

149931

T.C.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BİR TÜRK POPULASYONUNDA CCR5 GENİ Δ32 ALELİNİN  
DAĞILIMI VE ÇEŞİTLİ KANSERLERLE İLİŞKİSİ**

**EMİRE YILMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2004**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Naci DEĞERLİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Bu çalışma jürimiz tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç Dr. Fevzi Bardakcı.....

Üye : Doç. Dr. Ergün Pınarbaşı.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Naci Değerli.....

**ONAY**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım

22.10.1/2004

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ**

**Prof. Dr. Rauf AMİROV.**

R. Muzayitov

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1-GİRİŞ	1
1.1- HIV'in Genel Özellikleri	1
1.1.1- HIV'in Evrimsel Farklılaşması	2
1.1.2- HIV'in Mikrobiyolojik Özellikleri	3
1.1.3- Viral Genetik Çeşitlilik	3
1.2- Viral Yaşam Döngüsü	4
1.3- HIV'in Hücrelere Girişi İle İlgili Hücre Yüzey Reseptörleri	8
1.4- Kemokin Reseptörler Nedir?	9
1.4.1- Kemokin Reseptörler ve HIV	9
1.4.1.1- Gp120 ve Koreseptörler Arasındaki Etkileşim	10
1.4.2- - Kemokin Reseptörlerdeki Genetik Varyasyonlar	12
1.4.2.1- <i>CCR5-Δ32</i> Varyantı ve AIDS	13
1.4.2.2- <i>CCR2-64I</i>	20
1.4.2.3- <i>CCR5</i> Promoter Aleller	21
1.4.2.4- <i>SDF1-3'A</i> (Stromal Derived Factor 1-3'A)	23
2- MATERYAL VE METOD	25
2.1- Örneklerin Alınması	25
2.2- Total Genomik DNA İzolasyonu	25
2.3- Genomik DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi	26
2.4- Gen Bölgesine Uygun Primer Seçimi	27
2.5- PZR Reaksiyonu	27
2.6- Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.7- Poliakrilamid jel Elektroforezi	29
2.8- İstatistiksel Analiz	29

3- BULGULAR	30
4- TARTIŞMA VE SONUÇ	40
5- KAYNAKLAR	49
6- ÖZGEÇMİŞ	53



**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****Bir Türk popülasyonunda CCR5 Geni  $\Delta 32$  Alelinin Dağılımı ve Çeşitli Kanserlerle İlişkisi****Emire YILMAZ****Cumhuriyet Üniversitesi****Fen bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Yrd. Doç. Dr. Naci Değerli**

Kemokin reseptör CCR5, HIV-1'in M-tropik türleri için temel koreseptördür. CCR5'in  $\Delta 32$  mutant alelinin, homozigot bireylerde HIV-1 enfeksiyonuna karşı güçlü bir direnç sağladığı gösterilmiştir. CCR5 geninin kodlama bölgesi 1114 baz çifti uzunluğundadır ve kromozom 3p21 üzerinde yer almaktadır.

Bu mutasyonun Avrupalılarda, siyahlar ve Asyalılara göre daha yüksek sıklıkta olması ve popülasyonun coğrafik yerleşimine göre sıklığının değişmesi, bunun diğer popülasyonlardaki dağılımını belirlemeye yönelik bir ilgi oluşturmuştur. Bu mutant alelin sıklığı beyaz ırkta yaklaşık %10'luk bir oranla nispeten yaygındır ve beyaz popülasyondaki homozigot genotip oranı %1 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada  $\Delta 32$  alelinin Türkiye'deki sıklığını ve bu alelin bazı kanser türleriyle olan ilişkisini belirlemeyi amaçladık. Mevcut çalışmada, polimeraz zincir reaksiyonu teknikleri kullanılarak, Türkiye'nin Sivas ilinde yaşayan 267 sağlıklı (ciddi bir hastalığı olmayan) ve 20 beyin, 39 meme, 34 larinks ve 30 tiroid kanserli bireydeki CCR5- $\Delta 32$  alel sıklığını belirledik. Örnekler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden temin edilmiştir. CCR5/CCR5 normal homozigot bireyler için %95.6'lık (373/390) bir sıklık ve CCR5/CCR5- $\Delta 32$  heterozigot bireyler için %4.35'lik (17/390) bir sıklık saptandı. Bu popülasyonda CCR5 yabancı alel sıklığı %97.8 (763/790), mutant alel sıklığı ise %2.18 (17/780)'dir. Bununla birlikte test edilen bireylerde hiçbir CCR5- $\Delta 32$  homozigot birey saptanamamıştır.

Türkiye ile ilgili sonuçlarımız (0.0218), Batı Avrupa'da yapılmış olan ve kuzeyden güneye doğru  $\Delta 32$  sıklığında bir azalma olduğunu gösteren bulgularla uyumludur. Test edilen gruplarda alel ve genotipik sıklıklardaki farklılık, bazı kanserli doku ve non-infekte bireyler için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Gözlenen genotipik sıklıklar ile beklenen sıklıklar aynı olduğundan, test edilen popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinden bir sapma göstermemektedir ( $p < 0.159$ ).

**Anahtar Kelimeler:** CCR5, CCR5- $\Delta 32$ , HIV-1, genetik polimorfizm ve Türk

**SUMMARY****MSc THESIS****The  $\Delta 32$  Allele Distribution of The *CCR5* Gene in a Turkish Population and Its Relationships with Several Cancers****EMİRE YILMAZ****Cumhuriyet University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Department of Biology****Supervisor: Ass. Prof. Naci Değerli**

The chemokine receptor *CCR5* constitutes the major co receptor for the M-tropic strains of HIV-1. A mutant allele of the *CCR5* gene named  $\Delta 32$  was shown to confer a strong resistance to homozygote individuals against HIV-1 infection. The entire coding region of *CCR5* gene is 1114 base pair long and located on the chromosome 3p21.

Since the frequency of this mutation is higher in Europeans than in Blacks and Asians, and its frequency varies with the geographic location of a population, a great interest has been generated for determination of its distribution in other populations. The frequency of this mutant allele is relatively common in Caucasian with ratio of approximately 10 % and the frequency of homozygote was reported as 1 per cent.

In the present study, we proposed to determine the frequency of  $\Delta 32$  allele in Turkey and its relationships with the several cancer types. We have determined the allelic frequency of *CCR5- $\Delta 32$* , in 267 healthy and 20 brain, 39 breast, 34 larynx and 30 thyroid cancerous individuals living in Sivas, Turkey, using polymerase chain reaction. The samples were obtained from The Medical Hospital of Cumhuriyet University. A 95.6 % (373/390) frequency of normal *CCR5/CCR5* homozygous individuals and a 4.35 % (17/390) frequency of *CCR5/CCR5- $\Delta 32$*  heterozygous individuals were determined. The frequency of the *CCR5* wild allele is 97.8 % (763/780) and mutant allele 2.18 % (17/780) in this population. However, no homozygous *CCR5- $\Delta 32$*  individual was detected among the individuals examined.

Since a general north to south downhill gradient of  $\Delta 32$  frequencies was reported in west Europe, our present result for Turkey (2.18 %) is correlated with these findings. The differences in the allelic and genotypic frequencies among the tested groups found not statistically significant for some cancerous and non-infected individuals. Since the observed genotypic frequencies are similar to the expected genotypic ones, tested population did not show a significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium ( $p < 0.159$ ).

**Key Words:** *CCR5*, *CCR5- $\Delta 32$* , HIV-1, genetic polymorphism and Turks

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bilgi ve birikimi ile her türlü desteği veren ve her konuda yardımcı olan danışmanım sayın Yard. Doç. Dr. Naci DEĞERLİ'ye teşekkür ederim.

Desteğini ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Fevzi BARDAKCI'ya teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin hazırlanması sırasında her türlü sıkıntımı paylaşarak her zaman yanımda olan sevgili eşim Cebrail YILMAZ'a teşekkür ediyorum.

**Emire YILMAZ**

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

- Şekil 1.** HIV'in dünya üzerindeki genel coğrafik dağılımı 2
- Şekil 2.** a- HIV'in genel yapısı 5  
b- HIV'in yaşam döngüsü
- Şekil 3.** HIV genomunun şematik görünümü 7
- Şekil 4.** İnsan kromozomu 3p21 üzerinde kemokin reseptörlerin gen haritası. *CCR2-62I*, *CCR5Δ32* ve *CCR5* promotör bölgesinin tek nükleotid varyantları, nükleotid pozisyonlarıyla gösterilmiştir. 14
- Şekil 5.** *CCR5*'in mutant formunun yapısı. 15  
a- İşlevsel olmayan  $\Delta ccr5$  proteinin aminoasit dizisi  
b- Delesyonlu bölgeyi çevreleyen *CCR5* geninin nükleotid dizisi
- Şekil 6-** PZR ile birey genotiplemesi. Homozigot yabancı tip *CCR5* alleli, mutant *CCR5Δ32* aleli ve heterozigot *CCR5* bireyler için PZR amplifikasyonu ve *EcoRI* kesimi sonucunda gözlenen otoradyografi 16
- Şekil 7.** PAGE (% 8'lik) sonucunda moleküler standart ile birlikte koşturulan yabancı genotipe (*CCR5+/+*) sahip ve mutant genotipi (*CCR5+Δ32*) içeren bazı heterozigot bant örnekleri 31



**TABLO DİZİNİ**

<b>Tablo 1.</b> HIV genomunda yer alan genler	7
<b>Tablo 2.</b> Değişik populasyonlarda CCR5 genotiplerinde gözlenen çeşitlilik	19
<b>Tablo 3.</b> <i>CCR5+Δ32</i> genotip ve alel sıklığının 390 bireyde ve yapılan alt gruplamalarda elde edilen sonuçlara göre bireylerin dağılım şekilleri	32
<b>Tablo 4.</b> Tüm bireyleri kapsayan populasyonun alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (390 birey)	33
<b>Tablo 5.</b> Normal birey populasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (267 birey)	34
<b>Tablo 6.</b> Meme kanser dokulu birey populasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (39 birey)	35
<b>Tablo 7.</b> Larinks kanser dokulu birey populasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (34 birey)	36
<b>Tablo 8.</b> ,Tiroid kanserli birey populasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (30 birey)	37
<b>Tablo 9.</b> Beyin kanserli birey populasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (20 birey)	38

## 1-GİRİŞ

### 1.1-HIV'in Genel Özellikleri

İnsan immün yetmezlik virüsleri (HIV), kazanılmış immün yetmezlik sendromuna (AIDS) neden olan etkenlerdir. Retroviridae ailesinden Lentivirinae alt ailesinde yer alırlar (Yılmaz ve Özkan, 2002).

AIDS ilk defa 1981 yılında, halk sağlığı kurumlarında, nadir görülen enfeksiyonlar arasında not edilmiştir. Kısa bir süre sonra bunun altında yatan nedenin, gerçekte genel bir immün yetmezlik olduğu anlaşılmıştır. Böylece vücutta normalde yüksek düzeyde etkili olan savunmalar, yaygın olarak maruz kalınan patojenlerin yaptığı enfeksiyonları önleyememektedir (Holmes, 2000).

1980'lerin ortalarında, insan toplumlarında dolanan iki farklı HIV olduğu ortaya çıkarılmıştır. Enfeksiyonların büyük çoğunluğu, artan bir küresel dağılım gösteren HIV-1 tarafından oluşturulurken, Batı Afrika'nın yerli insanların küçük bir kısmında ya da orijin olarak bu bölgeden olanlarda gözlenen enfeksiyonlar, akraba bir virüs olan HIV-2 tarafından oluşturulur. HIV-2, AIDS'e neden olan bir ajan olsa da HIV-1'den daha az bulaşıcı gibi görünmekte, daha yavaş hızda yayılmakta ve hastaların tam bir hastalık tablosuna erişmesi için daha uzun bir süreç gerekmektedir (Holmes, 2000). HIV-1 daha çok Afrika, Asya, Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika'da yaygınlık göstermektedir.

2000 yılı tahminlerine göre 16 milyondan fazla insan HIV enfeksiyonundan ölmüştür. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2000 yılı sonu tahminlerine göre şimdiye kadar dünyada 34.7 milyon erişkin ve 1.4 milyon çocuk olmak üzere toplam 36.1 milyon kişi HIV ile enfektedir (Yılmaz ve Özkan, 2002).

HIV ile enfekte insanların yaklaşık %70'i Sahra-Altı Afrika yerleşimli olup, erişkinlerdeki ortalama yaygınlık %8'e ulaşmaktadır. Afrika'dan başka en çok etkilenen bölge Güney ve Güney-Doğu Asya olup yaklaşık 6 milyon enfekte insan bu bölgede yaşamaktadır (Şekil 1). Batı Avrupa'da AIDS epidemisi dünyanın diğer bölgelerine oranla çok daha az ciddi olsa da, bu bölgede beş yüz bin HIV-enfekte kişinin yaşadığı tahmin edilmektedir (Holmes, 2000)



**Şekil-1** HIV'in dünya üzerindeki genel coğrafik dağılımı (Freeman ve Herron, 1999)

### 1.1.1- HIV'in Evrimsel Farklılaşması

İnsan ve diğer primatların bağışıklık yetmezlik virüsleri arasında önemli benzerlikler vardır. Bu virüslerin ortak bir atadan farklılaştığı ve *Cercopithecus* türü maymunlardan diğer primatlara ve onlardan da yakın bir geçmişte insanlara yayıldığı öne sürülmektedir (Abacıoğlu, 1998). Nitekim, HIV-1'in şempanze virüslerinden (Simian Immünodeficiency Virus - SIVcpz), HIV-2'nin ise isli maymun virüslerinden (SIVsm) köken aldığını gösteren epidemiyolojik ve moleküler genetik kanıtlar bulunmaktadır (Holmes, 2000). HIV-1 ve HIV-2 arasında nükleotid düzeyindeki farklılık, olasılıkla bu virüslerin farklı maymun türlerinden köken alması ile ilişkilidir. Her iki tip te AIDS'e yol açmakla birlikte, HIV-1 ve HIV-2 arasında biyolojik özellikler ve epidemiyolojik açıdan da farklılıklar vardır. HIV-1'de *vpu* geni bulunurken, HIV-2'de bu gen bulunmamaktadır. HIV-2'de bulunan *vpx* ve *vpr* genleri ise tip 1 virüslerde bulunmamaktadır. HIV-2 ile enfekte bireylerde klinik latent dönem daha uzun ve

bu dönemde dolaşımdaki viral yük daha düşüktür. HIV-2 ile vertikal ve horizontal bulaşma riskleri de daha azdır. Bu bulgular, HIV-2'nin virulansının daha düşük olduğunu göstermektedir. Diğer yandan HIV-1 tüm dünyada yaygın iken, HIV-2 çoğunlukla Batı Afrika ülkelerinde yaşayanlarda saptanmaktadır (Holmes, 2000). Viral geçişlerin mantıklı bir açıklaması vardır: İslî maymunlar zaman zaman beslenen ve bazen de bu bölgelerde yemek olarak yenilen Batı Afrika maymun türleridir ve HIV-2'nin coğrafik dağılımı Batı Afrika'dan köken aldığını kuvvetle ileri sürmektedir. Sonuç olarak eldeki tüm kanıtlar, HIV-2'nin zoonotik (hayvandan insana geçen) bir hastalık olarak ve doğal yoldan enfekte kaynak popülasyon olarak isli maymunlarından aktarıldığını göstermektedir (Holmes, 2000; Freeman ve Herron, 1999).

HIV-1 için de benzer bir mekanizma ileri sürülmüştür. Şempanzelerin avlanıyor olması viral geçiş açısından bir fikir sunmaktadır. Bununla birlikte sorun, doğadaki vahşi ya da evcil hayvanlarda nadir görülmesine bağlı olarak şempanzelerde görülen düşük virüs prevelansıdır. Bu şekilde nadir enfekte olan bir kaynak popülasyon, hem insanlar hem de şempanzelerin kendi lentivirüslerini bağımsız olarak ve halen bilinmeyen üçüncü bir kaynaktan edindikleri anlamına gelebilir. Fakat bu konuda yapılan çalışmalar herhangi bir sonuç sağlamamıştır (Holmes, 2000; Freeman ve Herron, 1999).

### **1.1.2 – HIV'in Mikrobiyolojik Özellikleri**

HIV, 110 nm çapında sferik, koni şekilli ve nükleokapsitin iki tabakalı lipit zarfla çevrili olduğu bir virüstür (Şekil 2-a). Zarf üzerinde 72 adet çıkıntı yer alır. Bu uzantılar iki glikoproteinden oluşur. Bunlara gp120 ve gp41 denir. Gp41 iki tabakalı lipit içinde yer alan transmembran glikoproteinidir. Gp120 ise gp41'e bağlıdır ve virüsün yüzeyinde yer alır. Ana fonksiyonu uygun hücre yüzey reseptörlerini taşıyan hücreleri bağlamaktır (Yılmaz ve Özkan, 2002; Campell, 1997).

### **1.1.3 – Viral Genetik Çeşitlilik**

HIV-1 ve HIV-2, bir virionun içinde, yaklaşık 11 kb uzunluğunda iki tek zincirli RNA genomunun bulunmasıyla karakterize (pseudohaploid) olan retrovirüslerdir. Viral replikasyon, RNA kopyasından provirüs olarak bilinen bir

DNA kopyası oluşturan reverz transkriptaz (RT) enzimine ihtiyaç duyar (Holmes, 2000).

HIV, büyük bir replikasyon gücüne sahiptir ve buna bağlı olarak çok hızlı mutasyon üretir. RT'nin yüksek düzeyde hata yapması sonucu, genomun her replikasyonu esnasında bir hata oluşur. Mutasyon ve replikasyon sürelerinin hızlı olması, HIV'deki nükleotid değişim hızının, insan genlerindeki 1 milyon kat daha fazla olduğunu gösterir. Bu hızlı evrimsel sürecin önemli genetik sonucu bireysel antiviral ilaçlara direncin aylar içinde kazanılabilmesi, böylece tedavi olanaklarının ciddi şekilde çökmesi ve küresel olarak etkili ilaç üretiminin oldukça zorlaşmasıdır (Holmes, 2000).

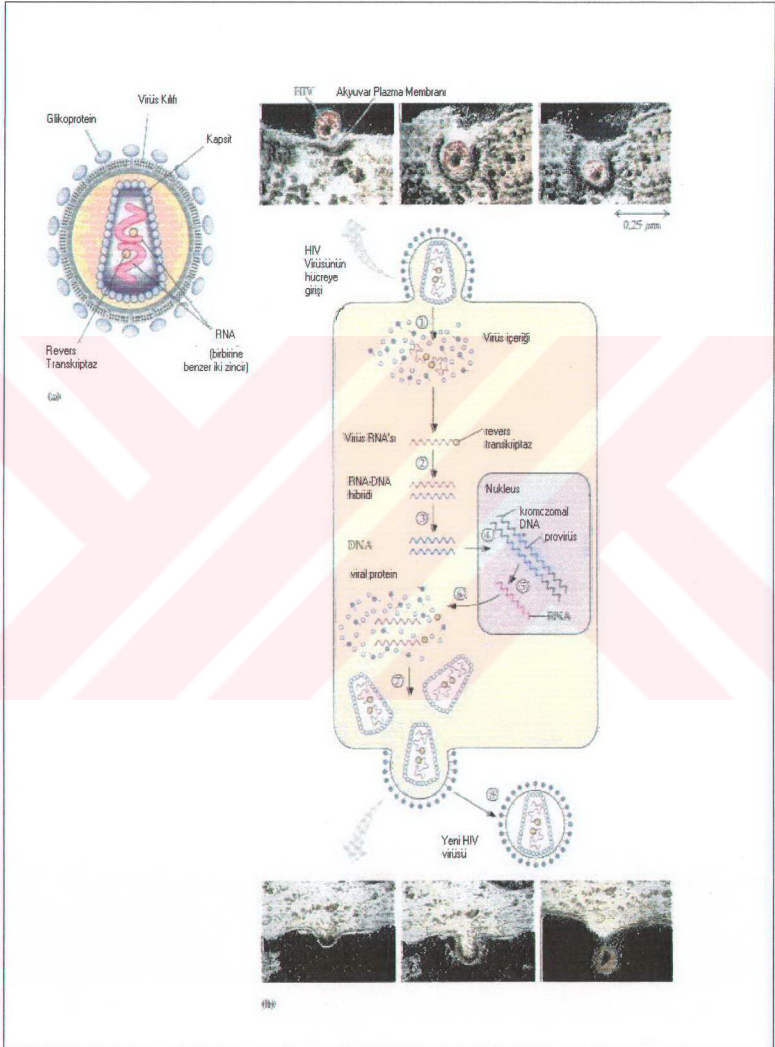
Hızlı mutasyon ve rekombinasyon nedeniyle çok değişken olan HIV'in farklı grup ve alt tipleri vardır. Bugüne kadar üç HIV-1 grubu tanımlanmıştır; bunlar "M", "O" ve "N" dir. Bunların önemini farklı coğrafik dağılımları belirler. M grubu endemikliğine göre A'dan K'ya kadar 11 alt tipe ayrılmıştır. O ve N gruplarında böyle bir alt tip ayırımı bulunmamıştır.

HIV-2 için de filogenetik gruplar tanımlanmıştır (alt tipler A'dan G'e kadar çeşitlilik arz eder). Bunların hepsi Batı Afrika'da bulunmakta ve az oranda coğrafik farklılaşma göstermektedirler (Holmes, 2000).

## 1.2 – Viral Yaşam Döngüsü

HIV, hücre yüzeylerinde çeşitli reseptörlerle etkileşir. Tercihli olarak, makrofajlar ve T lenfositler gibi CD4+ reseptörü taşıyan hücreleri enfekte eder. Enfekte ettiği hücre tipine göre türler birbirinden ayrılmaktadır. Makrofajlar ve primer T hücrelerinde replike olan HIV türleri M-tropik türler, sadece T hücrelerinde replike olabilen türler ise T-tropik türlerdir (Samson ve Ark., 1996).

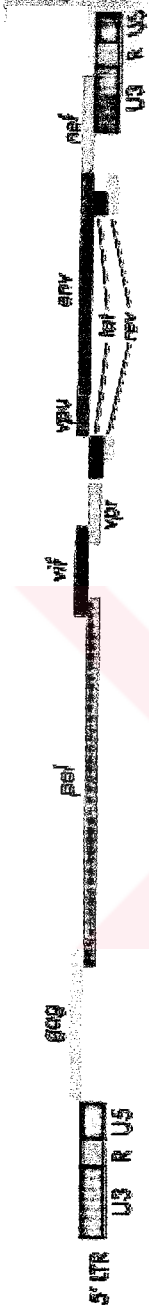
HIV'in yaşam döngüsü viral tutunmayı ve konak hücreye girişi kapsar. Bunu reverz transkripsiyon ve provirüsün konak genomuna entegrasyonu takip eder. Enfekte hücreler aktive olduktan sonra viral transkripsiyon, translasyon, virion oluşumu en son olarak tomurcuklanma (Şekil 2-b) ile yaşam döngüsü tamamlanır (Campell, 1997).



Şekil-2. a- HIV'in genel yapısı b- HIV'in yaşam döngüsü (Campell, 1997)

Enfekte konaklarda günde  $10^{10}$  virion üretilir ve virionların plazmadaki yarı ömürleri yaklaşık olarak 8 saattir. HIV'in yaşam döngüsünde ilk aşama, virüsün hücre yüzeyine tutunduğu aşamadır. Lipit tabaka içinde gömülü olan gp120 proteini ile virüs, hedef hücre yüzeyindeki reseptörü bağlar (Şekil 2-b). Hücre yüzeyine bağlanma işlemi, HIV'in hedef hücre yüzeyindeki ikinci bir proteine (koreseptör) tutunması ile tamamlanır. Sonraki aşamada, HIV'in lipit zarfı konak hücre membranı ile kaynaşır ve virüsün kor denilen kısmı konak hücre stoplazmasına aktarılır. HIV-RNA genomu, reverz transkriptaz enzimi aracılığıyla çift zincirli DNA'ya çevrilir. Bu sentez, konak hücrenin ATP ve nükleotidleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bundan sonra viral DNA konak hücre DNA'sına entegre olur ve konak hücrenin RNA polimeraz II enzimi tarafından transkribe edilir. Oluşan viral mRNA konak hücrenin ribozomları tarafından translasyona tabi tutularak proteinler üretilir. Viral proteinler ve RNA genom kopyaları sentezlendikten sonra konak hücre stoplazmasında yeni virionlar oluşur. Virionların hücre membranından tomurcuklanarak hücre dışına salınması ile hücre döngüsü tamamlanmış olur.

HIV, regülâtör genler içeren 11 kb uzunluğunda kompleks bir genoma sahiptir (Şekil 3). HIV genomik RNA'sının her iki ucunda "uzun terminal tekrarlar-long terminal repeats" (LTRs) yer alır. LTR dizileri farklı hücresel transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasında kullanılan "promotör", "enhancer" ve diğer gen dizilerini içerir. Genomun 5' ucunda bulunan *gag* geni öncül bir poliproteini kodlar (Pr55) ve bu protein dört küçük yapısal protein oluşturmak üzere kesilir. Bu kesim işlemi yapan proteaz, *pol* geni tarafından kodlanır ve ikinci bir uzun poliprotein bir parçasıdır (Pr160). Pr160, *gag-pol*RNA tarafından üretilir. Reverz transkriptaz da bu proteinin bir parçasıdır. Üçüncü önemli gen bölgesi *env*, gp160 denilen bir proteini kodlar (Tablo 1). Bu, glikozillenmiş bir proteindir ve daha sonra konak hücre proteazı tarafından iki küçük moleküle kesilir: gp41 ve gp120. Böylece *gag* ve *pol* tarafından kodlanan proteinler genomik RNA'nın çevresini sarar ve bu yapı hücre yüzeyinden tomurcuklanır. Tomurcuklanma esnasında hücre membranından lipit bir tabaka ve gp120 ile gp41 proteinlerini kazanır (Yılmaz ve Özkan, 2002).



**Tablo1.** HIV genomunda yer alan genler  
(Watson ve Ark., 1992)

<i>Env</i>	Virüs zarf proteinlerini kodlar
<i>Gag</i>	Cor proteinlerini kodlar
<i>Nef</i>	Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir
<i>Pol</i>	Virial enzimleri kodlar
<i>Rev</i>	RNA'nın stoplazmaya salınımını sağlayan Rev proteinini kodlar
<i>Tat</i>	Tat proteinini kodlar
<i>Vif</i>	Virüs partiküllerinin infektivitesini belirler
<i>Vpr</i>	Transkripsiyonel aktivatörü kodlar
<i>Vpu</i>	Virial tomurcuklanmada rol oynar

**Şekil-3** HIV genomunun şematik görünümü (Watson ve Ark., 1992)



HIV enfeksiyonunda büyük rol oynayan üç temel gen vardır. Bunlar, *tat*, *rev* ve *nef* genleridir. *Tat* geni, Tat isimli bir proteini kodlar ve bu protein HIV genlerinin yüksek düzeyde ekspresyonunu teşvik eder. *Rev* geni, enfeksiyonda kritik rol oynayan *Rev* proteinini kodlar. Bu protein, HIV-RNA'nın nukleustan stoplazmaya hareketini düzenler. *Nef* geninin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir, ama enfeksiyonun yüksek düzeyde devam etmesini sağladığı düşünülmektedir (Yılmaz ve Özkan, 2002).

### 1.3 - HIV'in Hücrelere Girişi İle İlgili Hücre Yüzey Reseptörleri

HIV, hücre yüzeylerinde çeşitli reseptörlerle etkileşir. CD4 ve koreseptör olmak üzere iki reseptör türü viral ve hücrel membranın kaynaşmasını tetiklemek amacıyla sırayla etki eder ve virüsün hücreye girişinde rol alır.

*In vivo* ortamda HIV tarafından hedeflenen ana hücreler T-hücreleri, makrofajlar ve muhtemelen dendritik hücrelerdir. Bu hücrel tercih, temel olarak hücre yüzeyine tutunmak ve hücrelere girmek amacıyla HIV için gerekli olan hücre yüzey reseptörleri tarafından belirlenir. Genelde CD4 ve bir koreseptör olmak üzere iki farklı reseptör, HIV'in hücreleri etkili şekilde enfekte etmesinde önemlidir (Clapham ve McKnight, 2001).

HIV hücrelere girmek için CD4 ve bir 7-transmembran (7Tm) koreseptörüyle etkileşir. Virüs partiküllerinin yüzeyindeki zarf glikoprotein çıkıntıları, transmembran gp41'e non-kovalent olarak bağlı olan dış yüzey gp120'i kapsar. CD4'ün gp120'e bağlanması, koreseptör için bağlanma bölgesi oluşturmak üzere yapısal bir değişimi tetikler. Koreseptör bağlandığı zaman daha ileri düzeyde bir yapısal düzenleme başlamış olur. Bu değişimler temel olarak gp41'de oluşur. Sonuçta viral ve hücrel membranların kaynaşması tetiklenmiş olur.

Ondörtten fazla 7Tm reseptörünün, HIV için potansiyel koreseptörler olduğu belirlenmiştir. Bu reseptörler kemokin reseptör ailesinin üyeleridir. CCR5 ve CXCR4 en temel koreseptörlerdir. CCR5, *in vivo* ortamda kullanılan asıl koreseptördür. Bununla birlikte başka bir koreseptör olan CXCR4'ü kullanan varyantlar da mevcuttur. Alternatif koreseptörleri kendi yararı için kullanma kapasitesi, HIV türleri için avantaj sağlamak ve daha geniş bir hücre tropizmi

sunmaktadır. Bununla birlikte son kanıtlar CCR5 veya CXCR4 dışındaki koreseptörlerin *in vivo* kullanımının kısıtlanmış olduğunu gösterir (Clapham ve McKnight, 2001).

#### 1.4 – Kemokin Reseptörler Nedir?

Kemokin reseptörler fizyolojik olarak T-hücrelerinin ve makrofajların yangı olayının meydana geldiği bölgeye göç etmesine aracılık ederler (Liu ve Ark, 1996). Kemokin reseptörler, kemokin denilen küçük peptidleri bağlayan hücre yüzey proteinleridir. Kemokinler, tarihsel olarak korunmuş olan (konserved) sistein amino asitlerin yerleşim yerine ve sayısına göre üç grup altında sınıflandırılabilirler: C, CC ve CXC. Kemokin reseptörler, bağladıkları kemokin ligandlarına göre gruplandırılırlar: CC, CXC ya da her ikisi. Bazı reseptörler ligand bağlama açısından seçici iken, bazılarının bu tip bir özelliği yoktur. Reseptörler, hematopoietik (kanın şekilli elamanları) ve diğer hücrelerde geniş oranda dağılmışlardır. Çeşitli insan kemokin reseptörleri gen dizileri ve ürettikleri protein yapılarının benzerliğine göre sınıflandırılmıştır (McNicholl ve Ark., 1997).

C-C ya da  $\beta$  kemokin reseptörler, heterotrimerik (üç farklı birimin birlikteliği) GTP-bağlayan protein bağlantılı reseptör ailesinde yer alırlar. C-C kemokin reseptörler yedi transmembran domain içerirler ve tipik olarak intron içermezler (Dean ve Ark., 1996). Reseptörlerin hücre içi kısımlar hücre sinyalinde rol alırken, hücre dışı kısımlar kemokin bağlamada rol alırlar. Reseptör-ligand etkileşimine G-protein bağlantılı etkileşimler aracılık eder (McNicholl ve Ark., 1997). Bazı kemokin reseptörler, enfeksiyöz hastalıklara eğilim ya da patojenezde önemli bir rol alırlar. Çeşitli CC ya da CXC reseptörleri, HIV-1 ve HIV-2 tarafından giriş kofaktörü olarak kullanılırlar (McNicholl ve Ark., 1997).

##### 1.4.1 – Kemokin Reseptörler ve HIV

HIV'in hücrelere girişi ile ilgili en büyük koreseptörler CCR5 ve CXCR4'tür. Bütün HIV-1 izolatları bunlardan birini ya da her ikisini birden kullanabilirler (Clapham ve McKnight, 2001). Farklı reseptör tercihinine sahip olan HIV-1 izolatları, *in vivo* olarak farklı enfeksiyon aşamalarıyla ilişkilidirler. Primer HIV enfeksiyonlarının % 90'ı veya daha fazlasından sorumlu olan M-tropik ya da

R-5 izolatları denilen virüsler, koreseptör olarak bir kemokin reseptör olan CCR5'i kullanırlar. Alt tip B olarak bilinen HIV virüsleri ise koreseptör olarak CXCR4'ü kullanırlar (O'Brien ve Moore, 2000).

#### 1.4.1.1 – Gp120 ve Koreseptörler Arasındaki Etkileşim

CD4 bağlanma bölgesini şekillendiren gp120 üzerindeki aminoasitlerin bazıları değişkendir ve bu amino asit dizi atıkları ile ilgili olarak, CD4 etkileşiminde, yan zincirlerden çok peptid omurgası rol oynar. Gp120 üzerindeki koreseptör bağlanma bölgesi, genelde CD4 bağlanana kadar tam olarak açığa çıkarılmaz (Clapham ve McKnight, 2001).

Gp120'nin V1, V2 ve V3 bölgeleri, CCR5 ya da CXCR4 ile etkileşir. Bu bölgeler virüsün makrofajlar ve T-lenfositlere girişinden sorumludur (Cunnigham, 2000). Koreseptörlerle etkileşimde rol alan gp120 bölgesinin, çıkıntılı ve değişken V1-V2 ile V3 loopları arasında bulunan nispeten korunmuş "bridging sheet-köprü kurucu levha" içerdiği düşünülmektedir. V3 loop'unun hücre tropizminin en büyük belirleyicisi olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir. V3'teki pozitif yüklü aminoasitler, CXCR4 kullanımı ile ilişkilidir. V1-V2 looplarının, koreseptör etkileşimindeki rolü net değildir. Çünkü V1-V2'ye sahip olmayan HIV-1 mutantları da enfekte edici özelliktedir. Ayrıca benzer şekilde, rekombinant olarak V1-V2'si silinmiş gp120 de koreseptörleri bağlar. Bununla birlikte V1 ve V2, hem hücre tropizmini hem de kullanılan koreseptörleri etkiler (Clapham ve McKnight, 2001).

Yedi transmembran bölge ile çevrelenmiş merkezi bir por içeren kemokin reseptörler, hücre membranında çubuk şeklinde yer alırlar. Hücre yüzeyinde dört bölge oluşturulmuştur: Bunlar N-terminal ve üç hücreler arası loop (E1, E2 ve E3). Koreseptörler, hücre yüzeylerinde ve farklı hücre tiplerinde farklı konformasyonlar kazanırlar ve bu HIV enfeksiyonunu destekleme yeteneklerini etkiler. Koreseptörler üzerinde N-terminal ve E2 etrafındaki iki bölge, HIV'in hücre içine girişinde rol alır. Mutajenez çalışmalarından elde edilen bilgiler ışığında, CCR5'in N-terminal bölgesinin, CCR5 kullanan (R5) HIV-1 ile ilgili koreseptör aktivitesi açısından önemli olduğu gösterilmiştir (Clapham ve McKnight, 2001).

CXCR4 kullanan X4 türleri için E2 önemlidir ve CXCR4'ün N-terminalinin delesyonu tüm türlerde değil ama bazı türlerde ufak etkilere sahiptir. Böylece X4 virüs girişini, CXCR4'ün E2 loopu kadar kimerik (farklı kaynaklardan alt ünitelerin dizi karışımından ibaret protein) koreseptörler de destekler (Clapham ve McKnight, 2001).

Gp120-koreseptör etkileşimlerinde, elektrostatik yük etkileşimleri de rol oynar. CCR5'in, koreseptör fonksiyonu için önemli olan N-terminal bölgesi, dört sülfatlanmış tirozin atığı ve üç aminoasit nedeniyle negatif olarak yüklüdür. Bu negatif yüklü atıklar, gp120 üzerindeki köprü kurucu levha etrafında ve bu levhada yer alan pozitif aminoasitlerle etkileşmeyi sağlayabilir. Ayrıca, X4 türlerinin V3 loopları yüksek düzeyde pozitif yüklü iken, CXCR4'ün E2 kısmı, beş negatif yüklü aminoasit içerir ve bu zıt yüklü yüzeyler muhtemelen karşılıklı olarak etkileşirler. Bununla birlikte, beş asidik yüklü atığın hepsinin mutajenezi, HIV enfeksiyonunu tamamen yok etmez. Böylece CCR5'in N-terminalinde ve CXCR4'ün E2'sindeki negatif yüklü atık unsurlar sırasıyla R5 ve X4 türlerinin elektrostatik etkileşimi sonucu, gp120-koreseptör etkileşimini artırır ama etkileşimin spesifikliğini belirlemez (Clapham ve McKnight, 2001).

Gp120 üzerindeki V3 loopu, köprü kurucu levha ve V1-V2 loopundaki bölgeler, koreseptörün N-terminal ve E2 bölgeleri ile en az iki spesifik etkileşime katkıda bulunurlar. Her bölgedeki "yüksek affinite" etkileşimi, enfeksiyonun tetiklenmesini gerektirmeyebilir ve buda koreseptör etkileşiminin spesifikliğinin, neden N-terminal ya da E2 ile düzenlenmediğini açıklar. Özetle, farklı virüs türleri, hücreyi tanıma ve hücreyle kaynaşma için kendi yararlarına kullandıkları koreseptörlerin spesifik aminoasitleri ve bölgeleri açısından oldukça farklılık gösterirler. HIV'in etkileşimlerinde yer alan zarf ve koreseptör atıkları değiştirme kapasitesi, immün kaçışın en temel mekanizması olacaktır (Clapham ve McKnight, 2001).

HIV bulaşımını ya da hastalık sürecini etkileyen CCR5 genindeki çeşitli polimorfizmler, bu koreseptörlerin *in vivo* önemine ışık tutmuştur. En önemli polimorfizm, hücre yüzeyine çıkamayan kusurlu bir CCR5 ürünü ile sonuçlanan, kodlama bölgesindeki 32 baz çiftinin (CCR5 Δ32) delesyonudur. Böylece

homozigotlar CCR5-negatiftir. Cinsel ilişki, kan teması ya da anneden çocuğa gibi, hangi tür bulaşma riski olursa olsun HIV enfeksiyonuna karşı olan dirençleri, CCR5'in bulaşma aşamasında önemli bir rolü olduğunu gösterir. Bununla birlikte, bulaşma sadece CCR5 yolunu izlemez ve tanımlanmış olan HIV pozitif birkaç CCR5 homozigot, CXCR4 kullanan virüsleri taşıyıcı gibi görünmektedirler. Kusurlu CCR5  $\Delta 32$  gen ürünü, endoplazmik retikulumda yabancı tip CCR5 içeren oligomerler formunda olabilir ve bu yüzden heterozigotların, hücre yüzeyindeki CCR5'in %50'den fazlasını kaybetme olasılığı vardır. HIV pozitif olan CCR5  $\Delta 32$  içeren heterozigot bireyler, HIV patojenezinde, daha yavaş bir hastalık seyri gösterirler. Dikkat çekici CXCR4 polimorfizmlerine raslanmamıştır. Bunun nedeni muhtemelen CXCR4'ün, gelişimde temel bir ihtiyaç olması ve "nakavt" fenotipin farelerde ölümcül olmasıdır. CXCR4 kullanan virüslerin çıkışıyla ilişkili olarak CD4+ hücrelerin hızla kaybedilmesi ve daha hızlı hastalık seyri, bazı bireylerde CXCR4'ün *in vivo* önemli bir rolünü gösterir. *In vivo* ortamda, HIV-1 replikasyonu ile ilgili diğer koreseptörlerin önemi ve patogenezi belirli değildir. Bununla birlikte son kanıtlar, CXCR6'nın *in vitro* ortamda primer T hücrelerinin alt setinin enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu ve CCR8'in timositlerin enfeksiyonunu desteklediğini göstermiştir. Bu koreseptörlerin bu tip primer hücre kültürlerinin enfeksiyonunu destekleme kapasitesi *in vivo* ortamda muhtemelen bir rol açısından daha güçlü bir destek sağlar (Clapham ve McKnight, 2001).

#### 1.4.2 – Kemokin Reseptörlerdeki Genetik Varyasyonlar (Polimorfizm)

HIV koreseptörlerini (CD4, CCR5, CXCR4), ligandlarını ve az etkili olan diğer kemokin reseptörlerini belirleyen kodlama ve regülatör genlerde yaygın genetik mutasyonlar olduğu keşfedilmiştir. Bu genetik polimorfizm, klinik sonuçlarla ilişkili olan populasyon genetik dengesindeki bozulmalar açısından, AIDS epidemiyolojik gruplarında değerlendirilmiştir. AIDS epidemiyolojik gruplarında çoklu klinik parametreler değiştiği halde, genetik polimorfizm açısından potansiyel etki bölgesi olarak beş klinik noktaya odaklanılmıştır. Böylece genetik ilişkiler;

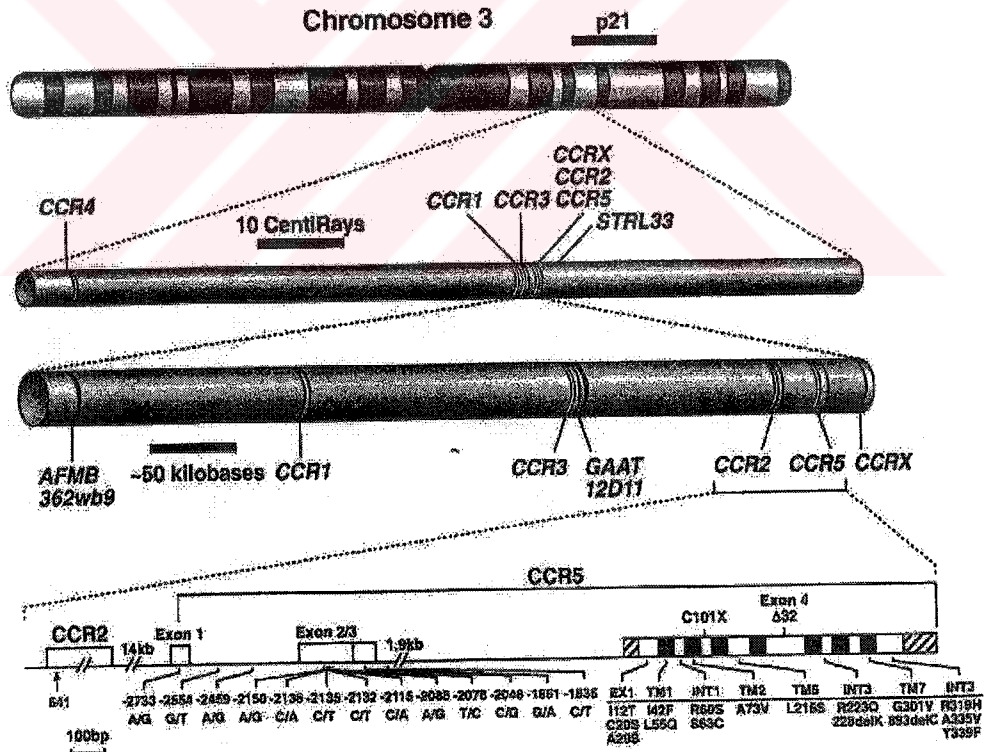
- (1) HIV'e maruz kalmış kişilerin, enfekte mi olduklarına ya da enfeksiyona dirençli mi olduklarına göre,
- (2) enfeksiyondan sonra klinik AIDS gelişim hızına;
- (3) gerçek AIDS'i tanımlayan hastalık gelişimine (Kaposi sarkomu, *Pneumocystic carinii* pneumonisi, nörolojik patoloji, lenfoma, CMV ve diğer hastalıklar);
- (4) HIV'e yönelik hücrel ve sayısal immün yanıt; ve son olarak
- (5) AIDS'in geri döndürülmesinde yüksek oranda aktif anti-retroviral terapinin (HAART) başarısı ya da yetmezliğine göre araştırılmıştır (O'Brien ve Moore, 2000).

İlk AIDS sınırlayıcı alel olan *CCR5-Δ32*, 1996'da keşfedildi ve varyant açısından homozigot olan HIV'e maruz kalmış bireyler arasında, HIV enfeksiyonuna karşı somut bir direnç olduğu görülmüştür (Liu ve Ark, 1996; Samson ve Ark., 1996; Martinson ve Ark., 1997). Ayrıca, *CCR5*'in upstream regülatör bölgesinde ve stromal kaynaklı faktör – stromal derived factor -SDF-1 ile ilgili transkriptin 3' untransle bölgesinde ek varyantların da, grup çalışmalarında AIDS gelişim hızını etkilediği gösterilmiştir. HIV enfeksiyonu ve AIDS sonuçları üzerindeki bu genetik etkilerin doğrulanması, konak hücrel aygıtın, AIDS'e doğru sağlam gidiş ile ilgili rolüne yönelik anlayışı değiştirmiştir. (O'Brien ve Moore, 2000).

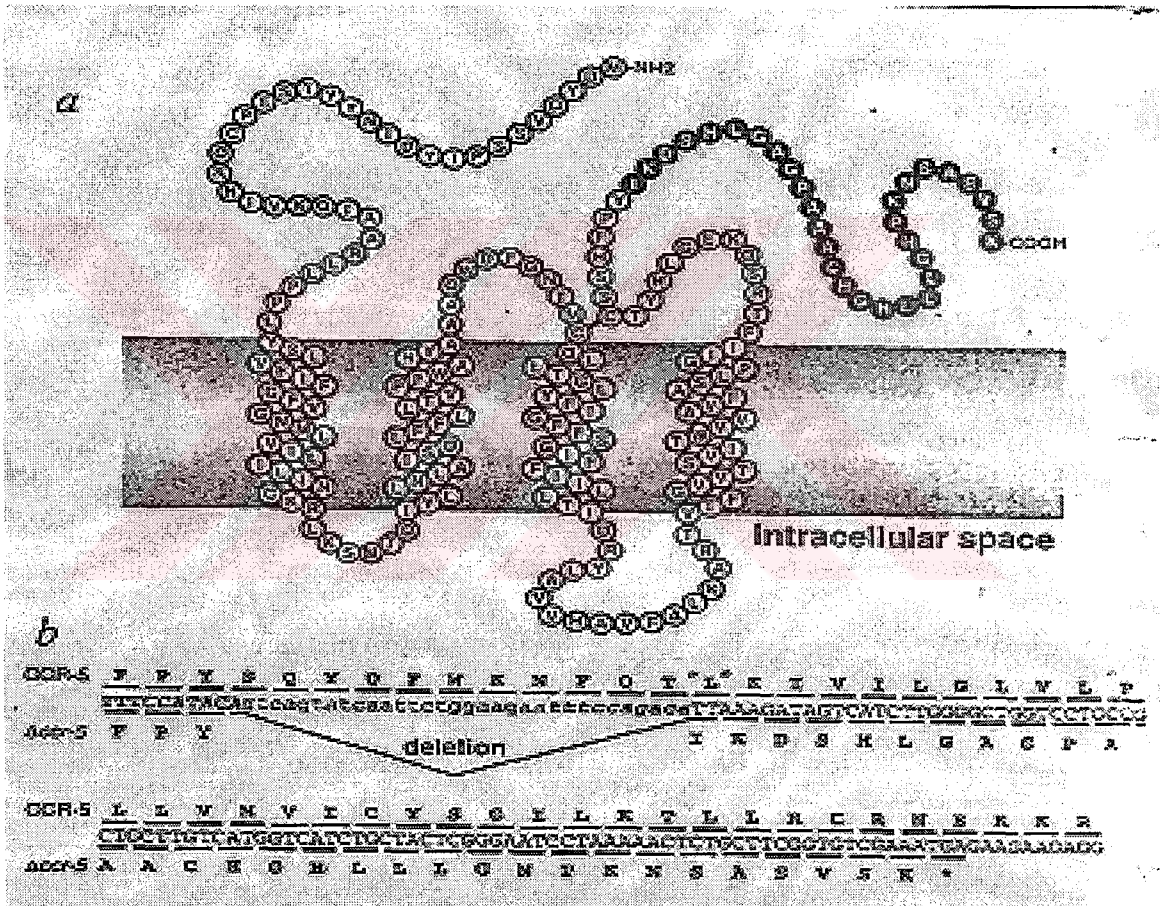
#### 1.4.2.1 - *CCR5-Δ32* Varyantı ve AIDS

*CCR5* yapısal geni, kromozom 3p21 üzerinde haritalanmıştır (Şekil 4). Liu ve Ark. (1996), *CCR5* lokusunda, eşeyssel yolla bulaştırılan ve HIV-1 ırklarınca oluşturulan enfeksiyona karşı duyarlılığı etkileyen bir varyasyon bulunduğunu keşfettiler. Liu ve Ark. (1996), HIV-1 pozitif oldukları bilinen kişilerle, hiçbir koruma önlemi almadan birçok kez cinsel ilişkiye girmiş fakat hastalığa yakalanmamış iki kişiyi çalıştılar. Araştırmacılar, söz konusu iki kişinin *CCR5*'i veren genlerinin kodlama bölgesinde 32-baz çiftlik bir delesyon açısından homozigot olduklarını belirlediler. Delesyon nedeniyle, kodlanan protein oldukça kısa ve fonksiyonsuzdur (Şekil 5). Aynı mutant aleli Michel Samson ve arkadaşları da (1996) bu gruptan bağımsız olarak keşfetmiştir.

Araştırmacılar, test edecekleri bireyin hücrelerinden önce DNA elde ettiler. Daha sonra, 32 baz çiftlik delesyonu kapsayan birkaç yüz baz çiftlik bölgenin (736 bp) çok sayıda kopyasını elde etmek için “Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)” denilen tekniği kullandılar. Daha sonra amplifiye edilen gen bölgesini restriksiyon enzim sindirimine tabi tutmuşlardır. İki alelin her biri (yabani *CCR5* ve mutant *CCR5 Δ32*), iki DNA fragmenti meydana getirmiştir. *CCR5+* (yabani tip) alelinin meydana getirdiği fragmentler 332- ve 403- baz çifti uzunluğundadır. *CCR5 Δ32* mutant alelinden oluşan fragmentler ise 332- ve 371 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 5). Jel üzerinde homozigotlar sadece iki banda sahip iken, heterozigotlar (*CCR5* yabani ve *CCR5 Δ32* mutant allel) üç banda sahip olduğu görülmüştür (Şekil 6) (Samson ve Ark., 1996).

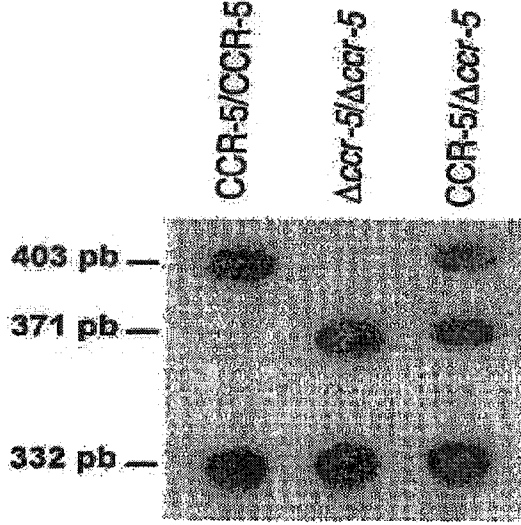


**Şekil 4-** İnsan kromozomu 3p21 üzerinde kemokin reseptörlerin gen haritası. *CCR2-64I*, *CCR5-Δ32* ve *CCR5* promoter bölgesinin tek nükleotid varyantları, nükleotid pozisyonlarıyla gösterilmiştir (O'Brien ve Moore, 2000)



**Şekil 5** – CCR5'in mutant formunun yapısı. a- İşlevsel olmayan CCR5-Δ32 proteininin aminoasit dizisi. b-Delesyonlu bölgeyi çevreleyen CCR5 geninin nükleotid dizisi (Samson ve Ark., 1996)





**Şekil 6-** PZR ile birey genotiplenmesi. Homozigot yabancı tip *CCR5* aleli (*CCR5/CCR5*), mutant *CCR5-Δ32* aleli (*CCR5Δ32/CCR5Δ32*) ve heterozigot *CCR5* (*CCR5/ CCR5Δ32*) bireyler için PZR amplifikasyonu ve *EcoRI* kesimi sonucunda gözlenen otoradyografi (Samson ve Ark., 1996)

*CCR5* yapısal geninin kodlama bölgesindeki yaygın genetik varyant, baş kısmı kesilmiş bir protein oluşturmak için açık okuma yapısı değişen 32 baz çiftinin (*CCR5-Δ32*) delesyonunu kapsar (Şekil 5). Bu protein, mutasyon açısından homozigot bireylerde hücre yüzeyine yerleşemez. *CCR5 +/Δ32* heterozigotlarda, hücre yüzeylerinde, *CCR5* reseptörlerinin sayısı azalmıştır ve bu, gen-dozaj etkisine bağlı olarak beklenen %50'lik azalmadan daha fazladır. *CCR5 +/Δ32* heterozigotlarda yabancı tip seviyelerinde ortalama % 20-30 azalma mümkündür, çünkü yeni *CCR5-Δ32* polipeptidleri, endoplazmik retikulumda yabancı tip *CCR5* kopyalarıyla dimerize olurlar, ama hücre yüzeyine *CCR5*'in aktarılması yabancı tipe kıyaslandığında gecikir (O'Brien ve Moore, 2000).

HIV enfeksiyonu açısından risk altında olan 10000 bireyin genetik analizleri, *CCR5-Δ32/Δ32* homozigot bireylerin, primer R5-tropik HIV türlerine ait enfeksiyona tamamen dirençli olduklarını göstermiştir (McNicholl ve Ark., 1997). Ancak geç faz X4 türleriyle enfekte olmuş birkaç homozigot raporu vardır ve bunun nedeni muhtemelen virüsün, *CCR5*'e olan gereksinimini, bunun yerine CXCR4'ü kullanmasıyla gidermiş olmasıdır. X4 türleriyle enfekte olmuş nadir

sayıda homozigotun, virüsle enfekte olmuş *CCR5*  $\Delta32$  ya da *CCR5*  $\Delta\Delta$  bireylerde olduğundan daha düşük bir HIV viral yüküne (kandaki hücre sayısı gibi) sahip olmaları önemli olabilir. Eğer doğrulanabilirse, bu farklılık, CXCR4 hücrelerinin, HIV'in *in vivo* olarak maksimum düzeyde replike olmasına yönelik yeteneği ile ilgili kısıtlamaları yansıtabilir (O'Brien ve Moore, 2000).

Mutant alel taşıyan hasta popülasyonlarında, heterozigotlar (*CCR5* $\Delta32$ ), HIV ile hemen enfekte olurlar. Bununla birlikte, enfekte olduklarında, AIDS'e ait patolojinin gelişmesi 2-3 yıllık bir gecikme sonucu biraz zaman alır. Ayrıca, viral yükte de bir azalma gözlenir. Bu da basit bir şekilde açıklanabilir; *CCR5*  $\Delta32$  heterozigotların hücreleri üzerindeki mevcut birkaç *CCR5* aracısı, CD4+, *CCR5*+T hücre lenfosit popülasyonunun virüs aracılı yıkımını ve HIV replikasyonunu geciktirir. Bu epidemiyolojik genetik bulgular daha da önemlidir, çünkü *CCR5*-aracılı hücre girişinin, yabancı tip genin tek bir kopyasına sahip hastalarda bile hızı sınırlayabileceği fikrini doğrular. Doğal genetik mutasyonların, hasta popülasyonlarında AIDS'i yavaşlatması ya da geciktirmesi, virüs-koreseptör etkileşimini hedefleyen terapötik müdahalelerle ilgili fikirleri ortaya çıkarır (O'Brien ve Moore, 2000).

Spesifik AIDS hastalıklarının gelişmesi de, *CCR5* mutasyonları tarafından düzenlenir gibi görünmektedir. Büyük bir vaka kontrol çalışmasında, *CCR5*  $\Delta32$  HIV-enfekte bireylerde, Non-Hodgkin B-hücre lenfomasının gelişme olasılığı *CCR5*  $\Delta\Delta$  bireylerdekinin yarısı kadardır. B-hücreleri yüzeylerine *CCR5*'i sentezlerler ve bu da HIV ve B hücrelerinin, AIDS hastalarında lenfoma sıklığı yönünden direkt etkileşebileceklerini gösterir. B-hücre *CCR5* reseptörlerinin sayısındaki azalma, B-hücrelerinin *CCR5* ligandları tarafından oluşturulan mitojenik uyarılara yönelik tepkilerini azaltabilir (O'Brien ve Moore, 2000).

*CCR5* mutant aleline bağlı olarak ortaya çıkan genetik sınırlamanın şaşırtıcı bir yönü de, bu varyant veya mutant alelin popülasyon dağılımı ve bununla ilgili doğal bir hikayeyi kapsıyor olmasıdır. *CCR5*- $\Delta32$  aleli, Avrupalı beyazlar arasında yaygındır (alel sıklığı %5-15), ama yerli Afrikalı ve Batı Asya etnik gruplarında yoktur (Tablo 2). Avrupalı beyaz popülasyonlarda 3. kromozom

üzerindeki CCR5 lokusu etrafındaki dengesiz bölmelerin uzunluğuna yönelik söz konusu popülasyon genetiği değerlendirmeleri esas alınarak, CCR5-Δ32 mutasyonunun, spesifik bitişik polimorfik kısa tandem tekrarlı (Specific Conjugated Tandems Repeats-STRs) lokus aleleri tarafından kuşatılan temel bir haplotiple bir defada oluştuğunu ve bunun yaklaşık 4000-6000 yıldan daha kısa bir süre önce ortaya çıktığını ileri sürülür. Ayrıca, CCR5-Δ32 haplotip bölgesinin en son sıklık artışı, insan popülasyonlarında yaklaşık 700 yıl önce oluşmuştur. İnsan popülasyonları 50.000 yıldan daha fazla bir süreç boyunca genişlemiş (10.000-100.000) oldukları kabul gördüğü için, bu sonuçların hepsi CCR5-Δ32 alel sıklığının, Avrupa kökenli beyaz popülasyonda çok kısa bir zaman zarfında arttığını öngörür. Alel sıklığındaki bu tip hızlı artış, sadece CCR5-Δ32'nin üretken taşıyıcılarının maruz kaldığı güçlü, devamlı ve seçici bir baskıyla açıklanabilir (O'Brien ve Moore, 2000). Güçlü seçici baskının nedeni açık değildir ama, birleştirilmek üzere olan tarihi sonuçlar (yaklaşık 700 yıl önce) 14. yüzyıl Avrupa'sının kara veba'sının, bu felaketten daha önceki altı yüzyıl boyunca her beyaz popülasyon neslini harap ettiği için epidemik bir aday olduğu ihtimalini ortaya çıkarmaktadır. Veba etkeni *Yersinia pestis* ile AIDS'in hedef hücre ve dokularındaki (makrofajlar, lenfositler) benzerlikler, CCR5'in veba basili ile enfekte olmuş insanların yaşamında kötü bir rol oynayıp oynamadığı sorusunu akla getirir. CCR5 ve *Yersinia*'nın fonksiyonel bağlantısı henüz belirlenmemiştir. Bir raporda, hücre içi bir mikoplazma olan *Cryptococcus neoformans*'ın sinir dokusundan temizlenmesindeki immün sistem etkililiğini kapsayan CCR5 murin gen zararlarını ele almıştır. Başka bir rapor, tavşan myxoma (pox) virüsünün, hücreye girmek için CCR5'i etkili bir şekilde kullandığını gösterir, buda, çiçek hastalığının tarihi epidemilerinin, CCR5-Δ32'nin seçici tercihinde aday olabileceği fikrini ortaya çıkarır (O'Brien ve Moore, 2000).

**Tablo 2-** Değişik populasyonlarda *CCR5* genotiplerinde gözlenen çeşitlilik  
(Martinson ve Ark., 1997)

Populasyon	Test edilen birey sayısı	Genotiplere göre birey sayısı			Alel frekansları	
		+/+	+/ <i>A32</i>	<i>A32/A32</i>	<i>CCR5</i> +	<i>CCR5A32</i>
<b>AVRUPA</b>						
Ashkenazi	43	26	16	1	79.1	20.9
İzlanda	102	75	24	3	85.3	14.7
İngiltere	283	223	57	3	88.8	11.1
İspanya	29	24	5	0	91.3	8.6
İtalya	91	81	10	0	94.5	5.4
İrlanda	44	40	4	0	95.4	4.5
Yunanistan	63	60	3	0	97.6	2.3
<b>ORTA DOĞU</b>						
Kafkasya	110	96	14	0	93.6	6.3
Suudi Arabistan	241	231	10	0	97.9	2.0
Yemen	34	34	0	0	100	0.0
<b>ASYA</b>						
Rusya	46	38	7	1	90.2	9.7
Pakistan	34	32	2	0	97.0	2.9
Penjab	34	33	1	0	98.5	1.4
Bengal	25	25	0	0	100	0.0
Hong Kong	50	50	0	0	100	0.0
Filipinler	26	26	0	0	100	0.0
Moğolistan	59	59	0	0	100	0.0
Tayland	101	100	1	0	99.5	0.4
Borneo	151	151	0	0	100	0.0
<b>AFRİKA</b>						
Nijerya	111	110	1	0	99.5	0.45
Orta Afrika	52	52	0	0	100	0.0
Kenya	80	80	0	0	100	0.0
İvory sahilleri	87	87	0	0	100	0.0
Zambia	96	96	0	0	100	0.0
Kalahari San	36	36	0	0	100	0.0
<b>OKYANUSYA</b>						
Yeni Gine	96	96	0	0	100	0.0
Fransız Polynezyası	94	94	0	0	100	0.0
Aborjin Avustralyası	98	96	2	0	98.9	1.0
Guam	59	58	1	0	99.1	0.8
Fiji	17	17	0	0	100	0.0
<b>AMERİKALILAR</b>						
Nuu-Chah Nulth	38	37	1	0	98.6	1.3
Meksika	52	52	0	0	100	0.0
Brezilya	98	98	0	0	100	0.0
Jamaika	119	119	0	0	100	0.0

Son olarak, *CCR5-Δ32*'nin hipertansiyonla ilgili olduğuna yönelik yeni bulgularda vardır. *CCR5* geninin, Δ32 dışındaki diğer mutasyonlar bakımından olan dağılımları, reseptörün muhtemelen geçmişteki infeksiyöz hastalıklar nedeniyle doğal seçici baskının söz konusu olduğunu gösterir. Bugüne kadar, *CCR5*'i kodlayan genlerin 22 ayrı aleli tanımlanmıştır. Bunların 18 tanesi (%82) sinonim olmayan ve bu diğer bilinen kodlayıcı gen polimorfizmlerine göre daha yüksek rastlanılan bir durumdur. Kodon-değiştirici (replacement substitution-değiştirici baz değişim) varyantların bu yüksek seviyesi, aminoasit farklılığını geri kazanmaya yönelik selektif baskının bir işaretidir (örneğin memeli major histokompatibilite kompleksindeki MHC alelleri). Yukarıda tartışılan tarihi durumla birlikte düşünülen polimorfizm modelinde, MHC ile olan paralellik, *CCR5* alel ürünlerinin, mutasyonel varyantların taşıyıcılarına seçici avantaj sağlayan diğer bulaşıcı hastalıklar tarafından birlikte seçildiklerine yönelik kışkırtıcı bir vaka sunar (O'Brien ve Moore, 2000).

#### 1.4.2.2- *CCR2-64I*

*CCR2*, HIV koreseptörü olarak işlev görebilen kemokin koreseptörlerinden biridir ve kromozomal yakınlık ve DNA dizi homolojisi açısından *CCR5*'in en yakın genomik akrabasıdır. *CCR2*'nin birinci transmembran domain'inde valin yerine izolösin'nin bulunduğu yaygın bir varyant olan *CCR2-64I*, HIV bulaşımında hiçbir etkiye sahip olmadığı halde homozigot ve heterozigotlarda AIDS oluşumunun gecikmesine neden olur. AIDS gelişimi üzerindeki epidemiyolojik etkinin, bu reseptörün 7 transmembran segmentinin birinde yer alan bir pozisyondaki zararsız bir değişmeden (valin-izolösin) kaynaklanıyor olması şaşırtıcıdır. Çeşitli bağımsız çalışmalar, *CCR2-64I*'nin AIDS geciktirici etkilerini doğrulamıştır. Mutasyonun, bağlantı dengesizliği nedeniyle *CCR5Δ32*'nin izinde olduğuna yönelik ilk tahminler çürütülmüştür (*CCR5* ve *CCR2* 14kb büyüklüğündedir). Çünkü *CCR2-64I*'i taşıyan kromozomlar, her zaman *CCR5+* alelleri taşıırken, *CCR5-Δ32* kromozomları her zaman *CCR2+* bulunmuştur.

Bu yüzden, *CCR5-Δ32* ve *CCR2-64I* AIDS'i geciktirmede bağımsız ve güçlü fazladan etkilere sahiptir. Primer reseptör *CCR5*'in upstream regülatör

alellerle olan dizi eşitsizliği şu açıklamayı da geçersizleştirmiştir: “hem *CCR5-Δ32* hem de *CCR2-64I* her zaman AIDS başlangıcını geciktirme ile değil de, hızlandırmayla ilişkili olan bir *CCR5* promotör haplotip ile (*CCR5P1*) bir kromozomda taşınmaktadır”. Farklı insan etnik grupları arasında *CCR2-64I*'nin dağılımı *CCR5*'ten farklıdır; tüm büyük etnik gruplar, fark edilebilir bir düzeyde *CCR2-64I* sıklığına sahiptir. Nairobi'deki yerli Afrikalı grup arasında, *CCR2-64I* alelinin sıklığı ( $f=0.23$ ), Amerikalı beyazlardakinin ( $f= 0.10$ ) iki katı kadar yüksektir ve AIDS oluşumundaki gecikme, beyaz ırkın benzer şekilde oranlanan hastalık kategorilerine göre iki katı kadardır (nispi risk  $RR=4.17$ ). Nairobi grubunda hem genetik korumanın kuvveti, hem de koruyucu alel sıklığındaki bu dramatik artış, kemokin reseptörü kullanan infeksiyöz ajanların, varyant alel dağılımı üzerindeki sıkı etkisini gösterir. Yerli Afrikalılarda, *CCR2-64I*'nin AIDS üzerindeki etkisinde gözlenen artış, popülasyonda *CCR5-Δ32*'nin yokluğuyla kısmen ilişkili olabilir (O'Brien ve Moore, 2000).

#### 1.4.2.3-CCR5 Promotör Aleller

*CCR5-Δ32* ve *CCR2-64I*'nin etkilerinin doğruluğu kanıtlanabildiği ve fonksiyonel kapsamda en azından kısmen de olsa yorumlanabildiği halde, HIV'e maruz kalan enfekte olmamış bireylerin sadece küçük bir kısmında (< %20) bulunur ve enfekte hastaların AIDS sonucundaki varyasyonun sadece ufak bir oranından sorumludurlar. *CCR5* promotör bölgesindeki regülasyonların, HIV hastalığını etkilediğinin belirlenip belirlenmeyeceği merak edilmiştir. Bugüne kadar, promotör ve regülasyon aktivite gösteren *CCR5* kodlayıcı ekzonların üst kısmındaki 1000 bp bölgesinde 13 ayrı tek nükleotid polimorfizmi (SNP-single nükleotid polimorfizm) bulunmuştur. Bu 13 SNP, teorik olarak,  $2^{13}=8192$  muhtemel haplotip kombinasyonu düzeyindeki bir çeşitlilikte olabilir. Gerçekte 13 haplotip gözlenmiştir ve bunların dördü (*CCR5 P1-P4*), beyaz ırk ve Afrikalı Amerikalılar arasında nispeten yaygındır. Tüm zincir dengesizliği nedeniyle, *CCR5-Δ32*, *CCR2-64I*'da olduğu gibi *CCR5-P1* ile ilişkilidir. Ek olarak hem *CCR5*, hem de *CCR2* ile ilgili yabancı tip alele bağlantılı olan *CCR5P1* alellerinde fark edilir bir sıklık mevcuttur. Bu yüzden, genetik/epidemiolojik amaçlar için, düşünülen altı haplotip vardır (bunlar,

*CCR2*, *CCR5P*; *CCR5* süper lokusunun alelleri olarak düşünülebilir). *CCR5-Δ32* ve *CCR2-64I* aracılı AIDS gecikmesi gözlemlenmiştir, ancak *CCR2* ve *CCR5* açısından yabancı tip ve *CCR5/P1* için homozigot olan HIV'le infekte bireyler arasında hızlı bir AIDS oluşumu olduğu da görülmüştür. Öte yandan, HIV bulaşım hızında farklı promotör haplotiplerinin etkisine rastlanmamıştır (O'Brien ve Moore, 2000).

*CCR5P1/P2*'in AIDS oluşumunu hızlandırması ile ilgili muhtemel bir hipotez, mevcut hücre yüzey HIV koreseptörlerini arttıran *CCR5* gen transkripsiyonunun upregulasyonunu kapsayabileceğidir. Bununla birlikte; a) lusiferaz geninin ifade ettiği bir ürünün *CCR5* promotör yönlendirimli transkripsiyonu; b) R5 ya da R5X4 ikili tropik HIV türlerinin HIV infektivitesi ; ya da c) lenfositler üzerindeki hücre yüzey reseptörü *CCR5*'in ortalama konsantrasyonu ile ilgili kantitatif analizler, farklı promotör genotipler arasında herhangi bir farklılık göstermemiştir. Bu negatif sonuçlar dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır, çünkü deneyler sadece belirleyici promotör farklılıkları ortaya çıkarır ve transkripsiyon faktörlerine yönelik hücreye spesifik cevapları ortaya çıkaramaz. Gerçekte, *CCR5P1* haplotip alelini tanımlayan, SNP bölgesinin alternatif formları için spesifik olan oligonükleotidlerdir. Bu, belli hücre tiplerindeki transkripsiyon faktörlerinin, varyant promotör alellerini farklı şekillerde bağlayabildiğini ve böylece *CCR5* transkripsiyonunu regüle edebildiğini gösterir. Bununla birlikte, bu bölgeye farklı transkripsiyon faktörünün bağlanması, *CCR5-P1/P1*'in hızlı AIDS oluşumu ile ilgili olduğu konusunda tam bir açıklama sağlayamaz. Çünkü, *CCR5P1* SNP "G" aynı zamanda, AIDS'i hızlandırmayan bir alel olan *CCR5P2*'de bulunmuştur. Ama *CCR5P3* ve *CCR5P4*'te bulunmamıştır (O'Brien ve Moore, 2000).

*CCR5P1* promotör alel ilişkisi, hızlı AIDS gelişimi ile ilgili olan ilk genetik varyanttır (başka genlerin AIDS hızlandırıcı varyantları son zamanlarda gözlenmiştir). Genetik etkinin, mevcut *CCR5* araçlarındaki bir artışla oluştuğu hipotezi, epidemiyolojik modelle desteklenmiştir. *CCR5P1/P2*'in aracılık ettiği en güçlü hızlandırma, hastaların %90-95'inde R5 virüsü predominant olduğu bir periyot olan infeksiyonun ilk 5 yılında oluşur. Sonuç olarak, *CCR5-Δ32* ve *CCR2*

64I'e bakmaksızın, enfeksiyondan sonraki 3.5 yıl içinde AIDS'e maruz kalan hızlı ilerlemeye sahip bireylerde %10-17 arasında durum böyle olur gibi görünür, çünkü *CCR5P1/P1* promotör aleli açısından homozigotturlar (O'Brien ve Moore, 2000).

#### 1.4.2.4- SDF1-3'A (Stromal-Derived Factor 1-3'A)

Eğer R5-HIV türü reseptörlerini kodlayan *CCR5* ve *CCR2* genlerinin varyantları AIDS'i kısıtlayabilirse, belki de geç faz HIV reseptörü CXCR4 ya da bunun ligandındaki varyantlar da yapabilir. *CXCR4* geninde keşfedilen polimorfizm alanları, az epidemiyolojik sonuca sahip olan sadece iki nükleotid varyantı ortaya koymuştur. Bilinen tek *CXCR4* ligandı olan SDF'nin kodlama bölgesi incelendiğinde SDF-1 $\beta$  ile ilgili, ucuca ekli bir varyant transkriptinin 3' traslasyon görülmeyen bölgesinde (3' UTR) 801. pozisyonda (AUG kodonunda) yaygın bir SNP varyantı keşfedilmiştir. Varyant, insan ve fare SDF-1 homologları arasındaki dizide sırasıyla %88 ve %92'si korunmuş olan iki DNA segmentinden 37 baz çifti içerir. Bir 3' UTR sinyalindeki bu korunmuş dizi seviyesi, DNA bağlama regülatör faktörleri ile ilgili tanıma dizisi gibi bir segment için mutasyonel farklılığı selektif olarak sınırlar. *SDF1-3'A/3'A* varyantı açısından homozigot olan HIV'le enfekte bireyler, birleştirilmiş ya da ayrı gruplarda AIDS'e karşı belirgin bir koruma seviyesi gösterir. Hem *SDF-3'A/3'A* hem de *CCR5* (ya da *CCR2*) heterozigot korumaya sahip bireyler arasında koruyucu etki oldukça güçlüdür ve sadece *CCR5* ya da *CCR2* heterozigotluğunun söz konusu olduğu zamankinden birkaç kat daha yüksektir.

*CCR5/2* ve *SDF1-3'A*'nın epidemiyolojik etkileşimi (epistazi denilen ve alelik olmayan diğer bir gen tarafından bir genin etkisinin maskelendiği genetik bir fenomen), fonksiyonel bir etkileşimin, artmış korunmayı açıklayabileceğini gösterir. Muhtemel bir hipotez şöyle olabilir; *CCR2* ve *CCR5* varyantları, erken fazda HIV'in replikasyonunu ve yayılmasına aracılık eden *CCR5* koreseptörlerinin sayısını kısıtlayarak AIDS'i yavaşlatırken, *SDF1-3'A* varyantı, AIDS'i oluşturan sürecin oluşumunu ve tropik HIV türlerinin çıkışını sınırlar. Muhtemel mekanizmalardan biri, ortaya çıkmak ve dominant olmak için X4 virüsleri için gerekli olan CXCR4 reseptörlerine bağlanarak onları bloke eden



SDF1'in lokal bölgelerde aşırı üretilmesi olabilir. SDF1-3'A'nın, ligandın sentezi, niteliği ya da yarı ömrü üzerindeki etkisine yönelik doğrudan bir kanıt *in vitro* ortamda elde edilememiştir. SDF'nin sentezlenmesi, stromal hücrelerde ve miktarının belirlenmesinin kolay olmadığı diğer dokularla sınırlı olduğu ya da B-hücre saflarında sentezlenemediği için bu fikri *in vivo* olarak test etmek zordur.

Etnik grupların karışıklığı, serolojik bulgular açısından belirtiler gösteren hastaların bulunması ya da HIV enfeksiyonunda birkaç yıl sonra başlamış grupların zayıf tarafının epidemiyolojik sinyalleri maskeleyebileceği halde, açıklamalar belirsizdir. Ayrıca SDF1-3' A/3'A etkisi resesiftir, böylece homozigotlar nadirdir ( $\approx$  %6). NCI (National Cancer Institution) çalışmasında gözlenen epidemiyolojik korunma gücü kışkırtıcı olduğu ve göz ardı edilmemiş olduğu halde, SDF2-3'A'nın hastalık oluşumuyla ilgisinin genelleşmediği ihtimali göz ardı edilmemelidir (O'Brien ve Moore, 2000).

Yukarıda oldukça ayrıntılı olarak verilmiş olan bilgiler ışığında, değişik zamanlarda, farklı popülasyonlara yönelik olarak *CCR5-Δ32* alelinin sıklığına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Genel olarak bakıldığında bu mutant alelin sıklığının oldukça yüksek olduğu kuzey Avrupa popülasyonları ve beyaz ırk popülasyonlarına yönelik çalışmalar en fazla ilgi görmüş olan çalışmalardır. Bu veriler ışığında *Δ32* alelinin coğrafik dağılışı ve bu alelin ortaya çıkışı ile ilgili değişik yaklaşımlar ileri sürülmüştür. Genel olarak kuzey-güney enlemleri doğrultusunda azalan bir alel frekansından bahsedildiğinden, Türk popülasyonunda elde edilecek alel frekansı bu bilgiler ışığında tartışılacaktır.

Bu çalışmada, *CCR5-Δ32* alelinin Türkiye'deki sıklığını ve bu mutant alelin çeşitli kanser tipleriyle olan ilişkisini araştırmayı amaçladık. Zira, kemokinlerin kanserleşmede anjiojenez denilen farklılaşmada rolü olduğu bilinmektedir (Vicari ve Caux, 2002). Bu yüzden laboratuvar örnekleri arasında bulunan kanserli bireylere ait kan doku örnekleri kullanılarak, *Δ32* aleli ve bu bazı kanser türleri arasında bir ilişki olup olmadığı ayrıca araştırılmıştır. Elde edilecek bilgiler bu alelin Türk popülasyonundaki sıklığının ne olduğu ve diğer çalışılmış popülasyonlara göre ne durumda olduğu hakkında bilgiler sunacaktır.

## 2-MATERYAL VE METOD

### 2.1-Örneklerin Alınması

Türk popülasyonunda *CCR5-Δ32* mutant alelinin sıklığını belirlemek amacıyla, bu çalışmada kullanılan örnekler, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kan Alma Merkezine gelen 267 gönüllü bireyden kan alınmasıyla gerçekleştirildi. Her bir bireyden alınan 2 ml'lik kan örnekleri, 1mM EDTA (etilen diamin tetra asetat) içerikli tüplere konulmuştur. Her defasında ortalama 20-25'li gruplar halinde alınan kan örnekleri doğrudan Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na getirilerek genomik DNA eldesi için kullanılmıştır. Kan örnekleri alınan bireylerin seçimi tamamen tesadüfi olarak ve o gün hastaneye başvuran gönüllü bireylerden seçilmiştir. Ayrıca bu çalışmada laboratuvarımızda bulunan kanserli bireylere ait kan DNA örnekleri de kullanılmıştır. Bu amaçla 20 beyin tümörü, 39 meme kanseri, 33 larinks kanseri ve 30 tiroid kanserli bireye ait kan örneği kullanılmıştır. Sonuç olarak toplam 390 DNA örneği çalışılmıştır.

### 2.2- Total Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, Hillis ve Moritz'in (1990) DNA izolasyon protokolünde bazı değişiklikler yaparak kullanan Arslan (2002)'in Yüksek Lisans Tez çalışmasında kullanmış olduğu uygulaması esas alınarak yapılmıştır. Fakat yinede uygulamada bazı ufak değişiklikler yapılmıştır. Öncelikle her bireyden alınan kan örneklerinden 400µl antikoagülanlı kan örneğinin çökelti halindeki hücresel kısımdan alınan kısım mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Üzerlerine 500 µl STE (0.1 M NaCl, 0.05 M Tris ve 0.001 M EDTA, pH:8) tamponu ilave edildi. Tampon ve kan örneği karışımları üzerine 10 µl proteinaz K (Sigma; 10 mg/ml) ve 50µl SDS (%10'luk) ilave edilerek steril pipet ucuyla dikkatlice karıştırıldı. Karıştırılma sonrası tüpler yavaşça bir kaç kez alt üst edildi. Bu karışım 55 °C'de zaman zaman karıştırılmak suretiyle 2 saat, bazen de 37 °C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 500µl PCI (Fenol-kloroform-izoamil alkol 25:24:1) karışımı ilave edildi. Her bir tüp dikkatlice altüst edilerek, oda ısısında 5 dakika kendi halinde dengeye gelmesi için bekletilen örnekler 10.000 rpm'de (13 100 g) 5 dakika Ependorf marka santrifüj ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte

oluşan berrak tabaka, interfazın bozulmamasına dikkat edilerek, mikropipetle dikkatlice alınıp başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerlerine tekrar 500µl KI (kloroform-izoamil alkol 24:1) ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 10000 rpm'de 5 dk. santrifüj sonrası üst berrak katman aynı şekilde başka tüpe aktarıldı. Bazen üst tabakanın berraklığı dikkate alınarak üçüncü bir kademe olarak üst faza kloroform ilave edilerek protein ve diğer kontaminasyon ortadan kaldırılmaya çalışıldı. Üzerlerine 1 ml'lik hacimler halinde soğuk mutlak etil alkol ilave edildi. DNA gözle görününceye kadar tüp yavaşça alt üst edildi ve örnekler içerisindeki DNA'nın daha etkin çökmesi için 2 ila 3 saat arasında -20 °C'de bekletildi. 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek DNA'nın tamamen çöktürülmesi sağlandı. Ependorf tüp içerisinde çökelmiş olan DNA üzerinde yer alan alkol doğrudan dökülerek uzaklaştırıldı. Çöktürülen DNA'dan alkolü tamamen uzaklaştırmak için, tüpler kısa bir santrifüj uygulaması sonrası her bir tüpten mikropipet yardımıyla kalıntı sıvı alındı ve sonrasında 37 °C'de 5 dakika süresince kalan sıvı evaporasyonla uzaklaştırıldı. Dipte elde edilen DNA tortusu 100 µl enjektörle bidistile suda oda sıcaklığında bekletilerek yeniden çözündürüldü. Kanseri doku örneklerinin DNA eldesinde de aynı protokol takip edilmiştir.

Bu kullanılan kan örneklerinin yanı sıra diğer çalışmalar için kullanmış olduğumuz değişik kanser gruplarının kan örneklerinden elde edilen DNA örnekleri de *CCR5* Δ32 mutant reseptör-kanser ilişkisini olup olmadığını araştırmak amacıyla çalışmada kullanılmıştır. Bu DNA örneklerinin elde edilişleri de daha önce bahsedilen protokoller ile başarılmıştır.

### **2.3-Genomik DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi**

İzole edilen DNA numunelerini kalite açısından (izolasyon sırasında hasar görüp görmediği) değerlendirmek amacıyla, DNA örneklerinde birkaç mikrolitre alınarak, %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. Agaroz jel ortamında net görüntü veren ve taban kirliliği çok fazla olmayan örneklerde yeterli DNA'nın var olduğu kabul edildi.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu, Cecil marka spektrofotometre ile 260 nm'de absorbanları okunarak belirlendi. DNA örnekleri ölçüm esnasında

gerekli oranda seyreltilerek spektrofotometrede referans olarak distile suya karşı absorbansları ölçüldü. Ayrıca 280 nm'deki absorbansta alınarak, 260/280 soğurum indekslerinin 1.8 değerine yakın veya uzaklığına göre protein kontaminasyonu olup olmadığı kontrol edildi. İzole edilen DNA'nın konsantrasyonunu belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

**DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) = 260 nm'deki OD (absorbans) x Sulandırma katsayısı x 50\***  
\*1 absorbans 50  $\mu\text{g/ml}$  çift iplikçikli DNA'ya karşılık gelmektedir.

#### 2.4 – Gen Bölgesine Uygun Primer Seçimi

Başlangıç olarak projede belirtildiği gibi, *CCR5* geninin 1019 bazlık gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla bir çift primer dizisi kullanıldı. Fakat çalışma teknik olarak restriksiyon enzimleriyle kesim ve SSCP tekniğinin birlikte kullanılmasını amaçladığından, bu oligonükleotidlerle söz konusu gen bölgesinin kullanılan tüm örneklerin amplifikasyonunda etkin olmadığı görüldü. Uygulama olarak, tasarlanmış olduğumuz primerler ile yapılan PZR reaksiyonu sonucunda amplifikasyon ürünü *HaeIII* restriksiyon enzimi ile sindirime tabi tutuldu. *HaeIII* enziminin *CCR5* geni üzerinde iki adet tanıma bölgesi vardır (GGCC). Enzim sindirimi sonucunda 215, 541 ve 263 bç uzunluğunda muhtemel üç fragment oluşması beklenmiştir. Daha sonra sindirim ürünleri 1-2 dk 95 °C'de tutularak DNA çift zincirleri denatüre edildi ve poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu (Single Stranded Conformation Polymorfizm – SSCP). Amplifiye olan DNA miktarı yeterli olmadığından tasarlanan primerden vazgeçilip Jagodzinski ve Ark.'nın (2000) çalışmalarında kullandığı ve yalnızca delesyon bölgesini çoğaltmayı amaçlayan 182 bç uzunluğundaki gen bölgesinin amplifiye olmasına olanak sağlayan primerlerin kullanılmasına karar verildi.

#### 2.5 – PZR Reaksiyonu

İlk adımda delesyon bölgesini kapsayan 182 bç uzunluğundaki *CCR5* gen fragmenti PZR ile çoğaltıldı. 182 bç uzunluğunda olan yabanıl tip fragment ve 150 bç uzunluğundaki mutant fragmenti oluşturmak amacıyla (Jagodzinski ve Ark., 2000) iki oligonükleotid kullanıldı. Bunlar *CCR5*-spesifik forward ve reverse primerler olup, GeneBank kodu, baz dizisi ve diğer özellikleri aşağıda

belirtildiği gibidir: SP4.760, 5'-CCT CAT TAC ACC TGC AGC TCT-3' forward ve PM6.942, 5'-CAC AGC CCT GTG CTT CTT CTT-3' revers. Optimizasyonu sağlamak için PZR'yi etkileyen birçok parametre denenmiş ve en iyi sonuçlar aşağıdaki parametreler uygulanınca elde edilmiştir. Özellikle agaroz jel ortamında gözlenen non-spesifik amplifikasyonu azaltmak amacıyla, PCR ortamına Amonyum Sülfat (AS) içeren tampon dahil edilmiştir. Deneysel protokol aşağıda verildiği şekilde uygulanmıştır: Denede Fermantase *Taq* polimeraz enzimi ve diğer bileşenleri kullanılmıştır.

Tampon (750mM Tris-HCl (25 °C'de pH:8.8), 200mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0.1 Tween 20), 5µl dNTPs, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.2µl primer forward, 0.2µl primer reverse, 0.1µl *taq* DNA polimeraz ve 1µl genomik DNA (yaklaşık 150 ng) içeren 25µl'lik hacimde gerçekleştirildi.

#### PZR Profili

Başlangıç denatürasyonu	→ 94 °C 1 dk
Denatürasyon	→ 94 °C 30 sn
Primer bağlanması (Annealing)	→ 60 °C 60 sn
Uzama (Extention)	→ 72 °C 60 sn
Son uzama (Final Extention)	→ 72 °C 5dk
	→ 33 döngü

## 2.6 – Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon ürününden yaklaşık 10µl alınarak, 5µl yükleme tamponu (6x Loading dye: %50 gliserol, 0.1 M EDTA, %1 SDS, %0.1 bromfenol mavisi, ksilen siyanol) ile karıştırıldı. TBE tamponu (0.089 M Tris, 0.089 M Borik asit ve 0.011 M EDTA, pH: 8.3) içerisindeki %2.5'lik agaroz jelde ayrıştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında, 10xTBE (50 mM olacak şekilde % 10'luk hazırlandı), distile su, 0.5 µg/ml etidyum bromid ve agaroz (Sigma) kullanıldı. Elektroforez, elektrik güç kaynağı ile 80 mA'de en az 2 saat süresince yapıldı.

## 2.7 – Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PZR sonucunda oluşan amplifikasyon ürününden 5 µl alınarak, 2µl yükleme tamponu (6x) (%50 gliserol, 0.1 M EDTA, %0.1 Bromfenol Blue, Ksilen siyanol) ile karıştırıldı. TBE tamponu içerisindeki, % 8'lik denatüre edici olmayan vertikal poliakrilamid jelde ayrıştırıldı. Elektroforez, jel soğutma sistemi kullanarak, 20x20 cm boyutlarındaki jel üzerinde, 15 °C'lik sabit sıcaklıkta 50 mA de bir gece boyunca gerçekleştirildi.

Elektroforezden sonra, jeller gümüş boyama metodu ile boyandı. Bunun için jel %10 etanol ve %0.5 asetik asit içeren çözeltide 3'er dakika olmak üzere iki kez tespit edildi. Tespit işleminden sonra, %0.1'lik gümüş nitrat çözeltisi ile 10 dakika boyama yapıldı. Jel distile su ile iki kez yıkandıktan sonra, alkalın çözeltide (%1.5 NaOH, %0.1 NaBH<sub>4</sub> ve %0.15 CH<sub>2</sub>O) en az 20 dakika bekletilerek bantların belirgin hale gelmesi sağlandı. Jeller naylon torbalar içinde saklandı ve bantlar incelenerek yabancı tip ve mutant alellerin agaroz jel ile uyumları kontrol edildi.

## 2.8- İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Popgene version 1.31 (Yeh ve Ark., 1999) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilmiş olan alel ve genotip frekansları Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi kullanılarak karşılaştırıldı ve farklılıklar değerlendirildi. Genotiplerin gözlenen ve beklenen frekansları arasındaki farklılıklar aynı test kullanılarak yapıldı (Yeh ve Ark., 1999). Beklenen homozigot heterozigot verileri Levene (1949)'e göre hesaplandı. Ayrıca Nei'nin (1933) beklenen heterozigotluk değeri de aynı hesaplamalar içinde yer almıştır.

### 3 – BULGULAR

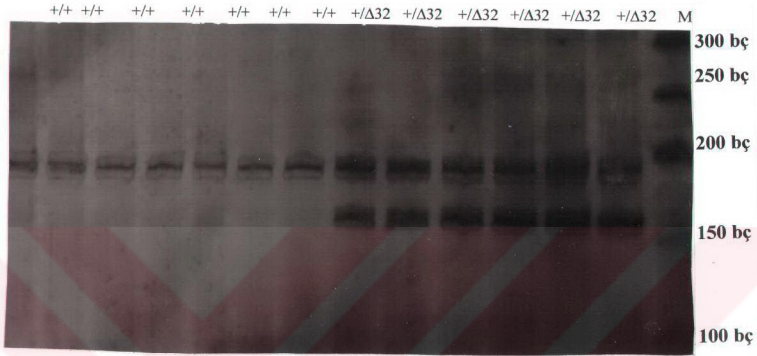
Türk populasyonunda *CCR5* alelinin sıklığını belirlemek için 390 bireyde yapılan analizler sadece Sivas İli Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesine değişik rahatsızlıkları sonucunda baş vuran HIV negatif bireylerden ibarettir. Çalışmanın amacı çok sayıda birey kullanarak, Türk populasyonunda bu mutant alelin sıklığının ne düzeyde olduğunu saptamak ve diğer populasyonlar ile karşılaştırmak olduğundan, bireylerle ilgili herhangi bir anket veya anemnez bilgisi alınmamıştır.

Yapılan bu ön çalışma sonucunda 17 bireyin heterozigot durumda *CCR5*- $\Delta$ 32 genotipine sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında bu alelin Türk populasyonu açısından Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı test edilmiştir. Buna göre populasyondaki *CCR5*- $\Delta$ 32 genotip'e sahip yabancı form sıklığı 0,9782 (373/390) olarak hesaplanırken, *CCR5*- $\Delta$ 32 genotip içeren HIV negatif bireyler arasındaki genel sıklığının 0.0218 (17/390) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3).

Türk populasyonunda *CCR5* lokusuna ait alel ve genotip sıklıkları belirlenmesini amaçlayan bu çalışma için, Polimeraz Zincir Reaksiyonundan yararlanılmıştır. Agaroz ve akrilamid jel elektroforezi uygulamaları sonucunda, jel üzerinde homozigot yabancı bireyler için yalnız bir band gözlenirken (182 bç), heterozigot olanlarda iki band ayırt edilmiştir (182 ve 150 bç uzunluğunda). Homozigot durumda mutant *CCR5*- $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 genotip'e sahip bireylere ise rastlanılmamıştır. Bu uygulamalar sonucunda özellikle akrilamid jel görüntüsünde yer aldığı gibi (Şekil 7) mutasyon bölgesini yansıtan bandlardan birisi (mutant  $\Delta$ 32), aynı ortamda paralel koşturulan GeneRuler moleküler standart bandlarından, 150 bazlık diziye karşılık olacak şekilde yer alırken, diğer yabancı formu temsil eden 182 baz çiftine karşılık gelen band ise standart bandlarından 200 bç'inin hemen üzerinde lokalize olduğu görülmüştür.

Ayrıca elimizde bulunan kanserli bazı doku örnekleri de çalışmada kullanıldığından, herbir gruba ait bireyler açısından analizler yapıldığında genotip ve alel frekans dağılımları ile ilgili genel sonuçlar sırasıyla ayrı tablolar halinde verilmiştir. Populasyon hem genel olarak, hem de farklı gruplar altında test

test edilerek her bir grup için elde edilen veriler belirtilen tablo ile birlikte ifade edilmiştir.



**Şekil 7.** PAGE (% 8) sonucunda moleküler standart ile birlikte koşturulan yabancıl (*CCR5* +/+) sahip ve mutant form (*CCR5* +/Δ32 ) içeren bazı heterozigot band örnekleri (M= moleküler standart bandları, +/+ = yabancıl form, +/Δ32 = heterozigot bireyler).

Tablo 3'de özetlenen genel popülasyonu ve her bir grubu temsilen elde edilen Ki kare ( $\chi^2$ ) testi Hardy-Weinberg denge analiz sonuçları yapılan her bir gruplama için ayrı ayrı elde edilerek, istatistiksel açıdan bir fark olup olmadığı analizlerle ortaya konmuştur. Bu amaçla yapılan uygulamalar sırasıyla aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

Toplam olarak 390 bireyin test edildiği ve kanserli olan dokuların her biri kendi aralarında gruplandırıldığında, mutant ale taşıyan bireylerin genel dağılımı Tablo 3'deki gibi elde edilmiştir. Elde edilen 17 heterozigot durumdaki bireylerden mutant formu içeren 13 birey normal birey olarak adlandırdığımız grupta yer alırken, kalan 4 mutant içeren heterozigot bireyin 3'ü meme kanser örneklerinde, 1'i ise larinks kanser örneğinde test edilmiştir. Beyin ve tiroid kanserinde heterozigot durumunda mutant form içermediği saptanmıştır.



**Tablo 3.** *CCR5* +/ $\Delta$ 32 genotip ve alel sıklığının 390 bireyde ve yapılan alt gruplamalarda elde edilen sonuçlara göre bireylerin dağılım şekilleri

	Genotip				Alel		
	<i>CCR5</i> -+/+	<i>CCR5</i> -+/ $\Delta$ 32	<i>CCR5</i> - $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32	Toplam	<i>CCR5</i> +	<i>CCR5</i> - $\Delta$ 32	Toplam
Genel Grup	373	17	00	390	763	17	780
<b>Gruplandırılmış Bireylerdeki Dağılım</b>							
	<i>CCR5</i> -+/+	<i>CCR5</i> -+/ $\Delta$ 32	<i>CCR5</i> - $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32	Toplam	<i>CCR5</i> +	<i>CCR5</i> - $\Delta$ 32	Toplam
Normal Bireyler	254	13	00	267	521	13	534
Beyin Kanseri	20	00	00	20	40	00	40
Meme Kanseri	36	3	00	39	75	3	78
Larinks Kanseri	33	1	00	34	67	1	68
Tiroid Kanseri	30	00	00	30	60	00	60

**Tablo 4.** Tüm bireyleri kapsayan populasyonun alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (390 birey)

Alel	CCR5 alellerin sıklığı						
Yabanıl alel (763/780)	0.9782						
Mutant $\Delta$ 32 (17/780)	0.0218						

Lokus	Örn. Büyük.	Göz.Hom	Göz.Het.	Bek.Hom*	Bek.Het*	Nei**	Ort.Het
CCR5	780	0.9564	0.0436	0.9573	0.0427	0.0426	0.0426
Ort.	780	0.9564	0.0436	0.9573	0.0427	0.0426	0.0426
St. Sap.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0000

Örn. Büyük.: Örneklem Büyüklüğü

Göz.Hom.: Gözlenen homozigot değeri.

Göz. Het.: Gözlenen heterozigot değeri.

Bek.Hom.: Beklenen homozigot değeri.

Bek.Het.: Beklenen heterozigot değeri.

St.Sap.: Standart sapma.

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri.

\*Beklenen homozigot ve heterozigot verileri Levene (1949) kullanılarak elde edilmiştir.

\*\*Nei'nin (1973) beklenen heterozigotluk değeri.

Yukarıda Tablo 4'de populasyon tüm olarak test edildiğinde, yabanıl alel 0.9782 bulunurken, mutant alel sıklığı 0.218 olarak saptanmıştır. Populasyon büyüklüğüne bağlı olarak homozigot ve heterozigot durumdaki bireyler için gözlenen ve beklenen değerler aynı Tablo içerisinde verilmiştir. Populasyonun geneline bakıldığında, gözlenen ve beklenen değerler birbirine çok yakın bulunmuştur. Test edilen populasyon için serbestlik derecesi 1 iken, Ki-kare değeri 0.181986 şeklinde saptanmıştır.

Normal ve kanserli doku şeklinde bir gruplandırma yapıldığında popülasyonun alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk sonuçlarını her bir grup için ayrı ayrı elde edilmiş, her bir gruplama sonucunda gözlenen ve beklenen heterozigotluk düzeylerindeki veriler ayrıntılı olarak verilmiştir.

**Tablo 5.** Normal birey popülasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk istatistik sonuçları (267 birey)

Alel	CCR5 alellerin sıklığı						
Yabanıl alel (521/534)	0.9757						
Mutant $\Delta$ 32 (13/234)	0.0243						

Lokus	Örn. Büyük.	Göz.Hom	Göz.Het.	Bek.Hom*	Bek.Het *	Nei**	Ort.Het
CCR5	534	0.9513	0.0487	0.9524	0.0476	0.0475	0.0301
Ort.	534	0.9513	0.0487	0.9524	0.0476	0.0475	0.0301
St. Sap.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Örn. Büyük.: Örneklem büyüklüğü

Göz.Hom.: Gözlenen homozigot değeri.

Göz. Het.: Gözlenen heterozigot değeri.

Bek.Hom.: Beklenen homozigot değeri.

Bek.Het.: Beklenen heterozigot değeri.

St.Sap.: Standart sapma.

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri.

\*Beklenen homozigot ve heterozigot verileri Levene (1949) kullanılarak elde edilmiştir.

\*\*Nei'nin (1973) beklenen heterozigotluk değeri.

Kanserli dokuların hariç tutulduğu ve 267 bireyi içeren popülasyon için yabanıl alel sıklığı, homozigot ve heterozigot bireylerde gözlenen/beklenen değerler ve diğer sonuçlar Tablo 5'te yer almaktadır. Örneklem için serbestlik derecesi aynı olup, ki-kare değeri 0.153167 bulunmuştur. Mutant alel içeren bireyler %2.43 olarak saptanmıştır.

**Tablo 6.** Meme kanser dokulu birey popülasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk sonuçları (39 birey)

Alel	CCR5 alellerin sıklığı						
Yabancı alel (75/78)	0.9615						
Mutant $\Delta$ 32 (3/78)	0.0385						
Lokus	Örn.Büyük.	Göz.Hom	Göz.Het.	Bek.Hom*	Bek.Het	* Nei**	Ort.Het.
CCR5	78	0.9231	0.0769	0.9251	0.0749	0.0740	0.0301
Ort.	78	0.9231	0.0769	0.9251	0.0749	0.0740	0.0301
St. Sap.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Örn. Büyük.: Örneklem büyüklüğü

Göz.Hom.: Gözlenen homozigot değeri.

Göz. Het.: Gözlenen heterozigot değeri.

Bek.Hom.: Beklenen homozigot değeri.

Bek.Het.: Beklenen heterozigot değeri.

St.Sap.: Standart sapma.

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri.

\*Beklenen homozigot ve heterozigot verileri Levene(1949) kullanılarak elde edilmiştir.

\*\*Nei'nin (1973) beklenen heterozigotluk değeri.

Toplam 39 bireyden oluşan ve % 3.85'lik bir alel sıklığının tespit edildiği meme kanserli örneklem, heterozigotluk yüzdesinin en yüksek olduğu popülasyon olarak saptanmıştır. Fakat gözlenen ve beklenen homozigot ile heterozigot değerleri tamamıyla aynı bulunmuştur. Serbestlik derecesi aynı olup, ki kare değeri 0.0411 şeklinde tayin edilmiştir.

**Tablo 7.** Larinks kanser dokulu birey örneklemeine ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk sonuçları (34 birey)

Alel	CCR5 alellerin sıklığı						
Yabancıl alel (67/68)	0.9853						
Mutant $\Delta$ 32 (1/68)	0.0147						

Lokus	Örn. Büyük.	Göz.Hom	Göz.Het.	Bek.Hom*	Bek.Het	* Nei**	Ort. Het
CCR5	68	0.9706	0.0294	0.9706	0.0294	0.0290	0.0301
Ort.	68	0.9706	0.0294	0.9706	0.0294	0.0290	0.0301
St. Sap.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Örn. Büyük.: Örneklem büyüklüğü

Göz.Hom.: Gözlenen homozigot değeri.

Göz. Het.: Gözlenen heterozigot değeri.

Bek.Hom.: Beklenen homozigot değeri.

Bek.Het.: Beklenen heterozigot değeri.

St.Sap.: Standart sapma.

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri.

\*Beklenen homozigot ve heterozigot verileri Levene(1949) kullanılarak elde edilmiştir.

\*\*Nei'nin (1973) beklenen heterozigotluk değeri.

Toplam 34 bireyin test edildiği larinks kanser dokulu örnekleme mutant genotip içeren heterozigot durumda yalnızca bir birey saptanmıştır. Analiz edilen diğer parametrelerde ise farklı bir sonuç elde edilmemiştir. Aynı serbestlik derecesi esas alındığında, ki-kare değeri 0.000 şeklinde tespit edilmiştir (Tablo 7).

**Tablo 8.** Trioid kanserli birey popülasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk sonuçları (30 birey)

Alel	CCR5 alellerin sıklığı					
Yabancı alel (60/60)	1.00					
Mutant $\Delta$ 32 (0/60)	0.00					

Lokus	Örn. Büyük.	Göz.Hom	Göz.Het.	Bek.Hom*	Bek.Het *	Nei**	Ort.Het.
CCR5	60	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0301
Ort.	60	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0301
St. Sap.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Örn. Büyük.: Örneklem büyüklüğü

Göz.Hom.: Gözlenen homozigot değeri.

Göz. Het.: Gözlenen heterozigot değeri.

Bek.Hom.: Beklenen homozigot değeri.

Bek.Het.: Beklenen heterozigot değeri.

St.Sap.: Standart sapma.

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri.

\*Beklenen homozigot ve heterozigot verileri Levene(1949) kullanılarak elde edilmiştir.

\*\*Nei'nin (1973) beklenen heterozigotluk değeri.

Yukarıda tablo 8'de yer alan tiroid kanserli 30 bireyden oluşan popülasyon ve 20 bireyin test edildiği beyin kanserli küçük alt popülasyonlarda mutant genotip içeren heterozigot halde bireye rastlanılmadığından, istatistiksel olarak bir parametre elde edilememiştir.

**Tablo 9.** Beyin kanserli birey popülasyonuna ait alel frekansı ve bir tek lokus için heterozigotluk sonuçları (20 birey)

Alel	CCR5 alellerin sıklığı						
Yabanıl alel (40/40)	1.00						
Mutant $\Delta$ 32 (0/40)	0.00						

Lokus	Örn. Büyük.	Göz.Hom	Göz.Het.	Bek.Hom*	Bek.Het *	Nei**	Ort.Het.
CCR5	40	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0301
Ort.	40	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0301
St. Sap.	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Örn. Büyük.: Örneklem büyüklüğü

Göz.Hom.: Gözlenen homozigot değeri.

Göz. Het.: Gözlenen heterozigot değeri.

Bek.Hom.: Beklenen homozigot değeri.

Bek.Het.: Beklenen heterozigot değeri.

St.Sap.: Standart sapma.

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri.

\*Beklenen homozigot ve heterozigot verileri Levene(1949) kullanılarak elde edilmiştir.

\*\*Nei'nin (1973) beklenen heterozigotluk değeri.

Yukarıda detaylı şekilde verilen analiz sonuçlarına bakıldığında, popülasyon büyüklüğüne bakılmaksızın tüm gruplarda yapılan hesaplamalara göre **gözlenen frekanslarla, beklenen frekanslar**, hemen hemen birbirinin aynıdır. Doğrudan popülasyonun tümüne uygulanan istatistik analizlere göre 390 bireylik bir örneklem, aynı zamanda 780 alellik bir örnekleme ifade eder (Tablo 4). Tüm gruplamalar için serbestlik derecesi 1 alınmıştır. Ki-kare değeri yaklaşık 0.1819 bulunmuş olup, istatistiksel açıdan anlamlı olabilmesi için kabul edilen düşük  $p$  değeri olan 0.05 düzeyindeki ki-kare değeri 3.84 olmalıdır (İstatistik

kitaplarındaki verilere bakıldığında, 1 serbestlik derecesi ve  $P = 0.05$  seviyesi için verilen kritik  $\chi^2$  değeri 3.841'dir. İkinci olarak normal ve kanserli doku şeklinde yapılan örneklem sonuçları da benzerdir. Bunlardan kanserli olan doku örnekleri çıkartıldıktan sonra yapılan istatistik sonucunda, 267 bireylik örneklemin (Tablo 5) 534 alel içerdiği, mutant alel sıklığının 0.0243 olduğu görülmüştür. Ki-kare değeri ise bir önceki analiz örneğindeki sonuca benzer bulunmuştur (0.1532). Gözlenen heterozigot ve beklenen heterozigotluk ise farklı değildir. Kanserli doku örneklerinde ise en yüksek  $\Delta 32$  alel sıklığı 0.0385 değeri ile meme doku grubunda elde edilmiştir (Tablo 6). Larinks kanserli örneklerde mutant  $\Delta 32$  alel oranı 0.0147 olarak hesaplanmıştır (Tablo 7). Diğer iki kanser grubunda (troid ve beyin tümörü) hiçbir heterozigot birey tespit edilemediğinden ki-kare değerleri sıfır olarak hesap edilirken, gözlenen ve beklenen heterozigotlukta sıfır olarak hesaplanmıştır (Tablo 8 ve 9). Heterozigot yüzdesinin en yüksek olduğu meme kanserli örnekleme dahi gözlenen frekanslarla, beklenen frekanslar hemen hemen birbirine benzer bulunmuştur. Bütün bu ki-kare analiz sonuçları bize popülasyonun test edilmesi sonucunda Hardy-Weinberg dengesinin bozulduğunu gösteren bir delil sunmamaktadır.



#### 4 – TARTIŞMA VE SONUÇ

Populasyonun belirli bir genotipe sahip kısmına genotip frekansı denir. Gen havuzu ise, belirli bir nesildeki populasyonun üreyebilen üyelerinin tümü tarafından oluşturulan tüm gametlerden meydana gelir. Gen havuzunu oluşturan yumurtalar ve spermeler birer haplotiptir ve dolayısıyla her genetik lokus için yalnız birer alel içerirler. Tek bir lokus ele alındığında, farklı gametlerin, farklı aleller taşıdığını görebiliriz. Belirli bir aleli taşıyan gametlerin gen havuzundaki bölümü, alel frekansı olarak ifade edilmekte olup, populasyondaki genotipler ile olduğu kadar, gen havuzundaki çeşitli alelerin frekansının zamanla değişip değişmediğini de test eder. Zira  $\Delta 32$  aleli ilk saptandığından bu yana başta Kuzey Avrupa halkları olmak üzere, bu alelin sıklığı ve populasyon dengesi oldukça ayrıntılı çalışılmıştır. Fakat Türkiye’de genel populasyon sıklığına yönelik çalışma mevcut değildir. Bizler bu çalışma ile bölgesel de olsa rasgele seçilmiş bir örneklemeden ibaret bir populasyonun  $\Delta 32$  alel sıklığını belirledik. Bu çalışmada, bu kısa bilgiler ışığında Türk populasyonundaki genotiplerin dengede olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. İlk olarak genotip frekansı çıkarılmış ve *CCR5* alelinin mutant formu kapsayan heterozigot düzeyi belirlenmiştir. Bu yolla genotip frekansından hareketle alel frekansları hesaplanmıştır. Hardy-Weinberg kanununa göre genotip frekanslarının  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  denkleminde uyması beklenir. Uymaz ise, H-W kanununu tanımlayan parametlerden bir veya birkaçının ihlal edildiği sonucu ortaya çıkar. Buna göre yaptığımız bu çalışmada 390 bireyden oluşan örnekleme *CCR5* yabancı alel frekansının 0.9782, *CCR5*- $\Delta 32$  alel oranının 0.0218 (% 2,18) olduğu belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda  $\Delta 32$  mutant alel sıklığı PZR yoluyla saptanmıştır. Herhangi bir mutant  $\Delta 32/\Delta 32$  genotipi saptanamamıştır. Agaroz ortamında tam olarak ayırt edilemeyen örnekler daha sonra heterozigot bireylerle birlikte akrilamid jel elektroforezinde belirgin bir şekilde ayırt edilmiştir (Şekil 7). Elde edilen akrilamid jel ortamında heterozigot (+/ $\Delta 32$ ) genotipine sahip bireylerle, bazı homozigot yabancı örnekler (+/+) 50 bç’lik DNA büyüklük standardı eşliğinde koşturulmuştur. Şekil 7’de yer alan akrilamid jel görüntüsünde olduğu

gibi, yabancı aleli temsil eden tek bir band ve heterozigot bireylerdeki yabancı aleli temsil eden bandın moleküler standart'ta yer alan 200 bç'inin hemen üzerinde yer aldığı tespit edilmiştir. Heterozigot bireylerde yer alan mutant alel bandının ise moleküler standarttaki 150 bç'inin yakınında lokalize olduğu görülmüştür.

*CCR5* geninin 32 bç kapsayan ve daha sonra  $\Delta 32$  aleli şeklinde adlandırılan varyant açısından homozigot olan bireylerin HIV-1 bulaşımına karşı dirençli olduklarının Liu ve Ark. (1996) ve Samson ve Ark. (1996) tarafından eş zamanlı keşfedilmesinin ardından, Martinson ve Ark., (1997) bu mutant alelin en sık rastlandığı popülasyonların listesini yayınlamıştır. Sonraki yıllarda  $\Delta 32$  mutant reseptör geni dikkatlerin üzerine çevrildiği kemokin reseptörü olmuştur. Çalışmalar yalnızca bununla kalmayıp ardı ardına birçok popülasyonda araştırılmasının yanı sıra, bu ve diğer mutant reseptörlerin diğer patolojik olaylarla ilişkisine de yönelmiştir. Ayrıca  $\Delta 32$  mutant alelinin varlığı popülasyon çalışan evrim biyologları için bir model olmuştur (Stephens ve Ark., 1998).

*CCR5- $\Delta 32$*  alelinin keşfedilmesinden sonra, araştırmacılar hızla çeşitli popülasyonlarda bu alelin sıklığını araştırmaya yönelmişlerdir. 1997'de Martinson ve Ark.'nın (1997) yaptığı çalışma, *CCR5- $\Delta 32$*  alelinin dünya üzerinde yayılış modeli ile ilgili ilginç bir sonuç ortaya çıkarmıştır. *CCR5- $\Delta 32$*  aleli Kuzey Avrupa kökenli popülasyonlarda % 21'e varan bir frekans ile oldukça yaygındır. Buna karşılık, Kuzey Avrupa'dan doğuya ve güneye gidildikçe,  $\Delta 32$  alelinin frekansı düşer. Ortadoğu ve Batı Asya'da ise bu alel hemen hemen hiç yoktur. Dolayısıyla *CCR5- $\Delta 32$*  alelinin insan popülasyonlarındaki coğrafik dağılımı ve bazı insan gruplarının Afrika'dan ayrılmasını takiben, yeryüzüne dağılımı hakkında bilgi veren bir unsur olarak kabul görmektedir. Diğer bir yararı ise HIV-1 epidemiyolojisinde sahip olduğu rol ve tarihteki diğer salgın hastalıkların aydınlatılmasında bir belirteç olarak kabul görmektedir (Martinson ve Ark., 1997). Martinson ve Ark.'nın (1997) dikkatini çeken diğer bir ayrıntı, ortaçağ Avrupa'sını kasıp kavuran, *Yersina pestis*'in neden olduğu kara veba salgınında hayatta kalmış olan bireylerin hikayesidir. Bu araştırmacılar Londra yakınlarında küçük bir yerleşim biriminde bazı insanların bu salgın esnasında hayatta kalmayı

başarmış olmanın sırrını bir dedektif gibi araştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda hayatta kalmış olan bu bireylerin sonraki soylarının  $\Delta 32$  mutant aleli içerdiğini tespit etmişlerdir. Zira veba etkeninin de HIV-1 virüsünde olduğu gibi aynı hedef hücreleri ve benzer moleküler mekanizmaları kullandığı bilinmektedir.

$\Delta 32$  mutant alelini ilginç kılan bir diğer unsur bazı etnik gruplardaki yüksek frekansıdır. Bu bağlamda en çok araştırılan beyaz ırk kökenli bireylerden oluşan popülasyonlardır. Lucotte (1997), Fransa, Kuzey Afrika, Sahra-altı Afrika ve Vietnam'ı kapsayan dört coğrafik bölgede 1031 bireyin bu allel ile ilgili genotiplerini çalışmıştır. Bu çalışmaya göre Kuzey Fransa'da  $\Delta 32$  allel sıklığı %12.9 iken, Güney Fransa'da %9.8, Kuzey Afrika'da %6.3, Sahra-altı Afrika'da %0.16'dır. Vietnam'da ise  $\Delta 32$  aleli bulunamamıştır. Fakat daha sonra Magierowska ve Ark. (1999), yayınladıkları bir mektup ile Vietnam popülasyonunda yaygın mutant  $\Delta 32$  alelinin aksine, (C178R) olarak teşhis ettikleri bir varyantın varlığını rapor etmişlerdir. Bu elde edilen varyantın Avrupa kökenli beyaz bireylerde yer almadığını bildirmişlerdir.

Libert ve Ark., (1997) Türkiye'nin de içinde yer aldığı 18 Avrupa ülkesini kapsayan beyaz ırk popülasyonuna yönelik bir başka çalışmada ise,  $\Delta 32$  alelinin Kuzey Avrupa'dan başlayıp güneye doğru olan dağılımını araştırmıştır. En yüksek frekansın % 16 ile Finlandiya, en düşük frekansın ise % 4 ile İtalyan Sardinia popülasyonuna ait olduğunu ortaya koymuştur. Türkiye ise % 6.3 değeri ile Portekiz ve İspanya'daki Bask bölgesinin beyaz birey popülasyonları ile aynı değerde bulunmuştur. Libert bu sonuçlarla *CCR5- $\Delta 32$*  allelinin Kuzey Avrupa'da tekli bir mutasyon olayı ile birkaç bin yıl önce meydana gelmiş olabileceğini savunmuştur. Yine *CCR5- $\Delta 32$*  alelinin beyaz ırk popülasyonunda yüksek frekansta bulunmasının rasgele genetik sürüklenme yoluyla meydana gelmiş olabileceğinin kolay kabul edilemeyeceğini, homo- veya heterozigot *CCR5- $\Delta 32$*  alel taşıyıcıları ile bağlantılı seçici bir avantajın olabileceği önerisini ileri sürmüştür (Libert ve Ark., 1997).

Lucotte (2001) ise daha sonra  $\Delta 32$  alelini çok geniş çaplı olarak Avrupalı, Orta Doğulu ve Kuzey Afrikalı beyaz ırk kökenli 40 değişik popülasyondan elde ettiği toplam 8842 infekte olmayan bireyden oluşan bir örneklem ile

karşılaştırmalı olarak çalışmıştır.  $\Delta 32$  alel frekansının belirgin bir biçimde kuzey-güney doğrultusunda (Kuzey Avrupa'dan - Kuzey Afrika'ya) istatistiksel açıdan, dikkate değer bir korelasyon katsayısı ile ( $r= 0.83$ ) belirgin bir azalış gösterdiğini ortaya koymuştur. Buna göre  $\Delta 32$  alelinin İsveç, Norveç, Danimarka, Finlandiya ve İzlanda Kuzey halkları arasında % 13.4'lük bir sıklık değeri ile ortalama  $\Delta 32$  değerinden oldukça yüksek olduğunu tespit etmiştir. En düşük değerleri ise Fas, Tunus (Kuzey Afrika), Suriye ve İran gibi daha güney ülkelerinde saptamışlardır. Bu sonuçlara dayalı olarak  $\Delta 32$  alelinin VIII ve X. Yüzyıllarda Vikingler yoluyla yayılmış olacağı tezini ileri sürmektedir. Muhtemelen günümüz Avrupa'sında yüksek frekansta bulunmasının Variola virüsünün Avrupa'daki  $\Delta 32$  taşıyıcılarını MS VIII. yüzyıldan beri yarışmalarına yol açmış olacağını savunmaktadır. Böylece beyaz ırkın Afrikalı-Beyaz atalarının ayrılması ile oluşan bir evrim olayı olabileceği sonucuna varmıştır.

Yine Lucotte (2001) bir başka araştırmasında 31 farklı Avrupa popülasyonu ile birlikte, Kıbrıs, Dağıstan, Kuzey Afrika ve Türkiye'nin (Libert ve Ark., 1997)' de dahil edildiği 7328 infekte olmayan bireyi kapsayan çalışma ile *CCR5* alelinin kuzey-güney doğrultusunda gözlenen enlemsel dağılımını test etmiştir. *CCR5-Δ32* alelinin bütün çalışılan popülasyonlarda yer aldığı ve ortalama değerin % 8 olduğunu saptamıştır. Kuzey Avrupa ülkelerinde en yüksek değer ile başlayan ve kuzey-güney enlemi doğrultusunda *CCR5-Δ32* alel frekansı ile orantılı bir azalışın ortaya çıktığını ( $r=0.795$ ) istatistiksel olarak ortaya koymuştur. Yine aynı şekilde yukarıdaki çalışmasında vurguladığı Viking hipotezinin bu genin dağılımında belirtilen dönemlerde belirleyici olduğunu savunmuştur.

Leboute ve Ark., (1999), Brezilya Amazon kabileleri ile ilgili yaptığı bir çalışmada 300 bireyin tamamının yabancı alel açısından homozigot olduğunu saptamıştır. Böylece bu araştırmacılar  $\Delta 32$  alelinin Avrupa orijinli olduğunu ve Kuzey Amerika'da kırsal popülasyonlardaki varlığının göçün bir sonucu olduğunu doğrulamışlardır. Passos ve Picanço (1998) Brezilya'nın kentsel bölgelerinde yaşayan bireylerden oluşan bir örneklem grubunda % 93'lük bir yabancı alel

sıklığı ve %7'lik bir heterozigot yüzdesine ulaşmışlardır. Mutant alel yüzdesi ise % 3.5 olarak verilmesine karşın, homozigot  $\Delta 32$  içeren birey tespit edilememiştir.

Güney Amerika kıtasında  $CCR5-\Delta 32$  alel frekansının çalışıldığı bir diğer populasyon Şili ile ilgili olanıdır. Desgranges ve Ark., (2001), 63 HIV-1 enfekteli ve 62 enfekte olmayan bireylerden oluşan gruplamasında, hiç  $CCR5-\Delta 32$  homozigot birey saptayamazken, her iki grup arasında gözlenen heterozigot yüzdesi (yaklaşık %2.4) açısından belirgin bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Kuzey Amerika kıtasının  $CCR5-\Delta 32$  alel sıklığı ise oldukça yüksek olup (%11 ila 11,63 arasında), bu değer Kuzey Avrupa için rapor edilen değerlerle yaklaşık olarak eşittir (Dean ve Ark., 1996; Huang ve Ark., 1996; ve Zimmerman ve Ark., 1997).

Avrupa kıtasının en güney ucu olarak görülen Yunanistan da, Papa ve Ark. (2000) tarafından yalnızca Kuzey Yunanistan'ı kapsayan 240 HIV-1 pozitif ve 128 HIV-1 negatif birey ile yapılan çalışma sonucunda,  $CCR5-\Delta 32$  alel frekansı % 5.2 bulunmuştur. Aynı çalışmada yapılan gruplama ile HIV negatif bireylerde 1 adet homozigot  $CCR5-\Delta 32$  genotip elde edilirken, negatif grupta yer alan örneklerin, seropozitif olanlara göre iki kat daha fazla frekansa sahip olduğu ve dolayısıyla heterozigot genotipin HIV enfeksiyonuna karşı kısmi bir koruma sağladığı belirtilmiştir.

Kuzey Avrupa ülkelerinden Polonya populasyonu ile yapılan bir çalışma ise ülkenin hemen hemen tamamını kapsamakta olup, 16 şehirden alınan 861 bireyden oluşan örnekleme ortalama  $CCR5-\Delta 32$  alel frekansı % 10.9 olup bu değer kuzey Avrupa ülkeleri için kaydedilen oranla eşdeğerdir (Jagodzinski ve Lecybyl, 2000).

Uzak-doğuya yönelik yapılan çalışmalarda ise Husian ve Ark. (1998), beyaz ırk kökenli olmayan 100 Hindistanlı bireyden oluşan bir grupta yalnızca bir bireyin heterozigot durumda olduğunu belirlemişlerdir. Martinson ve Ark. (1997), Japonya, Vietnam, Tayvan, Filipinler gibi diğer Uzakdoğu populasyonlarında  $CCR5-\Delta 32$  alelinin hiç temsil edilmediğini belirtmektedir.

$CCR5-\Delta 32$  alel sıklığının en çok test edildiği bir diğer populasyon, değişik ülkelerde yaşayan Yahudi topluluklarıdır. Kuzey Avrupa kökenli Ashkenazi yerel

topluluğu şimdiye kadar rapor edilmiş en yüksek *CCR5-Δ32* alel frekansına (% 20.93) sahiptir (Martinson ve Ark., 1997). Kantor ve Gershoni (1999) İsrail’de, başta Avrupa ve dünyanın değişik bölgelerinden gelip yerleşmiş değişik etnik gruplarda yaptıkları tarama sonucunda, Polonya ve Romanya’dan göç eden topluluklarda *CCR5-Δ32* alel frekansının yüksek oranda temsil edildiğini saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, Orta Doğu ve Kuzey Afrika’dan göç eden Yahudi vatandaşlarında bu değer oldukça düşüktür, diğer Afrika bölgelerinden göç eden Yahudilerde ise yer almamaktadır. Yahudi olmayan azınlıklarda ise (Filistin gibi) oran % 1 ila 2 arasındaki değerlere kadar düşmektedir. Bu çalışmada ortaya konulan sonuç ise *CCR5-Δ32* alelinin daha önce belirtildiği gibi, Kuzey Avrupa kökenli Ashkenezi Yahudi grupları arasında oldukça yaygın olduğudur (Lucotte, 1997). Klitz ve Ark. (2001), diğer bilim insanları ile birlikte, Yahudi Ashkenazi popülasyonunda *CCR5-Δ32* alelinin, tekli bir mutasyon sonucunda Kuzey Avrupa halklarında meydana geldiği ve daha sonraki süreçte Ashkenazi Yahudi bireylerine geçtiğini, VIII. yüzyıl Avrupa’sında görülen tekrarlı epidemik çiçek salgınları (small pox) sonucunda yüksek frekanslar ulaştığını belirtmişlerdir. Daha kapalı bir yaşam tarzı sergileyen Avrupa Yahudilerinin bu frekansın yüksek değerlere ulaşmasında rolünün belirleyici olduğu da aynı araştırmacılar tarafından savunulan bir başka görüştür.

Macaristan halkı ve Macar Çingenerinde *CCR5-Δ32* alel sıklığını kapsayan bir çalışmada ise sırasıyla %11.3 ve %10.1’lik birbirinden farklı olmayan frekanslar elde edilmiştir (Szalai ve Ark., 1998).

Yaptığımız çalışmada *Δ32* alel sıklığı %2.18 çıkmıştır. Bu sonuç *Δ32* alel sıklığının güneye ve doğuya doğru gidildikçe azaldığı fikrini doğrulamaktadır. Dolayısıyla bizim bulduğumuz %2.18’lik oran Orta-Doğu için verilen %1.15 oranıyla uyumludur (Kantor ve Gershoni, 1999). Libert ve Ark., (1998) Avrupa kökenli olan 104 Türk bireyden oluşan örnekleminde %6.3’lük bir mutant *Δ32* sıklığı rapor etmiş olup, bu değer diğer Avrupa kökenli beyaz ırk popülasyonları ile oranlandığında nispeten düşük düzeydedir. Ayrıca bu çalışma Türk popülasyonunun genelini değil sadece amaçlı seçilmiş bir popülasyonu temsil etmektedir. Bizim elde ettiğimiz örneklem rasgele seçilmiş bireylerden oluşması

ve daha fazla sayıda bireyi (390) kapsaması nedeniyle daha homojen bir sonuç yansıtmaktadır. Fakat Türkiye'nin tüm bölgelerini kapsayan ve daha fazla örneklemeden oluşacak bir çalışma, Türk populasyonundaki heterozigot genotip düzeyini daha net yansıtacağı gibi, homozigot mutant genotip varlığının belirlenmesinde de yararlı olacaktır.

Kemokin reseptörlerin, HIV'in hücre içine girişi ile ilgili rolünün keşfedilmesi, HIV patojenezi ve buna yönelik ilaç ve aşı geliştirilmesi ile ilgili yeni yollar açmıştır. Örneğin kullanılan reseptör türüne göre yeni sınıflandırmalar yapılmaktadır. Reseptör taklitleri, reseptör ligandları, kemokinler veya kemokin analoglarına dayalı yeni terapiler *in vitro* olarak geliştirilmekte ve test edilmektedir (McNicholl ve Ark.,1997; O'Brien ve Moore, 2000). Ayrıca CCR5 reseptörüne yönelik değişik antagonist ajanların potansiyel anti viral aktivite sergilemeleri HIV-1 kaynaklı AIDS salgını mücadelesinde başvurulan bir başka yöntemdir (Cascieri ve Spinger, 2000).

Sonuç olarak, Lucotte (2001) tarafından yaklaşık 40 populasyonda 8842 bireyi ve Avrupa'nın tamamı ve Kuzey Afrika'yı kapsayan örneklemin ortaya koyduğu gibi, tüm populasyonlar Hardy-Weinberg dengesinde olup, *CCR5-Δ32* alelinin frekansı bir artış göstermemektedir. Evrim çalışan biyologlar bu artışın olabilmesi için tartışmanın HIV-1 virüsü enfeksiyonuna karşı direnç oluşturmada etkili olduğu kanıtlanan *CCR5 Δ32/Δ32* mutant geninin populasyonda frekansının hızlı bir şekilde nasıl artabileceği konusunda gerek yüksek oranda HIV ile enfekte olan bireylerin, gerekse bu enfeksiyona karşı bireye dirençlilik sağlayan ve populasyonda yüksek frekansta temsil edilen *Δ32* genotipine sahip bireylerin bir arada bulunmaları gerektiği hususunda hemfikirdirler. Bu nedenle, kaydedilmiş en yüksek *Δ32* frekansı ile kaydedilmiş en yüksek enfeksiyon oranını birlikte bulduran insan populasyonlarında, AIDS salgını *Δ32* aleli frekansının hızlı bir şekilde artmasına neden olabilir (Freeman ve Heron, 1999).

Ancak günümüzde hem en yüksek *Δ32* frekansını, hem de en yüksek HIV enfeksiyonunu birlikte barındıran bir populasyon bilinmemektedir. Kuzey Avrupa'daki birçok populasyon 0.1–0.2 oranında bir *Δ32* aleli frekansına sahiptir (Martinson ve Ark., 1997; Stephans ve Ark., 1998). Fakat bu populasyonlardaki

HIV enfeksiyon oranı %1' in çok altındadır (UNAIDS 1998). Bu anlamda Afrika popülasyonlarında yüksek AIDS yoğunluğuna karşın,  $\Delta 32$  frekansının düşük veya yok denecek düzeyde az olması veya Avrupa yerel popülasyonlarında tam tersi yüksek  $\Delta 32$  frekansına karşın AIDS'e karşı etkin koruma yolları nedeniyle *CCR5* alel sıklığında bir değişim beklemek mümkün gözükmemektedir.

Son olarak bu çalışmada kullanılmış olan kanserli doku örnekleri ile, *CCR5* kemokin reseptör mutant geni arasında bir ilişki bulunma olasılığı popülasyon genetiği açısından araştırılmıştır. Tablo 4 ve Tablo 5,6,7,8,9'da verilen gruplamalarda, beyin ve troid kanserli dokularda heterozigot durumda hiç birey saptanamazken, meme doku kanserinde toplam 39 bireyde 3, larinks kanserli bireylerde 1 heterozigot birey tespit edilmiştir. Heterozigot bireylerin saptandığı bu grupların analizinde gözlenen ve beklenen heterozigot değerleri arasında bir fark tespit edilememiştir. Böyle bir araştırmanın amacı mutant alelelin kanserli dokularda bulunmasının veya bulunmamasının bu tür kanser olguları ile bir ilişki kurulabilmesi amacını gütmektedir.

Kemokinler, anjiyoenez kontrolü ve hücre trafiği düzenini sağlamak yoluyla, yangı ve enfeksiyon süresince konak tepkisinin oluşum mekanizmalarına katılırlar. Bu mekanizmaların çoğunluğu kanser oluşumunda da kullanılmaktadır (Vicari and Caux, 2002). Anjiyoenezin uyarılması veya tümör büyümesi, kemokinlerin tümör gelişimini teşvik ettiği tipik durumlardır. Dolayısıyla kemokinler etkilerini aracı kemokin reseptörler yoluyla ortaya koymaları nedeniyle, reseptörlerde gözlenen varyasyonun kanser gelişimini nasıl etkilediği güncel araştırmaların başlıca konuları arasında yer almaktadır (Vicari and Caux, 2002).

AIDS-bağlantılı olduğu düşünülen tümör türlerinden Kaposi sarkoma, Non-Hodgkin's lenfoması, Hodgkin hastalığı ve Anogenital malignansı ile HIV'le enfekte olmuş haldeki diğer kanser türlerinde (derinin bazal hücre karsinoması, testiküler kanser, akciğer kanseri, ağız mukoza, baş ve boyun kanser türlerinde reseptör varyasyon ilişkisi geniş çaplı test edilmiştir (Tirelli and Ark., 2002).

*CCR5* kemokin reseptör geninde saptanmış olan  $\Delta 32$  delesyonun AIDS yakalanma ve enfeksiyon riskini değiştiriyor olması, bu mutant genin AIDS



lenfomasındaki potansiyel rolünün neler olabileceği olasılığı Dean ve Ark. (1999) tarafından araştırılmıştır. Geniş çaplı bir AIDS araştırma merkezinde yürütülen çalışmalarda, Non-Hodgkin Lenfomanın bütün gerekli özelliklerini taşıyan hastalarda yürütülen vaka-kontrol çalışmaları ile bu ilişki ayrıntılı test edilmiştir (Dean ve Ark., 1999). Çalışmada özellikle hastaların yaşı, iş yerleri, AIDS bulaşamadan önceki süreleri ve CD4+ T hücre sayısında gözlenen azalmalar dikkatlice izlenmiştir. Çalışma sonucunda *CCR5-Δ32* aleli AIDS enfeksiyon ve ilerleyiş zamanının kontrol edilmişinden sonra, test edilen bireyler arasında Non-Hodgkin Lenfoma riskinde 3-katlık bir azalma ile ilintili olduğu saptanmıştır. Fakat aynı mutant alel bakımından heterozigot bireylerde Kaposi sarkoma ve AIDS'li hastalarda rastlanılan diğer yaygın malignensi ile fırsatçı enfeksiyonlar arasında bir bağlantı kurulamamıştır (Dean ve Ark., 1999).

Sonuç olarak Türk popülasyonunda *CCR5-Δ32* mutant alelinin sıklığını saptamayı amaçlayan bu çalışma ile, mutant alel frekansı 0.0218 olarak saptanmıştır. Kaynak bilgilerinde vurgulandığı gibi *CCR5-Δ32* mutant formunun Türk popülasyonunda yer aldığı ve kuzey-güney doğrultusunda popülasyonlarda gözlenen frekans azalış modeline uyduğu saptanmıştır. Test edilen popülasyonlarda olduğu gibi 390 bireyden oluşan bu popülasyon örneği Hardy-Weinberg dengesinden sapmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada test edilen meme doku kanserli ve larinks kanserli bireylerde *CCR5 Δ32* mutant alelin varlığına karşın, diğer iki doku kanserli bireyde hiç mutant alel tespit edilememiş olmasının, mutant alel varlığı ile bu kanser türleri arasında bir ilişki kurmanın zor olduğu gözükmektedir. Gerek örneklemin düşük sayıda olması, gerekse AIDS-bağlantılı tümör analizlerinde olduğu gibi sistematik bir çalışmanın yapılmamış olması (anketleme, aile hikayesi vd.) nedeniyle mutant alel ve bu kanser türleri arasında doğrudan veya dolaylı bir bağlantı kurmayı güçleştirmektedir. En azından test edilen bu kanser türlerinde kemokinlerin genel olarak hangi tür rollere sahip oldukları ortaya koymadan, bu tür bir ilişkinin şu an için kurulması zor görülmektedir.

## 6-KAYNAKLAR

- Abacıoğlu, H. 1998 HIV'deki genetic değişkenliğin biyolojik ve epidemiyolojik sonuçları. HIV-AIDS ; 1(3): 106-109.
- Arslan, S. 2002. Türk Populasyonunda NAT1 (N-asetiltransferaz tip 1) Lokusu Polimorfizmi. Yüksek Lisans Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Campell, N.A. 1996. Biologie. Dt. Übers. Hrsg. Von Jürgen Markl., 1997. Spectrum Akad. Verl. ISBN 3-8274-0032-5.
- Cascieri, M.A. and Springer, M.S. 2000. The chemokine / chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention. Current Opinion in Chemical Biology; 4: 420-427.
- Clapham, P.R. and McKnight A. 2001. HIV-1 receptors and cell tropism. British Medical Bulletin; 58: 43-59.
- Cunnigham, A.L., Li, S., Juarez, J., Lynch, G., Alali, M. and Naif, H. 2000. The level of HIV infection of macrophages is determined by interaction of viral and host genotypes. Journal of Leucocyte Biology; Volume 68.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E.W., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detel, R., O'Brien, S.J. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of *CKR5* structural gene. Science ; 273: 1856-1862.
- Desgranges, C., Carvajal, P., Afani, A., Guzman, M., Sasco, A., Sepulveda, C. 2001. Frequency of *CCR5* gene 32-basepair deletion in Chilean HIV-1 infected and non-infected individuals. Immunology Letters 76: 115-117.
- Freeman, S., and Herron, J.C. 1999. Evolutinary Analysis -Prentise- Hall, Inc. (second edition)- Chapter 1.
- Hillis, D., Moritz, C. 1990. Molecular Systematics. Sinauer, Associates. Inc. Publishen, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Holmes, E.C. 2000. On origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Boil. Rev*, 76.pp 239-254.
- Huang, Y., Paxton, W.A., Wolinski, S.M. et al. 1996. The role of mutant *CCR5* allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Mol Med*, 2: 1240-3.
- Jagodzinski, P.P., Lecybyt, R., Ignaca, M., Juszczak, J., Trzeciak, W.H. 2000. Distribution of  $\Delta 32$  allele of the *CCR5* gene in the population of Poland. *J Hum Genet*; 45: 271-274.
- Kantor, R. and Gershony, J.M. 1999. Distribution of the *CCR5* Gene 32- Base Pair Deletion in Israeli Ethnic Groups. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*; 20: 81-84.
- Klitz, W., Brautbar, C., Schito, A.M., Barcellos, L.F., Oksenberg, J.R. 2001. Evolution of the *CCR5*  $\Delta 32$  Mutation Based on Haplotype Variation in Jewish and Northern European Population Samples. *Human Immunology*;62: 530-538.
- Leboute, A.P.M., Carvalho, M.W.P., Simões, A.L. 1999. Absence of the  $\Delta CCR5$  mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. *Hum Genet*; 105: 442-443.
- Levene, H., (1949). On a matching problem in genetics. *Ann. Math. Stat.* 20:91-94
- Libert, F., Cochaux, P., Beckman, G., Samson, M., Aksenova, M., Cao, A., Czeizel, A., Claustres, M., Ferrarri, M., Ferrec, C., Glover, G., Grinde, B., Güran, S., Kucinkas, V., Lavinha, J., Mercier, B., Ogur, G., Peltonen, L., Rosatelli, C., Schwartz, M., Spitsyn, V., Timar, L., Beckman, L., Parmentier, M., Vassart, G. 1997. The  $\Delta CCR5$  mutation conferring protection against HIV- 1 in Caucassian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Oxford Journals Online*; p. 399- 406.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A. and Landau, N.R. 1996. Homozygous defect in HIV-1 co receptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*; vol. 86, 367-377.

- Lucotte, G. 1997. Frequency of the CC chemokine receptor 5  $\Delta 32$  allele in various populations of defined racial background. *Biomed & Pharmacother*; 51: 469-473
- Lucotte G. 2001. Distribution of the *CCR5* Gene 32-Basepair Deletion in West Europe. A Hypothesis About the Possible Dispersion of the Mutation by the Vikings in Historical Times. *Human Immunology*; 62: 933-936.
- Lucotte G. 2002. Frequencies of 32 base pair deletion of the ( $\Delta 32$ ) allele of the *CCR5* HIV-1 co-receptor gene in Caucasians: a comparative analysis. *Infection, Genetics and Evolution*; 1 : 201-205.
- Magierowska, M., Lepage, V., Lien, T.X., Lan, H.N.T., Guillotel, M., Issafras, H., Reynes, J., Fleury, H.J.A., Chi, N.H., Follezou, J., Debre, P., Theodorou, I., Barré-Sinoussi, F. 1999. Novel variant of the *CCR5* gene in a Vietnamese population. *Microbes and Infection*; 2: 123-124.
- Martinson, J.J., N. H. Chapman et al. 1997. Global distribution of the *CCR5* gene 32-base- pair deletion. *Nature Genetics* 16: 100-103.
- McNicholl, J.M., Smith, D.K., Quari, S.H. and Hodge, T. 1997. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene *CCR5* and its allele ( $\Delta 32$ *CCR5*). *Emerging Infectious Diseases*; Vol 3, No.3; 261-269.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Math. Acad. Sci. USA*. 70: 3321-3323.
- O'Brien, S.J., Moore, J.P. 2000. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and in progression to AIDS. *Immunologic Reviews*; Vol. 177: 99-111.
- Papa, A., Papadimitriou, E., Adwan, G., Clewley, J.P., Malissiovas, N., Ntoutsos, I., Alexiou, S., Antoniadis, A. 2000. HIV-1 co-receptor *CCR5* and *CCR2* mutations among Greeks. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; 28: 87-89.
- Passos, G.A.S.J. and Picanço, V.P. 1998. Frequency of the  $\Delta$ *CCR5* deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunology Letters*; 61: 205-207.

- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoum eroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G. and parmeintier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the *CCR5* chemokine receptor gene. *Nature*; Vol. 382.
- Stephens, J. C., D. E. Reich et al. 1998. Dating the origin of *CCR5-Δ32* AIDS resistance allele by coalescence of haplotypes. *American Journal of Human Genetics* 62: 1507-1515.
- Szalai, C., Cs asz ar, A., Czinner, A., Szab o, T., Falus, A. 1998. High frequency of the *CCR5* deletion allele in Gypsies living in Hungary. *Immunology Letters*; 63: 57-58.
- Tirelli, V., Bernardi, D., Spina. M. and Vaccher. E.2002. AIDS-related tumors: Integrating antiviral and anticancer therapy. *Oncology Haematology*, 41:299-315
- UNAIDS. 1998. AIDS epidemic update: December 1998.(Geneva Switzerland). World Wide Web URL:<http://WWW.unaids.org>.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., and Zoller, M. 1992. *Recombinant DNA: second eddition*, New York.
- Vicari, A.P. and Caux, C. 2002. Chemokines in Cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*; 13: 143-154.
- Yeh F.C., Yang R. and Boyle T. 1999. population genetic analysis POPGENE version 1.32. Ag/For Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta and Center For International Forestry Research.
- Yılmaz, G., ve  zkan, E. 2002. Retroviruslar. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*; 1322-1340.
- Zimmerman, N., Bernstein, J., Rothenberg, M.E. 1998. Polymorphism in the human CC chemokine receptor-3 gene. *Elsevier Science*: 170-174.

## 6- ÖZGEÇMİŞ

1974'te Hollanda'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Hatay'ın İskenderun ilçesinde tamamladı. 1990 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 1994'te bu bölümden mezun oldu.

1995 yılında evlendi. 1996 yılında Sivas Kızılay Polikliniğinde işe başladı. 2000 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Kızılay Tıp Merkezinde Laboratuvar Şefi olarak görevine devam etmektedir.





T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

10.01.2003

SAYI : B.30.2.CUM.0.1H.00.00/

KONU :

Karar No: (8) 8/2003

Etik Kurul Kararı:

"Türk Populasyonunda HIV'in CCR5 Genine Ait 32 Alel Dağılımı" adlı  
Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi: Emire YILMAZ'a ait Tez Projesi.  
Yerel Etik Kurul Kararında uygun olduğuna;

Karar verilmiştir.

Prof.Dr.A. Oktay İSİK

Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ

Prof.Dr.Fahrettin GÖZE  
KATİEMADI

Prof.Dr.Öge ÇETINKAYA

Doç.Dr.Tijen KAYA

Doç.Dr.Okay BULUT

Doç.Dr.Serdar SOYDAN

ASLI GIBİDİR

Fazlı KIRIKTAŞ  
Enstitu Sekreteri

