

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

**BİR TÜRK POPÜLASYONUNDA
PROSTAT KANSERİ VE Axin-2 GEN
POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gonca DÖNMEZ**

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Ergün PINARBAŞI**

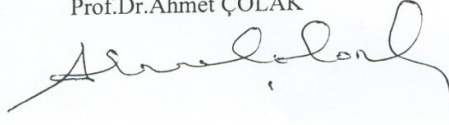
**2008
SİVAS**

SINAV TUTANAĐI

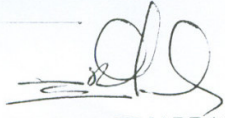
Sağlık Bilimleri Enstitüsü 15/01/2008 tarih ve 1/7 sayılı kararı ile oluşturulan jürimiz Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Öğrencisi Gonca DÖNMEZ'in Tez Savunma sınavını yapmak üzere 30/01/2008 tarihinde saat 14:00'de Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında toplanmıştır.

Adayın tezinin kabul edildiği ve tez savunmasıyla ilgili olarak kendisine yöneltilen sorulara verdiği yanıtları tatminkâr bulan jürimiz adayın sınavı başardığına oy birliği ile karar vermiştir.

Prof.Dr.Ahmet ÇOLAK



Prof.Dr.Ergün PINARBAŞI



Yrd.Doç.Dr.Yavuz SİLİĞ



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05. 01. 1984 tarih ve 84/1 nolu kararı ile kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLO ve RESİM DİZİNİ	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Bezi	3
2.2. Prostat Bezi Problemleri	4
2.3. Prostat Kanseri	5
2.4. Prostat Kanseri Etyolojisi	7
2.5. Prostat Kanseri Gelişiminde ve Metastazında Rol Alan Sinyal İletim Yolakları	9
2.5.1. Hormonal Sinyal İletim Yolakları	11
2.5.1.1. Androjenik Sinyal İletim Yolağı	12
2.5.1.2. Östrojen Sinyal İletim Yolağı	12
2.5.2. Büyüme Faktörü Sinyal İletim Yolakları	12
2.5.2.1. Sitokin Sinyal İletim Yolakları	12
2.5.2.2. Nöropeptid Sinyal İletim Yolakları	13
2.5.2.3. EGFR Ailesi Üyesi Yolağı	13
2.5.2.4. Hedgehog Sinyal İletim Yolağı	13
2.5.2.5. Wnt Sinyal İletim Yolakları	14
2.6. Axin2 Gen Yapısı, Fonksiyonu ve Kanser Gelişimindeki Rolü	16
2.7. Polimorfizmin Tanımı ve Genetik Polimorfizmin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	19
2.7.1. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	20
2.7.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)	20

2.7.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	22
2.8. Agaroz Jel Elektroforezi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Kullanılan Cihazlar	25
3.2. Kimyasal Maddeler	26
3.3. Çalışma Grubu	27
3.4. Örneklerin Alınması	27
3.5. DNA İzolasyon	27
3.6. Genotipleme	27
3.7. Jel Elektroforezi	31
3.7.1. Jelin Hazırlanması	31
3.7.2. Jelde DNA'nın Koşturulması	31
3.8. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Axin2 Geni Ekzon1 ve Ekzon5 Polimorfizmlerinin RFLP Yöntemi ile Değerlendirilmesi	33
4.2. Hasta ve Kontrol Grubunda Yer Alan Bireylerin Yaş Ortalamalarının Değerlendirilmesi	37
4.3. Hasta ve Kontrol Grubunda Yer Alan Bireylerin Sigara ve Alkol Kullanımı ile Ailesel Öykülerinin Değerlendirilmesi	38
4.4. Axin2 Geni Ekzon1 ve Ekzon5 Polimorfizmlerinin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımlarının Değerlendirilmesi	39
4.4.1. Axin2 Geni Ekzon1 148C>T Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi	39
4.4.2. Axin2 Geni Ekzon1 432T>C Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi	41
4.4.3. Axin2 Geni Ekzon5 1365A>G Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi	43
4.4.4. Axin2 Geni Ekzon5 1386C>T Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi	45

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
6. ÖZET	54
7. SUMMARY	55
8. KAYNAKLAR	56
EKLER	66
YEREL ETİK KURUL KARARI	69

AILEM'E

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince verdiği destek ve önerilerle bana iyi bir rehber olan değerli hocam Prof. Dr. Ergün Pınarbaşı'na gösterdiği sabır ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Bilgi birikimlerinden her zaman yararlandığım ve desteklerini benden esirgemeyen Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim elemanlarından Prof. Dr. Ahmet Çolak ve Yrd. Doç. Dr. İzzet Yelkovan'a, ayrıca katkılarından dolayı Biyoistatistik A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ziyet Çınar'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan, beraber çalışmaktan her zaman mutlu olduğum, çıkmaza girdiğim zamanlarda benden desteğini esirgemeyen canım arkadaşım Meral Yılmaz'a varlığından dolayı teşekkür ederim.

Önerileri her zaman benim için önemli olan, hayatımın vazgeçilmezleri arasında yer alan can dostum Erkan Gümüş'e varlığından dolayı teşekkür ederim.

Verdikleri destek ve gösterdikleri alakadan dolayı çalışma arkadaşlarım Egemen Akgün ve E. Gülşen Güneş'e teşekkür ederim.

Yüreklerindeki güzel sevgiyi benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olacaklarına inandığım can dostlarım Esra Derkuş ve M. Ulaş Tatlıdil'e teşekkür ederim.

Güleç yüzüyle içimi ısıtan, tüm asabi hallerim ve huysuzluklarıma rağmen benden desteğini, önerilerini, sevgisini ve yüreğini esirgemeyen H. Nejat Postacıoğlu'na varlığından dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında benim için iyi birer model olan, tüm sıkıntılarımı paylaşan, zorluklarla nasıl savaşağımı bana öğreten, sevgilerini her zaman yürekte hissettiğim canım annem ve babam, Sebhat ve Mehmet Dönmez'e ve canım ağabeyim Burçin Dönmez'e candan teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Prostat kanseri başlangıcı ve ilerleyişi ile ilişkili hücresel olayların önerilen modeli	10
Şekil 2.2. Axin proteininin görev aldığı sinyal oluşum yolları	17
Şekil 2.3. Axin2 gen yapısı	18
Şekil 4.1. Ekzon1 148C>T polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü	33
Şekil 4.2. Ekzon1 432T>C polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü	35
Şekil 4.3. Ekzon5 1365A>G polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü	36
Şekil 4.4. Ekzon5 1386C>T polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü	37

TABLO VE RESİM DİZİNİ

Tablo 3.1. Ekzon1 ve ekzon5 amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri	28
Tablo 3.2. PCR koşulları	29
Tablo 3.3. Ekzon1 ve ekzon5 polimorfizmleri için PCR programı	29
Tablo 3.4 RFLP koşulları	30
Tablo 3.5. RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazların DNA üzerindeki tanıma bölgeleri	30
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş ortalamaları	38
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin sigara kullanımı, alkol kullanımı ve ailesel öyküleri açısından değerlendirme sonuçları	39
Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubundaki Axin2 geni 148. bölge genotip ve allel dağılımları	40
Tablo 4.4. Hastalığın ortaya çıkışında hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (C alleli için)	41
Tablo 4.5. Hasta ve kontrol grubundaki Axin2 geni 432. bölge genotip ve allel dağılımları	42
Tablo 4.6. Hastalığın ortaya çıkışında hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (C alleli için)	43
Tablo 4.7. Hasta ve kontrol grubundaki Axin2 geni 1365. bölge genotip ve allel dağılımları	44
Tablo 4.8. Hastalığın ortaya çıkışında hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (A alleli için)	45
Tablo 4.9. Hasta ve kontrol grubundaki Axin2 geni 1386. bölge genotip ve allel dağılımları	46
Tablo 4.10. Hastalığın ortaya çıkışında hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (T alleli için)	47

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Polimorfizm genel olarak aynı türün aynı popülasyonunda iki ya da daha fazla farklı formun var olması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Polimorfizm biyoçeşitlilik, genetik varyasyon ve adaptasyon ile ilişkili bir çeşit değişkenliktir. Evrimsel bir sürecin sonucu olan polimorfizm kalıtlıdır ve seçim yoluyla değiştirilebilir. Bunun yanı sıra, moleküler biyoloji alanında yapılan polimorfizm çalışmaları sonucunda elde edilen bulguların, bir çok hastalığa yatkınlığın belirlenmesindeki önemleri büyüktür.

Polimorfizm ve prostat kanseri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çok çalışma vardır.

Prostat kanseri, prostat bezindeki salgı hücrelerinin kontrolsüz büyümesine bağlıdır ve genellikle prostat bezinin dış kısmındaki hücrelerde görülmesine karşın (esas prostat bezlerinden), prostatın her bölgesinden gelişebilmektedir (1).

Epidemiyolojik çalışmalar prostat kanseri insidansının etnik ve coğrafik farklılıklar gösterdiğini; fakat prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesinden sorumlu olan genetik ve çevresel faktörler altındaki nedenlerin henüz tam anlaşamadıklarına işaret etmişlerdir (2).

Kanser gelişimi, hücre büyümesi ve devamlılığını kontrol eden ve normal embriyonik gelişimde önemli roller oynayan sinyal transdüksiyon yollarının anormal aktivasyonuna bağlıdır (3).

Omurgalı ve omurgasız embriyo gelişiminde tanımlanmış olan Wnt'ler bu süreçte hücre büyümesi, hareketliliği ve farklılaşmasını düzenleyerek, hedef hücreler içinde çeşitli sinyal kaskadlarını aktive eden, parakrin şeklinde davranan glikoproteinlerdir.

Wnt sinyal iletim yolağı bir çok organ sisteminde tümör gelişimi ile ilgilidir (4). Prostat hücrelerinde artan Wnt düzensizliği prostat kanseri gelişimine neden olabilmektedir (5,6,7).

Bazı tümör örneklerinde Wnt sinyal yolağı bileşenlerinden APC gen mutasyonları ve heterozigotluk kaybı belirlenmiştir. E-kaderin, β -katenin ve

GSK3 β ekspresyonlarının daha istilacı potansiyelli prostat kanseri hücre hatlarında azaldığı gösterilmiştir (8). Bu yolağın diğer önemli bileşeni ise Axin proteini. *Axin2* insan kromozom 17q24'de yer alır. Bu bölgedeki heterozigotluk kayıplarının meme, nöroblastoma ve diğer bazı tümörlerde sık rastlandığı belirlenmiştir.

Prostat kanseri ve *Axin2* polimorfizmi arasındaki ilişkinin var olup olmadığına dair literatürde herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Ancak çeşitli kanser tipleri ile *Axin2* arasındaki ilişki araştırılmış ve bu gendeki polimorfizmin prostat kanserine yakınlık oluşturabileceği ileri sürülmüştür (3).

Çalışmamız, *Axin2* geninin ekzon1 bölgesindeki 148C>T ve 432T>C ile ekzon5 bölgesindeki 1365A>G ve 1386C>T polimorfizmlerinin, prostat kanseri gelişmesinde bir risk faktörü olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Prostat Bezi

Latince’de “pro-önce” ve “stare-durmak” kelimelerinden oluşan prostat (9), erkeklerde bulunan en büyük yardımcı genital bezdir (1). Prostat ilk olarak bir anatomist olan Niccolò Massa tarafından 1536’da tanımlanmış, ve Flaman anatomist Andreas Vesalius tarafından 1538’de resmedilmiştir (10).

Seminal sıvı yapımı ve depolanmasına yardımcı olan prostat bezi yetişkin bir erkekte yaklaşık olarak 3cm uzunluğunda ve 20 gram ağırlığındadır (11). İçeriklerini uzun boşaltım kanalları aracılığıyla prostatik üretraya boşaltan 30-50 adet dallanmış bileşik tübüloalveoler bezden oluşur, ve ayrıca düz kasları da içermektedir. Prostatik bezler periüretal mukozal bezler, periüretal submukozal bezler ve esas bezler olarak adlandırılan periferal bileşik bezler olmak üzere üç bölgede düzenlenmişlerdir (1). Türler arasında anatomik, kimyasal ve fizyolojik olarak oldukça farklılık gösteren prostat, rektumun hemen önünde ve içinde idrarın biriktiği mesanenin alt kısmında bulunmaktadır ve aynı zamanda idrarın içinden geçtiği kanal olan üretrayı sarmaktadır (12,13).

Prostat zonlar ve loblar ile iki farklı yolla kısımlarına ayrılabilir. Zon sınıflandırması genellikle patolojide kullanılır. Periferal zon (PZ), genç erkek bireylerde normal prostatın %70’ini ve prostatik kanser kökeninin %70’inden fazlasını oluşturmaktadır. Ejakulatör kanalları çevreleyen merkezi zon (CZ) ise, normal prostat bezinin yaklaşık %25’ini oluşturur ve merkezi zon tümörleri prostat kanserlerinin %25’inden fazlasını oluşturur. Nadiren karsinoma ile ilişkili olan transisyon zonu (TZ) prostat hacminin %5’idir ve proksimal üretrayı çevreler ve benign prostatik büyümeden sorumlu kısımdır. Anteriör fibro-muskular zon (Stroma), prostatik ağırlığın yaklaşık %5’ini oluşturur ve sadece kas ve fibröz dokudan oluşmaktadır. Lob sınıflandırması ise genellikle anatomide kullanılır ve prostat anterior lob (isthmus), posterior lob, lateral loblar ve median lob olmak üzere dört loba ayrılır (14).

2. 2. Prostat Bezi Problemleri

Ergenlik döneminden sonra prostat, kabaca bir misket büyüklüğünden yaklaşık bir golf topu büyüklüğüne kadar yavaş yavaş büyür. 50'li yaşlarda ve bir çok faktörün etkisiyle, prostat tekrar büyümeye başlar. Bu artan büyüme çoğunlukla benign prostat hipertrofi (BPH) ya da prostat genişlemesi, prostatit ve hatta prostat kanserini içeren çeşitli problemlere neden olabilir.

Benign prostatik hipertrofi (BPH) ya da prostat büyümesi, prostat bezinin iç korunda bulunan hücrelerin büyümesi ve fibröz nodüller oluşturmasıdır. Bu nodüller üretraya baskı yaparak ağrı ve ürinyasyon problemleri yaratır. Tedavi edilmediği sürece BPH prostatite neden olur, şiddetli durumlarda ise mesanenin boşaltımında sorunlar çıkar ve bu sorunlar mesanenin ve böbreklerin tamamına yayılabilir. Prostat büyümesinin belirtilerini sık idrar atım ihtiyacı, ağrı, yanma, ürinyasyonun başlama ve bitişinde zorluklar, idrarda kan belirmesi, idrar akımında yavaşlama, gece sık idrar atımına çıkma ve idrarı tam atamama hissi olarak sıralayabiliriz.

Prostatit, prostat bezinin inflamasyonudur ve genellikle vücudun diğer bir kısmından yayılan bakteriyel bir infeksiyondan kaynaklanır. Akut prostatitte olduğu gibi hızlı bir şekilde gelişebilir ya da kronik prostatitte olduğu gibi uzun bir zaman periyodunda yavaşça gelişebilir. 20-35 yaşları arasındaki erkeklerde yaygın olarak görülen akut prostatit semptomları arasında titreme, ateş, ürinyasyon ve ejakulasyonda ağrı, idrar tutulması, idrarda ve/veya semende kan, idrara çıkma ihtiyacında artma ve testislerde ağrı yer almaktadır. Kronik prostatit akut prostatitten gelişir ve genellikle hormonal değişime bağlı olarak 30-50 yaşları arasındaki erkeklerde yaygın durumdadır. Belirtileri ise, diğer üriner bölge enfeksiyonlarında gözlenen belirtilerin yanı sıra ağrı, idrarda kan gözlenmesi, idrarı tutamama, anormal idrar rengi olarak sıralanabilir (13).

2. 3. Prostat Kanseri

Kanser ingilizcede “yengeç” anlamına gelir. Yengeç düşmanını kısırdıktan sonra, dişli kollarıyla sıkıca tutar ve yavaş yavaş kemirerek yer. Tedavi edilmediği takdirde, insanı giderek zayıflatıp halsiz düşüren ve sonunda öldüren bu hastalığa, bu nedenle “kanser” adı verilmiştir. Kanserin kesin sebebi ya da sebepleri henüz bilinmese de, kişiyi bazı kanser türlerine karşı yatkın hale getiren genler, kanser oluşumuna yol açan virüsler, radyasyona maruz kalma, çeşitli kimyasal maddeler kanser sebepleri arasında sayılmaktadır. Bağışıklık sistemindeki bozulmalar, çeşitli çevresel faktörler ya da beslenme tarzı da kanser oluşumunda rol oynamaktadır. Kanselerin yaklaşık %20’sinin kalıtsal nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir (15).

Epitelden gelişen ve “Karsinoma” olarak adlandırılan kanserler tüm kanser tipleri arasında en yaygın olanıdır. Ölüm oranı kadar insidansı konusunda da önemli olan dört kanser tipi vardır. Akciğer ve kalınbağırsak (kolon ve rektum) kanserleri her iki cinste de önemli bir problemken, kadınlarda meme kanseri, erkeklerde ise prostat kanseri en önemli sorundur. Bu majör dörtlü grup dışında ikinci grupta yer alan kanser tipleri ise, mesane, mide, karaciğer, böbrek, pankreas, özafagus ile kadınlarda görülen serviks ve yumurtalık kanserleridir. Bunların her biri total kanser insidansının ve mortalite oranının küçük bir yüzdesini oluşturmaktadır (15,16).

Tam olarak “prostat adenokarsinoma” olarak adlandırılan prostat kanseri, prostat bezindeki salgı hücrelerinin kontrolsüz büyümesine bağlıdır ve genellikle prostat bezinin dış kısmındaki hücrelerden (esas prostat bezlerinden) olmak üzere, prostatın her bölgesinden gelişebilmektedir (1,15,16).

Klinik yönü değişken olan prostat kanseri, klinik olarak anlamsız tümörlerden, bir kaç yıl içinde hastayı öldürebilecek agresif bir hale dönüşebilmektedir (16). Erkeklerde teşhis edilen en yaygın malignansi olan prostat kanserinin metastatik formları ise ikinci mortalite nedenidir (17). Prostat bezi dışına yayılma söz konusu olduğu metastatik formda, tümör hücreleri prostat

yanındaki dokulara, ilk önce pelvis lenf yumrularına ve sonunda uzaktaki lenf yumrularına, kemiklere, beyin, karaciğer ve akciğerlere yayılabilmektedir (18-20).

Prostat kanseri oranı, dünya çapında geniş ölçüde değişkendir. Her ne kadar ülkeler arasında büyük farklılıklar varsa da, güney ve doğu Asya en az derecede, Avrupa'da biraz daha yaygın, ABD'de ise en yaygın görüldüğü bölgedir (21). Amerikan Kanser Derneği'nin (American Cancer Society) 2006 verilerine göre Amerikalı erkeklerde en sık görülen kanser türü %33 ile prostat kanseridir ve ayrıca kanserden ölüm oranlarında ise prostat kanseri %9 ile üçüncü sırada yer almaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi'nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre, erkeklerde görülen kanser türleri arasında prostat kanseri %5.5 ile 6.sırada bulunmaktadır (22).

Bir erkeğin yaşamı boyunca prostat kanserine yakalanma olasılığı %16-20'dir. Elli yaşın üzerindeki erkeklerin %40'ında mikroskopik düzeyde, yani muayene ya da diğer tetkiklerle anlaşılamayacak kadar küçük prostat kanseri olduğu düşünülmektedir. Yetmişbeş yaş üzerinde yapılan otopsi çalışmalarında bu oran %75 civarındadır (15).

Prostat kanseri erken evrelerinde genellikle semptomlar oluşmamaktadır. Bununla beraber, bazı durumlarda prostat kanseri benign prostatik hipertrofiye olduğu gibi semptomlara neden olabilir (23). Prostat kanseri semptomları idrar akımında azalma, sık idrara gitme, idrarı boşaltamama hissi, idrar kaçırmaya, idrar yolu enfeksiyonu, idrarda kan gözlenmesi, idrar yaparken yanma, kasık ağrısı ve iktidarsızlık olarak sıralanabilir (24). Gelişen prostat kanseri ek semptomlara neden olabilir, hastalığın vücudun diğer bölgelerine yayılması gibi. En ortak semptom kemik ağrısıdır, genellikle omurga kemikleri, pelvis ya da kaburga kemiklerinde bu kemiklere yayılımından dolayı ağrı hissedilir. Ayrıca prostat kanseri omurgadaki spinal kord sıkıştırabilir, bu da bacaklarda zayıflığa ve tuvaletini tutamamaya neden olur (25).

1980'lerin sonlarına kadar, prostat kanserlerinin çoğu klinik semptomlarca belirleniyordu (16). Tanı için en önemli ilk basamak muayenedir. Muayene sırasında prostatın sert olması ya da üzerindeki nodüllerin (küçük yumrular) ele

gelmesi kuşkulandırıcı bulgulardır (15). Erken evrelerde prostat kanserlerinin belirlenmesinde birkaç erken tanımlama testlerinin kombine kullanımı gerekmektedir. Bu testler dijital rektal muayene (DRE), serum tPSA (toplam Prostat Spesifik Antijen) ve kanda serbest PSA ile kompleks PSA yüzdelerinin değerlendirilmesini, ve bunların arkasından prostat biyopsisini içerir (26,27). PSA kallikrein alt grubuna ait bir serin proteazdır ve normal prostat hücrelerine nazaran prostat kanseri hücrelerinde yüksek düzeylerde bulunur. Normal bir erkekte genellikle PSA düzeyi <4 ng/ml'dir, buna karşın bu değer $>4-10$ ng/ml olduğu zaman hastanın prostat kanseri olma ihtimalini artırır, ve eğer bu değer >10 ng/ml olursa prostat kanseri olma ihtimalinin %50'den fazla olduğu belirlenmiştir. Erken tanı testleri prostat kanseri varlığına işaret ettiği zaman biyopsi ile alınan örnekler Gleason score ile derecelendirilebilir. Gleason score hastalığın agresifliğini tahmin etmek için kullanılır ve glandular yapı özelliklerindeki değişimleri temel almaktadır. Eğer prostat kanseri lenf yumruları, kemik ve diğer iç organlara yayılmışsa, radyonüklid (radyoaktif çekirdek) kemik taraması, bilgisayarlı tomografi, magnetik rezonans görüntüleme ve prostaScint tarama yöntemleri kullanılarak belirlenebilir. Normal prostat ve prostatik kanseri hücre ve dokularındaki gen ürünlerinin karşılaştırılmasında kullanılan proteomik çalışmalarında olduğu gibi microarray, immünohistokimyasal ve RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) analizleri birçok yeni potansiyel diagnostik ve prognostik biyobelirteçlerin belirlenmesini sağlamışlardır. Cerrahi ve radyasyon terapisi, hormonal terapi (antiandrojen terapisi), kemoterapi ve moleküler hedef oluşturan terapiler prostat kanseri tedavisinde kullanılan yöntemlerdir (15, 18).

2. 4. Prostat Kanseri Etyolojisi

Prostat kanserinin spesifik nedenleri hala bilinmemekle beraber, bir erkeğin prostat kanseri geliştirme riski onun yaşı, genetiği, ırkı, aile öyküsü, beslenmesi, yaşam stiline ve diğer faktörlere bağlıdır (11,28). Primer faktör ise yaşıdır. Prostat kanseri 45 yaş altındaki erkeklerde nadiren görülmektedir; fakat

daha ileri yaşlarla beraber sıklığı artmaktadır. Bununla birlikte, bir çok erkek prostat kanseri olduğunu hiçbir zaman bilmez. Çin, Almanya, İsrail, Jameika, İsveç, Uganda'da yapılan otopsi çalışmalarına göre, 50'li yaşlarında farklı nedenlerden dolayı ölen erkeklerin %30'u, 70'li yaşlarında ölen erkeklerin ise %80'inin prostat kanseri olduğu bulunmuştur (11).

Bir erkeğin genetik alt yapısı onun prostat kanseri geliştirme riskine katkıda bulunmaktadır. ABD'de beyaz ırktan ya da İspanyol ırkından olan erkeklere göre siyah ırktaki erkeklerin prostat kanserinden daha çok etkilendiği, en fazla ölüm oranının da siyah erkeklerde olduğu belirlenmiştir (29). Babası ya da kardeşi prostat kanseri olan erkeklerde ise risk iki kat artmaktadır. Prostat kanserinden sorumlu tek bir gen yoktur, bir çok farklı gen işe karışmaktadır (11). Son on yılda yapılan çalışmalar, prostat kanserinde yüksek risk allelleri belirlemiştir, ve bir kalıtsal prostat kanser geni için otozomal dominant ya da X-bağlı kalıtım gösterilmiştir. Prostat kanserindeki ortak kromozomal değişimleri 1p, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, ve 18q kayıpları ve 1q, 2p, 7, 8q, 18q, ve Xq kazanımlarıdır (28,30).

Prostat kanseri için en az yedi gen lokusu adaydır. Bu lokuslarda üç aday gen belirlenmiştir, 17p üzerinde *HPC2/ELAC2*, 8p22-23 üzerinde *MSRI*, ve 1q25 üzerinde *RNASEL*. Prostat kanseri hücrelerinde kromozomların telomerlerinin, herhangi bir normal komşu prostat doku hücreleri telomerlerinden daha kısa oldukları bulunmuştur.

Ayrıca prostat kanseri için kalıtsal yatkınlık terimi oldukça önemlidir ve diğer gen allellerindeki polimorfizmler yaygındır, bunlar genetiği değiştirici ya da niteleyici alleler olarak adlandırılır. Bu değişiklikler çok uzun bir liste oluştursa da, androjen etkisi, DNA tamiri, karsinojen metabolizması, ve inflamasyon yolaklarındaki değişimler önemlidir (28).

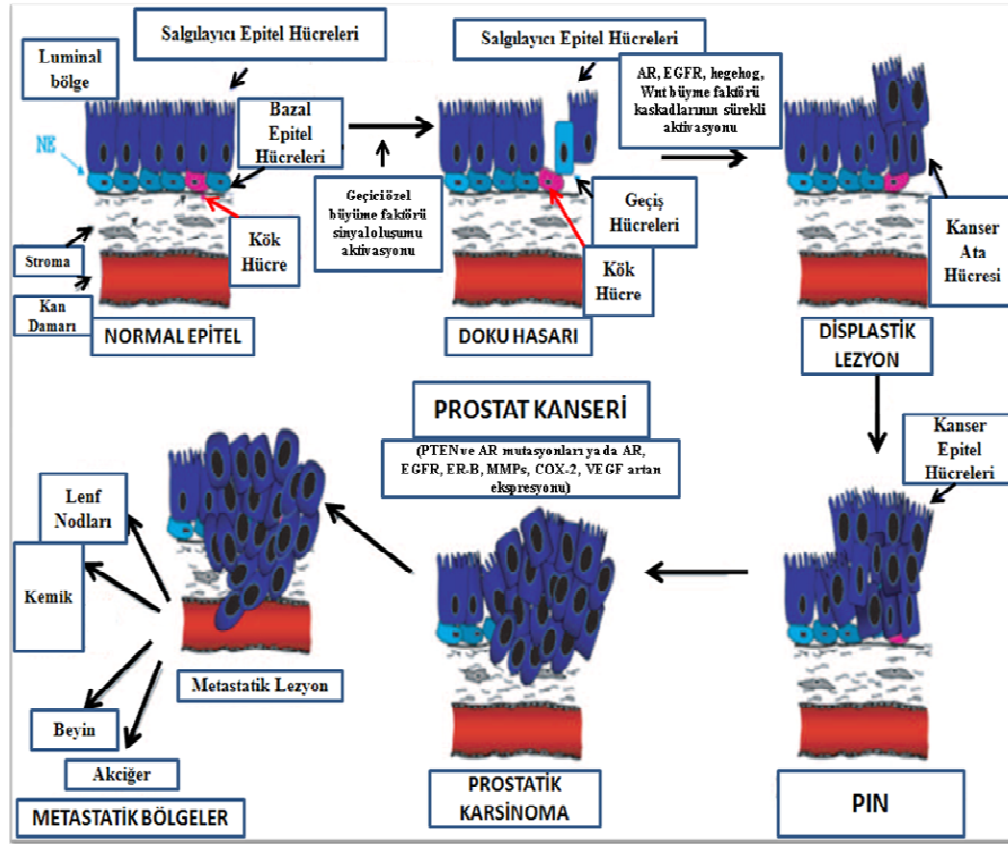
Erkeklerde seksüel yardımcı bir doku olan prostat bezinin gelişimi ve olgunlaşması erkek (androjenik) steroid hormonlarına bağlıdır ve yaşla ilgili olan anormal prostat büyümesi hastalıklarının (BHP ve prostat kanseri) androjenik steroidler etkisi altında geliştiği ve ilerlediği belirlenmiştir (31).

2. 5. Prostat Kanseri Gelişimi ve Metastazında Rol Alan Sinyal İletim Yolakları

Kanser gelişimi, hücre büyümesi ve devamlılığını sağlayan, normal embriyonik gelişimde önemli roller oynayan sinyal transdüksiyon yolaklarının anormal aktivasyonuna bağlıdır (3).

Prostat kanserinin farklı gelişimsel evreleri boyunca epitel ve stromal tümör hücrelerinde gen ekspresyonundaki özgün değişimler özellikle tümör hücre büyümesini, devamlılığını, göçünü ve yayılma özelliğini artırmaya katkıda bulunurlar. Özellikle, androjen reseptör (AR), östrojen reseptör(ER), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), HER-2, Hedgehog ve Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolaklarını içeren çoklu gelişimsel sinyal iletim yolaklarının aktivasyonu tümör hücrelerine agresif fenotip kazandırır (18). Bunun dışında, özellikle metastatik prostat kanseri hücrelerindeki birkaç apoptotik sinyal iletim yolaklarında yer alan elementlerin azalan ekspresyonu (seramid ve kaspazlar gibi) ile antiapoptotik faktörlerin (Bcl 2 gibi) artan ekspresyonu birleşerek tümör epitel hücrelerinin hayatta kalışlarına aracı olabilmektedir (32,33).

Prostat rejenerasyonu süresince gerekli olan prostat spesifik kök hücreleri havuzu bulunmaktadır. Bu havuzda bulunan epitel hücrelerinin bir kısmının prostat kanser hücrelerinin atasını oluşturan epitel hücreleri olduğu düşünülmektedir. Prostat ata epitel hücrelerinin, kanser ata hücrelerine onkogenik transformasyonunun uyarılması için farklı büyüme faktörü sinyal iletim yolaklarının devamlı aktivasyonları gerekmektedir. Kanser ata hücrelerindeki farklı tümörjenik yolak elementlerinin artan ekspresyonları ve aktivitesi prostatik karsinoma ve metastatik lezyonlara öncülük ettiği gösterilmiştir (Şekil 2.1.)(18, 34).



Şekil 2.1. Prostat kanseri başlangıcı ve ilerleyişi ile ilişkili hücresel olayların önerilen modeli.

Prostatik kök hücrelerinin belirlenmesi için son zamanlarda kabul edilen yaklaşımlar vardır. Buna rağmen, prostat ata epitel hücrelerinin onkogenik transformasyonu için gerekli hücresel ve moleküler mekanizmalar ile başlatıcı olaylara aracılık eden stromal-epitelial etkileşimlerdeki değişimler henüz tam olarak bilinmemektedir. Prostat kanseri başlangıcının modelleri arasında, prostat displastik lezyonlar, bazal multipotent kök hücreler ve/veya aracı (intermediate) hücrelerindeki mitojenik sinyal iletim yollarının düzensizliği yer almaktadır. Prostat displastik lezyonlar, kanser epitel hücrelerinin heterojen popülasyonuna yol açabilir ki bunlar anormal farklılaşma, sınırsız bölünme ve apoptotik hücre ölümünde azalma göstermektedir (34,35).

In vivo ve *in vitro* olarak normal prostat epitel hücreleri ve prostat kanseri hücre hatlarında bir çok onkogenik sinyal yolağı karşılaştırmalı olarak

incelenmiştir. Bu incelemeler lokalize ve androjen-bağımlı prostat kanseri formunun, agresif ve androjen-bağımsız evrelere ilerlemesinin düzenlenmesinde gerekli olan onkogenik sinyal iletim yolları olduğunu göstermiştir (8,36,37). Ek olarak, stromal-epitel hücrelerindeki genetik değişimler yetişkinlerde prostat homeostazisini değiştirebilmektedir. Bu değişimler, prostatik düz kasların farklılaşmasına, PIN (prostatic intraepithelial neoplasia)'lerin düşük dereceden yüksek dereceye geçişine ve prostat kanseri gelişimi süresince vasküler endotelial ve epitel hücrelerinde artan bir çoğalmaya öncülük eder (38, 39).

Normal prostat bez epitelinden malign transformasyona neden olan farklı evrelerle ilişkili bir çok genetik değişim vardır. Prostat kanserinde farklı olarak eksprese olan bu genler;

Ekspresyonunda artma olan genler: büyüme faktör reseptörleri (c-erbB1 (EGFR), c-erbB2 (HER-2/neu), c-erbB3(HER-3), PTCH receptor, IGF-1R, FGFR, VEGFR), büyüme faktörleri (EGF, TGF-a, HB-EGF, amphiregulin, HRG, Wnts, IGF-1, IGF-2, FGFs,HGF, IL-6, VEGF), sinyal iletim elemanları (GLI-1, cyclin D1, telomerase, c-Myc, caveolin-1, Bcl-2, survivin,clusterin, syndecan-1, NF-κB, ILK, b-catenin, PKC ϵ , HDAC1, COX-2, MMP-2, MUC1, MUC18, S100P, FKBP51).

Ekspreyonunda azalma olan genler: p53, PTEN/MMAC, E-catherin, prostasin olarak sıralanabilir (18).

2. 5. 1. Hormonal sinyal iletim yolları

Prostat bezinde büyüme ve homeostazın korunması hormon bağımlıdır. Testosteron ve dehidroepiandrosteron erkeklerde esas olarak dolaşan, testislerde ve adrenal bezde bol miktarda üretilen androjenlerdir. Genel olarak, ilerleyen yaşla beraber serumda testosteron oranı düşerken, E2'yi içeren östrojen düzeyi prostat sıvısında lokal olarak artmaktadır (18,40). Aslında, androjenlerle ilişkili olarak östrojen oranındaki artış displazi ve prostat karsinogenezinin başlamasına aracılık edebilecek önemli bir faktördür.

2. 5. 1. 1. Androjenik sinyal iletim yolağı

Androjen reseptörü nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve ligandla aktive edilen bir transkripsiyon faktörü olarak hareket eder. Böylece, prostatın normal ve neoplastik gelişimi için önemli sinyal iletim elementleri olan çeşitli mitotik gen ürünlerinin ekspresyonu teşvik edilir (41). Androjenlerle AR (Androjen Reseptörü) sinyal iletiminin aktivasyonu çeşitli genlerin artan ekspresyonlarına neden olabilir (*PSA*, *c-fos*, *Drg-1* ve *caveolin-1*). Bunun yanı sıra AR aktivasyonu hücre büyümesinde gerekli olan farklı intraselüler yolakların uyarılmasına, değişmemiş hücrelerin ve prostatik tümör hücrelerinin canlılıklarını sağlayacak yolakların da uyarılmalarına öncülük edebilir (42).

2. 5. 1. 2. Östrojen sinyal iletim yolağı

Östrojenlerin prostat kanserinin başlaması ve gelişiminde önemli olduğu kadar erişkin prostat homeostazisinin korunmasında da önemli bir fonksiyonu olduğuna dair kanıtlar vardır. Yaşlanan erkeklerde, prostat kanseri genellikle azalan androjen düzeyleri ile birlikte östrojen-baskın olan çevrede oluşur (40).

2. 5. 2. Büyüme faktörü sinyal iletim yolakları

2. 5. 2. 1. Sitokin sinyal iletim yolağı

Prostat kanserli hastaların serumlarında çeşitli sitokinlerin artan düzeylerinin daha malign prostat kanseri formlarının gelişimi ile ilgili olduğü gözükmetedir. *IL-6* düzeylerinin *HRPC*'li hasta serum ve dokularında yüksek olduğü tespit edilmiştir. *IL-6*'nın AR aktivitesini artırdığı düşünölmektedir (43). Prostat kanseri hasta serumlarında artan seviyelerde bulunan bir diğer sitokinler, *TGF-β* ailesi üyeleridir (44). Gelişmiş prostatik karsinomlarda prostat kanser hücrelerinin *TGF-β1* ve *TGF-β2*'nin büyümeyi engelleyen etkilerine karşı duyarsız olduğü belirlenmiştir. Bu sitokinler diğer büyüme faktörleri ile

bağlantılara katılarak androjen-bağımsız prostat kanseri hücrelerine daha malign fenotiplerin kazanımını sağlıyor gibi gözükmektedirler. Bu kısmen TGF- β tip I reseptörü ve/veya TGF- β tip II reseptörünün promotorunun metilasyonu sonucunda sesizleştirilmesinden kaynaklanır (18).

2. 5. 2. 2. Nöropeptid sinyal iletim yolları

Bombesin, nörotensin, serotonin, endotelin, kalsitonin, bradikinin, lizofosfatidik asid (LPA)'i içeren bir çok nöropeptid G proteinleri-bağlı reseptörler üzerinden etkilerini gösterirler, ve ayrıca prostat kanseri hücrelerinin NE farklılaşması, çoğalması, göç etmesi ve metastazında gerekli tümörigenik genlerin aktivasyonuna katılmaktadırlar (45).

2. 5. 2. 3. EGFR ailesi üyesi yolağı

EGFR (ErbB1) ve ligandlarının (EGF, TGF- α , HB-EGF ve amfiregulin) artan ekspresyonlarının prostat kanseri malignansilerinin yüksek dereceleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (46). Ligandları aracılığıyla EGFR aktivasyonunun lokalize prostat kanserinin daha metastatik evrelere ilerleyişine aracılık ettiği düşünülmektedir. Aktive edilen EGFR farklı mitotik yolların uyarılmasına neden olabilmektedir. Bu yollar, Shc, MAPK, PI3K/Akt, NF- κ B ve fosfolipaz C γ (PC γ) sinyal iletim yollarını içermektedir, ki bu yollar prostat kanseri hücrelerinin çoğalmalarının, devamlılıklarının, hareketliliklerinin ve yayılımlarının uyarılmasına katkıda bulunurlar (47).

2. 5. 2. 4. Hedgehog sinyal iletim yolağı

Normal prostat dokusu ile karşılaştırıldığında prostat tümör hücrelerinde Hedgehog sinyal iletim bileşenlerinin ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. Özellikle, Sonik Hedgehog ligandının (SHH) prostat kanseri hücrelerinde artan ekspresyonu düzeyinin GLI-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna yol

açmaktadır. Bu ise, prostat kanseri hücrelerinin büyümelerine katkıda bulunan siklin D1 ve c-Myc gibi çeşitli tümörigenik genlerin ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır (37).

2. 5. 2. 5. Wnt sinyal iletim yolları

Çeşitli insan solid tümörlerinde canonical Wnt sinyal iletiminin katılımına dair kanıtlara uyumlu olarak , anormal Wnt sinyal iletiminin prostat kanseri gelişimi ve ilerleyişinde de etkili olabileceği üzerine kanıtlara da işaret edilmiştir (8). Canonical Wnt/ β -katenin sinyal iletim yolağının anormal aktivasyonunun daha malign evrelerde olduğu gibi erken evrelerde de prostat kanseri ilerleyişine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Birçok Wnt ligandının prostatik stromal hücrelerinde, androjen-bağımlı ve bağımsız prostat kanseri hücre hatlarında ve tümöral dokularda anlamlı düzeylerde eksprese oldukları belirlenmiştir (18).

Wnt'ler embriyonik gelişim süresince hücre büyümesi, hareketliliği ve farklılaşmasını düzenleyen parakrin şeklinde salgılanan glikoproteinlerdir (48). Wnt sinyal yolağı çoğunlukla, APC, axin ve onun homoloğu olan axin2/conductin ve β -katenin'deki mutasyonlar yoluyla çeşitli tümör tiplerinin (akciğer kanseri, kolorektal kanseri, hepatoselüler karsinoma, melanoma, medulloblastoma, over endometrial adenokarsinomalar, özafagial squamoz hücre karsinoması gibi) gelişimine katkıda bulunmaktadır (3, 49, 50).

Wnt-1 orjinal olarak int-1 olarak adlandırılmış ve ilk olarak farelerde meme tümör gelişiminde tanımlanmış bir gendir. Daha sonra ise, bu genin homoloğu *Drosophila*'da *wingless* olarak adlandırılmış ve bu iki ismin kombinasyonu sonucunda Wnt terimi oluşmuştur. İnsanlarda saptanmış olan 19 tane wnt proteini vardır ve ortalama 40 kDa moleküler ağırlığına sahiptirler (51).

Wnt'lerin hücre yüzey reseptörleri Frizzled ailesine aittir ve yapısal olarak G-proteini-bağlı reseptörler olarak toplanırlar, ve bazıları G proteinleri ve inozitol fosfolipid yolağı üzerinden sinyal iletebilirler. Başlıca sinyal iletimi, G proteini

bağımsız yoldan gerçekleşir, ki bunun için Dishevelled adı verilen sitoplazmik sinyal iletimi proteinine gereksinim vardır.

En iyi şekilde karakterize edilmiş Dishevelled-bağımlı yollar, β -katenin isimli multifonksiyonal proteinin proteolizinin düzenlenmesiyle etkilidirler. β -katenin, hücre-hücre adezyonunda ve gizli bir regülatör proteini olarak işlev görür. Wnt'ler bu yolağı Frizzled proteini ve ko-reseptör proteine bağlanarak aktive ederler. Ko-reseptör proteini "low density lipoprotein(LDL)" ile ilişkilidir ve bu yüzden "LDL-reseptör-ilişkili protein (LRP)" olarak adlandırılır. Frizzled ve LRP'nin Dishevelled'i nasıl aktive ettiği henüz açık değildir (52).

Multiprotein β -katenin degradasyon kompleksi olarak adlandırılan kompleks, axin/conductin, GSK3 β , APC, β -katenin, kazein kinaz1 α /c, ve diversin'den oluşur ve β -kateninin stabilitesinin kontrolü için önemli rol oynar. Bu kompleksin ana fonksiyonu β -katenini fosforile etmek ve böylece, onun ubiquitinasyonunu başlatmak ve sonunda proteozomlarda degradasyonunu sağlamaktır (3,8,53).

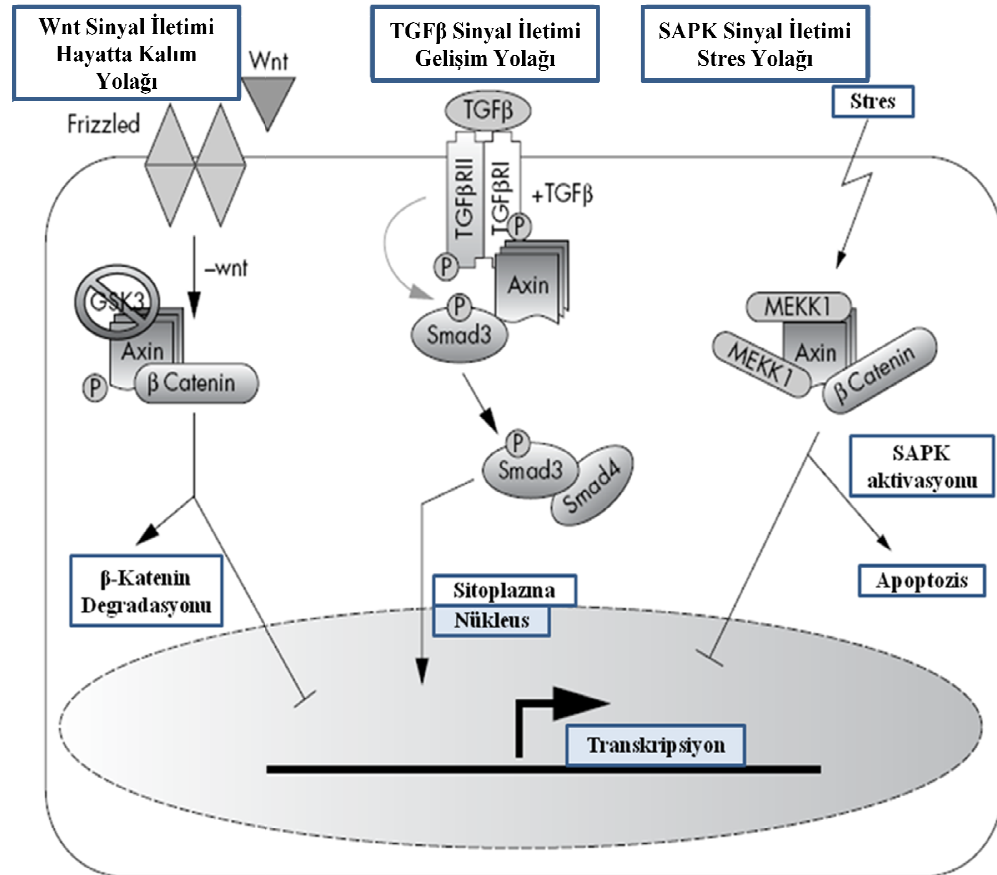
Bir Wnt proteini Frizzled ve LRP'ye bağlandığı zaman, β -katenin fosforilasyonu ve degradasyonunun inhibe edilmesine yol açar. Mekanizmada Dishevelled ve buna bağlanan bir çok sinyal iletim proteinine gereksinim olduğu bilinmektedir. Serin/treonin kinaz GSK3 β (glikojen sentaz kinaz 3) Wnt yolağında bir çok proteine bağlanır ve fosforile eder. GSK3 β tarafından 33,37 ve 41. bölgede β -katenin fosforilasyonu E3 ligaz β -TrCP'nin β -katenini tanıması için kritiktir, bu sayede β -katenin ubiquitinasyonu ve proteozomlarda degradasyonuna öncülük etmiş olur (54,55). Ek olarak, GSK3 β APC ve axin'i de fosforile etmektedir (56). Degradasyon kompleksi bileşenlerinin defosforilasyonu sadece β -katenin ubiquitinasyonunu inhibe etmekle kalmaz ayrıca β -katenin'in axin ve APC'ye olan ilgisini de düşürür, böylece β -katenin kompleksten ayrılır (57). Sonuç olarak, fosforile olamamış β -katenin sitoplazma ve nükleusta birikir. Nükleusta, Wnt sinyal iletimi için hedef genler normalde sessiz durumda tutulur, bu ise gen düzenleyici proteinlerin baskılayıcı bir kompleksi yoluyla gerçekleşir. Bu düzenleyici proteinler, korepresör protein olan Groucho'ya bağlanan LEF-

1/TCF ailesidir. Wnt sinyali nedenli degrade olmamış β -katenin'deki artış, β -katenin'nin nükleus içine girmesine ve LEF-1/TCF'e bağlanmasına olanak sağlar, Groucho'yu yerinden ederek. Böylece, β -katenin artık bir koaktivatör olarak görev alır, Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu indükler (52).

Wnt yolağı hedef genleri arasında, ilk tanımlanan hedef genler, bir protoonkogen olan c-myc, ve cyclin-bağımlı kinaz aktivatörü olan cdc2' dir. Bunların dışında, c-jun ve fra-1 protoonkogenleri, survivin, VEGF (vascular endothelial growth factor)-pro-angiogenik protein, WISP-1 (Wnt-1-induced secreted protein 1)-bağ doku büyüme faktörü ailesi üyesi, BMP-4, gastrin, reseptör trozin kinaz c-met, HGF/scatter faktör, matrilysin/MMP7 ve MMP-26 gibi ekstraselüler matriksi degrade eden proteazlar, hücre adezyon molekülleri, ITF-2AF17, PML ve *Axin2* hedef genler arasındadır (3,50).

2. 6. Axin2 Gen Yapısı, Fonksiyonu ve Kansere Gelişimindeki Rolü

Axin ilk önce farede tanımlanmış ve "fused" ya da "fu" olarak adlandırılmış bir gen ürünüdür, daha sonra ise Axin (Aksis inhibisyon proteini) olarak yeniden isimlendirilmiştir (49,50,58,59). Axin embriyonik gelişim süresince axis oluşumunun kontrolünde kritik bir role sahiptir. Wnt sinyal iletimi aktivitesi, omurgalılarda dorsal-ventral duplikasyonu belirler ve axin bu sinyal iletim yolağında negatif düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Axin'in, Wnt sinyal iletim yolağının negatif düzenleyicisi olması düşüncesinden yola çıkılarak yapılan çalışmalarda bir tümör baskılayıcı gen olduğu ortaya konulmuş ve en az üç farklı sinyal oluşum yolağında görev aldığı belirlenmiştir, SAPK (Stress-activated protein kinase), TGF β (transforming growth factor β), ve Wnt sinyal iletim yolları (Şekil 2.2.) (50).

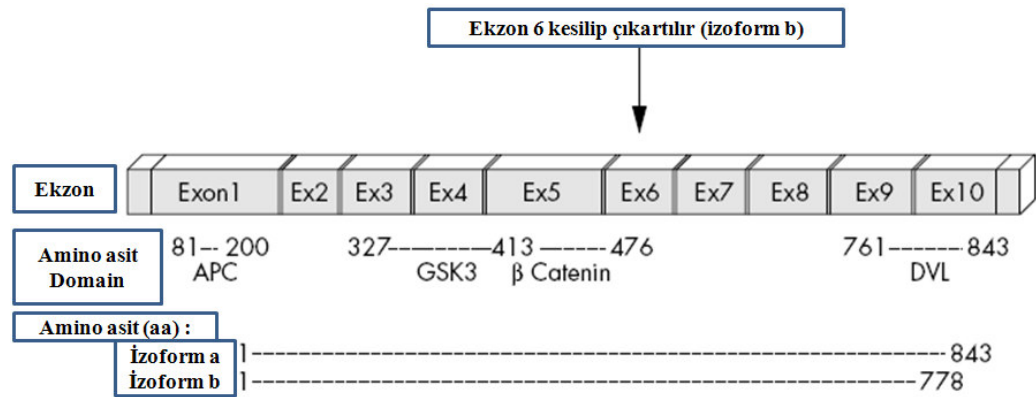


Şekil 2.2. Axin proteininin görev aldığı sinyal iletim yolları

Axin gen ailesinin çeşitli türlerde varlığı gösterilmiştir. *Axin1* (basit olarak axin) ve *Axin2* (Axil ya da conductin) nükleotit düzeyinde %45'lik bir benzerlik gösterirler ve kodladıkları proteinler fonksiyonel olarak benzer gözükmektedir. Axin geni insan, rat, fare, tavuk, ve *Xenopus*'da korunmuş bir genidir (60).

Axin1 geninin insan homologu kromozom 16p13.3'de haritalanmıştır. Fare embriyogenezi süresince devamlı olarak eksprese olan *Axin1* β-katenin degradasyon kompleksinin esas olarak eksprese olan bileşenidir ve düşük düzeylerdeki wnt sinyal iletimi aktivitesinin korunmasında esastır. *Axin1*'in 862 amino asitlik polipeptidi kodlayan "a" ve 826 amino asitlik polipeptidi kodlayan "b" izoformu olmak üzere iki izoformu vardır (50).

Sınırlı biçimde eksprese olan *Axin2* β -katenin ile olan etkileşimi nedeniyle tanımlanmıştır (61,62). *Axin2* artan β -katenin konsantrasyonlarına yanıt olarak artan düzeyde eksprese edilir ve Wnt sinyalinin süresini ve şiddetini sınırlayıcı olarak iş görmektedir. Moleküler çalışmalar, *Axin2* geni'nin insanlarda kromozom 17q23-24'de yer aldığını, cDNA'sının 2529 bç okuma çerçevesi içerdiğini ve toplam 10 ekzona sahip olan 843 amino asitlik bir proteini kodladığını göstermiştir. Ayrıca insan *Axin2*, rat ve fare homologları ile karşılaştırıldığında %89'luk bir amino asit benzerliği gösterir (Şekil 2.3) (50,61,63).



Şekil 2.3. Axin2 gen yapısı

Axin2 proteini β -katenin degradasyonu için gerekli olan bileşenler için bağlanma domainleri içerir. APC'ye bağlanan 81-200 amino asitleri arasında bulunan N-terminal "G-proteini sinyal iletimi"(RGS)-domaini, proteinin ortasında sırası ile 327-413 ve 413-476. amino asitleri arasında yer alan GSK3 β ve β -katenin için ayrı bağlanma domainleri, ve bir dishevelled'in axin dimerizasyonuna aracılık eden bir bölümüne bağlanan ve 761-843 amino asitleri arasında bulunan C-terminal (DIX) domaini içerir. Moleküler düzeyde axin/conductin β -katenin'in fosforilasyonunda ihtiyaç duyulan tüm bileşenleri birbirine yaklaştıran bir scaffold protein gibi görev yapar (64,65).

Axin2 genindeki değişimler farklı tümör tiplerinde belirlenmiştir ve mutasyonların çoğu ise APC ve β -katenin bağlanma domainlerinde yer almaktadır. Ayrıca, kolon, yumurtalık, endometrioid, adenoarsinoma, ve HCC hücre hatlarında axin sekans değişimleri bulunmuştur ve bir çok çalışma çeşitli tümör tiplerinde axin'in rol aldığını göstermiştir. Meme kanseri, nöroblastoma ve diğer tümörlerde kromozom 17q24'de axin2 geninin yer aldığı bölgede heterozigote kaybı gözlenmiştir. İnsan Axin2 bu nedenle, çoklu tümör tiplerinde gerekli olan çok güçlü bir adaydır (50,61).

2. 7. Polimorfizmin Tanımı ve Genetik Polimorfizmin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Poli ve morfizmos sözcüklerinden oluşan polimorfizm, eski Yunanca'da “*çok şekillilik*” anlamı taşıyan bir kelimedir.

Genetik polimorfizm, bir populasyonda farklı allellere bağlı, genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir.

Populasyon genetikçilerine göre bir gen lokusu, nadir allellerin en az %1 frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görüldükleri takdirde polimorfik olarak tanımlanırlar. Populasyon genetiği açısından belli bir frekansa gereksinim olmasına karşın, moleküler biyoloji açısından, frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görülen varyant polimorfik adını almaktadır.

Polimorfizmler, türlerin buldukları ortama adaptasyonlarını kolaylaştırarak, evrimsel süreçte ayakta kalabilmelerine olanak verir.

Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) veya DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir.

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde PCR, RFLP, VNTR (variable number of tandem repeats), SSCP (single stranded conformational polymorphism)

laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (66).

2. 7. 1. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

SNP'ler yaygın olarak bir türün üyeleri arasında genomdaki tek bir nükleotit farklı olduğu zaman ortaya çıkan DNA dizisi varyasyonu olarak adlandırılır. SNP'lerin çoğu, tek bir nükleotidin bir başka nükleotidle yer değiştirmesi şeklindedir; ancak tek bir nükleotidin insersiyonu ya da delesyonu şeklinde de olabilmektedir(67,68).

Polimorfizmler popülasyonda en az %1 sıklıktan daha az yaygın bir varyantın olduğu bölge olarak da sıklıkla tanımlanırlar. Bu varyantlar düşük sıklıkta olmasına karşın bazı durumlarda çok önemlidirler. Bazı SNP alleleri, doğrudan bir hastalığa katkısı olan gen fonksiyonu veya düzenlenmesinde farklılığa yol açan DNA dizi varyantlarıdır. Farklı tipteki SNP'ler, bir proteinin fonksiyonu veya regülasyonu ve ekspresyonunu değiştirebilir. En yaygın tipi sinonim olmayan (nonsynonymous) SNP'ler dir. Bu tipteki allelerde protein ürünündeki amino asid farklıdır. Bazı SNP'ler splay bölgesindeki polimorfizmlerdir ve ekzon içerikleri farklı varyant proteinlerle sonuçlanır. Bazı SNP'ler ise promotor bölgesindedir ve proteinin regülasyonunu ve ekspresyonunu etkilemektedir (68). SNP'lerin ortaya çıkışı, yeni bir restriksiyon bölgesinin şekillenmesine ya da var olan bir restriksiyon bölgesinin kaybolmasına neden olabilir.

2. 7. 2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Günümüzde canlıların genetik yapılarının çözülmesi, genlerin yerlerinin ve işlevselliklerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi çalışmaları tüm hızıyla devam etmektedir.

1985 yılında Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki isimli araştırmacılar tarafından geliştirilen PCR yöntemi yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların tanısı, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Hücrelerden arındırılmış bu yöntem, DNA molekülleri birliğinde özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bunun için yok denecek kadar az miktardaki DNA bile yeterlidir. Belirli bir hedef DNA bölgesinin çoğaltılabilmesi için, bu bölgenin nükleotit dizilerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu bilgi, PCR'da primer olarak kullanılan oligonükleotitlerin hazırlanması için gereklidir.

PCR, tek iplikli DNA'yı kalıp alan ve deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullanan, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz (*Taq* polimeraz-*Thermus aquaticus*'dan elde edilen) enzimi ile gerçekleştirilir. *Taq* polimeraz, diğer DNA polimeraz enzimleri gibi 5'→3' yönünde sentez yapar ve dolayısıyla senteze başlayabilmesi için serbest 3'-OH grubuna gereksinim duyar. Bu serbest 3'-OH grubunu sağlayan PCR reaksiyonu bileşeni ise oligonükleotitler, yani primerlerdir. Kısaca ifade edilirse, kalıp DNA, *Taq* polimeraz, deoksiribonükleotitler ve oligonükleotitlerin bulunduğu bir karışım, uygun koşullar sağlandığında, primerler kalıp DNA üzerinde kendilerine komplemente bölgelerle eşleşerek, sentezi başlatıcı görev yaparlar. Enzim DNA ipliğini sentezlerken verimli çalışabilmesi için en uygun koşulların sağlanması gerekir ve bu koşullar tampon bir çözelti ile gerçekleştirilir.

PCR reaksiyonu üç basamakta gerçekleşir ve çoğaltılmış ürünün miktarı, teorik olarak, bu üç basamağın tekrar sayısına bağlıdır. İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir (denatürasyon). Bu aşama genellikle 90-95°C de gerçekleşir. İkinci adımda, sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır (annealing). Bu sıcaklık değerleri primerden primere değişmektedir. Ve polimerazın zinciri uzatması olan son aşama 70-75°C arasında gerçekleştirilir

(extension). Bu ardıl üç adım bir döngü olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü; yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler her bir döngüde kalıp görevi görürler. Her bir döngü sonunda geometrik olarak artan DNA miktarı, yirmibeş-otuz döngü sonunda yaklaşık 10^6 olur. İşlem *thermocycler* (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir.

Çok geniş kullanım alanı olan PCR modern genetikte çok yönlü kullanılabilen teknikler arasındadır (69,70).

2. 7. 3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimlerinin doğal biyolojik fonksiyonu, bakteriyel savunma mekanizmasında oynadıkları roldür. Bakteriye giren yabancı DNA'ları parçalayıp onların aktivitelerini kısıtlayan (restriksiyon) bu enzimler, intraselüler bakteriyel patojenleri inaktive edebilmekte ve bakteriyi virüslerden, yabancı DNA'lardan korumaktadırlar. 1965'de Werner Arber, bakterinin kendi endonükleazlarından kendi DNA'sını korumak için metillediğini ortaya çıkarmıştır. Bakteri bu olayı restriksiyon enzimlerin tanıdığı nükleotid dizilerindeki bazı bazlara metil grupları ekleyerek başarmaktadır.

Restriksiyon endonükleazlar DNA dizilerini ögöl olarak tanıyan ve bu dizilimlerden yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Günümüzde 300'e yakın farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000'den fazla RE varlığından söz edilmektedir. RE enzimlerinin çok büyük bir kısmı bakterilerden, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlardan izole edilmiştir.

1970'li yıllardan sonra restriksiyon endonükleaz kullanımına bağlı olarak rekombinant teknolojisi hızla gelişmiş ve bu gelişme seçilen bir genin çoğaltılmasını, genin kodladığı proteinin üretilmesini, genin diziliminin belirlenmesini vb. mümkün hale getirmiştir. bu teknolojideki merkezi konumu nedeniyle, RE enzimleri özellikle klonlama çalışmalarında sıklıkla

kullanılmaktadır. Rekombinant DNA elde edilmesinin yanı sıra, DNA haritası çıkarılması, polimorfizmlerin belirlenmesi, problemlerin hazırlanması ve DNA modifikasyon durumlarının analizi, restriksiyon endonükleazların kullanım alanlarıdır (71,72).

RE'lar; metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre sınıflandırılmışlardır (tip I, tip II, tip III, homing endonükleazlar ve nicking endonükleazlar). Tip II restriksiyon endonükleazlar genellikle 4, 5 veya 6 baz çifti (bç) uzunluğunda olan özgül bir nükleotid dizisini tanıır ve bu dizilerdeki metillenmemiş çift-zincirli DNA molekülünü keserler ve izole edilen RE'ların büyük bir kısmı bu gruptadır (71-73).

RFLP, bir restriksiyon endonükleaz ile DNA'nın kesilmesi üzerine dayandırılmış bir yöntemdir. İnsan genomu boyunca, her 200 nükleotitte 1 dizi farklılığı görülür. Bu özel bölgelerdeki nükleotit değişiklikleri, tek bir nükleotit çiftinde değişiklik, bir ya da birden fazla nükleotit çiftini çıkarılması (delesyon), veya araya sokulması (insersiyon) şeklinde görülür ve bir restriksiyon enziminin kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası yaratabilir. RE'lar DNA molekülü üzerindeki özel bir bölgeyi tanıyarak keserler ve fragment denilen kısa nükleotit dizilerini oluştururlar. Bir şekilde yaratılan bir restriksiyon bölgesi ya da başka bir deyişle enzimin tanıma dizisinde birkaç nükleotit değişim varsa, farklı kaynaklardan alınan DNA, bazı restriksiyon enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta DNA fragmentleri oluşur. Bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, **Restriksiyon Fragment uzunluk (Length) Polimorfizmi** olarak adlandırılır. Herhangi bir bireyin taşıdığı allel tipi, restriksiyon kesim bölgesindeki değişiklikler (polimorfizm) bu yöntemle belirlenebilir. Elde edilen DNA parçalarının kontrolü, restriksiyon kesimini takiben jel elektroforezi uygulaması, ayrıştırılan DNA parçalarının DNA bağlayan bir membrana transferi ve uygun bir probla hibridizasyonu ile saptanabilir (74).

2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA molekülünün analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber, tüm laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir. DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Jel elektroforezinde kullanılan matriks (destekleyici madde) nişasta, poliakrilamid, agaroz ya da agaroz-akrilamid karışımı olabilir.

Agaroz jel elektroforezi, biyokimya ve moleküler biyolojide DNA, RNA ve protein moleküllerini büyüklüklerine göre ayırmada kullanılan bir metoddur. Negatif yüklü nükleik asid moleküllerinin bir agaroz matriks boyunca hareketi elektriksel bir alanla başarılmaktadır.

Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkariddir. Agaroz uygun tamponda çözünür, ısıtılır ve soğutulduğu zaman polimerleşir ve polimerde karşılıklı hidrojen bağları oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu olay geri dönüşümlüdür. Agaroz konsantrasyonu değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fargmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanabilir.

DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi floresan bir boya olan etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300-360 nm'de ışığı absorblaması sonucu floresan etki göstermesi ile gerçekleştirilir (75).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Kullanılan Cihazlar

- Masaüstü Makro Santrifüj (Mistral 1000 MSE)
- Hassas Tartı (Denver Instrumen Company)
- Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- pH Metre (Metle Toledo MP 2200)
- Mikrodalga fırını (BEKO MD 1500)
- Mikropipetler -10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl- (Gilson)
- Fanlı Ekonomik İnkübatör (Gallenkamp)
- Thermal Cycler (Gen Amplifikasyon PCR sistem 9700 Applied Biosystems)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC 1000-90)
- Elektroforez Tankı (Whatman Biometra)
- Jel Görüntüleme (Vilber Lourmat Photodocumentation and Video Graphic Printer UP-895CE)
- UV Transilluminator (UVP)

3. 2. Kimyasal Maddeler

- Tris bazı (Sigma)
- Asetik asit (E-Merck)
- EDTA (Sigma)
- Primer sentezleri (Iontek)
- dNTP karışımı (Fermentas)
- MgCl₂ (Fermentas)
- *Taq* DNA Polimeraz Tamponu (Fermentas)
- *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas)
- *Mph*1103I Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- *Esp*3I Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- *Msp*I Restriksiyon Endonükleaz (Vivantis)
- *Taq*I Restriksiyon Endonükleaz (Vivantis)
- Agaroz (Sigma)
- Formamid (Sigma)
- Xylene Cyanol (Sigma)
- Bromfenol Blue (Bio Basic Inc.)
- Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)
- Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas)

3. 3. Çalışma Grubu

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne başvuran herhangi bir kanser tanısı konmamış, radyoterapi veya kemoterapi almamış, PSA değeri (ng/ml) 4.5 ± 0.5 olan, Türk anne ve babadan doğmuş 90 erkek birey kontrol grubunu oluştururken, çalışma grubu daha önce yapılmış olan projeler kapsamında, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Kliniğine başvuran prostat kanseri tanısı konan ve tedaviye başlanılmamış, PSA değeri (ng/ml) 30.6 ± 11.2 olan Türk anne ve babadan doğmuş 84 erkek hastadan oluşturuldu.

3. 4. Örneklerin Alınması

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Kliniğine başvuran prostat kanseri tanısı konan hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylere yapılacak çalışma hakkında gereken açıklamalar yapılmış, izin belgesini imzalamaları sağlanmıştır. Özgeçmişleri hakkında gerekli bilgilerin bulunduğu formları doldurmaları sağlandıktan sonra, 4 ml venöz kan sitrat içeren steril tüplere konulmuştur.

3. 5. DNA İzolasyonu

Yapılmış projeler kapsamında 84 hasta ve 90 kontrol grubunun DNA'ları daha önceden "*Yüksek Tuz Konsantrasyonu ile DNA İzolasyonu*" yöntemiyle izole edilmiştir (76).

3.6. Genotipleme

Axin-2 gen polimorfizmi için PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. PCR yönteminde Ekzon 1 ve Ekzon 5 amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri Tablo 3.1.de verilmektedir.

Tablo 3.1. Ekzon1 ve Ekzon5 amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

<p>Ekzon1, 148C>T polimorfizmi için; Forward (ileri) Primer: 5'-CCACGCCGATTGCTGAGAGG-3' Revers (geri) Primer: 5'-TTCCGCCTGGTGTGGAAGAGACAT-3'</p>
<p>Ekzon1, 432T>C polimorfizmi için; Forward (ileri) Primer: 5'- CCTGGAGAGGGAGAAATGC-3' Revers (geri) Primer: 5'- CATCACCGACTGGATCTCG-3'</p>
<p>Ekzon5, 1365A>G polimorfizmi için; Forward (ileri) Primer: 5'- ACGTCTTCCCTTTCAGGATG-3' Revers (geri) Primer: 5'-GGTACTGCGAATGGTGGTG-3'</p>
<p>Ekzon5, 1386C>T polimorfizmi için; Forward (ileri) Primer: 5'- TGCGTAGGGAGCCGAATGTTG-3' Revers (geri) Primer: 5'-GTGGTCCGGGGAGCGGGATC-3'</p>

Tablo 3.2.'de gösterildiği oranlarda hazırlanan karışımdan 24,5 µl alınarak etiketlenmiş 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüplere paylaştırıldı. İzole edilmiş DNA örneklerinden 0,5 µl alınarak bu karışımlara eklenip, amplifikasyon işlemi için PCR cihazına yerleştirildi (toplam hacim: 25µl). Herbir ekzonun amplifikasyonu için kullanılan PCR programları Tablo 3.3'de verilmektedir. PCR cihazı aşağıda belirtilen programa ayarlanarak PCR tepkimesi uygulandı.

Tablo 3. 2. PCR koşulları

Solüsyonlar	Konsantrasyon	Miktar
<i>Taq</i> DNA polimeraz tamponu	1X	2.5 µl
dNTP karışımı	2 mM	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl
Forward primeri	10 pmol	1 µl
Reverse primeri	10 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	5 U/µl	0.5 µl
dH ₂ O	-	15.5 µl
DNA	50 ng/µl	0,5 µl

Tablo 3.3. Ekzon1ve Ekzon5 polimorfizimleri için PCR Programı

Ayrılma (Denatürasyon)		94 °C'de 3 dakika	1 döngü
Primerlerin bağlanması (Annaeling)		94 °C'de 30 saniye	40 döngü
	Ekzon1- 148C>T	63.2 °C'de 1 dakika	
	Ekzon1- 432T>C	50.9 °C'de 1 dakika	
	Ekzon5-1365A>G	55.6 °C'de 1 dakika	
	Ekzon5-1386C>T	63.2 °C'de 1 dakika	
		72 °C'de 1 dakika	
Uzama (Extension)		72 °C'de 7 dakika	1 döngü

Elde edilen her bir bölgenin PCR ürünleri, RFLP yöntemi için kullanılmıştır. Ekzon1 148C>T polimorfizminin genotiplemesi *Mph1103I* restriksiyon endonükleaz, ekzon1 432T>C polimorfizminin genotiplemesi *Esp3I* restriksiyon endonükleaz, ekzon5 1365A>G *MspI* restriksiyon endonükleaz ve ekzon5 1386C>T *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile gerçekleştirilmiştir. RFLP koşulları Tablo 3.4 ve her bir enzimin tanıma bölgesi Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3. 4. RFLP koşulları

PCR amplifikasyon ürünü	8,5 µl
Tampon solüsyonu	1 µl
Restriksiyon Endonükleaz enzimi	0,5 µl

Tablo 3.4.’de verilen miktarlarla hazırlanan karışım etiketlenmiş 0.2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine konulup 37 °C sıcaklıkta 3 saat bekletilerek DNA parçalarının kesilmesi sağlandı.

Tablo 3.5. RFLP yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazların DNA üzerindeki tanıma bölgeleri

<i>Mph1103I</i>	5'-A T G C A [^] T-3' 3'-T [^] A C G T A-5'
<i>Esp3I</i>	5'-C G T C T C(N) ₁ [^] -3' 3'-G C A G A G(N) ₅ [^] -5'
<i>MspI</i>	5'-C [^] C G G-3' 3'-G G C [^] C-5'
<i>TaqI</i>	5'-T [^] C G A-3' 3'-A G C [^] T-5'

3. 7. Jel Elektroforezi:

PCR sonrası elde edilen ürünler %1.5, RFLP sonrasında elde edilen ürünler %2.5 yoğunlukta agaroz jel elektroforezinde koşturuldu.

3. 7. 1. Jelin Hazırlanması:

100 ml'lik jel tankında %1,5 yoğunlukta agaroz jeli hazırlamak için 1,5 gr agaroz ve %2,5 yoğunlukta agaroz jeli hazırlamak için 2,5 gr agaroz tartılarak erlenmayer içine konuldu. Üzerlerine X50 yoğunlukta olan TAE tamponundan (Tris, Glasiyal asetik asit, EDTA) X1 (2 ml X50 yoğunlukta TAE tamponuna 98 ml bidistile su eklenerek hazırlanır) yoğunlukta hazırlanan 100 ml TAE tamponu kondu ve mikrodalga fırınında ısıtılarak berraklaşması sağlandı. Berraklaşan jelin el yakmayacak ısıya düşürülmesi için akan musluk altında soğutuldu. Jel içerisine 10 µl etidium bromür eklenerek boyanması sağlandı ve 100 ml'lik agaroz jel tankına döküldü. DNA yüklenecek kuyucukların oluşturulması için taraklar yerleştirildi ve jelin soğuyup polimerleşmesi beklendi.

3. 7. 2. Jelde DNA'nın koşturulması

5 µl PCR ürününe 1-2 µl yükleme tamponu eklendi. Toplam karışım kuyucuklara yüklendi. DNA fragmentlerinin baz çifti uzunluklarını karşılaştırmak için 50 bp (baz çifti) ve 100 bp'lik DNA belirteçleri kullanıldı. DNA belirteçlerinden 1 µl alınıp, X6'luk yükleme tamponu ve 4 µl distile su ile karıştırılarak kuyucuğa yüklendi. Yüklenen PCR ürünleri 100 voltta 30 dakika, restriksiyon endonükleaz enzimi kesim ürünleri ise 100 voltta 45 dakika koşturuldu ve UV altında görüntülendi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda; hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin yaş ortalamalarının karşılaştırılması için Independent-Samples T testi, hasta ve kontrol grupları arasındaki sigara ve alkol kullanımı, aile öyküsü ve genotip frekanslarının değerlendirilmesi için ise χ^2 testi kullanıldı. İstatistiksel analiz, SPSS 13.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Ayrıca risk oranları (OR:Odds Ratio) ve güvenlik aralıkları (CI: %95 Confidense Interval) χ^2 testi kullanılarak tespit edildi (77).

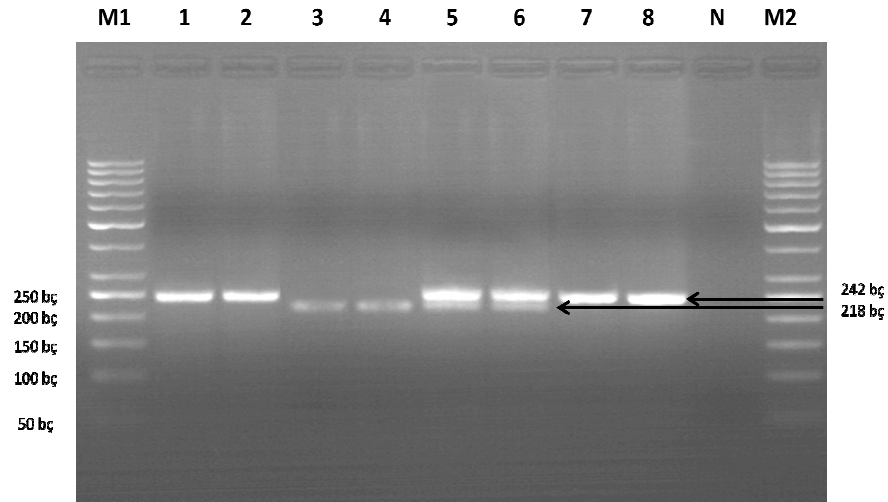
χ^2 testi uygulamasında değerlendirmenin sağlıklı yapılabilmesi için, değerlendirme gözlerine düşen beklenen değer sayısının 5'den küçük olmaması gerekmektedir. Fakat çalışmamızda kaynak olarak gösterilen Jerrold H. Zar'a göre, toplam birey sayısı gözenek sayısına bölüldüğünde, her bir göz için beklenen değerlerin ortalama sayısı 6 olursa χ^2 analizi yapılabilmektedir. Bulguların değerlendirilmesinde bu açıklama göz önünde tutulacaktır (78).

4. BULGULAR

Çalışmamızda prostat kanseri ve axin2 polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması için prostat tanısı konmuş 84 erkek birey hasta grubu ve 90 erkek birey ise kontrol grubu olarak incelemeye alındı.

4.1. Axin2 Geni Ekzon1 ve Ekzon5 Polimorfizmlerinin RFLP Yöntemi İle Değerlendirilmeleri

Axin2 geni 1. ekzonu 148C>T polimorfizminin belirlenmesi için ilk önce, bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 242 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 148. bazını içermektedir. *Mph1103I* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 148. pozisyonda C (sitozin) bazının bulunması, bu bölgede *Mph1103I* için bir kesim bölgesi oluştururken, aynı pozisyonda T (timin) bazının olması sonucunda tanıma bölgesi oluşmamaktadır. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot CC alleli için 218 ve 24 bç'lik iki fragment, homozigot TT alleli için 242 bç'lik tek bir fragment ve heterozigot CT alleli için ise 242, 218 ve 24 bç'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Ekzon1 148C>T polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü

M1 ve M2: Marker (belirteç), Gene Ruler™ 50 bç (baz çifti) DNA Ladder

1 ve 2: PCR sonucu elde edilen 242 bç uzunluğundaki fragment

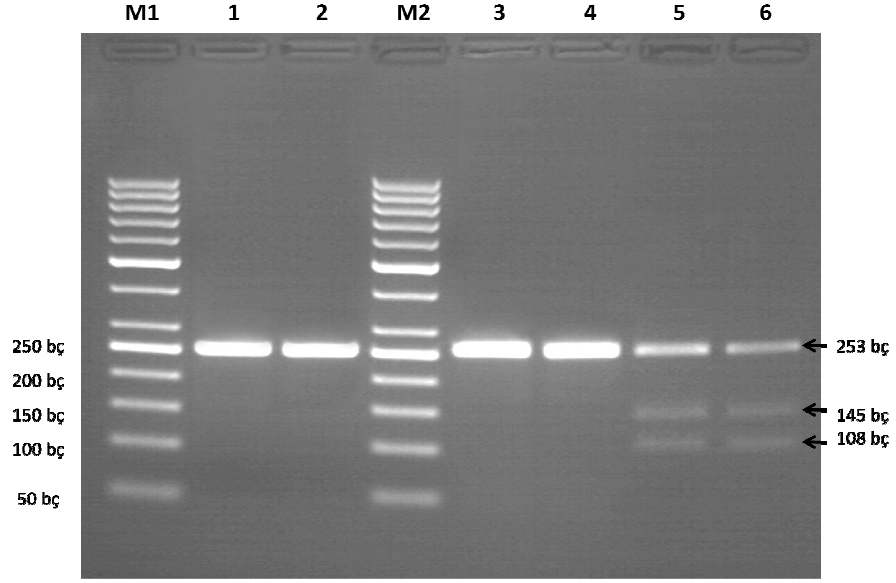
3 ve 4: PCR ürününün *Mph1103I* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot CC alleli.

5 ve 6: PCR ürününün *Mph1103I* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen heterozigot CT alleli.

7 ve 8: PCR ürününün *Mph1103I* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot TT alleli.

N: PCR reaksiyonunda kullanılan negatif kontrol.

Axin2 geni 1. ekzonu 432T>C polimorfizminin belirlenmesi için ilk önce, bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 253 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 432. bazını içermektedir. *Esp3I* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 432. pozisyonda T (timin) bazının bulunması, bu bölgede *Esp3I* için bir kesim bölgesi oluşturmazken, aynı pozisyonda C (sitozin) bazının olması sonucunda bir tane tanıma bölgesi oluşur. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot TT alleli için 253 bç'lik bir fragment, heterozigot TC alleli için ise 253, 145 ve 108 bç'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Ekzon1 432T>C polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü

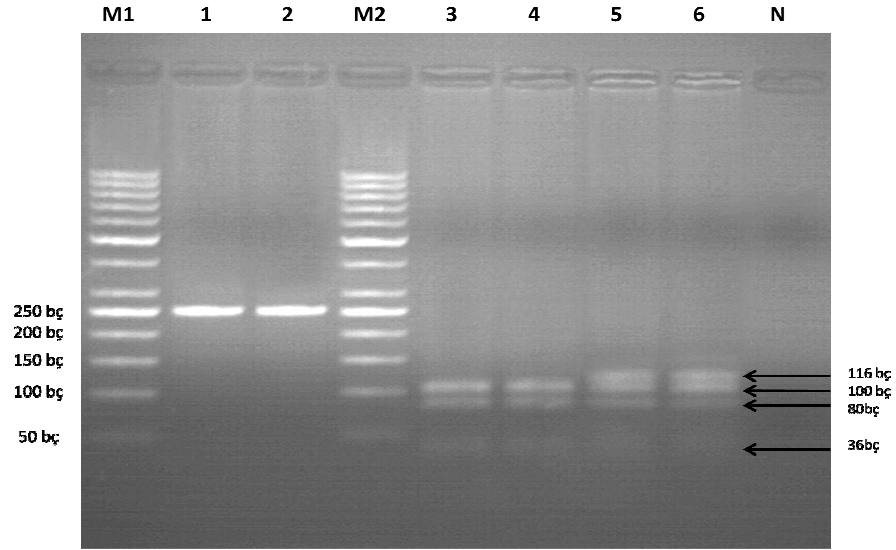
M1 ve M2: Marker (belirteç), Gene Ruler™ 50 bç (baz çifti) DNA Ladder

1 ve 2: PCR sonucu elde edilen 253 bç uzunluğundaki fragment

3 ve 4: PCR ürününün *Esp3I* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot TT alleli.

5 ve 6: PCR ürününün *Esp3I* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen heterozigot TC alleli.

Axin2 geni 5. ekzonu 1365A>G polimorfizminin belirlenmesi için ilk önce, bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 248 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 1365. bazını içerir. *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 1365. pozisyonda A (adenin) bazının bulunması, bu bölgede *MspI* için iki kesim bölgesi oluştururken, aynı pozisyonda G (guanin) bazının olması sonucunda üç tane tanıma bölgesi oluşur. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot GG alleli için 100, 80, 36 ve 32 bç'lik dört fragment ve heterozigot AG alleli için ise 116, 100, 80, 36 ve 32 bç'lik olmak üzere beş fragment elde edildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Ekzon5 1365A>G polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü

M1 ve M2: Marker (belirteç), Gene Ruler™ 50 bç (baz çifti) DNA Ladder

1 ve 2: PCR sonucu elde edilen 248 bç uzunluğundaki fragment

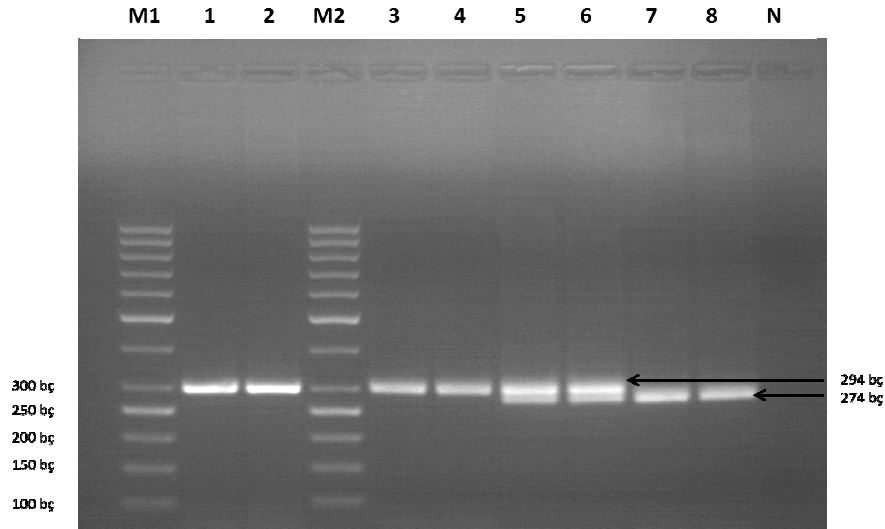
3 ve 4: PCR ürününün *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot GG alleli.

5 ve 6: PCR ürününün *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen heterozigot AG alleli.

N: PCR reaksiyonunda kullanılan negatif kontrol.

Axin2 geni 5. ekzonu 1386C>T polimorfizminin belirlenmesi için ilk önce, bölge polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı ve reaksiyon sonucunda 294 bç'lik DNA dizisi elde edildi. Bu dizi genin 1386. bazını içerir. *TaqI* restriksiyon endonükleaz enzimine maruz bırakıldığında 1386. pozisyonda C (sitozin) bazının bulunması, bu bölgede *TaqI* için bir kesim bölgesi oluşturmazken, aynı pozisyonda T (timin) bazının olması sonucunda bir tane tanıma bölgesi oluşur. Böylece enzimle kesim sonucunda homozigot CC alleli için 294 bç'lik bir fragment, homozigot TT alleli için 274 ve 20 bç'lik iki fragment ve heterozigot

CT alleli için ise 294, 274 ve 20 bç'lik olmak üzere üç fragment elde edildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Ekzon5 1386C>T polimorfizminin agaroz jeldeki görüntüsü

M1 ve M2: Marker (belirteç), Gene Ruler™ 50 bç (baz çifti) DNA Ladder

1 ve 2: PCR sonucu elde edilen 294 bç uzunluğundaki fragment

3 ve 4: PCR ürününün *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot CC alleli.

5 ve 6: PCR ürününün *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen heterozigot CT alleli.

7 ve 8: PCR ürününün *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen homozigot TT alleli.

N: PCR reaksiyonunda kullanılan negatif kontrol.

4.2. Hasta ve Kontrol Grubunda Yer Alan Bireylerin Yaş Ortalamalarının Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş ortalamaları Independent-Sample T testine göre değerlendirildiğinde, hasta grubunda bulunan

bireylerin yaş ortalaması 68.87 ± 7.80 , kontrol grubunda ise 66.68 ± 8.33 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında yaş yönünden anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.078$, $p>0.05$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş ortalamaları

Gruplar	Ortalama	Standart Sapma	p Değeri
YAŞ			
Prostat Kanseri	68.87	± 7.80	0.078
Kontrol	66.68	± 8.33	

4.3. Hasta ve Kontrol Grubunda Yer Alan Bireylerin Sigara ve Alkol Kullanımı ile Ailesel Öykülerinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin sigara ve alkol kullanımı ile ailesel öyküleri arasında fark olup olmadığı χ^2 testine göre değerlendirildiğinde (Tablo 4.2.), hasta ve kontrol grubunda sigara içen bireylerin yüzdeleri sırası ile %53.6 ve %41.1, sigara içmeyenlerin ise sırası ile %46.4 ve %58.9 olarak belirlendi. Her iki grup arasında sigara kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.10$, $p>0.05$). Hasta ve kontrol grupları arasında alkol kullananların yüzdeleri sırası ile %15.5 ve %6.7, kullanmayan bireylerin yüzdeleri sırası ile %84.5 ve %93.3 olarak belirlendi. İstatistiksel değerlendirmeye göre her iki grup arasında alkol kullanımı arasındaki fark anlamsız bulundu ($p=0.06$, $p>0.05$). Ayrıca, hasta ve kontrol grubunda bulunan bireylerde kanser hastalığı yönünden ailesel öyküsü olanların yüzdeleri sırası ile %11.9 ve %4.4, bulunmayanların yüzdeleri ise sırası ile %88.1 ve %95.6 olarak belirlendi. Değerlendirme sonuçlarına göre, hasta ve kontrol grubu arasında ailesel öykü yönünden anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.07$, $p>0.05$).

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin sigara kullanımı, alkol kullanımı ve ailesel öyküleri açısından değerlendirme sonuçları

	Prostat Kanseri (n=84)	Kontrol (n=90)	χ^2 Değeri	p Değeri
Sigara İçen	45 (%53.6)	37 (%41.1)	2.71	0.10
Sigara İçmeyen	39 (%46.4)	53 (%58.9)		
Alkol Kullanan	13 (%15.5)	6 (%6.7)	3.47	0.06
Alkol Kullanmayan	71 (%84.5)	84 (%93.3)		
Aile öyküsü var	10 (%11.9)	4 (%4.4)	3.27	0.07
Aile öyküsü yok	74 (%88.1)	86 (%95.6)		

Parantez içindeki sayılar yüzde değerleri göstermektedir.

4.4. Axin2 Geni Ekzon1 ve Ekzon5 Polimorfizmlerinin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımlarının Değerlendirilmesi

4.4.1. Axin2 Geni Ekzon1 148C>T Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi

Axin2 geni ekzon1 148C>T polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı açısından fark olup olmadığını araştırmak için, hasta grubu için 84 birey, kontrol grubu için ise 80 birey değerlendirmeye alınmıştır.

Axin2 geni 1. ekzonunun, 148. bazında sitozinin timine dönüşmesiyle (C>T) meydana gelen polimorfizmin prostat kanseri hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları Tablo 4.3.'de gösterilmektedir. Gözlenen genotip frekansları Hardy-Weinberg Dengesine uygunluk göstermektedir.

Axin2 148C>T genotiplerinin yüzdeleri, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için %13.1 ve %2.5, CT genotipi için %57.1 ve %46.3, TT genotipi için ise %29.8 ve %51.3 olarak tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları ise sırasıyla C alleli için 0.42 ve 0.26, T alleli için 0.58 ve 0.74 olarak belirlendi. Bu verilere dayanılarak, genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulundu (χ^2 : 11.44, $p<0.05$). Ayrıca bu bulgulara ek olarak, allel dağılımı göz önüne alındığında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulundu (χ^2 : 9.42, $p<0.05$).

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubundaki Axin2 geni 148. bölge genotip ve allel dağılımları

		Prostat Kanseri (n=84)	Kontrol (n=80)	p Değeri
Genotipler	CC	11 (%13.1)	2 (%2.5)	0.003
	CT	48 (%57.1)	37 (%46.3)	
	TT	25 (%29.8)	41 (%51.3)	
Allel Frekansları	C	0.42	0.26	0.002
	T	0.58	0.74	

Axin2 geninin 148C>T polimorfizminin hastalığın çıkışında bir risk faktörü olup olmadığı, χ^2 testine göre değerlendirildi. TT genotipi sık rastlanılan (wild type) genotip olduğundan, CT ve CC polimorfik genotip frekansları birleştirilerek polimorfik genotiplerin prostat kanseri'nin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirildi. Genotip oranları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla TT genotipi için %29.8 ve %51.3, CT + CC genotipleri için

%70.2 ve %48.8 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, C alleleline sahip bireylerin, T allelini taşıyan bireylere göre prostat kanserine yatkınlık açısından anlamlı bir risk taşıdıkları belirlendi ve C allelini taşıyan bireyler prostat kanserine 2,48 kez daha fazla yatkınlık göstermektedirler (χ^2 : 7.87, p: 0.007) (%95 CI: 1.31-4.71) (Tablo 4.4.).

Tablo 4. 4. Hastalığın ortaya çıkmasında hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (C alleli için)

	Genotip		Odds Ratio (%95 CI)	p Değeri
	TT	CT+CC		
Kontrol (n=80)	41 (%51.3)	39 (%48.8)	2,48 (1.31-4.71)	0.007
Prostat Kanseri (n=84)	25 (%29.8)	59 (%70.2)		

χ^2 : 7.87, Odds ratio sütununda verilmiş olan parantez içindeki sayılar %95 güven aralığını ifade etmektedir.

4.4.2. Axin2 Geni Ekzon1 432T>C Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi

Axin2 geni ekzon1 432 T >C polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı açısından fark olup olmadığını araştırmak için, hasta grubu için 83 birey, kontrol grubu için ise 90 birey değerlendirmeye alınmıştır.

Axin2 geni 1. ekzonunun, 432. bazında timinin sitozine dönüşmesiyle (T>C) meydana gelen polimorfizmin prostat kanseri hasta ve kontrol gruplarında

dağılımı Tablo 4.5.'de gösterilmektedir. Gözlenen genotip frekansları Hardy-Weinberg Dengesine uygunluk göstermektedir.

Axin2 432T>C genotiplerinin yüzdeleri, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla TT genotipi için %96.4 ve %97.8, TC genotipi için %3.6 ve %2.2 olarak belirlendi. Çalışılan popülasyon içinde CC genotipine sahip birey bulunmamaktadır. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları ise sırasıyla T alleli için 0.98 ve 0.99, C alleli için 0.02 ve 0.01 olarak belirlendi. χ^2 ve Fisher's exact testi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre, genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (χ^2 : 0.30, p>0.05). Ayrıca, allel dağılımı göz önüne alındığında da hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (χ^2 : 0.29, p>0.05).

Tablo 4.5. Hasta ve kontrol grubundaki Axin2 geni 432. bölge genotip ve allel dağılımları

		Prostat Kanseri (n=83)	Kontrol (n=90)	p Değeri
Genotipler	TT	80 (%96.4)	88 (%97.8)	0.585
	TC	3 (%3.6)	2 (%2.2)	
	CC	0 (%0)	0 (%0)	
Allel Frekansları	T	0.98	0.99	0.647
	C	0.02	0.01	

Axin2 geninin 432T>C polimorfizminin hastalığın çıkışında bir risk faktörü olup olmadığı, χ^2 ve Fisher's exact testine göre değerlendirildi. TT genotipi sık rastlanılan (wild type) genotip olduğundan, CT ve CC polimorfik genotip frekansları birleştirilerek polimorfik genotiplerin prostat kanseri'nin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirildi. Genotip oranları,

hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla TT genotipi için %96.4 ve %97.8, CT + CC genotipleri için %3.6 ve %2.2 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, C allelini taşıyan bireylerin prostat kanserine 1.65 kez daha fazla yatkınlık gösterdikleri, ancak bu yatkınlığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (χ^2 : 0.30, p: 0.672) (%95 CI: 0.27-10.13) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Hastalığın ortaya çıkmasında hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (C alleli için)

	Genotip		Odds Ratio (%95 CI)	p Değeri
	TT	CT+CC		
Kontrol (n=90)	88 (%97.8)	2 (%2.2)	1.65 (0.27-10.13)	0.672
Prostat Kanseri (n=83)	80 (%96.4)	3 (%3.6)		

χ^2 : 0.30, Odds ratio sütununda verilmiş olan parantez içindeki sayılar %95 güven aralığını ifade etmektedir.

4.4.3. Axin2 Geni Ekzon5 1365A>G Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi

Axin2 geni ekzon5 1365A>G polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı açısından fark olup olmadığını araştırmak için, hasta grubu için 83 birey, kontrol grubu için ise 89 birey değerlendirmeye alınmıştır.

Axin2 geni 5. ekzonunun, 1365. bazında adeninin guanine dönüşmesiyle (A>G) meydana gelen polimorfizmin prostat kanseri hasta ve kontrol gruplarında

dağılımı Tablo 4.7.'de gösterilmektedir. Gözlenen genotip frekansları Hardy-Weinberg Dengesine uygunluk göstermektedir.

Axin2 1365A>G genotiplerinin yüzdeleri, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla GG genotipi için %85.5 ve %91, AG genotipi için %14.5 ve %9 olarak belirlendi. Çalışılan popülasyon içinde AA genotipine sahip birey bulunmamaktadır. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları ise sırasıyla A alleli için 0.07 ve 0.04, G alleli için 0.93 ve 0.96 olarak belirlendi. Bu verilere dayanılarak, genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (χ^2 : 1.25, $p>0.05$). Ayrıca, allel dağılımı göz önüne alındığında da hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (χ^2 : 1.17, $p>0.05$).

Tablo 4.7. Hasta ve kontrol grubundaki *Axin2* geni 1365. bölge genotip ve allel dağılımları

		Prostat Kanseri (n=83)	Kontrol (n=89)	p Değeri
Genotipler	AA	0 (%0)	0 (%0)	0.264
	AG	12 (%14.5)	8 (%9.0)	
	GG	71 (%85.5)	81 (%91)	
Allel Frekansları	A	0.07	0.04	0.358
	G	0.93	0.96	

Axin2 geninin 1365A>G polimorfizminin hastalığın çıkışında bir risk faktörü olup olmadığı, χ^2 testine göre değerlendirildi. GG genotipi sık rastlanılan (wild type) genotip olduğundan, AG ve AA polimorfik genotip frekansları birleştirilerek polimorfik genotiplerin prostat kanseri'nin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirildi. Genotip oranları, hasta ve kontrol

gruplarında sırasıyla GG genotipi için %85.5 ve %91, AG + AA genotipleri için %14.5 ve %9 olarak tespit edildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, A allelini taşıyan bireylerin prostat kanserine 1.71 kez daha fazla yatkınlık göstermektedirler ancak bu yatkınlığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (χ^2 : 1.25, p: 0.342) (%95 CI: 0.66-4.42) (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. Hastalığın ortaya çıkmasında hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (A alleli için)

	Genotip		Odds Ratio (%95 CI)	p Değeri
	GG	AG+AA		
Kontrol (n=89)	81 (%91)	8 (%9)	1.71 (0.66-4.42)	0.342
Prostat Kanseri (n=83)	71 (%85.5)	12 (%14.5)		

χ^2 : 1.25, Odds ratio sütununda verilmiş olan parantez içindeki sayılar %95 güven aralığını ifade etmektedir.

4.4.4. Axin2 Geni Ekzon5 1386C>T Polimorfizminin Hasta ve Kontrol Grubundaki Dağılımının Değerlendirilmesi

Axin2 geni ekzon5 1386C>T polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımı açısından fark olup olmadığını araştırmak için, hasta grubu için 83 birey, kontrol grubu için ise 84 birey değerlendirmeye alınmıştır.

Axin2 geni 5. ekzonunun, 1386. bazında sitozinin timine dönüşmesiyle (C>T) meydana gelen polimorfizmin prostat kanseri hasta ve kontrol gruplarında

dağılımı Tablo 4.9.'da gösterilmektedir. Gözlenen genotip frekansları Hardy-Weinberg Dengesine uygunluk göstermektedir.

Axin2 1386C>T genotiplerinin yüzdeleri, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için %7.2 ve %42.9, CT genotipi için %48.2 ve %51.2, TT genotipi için ise %44.6 ve %6.0 olarak tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarındaki allel frekansları ise sırasıyla C alleli için 0.31 ve 0.61, T alleli için 0.69 ve 0.39 olarak belirlendi. Bu verilere dayanılarak, genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulundu (χ^2 : 45.91, $p<0.05$). Ayrıca bu bulgulara ek olarak, allel dağılımı göz önüne alındığında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulundu (χ^2 : 31.51, $p<0.05$).

Tablo 4.9. Hasta ve kontrol grubundaki *Axin2* geni 1386. bölge genotip ve allel dağılımları

		Prostat Kanseri (n=83)	Kontrol (n=84)	p Değeri
Genotipler	CC	6 (%7.2)	36 (%42.9)	0.000
	CT	40 (%48.2)	43 (%51.2)	
	TT	37 (%44.6)	5 (%6.0)	
Allel Frekansları	C	0.31	0.61	0.000
	T	0.69	0.39	

Axin2 geninin 1386C>T polimorfizminin hastalığın çıkışında bir risk faktörü olup olmadığı, χ^2 testine göre değerlendirildi.

CC genotipi sık rastlanılan (wild type) genotip olduğundan, CT ve TT polimorfik genotip frekansları birleştirilerek polimorfik genotiplerin prostat kanseri'nin ortaya çıkmasında bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirildi. Genotip oranları, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için %7.2 ve %42.9, CT + TT genotipleri için %92.8 ve %51.1 olarak tespit edildi. İstatistiksel

değerlendirme sonucunda, T alleleline sahip bireylerin, C allelini taşıyan bireylere göre prostat kanserine yatkınlık açısından anlamlı bir risk taşıdıkları belirlendi ve T allelini taşıyan bireyler prostat kanserine 9.63 kez daha fazla yatkınlık göstermektedirler (χ^2 : 28.15, p: 0.000) (%95 CI: 3.77-24.55) (Tablo 4.10.).

Tablo 4.10. Hastalığın ortaya çıkmasında, hasta grubunun kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranı (T alleli için)

	Genotip		Odds Ratio (%95 CI)	p Değeri
	CC	CT+TT		
Kontrol (n=84)	36 (%42.9)	48 (%51.1)	9.63 (3.77-24.55)	0.000
Prostat Kanseri (n=83)	6 (%7.2)	77 (%92.8)		

χ^2 : 28.15, Odds ratio sütununda verilmiş olan parantez içindeki sayılar %95 güven aralığını ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bilim dünyasında büyük devrimlerin yaşandığı günümüzde bu etkinin en fazla görüldüğü alanlardan bir tanesi de kanserle ilgili gelişmelerdir. Kanser çoğu kez tek bir hastalık gibi görünmesine karşın, gerçekte hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık grubudur. Kanser genetik bilimi ile bağlantılı olabileceği düşüncesi ilk kez 20. yüzyılın başlarında atıldı ve bu fikir kanser araştırmalarının kaynağı olarak rol oynadı. Bu gün kanser bir sinyal iletim yolu bozukluğu olarak tanımlanmakta ve çalışmalar sinyal iletim yollarında yer alan onkogen ve tümör baskılayıcı gen ürünlerinin birbirleri ile etkileşimlerinin incelenmesine dayanmaktadır. Prostat kanserinin gelişiminden sorumlu spesifik faktörler tam olarak belirlenememişse de etnik farklılıkların yanı sıra, ilerleyen yaş, yaşam tarzı, beslenme, androjen mekanizmasındaki bozukluklar ve genetik faktörlerin prostat kanseri gelişiminde rol oynadıkları düşünülmektedir. Bununla beraber, epidemiyolojik çalışmalar prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesinden sorumlu olan genetik ve çevresel faktörler altındaki nedenlerin henüz tam anlaşılamadıklarına işaret etmiştir.

Çalışmamızda, Axin2 geninin ekzon-1 bölgesindeki 148C>T ve 432T>C ile ekzon-5 bölgesindeki 1365A>G ve 1386C>T polimorfizmlerinin, erkeklerde prostat kanseri gelişmesinde bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirilmiştir. Tüm dünyada giderek büyüyen bir sağlık sorunu olan prostat kanserinin genetik alt yapısının belirlenmesi, prostat kanserinde rol alan gen ürünlerinin ve etkileşimlerinin ortaya çıkarılması, bu etkileşimlerin azaltılması veya artırılmasını sağlayacak tedavilerin geliştirilmesinde etkili olacaktır. Ayrıca prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesinde etkin olan onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin, bu genlerdeki mutasyon ve polimorfizmlerin belirlenmesi gen tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

Sigara kullanımı ile bir çok kanser tipi arasında ilişki saptanmasına rağmen, sigaranın prostat kanserindeki rolü henüz açık değildir (79). Prostat kanseri insidansı ve sigara kullanımı arasındaki bağlantı üzerine yapılan

çalışmalar birbirleri ile tutarlı olmasa da, yapılan bir çok çalışmada ölümcül prostat kanserinin oluşmasında sigara kullanımının ilişkisi ortaya konmuştur (80). Japonya'da Furuya ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sigara kullanımının prostat kanseri gelişimi için bir risk oluşturmadığı belirlenmiştir (81). Ayrıca ABD'de yapılan bir başka çalışmada da sigara kullanımının bir risk faktörü olmadığı saptanmıştır (82). Türkiye'de Aktaş ve arkadaşlarının araştırma sonuçlarına göre de sigara ve prostat kanseri riski arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (83). Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda sigara içen bireylerin yüzdeleri sırası ile %53.6 ve %41.1, sigara içmeyenlerin ise sırası ile %46.4 ve %58.9 olarak belirlenmiştir. Her iki grup arasında sigara kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Yapılan bu çalışmalarla karşılaştırıldığında elde ettiğimiz sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir.

Kesinliği olmayan bir diğer risk faktörü ise alkol kullanımındır. Prostat kanseri riski ve alkol tüketimi arasındaki ilişki henüz tam kesin olmasa da, bazı çalışmalarda yüksek alkol tüketiminin artan risk ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Son zamanlarda elde edilen bir çalışmaya göre kırmızı şarap tüketiminin azalan risk ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (84). Sesso ve arkadaşları tarafından ABD'de yapılan bir çalışmada şarap ve bira tüketiminin prostat kanseri gelişimi ile ilişkili olmadığı; ancak likör tüketiminin prostat kanseri riskini %61-67 oranında artırdığı saptanmıştır (p , doğrusal olmayan eğilim <0.001) (85). Ayrıca, ABD'de yapılan başka bir çalışmada günde üç kadeh alkol tüketiminin prostat kanseri riskini etkilemediği, günde yedi kadeh veya daha fazla alkol tüketiminin ise prostat kanseri için artan bir risk olabileceği bildirilmiştir (86). Bizim çalışmamızda ise hasta ve kontrol grupları arasında alkol kullananların yüzdeleri sırası ile %15.5 ve %6.7, alkol kullanmayan bireylerin yüzdeleri sırası ile %84.5 ve %93.3 olarak belirlenmiş ve istatistiksel değerlendirmeye göre her iki grup arasında alkol kullanımı arasındaki fark bulunamamıştır ($p=0.06$, $p>0.05$). Sonuç olarak, çalışmamızda alkolün bir risk faktörü olmadığı gözlenmiştir.

Yaş ve ırk gibi faktörlerin yanı sıra prostat kanseri için en iyi bilinen bir diğer risk faktörü ise hastalığın ailesel kökenidir. Birinci dereceden prostat kanseri

öyküsü olan kişilerde 2-3 kat artan bir riskin bulunduğu saptanmıştır (87). Gallus ve arkadaşlarının 60 yaşın altındaki bireyler ile yaptıkları bir çalışmada, prostat kanserinin ailesel öyküsünün bu hastalığın riskini artırdığı (OR, 5.5; CI %95, 2.4-12.7) bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, beyin kanseri aile öyküsünün (OR, 3.7; CI %95, 1.2-11.7) ve lösemi öyküsünün (OR, 6.2; CI %95, 1.2-31.7) prostat kanser riski ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (88). Bizim çalışmamızda, hasta grubunda 10 bireyin, kontrol grubunda ise 4 bireyin ailesinde kanser öyküsü bulunmaktadır. Hasta ve kontrol grubunda bulunan bireylerde kanser hastalığı yönünden ailesel öyküsü olanların yüzdeleri sırası ile %11.9 ve %4.4, ailesel öyküsü bulunmayanların yüzdeleri ise sırası ile %88.1 ve %95.6 olarak belirlenmiştir. Değerlendime sonuçlarına göre, hasta ve kontrol grubu arasında ailesel öykü yönünden anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.07$, $p>0.05$). Sonuç olarak bulgularımız yapılan bu çalışmalarla uyumlu değildir.

Çalışmamız, Wnt sinyal iletim yolağında görev alan Axin2 proteinini kodlayan Axin2 geninin ekzon1 148C>T ve 432T>C ile ekzon5 1365A>G ve 1386C>T polimorfizmlerinin prostat kanseri gelişiminde bir risk faktörü olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Wnt sinyal iletim yolağının embriyonik gelişim süresince hücre büyümesi, hareketliliği ve farklılaşmasını düzenlediği ve bu yolda rol alan proteinlerde gerçekleşen bazı mutasyonlar yoluyla çeşitli tümör tiplerinin gelişiminde etkisi olduğu saptanmıştır. Akciğer kanseri, kolorektal kanser, hepatoselüler karsinoma, melanoma, medullablastoma gibi kanser tiplerinin gelişiminde rol aldığı belirlenen bu yolda çoğunlukla APC, axin ve axin2, ve β -katenin'deki mutasyonları etkindir (3).

Bazı çalışmalarda prostat kanserinin β -katenin ve APC mutasyonları taşıdığı bildirilmiştir. Vakaların yaklaşık %10'unda bu proteinlerin herbirinde değişimlerin meydana geldiği ve prostat tümörlerinin en az %30'unda Wnt yolağındaki mutasyonların önemli rol oynadığı saptanmıştır (3,89,90). Bununla beraber Japonya'da yapılan başka bir çalışmada ise APC gen mutasyonu frekansının prostat kanserli hastalarda çok düşük olduğu saptanmıştır (91).

Wnt sinyal iletim yolağında Axin2 proteini moleküler düzeyde β -katenin'in fosforilasyonunda ihtiyaç duyulan tüm bileşenleri birbirine yaklaştıran bir skaffold proteini gibi görev yaptığı için oldukça önemli bir moleküldür. Axin2 proteini yapısında β -katenin degradasyon kompleksinde yer alan proteinlerin bağlanmasını sağlayan domainler içermektedir. Bu domainlerde gerçekleşecek mutasyon ya da polimorfizmler sonucunda komplekste yer alması gereken proteinlerin Axin2 proteinine bağlanma ilgilerinin azalabileceği düşünülmektedir. Bu durumda, kompleks tarafından β -katenin fosforile edilemez ve defosforile β -katenin tercihen nükleusa transloke olur ve LEF/TCF ailesi üyelerine bağlanarak hedef genleri aktive eder. Bu hedef genler arasında tümör gelişiminde gerekli olan genler de yer almaktadır.

Axin2 gen mutasyonlarının ve polimorfizmlerinin araştırıldığı bir kaç çalışma mevcuttur. Almanya'da Medullablastoma vakalarında yapılan bir çalışma sonucunda, sporadik medullablastoma patogenezinde Axin2 gen değişimlerinin gerekli olduğu ve ekzon5 ve ekzon8'de gerçekleşen mutasyonların onkogenik aktivasyona neden olabileceği saptanmıştır (92). Koch ve arkadaşları tarafından yapılan sporadik hepatoblastoma patogenezinde Axin2 mutasyonlarının tarandığı çalışmada ekzon9'da somatik nokta mutasyonu, ekzon 8-9'da delesyon, ve ayrıca ekzon5'in 455. ve 462. kodonlarında yer alan tek nükleotit polimorfizmleri saptanmıştır (93). Kanzaki ve arkadaşları tarafından akciğer kanseri ve Axin2 gen polimorfimi ilişkisinin araştırıldığı çalışmada ise, Axin2 geni ekzon1 50. kodonundaki tek nükleotit polimorfizminin akciğer kanser riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır (49). Polonya'da yapılan başka bir çalışmada ise Axin2 ekzonları ve ekzon-intron sınırlarında gerçekleşen tek nükleotit polimorfizmleri araştırılmış ve intron2 956+16A>G ve ekzon7 2062C>T polimorfizmlerinin diş agenezi riskini artırdığı saptanmıştır (59).

Axin2 gen polimorfizmi ve prostat kanseri riski arasında ilişki olup olmadığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, Axin2 gen mutasyonlarının ya da polimorfizmlerinin bazı hastalıkların oluşumu ile ilişkili olduğuna dair elde edilen bulgulara dayanarak, Axin2 geninde gerçekleşecek

polimorfizmlerin prostat kanseri gelişiminde de rol alabileceği düşüncesinden yola çıkarak çalışmamızı gerçekleştirdik.

Axin ve APC proteinlerinin β -katenin sitoplazmik lokalizasyonunun düzenlenmesinde kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Bu düzenleme sırasında APC, Axin2 proteininin RGS domainine (81-200. amino asitler arasında) bağlanır. APC'de Axin-bağlanma bölgesinde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda Axin proteinine bağlanma ilgisinin azaldığı ve dolayısı ile APC'nin karsinogenezi etkilediği düşünülmektedir (49). Sonuç olarak Axin2 proteininde APC bağlanma ilgisini azaltacak bir mutasyon ya da polimorfizmin gerçekleşmesi ile Axin2'nin de karsinogenezde etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızın bir kısmı *Axin2* 148C>T polimorfizminin araştırılmasını içermektedir. Bu polimorfizim ekzon1'in 148. bazında ve RGS domainine çok yakın bir bölgede şekillenmektedir. Dolayısı ile ekzon1 148. bazında gerçekleşen bu tek nükleotit polimorfizmi APC'nin Axin proteinine bağlanma ilgisini azaltabilir ve sonuçta karsinogenezi etkileyebilir. Çalışmamızda, *Axin2* 148C>T genotiplerinin yüzdeleri, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için %13.1 ve %2.5, CT genotipi için %57.1 ve %46.3, TT genotipi için ise %29.8 ve %51.3 olarak tespit edilmiş ve genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (χ^2 : 11.44, $p < 0.05$). Ayrıca 148C/C genotipine sahip bireylerin, 148C/T ve 148T/T genotipine sahip bireylere göre prostat kanseri geliştirme riskinin 2.48 kez daha fazla olduğu bulunmuştur (χ^2 : 7.87, $p < 0.05$) (%95 CI: 1.31-4.71). Bu verilere dayanarak, 148T/T genotipinin prostat kanseri riskine karşı koruyucu genotip olduğunu ve 148C/C genotipinin prostat kanseri gelişiminde etkili olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızın bir diğer kısmında araştırılan ekzon5 1386C>T polimorfizmi Axin proteininin β - katenin bağlanma domaininde bulunmaktadır. Birçok çalışmada β -katenin'in hücre çoğalmasında gerekli olan birçok hedef genin transkripsiyonal transaktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, prostat kanseri hücrelerinde β -kateninin mutant formlarının degeradasyon

kompleksi tarafından gerçekleştirilen düzenlenmeden kaçabileceğine işaret edilmiştir (89). Dolayısı ile, β -kateninde gerçekleşebilen bir mutasyon karsinogenezde etkili ise, bu proteinin düzenlenmesinde rol alan ve Axin2 proteininin kritik bir rolü olduğu degradasyon kompleksi bileşenlerindeki mutasyon ya da polimorfizmlerin de prostat kanserinde etken olabileceği düşünülebilir. Bu düşünceden yola çıkarak, çalışmamızda Axin2 proteininin β -katenin bağlanma bölgesindeki ekzon5 1386C>T polimorfizmi araştırılmıştır. Axin2 1386C>T genotiplerinin yüzdeleri, hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla CC genotipi için %7.2 ve %42.9, CT genotipi için %48.2 ve %51.2, TT genotipi için ise %44.6 ve %6.0 olarak tespit edilmiştir ve genotip dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (χ^2 : 45.91, $p < 0.05$). Ayrıca, 1386T/T genotipine sahip bireylerin, 1386C/T ve 1386C/C genotipi taşıyan bireylere göre prostat kanseri geliştirme riskinin 9.63 kez daha fazla olduğu belirlenmiştir (χ^2 : 28.15, $p < 0.05$) (%95 CI: 3.77-24.55). Bu sonuçlar göz önüne alındığında, axin2 geni 1386. bazında gerçekleşen tek nükleotit polimorfizminin prostat kanserine yatkınlık açısından önemli olduğu düşünülebilir.

χ^2 analizi ile yapılan değerlendirmeler sonucunda Axin2 ekzon1 432T>C polimorfizmi dağılımının hasta ve kontrol grupları arasında bir fark olmadığı görülmüştür (χ^2 : 0.30, $p > 0.05$). Ayrıca, ekzon5 1365A>G polimorfizminin dağılımı açısından da hasta ve kontrol grupları arasında bir fark bulunamamıştır (χ^2 : 1.25, $p > 0.05$). Çalışmamızda, prostat kanseri ile Axin2 geni ekzon1 432T>C ve ekzon5 1365A>G polimorfizmleri arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma prostat kanseri ve Axin2 geni polimorfizmi arasındaki ilişkinin ortaya konulduğu ilk ön çalışmadır. Özellikle hasta grubu genişletilerek farklı popülasyonlarda Axin2 geni ekzon1 148C>T ve ekzon5 1386C>T polimorfizmlerinin çalışılması bu varsayımımızın geçerliliğini ortaya koyabilir. Çalışma gurubunun genişletilmesinin, ekzon1 432T>C ve ekzon5 1365A>G bölgelerinde gerçekleşen polimorfizmler açısından çalışmayı anlamlı kılabilceği düşünülebilir.

ÖZET

BİR TÜRK POPÜLASYONUNDA PROSTAT KANSERİ VE Axin-2 GEN POLİMORFİZMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda Axin2 (Axis inhibisyon proteini 2) geni ekzon1 148C>T ve 432T>C ile ekzon5 1365A>G ve 1386C>T polimorfizmlerinin prostat kanseri gelişiminde risk oluşturup oluşturmadığı amaçlanmıştır. Çalışmada prostat kanseri tanısı konmuş 84 birey hasta grubu ve 90 birey kontrol grubu olarak incelenmiştir.

Axin2 geni 148C>T, 432T>C, 1365A>G ve 1386C>T polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi, izole edilen DNA'lar kullanılarak PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction ve Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

χ^2 testi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde, ekzon1 148C>T polimorfizmi dağılımının hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı olarak farklı olduğu gözlemlenmiştir (χ^2 : 11.44, $p<0.05$). Ayrıca 148C/C genotipine sahip bireylerin, 148C/T ve 148T/T genotipine sahip bireylere göre prostat kanseri geliştirme riskinin 2.48 kez daha fazla olduğu bulunmuştur (χ^2 : 7.87, $p<0.05$) (%95 CI: 1.31-4.71). Bununla beraber, ekzon1 432T>C ve ekzon5 1365A>G polimorfizimlerinin dağılımı açısından hasta ve kontrol grubu arasından anlamlı bir fark bulunamamıştır (432T/C için χ^2 : 0.30, $p>0.05$, 1365A/G için χ^2 : 1.25, $p>0.05$). Ekzon5 1386C>T polimorfizmi dağılımı açısından ise hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu gördük (χ^2 : 45.91, $p<0.05$). Buna ek olarak, 1386T/T genotipine sahip bireylerin, 1386C/T ve 1386C/C genotipine sahip bireylere göre prostat kanseri geliştirme riskinin 9.63 kez daha fazla olduğu saptanmıştır (χ^2 : 28.15, $p<0.05$) (%95 CI: 3.77-24.55).

Sonuç olarak çalışmamızda, prostat kanseri ile ekzon1 148C>T ve ekzon5 1386C>T polimorfizmi arasında bir ilişki bulunmuştur. Buna karşın, ekzon1 432T>C ve ekzon5 1365A>G polimorfizmi ile prostat kanseri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, Axin2 geni, polimorfizm.

SUMMARY

INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN PROSTATE CANCER AND Axin2 GENE POLYMORPHISM IN A TURKISH POPULATION

In our study, we aimed whether exon1 148C>T, 432T>C and exon5 1365A>G, 1386C>T polymorphisms of Axin2 gene is a risk factor of prostate cancer development. In this study, 84 male patients with prostate cancer and 90 healthy males as a control group are examined.

Genotyping of 148C>T, 432T>C, 1365A>G and 1386C>T polymorphisms of Axin2 gene have been performed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction ve Restriction Fragment Length Polymorphism) methods using isolated DNA.

In statistical analyses using χ^2 test, we observed that distribution of exon1 148C>T polymorphism between case and control groups was significantly different (χ^2 : 11.44, $p<0.05$). We also found that individuals with 148C/C genotype have 2.48 times more risk for prostate cancer development than individuals with 148C/T and 148T/T genotypes (χ^2 : 7.87, $p<0.05$) (%95 CI: 1.31-4.71). On the other hand, there was no significant difference between case and control groups for distribution of exon1 432T>C and exon5 1365A>G polymorphisms (for 432T/C χ^2 : 0.30, $p>0.05$, for 1365A/G χ^2 : 1.25, $p>0.05$). We observed that distribution of exon5 1386C>T polymorphism between case and control groups was significantly different (χ^2 : 45.91, $p<0.05$). In addition, it has been found that individuals with 1386T/T genotype have 9.63 times more risk for prostate cancer development than individuals with 1386C/T and 1386C/C genotypes (χ^2 : 28.15, $p<0.05$) (%95 CI: 3.77-24.55).

In conclusion, we found an association between prostate cancer and exon1 148C>T and exon5 1386C>T polymorphisms. On the contrary, there was no relationship between prostate cancer with exon1 432T>C and exon5 1365A>G polymorphisms.

Keywords: Prostate cancer, Axin2 gene, polymorphism.

8. KAYNAKLAR

1. Kierszenbaum A. L., MD, PhD (Çeviri editörü : Demir R.) (2006) Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme yayıncılık, Sayfa: 558-59.
2. Siliğ Y., Pınarbaşı H., Güneş S., Ayan S., Bağcı H., Çetinkaya Ö., (2006) Polymorphisms of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, and prostate cancer risk in Turkish population, *Cancer Investigation*, 24: 41-45.
3. Lustig B., Behrens J., (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 199–221.
4. Polakis P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837–1851.
5. Truica CI, Byers S, Gelmann EP., (2000) Betacatenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res*; 60 : 4709–13.
6. Gerstein AV, Almeida TA, Zhao G., (2002) APC/CTNNB1 (beta-catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer*;34 9–16.
7. Chesire DR, Ewing CM, Gage WR, Isaacs WB., (2002) *In vitro* evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene*; 21: 2679–94.
8. Yardy G.W. and Brewster S.F. (2005) Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 8, 119–126.
9. Karol S., Suludere Z., Ayvalı C. (1998) *Biyoloji Terimleri Sözlüğü*. Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dil Kurumu Yayınları, Sayfa: 544.
10. Hellerstedt BA and Pienta KJ, (2002) The current state of hormonal therapy for prostate cancer, *CA Cancer J. Clin.* 52: 154–179.
11. http://en.wikipedia.org/wiki/Prostate_cancer
12. http://en.wikipedia.org/wiki/Prostate_gland

13. <http://www.unimedsaglik.com/green.html>
14. <http://www.instantanatomy.net/abdomen/vessels/vprostaticplexus.html>
15. <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/kanser.pdf>
16. Schulz W. A., (2005) *Molecular Biology of Human Cancers*. Springer, Sayfa: 383-402,.
17. Jemal,A., Tiwari,R.C., Murray,T., Ghafoor,A., Samuels,A., Ward,E., Feuer,E.J. and Thun,M.J. (2004) Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.*, 54, 8–29.
18. Mimeault M, Batra SK. (2006) Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies, *Carcinogenesis*, 27, 1–22.
19. Bostwick,D.G., Qian,J. and Maihle,N.J. (2004) Amphiregulin expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 93 cases. *Prostate*, 58, 164–168.
20. De,S., Chen,J., Narizhneva,N.V., Heston,W., Brainard,J., Sage,E.H. and Byzova,T.V. (2003) Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J.Biol.Chem.*, 278, 39044–39050.
21. <http://web.archive.org/web/20060205235509/http://www.jncicancerspectrum.oxfordjournals.org/cgi/statContent/cspectfstat;99>.
22. http://www2.dunyagazetesi.com.tr/news_display.asp?upsale_id=293710
23. Miller, DC; Hafez, KS, Stewart, A, et al (2003). Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update form the National Cancer Data Base. *Cancer* 98: 1169.
24. <http://www.diyethaber.com/index.asp?actions=saglikdetay&saglik=125>
25. van der Crujisen-Koeter, IW; Vis AN, Roobol MJ, Wildhagen MF, de Koning HJ, van der Kwast TH, Schroder FH (Jul 2005). Comparison of screen detected and clinically diagnosed prostate cancer in the European

randomized study of screening for prostate cancer, section rotterdam. *Urol* 174 (1): 121-5.

26. Garzotto, M., Hudson, R.G., Peters, L., Hsieh, Y.C., Barrera, E., Mori, M., Beer, T.M. and Klein, T. (2003) Predictive modeling for the presence of prostate carcinoma using clinical, laboratory, and ultrasound parameters in patients with prostate specific antigen levels 5 or $\frac{1}{4}$ 10 ng/mL. *Cancer*, 98, 1417–1422.
27. Pelzer, A., Bektic, J., Berger, A.P., Pallwein, L., Halpern, E.J., Horninger, W., Bartsch, G. and Frauscher, F. (2005) Prostate cancer detection in men with prostate specific antigen 4 to 10 ng/ml using a combined approach of contrast enhanced color Doppler targeted and systematic biopsy. *J. Urol.*, 173, 1926–1929.
28. Rubin, M.A., De Marzo A.M. (2004) Molecular genetics of human prostate cancer. *Modern Pathology* 17, 380–388.
29. Hoffman, R.M., Gilliland F.D., Eley J.W., Harlan L.C., Stephenson R.A., Stanford J.L., Albertson P.C., Hamilton A.S., Hunt W.C., Potosky A.L. (March 7 2001). Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst* 93 (5), 388-95.
30. Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, et al. (1998) Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* 153, 141–148.
31. Terry S., Yang X., Chen M., Vacherot F., ve Buttyan R. (2006) Multifaceted Interaction Between the Androgen and Wnt Signaling Pathways and the Implication for Prostate Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 99, 401-410.
32. Mimeault M. (2002) New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS Lett.*, 530, 9–16.

33. Wang H., Charles A.G., Frankel A.J. and Cabot M.C. (2003) Increasing intracellular ceramide: an approach that enhances the cytotoxic response in prostate cancer cells. *Urology*, 61, 1047–1052.
34. Hudson D.L. (2004) Epithelial stem cells in human prostate growth and disease. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 7, 188–194.
35. Long,R.M., Morrissey,C., Fitzpatrick,J.M. and Watson,R.W. (2005) Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin. Sci. (Lond.)*, 108, 1–11.
36. Ashida S., Nakagawa H., Katagiri T. et al. (2004) Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs. *Cancer Res.*, 64, 5963–5972.
37. Sanchez P., Hernandez A.M., Stecca B., Kahler A.J., DeGueme A.M., Barrett A., Beyna M., Datta M.W., Datta S. and Altaba A. (2004) Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101,12561–12566.
38. Chung L.W., Baseman A., Assikis V. and Zhau H.E. (2005) Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J. Urol.*, 173, 10–20.
39. Tsujimura A., Koikawa Y., Salm S., Takao T., Coetzee S., Moscatelli D., Shapiro E., Lepor,H., Sun,T.T. and Wilson,E.L. (2002) Proximal location of mouse prostate epithelial stem cells: a model of prostatic homeostasis. *J. Cell Biol.*, 157, 1257–1265.
40. Ho,S.M. (2004) Estrogens and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J. Cell Biochem.*, 91, 491–503.

41. Suzuki,H., Ueda,T., Ichikawa,T. and Ito,H. (2003) Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 10, 209–216.
42. Li,L., Yang,G., Ebara,S., Satoh,T., Nasu,Y., Timme,T.L., Ren,C., Wang,J., Tahir,S.A. and Thompson,T.C. (2001) Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 61, 4386–4392.
43. Culig,Z., Steiner,H., Bartsch,G. and Hobisch,A. (2005) Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J. Cell Biochem.*, 95, 497–505.
44. San,F.I., DeWolf,W.C., Peehl,D.M. and Olumi,A.F. (2004) Expression of transforming growth factor-beta 1 and growth in soft agar differentiate prostate carcinoma-associated fibroblasts from normal prostate fibroblasts. *Int. J. Cancer*, 112, 213–218.
45. Lee,L.F., Guan,J., Qiu,Y. and Kung,H.-J. (2001) Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: Roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bxm, Src, and focal adhesion kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 8385–8397.
46. Di,L.G., Tortora,G., D’Armiento,F.P. et al. (2002) Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 8, 3438–3444.
47. Bonaccorsi,L., Marchiani,S., Muratori,M., Forti,G. and Baldi,E. (2004) Gefitinib (‘IRESSA’, ZD1839) inhibits EGF-induced invasion in prostate cancer cells by suppressing PI3 K/AKT activation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130, 604–614.
48. Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286–3305
49. Kanzaki H., Ouchida M., Hanafusa H., Yano M., Suzuki H., Aoe M., Iai K., Shimizu N., Nakachi K., Shimizu K. (2006) Single nucleotide

- polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *International Journal of molecular medicine*. 18:279-284.
50. Salahshor S., Woodgett J. R. (2005) The link between axin and carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* 58: 225-236.
 51. Miller JR (2002) The Wnts. *Genome Biol* 3[Review]:S3001
 52. Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2002) *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, Sayfa: 895-96.
 53. Chesire D.R., Isaacs W.B (2003) β -Catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocrine-Related Cancer* 10:537–560.
 54. Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Matsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K (1999) An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *Embo J* 18:2401–2410.
 55. Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW (1999) The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in κ Balpa and beta-catenin and stimulates κ Balpa ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13:270–283.
 56. Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Ikeda S, Takada S, Kikuchi A (1999) Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 β regulates its stability. *J Biol Chem* 274:10681–10684.
 57. Willert K, Shibamoto S, Nusse R (1999) Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev* 13:1768–1773.
 58. Kikuchi A., (1999) Roles of Axin in the Wnt Signalling Pathway. *Cell. Signal*. Vol. 11, No. 11, pp. 777–788.

59. Mostowska A., Biedziak B., Jagodzinski P.P. (2006) Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms a risk factor for selective tooth agenesis. *J Hum Genet* 51:262–266.
60. Hedgepeth C. M., Deardorff M. A. and Klein P. S. (1999) *Xenopus* axin interacts with glycogen synthase kinase-3 beta and is expressed in the anterior midbrain. *Mech. Dev.* 80, 147–151.
61. Mai M, Qian C, Yokomizo A, et al. (1999) Cloning of the human homolog of conductin (AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23–q24. *Genomics*, 5:341–4.
62. Yamamoto H, Kishida S, Uochi T, et al. (1998) Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* 18, 2867–75.
63. Wiechens N, Heinle K, Englmeier L, et al. (2004) Nucleo–cytoplasmic shuttling of Axin, a negative regulator of the Wnt–beta-catenin pathway. *J Biol Chem* 279:5263–7.
64. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280:596–599.
65. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* 17:1371–1384.
66. Lüleci G., Sakızlı M., Alper Ö., (1995) *Renkli Genetik Atlası* ISBN: 975-420-035-1.
67. http://en.wikipedia.org/wiki/Single_nucleotide_polymorphism
68. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/WEB/derleme/d_snp.pdf

69. Klug W.S., Cummings M.R. (Çeviri editörü: Öner C.) (2002) Genetik Kavramlar. Palme yayıncılık Altıncı baskı, ISBN: 0-13-081626-4, Sayfa: 515-17.
70. Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç B. (Editörler) (2007) Moleküler Biyoloji. Nobel Yayın Dağıtım birinci basım. Sayfa: 543-46.
71. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/WEB/sunu/s_restrictions.pdf
72. <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/109.pdf>
73. Başbüyük H.H., Bardakçı F., Belshaw R., Quicke D.L.J. (2000) Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice. Önder matbaa, Sivas/Turkey.
74. Klug W.S., Cummings M.R. (Çeviri editörü: Öner C.) (2002) Genetik Kavramlar. Palme yayıncılık Altıncı baskı, ISBN: 0-13-081626-4, Sayfa: 578
75. Temizkan G., Yılmaz S., Öztürk M., Arı Ş., Ertan H., Olgun A., Topal Sarıkaya A., Arda N. (1999) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, Sayfa: 34-35
76. Miller S.A., Dykes D.D., Poldesky H.F., (1988) A Simple Salting-Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cell. Nucl. Acids Res. 16, 1215.
77. Sümbüloğlu K., (1978) Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik, Matış Yayınları, Ankara.
78. Zar J.H. (1998) Biostatistical Analysis. Fourth Edition. ISBN:013081542X, Sayfa: 489.
79. Hickey K., Do K.-A., Green A. (2001) Smoking and Prostate Cancer. *Epidemiol Rev* Vol. 23, No. 1.
80. Giovannucci E., Rimm E.B., Ascherio A., Colditz G.A., Spiegelman D., Stampfer M.J., Willett W.C. (1999) Smoking and Risk of Total and Fatal

Prostate Cancer in United States Health Professionals. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* Vol. 8, 277–282.

81. Furuya Y., Akimoto S., Akakura K., Ito H., (1998) Smoking and Obesity in Relation to the Etiology and Disease Progression of Prostate Cancer in Japan. *International Journal of Urology* 5 (2) Page 134-137.
82. Slattery M.L., and West D.W. (1993) Smoking, alcohol, coffee, tea, caffeine, and theobromine: risk of prostate cancer in Utah (United States). *Cancer Causes and Control* journal. Volume 4, Number 6.
83. Aktaş D., Hasçıçek M., Sözen S., Özen H., Tunçbilek E., (2004) *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphic genotypes in patients with prostate cancer in a Turkish population *Cancer Genetics and Cytogenetics* 154: 81–85.
84. Velicer C.M., Kristal A., White E. (2006) Alcohol use and the risk of prostate cancer: results from the VITAL cohort study. *Nutr Cancer.*;56(1):50-6.
85. Sesso H.D., Paffenbarger Jr R.S., Lee I-Min (2001) Alcohol consumption and risk of prostate cancer: The Harvard Alumni Health Study. *International Journal of Epidemiology* 30; 749-755.
86. Dennis L.K., and Hayes R.B.(2002) Alcohol and Prostate Cancer. *Epidemiologic Reviews*, Vol 23, no 1.
87. Langeberg W.J., Isaacs W.B., Stanford Janet .L. (2007) Genetic etiology of hereditary prostate cancer. *Frontiers in Bioscience* 12, 4101-4110.
88. Gallus S., Foschi R., Talamini R., Altieri A., Negri E., Franceschi S., Montella M., Dal Maso L., Ramazzotti V.,and La Vecchia C. (2007) Risk Factors for Prostate Cancer in Men Aged Less Than 60 Years: A Case–Control Study from Italy. *UROLOGY* 70: 1121–1126.
89. Chesire D.R., Ewing C.M., Sauvageot J., Bova G.S., Isaacs W.B. (2000) Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer. *Prostate* 45:323–334.

90. Voeller H.J., Truica C.I., Gelmann E.P. (1998) Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 58:2520–2523.
91. Watanabe M., Kakiuchi H., Kato H., Shiraishi T., Yatani R., Sugimura T. and Nagao M. (1996) *APC* Gene Mutations in Human Prostate Cancer. *Jpn J Clin Oncol* 26: 77-81.
92. Koch A., Hrychyk A., Hartmann W., Waha A., Mikeska T., Waha A., Schüller U., Sörensen N., Berthold F., Goodyer C.G., Wiestler O.D., Birchmeier W., Behrens J., Pietsch T. (2007) Mutations of the Wnt antagonist *AXIN2* (Conductin) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas. *Int J Cancer.*;121(2):284-91.
93. Koch A., Weber N., Waha A., Hartmann W., Denkhaus D., Behrens J., Birchmeier W., von Schweinitz D., and Pietsch T. (2004) Mutations and elevated transcriptional activity of *conductin* (*AXIN2*) in hepatoblastomas. *J Pathol*; 204: 546–554.

EKLER

EK - 1

Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Tamponlar

- TAE Tamponu: 50XTAE için; Tris 242 gr
EDTA 37.2 gr
Glasial Asetik Asit 57.2 ml, 1000ml
bidistile su içerisinde çözdürülerek pH: 7.8'e ayarlandı ve otoklavda steril edildi.
- Yükleme Tamponu (Loadind Dye):

Formamid (%95)	9.5 ml
Xylen Cyanol (%0.5)	0.05 gr
Bromfenol Blue (%0.5)	0.05 gr

Bu üç kimyasal 15 ml'lik konik santrifüj tüpü içerisine konularak vortekste karıştırıldı. Kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

PCR Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

- dNTP solüsyonu: 100mM stok Adenin, Timin, Guanin, Citozin nükleotitlerinin her birinden 2µl alınarak 92µl distile su ile karıştırıldı. 2 mM'lık dNTP çalışma solüsyonu hazırlandı.
- Ekzon1 148 C>T polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan,

Forward primer: 128.8 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 46.1µl distile suya 3.9µl 148 C>T forward primeri eklenerek hazırlandı.

Reverse primeri: 119.6 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 45.8 µl distile suya 4.2µl 148 C>T reverse primeri eklenerek hazırlandı.

- Ekzon1 432T>C polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan,
Forward primer: 165.10 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 47µl distile suya 3µl 432T>C forward primeri eklenerek hazırlandı.
Reverse primeri: 131 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 46.2 µl distile suya 3.8µl 432T>C reverse primeri eklenerek hazırlandı.
- Ekzon5 1365A>G polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan,
Forward primer: 118.70 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 45.8µl distile suya 4.2µl 1365A>G forward primeri eklenerek hazırlandı.
Reverse primeri: 138.50 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 46.4 µl distile suya 3.6µl 1365A>G reverse primeri eklenerek hazırlandı.
- Ekzon5 1386C>T polimorfizminin belirlenmesinde kullanılan,
Forward primer: 141.10 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 46.5µl distile suya 3.5µl 1386C>T forward primeri eklenerek hazırlandı.
Reverse primeri: 172 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 50µl 10pmol olacak şekilde 47.1 µl distile suya 2.9µl 1386C>T reverse primeri eklenerek hazırlandı.

EK-2 : Hasta ve Kontrollere Ait Sorgu Formu

No :		
Tarih :		
Adı Soyadı :		
Cinsiyeti :		
Adres :		
Tel Ev :		
Cep :		
Doğum yeri :		
Doğum tarihi :		
Dedelerinin Doğum yeri :		
Mesleği :		
Mesleğinin özellikleri		
Sigara :	Evet	Hayır
Ne kadar zamandır içiyor		
Günlük kaç tane içiyor		
Alkol	Evet	Hayır
Ne kadar zamandır içiyor		
Günlük ne kadar içiyor		
Histopatolojik Tanı		
Ailede Ca Hikayesi		



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

SAYI : B.30.2.CUM.0.1.H.00.00/12
KONU : Etik Kurul Toplantısı

6 / 12 / 2001

Karar No: 8

Etik Kurul Kararları :

5- Türk popülasyonunda prostat kanseri riski....." adlı Dr.Yavuz SİLİĞ'e ait DPT projesi, yerel etik kurul kararında uygun olduğuna;

Karar verilmiştir.

Prof.Dr.Füsun GÜLTEKİN

Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ

Prof.dr.Handan AKER

Prof.Dr.Öge ÇETİNKAYA
(Toplantıda)

Doç.Dr.Tijen KAYA

Doç.Dr.Okay BULUT

Doç.Dr.Serdar SOYDAN