

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERLİ OLGULARDA GLUTATYON S-
TRANSFERAZ P1 GENİNİN İLE105VAL POLİMORFİZMİNİN VE
PROMOTER BÖLGE HİPERMETİLASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ar. Gör. Rukiye ÖZEL

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA

İZMİR

2006

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERLİ OLGULARDA GLUTATYON S-
TRANSFERAZ P1 GENİNİN İLE105VAL POLİMORFİZMİNİN VE
PROMOTER BÖLGE HİPERMETİLASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ar. Gör. Rukiye ÖZEL

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA

İZMİR

2006

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan (Danışman) : Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA

Üye : Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU

Üye : Doç. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr Buket Kosova' ya,

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini hep yanımda hissettiğim Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU' na,

Tez çalışmam için gerekli olan hasta grubunu temin edip, çalışmayı özveriyle takip eden, her zaman desteğini hissettiğim Sayın Doç. Dr. Çağ ÇAL' a,

Anabilim Dalımızın diğer değerli öğretim üyeleri, Sayın Yard. Doç. Dr. Zuhal EROĞLU' na ve Sayın Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ' e,

Çalışmamın metilasyon aşamasında sınırsız sabrıyla tüm birikimlerini benimle paylaşarak beni yönlendiren Sayın Uzman Dr. Hüseyin ONAY' a,

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte çalıştığım, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, Sayın Ar. Gör. Aslı Tetik, Sayın Ar. Gör. Nur Selvi ve Sayın Ar. Gör. Burçin Tezcanlı' ya,

Anabilim dalımızın diğer tüm çalışanlarına,

Lisans eğitimim ve yüksek lisans boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini, sevgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Çağdaş ŞİŞMAN, Sayın Bahar ÇAVUŞOĞLU, Sayın Miray APAK ve Sayın Mükremin BALCI' ya,

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Ailem' e ve tez çalışmamın yazılım aşamasında yardımını esirgemeyen sevgili abim Dilaver ÖZEL ve eşi Ezgi ÖZEL' e,

TEŞEKKÜR EDİYORUM.

İZMİR 2006

Ar. Gör. Rukiye ÖZEL

İÇİNDEKİLER

1. BÖLÜM	
1.1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.2. GENEL BİLGİLER	4
1.2.1. PROSTAT KANSERİ	5
1.2.2. PROSTAT KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ	6
1.2.2.1. İnsidans ve Ölüm Oranı	6
1.2.3. PROSTAT KANSERİNİN ETİYOLOJİSİ	7
1.2.3.1. Irksal ve Etnik Farklılıklar	7
1.2.3.2. Yaş	8
1.2.3.3. Sigara ve Alkol Kullanımı	8
1.2.3.4. Beslenme	9
1.2.3.5. Genetik Yapı	10
1.2.3.5.1. Herediter Prostat Kanseri	11
1.2.3.5.2. Herediter Olmayan (Sporadik) Prostat Kanseri ..	11
1.2.3.6. Polimorfizmler	12
1.2.3.7. Epigenetik Değişiklikler	14
1.2.4. PROSTAT KANSERİNİN FİZYOLOJİSİ VE HİSTOPATOLOJİSİ	14
1.2.4.1. Hormonal Düzenleme	16
1.2.4.2. Prostat Kanserinin Gelişimi	16
1.2.4.3. Prostatik Intraepiteliyal Neoplazi (PIN)	17
1.2.5. PROSTAT KANSERİNİN TEŞHİSİ VE PROGNOZU İÇİN KULLANILAN METOTLAR	18
1.2.5.1. Gleason Derecelendirilmesi	18
1.2.5.2. DNA Ploidileri	20
1.2.5.3. Radyolojik Evreleme	20
1.2.5.4. Prostat Kanserinin Tedavisi	22
1.2.5.5. Prostat Kanseri Belirteçleri	23
1.2.5.5.1. Prostat Spesifik Antijen (PSA)	24
1.2.6. GLUTATYON S-TRANSFERAZLAR	25
1.2.6.1. Glutasyon S-Transferazların Sınıflandırılması	26
1.2.6.1.1. Glutasyon S-Transferaz M1 (GSTM1)	27
1.2.6.1.2. Glutasyon S-Transferaz T1 (GSTT1)	29
1.2.6.1.3. Glutasyon S-Transferaz P1 (GSTP1)	29
1.2.6.1.3.1. GSTP1' in Prostat Kanseri Oluşumundaki Rolü	30
1.2.7. PROSTAT KANSERİ OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN GENLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	31
1.2.7.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri	31
1.2.7.1.1. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	34
1.2.7.1.2. LightCycler Sistemi	35
1.2.8. EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER	39
1.2.8.1. DNA Metilasyonu	39
1.2.8.1.1. CpG Adaları	40
1.2.8.1.2. G+C İzokorları	41
1.2.8.1.3. CpG Sıcak Noktaları	41
1.2.9. DNA METİL TRANSFERAZLAR (DNMT)	42

1.2.10. HISTON DEASETİLAZLAR (HDAC) ve METİL-CpG BAĞLAYAN PROTEİNLER (MBD)	45
1.2.11. DNA METİLASYONUNUN FONKSİYONU.....	46
1.2.11.1. Gen İfadesinin Baskılanması.....	46
1.2.11.2. Genom Güvenliği ve Yapısal Bütünlüğünün Korunması.....	48
1.2.12. METİLASYON VE KANSER.....	49
1.2.12.1. Genom Genelindeki Hipometilasyon.....	49
1.2.12.2. Tümör Süpresör Gen Hipermetilasyonu.....	50
1.2.12.3. CpG Dinükleotidlerindeki Mutasyonlar.....	52
1.2.13. PROSTAT KANSERİNDE HİPERMETİLASYON.....	53
1.2.13.1. DNA Metilasyonunun Kaldırılması İle ilgili yeni Tedavi Stratejileri	61
1.2.13.2. Metilasyonun Araştırılmasında Kullanılan Metotlar	
1.2.13.2.1. Southern Blot.....	64
1.2.13.2.2. Restriksiyon enzimi- PCR.....	64
1.2.13.2.3. Bisüfit DNA Dizi Analizi.....	65
1.2.13.2.4. Metilasyona Hassas Tek Nükleotid Primer Uzaması(MS-SnuPE).....	65
1.2.13.2.5. Restriksiyon belirteç genomik taraması (RLGS)..	67
1.2.13.2.6. Diferansiyel metilasyon hibridizasyonu (DMH) ...	67
1.2.13.2.7. DNA-Chip.....	67
1.2.13.2.8. Metilasyon Spesifik PCR (MSP).....	68

2. BÖLÜM

2.1. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.1. Kontrol ve Çalışma Grubu.....	69
2.1.2. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Analizi.....	69
2.1.2.1. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Analizi Esnasında Kullanılan Cihazlar	70
2.1.2.2. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Analizi Esnasında Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	70
2.1.2.3. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Analizi Esnasında Kullanılan Hazır Kitler.....	71
2.1.2.3.1. DNA İzolasyonu Kiti.....	71
2.1.2.3.2. PCR Ürünleri Pürifikasyon Kiti.....	71
2.1.2.3.3. LightCycler Hybridization Probes Kiti.....	72
2.1.2.4. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Analizi Esnasında Kullanılan Primerler	72
2.1.2.4.1. GSTP1 Ile105Val Polimorfizmi Analizinde Kullanılan Primer Çifti	72
2.1.2.4.2. GSTP1 Ile105Val Polimorfizmi Analizinde LC İçin Kullanılan Primer Çifti.....	73
2.1.2.5. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Analizi Esnasında Kullanılan Restriksiyon Enzimi.....	74
2.1.2.6. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Analizi Esnasında Kullanılan Belirteç DNA' lar.....	74
2.1.3. GSTP1 Ile105Val Polimorfizmi İçin Çalışma Protokolü	74
2.1.3.1. Kandan DNA İzolasyonu Aşaması.....	74

2.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	76
2.1.3.2.1. Glutasyon S-Transferaz P1 için PCR.....	78
2.1.3.2.2. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin LC için Termal Profili.....	79
2.1.3.3. PCR Sonrası % 2' lik Agaroz Jel Elektroforezi.....	81
2.1.3.4. PCR Ürününün Saflaştırılması.....	81
2.1.3.5. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Polimorfizm Analizi.....	82
2.1.3.5.1. GSTP1 Ile105Val Polimorfizm Analizi için Restriksiyon Enzim Kesimi.....	82
2.1.3.5.1.1. GSTP1 Restriksiyon Enzim Kesimi Ürünlerinin Değerlendirilmesi.....	83
2.1.3.5.1.2. GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	84
2.1.4. KULLANILAN KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI.....	84
2.1.4.1. Ethidyum Bromür Hazırlanması.....	84
2.1.4.2. dNTP Hazırlanması.....	85
2.1.4.3. TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tamponu.....	85
2.1.4.4. % 2' lik Agaroz Jel Hazırlama.....	85
2.1.4.5. Enzim Kesimi için Reaksiyon Karışımının Hazırlanması.....	86
2.1.4.6. % 2' lik Millipore Agaroz (NuSieve) Jel Elektroforezi	87
2.1.5. Metilasyonun Araştırılması	87
2.1.5.1. Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Cihazlar	88
2.1.5.2. Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	88
2.1.5.3. Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Hazır Kitler..	89
2.1.5.3.1. DNA İzolasyonu Kiti.....	89
2.1.5.3.2. DNA Wizard Cleanup Kit	89
2.1.5.4. Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Primerler	90
2.1.5.5. Metilasyon Analizi için Çalışma Protokolü	91
2.1.5.5.1. Plazmadan Serbest DNA İzolasyonu Aşaması ..	91
2.1.5.5.2. NanoDrop Cihazı ile Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Kalite Ölçümü	93
2.1.5.5.3. Bisülfid Modifikasyonu	94
2.1.5.5.4. Metilasyon Spesifik-PCR (MSP)	96
2.1.5.5.4.1 PCR Reaksiyon Karışımı	97
2.1.5.5.5. MSP Sonrası % 2' lik Agaroz Jel Elektroforezi....	98
2.1.5.5.6. Metilasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	98
2.1.5.5.7. Kullanılan Kimyasal Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanışı	99
2.1.5.5.7.1. 3.9 M' lık Amonyum Asetatin Hazırlanması	99
2.1.5.5.7.2. <i>In Vitro</i> Metillenmiş Pozitif Kontrol DNA' sının Hazırlanışı	99
2.1.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ	100
3. BÖLÜM	
3.1. BULGULAR	101

3.1.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özelliklerinin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri	101
3.1.1.1. Kontrol Grubu	101
3.1.1.2. Çalışma Grubu	101
3.2. GLUTATYON S-TRANSFERAZ P1 (<i>GSTP1</i>) Ile105Val POLİMORFİZMİNE AİT BULGULAR	103
3.2.1. Glutasyon S-transferaz P1' in PCR Amplifikasyonu	103
3.2.2. Restriksiyon Enzim Kesimi Sonuçlarına Göre Olguların <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizmi İçin Genotiplendirilmeleri Ve Elde Edilen Bulgular	104
3.2.3. LightCycler Sonuçlarına Göre Olguların <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizmi İçin Genotiplendirilmeleri Ve Elde Edilen Bulgular	105
3.2.4. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Genotip ve Haplotip Analizleri.....	107
3.2.4.1. Kontrol Grubu	107
3.2.4.2. Çalışma Grubu.....	108
3.2.4.3. Kontrol ve Çalışma Gruplarının <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizmi İçin İstatistiksel Analizi	109
3.2.5. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisinde Yaş' a Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı	109
3.2.5.1. Kontrol Grubu.....	109
3.2.5.2. Çalışma Grubu.....	111
3.2.5.2.1 <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisindeki Yaş Değerleri İçin İstatistiksel Analizi.....	113
3.2.6. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde PSA' ya Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı.....	113
3.2.6.1. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisindeki PSA Değerleri İçin İstatistiksel Analizi	116
3.2.7. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Kanserin Gelişim Evresi' ne Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı	116
3.2.7.1. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisindeki Kanseri Gelişim Evresi Değerleri İçin İstatistiksel Analizi.....	118
3.2.8. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor' a Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı	118
3.2.8.1. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisindeki Gleason Skor Değerleri İçin İstatistiksel Analizi	120
3.3. Kontrol ve Çalışma Gruplarının <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri.....	120
3.3.1. Glutasyon S-transferaz P1 (<i>GSTP1</i>) Promoter Bölge Hipermetilasyonuna Ait Bulgular.....	121
3.3.2. <i>GSTP1</i> Geninin Promoter Bölge Hipermetilasyon Analizi.....	122
3.3.2.1. Kontrol Grubu.....	122

3.3.2.2. Çalışma Grubu.....	122
3.3.2.3. Kontrol ve Çalışma Gruplarının <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonu İçin İstatistiksel Analizi	123
3.3.2.2.1. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Kontrol Grubu İçerisinde Yaşa Göre Dağılımı....	124
3.3.2.2.2. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Dağılımı....	125
3.3.2.2.2.1. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisindeki Yaş Değerleri İçin İstatistiksel Analizi	126
3.3.2.2.3. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde PSA' ya Göre Dağılımı.....	126
3.3.2.2.3.1. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisindeki PSA Değerleri İçin İstatistiksel Analizi.....	127
3.3.2.2.4. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Kansere Gelişim Evresine Göre Dağılımı	127
3.3.2.2.4.1. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisindeki Kansere Gelişim Evresinin Değerleri İçin İstatistiksel Analizi	128
3.3.2.2.5. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor' a Göre Dağılımı	129
3.3.2.2.5.1. <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor Değerleri İçin İstatistiksel Analizi.....	130
3.3.3. KONTROL VE ÇALIŞMA GRUPLARININ BİLEŞİK ANALİZİ	130
3.3.3.1. Kontrol grubu	130
3.3.3.2. Çalışma grubu	130
3.3.3.3. Kontrol ve Çalışma Gruplarının <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Bileşik Analizi.....	131
3.3.3.3.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarının <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizmi ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonu için Bileşik Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	132
3.3.3.2.1. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Dağılımı.....	132
3.3.3.2.1.1. Kontrol Grubu.....	132
3.3.3.2.1.2. Çalışma Grubu	133
3.3.3.2.1.3. <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Yaş Değerleri için İstatistiksel Analizi	134

3.3.3.2.2.	<i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde PSA' ya Göre Dağılımı.....	134
3.3.3.2.2.1.	<i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde PSA Değerleri için İstatistiksel Analizi.....	136
3.3.3.2.3.	<i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Kansere Gelişim Evresine Göre Dağılımı.....	136
3.3.3.2.3.1.	<i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Kansere Gelişim Evresi Değerleri için İstatistiksel Analizi.....	137
3.3.3.2.4.	<i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor' a Göre Dağılımı.....	137
3.3.3.2.4.1.	<i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor Değerleri için İstatistiksel Analizi.....	139
3.4.	Kontrol Grubundaki <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Genotip ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonu Analizlerinin Sonuçları.....	140
3.5.	Çalışma Grubundaki <i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizminin Genotip ve <i>GSTP1</i> Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Sonuçları.....	141
4.	BÖLÜM	
4.1.	TARTIŞMA	142
5.	BÖLÜM	
5.1.	SONUÇ VE ÖNERİLER	157
6.	BÖLÜM	
6.1.	ÖZET	159
6.2.	ABSTRACT	161
7.	BÖLÜM	
7.1.	YARARLANILAN KAYNAKLAR	163
7.2.	KISALTMALAR	184
7.3.	ÖZGEÇMİŞ	187

1.1 GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser olup, kanserin yol açtığı ölüm nedenleri arasında akciğer ve kolon kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (3). Gelişmiş ülkelerde önemi gittikçe artan bir sağlık problemi haline gelen prostat kanseri, 55 yaş ve üzeri olan erkeklerde kansere bağlı ölümlerin yaklaşık % 9' undan sorumludur. Bununla beraber, prostat kanseri insidansı ve mortalitesi ırksal ve etnik gruplar arasında, ve ülkeden ülkeye çok farklılıklar göstermektedir ([142](#), 167).

Prostat kanserinin klinik önemi ve yüksek yaygınlığına rağmen, esas ortaya çıkış nedenleri, gelişimi ve ilerlemesine temel oluşturan moleküler mekanizmalar daha tam olarak aydınlatılamamıştır ([56](#), 216). Prostat kanserine karşı yaklaşım, genellikle ilaç kullanımı ve biyokimyasal düzeyde klinik araştırmalar ile sınırlı kalmaktadır. Ancak, multidisipliner yaklaşım ile ele alınması gereken prostat kanserinde genetik ve moleküler biyoloji gittikçe önem kazanmaktadır.

Etiyolojik olarak çeşitli çevresel ve genetik faktörleri içeren multifaktöriyel bir hastalık olmasına karşılık, şimdiye kadar prostat kanserinin bu faktörler ile arasındaki etkileşimi daha tam olarak ortaya konulamamıştır (131, [142](#)). Hastalığın gelişiminde etnik özelliklerin yanında ileri yaş, yaşam tarzı, beslenme, bozulmuş androjen metabolizması, çevresel faktörler ve genetik faktörleri gibi birkaç risk faktörü tanımlanmıştır (58, [303](#)). Mutasyon ve polimorfizmler, DNA' da kalıcı değişiklikler oluşturmalarına karşılık, epigenetik değişimler DNA dizisinde değişiklik meydana getirmeyen, fakat gen ifadesinin kalıcı değişikliklerini oluşturup, ilerlemesine neden olan değişimlerdir (307).

Prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş genlerden bir tanesi testiste, adrenal bezde, insan epitel dokusunda, pankreasta ve diğer pek çok dokuda ifade edilen Glutasyon S-Transferaz P1 (*GSTP1*)' dir (65, 83). *GSTP1* genomda 11q13' de lokalizedir, ve glutasyon konjugasyonu vasıtasıyla karsinojenler ve sitotoksik ilaçlar gibi elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunu gerçekleştiren glutasyon S-transferaz (GST) enzimlerinin süper gen ailesi üyelerindedir (319). Bu enzimlerin, DNA' yı oksidatif hasardan korunmada da önemli bir rol oynadıklarına inanılmaktadır (53, 142). *GSTP1* geninin 5. eksonundaki 313. pozisyonundaki Adenin nükleotidinin Guanin' e transisyonu sonucunda, 105. kodonundaki İzolösin aminoasidinin Valin' e (I105V) değiştiği yaygın bir polimorfizmi bilinmektedir. *GSTP1*' in bu tek nükleotid polimorfizmi fonksiyoneldir; azalmış enzim aktivitesine neden olduğundan, daha az etkili detoksifikasyonla kendini gösterir (110, 284, 319). Prostat kanseri ile ilişkisi tartışmalı olmakla birlikte meme (198, 271), ağız (265), mesane (267, 285), akciğer (155) ve over (264) kanserleri, ile astım (117) ve endometriyozis (52, 129) ile ilişkilendirilmiştir.

GSTP1' in prostat kanserine yatkınlık kazandırdığı kesinleşmiş olan bir başka değişikliği ise promoter bölgesinin hipermetilasyonu sonucu inaktive olmasıdır. Hipermetilasyona bağlı *GSTP1* inaktivasyonu, hücrelerin oksidatif DNA hasarına karşı hassasiyetlerinin artmasına ve DNA baz bileşimlerinin birikmesine bağlı olarak tümör hücresinin başka genetik değişiklikleri kazanmasına neden olabilmektedir (18, 140, 141, 211). *GSTP1* geninde gözlenen bu epigenetik modifikasyon prostat kanseri dışında (29, 170, 197) mesane (36), böbrek (71), meme (74), karaciğer (281), mide (169) ve akciğer (72) kanserleri ile de ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada, prostat kanseri ile ilişkisi tam olarak belirlenmemiş olan *GSTP1* Ile105Val gen polimorfizminin, Türk populasyonunda bir risk faktörü oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bunun yanında, promoter bölge hipermetilasyon değişikliklerinin klinik olarak hastalık daha tam ortaya çıkmadan önce başladıkları bilindiğinden, *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu prostat kanseri hastalarının erken tanısında faydalı bilgiler verip vermeyeceği de araştırılmak istenmiştir. Böylece, ailesinde prostat kanseri öyküsü bulunan bireyler daha az invazif olan bu yöntemle rutin olarak taranabileceklere, ve erken tanı ile kanserin seyri kontrol altına alınabilecektir. Çalışmanın sonunda, *GSTP1* gen polimorfizminin ve hipermetilasyonunun birlikte prostat kanseri gelişimi üzerinde nasıl bir etki yarattıkları irdelenecektir.

II. BÖLÜM

1.2 GENEL BİLGİLER

Kanser, genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu tümör süpresör (baskılayıcı) genleri inaktif ve onkogenleri aktif hale getiren karmaşık bir hastalıktır (154). Hanahan ve Weinberg kanser hücre fenotipinin niteliğini açıklayan altı temel özelliği tanımlamışlardır: Bunlar,

1. Büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık
2. Devamlı proliferasyon
3. Apoptozdan kurtulma
4. Anjiyogenez özelliğinin kazanılması
5. Doku invazyonu
6. ve Metastaz oluşumudur (63).

Kanser patolojisindeki en önemli konu iyi (benign) ve kötü (malign) huylu tümörleri birbirinden ayırt edebilmektir. Benign tümörler çevredeki dokuya veya vücudun uzak bölgelerine yayılmazlar ve etrafları bağ dokusu ile kuşatılmıştır. Buna karşılık malign tümörler hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaz oluştururlar.

Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabileceğinden gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren çok fazla sayıdaki türü mevcuttur. Ürogenital kanserler % 17,5 oranı ile erkeklerde görülen kanser sıralamasında ilk sırada yer alırlarken, kadınlarda meme ve sindirim sistemi kanserlerini takiben üçüncü sırada yer almaktadırlar (3). Erkeklerde ürogenital kanserlerden en sık gözlenen prostat kanserinin, gen mutasyonları

ve polimorfizmlerin yanında epigenetik değişikliklerle de ilişkili olduğunun açıklanmasından bu yana, hastalığın esas nedenlerini aydınlatmaya yönelik çalışmalara hız verilmiştir.

1.2.1 PROSTAT KANSERİ

Ürolojik hastalıklarla ilgili ilk yazılı bilgiler M.Ö. 1550 yılında eski bir Mısır papirüsü üzerindeki mesane ve böbrek taşlarına kadar dayanmaktadır. Prostat bezi ise ilk kez İtalyan hekim Niccolo Massa tarafından tanımlanmıştır ve Yunanca' da "önceden hazırlama" anlamına gelmektedir.

16. yüzyıl Avrupa' sında ünlü Fransız cerrahı Ambroise Pare mumyalanmış kadavralar üzerinde yeni tıbbi teknikler denemiş ve prostat bezini mesaneden ayrı bir organ olarak tanımlayan ilk kişi olmuştur. Meninin oluşturulmasını sağlayan organlar ve ejakülasyon kanallarıyla prostat bezinin arasındaki bağlantıyı detaylandırmış, ejakülasyon esnasında nasıl çalıştığını açıklamıştır. alışmaları, prostat fonksiyonlarını anlamamızda büyük katkılar sağlamıştır (85).

Prostat kanseri ilk kez 1817 yılında doktor George Langstaff tarafından tıp literatüründe tanımlanmıştır (168) ve prostat ilk kez 1904 yılında Johns Hopkins Hastanesi' nde alışan Young adındaki bir cerrah tarafından cerrahi olarak radikal perineal prostatektomi ile çıkarılmıştır. Bu teknik sonraları, 40 yaş erkekler için operasyonla hastalığın yarattığı yan etkileri azaltmak amacı ile kullanılmıştır; fakat, neredeyse tüm hastalar ameliyat sonrasında cinsel işlevlerini yitirmişlerdir. 1945 yılında Millin, radikal retropubik prostatektomiye ilk kez uygulamış ve bu metot, 1983 yılında Walsh tarafından erkeğin cinsel iktidarını devam ettirebilmesi için modifiye edilmiştir. 1941 yılında Charles Brenton Huggins, ilerlemiş prostat kanserli hastalarda androjen hormonunun

kan dolaşımından uzaklaştırılması için orşiektomi operasyonunu uygulamıştır. Oral östrojenlerin prostat kanserli hastaların tedavisinde kullanımının üzerinde yine iktidarsızlığa neden olduğu rapor edilmiştir. 1966 yılında prostat kanserinin hormonal tedavisi ile ilgili yeni çalışmaları ile Huggins Fizyoloji ve Tıp alanındaki Nobel ödülüne layık görülmüştür (9, 238).

Prostat kanserinin tanı ve tedavisinde en büyük ilerlemeler 1980' li yılların ortalarından itibaren sağlanmıştır. Özellikle 1990' lı yıllardan beri geliştirilen yeni testler ve prostat kanseri tedavisindeki çarpıcı değişiklikler, prostat kanserinin evresi ve bu hastalığa bağlı ölüm oranları ile ilişkilendirilmiştir. Prostat kanserinin tedavisinde yaşanan bu gelişmelere karşın hastalığın gelişimine yönelik araştırmalar yetersiz kalmıştır. Prostat kanserinin erken teşhisi ve uygun tedavisi için yeni ve daha iyi çözümlerin oluşturulmasında moleküler araştırmalara yer verilmesinin gereği vurgulanmıştır.

1.2.2 PROSTAT KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ

1.2.2.1 İNSİDANS VE ÖLÜM ORANI

Prostat kanseri dünya çapında en sık görülen kanser olması nedeniyle birçok ülkede önde gelen bir sağlık problemidir (220). Dünya Sağlık Örgütü' ne (*World Health Organisation, WHO*) göre, 2006 yılında Amerika' da 234.468 erkekte prostat kanseri teşhis edildiği ve 27.350 kişinin de bu hastalıktan öldüğü rapor edilmiştir (3).

Genel olarak prostat kanseri yavaş ilerleyen bir tümördür ve klinik seyri çoğunlukla 10-20 yıllık bir zaman dilimine yayılır. Prostat kanseri olgularının ~% 11' i kolaylıkla anlaşılmaktadır ve yalnızca % 3' ü bu hastalığa bağlı olarak ölmektedir (252).

1.2.3 PROSTAT KANSERİNİN ETİYOLOJİSİ

Prostat kanser gelişiminin temelini oluşturan nedenler büyük ölçüde gizli kalmaktadır; çünkü, hastalık heterojendir ve büyük bir olasılıkla çevresel ve genetik faktörler arasındaki kompleks etkileşimleri yansıtmaktadır.

Prostat kanseri etiolojisinin büyük bir oranının bilinmemesi gerçeğine rağmen, gelişiminde ırksal ve etnik farklılıklar, ileri yaş, sigara ve alkol kullanımı, beslenme, ile aile öyküsü (kalıtsal yatkınlık) gibi genetik temelli bazı risk faktörleri tanımlanmıştır.

1.2.3.1 IRKSAL VE ETNİK FARKLILIKLAR

Prostat kanserinin insidansı, ırklar ve etnik gruplar arasında çeşitlilik gösterir; Çin ve Asya' nın diğer kesimlerinde yaşayan sarı ırktaki erkeklerde en düşük oranda görülürken beyaz ırktaki erkeklerin yaygın olarak yaşadıkları İskandinavya, Amerika ve Kanada gibi ülkelerde daha yüksek oranda görülmektedir (30). Aynı zamanda, prostat kanserine bağlı ölüm oranları da en yüksek İskandinavya ve Karayip Adalarında iken; Çin, Japonya ve eski Sovyetler Birliği ülkelerinde en düşük oranlarda gözlenmesi sebebiyle dünya çapında değişkenlik göstermektedir (7). Pek çok etnik grubu içeren topluluklar ile yapılan bir çalışmaya göre, Afrika kökenli Amerikalı erkeklerin beyaz ırktan olan Amerika' lı erkeklere oranla prostat kanserine yakalanma risklerinin iki katdan fazla olduğu gözlenmiştir (161). Prostat kanseri yaygınlığının, Amerika' ya göç etmiş Japon erkeklerde Japonya' da yaşayan Japon erkeklere göre de arttığı gözlenmiş ve etnik farklılıkların yanında çevresel risk faktörlerinin de prostat kanseri gelişimi üzerinde çok fazla katkısı olduğu açıklanmıştır (45, 261).

1.2.3.2 YAŞ

Prostat kanserinin yaşla çok kuvvetli bir ilişkisi bulunmaktadır. Prostat kanserli tüm hastaların % 70' inden daha fazlası 65 yaşından sonra teşhis edilmektedir (7). Birçok diğer organ kanserinde belirli bir yaşta insidans belirgin olarak artarken; prostat kanserinde belli bir yaş aralığında insidansın artmasından ziyade, yaşın artışına paralel olarak insidansda bir yükselme görülür. Özellikle, 50 yaşından sonra insidans neredeyse katlanarak artmaktadır. 50 yaşındaki bir erkeğin yaşamı boyunca latent prostat kanserine yakalanma riski % 40, manifest prostat kanseri (klinik olarak belirti veren) teşhis edilme riski % 9,5 ve bu kanserden ölme riski ise % 2,9 olarak hesaplanmaktadır. Bu da göstermektedir ki, prostat kanserlerinin büyük çoğunluğu oldukça selim ve yavaş seyirli olmakla birlikte bunların yaklaşık % 20' si klinik olarak tespit edilebilmekte ve % 6' sı ölümcül olmaktadır. 40 yaşın altında prostat kanseri geliştirme riski 1/10.000, 40 -59 yaş arasında 1/103 ve 60-79 yaş arasında 1/8' dir. Hastalığın teşhis edilmesinde ortalama yaş 71 ve ölüm yaşı 78' dir (111).

1.2.3.3 SİĞARA VE ALKOL KULLANIMI

Prostat kanseri oluşumunda sigara kullanımının rolü tam olarak belirlenememiştir ve bu nedenle çok açık değildir; birçok çalışma, prostat kanseri gelişimi ile sigara kullanımı arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir (125). Bununla birlikte, İsveç ve Amerika' da kalabalık topluluklarla yapılan çalışmalarda gelişmekte olan prostat kanseri için sigara kullanımının önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (2, 34,124). Prostat kanseri riski, fazla sigara kullanan, yüksek beden kitle indeksine sahip erkekler arasında 2-3 kat artmaktadır (124, 257) . Sigara kullanımına benzer

şekilde, alkol tüketiminin de prostat kanseri için muhtemel bir risk faktörü olup olmadığı konusunda tartışmalar bulunmaktadır (14, 28); yapılan bazı çalışmalarda prostat kanseri ile alkol arasında ilişkili olduğu gösterilmektedir (229, 254, 256), diğer bazı çalışmalarda ise alkol kullanımının prostat kanseri gelişiminde bir risk teşkil etmediği bulunmuştur. Ancak alkol, bağışıklığın baskılanmasını, kanserojen metabolitlerin aktivasyonunu veya plazma seks hormon seviyesi üzerinde etki yarattığından, prostat kanseri geliştirme riskini etkileyebilmektedir (254).

1.2.3.4 BESLENME

Japonya gibi beslenmelerinde yağ oranı düşük, soya ağırlıklı yiyecekleri tercih eden ülkelerde prostat kanseri daha az görülmektedir. Japon erkekler Amerika'ya göç edip, et ve patates ağırlıklı batı tarzı yiyeceklere geçince, prostat kanseri oranının hemen yükseldiği ve bir sonraki kuşaklarda insidansın daha da arttığı gözlenmektedir. Bu tür veriler, yağ oranı yüksek besin tüketiminin prostat kanseri ile bağlantılı olduğunu kanıtlamaktadır.

Kilo fazlalığı prostat kanserli erkeklerin durumunu ciddi şekilde etkilemektedir. Son zamanlarda yapılmış olan geniş bir araştırmada, prostat kanserinden kaynaklanan ölüm oranının beden kitesiyle doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir. Kilo fazlalığı olanların kilo-boy oranları normal limitler içinde olan hastalarla karşılaştırıldığında, 530-kat daha fazla ölüm riski taşıdıkları saptanmıştır (303).

Hormonlar da prostat kanseri gelişiminde rol oynamaktadırlar. Vücutta bulunan artmış testosteron düzeyinin prostat kanseri ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Hayvansal yağlardaki kolesterol, bir enzimin etkisiyle

testosterona dönüşebilir ve böylece ortalamanın üzerinde bir miktarda üretilebilir (305).

Selenyum ve antioksidanlardan yoksun bir beslenme, prostat kanseri riskini arttırabilir. Meyve ve sebzelerden zengin bir beslenme ise hastalığın oluşumunu önlemede yardımcı olabilir.

Birçok çalışmada domates ürünlerinin yüksek tüketiminin, gelişmekte olan prostat kanser riskini azaltması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (88). Bunun açıklaması, domatesin yüksek seviyede likopen içermesi ve karotenoidin anti-oksidatif özelliğe sahip olması şeklinde verilmektedir. Vitamin E ve D, selenyum ve çinko gibi diet ile ilgili diğer koruyucu faktörler halen daha tartışılma konusudur (35, 260).

1.2.3.5 GENETİK YAPI

Genetik yapının önemi, etkilenen 1. derecedeki akrabalar ve onların prostat kanseri teşhis yaşları ile prostat kanseri gelişme riski arasındaki lineer ilişkiden dolayı ortaya çıkmıştır. İkiz çalışmaları ve genetik pozisyon ile daha ileri destek bulmuştur.

Prostat kanseri riskinin aile içi arttığı gösterilmiştir. Babalarında ya da erkek kardeşlerinde prostat kanseri olan erkeklerin bu kansere yakalanma risklerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, prostat kanserindeki teşhis yaşı düştükçe kardeşlerde ya da ailenin diğer erkek bireylerinde prostat kanserine yakalanma riskinin de arttığı gösterilmiştir. Bu rölatif riskin, 70 yaşında prostat kanserine yakalanmış olan bir aile fertine akraba olan erkekte 4 kat olduğu gösterilmesine karşın, aynı risk 60 yaş için 5 kat, 50 yaş için ise 7 kat olarak hesaplanmıştır (176).

Prostat kanseri kalıtsal ve sporadik, yani herediter ve herediter olmayan prostat kanseri şeklinde iki sınıfta incelenebilmektedir.

1.2.3.5.1 HEREDİTER PROSTAT KANSERİ

Prostat kanserinin ~% 10' unun genetik geçişli olduğuna inanılmaktadır. Prostat kanserinin genetik bir komponentinin olduğuna dair bulgular, epidemiyolojik ve genetik çalışmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır. Prostat kanseri gelişimine yatkınlık oluşturan bazı yüksek riskli genler tanımlanmıştır (293). Bu genlere örnek olarak, kromozom 1q24-25 üzerindeki *HPC 1* ([262](#)), Xq27-28' de yer alan (X' e bağlı geçiş ile) *HPC X* (310), 17q21 üzerindeki *BRCA 1*, 13q12' de yer alan *BRCA 2* (66), 11p36 üzerindeki *CAPB* (87), 1q42.2-43' de yer alan *PCAP* ([20](#)) ve son dönemlerde 17p kromozomu üzerindeki *ELAC2/HPC2* ([279](#)) verilebilir; bu genlerin yanında prostat kanseri ile ilişkili birçok gen daha tanımlanmış ve hepsi Tablo 1' de özetlenmiştir. Mutasyonlu halleri yüksek penetransa sahip olan bu genler ile prostat kanseri arasındaki ilişki, prostat kanserinin karmaşık ve multigenik kalıtıma sahip olduğunu göstermektedir (293).

1.2.3.5.2 HEREDİTER OLMAYAN (SPORADİK) PROSTAT KANSERİ

Prostat kanseri % 90 olguda sporadik olarak gelişmektedir. Genellikle düşük penetransa sahip gen polimorfizmlerinin, çevresel faktörlerle birlikte prostat kanseri gelişimi için yatkınlık kazandırdıkları durumlar bunlardır.

Prostat kanserinin seyri ile ilişkili genetik değişiklikler, normal hücre büyümesi kontrolünü sağlayan mekanizmalardan, tümör baskılayıcı ve apoptozu sağlayan mekanizmalara kadar geniş bir alanda etki gösterebilirler.

Heterozigozitenin kaybı ile ilgili çalışmalarda, belli kromozomal delesyon sahalarının ortaya çıkarılması ile kromozomlarda (8p, 10q, 13q, 16q, 17p ve 18q) potansiyel tümör süpresör genler belirlenmiştir. Prostat kanseri ile ilişkili bazı tümör süpresör genlerin yanında diğer ilişkili genler Tablo 1' de özetlenmiştir.

DNA' daki baz dizisi değişiklikleri mutasyon olarak tanımlanır. Mutasyonlar bir gen bölgesinin dışında oluşabildikleri gibi, gen bölgesinin içinde de meydana gelebilirler ve aminoasit sırasını ve/veya kodlanan aminoasidi değiştirebilirler. DNA baz dizisindeki değişiklikler her zaman ciddi bir hastalığa neden olmazlar; çoğu zaman bir popülasyondaki genetik varyasyonları oluştururlar. Eğer belirli bir genetik varyasyon toplumda % 1' den daha sık görülüyorsa **polimorfizm**' den söz edilir.

1.2.3.6 POLİMORFİZMLER

Mendelian kalıtım ile yüksek penetransa sahip genlerin neden olmadığı sporadik prostat kanseri, çevresel faktörler nedeniyle oluşmaktadır; fakat, daha yaygın olarak genetik varyasyonlar nedeniyle, yani düşük penetranslı genler veya gen polimorfizmleri nedeniyle gelişmektedir ([226](#)). Polimorfizmler, genelde popülasyonda yüksek frekansta meydana geldiklerinden prostat kanseri geliştirme riski üzerine yüksek etkiye sahip olabilirler. Birçok aday gendeki polimorfizmler prostat kanseri ile ilişkili olarak incelenmiştir. Bunlardan bazıları Glutasyon S-transferaz P1 (*GSTP1*) ([234](#)), Glutasyon S-transferaz T1 (*GSTT1*), Glutasyon S-transferaz M1 (*GSTM1*) ([233](#)), Androjen reseptör (*AR*), 5 alfa-redüktaz tip II (*SRD5A2*) ([206](#)), 17-hidroksilaz sitokrom p450 (*CYP17*), Sitokrom P450 3A4 (*CYP3A4*) ([172](#)), Vitamin D reseptör (*VDR*) ([128](#)), Prostat Spesifik Antijen (*PSA*) ([89](#)), İnsülin

benzeri büyüme faktörü (*IGF-I*) (40,) ve IGF bağlayıcı protein 3 (*IGFBP-3*)'deki polimorfizmlerdir.

Tablo 1: Prostat Kanserinin Başlangıcı ve Gelişiminde Etkili Olan Genler (10)

Gen	Fonksiyonu	Referans
Aktivite Azalmasına Neden Olan Mutasyonlar		
<i>MS</i>	Anti-enfeksiyöz, 'scavenger' receptor	Angelo <i>et al.</i> 2003.
<i>RNASEL</i>	Apoptoz	Carpten <i>et al.</i> 2002.
<i>ELAC2</i>	Metale bağlı hidrolaz	Wang L <i>et al.</i> 2001, Suarez <i>et al.</i> 2001
Heterozigositenin Kaybı ve Nokta Mutasyonu		
<i>PTEN</i>	Hücre yaşamının devamı ve çoğalması	Wang SI <i>et al.</i> 1998, McMenamin <i>et al.</i> 1999.
<i>TP53(p53)</i>	Hücre yaşamının devamı ve çoğalması , genomun stabilitesi	Navone <i>et al.</i> 1993.
Heterozigositenin Kaybı ve Tek bir alelin kaybına bağlı yetersizlik (Haploinsufficiency)		
<i>NKX3-1</i>	Hücre farklılaşması ve çoğalması	Bhatia-Gaur <i>et al.</i> 1999, Bowen <i>et al.</i> 2000.
<i>CDKN1B(P27KIP1)</i>	Hücre çoğalması	Cote RJ <i>et al.</i> 1998.
Nokta Mutasyonları		
<i>COBEP (KLF6)</i>	Transkripsiyon düzenleyici	Narla <i>et al.</i> 2001.
<i>AR</i>	Hücre çoğalması ve farklılaşması	Angelo <i>et al.</i> 2003.
Amplifikasyon		
<i>AR</i>	Hücre çoğalması ve farklılaşması	Angelo <i>et al.</i> 2003, Visakorpi T. .2003.
Protein ve mRNA Seviyesinde İfade Edilen Genler		
<i>hTERT</i>	Hücre immortalite	Angelo <i>et al.</i> 2003.
<i>HPN</i>	Transmembran proteaz	Angelo <i>et al.</i> 2003.
<i>FASN</i>	Yağ asidi sentezi	Angelo <i>et al.</i> 2003.
<i>AMACR</i>	Yağ asidi metabolizması, dallı zincir	Angelo <i>et al.</i> 2003.
<i>EZH2</i>	Transkripsiyon baskılayıcı, hücre çoğalması	Angelo <i>et al.</i> 2003.
<i>MYC</i>	Hücre çoğalması	Sato <i>et al.</i> 1999, Meng <i>et al.</i> 2002
<i>BCL2</i>	Hücre yaşamının devamı	DiPaola <i>et al.</i> 2001
Prostat Kanseri Riskini Etkileyen Polimorfizmler		
<i>AR</i>	Hücre çoğalması ve farklılaşması	Angelo <i>et al.</i> 2003, William <i>et al.</i> 2003
<i>CYP17</i>	Androjen metabolizması	Angelo <i>et al.</i> 2003, William <i>et al.</i> 2003
<i>SRD5A2</i>	Androjen metabolizması	Angelo <i>et al.</i> 2003, William <i>et al.</i> 2003

Tablo1' deki kısaltmaların açıklaması:

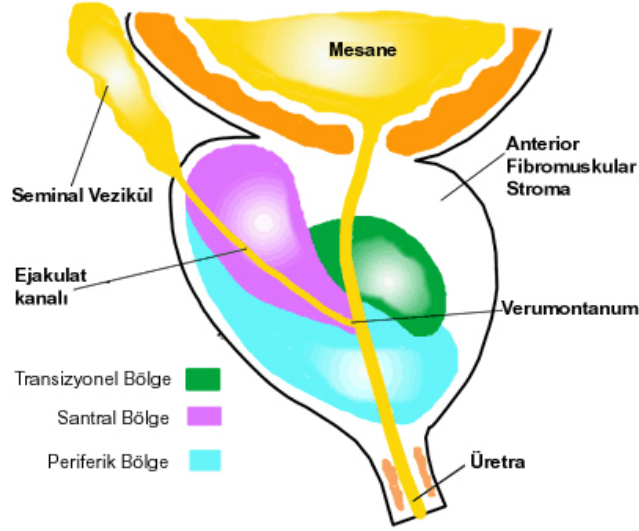
MSR1 (macrophage scavenger receptor 1),*RNASEL* (ribonuclease L), *ELAC2* (elaC homolog 2), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *TP53* (p53)(p53 tumor suppressor), *NKX3-1* (NK3 transcription factor related, locus 1), *CDKN1B* (P27KIP1) (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), *COBEP* (KLF6) (core promoter element binding protein), *AR* (androgen receptor), *hTERT* (human telomerase reverse transcriptase), *HPN* (hepsin, transmembrane protease, serine 1)), *FASN* (fatty acid synthase), *AMACR* (alpha-methylacyl-CoA racemase), *EZH2*(enhancer of zeste 2), *MYC* (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog), *BCL2* (B-cell CLL/lymphoma 2), *CYP17* (cytochrome P450, subfamily XVII, steroid 17-alpha-hydroxylase), *SRD5A2* (steroid 5-alpha-reductase 2)

1.2.3.7 EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER

Epigenetik değişiklikler, DNA dizisindeki bazları ve baz sırasını değiştirmeyen fakat gen ekspresyonunu etkileyen ve kalıtım yoluyla kalıtılabilen değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (307). DNA metilasyonu için hipo- veya hipermetilasyon, histon modifikasyonları için asetilasyon veya deasetilasyon epigenetik değişikliklere örnek olarak verilebilir. Bu değişiklikler, kanser gelişiminde ve iyi huylu bir tümörün kötü huylu bir tümöre dönüşmesinde rol oynamaktadırlar (175). Birçok gen promoteri, CpG adaları olarak bilinen CG dinükleotidlerce zengin bölgeleri içermektedirler. Bu bölgelerde meydana gelen olağan dışı metilasyon değişiklikleri, kromozomal instabiliteye ve transkripsiyonel gen susturulmasına sebep olabilirler. *GSTP1* geninin ekspresyon kaybı prostat kanserinde sık görülen bir bulgudur ve *GSTP1* susturulması direkt olarak promoter bölge hipermetilasyonu ile ilişkilendirilmiştir (138, 170). Prostat kanserinde hipermetillenmiş olarak bulunan genler ile ilgili birçok yayın bulunmaktadır (Tablo 5 ve 6); ancak, potansiyel olarak yararlı tek belirteç olan *GSTP1*' dir; çünkü, prostat kanserinin belirlenmesinde yeterli özgüllük ve duyarlılığa sahiptir.

1.2.4 PROSTAT KANSERİNİN FİZYOLOJİSİ VE HİSTOPATOLOJİSİ

Genç bir erkeğin normal prostat bezi yaklaşık olarak 4x3x3 cm ölçülerinde ve üretranın etrafını saran mesanenin hemen altında lokalizedir. Prostat anatomik olarak periferik (*peripheral zone*, PZ), santral (*central zone*, CZ), transisyonel (*transition zone*, TZ) ve anterior fibromuskular stroma olmak üzere dört bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1) (193).



Şekil 1: Prostat Bezinin Bölgeleri. Yeşil renk ile gösterilen kısım transizyonel bölge, mor renk ile gösterilen kısım santral bölge ve mavi renk ile gösterilen kısım periferik bölgedir.

Periferik bölge prostatın yaklaşık olarak % 70' ini oluşturan en büyük bölgedir (194). Bu alan, prostatın iyi huylu hiperplastik nodüllerinin (*prostatic intraepithelial neoplasia*, PIN) çoğunun ve kanserlerin en sık görüldüğü alandır (192). Santral bölge, prostat hacminin % 25' ini oluşturur ve PZ ve TZ' den histolojik olarak farklıdır; çoğunlukla hastalıktan daha az etkilenmektedir (242). Transizyonel bölge ise normal prostat hacminin en küçük kısmını oluşturmaktadır ve prostatın yaklaşık % 5' i civarındadır.

Prostat, fibromusküler stroma ve sonunda üretra içine boşalan bezlerin salgılarını akıttıkları kanalda dallanan birçok bezden oluşur. Her salgı bezine ait asinusun içini vücutta sıvı madde oluşturan lüminal epitelyal hücreler, bazal hücreler ve yayılmış nöroendokrin hücreler kaplamaktadır. Prostatın üç bölgesinde de bazal ve sıvı madde oluşturan hücrelerle birlikte, salgı bezine ait asinus ve salgısını akıttığı kanal bulunmaktadır. Bazal hücre tabakasının, epitelyal prostat hücreleri için bir kök hücre popülasyonunu içerdiğine inanılmaktadır (242). Stroma kısmı düz kas hücreleri, fibroblastlar ve

endotelial hücreleri içermektedir. Stroma ve epitelial etkileşim tam olarak anlaşılammıştır; ancak, prostat kanserinde stroma, prostatın gelişiminde prostatik epitelial hücrelerin farklılaşmasının temel indükleyicisidir (48). Tüm prostat kanserlerinin % 98' inden fazlası prostat bezlerinin asinus ve kanallarındaki epitelial hücrelerinden ortaya çıkan adenokarsinomlardan kaynaklanmaktadır.

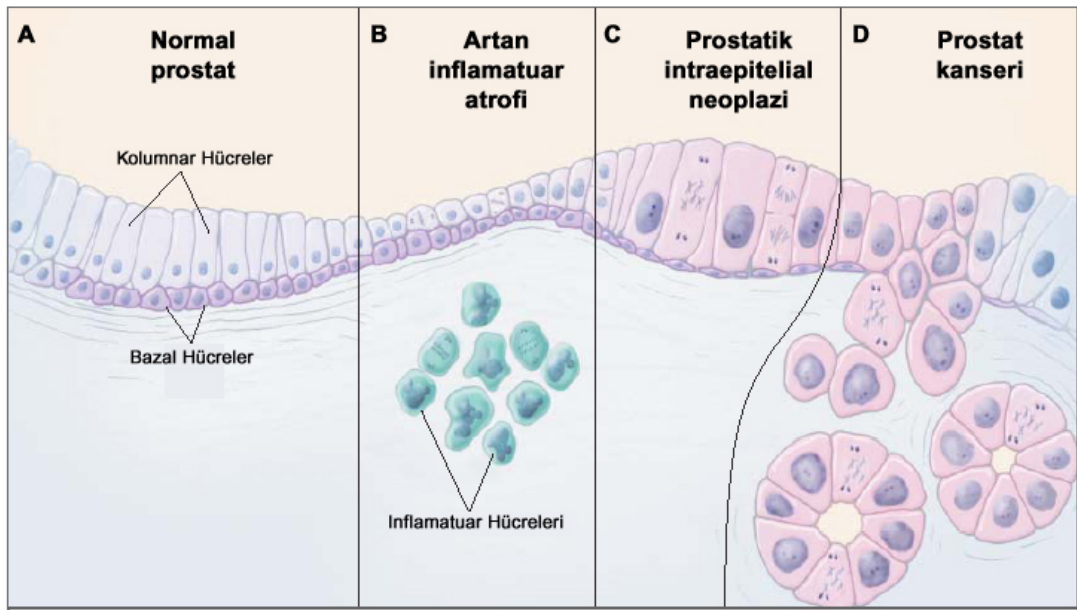
1.2.4.1 HORMONAL DÜZENLEME

Prostat bezinin büyüme, gelişme ve fonksiyonu androjenlerin (erkeklik hormonlarının) varlığına bağlıdır. En önemli androjen, başlıca testislerde üretilen bir steroid hormon olan testosterondur. Kanda bulunan testosteron, 5α redüktaz enzimi vasıtasıyla prostatta dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Prostat kanseri hücreleri, normal prostat hücreleri gibi, yaşamlarını sürdürmek için androjenlerin varlığına ihtiyaç duyarlar. Bundan dolayı, androjenlerin görevlerini yerine getirememeleri durumunda, kanser hücrelerinin büyük bir çoğunluğu ölmektedir.

1.2.4.2 PROSTAT KANSERİNİN GELİŞİMİ

Prostat kanserinin moleküler patolojisi çok komplekstir ve birçok geni kapsamaktadır. Kronik ve yinelenen prostat iltihabı, beslenme, yaşam tarzı ve çevresel faktörler kanserlerin başlamasına ve gelişmesine yardımcı olmaktadır. Çalışmalar, prostat kanserinin nasıl ortaya çıktığı ve geliştiğine dair ipuçlarını vermektedir; ancak, prostat kanserinin başlama, ilerleme ve gelişmesinden sorumlu moleküler yollar ve sonradan kazanılan moleküler bozukluklar halen büyük ölçüde bilinmemektedir. Kolon kanserindeki karsinogenezin önemli bir modeli 1988 yılında Vogelstein ve meslektaşları tarafından geliştirilmiştir (292). Vogelstein' a göre kolon kanserinin gelişimi,

sorumlu genetik değişikliklerin tesadüfi olarak birikmesiyle açıklanabilmektedir. Böyle bir doğrusal gelişim modeli, daha fazla heterojen patolojiye sahip olan prostat kanserinin tayini için daha zordur. Bununla beraber, prostatik karsinogenezin bir modeli prostatik intraepitelyal neoplazinin (PIN) morfolojik yapısına ve karsinogenezin çok basamaklı teorisine dayanmaktadır (96, [212](#)) (Şekil 2).



Şekil 2: Prostat Kanserinde Tümör Gelişimi (William et al. 2003) **A.** Prostatta kolumnar ve bazal hücrelerin görünümü, **B.** İnflamatuvar hücrelerin atrofi oluşturmaları, **C.** Kolumnar hücrelerin büyümesiyle prostatik intraepitelyal neoplazi oluşumu ve **D.** Kolumnar hücrelerin çoğalarak yayılımı ve prostat kanserinin oluşumu.

1.2.4.3 Prostatik Intraepitelyal Neoplazi (PIN)

Prostatik intraepitelyal neoplazinin prostat kanserinin en uygun prekürsörü olduğu düşünülmektedir, ve prostatik salgı bezi kanalı ve asinüs hatlarındaki hücrelerin invazif olmayan, preneoplastik gelişimi olarak tanımlanmaktadır.

PIN genellikle düşük dereceli (PIN I) ve yüksek dereceli (PIN II ve PIN III) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yüksek dereceli PIN' de düz, öbek, papiller ve delikli olmak üzere en azından dört farklı yapısal model ayırt edilmektedir (27). Prostat kanseri ve PIN' in çoğalan dereceleri ile bazal hücre tabakasının bozulması, bazal hücre tabakasının bütünüyle kaybı gözlenmektedir (182).

PIN genel olarak PZ' de ve olguların %85' inden fazlasında kanser ile birlikte bulunmaktadır. PIN' e sahip pek çok hastanın 10 yıl içinde kanser geliştireceği ileri sürülmektedir.

1.2.5 PROSTAT KANSERİNİN TEŞHİSİ VE PROGNOZU İÇİN KULLANILAN METOTLAR

Prostat kanserinin tanısında kullanılan standart metotlar Parmakla Rektal Muayene (DRE), Serum Prostat Spesifik Antijen (PSA) ve Ultrasonografi' yi içermektedir. Yalnızca, DRE ve PSA testleri prostat kanseri tanısı için yeterli değildir. Prostat kanserinin kesin tanısı biyopsi ile konulur. Prostat kanserinin derecesini belirlemek amacı ile çeşitli biyopsi örnekleri alınır. Son yapılan çalışmalarda prostatın 4-6 segmentinden alınan 8 ile 12 odak arasındaki doku örneğinin en doğru örnekleme yöntemi olduğu gösterilmiştir (55, 228).

1.2.5.1 GLEASON DERECELENDİRMESİ

Prostat kanserinin histopatolojik olarak derecelendirilmesi için, dünya çapında Gleason derecelendirme sistemi kabul edilmektedir (90.). Gleason derecelendirmesinde kanserli bezlerin özellikleri 5 histolojik model içinde farklılaşmaktadır ve en fazla farklılaşan model I iken, en az farklılaşan model V' dir (10).

Gleason derecelendirme sistemi, prostat kanserinin kuvvetli prognostik faktörlerinden biridir. Gleason sisteminde 2-4 iyi, 5-7 orta, 8-10 kötü derecede farklılaşmış kanseri gösterir (10, 85).

Biyopside tanımlanan Gleason derecelendirme ile takip edilen radikal prostatektomi örneklerinde izlenen derece oldukça tutarlıdır: Gleason skoru 5-6 olan biyopsi örneklerinin radikal prostatektomi örnekleri ile % 64 oranında aynı derecede oldukları bulunmuştur. Gleason skoru 7 veya daha fazla olan biyopsilerde bu oran artmaktadır ve % 87.5' dir (67).

GLEASON MİKROSKOPİK DERECELENDİRME SİSTEMİ

I. En nadir desen olup genellikle yuvarlak, düzgün sınırlı uniform bezlerin sık olarak bir araya gelmelerinden oluşmuştur.

II. Daha az uniform bezler, gevşek olarak bir araya gelmişlerdir. Bezler arasında az miktarda stroma bulunur ve kenarları daha düzenlidir.

IIIa- Bezlerin ölçü ve şekillerinde büyük farklılıklar vardır, sık olarak yerleşmişlerdir; fakat düzensizdirler ve iyi sınırlı değildirler.

IIIb- IIIa' ya benzer, çok küçük bezler ve ufak hücre kümelerinden oluşur.

IIIc- Tümör papiller veya gevşek kribriform yapıların keskin ve düzgün sınırlı yuvarlak kitlelerinden oluşur. Bazı yazarlar bunu papiller intraduktal tümör olarak isimlendirirler.

IVa- Düzensiz sınırlı, düzensiz infiltrasyon gösteren birleşmiş bezlerden oluşur.

IVb- IVa' ya benzer, beraberinde geniş soluk boyanan hücreler vardır.

Va- Santral nekrozlu, keskin dairesel yuvarlak kitle oluşturan, solid kribriform karsinom (komedokarsinom).

Vb- Anaplastik karsinom, sadece adenokarsinom tanısı için yeterli bez ve vakuol formasyonu bulunur.

1.2.5.2 DNA PLOİDİLERİ

DNA ploidi modelleri diploidi, tetraploidi veya anöploidi olarak sınıflandırılırlar. Bazı tercih edilen sınıflandırmalar ploidi modelini, diploidi veya diploidi olmayan şekilde ayırırlar. Flow sitometri ve istatistiksel imaj analizi sistemlerinin her ikisi de ploidy belirlemede kullanılabilir (286). Prostat kanserinde DNA ploidi yaygın bir şekilde çalışılmıştır ve histolojik derece ve tümör evresinden bağımsız prognostik bilgi sağlamaktadır.

1.2.5.3 RADYOLOJİK EVRELEME

Prostat kanserinin doğru tedavisi için, hastalığın evresinin belirlenmesi gereklidir (101).

Prostat kanserinin evrelendirilmesinde yaygın olarak TNM (tümör, nod, metastaz) klasifikasyonu (Tablo 2) kullanılmaktadır (263). İlk olarak tümörün derecesi (T evresi), sonra lenf nodülleri yakınına yayılımının varlığı veya yokluğu (N evresi), ve sonunda belirsiz metastazın varlığı veya yokluğu (M evresi) tanımlanır.

Tablo 2: Prostat Adenokarsinomlarının Klinik TNM Evrelendirilmesi
TNM SINIFLAMASI

T: Tümörün prostat ve çevresindeki alanda yaygınlığı

N: Tümörün lenf dokularına yayılması

M: Tümörün uzak organlara yayılması' dır.

Bu sisteme göre;

- * Tx Prostatdaki tümörün değerlendirilememesi
 - * T0 Prostatda tümör bulunmaması
 - * T1 Parmakla muayene ve görüntüleme yöntemleriyle prostatta tümör saptanamayan hastalar
 - T1a Kapalı prostat ameliyatı sırasında çıkarılan dokularda <%5 oranda raslantısal tümör saptanması
 - T1b Kapalı prostat ameliyatı sırasında çıkarılan dokularda >%5 oranda raslantısal tümör saptanması
 - T1c PSA yüksekliği nedeniyle yapılan iğne biyopsisinde tümör saptanması
 - * T2 Prostat bezinde sınırlı tümör, parmakla yapılan muayenede prostatta nodül bulunması
 - T2a Tek bir prostat lobunu tutan tümör
 - T2b Her iki prostat lobunu tutan tümör
 - * T3 Prostat kapsülünü aşan tümör
 - T3a Kapsül dışına tek veya iki taraflı uzanım
 - T3b Vezikula seminalis tutulumu
 - * T4 Vezikula seminalisler dışında diğer komşu organlara yayılım gösteren tümör

 - * Nx Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi
 - * N0 Bölgesel lenf bezi yayılımı olmaması
 - * N1 Bölgesel lenf bezi yayılımı bulunması

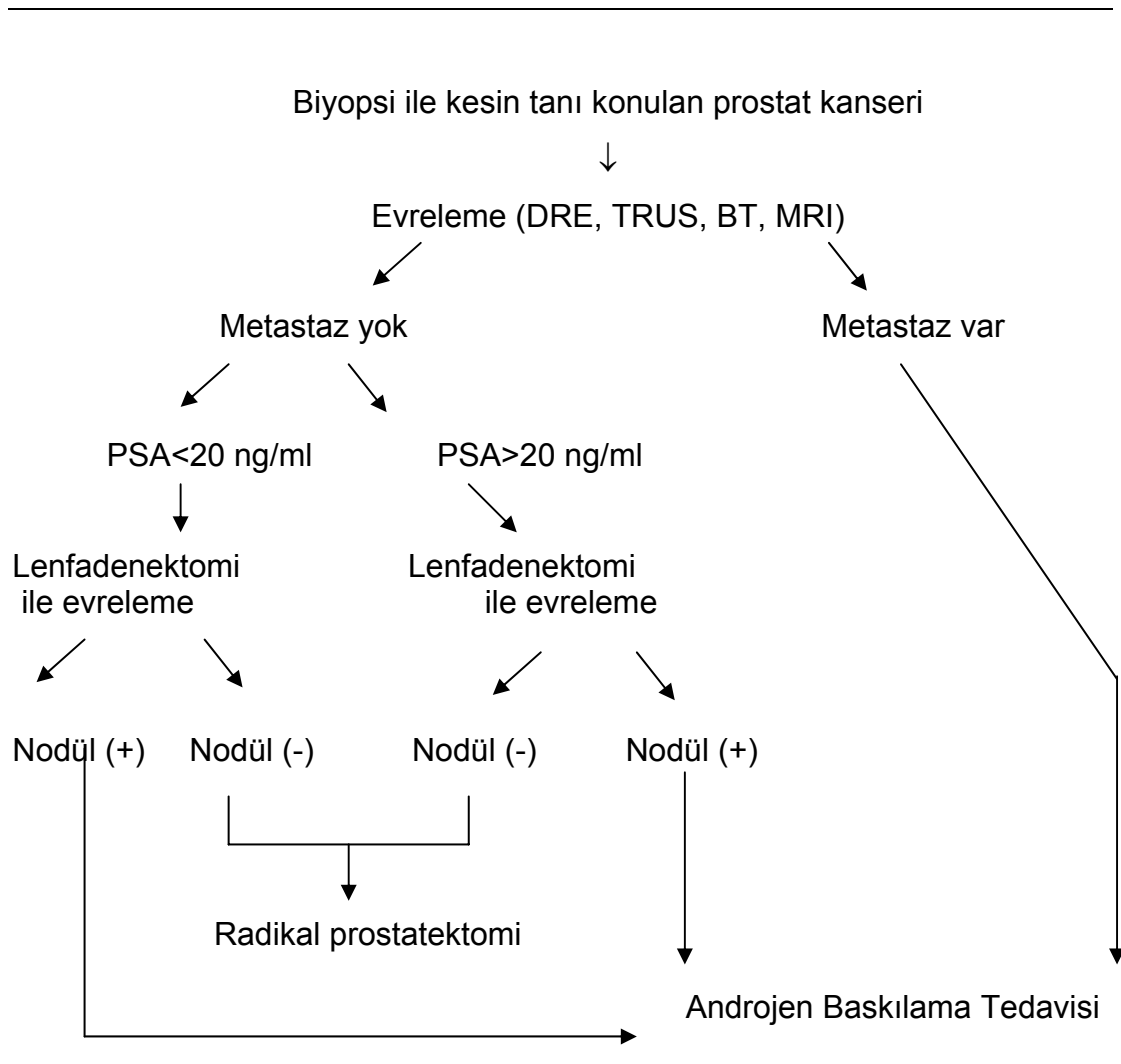
 - * Mx Uzak organ yayılımının değerlendirilememesi
 - * M0 Uzak organ yayılımı olmaması
 - * M1 Uzak organ yayılımı olması
 - M1a Bölgesel olmayan lenf bezine yayılım
 - M1b Kemiklere yayılım olması
 - M1c Diğer uzak organlara yayılım bulunması
-

Prostat kanserini evrelendirmek için hastalığın lokal yayılım sınırlarını çizmek gerekir. Bunun standart uygulama yolu ise parmakla rektal muayene (DRE), ardından lenf nodülleri tutulumunu saptamak için bilgisayarlı tomografi (BT), ve gerektiğinde manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya pelvik lenfadenektomi uygulamalarıdır (85). Yapılan çalışmalarda ultrasonografi eşliğindeki biyopsilerin, DRE veya rasgele biyopsilere göre kanseri en doğru biçimde evrelendirip, dereceleri belirlediği gösterilmiştir. Kapsül dışı yayılımı saptamak açısından transrektal ultrasonografi, DRE' den daha duyarlıdır.

Bilgisayarlı tomografi (BT) ise yalnızca yaygın lenf nodülü metastazından kuşkulandığında, prostat kanserini evrelendirmek için kullanılır. Hastalarda PSA (>20 ng/ml) ve Gleason skoru yüksekliği (>7) saptanmadıkça, BT taraması nodüllerin değerlendirilmesi için kullanılan bir yöntem değildir.

1.2.5.4 PROSTAT KANSERİNİN TEDAVİSİ

Organa sınırlı lokalize prostat kanseri için en önemli tedavi seçenekleri ameliyat (radikal prostatektomi), radyoterapi ve takibini içerir. Tüm metotlar kendilerine özgül riskleri ve yararlarıyla hastanın tercih hakkına dayanan tedavi seçeneklerine zemin oluştururlar. Metastatik veya ilerlemiş prostat kanserinde hormon baskılama tedavisi sadece palyatif bir etki oluşturur. Prostat kanserinin tedavisi Tablo 3' de özetlenmiştir.

Tablo 3: Prostat Kanseri tedavi şeması

1.2.5.5 PROSTAT KANSERİ BELİRTEÇLERİ

Birçok aday prostat kanseri moleküler belirteçleri rapor edilmiştir; ancak, bunlardan yalnızca birkaçı yaygın olarak klinik uygulamalarda yer almaktadır. Prognostik faktörler üç kategoride sınıflandırılmıştır (244):

Kategori I prognostik faktörleri genellikle hasta idaresinde kullanılmasına dayanmaktadır; Kategori II ise, biyolojik ve klinik olarak yaygın bir şekilde çalışılan faktörlerdir; Kategori III faktörleri, prognozun belirlenmesinde yetersiz veriye sahiplerdir. PSA kategori I prognostik faktörlerinden biridir. DNA ploidi, prostat kanserinin belirlenmesinde yaygın

olan kategori II' de yer alan yardımcı bir metottur. Dokuya özgül yeni belirteçlerin çoğu da kategori III içinde yer alırlar (244).

1.2.5.5.1 PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN (PSA)

Prostat kanseri tanısında kaydedilen en önemli ilerlemelerden biri, tümör belirleyicisi olan PSA' nın keşfidir. İlk olarak 1971 yılında Hara tarafından seminal plazmada tanımlanan PSA, daha sonra prostat dokusundan izole edilmiştir (298). PSA' nın serumdaki varlığının gösterilmesiyle de klinik kullanımı başlanmıştır. PSA' nın tanı, tedavi ve takibindeki yüksek anlamlılığı, klinik kullanıma başlanılmasından sonra prostat kanseriyle mücadelede çok kısa zamanda önemli gelişmelerin elde edilmesini sağlamıştır (134).

PSA kromozom 19 üzerinde lokalize bir gen tarafından kodlanan, 33 kDa ağırlığındaki bir glikoproteindir (241, 268). Yapısal olarak incelendiğinde, 237 aminoasit kalıntısıyla, 5 tane disülfid bağı ve N- oligosakkarid zinciri formunda karbonhidrat içerdiği görülmektedir (186, 301). Prostat bezinin epiteliyumundan sentezlenen PSA, seminal plazmaya 0.5-2.0 gr/L konsantrasyonunda salgılanmaktadır; bu konsantrasyon serumdaki 0.1-4 ng/ml değerine eşittir.

Genç yetişkin erkeklerde PSA' nın normal değerleri 0-4 ng/ml arasındadır. Prostat kanserinde PSA üretimi değişkendir ve farklılaşmanın derecesine bağlıdır. İyi farklılaşmış kanser dokusu daha fazla, farklılaşmamış kanser dokusu ise daha az miktarlarda PSA üretmektedir. PSA düzeyleri 4 ng/ml üstünde olan olguların %25-30' u prostat kanserine yakalanmaktadır.

Prostat kanseri belirteçi olan PSA, serumda predominant olarak 3 ayrı moleküler formda bulunmaktadır; serbest PSA (free PSA), alfa 2-

makroglobuline bağlı PSA (A2M-PSA) ve alfa anti-kimotripsine bağlı PSA (51). PSA' nın serbest formu, serum PSA' sının yaklaşık olarak % 5-40' ını oluşturmaktadır. Serbest PSA' nın total PSA' ya oranının klinik açıdan önemli olduğu gösterilmiştir ve prostat kanserli hastalarda bu oran, BPH veya prostatite sahip hastalara göre daha düşük seviyededir. Serumdaki serbest ve total PSA arasındaki bu oranın, BPH ve kanserli hasta arasındaki ayrımı yapmada yardımcı olabileceği gösterilmiştir.

PSA testlerinin artan kullanımı sonrasında, ilk tanı anında lokal ileri evre veya uzak yayılımı bulunan kanser olgularının sayısında sürekli bir düşüş gözlenmiştir. Bu testler etkili olarak ele alınabildiğinde birçok kanser erken evrede teşhis edilebilmektedir.

Prostat kanserinin tedavi takibinde kullanılan bu belirteçlerin yanı sıra, moleküler genetik çalışmaların ilerlemesi ile prostat kanserinde gen polimorfizmleri ve gen ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerinin de çok önemli olduğu anlaşılmış ve bu alanda elde edilen gelişmelere dayanarak, gen polimorfizmleri ve gen ekspresyonları incelenmeye başlanmıştır.

1.2.6 GLUTATYON S-TRANSFERAZLAR

Memelilerde Glutatyon S-transferazlar' ın (GST' ler) yapısı hakkındaki ilk bilgiler 1961 yılında, fare karaciğerinde glutatyonun (GSH) konjugasyonunun gözlenmesi üzerine elde edilmiştir (26, 44). GST' ler, üzülebilir proteinlerdir ve tripeptid glutatyonun (gamma-glutamil-glisin; GSH) transferini katalize ederler; reaktif elektrofolik merkez içeren bir kosubstrattan (R-X) kutupsal bir S- Glutatyonlu (R-SG) reaksiyon ürününün oluşmasını sağlarlar ($R-X + GSH \rightarrow R-SG + HX$). GST' ler ~26 kDa ağırlığında iki alt üniteden oluşan dimerik yapıya sahiptirler; izoelektrik noktaları pH 4-5' te

olduğundan hidrofobik 50 kDa ağırlığındaki bir proteini oluştururlar. Heterodimer formları oluşturmaları durumu ise GST' lerin çeşitliliğini artırır. GST' nin her bir alt ünitesi, iki bileşenden oluşan serbest bir katalitik bölgeyi içerir. Birinci bileşen GSH için özgü bir bağlanma bölgesine sahiptir veya polipeptidin NH₂ - ucundaki aminoasit kalıntılarından oluşan homolog bölge (G bölgesi) ile yakından ilişkilidir. İkinci bileşen ise hidrofobik substratın bağlandığı bir bölgedir (H bölgesi) ve COO⁻ - ucundaki kalıntılardan oluşmaktadır.

Memeli dokularında eksprese olan GST, Faz II enzimler grubuna dahil edilen geniş bir gen ailesidir; bu gen ailesine üye GST enzimleri kanserojenik potansiyele sahip birçok endojen ve ekzojen kimyasallara karşı hücre savunmasının önemli bir bölümünü oluştururlar. Ayrıca, dokuların oksidatif hasardan korunması ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan önemli enzimlerdir. GST' ler prostat kanseri etiyolojisi ile ilişkili olan ajanların oksidatif metabolitlerinin aktivasyonunu da içermektedir. Katalitik aktivitelerine ek olarak, GST' lerin prostat kanserinin gelişiminde önemli belirleyici faktör olan steroid hormonların hücre içi transportunda da görevli oldukları düşünülmektedir (183).

1.2.6.1 GLUTATYON S-TRANSFERAZLARIN SINIFLANDIRILMASI

İnsan sitozolik GST' lerin birçok formu bulunduğundan ayrı olarak sınıflandırılmışlardır (13). Bu sınıflandırmaları, aminoasit dizileri gibi proteinin temel yapısına dayanmaktadır.

İnsan dokularında sentezlenen sitozolik Glutatyon-S transferaz enzimleri, en az sekiz gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bu enzimler; Alpha (GST α), Mu (GSTM, GST μ), Pi (GSTP, GST π), Teta (GSTT, GST θ),

Sigma (GSTS), Kappa (GSTK), Omega (GSTO) ve Zeta (GSTZ)' dir (54). Glutasyon-S transferazlarından GSTM1, GSTM3, GSTT1 ve GSTP1 enzimlerinin genleri polimorfik olduklarından, moleküler epidemiyolojik çalışmaların özel ilgi alanına girmektedirler; bu genler ve polimorfizmleri Tablo 4' de özetlenmiştir (313).

Tablo 4: Glutasyon S-Transferaz Polimorfizmlerinin Sınıflandırılması

Gen	GSTM1	GSTM3	GSTP1	GSTT1
Lokalizasyonu	1p13.3	1p13.3	11q13.3	22q11.23
Uzunluğu	5.92kb	4.53kb	2.84kb	8.09kb
Ekson Sayısı	8	9	7	5
Polimorfizmi	Delesyon	İntron 6'da 3bp' lik delesyon	A313G (Ile105Val) C341T (Ala114Val)	Delesyon
Enzim Aktivitesi	Null	Değişken	% 30 azalır	Null
Ana Substratları	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve aflotoksinler	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve aflotoksinler	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar	Butadin, mono ve dihaloalkenler

Glutasyon S-Transferaz gen ailesinde yer alan polimorfik GSTM1, GSTM3, GSTP1 ve GSTT1 genlerinin genel özelliklerinin sınıflandırılması (313)

1.2.6.1.1 GLUTATYON S-TRANSFERAZ M1 (GSTM1)

GST μ enzimi karaciğer, testis, beyin, kalp ve diğer pek çok dokuda yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Benzo[a]pyren ve mikotoksin aflotoksin gibi kanserojen polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) detoksifikasyonundan sorumludur (157, 191).

GSTM μ gen ailesine ait olan 20 kb uzunluğundaki GSTM genleri (M1-M2-M3-M4-M5), kromozom 1p13.3 lokusunda haritalanmışlardır (311).

GSTM1 geninin 3 farklı aleli belirlenmiştir; gen delesyonu ve alel varyasyonu nedeniyle de gelişen dört genel fenotipinden söz edilmektedir. *GSTM1*0* delesyon alelidir (*null genotipi*, *GSTM1^{-/-}*) ve delesyon meydana geldiğinde sıklıkla iki alel de etkilenmektedir, hiçbir protein oluşmamaktadır. Beyaz ırkın ve Japon toplumunun ~% 50' si, kalıtsal olarak her iki alelin homozigot delesyonu nedeniyle *GSTM1* geninden yoksundurlar. *GSTM1* gen dizisindeki tek bir nükleotidin değişiminin gözlemlendiği *GSTM1*A* ve *GSTM1*B* alelleri de diğer polimorfik alelleridir.

*GSTM1*A* ve *GSTM1*B* alelleri, sırası ile *GSTM1 A* ve *GSTM1 B* proteinlerini kodlamaktadırlar. Bu proteinler fonksiyonel olarak benzerdirler ve sadece tek bir aminoasit açısından farklıdırlar (304). *GSTM1 A* proteininin 172. pozisyonda Lizin aminoasidi bulunurken, *GSTM1 B* proteininin aynı pozisyonunda asparajin aminoasidi bulunmaktadır (8). *GSTM1* geninde meydana gelen polimorfizmler çeşitli kanserlerin gelişiminde etkilidirler.

GSTM1 null genotipi akciğer (210), mesane (4), meme (116), kolon (317), gastrointestinal (17), over (269), tiroid (147) kanserleri gibi birçok kanserin gelişimi ve koroner arter hastalığı (306), şizofreni (107) gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

GSTM3 enzimi özellikle akciğer ve bronşlara ait epitelyumda bulunmaktadır (224). *GSTM3*' ün de polimorfik formları bulunmaktadır. Bir varyant genotipi transkripsiyon faktörü Yin Yang 1 (YY1)' in bağlanması ya da bağlanamaması ile sonuçlanan intron 6' da 3 baz çiftlik bir delesyondan meydana gelmektedir (49). Bu polimorfizm multiple skleroz (187) ve romatoid artrit (190) gibi inflamatuvar hastalıklar ile ilişkilidir.

1.2.6.1.2 GLUTATYON S-TRANSFERAZ T1 (*GSTT1*)

Glutasyon S-Transferaz θ enzimi prostat, böbrek, beyin, akciğer ve yine diğer pek çok dokuda bulunmaktadır (65). Metilleyici ajanlar, peptisitler ve çözücüler gibi monohalometanları ve çok sayıda potensiyel kanserojenleri metabolize eder (205).

GSTT1 geni kromozom 22q11.23' de yer alır. *GSTM1* geninde olduğu gibi, *GSTT1* geninin de bir null genotip bulunur ve delesyon varyantının varlığı enzimin oluşmamasına neden olmaktadır. Beyaz popülasyonunun %10-20' sinde *GSTT1* null genotipi gözlenmektedir.

GSTT1 null genotipi, prostat (205, 233), mesane (156), akciğer (158), mide (253), kolorektal (57, 302) kanserleri, astım (276) ve miyelodisplastik sendrom (38) ile ilişkilendirilmiştir (104).

1.2.6.1.3 GLUTATYON S-TRANSFERAZ P1 (*GSTP1*)

$GST\pi$ enzimi başlıca testis, adrenal bez, insan epitel dokusu, pankreas doku ve hücrelerinde önemli miktarlarda; özellikle üriner, solunum ve sindirimle ilgili sistemlerde ise daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır (65, 83).

$GST\pi$ enzimi, karsinojenler ve sitotoksik ilaçlar gibi elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunu gerçekleştirmektedir. Buna ilave olarak, DNA'yı oksidatif hasardan korumada önemli bir rol oynamaktadır (6, 282, 300).

Genomdaki lokalizasyonu kromozom 11q.13 ve transkript uzunluğu 719 bp olan, 7 eksondan oluşan *GSTP1* geninin iki önemli polimorfizmi bilinmektedir. Birinci polimorfizm, 313. nükleotidde Adenin bazının Guanine değişmesi sonucunda gelişen Ile105Val polimorfizmidir ve bu değişiklik azalan enzim aktivitesi ile sonuçlanmaktadır. İkinci polimorfizm ise 341.

nükleotide karşılık gelen sitozinin (C) timine (T) transisyonu sonucunda 114. kodonda Alanin aminoasidinin Valin aminoasidine (Ala114Val) değişimine neden olmaktadır.

Aleller $GSTP1*Ile^{105}$, $GSTP1*Val^{105}$, $GSTP1*Ala^{114}$, $GSTP1*Val^{114}$ olarak belirtilmektedir. *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi için AA (Ile/Ile) yabanıl tip, AG (Ile/Val) heterozigot ve GG (Val/Val) homozigot polimorfik genotiplerini oluşturmaktadır. *GSTP1* Ala114Val polimorfizmi için CC (Ala/Ala) yabanıl tip, CT (Ala/Val) heterozigot ve TT (Val/Val) homozigot polimorfik genotiplerini oluşturmaktadır.

1.2.6.1.3.1 *GSTP1*' İN PROSTAT KANSERİ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ

GSTP1 geninde iyi tanımlanmış olan bir değişiklik, katalitik enzim aktivitesinin % 30 azalmasına neden olan *GSTP1* Ile105Val polimorfizmidir [dbSNP no; rs1695] (319). Bu polimorfizm, *GSTP1* geninin 105. kodonda 313. nükleotide karşılık gelen Adenin bazının Guanine transisyonu sonucunda; 5. eksonunda, izolösin aminoasidinin Valin' e değişmesi ile karakterizedir (6, [16](#), [118](#), 273).

Valin aminoasidinin İzolösin aminoasidinin yerine geçmesi, *GSTP1*' de substratına göre katalitik aktivitesindeki değişiklikler ile sonuçlanmaktadır (6, 273). Örneğin; İzolösin aleli, klorlu nitroaryl substratlar için yüksek aktiviteye sahipken, Valin aleli ethancrynic asit ve PAH' ın diol epoksitleri için yüksek aktiviteye sahiptir. Val aleli, polisiklik aromatik hidrokarbonların diol epoksitleri için Ile aleline göre (105Ile) 7-kat daha yüksek katalitik aktiviteye sahip iken, aynı varyant 1-kloro-2.4-dinitrobenzen konjugasyonunda 3 kat daha düşük etkiye sahiptir (273, 300). Aynı zamanda, Valin aminoasit değişimi değişmiş termal stabilite ile sonuçlanmaktadır (127, [143](#)). Val aleli, Ile aleline oranla,

birçok substrat için daha az ısıya dayanıklıdır ve genellikle daha düşük enzimatik aktiviteye sahiptir (319).

Düşük GSTP1 enzim aktivitesinden sorumlu olan 105Val aleli; mesane (267, 285), meme (116, [198](#), 271), ağız, akciğer (155) ve over ([264](#)) kanserleri ile astım (81, 117, 188), endometriyozis (52, 129), kokain bağımlılığı (32) ve psikoz (114) ile ilişkilendirilmiştir.

1.2.7 PROSTAT KANSERİ OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN GENLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Son yıllarda, moleküler genetik alanında kaydedilen önemli gelişmeler, prostat kanserine yatkınlık oluşturan veya sorumlu olan genlerin genetik çalışmalarla belirlenmesini olanaklı hale getirmiştir.

Prostat kanserine yatkınlık yaratan genlerden biri olan *GSTP1*'nin polimorfizmlerinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntem Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonrası Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemidir (104, 110, 163, 275, [300](#)). RFLP metodunun yanı sıra, LightCycler (LC) gibi gerçek zamanlı PCR (*real time polymerase chain reaction*, RT-PCR) cihazları ile birlikte floresan boyalı işaretli hibridizasyon problemlerinin kullanımına dayalı Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi kullanılmaktadır ([161](#)).

1.2.7.1 TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ

Tek nükleotid polimorfizmleri (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), genom dizisi içerisinde A, T, C yada G bazlarından birisinin değişmesiyle meydana gelen DNA dizi farklılıklarıdır. Örneğin, AAGGCTAA dizisinin A**I**GGCTAA dizisi şekline dönüşmesi ile bir SNP oluşur. Belirli bir SNP' den söz etmek için, o SNP' in popülasyonda en az % 1 oranında

görülmesi gerekmektedir (260, 271). İnsanlar arasında genetik farklılıkların % 90' ını oluşturan SNP' ler, genomda yaklaşık her bin bazda bir meydana gelmektedirler (271). Bu SNP' lerin yaklaşık yarısı, protein kodlama bölgesinde meydana gelmekte ve insanlar arası tüm kalıtsal varyasyonların sebebini oluşturmaktadır. Fonksiyonel bir SNP, bir proteinin aminoasit dizisini veya ekspresyonunu değiştirerek, kişinin davranış özelliklerini, hastalık yatkınlığını, dayanıklılığını ve tedaviye verdiği yanıtı modifiye edebilir. İnsan haploid genomunun yaklaşık 3 milyar bazdan oluştuğu düşünülecek olunursa, total SNP sayısının 3 milyon civarında olduğu hesaplanabilmektedir.

DNA dizisindeki farklılıkların bakteri, virüs, toksinler, kimyasallar ve ilaçlar gibi çevresel etkenlere ve hastalıklara verilen yanıt üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Bu yüzden SNP' lerin belirlenmesi, biyomedikal araştırmalarda ve farmakolojik ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. SNP' lerin evrim süresince stabil kalmaları, yani kuşaklar arası geçişte fazla değişmemeleri, populasyon çalışmalarının kolay izlenmesini sağlamaktadır.

İnsan genomunun SNP haritasının çıkarılması konusunda dünyada çok sayıda grup çalışmaktadır. Bu gruplar içinde en önemli olanlar, SNP Konsorsiyumu (TSC project) ve International HapMap Project (www.hapmap.org)' tir. SNP Konsorsiyumu, Şubat 1999' da insan genomunda eşit dağılım gösteren ~300.000 SNP' nin tanımlanması ve "fikri mülkiyet" sınırlaması olmaksızın bilginin halka aktarımını sağlamak amacı ile kurulmuş bir organizasyondur. Hedefi, iki yıl içerisinde 300.000 SNP' nin tanımlanması olan SNP Konsorsiyumu' nun 2001 yılı sonunda yayımlanan

raporunda, 1.4 milyon SNP açıklanmıştır (248). 2003 yılında HapMap projesi ile 2.8 milyon SNP keşfedilmiş ve 2006 yılında da veritabanında 10 milyondan fazla SNP açıklanmıştır.

SNP haritalarının kanser, diyabet, vasküler hastalıklar gibi poligenik kalıtım gösteren hastalıkların çözümlenmesinde çok faydalı olacağı düşünülmektedir.

SNP' ler genellikle hastalık gelişimine neden olmadıkları halde, belirli hastalıklara yatkınlık kazandırabilmektedirler. Örneğin, prostat kanserine yatkınlık, testosteron metabolizmasında etkili olan Sitokrom P450 3A4'deki (*CYP3A4*) bir SNP' e bağlanmıştır. Bu tek nükleotid polimorfizmi, *CYP3A4* geninin promoter bölgesinde 392. pozisyonundaki Adenin Guanine transisyonu sonucu gelişmektedir (233). Polimorfizm, beyaz ırkta prostat kanserine yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir ve G aleline sahip bireyler 6-kat daha fazla riske sahipken, aynı polimorfizme sahip Afrikalı Amerikalılarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (220, 233). Bunun nedeni, prostat kanserinin ayrıca etnik kökenlere bağlı olarak farklılıklar göstermesidir (38, 200).

SNP' lerin hastalık gelişiminde her zaman tek başlarına ve kesin olarak belirleyici olmamaları dikkat edilmesi gereken bir konudur. Yukarıda bahsedilen, *CYP3A4* geninde tanımlanmış polimorfizmin, fonksiyonel başka bir polimorfizmle de bağlantı gösterip, prostat kanserine neden olabilir (250). Prostat kanseri birçok genin bir arada etken olduğu bir hastalıktır; poligenik kalıtımla oluşması, tanımlanmasını gerçekleştirecek genetik testlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır.

SNP' lerin varlıkları, pek çok değişik moleküler yöntem ile ortaya konulabilmektedir. En yaygın olarak kullanılan metotlar, Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi, gerçek zamanlı PCR ve DNA dizi analizi' dir.

1.2.7.1.1 RESTRİKSİYON FRAGMAN UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP)

SNP' lerin belirlenmesi için kullanılan moleküler biyolojik yöntemlerden biri, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi' dir (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (110, 267).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri, çift sarmal DNA' yı özgül baz dizilerinden kesen ve bu şekilde DNA ile çalışılmasını mümkün kılan çok önemli enzimlerdir. Bu enzimler ile insan DNA' sı, 1.000 – 10.000 baz çifti uzunluğundaki fragmanlara ayrılabilir.

Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde restriksiyon enzimi sentezlerler. Asıl görevleri, bakteriye dışarıdan giren yabancı genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonları önlemek ve böylece bakteri DNA' sını korumaktır. Bakteriye özgül olan bu enzimler, çift iplikli DNA (dsDNA) üzerinde özgün bir bölgeyi ('palindrom') tanır ve dsDNA' nın her iki zincirindeki fosfodiester bağını keserek DNA' yı tanıdıkları kesim noktalarından parçalara ayırır. Günümüzde 500' e yakın restriksiyon enzimi değişik mikroorganizmalardan elde edilmektedir. İsimleri, izole edildikleri bakterinin ilk harfi cins, ilk iki harfi tür; aynı bakteriden birkaç enzim elde edildi ise Roma rakamı ile belirtilmektedir.

RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz ile kesildikten sonra, fragmanlar moleküler büyüklüklerine göre jel elektroforezinde ayrıştırılır. Moleküler ağırlık standardı (belirteç)

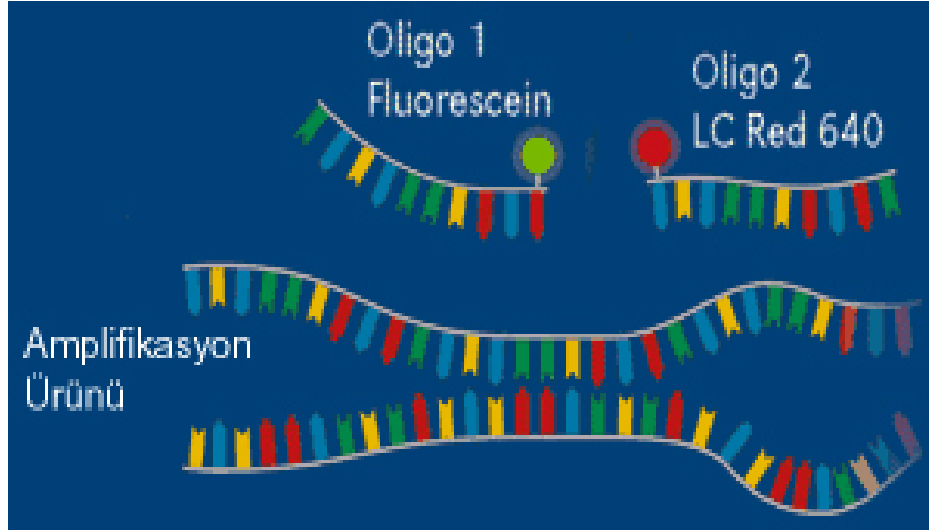
yardımıyla, fragmanların moleküler ağırlıkları belirlenir. Jel, ethidyum bromid ile boyandıktan sonra, fragmanlar UV (260 nm) ışık altında görünür hale getirilir ve incelenir.

1.2.7.1.2 LIGHTCYCLER SİSTEMİ

Gerçek zamanlı (real-time) bir PCR cihazı olan LightCycler, ultra hızlı ısıtma ve soğutma kapasitesi sayesinde 30-40 PCR döngüsünü 20-30 dakika içinde gerçekleştirilebilir. Ayrıca sistemdeki erime eğrisi analizi mutasyonların ve SNP'lerin belirlenmesi ve genotiplendirilmesi için çok uygundur (186). Erime eğrisi analizi boyunca diziye özgül hibridizasyon problemlerinin tek zincirli DNA'ya hibridizasyonu izlenebilir. PCR'dan sonra herhangi ek bir manüel işleme ihtiyaç yoktur ve buna bağlı olarak kontaminasyon riski de en aza indirgenmiştir (178).

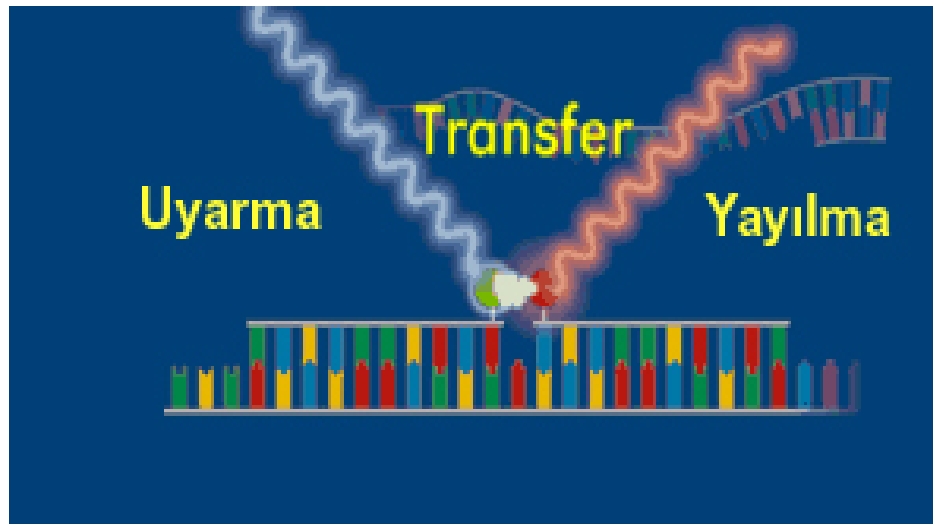
Hibridizasyon problemlerinin bir tanesi potansiyel mutasyon bölgesini kapsar ve *mutasyon probu* olarak adlandırılır. Diğer prob ise bağlanma *probu* (*anchor probu*) olarak isimlendirilir. Mutasyon ve bağlanma problemleri, DNA zincirine baş-kuyruk pozisyonunda hibridize olacak şekilde dizayn edilirler.

Araştırılan gen bölgesi, o bölgeye özgül iki primer ile amplifiye edildikten sonra, oluşan ampikon bir sonraki döngünün annealing aşamasında özgül hibridizasyon problemleri ile tespit edilir.



Şekil 3: Denatürasyon fazı sırasında hibridizasyon problemleri ve DNA zinciri (178)

Şekil 3' de hibridizasyon problemlerinin bir PCR döngüsü süresince nasıl davrandıkları gösterilmiştir. Hibridizasyon probu olarak floresan boyalar ile işaretlenmiş iki farklı oligonükleotid ve amplifikasyon ürünü bulunmaktadır. Oligo 1, 3' ucundan fluorescein (donör boya) ile, oligo 2 ise, 5' ucundan LC Red 640 (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. PCR' ın denatürasyon aşaması boyunca hibridizasyon olmadığından bu fazda floresan ölçülmeyecektir.



Şekil 4: Hibridizasyon problemlerinin DNA' ya baş-kuyruk pozisyonunda hibridizasyonu ve FRET (178)

Annealing aşamasında iki oligonükleotid, DNA zincirine baş-kuyruk pozisyonunda bağlanırlar. Oligonükleotidler bu pozisyonda hibridize olduklarında iki floresan boya birbirine çok yaklaşmış olur. Fluorescein ile işaretli 1.oligo, LC cihazının ışık kaynağından (LED- Light Emitting Diode) yayılan 470 nm' deki mavi ışık ile uyarılır ve uzun dalga boyunda (530 nm) yeşil floresan ışık yayar. İki probun birbirlerine çok yakın buldukları annealing aşamasında 530 nm' den yayılan enerji ikinci hibridizasyon probuna aktarılarak onu uyarır ve farklı bir dalga boyunda (640 nm) kırmızı floresan ışık yayılmasına neden olur. İki prob arasındaki bu enerji transferi, **F**loresans **R**ezonans **E**nerji **T**ransferi yani FRET olarak tanımlanır (Şekil 4).

Enerji transferinin etkili olması için iki floresan molekülü arasındaki mesafenin çok az olması gerekmektedir (1-5 nükleotid arası). Bu yüzden oligonükleotidlerin baş-kuyruk pozisyonundaki hibridizasyonları çok önemlidir. LC Red 640, LC cihazının optik ünitesinin ikinci kanalında (F2) ölçülür. Ölçüm maksimum ışımanın olduğu annealing fazının sonunda yapılır.

Annealing fazından sonra, sıcaklık artar ve hibridizasyon problemleri başlayan uzama (elongation) aşamasında amplikondan ayrılırlar.

Uzama aşamasından sonra oluşan amplikonlar çift zincirli olduklarından hibridizasyon problemleri ile hibridize olamazlar. Bu durumda, iki prob birbirlerinden uzakta ve serbest halde oldukları için FRET gerçekleşemez.

Donör prob daima fluorescein ile işaretlenirken, alıcı prob LC Red 640 veya LC Red 705 ile işaretlenebilir. LC Red 705 aynı LC Red 640 gibi fluorescein' in yaydığı 530 nm' deki yeşil ışık ile uyarılabilirken, ondan farklı olarak 705 nm' de kırmızı ışık yaymaktadır (249).

1.2.8.3.2.1 ERİME EĞRİSİ ANALİZİ

LC cihazı kullanılarak, SNP'lerin genotiplendirilmesi ve mutasyonların analizi oldukça hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir. Erime eğrisi (melting curve) analizi ile diziyeye özgül hibridizasyon problemlerinin tek zincirli DNA'ya sıcaklığa bağlı hibridizasyonları izlenebilmektedir.

Her çift zincirli DNA (dsDNA) molekülünün, kendine özgül bir erime sıcaklığı (T_m) vardır. Erime sıcaklığı DNA molekülünün % 50'ünün tek zincirli hale geldiği sıcaklık olarak tanımlanabilir.

Mutasyon analizi PCR tamamlandıktan sonra yapılır. PCR işleminde, floresan boyalar ile işaretli diziyeye özgül problemler ve amplifikasyonu sağlayacak primerler ile hedef gen bölgesi amplifiye edilir. Bu aşamada mutasyon ile ilgili bir bilgiye henüz ulaşılamaz. Ancak PCR işlemi tamamlandıktan sonra, erime eğrisi analizine geçilir. Oluşan amplicon yavaş yavaş ısıtılır ve floresandaki değişiklikler sürekli ölçülür. Erime eğrisi analizi sonucunda elde edilen erime eğrisi hangi sıcaklıkta floresan şiddetinde düşme olduğu açısından değerlendirilir ve buna göre hastanın o geni için genotiplendirilmesi yapılabilir. Ayrıca, bir gen bölgesi içinde birden fazla prob kullanılarak birden fazla mutasyon tek bir reaksiyonda çalışılabilir.

RFLP gibi standart mutasyon belirleme analizi, PCR basamağından sonra ek bir enzim kesme basamağını içermektedir. LC cihazında hibridizasyon problemleri ve erime eğrisi analizi yöntemi ile amplifikasyon ve genotiplendirme aynı kapiller tüp içerisinde gerçekleştirilebilmektedir. Bu sayede kontaminasyon riski oldukça azalır ve 32 örnek, bir saat gibi kısa bir sürede çalışılıp incelenebilir, sonuçlar RFLP analizine göre daha kolay yorumlanabilir ve istenildiği zaman bilgisayar belleğindeki veriler incelenebilir.

Her olası genotip için ayrı problemlerin kullanılmasına gerek yoktur. Tek bir prob çifti kullanılarak homozigot (yabancıl tip, mutant tip) ve heterozigot genotipler analiz edilebilir.

1.2.8 EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER

Prostat kanserinin erken teşhisi günümüzde yaygın olarak, dijital rektal muayene ve serum prostat spesifik antijenin belirlenmesi ile sağlanmaktadır. Ancak, bu metotların sınırlı duyarlılığı ve özgüllüğünden dolayı prostat kanserinin erken evresi güvenilir olarak belirlenemez (315). Uygulanan bu rutin klinik uygulamalara ek olarak, prostat kanserinin erken teşhisi ve etkili tedavisinde genetik mutasyonların yanı sıra epigenetik değişikliklerin de bakılması söz konusudur (143, 315).

Epigenetik tanımı ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından ortaya atılmıştır ve DNA dizi değişikliği olmadan mayotik ve/veya mitotik olarak kalıtılabilen gen ekspresyon değişiklikleri olarak tanımlanır (24, 87). DNA metilasyonu için hipo- veya hipermetilasyon, histon modifikasyonları için asetilasyon veya deasetilasyon epigenetik değişikliklere örnek olarak verilebilir. Son on yılda yapılan çalışmalar, epigenetik değişikliklerin tümör gelişiminde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Kanserin gelişimi süresince meydana gelen epigenetik değişiklikler, tümör süpresör genlerinin DNA metilasyonu ve kromatinin histon modifikasyonları' dır (226, 240).

1.2.8.1 DNA METİLYASYONU

Metilasyon, memeli genomunda yalnızca CpG dinükleotidinde guanozine göre 5' lokalizasyon gösteren sitozin bazlarında meydana gelmektedir (24, 83). Sitozinin 5. karbonuna metil grubu (-CH₃) eklenmesi ile gerçekleşir ve 5- metilsitozinin (5-MeC) oluşmasına neden olur (146).

Böylece transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına engel olup, transkripsiyonun baskılanmasına neden olur.

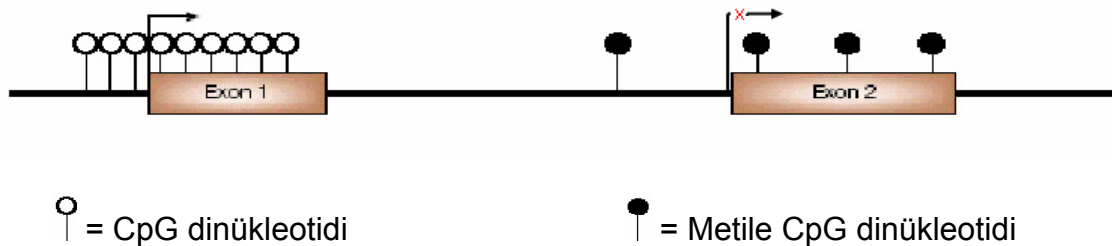
Genomda tüm sitozinlerin % 3-4' ü metile halde bulunmaktadır. 5-MeC' ler büyük oranda CpG dinükleotidlerinde metillenmesine rağmen, memeli dışındaki canlılarda düşük oranlarda da olsa CpNG, CC(a/t)GG, CpA ve CpT' nin metillendiği bilinmektedir. Örneğin; *E.coli* gibi bakterilerde sitozinin dışında adeninin de metillenir (216).

Memeli genomunda sitozin metilasyonunun önemli olduğu bölgeler; CpG adaları, G+C izokorları ve CpG sıcak noktaları' dır.

1.2.8.1.1 CpG ADALARI

CpG içeriği zengin 0,5 – 4 kilobaz (kb) uzunluğundaki kısa diziler CpG adaları olarak tanımlanırlar (24, 276). Bu bölgelerin CG içeriği % 50' den fazladır ve bu bölgedeki CpG dinükleotidleri normal durumda metile olmamış durumdadırlar (85, 131, 276). Fakat, genom genelinde CpG' lerin %70' i metiledir. İnsan genomunun son tasarlanan şeklinde yaklaşık 29.000 CpG adası tespit edilmiştir ve kromozomların Megabaz (Mb) başına 5-15 CpG adasına sahip olduğu hesaplanmıştır (131).

CpG adaları özellikle dokularda ifade edilen bazı genlerin, örneğin 'housekeeping' geni gibi genlerin promoter bölgelerinde ve ilk eksonlarında bulunurlar (11, 222) (Şekil 5).



Şekil 5: CpG adaları memeli genomunu oluşturan genlerin yarısının önündeki promoter bölgelerinde bulunurlar.

Normal hücrelerde CpG adalarının çoğu metillenmemiş durumdadır; fakat, CpG adalarının normalde metillenmiş olarak bulunduğu 4 yer bilinmektedir (25, 101, 133, [175](#), 288).

- 1- Kadınlarda X kromozomu
- 2- Imprintlenmiş genler
- 3- Germline' na özgül genler
- 4- Dokuya özgül genler

1.2.8.1.2 G+C İZOKORLARI

İnsan genomu G+C içeriği olarak farklı bölgelere ayrılabilir ve bu farklı bölgeler (izokorlar) kendi içinde benzer G+C içeriğine sahipler iken, gruplar arasında belirgin farklılıklar gözlenir (19).

Beş izokor ailesi bulunmaktadır: L1 ve L2, G+C içeriği az (% 40); H1 ve H2, G+C içeriği zengin (sırasıyla % 45 ve % 50); ve H3, G+C içeriği çok zengin (% 53) bölgeler olarak tanımlanırlar. G+C içeriği ve gen yoğunluğu arasındaki ilişkiden dolayı, H3 izokorlar en fazla gene, CpG adasına ve CG dinükleotidine sahip bölgelerdir (216).

1.2.8.1.3 CpG SICAK NOKTALARI

CpG bölgelerinin mutasyonlar için sıcak noktalar gibi davrandıkları gösterilmiştir. Eşey hücresi nokta mutasyonlarının % 30' unun 5-MeC' nin spontan deaminasyonu sonucu oluşan MeCpG → TpG transisyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir (47). p53 geninde gözlenen inaktive edici nokta mutasyonlarının yaklaşık % 50' si CpG dinükleotidlerinde meydana gelmektedir (78).

Bunun mekanizması ise sigara ile ilişkili akciğer kanserinde açığa çıkartılmıştır: Metile sitozinlerin karsinojenleri CpG dinükleotidlerine

yönlendirerek Guaninin→Timine transversiyonuna neden oldukları (149) ve bu nokta mutasyonlarının, 5-MeC' nin yanında yer alan Guanin ile reaksiyona giren benzo[a]pyren ve diğer kimyasal karsinojenler gibi polisiklik aromatik bileşiklerde meydana geldiği görülmüştür (216). Bu olay, DNA metilasyonunun kansere yol açan genetik değişikliklerle olan ilişkisini açıklamaktadır.

Metil gruplarını sitozine enzimatik olarak bağlayan enzimler DNA Metil Transferazlar (DNMT)' dir (216).

1.2.9 DNA METİL TRANSFERAZLAR (DNMT)

Sitozinin metillenmesi DNA sentezinden sonra, bir sitozinin 5' lokalizasyonundaki karbonuna metil donör S-adenozilmetioninden bir metil grubunun enzimatik transferi ile meydana gelmektedir; bu enzimatik reaksiyon, DNA metiltransferazlar (DNMT) olarak bilinen enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (167, 218, [226](#), 232, 240).

Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olmak üzere toplam beş tane DNA Metiltransferaz karakterize edilmiştir (Şekil 6) (22, 136). Bir DNMT' ın COO⁻ - terminal bölgesi katalitik aktiviteden sorumlu iken, NH₂- terminal bölgesi DMAP1 ([DNA methyltransferase 1 associated protein 1](#)), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ve Rb (Retinoblastoma) gibi birçok proteinlerle ilişkilidir (197).

DNA metiltransferazlar metilasyon sinyallerinin muhafazası ve *de novo* metilasyon olmak üzere iyi karakterize edilmiş iki fonksiyona sahiptirler.

DNMT1; metillenmiş bir dizinin replikasyonundan sonra DNA metilasyonunun sürdürülmesi için gerekli bir enzimdir (5, [226](#)). Bu özelliği

sayesinde replikasyon öncesi metilasyon modelini, yeni oluşmuş olan DNA zincirine geçirmektedir (216).

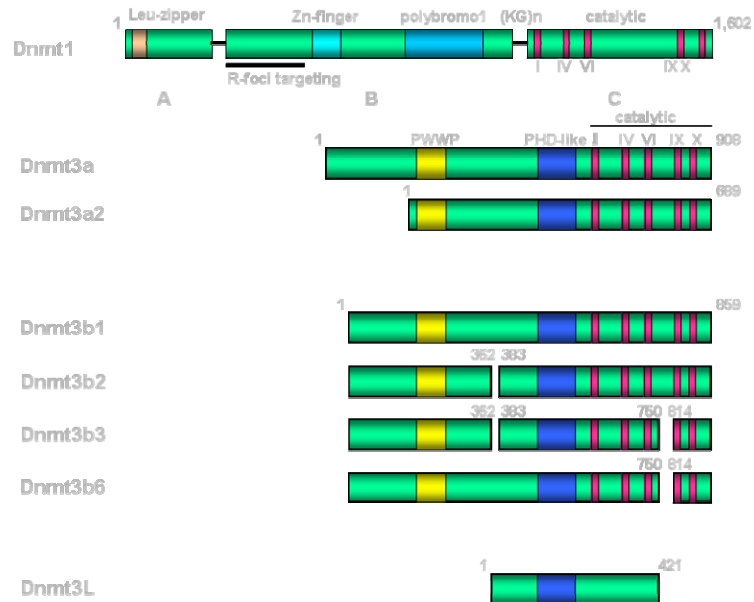
Yapılan fare deneylerinde DNMT1 delesyonunun ölümcül olduğu ve DNMT1' den yoksun fare embriyolarının gastrulasyon aşamasından sonra genom genelindeki demetilasyonuna bağlı olarak öldükleri gösterilmiştir (174, 216). DNMT1' in *de novo* metilasyonunda önemli bir role sahip olduğu konusunda dair kesin bir kanıt bulunmaz iken, aksine gösteren bir bulgu da yoktur (22). Hatta; DNMT1' in yüksek ifade edilmesinin kanser hücre hatlarında CpG adalarının *de novo* metilasyonunu artırdığı gösterilmiştir (289).

DNMT2' nin rolü henüz tam olarak saptanamamıştır; fakat, sitozin metiltransferazlara ait karakteristik korunmuş motifleri içermektedir (219). Bununla birlikte sentromerik bölgelerin kontrolünde fonksiyon gördüğüne dair bazı kanıtlar bulunmaktadır (22).

DNMT3L gametogenez sırasında ifade edilmektedir; DNMT3a ve DNMT3b ile benzer homolojiye sahip olsa da maternal genomik imprintlenmede rolü bulunmaktadır.

DNMT3a ve DNMT3b *de novo* metilaz aktiviteye sahiplerdir ve erken embriyogenez esnasında temel bir rol oynamaktadırlar (218). Fertilizasyonun hemen sonrasında fare zigotunun genomu demetillenmiş haldedir (237). İmplantasyon sırasında DNMT3a ve DNMT3b vasıtasıyla genomun remetilasyonu gerçekleşir, ki bu normal memeli gelişimi için gereklidir (201, 237). Her iki DNMT3 metiltransferazdan yoksun olan fareler anormal morfolojiye sahip olurlar ve gastrulasyondan hemen sonra ölürlar (218). DNMT3b, DNMT3a' dan farklı olarak sentromerik minör satellit tekrarlarının

metillenmesi için gereklidir. Bu fonksiyonu evrimsel olarak korunmuş olarak ortaya çıkmaktadır. Örneğin; az bulunan otozomal resesif ICF (Immunodeficiency- Centromeric Instability- Facial Anomalies) sendromlu kişilerde DNMT3b' de meydana gelen korunmuş mutasyonlar, perisentrik heterokromatinde hipometilasyona neden olmaktadır (107, 137). DNMT3a'nın DNMT3a2 olmak üzere 1 tane, DNMT3b' nin de DNMT3b1, DNMT3b2, DNMT3b3 ve DNMT3b6 olmak üzere toplam 4 tane alt sınıfı bulunmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6: DNA Metil Transferaz (DNMT) ailesi

DNA metiltransferaz beş aile üyesinin genel organizasyonunu göstermektedir. Dnmt1 N- ve C- terminal alanları etkileşim halindedir. Fonksiyonel alanlarının bir kısmı ve yapısal motifleri Dnmt1 ve Dnmt3' ün N- terminal bölgesinde tanımlanır ve bunlar PCNA bağlayıcı domain (PCNA binding domain, PBD), hedef bir dizi (targeting sequence, TS), sisteince- zengin bölge (C), polybromo homology domain (PBHD), triptofan- zengin bölge (PWWP) ve diğer sisteince- zengin bölge (C-rich) olarak bilinirler. Diğer dikey çizgilerin iç kısmında, DNA metiltransferazların sadece Motif I, IV ve X isimlendirilir. Bağlayıcı bölge – 6 Glisin-Lizin (GlyLys) tekrarı, Dnmt1' in N- ve C- terminal bölgesi arasında kısa ince bir yatay çizgi ile gösterilir (136).

DNMT' lar, DNA metilasyonu varlığında histon deasetilaz (HDAC) gibi diğer proteinlerle işbirliği içinde transkripsiyonel süpresörler gibi görev yapabilmektedirler (222).

DNMT' ların gen transkripsiyonun susturulması esnasında, Histon modifiye edici enzimler ve Metil-CpG Bağlayan Proteinler (MBD) ile ilişkili buldukları gösterilmiştir (134).

1.2.10 HİSTON DEASETİLAZLAR (HDAC) ve METİL-CpG BAĞLAYAN PROTEİNLER (MBD)

Histonlar asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon gibi birkaç çeşit yol ile modifiye olabilirler (138). Lizin kalıntılarında meydana gelen ve histon asetiltransferazlar (HAT) ile katalize edilen histonların asetilasyonu, gen transkripsiyonunun aktivasyonu ile ilişkilidir. Histon deasetilaz (HDAC) vasıtasıyla katalize edilen histonların deasetilasyonu ise gen transkripsiyonunun susturulması ile ilişkilidir (106, 122). HDAC' lar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunun birbirine bağlı olduğunu kanıtlamaktadır (69).

HDAC' lar histon kuyruklarındaki lizin kalıntılarını deasetile ederek komşu histonlar arasındaki ilişkiyi kolaylaştırırlar ve daha yoğun olarak paketlenmiş bir kromatin yapısının ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu yoğun paketlenmiş yapı transkripsiyon faktörlerinin DNA' ya bağlanmasını engelleyerek gen ekspresyonunu baskılar.

İlk metil-CpG bağlayıcı protein olan MECP2, metille CpG adalarına bağlanmak için artmış affinite gösterir; ayrıca, Histon deasetilaz, HDAC1 ve transkripsiyonel korepresörlerin ortamda toplanmalarını sağlamaktadır (233). Son birkaç yıldır MECP2' ye ek olarak metil bağlayıcı proteinler (MBDs) tespit

edilmiştir. Şimdiye kadar dört tane MBD karakterize edilmiştir ve MBD1-4 olarak adlandırılmışlardır (295). MECP2 gibi, MBD2 ve MBD4 de transkripsiyon baskılayıcıları olarak görev görürler.

Tüm bildiklerimizin yanında yine de gen susturulması için hipoasetilasyonun mu yoksa metilasyonun mu önemli bir basamak olduğu anlaşılamamıştır.

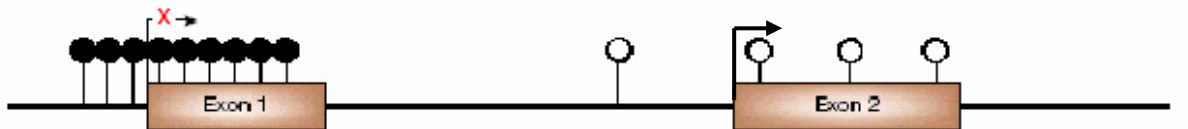
1.2.11 DNA METİLYASYONUNUN FONKSİYONU

DNA metilasyonunun bilinen iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır;

1. Gen ifadesinin baskılanması
2. Genom güvenliği ve yapısal bütünlüğünün korunması

1.2.11.1 GEN İFADESİNİN BASKILANMASI

Metilasyondaki metil grubu baz eşleşmesini etkilemez; fakat, DNA'nın büyük oluğuna çıkıntı yaptığından protein-DNA etkileşimini etkiler (145, 244). Genellikle omurgalı genomunun metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engellemekte ve böylece transkripsiyonel susturulma ile sonuçlanmaktadır (279) (Şekil 7). Myc ve AP-2 gibi transkripsiyon faktörlerinin bağlandıkları uygun düzenleyici dizilerindeki metilasyon, bu faktörlerin DNA'ya bağlanmalarını engellemektedir (228). Aynı şekilde DNA metilasyonu, çinko parmak proteini CTCF (CTC binding factor) ve imprintlenmiş Igf2/ H19 arasındaki ilişkiyi de bloke etmektedir (110).



Şekil 7: Promoter bölgelerin hipermetilasyonuna bağlı transkripsiyonel susturulması; genom genelindeki hipometilasyona bağlı transkripsiyonel aktivasyon.

Bir genin ifade edilmesi için 3 kriterin gerçekleşmesi gereklidir,

- 1) Uygun transkripsiyon faktörlerinin ortamda bulunmaları,
- 2) Histonların asetile ve metillenmemiş durumda olmaları,
- 3) ve CpG adalarındaki sitozinlerin metillenmemiş olarak bulunmaları (279).

Gen susturulması, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kromatinin yeniden düzenlenmesine bağlı olmak üzere 3 tane hipotez ile açıklanabilir.

İlk hipotezde, DNA metilasyonunun histon modifikasyonlarını tetiklediği düşünülmektedir. DNMT3a ve DNMT3b tarafından *de novo* metilasyon gerçekleşmekte ve buna takiben MECP2-Sin3a-HDAC' dan oluşan kompleks histon deasetilasyonunu meydana getirmektedir. Yeniden düzenlenmiş olan bu kromatin Suv39h gibi histon metiltransferazları aktif ederek, Histon 3' ün 9. pozisyonundaki Lizin aminoasit kalıntısını (Lizin 9) (H3-K9) metile etmekte ve böylece kromatinin inaktif yapısı stabil hale getirmektedir.

İkinci hipotezde, histon metilasyonunun DNA metilasyonunu başlattığı öne sürülmektedir. Metile H3-K9, Hp1 (methyl-lysine binding protein)' i ortama çağırarak bir sinyal gibi işlev görür; hem H3-K9' un metillenmesini devam ettirir, hem de DNMT' ları ortama çağırarak inaktif kromatinin stabil olmasını sağlar.

Üçüncü hipotezde, kromatinin yeniden düzenlenmesi DNA metilasyonunu başlatmaktadır. ATRX gibi proteinlerin DNA helikaz aktivitesi nükleozomal DNA' nın boğumlanmış yapısını gevşeterek DNMT ve HDAC' ların ortama gelmesini kolaylaştırır (171) .

1.2.11.2 GENOM GÜVENLİĞİ VE YAPISAL BÜTÜNLÜĞÜNÜN KORUNMASI

5-MeC' nin memeli genomundaki dağılımı incelendiğinde, büyük çoğunluğunun genomda yaygın ve metile olduğu gözlenmektedir. Me-CpG' lerin çoğunun L1 elemanları, ALU elemanları gibi parazitik DNA dizilerinin (retrotranspozonlar) içinde yer aldıkları görülmüştür. Bu tekrarlayan diziler CpG' den zengindirler ve yaklaşık olarak genomun % 40' ını oluştururlar (44, 316). Retrotranspozonların ekspresyonu baskılamak için DNA metilasyonu bir savunma mekanizması gibi fonksiyon görür ve buna bağlı olarak transkripsiyonel ünitelerdeki tekrarlayan elemanların DNA' ya entegrasyonları engellenmiş olur (316). *DNMT1* geni için homozigot mutant olan embriyonik kök hücreleri sonradan transkribe edilmiş tekrarlayan elemanların hipometilasyonunu gösterirler (297). Aynı zamanda mutant embriyonik kök hücrelerinin ve normal embriyonik kök hücrelerinin mutasyon hızı oranları karşılaştırıldıklarında, mutant kök hücrelerinin mutasyon oranlarında on katlık bir artış olduğu gözlenir (40).

Tekrarlayan dizilerin azalmış metilasyonunun kromozomal instabiliteye neden olduğu bilinmektedir. Örneğin perisentromik heterokromatin, normal şartlar altında, yüksek oranda metillenmiş durumdadır; bu durumun, kromozom konformasyonunu koruduğu ve anormal rekombinasyonu önlemede önemli olduğu düşünülmektedir. Sentromerik heterokromatinin hipometilasyonu, izokromozomlar, translokasyonlar ve delesyonlar gibi kromozomal bozuklukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (70). Burada DNA metilasyonunun görevi, rekombinasyon başlama bölgelerinin bloke

etmek veya kromatin yapısının yoğunlaştırarak homolog rekombinasyonu bastırmak olduğu düşünülmektedir (81).

Metilasyon kanserin erken teşhisi, sınıflandırılması, prognozu ve tedavisi ile ilgili olarak önemli bilgiler verdiği için, kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir.

1.2.12 METİLASYON VE KANSER

Tümör hücreleri normal hücrelerle karşılaştırıldıklarında, DNA metilasyon desenlerinde büyük değişikliğe uğradıkları gözlenmektedir. Tümör hücrelerinde hipometilasyon çoğunlukla SINEs (*short interspersed nuclear elements*) ve LINEs (*long interspersed nuclear elements*) gibi tekrarlayan DNA dizilerinde, hipermetilasyon ise CpG adalarında görülmektedir (216). Metilasyona bağlı tümör gelişimi genom genelindeki hipometilasyon, CpG adalarının hipermetilasyonu ile tümör süpresör genlerin inaktivasyonu, ve CpG dinükleotitlerindeki mutasyonlar olmak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleşir.

1.2.12.1 GENOM GENELİNDEKİ HİPOMETİLASYON

Tümörlerin geniş bir çeşitliliğinde gözlemlenen hipometilasyonun çoğunluğu satellit dizilerde veya sentromerik bölgelerde lokalize olan tekrarlayan elemanlarda (SINEs ve LINEs) meydana gelir (70). LINEs, genomda bulunan kararsız DNA'ların çoğu veya retrotranspozonlardır. Kararsız DNA'ların hipometilasyonu transkripsiyonel aktivasyona neden olmakta ve mesane kanseri gibi pek çok kanser çeşidinde ortaya çıkmaktadır (1). Hipometile olma durumu kromozomal instabilite, transpozabl elemanların reaktivasyonu ve imprinting kaybı yolları ile kansere neden olmaktadır.

Genom genelindeki hipometilasyon hemen her insan tümörünü açıklamaktadır (82). Örneğin; metastatik karaciğer kanseri, servikal kanser, prostat tümörleri gibi solid tümörlerde, B-hücreli kronik lenfositik lösemi gibi hematolojik tümörlerde bile hipometilasyon yaygındır (70). Kromozom 1 ve 16 üzerindeki perisentrik heterokromatin bölgeleri, bağışıklık sistemi eksikliği olan ve sentromerik instabiliteye sahip olan hastalarda ve pek çok kanserde hipometillenmiş durumdadırlar (218).

1.2.12.2 TÜMÖR SÜPRESÖR GEN HİPERMETİLYASYONU

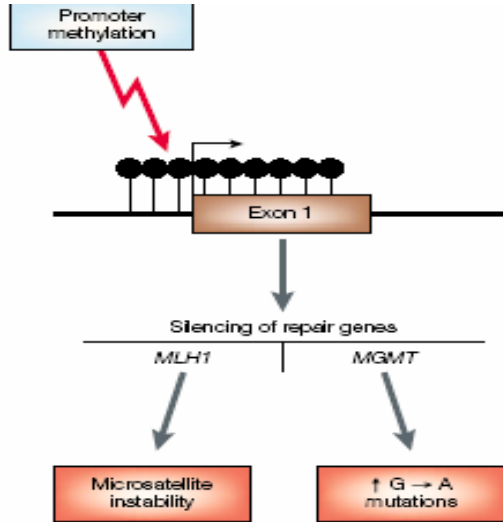
CpG adaları memeli genomunu oluşturan genlerin promoter bölgelerinde metillenmemiş halde bulunurlar; bununla birlikte, kanser hücrelerinde promoter bölgelerinin hipermetilasyonu tümörlerde en fazla gözlenen epigenetik değişikliklerdir (Şekil 7). Metilasyona bağlı olarak promoter bölgenin transkripsiyonel susturulması kanser gelişimi ile ilişkilidir (146).

Knudson'ın iki alelik hedef (= double hit) hipotezine göre, bir tümör süpresör geninin ekspresyon kaybına bağlı olarak ortaya çıkan tümör ancak o genin her iki alelinin de inaktive olması sonucu gözlenebilir (160). Yapılan birçok çalışmada eşey hücrelerinde kalıtılan ilk mutasyondan sonra ikinci alelin susturulmasında en önemli mekanizmalardan birinin metilasyon olduğu gösterilmiştir. Mutasyonlu alelin promoter bölgesinde herhangi bir değişiklik olmazken, sağlam alelde metilasyon sonucu inaktivasyon meydana gelmektedir. Tümörlerde tümör süpresör genin bir aleli hipermetillendiğinde, genin diğer alelinin mutasyonlu olduğu durumlar sıklıkla gözlenmektedir.

Promoter bölge hipermetilasyonuna bağlı olarak susturulan ve böylece kanserlere neden olan aday tümör süpresör genlerinin büyüyen bir listesi

bulunmaktadır. Bu genler, önemli bir DNA tamir geni kodlayan O⁶-metilguanin- DNA metiltransferaz (*MGMT*), bir hücre döngüsü regülatörü siklin- bağımlı kinaz inhibitörü 2B (*CDKN2B*) olan p15 ve fonksiyonu bilinmeyen bir proteini kodlayan RAS onkogenine bağlanabilen *RASSF1A*' yı içermektedir. Tümör süpresör grubunda önemli yerleri bulunan bu genlerin susturulmaları sonucunda, örneğin DNA hasarının tamiri uygun olarak yapılamayacağı için, mutasyonlar ortaya çıkacaktır. Örneğin, *MGMT* geninin promoter bölge hipermetilasyonu, aktif bir enzimin sentezlenmesini engeller. Bu durumda *MGMT*, DNA tamir enzimi olarak görevini yerine getiremez ve genomda tamir edilemeyen mutasyonlar artar. Bunlar genellikle G→ A değişimine neden olan mutasyonlardır. *MGMT* geni kolon, karaciger ve lenfoid tümörlerinde promoter bölge hipermetilasyonuna bağlı olarak susturulmuştur. Susturulmuş *MGMT* alellerini içeren tümörlerde, *K-RAS* ve tümör protein p53 (*TP53*) gibi anahtar genlerin de mutasyonlardan etkilenmiş oldukları görülmüştür (71).

Yukarıda bahsettiğimiz ve Şekil 8' de de gösterilen *MGMT* genine ek olarak non-polipozis kolon kanserlerinin oluşumunda rol oynayan *MLH1* geni de örnek olarak verilebilir. *MLH1*, bir yanlış eşleşme (mismatch) tamir genidir ve mikrosatellit instabilitesi olan sporadik tümörlerde genellikle metillenmeye bağlı olarak susturulmuştur (205).

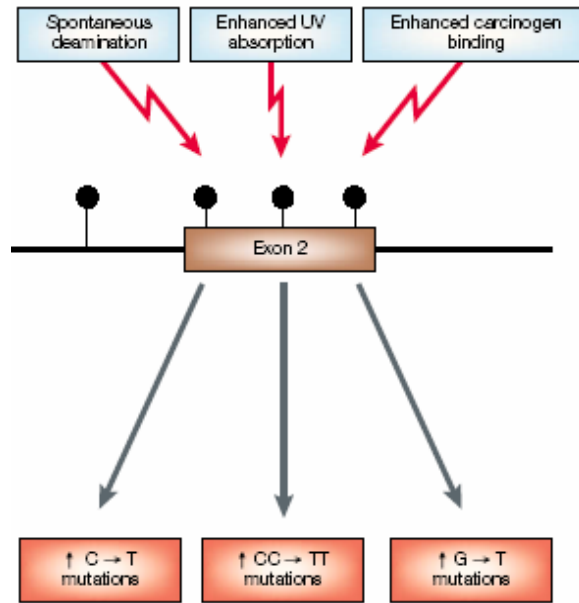


Şekil 8: *MLH1* ve *MGMT* gibi DNA tamir genlerinin promoter bölgelerindeki CpG adalarının hipermetilasyonu genlerin inaktivasyonuna neden olabilir. *MLH1*' in promoter bölgesindeki hipermetilasyon mikrosatellit instabiliteye, *MGMT* geninin promoter bölgesindeki hipermetilasyon ise G → A mutasyonlarının artmasına neden olur (222).

Ailesel tip kanser oluşturan genlerin sporadik formlarının %50' sinin hipermetilasyona bağlı olarak susturulmuş olmalarından dolayı geliştikleri gösterilmiştir. Von-Hippel Lindau sendromu (*VHL*), *BRCA1* ve serin/treonin kinaz 11 (*STK11*) bu genlerin bazılarıdır (74, 124).

1.2.12.3 CpG DİNÜKLEOTİDLERİNDEKİ MUTASYONLAR

Bir genin kodlayan bölgesi içinde kalan sitozinin metillenmesi sonucunda da mutasyon oluşabilir; çünkü metile sitozinin kendisi de mutajeniktir ve Şekil 9' da gösterildiği gibi spontan hidrolitik deaminasyonu ile C → T transisyonu ortaya çıkabilir ve mutasyon gelişebilir (71). Somatik hücrelerdeki *TP53* tümör süpresör geninin kodlayan bölgesindeki nokta mutasyonlarının % 50' si metillenmiş sitozinlerden kaynaklanır.



Şekil 9: Genlerin kodlayan bölgelerindeki sitozin metillenmesi mutasyon oranını artırabilir. Çünkü spontan hidrolitik deaminasyonu ile C→T transisyonu ortaya çıkabilir ve metile CpG adalarında mutasyon gelişebilir. Metillenmiş sitozinlerin dalga boyu değişip CC→TT mutasyonları gelişebilir ve deri kanserine neden olabilir. Metillenmiş sitozinlere sigara dumanında bulunan benzo(a) pyrene diol epoxide ve başka karsinojenler daha sık bağlanırlar ve G→ T değişimi sonucunda mutasyonlar gelişir. *MLH1: mutL homologue 1*, *MGMT: O6- mehylguanine-DNA methyltransferase* (222).

TP53 geninin kodlayan bölgesindeki CpG dinükleotidindeki metil grubunun varlığı, cilt kanserinin gelişimi esnasında ultraviyole ışığı (UV) vasıtasıyla oluşan mutasyonların oranını arttırmaktadır (224). Metillenmiş sitozinin soğurduğu dalga boyu değişir ve güneş ışığı aralığına kayar, CC→ TT mutasyonları gelişebilir ve deri kanserine neden olabilir (Şekil 9).

Metillenmiş sitozinlere sigara dumanında bulunan benzo(a) pyrene diol epoxide ve başka karsinojenler daha sık bağlanırlar, DNA bileşikleri oluşur ve G→ T değişimi sonucunda mutasyonlar gelişir (216).

Kısacası, kanserde metilasyon değişiklikleri transkripsiyonel susturulma ve anahtar genlerin fonksiyonlarının kaybı ile ilişkilidir; ayrıca, mutasyon gelişimden de birebir sorumlu olabilir.

DNA hipermetilasyonu, prostat kanseri dahil birçok kanserde meydana gelen en yaygın ve en iyi karakterize edilen epigenetik değişikliklerdir (216).

1.2.13 PROSTAT KANSERİNDE HİPERMETİLASYON

Epigenetik mekanizmalar sonucu tümör süpresör genlerinin inaktivasyonu, prostat kanserinin oluşumuna neden olmaktadır. Prostat kanserinde epigenetik mekanizma ile susturulmuş olan genler Tablo 5 ve 6' da gösterilmektedirler. Bunların belirlenmeleri prostat kanserinin tanısı için yararlı olduklarından iyi birer moleküler belirteçlerdir.

Ras onkogenine bağlanabilen RASSF1A (*ras-association domain family 1A, RASSF1A*), Hüresel Retinol Bağlayıcı Protein (*cellular retinol binding protein 1, CRBP1*), Adenomatöz Polipozis Coli (*adenomatous polyposis coli ,APC*) ve Retinoik Asit Reseptörü (*retinoic acid receptor β 2, RAR β 2*) gibi genlerin neoplastik ve iyi huylu hücreler arasındaki metilasyon seviyelerindeki farklılıklar dikkat çekicidir (140, 141). Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, genlerin hipermetilasyonu morfolojik değişikliklerden önce meydana gelebilmektedir. Ayrıca, prostat ve kolon kanserleri ile ilişkili bazı genlerin hipermetilasyonunun yaş ile ilişkili olduğu savunulmaktadır (133).

Tablo 5: Prostat Kanserinde %50' den Yüksek Sıklıkta Metillenen Genler		
Gen	Evre	Referans
Kanserojen Metabolizması		
<i>GSTP1</i>	HGPIN, primer & metastatik	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004c, Kang <i>et al.</i> 2004, Lin <i>et al.</i> 2001b, Maruyama <i>et al.</i> 2002, Singal <i>et al.</i> 2004, Woodson <i>et al.</i> 2004a, Yamanaka <i>et al.</i> 2003, Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
Tümör Gelişiminde Negatif Regülatör		
<i>SI00A2</i> ^b	HGPIN, primer & metastatik	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004c, Rehman <i>et al.</i> 2005)
<i>APC</i> ^a	HGPIN, primer & metastatik	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004c, Kang <i>et al.</i> 2004, Maruyama <i>et al.</i> 2002, Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
Steroid Hormon Reseptörleri		
<i>ERαA</i> ^b	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Li <i>et al.</i> 2000, Sasaki <i>et al.</i> 2002)
<i>ERαB</i>	Primer	(Sasaki <i>et al.</i> 2002)
<i>ERβ</i>	Primer, metastazda azalan sıklık	(Nojima <i>et al.</i> 2001, Sasaki <i>et al.</i> 2002, Zhu <i>et al.</i> 2004)
<i>RARβ2</i>	HGPIN, Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004b, Maruyama <i>et al.</i> 2002, Nakayama <i>et al.</i> 2001, Singal <i>et al.</i> 2004, Woodson <i>et al.</i> 2004b, Yamanaka <i>et al.</i> 2003)
'Scaffolding' Protein		
<i>Caveolin-1</i> ^a	Primer	(Cui <i>et al.</i> 2001, Woodson <i>et al.</i> 2004a)
Hücre Adhezyonu		
CD44	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Kito <i>et al.</i> 2001, Lou <i>et al.</i> 1999, Singal <i>et al.</i> 2004, Verkaik <i>et al.</i> 2000, Woodson <i>et al.</i> 2004a, Woodson <i>et al.</i> 2003, Woodson <i>et al.</i> 2004b)
<i>TIG1</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Zhang <i>et al.</i> 2004)
<i>PTGS2</i>	HGPIN, Primer & metastatik	(Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
Hücre Büyümesi /Çoğalması		
<i>MDR1</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Enokida <i>et al.</i> 2004, Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
<i>RASSF1A</i> ^b	HGPIN, primer & metastatik	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004c, Kang <i>et al.</i> 2004, Kuzmin <i>et al.</i> 2002, Maruyama <i>et al.</i> 2002, Singal <i>et al.</i> 2004, Woodson <i>et al.</i> 2004a, Woodson <i>et al.</i> 2004b, Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
<i>ZNF185</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Vanaja <i>et al.</i> 2003)
<i>NTRK2</i>	Primer	(Yamada <i>et al.</i> 2004)
<i>HIN-1</i>	Primer & metastatik	(Krop <i>et al.</i> 2004, Shigematsu <i>et al.</i> 2005)
<i>14-3-3σ</i>	Primer	(Lodygin <i>et al.</i> 2004, Mhaweche <i>et al.</i> 2005)
<i>hSPRY2</i>	Primer	(McKie <i>et al.</i> 2005)
Normal Gelişim		
<i>EDNRB</i> ^{a,b}	Primer, metastatik	(Jeronimo <i>et al.</i> 2003, Nelson <i>et al.</i> 1997, Singal <i>et al.</i> 2004, Woodson <i>et al.</i> 2004a, Woodson <i>et al.</i> 2004b, Yegnasubramanian
Apoptoz		
<i>RTVP1/GLIPR</i>	Primer	(Ren <i>et al.</i> 2004)
<i>CRBP1</i>	HGPIN, primer	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004a, Jeronimo <i>et al.</i> 2004c)
<i>DcR1/TRAILR3</i>	Bilinmiyor	(Shivapurkar <i>et al.</i> 2004)

Tablo 6: Prostat Kanserinde %50' den Düşük Sıklıkta Metillen Genler		
Gen	Evre	Referans
Tümör Gelişiminde Negatif Regülatör		
<i>TIMP3</i> ^{a,b}	HGPIN, primer & metastatik	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004c, Yamanaka <i>et al.</i> 2003, Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
<i>SI00A6</i>	Primer & metastatik	(Rehman <i>et al.</i> 2005)
Hücre Adhezyonu		
<i>E-cad/CDH-1</i> ^a	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Kang <i>et al.</i> 2004, Li <i>et al.</i> 2001, Maruyama <i>et al.</i> 2002, Singal <i>et al.</i> 2004, Woodson <i>et al.</i> 2003, Woodson <i>et al.</i> 2004b, Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
<i>TSLC1/BL2/IGSF4</i>	Primer	(Fukuhara <i>et al.</i> 2002)
<i>LAM-A3, B3 & C3</i>	Primer & metastatik	(Sathyanarayana <i>et al.</i> 2003)
Hücre Büyümesi		
<i>NEP</i> ^c	Primer	(Osman <i>et al.</i> 2004, Usmani <i>et al.</i> 2000)
<i>CDH13</i>	Primer & metastatik	(Maruyama <i>et al.</i> 2002)
Apoptoz		
<i>FHIT</i>	Primer & metastatik	(Maruyama <i>et al.</i> 2002)
<i>DAPK</i>	Primer & metastatik	(Kang <i>et al.</i> 2004, Maruyama <i>et al.</i> 2002, Yamanaka <i>et al.</i> 2003)
<i>DcR2/TRAIL-R4</i>	Bilinmiyor	(Shivapurkar <i>et al.</i> 2004)
Hücre Döngüsü Kontrolü		
<i>Cyclin D2</i>	Primer	(Padar <i>et al.</i> 2003)
<i>COX2</i>	Primer	(Kang <i>et al.</i> 2004)
<i>p27/KIP1</i>	Primer, metastatik	(Kibel <i>et al.</i> 2001, Konishi <i>et al.</i> 2002a)
<i>p14</i> ^b	Primer	(Kang <i>et al.</i> 2004)
<i>p16/CDKN2/INK4A</i> ^{a,b}	HGPIN, primer & metastatik	(Jarrard <i>et al.</i> 1997, Jeronimo <i>et al.</i> 2004c, Kang <i>et al.</i> 2004, Konishi <i>et al.</i> 2002b, Maruyama <i>et al.</i> 2002, Yegnasubramanian <i>et al.</i> 2004)
Anjiyogenez		
<i>THBS1</i>	Primer	(153 <i>et al.</i> 2004)
Steroid Hormon Reseptörleri		
<i>AR</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık	(Jarrard <i>et al.</i> 1998, Kinoshita <i>et al.</i> 2000, 205 <i>et al.</i> 2000, Sasaki <i>et al.</i> 2002, Yamanaka <i>et al.</i> 2003)
DNA Tamiri		
<i>MGMT</i> ^b	HGPIN, primer & metastatik	(Jeronimo <i>et al.</i> 2004c, 153 <i>et al.</i> 2004, Konishi <i>et al.</i> 2002a, 190 <i>et al.</i> 2002, Yamanaka <i>et al.</i> 2003, 315 <i>et al.</i> 2004)
Transkripsiyonel Düzenleme		
<i>RUNX3/AML2</i>	HGPIN, primer	(153 <i>et al.</i> 2004)

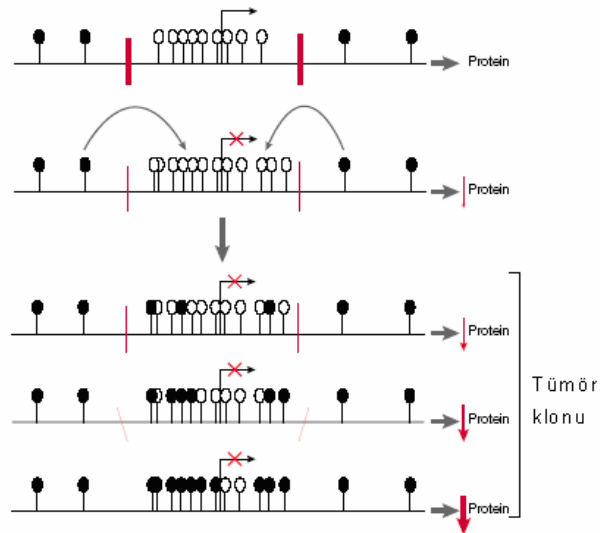
Primer prostat kanseri sadece organa sınırlı değil ilerlemiş tümörleri de gösterir.

^a Bu genler için farklı metilasyon sıklıkları rapor edilmiştir ve farklı CpG adalarının analizini yansıtır.

^b Bu genlerin metilasyonu iyi ve kötü huylu tümörlerde aynı sıklıklarda meydana gelir.

^c Metilasyon sadece gen ifadesinin kaybı ile ilişkili örneklerde değerlendirilir.

Promoter bölge hipermetilasyonu, birçok insan tümöründe karsinogenezin ilk olgusudur. Prostat kanserinin ilerlemesinde birçok metillenmiş gen etkilidir: *GSTP1*, *APC*, *RASSF1A*, *RARβ2*, *CRBP1*, Metalloproteinaz Doku İnhibitörü 3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 3*, *TIMP3*), O^6 - Metilguanin DNA Metiltransferaz (*MGMT*) ve Prostaglandin Endoperoksidaz Sentez 2 (*prostaglandin endoperoxidase synthase 2*, *PTGS2*) gibi. Bu gibi genlerin metilasyon sıklıkları prostat kanserinin ön aşamalarında, yani daha büyük bir tümör kitlesi oluşmadan, metaplazi ve displazi aşamalarında saptanabilir. HGPIN ve hastalığın gelişme evresi arttıkça metilasyon sıklığının da yavaş yavaş arttığı gözlenmektedir (141, 153, 190) (Şekil 10).



Şekil 10: Bir gende meydana gelen epigenetik değişiklikler ile oluşan gen susturulmasında, tümör gelişiminin erken fazında transkripsiyon seviyesinin azalması ile yavaş yavaş başlar ve protein ürününün minor bir azalmasına neden olur. Bu azalan transkripsiyon, CpG adalarının içine yayılan metilasyon ve komşu heterokromatinin (sağ ve soldaki siyah köşeli iki ok) dolayı CpG adalarının korunmasında bir azalma gözlenir (kırmızı dikey oklar). Bu azalma CpG adalarının metilasyonunda aşamalı artışlar ile sonuçlanır. Böylece farklı hücrelerde aynı gen kopyaları arasında değişiklikler gözlenebilir ve bir tümör klonunda farklı düzeylerde protein üreten hücreler bulunur (222).

Epigenetik gen susturulmasında, önce genin transkripsiyon düzeyinde hafif bir azalma olur ve protein oluşumunda da buna bağlı olarak hafif bir azalma gözlenir. Transkripsiyondaki azalma CpG adaların korunmasındaki azalmayı yanında getirerek, yayılmış veya komşu heterokromatindeki CpG adalarının etkileri sonucunda metilasyonun gerçekleşmesine neden olur. Metilasyon gradiyal olarak artar; böylelikle, gelişen bir tümör klonunda farklı düzeylerde metillenmiş promoter bölgeye sahip ve farklı düzeylerde protein üreten hücreler bulunur ve tümör heterojen bir karakter kazanır. Bu durum, farklı karakterlerdeki hücrelerin oluşmasına neden olur; örneğin, metastatik hücrelerin oluşması gibi. Genetik gen susturulmasında, gende bir mutasyon gelişir ve buna bağlı olarak ta fonksiyonel bir protein üretilemez. Eğer bu mutasyon seçici bir üstünlüğe sahip ise ve kanser gelişimine neden oluyorsa, her hücre bölünmesinden sonra yeni oluşacak olan hücrelere aktarılacaktır ve yine fonksiyonel protein üretimini engelleyecektir. Sonuçta genetik gen susturulmasında klonalite gözlenirken, epigenetik gen susturulmasında heterojenite gözlenir.

Günümüzde, prostat kanserinde sıklıkla metillenmiş olarak karşımıza çıkan gen *GSTP1*' dir. *GSTP1* metilasyonu tümöre özgüdür; hem yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi (*High grade prostatic intraepithelial neoplasia*, HGPIN) lezyonlarında, hem de prostat tümörlerinde çok yaygındır ve kanseri erken safhada ortaya çıkarmak için önemli bir belirteçtir.

Prostat kanserinde GST π enziminin ifade kaybı sık görülen bir bulgudur ve *GSTP1*' in susturulması doğrudan promoter bölge hipermetilasyonu ile ilişkilidir (120, 141, 142, [170](#), [171](#)). GST π potensiyel karsinojenlerin detoksifikasyonu ve konjugasyonunda görev alır ve bu şekilde

koruyucu aktiviteye sahiptir (116). *GSTP1*' in hipermetilasyon sonucu inaktive olması, olguların karsinojenlere karşı hassasiyetini artırır ve böylece başka mutasyonlara ve DNA hasarına yatkınlık kazandırır (170, 171).

GSTP1 metilasyonu prostat kanserinin % 90' ında, prostat kanserinin öncü evresi HGPIN' in % 50 - 70' inde ve prostat intraepitelyal atrofi (PIA) lezyonlarının % 6' sında saptanmıştır (15, 62, 205, 310). *GSTP1* ekspresyonunun yükselmesi PIA' nın özelliği olmasına rağmen, PIA lezyonlarında *GSTP1* aktivite kaybı HGPIN' e ve /veya adenokarsinoma dönüşmesine neden olabilir (56, 213). *GSTP1*' in promoter bölgesindeki farklı CpG adalarındaki metilasyon sıklığının hastalığın ilerlemesi süresince arttığı gözlenmiştir (205).

GSTP1 promoter bölge hipermetilasyonu iyi bir prostat kanseri belirteçidir; çünkü, kansersiz prostat dokularında metilasyon seyrek gözlenmektedir (29, 172, [197](#)). *GSTP1* hipermetilasyonu birçok meme ve karaciğer kanserinde teşhis edilmesine rağmen, yine ürogenital sistem tümörlerinden, mesane ve böbrek kanserlerinde daha az sıklıkta teşhis edilmektedir (71, 72).

Tümör DNA' sının kanser hastalarının vücut sıvılarında saptanabilmesinden beri, *GSTP1* hipermetilasyonu önemli bir araştırma parametresi olmuştur. İdrar, plazma ve serum gibi çeşitli vücut sıvılarında var olan ekstrasellüler DNA' daki gen metilasyonunun gösterilmesi ile daha az invazif bir yöntem olarak kullanılabilir hale gelmiştir (30, 93, 141). Prostat kanserinde *GSTP1* hipermetilasyonun belirlenmesinde kullanılan örneklerdeki özgüllük ve duyarlılıkları Tablo 7' de gösterilmiştir.

Tablo 7: Prostat Kanserinde *GSTP1* Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Örneklerin Özgüllük ve Duyarlılıkları

Gen	Örnek Tipi	Özgüllük %	Duyarlılık %	Referans
<i>GSTP1</i>	Biyopsi	75-100	75-100	Chu <i>et al.</i> 2002 Goessl <i>et al.</i> 2002 Jeronimo <i>et al.</i> 2002 Tokumar <i>et al.</i> 2004 Zhou <i>et al.</i> 2004 Harden <i>et al.</i> 2003
	İdrar	82-100	18.8-76	Jeronimo <i>et al.</i> 2002 Gonzalogo <i>et al.</i> 2003
	Plazma/serum	100	13-72	Jeronimo <i>et al.</i> 2002 Goessl <i>et al.</i> 2002
	Ejakulat	100	50	Goessl <i>et al.</i> 2001

Goessl ve arkadaşları, kantitatif olmayan MSP metodunu kullanarak prostat kanserli hastaların plazma veya serum örneklerinin % 72' sinde, ejakulatın % 50' sinde ve idrar örneklerinin % 36' sında *GSTP1* hipermetilasyonunu saptamışlardır; ancak, iyi huylu prostatik hiperplazi' li hastaların vücut sıvılarında metilasyon saptanamamıştır (93). Bu da gösteriyor ki, tümör dokusu için oldukça özgül olan bu metilasyon durumu, hastaların plazma veya serum örneklerinde yüksek oranda saptanabilmektedir (141, 142). Son yapılan çalışmalarda, plazmadaki *GSTP1* metilasyon seviyesinin idrar örneğindeki metilasyona göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Serbest tümör DNA' sının, periferik kanda prostat kanal sistemine göre daha fazla bulunuşu, kanserli hücrelerin buldukları bölgelerden kan ya da lenf damarları yoluyla bedenin başka bölgelerine taşınmaları ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Prostat kanserinin belirlenmesi için *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonunun rolü sadece vücut sıvıları ile sınırlı değildir. Doku örnekleri ile yapılan bir çalışmada 16 farklı genin metilasyon seviyeleri ve

GSTP1, *APC*, *RASSF1A*, *PTGS2* ve *MDR1* genlerinin çeşitli kombinasyonları çalışılmış ve % 100' e yaklaşan duyarlılık ile % 92' den fazla özgüllüğe sahip iyi huylu prostat dokusundan prostat kanseri ayırt edilebilmiştir (315).

Metilasyon bakışının kanser çalışmalarındaki önemi giderek artmaktadır; çünkü, non-invazif yöntemler ile kolay saptanabilen hipermetile genler, *in vitro* olarak yeniden aktive edilebilmektedirler.

1.2.13.1 DNA Metilasyonunun Kaldırılması İle ilgili yeni Tedavi Stratejileri

Epigenetik değişikliklerin gen ifadesinde değişikliğe neden oldukları bilindiğinden beri, DNA metilasyonunun kaldırılması ile durumu eskisine çevirmeye dayalı değişik tedavi yolları aranmaktadır. Yakından ilişkili olan iki ilaç, 5-azacytidine (5-aza-C) and 5-aza-2'deoxyctidine (5-aza-dC / Decitabine), *in vitro* şartlarda susturulan çeşitli genlerin reaktivasyonunu sağlamak için kullanılmaktadırlar (181, 205).

5- aza-C ve 5-aza-CdR sitozin analoglarıdır; DNMT1 aktivite yokluğunda DNA' nın sentezine neden olurlar ve DNA' nın demetilasyonuna yol açarlar (79, 281). Bu ilaçların kullanımı, demetilasyonun bir sonucu olarak susturulmuş genlerin reaktivasyonlarını, kromatinin dekondeksasyonu ve hücrel farklılaşma gibi birçok değişikliklere neden olurlar (96).

Trichostatin A ve Butyrate gibi histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, metillenmiş genlerin ifadesini aktif hale getirmek için demetile ajanlar ile birlikte kullanılmaktadırlar (31). Kanser tedavisinde metile edici ilaçların klinik yararları, toksik etkileri nedeniyle sınırlıdır (150). Günümüzde, bu ajanlarla hematolojik kanserlerde (AML) klinik başarı sağlanabilmektedir (96).

Epigenetik ilaçlar Tablo 8' de gösterildiği gibi iki grup içerisinde sınıflandırılabilir.

Tablo 8 : Epigenetik Mekanizmalar Üzerinde Etkili Olan İlaçların Sınıflandırılması (134)

DNA Metiltransferaz İnhibitörleri

Nükleozid Analog İnhibitörleri

5-Azacytidine (5-aza-CR)

Decitabine (5-aza-CdR)

Zebularine

Non-Nükleozid Analog İnhibitörleri

Procainamide

Procaine

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

Antisense Oligonükleotidler

DNMT1 ASO

Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Hidroksamatlar

Trichostatin A

Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)

Siklitetrapeptidler

Depsipeptide

Apicidin

Alifatik asitler

Valproic acid

Phenyl butyrate

Benzamidler

MS – 275

CI – 994

Elektrofilik ketonlar

Trifluoromethyl ketones

α -Ketomides

DNMT, DNA metiltransferaz; HDAC, histon deasetilaz

1.2.13.2 METİLASYONUN ARAŞTIRILMASINDA KULLANILAN METOTLAR

Sitozin metilasyonunun gösterilmesi için birçok teknik geliştirilmiş ve özellikle DNA dizisindeki metile sitozinin (5-MeC) hızlı tanısına izin veren bisülfid reaksiyonuna bağlı metotlar geliştirilmiştir.

Bisülfid reaksiyonu, ilk kez 1970' li yılların başında tanımlanmış (115, 241) ve Frommer ve arkadaşları tarafından kullanılarak, DNA' daki sitozin ve 5- MeC arasındaki farkın ayırt edilmesi için kullanılmıştır (80).

Bu metotta, ilk olarak DNA sodyum bisülfid ile muamele edilir ve DNA' da sitozinler urasile dönüştürülür; ancak, 5-MeC' ler aynı, yani sitozin şeklinde kalırlar (Şekil 11). İncelenecek olan DNA dizisi, daha sonra bisülfid ile muamele edilmiş DNA için özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilir (43).

PCR

C → C

M → C

Bisülfid PCR

C → U → T

M → M → C

Şekil 11: Bisülfid muamelesinin sitozin ve 5'-MeC üzerindeki etkisi. Genomik DNA sodyum bisülfid ile etkileştirildiğinde, metillenmemiş sitozin urasil'e dönüşürken, metillenmiş sitozin 5'-MeC olarak kalır.

5-MeC' nin araştırılmasında ilk bisülfıt reaksiyonun uygulanmasından bu yana aynı prensibe dayanan Southern Blot (30) , Restriksiyon enzimi- PCR (43), bisülfıt DNA dizi analizi, metilasyona hassas tek nükleotid primer uzaması (*Methylation-sensitive single nucleotid primer extension*, Ms-SNuPE) (96), Restriksiyon belirteç genomik taraması (*Restriction landmark genomic screening*, RLGS), Diferansiyel metilasyon hibridizasyonu (*Differential methylation hybridization*, DMH), DNA chip ve metilasyon-spesifik PCR (Methylation specific PCR, MSP) (122) gibi birçok metot geliştirilmiştir.

1.2.13.2.1 SOUTHERN BLOT

Southern Blot, DNA metilasyon analizi için en sık kullanılan metotlardan biridir. Bu metotta, genomik DNA metilasyona hassas ve hassas olmayan *HpaII* ve *MspI* gibi endonükleazlarla kesilir. Potensiyel metillenmiş CpG adaları için hedef dizinin analizi, uygun restriksiyon enzimlerinin doğru seçimi ile sağlanır. Kesim sonrası oluşan fragmanlar agaroz jelde yürütölüp, membrana transfer edilirler ve hedef dizi için özel bir prob ile hibridize edilirler. Radyografi, hedef dizinin metilasyon bölgesinin belirlenmesini sağlayan, beklenen büyüklükteki bantların varlığını gösterir.

1.2.13.2.2 RESTRİKSİYON ENZİMİ- PCR

Genomik DNA metilasyona hassas ve hassas olmayan restriksiyon enzimleriyle kesilir ve kesilen DNA, hedef bölgeye özgül primerler kullanılarak amplifiye edilir. Metilasyona hassas bir endonükleaz kullanılmış, ve hedef dizi metillenmiş CpG bölgeleri içeriyorsa, beklenen büyüklükteki DNA' nın PCR ile amplifiye edilmesi mümkün olur. PCR' dan önce metilasyona hassas olmayan bir endonükleaz kullanılmış ve hedef dizi yine

metillenmiş CpG bölgeleri içeriyorsa, bu sefer beklenen büyüklükteki DNA'nın PCR ile amplifikasyonu gerçekleşemez. Bu metodun temel şartı; enzim kesim işleminin tamamlanmış olmasıdır. Diğer şartı ise, birçok metillenmiş ve metillenmemiş CpG bölgesi hedef bölgede yer alıyorsa, bulunan sonuçlar anlamsız çıkabilir. Bu teknik, bir hedef dizideki DNA metilasyonunun varlığının ilk şüphesinde yararlı olmaktadır.

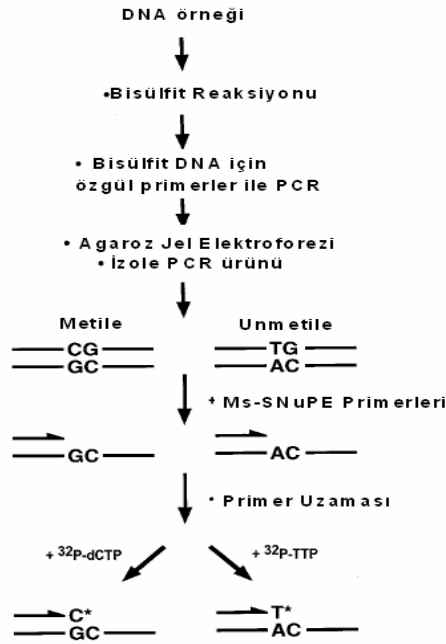
1.2.13.2.3 BİSÜLFİT DNA DİZİ ANALİZİ

Bisülfite DNA dizi analizi ilk kez 1992 yılında Frommer tarafından tanımlanmıştır. Bu teknik, yalnızca 5-MeC'lerin genomik DNA'da belirlenmesini sağlayan kusursuz bir yöntemdir. Bu metotta, diğer metotlarda olduğu gibi, sodyum bisülfite muamelesiyle DNA'daki metillenmiş sitozinler değişmezken, diğer tüm metillenmemiş sitozinler urasile dönüşürler. Modifiye DNA için özgül primerler kullanılır; tüm urasillerin timine dönüştüğü, sadece 5-MeC'lerin sitozin olarak kaldığı primerler seçilir. Amplifiye edilmiş kısımlar gerekli moleküllerin klonlanmasından sonra, dizi analizine tabi tutulurlar. Klonlama stratejisi aleller arasındaki metilasyon farklılığının analizi için yararlıdır (43). Bisülfite değişimi tamamlandığında, bunun doğruluğunu göstermek çok önemlidir; çünkü, metillenmiş CpG bölgesinin yakınındaki sitozinlerin bisülfite muamelesine dirençli olabildikleri rapor edilmiştir (113).

1.2.13.2.4 METİLYASYONA HASSAS TEK NÜKLEOTİD PRİMER UZAMASI (MS-SNuPE)

Tek nükleotid primer uzaması ilk kez 1991 yılında anormal alellerde mutasyonların belirlenmesinde Kuppaswamy tarafından kullanılmıştır. Gonzalvo ve Jones özgül CpG bölgelerindeki metilasyon farklılıklarının

belirlenmesi için bu metodu 1997 yılında modifiye etmişlerdir (Şekil 12) (98, 99).



Şekil 12: Metilasyona Hassas Tek Nükleotid Primer Uzaması metodu ile CpG adalarındaki metilasyon düzeyinin belirlenmesi

CpG adalarındaki metilasyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesini sağlayan hızlı bir metottur (96). Bisülfid muamelesinden sonra hedef DNA bölgesi özgül primerlerle amplifiye edilir ve amplifiye DNA sonuçları MS-SNuPE reaksiyonu için kullanılır. Pürifiye edilmiş amplifiye DNA, ya radyoaktif dCTP ya da dTTP ve DNA polimeraz ile inkübe edilir. Hedef bölge metillenmiş ise, bir sitozin nükleotid uzaması süresince; metillenmemişse, bir timin nükleotid uzaması süresince dahil edilir. İlişkili sitozin ve timinlerin toplam miktarı, hedef bölgenin metilasyon durumunun belirlenmesine izin verir.

1.2.13.2.5 RESTRİKSİYON BELİRTEÇ GENOMİK TARAMASI (RLGS)

DNA metilasyonunda CpG adalarındaki değişiklikleri genomun tamamında inceleme olanağı sağlayan metod iki boyutlu jel elektroforezidir. Genomik DNA, çoğunlukla CpG adalarında bulunan, CpG dizilerini tanıyan metilasyona hassas özgül restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra jel elektroforezinde yürütölür ve ortaya çıkan desen analiz edilir. Bu teknikle CpG adalarının çoğunun belirlenebilmesine rağmen, genlerin promoter bölgesinde olmayan CpG adalarının belirlenmesi de bir dezavantajdır.

1.2.13.2.6 DİFERANSİYEL METİLASYON HİBRİDİZASYONU (DMH)

DNA-chip temelli bir metottur; genomik DNA' nın önce metilasyona hassas olmayan bir enzimle, ardından da metilasyona hassas olan bir enzimle kesilmesine dayanır. Meydana gelen ürünler PCR ile amplifiye edilir ve ürünler yüzeye bağlanmış CpG adaları ile bir DNA-chip' i üzerine hibridize edilerek değerlendirilir.

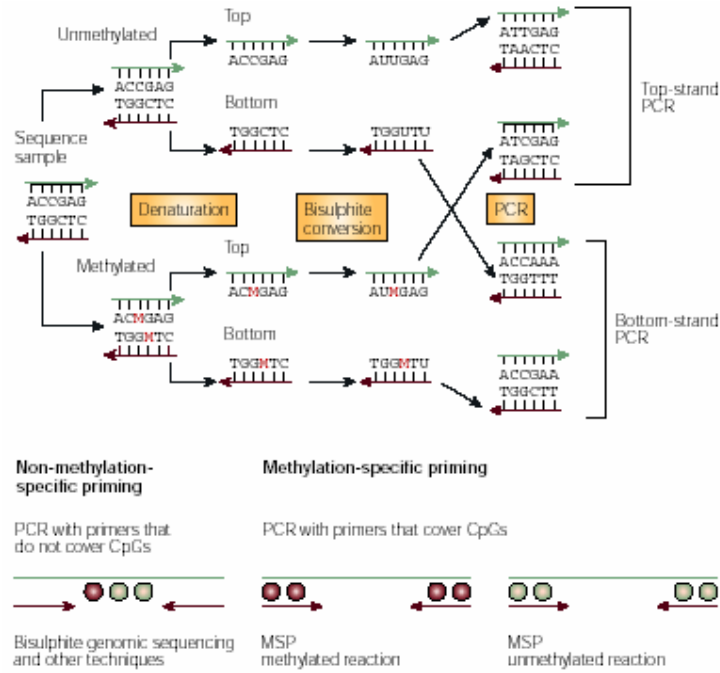
1.2.13.2.7 DNA-CHIP

Bu metotla hem histon deasetilasyonu, hem de promoter bölge hipermetilasyonunun inhibitörleri ile susturulmuş genlerin yeniden ifadesi, ve cDNA chip analizi sağlanır. Bu metodun avantajı, bu değişim ile etkilenen promoterler ve genlerin transkripsiyonel durumları ile hipermetilasyon bölgelerinin tespitinin ilişkili olmasıdır. Dezavantajı ise, hipermetillenen CpG adası ve ilişkili gen promoterinin genomik veri tabanlarında her zaman kolaylıkla belirlenememesidir.

1.2.13.2.8 METİLYASYON SPESİFİK PCR (MSP)

MSP ilk kez J.G. Herman tarafından tanımlanan yüksek duyarlılığa sahip bir metottür. Bu metotta, bisülfite muamelesinden sonra metillenmiş ve metillenmemiş DNA arasında var olan dizi farklılığından faydalanılır; bisülfite aşamasından sonra değişikliğe uğramış promoter bölgesinin amplifikasyonu için metilasyona özgü olan ve olmayan farklı primer çiftleri kullanılır (Şekil 13) (222).

MSP, DNA metilasyonunun varlığının analizi için niteleyici ve hızlı bir metottür.



Şekil 13: Bisülfite aşamasından sonra değişikliğe uğramış promoter bölgesinin amplifikasyonu için metilasyona özgü ve özgü olmayan primer çiftlerinin kullanımı.

BÖLÜM II

2.1 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.1 Kontrol ve Çalışma Grubu

Kontrol grubu, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan toplam 55 sağlıklı erkek olgudan oluşturuldu; yaş ortalamaları $55,13 \pm 6,89$ ' du.

Çalışma grubu, 2005 – 2006 yılları arasında, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı' na başvurup, klinik olarak prostat kanseri tanıları konmuş 50 olgudan oluşturuldu. Çalışma grubunu oluşturan 50 olgunun yaş ortalaması, $67,64 \pm 6,34$ olarak saptandı.

Buna göre, 55 sağlıklı birey ve 50 prostat kanserli olgudan oluşan iki grubun toplam yaş ortalaması $61,38 \pm 6,62$ ' di.

Çalışmaya katılan her olgu "Gönüllü Olur Formu" nu imzalayıp, çalışmaya katılmayı kabul etti. Ayrıca, her olgudan EDTA' lı tüplere 3' er ml olmak üzere toplam 4 tüp kan örneği alındı. Katılanlara tıbbi özgeçmişleri ile ilgili sorular soruldu ve bilgileri kaydedildi.

Çalışma protokolümüz Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 27. 09. 2005 tarihli ve 05 -9.1/14 sayılı kararı ile onaylandı.

2.1.2 *GSTP1* Ile105Val Gen Polimorfizminin Analizi

Araştırmadaki amacımıza uygun olarak seçilen kontrol ve çalışma grubu olgularının DNA' ları izole edildikten sonra, *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi analizi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi. PCR ürünü PCR sonrasında, istenmeyen yan ürünlerinden arındırıldı. Restriksiyon enzim kesimi sonrasında *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi için genotipleme aşamasına geçildi. Bu polimorfizm aynı zamanda LightCycler (LC) cihazı kullanılarak da analiz edildi.

2.1.2.1 *GSTP1* Ile105Val Gen Polimorfizmi Analizi Esnasında

Kullanılan Cihazlar (Tablo 9)

Tablo 9: Kullanılan Cihazlar

CİHAZ	MARKASI
Bio Doc Analyse Transiliminatör	Biometra (ABD)
Termal Cycler (PCR cihazı)	Techne Genius
LightCycler real-time PCR cihazı	Roche Applied Science
Yatay Jel Tankı ve Düzenegi	Biometra (ABD)
Derin Dondurucu (-20°C)	Uğur
Elektroforez Güç Kaynağı	Biometra (ABD)
Hassas Terazı	Stanton
İnkübatör	Eppendorf
Kuru Isı Bloğu	Eppendorf
Mikrodalga Fırını	Samsung
Otoklav	Aesculap
Otomatik Mikropipetler	Finnpipet (10, 20, 100, 200, 1000 µl)
Santrifüj	Heraus
Buzdolabı	Siemens
Thermocycler	Thermo

2.1.2.2 *GSTP1* Ile105Val Gen Polimorfizmi Analizi Esnasında

Kullanılan Kimyasal Maddeler (Tablo 10)

Tablo 10: Kimyasal maddeler

KİMYASAL MADDE	MARKASI
6x Mavi/Turuncu Yükleme Boyası	MBI Fermantas
Agaroz (Low EEO)	MBI Fermantas
dNTP Karışımı, 4X20mM	MBI Fermantas
EDTA	MBI Fermentas
Etanol	J.T. Baker
Glasiyal Asetik Asit	Merck
Isopropanol	Applichem
Millipore Agaroz	Applichem
Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 U/µl)	MBI Fermantas
Tris	MBI Fermentas

2.1.2.3 *GSTP1* Ile105Val Gen Polimorfizminin Analizi Esnasında

Kullanılan Hazır Kitler

2.1.2.3.1 DNA İzolasyonu Kiti

Kontrol ve çalışma grubu olgularının periferik kanından DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit' i (Roche Applied Science, Germany) kullanıldı.

High Pure PCR Template Preparation Kit İçeriği:

1. Bağlanma Çözeltisi (Binding Buffer) : 4 M urea, 200 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4, 25°C
2. Proteinaz K
3. İnhibitör Uzaklaştırıcı Çözelti (Inhibitor Removal Buffer): 5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6, 25°C (20 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı)
4. Yıkama Çözeltisi (Wash Buffer) : 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25°C (80 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı)
5. Elüsyon Çözeltisi (Elution Buffer) : 10 mM Tris, pH 8.5, 25°C
6. High Pure filtre tüpleri
7. Toplama (Collection) tüpleri

2.1.2.3.2 PCR Ürünleri Pürifikasyon Kit' i

PCR sonrası elde edilen PCR ürününden, istenmeyen yan ürünlerinin uzaklaştırılması için pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Bunun için, High Pure PCR Product Purification Kit' i (Roche Applied Science, Germany) kullanıldı.

High Pure PCR Product Purification Kit İçeriği

1. Bağlanma Çözeltisi (Binding Buffer) : 3M guaninidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, % 5 etanol (v/v), pH 6.6 (25°C)

2. Yıkama Çözeltisi (Wash Buffer) : 20 mM NaCl₂, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C) (40 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı)
3. Elüsyon Çözeltisi (Elution Buffer) : 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (25°C)
4. High Pure filtre tüpleri
5. Toplama (Collection) tüpleri

2.1.2.3.3 LightCycler Hibridizasyon Prob Kiti

GSTP1 geninin Ile105Val polimorfizmini LC ile saptamak için LightCycler Hibridizasyon Prob Kit' i kullanıldı.

LightCycler Hibridizasyon Prob Kit İçeriği

1. LightCycler DNA Master Hibridizasyon Probu (10X)
2. MgCl₂ (25mM)
3. H₂O: PCR derecesindeki saf su

2.1.2.4 *GSTP1* Ile105Val Gen Polimorfizminin Analizi Esnasında

Kullanılan Primerler

GSTP1 geninin PCR metodu ile amplifikasyonları için, genlere özgül primer dizileri seçildi ve sentez ettirildi (Interactiva, Germany).

2.1.2.4.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi Analizinde Kullanılan

Primer Çifti

GSTP1 geninin Ile105Val polimorfizmini saptamak için seçilen primer çifti ile 176 baz çiftlik (bç) bir DNA fragmanı amplifiye edildi.

***GSTP1* İleri Primer:** 5' – ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA –3'

***GSTP1* Geri Primer:** 5' – TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT –3'

Liyofilize halde ve 0.02 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan *GSTP1* ileri primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 232 µl; *GSTP1* geri primeri ise 225 µl, PCR için uygun saflıktaki

steril distile su eklenerek çözüldü ve 50 µl' lik eşit hacimler halinde -20°C' de muhafaza edildi.

2.1.2.4.2 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi Analizinde LC için

Kullanılan Primer Çifti

GSTP1 geninin Ile105Val polimorfizmini LC ile saptamak için seçilen primer ve prob çiftleri;

GSTP1 İleri Primer: 5' – ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA –3'

GSTP1 Geri Primer: 5' – TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT –3'

GSTP1 LC Red 640 probu: 5' – TGTGAGCATCTGCACCAGGGTTGGGC–3'

GSTP1 Floresan probu: 5' – TGCAAATACATCTCCCTCATCTACACCAAC –3'

Liyofilize halde ve 0.02 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan *GSTP1* ileri primeri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 50 µl; *GSTP1* geri primeri ise 50 µl, *GSTP1* floresan probu, 20 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 50 µl; *GSTP1* LC Red 640 probu ise 49 µl PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözüldü ve 50 µl' lik eşit hacimler halinde -20°C' de muhafaza edildi.

→İleri primer

5' ACCCCAGGGCTCTATGGGAAAGGACCAGCAGGAGGCAGCCCTGGTGGACATGGTGA
ATGACGGCGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATACATCTCCCTCATCTACACCAACTATG

→ Floresan probu

TGAGCATCTGCACCAGGGTTGGGC ACTGGGGGCTGAACAAAGAAAGGGGCTTCTTGT
LC Red 640 probu

GCCCTCA 3'

Geri primer ←

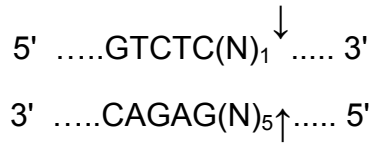
2.1.2.5 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi Analizi Esnasında

Kullanılan Restriksiyon Enzimi

GSTP1 geninin polimorfizm analizinde enzim kesimi aşaması için, *Acinetobacter Iwoffii* bakterisinden elde edilen *Alw26I* (*BsmAI*) restriksiyon enzimi seçildi.

Alw26I enzimi, toplam 5000 U ve 10 U/μl konsantrasyonda olacak şekilde temin edildi. *Alw26I* ile birlikte, 1 ml 10x Tampon G [33 mM Tris-asetate (pH 7.9), 10 mM Magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/ml BSA] da bulunmaktaydı.

Alw26I restriksiyon enziminin tanıma bölgesi aşağıda gösterilmektedir:



2.1.2.6 *GSTP1* Ile105Val Gen Polimorfizminin Analizi Esnasında

Kullanılan Belirteç DNA

GSTP1 geninin PCR amplifikasyonu sonunda elde edilen ürünün büyüklük kontrolü için GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Germany) belirteç DNA olarak kullanıldı.

Polimorfizm analizi için, PCR ürününün restriksiyon enzim kesimi sonrasında elde edilen DNA fragmanlarının büyüklük saptanmasında yine aynı belirteç DNA' sı kullanıldı.

2.1.3 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi için Çalışma Protokolü

2.1.3.1 Kandan DNA İzolasyonu Aşaması

GSTP1 Ile105Val polimorfizm tayinindeki ilk aşama, periferik kandan cam lifli filtreye nükleik asit bağlama metoduna göre gerçekleştirilen DNA

izolasyonudur. Çalışmalar, ticari olarak satılan DNA izolasyonu kiti protokolüne göre gerçekleştirildi.

Protokol, aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. EDTA' lı tüplere alınan kandan 200 µl alınıp, üzerine 200 µl bağlanma çözeltisi ve 40 µl Proteinaz K ilave edilir; pipetle resüspanse edilerek homojenizasyon sağlanır.
2. Tüpler, önceden 72°C' ye ayarlanan kuru ısı bloğunda 10 dakika inkübasyona bırakılır.
3. İnkübasyon sonunda, karışım üzerine 100 µl izopropanol eklenir ve pipetaj ile iyice karıştırılır.
4. Eppendorf tüp içinde bulunan örneğin tamamı, 'collection' tüp içine yerleştirilmiş filtreli tüpün içine pipetlenir.
5. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonrasında filtreli kısım yeni bir 'collection' tüpüne aktarılır.
7. Filtreli tüpün üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı çözeltisi eklenir.
8. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Santrifüj sonrasında filtreli kısım yeni bir 'collection' tüpüne aktarılır.
10. 500 µl yıkama çözeltisi eklenerek, 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Filtreli tüpler yeni collection tüplere aktarılır ve üzerlerine ikinci kez 500 µl yıkama çözeltisi eklenir.
12. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
13. Santrifüj bittikten sonra, tüplerin alt kısmında biriken süpernatant uzaklaştırılır ve tekrar 8.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edilir.

14. Filtreli tüpler, temiz birer Eppendorf tüpün içine yerleştirilir ve 72°C' ye ayarlanmış kuru ısı bloğunda ısıtılmış olan elüsyon çözeltisinden 200 µl ilave edilerek 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.

15. Santrifüj sonrasında filtreli tüp atılır. Eppendorf tüpte geri kalan çözelti genomik DNA' dır.

Cam lifli filtreye nükleik asit bağlama metoduna göre elde edilen genomik DNA' lar, *GSTP1* Ile105Val gen polimorfizminin tayininde kullanıldı.

2.1.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' da dizisi bilinen belirli bir bölgenin çoğaltılmasına (amplifikasyon) olanak veren *in vitro* DNA sentez yöntemidir. PCR, 3 ana basamaktan oluşur:

1. Amplifiye edilecek çift iplikli DNA' nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (denaturation)
2. Primerlerin özgül hibridizasyona olanak sağlayacak sıcaklıkta (T_m değerinin 3-5°C altındaki sıcaklık) hedef bölgelere bağlanmaları (annealing)
3. *Taq* DNA Polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72°C sıcaklıkta, zincirlerin primerlerden itibaren uzamaları (elongation)

PCR' da yer alan bileşenler;

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA
2. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisinin komplementeri olacak şekilde seçilmiş kısa primerler
3. Termostabil karakterde *Taq* DNA Polimeraz enzimi.

Hedef bölgeye özgül uygun primer çiftinin (ileri ve geri primer) doğru seçimi oldukça önemlidir. Primerler, genomik DNA' daki hedef bölge ile

hibridize olabilen, 15-20 nükleotid uzunluğunda, sentetik olarak sentez edilmiş tek zincirli oligonükleotidlerdir. Denatürasyonun ardından primerlerin bağlanma aşamasındaki T_m (erime derecesi) değerinin saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi açısından büyük öneme sahiptir ve yandaki formül ile kolayca hesaplanır: $T_m = 4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})$.

Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren *Taq* DNA Polimeraz enzimi, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, optimal aktivitesini 72°C ' de gösteren ve 94°C ' de bile aktivitesini kaybetmeyen bir enzimdir. *Taq* DNA polimerazın görevi, tek zincirli DNA' ya bağlanmış komplementer dizilerden itibaren DNA' yı çoğaltmaktır. Polimeraz enzimleri, aktivite gösterebilmek için, Mg^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyarlar; Mg^{2+} iyonları, *Taq* enziminin kofaktörü olarak işlev görürler. Bu nedenle, en uygun MgCl_2 konsantrasyonunun oluşturulması gerekmektedir. Magnezyum konsantrasyonunun fazla olduğu reaksiyonlarda hatalı eşleşmeler meydana gelirken, eksik olduğu reaksiyonlarda yeterli miktarda hibridizasyon gerçekleşmemektedir. Primerler ile başlatılan çift sarmal oluşumu, hedef zincirin *Taq* DNA polimeraz tarafından dNTP' lerin (deoksinükleotid trifosfat) kullanılarak uzatılmasıyla devam etmektedir. dNTP' ler (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) *Taq* DNA polimerazının sübstratlarıdır. Zincir, tek iplikli hedef DNA' nın komplementeri primer ile başlar ve *Taq* DNA polimeraz, ortamdaki dNTP' leri kullanarak bu zinciri uzatır. Tek iplikli DNA çift iplikli forma gelir. PCR denatürasyon, bağlanma ve uzama adımlarının tekrarlarına dayanan 20-40 döngü sonrasında tamamlanır ve sonunda hedef DNA' nın milyon kopyası oluşturulur.

2.1.3.2.1 Glutasyon- S Transferaz P1 için PCR

Glutasyon- S Transferaz P1 (*GSTP1*) geninin kodladığı GST π proteinin 105. kodonda, Adenin' in Guanin' e transisyonu sonrasında, İzolösinin Valine değişimine neden olan polimorfizmin tespiti amacıyla, polimorfizmi içeren 176 bç.' lik bir gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı. Her bir örnek için, daha önce otoklavda sterilize edilen 0.5 ml' lik PCR tüpünde 50 μ l' lik bir PCR reaksiyon karışımı hazırlandı:

<u>Bileşenler</u>	<u>Hacim</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 μ l	(1.5 mM)
GSTP1 İleri primer (100 μ M)	1,0 μ l	(100 μ M)
GSTP1 Geri primer (100 μ M)	1,0 μ l	(100 μ M)
dNTP Karışım (2 mM)	5,0 μ l	(0.2 mM)
10x PCR Tamponu	5,0 μ l	(1X)
Taq DNA Polimeraz (5 U/ μ l)	0,4 μ l	(1 U)
Steril Distile Su	29,6 μ l	
İzole genomik DNA	5,0 μ l	
Toplam hacim		50,0 μ l

Hazırlanan karışım daha sonra PCR cihazına yüklenerek, istenilen gen bölgesi çoğaltıldı.

GSTP1 amplifikasyonu için belirlenen PCR protokolü:

Denatürasyon	95°C' de	10 dakika	
Amplifikasyon	94°C' de	30 sn denatürasyon	} 45 döngü
	55°C' de	30 sn bağlanma	
	72°C' de	30 sn uzama	
Son uzama	72°C' de	10 dakika	
Soğutma	4°C' de	∞ Sonsuz	

2.1.3.2.2 GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin LC için Termal

profili:

GSTP1 polimorfizmini belirlemek için kullanılan termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma parametreleri olarak belirlendi ve ayarları LightCycler cihazına kaydedildi.

2.1.3.2.2.1 DENATÜRASYON

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isısı (°C)	95°C
İnkubasyon zamanı [dk]	10
Isı geçiş oranı [°C/sn]	20°C
İkincil Hedef Isısı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	
Basamak Geciktirmesi (döngü)	0
Okuma modu	Yok

2.1.3.2.2.2 AMPLİFİKASYON

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	45		
Tipi	Kantitasyon		
	1.Segment	2.Segment	3.Segment
Hedef Isısı (°C)	95°C	60°C	72°C
İnkubasyon zamanı [sn]	5	10	7
Isı geçiş oranı [°C/sn]	20°C	20°C	20°C
İkincil Hedef Isısı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0	0	0
Basamak Geciktirmesi (döngü)	0	0	0
Okuma modu	Yok	Tek	Yok

2.1.3.2.2.3 ERİME EĞRİSİ ANALİZİ

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	1		
Tipi	Erime Eğrileri		
	1.Segment	2.Segment	3.Segment
Hedef Isısı (°C)	95°C	50°C	80°C
İnkubasyon zamanı [dk]	2	0	0
Isı geçiş oranı [°C/sn]	20°C	20°C	0.2°C
İkincil Hedef Isısı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0	0	0
Basamak Geciktirmesi (döngü)	0	0	0
Okuma modu	Yok	Yok	Devamlı

2.1.3.2.2.4 SOĞUTMA

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isısı (°C)	40°C
İnkubasyon zamanı [sn]	30
Isı geçiş oranı [°C/sn]	20°C
İkincil Hedef Isısı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0
Basamak Geciktirmesi (döngü)	0
Okuma modu	Yok

PCR Karışımının Hazırlanması:

<u>Bileşenler</u>	<u>Hacim</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 µl	(4 mM)
GSTP1 İleri primer (100 µM)	1.0 µl	(1pmol/µl)
GSTP1 Geri primer (100 µM)	1.0 µl	(1pmol/µl)
GSTP1 Floresan probu (20 µM)	1.0 µl	(0.05 pmol/µl)
GSTP1 LC Red 640 probu (20 µM)	1.0 µl	(0.05 pmol/µl)
Hibridizasyon probu (10X)	1.0 µl	(1X)
Steril Distile Su	2.4 µl	
Master mix hacmi	9.0 µl	
İzole genomik DNA	+1.0 µl	
Toplam hacim	10.0 µl	

LightCycler cihazına uygun ve özel camdan yapılmış kapiller tüpler önceden soğutulmuş özel adaptörlerin içlerine yerleştirildi. PCR karışımı her bir hasta örneği için hazırlandıktan sonra, üzerlerine hasta örnekleri pipetlendi ve kapiller tüplerin ağızları plastik tıkaç ile kapatıldı. Kapiller tüplerdeki reaksiyon karışımının tamamının kapillerin ucuna toplanmasını sağlamak için, tüpler adaptörleri ile birlikte 3.000 rpm' de 3 saniye santrifüj edildi. Cam kapiller tüpler adaptörlerden çıkartılarak, örnek tepsisine yerleştirildi; üzerinde artık örneklerin bulunduğu tepsi LightCycler cihazına yerleştirildikten sonra çalışma başlatıldı.

Her çalışmada, reaktifin kontrolü için pozitif bir DNA kontrolü, ve kontaminasyonun kontrolü için de saf su negatif kontrol olarak kullanıldı.

2.1.3.3 PCR Sonrası % 2' lik Agaroz Jel Elektroforezi

GSTP1 geninden PCR sonrasında elde edilen ürünün büyüklüğünü kontrol etmek amacı ile, jel elektroforezi gerçekleştirildi. Bunun için, PCR ürünü %2' lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme ve dokümantasyon sisteminde görüntülendi.

2.1.3.4 PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan *GSTP1* geninin % 2' lik agaroz jelde kontrol edilmesi sonrasında, 176 bç.' lik doğru ürünün yanı sıra, yaklaşık 100 bç.' lik istenmeyen yan ürün de elde edildi. PCR optimizasyonu sağlanamayınca, *GSTP1* PCR ürünününün saflaştırılması gerçekleştirildi.

PCR Ürününün Saflaştırılma Aşamaları:

1. PCR ürünü, steril distile su ile 100 µl hacime tamamlanır.
2. PCR ürünü üzerine 500 µl bağlanma çözeltisi eklenir ve iyice resüspanse edilip, filtrelili tüpe aktarılır.

3. 13.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir ve toplanan sıvı atılır.
4. 200 µl yıkama çözeltisi eklenip, 13.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir ve toplanan sıvı uzaklaştırılır.
5. Filtreli tüp, Eppendorf tüpüne yerleştirilir. 50 µl elüsyon çözeltisi eklenir ve 13.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir. Eppendorf tüpte kalan çözelti saf PCR ürünüdür.

GSTP1 PCR ürününün saflaştırılması sonrasında elde edilen saf ürünü test etmek amacıyla, örnekler tekrar % 2' lik agaroz jelde koşuldu. Doğru bant büyüklüğündeki fragmanın dışındaki ürünlerin gözlenmemesi sonrasında enzim kesimi aşamasına geçildi.

2.1.3.5 Restriksiyon Enzim Kesimi ile Polimorfizm Analizi

Restriksiyon enzimleri, çift sarmal DNA' yı özgül tanıma bölgelerinden kesip DNA analizlerine olanak veren önemli enzimlerdir. Bakteriye özgül olan bu enzimler, çift iplikli DNA (dsDNA) üzerinde özgün bir bölgeyi tanımakta ve dsDNA' nın her iki zincirindeki fosfodiester bağına keserek DNA' yı tanıdıkları kesim noktalarından parçalara ayırmaktadır.

PCR ve PCR ürününün saflaştırılması sonrasında % 2' lik agaroz jelde uygun bant büyüklüğüne sahip ürün tespit edildikten sonra, *GSTP1* Ile105Val polimorfizm analizi restriksiyon enzim kesimi sonucuna göre gerçekleştirildi.

2.1.3.5.1 *GSTP1* Polimorfizm Analizi için Restriksiyon Enzim

Kesimi

GSTP1 geninin PCR ile çoğaltılan 176 bç.' lik hedef bölgesi, *A/w26I* restriksiyon enzimi için uygun bir kesim bölgesi içermemektedir. Eğer hedef gen bölgesinde A → G değişimi varsa (kırmızı ile gösterilen bölge), bir kesim yeri oluşmakta ve amplifikasyon ürünü bu yerden kesilmektedir.

Alw26I restriksiyon enziminin 176 bç.' lik *GSTP1* PCR ürünündeki tanıma bölgesi (kırmızı ile işaretlendirilmiş) ve kesim noktası (↓) aşağıda gösterilmektedir.

→ İleri primer

5 ' **ACCCAGGGCTCTATGGAA**GGACCAGCAGGAGGCAGCCCTGGTGGACATGGTGA
ATGACGGCGTGGAGGACCTCCGCTGCAAATAC**A**TCTCC↓CTCATCTACACCAACTA
TGTGAGCATCTGCACCAGGGTTGGGCACTGGGGGCTGAACAAAGAA**AGGGGCTTCTT**
GTGCCCTCA - 3 '

Geri primer ←

GSTP1 geninden elde edilen PCR ürününün *Alw26I* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda, ve olguların genotipine göre elde edilecek bantlar aşağıda belirtilmektedir:

- Polimorfizmi bulunmayan, yabanıl genotipteki olgulardan 176 bç. büyüklüğünde tek bir DNA fragmanı,
- Polimorfizm için heterozigot olan olgulardan 176 bç., 91 bç. ve 85 bç. büyüklüğünde üç DNA fragmanı,
- Polimorfizm için homozigot olan olgulardan 91 bç. ve 85 bç. büyüklüğünde iki DNA fragmanı elde edilmektedir.

2.1.3.5.1.1 *GSTP1* Restriksiyon Enzim Kesimi Ürünlerinin Değerlendirilmesi

GSTP1 geninin PCR ile çoğaltılan 176 bç.' lik bölgesinin *Alw26I* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan ürünler, % 2' lik Millipore agaroz (NuSieve) jelde yürütüldükten sonra görüntülendi ve değerlendirildi.

2.1.3.5.2.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

LC çalışması sonunda, erime eğrisi analizinde oluşan piklerin Tm derecelerine göre homozigot yabancı, homozigot polimorfik ve heterozigot genotipler ayırt edildi. *GSTP1* polimorfizminin ölçümü Kanal 2' den (F2) gerçekleştirildi.

Heterozigot genotip iki farklı Tm derecesinde iki pike sahipken; homozigot polimorfik ve homozigot yabancı genotipler belirli bir Tm derecesindeki tek bir pike sahiptirler (Tablo 11).

Tablo 11: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi Alellerinin Tm Değerleri ve Genotiplendirilmeleri

KANAL 2 (F2) <i>GSTP1</i> Ile105Val Genotiplendirmesi			
Hedef DNA	Pik Sayısı	Piklerin Tm Değerleri	Pikler Arasındaki ΔT
Yabancı genotip Ile/Ile	1	68.0°C	-
Heterozigot genotip Ile/Val	2	68.0°C 64.5°C	3.5°C
Homozigot polimorfik genotip Val/Val	1	64.5°C	-

2.1.4 KULLANILAN KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI

2.1.4.1 Ethidyum Bromür Hazırlanması

10 mg/ml stok solüsyon elde etmek için, 1 g ethidyum bromid 100 ml steril distile suda çözüldü ve karanlık ortamda 4°C' de saklandı.

2.1.4.2 dNTP Hazırlanması

Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP' ler) eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP' lardan oluşur.

2 mM konsantrasyondaki stok solüsyonunun hazırlanması için dNTP' ler distile suda sulandırıldı, küçük hacimlere (10-15 örneklik) bölündü ve -20°C' deki derin dondurucuda saklandı.

Bunun için dATP, dCTP, dGTP ve dTTP' nin her birinden 4 µl olmak üzere toplam 16 µl dNTP ve 184 µl steril distile su pipetlendi.

2.1.4.3 TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tamponu

Konsantre stok solüsyon olarak 50x TAE hazırlandı.

50x TAE;

242 gr Tris

57.1 ml Glasial Asetik Asit

100 ml 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) kullanılarak hazırlandı.

242 gr Tris, 500 ml saf su içinde çözüldü. 57.1 ml Glasial Asetik Asit ve 100 ml 0.5 M EDTA eklendi, son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

% 2' lik Agaroz ve Millipore agaroz için kullanılan 1x TAE tamponu, 50x TAE stok solüsyondan 1 ml alınıp, distile su ile 50 ml' ye tamamlanması suretiyle hazırlandı.

2.1.4.4 % 2' lik Agaroz Jel Hazırlama

0.8 gr Agaroz, 40 ml 1xTAE içine ilave edildi ve mikrodalga fırında eritildi. Tamamen homojen bir eriyik haline gelen jel ılıklaştıktan sonra, 5 µl Ethidyum Bromür (150 µl/lt 1x TAE) eklenip iyice karıştırıldı ve yükleme kuyularını oluşturacak tarağın da takılı olduğu elektroforez transfer kabına

döküldü. Jelin 4°C' de 15 dakika polimerleşmesini tamamlaması beklendi. Jel polimerize olduktan sonra, tarak çıkarıldı ve agaroz jelin bulunduğu transfer kabı elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı, jelin 1-2 mm üzerini kaplayacak şekilde 1xTAE tampon çözeltisi ile doldurulup, örnekler kuyucuklara yüklendi.

➤ Birinci kuyucuğa, 8 µl belirteç DNA yüklendi (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder).

➤ İkinci kuyucuğa, 10 µl PCR ürünü + 2 µl turuncu 6x yükleme boyası [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.15 orange G, % 0.03 xylene cyanol FF, % 60 glyserol, 60 mM EDTA; 6x Orange Loading Dye] karışımı yüklendi.

➤ Diğer kuyucuklar da, 10 µl PCR ürünü + 2 µl 6x yükleme boyası karışımı içerecek şekilde yüklendi.

➤ Son kuyucuğa, tekrar 8 µl belirteç DNA yüklendi.

Güç kaynağı 90V/25mA olacak şekilde ayarlanarak, jele yüklenen örnekler 45 dakika yürütüldü. Yürütme sonrasında jel, Whatman Biometra Biodoc Analyse jel görüntüleme, analiz ve dokümantasyon sistemi ile görüntülendi.

2.1.4.5 Enzim Kesimi için Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

GSTP1 PCR ürününün restriksiyon enzimi ile muamelesi için,

- PCR ürünü 10 µl
- Buffer Tango 2 µl
- 2 ünite *A/w26I* 0.2 µl

eklendi. Karışım, steril 1.5 ml' lik Eppendorf tüplerine konulduktan sonra, toplam hacim steril distile su ile 20 µl' ye tamamlandı. Tüpler, 2 saat süreyle 37°C' de kuru ısı bloğunda inkübe edildi ve inkübasyon sonrası, restriksiyon

enzim kesimini inaktif etmek amacıyla, 65°C' de 20 dakika inkübe edilip, -20°C' deki derin dondurucuya kaldırıldı.

2.1.4.6 % 2' lik Millipore Agaroz (NuSieve) Jel Elektroforezi

GSTP1 ile105Val polimorfizminin belirlenmesi için PCR ürünlerinin *A/w26I* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu elde edilen ürünler % 2' lik Millipore agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

% 2' lik Millipore agaroz hazırlamak için, 0.8 g Millipore agaroz, 40 ml 1x TAE içerisine eklenerek, mikrodalga fırında çözüldü. Bu aşamadan sonraki işlemler, % 2' lik agaroz ile aynı şekilde gerçekleştirildi.

2.1.5 Metilasyonun Araştırılması

Metilasyon Spesifik PCR (MSP), ilk olarak 1996 yılında Herman tarafından tanımlanmış yüksek duyarlılığa sahip bir metilasyon araştırma metodudur. Metot, bisülfid ile muamele edilmiş DNA' nın metile ve unmetile ayırımı yapabilen primerler yardımıyla çoğaltılması ve PCR sonuçlarının jelde görüntülenmesine dayanır.

2.1.5.1 Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Cihazlar (Tablo 12)

Tablo 12: Kullanılan Cihazlar

CİHAZ	MARKASI
Thermal Cycler	Techne Genius
Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold	Promega
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer
Vakum Pompası	Millipore
Soğutmalı Santrifüj	Thermo
Vorteks	Asons
Bio Doc Analyse Transiliminatör	Biometra (ABD)
pH metre	MultiCal pH Meter
Buzdolabı	Siemens
Derin Dondurucu (-20°C)	Uğur
Elektroforez Güç Kaynağı	Biometra (ABD)
Hassas Terazi	Stanton
İnkübatör	Eppendorf
Kuru Isı Bloğu	Eppendorf
Mikrodalga Fırını	Samsung
Otomatik Mikropipetler	Finnpipet (10, 20,100,200,1000 µl)
Santrifüj	Heraus
Thermocycler	Thermo
Yatay Jel Tankı ve Düzeneği	Biometra (ABD)

2.1.5.2. Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Kimyasal

Maddeler (Tablo 13)

Tablo 13: Kimyasal maddeler

KİMYASAL MADDE	MARKASI
Wizard DNA Clean Up	Promega
FastStart Taq DNA Polimeraz Enzimi	Roche Applied Science
Metil Transferaz (CpG Metilaz)	New England Biolabs
Kloroform	Applichem
Sodyum Bisülfid	Applichem
Sodyum hidroksit	Merck
Hidrokinon	Sigma
Glikojen	MBI Fermantas
Amonyum asetat	Applichem
Mineral Yağ	Sigma
Isopropanol	Applichem
Etanol	J.T. Baker
Agaroz (Low EEO)	MBI Fermantas
dNTP Karışımı	MBI Fermantas
EDTA	MBI Fermentas
Tris	MBI Fermentas
Glasiyal Asetik Asit	Merck
6x Mavi/Turuncu Yükleme Boyası	MBI Fermantas
Millipore Agaroz	Applichem

2.1.5.3 Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Hazır Kitler

2.1.5.3.1 DNA İzolasyonu Kiti

Kontrol ve çalışma grubu olgularının plazmalarındaki serbest DNA'larının izolasyonu için *GSTP1* ile 105Val polimorfizminin araştırılmasında da kullanılan High Pure PCR Template Preparation Kit' i (Roche Applied Science, Germany) kullanıldı.

2.1.5.3.2 DNA Wizard Cleanup Kit

Kontrol ve çalışma grubu olgularının bisüfit uygulaması sonrası DNA izolasyonu için DNA Wizard Cleanup Kit' i (Promega, USA) kullanıldı.

DNA Wizard Cleanup Kit İçeriği:

1. DNA Wizard Cleanup Resin: 100 ml
2. Wizard Mini kolonlar: 100 adet
3. Şırınga tüpleri: 100 adet

2.1.5.4 Metilasyon Analizi Esnasında Kullanılan Primerler

GSTP1 gen promoterinin PCR metodu ile amplifikasyonları için, bölgeye özgül primer dizileri seçildi ve sentez ettirildi (Interactiva, Germany).

Dış primerle (External Up, External Down) yapılan PCR işlemi sonucunda oluşacak olan PCR ürününün büyüklüğü 153 bp' dir. 2. PCR' da metile bölgelere özgül primerler (IntMe-S, IntMe-AS) ile yapılan PCR işlemi sonucunda oluşacak PCR ürününün büyüklüğü 92 bp' dir; metile olmayan bölgelere özgül primerler (IntUn-S, IntUn-AS) ile yapılan PCR işlemi sonucunda oluşacak PCR ürününün büyüklüğü 99 bp' dir. 1. PCR için primer bağlanma derecesi 56°C, 2. PCR için 59°C' dir.

Kullanılan Primer Dizileri:

GSTP-External Up : 5' – GGG ATT TTA GGG YGT TTT TTT G –3'

GSTP-External Down: 5' – ACC TCC RAA CCT TAT AAA AATAATCCC–3'

GSTP-IntMe-S : 5' – TTC GGG GTG TAG CGG TCG TC –3'

GSTP-IntMe-AS : 5' – GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G –3'

GSTP-IntUn-S : 5' – GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT –3'

GSTP-IntUn-AS : 5' –CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA –3'

Liyofilize halde ve 0.20 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan GSTP-External Up, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde firmanın önerisi olan 1290 µl, GSTP-External Down ise 1300 µl, GSTP-IntMe-S 1290 µl ,GSTP-IntMe-AS 1293 µl, GSTP-IntUn-S 1286 µl, GSTP-IntUn-AS 1290 µl olmak üzere PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözüldü ve 1:5 oranında dilüe edilerek 50 µl' lik eşit hacimler halinde -20°C' de muhafaza edildi.

GSTP1 promoter bölge hipermetilasyonunun MSP metodu ile araştırılmasında 1. PCR' da kullanılan External Up kırmızı, External Down mor ile, 2. PCR' da kullanılan GSTP-IntMe-S pembe ve GSTP-IntMe-AS mavi ile işaretlenerek, aşağıdaki dizide gösterilmeye çalışıldı. 2. PCR' da kullanılan GSTP-IntUn-S ve GSTP-IntUn-AS' nin dizileri, GSTP-IntMe-S ve GSTP-IntMe-AS ile neredeyse aynı olduklarından, yalnızca farklı olan bazlar sırasıyla lacivert ve yeşil renk ile belirtildi.

→ →

5' **GGGACTCCAGGGCGCCCTCTG**CGGCCGAC**CCCCGGGTGCAGCGGCCCGCC**GGGG
 CTGGGGCCGGCGGGAGTCCGCGGGACCCTCCAGAAGAGCGGCCGGCGC**CGTGA**CTCA
GCACTGGGG**CG**AGCGGGGC**GGGACCACCCTTATAAGGCTCGGAGGC**– 3'

← ←

←

2.1.5.5 Metilasyon Analizi için Çalışma Protokolü

2.1.5.5.1 Plazmadan Serbest DNA İzolasyonu Aşaması

Çalışma amacımıza uygun olarak seçilen kontrol ve çalışma grubu olgularından, toplam 4 adet EDTA' lı tüpe alınan 3' er ml kandan 200 µl' si *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi için genomik DNA izolasyonunda kullanıldıktan sonra, geri kalan kanın plazması ayrıldı ve serbest DNA izolasyonu için kullanıldı.

Protokol, aşağıdaki basamaklardan oluşur:

1. 15 ml' lik Falcon tüplerdeki 4 ml plazma üzerine 2,5 ml doymuş amonyum asetat ilave edilir.
2. Karıştırıldıktan sonra soğutmalı santrifüjde 4°C' de ve 3.000 rpm' de 10 dk santrifüj edilir.
3. Santrifüj sonrasında dipte kalan hücrelerin alınmamasına dikkat edilerek süpernatant 15 ml' lik yeni bir falkon tüpe aktarılır.
4. Falkon tüpteki süpernatant miktarı kadar üzerine kloroform ilave edilir.
5. Soğutmalı santrifüjde 4°C' de ve 3.000 rpm' de 10 dk santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonrası süpernatant yine yeni bir 15 ml' lik falkon tüpüne alınır.
7. Üzerine 4 ml bağlanma çözeltisi ile 800 µl Proteinaz K ilave edilip pipetle resüspanse edilerek homojenizasyonu sağlanır.
8. Örnekler, önceden 72°C' ye ayarlanan kuru ısı bloğunda 10 dakika inkübasyona bırakılır.

9. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine 2 ml izopropanol eklenir ve pipetaj ile iyice karıştırılır.
10. Eppendorf tüp içinde bulunan örneğin tamamı, 500 µl' lik hacimler şeklinde 'collection' tüp içine yerleştirilmiş filtreli tüplere aktarılır.
11. Tüm örnek çalışana kadar tüpler her yükleme sonrasında 8.000 rpm' de 1dk santrifüj edilir.
12. Santrifüj sonrasında, eski collection tüp atılır ve filtreli kısım yeni bir 'collection' tüpüne aktarılır.
13. Filtre üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı çözelti eklenir ve 8.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilir.
14. Santrifüj sonrasında, filtreli kısım yeni bir 'collection' tüpe aktarılır.
15. 500 µl yıkama çözeltisi ilave edilir ve 8.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilir.
16. Filtreli tüpler yeni collection tüplerine aktarılır ve ikinci kez 500 µl yıkama çözeltisi eklenir; 8.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilir.
17. Santrifüj bittikten sonra, tüplerin alt kısmında biriken sıvı uzaklaştırılır ve 10 saniye 8.000 rpm' de santrifüj edilir.
18. Filtreli tüpler, temiz bir Eppendorf tüpüne yerleştirilir ve 72°C' ye ayarlanmış kuru ısı bloğunda ısıtılan elüsyon çözeltisinden 50 µl ilave edilerek 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
19. Santrifüj sonrasında filtreli tüp atılır. Eppendorf tüpün içinde kalan çözelti serbest plazma DNA' sıdır.
20. Elde edilen serbest DNA - 86°C' ye kaldırılarak, saklanır.

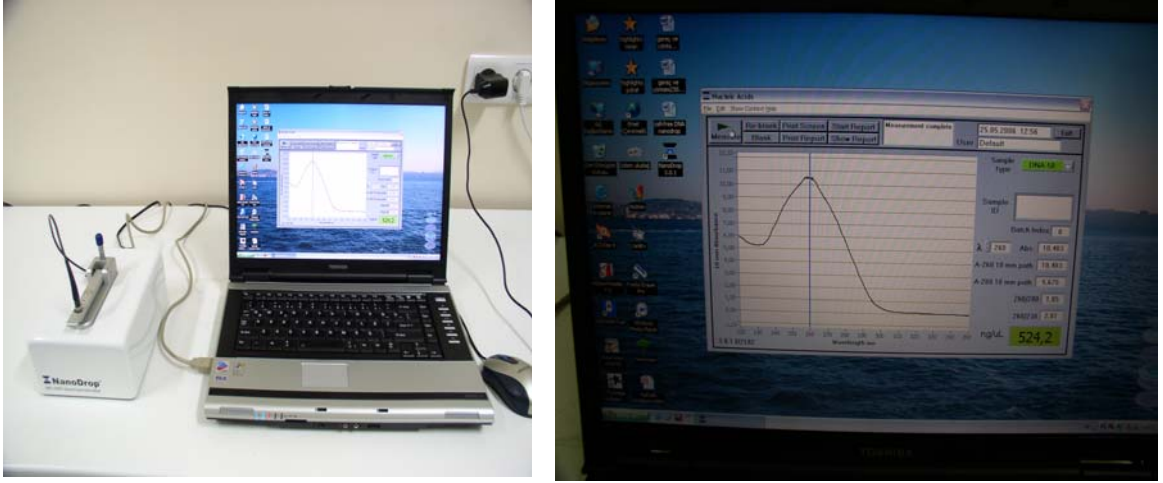
2.1.5.5.2 NanoDrop Cihazı ile Nükleik Asit Konsantrasyonu ve Kalite Ölçümü

NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometresi ile küçük hacimli numunelerin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte ölçümleri yapılabilinmektedir. Patentli numune tutma sistemi sayesinde küvet kullanımına gerek kalmamaktadır. Bu sayede cihaz, çok pahalı olan küvetlerin kullanımına gerek olmadan ölçüm zamanını kısaltmaktadır. Buna ilave olarak, yüksek absorbans kapasitesi sayesinde kullanıcıyı pek çok dilüsyon yapmaktan kurtarmaktadır. Daha az dilüsyon yaparak, ve daha önce harcanan aynı zaman içerisinde çok daha fazla ölçüm yapabilme olanağı sağlamaktadır.

NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometresi doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vererek 3.700 ng/ μ l' ye kadar konsantrasyondaki nükleik asit örneklerini sulandırmaya gerek duymadan ölçebilmekte ve bunu yapmak için cihaz, otomatik olarak yüksek konsantrasyonu tayin etmektedir. 0,2 mm ışık yolu kullanarak absorbansı hesaplamaktadır.

Serbest DNA' lar izole edildikten sonra ve bisülfid modifikasyonuna geçmeden önce konsantrasyonları ve saflıkları spektrofotometre ile incelenmesi gerekir. DNA' ların ölçümü ng/ μ l cinsinden yapılır ve bisülfid modifikasyonu için 1 μ g DNA kullanılır.

Bir örneğin ölçüm sonucu aşağıda görülmektedir (Resim 1).



Resim 1: NanoDrop Cihazı ile bir örneğin ölçüm sonucu.

2.1.5.5.3 Bisülfıt Modifikasyonu

Bisülfıt modifikasyon protokolü aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. 1 µg DNA steril distile H₂O ile 50 µl' ye tamamlanır
2. Karışımın üzerine 5 µl 2M NaOH eklenir
3. Çift zincirli DNA' yı denatüre etmek amacıyla 37°C' de 10 dakika inkübe edilir
4. Her tüpe 30 µl 10 mM hidrokinon eklenir (50 ml distile suya 55 mg hidrokinon eklenerek her seferinde taze hazırlanır)
5. Her tüpe 520 µl 3M sodyum bisülfıt eklenir (5 ml distile suya 1.88 gr sodyum bisülfıt eklenerek hazırlanır ve NaOH ile pH 5.0' a ayarlanır)
6. Karışım vortekslenir
7. Karışımın üstü mineral yağ ile tabaka oluşturacak şekilde kapatılır
8. 50°C' de 16 saat inkübe edilir
9. Mineral yağ pipet ile uzaklaştırılır

10. Üzerine 1 ml DNA Wizard Cleanup çözeltisi eklenir
11. Karışım, DNA Wizard Cleanup ile birlikte gelen miniprep kolona aktarılır
12. Vakum uygulanarak karışımın kolondan geçmesi sağlanır (Resim 2)
13. Kolona 2 ml % 80' lik izopropanol eklenir
14. Vakum uygulanarak isopropanol' ün kolondan geçmesi sağlanır
15. Kolon, 15 ml temiz bir tüpün üzerine yerleştirilir
16. Üzerine 60-70°C' ye ısıtılmış 50 µl distile su eklenir
17. Tüp/kolon 14.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir
18. Örneklerin toplandığı tüpe 5.5 µl 3M NaOH eklenir
19. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir
20. Örnek başına 1 µl glikojen + 17 µl 10M NH₄Ac olacak şekilde karışım hazırlanır ve her tüpe 18 µl eklenir
21. Her tüpe, tüpteki karışım hacminin 3 katı kadar (yaklaşık 200 µl) % 100 etanol eklenir
22. -20°C' de 1-1.5 saat bekletilir.
23. 14.000rpm' de 20 dakika santrifüj edilir
24. Süpernatant pelete kadar atılır
25. 300 µl % 70' lik etanol eklenir
26. 14.000 rpm ve 4°C' de 5 dakika santrifüj edilir
27. Süpernatant pelete kadar atılır
28. Tüp 30 dakika kapağı açık şekilde, oda ısısında kurumaya bırakılır

29. 20 µl bidistile su eklenir

30. Bisülfid modifikasyonuna uğramış DNA' lar -20°C' de saklanır



Resim 2: Millipore Vakum pompası kullanılarak örneklere vakum uygulanır ve Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold cihazı' na (Promega) ait kolonlardan geçmeleri sağlanır; filtrelili tüpte bisülfid modifikasyonu gerçekleştirilmiş serbest DNA toplanır.

2.1.5.5.4 Metilasyon Spesifik-PCR (MSP)

Bisülfid ile muamele edilmiş genomik DNA, metile ve unmetile (metile olmayan) DNA' ya özgül primerlerle çoğaltılır. Önce metilasyona özgül olmayan dış primerler yardımıyla istenilen promotör bölgesi çoğaltılır. Daha sonra elde edilen PCR ürünü kalıp olarak kullanılarak, her örnek için bir tane metile DNA' yı tanıyan, ve bir tane de metile olmayan DNA' yı tanıyan primer çifti ile 2. PCR işlemleri gerçekleştirilir.

2.1.5.5.4.1 PCR Reaksiyon Karışımı

1. PCR reaksiyon karışımı her örnek başına aşağıdaki gibi hazırlanır.

<u>Bileşenler</u>	<u>Hacim</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	(1.5 mM)
<i>GSTP1</i> External Down (20 µM)	0.5 µl	(1 pmol/µl)
<i>GSTP1</i> External Up (20 µM)	0.5 µl	(1 pmol/µl)
dNTP (2mM)	1.25 µl	(0.2 mM)
10X PCR Tamponu	2.5 µl	(1X)
FastStart Taq Polimeraz (500 U/µl)	0.5 µl	(2,5 U)
Steril Distile H ₂ O	18.75 µl	
Serbest DNA	4 µl	
Toplam hacim	30,0 µl	

1. PCR protokolü:

Denatürasyon	95°C' de	10 dakika	
Amplifikasyon	95°C' de	30 sn denatürasyon	} 35 döngü
	56°C' de	30 sn bağlanma	
	72°C' de	30 sn uzama	
Son uzama	72°C' de	8 dakika	
Soğutma	4°C' de	∞ Sonsuz	

2. PCR reaksiyonunun karışımı her örnek başına aşağıdaki gibi hazırlanır.

<u>Bileşenler</u>	<u>Hacim</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	(1.5 mM)
<i>GSTP1</i> IntMe-S (20 µM)	0.5 µl	(1 pmol/µl)
<i>GSTP1</i> IntMe-AS (20 µM)	0.5 µl	(1 pmol/µl)
dNTP (2mM)	1.25 µl	(0.2 mM)
10X PCR Tampon	2.5 µl	(1X)
FastStart Taq Polimeraz (500 U/µl)	0.5 µl	(2,5 U)
Steril Distile H ₂ O	20.75 µl	
1. PCR ürününden	2 µl	
Toplam hacim	30,0 µl	

Aynı reaksiyon karışımı metile olmayan *GSTP1*' nin amplifikasyon için IntUn-S ve *GSTP1* IntUn-AS primerleri ile de hazırlanır.

2. PCR protokolü:

Denatürasyon	95°C' de	10 dakika	
Amplifikasyon	95°C' de	30 sn denatürasyon	} 35 döngü
	59°C' de	30 sn bağlanma	
	72°C' de	30 sn uzama	
Son uzama	72°C' de	8 dakika	
Soğutma	4°C' de	∞ Sonsuz	

2.1.5.5.5 MSP Sonrası % 2' lik Agaroz Jel Elektrofrez

GSTP1 gen promoterinin PCR' ı gerçekleştirildikten sonra elde edilen ürünün büyüklüğünü kontrol etmek amacı ile, jel elektrofrez gerçekleştirildi. Bunun için PCR ürünü %2' lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme ve dokümantasyon sistemi ile görüntülendi.

2.1.5.5.6 Metilasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GSTP1 promoterinden elde edilen metilasyon spesifik PCR ürününün, % 2' lik agaroz jelde yürütülmesi sonucunda olguların metile veya metile olmayan durumlarına göre elde edilecek bantlar aşağıda belirtilmektedir:

✓ 2. PCR' da metile bölgelere özgül primerler (IntMe-S, IntMe-AS) ile yapılan PCR işlemi sonucunda oluşacak PCR ürününün büyüklüğü 92 bç' dir.

✓ 2. PCR' da metile olmayan bölgelere özgül primerler (IntUn-S, IntUn-AS) ile yapılan PCR işlemi sonucunda oluşacak PCR ürününün büyüklüğü 99 bç' dir.

2.1.5.5.7 KULLANILAN KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI

2.1.5.5.7.1 3.9 M' lik Amonyum Asetatın Hazırlanması

Stok solüsyonunu elde etmek için, 100 gr amonyum asetat 30 ml steril distile suda çözüldü ve 4°C' de saklandı.

2.1.5.5.7.2 *In Vitro* Metillenmiş Pozitif Kontrol DNA' sının Hazırlanışı

IVD (*in vitro* metillenmiş DNA) metilasyon çalışmalarında pozitif DNA kontrolü olarak kullanılır. Bunun için, normal bir bireyin DNA' sı izole edilir ve aşağıdaki basamaklara göre metillenir. IVD hazırlanırken DNA metilaz yardımıyla DNA' daki tüm CpG dinükleotidleri metile hale getirilir. Çalışmada bu amaçla SssI methylase (CpG methylase) enzimi (32 mM, % 10 ethanol, 5mM H₂SO₄), SAM çözeltisi (S-adenosylmethionine Buffer) ve NEBuffer 2 (10X Buffer) kullanıldı.

IVD hazırlamak için aşağıdaki protokol uygulanır:

1. 50 µl normal bir bireyin DNA' sı üzerine 150 µl steril distile H₂O pipetlenir.
2. 2.5 µl 32 mM SAM, 25 µl 10X Buffer, 12.5 µl (25 ünite) SssI (SssI methylase kiti) eklenir.
3. Karışıma 60 µl su eklenir.
4. 37°C' de 4 saat inkübe edilir.
5. Karışıma 5 µl 32 mM SAM ve 6 µl SssI eklenir.
6. 37°C' de 4 saat inkübe edilir.
7. DNA izolasyon metoduyla ekstraksiyonu yapılır.

2.1.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ

Hasta ve kontrol gruplarının *GSTP1* ile 105Val polimorfizminin PCR ve LC cihazı ile analizi gerçekleştirildikten sonra elde edilen bulguların değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel analiz testi Ki-kare Testi (χ^2)'dir.

Ki- Kare testi istatistikte en çok kullanılan temel örnekleme dağılımlarından biri olup çok çeşitli uygulama alanları bulunur. Sağlık araştırmalarında da sıklıkla kullanılan ve en güvenilir bulunan analiz yöntemi Ki- kare testidir. Ki-kare analizi, grupları çapraz tablo gözlerindeki gözlenen değerler ile beklenen değerler arasındaki farkı dikkate alarak karşılaştıran bir testtir. Anlamlılık değeri, $p < 0.05$ tir.

GSTP1 promoter bölge hipermetilasyonunun analizi için Ki-kare testi ve Fisher' in Kesin testi (Fisher's Exact test) kullanılmıştır.

Fisher' in Kesin testi sağlık araştırmalarında kullanılan bir analiz yöntemidir. Ki- Kare testi' nin uygulanamadığı özel koşullarda kullanılan bir testtir. Fisher' in Kesin testi, grupları çapraz tablo gözlerindeki gözlenen değerler ile beklenen değerler arasındaki farkı dikkate alarak karşılaştıran diğer bir testtir ve 0.05' den küçük çıkan p değerleri (iki yönlü) istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilir.

III. BÖLÜM

3.1 BULGULAR

3.1.1 Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özelliklerinin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri

Kontrol grubu, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 55 sağlıklı olgudan; çalışma grubu ise E.Ü.T.F. Üroloji ABD' da prostat kanseri tanıları konmuş 50 olgudan oluşturulmuştur.

Tüm bireylerden, 4x 3 ml' lik EDTA' lı tüplere alınmış olan periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, *GSTP1* geni için PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş, Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) metodu ve gerçek zamanlı bir PCR cihazı olan LightCycler™ ile Ile105Val polimorfizmi analiz edilmiştir. Kontrol ve çalışma grubu ile ilgili genel bilgiler, elde edilen bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1.1. Kontrol Grubu: Sağlıklı bireylerden seçilerek kontrol grubuna dahil edilen 55 olgunun yaş ortalaması $55,13 \pm 6,89$ olarak saptanmıştır. Kontrol grubuna ait genel özellikler Tablo 14' de, çalışmadaki toplam yüzdeleri Grafik 1' de ve yaş ortalamaları da Grafik 2' de verilmiştir.

Tablo 14: Kontrol Grubuna Ait Genel Özellikler

	<i>n</i>	%
Toplam	55	52
Yaş Ortalama \pm SD*	$55,13 \pm 6,89$	

*SD: Standart sapma

3.1.1.2 Çalışma Grubu: Prostat kanseri tanıları konmuş bireylerden oluşturulan bu gruptaki 50 erkek olgunun yaş ortalaması $67,64 \pm 6,34$ olarak saptanmıştır. Çalışma grubuna ait genel özellikler Tablo 15' de, çalışma

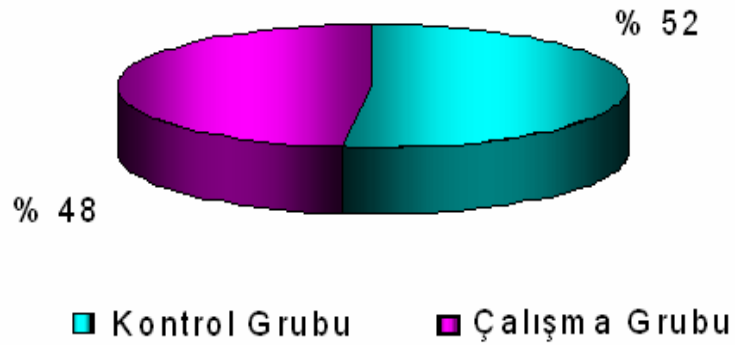
içindeki toplam yüzdesi Grafik 1' de ve yaş ortalamaları da Grafik 2' de verilmiştir. Her iki grubun toplam yaş ortalamaları ise $61,38 \pm 6,62$ olarak saptanmıştır ve Grafik 2' de verilmiştir.

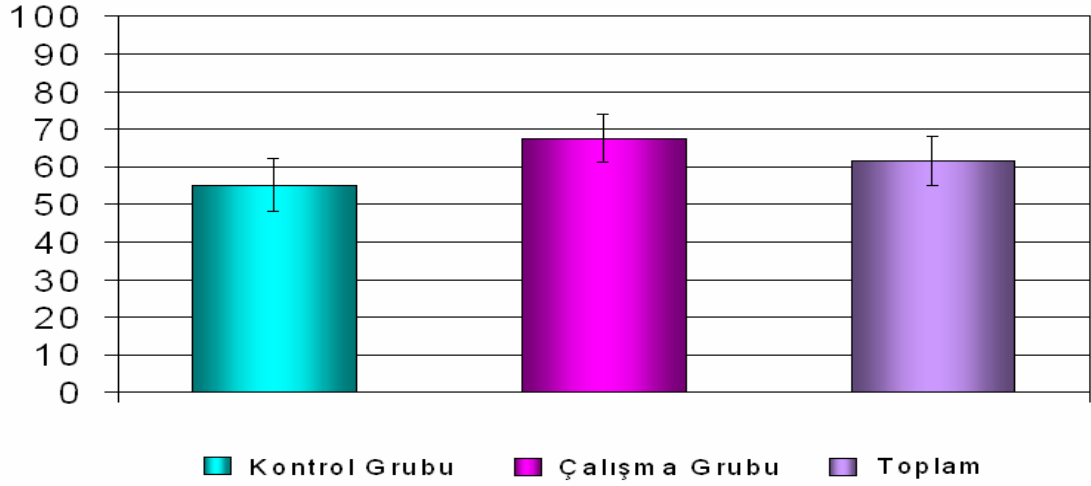
Kontrol ve çalışma grubundaki olgulara ait veriler ve polimorfizm analiz sonuçları Tablo 34 ve Tablo 35' de ayrıca ayrıntılı olarak verilmektedir.

Tablo 15: Çalışma Grubuna Ait Genel Özellikler

	<i>n</i>	%
Toplam	50	48
Yaş Ortalama \pm SD*	$67,64 \pm 6,34$	
PSA		
PSA<4	22	44
PSA 4-12	25	50
PSA \geq 12	3	6
Evre		
Erken Evre (T1-T2)	33	66
Geç Evre (T3-T4)	17	34
Gleason Skor		
Gleason Skor <7	18	34
Gleason Skor \geq 7	32	66

*SD: Standart sapma



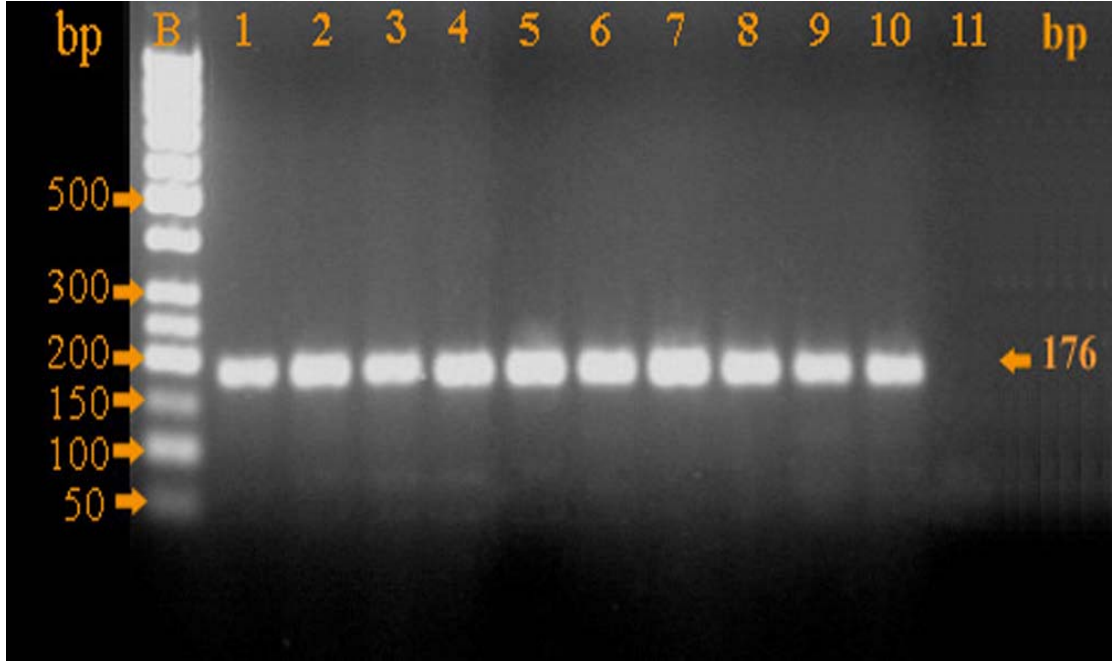
Grafik 1: Kontrol ve Çalışma grubunun yüzdeleri**Grafik 2:** Çalışma ve Kontrol grubunun yaş ortalamaları

3.2 Glutasyon S-transferaz P1 (*GSTP1*) Ile105Val Polimorfizmine

Ait Bulgular

3.2.1 Glutasyon S-transferaz P1' in PCR Amplifikasyonu

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olguların genomik DNA' larından amplifiye edilen ve polimorfik bölgeyi içeren *GSTP1* genine ait 176 bç.' lik PCR ürünlerinin % 2' lik agaroz jel görüntüleri Şekil 14' de verilmiştir.

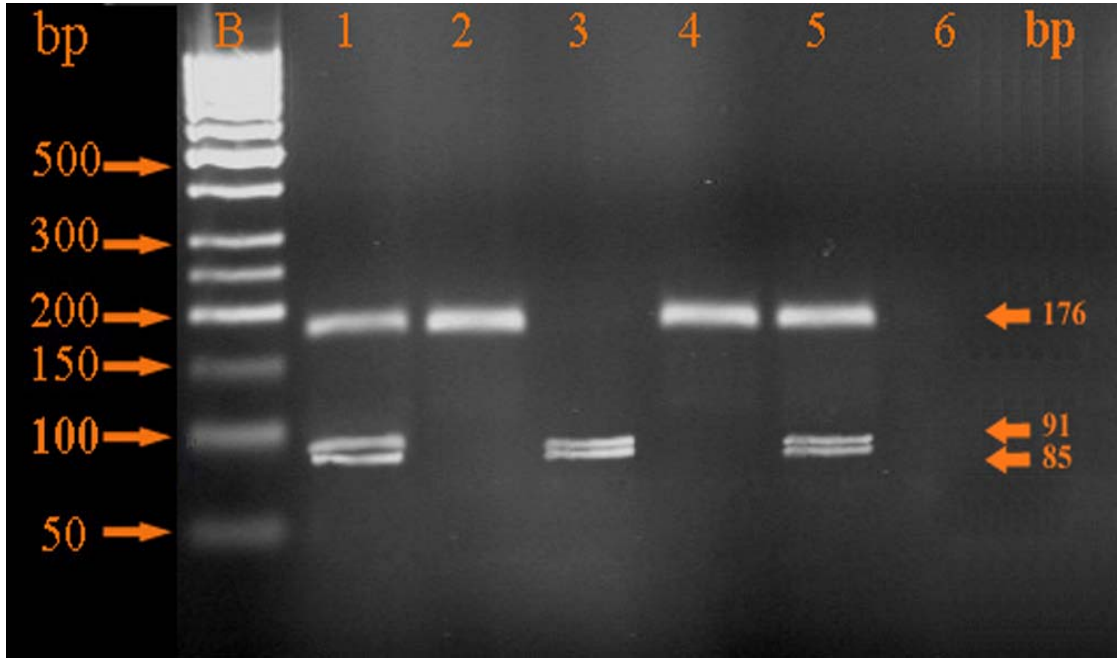


Şekil 14: Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait 176 bç.' lik *GSTP1* gen ürünününün % 2' lik agaroz jel üzerinde koşulmalarından sonraki görüntüleri.

B: Belirteç DNA (*GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder*; MBI Fermentas, Germany); 1: No' lu olgu, H9; 2: No' lu olgu, H20; 3: No' lu olgu, H13; 4: No' lu olgu, H40; 5: No' lu olgu, H37 ve 6: No' lu olgu, K1, 7: No' lu olgu, K15; 8: No' lu olgu, K43; 9: No' lu olgu, K54; 10: No' lu olgu, K38 ve 11: Negatif Kontrol.

3.2.2 Restriksiyon Enzim Kesimi Sonuçlarına Göre Olguların *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi İçin Genotiplendirilmeleri Ve Elde Edilen Bulgular

Olguların *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi (A → G) için genotiplendirilmeleri, RFLP işlemi sonrasında *GSTP1* ürünlerinden elde edilen değişik büyüklük ve sayıdaki DNA fragmanına göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, yabanıl genotipe sahip olgular (Ile/Ile) 176 bç. büyüklüğündeki tek bir DNA fragmanına; *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi için homozigot olan olgular (Val/Val) 91 bç. ve 85 bç. büyüklüğündeki 2 DNA fragmanına; ve *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi için heterozigot olan olgular (Ile /Val) 176 bç., 91 bç., ve 85 bç. büyüklüğündeki 3 DNA fragmanına sahiptirler (Şekil 15).



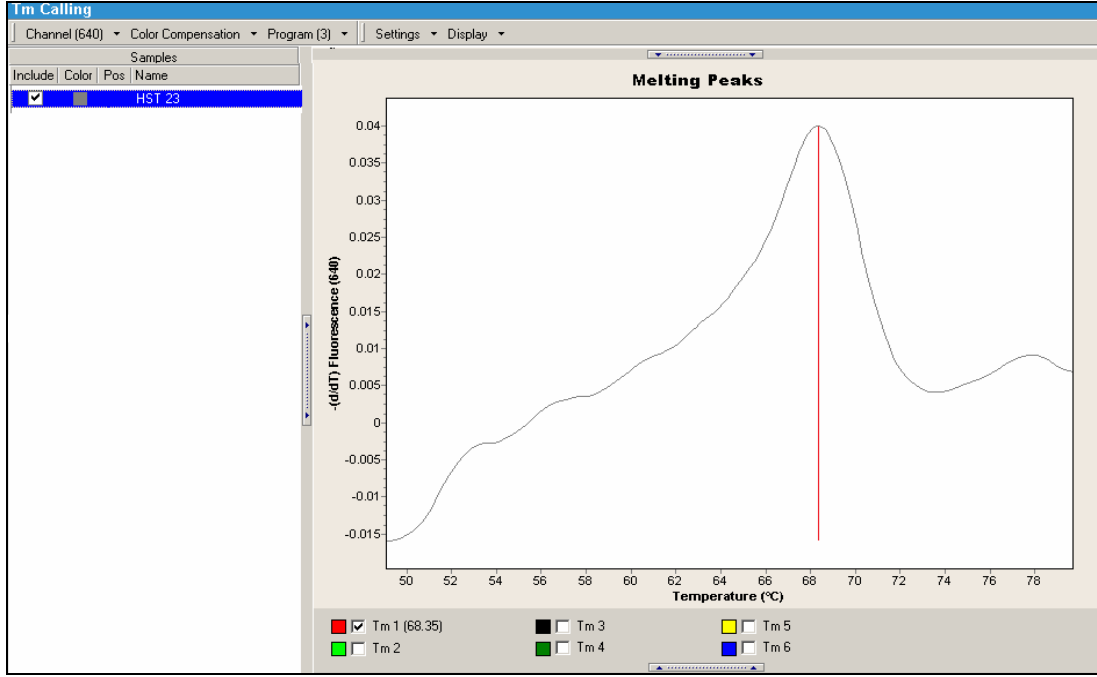
Şekil 15: Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait örneklerin, restriksiyon enzim kesimi ve % 2' lik NuSieve agaroz jelde koşulmalarından sonra, *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi için genotiplendirilmeleri.

B: Belirteç DNA (*GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder*; *MBI Fermentas, Germany*); 1 ve 5: No' lu olgular heterozigot (*Ile/Val*), H15- K39; 2 ve 4: No' lu olgular yabancı tip (*Ile/Ile*), H11 - K27; 3: No' lu olgu homozigot (*Val/Val*), H8 6: Negatif Kontrol.

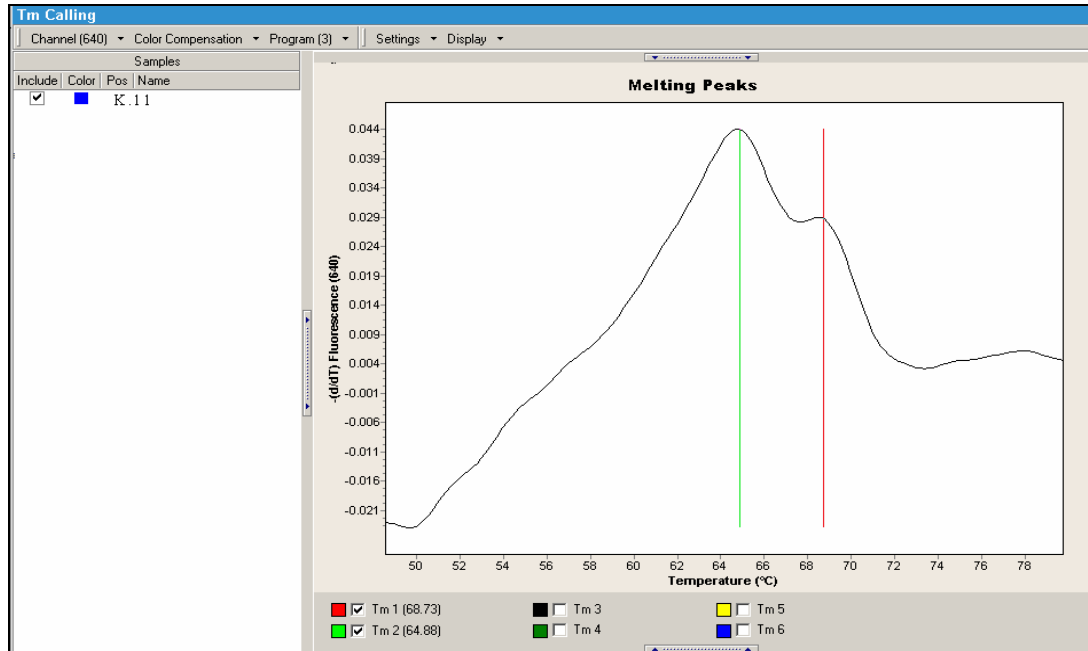
3.2.3 LightCycler Sonuçlarına Göre Olguların *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi İçin Genotiplendirilmeleri Ve Elde Edilen Bulgular

GSTP1 Ile105Val için yabancı genotip, erime eğrisi analizi sonrasında $68.0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de tek pik oluşması ile belirlenmiştir. Homozigot polimorfik genotipi meydana getiren her iki *GSTP1* alelindeki 313. nükleotidin A \rightarrow G transisyonu, $64.5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de tek pik oluşturması ile saptanmıştır. Heterozigot genotip ise $68.0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $64.5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ' lerde iki pikin oluşması ile belirlenmiştir.

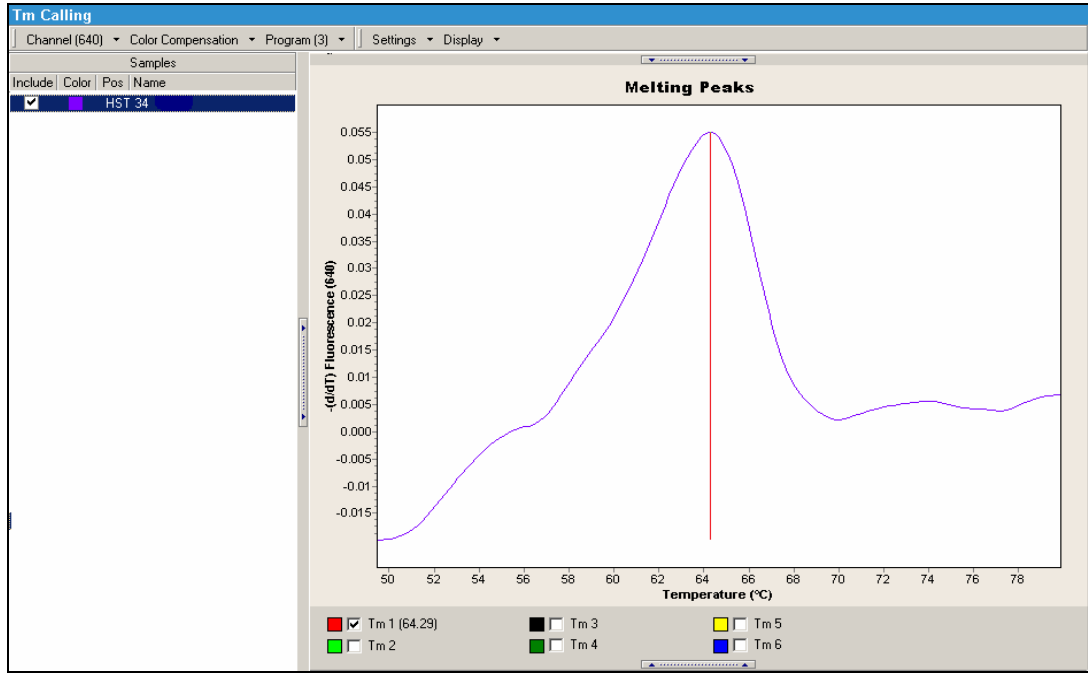
GSTP1 Ile105Val için normal, heterozigot ve homozigot genotip örneklerinin sonuçları Şekil 16, 17, 18' de gösterilmektedir.



Şekil 16: GSTP1 Ile105Val polimorfizmi yabancı genotip sonucu. 68.35°C' deki kırmızı dikey çizgi ile işaretlenmiş pik yabancı Ile alelini göstermektedir. (Olgu No: H.23)



Şekil 17: GSTP1 Ile105Val polimorfizmi heterozigot genotip sonucu. 68.73°C' deki kırmızı dikey çizgi ile işaretlenmiş pik yabancı Ile alelini, 64.88°C' deki yeşil dikey çizgi ile işaretlenmiş pik polimorfik Val alelini göstermektedir. (Olgu No: K.11)



Şekil 18: *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi homozigot genotip sonucu. 64.29°C' deki kırmızı dikey çizgi ile işaretlenmiş pik polimorfik Val alelini göstermektedir. (Olgu No: H.34)

3.2.4 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Genotip ve Haplotip Analizleri

3.2.4.1 Kontrol Grubu:

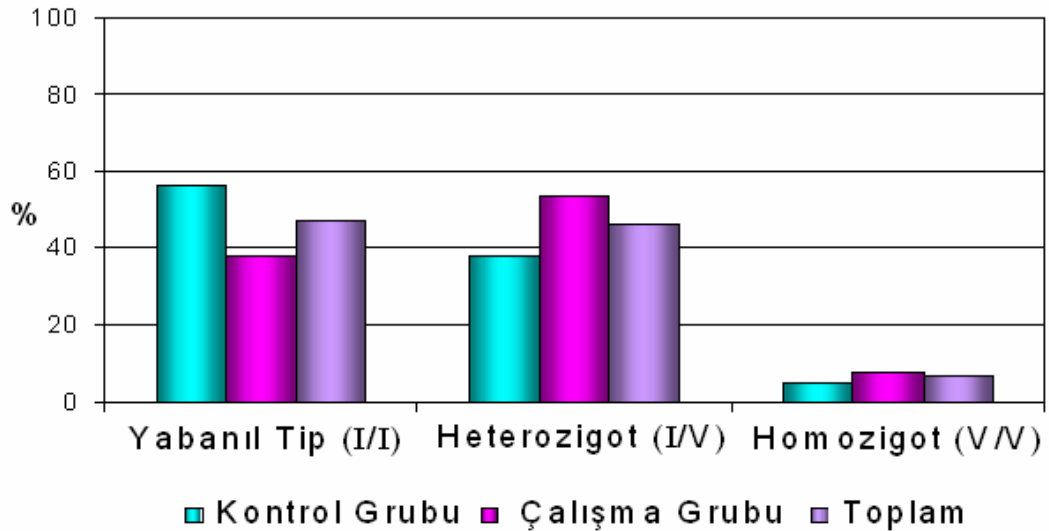
Toplam 55 olgudan oluşan bu grupta, *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi için 31 olgunun (% 56,4) yabancı (Ile/Ile), 21 olgunun (% 38,2) heterozigot (Ile/Val) ve 3 olgunun da (% 5,4) homozigot (Val/Val) genotipe sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 16; Grafik 3). Kontrol grubunun alel sıklığı, 83 adet Adenin (Ile) (% 75,5) ve 27 adet Guanin (Val) (% 24,5) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 16; Grafik 4).

3.2.4.2 Çalışma Grubu:

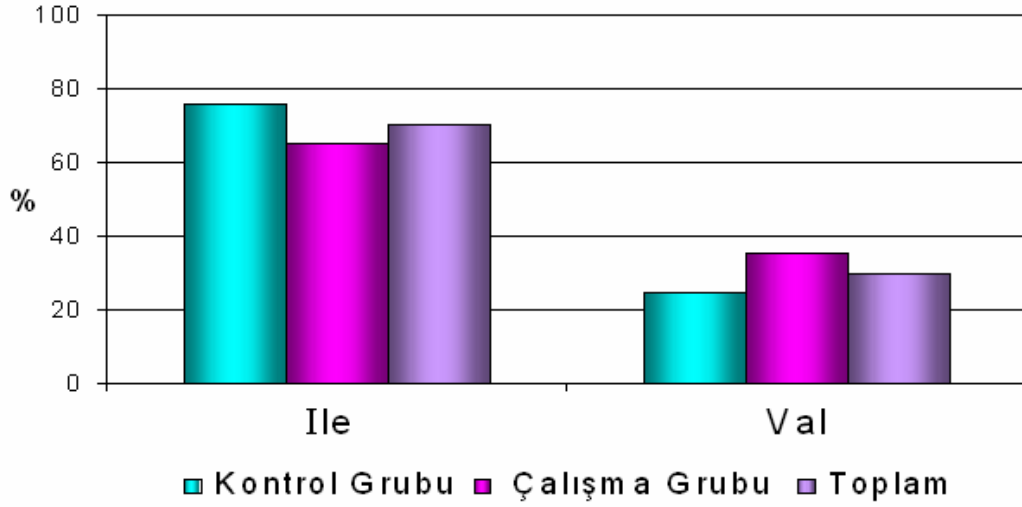
Prostat kanseri tanısı konmuş 50 olgudan 19 olgunun (% 38,0) yabancı (Ile/Ile), 27 olgunun (% 54,0) heterozigot (Ile/Val) ve 4 olgunun da (% 8,0) homozigot (Val/Val) genotipe sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 16; Grafik 3). Çalışma grubunun alel sıklığı, 65 adet Adenin (Ile) (% 65,0) ve 35 adet Guanin (Val) (% 35,0) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 16; Grafik 4).

Tablo 16: Kontrol ve Çalışma Grubunda *GSTP1* Ile/Val Alel Sıklığı ve Genotip Dağılımı

GSTP1	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Ile	Val	Ile/Ile	Ile /Val	Val/Val
Kontrol grubu (n=55)	83 (% 75,5)	27 (% 24,5)	31 (% 56,4)	21 (% 38,2)	3 (% 5,4)
Çalışma grubu (n=50)	65 (% 65,0)	35 (% 35,0)	19 (% 38,0)	27 (% 54,0)	4 (% 8,0)
Toplam (n=105)	148 (% 70,2)	62 (% 29,8)	50 (% 47,2)	48 (% 46,1)	7 (% 6,7)



Grafik 3: Kontrol grubu ve çalışma grubunun *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi analiz sonuçlarının karşılaştırılması; genotip dağılımı.



Grafik 4: Kontrol grubu ve çalışma grubunun *GSTP1* Ile/Val haplotip analiz sonuçlarının karşılaştırılması; alel sıklığı.

3.2.4.3 Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val

Polimorfizmi İçin İstatistiksel Analizi

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olgular *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi açısından karşılaştırıldıklarında, iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=3,543$, $p>0,05$). Aynı gruplar, *GSTP1* Ile/Val haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=2,889$, $p>0,05$).

3.2.5 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisinde Yaş' a Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı

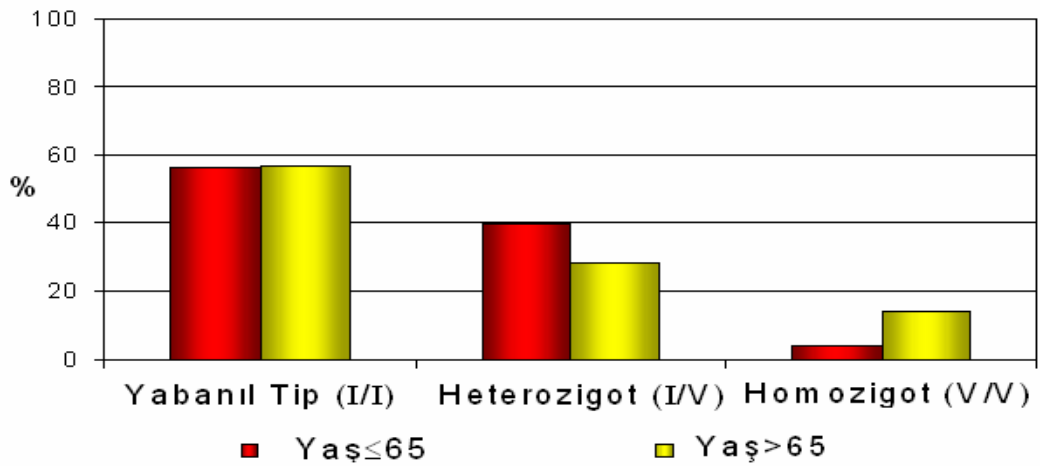
3.2.5.1 Kontrol Grubu

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin kontrol grubundaki dağılımı 65 yaşına eşit ve 65 yaşından küçük olgulara göre değerlendirildiğinde, 48 olgudan 27' sinin (% 56,3) yabanıl (Ile/Ile), 19' unun (% 39,6) heterozigot (Ile/Val), 2' sinin (% 4,1) homozigot (Val/Val) genotipte olduğu saptanmıştır

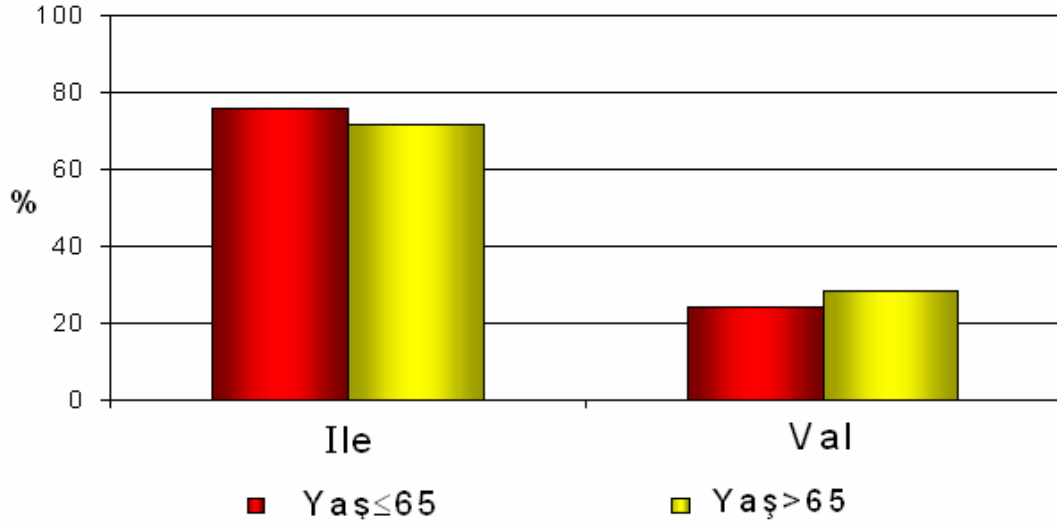
(Tablo 17; Grafik 5). Alel sıklığı ise 73 adet Adenin (Ile) (% 61,9) ve 23 adet Guanin (Val) (% 38,1) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 17; Grafik 6). 65 yaştan büyük olguların dağılımı incelendiğinde, 7 olgudan 4' ünün (% 57,1) yabancı (Ile/Ile), 2' sinin (% 28,6) heterozigot (Ile/Val) ve 1' inin (% 14,3) homozigot (Val/Val) genotipte oldukları belirlenmiştir (Tablo 17; Grafik 5). Alel sıklığı ise 10 adet Adenin (Ile) (% 71,4) ve 4 adet Guanin (Val) (% 28,6) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 17; Grafik 6).

Tablo 17: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin kontrol grubu içerisinde yaşa göre alel sıklığı ve genotip dağılımı

YAŞ	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Ile	Val	Ile/Ile	Ile /Val	Val/Val
Kontrol Grubu					
Yaş≤65 (n= 48)	73 (% 76)	23 (% 24)	27 (% 56,3)	19 (% 39,6)	2 (% 4,1)
Yaş>65 (n=7)	10 (% 71,4)	4 (% 28,6)	4 (% 57,1)	2 (% 28,6)	1 (%14,3)



Grafik 5: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Kontrol Grubu İçerisinde Yaşa Göre Genotip Dağılımı.



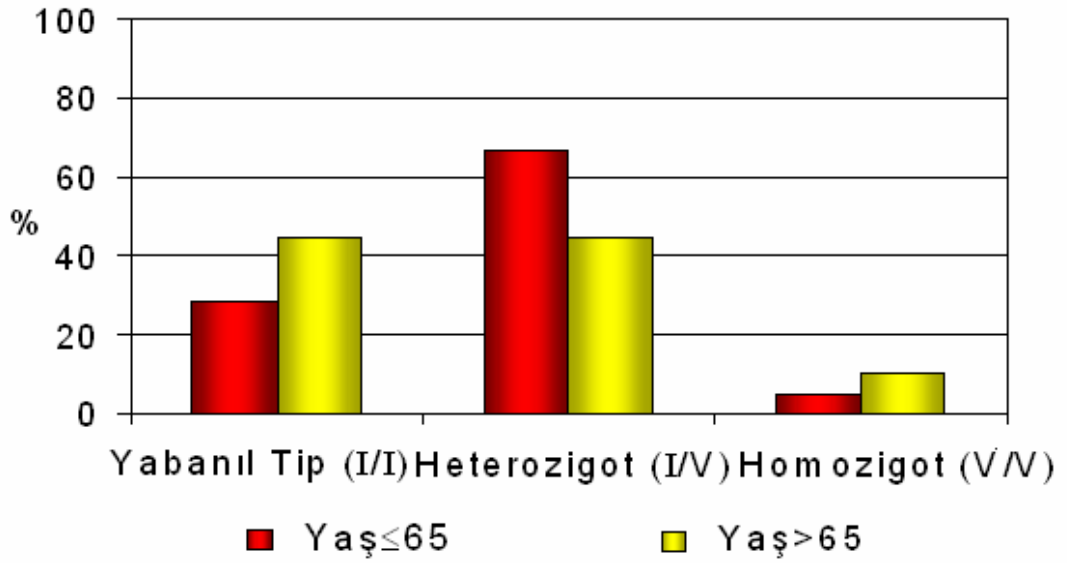
Grafik 6: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Kontrol Grubu İçerisinde Yaşa Göre Alel Sıklığı.

3.2.5.2 Çalışma Grubu

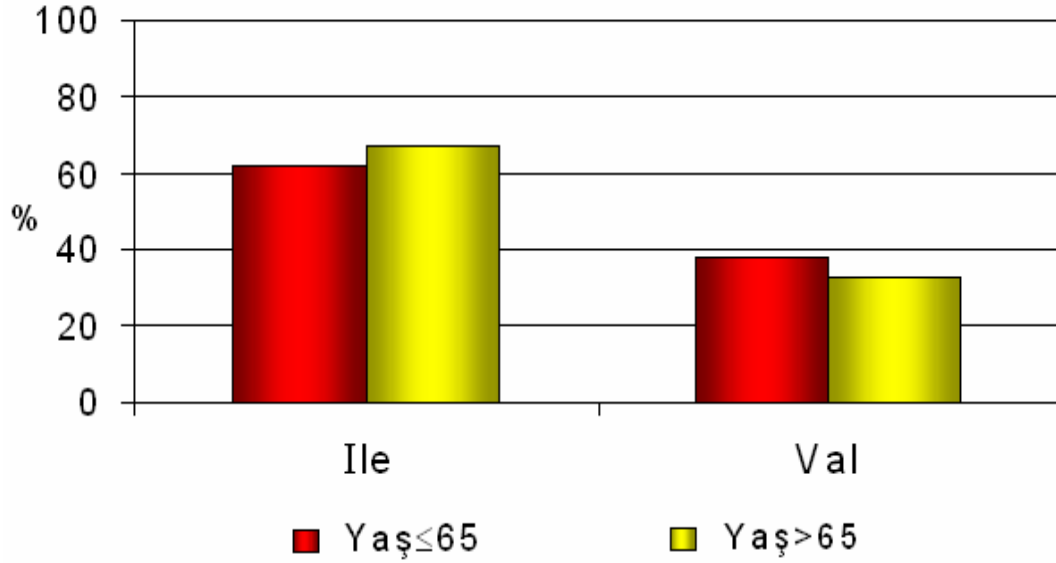
GSTP1 Ile105Val polimorfizminin çalışma grubundaki dağılımı 65 yaşına eşit ve 65 yaşından küçük olgulara göre değerlendirildiğinde, 21 olgudan 6' sının (% 28,6) yabanıl (Ile/Ile), 14' ünün (% 66,7) heterozigot (Ile/Val) ve 1' inin (% 4,7) homozigot (Val/Val) genotipte olduğu saptanmıştır (Tablo 18; Grafik 7). Alel sıklığı ise 26 adet Adenin (Ile) (% 61,9) ve 16 adet Guanin (Val) (% 38,1) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 18; Grafik 8). 65 yaştan büyük olguların dağılımı incelendiğinde, 29 olgudan 13' ünün (%44,8) yabanıl (Ile/Ile), 13' ünün (% 44,8) heterozigot (Ile/Val) ve 3' ünün (% 10,4) homozigot (Val/Val) genotipte oldukları belirlenmiştir (Tablo 18; Grafik 7). Alel sıklığı ise 39 adet Adenin (Ile) (% 67,2) ve 19 adet Guanin (Val) (% 32,8) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 18; Grafik 8).

Tablo 18: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin çalışma grubu içerisinde yaşa göre alel sıklığı ve genotip dağılımı

YAŞ	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Ile	Val	Ile/Ile	Ile /Val	Val/Val
Yaş≤65 (n= 21)	26 (% 61,9)	16 (% 38,1)	6 (% 28,6)	14 (% 66,7)	1 (% 4,7)
Yaş>65 (n=29)	39 (% 67,2)	19 (% 32,8)	13 (% 44,8)	13 (% 44,8)	3 (% 10,4)



Grafik 7: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Genotip Dağılımı.



Grafik 8: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Alel Sıklığı.

3.2.5.2.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisindeki Yaş Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olgular *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve yaş açısından karşılaştırıldıklarında, iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=1,821$, $p>0,05$). Aynı gruplar, *GSTP1* Ile/Val haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=0,309$, $p>0,05$).

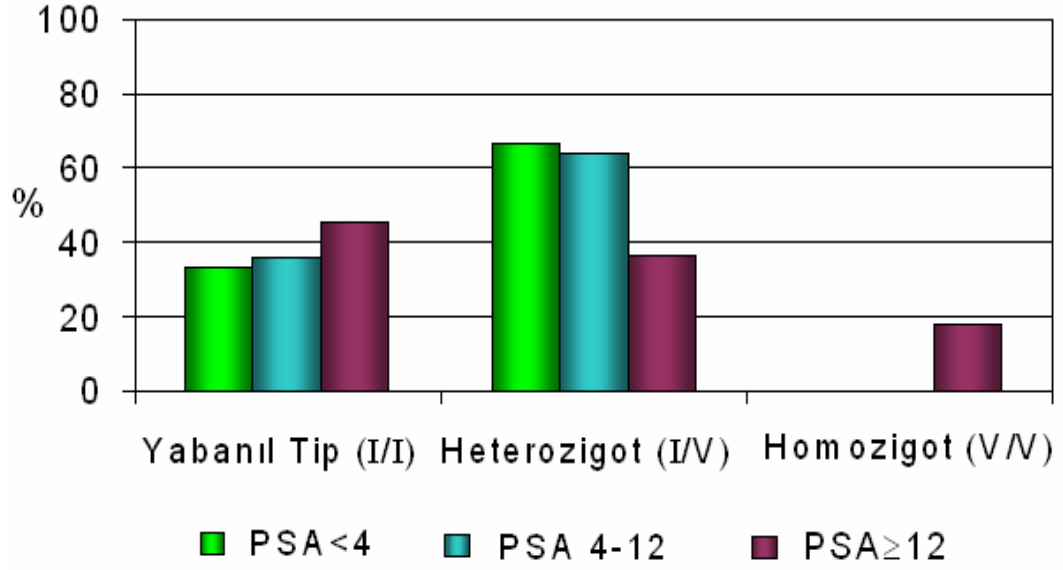
3.2.6 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde PSA' ya Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin çalışma grubundaki PSA' nın 4' den küçük değerlere göre dağılımı incelendiğinde, 3 olgudan 1' inin (% 33,3) yabanıl (Ile/Ile) ve 2' sinin (% 66,7) heterozigot (Ile/Val) genotipte olduğu belirlenmiştir. PSA' nın 4' den küçük değerleri için homozigot (Val/Val) genotipine sahip olgu bulunmamakta idi (Tablo 19; Grafik 9). Alel sıklığı ise, 4

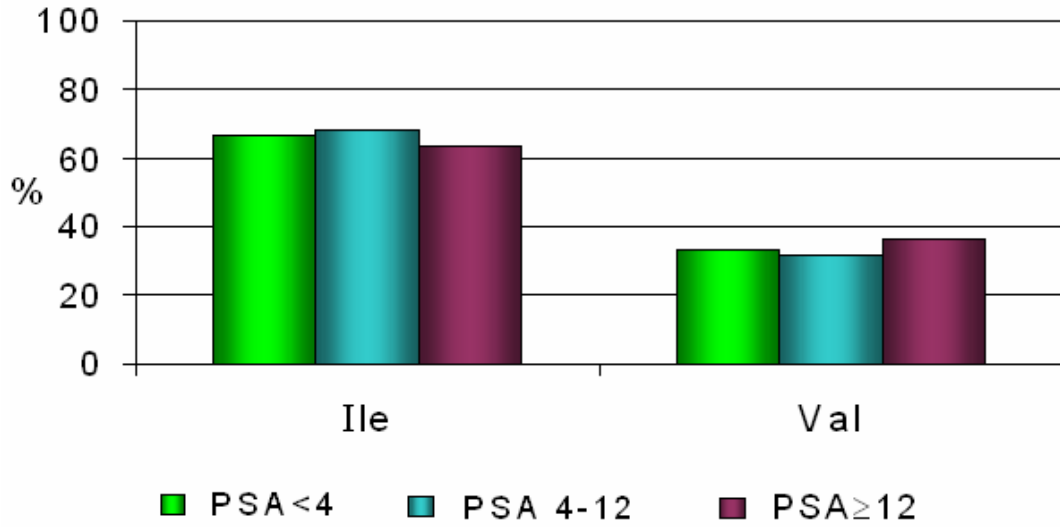
adet Adenin (Ile) (% 66,7) ve 2 adet Guanin (Val) (% 33,3) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 19; Grafik 10). PSA 4 ile 12 arasındaki değerlere göre dağılımı incelendiğinde, 25 olgudan 9' unun (% 36) yabancı (Ile/Ile) ve 16' sının (% 64) heterozigot (Ile/Val) genotipte olduğu belirlenmiştir. PSA 4-12 değerleri için homozigot (Val/Val) genotipine sahip olgu bulunmamakta idi (Tablo 19; Grafik 9). Alel sıklığı ise, 34 adet Adenin (Ile) (% 68) ve 16 adet Guanin (Val) (% 32) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 19; Grafik 10). PSA 12' ye eşit ve 12' den büyük değerlere göre dağılımı incelendiğinde, 22 olgudan 10' unun (% 45,5) yabancı (Ile/Ile), 8' inin (% 36,4) heterozigot (Ile/Val) ve 4' ünün (% 18,2) homozigot genotipte olduğu saptanmıştır (Tablo 19; Grafik 9). Alel sıklığı ise, 28 adet Adenin (Ile) (% 63,6) ve 16 adet Guanin (Val) (% 36,4) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 19; Grafik 10).

Tablo 19: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin çalışma grubu içerisinde PSA' ya göre alel sıklığı ve genotip dağılımı

PSA	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Ile	Val	Ile/Ile	Ile /Val	Val/Val
PSA<4 (n=3)	4 (% 66,7)	2 (% 33,3)	1 (% 33,3)	2 (% 66,7)	0
PSA 4-12 (n=25)	34 (% 68,0)	16 (% 32,0)	9 (% 36,0)	16 (% 64,0)	0
PSA≥12 (n=22)	28 (% 63,6)	16 (% 36,4)	10 (% 45,5)	8 (% 36,4)	4 (% 18,2)



Grafik 9: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde PSA'ya Göre Genotip Dağılımı.



Grafik 10: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde PSA'ya Göre Alel Sıklığı.

3.2.6.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisindeki PSA Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

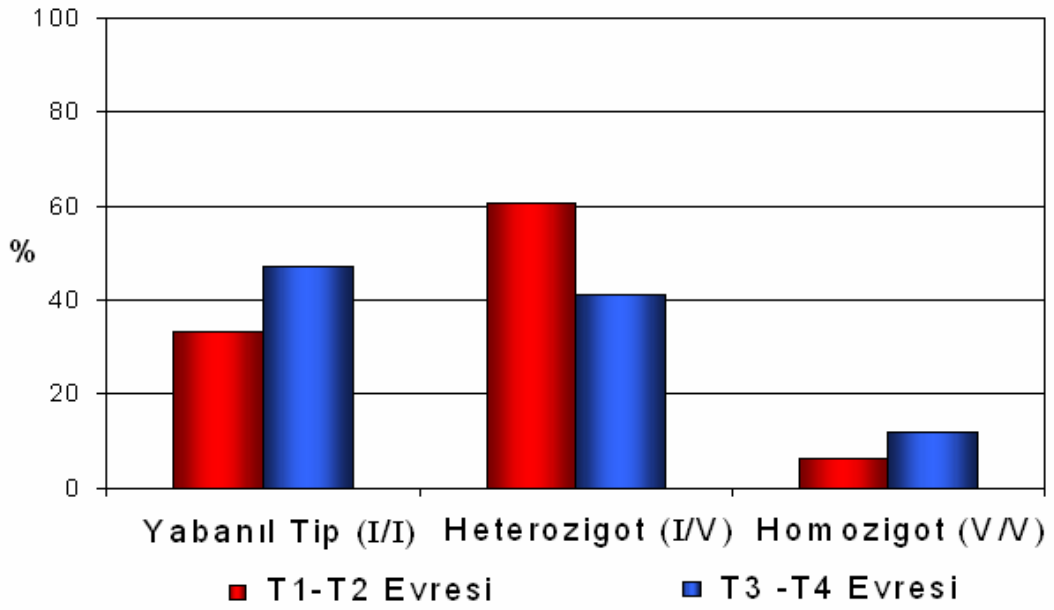
Çalışma grubunu oluşturan olgular *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve PSA değerleri açısından incelendiğinde, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=7,239$, $p>0,05$). Aynı gruplar, *GSTP1* Ile/Val haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=0,200$, $p>0,05$).

3.2.7 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Kanserin Gelişim Evresi' ne Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı

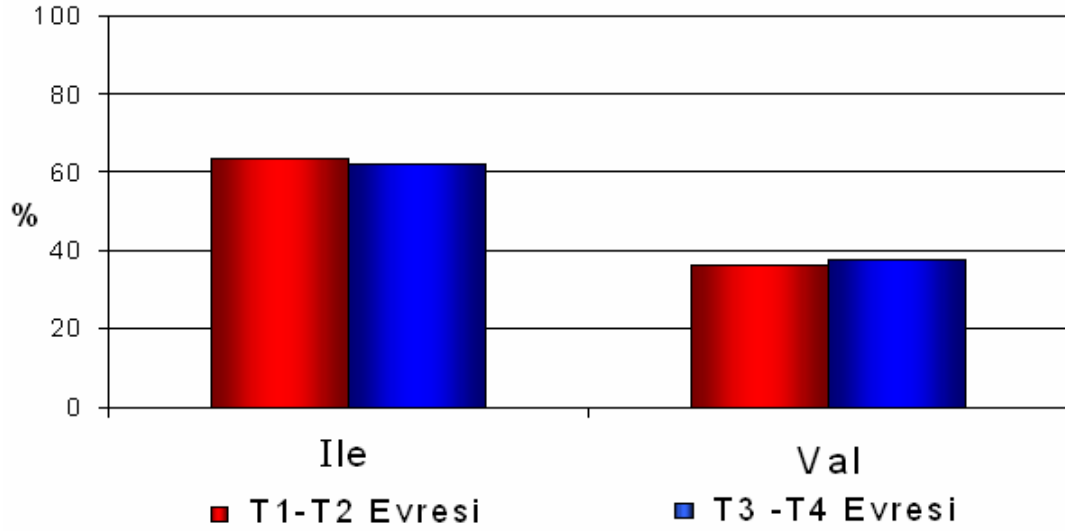
GSTP1 Ile105Val polimorfizminin çalışma grubundaki dağılımı kanser gelişiminin erken evresi T1-T2' ye göre incelendiğinde, 33 olgudan 11' inin (% 33,3) yabanıl (Ile/Ile), 20' sinin (% 60,6) heterozigot (Ile/Val) ve 2' sinin (% 6,1) homozigot (Val/Val) genotipte olduğu saptanmıştır (Tablo 20; Grafik 11). Alel sıklığı ise, 42 adet Adenin (Ile) (% 63,6) ve 24 adet Guanin (Val) (% 36,4) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 20; Grafik 12). Kanser gelişiminin geç evresi T3-T4' e göre dağılımı incelendiğinde, 17 olgudan 8' inin (% 47,1) yabanıl (Ile/Ile), 7' sinin (% 41,2) heterozigot (Ile/Val) ve 2' sinin (% 11,8) homozigot (Val/Val) genotipte oldukları belirlenmiştir (Tablo 20; Grafik 11). Alel sıklığı ise, 23 adet Adenin (Ile) (% 62,2) ve 11 adet Guanin (Val) (% 37,8) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 20; Grafik 12).

Tablo 20: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin çalışma grubu içerisinde kanser gelişim evresine göre alel sıklığı ve genotip dağılımı

EVRE	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Ile	Val	Ile/Ile	Ile /Val	Val/Val
T1-T2 Evresi (n=33)	42 (% 63,6)	24 (% 36,4)	11 (% 33,3)	20 (% 60,6)	2 (% 6,1)
T3-T4 Evresi (n=17)	23 (% 62,2)	11 (% 37,8)	8 (% 47,1)	7 (% 41,2)	2 (% 11,8)



Grafik 11: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Kanser Gelişim Evresine Göre Genotip Dağılımı.



Grafik 12: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Kanser Gelişim Evresine Göre Alel Sıklığı.

3.2.7.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisindeki Kanser Gelişim Evresi Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

Çalışma grubunu oluşturan olgular *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve kanserin gelişim evresi açısından karşılaştırıldıklarında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=1,797$, $p>0,05$). Aynı gruplar, *GSTP1* Ile/Val haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=0,022$, $p>0,05$).

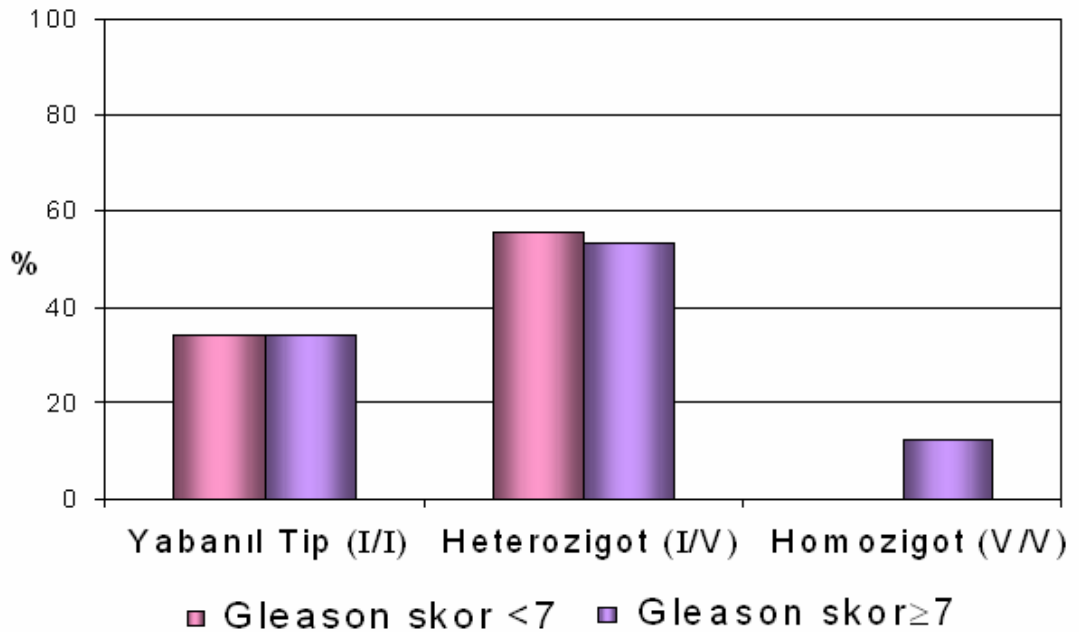
3.2.8 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor' a Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin çalışma grubundaki dağılımı 7' den küçük Gleason Skor' a göre incelendiğinde, 18 olgudan 8' inin (% 34,4) yabancı (Ile/Ile) ve 10' unun (% 55,6) heterozigot (Ile/Val) genotipe olduğu saptanmıştır; homozigot (Val/Val) genotipe sahip olgu bulunmamakta idi (Tablo 21; Grafik 13). Alel sıklığı ise, 26 adet Adenin (Ile) (% 72,2) ve 10 adet

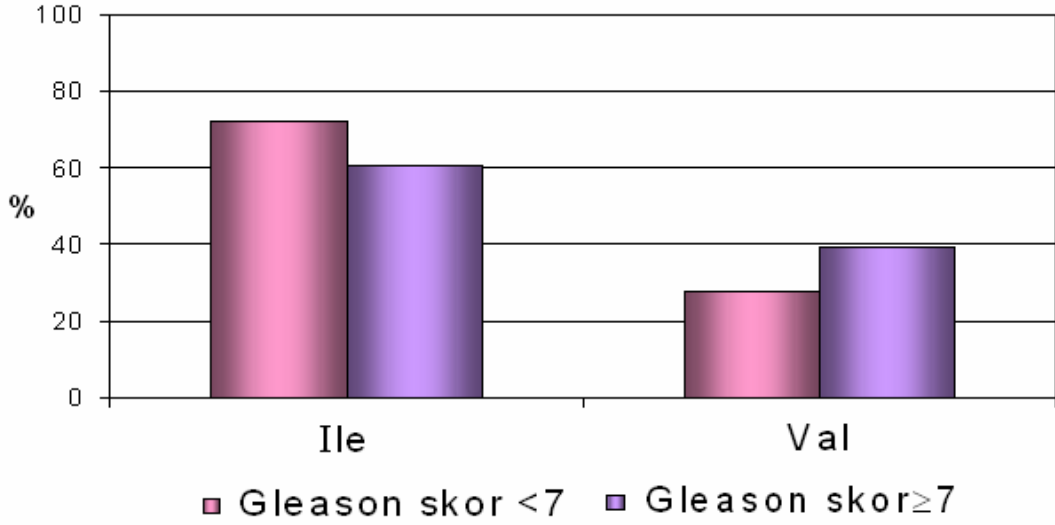
Guanin (Val) (% 27,8) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 21; Grafik 14). 7' ye eşit ve 7' den büyük Gleason Skor değerlerine göre incelendiğinde, 32 olgudan 11' inin (% 34,4) yabancı (Ile/Ile), 17' sinin (% 53,1) heterozigot (Ile/Val) ve 4' ünün homozigot (Val/Val) (% 12,5) genotipte olduğu saptanmıştır (Tablo 21; Grafik 13). Alel sıklığı incelendiğinde, 39 adet Adenin (Ile) (% 60,9) ve 25 adet Guanin (Val) (% 39,1) haplotipi belirlenmiştir (Tablo 21; Grafik 14).

Tablo 21: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin çalışma grubu içerisinde Gleason Skor' a göre alel sıklığı ve genotip dağılımı

Gleason Skor	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Ile	Val	Ile/Ile	Ile /Val	Val/Val
Gleason Skor<7 (n=18)	26 (% 72,2)	10 (% 27,8)	8 (% 34,4)	10 (% 55,6)	0
Gleason Skor≥7 (n=32)	39 (% 60,9)	25 (% 39,1)	11 (% 34,4)	17 (% 53,1)	4 (% 12,5)



Grafik 13: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor Değerine Göre Genotip Dağılımı.



Grafik 14: *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor Değerine Göre Alel Sıklığı.

3.2.8.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Çalışma Grubu İçerisindeki Gleason Skor Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

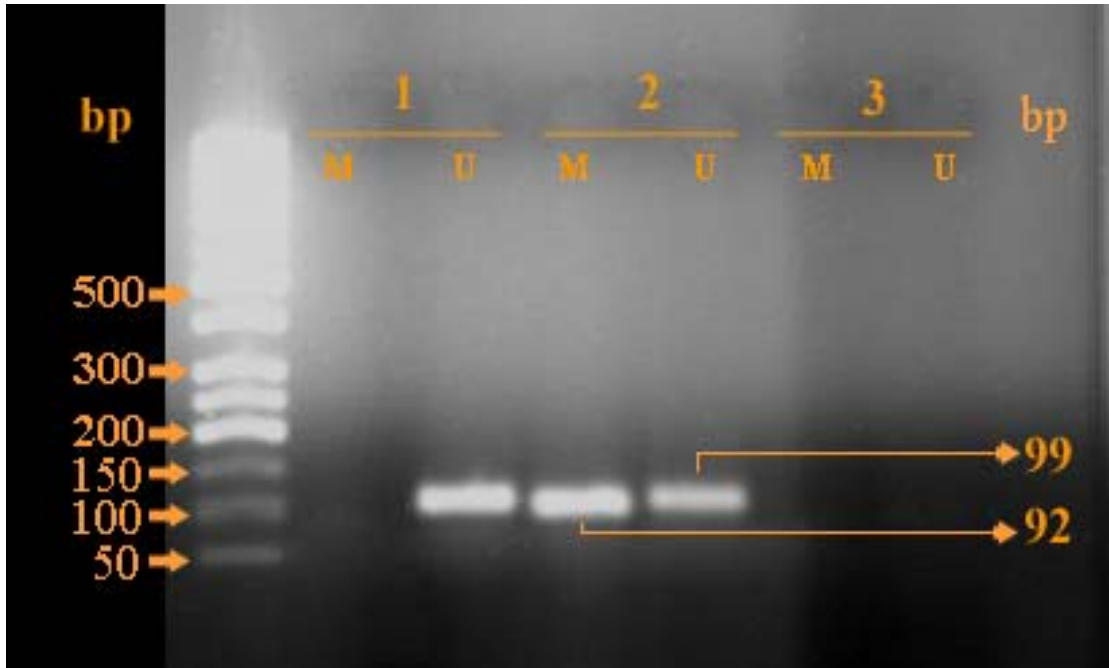
Çalışma grubunu oluşturan olgular *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve Gleason Skor' u açısından karşılaştırıldıklarında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=2,570$, $p>0,05$). Aynı gruplar, *GSTP1* Ile/Val haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=1,290$, $p>0,05$).

3.3 Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olgularının, normalde metillenmemiş halde bulunması gereken *GSTP1* geni promoter bölge metilasyon durumları, plazmalarından izole edilen serbest DNA' larından araştırılmıştır. Elde edilen bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

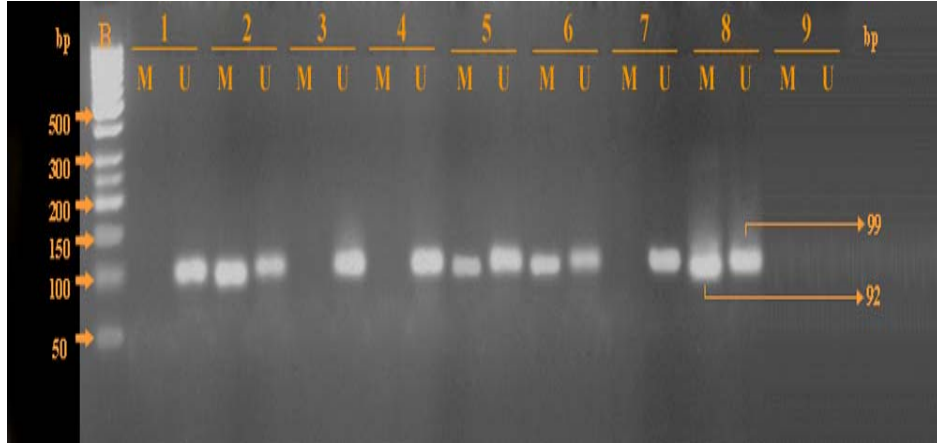
3.3.1 Glutasyon S-transferaz P1 (GSTP1) Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonuna Ait Bulgular

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olguların bisüfit ile muamele edilmiş serbest DNA' larından dış primerle (External Up, External Down) yapılan PCR işlemi sonucunda 153 bç' lik PCR ürünleri oluşmuştur. Plazmadaki serbest DNA konsantrasyonu çok düşük olduğundan 1.PCR sonucunda görüntülenebilecek miktarda PCR ürünü oluşmamaktadır. 2. PCR' da metile bölgelere özgül primerler (IntMe-S, IntMe-AS) ile yapılan PCR işlemi sonucunda oluşan 92 bç' lik, ve metile olmayan bölgelere özgül primerler (IntUn-S, IntUn-AS) ile yapılan PCR işlemi sonucunda oluşan 99 bç' lik PCR ürünlerinin % 2' lik agaroz jel görüntüleri Şekil 19 ve 20' de gösterilmiştir.



Şekil 19: Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait serbest plazma DNA' larla yapılan GSTP1 geninin promoter bölge hipermetilasyon analizi jel görüntüsü. M: Metillenmiş (92 bç), U: Metillenmemiş (99 bç).

B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1: No' lu olgu metillenmemiş, H1; 2: No' lu olgu metillenmiş, H8; 3: Negatif Kontrol.



Şekil 20: Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait serbest plazma DNA' larla yapılan GSTP1 geninin promoter bölge hipermetilasyon analizi jel görüntüsü. M: Metillenmiş (92 bç), U: Metillenmemiş (99 bç).

B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1, 3, 4 ve 7: No' lu olgular metile olmamış, H4, K12, H18, K27; 2, 5 ve 6: No' lu olgular metillenmiş, K8, H34, H10; 8: No' lu olgu, IVD (+ kontrol); 9: Negatif Kontrol (-). Not: IVD normal bir bireyin DNA' sının DNA metilaz yardımıyla DNA' daki tüm CpG dinükleotidleri metile hale getirilerek metilasyon analizinde pozitif kontrol olarak kullanılır.

3.3.2 GSTP1 Geninin Promoter Bölge Hipermetilasyon Analizi

3.3.2.1 Kontrol Grubu:

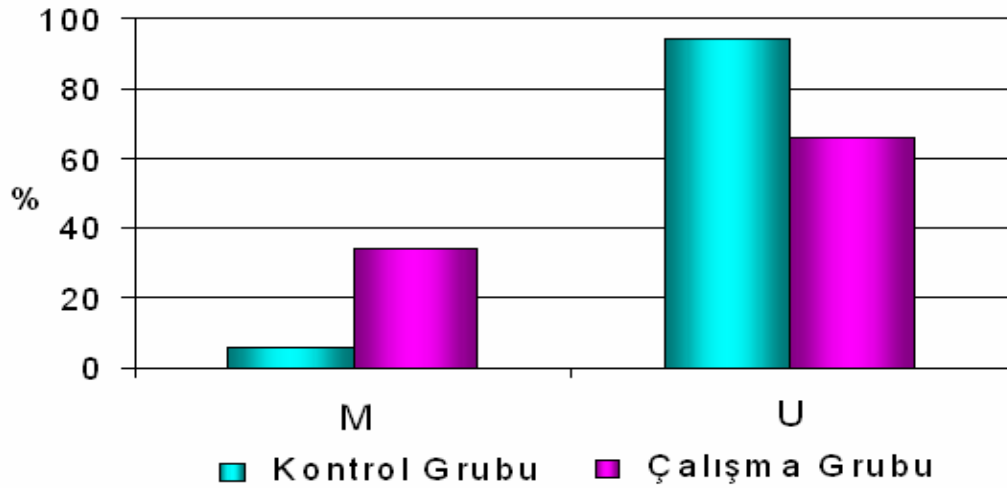
GSTP1 geni promoter bölge hipermetilasyonu incelenen ve toplam 55 olgudan oluşan bu grupta, 3 olgunun (% 5,5) metile olduğu ve 52 olgunun da (% 94,5) metile olmadığı saptanmıştır (Tablo 22; Grafik 15).

3.3.2.2 Çalışma Grubu:

Prostat kanseri tanısı konmuş 50 olgudan, 17' sinin (% 34) metile olduğu ve 33 olgunun da (% 66) metile olmadığı saptanmıştır (Tablo 22; Grafik 15).

Tablo 22: Kontrol ve Çalışma Grubunda *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyon Dağılımı ve Yüzdesi

<i>GSTP1</i>	Metilasyon Dağılımı	
	Metillenmiş (M)	Metillenmemiş (U)
Kontrol grubu (n=55)	3 (% 5,5)	52 (% 94,5)
Çalışma grubu (n=50)	17 (% 34)	33 (% 66)
Toplam (n=105)	20 (% 19)	85 (% 81)



Grafik 15: Kontrol ve çalışma gruplarının *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyon analiz sonuçlarının karşılaştırılması

3.3.2.3 Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu İçin İstatistiksel Analizi

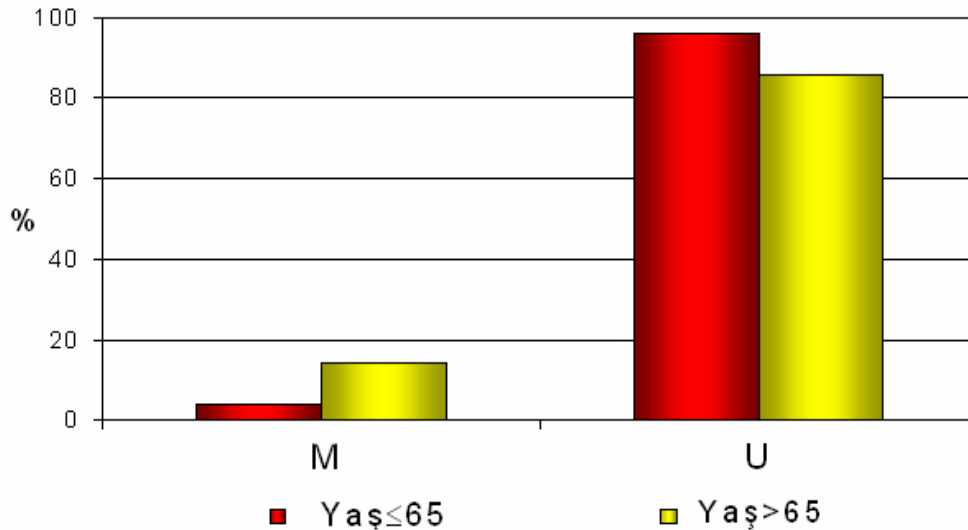
Kontrol ve çalışma grubu *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyon analiz sonuçları açısından karşılaştırıldıklarında, iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmış ve metilasyonun çalışma grubunda belirgin bir artışı gözlenmiştir ($\chi^2=15,273$, $p<0,001$).

3.3.2.2.1 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Kontrol Grubu İçerisinde Yaşa Göre Dağılımı

GSTP1 geni promoter bölge hipermetilasyonunun kontrol grubundaki dağılımı 65 yaşına eşit ve 65 yaştan küçük olgulara göre incelendiğinde, 48 olgudan 2' sinin (% 4,2) metile (M) ve 46' sının (% 95,8) metile olmadığı (U) saptanmıştır. 65 yaştan büyük olguların dağılımı incelendiğinde, 7 olgudan 1' inin (% 14,3) metile (M) ve 6' sının (% 85,7) metile olmadığı (U) saptanmıştır (Tablo 23; Grafik 16).

Tablo 23: *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun kontrol grubu içerisinde yaşa göre dağılımı

YAŞ	Metilasyon Dağılımı	
	Metillenmiş (M) (n=3)	Metillenmemiş (U) (n=52)
Yaş≤65 (n= 48)	2 (% 4,2)	46 (% 95,8)
Yaş>65 (n=7)	1 (% 14,3)	6 (% 85,7)



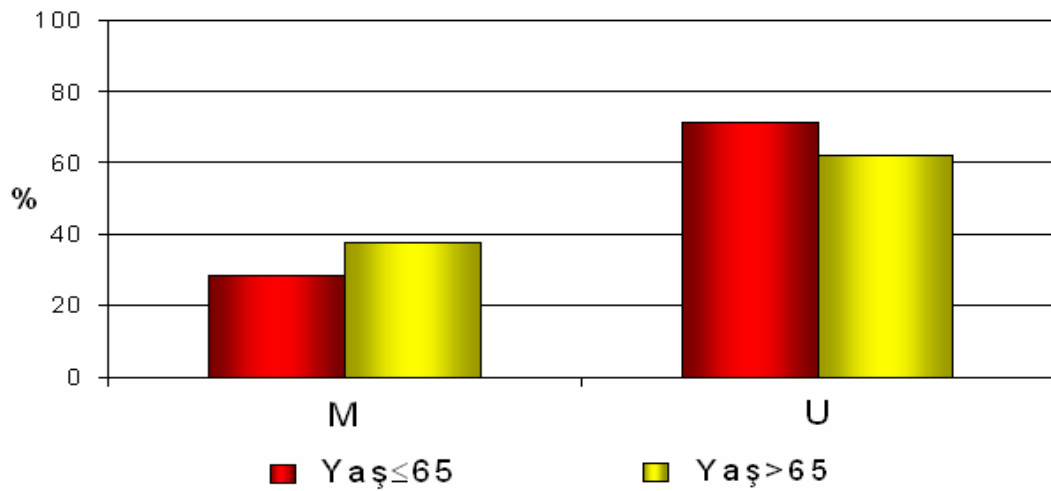
Grafik 16: *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Kontrol Grubu İçerisinde Yaş Değerlerine Göre Dağılımı.

3.3.2.2.2 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Dağılımı

GSTP1 geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki dağılımı 65 yaşına eşit ve 65 yaştan küçük olgulara göre incelendiğinde, 21 olgudan 6' sının (% 28,6) metile (M) ve 15' inin (% 71,4) metile olmadığı (U) saptanmıştır. 65 yaştan büyük olguların dağılımı incelendiğinde, 29 olgudan 11' inin (% 37,9) metile (M) ve 18' inin (% 62,1) metile olmadığı (U) saptanmıştır (Tablo 24; Grafik 17).

Tablo 24: *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubu içerisinde yaşa göre dağılımı

YAŞ	Metilasyon Dağılımı	
	Metillenmiş (M) (n=17)	Metillenmemiş (U) (n=33)
Yaş≤65 (n= 21)	6 (% 28,6)	15 (% 71,4)
Yaş>65 (n=29)	11 (% 37,9)	18 (% 62,1)



Grafik 17: *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Yaş Değerlerine Göre Dağılımı.

3.3.2.2.1 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisindeki Yaş Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

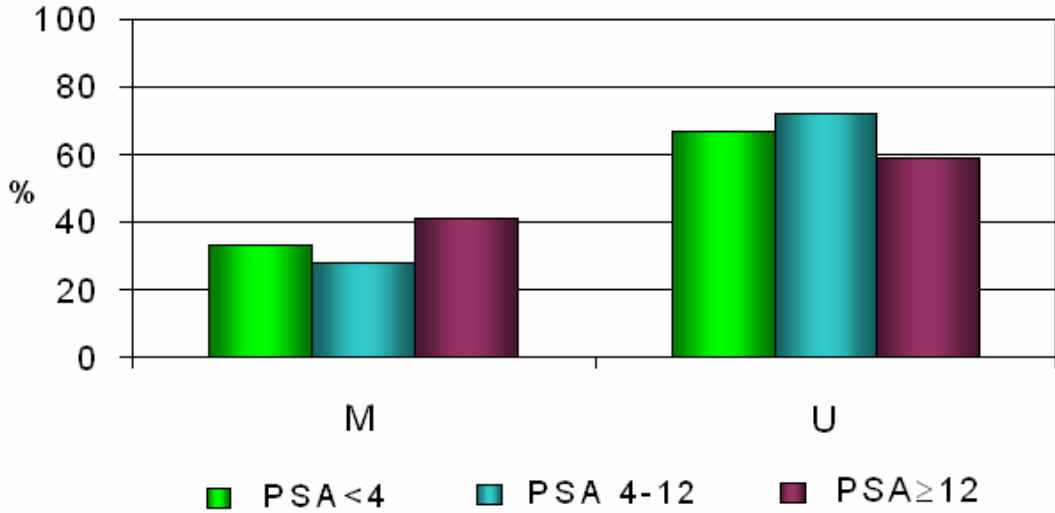
Kontrol ve çalışma grubunda *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyon analiz sonuçları, olguların yaşlarına göre karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=0,844$, $p>0,05$).

3.3.2.2.3 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde PSA' ya Göre Dağılımı

GSTP1 geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki PSA' nın 4' den küçük değerlere göre dağılımı incelendiğinde, 3 olgudan 1' inin (% 33,3) metile (M) ve 2' sinin (% 66,7) metile olmadığı (U); PSA 4 ile 12 arasındaki değerlere göre dağılımı incelendiğinde, 25 olgudan 7' sinin (% 28) metile ve 18' inin (% 72) metile olmadığı (U); ve PSA 12' ye eşit ve 12' den büyük değerlere göre dağılımı incelendiğinde ise, 22 olgudan 9' unun (% 40,9) metile (M) ve 13' ünün (% 59,1) metile olmadığı (U) saptanmıştır (Tablo 25; Grafik 18).

Tablo 25: *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubu içerisinde PSA' ya göre dağılımı

PSA	Metilasyon Dağılımı	
	Metillenmiş (M) (n=17)	Metillenmemiş (U) (n=33)
PSA<4 (n=3)	1 (% 33,3)	2 (% 66,7)
PSA 4-12 (n=25)	7 (% 28,0)	18 (% 72,0)
PSA≥12 (n=22)	9 (% 40,9)	13 (% 59,1)



Grafik 18: *GSTP1* Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde PSA Değerlerine Göre Dağılımı.

3.3.2.2.3.1 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisindeki PSA Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

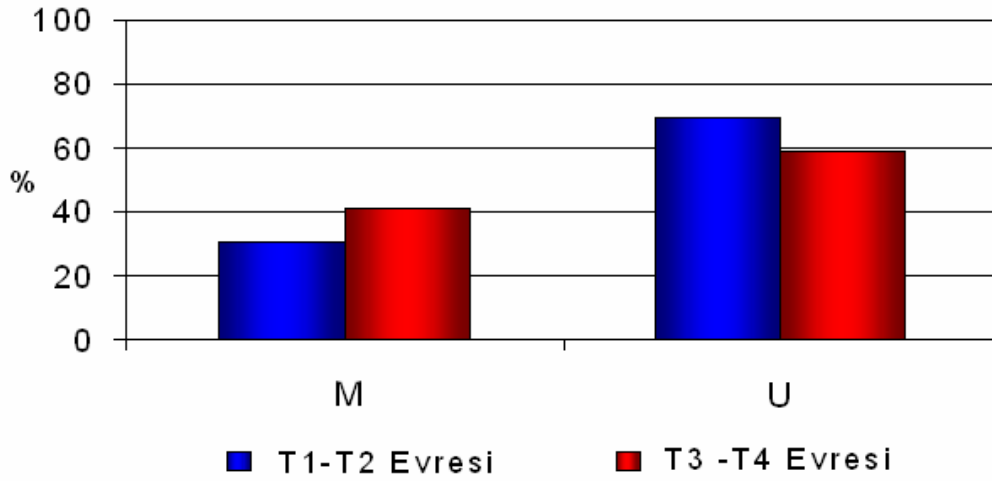
Çalışma grubu *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyon analiz sonuçları ve PSA değerleri açısından karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=0,870$, $p>0,05$).

3.3.2.2.4 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Kanser Gelişim Evresine Göre Dağılımı

GSTP1 geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki dağılımı kanser gelişiminin erken evresi T1-T2' ye göre incelendiğinde, 33 olgudan 10' unun (% 30,3) metile (M) ve 23' ünün (% 69,7) metile olmadığı (U) saptanmıştır. Kanser gelişiminin geç evresi T3-T4' e göre dağılımı incelendiğinde, 17 olgudan 7' sinin (% 41,1) metile (M) ve 10' unun (% 58,9) metile olmadığı (U) saptanmıştır (Tablo 26; Grafik 19).

Tablo 26: *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubu içerisinde kanser gelişimi evresine göre dağılımı

EVRE	Metilasyon Dağılımı	
	Metillenmiş (M) (n=17)	Metillenmemiş (U) (n=33)
T1-T2 Evresi (n=33)	10 (% 30,3)	23 (% 69,7)
T3-T4 Evresi (n=17)	7 (% 41,1)	10 (% 58,9)



Grafik 19: *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Kanser Gelişim Evresine Göre Dağılımı.

3.3.2.2.4.1 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisindeki Kanser Gelişim Evresinin Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

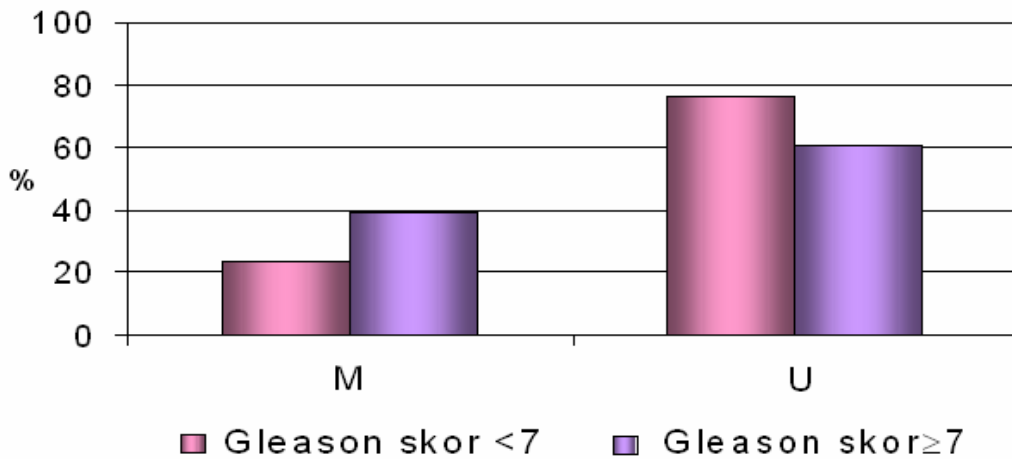
Çalışma grubu *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyon analiz sonuçları, kanser gelişim evreleri ile karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=1,367$, $p>0,05$).

3.3.2.2.5 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor' a Göre Dağılımı

GSTP1 geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki 7' den küçük Gleason Skor değerlerine göre dağılımı incelendiğinde, 18 olgudan 4' ünün (% 22,2) metile (M) ve 14' ünün (% 77,8) metile olmadığı (U) saptanmıştır. 7' ye eşit ve 7' den büyük Gleason Skor değerlerine göre dağılımı incelendiğinde, 32 olgudan 13' ünün (% 39,4) metile ve 19' unun (% 60,6) metile olmadığı (U) saptanmıştır (Tablo 27; Grafik 20).

Tablo 27: *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubu içerisinde Gleason Skor' a göre dağılımı

Metilasyon Dağılımı		
Gleason Skor	Metillenmiş (M) (n=17)	Metillenmemiş (U) (n=33)
Gleason Skor <7 (n=18)	4 (% 23,5)	14 (% 76,5)
Gleason Skor ≥7 (n=32)	13 (% 39,4)	19 (% 60,6)



Grafik 20: *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor Değerlerine Göre Dağılımı.

3.3.2.2.5.1 *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

Çalışma grubu *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyon analiz sonuçları, Gleason Skor değerleri ile karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=1,258$, $p>0,05$).

3.3.3 Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Bileşik Analizi

Kontrol ve çalışma grupları için *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun araştırılması tamamlandığında, bazı olguların iki çalışma için yabancı/M, yabancı/U, heterozigot/M, heterozigot/U ve homozigot/M, homozigot/U oldukları belirlenmiştir ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

3.3.3.1 Kontrol grubu:

GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun bileşik analizlerinde kontrol grubunu oluşturan 55 olgudan hiç yabancı genotip/ metile (II/M) olgu bulunmamakta idi, 31' i (% 56,4) yabancı genotip/ metile olmayan (II/U); 2' si (% 3,6) heterozigot genotip/ metile (IV/M), 19' u (% 34,5) heterozigot genotip/metile olmayan (IV/U); 1' i (% 1,8) homozigot genotip/metile(VV/M) ve 2' si (% 3,7) homozigot genotip/ metile olmayan (VV/U) olarak saptanmıştır (Tablo 28; Grafik 21).

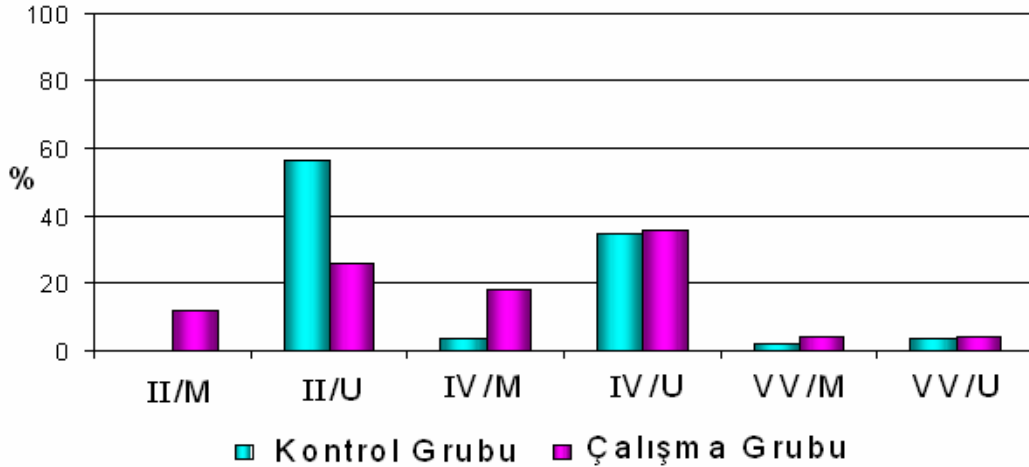
3.3.3.2 Çalışma grubu:

Çalışma grubunu oluşturan 50 olgudan 6' sı (% 12,0) yabancı genotip/ metile (II/M), 13' ü (% 26,0) yabancı genotip/ metile olmayan (II/U) ; 9' u (%

18,0) heterozigot genotip/ metile (IV/M), 18' i (% 36,0) heterozigot genotip/metile olmayan (IV/U); 2' si (% 4,0) homozigot genotip/metile (VV/M), ve 2' si (% 4,0) homozigot/ metile olmayan (VV/U) olarak saptanmıştır (Tablo 28; Grafik 21).

Tablo 28: Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için Bileşik Analiz Sonuçları

Bileşik Analiz	KONTROL GRUBU (n=55)	ÇALIŞMA GRUBU (n=50)
II/M	0	6 (% 12,0)
II/U	31 (% 56,4)	13 (% 26,0)
IV/M	2 (% 3,6)	9 (% 18,0)
IV/U	19 (% 34,5)	18 (% 36,0)
VV/M	1 (% 1,8)	2 (% 4,0)
VV/U	2 (% 3,7)	2 (% 4,0)



Grafik 21: Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için Bileşik Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması.

3.3.3.3.1 Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için Bileşik Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için bileşik analizleri gerçekleştirildiklerinde, iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmış ve II/M bileşik analiz sonuçlarının çalışma grubunda belirgin bir artışı gözlenmiştir ($\chi^2=17,981$, $p<0,005$).

3.3.3.2.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Dağılımı

3.3.3.2.1.1 Kontrol Grubu:

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun kontrol grubundaki 65 yaşına eşit ve 65 yaşından küçük olgulara göre dağılımı incelendiğinde, 48 olgudan 27' sinin (% 56,3) II/U, 2' sinin (% 4,2) IV/M, 17' sinin (% 35,4) IV/U ve 2' sinin (% 4,2) VV/U; ve 65 yaştan büyük olguların dağılımı incelendiğinde, 7 olgudan 4' ünün (% 57,1) II/U, 2' sinin (% 28,6) IV/U ve 1' inin (% 14,3) VV/M olduğu saptanmıştır (Tablo 29; Grafik 22).

Tablo 29: Kontrol Grubunun *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için Yaşa Göre Bileşik Analiz Sonucu

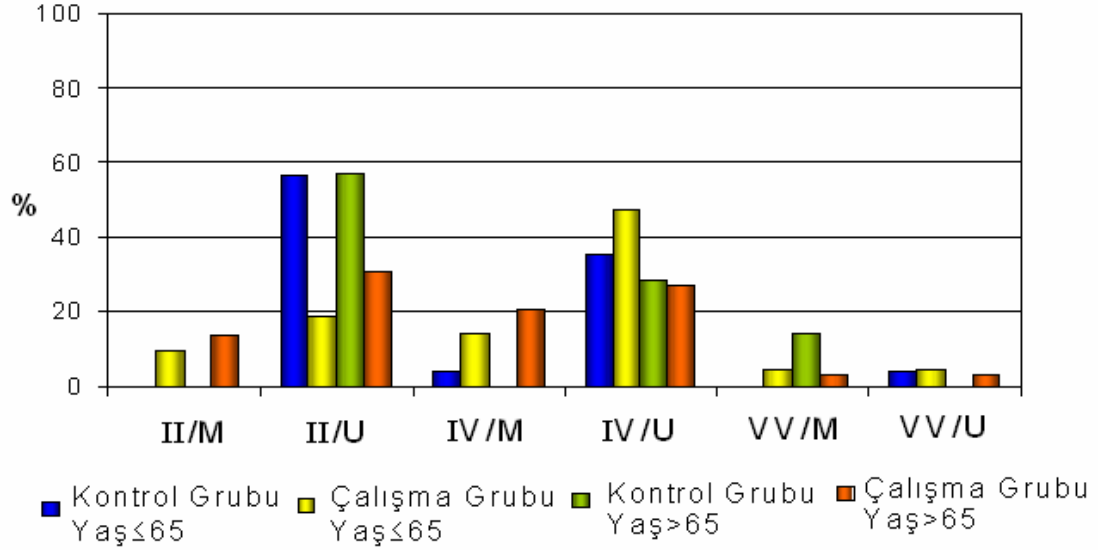
YAŞ	Polimorfizm/Metilasyon Dağılımı					
	II/M (n=0)	II/U (n=31)	IV/M (n=2)	IV/U (n=19)	VV/M (n=1)	VV/U (n=2)
Yaş≤65 (n=48)	0	27 (% 56,3)	2 (% 4,2)	17 (% 35,4)	0	2 (% 4,2)
Yaş>65 (n=7)	0	4 (% 57,1)	0	2 (% 28,6)	1(% 14,3)	0

3.3.3.2.1.2 Çalışma Grubu:

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki 65 yaşına eşit ve 65 yaşından küçük olgulara göre dağılımı incelendiğinde, 21 olgudan 2' sinin (% 9,5) II/M, 4' ünün (% 19) II/U, 3' ünün (% 14,3) IV/M, 10' unun (% 47,6) IV/U, 1' inin (% 4,8) VV/M, 1' inin (% 4,8) VV/U ; ve 65 yaştan büyük olguların dağılımı incelendiğinde, 29 olgudan 4' ünün (% 13,8) II/M, 9' unun (% 31) II/U, 6' sının (% 20,7) IV/M, 8' inin (% 27,6) IV/U, 1' inin (% 3,4) VV/M ve 1' inin (% 3,4) VV/U olduğu saptanmıştır (Tablo 30; Grafik 22).

Tablo 30: Çalışma Grubunun *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için Yaşa Göre Bileşik Analiz Sonucu

YAŞ	Polimorfizm/Metilasyon Dağılımı					
	II/M (n=6)	II/U (n=13)	IV/M (n=9)	IV/U (n=18)	VV/M (n=2)	VV/U (n=2)
Yaş≤65 (n=21)	2(% 9,5)	4 (% 19)	3 (% 14,3)	10 (% 47,6)	1 (% 48)	1 (% 4,2)
Yaş>65 (n=29)	4 (% 13,8)	9 (% 31)	6 (% 20,7)	8 (% 27,6)	1 (% 3, 4)	1 (% 3, 4)



Grafik 22: Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki yaşa göre dağılımı

3.3.3.2.1.3 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Yaş Değerleri için İstatistiksel Analizi

Kontrol ve Çalışma Gruplarının *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için bileşik analiz sonuçları yaş değerleri ile karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=7,254$, $p>0,05$).

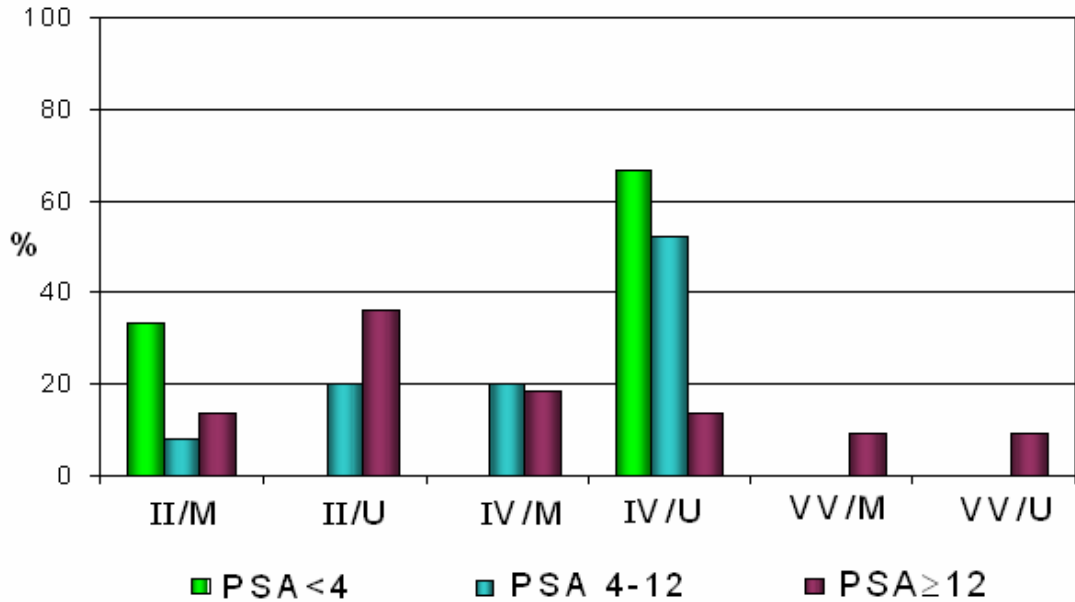
3.3.3.2.2 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde PSA' ya Göre Dağılımı

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki PSA' nın 4' den küçük değerlere göre dağılımı incelendiğinde, 3 olgudan 1' inin (% 33,3) II/M, 2' sinin (% 66,7) IV/U; PSA 4 ile 12 arasındaki değerlere göre dağılımı incelendiğinde, 25

olgudan 2' sinin (% 8) II/M, 5' inin (% 20) II/U, 13' ünün (% 52) IV/U; ve PSA 12' ye eşit ve 12' den büyük değerlere göre dağılımı incelendiğinde ise, 22 olgudan 3' ünün (% 13,6) II/M, 8' inin (% 36,4) II/U, 4' ünün (% 18,2) IV/M, 3' ünün (%13,6) IV/U, 2' sinin (% 9,1) VV/M ve 2' sinin (% 9,1) VV/U olduğu saptanmıştır (Tablo 31; Grafik 23).

Tablo 31: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubu içerisinde PSA' ya göre dağılımı

PSA	Polimorfizm/Metilasyon Dağılımı					
	II/M (n=6)	II/U (n=13)	IV/M (n=9)	IV/U (n=18)	VV/M (n=2)	VV/U (n=2)
PSA<4 (n=3)	1 (% 33,3)	0	0	2 (% 66,7)	0	0
PSA 4-12 (n=25)	2 (% 8)	5 (% 20)	5 (% 20)	13 (% 52)	0	0
PSA≥12 (n=22)	3 (% 13,6)	8 (% 36,4)	4 (% 18,2)	3 (%13,6)	2 (% 9,1)	2 (% 9,1)



Grafik 23: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki PSA' ya göre dağılımı

3.3.3.2.2.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde PSA Değerleri için İstatistiksel Analizi

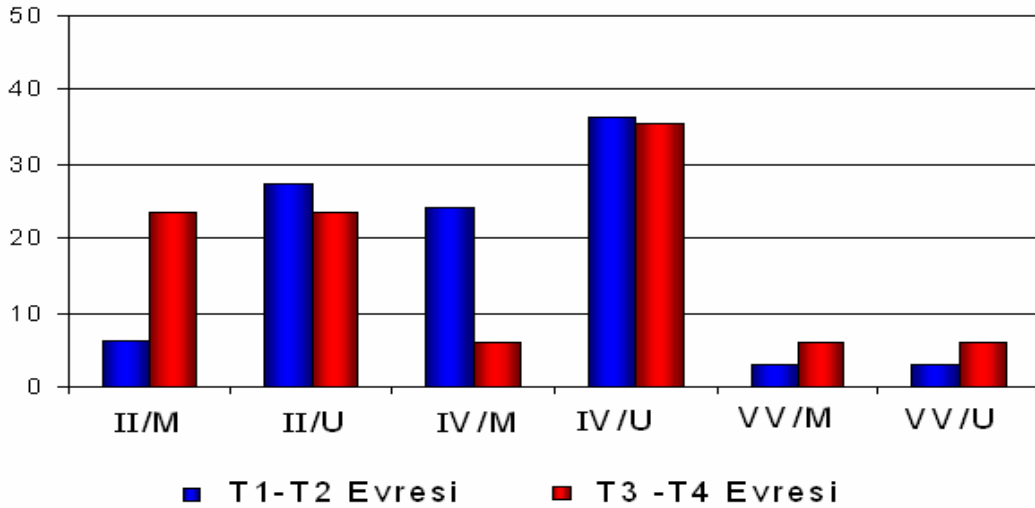
Çalışma Grubunun *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için bileşik analiz sonuçları PSA değerleri ile karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=14,860$, $p>0,05$).

3.3.3.2.3 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Kanser Gelişim Evresine Göre Dağılımı

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki dağılımı kanser gelişiminin erken evresi T1-T2' ye göre incelendiğinde, 33 olgudan 2' sinin (% 6,1) II/M, 9' unun (% 27,3) II/U, 8' inin (% 24,2) IV/M, 12' sinin (% 36,4) IV/U, 1' inin (% 3) VV/M ve 1' inin (% 3) VV/U olduğu saptanmıştır. Kanser gelişiminin geç evresi T3-T4' e göre dağılımı incelendiğinde, 17 olgudan 4' ünün (% 23,5) II/M, 4' ünün (% 23,5) II/U, 1' inin (% 5,9) VV/M, 6' sının (%35,3) IV/U, 1' inin (% 5,9) VV/M, ve 1' inin (% 5,9) VV/U olduğu saptanmıştır (Tablo 32; Grafik 24).

Tablo 32: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubu içerisinde kanser gelişimi evresine göre dağılımı

EVRE	Polimorfizm/Metilasyon Dağılımı					
	II/M (n=6)	II/U (n=13)	IV/M (n=9)	IV/U (n=18)	VV/M (n=2)	VV/U (n=2)
T1-T2 Evresi (n=33)	2 (% 6,1)	9 (% 27,3)	8 (% 24,2)	12 (% 36,4)	1 (% 3)	1 (% 3)
T3-T4 Evresi (n=17)	4 (% 23,5)	4 (% 23,5)	1 (% 5,9)	6 (% 35,3)	1 (% 5,9)	1 (% 5,9)



Grafik 24: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki Kanser Gelişim Evresine göre dağılımı

3.3.3.2.3.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Kanser Gelişim Evresi Değerleri için İstatistiksel Analizi

Çalışma Grubunun *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için bileşik analiz sonuçları kanser gelişim evresinin

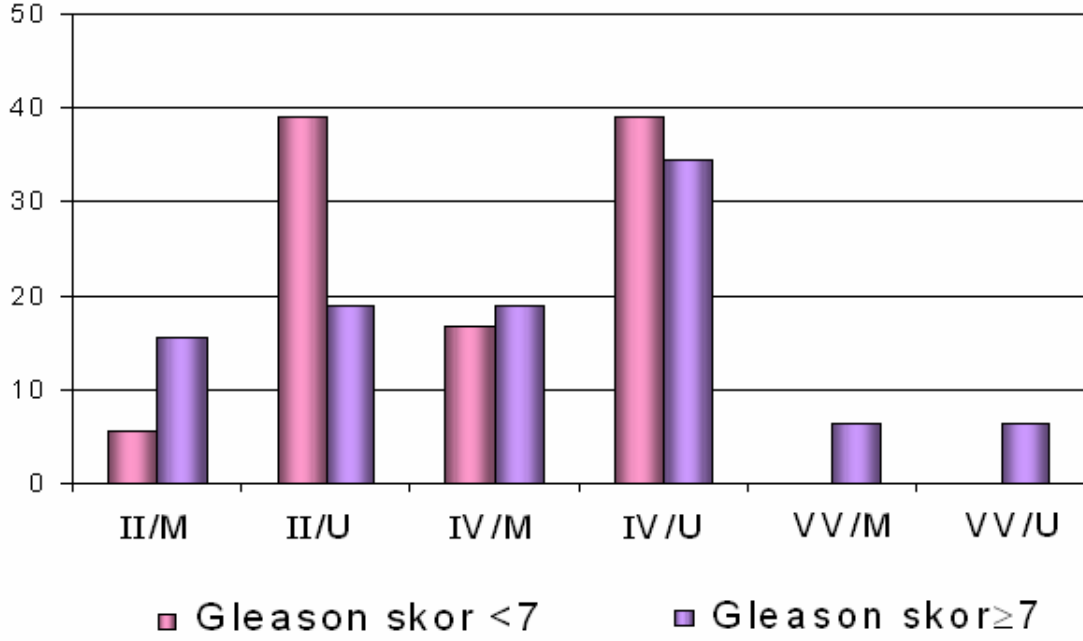
değerleri ile karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=5,475$, $p>0,05$).

3.3.3.2.4 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor' a Göre Dağılımı

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki dağılımı 7' den küçük Gleason Skor değerlerine göre incelendiğinde, 18 olgudan 1' inin (% 5,6) II/M, ve 7' sinin (% 38,9) II/U, 3' ünün (% 16,7) IV/M, ve 7' sinin (%38,9) IV/U olduğu saptanmıştır; VV/M ve VV/U olan olgular bulunmamakta idi. 7' ye eşit ve 7' den büyük Gleason Skor değerlerine göre dağılımı incelendiğinde, 32 olgudan 5' inin (% 15,6) II/M, 6' sının (% 18,8) II/U, 6' sının (% 18,8) IV/M, 11' inin (%34,4) IV/U, 2' sinin (% 6,3) VV/M ve 2' sinin (% 6,3) VV/U olduğu saptanmıştır (Tablo 33; Grafik 25).

Tablo 33: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubu içerisinde Gleason Skor' a göre dağılımı

Gleason Skor	Polimorfizm/Metilasyon Dağılımı					
	II/M (n=6)	II/U (n=13)	IV/M (n=9)	IV/U (n=18)	VV/M (n=2)	VV/U (n=2)
Gleason Skor<7 (n=18)	1 (% 5,6)	7 (% 38,9)	3 (% 16,7)	7 (% 38,9)	0	0
Gleason Skor≥7 (n=32)	5 (% 15,6)	6 (% 18,8)	6 (% 18,8)	11(% 34,4)	2 (% 6,3)	2 (% 6,3)



Grafik 25: *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin ve *GSTP1* geni promoter bölge hipermetilasyonunun çalışma grubundaki Gleason Skor' a göre dağılımı

3.3.3.2.4.1 *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Çalışma Grubu İçerisinde Gleason Skor Değerleri İçin İstatistiksel Analizi

Çalışma Grubunun *GSTP1* Ile105Val Polimorfizmi ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu için bileşik analiz sonuçları Gleason Skor değerleri ile karşılaştırıldığında, ikisi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($\chi^2=5,113$, $p>0,05$).

3.4 Kontrol Grubundaki *GSTP1* Ile105Val Polimorfizminin Genotip ve *GSTP1* Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonu Analizlerinin Sonuçları (Tablo 34)

Olgu No	KONTROL GRUBU				
	OLGU	YAŞ	<i>GSTP1</i> Ile105Val Polimorfizmi		<i>GSTP1</i> GENİ PROMOTER BÖLGE HİPERMETİLASYONU
			RFLP	LC	
1	K-04	64	II	II	U
2	K-19	63	II	II	U
3	K-29	50	II	II	U
4	K-13	75	II	II	U
5	K-14	59	II	II	U
6	K-05	67	II	II	U
7	K-09	50	II	II	U
8	K-21	50	II	II	U
9	K-27	52	II	II	U
10	K-06	56	II	II	U
11	K-28	66	II	II	U
12	K-22	54	II	II	U
13	K-47	49	II	II	U
14	K-53	52	II	II	U
15	K-42	53	II	II	U
16	K-33	65	II	II	U
17	K-50	51	II	II	U
18	K-37	50	II	II	U
19	K-41	51	II	II	U
20	K-55	50	II	II	U
21	K-40	49	II	II	U
22	K-44	60	II	II	U
23	K-51	56	II	II	U
24	K-48	54	II	II	U
25	K-35	53	II	II	U
26	K-39	68	II	II	U
27	K-32	55	II	II	U
28	K-49	52	II	II	U
29	K-54	50	II	II	U
30	K-36	52	II	II	U
31	K-52	50	II	II	U
32	K-02	76	IV	IV	U
33	K-16	55	IV	IV	U
34	K-20	55	IV	IV	U
35	K-24	59	IV	IV	U
36	K-23	54	IV	IV	U
37	K-15	56	IV	IV	U
38	K-11	49	IV	IV	U
39	K-07	50	IV	IV	U
40	K-31	52	IV	IV	U
41	K-46	51	IV	IV	U
42	K-01	52	IV	IV	U
43	K-18	52	IV	IV	U
44	K-10	51	IV	IV	U
45	K-25	50	IV	IV	U
46	K-12	52	IV	IV	U
47	K-45	46	IV	IV	U
48	K-38	66	IV	IV	U
49	K-43	50	IV	IV	U
50	K-34	52	IV	IV	U
51	K-08	58	IV	IV	M
52	K-30	50	IV	IV	M
53	K-03	69	VV	VV	M
54	K-17	51	VV	VV	U
55	K-26	50	VV	VV	U

Tablo 34: *GSTP1* Genotip ve Promoter Bölge Hipermetilasyon Sonuçları; II: Yabancıl (wild type), IV: Heterozigot, VV: Homozigot genotipler, M: Metile olan, U: Metile olmayan

3.5 Çalışma Grubundaki GSTP1 Ile105Val Polimorfizminin Genotip ve GSTP1 Geni Promoter Bölge Hipermetilasyonunun Sonuçları (Tablo 35)

Olgu No	ÇALIŞMA GRUBU							
	OLGU	YAŞ	PSA	Evre	Gleason Skor	GSTP1 Ile105Val Polimorfizmi		GSTP1 GENİ PROMOTER BÖLGE HİPERMETİLASYONU
						RFLP	LC	
1	H-05	68	17,2	T3b	6/10	II	II	U
2	H-23	74	17	T3	7/10	II	II	U
3	H-48	70	31,3	T2c	7/10	II	II	U
4	H-37	60	19,5	T2c	8/10	II	II	U
5	H-33	70	6,2	T2b	6/10	II	II	U
6	H-12	74	4,24	T2c	7/10	II	II	U
7	H-32	73	7,4	T2c	7/10	II	II	U
8	H-02	60	9,65	T2c	6/10	II	II	U
9	H-11	63	19,79	T2b	7/10	II	II	U
10	H-42	67	12,1	T3b	6/10	II	II	U
11	H-27	80	11,7	T2b	6/10	II	II	U
12	H-04	57	28,35	T3a	6/10	II	II	U
13	H-22	75	12	T2	6/10	II	II	U
14	H-10	72	150	T4	7/10	II	II	M
15	H-20	76	3,89	T3a	7/10	II	II	M
16	H-14	64	5,8	T2a	6/10	II	II	M
17	H-24	74	10,09	T2c	7/10	II	II	M
18	H-21	76	21,7	T3a	7/10	II	II	M
19	H-07	63	40,21	T3b	8/10	II	II	M
20	H-15	70	15,6	T2b	7/10	IV	IV	M
21	H-13	70	6,7	T2c	7/10	IV	IV	M
22	H-45	57	6,25	T2c	6/10	IV	IV	M
23	H-40	65	7,8	T2c	6/10	IV	IV	M
24	H-43	71	7,6	T3b	7/10	IV	IV	M
25	H-44	69	9,61	T2c	6/10	IV	IV	M
26	H-47	66	6,9	T2a	8/10	IV	IV	M
27	H-17	63	100	T4	7/10	IV	IV	M
28	H-49	73	14,5	T2c	7/10	IV	IV	M
29	H-09	60	0,36	T2c	7/10	IV	IV	U
30	H-30	57	6,94	T2c	8/10	IV	IV	U
31	H-16	62	100	T3b	7/10	IV	IV	U
32	H-26	73	14,2	T2c	7/10	IV	IV	U
33	H-36	71	11,2	T3a	6/10	IV	IV	U
34	H-38	66	4,9	T2b	7/10	IV	IV	U
35	H-01	65	19,24	T2c	7/10	IV	IV	U
36	H-19	64	6,62	T2c	6/10	IV	IV	U
37	H-28	76	8,76	T2c	6/10	IV	IV	U
38	H-50	60	0,36	T2c	7/10	IV	IV	U
39	H-25	63	10,09	T2c	7/10	IV	IV	U
40	H-35	65	14,2	T3b	7/10	IV	IV	U
41	H-46	66	4,9	T2a	6/10	IV	IV	U
42	H-39	73	11,33	T3a	8/10	IV	IV	U
43	H-45	57	6,25	T2c	6/10	IV	IV	U
44	H-03	65	6,9	T2c	6/10	IV	IV	U
45	H-41	64	150	T3	9/10	IV	IV	U
46	H-29	76	6,9	T2c	6/10	IV	IV	U
47	H-06	67	19,0	T2	7/10	VV	VV	U
48	H-18	73	49,2	T4	7/10	VV	VV	U
49	H-08	66	79,79	T3a	8/10	VV	VV	M
50	H-34	63	438,2	T2c	9/10	VV	VV	M

BÖLÜM IV

4.1 TARTIŞMA

Prostat kanser gelişiminin moleküler mekanizmaları daha tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, hastalığın gelişiminde hormonların ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bazı karsinojenlerin etkili oldukları bilinmektedir (259). Bundan dolayı, ksenobiyotik detoksifikasyonda rol alan GST π enziminin farklı *in vitro* enzimatik aktivitelere sahip alelik varyantlarının varlığı, prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde birer risk faktörünü teşkil edebilmektedir. GST π enzim aktivite değişikliği veya eksikliği, geciken veya gerçekleşmeyen karsinojen detoksifikasyonuna neden olduğundan, hücrelerde buna bağlı olarak tümör oluşumunu tetikleyen somatik mutasyonlar artabilmektedir (235, 290). *GSTP1* geninin sık görülen Ile105Val polimorfizminin farklı alelik varyantlarının ekspresyonu, hücrenin detoksifiye edici özelliğini değiştiren işte böyle bir etkisi bulunmaktadır. Yalnız, polimorfik 105Val alelinin düşük ısıya dayanıklılığı nedeniyle mi, ya da değişen aktivitesi nedeniyle mi kansere neden olduğu daha henüz belirlenememiştir (165). Yapılan çalışmalar sonucunda polimorfik 105Val alelinin, mesane ve meme kanseri gibi bazı kanserlerle ilişkisi ortaya konulurken, prostat kanserinde elde edilen sonuçlar kesin bir yargıya varmak açısından şimdilik daha çelişkili ve yetersizdir. Tüm bu anlatılan nedenlerden dolayı, ülkemizde de sık görülen prostat kanserinin ortaya çıkışında *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin kişilere bir yatkınlık sağlayıp sağlamadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bunun için öncelikle, bu polimorfizmin toplumdaki yaygınlığı belirlenmiş ve diğer ülkeler ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda, incelenen

toplam 105 olgunun alel sıklıklarına bakıldığında değerlerinin, 105Ile aleli için % 70,6 ve 105Val aleli için % 26,4 olduğu görülmüştür. Mersin' de yürütülen, akciğer kanserli ve sağlıklı toplam 100 olgudan oluşan bir çalışmanın sonucunda, alel sıklığının 105Ile için % 80 ve 105Val aleli için % 20 olduğu bulunmuştur (77). *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin beyaz populasyon genelindeki alel sıklığına bakıldığında ise, 105Ile aleli için % 63 ve 105Val aleli için % 37 olduğu görülmektedir (103). Buna göre, hem bizim hem de Mersin' deki grubun elde ettiği sonuçlar doğrultusunda toplumumuzda yabancı tip ile aleli, beyaz popülasyona oranla daha yüksek bulunmaktadır; fakat, bu anlamlı bir fark yaratmamaktadır. % 95' i beyaz ırktan oluşan toplam 590 Amerikalı olgu ile yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde 105Ile alelinin görülme sıklığı 105Val aleline oranla yüksek, ve sırasıyla % 69,8 ile % 30,2 olarak bulunmuştur (259). Rossini ve arkadaşlarının siyah ırktaki bireylerle yaptığı çalışmada da yine ile alelinin görülme sıklığının Val aleline göre daha yüksek, ve % 69,1 ile % 30,9 olarak saptanmıştır (246). HapMap Projesinin bir sonucu olarak, 105Ile alelinin daha yüksek ve % 82,2 ile % 90,9 oranında sarı ırktaki Asyalılarda bulunduğu, % 60,8 ve % 62,5 oranında ve daha düşük olarak beyaz ırktaki Avrupalılar ve siyah ırktaki Sub-Sahara Afrikalılarda bulunduğu ortaya konulmuştur (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1695) (127).

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin genotip dağılımı bakıldığında yine benzer sonuçlar elde edilmektedir. Çalışmamızda yabancı tip genotipin (Ile/Ile) görülme oranı % 47,2, heterozigot genotipin (Ile/Val) % 46,1 ve homozigot polimorfik genotipin (Val/Val) % 6,7 olarak bulunmuştur. Mersin' deki grubun elde ettiği sonuçlar ise sırasıyla % 52, % 38 ve % 10 idi (77).

Bununla birlikte, *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin genotip dağılımının farklı ırksal gruplar arasında değişiklikler gösterdiği de bildirilmektedir (259). Rossini ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, beyaz ırktaki bireylerde homozigot polimorfik genotip (Val/Val) dağılımının siyah ırktaki bireylere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (% 12,2 karşılık % 7, 246). Buna karşılık, Kuzey Amerika' da yapılan bir çalışmada Afrikalı Amerikan erkeklerde Val/Val genotip oranının da yüksek ve % 19 olduğu gözlenmiştir (301). HapMap Projesinin bir sonucu olarak, Val/Val genotipi en yüksek % 16,7 oranında siyah ırktaki Sub-Sahara Afrikalılarda, sonra % 11,7 oranında beyaz ırktaki Avrupalılarda, ve en düşük olarak ta ~ % 2,3 oranında sarı ırktaki Asyalılarda bulunmuştur (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1695).

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin, GST π enzim dayanıklılığı ve fonksiyonu üzerinde olumsuz etkileri bulunmasına karşılık, prostat kanseri ile ilişkisi daha halen açıklığa kavuşturulamamıştır. İtalyan popülasyonunda, 384 prostat kanserli ve 360 iyi huylu prostatik hiperplazi olgu ile yapılan bir çalışmada polimorfik homozigot Val/Val genotipinin beklenmedik şekilde prostat kanserli olgularda daha az ve % 2,1 oranında, diğer olgularda ise yüksek ve % 5,6 olarak tespit edilmiştir. Hatta, prostat kanseri olgularında heterozigot Ile/Val genotipinin sıklığında belirgin bir artış saptanmış ($p < 0,0001$); fakat, istatistiksel olarak anlamlı bir farka ulaşılamamıştır (12). Gsur ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmanın sonucunda, homozigot polimorfik Val/Val genotipinin prostat kanserinin riskini % 76 oranında azalttığını bile rapor etmişlerdir. Bu çalışmanın bulgularını destekleyen ve 36 prostat kanserli olgu ile yapılan bir diğer çalışmada yine Val/Val genotipinin

prostat kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (110). Kote-Jarai ve arkadaşlarının yürüttükleri bir çalışmada, Gsur ve arkadaşlarının bulgularına karşıt olarak, Ile/Ile genotipinin prostat kanserine karşı koruyucu özelliğe sahip olduğunu saptanmıştır (165). Biz de çalışmamızın sonunda, kontrol grubundaki yabancı tipteki Ile/Ile genotipini çalışma grubuna oranla daha yüksek bulmamıza karşılık, iki grup arasında anlamlı bir fark saptayamadık. Bu konudaki bulguların çelişkili olduğunu gösteren bir diğer çalışma da, Vijayalakshmi ve arkadaşlarının yürüttükleri ve kontrol grubundaki Ile/Val genotip dağılımının prostat kanseri çalışma grubuna göre daha yüksek olarak buldukları çalışmadır; onlar da Ile/Val genotipinin prostat kanseri riskini azalttığını ileri sürmüşlerdir (290). Özetle, *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin prostat kanseri ile ilişkisi çalışmamızın sonucunda da Türk hastaları için kesin belirlenememiştir ve bu konuda daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Fakat, aynı polimorfizmin mesane, meme ve akciğer kanserleri gibi diğer tümör tiplerinde ilişkili olduğu ve homozigot polimorfik Val/Val genotipinin bu kanserlerin gelişimi için bir yatkınlık yarattığı kabul edilmiştir. *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi belki de, *GSTP1*' in diğer bir fonksiyonel polimorfizmi olan ve 6. eksonunda bulunan Ala114Val polimorfizmi ile birlikte prostat kanseri gelişimi üzerinde daha etkilidir ve birlikte bakılması daha anlamlı sonuçların elde edilmesine sağlamaktadır. Örneğin, Yang ve arkadaşlarının çeşitli *GST* gen polimorfizmleri ile yürüttükleri bir çalışmada *GSTP1* Ile105Val ve Ala114Val polimorfizminin nevoid bazal hücreli karsinomunun gelişiminde etkili olduğunu göstermişlerdir (313).

GSTP1 Ile105Val polimorfizminin tek başına değil de, diğer GST gen ailesi üyeleri *GSTM1* ve *GSTT1*' de yer alan polimorfizmler ile birlikte prostat kanseri gelişimi üzerinde etkili olabileceği düşünülmüş, ve bu konuda da bazı araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bununla ilgili olarak, Srivastava ve arkadaşlarının Kuzey Hindistan' da 271 olgu ile yürüttükleri bir birleşik genotip çalışmasında *GSTP1* Ile/Val genotipinin veya *GSTM1* ve *GSTT1* null genotiplerinin prostat kanseri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada *GSTM1* null ve *GSTT1* null genotiplerinin veya *GSTP1* Ile/Val ve Val/Val genotiplerinin birleşik genotip sonuçları değerlendirildiğinde *GSTP1* ve *GSTT1* genotipleri için 4-kat, *GSTM1* ve *GSTT1* genotipleri için 3.7-kat prostat kanseri riskinin arttırdığı gösterilmiştir (267). Japon populasyonunda yapılan bir çalışmada da, Srivastava ve arkadaşlarının bulgularını destekleyen sonuçlar elde edilmiş ve *GSTP1* Val/Val genotipinin, *GSTM1* null veya *GSTT1* null genotipleri ile birlikte bulunduğu zamanlarda prostat kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır ($p<0.03$) (206). Çalışmamızda, *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi tek başına prostat kanser gelişimi ile ilişkili bulunamadığından, devamında *GSTM1* ve *GSTT1* polimorfizmleri ile birleşik genotip analizleri yapılması planlanmış ve bununla ilgili olarak malzemeler temin edilmiştir; tez süresinin yetersiz olması nedeniyle ve kısıtlı sürede etik kurul onayı alınamadığı için, bununla ilgili araştırmalar çalışmamıza dahil edilememiştir.

Prostat kanserinin yaşa bağlı olarak ortaya çıktığı, ve yaş arttıkça görülme sıklığının da buna paralel olarak arttığının bilinmesinden dolayı, *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin çalışma ve kontrol gruplarında yaşa bağlı olarak araştırılması gerçekleştirilmiştir; fakat, ikisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenememiştir. Çalışmamıza benzer olarak Jose Debes ve

arkadaşları, toplam 499 olguyu inceledikleri çalışmalarında prostat kanseri gelişiminin *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve yaş ile bağlantılı olmadığını saptamışlardır (60, 165). Ancak, çalışmamızda Ile/Val genotipinin 65 yaştan küçük olan prostat kanserli hastalarda 65 yaştan büyük olan hastalara oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur (% 66,7' ye karşılık % 44,8); ki bu sonuç, Antognelli ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışma ile çakışmaktadır. Onların çalışmaları sonucunda, 65 yaştan büyük olan prostat kanserli hastalarda Ile/Val genotipi daha yüksek oranda gözlenmekteydi (% 60,5). Çalışmalar arasındaki bu farklı sonuçların yorumlanması oldukça zordur; çünkü, bu konu ile ilgili fazla yayın bulunmamaktadır. Bunun için çalışma grubumuzun sayısını arttırarak, bu polimorfizm ve yaş arasındaki ilişkinin tekrardan gözden geçirilmesi, ve elde edilen sonuçların istatistiksel olarak yeniden değerlendirilmesi planlanmıştır.

Günümüzde yaygın olarak ve kandan kolayca bakılabilen en iyi tanımlanmış prostat kanser beliteçi PSA' dır. *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin PSA ile ilişkili olup olmadığını araştırdığımızda, PSA' nın 4' den küçük ve 4-12 arasındaki değerlere sahip olan olgularda homozigot polimorfik Val/Val genotipinin hiç gözlenmediği, ancak PSA 12' ye eşit ve 12' den büyük değerlere sahip olan bireyler için bu genotipin yüksek olduğu saptanmıştır (% 18,2). Bu gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamış olmasına karşılık, Val/Val genotipinin yüksek PSA değerleri ile birlikte gözlenmesi ilginç bulunmuştur. Yaptığımız yoğun literatür araştırması sonucunda da, bu konuyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. *GSTP1* genindeki bir polimorfizmin PSA düzeyi üzerinde nasıl bir rol oynayabileceği konusunda bir fikir yürütememize karşılık, PSA düzeylerinin

yüksek olduğu durumlarda, genellikle *GSTP1*' in promoter bölge hipermetilasyonuna bağlı olarak susturulmuş olarak bulunduğu dair bilgiler mevcuttur (153).

Çalışmalarımızı yürüttüğümüz süre içerisinde, Jeronimo ve arkadaşlarının prostat kanserli hastalarda *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin kanserin gelişim evresi ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalarına rastladık. Çalışmalarında prostat kanserinin geç evresinde bulunan olguların dahil edilmediği, ve sadece klinik olarak lokalize hastalar ile çalışıldığı; ancak, geç kanser evresinde bulunan olguları çalışmaya dahil etmiş olsalardı, daha anlamlı sonuçlar elde edebileceklerini vurgulamışlardır (143). Bunun üzerine Antognelli ve arkadaşlarının, prostat kanserinin geç gelişim evreleri olan T3-T4' deki olgularda Val/Val genotip sıklığının, kanserin erken gelişim evreleri olan T1-T2' deki olgulara oranla daha yüksek olduğunu; fakat bunun, ikisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığını göstermişlerdir (12). Çalışmamızda da, Val/Val genotip sıklığının kanserin geç gelişim evreleri olan T3-T4' deki olgularda, kanserin erken gelişim evreleri olan T1-T2' deki olgulara oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla, % 11,8' e karşılık % 6,1). Fakat, Antognelli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya paralel olarak, *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve kanserin gelişim evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Prostat kanser gelişiminin T1-T4 evrelendirilmesi radyolojik bulgulara dayanırken, Gleason Skor değerleri biyopsi materyallerinin histolojik özelliklerine dayanmaktadır; ve tüm prostat kanserli olgularda her ikisi birlikte değerlendirilmektedir. *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin Gleason Skor değerleri ile ilgili olup olmadığını araştırdığımızda yabancı Ile/Ile genotipinin

görülme sıklığının Gleason Skor <7 ve ≥7 değerler için eşit olduğu bulunmuştur. Homozigot polimorfik Val/Val genotipinin görülme sıklığı ise Gleason Skor ≥7 değerlerinde, Gleason Skor <7 değerlerine oranla daha yüksek olarak bulunmuştur (% 12,5' a karşılık % 0). Elde ettiğimiz bu sonuçlar, prostat kanser gelişiminin T1-T4 evrelendirilmesi ile elde edilen sonuçları desteklemektedir; ve ikisi birlikte *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin kanserin gelişim evreleri ile istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermektedir. Çalışmamıza benzer olarak, Vijayalakshmi ve arkadaşları da prostat kanserinde *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve Gleason Skor değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır. Yine bizim çalışmamıza uygun olarak, Jose ve arkadaşlarının yürüttükleri bir çalışmada Gleason Skor ≥7 olan değerler için Val/Val genotip sıklığının yüksek ve % 14,2 olduğu, ama istatistiksel olarak bir anlam taşımadığını saptanmıştır (60).

Prostat kanseri gelişiminde en sık gözlenen epigenetik değişikliklerden bir tanesi CpG adalarının hipermetilasyonuna bağlı olarak *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *GSTP1*, *E-cadherin* ve *VHL* gibi belirli genlerin susturulmalarıdır (164, 185). Bunların arasındaki en önemli prostat kanseri belirteci, % 90' ın üstünde olan yüksek özgüllüğü ve duyarlılığı nedeniyle *GSTP1* genidir, ve bu özellikleri sayesinde diğer aday genler arasında birinci sırayı almaktadır (15, 153). *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonunun özgül olarak yalnızca prostat kanserinde gözlenmesi, normal ve iyi huylu prostatik dokularda gözlenmemesi nedeniyle, hastalığın tanısında önemli bir yere sahiptir (30, 172, 143, 120, 29). *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu aynı zamanda mesane ve böbrek kanseri gibi diğer ürogenital sistem kanserleriyle de ilişkili bulunmuştur (36,72). Çalışmamızda, toplumumuzda da sık gözlenen prostat

kanserinin *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonunun hastalığın erken tanısında saptanması, ve prostat kanseri hastalarının prognozu ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada biyopsi örneği yerine hastaların plazma örneklerinin tercih edilme sebebi, ileride prostat kanserine yatkınlık gösterebilecek olguların daha az invazif olan bu yöntem ile rutin olarak taramalarını gerçekleştirmektir. Araştırmamızda kullanılan MSP metodu neredeyse % 100 özgüllüğe sahip, epigenetik değişiklikleri kalitatif olarak belirleyebilen, ucuz ve hızlı metilasyona özgü yöntemlerden biridir. Bu şekilde tasarlanmış olan çalışmamızın sonucunda, normalde metillenmemiş halde bulunması gereken *GSTP1* geninin metilasyon durumu normal ve prostat kanseri tanılı olgulara ait plazma serbest DNA' larında incelendi ve prostat kanserli olgularda % 34 olarak saptanarak, kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p < 0,001$). Ailesinde prostat kanseri hikayesi ve klinik olarak prostat kanseri teşhisleri bulunmayan olgulardan oluşturulmuş olan kontrol grubunda % 5,5 oranında da *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonun gözlenmesi beklenmedik bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Diğer çalışmalarda kontrol grubu genellikle iyi huylu prostatik hiperplazili hastalardan oluşturulmuş olduğundan, bu olguların hiçbirinde hipermetilasyon gözlenmemiştir (15). Bu nedenle, *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu gözlenen kontrol olgularımızın tekrardan klinik olarak muayene edilmeleri, prostat kanseri dışında farklı bir tümörel gelişimleri bulunup bulunmadığına dair bilgilerin elde edilebilmesi uygun olabilir.

MSP metodunu kullanarak, plazmadaki serbest DNA metilasyonu oranını prostat kanserli olgularımızda % 34 olarak ve bazı çalışmalara göre

düşük oranda saptadık. Yapılan bir çalışmada, *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu prostat kanseri olgularının plazma veya serum örneklerinde % 72, idrar örneğinde % 36 olarak saptanmıştır. Metilasyonu, plazma ve serum örneklerinden izole ettikleri serbest DNA' larda, idrar örneklerinden elde ettikleri epiteliyal hücre DNA' larına oranla daha iyi saptanabilmelerinin nedeni olarak, idrarda uygun bir DNA izolasyon yöntemi kullanmamış olmalarına bağlamışlardır (93). Plazma, serum ve idrar gibi vücut sıvılarının kolay sağlanabilme avantajlarına sahip olmalarına rağmen, doku örnekleri ile yapılan metilasyon çalışmaları genellikle daha başarılıdır. Örneğin, prostat kanserinde sıklıkla hipermetillenen *GSTP1*, *APC*, *RARβ2* ve *TIG1* genlerinin kantitatif gerçek zamanlı MSP (*Quantitative real-time methylation specific pcr*, QMSP) metodu ile taze dokudan araştırılan bir çalışmada *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu kontrol grubuna göre daha yüksek sıklıkta saptanmıştır (284). QMSP metodu kullanılan başka bir araştırmada ise *TIG1*, *APC*, *RARβ2* ve *GSTP1* genlerinin metilasyon oranı parafin dokudan araştırılmış ve % 75 olarak saptanmıştır (284). Jeronimo ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada QMSP ve MSP metotları kullanılarak plazma ve idrar örneklerinde metilasyon oranları saptanmış, ve her iki metotla farklı değerler elde edilmiştir: QMSP metodu ile sırasıyla % 13 ve % 18.8, MSP metodu ile % 36.2 ve % 30.4 metilasyon oranları saptanmıştır. Bu çalışmada da gözleendiği gibi, kansere özgü bir olay olan metilasyonun belirlenmesinde çalışma örneğinin seçimi kadar, kullanılan metodun seçimi de metilasyon oranının doğru saptanabilmesi için çok önemlidir.

Prostat kanserli olguların plazmalarındaki serbest DNA' larında gözlenen *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonunun kontrol grubuna

oranla anlamlı, fakat yine de yalnızca % 34 oranında saptanması nedeniyle, bunun prostat kanseri ile ilişkili diğer aday genlerle birlikte çalışılması ve bu değerlerin artırılabilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir. Örneğin Kang ve arkadaşları, prostat kanserli ve sağlıklı toplam 71 olgunun parafin doku örnekleri ile yaptıkları bir çalışmada prostat kanseri ve prostatik intraepitelyal neoplazi ile ilişkili 11 genin (*GSTP1*, *APC*, *COX2*, *DAP-kinase*, *E-Cadherin*, *p14*, *p16*, *RUNX3*, *THBS1*, *MGMT* ve *RASSF1A*) MSP metodu kullanarak metilasyon profilini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmanın sonunda, *GSTP1* geninin prostat kanserinde prostatik intraepitelyal neoplaziye oranla daha yüksek sıklıkta saptanabildiğini ve ayrıca bu genler arasında da en yüksek metilasyon sıklığına sahip olduğunu göstermişlerdir (% 86,5) (153). Bu çalışmanın da gösterdiği gibi, prostat kanserinde promoter bölge hipermetilasyonu sonucu sıklıkla susturulan en önemli geni yine de *GSTP1*' dir.

GSTP1 geni prostat kanserinde metilasyon sonucu en sık susturulan gen olmasının yanında, tümörün belirlenmesi için yine en yüksek özgüllüğe sahip olanıdır. 31 prostat kanseri ve 5 iyi huylu prostatik hiperplazi doku örneğinin araştırıldığı bir çalışmada, *GSTP1* geninin promoter bölgesinde hipermetilasyon oranı prostat kanserli olguların 28' inde, yani % 90.3 oranında tespit edilirken, iyi huylu prostatik hiperplazili hastalarda hiç tespit edilememiştir (15). Jeronimo ve arkadaşlarının prostat doku örnekleriyle *GSTP1*, *MGMT*, *p16*, *p14*, *RASSF1A*, *APC*, *TIMP3*, *S100A2* ve *CRBP1* olmak üzere 9 gen ile yaptıkları metilasyon çalışmasında *GSTP1* geni prostat kanserli hastalarda % 94.9, prostatik intraepitelyal neoplazili hastalarda % 76.3 oranında saptanmıştır; Bastian ve arkadaşlarının çalışmalarında olduğu

gibi, bu çalışmada da iyi huylu prostatik hiperplazili hastalarda metilasyon saptanmamıştır (141). Görüldüğü gibi, *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu prostat kanserinde yalnızca hastalara ait malign dokularda saptanmıştır. Buna karşılık, 69 prostat kanseri, 28 prostatik intraepitelial neoplazi ve 31 iyi huylu prostatik hiperplazi doku örneğinin araştırıldığı bir çalışmada, *GSTP1* genine ait hipermetilasyon oranı prostat kanseri olgularında % 91.3, prostatik intraepitelial neoplazide % 50 ve iyi huylu prostatik hiperplazide % 29 olarak saptanmıştır (141). İyi huylu prostatik hiperplazide % 29 oranında *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonun saptanmasının nedeni, dokulardaki hücrelerin farklı metilasyon oranına sahip olmaları ve heterojen bir yapı sergilemelerinden kaynaklanıyor olabilir.

Hipermetilasyon ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda, genlerin promoter bölgelerinde bulunan CpG adalarının hipermetilasyon seviyelerinin yaş ile ilişkili olabileceği, ve yaş ile birlikte arttığı ileri sürülmüştür (203). Bastian ve arkadaşları, 31 prostat kanseri ve 5 iyi huylu prostatik hiperplazi doku örneği ile yaptıkları bir araştırmanın sonucunda, metilasyon oranının yaş ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (15). Kendi çalışmamızın sonucunda ise, 65 yaştan büyük olan olguların *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyon oranı, 65 yaştan küçük olan olgulara göre yüksek ve sırasıyla % 37,9 ile % 14.3 olarak bulunmuş; fakat, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Sonucumuz yine de yaş ile metilasyon seviyesi arasında var olabilecek ilişkiyi göz ardı edemez. Nedeni ise, çalışmamızda yalnızca belirli bir *GSTP1* promoter bölgesini incelemiş olmamız, ve böyle bir varsayıma gidebilmek için tüm *GSTP1* promoterindeki CpG adalarını incelenmemiz gerektiğidir.

Yapılan çeşitli araştırmalarda, *GSTP1* hipermetilasyonun neoplastik olan ve olmayan prostatik dokularda farklı düzeylerde bulunduğu, ve ağırlıklı olarak neoplastik dokularda görüldüğü gösterilmiştir. Bu nedenle, klinik olarak saptanmamış, fakat prostat kanseri olan olguları; prostat kanseri için düşük riske sahip olan olgulardan ayırt etmek için, PSA ölçümlerinin yerine *GSTP1* hipermetilasyonun serumda belirlenmesinin daha anlamlı olabileceği ileri sürülmüştür (93). Prostat kanseri, ve PSA ile *GSTP1* metilasyon düzeyleri arasındaki ilişkinin incelendiği böyle bir çalışmada, üçü arasında bu tür bir bağlantı saptanamamıştır (142, 15). Biz de, çalışmamızda prostat kanserli olguların PSA düzeyleri ve *GSTP1* metilasyon düzeyleri arasında böyle bir bağlantıyı gösteremedik. Her ne kadar *GSTP1* metilasyon oranı en yüksek PSA ≥ 12 değerinde bulunmuş olursa dahi (% 40,9), PSA' ları ≥ 12 olan diğer olgularda metilasyon gözlenmemiştir (% 59,1). Bu da prostat kanserinde her iki belirtecin ayrı olarak değerlendirilmesini gerektirdiğini göstermektedir.

Promoter bölge hipermetilasyonu, daha tümörün gözlenmediği metaplazi ve displazi evrelerinde ortaya çıktığı ve giderek arttığı için, kanserin gelişim evresi arttıkça metilasyon seviyesinin de artması gerektiği düşünülmektedir (146). Kanser gelişim evresinin ve metilasyon seviyesinin karşılaştırıldığı bir yayında, metastatik veya T4 evresinde olan tüm hastaların plazma veya serum örneklerinde *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu gösterilebilmiştir (30). Prostat kanserinin gelişim evresi ile ilişkilendirilen bir başka çalışmada da T3-T4 evresi ile metilasyon oranı arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p < 0.008$) (93). Çalışmamızda ise, T4 evresinde bulunan toplam 3 olgunun 2' sinde *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu gözlenirken, 1' inde gözlenmemiştir. T3-T4 evrelerindeki metilasyon oranını

T1-T2 evrelerine göre daha yüksek saptamamıza rağmen, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptayamadık. Çalışmalarımızın devamında, T3-T4 evrelerine sahip daha fazla sayıdaki olguyu çalışma grubuna dahil ederek, kanserin gelişim evresi ve metilasyon arasındaki ilişkinin daha kesin olarak ortaya koyabileceğimize inanmaktayız.

Gleason Skor değerleri yüksek olan prostat kanseri olgularında genellikle metilasyon da gösterilebilmektedir. Bununla ilgili olarak Konishi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonunun kötü prognoz belirtisi olan Gleason Skor ≥ 7 değerlerindeki olgularda daha yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (164). Jeronimo ve arkadaşlarının prostat kanseri biyopsi örnekleri ile yaptıkları bir çalışmada *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyon oranının kanserin patolojik evresinin yanında, yine Gleason Skoru ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (139). Zhou ve arkadaşları da, prostat kanserinde Gleason skorununun *GSTP1* geni promoter bölgesinde yer alan CpG adalarının hipermetilasyon düzeyi ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (319). Kendi çalışmamızda ise *GSTP1* genine ait metilasyon oranı ve Gleason skor değerleri karşılaştırıldığında, metilasyon oranının Gleason Skor ≥ 7 değerler için, Gleason Skor <7 değerlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür; fakat, ikisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Jeronimo ve arkadaşlarının bu sefer prostat kanserli olguların plazma serbest DNA örnekleri ile yaptıkları bir çalışmada ise, bizim çalışmamıza benzer olarak; fakat, prostat biyopsi örnekleri ile yaptıkları kendi çalışmalarından farklı olarak, kanserin gelişim evresi ve Gleason Skor değerleri ile metilasyon düzeyi aralarında anlamlı bir ilişkili bulamamışlardır (141). Bunun açıklaması,

plazmadaki serbest DNA' nın yalnızca prostatik dokuya ait hücrelere ait olmadığı, birçok farklı dokunun apoptotik hücrelerinin DNA' larından oluştuğu, bu nedenlerden dolayı da her zaman prostat doku özelliklerini tam olarak yansıtamayacağı olabilir.

Çalışmaya başlama amacımız, *GSTP1* geninin Ile105Val polimorfizminin ve / veya promoter bölge hipermetilasyonuna bakarak, bunların prostat kanserine yatkınlık kazandırıp kazandırmadıklarını, ve hastalığın erken tanısında kullanılıp kullanılmayacağını öğrenmekti. Literatürleri inceldiğimizde her iki gen değişikliğini birlikte inceleyen yalnızca bir yayına rastalayabildik ve bu çalışmada da promoter bölge hipermetilasyonun mu, yoksa *GSTP1* geninin Ile105Val polimorfizminin mi prostat kanserine yatkınlık sağladığı incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonunun GST π ' nin azalmış fonksiyonu ile ilgili, fakat tek nedeni olmadığı; ve *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin de prostat kanserinin değişen duyarlılığı ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (143). Biz bu konuya farklı bir bakış açısı ile yaklaşım, her iki gen değişikliği birlikte analiz edilirse, prostat kanseri tanısı daha yüksek duyarlılıkta konulabilir mi diye görmek istedik.

Kontrol ve çalışma gruplarının *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve promoter bölge hipermetilasyon birleşik analizleri gerçekleştirildiğinde, II/M bileşik analiz sonucunun çalışma grubunda, kontrol grubuna göre belirgin artışı gözlenmiştir ($p < 0.005$). II/M durumu, yani yabancı Ile/Ile genotipine sahip olgularının her iki alellerinin metilasyon sonucu susturulmaları sonrasında prostat kanseri geliştirebilmeleri mümkündür.

V. BÖLÜM

5.1 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, 55 sağlıklı ve 50 prostat kanseri tanıları konmuş toplam 105 olguda *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve promoter bölge hipermetilasyonu incelendi ve prostat kanseri gelişimi üzerindeki etkileri araştırıldı.

Elde edilen bulguların değerlendirilmesi sonucunda, aşağıdaki sonuçlara varıldı:

Çalışmamızın sonunda, prostat kanserine yatkınlık sağlayıp sağlamadığı konusu halen tartışmalı olan *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin heterozigot Ile/Val ve homozigot polimorfik Val/Val genotipleri, çalışma grubunda yüksek oranlarda bulundu. Çalışma grubunda *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi daha sık gözlenmesine rağmen, kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bu nedenle, ilerisi için yapmaya planladığımız çalışmada, Ile105Val polimorfizmini *GSTP1*' nin diğer bir fonksiyonel polimorfizmi olan Ala114Val ile birlikte değerlendirmeyi hedefledik.

GSTP1' in prostat kanserine yatkınlık kazandırdığı bilinen en önemli değişikliklerinden biri promoter bölge hipermetilasyonudur. Plazmadan izole edilen serbest DNA ile yürüttüğümüz çalışmanın sonucunda, prostat kanserli olguların % 34' ünde *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonu saptandı, ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bulundu. Sonuçların anlamlı bulunması nedeniyle çalışmalarımızı, prostat kanseri hastalarının plazma, serum, idrar gibi kolay elde edilebilen vücut sıvılarında sürdürmeyi planlamaktayız. Bunun yanı sıra *GSTP1* promoter bölge

hipermetilasyonunu diğer ürogenital sistem kanserleri ile ilişkili olarak araştırmayı planlıyoruz.

Çalışmamızın ileri hedefleri arasında *GSTP1* Ile105Val polimorfizminin, Glutasyon S-transferaz gen ailesi üyelerinden *GSTM1* ve *GSTT1*' nin null genotipleri ile birlikte analizlerinin yapılması bulunmaktadır. *GSTM1* ve *GSTT1* genlerinin hızlı, güvenilir bir metod olan gerçek zamanlı PCR ile prostat ve mesane kanserlerinde araştırılmaları, ve rutine alınmaları planlanmaktadır. '*GSTM1*, *GSTT1* ve *GSTP1* gen polimorfizmlerinin mesane kanseri üzerine etkisinin araştırılması' isimli proje önerimiz Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından, 07. 06. 2006 tarihli ve 06 - 6/12 sayılı kararı ile onaylanmıştır, ve bir sonraki başvuru dönemi içerisinde Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına sunulacaktır.

MSP metoduna alternatif olarak *GSTP1* promoter bölge hipermetilasyonunun QMSP metodu ile araştırılmasını; ve prostat kanserinde susturuldukları gözlenen diğer genleri de çalışmamıza dahil ederek, metilasyon araştırmalarımızı genişletmeyi planlamaktayız. Böylece, ailesinde prostat kanseri öyküsü bulunan erkeklerin erken tanılarında birkaç genetik belirteç birlikte ele alınarak, belirlenen sonuçlar doğrultusunda kanser gelişimleri kontrol altına alınabilecektir.

GSTP1 Ile105Val polimorfizmi ve promoter bölge hipermetilasyonunu araştırdığımız süre içinde, kontrol ve çalışma grubu olgularının plazma örneklerinden, gelecekte yapmayı planladığımız proteomiks çalışması için 100' er µl ayırıp, -86°C' de sakladık. En yakın zamanda olgu sayılarını arttırarak, bu çalışmayı başlatmayı düşünüyoruz.

VI. BÖLÜM

6.1 ÖZET

Prostat kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır; ortaya çıkışında ırksal ve etnik farklılıklar, ileri yaş, sigara ve alkol kullanımı, beslenme, ve prostat kanseri aile öyküsü gibi genetik temelli bazı risk faktörleri bulunmaktadır.

Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesindeki moleküler mekanizmalar daha tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, etkili olan bazı genetik ve epigenetik değişiklikler bildirilmiştir. Bu değişikliklere örnek olarak *GSTP1* geninde meydana gelen Ile105Val polimorfizmi ve promoter bölge hipermetilasyonu verilebilir.

Prostat kanseri gelişiminde *GSTP1* geninin etkisini saptayabilmek için 50 prostat kanserli ve 55 sağlıklı, toplam 105 olgu çalışmaya dahil edildi; ve Ile105Val polimorfizmi ile promoter bölge hipermetilasyonları araştırıldı.

GSTP1 polimorfizm analizinde, çalışma grubunu oluşturan 50 olgudan 19' unun (% 38,0) yabanıl (Ile/Ile), 27' sinin (% 54,0) heterozigot (Ile/Val) ve 4' ünün de (% 8,0) homozigot (Val/Val) genotipe sahip oldukları saptandı. Kontrol grubunu oluşturan 55 olgudan 31' inin (% 56,4) yabanıl (Ile/Ile), 21' inin (% 38,2) heterozigot (Ile/Val) ve 3' ünün de (% 5,4) homozigot (Val/Val) genotipe sahip oldukları saptandı. Analiz sonuçlarına göre, prostat kanserli olgularda heterozigot (Ile/Val) ve homozigot (Val/Val) genotipleri daha yüksek bulunmalarına karşılık, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

GSTP1 promoter bölge hipermetilasyonu analizinde, çalışma grubunu oluşturan 50 olgudan 17' sinin (% 34) metile olduğu ve 33' ünün de (% 66) metile olmadığı saptandı. Kontrol grubunu oluşturan 55 olgudan 3' ünün (%

5,5) metile olduğu ve 52' sinin de (% 94,5) metile olmadığı saptandı. Çalışma ve kontrol grupları metilasyon sonuçları açısından karşılaştırdıklarında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.

Çalışma grubundaki olguların yaş, PSA, prostat kanserinin gelişim evresi ve Gleason Skor gibi klinik zellikleri *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi ve promoter bölge hipermetilasyonu ile karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir ilişkinin olmadığı görüldü.

GSTP1 Ile105Val polimorfizmi ve promoter bölge hipermetilasyonu birlikte değerlendirildiklerinde, II/M bileşik analiz sonucunun çalışma grubunda belirgin ve anlamlı bir artışı gözlendi.

Sonuç olarak, *GSTP1* Ile105Val polimorfizmi tek başına değerlendirildiğinde prostat kanseri gelişimi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığı gibi görülmesine karşılık, metilasyon ile birlikte değerlendirildiğinde önemli bir etkiye sahip olabilir.

6.2 ABSTRACT

Prostate cancer is a multifactorial disease; some genetically based risk factors like ethnic and racial differences, high age, smoking and alcohol usage, diet, and family prostate cancer history are involved in its evolution.

Although the molecular mechanisms behind the evolution and progression of prostate cancer are not completely solved yet, some genetic and epigenetic differences were reported. One can give the Ile105Val polymorphism and promoter region hypermethylation of the *GSTP1* gene as an example for these differences.

To study the role of the *GSTP1* gene in prostate cancer evolution a total of 105 cases, consisting of 50 prostate cancer and 55 healthy individuals, were included to the study; and their Ile105Val polymorphism and promoter region hypermethylation were examined.

After the analysis of the *GSTP1* polymorphism, 19 cases (38,0 %) from 50 in the working group were found to carry the wild type (Ile/Ile), 27 (54,0 %) the heterozygote (Ile/Val) and 4 (8,0 %) the homozygote (Val/Val) genotype. From the 55 cases in the control group 31 (56,4 %) were found to carry the wild type (Ile/Ile), 21 (38,2 %) the heterozygote (Ile/Val) and 3 (5,4 %) the homozygote (Val/Val) genotype. According to this results, the heterozygote (Ile/Val) and homozygote (Val/Val) genotype ratios were higher in the working group compared to the control group, but statistically there was no significant difference.

Also, after the analysis of the *GSTP1* promoter region hypermethylation, 17 cases (34 %) from 50 in the working group were found to be methylated and 33 (66 %) were found not to be methylated. From the

55 cases in the control group 3 (5,5 %) were found to be methylated and 52 (94,5 %) were found not to be methylated. When the results from the working and control groups were compared, a statistically significant difference was found between both groups.

When the *GSTP1* Ile105Val polymorphism and promoter region hypermethylation status of the cases in the working group were compared with clinical features like age, PSA, prostate cancer development state and Gleason score, no significant relationship was found.

The compound analysis of the *GSTP1* Ile105Val polymorphism and promoter region hypermethylation resulted in an evident and meaningful increase of the II/M condition in the working group.

In conclusion, when the role of the *GSTP1* Ile105Val polymorphism is analysed on its own in the evolution of prostate cancer no evident role is seen, but when analysed together with the methylation status its important evidence becomes clear.

VII. BÖLÜM

7.1 YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Baylin SB, Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* **16**,168-174
2. Adami HO, Bergstrom R, Engholm G, Nyren O, Wolk A, Ekblom A, Englund A, Baron J. (1996). A prospective study of smoking and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* Sep;67:764-8.
3. Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Taylor Murray, Jiaquan Xu, Carol. (2006). Cancer İstatistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 56;106-130.
4. Aktas D, Ozen H, Atsu N, et al (2001). Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients: a marker for invasive bladder cancer? *Cancer Genet Cytogenet*; 125, 1-4.
5. Albino Bacolla, Sriharsa Pradhan, Richard J. Roberts, and Robert D. Well (1999). Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase *J Biol Chem*; Vol. 274, Issue 46, 33011-33019.
6. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J.(1997). Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. *J Biol Chem*; 272:10004–10012.
7. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures* 2005; (American Cancer Society, Atlanta, 2005).
8. Ana H., Maria N. K.-G., Felizardo P.and Pedro H. C. (2000). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 709-713.
9. Andre Konski , MD, MBA, MA, FACR. (2 0 0 4). Evaluating the Addition of Total Androgen Suppression to Radiation versus Radiation Alone for Locally Advanced Prostate Cancer. *Radiation Oncology R E V I E W*; 71-72.
10. Angelo M D., William G N., William B I., Jonathan I E.(2003). Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *The Lancet*; 361:955-964.
11. A. Bird. (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 90, 11995-11999.
12. Antognelli C, Mearini L, Talesa VN, Giannantoni A, Mearini E.(2004). Association of CYP17, GSTP1, and PON1. Polymorphisms with the risk of Prostate cancer. *The Prostate*,9999, 1-12.
13. B Mannervik, Y C Awasthi, P G Board, J D Hayes, C Di Ilio, B Ketterer, I Listowsky, R Morgenstern, M Muramatsu, W R Pearson, et al. (1992). Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J.* February 15; 282(Pt 1): 305–306.
14. Bagnardi V, Blangiardo M, Vecchia CL, Corrao G (2001). A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* Nov;85:1700-5.
15. [Bastian PJ, Ellinger J, Schmidt D, Wernert N, Wellmann A, Muller SC, von Rucker A.](#)(2004). GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostatic cancer: is there a correlation with clinical stage, Gleason grade, PSA value or age? *Eur J Med Res.* Nov 29;9(11):523-7.

16. [Beer TM](#), [Evans AJ](#), [Hough KM](#), [Lowe BA](#), [McWilliams JE](#), [Henner WD](#). (2002). Polymorphisms of GSTP1 and related genes and prostate cancer risk. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*;5(1):22-7.
17. Bell DA, Thompson CL, Taylor J, Miller CR, Perera F, Hsieh LL, et al (1992). Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: application to glutathione transferase mu. *Environ Health Perspect*; 98:113-117.
18. Berhane, K., Widersten, M., Engström, Å., Kozarich, J. W., and Mannervik, B.(1994). Detoxication of base propenals and other α,β -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91: 1480–1484.
19. [Bernardi G](#). (2000) Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates. *Gene*. Jan 4;241(1):3-17.
20. [Berthon P](#), [Valeri A](#), [Cohen-Akenine A](#), [Drelon E](#). et al. (1998). Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet*. Jun;62(6):1416-24.
21. Bestor T.H. (1998). The host defense function of genomic methylation patterns. *Novartis Found. Symp.*; 214, 6-16, discussion 16-21, 46-50.
22. Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9:2395-2402.
23. Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, et al (1999). Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev*; 13: 966–77.
24. Bird A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*;16, 6–21.
25. Bird A., Taggart M., Frommer M., Miller O.J. and Macleod D.(1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG- rich DNA. *Cell*; 40, 91-99
26. Booth J, Boyland E, Sims P (1961). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem J*. Jun;79(3):516–524.
27. Bostwick DG (1989). Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *Urology*; 34;16-22.
28. Breslow RA, Weed DL (1998). Review of epidemiologic studies of alcohol and prostate cancer: 1971- 1996. *Nutr Cancer*;30:1-13.
29. Brooks J. D., Weinstein, M., Lin, X., Sun, Y., Pin, S. S., Bova, G. S., Epstein, J. I., Isaacs, W. B., and Nelson, W. G.(1998). CG island methylation changes near the *GSTP1* gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev* ;7: 531–536.
30. Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C, Sanchez-Cespedes M, Chow NH, Grasso M, Wu L, Westra WB et al.(2001). Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res*; 7: 2727-2730.
31. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG & Baylin SB (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21 103-107.
32. Camila Guindalinia
33. Colin O'Garaa, Ronaldo Laranjeirad, David Colliera, Aauto Castelod, Homero Valladab and Gerome Breena (2005). A GSTP1 functional variant associated with cocaine dependence in a Brazilian population. *Pharmacogenetics and Genomics*. ;15:891–893.

34. Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, et al. (2002) Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet*; 30: 181–84.
35. Cerhan JR, Torner JC, Lynch CF, Rubenstein LM, Lemke JH, Cohen MB, Lubaroff DM, Wallace RB. (1997). Association of smoking, body mass, and physical activity with risk of prostate cancer in the Iowa 65+ Rural Health Study (United States). *Cancer Causes Control* Mar;8:229-38.
36. [Chan JM](#), [Giovannucci EL](#). (2001). Dairy products, calcium, and vitamin D and risk of prostate cancer. *Epidemiol Rev.*;23(1):87-92.
37. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, et al. (2002). Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res*; 8:464–70.
38. Channa K., Erin C. McCanlies, and Ainsley W. (2004). CYP3A4 Polymorphisms—Potential Risk Factors for Breast and Prostate Cancer: A HuGE Review *Am J Epidemiol*;160:825–841.
39. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, et al (1996). Increased risk for myelodysplastic syndromes amongst those with glutathione transferase theta1 (GST1) gene defect. *Lancet*; 347:295-297.
40. Chen R.Z., Pettersson U., Beard C., Jackson-Grusby L., and Jaenisch R. (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature.*; 395:89-93.
41. Chokkalingam, A. P., Pollak, M., Fillmore, C-M., Gao, Y-T., Stanczyk, F. Z., Deng, J., Sesterhenn, I. A., Mostofi, F. K., Fears, T. R., Madigan, M. P., Ziegler, R. G., Fraumeni, J. F., and Hsing, A. W. (2001). Insulin-like growth factors and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10: 421–427.
42. Chu DC, Chuang CK, Fu JB, Huang HS, Tseng CP & Sun CF (2002). The use of real-time quantitative polymerase Chain Reaction to detect hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking the GSTP1 gene to diagnose prostate cancer. *Journal of Urology* 167 1854-1858.
43. [Clark SJ](#), [Harrison J](#), [Paul CL](#), [Frommer M](#). (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* Aug 11;22(15):2990-7.
44. Colot V., and Rossignol J.-L. (1999). Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays.*;21, 402-411.
45. Combes, Burton.; Stakelum, Geneva Sue (1961). A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J Clin Invest.* Jun;40(6):981–988.
46. Cook LS, Goldoft M, Schwartz SM, Weiss NS. (1999). Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *J Urol*; 161,152-5.
47. Cooper DN, Youssoufian H. (1988). The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Genet*; 78: 151-5.
48. Cote RJ, Shi Y, Groshen S, et al (1998). Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 90: 916–20.
49. [Cunha GR](#), [Hayward SW](#), [Wang YZ](#). (2002). Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation.* Dec;70(9-10):473-85.

50. Cyril F., Alexandra H.-C., Pierre-Y. B., Francois B., Jacques B., Bertrand D., Jean-F.D., Christophe M., Michel R., Marie-C. M., Michele B., Richard C. S. And Annick C (2004). Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis. *Pharmacogenetics*, Vol 14 No 5
51. Çağ Ç., İbrahim C., Prostat Kanserinde Tedavi. (2003).
52. D. MAZHAR and J. WAXMAN. Diet and prostate Cancer. (2004). *B J U I N T E R N A T I O N A L* 919-922.
53. D.Ertunc, M.Aban, E.C.Tok, L.Tamer, M.Arslan, S.Dilek (2005). Glutathione-S-transferase P1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis. *Human Reproduction*, 8;2157–2161.
54. David Ryberg, Vidar Skaug¹, Alan Hewer, David H.Phillips, Lorna W.Harries, C.Roland Wolf, Dagfinn greid, Arve Ulvik, Phuong Vu and Aage Haugen. (1997). Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*; vol.18 no.7 pp.1285–1289.
55. David S., Gerardene M., Vivienne M. F. and Catriona A. D (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*;360,1-16.
56. Davis M, Sofer M, Kim SS, et al.(2002). The procedure of transrectal ultrasound guided biopsy of the prostate: a survey of patient preparation and biopsy technique. *J Urol*;167:566-70.
57. [De Marzo AM](#), [Meeker AK](#), [Zha S](#), [Luo J](#), [Nakayama M](#), [Platz EA](#), [Isaacs WB](#), [Nelson WG](#).(2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*. 62:55-62.
58. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C, et al (1996). Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interaction with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*;17:881-884.
59. Dearnaley DP. Cancer of the prostate. [Erratum: *BMJ* 1994;308:975.] *BMJ* 1994;308:780–4.
60. Debes JD, Yokomizo A, McDonnell SK, Hebring SJ, Christensen GB, Cunningham JM, Jacobsen SJ, Tindall DJ, Liu W, Schaid DJ, Thibodeau SN.(2004). Glutathione-S-transferase P1 polymorphism I105V in familial and sporadic prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. Nov;155(1):82-6.
61. Dhruva K.M., Anant K., Daya S.L.S., Rama D.M.(2004). Allelic variation of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes in North Indian population. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 5: 362-365.
62. Dimitri L., Alexey E., Antje M., Joachim D., and Heiko H.(2005). Functional Epigenomics Identifies Genes Frequently Silenced in Prostate Cancer. *Cancer Res* 65: 4218-27).
63. DiPaola RS, Patel J, Rafi MM (2001). Targeting apoptosis in prostate cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*; 15: 509–24.
64. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg.(2000). The Hallmarks of Cancer Review. *Cell*; Vol. 100, 57–70.
65. Duncan B.K., and Miller J.H. (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*. 287: 560-561.

66. Eaton DL and Bammler TK (1999). Concise Review of Glutathione S-transferase and their Significance to Toxicology. *Toxicological Sciences*;49;156-164.
67. Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, et al. (2003) Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am J Hum Genet.* Jan;72(1):1-12. Epub 2002 Dec 9.
68. [Egevad L](#), [Norlen BJ](#), [Norberg M](#) (2001).The value of multiple core biopsies for predicting the Gleason score of prostate cancer. *BJU Int.* Nov;88(7):716-21.
69. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*; 429 : 457-63.
70. Ehrlich M.(2000). DNA methylation: normal development, inherited diseases and cancer. *J. Clin. Ligand Assay*; 23, 144-146.
71. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*;61:3225–9.
72. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG.(1998) Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*;58:4515–8.
73. Esteller, M. et al. (1999). Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*;59:67-70.
74. Esteller, M. et al. (2000). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* **60**, 2368–2371.
75. Esteller, M. et al. (2000). Promoter hypermethylation and *BRCA1* inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl Cancer Inst.* **92**, 564–569
76. Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* **59**, 793–797
77. Fatma S., ETEM A., ERTUĞRUL S., HİCRAN M., HANDAN Ç. (2006). The relationship between the risk of lung cancer and the exon 5 (*ILE105VAL*) polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene. *Turkish Journal of Cancer*:Volume 36, No.1,5-10.
78. Fearon ER and Jones PA. (1992). Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB Journal*,; Vol 6, 2783-2790.
79. Friedman S (1985). The irreversible binding of azacytosine-containing DNA fragments to bacterial DNA(DNA(cytosine-5)methyltransferases. *J Biol Chem* **260** 5698-5705.
80. [Frommer M](#), [McDonald LE](#), [Millar DS](#), [Collis CM](#), [Watt F](#), [Grigg GW](#), [Molloy PL](#), [Paul CL](#) (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 1;89(5):1827-31.
81. Frommer M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.

82. Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC, Spiteri MA (2000). Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 161:1437–42.
83. G. Strathdee and R. Brown. (2002). Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Exp. Rev. Mol. Med*;1-17.
84. Gajewska J, Szczypka M (1992). Role of pi form of glutathione S-transferase (GST-pi) in cancer: a minireview. *Mater Med Pol*; 24:45-49.
85. Gardiner- Garden M. and Frommer M.(1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261-282
86. Genel Üroloji Smith
87. Gerda E., Gangning L., Ana A. & Peter A. J. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *NATURE*; 429:457-463.
88. Gibbs M, Stanford JL, McIndoe RA, Jarvik GP, et al. (1999). Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. [*Am J Hum Genet.* 64:776-87.](#)
89. Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, et al. (1993). A prospective study of dietary fat and risk of prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*;85:1571–9.
90. Giovannucci E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. [*J Natl Cancer Inst.* Feb 17;91\(4\):317-31.](#)
91. Gleason DF, Mellinger GT. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. [*J Urol.* Jan;111\(1\):58-64.](#)
92. Goelz, S.E., Vogelstein, B., Hamilton, S.R., Feinberg, A.P., (1985). Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms., *Science*, 228, 187-190.
93. [Goessl C, Krause H, Muller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J, Miller K.](#) (2000). Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res.* Nov 1;60(21):5941-5.
94. Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H & Miller K. (2001). DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. *Ann N Y Acad Sci*; 945: 51-58.
95. Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Schostak M, Straub B & Miller K. (2002). Methylation-specific PCR for detection of neoplastic DNA in biopsy washings. *J Pathol* ;196:331-334.
96. Goffin J & Eisenhauer E (2002). DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol* **13** 1699-1716.
97. Gonzalgo ML ; Isaacs WB (2003). Molecular pathways to prostate cancer . *J Urol .*; 170: 2444 – 52.
98. [Gonzalgo ML, Jones PA.](#)(2002). Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). [*Methods.* Jun;27\(2\):128-33.](#)
99. Gonzalgo ML, Jones Peter A.(1997). Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Research.* 2529-2531.
100. Gonzalgo ML, Pavlovich CP, Lee SM & Nelson WG. (2003). Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res*; 9: 2673-2677.

101. Goto T. and Monk M. (1998). Regulation of X- chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbial. Mol. Biol. Rev.*; 62, 362-378.
102. Greene FL, Page DL, Fleming ID. AJCC (2002). Cancer staging manual, (Springer Verlag, New York,).
103. Gsur A, Feik E, Madersbacher S (2004). Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol*;21:414–23. [2003 Nov. 26: Epub].
104. Gsur A, Haidinger G, Hinteregger S, Bernhofer G, Schatzl G, Madersbacher S, Marberger M, Vutuc C, Micksche M (2001). Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTP1, GSTM1 and GSTT1) and prostate-cancer risk.*Int J Cancer*. May 20;95(3):152-5.
105. Guengerich FP, Thier R, Persmark M, Taylor JB, Pemble SE, Ketterer B.(1995). Conjugation of carcinogens by θ class glutathione S-transferases: mechanisms and relevance to variations in human risk. *Pharmacogenetics*; 5: S103–S107.
106. Hake SB, Xiao A, Allis CD. (2004). Linking the epigenetic ‘language’ of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 2004; 90 : 761-9.
107. Hansen R.S., Wijmenga C., Luo P., Stanek A.M., Canfield T.K., Weemaes C.M., and Gartler S.M.(1999). The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF Immunodeficiency syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 96, 14412-14417.
108. Harada S, Tachikawa H, Kawanishi Y (2001). Glutathione S-transferase M1 gene deletion may be associated with susceptibility to certain forms of schizophrenia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 281:267-271.
109. Harden SV, Sanderson H, Goodman SN, Partin AA, Walsh PC, Epstein JI & Sidransky D. (2003). Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst* 95: 1634-1637.
110. Hark A.T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., and Tilghman S.M.(2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature.*; 405, 486-489.
111. [Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR \(1997\).](#) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. Apr;18(4):641-4.
112. Harris R, Lohr KN (2002). Screening for prostate cancer: an update of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*;137, 917-29.
113. Harrison J, Stirzaker C, Clark S. (1998). Cytosines adjacent to methylated CpG sites can be partially resistant to conversion in genomic bisulfite sequencing leading to methylation artifacts. *Anal Biochem* 264, 129–132.
114. Hashimoto T, Hashimoto K, Matsuzawa D, Shimizu E, Sekine Y, Inada T, et al (2005). A functional glutathione S-transferase P1 gene polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; 135:5–9.
115. Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S. (1970). Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine and their derivatives. *Biochemistry* 9, 2858–2866.

116. Hayes JD, Pulford DJ (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*;30:445– 600.
117. Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, Strickland PT, Alberg AJ, Watson M, et al (1998). Association between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *JNCI*; 90:512-517.
118. Hemmingsen A, Fryer AA, Hepple M, Strange RC, Spiteri MA.(2001) Simultaneous identification of GSTP1 Ile105 – >Val105 and Ala114 – >Val114 substitutions using an amplification refractory mutation system polymerase chain reaction assay: studies in patients with asthma. *Respir Res*; 2: 255–60.
119. [Hengstler JG](#), [Arand M](#), [Herrero ME](#), [Oesch F](#) (1998). Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res.*;154:47-85.
120. [Henrique R](#), [Jeronimo C](#). (2004). Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. *Eur Urol*. Nov;46(5):660-9; discussion 669. Review.
121. Henrique R., and Jeronimo C. (2004). Molecular detection of. prostate cancer: A role for GSTP1 hypermethylation. *Eur. Urol*. 46:660-669.
122. Herman JG, Baylin SB.(2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*; 349 : 2042-54.
123. [Herman JG](#), [Graff JR](#), [Myohanen S](#), [Nelkin BD](#), [Baylin SB](#). (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3;93(18):9821-6.
124. Herman, J. G. *et al.* (1994). Silencing of the *VHL* tumorsuppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 9700–9704
125. Hiatt RA, Armstrong MA, Klatsky AL, Sidney S. (1994). Alcohol consumption, smoking, and other risk factors and prostate cancer in a large health plan cohort in California (United States). *Cancer Causes Control* Jan;5:66-72.
126. Hickey K, Do KA, Green A. (2001). Smoking and prostate cancer. *Epidemiol Rev*;23:115-25.
127. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1695
128. Hu X, Xia H, Srivastava SK, et al (1998). Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[c]phenanthrene and benzo[g]chrysene. *Cancer Res*;58:5340 – 3.
129. [Huang SP](#), [Huang CY](#), [Wu WJ](#), [Pu YS](#), [Chen J](#), [Chen YY](#), [Yu CC](#), [Wu TT](#), [Wang JS](#), [Lee YH](#), [Huang JK](#), [Huang CH](#), [Wu MT](#). (2006) Association of vitamin D receptor FokI polymorphism with prostate cancer risk, clinicopathological features and recurrence of prostate specific antigen after radical prostatectomy. *Int J Cancer*. May 17
130. Hur SE, Lee JY, Moon HS and Chung HW (2004). Polymorphisms of the genes encoding the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Korean women: no association with endometriosis. *Mol Hum Reprod*, 11;15–19.

131. International Human Genome Sequencing Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409, 860-921.
132. Isaacs W. B., Bova G. B. Prostate cancer Vogelstein B. Kinzler K. W. eds. (1998). *The Genetic Basis of Human Cancer*, McGraw-Hill New York 653-660.
133. Issa J.P. (2000). CpG island methylation in aging and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 249, 101-118.
134. Jacob P. (2006). Epigenetic therapy - a new development in pharmacology. *Indian J Med Res.* 123:17-24.
135. Jacobsen SJ, Katusic SK, Bergstralh EJ, et al (1995). Incidence of prostate cancer diagnosis in the eras before and after serum prostate-specific antigen testing. *MM JAMA.* Nov 8;274(18):1445-9.
136. Jean B M., Ann E Ehrenhofer-M. and Heinrich L.(2003) Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Molecular Biology*, 4:1-9.
137. Jeanpierre M., Turleau C., Aurias A., Prieur M., Ledest, F., Fischer A., and Viegas-Pequignot E.(1993). An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum. Mol. Genet.*;2, 731-735.
138. Jenuwein T, Allis CD.(2001). Translating the histone code. *Science*; 293 : 1074-80.
139. Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, Oliveira J, Teixeira MR, Lopes C & Sidransky D (2004c) A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **10** 8472-8478.
140. Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Ribeiro FR, Oliveira J, Fonseca D, Teixeira MR, Lopes C & Sidransky D (2004b) Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. *Clin Cancer Res.* **10** 4010-4014.
141. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG & Sidransky D (2001). Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.*; 93: 1747-1752.
142. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C & Sidransky D (2002). Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology* 60. 1131-1135.
143. [Jeronimo C.](#), [Varzim G.](#), [Henrique R.](#), [Oliveira J.](#), [Bento MJ.](#), [Silva C.](#), [Lopes C.](#), [Sidransky D.](#) (2002). I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 11(5):445-50.
144. [Johansson AS](#), [Stenberg G](#), [Widersten M](#), [Mannervik B.](#)(1998) Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol.* May 8;278(3):687-98.
145. Jones P.A., and Takai D.(2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*; 293, 1068-1070.
146. [Jones PA](#), [Baylin SB.](#) (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* Jun;3(6):415-28.

147. Jones, P.L. and Laird, P.W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* **21**, 163-167.
148. Jorge G, Sonia R, Octavia MG, Lsabel M, Teresa CF, Edward L, Luzia G, Julieta EP, Jose R.(2004). *Combined effects of glutathione S-transferase polymorphisms and thyroid cancer risk. Cancer Genet Cytogenet; 151: 60-7.*
149. Jung-Hoon Yoon, Leslie E. Smith, Zaohui Feng, Moon-shong Tang, Chong-Soon Lee and Gerd P. Pfeifer (2001). Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res.*;61:7110-7117.
150. Juttermann R, Li E & Jaenisch R (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** 11797-11801.
151. JY, Schantz SP, Stern JC, Kaur T, Lazarus P.(1999) Association between glutathione S-transferase pi genetic polymorphisms and oral cancer risk. *Pharmacogenetics*; 9:497-504.
152. Kane, M. F. *et al* (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* **57**, 808–811.
153. [Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS.](#)(2004). Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol.* Feb;202(2):233-40.
154. Kathrin Sundberg, Ann-Sofie Johansson, Gun Stenberg, Mikael Widersten, Albrecht Seidel, Bengt Mannervik and Bengt Jernstrom (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* vol.19 no.3 pp.433–436.
155. Kati P.P. and Tapio V. (2004). Molecular mechanisms of prostate Cancer. *European Urology*; 45: 683-691.
156. Katoh T, Kaneko S, Takasawa S, Nagata N, Inatomi H, Ikemura K, Itoh H, Matsumoto T, Kawamoto T, Bell DA.(1999). Human glutathione S-transferase P1 polymorphism and susceptibility to smoking related epithelial cancer; oral, lung, gastric, colorectal and urothelial cancer. *Pharmacogenetics* 9: 165-169.
157. Kempkes M, Golka K, Reich S *et al* (1996). Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotype as potential risk factor for urothelial cancer of the bladder. *Arch Toxicol*; 71, 123-6.
158. Ketterer B, Haris JM, Talaksa G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, Lang NP, Kadlubar FF (1992). The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung Cancer *Environ Health Perspect*; 98: 87-94.
159. Kiyohara C, Yamamura K, Nakanishi Y, *et al* (2000). Polymorphism in GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to lung cancer in a Japanese population. *Asian Pacific J Cancer Prev*; 1, 293-8.
160. Knudson, A. G. (2000). Chasing the cancer demon. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 1–19

161. [Ko Y](#), [Koch B](#), [Harth V](#), [Sachinidis A](#), [Thier R](#), [Vetter H](#), [Bolt HM](#), [Bruning T](#) (2000). Rapid analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms using real-time polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics*. Apr;10(3):271-4.
162. Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. (2004) The Multiethnic Cohort Study: Exploring Genes, Lifestyle and Cancer Risk. *Nature Reviews Cancer*;4:519-27.
163. [Komiya Y](#), [Tsukino H](#), [Nakao H](#), [Kuroda Y](#), [Imai H](#), [Kato T](#). (2005). Human glutathione S-transferase A1, T1, M1, and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *J Cancer Res Clin Oncol*. Apr;131(4):238-42. Epub 2004 Dec 23.
164. [Konishi N](#), [Nakamura M](#), [Kishi M](#), [Nishimine M](#), [Ishida E](#), [Shimada K](#). (2002). DNA hypermethylation status of multiple genes in prostate adenocarcinomas. *Jpn J Cancer Res*. Jul;93(7):767-73.
165. Kote-Jarai et. al. (2001). Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1. polymorphisms and early onset prostate cancer. *Pharmacogenetics* 11,. 325–330
166. Kote-Jarai Z, Easton D, Edwards SM, Jefferies S, Durocher F, Jackson RA, Singh R, Ardern-Jones A, Murkin A, Dearnaley DP, Shearer R, Kirby R, Houlston R, Eeles R (2001); CRC/BPG UK Familial Prostate Cancer Study Collaborators. Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 polymorphisms and early onset prostate cancer. *Pharmacogenetics*. Jun;11(4):325-30.
167. Laird PW. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 253–266.
168. Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S., and Wingo,(1999) P. A. Cancer statistics. *CA Cancer Clin.*; 49: 8–31.
169. Langstaff, G. (1817). Cases of fungus haematodes, with observations. *Medico-. Chirurgical Transactions*; 8, 272-305.
170. Lee T.L. et al.(2002). detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:1761-1766.
171. [Lee WH](#), [Isaacs WB](#), [Bova GS](#), [Nelson WG](#). (1997).CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. Jun;6(6):443-50.
172. Lee W-H., Morton, R. A., Epstein, J. I., Brooks, J. D., Campbell, P. A., Bova, G. S., Hsieh, W-S., Isaacs, W. B., and Nelson, W. G.(1994). Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;91: 11733–11737.
173. Lewis, D. F. V., and Lee-Robichaud, P (1998). Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*; 66: 217–233.
174. Li E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet*,3 (9):662-73.
175. Li E., Bestor T.H., and Jaenisch R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.*;69, 915-926.

176. [Li LC](#), [Carroll PR](#), [Dahiya R](#) (2005). Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis. and treatment. *J Natl Cancer Inst.* Jan 19;97(2):103-15.
177. [Li PE](#), [Nelson PS](#). (2001) Prostate cancer genomics. *Curr Urol Rep.* Feb;2(1):70-8.
178. LightCycler System, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim/ Germany
179. Lilja HA (1985). Kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest*;76:1899-1903.
180. Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, et al (2001) Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* **61**, 4238-4243.
181. Lin X, Asgari K, Putzi M, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, Kumar A, Piantadosi S, DeWeese TL, De Marzo AM *et al.* (2001a). Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1)
182. Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, Asgari K, Freije D, van Rees B, Gage WR *et al.* (2001b). GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 159 1815-1826.
183. Lipski BA, Garcia RL, Brawer MK (1996). Prostatic intraepithelial neoplasia: significance and management. *Semin Urol Oncol.*;14:149-155.
184. Listowsky I, Abramovitz M, Homma H, Niitsu Y (1988). Intracellular Binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. *Drug Metab Rev*;19:305–18.
185. Lodygin D, Diebold J & Hermeking H (2004). Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression. *Oncogene* **23** 9034-9041.
186. Lohmann S., Lehmann L., Tabiti K. (2000). Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *Biochemica*; 4: 23-28.
187. [Lundwall A](#), [Lilja H](#) (1987). Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA. *FEBSLett*;214:317-22.
188. Mann CL, Davies MB, Boggild MD, Alldersea J, Fryer AA, Jones PW, et al.(2000). Glutathione S-transferase polymorphisms in MS: their relationship to disability. *Neurology*; 54:552–557.
189. Mapp CE, Fryer AA, De Marzo N et al (2002). Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol*; 109: 867–72.
190. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Minna JD, McConnell J, Frenkel EP & Gazdar AF (2002). Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res.* **8** 514-519.
191. Matthey DL, Hassell AB, Plant M, Dawes PT, Ollier WR, Jones PW, et al (1999). Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. *Ann Rheum Dis*; 58:164–168.
192. Maugard CM, Charrier J, Bignon, Y (1998). Allelic deletion at glutathione S-transferase M1 locus and its association with breast cancer susceptibility. *Chem Biol Interact*;

193. McNeal JE (2003). Origin and development of carcinoma in the prostate. [Aktuelle Urol.](#) 2003 Mar;34(2):81-2.
194. McNeal, J.E.(1981) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*;2:35-49.
195. McNeal. J.E (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*; 12:619-33.
196. Meng MV, Dahiya R (2002). Molecular genetics. In: Carroll PR, Grossfeld GD, eds. *Prostate cancer*. Hamilton, Ontario: B C Decker,; 42–59.
197. Michael R. Rountree, Kurtis E. Bachman & Stephen B. Baylin (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature Genetics*;25, 269 – 277.
198. [Millar DS](#), [Ow KK](#), [Paul CL](#), [Russell PJ](#), [Molloy PL](#), [Clark SJ](#).(1999). Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* Feb 11;18(6):1313-24.
199. [Mitrunen K](#), [Jourenkova N](#), [Kataja V](#), [Eskelinen M](#), [Kosma VM](#), [Benhamou S](#), [Vainio H](#), [Uusitupa M](#), [Hirvonen A](#). (2001). Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. [Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.](#) Mar;10(3):229-36.
200. Mohammed T. T., CAROLINE C., LINDA S., NEVA E. H., PATRICK H. R., GRAEME I. M., SIMON N.L. P. AND HOWARD L. M.(2002). CYP3A4 promoter variant is associated with prostate cancer risk in men with benign prostate hyperplasia. *Oncology REPORTS* 9: 653-655.
201. Monk M., Boubelik M., and Lehnert S.(1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. [Development.](#) 99, 371-382.
202. Myohanen, S. K., Baylin, S. B. & Herman, J. G. Hypermethylation can selectively silence individual *p16ink4A* alleles in neoplasia. *Cancer Res.* **58**, 591–593 (1998).
203. N Ahuja, Q Li, AL Mohan, SB Baylin and JP Issa (2006). Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and Cancer. *Cancer Research*, Vol 58, Issue 23 5489-5494.
204. Nakagawa, H. *et al.* (2001). Age-related hypermethylation of the 5' region of *MLH1* in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res.* **61**, 6991–6995
205. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG & De Marzo AM.(2003). Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol.*; 163: 923-933.
206. [Nakazato H](#), [Suzuki K](#), [Matsui H](#), [Koike H](#), [Okugi H](#), [Ohtake N](#), [Takei T](#), [Nakata S](#), [Hasumi M](#), [Ito K](#), [Kurokawa K](#), [Yamanaka H](#) (2003). Association of genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) with familial prostate cancer risk in a Japanese population [Anticancer Res.](#);23:2897-902.
207. Nam, R. K., Toi, A., Vesprini, D., Ho, M., Chu, W., Harvie, S., Sweet, J., Trachtenberg, J., Jewett, M. A. S., and Narod, S. A (2000). The V89L

- polymorphism of the *SRD5A2* gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology*;57:199-204.
208. Naoki K., Takeshi N., Jun M., Hiromi S., Masahiro M., Noriaki T. and Nagahide M.(2005). Methylation profiles of genes utilizing newly developed CpG island methylation microarray on colorectal cancer patients [Nucleic Acids Research Volume 33, Number 5](#) Pp. e46
 209. Narla G, Heath KE, Reeves HL, et al (2001). KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science*; 294: 2563–66.
 210. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, et al (1993). p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 85: 1657–69.
 211. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton, DL, White E, Hornung SK, Leng ZT, et al (1993). The glutathione S-transferase mu polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res*; 53:2312-2318.
 212. [Nelson CP](#), [Kidd LC](#), [Sauvageot J](#), [Isaacs WB](#), [De Marzo AM](#), [Groopman JD](#), [Nelson WG](#), [Kensler TW](#).(2001). Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferaseP1. [CancerRes](#). Jan1;61(1):103-9.
 213. Nelson WG, De Marzo AM, Deweese TL, Lin X, Brooks JD, Putzi MJ, Nelson CP, Groopman JD & Kensler TW.(2001) Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*. 952: 135-144.
 214. [Nelson WG](#), [De Marzo AM](#), [Isaacs WB](#) (2003). Prostate cancer. [N Engl J Med](#). Jul 24;349(4):366-81.
 215. Nelson, C. P., Kidd, L. C., Sauvageot, J., Isaacs, W. B., De Marzo, A. M., Groopman, J. D., Nelson, W. G., and Kensler, T. W. Protection against 2- hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Cancer Res*. 2001; 61: 103–109.
 216. Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S. (2002). Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues MolBiol*.;4(4):111-28.
 217. Nupponen N, and Visakorpi T. (1999) Molecular biology of progression of prostate Cancer. *Eur Urol* 35: 351-354.
 218. Okano M., Bell D.W., Haber D.A., and Li E.(1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*.; 99, 247-257.
 219. Okano M., Xie S., and Li, E. (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 26, 2536-2540.
 220. Paris, P. L., Kupelian, P. A., Hall, J. M., Williams, T. L., Levin, H., Klein, E. A., Casey, G., and Witte, J. S.(1999). Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*; 8: 901–905.
 221. Parkin D.M., Bray F., Ferlay, J., Pisani, P. (2002). Global cancer statistics,. *CA Cancer J Clin* 2005; 55, 74-108.
 222. Peter A. Jones and Daiya Takai. (2001). The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *SCIENCE* ;293,1068-1070.

223. Peter L. J., Gert C. J. V., Paul A. W., Danielle V., Stefan U. K., Nicoletta L., John S. & Alan P. W. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* ;19, 187 – 191.
224. Pfeifer, G. P., Tang, M. & Denissenko, M. F. (2000). Mutation hotspots and DNA methylation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 249, 1–19.
225. Piipari R, Nurminen T, Savela K, Hirvonen A, Mantyla T, Anttila S. (2003). Glutathione S-transferases and aromatic DNA adducts in smoker bronchoalveolar macrophages. *Lung Cancer*, 39:265–272.
226. [Plass C](#) (2002). Cancer epigenomics. [Hum Mol Genet.](#) Oct 1;11(20):2479-88.
227. [Pollak M](#), [Beamer W](#), [Zhang JC](#). (1998-99). Insulin-like growth factors and prostate cancer. [Cancer Metastasis Rev.](#);17(4):383-90.
228. Prendergast G.C. and Ziff E.B (1991). Methylation sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science*; 251, 186-189.
229. [Presti JC](#) (2003). [Jr](#). Prostate biopsy: how many cores are enough? [Urol Oncol.](#) Mar-Apr;21(2):135-40.
230. Putnam SD, Cerhan JR, Parker AS, Bianchi GD, Wallace RB, Cantor KP, Lynch CF.(2000). Lifestyle and anthropometric risk factors for prostate cancer in a cohort of Iowa men. *Ann Epidemiol* Aug;10:361-9.
231. Quinn M, Babb P (2002). Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: 85 comparisons. *BJU Int*;90,162-73.
232. Ramsahoye B. H. Et al (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 97, 5237-5242.
233. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ and Malkowicz SB (1998) Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*;90: 1225-1229.
234. [Rebbeck TR](#), [Walker AH](#), [Jaffe JM](#), [White DL](#), [Wein AJ](#), [Malkowicz SB](#) (1999). Glutathione S-transferase-mu (GSTM1) and -theta (GSTT1) genotypes in the etiology of prostate cancer. [Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.](#); 8:283-7.
235. Rebbeck, T. R. (1997). Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*; 6: 733–743.
236. Rehman I, Cross SS, Catto JW, Leiblich A, Mukherjee A, Azzouzi AR, Leung HY & Hamdy FC (2005). Promoter hyper-methylation of calcium binding proteins S100A6 and S100A2 in human prostate cancer. *Prostate*.
237. Reik W., Dean W., and Walter J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 293, 1089-1093.
238. [Rennie PS](#), [Nelson CC](#).(1998-99)Epigenetic mechanisms for progression of prostate cancer. [Cancer Metastasis Rev.](#)17(4):401-9.
239. Ricardo Guerrero.(2005). Year's comments for 2005 85 *MICROBIOLOGY*;8:231-234.
240. Richard L. M (2003). Cancer Epigenetics. *Oncogene*; 22, 6479-6483.
241. Richard Y.-H.Wang, Charles W.Gehrke and Melanie Ehrlich.(1980) Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Research* Volume 8 Number 20.

242. Riegman PH, Vliestra RJ, Van Der Koput J et al (1989). Characterization of the PSA gene. *Biochem Biophys Res Commun*; 159:95-102.
243. [Rizzo S](#), [Attard G](#), [Hudson DL](#). (2005). Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif.*; 38:363-74.
244. Robertson K.D. and Wolffe A.P. (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat. Rev. Genet.*1, 11-19.
245. [Ross JS](#), [Sheehan CE](#), [Dolen EM](#), [Kallakury BV](#). (2002). Morphologic and molecular prognostic markers in prostate cancer. *Adv Anat Pathol.* Mar;9(2):115-28.
246. Rossini A., Rapozo D. C.M., Amorim L.M.F., Macedo J.M.B., Medina R., Neto J. et al (2002). Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population *Genet. Mol. Res.* (3): 233-240.
247. Rush, L.J. and Plass, C. (2002). Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present and future applications. *Anal. Biochem.* Aug 15;307(2):191-201.
248. Sachidanandam R., Weissman, D., Schmidt, S., Kakol, J., Stein, L., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J., Mortimore, B., Willey, D., Hunt, S., Cole, C., Coggill, P., Rice, C., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D., Kwok, P., Mardis, E., Yeh, R., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R., McPherson, J., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W., Reich, D., Higgins, J., Daly, M., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M., Linton, L., Lander, E. and Altshuler, D. (2001). The 85 SNP Map Working Group A Map of Human Genome Sequence Variation Containing 1.42 Million Single Nucleotide Polymorphisms., *Nature* 409: 928–933.
249. Sagner, G., Goldstein, C., Miltenburg, R (1999). Detection of Multiple Reporter Dyes in Real-time, On-line PCR Analysis with the LightCycler System. *Biochemica*,;2: 7-11.
250. Sarah J. P., David V. C., Pamela L. P., Anthony P. C., Graham C., and John S. W (2003). *CYP3A4* and *CYP3A5* Genotypes, Haplotypes, and Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; Vol. 12, 928–932.
251. Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharia A, Kotcherguina I, Fujimoto S & Dahiya R (2002) Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **94** 384-390.
252. Sato K, Qian J, Slezak JM, et al (1999). Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 91: 1574–80.
253. Scardino PT, Weaver R (1992). Early detection of prostate cancer *Hum. Pathol.*;23, 211-222.
254. Sctiawan VW, Zhang ZF, Yu GP, et al (2000). *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes and risk of gastric cancer: A case control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 9, 73 -80.
255. Sesso HD, Paffenbarger RS Jr, Lee IM (2001). Alcohol consumption and risk of prostate cancer: The Harvard Alumni Health Study. *Int J Epidemiol* Aug;30:749-55.
256. Sesterhenn I.A., *IARC Pres Lyon*, (2004) 159-215 World Health Organization Classification of Tumors.

257. Sharpe CR, Siemiatycki J (2001). Case-control study of alcohol consumption and prostate cancer risk in Montreal, Canada. *Cancer Causes Control* Sep;12:589-98.
258. Sharpe CR, Siemiatycki J. (2001). Joint effects of smoking and body mass index on prostate cancer risk. *Epidemiology* Sep;12:546-51.
259. Shepard TF, Platz EA, Kantoff PW, Nelson WG, Isaacs WB, Freije D, Febbo PG, Stampfer MJ, Giovannucci E. (2001). The I105V polymorphism of the glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) and prostate cancer risk: a prospective study. *Cancer P&S Medical Review*. Nov;7(2):9-14.
260. Sherry S.T. et al.(2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.*;29, 308-311.
261. Shiari T, asamoto M, takahashi S, Imaida K. et al (2002) Diet and prostate cancer *Toxicology*,; 181-182:89-94.
262. Shimuza H, Ross R, Bernstein L, Yatani R, et al (1991). Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles Country. *Br J Cancer*; 63, 963-6.
263. [Smith JR](#), [Freije D](#), [Carpten JD](#), [Gronberg H](#).et al. (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science*. Nov22;274(5291):1371-4.
264. Sobin LH, Wittekind C, eds (1997). TNM classification of Malignant Tumours. *85 Union Against Cancer*.;5th ed. New York, Ny: Wiley-Liss,
265. [Spurdle AB](#), [Webb PM](#), [Purdie DM](#), [Chen X](#), [Green A](#), [Chenevix-Trench G](#). (2001). Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis*;22(1):67-72.
266. [Sreelekha TT](#), [Ramadas K](#), [Pandey M](#), [Thomas G](#), [Nalinakumari KR](#), [Pillai MR](#).(2001). Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral Oncol*. Oct;37(7):593-8.
267. Srivastava D, Mandhani A, Mittal B, Mittal RD. (2005). Genetic polymorphism of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and susceptibility to Prostate cancer in Northern India. *BJU Int*, 95, 170- 3.
268. 267, Frank KH, Golka K, et al (2000). Glutathione transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma. *Arch Toxicol*, 74;521-6.
269. Stephen D, Mikolajczyk and Harry G (2002). Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. Review
270. Steven S.C. and Ingrid J.H. (2002). Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer : A HuGE review. *Genetics in medicine*.; 4: 250-256.
271. Stoneking M. (2001). Single Nucleotide Polymorphisms. From the Evolutionary Past, *Nature*,; 15: 821-822.
272. Su F, Hu X, Jia W, Gong C, Song E, Hamar P.(2003). Glutathion S transferase pi indicates chemotherapy resistance in breast cancer. *J Surg Res*. Jul;113(1):102-8.
273. Suarez BK, Gerhard DS, Lin J, et al (2001). Polymorphisms in the prostate cancer susceptibility gene HPC2/ELAC2 in multiplex families and healthy controls. *Cancer Res*; 61: 4982–84.

274. Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, et al (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*;19:433-436.
275. Takahiko K, Masahiro N, Makoto Y, Hisato I, Tetsuro M and Toshihiro K. (1999). Urothelial Cancer Risk in Relation to Genotypes of Glutathione S-Transferase (GST) M1, T1, P1 and N-Acetyltransferase 2 (NAT2), and Tobacco Smoking *J Occup Health*; 41: 12–18.
276. Takai D. & Jones P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 3740–3745.
277. Tamer L, Çalikoğlu M, Ates NA, Yıldırım H, Ercan B, Sarıtas E, Ünlü A, Atık U (2004). Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology*; 9: 493–498.
278. Tapio V (2003). The Molecular genetics of Prostate Cancer. *Urology*; 62: 3-10.
279. Tate P.H., and Bird A.P.(1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.*; 3, 226-231.
280. [Tavtigian SV](#), [Simard J](#), [Teng DH](#), [Abtin V](#). et al (2001). A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet.* Feb;27(2):172-80.
281. Taylor SM & Jones PA (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol* 111 187-194.
282. Tchou JC, Lin X, Freije D, Isaacs WB, Brooks JD, Rashid A, et al. (2000). GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*;16:663–76.
283. Terrier P, Townsend AJ, Coindre JM, Triche TJ, Cowan KH (1990). An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am J Pathol*; 137: 845–853.
284. [Tokumaru Y](#), [Harden SV](#), [Sun DI](#), [Yamashita K](#), [Epstein JI](#), [Sidransky D](#). (2004). Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* Aug 15;10(16):5518-22.
285. Tolbert PE. Oils and Cancer (1997). *Cancer Causes and Control*; 8: 386-405.
286. Toruner GA, Akyerli C, Ucar A, et al.(2001). Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and bladder cancer susceptibility in the Turkish population. *Arch Toxicol*, 75;459-64.
287. [Tribukait B](#).(1993). Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patients with prostate carcinomas: clinical research and application. *Eur Urol*;23 Suppl 2:64-76.
288. Tycko B. (1997). DNA methylation in genomic imprinting. *Mutat. Res.*; 386, 131-140.
289. Vertino P.M., Yen R.W., Gao J., and Baylin S.B. (1996). De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts

- overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol. Cell. Biol.*; 16: 4555-45.
290. Vijayalakshmi K, Vettriselvi V, Krishnan M, Shroff S, Vishwanathan KN, Jayanth VR, Paul SF (2005). Polymorphisms at GSTM1 and GSTP1 gene loci and risk of prostate cancer in a South Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev*. Jul-Sep;6(3):309-14.
 291. Vincenzo Bagnardi, Ms.C., Marta Blangiardo, Ms.C., Carlo La Vecchia, M.D., and Giovanni Corrao, Ph.D (2001). Alcohol Consumption and the Risk of Cancer. *A Meta-Analysis Alcohol Research & Health* Vol. 25, No. 4, 263-270.
 292. Visakorpi T, Elo JP (2001). Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med* 33: 130-41.
 293. [Vogelstein B](#), [Fearon ER](#), [Hamilton SR](#), [Kern SE](#) et al (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. Sep 1;319(9):525-32.
 294. W.A. Schulz, M. Burchardt and M.V. Cronauer (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction*.; 9:437-448.
 295. Wade P.A. (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays*.; 23: 1131-1137.
 296. Wadelius M, Autrup JL, Stubbins MJ, Andersson S-O, Johnansson J-E, Wadelius C, Wolf CR, Autrup H, Rane A. (1999). Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19, and GSTP1 and their association with prostate cancer. *Pharmacogenetics* 9: 333-40.
 297. Walsh C.P., Chaillet J.R., and Bestor T.H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.*; 20, 116-117.
 298. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, et al (2001). Role of HPC2/ELAC2 in hereditary prostate cancer. *Cancer Res*; 61: 6494-99.
 299. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. (2002). [Purification of a human prostate specific antigen](#). *J Urol*. Mar;167(3):1226-30.
 300. Wang SI, Parsons R, Iltmann M. (1998). Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 4: 811-15.
 301. [Watson MA](#), [Stewart RK](#), [Smith GB](#), [Massey TE](#), [Bell DA](#) (1998). Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. Feb;19(2):275-80.
 302. Watt KW, Lee PJ, M'Timkulu T, Chan WP, Loo R (1986). Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 3166-3170.
 303. Welfare M, Adekun AM, Bassendine MF, et al (1999). Polymorphisms in GSTP1, GSTM1 and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 8, 289-2.
 304. [Whittemore AS](#), [Kolonel LN](#), [Wu AH](#), [John EM](#), [Gallagher RP](#), [Howe GR](#), [Burch JD](#), [Hankin J](#), [Dreon DM](#), [West DW](#). (1995). Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst*. May 3;87(9):652-61.

305. Widersten, M., Pearson, W.R., Engström, A. and Mannervik, B. (1991). Heterologous expression of the allelic variant μ -class glutathione transferases μ and ψ . *Biochem. J.* 276: 519-524.
306. William G. Nelson, M.D., Ph.D., Angelo M. De Marzo, M.D., Ph.D., and William B. Isaacs, Ph.D. (2003). Mechanisms of disease, Prostate Cancer. *N Engl J Med*;349:366-81.
307. Wilson MH, Grant PJ, Kain K, Warner DP, Wild CP.(2003). Association between the risk of coronary artery disease in South Asians and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase M1. *Biomarkers*; 8:43-50.
308. Wolffe AP, Matzke MA (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*;286: 481-6.
309. Woodson K, Gillespie J, Hanson J, Emmert-Buck M, Phillips JM, Linehan WM & Tangrea JA.(2004). Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate*, 60 25-31.
310. Woodson K, Hanson J & Tangrea J (2004a). A survey of gene-specific methylation in human prostate cancer among black and white men. *Cancer Lett* **205** 181-188.
311. Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S (1998). Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. [*Nat Genet.* Oct;20\(2\):175-9.](#)
312. [Xu S](#), [Wang Y](#), [Roe B](#), [Pearson WR](#). (1998). Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. [*J Biol Chem.* Feb 6;273\(6\):3517-27.](#)
313. Yang, R M Pfeiffer and A M (2006). Goldstein Influence of glutathione-S-transferase (GSTM1, GSTP1, GSTT1) and cytochrome p450 (CYP1A1, CYP2D6) polymorphisms on numbers of basal cell carcinomas (BCCs) in families with the naevoid basal cell carcinoma syndrome [BMJ Publishing Group Ltd](#) 43.
314. [Ye Z](#), [Song H](#), [Higgins JP](#), [Pharoah P](#), [Danesh J](#). (2006). Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. [*PLoS Med.* Apr;3\(4\):e91. 1-11](#)
315. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB & Nelson WG 2004 Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res.* 64 1975-1986.
316. Yoder J.A., Walsh C.P., and Bestor T.H.(1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*;13, 335-340
317. Zhang J., Pfeifer GP (2004) Methylation of the retinoid response gene TIG1 in prostate cancer correlates with methylation of the retinoic acid receptor beta gene. *Oncogene* 23 2241-2249.
318. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK (1993). Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. [*Carcinogenesis.* Sep;14\(9\):1821-4.](#)
319. Zhou M, Tokumaru Y, Sidransky D & Epstein JI. (2004). Quantitative GSTP1 methylation levels correlate with Gleason grade and tumor volume in prostate needle biopsies. *J Urol* 171: 2195-2198.

320. [Zimniak P](#), [Nanduri B](#), [Pikula S](#), [Bandorowicz-Pikula J](#), [Singhal SS](#), [Srivastava SK](#), [Awasthi S](#), [Awasthi YC](#).(1994). Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. [*Eur JBiochem.*](#) Sep15;224(3):893-9.

7.2 KISALTMALAR

5-aza-C: azacytidine

5-aza-dC: 5-aza-2'deoxyctidine

5-MeC: metilsitozin

A: Adenin

Ala: Alanin

AMACR: Alpha-methylacyl-CoA racemase

APC: Adenomatous polyposis coli (Adenomatöz Polipozis Coli)

AR: Androjen reseptörü

ATP: Adenozin trifosfat

BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2

BRCA 1: Breast cancer 1, early onset

BRCA 2: Breast cancer 2, early onset

BSP: Bisülfid-dizi PCR

BT: Bilgisayarlı tomografi

C: Sitozin

CAPB: Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta

CDKN1B (P27KIP1): cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (Siklin- bağımlı kinaz inhibitörü 1B)

CDKN2B: Siklin- bağımlı kinaz inhibitörü 2B

CH₃:Metil grubu

COBEP (KLF6): Core promoter element binding protein

CRBP1: Cellular retinol binding protein 1 (Hücresel Retinol Bağlayıcı Protein)

CYP17: cytochrome P450, subfamily XVII, (17-hidroksilaz sitokrom p450)

CYP3A4: Sitokrom P450 3A4

CZ: Santral bölge (central zone)

DHT: Dihidrotestosteron

DMAP1: [DNA methyltransferase 1 associated protein 1](#)

DMH: Differential methylation Hybridization (Diferansiyel metilasyon hibridizasyonu)

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNMT: DNA metiltransferazlar

DRE: Parmakla Rektal Muayene

dsDNA: Çift iplikli DNA

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ELAC2: ElaC homolog 2
EZH2: Enhancer of zeste 2
FASN: Fatty acid synthase
FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi
G: Guanin
GSH: Glutasyon
GST: Glutasyon S-transferaz
GSTM1: Glutasyon S-transferaz M1
GSTP1: Glutasyon S-Transferaz P1
GSTT1: Glutasyon S-transferaz T1
HAT: Histon asetiltransferazlar
HDAC: Histon deasetilaz
HGPIN: High grade prostatic intraepithelial neoplasia (yüksek dereceli prostatik intraepitelial neoplazi)
HPC 1: Hereditary prostate cancer 1
HPC X: Prostate cancer, hereditary, X-linked
HPN: Hepsin (transmembrane protease, serine 1)
hTERT: Human telomerase reverse transcriptase
ICF: Immunodeficiency- Centromeric Instability- Facial Anomalies
IGFBP-3: IGF bağlayıcı protein 3
IGF-I: İnsülin benzeri büyüme faktörü
Ile: İzolösin
kb : Kilobaz
LC: LightCycler
LINEs: Long interspersed nuclear elements
Mb: Megabaz
MBD: Metil-CpG Bağlayan Proteinler
MBD: Metil-CpG Bağlayan Proteinler
MGMT: O⁶- metilguanin- DNA metiltransferaz
MRI: manyetik rezonans görüntüleme
MSP: Metilasyon-Spesifik PCR
MSR1: macrophage scavenger receptor 1
MS-SNuPE: Metilasyona Hassas Tek Nükleotid Primer Uzaması

MYC: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
 NKX3-1: NK3 transcription factor related, locus 1
 PAH: Polisiklik aromatik hidrokarbon
 PCAP: Predisposing for prostate cancer
 PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
 PIA: Prostat intraepitelyal atrofi
 PIN: İyi huylu hiperplastik nodül (prostatic intraepithelial neoplasia)
 PSA: Prostat Spesifik Antijen
 PTEN: Phosphatase and tensin homolog
 PTGS2: Prostaglandin endoperoxidase synthase 2 (Prostaglandin Endoperoksidaz Sentez 2)
 PZ: Periferik bölge (peripheral zone)
 RAR β 2: Retinoic acid receptor β 2 (Retinoik Asit Reseptörü)
 RASSF1A: Ras-association domain family 1A
 Rb: Retinoblastoma
 RFLP: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
 RLGS: Restriction landmark genomic screening
 RNASEL: Ribonuclease L
 RT-PCR: Real time polymerase chain reaction
 SAM: S-Adenozil metionin
 SINEs: Short interspersed nuclear elements
 SNP: (Single Nucleotide Polymorphism) Tek nükleotid Polimorfizmi
 SRD5A2: 5 alfa-redüktaz tip II (Steroid 5-alpha-reductase 2)
 STK11: Serin/treonin kinaz 11
 T: Timin
 TIMP3: Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Metalloproteinaz Doku İnhibitörü 3)
 Tm: Erime Sıcaklığı
 TNM: Tümör, nod, metastaz
 TP53 (p53): p53 tumor suppressor, tümör protein p53
 TZ: Transisyonel bölge (transition zone)
 Val: Valin
 VDR: Vitamin D reseptör
 VHL: Von-Hippel Lindau sendromu
 WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

7.3 ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Almanya' da doğdum. 1999 – 2000 öğretim yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladım ve 2004 yılında mezun oldum. 2004 yılında, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü' nün açtığı Tıbbi Biyoloji lisans üstü eğitim programında yüksek lisansa başladım. 16 Ekim 2005 tarihinden itibaren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.