	226	55
CYP2A6F CCCTCATGAAGATCAGTGAGC CYP2A6R GCGCTCCCCGTTGCTGAATA	200	85
CYP 2B6F ATG GGG CAC TGA AAA AGA CTG A CYP 2B6R AGA GGC GGG GAC ACT GAA TGA C	283	80
CYP2CF CCAGAGGTCACAGCTAAAGT CYP2CR CCTGCTGAGAAAGGCATGAA	344	85
CYP 2D6F CTA AGG GAA CGA CAC TCA TCA C CYP 2D6R CTC ACC AGG AAA GCA AAG ACA C	289	80
CYP 2E1F AGCACAACCTCTGAGATATGG CYP 2E1R ATAGTCACTGTACTTGAACCT	365	51
CYP3A5F CCCAGTTGCTATTAGACTTGA CYP3A5R GGGGCACAGCTTTCTTGAAGACCA	454	85

2.4.3. PCR AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Çalışmamızda PCR reaksiyon ürünleri % 1,5 konsantrasyonda agaroz jelde 180 V.h. yürütülerek analiz edildi. Agaroz jel 0,5 X Tris Borat EDTA (TBE) (0.045 M Tris-Borat, 0.001 M EDTA) tamponu kullanılarak hazırlandı. Her bir örnek için 25 µL PCR ürünü agaroz jele uygulandıktan sonra Ethidium Bromid ile boyanarak (0.5 µg/mL) UV ışığı altında jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Paris, France) yardımıyla görüntülenmiştir.

2.4.4. REAL TIME (RT-PCR) PCR

Çalışmamızda Roche üretici firmasına ait LightCycler cihazı (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ve 'LightCycler FastStart DNA Master Syber Green I Kiti' (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) kullanıldı. Her primerden 0,5 µm konsantrasyonda 1 µl kullanıldı. 3 µm konsantrasyonda 1,6 µl MgCl₂, 2 µl master mix ve her örnekten 2 µl cDNA ve dH₂O ile toplam reaksiyon 20 µl' ye tamamlandı. Amplifike ürünlerin 530 nm' de verdiği ışımaya değerlerinin ölçülmesi yoluyla reaksiyon analizi ve amplifikasyonun reaksiyona sokulan primerlere özgü erime eğrisi analizi yapıldı. Genel RT-PCR bileşenleri ve genel PCR programı sırasıyla Tablo 5 ve Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 5. Real Time PCR Bileşenleri

PCR BİLEŞENLERİ	MİKTAR (μ l)
PCR-grade dH ₂ O	12.4
F-primer (5 μ M)	1
R-primer (5 μ M)	1
MgCl ₂ (25 mM)	1.6
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Gren I (10X)	2
DNA (1 μ /mL)	2

Tablo 6. Genel PCR Programı

Pre-inkubasyon (°C- s)	Amplifikasyon (°C- s)	Erime Eğrisi (Melting curve) Analizi (°C- s)	Soğutma (°C- s)
95 °C' de 10dk	95°C' de 10s	95 °C' de 00 s	40 °C' de 30 s
	60 °C' de 5s	65 °C' de 15 s	
	72 °C' de 15s	95 °C' de 00 s (0,1°C/s slope)	

İzoformlar için kullanılan özgün amplifikasyon reaksiyon koşulları *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A5* için sırasıyla Tablo 7' de verilmiştir.

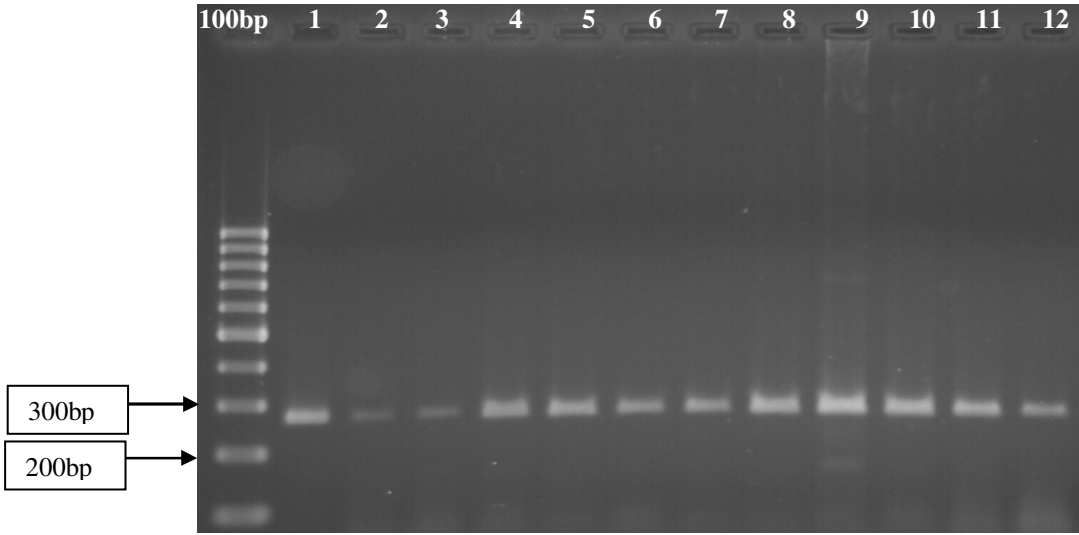
Tablo 7. İzofomlar için kullanılan özgün amplifikasyon reaksiyon koşulları.

GENLER	AMPLİFİKASYON KOŞULLARI (°C- s)	REAKSİYON DÖNGÜ SAYISI
<i>CYP1A1</i>	95°C 10 sn 57°C 5 sn 72°C 15 sn	40
<i>CYP1A2</i>	95°C 10 sn 57°C 5 sn 72°C 9 sn	40
<i>CYP2A6</i>	95°C 10 sn 59°C 5 sn 72°C 9 sn	40
<i>CYP2B6</i>	95°C 10 sn 60°C 5 sn 72°C 12 sn	35
<i>CYP2C</i>	95°C 10 sn 55°C 5 sn 72°C 14 sn	40
<i>CYP2D6</i>	95°C 10 sn 60°C 5 sn 72°C 12 sn	45
<i>CYP2E1</i>	95°C 10 sn 49°C 5 sn 72°C 15 sn	30
<i>CYP3A5</i>	95°C 10 sn 60°C 5 sn 72°C 12 sn	40

BÖLÜM III

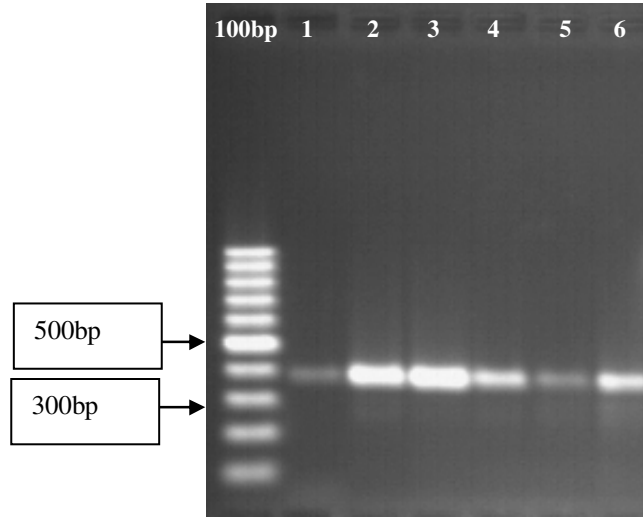
3.1. BULGULAR

Çalışmamızın esas metodolojisini RT-PCR oluşturmakla beraber RNA izolasyonu yapılan örneklerin güvenilirlik testleri konvansiyonel PCR ile gerçekleştirilmiştir. Bu *in vitro* koşullarda hedef DNA molekülünün enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan oldukça hassas bir yöntemdir. Amplifikasyon sonucu elde edilen DNA bandları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Test işlemleri için pozitif kontrol primeri olarak β -Globin geni kullanılmıştır. Bu primer kullanılarak gerçekleştirdiğimiz PCR sonuçları 12 adet örnek için Şekil 2' de verilmiştir.

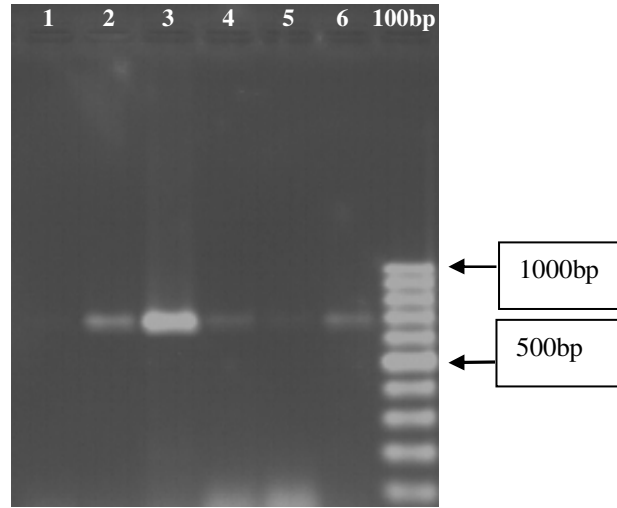


Şekil 2. β -Globin primeri ile PCR amplifikasyonu.

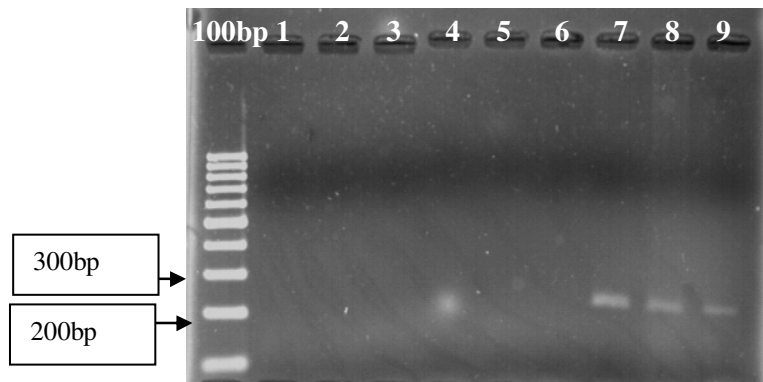
Bu işlemi takiben RT-PCR öncesi yöntem bölümünde belirtilen primerler kullanılarak amaçlanan *CYP* izoformlarının amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla belirli örneklerle uyguladığımız *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2D6*, *CYP2E1* amplifikasyonları sırasıyla Şekil 3, 4, 5, 6, 7, 8' de gösterilmiştir.



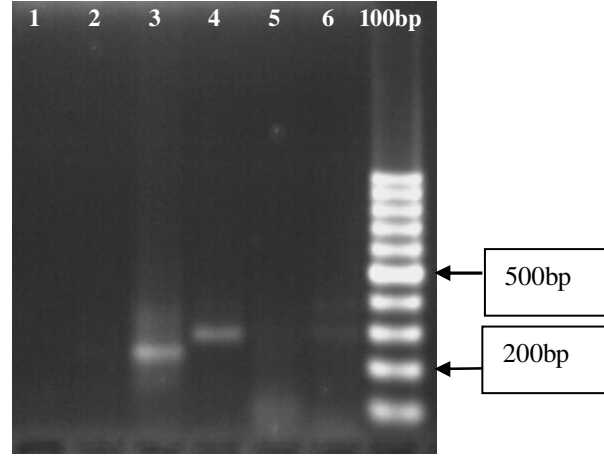
Şekil 3. *CYP1A1* primeri ile PCR amplifikasyonu



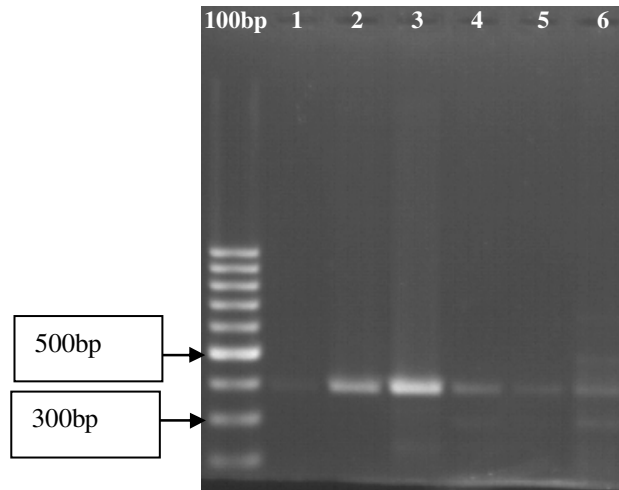
Şekil 4. *CYP1A2* primeri ile PCR amplifikasyonu



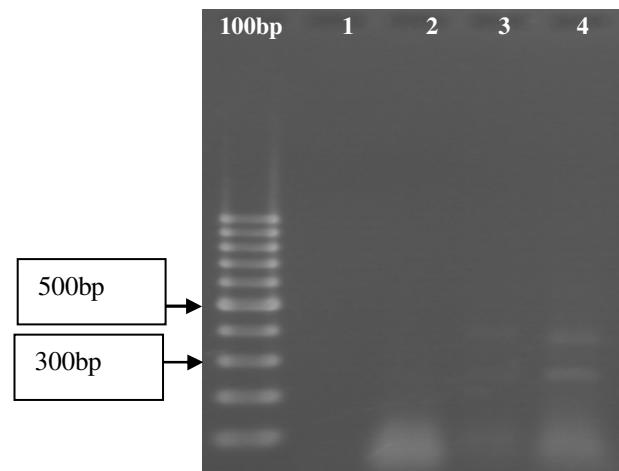
Şekil 5. *CYP2A6* primeri ile PCR amplifikasyonu



Şekil 6. *CYP2B6* primeri ile PCR amplifikasyonu

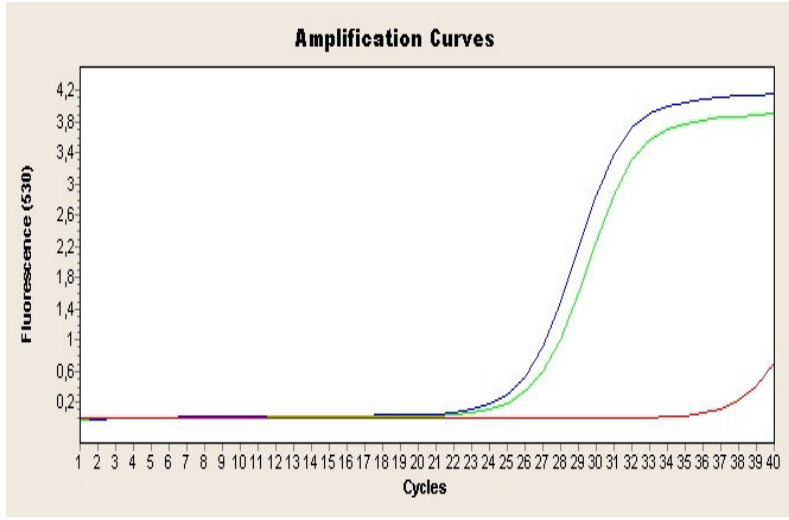


Şekil 7. *CYP2D6* primeri ile PCR amplifikasyonu

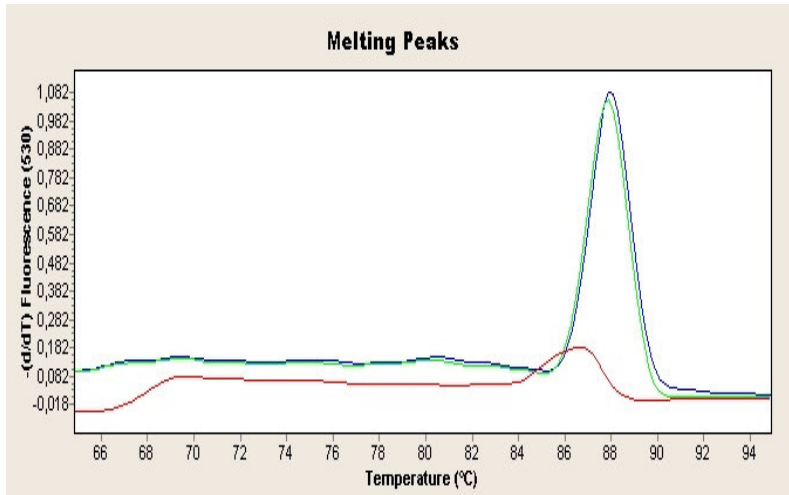


Şekil 8. *CYP2E1* primeri ile PCR amplifikasyonu

Yukarda sözü edilen konvansiyonel PCR deneyleri sonucunda amplifikasyonları gösterilen bu *CYP* izoformları için real time PCR reaksiyonları yapılmıştır. Bu süreçte çalışılan *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A5* için reaksiyon amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi analizi sırasıyla Şekil 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ve 16' da gösterilmektedir.

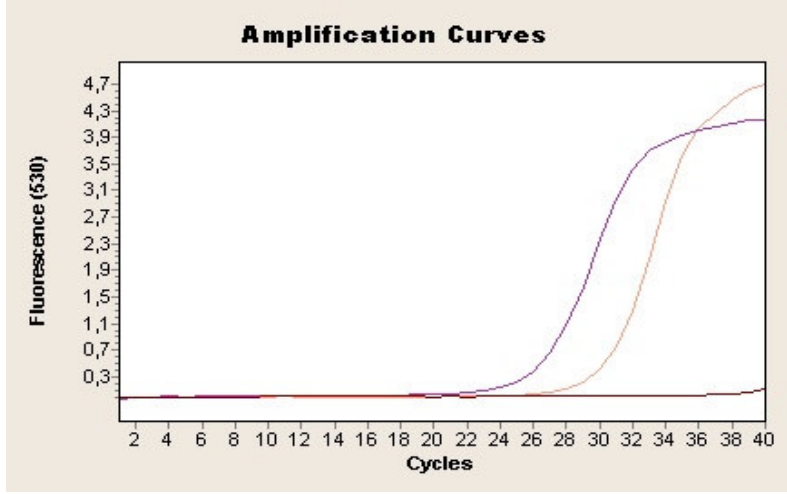


a)

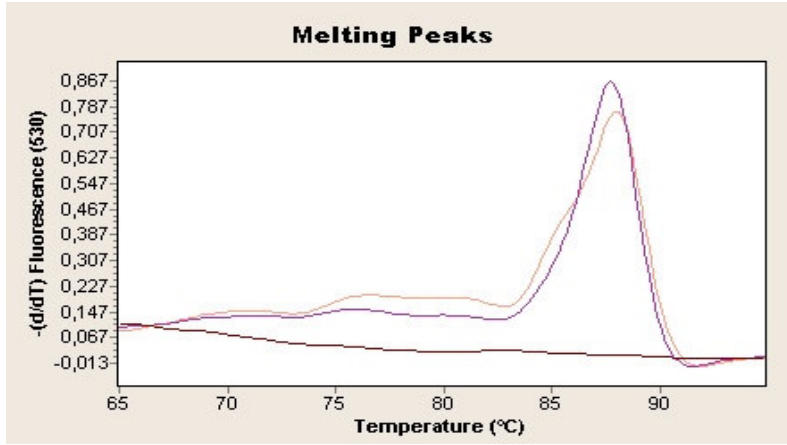


b)

Şekil 9. *CYP1A1* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen iki pozitif örnek, mavi ve yeşil renklerle gösterilmektedir. Kırmızı renkte gösterilen örnek negatif kontroldür).

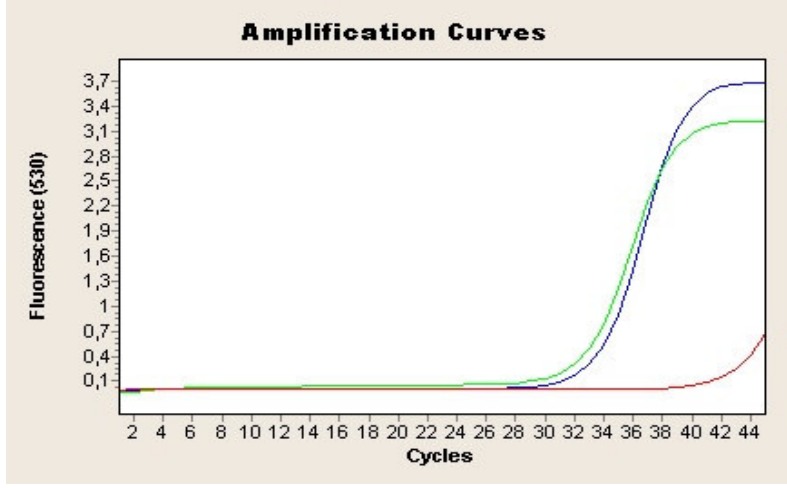


a)

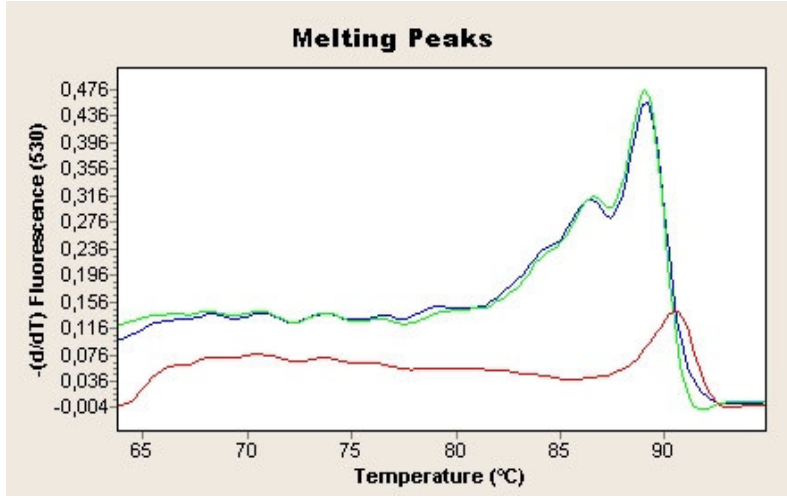


b)

Şekil 10. *CYP1A2* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen iki pozitif örnek, pembe ve turuncu renklerle gösterilmektedir. Kırmızı renkte gösterilen örnek negatif kontroldür).

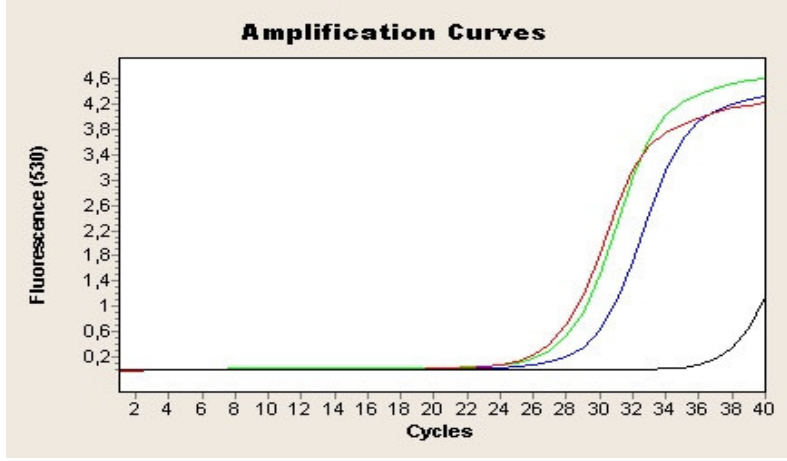


a)

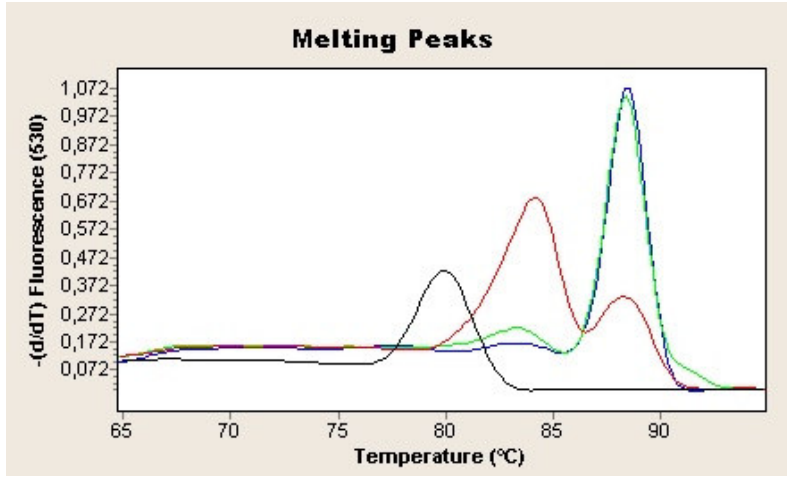


b)

Şekil 11. *CYP2A6* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen iki pozitif örnek, mavi ve yeşil renklerle gösterilmektedir. Kırmızı renkte gösterilen örnek negatif kontroldür).

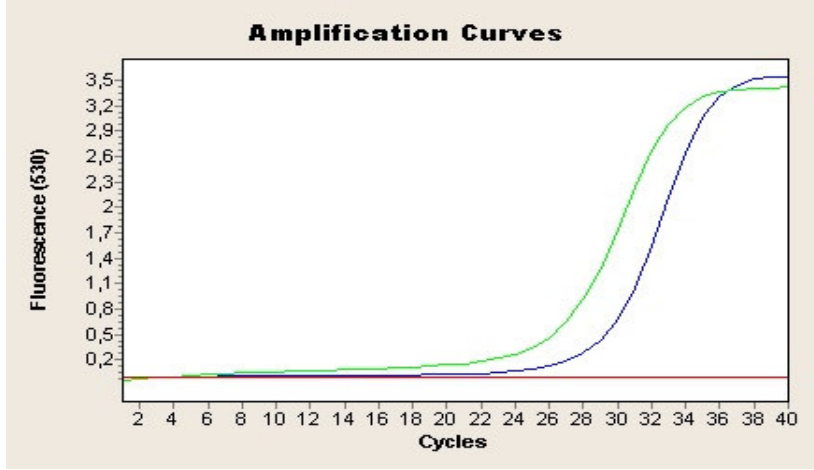


a)

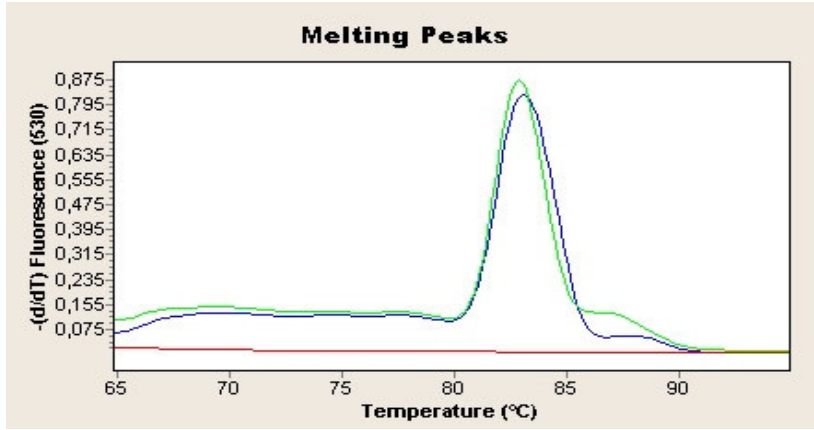


b)

Şekil 12. *CYP2B6* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen üç pozitif örnek, mavi, kırmızı ve yeşil renklerle gösterilmektedir. Siyah renkte gösterilen örnek negatif kontroldür; negatif kontrolde pik gözlenmesi primer dimerleri oluştuğunu göstermektedir).

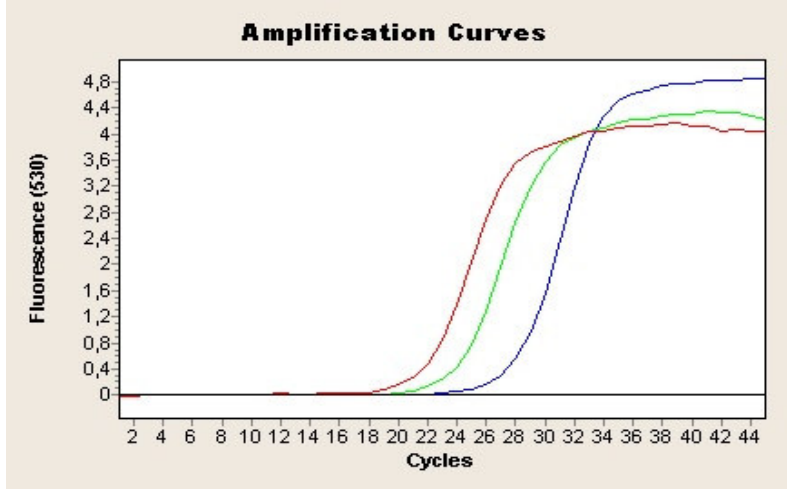


a)

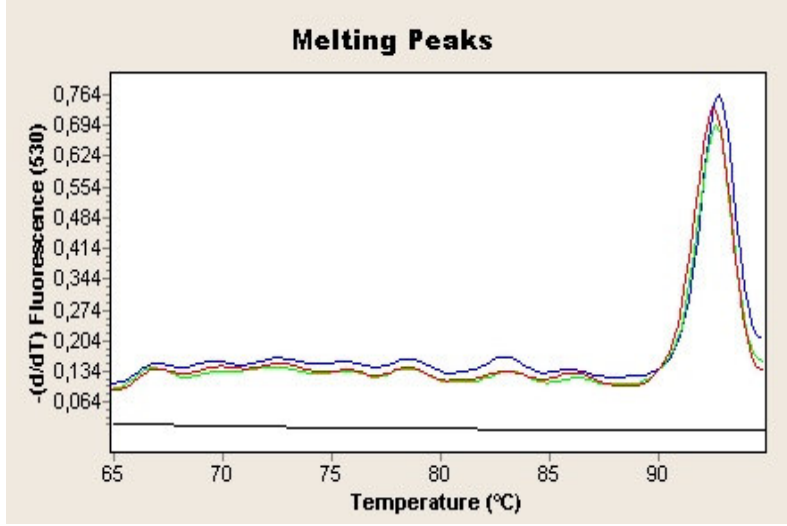


b)

Şekil 13. *CYP2C* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen iki pozitif örnek, mavi ve yeşil renklerle gösterilmektedir. Kırmızı renkte gösterilen örnek negatif kontroldür).

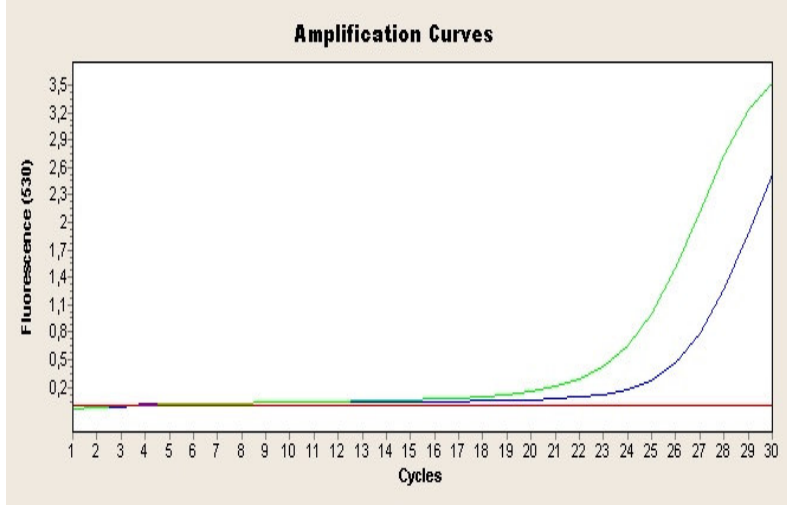


a)

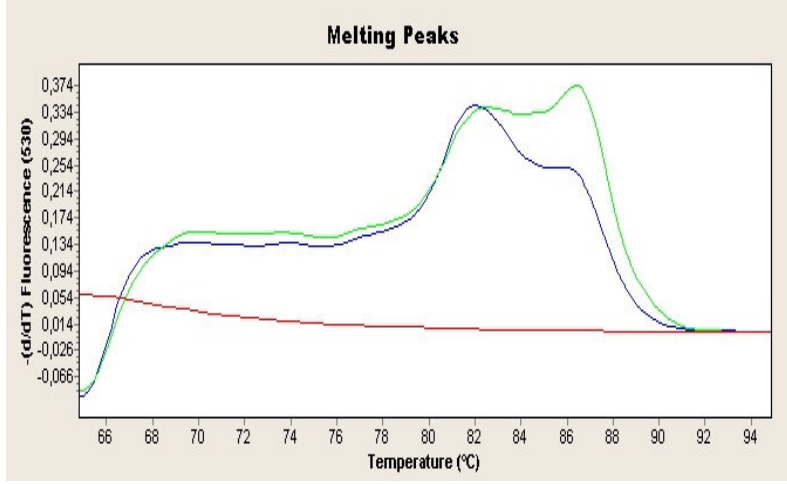


b)

Şekil 14. *CYP2D6* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen üç pozitif örnek, mavi, kırmızı ve yeşil renklerle gösterilmektedir. Siyah renkte gösterilen örnek negatif kontroldür).

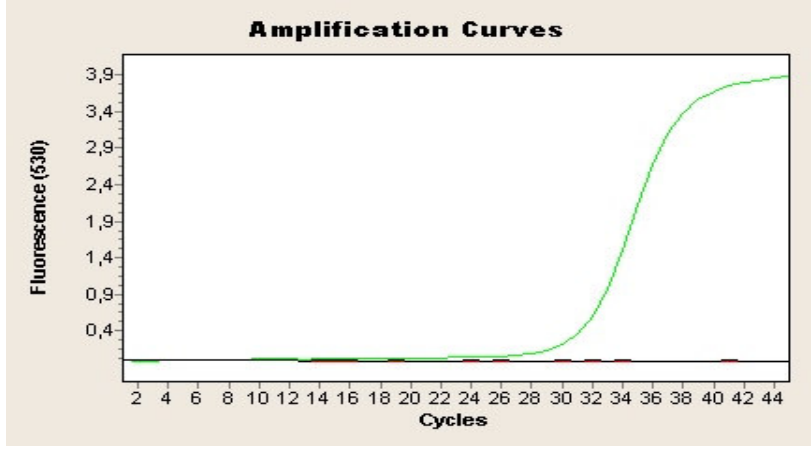


a)

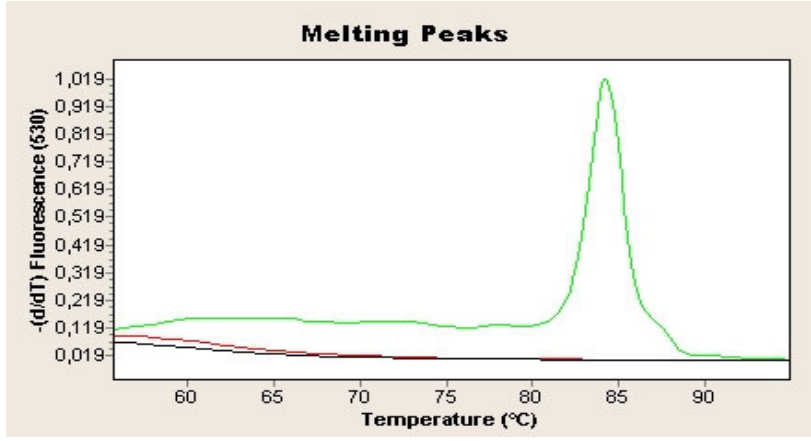


b)

Şekil 15. *CYP2E1* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen iki pozitif örnek, mavi ve yeşil renklerle gösterilmektedir. Kırmızı renkte gösterilen örnek negatif kontroldür).



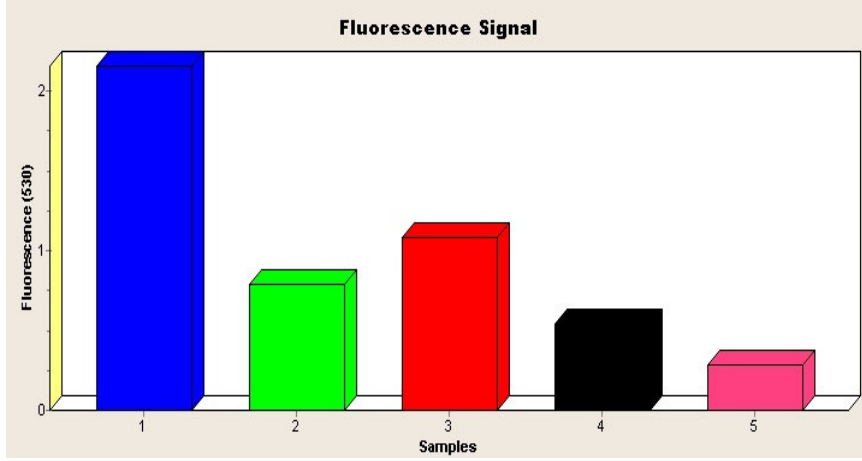
a)



b)

Şekil 16. *CYP3A5* için amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi (b) analizleri. (Şekilde gösterilen bir pozitif örnek yeşil ve bir negatif örnek siyah renklerle gösterilmektedir. Kırmızı renkte gösterilen örnek negatif kontroldür).

CYP2A6 için kantitasyon değerleri DNA örnekleriyle 10 katlı sulandırmalar yapılarak (1): 10^0 , (2): 10^{-2} , (3): 10^{-1} , (4): 10^{-3} , (5): Negatif kontrol olmak üzere farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. Daha sonra her bir örnek *CYP2A6* primerleri ile daha önceden optimize edilen PCR protokolü kullanılarak çoğaltıldı. *CYP2A6* için kantitasyon değerleri grafiği şekil 17' de verilmiştir. Genel olarak tüm izoformların ekspresyonu Tablo 8' de gösterilmektedir.



Şekil 17. *CYP2A6* için kantitasyon grafiği. Grafikte dilüsyon oranı arttıkça fluorasın değeri azalmaktadır.

Tablo 8. *CYP450* izoformlarının midede mRNA düzeyinde ekspresyonu.

HASTALIK DURUMU	ÖRNEKLER	<i>CYP450</i> İZOFORMLARININ EKSPRESYONU							
		<i>CYP2A6</i>	<i>CYP2B6</i>	<i>CYP2D6</i>	<i>CYP3A5</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>CYP2C</i>	<i>CYP2E1</i>
KANSER	Z3	-	+	+	+	+	+	+	-
	Z4	-	+	+	+	+	+	+	-
	Z5	-	+	+	+	+	-	+	+
	Z6	-	-	+	+	+	+	+	-
	Z10	+	+	+	+	+	+	+	+
	Z11	+	+	+	+	+	+	+	-
	Z12	-	+	+	+	+	+	+	-
	Z19	-	+	+	+	+	+	+	+
NORMAL	Z13	-	-	+	-	+	+	+	-
	Z14	-	-	+	-	+	+	+	-
	Z15	+	-	+	+	+	+	+	+
	Z16	+	+	+	+	+	+	+	+
	Z17	+	+	+	+	+	+	+	+
	Z18	+	+	+	+	+	+	+	-

3.1.1. *CYP450* İZOFORMLARININ EKSPRESYONUNA BAĞLI OLARAK GEN FREKANS TABLOLARI

Mide doku örneklerinde *CYP450* izoformlarının ekspresyonuna dayalı istatistiksel analizler Fischer Exact Chi-Square testi kullanılarak yapılmıştır. Gen ekspresyonu frekans ölçümlerinin sonuçları tablo 9' da gösterilmektedir.

Tablo 9. Eksprese olan *CYP* izoformlarının frekans tablosu

<i>CYP</i> izoformları	<i>CYP</i> isoformlarının frekans yüzdesi (%)
<i>CYP1A1</i>	100
<i>CYP1A2</i>	92,9
<i>CYP2A6</i>	42,9
<i>CYP2B6</i>	71,4
<i>CYP2C</i>	100
<i>CYP2D6</i>	100
<i>CYP2E1</i>	42,9
<i>CYP3A5</i>	85,7

3.1.2. CİNSİYETE BAĞLI OLARAK *CYP450* İZOFORMLARININ EKSPRESYONU

CYP1A1, *CYP2C*, *CYP2D6* tüm örneklerde eksprese olduğu için analiz edilemedi. *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP3A5* için $p=1.00$ değerini alarak cinsiyet bu genlerin ekspresyonunda anlamlı bir farklılık göstermemektedir. *CYP2E1* $p=0.286$ değerini alarak anlamlı bir değer göstermemektedir. *CYP2A6* ise $p=0.029$ değeri ile kadınlarda daha fazla eksprese olmaktadır. Tablo 10. *CYP* izoformlarının cinsiyete bağlı istatistik değerlerini göstermektedir.

CYP izoformları	Ekspresyon yüzdesi (%)		p değerleri
	Kadın	Erkek	
CYP1A1	100	100	.*
CYP1A2	100	85,7	1.00
CYP2A6	14,3	83,3	0.029
CYP2B6	66,7	71,4	1.00
CYP2C	100	100	.*
CYP2D6	100	100	.*
CYP2E1	66,7	28,6	0.286
CYP3A5	83,3	85,7	1.00

* Bu izoformlar tüm örneklerde eksprese olduğu için analiz yapılamamıştır.

3.1.3. SİGARA İÇME ALIŞKANLIĞININ CYP450 İZOFROMLARININ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

CYP2A6, *CYP2B6*, *CYP1A2*, *CYP2E1* genleri için p değerleri baz alındığında anlamlı farklılık bulunamadı. *CYP2A6* p=0.559, *CYP2B6* p=0.530, *CYP1A2* p=0.308, *CYP2E1* p=0.559, *CYP3A5* p=1.00. *CYP1A1*, *CYP2C*, *CYP2D6* genleri ise tümü eksprese olduğu için analiz edilmemektedirler. Tablo 11. CYP izoformlarının cinsiyete bağlı istatistik değerlerini göstermektedir.

Tablo 11. *CYP* izoformlarının sigaraya bağlı istatistik değerleri

<i>CYP</i> izoformları	Kullanım durumuna bağlı ekspresyon yüzdesi (%)		<i>p</i> değerleri
	Kullanıyor	Kullanmıyor	
CYP1A1	100	100	-*
CYP1A2	75	100	0,308
CYP2A6	25	55,6	0,559
CYP2B6	50	77,8	0,530
CYP2C	100	100	-*
CYP2D6	100	100	-*
CYP2E1	25	55,6	0,559
CYP3A5	75	88,9	1,00

* Bu izoformlar tüm örneklerde eksprese olduğu için analiz yapılamamıştır.

3.1.4. ALKOL ALIŞKANLIĞININ *CYP450* İZOFROMLARININ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

CYP1A1, *CYP2C*, *CYP2D6* genleri örneklerin hepsinde eksprese olduğu için analiz edilemediler. *CYP1A2* ve *CYP2A6* ($p=1.00$), *CYP2B6* ($p=0.203$), *CYP3A5* ($p=0.423$), *CYP2E1* ($p=0.192$) genleri için *p* değerleri baz alındığında anlamlı farklılık bulunamadı. Tablo 12. de *CYP* izoformlarının alkole bağlı istatistik değerlerini göstermektedir

Tablo 12. *CYP* izoformlarının alkole bağlı istatistik değerleri

<i>CYP</i> izoformları	Kullanım durumuna bağlı ekspresyon yüzdesi (%)		<i>p</i> değerleri
	Kullanıyor	Kullanmıyor	
CYP1A1	100	100	-*
CYP1A2	100	90	0,308
CYP2A6	33,3	50	0,559
CYP2B6	33,3	80	0,530
CYP2C	100	100	-*
CYP2D6	100	100	-*
CYP2E1	60	0	0,559
CYP3A5	75	88,9	1,00

* Bu izoformlar tüm örneklerde eksprese olduğu için analiz yapılamamıştır.

3.1.5. ÜREAZ VARLIğININ *CYP450* İZOFROMLARININ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

CYP1A1, *CYP2C*, *CYP2D6* genleri ise tümü eksprese olduğu için analiz edilemediler. *CYP2A6* ($p=0.192$), *CYP3A5*, *CYP1A2*, *CYP2E1* ve *CYP2B6* ($p=1.00$) genleri için *p* değerleri baz alındığında anlamlı farklılık bulunamadı. Tablo 13. de *CYP* izoformlarının üreaza bağlı istatistik değerlerini göstermektedir.

Tablo 13. *CYP* izoformlarının üreaza bağlı istatistik değerleri

<i>CYP</i> izoformları	Üreaz aktivitesi durumuna bağlı ekspresyon yüzdesi (%)		<i>p</i> değerleri
	Var	Yok	
CYP1A1	100	100	.*
CYP1A2	100	90.9	1.00
CYP2A6	100	36.4	0.192
CYP2B6	100	63.6	1.00
CYP2C	100	100	.*
CYP2D6	100	100	.*
CYP2E1	50	45.5	1.00
CYP3A5	100	81.8	1.00

* Bu izoformlar tüm örneklerde eksprese olduğu için analiz yapılamamıştır.

3.1.6. YAŞIN *CYP450* İZOFORMLARININ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Tüm olguların yaş ortalaması 51 ± 3 'tür. Mide kanseri tanısı koyulan olguların yaş ortalaması 57 ± 3 , normal oldukları belirlenen olguların yaş ortalamasının ise 43 ± 2 'dir. Mide kanseri olan olguların yaş ortalaması normal (hasta olmayan) olgularınkinden daha yüksek olduğu gözlemlendi. *CYP1A2* ($p=0.295$), *CYP2A6* ($p=0.170$), *CYP2B6* ($p=0.464$), *CYP2E1* ($p=0.199$), *CYP3A5* ($p=0.336$) değerini almakla beraber *CYP1A1*, *CYP2C*, *CYP2D6* genleri tümü eksprese olduğu için analiz edilemediler. Tablo 14. te *CYP* izoformlarının yaşa bağlı istatistik değerlerini göstermektedir.

Tablo 14. CYP izoformlarının yaşa bağlı istatistik değerleri

CYP izoformları	Yaş Ortalaması		p değerleri
	Eksprese olanların yaş ortalaması	Eksprese olmayanların yaş ortalaması	
CYP1A1	51	-	.*
CYP1A2	48	64	0.295
CYP2A6	44	54	0.170
CYP2B6	51	45	0.464
CYP2C	51	-	.*
CYP2D6	51	-	.*
CYP2E1	45	54	0.199
CYP3A5	51	41	0.336

* Bu izoformlar tüm örneklerde eksprese olduğu için analiz yapılamamıştır.

3.1.7. MİDE KANSERİNİN CYP450 İZOFORMLARININ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Mide kanseri ile *CYP450* izoformlarının ekspresyonları karşılaştırıldığında; mide kanseri olgusu ile çalışılan izoformların ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenemedi. *CYP2A6* (p=0.277), *CYP2B6* (p=0.245) ve *CYP3A5* (p=0.165) genleri ekspresyonunda anlamlı farklılık bulunmayıp, *CYP1A1*, *CYP2C* ve *CYP2D6* çalışılan bütün olgularda eksprese oldu. *CYP1A2* ve *CYP2E1* için (p=1.00) anlamlı bir farklılık bulunamadı. Tablo 15. de CYP izoformlarının mide kanserine bağlı istatistik değerlerini göstermektedir.

Tablo 15. *CYP* izoformlarının kansere bağlı istatistik değerleri

<i>CYP</i> izoformları	Ekspresyon durumu (%)		<i>p</i> değerleri
	Kanser olanların	Kanser olmayanların	
CYP1A1	100	100	-*
CYP1A2	87,5	100	1.00
CYP2A6	25	66,7	0.277
CYP2B6	87,5	50	0.245
CYP2C	100	100	-*
CYP2D6	100	100	-*
CYP2E1	37,5	50	1.00
CYP3A5	100	66,7	0.165

* Bu izoformlar tüm örneklerde eksprese olduğu için analiz yapılamamıştır.

BÖLÜM IV

4.1 TARTIŞMA

Mide epitelyum dokusunun absorbe etme özelliğinden çok sekresyonunun fazla oluşu ve *CYP*' lerin diğer dokulara nispeten daha az eksprese oluşları nedeniyle midede *CYP450* gen ekspresyonu ile ilgili çalışmalar, elde edilen bulguları tanımlamada ve bu genlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde güçlük çıkarmaktadır. Bu izoformlar genellikle karaciğerde eksprese olmaktadır. Fakat bazı izoformlar ekstrahepatik olarak ta eksprese olmaktadır. Örneğin *CYP3A5* polimorfik olarak insan karaciğerinde eksprese olmaktadır (105) ancak akciğerde (45), kolonda (17), böbrekte (28, 87), özofagusta (51) da eksprese olduğunun belirlenmesi bu genin ekstrahepatik olarak ta eksprese edildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda araştırma materyali olarak insan mide dokusu kullanılmıştır. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümü' ne mide rahatsızlıkları nedeniyle başvuran 14 kişiden endoskopi yöntemi ile 10-100 mg mide biyopsi antrum doku örnekleri alınmıştır. Mide doku örneği alınmasının güçlükleri göz önüne alındığında çalışmamızın istatistiksel bir amaç taşımaması sebebiyle 14 örnek çalışılması genel olarak mide antrum dokusunda *CYP* ekspresyon profilini çıkarma hedefine uygun yeterli bir sayıdır. Tablo 3' de listesi verilen örnekler analiz edildiğinde malign ve normal doku örneklerinin alındığı bireylerin eş sayıda cinsiyet dağılımı gösterdikleri ve yaş ortalamalarının birbirleri ile karşılaştırılabilir durumda oldukları görülmektedir.

Çalışmamızda dikkat ettiğimiz bir farklı unsur intestinal metaplazi örneklerine yer vermeyişimizdir. İntestinal metaplazi, midede gastrik mukozanın ince bağırsak öncülü bir epitelyum ile yer değişiminden kaynaklanan kanser oluşumunda etkili bir lezyon bölgesidir. Bu bölgelerin etkinliğinin oldukça fazla oluşu yüzünden mide antrum bölgesi bağımsız olarak çalışılmıştır. Mide örneklerinde intestinal metaplazi olmadığına dair bilgilerin edinimi ve kanser, gastrit teşhisleri, Ege Üniversitesi Gastroentoloji Bölümü' nde yapılan muayene ve patoloji raporlarına dayanılarak yapılmıştır.

Çalışmamız temel olarak PCR kullanılarak yapılmıştır. Bu metod *in vitro* koşullarda hedef DNA molekülünün enzimatik olarak çoğaltılması (amplifikasyon) esasına dayanan bir yöntemdir. Temel olarak DNA' nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), primerlerin hedef DNA' ya bağlanması (hibridizasyon), DNA bağımlı DNA polimeraz enzimi aracılığıyla zincirlerin uzaması (polimerizasyon) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması ana basamaklarından oluşur. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR döngüsünü oluşturur. PCR teknolojisi için; DNA örneği, genellikle genomik DNA, çoğaltılacak olan bölgedeki her iki ipliğe bağlanan bir çift primer, deoksinukleotidtrifosfatlar (dNTP'ler: dA,dT,dC,dG), ısıya dayanıklı Taq Polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine komplementer bir çift primer kullanılarak istenen genin enzimatik olarak çoğaltılmasına dayanır.

Örneklerden izole ettiğimiz RNA ve cDNA ların güvenilirliği PCR ile test edilerek reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi fragmente edilmiş DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında, tanımlanmasında ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu metodların ilkesi; yapısındaki fosfat nedeniyle negatif yüklere sahip olan DNA moleküllerinin elektriksel alanda pozitif elektroda doğru hareket etmesidir. Bu işlemde; jel porlarının sıklığı ve DNA büyüklüğüne bağlı olarak DNA molekülleri, hızlı veya yavaş hareket ederler ve jel boyunca farklı bölgelerde yoğunlaşırlar. Yöntem basit olması, kısa zamanda yapılabilmesi ve yoğunluk gradienti gibi diğer yöntemlerden farklı olarak fragmanların analizine olanak sağlaması bakımından biyoteknolojide sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem kullanılarak, 1-10 ng kadar az DNA fragmanları bile floresan interkalasyon özelliği gösteren EtdBr ile boyanarak UV ışığı altında görüntülenebilmektedir.

Çalışmamızda her örnek için ortalama 4,3/10 µl ng RNA kullanılarak revers transkriptaz PCR ile cDNA sentezi yapılmıştır. Kullandığımız RNA miktarı ve örnek sayısı Thörn ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmayla benzer miktarda ve sayıdadır (100). RNA izolasyonu yapılan örneklerin güvenilirlik testleri konvansiyonel PCR ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA' larla konvansiyonel PCR ve ardından daha hassas ölçümler almak ve çalışmamızın güvenilirliğini artırmak için real time PCR yardımıyla spesifik primerlerle çalışılarak doku spesifik gen ekspresyonu gözlenmiştir. Kullandığımız primerler, daha önce insan dokularında CYP primerleri çalışılan ve pozitif sonuçlar alınan makalelerden derlenmiştir. Amplifikasyon sonucu elde edilen DNA bandları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Ancak örneğin Şekil 3' te DNA bandlarının farklı yoğunluklarda oldukları da

gözenmektedir. Bu farklılık RT-PCR' dan farklı olarak konvansiyonel PCR' ın kantitatif esasa dayanmamasından kaynaklanmaktadır. Şekil 3' te 12 örnek için verilen sonuçlar göz önüne alındığında uygulanan örneklerin tamamının, molekül ağırlığı 286 bp olan pozitif kontrol olarak kullandığımız β -Globin primeri ile PCR amplifikasyonu yapılan molekülün standart DNA bandlarına ya kıyasla, beklenen bölgelerde yoğunlaştığı görülmektedir. Konvansiyonel PCR deneyleri sonucunda amplifikasyonları gösterilen CYP izoformları için RT-PCR reaksiyonları yapılmıştır.

Sonuçlara göre yapılan kalitatif ve kantitatif çalışmalar birbirini desteklemiştir. Real Time PCR, hücre ve dokulardan çok az miktarda mRNA'nın ölçümüne olanak verdiği için kullanılan en hassas yöntemdir. Real Time-PCR, örneklerin amplifikasyonlarının reaksiyonla eş zamanlı olarak verdikleri piklerin ışına ölçümlerine dayanarak yapılmaktadır. Örnekler Syber-Green gibi floresan boyalarla boyanarak reaksiyon pikleri hassas bir ölçümle belirlenmektedir. Küçük RNA varyasyonlarının amplifikasyonları, ürün bazında ciddi farklılıklara yol açtığı için elde edilen ürün ve template miktarı arasındaki ilişki orantılı görülmemekte ve reaksiyonu standardize etme ihtiyacı doğmaktadır. Bunun için internal kontrol ve gen spesifik primerler kullanılmaktadır. Kalitatif PCR'da bu; her örnek için gen spesifik primerin internal kontrole oranı ile belirlenir. İnternal kontrol olarak yine β -Globin kullanılmıştır.

Çalışmamızda daha iyi reaksiyon koşulları sağlamak için RT-PCR aşamasında genellikle 60 °C annealing/bağlanma sıcaklığı uygulandı. Her primer için ayrı işlem basamakları oluşturuldu. Primerlerin annealing basamığında Tm sıcaklıkları göz önünde bulundurulmuştur. Tm sıcaklığı, çift iplikli DNA/ tek iplikli DNA

oranının birbirine eşit olduğu sıcaklıktır. Bu sıcaklık pozitif kontrol olarak kullanılarak diğer Tm dereceleriyle karşılaştırılıp optimizasyon sağlanır. Tm sıcaklığı aynı zamanda ürünün istenen büyüklükte olup olmadığını da anlamımıza yardım etmiştir. Eğer amplifikasyon süresince tek bir ürün oluşmuşsa pikler sadece bir erime sıcaklığında oluşacaktır. Eğer farklı büyüklükte ürünler oluşmuşsa Tm dereceleri farklı pikler gözlenecektir.

Çalışmamızda erime eğrileri grafikleri her bir primer için çalışılmış ve optimizasyonu sağlanmıştır. Primer konsantrasyonu 0,5 mM olup MgCl₂ her tüp için 3mM olarak kullanılmıştır. Spesifik primerlerle amplifike olan DNA ürünleri primer dimerlerinden daha yüksek sıcaklıklarda erime eğrisi verirler. Dolayısıyla primer dimerleri oluşumuna bağlı non-spesifik pikler gözlenmesi halinde hem annealing sıcaklığı hem de ekstensiyon süresi yükseltildi. Ekstensiyon süresi primer moleküler ağırlığı/25 formülü ile belirlendi. Primer dimeri oluşması durumunda bu süre uzatıldı. PCR döngülerinin sayısı (40-44) primer spesifikliğine göre belirlendi. RT-PCR süresince 530 nm dalga boyunda ürün oluşumuna bağlı pikleri gösteren floresan boya yardımı ile ışımalar grafikler halinde kaydedildi.

CYP izoformlarının ekspresyon sonuçlarına dayanarak yapılan Fischer Exact Chi-Square testine göre cinsiyet, sigara, yaş, alkol, üreaz ve kanser olmak üzere altı ayrı kategoriye göre istatistik analiz yapıldı. Gen ekspresyonu frekans ölçümlerine göre sırasıyla; CYP2A6(42,9%), CYP2B6(71,4%), CYP2D6(100%), CYP1A1(100%), CYP1A2(92,9%), CYP3A5(85,7%), CYP2C(100%), CYP2E1(42,9%) oranında eksprese oldukları gözlemlendi. Yaş ile CYP450 izoformlarının ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık

bulunamadı. Mide kanseri olan olguların yaş ortalaması normal (hasta olmayan) olgularınkinden daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Mide kanseri ile CYP450 izoformlarının ekspresyonları karşılaştırıldığında; mide kanseri olgusu ile çalışılan izoformların ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenemedi. CYP2A6, CYP2B6 ve CYP3A5 genleri ekspresyonunda olgu sayısı az olduğu nedeniyle anlamlı farklılık bulunmayıp CYP2D6, CYP1A1 ve CYP2C çalışılan bütün olgularda eksprese oldu. CYP2A6'nın ekspresyonunun kadınlarda daha fazla olduğu, diğer izoformların ekspresyonu ile cinsiyet arasında anlamlı farklılık olmadığı belirlendi. Üreaz, sigara ve alkol alışkanlığına bağlı CYP450 izoformlarının ekspresyonları karşılaştırıldığında; sigara, üreaz ve alkol alışkanlığının çalışılan izoformların ekspresyonu üzerine anlamlı etkisi olmadığı belirlendi.

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda mide dokusunda CYP450 enzimlerinin izoformlarının mRNA düzeyinde ekspresyonu araştırılarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre mide kanseri olan olguların yaş ortalaması normal (hasta olmayan) olgularınkinden daha yüksek olduğu gözlemlendi ve cinsiyete bağlı olarak CYP450 izoformlarının ekspresyonu değerlendirildiğinde sadece CYP2A6'nın ekspresyonunun kadınlarda daha fazla olduğu belirlendi. Çalışılan örnek sayısının azlığı yanı sıra CYP -1A1, -2C ve -2D6'nın tüm örneklerde eksprese olması sebebiyle bu izoformların kontrol grubu elde edilememektedir. CYP'lerin insan mide dokusundaki potansiyel endojen ve eksojen metabolizmasını açıklayabilmek için mRNA düzeyinde ekspresyonları belirlendi. Bu çalışmanın devamında post-translasyonel olarak regülasyonları; proteinlerin translasyon oranı, yarı ömürleri, polimorfizmleri ve ilaç etkileşimleri araştırılarak daha ileri seviyede bilgilere ulaşılabilecektir.

ÖZET

MİDE ANTRUM MUKOZA ÖRNEKLERİNDE SİTOKROM P450 GEN EKSPRESYONUNUN mRNA DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ

Sitokrom CYP450 enzimleri, yapısında demir grubu içeren ilaçlar ve bir çok karsinogen maddeler dahil, geniş bir aralığa ait zenobiyotik metabolizmasında görev alan bir enzim süper ailesidir. CYP enzimlerinin aile ve alt aileleri aminoasit dizilimi yönünden benzerliklerine göre değerlendirilmektedirler. Son yıllarda CYP'lerin kanserle ilişkisi hakkında çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu enzimlere ait genler genellikle karaciğerde eksprese olmaktadır. Ekspresyonları ise genellikle doku spesifikliği göstermektedir. 20 CYP enzimi insan dokularında tanımlanmakla birlikte mide dokusunda CYP ekspresyonu çalışması yeterli sayıda yapılmamıştır. Bu enzimlerin gastrointestinal sistemdeki ekspresyonuna bağlı endojen ve zenobiyotik enzim metabolizmasını daha iyi anlayabilmek için revers transkriptaz RT-PCR yöntemi ile mide dokusunda mRNA ekspresyonunu inceledik. Kullandığımız spesifik primerler yardımı ile CYP -1A1, -1A2, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, ve -3A5' in doku spesifik mRNA ekspresyonunu araştırdık. Doku spesifik CYP ekspresyonunun incelenmesi ile bir çok kimyasal karsinogenin doku spesifikliği ve ayrıca ilgili terapötik ajanların vücudu zenobiyotiklere karşı potansiyel koruma görevinin etkileri daha iyi açıklanabilecektir.

Anahtar kelimeler : Sitokrom P450, Mide dokusu, ilaç metabolize eden enzimler.

ABSTRACT

DETERMINATION OF CYTOCHROME P450 GENE EXPRESSION IN STOMACH ANTRUM TISSUE SAMPLES AT mRNA LEVEL

Cytochrome P450 (CYP) is a heme-containing enzyme superfamily metabolizing a wide variety of xenobiotics, including drugs and carcinogens. The CYP families and subfamilies are defined on the basis of their amino acid sequence similarities. Over the past years there have been an increased number of researches on the relationship between CYPs and cancer. The majority of these genes are expressed most abundantly in liver. The regulation of CYP expression is, in part, tissue-specific. Approximately 20 individual CYPs have been identified in human, however relatively little is known about the individual CYP forms present in stomach tissues. To understand more thoroughly the function of CYP systems in human gastrointestinal system and their significance in the metabolism of xenobiotics and endogenous compounds, we analyzed the mRNAs for the CYPs in stomach tissue samples using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The mRNA detections were made by using specific primers for CYPs *-1A1*, *-1A2*, *-2B6*, *-2C*, *-2D6*, *-2E1*, and *-3A5*. The tissue specificity of CYP expression may possibly underlie the organ specificity of chemical carcinogens and their potential roles in the protection of the body against xenobiotics as well as influence in the bioavailability of therapeutic compounds.

Key Words: Cytochrome P450, stomach tissue, drug metabolizing enzymes.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P.S., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. (1990). Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4790-4793
2. Bertz, R.J. and Granneman, G.R. (1997). Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* 32:210-258
3. Capdevila, J.H., Falck, J.R. and Haris, R.C. (2000). Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res* 41:163-181
4. Chang, T.K.H., Weber, G.F., Crespi, C.L. and Waxman, D.J. (1993). Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 53:5629-5637
5. Chang, T.K.H., Yu, L., Maurel, P. and Waxman, D.J. (1997). Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res* 57:1946-1954
6. Cholerton, S., Idle, M.E., Vas, A., Gonzalez, F.J. and Idle, J.R. (1992). Comparison of a novel thin-layer chromatographic-fluorescence detection method with a spectrofluorometric method for the determination of 7-hydroxycoumarin in human urine. *J Chromatogr* 575:325-330
7. Code, E.L., Crespi, C.L., Penman, B.W., Gonzalez, F.J., Chang, T.K.H. and Waxman, D.J. (1997). Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos* 25:985-993
8. Connell, O. (2002). *Methods in Molecular Biology, RT-PCR Protocols*, Humana Pres. Inc. New Jersey, 193:83-91
9. Czerwinski, M., McLemore, T.L., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. (1994). Quantitation of CYP2B7, CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors. *Cancer Res* 54:1085-1091

10. Dalen, P., Dahl, M.L., Ruiz, M.L., Nordin, J. and Bertilsson, L. (1998). 10-hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther* 63:444-452
11. Dalet-Beluche, I., Boulenc, X., Fabre, G., Maurel, P. and Bonfils, C. (1992). Purification of two cytochrome P450 isozymes related to CYP2A and CYP3A gene families from monkey (baboon, *Papio papio*) liver microsomes. Cross reactivity with human forms. *Eur J Biochem* 204:641-648
12. Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Matlib, R.S., Childs, N.L., Shertzer, H.G., Genter, M.B. and Nebert, D.W. (2000). Targeted knockout of *Cyp1a1* gene does not alter hepatic constitutive expression of other genes in the mouse [Ah]; battery. *Biochem Biophys Res Commun* 267:184-189
13. Dehal, S.S. and Kupfer, D. (1994). Metabolism of the proestrogenic pesticide methoxychlor by hepatic P450 monooxygenases in rats and humans. Dual pathways involving novel ortho ring-hydroxylation by CYP2B6. *Drug Metab Dispos* 22:937-946
14. Ding, X. and Kaminsky, L.S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:149-173
15. Yamano S, Tatsuno J and Gonzalez FJ (1990). The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry* 29:1322-1329
16. Edwards, R.J., Adams, D.A., Watts, P.S., Davies, D.S. and Boobis, A.R. (1998). Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans. *Biochem Pharmacol* 56:377-387
17. Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J.C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., de Berardinis, V., Martin, H., Beaune, P. and de Waziers, I. (1999). Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 9:295-306
18. Gonzalez, F.J. (1992). Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 13:346-352

19. Gonzalez, F.J., Crespi, C.L., Czerwinski, M. and Gelboin, H.V. (1992). Analysis of human cytochrome P450 catalytic activities and expression. *Tohoku J Exp Med* 168:67-72
20. Ged, C., Rouillon, J.M., Pichard, L., Combalbert, J., Bressot, N., Bories, P., Michel, H., Beaune, P. and Maurel, P. (1989). The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III_A induction. *Br J Clin Pharmacol* 28:373-387
21. Getchell, M.L., Chen, Y., Sparks, D.L., Ding, X. and Getchell, T.V. (1993). Immunohistochemical localization of a cytochrome P-450 isozyme in human nasal mucosa: age-related trends. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:368-374
22. Gu, J., Su, T., Chen, Y., Zhang, Q.Y. and Ding, X. (2000). Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: potential roles in developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 165:158-162
23. Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B. and Bradfiel C.A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:519-561
24. Guengerich, F.P. (1995) Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. In: Pacifici GM and Fracchia GN (eds) *Advances in drug metabolism in man*: 179-231. European Commission. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
25. Guengerich, F.P. (2002). *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. Edited by Ioannides C. John Wiley and Sons Ltd, USA
26. Gray, I.C., Nobile, C., Muresu, R., Ford, S. and Spurr, N.K. (1995). A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics* 28:328-332
27. Greuet, J., Pichard, L., Bonfils, C., Domergue, J. and Maurel, P. (1996). The fetal specific gene CYP3A7 is inducible by rifampicin in adult human hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 225:689-694
28. Haehner, B.D., Gorski, J.C., VandenBranden, M., Wrighton, S.A., Janardan, S.K., Watkins, P.B. and Hall, S.D. (1996). Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 50:52-59
29. Hakkola, J., Pasanen, M., Purkunen, R., Saarikoski, S., Pelkonen, O., Mäenpää, J., Rane, A. and Raunio, H. (1994). Expression of xenobiotic-

- metabolizing cytochrome P450 forms in human adult and fetal liver. *Biochem Pharmacol* 48:59-64
30. Hammons, G.J., Milton, D., Stepps, K., Guengerich, F.P., Tukey RH and Kadlubar FF (1997). Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis* 18:851-854
 31. Hecht, S.S. (1998). Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11:559-603
 32. Hecht, S.S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1194-1210
 33. Hoffman, S.M.G., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F.J. and Mohrenweiser, H.W. (1995). Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *J Molec Evolut* 41:894-900
 34. Hukkanen, J. (2000). Copyright Acta University of Oulu, D Medica 621 Ouluensis, Oulu, Finland
 35. Imaoka, S., Yamada, T., Hiroi, T., Hayashi, K., Sakaki, T., Yabusaki, Y. and Funae, Y. (1996). Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem Pharmacol* 51:1041-1050
 36. Imaoka, S., Yoneda, Y., Sugimoto, T., Hiroi, T., Yamamoto, K., Nakatani, T. and Funae, Y. (2000). CYP4B1 is a possible risk factor for bladder cancer in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 277:776-780
 37. Iscan, M., Rostami, H., Guray, T., Pelkonen, O. and Rautio, A. (1994). A study on the interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 47:315-318
 38. Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjöqvist, F. and Ingelman-Sundberg, M. (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11825-11829
 39. Jounaidi, Y., Hyraille, V., Gervot, L. and Maurel, P. (1996). Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? *Biochem Biophys Res Commun* 221:466-470

40. Kitada, M., Kamataki, T., Itahashi, K., Rikihisa, T., Kato, R. and Kanakubo, Y. (1985). Purification and properties of cytochrome P-450 from homogenates of human fetal livers. *Arch Biochem Biophys* 241:275-280
41. Kitada, M., Kamataki, T., Itahashi, K., Rikihisa, T. and Kanakubo, Y. (1987). Significance of cytochrome P-450 (P-450 HFLa) of human fetal livers in the steroid and drug oxidations. *Biochem Pharmacol* 36:453-456
42. Kitada, M., Taneda, M., Itahashi, K. and Kamataki, T. (1991). Four forms of cytochrome P-450 in human fetal livers: purification and their capacity to activate promutagens. *Jpn J Cancer Res* 82:426-432
43. Kitada, M. and Kamataki, T. (1994). Cytochrome P450 in human fetal liver: significance and fetal specific expression. *Drug Metab Rev* 26:305-323
44. Kitagawa, K., Kunugita, N., Katoh, T., Yang, M. and Kawamoto, T. (1999). The significance of the homozygous CYP2A6 deletion on nicotine metabolism: a new genotyping method of CYP2A6 using a single PCR-RFLP. *Biochem Biophys Res Commun* 262:146-151
45. Kivistö, K.T., Griese, E.U., Fritz, P., Linder, A., Hakkola, J., Raunio, H., Beaune, P. and Kroemer, H.K. (1996). Expression of cytochrome P4503A enzymes in human lung: a combined RT-PCR and immunohistochemical analysis of normal tissue and lung tumors. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 353:207-212
46. Kolars, J.C., Schmiedlin-Ren, P., Schuetz, J.D., Fang, C. and Watkins, P.B. (1992). Identification of rifampicin-inducible P450IIA4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest* 90:1871-1878
47. Koskela, S., Hakkola, J., Hukkanen, J., Pelkonen, O., Sorri, M., Saranen, A., Anttila, S., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F.J. and Raunio, H. (1999). Expression of CYP2A genes in human liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol* 57:1407-1413
48. Kushida, H., Fujita, K., Suzuki, A., Yamada, M., Endo, T., Nohmi, T. and Kamataki, T. (2000). Metabolic activation of N-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis* 21:1227-1232
49. Labuhn, M. and Brack, C. (1997). Age-related changes in mRNA expression of actin isoforms in *Drosophila Melangaster*. *Gerontology* 43:261-267

50. Landi, M.T., Sinha, R., Lang, N.P. and Kadlubar, F.F. (1999). Human cytochrome P4501A2. In: Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J and Boffetta P (eds) *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*: 173-195. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon.
51. Lechevrel, M., Casson, A.G., Wolf, C.R., Hardie, L. J., Flinterman, M.B., Montesano, R. and Wild, C.P. (1999). Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa *Carcinogenesis* 20:243–248
52. Lehmann, J.M., McKee, D.D., Watson, M.A., Wilson, T.M., Moore, J.T. and Kliewer, S.A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 102: 1016-1023
53. Lund, E.G., Guileyardo, J.M. and Russell, D.W. (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7238-7243
54. Lieber, C.S. (1997). Cytochrome P-4502E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 77:517-544
55. Lindell, M., Karlsson, M.O., Lennernäs, H., Pählman, L. and Lang, M.A. (2003). Variable expression of CYP and Pgp genes in the human small intestine. *European Journal of Clinical Investigation* 33:493–499
56. Macé, K., Aguilar, F., Wang, J.S., Vautravers, P., Gomez-Lechon, M., Gonzalez, F.J., Groopman, J., Haris, C.C. and Pfeifer, A.M.A. (1997). Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 18:1291-1297
57. Messina, E.S., Tyndale, R.F. and Sellers, E.M. (1997). A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1608-1614
58. McKinnon, R.A., Burgess, W.M., Gonzalez, F.J., Gasser, R. and McManus, M.E. (1994). Species-specific expression of CYP4B1 in rabbit and human gastrointestinal tissues. *Pharmacogenetics* 4:260-270
59. Mimura, M., Baba, T., Yamazaki, H., Ohmori, S., Inui, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1993). Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 21:1048-1056
60. Miyamoto, M., Umetsu, Y., Dosaka-Akita, H., Sawamura, Y., Yokota, J., Kunitoh, H., Nemoto, N., Sato, K., Ariyoshi, N. and Kamataki, T. (1999).

- CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 261:658-660
61. Moore, L.B., Parks, D.J., Jones, S.A., Bledsoe, R.K., Consler, T.G., Stimmel, J.B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S.G., Wilson, T.M., Collins, J.L. and Kliewer, S.A. (2000a). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* 275:15122-15127
 62. Morel, F., Beaune, P.H., Ratanasavanh, D., Flinois, J.P., Yang, C.S., Guengerich, F.P. and Guillouzo, A. (1990). Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur J Biochem* 191:437-444
 63. Nakajima, M., Yamamoto, T., Nunoya, K.I., Yokoi, T., Nagashima, K., Inoue, K., Funae, Y., Shimada, N. and Kuroiwa, Y. (1996). Role of human cytochrome P450A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* 24:1212-1217
 64. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D.W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42
 65. Nelson, D.R. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 369:1-10
 66. Nhamburo, P.T., Gonzalez, F.J., McBride, O.W., Gelboin, H.V. and Kimura, S. (1989). Identification of a new P450 expressed in human lung: complete cDNA sequence, cDNA-directed expression, and chromosome mapping. *Biochemistry* 28:8060-8066
 67. O'Connell J. (2002), *RT-PCR Protocols*. Humana Press. Totowa, NJ, USA.
 68. Pascussi, J.M., Jounaidi, Y., Drocourt, L., Domergue, J., Balabaud, C., Maurel, P. and Vilarem, M.J. (1999). Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 260:377-381
 69. Pascussi, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Fabre, J.M., Maurel, P. and Vilarem, M.J. (2000). Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 274:707-713

70. Pascussi, J.M., Drocourt, L., Fabre, J.M., Maurel, P. and Vilarem, M.J. (2000). Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor- α expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* 58:361-372
71. Pelkonen, O., Mäenpää, J., Taavitsainen, P., Rautio, A. and Raunio, H. (1998). Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 28:1203-1253
72. Pelkonen, O. and Raunio, H. (1997). Metabolic activation of toxins: Tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect* 105:767-774
73. Perrot, N., Nalpas, B., Yang, C.S. and Beaune, P.H. (1989). Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver, by ethanol and drug intake. *Eur J Clin Invest* 19:549-555
74. Raff, T. (1997). Design and testing of β -actin primers for RT-PCR which do not co-amplify processed pseudogenes. *Biotechniques* 23:456-460
75. Raunio, H., Pasanen, M., Mäenpää, J., Hakkola, J. and Pelkonen, O. (1995a) Expression of extrahepatic cytochrome P450 in humans. In: Pacifici GM and Fracchia GN (eds) *Advances in Drug Metabolism in Man*: 234-287. European Commission, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
76. Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hirvonen, A. and Pelkonen, O. (1995b). Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-review. *Gene* 159:113-121
77. Raunio, H., Hakkola, J., Hukkanen, J., Lassila, A., Päivärinta, K., Pelkonen, O., Anttila, S., Piipari, R., Boobis, A.R. and Edwards, R.J. (1999). Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue. *Exp Toxic Pathol* 51:412-417
78. Rautio, A., Kraul, H., Kojo, A., Salmela, E. and Pelkonen, O. (1992). Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy individuals. *Pharmacogenetics* 2:227-233
79. Rodríguez-Antona, C., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J. and Castell, J.V. (2000). Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450s: application to drug induction studies. *Arch Biochem Biophys* 376:109-116

80. Rodriguez-Antona, C., Donato, M.T., Gómez-Lechón, E.P. M. and Castell, J.V. (2001). Cytochrome P-450 mRNA Expression in Human Liver and Its Relationship with Enzyme Activity. *Biochemistry and Biophysics* 393:308–315
81. Ronis, M.J.J., Lindros, K.O. and Ingelman-Sundberg, M. (1996). The CYP2E subfamily. In: Ioannides C and Parke DV (eds) *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*: 211-239. CRC Press, Boca Raton.
82. Rostami-Hodjegan, A., Lennard, M.S., Woods, H.F. and Tucker, G.T. (1998). Meta-analysis of studies of the CYP2D6 polymorphism in relation to lung cancer and Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 8:227-238
83. Rowland, P., Blaney, F.E., Smyth, M.G., Jones, J.J., Leydon, V.R., Oxbrow, A.K. , Lewis, C.J. , Tennant, M.G., Modi, S., Eggleston, D.S., Chenery, R.J. and Bridges, A.M. (2006). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.* 281:7614-7622
84. Runge, D., Köhler, C., Kostrubsky, V.E., Jäger, D., Lehmann, T., Runge, D.M., May, U., Beer Stolz, D., Strom S.C., Fleig, W.E. and Michalopoulos GK (2000). Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 273:333-341
85. Sarikaya, D., Bilgen, C., Kamataki ,T., and Z. Topcu. (2006) Comparative Cytochrome P450 -1A1, -2A6, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, -3A5 and -4B1 Expressions in Human Larynx Tissue Analysed at mRNA Level. *Biopharm Drug Dispos* 27: 353–359
86. Schmidt, J.V. and Bradfield, C.A. (1996). Ah receptor signalling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89
87. Schuetz, E.G., Schuetz, J.D., Grogan, W.M., Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G., Raucy, J., Guzelian, P., Gionela, K. and Watlington, C.O. (1992). Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys* 294:206-214
88. Schuetz, J.D., Beach, D.L. and Guzelian, P.S. (1994). Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics* 4:11-20

89. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. and Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270:414-423
90. Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P. and Sutter, T.R. (1996a). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56:2979-2984
91. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Wakamiya, N., Ueng, Y.F., Guengerich, F.P. and Inui, Y. (1996b). Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal livers and adult lungs. *Drug Metab Dispos* 24:515-522
92. Song, B.J. (1995) Gene structure and multiple regulations of the ethanol-inducible cytochrome P4502E1 (CYP2E1) subfamily.
93. Watson R.R., *Drug and Alcohol Abuse Reviews*, Humana Press, Totowa, NJ., 6: Alcohol and Hormones: 177-192
94. Sotaniemi, E.A., Rautio, A., Bäckström, M., Arvela, P. and Pelkonen, O. (1995). CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol* 39:71-76
95. Su, T., Sheng, J.J., Lipinkas, T.W. and Ding, X. (1996). Expression of CYP2A genes in rodent and human nasal mucosa. *Drug Metab Dispos* 24:884-890
96. Su, T., Bao, Z., Zhang, Q.Y., Smith, T.J., Hong, J.Y. and Ding, X. (2000). Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 60:5074-5079
97. Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. and Negishi, M. (1999). The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem* 274:6043-6046
98. Tatemichi, M., Nomura, S., Ogura, T., Sone, H., Nagata, H., and Esumi, H. (1999). Mutagenic Activation of Environmental Carcinogens by

Microsomes of Gastric Mucosa with Intestinal Metaplasia *Cancer Research* 59:3893–3898

99. Thummel, K.E. and Wilkinson, G.R. (1998). In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:389-430
100. Thörn, M., Finnström, N., Lundgren, S., Rane, A., Lööf, L. (2005). Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol* 60:54–60
101. Treluyer, J.M., Gueret, G., Cheron, G., Sonnier, M. and Cresteil, T. (1997). Developmental expression of CYP2C and CYP2C-dependent activities in the human liver: in-vivo/in-vitro correlation and inducibility. *Pharmacogenetics* 7:441-452
102. Topcu, Z., Chiba, I., Fujieda, M., Shibata, T., Ariyoshi, N., Yamazaki, H., Sevgican, F., Muthumala, M., Kobayashi, H., and Kamataki, T. (2002). CYP2A6 gene deletion reduces oral cancer risk in betel quid chewers in Sri Lanka. *Carcinogenesis* 23:595–598
103. White, J.A., Beckett-Jones, B., Guo, Y.D., Dilworth, F.J., Bonasoro, J., Jones, G. and Petkovich, M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* 272:18538-18541
104. Willey, J.C., Coy, E.L., Frampton, M.W., Torres, A., Apostolakos, M.J., Hoehn, G., Schuermann, W.H., Thilly, W.G., Olson, D.E., Hammersley, J.R., Crespi, C.L. and Utell, M.J. (1997). Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:114-124
105. Wrighton, S.A., Ring, B.J., Watkins, P.B. and VandenBranden, M. (1989). Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P-450III family. *Mol Pharmacol* 86:97-105
106. Yamano S, Tatsuno J & Gonzalez FJ (1990). The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry* 29: 1322-1329.
107. Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1992). Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for

- metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 13:1789-1794
108. Yamazaki, H., Inui, Y., Wrighton, S.A., Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1995). Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in *Escherichia coli* and by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 16:2167-2170
109. Yamazaki, H., Inoue, K., Hashimoto, M. and Shimada, T. (1999). Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch Toxicol* 73:65-70
110. Yokose, T., Doy, M., Kakiki, M., Horie, T., Matsuzaki, Y., Mukai, K. (1998). Expression of cytochrome P450 3A4 in foveolar epithelium with intestinal metaplasia of the human stomach. *Jpn J Cancer Res.* 89:1028-32
111. Zevin, and Benowitz. (1999). Drug interactions with tobacco smoking. *Clin Pharmacokinet* 36:425-38
112. Zheng, Y.M., Fisher, M.B., Yokotani, N., Fujii-Kuriyama, Y. and Rettie, A.E. (1998). Identification of a meander region proline residue critical for heme binding to cytochrome P450: implications for the catalytic function of human CYP4B1. *Biochemistry* 37:12847-12851
113. Zilly, W., Breimer, D.D. and Richter, E. (1977). Stimulation of drug metabolism by rifampicin in patients with cirrhosis or cholestasis measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance. *Eur J Clin Pharmacol* 11:287-293

ÖZGEÇMİŞ

2000 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladım. 2005 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilimdalı'nda yüksek lisansa başladım. (Turkish Biochemical Society) Türk Biyokimya ve European Association for Cancer Research Dernekleri'ne üyeyim.