ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Müzeyyen İZMİRLİ

PROSTAT KANSERİNİN ELAC2 VE SRD5A2 GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLER İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSERİNİN ELAC2 VE SRD5A2 GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLER İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Müzeyyen İZMİRLİ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 08/01/2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza
Prof.Dr. Burhan ARIKAN
Danışman

İmza
Prof.Dr. Davut ALPTEKİN
2. Danışman

İmza
Prof.Dr. Osman DEMİRHAN
Üye

İmza
Doç.Dr. Hatice GÜVENMEZ
Üye

İmza
Yrd. Doç.Dr. Ashabil AYGAN
Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod no:

Prof.Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FEF2008D14

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
DOKTORA TEZİ

PROSTAT KANSERİNİN ELAC2 VE SRD5A2 GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLER İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Müzeyyen İZMİRLİ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof.Dr. Burhan ARIKAN
Yıl : 2009, Sayfa: 151
Jüri : Prof.Dr. Burhan ARIKAN
Prof.Dr. Davut ALPTEKİN
Prof.Dr. Osman DEMİRHAN
Doç.Dr. Hatice GÜVENMEZ
Yrd. Doç. Dr. Ashabil AYGAN

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması ve organ hacminin malign büyümesi olarak tanımlanabilir. Prostat kanseri hastalığına neden olan faktörler; hormonal, diyet, çevresel ve genetik faktörler olarak sıralanabilir. Prostat kanserine neden olan pek çok gen vardır. Bunlar; ELAC2, SRD5A2, HPC1, HPCX, AR, PSA ve vb. genler sayılabilir. ELAC2 geni 24 ekzondan meydana gelip, 25.1 kb büyüklüğündedir ve 17p11.2'de haritalanmıştır. Steroid 5α-redüktaz Tip II enzimi, 28.398kDa moleküler ağırlıkta olan bir enzimdir. Sorumlu olan gen SRD5A2 olarak isimlendirilmekte olup, 5 ekzon ve 4 introndan meydana gelmektedir. Bu gen, 2p22-23'te haritalanmış ve gen büyüklüğü yaklaşık olarak 56.4 kb'dır. Bu çalışmanın amacı; prostat kanseri ile ELAC2 geni Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri ile SRD5A2 geninin Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Bu amaçla, polimorfizmlerin bulunduğu bölgeler Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Polimorfizmler uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada; ELAC2 geni Ser217Leu ($p=0,001<0,05$) ve SRD5A2 geni Ala49Thr ($p=0,001<0,05$) polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak, ELAC2 geni Ala541Thr ($p=0,494<0,05$) ve SRD5A2 geni Val89Leu ($p=0,460<0,05$) polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, ELAC2 geni, SRD5A2 geni

ABSTRACT
PhD THESİS

TO INVESTIGATE RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISMS OF THE ELAC2 and THE SRD5A2 GENES AND PROSTATE CANCER

Müzeyyen İZMİRLİ

UNIVERSITY of ÇUKUROVA
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT of BIOLOGY

Supervisor: Prof.Dr. Burhan ARIKAN
Year : 2009, Pages: 151
Jury : Prof.Dr. Burhan ARIKAN
Prof.Dr. Davut ALPTEKİN
Prof.Dr. Osman DEMİRHAN
Assoc.Prof.Dr. Hatice GÜVENMEZ
Asist.Prof.Dr. Ashabil AYGAN

Prostate cancer can be determined as the alteration of the balance between cell proliferation and cell death in the prostate bladder which causes malign increase of the organ volume. The factors causing prostate cancer can be hormonal, diet, environmental and genetical. There are a number of genes causing prostate cancer. These are ELAC2, SRD5A2, HPC1, HPCX, AR, PSA etc. genes. ELAC2 gene composed of 24 exons is 25.1 kb and has been mapped to chromosome 17p11.2. Steroide 5α-reductase type II enzyme has a 28.398 kDa molecular weight. The responsible gene is called as SRD5A2 that is consisted of 5 exons and 4 introns. This gene has been mapped to chromosome 2p22-23 and has approximately 56.4 kb length. The aim of this study is to investigate relationship between Ser217Leu and Ala541Thr polymorphisms of the ELAC2 gene and Ala49Thr and Val89Leu polymorphisms of the SRD5A2 gene and prostate cancers. For this aim, regions where polymorphisms are located in were amplified with Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Polymorphisms were determined by using available restriction enzymes with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method. In this study, a statistically significant relationship has been found between ELAC2 gene Ser217Leu ($p=0,001<0,05$) and SRD5A2 gene Ala49Thr ($p=0,001<0,05$) polymorphisms and prostate cancers. However, the relationships between Ala541Thr ($p=0,494>0,05$) polymorphisms of ELAC2 gene and Val89Leu ($p=0,460>0,05$) polymorphisms of SRD5A2 gene and prostate cancers hasn't been found statistically significant.

Key Words: Prostate cancer, ELAC2 gene, SRD5A2 gene

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde beni destekleyen, yönlendiren, tez çalışmalarımın her aşamasında bilimsel katkılarını esirgemeyen danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Burhan ARIKAN ile Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e, laboratuvar aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Osman DEMİRHAN ile Öğr. Gör. Ali İrfan GÜZEL'e ve istatistiksel analizlerimde yardımcı olan Prof. Dr. Hamza EROL'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren aileme, manevi desteklerini her zaman hissettirdikleri ve hep yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……I
ABSTRACT……II
TEŞEKKÜR……III
İÇİNDEKİLER……...IV
ÇİZELGELER DİZİNİ ……...VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ ……X
SİMGELER ve KISALTMALAR..... XVIII
1.GİRİŞ……1
1.1. Kanser……..……1
1.1.1. Kanser biyolojisi..... 1
1.1.1.1. Normal Hücre Çoğalmasının Özellikleri..... 1
1.1.1.2. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri..... 5
1.1.2. Aşırı Kanser Hücresi Üretiminin Nedeni..... 7
1.1.2.1. Anormal Hücrelerin Apopitoza Gidememesi..... 7
1.1.2.2. Hücre Proliferasyonunu Anormal Şekilde Uyaran Genetik Bozukluklar..... 8
1.1.2.3. Tümör Supressör Genlerdeki Anormallikler..... 9
1.1.2.4. Tümör anjiogenezi..... 10
1.1.2.5. Onkogenler..... 11
1.2. Prostat Kanseri..... 15
1.2.1. Hormonal Etkiler..... 17
1.2.1.1. Androjen..... 17
1.2.1.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)..... 19
1.2.2. Diyet ve Çevresel Faktörler..... 20
1.2.3. Genetik Faktörler..... 23
1.2.3.1. Kalıtsal Prostat Kanseri..... 24
1.2.3.1.(1). ELAC2 Geni..... 25
1.2.3.1.(2). Kalıtsal Prostat Kanseri 1 Geni (HPC1)..... 28

1.2.3.1.(3). PCAP (Putative Cancer of Prostate) ve CAPB (Capping Protein Beta) Geni 28
1.2.3.1.(4). HPCX Geni 28
1.2.3.2. Sporadik Prostat Kanseri 29
1.2.3.2.(1). 5α-Redüktaz Tip II Geni (SRD5A2) 29
1.2.3.2.(2). Androjen Reseptör (AR) Geni 35
1.2.3.2.(3). Prostat-Spesifik Antijen (PSA) Geni 36
1.2.3.2.(4). Sitokrom p450c17α Geni (CYP17) 37
1.2.3.2.(5). Sitokrom p450 3A4 Geni (CYP3A4) 38
1.2.3.2.(6). Kromozom 8p'de Heterozigozitenin Kaybolması 39
1.2.3.2.(7). Tip 2, 3 β-Hidroksisteroid Dehidrogenaz Geni (HSD3B2) 39
1.2.3.2.(8). Sitokrom P459C17α ve Sitokrom P450 3A4 Geni 39
1.2.3.2.(9). Sitokrom P450 3A4 Geni (CYP3A4) 39
1.2.3.2.(10). Vitamin D Reseptörü 40
1.2.3.2.(11). İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü 41
1.2.3.3. Diğer Genetik Değişiklikler 42
1.2.3.3.(1). Telomeraz 42
1.2.3.3.(2). Glutatyon-S-Transferaz Pi 42
1.2.3.3.(3). PTEN/AKT Geni 43
1.2.3.3.(4). p27 Geni 44
1.2.3.3.(5). MYC Geni 45
1.2.3.3.(6). bcl2 Geni 46
1.2.3.3.(7). p53 Geni 46
1.2.3.3.(8). Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) 46
1.2.3.3.(9). Metalloproteinazlar 47
1.2.3.3.(10). E-Kaderin Geni 47
1.2.4. Prostat Kanserinin İlerlemesi 47
1.2.5. Yeni Gelişmeler: Genomik ve Postgenomik Dönemler 48
1.2.6. Stratejiler 48
1.2.7. Yüksek Risk Altındaki Bireylerin Taranması 49

1.2.8. Onkolojide Moleküler Tanı 49
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 51
3. MATERYAL VE METOD 60
3.1. Materyal……..……...60
3.1.1. Kimyasallar 60
3.1.2. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler 61
3.2. Metod……..……...62
3.2.1. DNA İzolasyonu 62
3.2.1.1. Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi 62
3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi 63
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 64
3.2.3.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları 65
3.2.3.2. PCR Reaksiyonun Hazırlanması 67
3.2.4. PCR Ürününün Elektroforezi 75
3.2.5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR Ürünlerinin Kesimi 75
3.2.5.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamit Jel Elektroferezi (EK-6) ve Yorumlanması 76
3.2.6. İstatistik Analiz 78
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 79
4.1. Bulgular……..……...79
4.2. Tartışma……..……126
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 134
KAYNAKLAR……136
ÖZGEÇMİŞ……..146
EKLER……..147
EK-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı 147
1.1. Lizis Tamponu 147
1.2. Fizyolojik Tampon 148
1.3. TE-9……..……..……...148

1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) Solüsyonu 148
1.5. TE Tamponu (pH 7.0 ve 8.0) 148
EK-2. PCR ÇEŞİTLERİ 149
2.1. Demirlenmiş "Anchored" PCR 149
2.2. Geri "Revers" Transkripsiyon PCR (RT-PCR) 149
2.3. Asimetrik PCR 150
2.4. Ters "Inverse" PCR (IPCR) 150
2.5. In Situ PCR……...…….…….……151
2.6. Multipleks PCR. 151
2.7. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) 151
2.8. İmmuno PCR.……...……152
EK-3. Jel Elektroforezi 153
3.1. DNA'nın moleküler büyüklüğü 153
3.2. Agaroz konsantrasyonu 154
3.3. DNA'nın Konformasyonu 154
3.4. Uygulanan Voltaj 154
3.5. Elektrik Akımının Yönü 155
3.6. Baz Kompozisyonu ve Isı 155
3.7. Boyaların Etkisi 155
3.8. Eletroforez Tamponunun Kompozisyonu 156
EK-4. Agaroz Jelin Hazırlanması 157
4.1. Yükleme Tamponu (6X) 157
EK-5. Kullanılan Enzimler ve Tampon Sistemleri 158
5.1. Restriksiyon Endonükleazlar 158
EK-6. Poliakrilamit Jel Elektroforezi 159
6.1. %30 Poliakrilamit 160
6.2. %25 Amonyum Per Sulfat (APS) 161
6.3. 5X TBE Tamponu (pH 8.0) 161
6.4. Ethidium Bromid (EtBr= 10mg/ml) 161

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. ELAC2 geni 7. ekzonu 69
Çizelge 3.2. ELAC2 geni 17. ekzonu 70
Çizelge 3.3. Ser217Leu polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu 71
Çizelge 3.4. Ala549Thr polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu 72
Çizelge 3.5. SRD5A2 geni 73
Çizelge 3.6. SRD5A2 geni polimorfizmleri için PCR reaksiyonu 74
Çizelge 4.1. Adenokarsinom prostat kanserlerinin ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili 105
Çizelge 4.2. BPH hastalarının ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili 107
Çizelge 4.3. Sağlıklı kontrol bireylerin ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili 108
Çizelge 4.4. Hastaların ve akrabalarının ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili 109
Çizelge 4.5. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 110
Çizelge 4.6. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 111
Çizelge 4.7. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 112
Çizelge 4.8. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 113
Çizelge 4.9. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 114
Çizelge 4.10. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 115

Çizelge 4.11. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 116
Çizelge 4.12. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 117
Çizelge 4.13. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 118
Çizelge 4.14. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 119
Çizelge 4.15. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 120
Çizelge 4.16. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 121
Çizelge 4.17. PSA gruplarının ELAC2 Ser217Leu polimorfizmi üzerindeki dağılımı 122
Çizelge 4.18. PSA gruplarının ELAC2 Ala541Thr polimorfizmi üzerindeki dağılımı 122
Çizelge 4.19. PSA gruplarının SRD5A2 Ala49Thr polimorfizmi üzerindeki dağılımı 123
Çizelge 4.20. PSA gruplarının SRD5A2 Val89Leu polimorfizmi üzerindeki dağılımı 123
Çizelge 4.21. PSA grupları ile adenokarsinom prostat kanseri ve kontrol grupları arasındaki ilişki 124
Çizelge 4.22. PSA grupları ile BPH hastaları ve kontrol grupları arasındaki ilişki 124
Çizelge 4.23. PSA grupları ile prostat kanseri ve kontrol grupları arasındaki ilişki 124
Çizelge 3.1. Agoroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri 153
Çizelge 5.1. Restriksiyon endonükleazlar 158
Çizelge 6.1. Akrilamit 159

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Normal ve büyümüş prostat bezinin şematize edilmiş hali (http://www.prostathapi.com/prostat-belirtileri.html) 16
Şekil 1.2. ELAC 2 geninin 17. kromozom üzerindeki yeri ve yapısı (Simard ve ark, 2003) 25
Şekil 1.3. ELAC 2 proteinin genel şematize edilmiş hali (Simard ve ark, 2003). 26
Şekil 1.4. 5α-redüktaz enziminin rol oynadığı androjen metabolizması biyokimyasal yolağı (Simard ve ark, 2003) 30
Şekil 1.5. Androjen metabolizması (Simard ve ark, 2003) 31
Şekil 1.6. 5α-redüktaz tip II geninin 2. kromozom üzerindeki yeri, yapısı ve proteinin genel yapısı (Simard ve ark, 2003). 33
Şekil 4.1. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü 80
Şekil 4.2. ELAC2 Ala541Thr polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü 80
Şekil 4.3. SRD5A2 Geni Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü 81
Şekil 4.4. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B2, A4, A4.1, A5, B3, A6, A7, A8, A9 ve B4 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 82
Şekil 4.5. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A11, B5, K2, B6, A12, A13, A13.1, B7 ve B8 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 82
Şekil 4.6. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A20.1 K3, A21 ve A22 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 82
Şekil 4.7. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A23, A24, A24.1, A25, B9, A26.1, A26, A27 ve A28 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 83
Şekil 4.8. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A29, B10, A30, B11, A31, A32, K4, A33, A31.1, A34 ve B12 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 83

Şekil 4.9. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A35, B13, B13.1, A35.1, A36, A36.1, K5, A37 ve K6 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü..... 83
Şekil 4.10. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B14, A38, B15, A39, A40, A40.1, B16, A41, A42 ve A42.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü.. 84
Şekil 4.11. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A43, A43.1 A44, A45, A45.1, B39, K19, K20 ve K21 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü..... 84
Şekil 4.12. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A53, A54, A55, K35, B17, A56, B18, A57, A58, A59 ve A60 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 84
Şekil 4.13. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26, K7 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü..... 85
Şekil 4.14. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B28, B29, A61, A62, A63, B30, B31, A64, A65, A65.1 ve A65.2 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 85
Şekil 4.15. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B34, B35, B36, K10, A66, K11, A67, K12 ve B37 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü..... 85
Şekil 4.16. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B38, K13, K14, K15, K16, K17 ve K18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü..... 86
Şekil 4.17. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; K23, K24, K25, K26, K27, K28, K29 ve K30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 86
Şekil 4.18. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A1, A1.1, K1, A2, A2.1, A3, B1, B2 ve A4 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 87
Şekil 4.19. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A4.1, A5, B3, A8, A9, B4, A10, A11 ve B5 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 87
Şekil 4.20. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B6, A12, A13, A13.1, B7, B8, A14 ve A15 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 87
Şekil 4.21. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A16, A17, A18, A19, A19.1, A20, K3, A21, A22, A23 ve A24 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 88
Şekil 4.22. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A24.1, A25, B9, A26.1, A27, A28, A29 ve B10 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 88

Şekil 4.23. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B11, A31, A32, K4, A33 ve A31.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 88
Şekil 4.24. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A30, A35, B13, A13.1, A35.1, A36, A36.1, B5, B6 ve B15 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 89
Şekil 4.25. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A34, B12, B14 A38, A39, A40, A40.1 ve B16 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 89
Şekil 4.26. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A41, A42, A42.1, A43, A44, A45, A45.1, A65, A65.1 ve A65.2 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 89
Şekil 4.27. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A48, A49, A50, A51, A52, A53, A54 ve A55 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 90
Şekil 4.28. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K35, B17, A56, B18, A57, A58, A59, A60, A45.1 B27 ve B30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 90
Şekil 4.29. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K8, K9, K31 ve K34 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 90
Şekil 4.30. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B35, B36, K10, A66, K11, A67, K12, B37, B38, K13 ve K14 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 91
Şekil 4.31. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K32, K15, K16, K33, K17, K18, B39, K19 ve K20 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 91
Şekil 4.32. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K23, K24, K25, K26, K27, K28, K29 ve K30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 91
Şekil 4.33. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B34, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25 ve B26 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü..... 92
Şekil 4.34. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K7, B28, B29, A61, A62, A64 ve B22 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 92
Şekil 4.35. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A1, A1.1, K1, A2, A2.1 ve A3 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü..... 93

Şekil 4.36. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B2, A4, A4.1, A5, B3, A6, A7, A8, A9 ve B4 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 93
Şekil 4.37. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B6, A12, B7, A15, A16, A17 ve A18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 94
Şekil 4.38. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A19, A20.1, A20, K3, A21, A22 ve A23 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 94
Şekil 4.39. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A24, A24.1, A25, B9, A26.1, A26, A27, A28, A29 ve B10 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 94
Şekil 4.40. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A11, A30, B11, A31, A32, K4, A33, A31.1 ve A34 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 95
Şekil 4.41. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B12, A35, B13, B13.1, A35.1, A36, A36.1, K5, A37, K6 ve B14 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 95
Şekil 4.42. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A38, B15, A39, A40, A40.1 ve B16 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 95
Şekil 4.43. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A41, A42, A42.1, A43, A43.1, A44, A45,A45.1, A46 ve A46.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 96
Şekil 4.44. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A48, A49, A50, A51, A52, A53, A54, A55, K35, B17 ve A56 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 96
Şekil 4.45. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B18, A57, A58, A59, A60, K8, K9 ve K31 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 96
Şekil 4.46. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B34, K32, B35, B36, K10, A6, K11, A67,K12, B37 ve B38 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü .97
Şekil 4.47. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; K13, K14, K33, K15, K16, K17 ve K18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 97
Şekil 4.48. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B39, K19, K20, K21, K22, K23, K24, K25, K26, K27 ve K28 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 97

Şekil 4.49. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B19, B20, B21, B22, B23, B24, K33 ve A47 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 98
Şekil 4.50. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B25, B26, K7, B27,B28, B29, A61 ve A62 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 98
Şekil 4.51. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A63, B30, B31, A64, A65, A65.1, A65.2, K29, K30, K31 ve K33 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 98
Şekil 4.52. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A2.1, A3, B1, B2, A4, A4.1, A5 ve B3 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 99
Şekil 4.53. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A6, A7, A8, A9, B4, A10, A11, B5, K2, B6 ve A12 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 99
Şekil 4.54. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A13, A13.1, B7, B8, A14, A15, A16, A17, A18, A19 ve A20.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 100
Şekil 4.55. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B9, A26.1, A26, A27, A28, A29, B10 ve B30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 100
Şekil 4.56. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B11, A31, A32, K4, A33, A31.1, A34, B12, A35 ve B13 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü .. 100
Şekil 4.57. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B13, B13.1, A35.1, A36, A36.1, K5, A37 ve K6 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 101
Şekil 4.58. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B14, A38, B15, A39, A40, A40.1, B16, A41, A42 ve A42.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 101
Şekil 4.59. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A43.1, A44, A45, A45.1, A46, A47 ve A48 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 101
Şekil 4.60. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A49, A50, A51, A52, A53, A54, A55, K35, B17, A56 ve B18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 102
Şekil 4.61. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A57, A58, A59, A60, B19, B20, B21 ve B22 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 102

Şekil 4.62. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A1, A1.1, K1, A2, A46.1, K15, K16, K22, K23, K24 ve K25 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 102
Şekil 4.63. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; K34, B34, K33, B35, B36, K10, A66 ve K11 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 103
Şekil 4.64. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A67, K12, B37, B38, K13, K14 ve K32 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 103
Şekil 4.65. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; K17, K18, B39, K20, K21, K22, K23, K24, K25 ve K26 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü ... 103
Şekil 4.66. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B23, B24, B25, B26, K7, B27, B28, B29, A61 ve A62 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü ... 104
Şekil 4.67. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A63, B30, B31, A64, A65, A65.1, A65.2, B32, B33, K8 ve K9 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü 104
Şekil 4.68. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 110
Şekil 4.69. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 111
Şekil 4.70. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 112
Şekil 4.71. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 113
Şekil 4.72. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 114
Şekil 4.73. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 115
Şekil 4.74. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 116
Şekil 4.75. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı..... 117

Şekil 4.76. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 118
Şekil 4.77. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 119
Şekil 4.78. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 120
Şekil 4.79. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı 121
Şekil 4.80. PSA grupları ile hasta grupları arasındaki ilişki 125

SİMGELER ve KISALTMALAR

A	Adenin
A	Amper
AD	Anabilim Dalı
A-diol-g	Androstenidol glukuronide
Ala	Alanin
APS	Amonyum Persülfat
AR	Androjen reseptörü
ASAP	Atipik küçük asiner proliferasyon
bç	Baz çifti
BPH	Bening Prostat Hiperplazisi
BRCA	Meme kanseri
C	Sitozin
CAPB	Capping Protein Beta
CBS	Sistatyon-β-Sentaz
CDKN20	Familyal melonoma
C terminal	Karboksi terminal
c-onc	Proto-onkogen
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHT	Dihidrotestesteron
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	deoksi Nükleotid Tri Fosfat
erb-B	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FAPC	Familyal adenomatozis polipozis Coli
FISH	Fluoresan In Situ Hibridizasyon
fms	Koloni uyarıcı faktör reseptörü
fPSA	Free PSA
G	Guanin

GDP	Guanozin Di Fosfat
GTP	Guanozin Tri Fosfat
GFR	Büyüme Faktörü Reseptörü
GST	Glutatyon-S-transferaz
5-HETE	5-Hidrosieikosatetraenoik aside
HPC	Kalıtsal Prostat Kanseri
kb	Kilobaz
kD	Kilodalton
L	Litre
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
Leu	Lözin
LTR	Uç tekrar dizileri
µ	Mikro
MEN1	Multipl endokrin neoplazi
$MgCl_2$	Mağnezyum Klorür
ml	Mililitre
MR	Manyetik Rözenans
mRNA	"Messenger RNA"
NaCl	Sodyum Klorür
NADH	Nikotin Amid Dinükleotidin indirgenmiş hali
NADP	Nikotin Amid Dinükleotid fosfat
NADPH	Nikotin Amid Dinükleotid Fosfatın indirgenmiş hali
NFSE	$P450_{NF}$–spesifik element
PCAP	Putative Cancer of Prostate
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIN	Prostatik epitelyal neoplazi
PKC	Protein Kinaz C
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PSCA	Prostat Stem Cell Antijen
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Revers transkriptaz-polimeraz zincie reaksiyonu
sbk	sikline bağımlı kinaz
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
Ser	Serin
SHBG	Hormon bağlayıcı globulin
SRD5A	Steroid 5α-redüktaz enzimi geni
ssDNA	Tek İplikli DNA
T	Testesteron
T	Timin
TBE	Tris Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N'-Tetra Metilen Daimin
Thr	Treonin
Tm	Erime ısısı
UTR	Translasyonu Olmayan Bölge
UV	Ultra Viyole
V	Volt
Val	Valin
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
v-onc	Retroviral onkogen
WT1	Wilm's tümörü

1.GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, belirli genlerde bir takım etkilerle oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ve zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan, hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Bu bozukluk neticesinde, hücre döngüsünün bozularak sürekli olarak yeni kanser hücrelerinin meydana gelmesi ve yok edilememesi ile karakterize bir hastalıktır (Cummings ve Klug, 2002).

1.1.1. Kanser biyolojisi

1.1.1.1. Normal Hücre Çoğalmasının Özellikleri

Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyacına göre belirlenir. Hücre çoğalmasının azalması veya artan ölüm hızı vücuttaki aşırı hücre oluşumunu engeller (Lowitz ve Casciato, 2007).

Hücre Siklusu

Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri aşamadan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilirler. Hücre siklusunda beş safha görülmektedir (Lowitz ve Casciato, 2007).

a. G_0 fazında (istirahat fazı), hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.

b. G_1 fazında (ara faz, interfaz), spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G_1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir.
c. S fazında (DNA sentezi fazı) hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.
d. G_2 fazında DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, sentez edilen DNA'daki kusurlar tamir edilir ve mitotik mikrotübüler prekürsörler üretilir.
e. M fazında (mitoz) protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozu takiben oluşan yeni hücreler ya G_0 ya da G_1 fazına girerler (Cummings ve Klug, 2002).

Siklinler

Hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir. Bölünme yeteneğine sahip çoğu normal hücre büyüme faktörleri, bazı hormonlar ve hücre yüzey reseptörlerini etkileyen antijen-histokompatibilite kompleksleri gibi dış uyarılara karşı yanıt olarak bölünür. Bu hücre yüzey reseptörleri, alınan sinyali iletir ve hücre bölünür. Tirozin kinazlar, hücre dışı büyüme faktörlerinden çekirdeğe kadar kaskad (arka arkaya gelen bir dizi süreç) şeklinde ilerleyen proliferatif sinyal sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Siklinler, kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktifleştirirler ve etkilerini düzenlerler. Hücre siklusunda çeşitli fazlarda çeşitli siklinler sentezlenir ve düzeyleri senkronize bir şekilde siklusun çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar (Lowitz ve Casciato, 2007).

Hücre Siklusu Kontrol Noktaları

Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. Bunların en önemlileri, ilki DNA sentezinden hemen önce ve ikincisi mitozdan hemen öncedir. Bu histolojik dinlenme periyotları, olasılıkla siklin bağımlı kinazların ve tümör supressor proteinlerin aktivitelerinin azalmasıyla gerçekleşir.

Gerçekte, bu fazdaki hücreler hücre siklusunun bir sonraki fazına girecek proteinleri sentezlediklerinden biyokimyasal olarak aktiftirler. Kontrol noktalarında genetik bozukluklar varsa düzeltilir. Sonuç olarak, hücre, siklus boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında kontrol edilir (Lowitz ve Casciato, 2007).

Normal hücreler DNA yapısında oluşan hataları saptayan mekanizmalara sahiptirler. DNA hasara uğradığı zaman bir grup tamir mekanizması hasarlı nükleotidleri normal moleküllerle değiştirir. Bu mekanizmalar oluşan iki yeni hücredeki genetik materyalin ana hücredeki materyalle kesinlikle aynı olmasını sağlarlar (Lowitz ve Casciato, 2007).

İlk kontrol noktası geç G_1 fazında, S fazına girmeden hemen önce gelir. DNA sentezi için uygun ekstraselüler sinyaller ve tüm mekanizma işler durumda olsa bile, hücrenin G_1 fazını terk etmeden önce DNA'nın doğru (hasarsız) bir durumda olması gerekir. Eğer herhangi bir DNA hasarı saptanırsa, hücreler ya hasarı onarır ya da apoptoza giderek ölürler. Bu kontrol noktası p53 proteinin etki yerlerinden biridir (Lowitz ve Casciato, 2007).

İkinci kontrol noktası hücreler G_2 fazında, M fazına girmeden hemen önce gelir. Hücre siklusu inhibitörleri, hücreyi yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanmamışsa veya beraberindeki tüm proteinler, iplikçik materyalleri ve mitozun tamamlanması için gerekli diğer tüm maddeler eksiksiz olarak tamamlanmamışsa hücre bu kontrol noktasında her şey başarıyla düzenleninceye kadar durur ve ardından M fazına girer (Lowitz ve Casciato, 2007).

Üçüncü kontrol noktası ise M fazındadır. Bu kontrol noktası kromozomların mitoz mekiği üzerinde dizilmesini kontrol eder ve yavru hücrelere kromozom setlerinin doğru bir şekilde dağıtılmasını sağlar. Ayrıca, kromozomlar mekik üzerinde her iki yavru hücreye tam bir kromozom seti gidecek şekilde dizilmedikçe kromatidlerin ayrılmasını önler (Cummings ve Klug, 2002; Lüleyap, 2008).

Hücre Populasyonu Tipleri

Normal hücre populasyonunun küçük bir miktarı ölümsüz hücrelerden oluşur. Bu hücreler organizmanın diğer kısımlarından gelen sinyallerin etkisiyle kendilerini yenileme ve ayrıca olgunlaşan ve organizmanın gerekli fonksiyonlarını görmek üzere diferansiye olabilen yeni hücreler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Sadece birkaç doku tipi diferansiye olabilmesine rağmen, çoğu hücre tipi diferansiye olurken hayatsal faaliyetlerini kaybederler, yaşlanıp istirahat fazına girerler ve sonunda ölürler. Ökaryotlarda aşağıdaki gibi 4 hücre tipi bulunur (Lowitz ve Casciato, 2007).

a. Germ hücreleri: Sınırsız sayıda çoğalabilme yetenekleri vardır. Bunun nedeni olasılıkla, mayozla bölünmeleridir. Kanser hücrelerinin aksine, bu hücreler ölümsüz hücre dizisi oluşturmak üzere mayoz bölünmeye girmelidirler.

b. Kök hücreleri: İki işlevleri vardır. Birincisi, yeni kök hücreyi oluşturmak, ikincisi ise diferansiye organizma için gerekli özgün işlevleri yerine getirecek yeni hücreyi oluşturmaktır. Kanser hücrelerinin aksine, bu hücrelerin tekrar oluşmak üzere girdikleri siklus sayısı sınırlıdır.

c. Kısmen diferansiye olmuş hücreler: Bunlar da sınırlı sayıda çoğalma kapasitesine sahiptir ve kendilerinden oluşan yeni hücreler sonunda tam diferansiye ve çoğalma yeteneği olmayan hücreler haline gelirler (Örneğin; bağ dokusu hücreleri).

d. Tam olgunlaşmış özelleşmiş hücreler: Bunlar bir daha çoğalamazlar (Örneğin; nöron) (Lowitz ve Casciato, 2007).

Diferansiyasyonun İmmortalite (Ölümsüzleşme) ile İlişkisi

Diferansiyasyon immortalite ile ters ilişkilidir. Ölümsüz kanser hücresi dizilerinin aksine, diferansiye olmuş normal hücreler, hücrelerin ne sayıda bölündüğünü sayan biyolojik bir saate sahiptir. Belli bir sayıya ulaşıldığında hücre artık daha fazla bölünemez. Örneğin, insan fibroblast hücreleri hücre kültürlerinde yaklaşık 38 kez bölünür. Sonra, beslenme koşulları ne olursa olsun bir daha bölünemez (Lowitz ve Casciato, 2007).

1.1.1.2. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kanser, anormal hücrelerin sürekli olarak birikmesi ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir. Bu hücreler invazyon yaparlar ve organizmanın organlarını hasara uğratırlar. Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuç da hücreler devamlı birikir. Aşırı hücre birikimi sonucunda oluşan bu dengesizlik hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanır. Kanser hücrelerinin, diğer hücrelerde olmayan bazı eşsiz özellikleri şu şekildedir (Lowitz ve Casciato, 2007).

Klonal Orjin

Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Bazı kanserler ise birden fazla sayıda malign klonlardan doğar. Bu klonlar ya bir saha hasarı "field defect" sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücresi karsinojene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtımsal defektler sonucu oluşurlar (Lowitz ve Casciato, 2007).

İmmortalite (Ölümsüzlük)

Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluştururlar. Ölümsüzlük mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken, çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat, kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Tamamıyla diferansiye olmuş bir hücre istirahat durumuna

girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa, birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır. Bugün laboratuar ortamında kullanılan HeLa hücreleri, serviks kanserinden 1951 yılında ölen Henrietta Lacks'ın hücreleri olup, hala canlılığını sürdürmektedir (Lowitz ve Casciato, 2007).

Genetik Kararsızlık

Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA ipliklerinin birbirlerini tanımadaki defektlerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların yabancı ortamlarda yaşama yeteneği gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar (Lowitz ve Casciato, 2007).

Kontakt İnhibisyonun ve Substratına Tutunarak Büyüme Özelliklerinin Kaybı

Kültür ortamında büyüyen normal hücreler, hücrelerin normalde yapıştığı substratına yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde ("monolayer") doldurduklarında da bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını ihtiva etse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarı katı bir besiyerinde substratına yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye devam edebilirler. Hatta hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyümeye devam edebilirler. Bu nedenle kültür ortamında normal hücre düzenli görülürken, kanser hücreleri sağa-sola uzantılı karmaşık bir yapı içinde görülür (Lowitz ve Casciato, 2007).

Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve besin elemanlarından bağımsız olarak devamlı artışı

Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler. Birçok hayvan türünün de bu şekilde davranması ilginçtir. Oysa normal hücreler ortamda besin yokluğunda büyümeyi durdurur (Lowitz ve Casciato, 2007).

Metastaz

İyi huylu olarak adlandırılan tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücresel proteinlerin kaybı ya da anormalliklerinden, hücreler arası etkileşimin bozulmasından, hücrelerin bazal membranına tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metalloproteaz gibi bazı enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir. Sonuçta ortama tutunamayan kanser hücresi, bulunduğu yerden ayrılarak dolaşım ile başka bir bölgeye gidip burada çoğalabilirler. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır (Lowitz ve Casciato, 2007).

1.1.2. Aşırı Kanser Hücresi Üretiminin Nedeni

1.1.2.1. Anormal Hücrelerin Apopitoza Gidememesi

Apopitoz, programlı hücre ölümü demektir.

1. Apopitoz anormal DNA'lı hücreleri yok eder. Anormal DNA'lı hücreler ise ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkribe olmuş DNA'dan meydana gelmişlerdir. Buradaki apopitoz, belli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesinde ve

aneploidinin önlenmesinde ana mekanizmadır. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitoza girmesi sağlanır.

2. Apopitoz normal doku kaybından sorumludur. Bunun klasik örneği larva evresinde kuyruğu olan kurbağaların kuyruklarının kaybolmasıdır. Apoptoz ayrıca primatlarda embriyogenez döneminde var olan parmaklar arası perdelerin kaybolmasından da sorumludur. Apopitoz, yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdan yok edilmelerini sağlar. Ayrıca, organizmanın kendi dokularını tanıyan T hücrelerinin eliminasyonunda da rol alır. Böylece, bu hücrelerin organizmaya karşı immun atağı önlenir.

3. Apopitotik hücreler mikroskopik olarak tanınabilir. Bu hücrelerde intrasellüler organeller bir araya toplanırlar. Çekirdek yoğunlaşır ve fragmanlara ayrılır. Hücreler apopitotik cisimciklere ayrıldığında, bu cisimcikler fagositozla komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından alınırlar. Nekrozun tersine, apopitoz inflamatuar reaksiyona yol açmaz. Apopitozda evrim sürecinde korunan bazı spesifik proteinlerin sentezi gerçekleşir.

4. Kanser hücreleri ve bazı immün sistem hücreleri normal dokularda apopitozu anormal olarak indükleyen maddeleri üretirler. Apopitoz genetik olarak düzenlenir ve malign hücrelerde bozulabilir. Örneğin, p53 tümör supressör onkogeni apopitozu uyarır. Bcl-2 onkogeni ise apopitozu inhibe eder. Böylece, normal hücre ölümünü yavaşlatarak aşırı hücre birikmesine yol açar. Apopitoz, tümör hücrelerinin hormonlar, sitotoksik kemoterapi ve radyasyon terapisiyle azaltılmasında (yok edilmesinde) ana mekanizma olabilir (Lowitz ve Casciato, 2007; Polard ve Earnshaw, 2004).

1.1.2.2. Hücre Proliferasyonunu Anormal Şekilde Uyaran Genetik Bozukluklar

Bu bozukluklar normal proliferasyon mekanizmasından bağımsız olarak oluşur. Reseptörlerin veya sinyal aktarıcı proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kendi başına giden hücre bölünmesine yol açarlar. Bu gen

anormallikleri genellikle dominanttır (örn. anormal hücre ile hibridlenen bir normal hücre fenotipik olarak malign hale gelir) (Lowitz ve Casciato, 2007).

1.1.2.3. Tümör Supressör Genlerdeki Anormallikler

Bu genler hücre bölünmesinin baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Bu genler resesifdir; yani malign hücre normal hücre ile hibridleştirildiğinde normalleşir. Tümör süpressör genlerine örnek olarak retinoblastoma geni ve p53 geni verilebilir (Cummings ve Klug, 2002).

Retinoblastoma geni; Retinoblastoma geni bu genler arasında ilk keşfedilen gendir. Ardından, özellikle sık rastlanmayan veya nadir kalıtsal hastalıklarda olmak üzere diğer süpressör gen anormallikleri de saptanmıştır. Wilm's tümörü (WT1), familyal polipozis (APC), familyal melonoma (CDKN20), familyal meme ve over kanserleri (BRCA-1 ve BRCA-2) diğer süpressör gen anormalliklerine örnek olarak verilebilir (Lowitz ve Casciato, 2007).

p53 süpressör geni; Bu genler içinde en önemli gen p53 süpressör genidir. Bu genin ürünü olan p53 proteini birçok kompleks aktivitesi olan ve hücre siklusunu baskılayan bir proteindir. Bu protein nükleotid yanlış eşleşmelerini, DNA sarmalının kırıkları gibi DNA lezyonlarını ve ayrıca radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarlarını saptayabilir (Perantoni, 2006).

- DNA lezyonu saptandığında, p53 hücre siklusunu G_1 fazında durdurur, böylece hücrenin S fazına girişini önler. Ardından, ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apopitoza yol açan proteinleri indükler (Lowitz ve Casciato, 2007).
- İn vitro çalışmalar, kemoterapi ve radyasyonun kanser hücrelerini DNA hasarı yaratarak ve böylece p53'le indüklenen apopitoza yol açarak öldürdüklerini göstermiştir. p53 proteininin eksik olduğu fare timositlerinde ve istirahat halindeki lenfositlerde radyasyonun bu öldürücü etkisi görülmez ve hücreler canlılığını sürdürür (Lowitz ve Casciato, 2007).

- Birçok insan kanserlerinin mutant p53 süpressör genine sahip olduğu bulunmuştur. Mutant p53, Li-Fraumeni sendromunun karakteristik bulgusudur. Bu sendrom, hem yumuşak doku hem de epitel kaynaklı kanserlerin birçok organda görüldüğü ve erken bir yaşta başladığı herediter otozomal dominant bir sendromdur (Lowitz ve Casciato, 2007; Perantoni, 2006).

1.1.2.4. Tümör anjiogenezi

Kan desteği olmayan kanser kolonileri çap olarak 1 mm'den daha fazla büyümezler. Yeterli kan desteği olmayan koloniler istirahat halinde değillerdir. Yani hücre siklusunun G_0 fazındaki gibi değillerdir. Bu durumdaki koloniler tipik olarak daha hızlı prolifere olurlar fakat artmış proliferasyon hızını dengeleyecek şekilde hücre ölümü de artar. Kan akımı sağlandıktan sonra, hücre ölüm hızı azalır ve tümör hızla büyür (Lowitz ve Casciato, 2007).

Yeni kan damarlarının oluşumu için bazı maddeler gereklidir. Bu durum normal dokularda böyledir. Fakat, hemen hemen tüm ölçülebilir kanserlerde bu maddelerin sadece biri üretilir. Bu faktörün adı vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF). Bu faktör yeni kan damarlarının oluşumunu indükler. VEGF özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde faydalı olmaktadır (Lowitz ve Casciato, 2007).

- VEGF, olgunlaşmış ve prolifere olmayan kan damarı endotel hücrelerinde kendi reseptörlerini indükler. Normalde istirahat halindeki endotel hücrelerinin VEGF reseptörü yoktur fakat VEGF'ye maruz kaldıklarında reseptörü üretirler.
- VEGF, kan damarlarının oluşumuna yol açan diğer birçok büyüme faktörünün üretimini ve aktivitesini indükler.
- VEGF, c-ras ve VEGF üretimini daha ileriye götüren diğer onkogen ve büyüme faktörleri tarafından indüklenir.

- Normal gelişim için diğer faktörlere de gereksinim duyan normal kan damarlarının aksine, VEGF tarafından indüklenen kan damarları sızdırma özelliğine sahiptir. Örneğin, fibrinojen gibi VEGF ile indüklenen plazma proteinleri yeni oluşan damarlardan dışarı sızarlar. Böylece, tümörün etrafında süngerimsi bir jel oluşur. Bu jel VEGF içerir: bu durum anjiogenezi daha da ilerletir.
- VEGF'nün, indüklenmiş epitel hücrelerinde apopitozu baskıladığı görülmektedir.

Tümörler ayrıca anjiogenez inhibitörleri de içerirler. Bu inhibitörler uzak bölgelerdeki tümörlerin büyümelerini azaltır. Murin; akciğer kanserinin bir formu bu gibi inhibitörleri içeren ve böylece primer odağın büyümesini yavaşlatan metastazlara yol açar. Bu mekanizma metastazla birlikte seyreden primer tümörlerin lokalize edilmesindeki güçlüğü ve primer tümörün bulunamadığı durumları (orjini bilinmeyen primer tümörleri) açıklayabilir (Lowitz ve Casciato, 2007).

1.1.2.5. Onkogenler

Onkogenler, normal hücrelerin malign transformasyonuna neden olan genler demektir. Her zaman malignensi ile ilişkilidirler veya hücresel ya da retroviral orijinli olabilirler. Genel olarak, kanserde birden fazla onkogen anormal olarak aktifdir. Hücre bölünmesi için gerekli olan, onkogenler, aralarındaki etkileşimler neticesinde diğer onkogenlerin de aktifleşmesine neden olur. Çoğu kanserler ile tek bir onkogen anormalliği arasında bire bir ilişki genellikle saptanamaz (Perantoni, 2006).

1. Retroviral onkogenler (v-onc) hayvan tümörlerinden elde edilmiş hızla transforme edici retrovirüslerde ilk olarak keşfedilmişlerdir. Bu tip yaklaşık 20 çeşit onkogen tanımlanmıştır.

2. Hücresel onkogenler kanser hücrelerinden DNA elde edildikden sonra, DNA'ların normal hücrelere sokulması ve böylece hücrelerin malignleşmesi (DNA transfeksiyonu) yoluyla keşfedilmişlerdir. Bu çeşit 20'den fazla onkogen tanımlanmıştır.

3. İnhibitör genler hücre proliferasyonunu inhibe eden proteinleri üretirler. Bu genlerdeki anormallikler anormal hücre proliferasyonuna yol açar. Yaklaşık 12 gen tanımlanmıştır.

4. Proto-onkogenler (c-onc veya normal hücre genleri) normal hücrelerde proliferasyon ve diferansiyasyonu kontrol ederler. Bunların bilinen tüm onkogenlerin kaynağı olduğu düşünülmektedir. Bu fikre bir kanıt olarak, transforme edici retrovirüslerden elde edilen RNA'nın çeşitli proto-onkogenlerle homoloji göstermesi verilebilir.

a. Proto-onkogenler evrim boyunca iyi korunmaktadırlar. Birçok aynı onkogen insanlardan mayalara kadar çok çeşitli canlılarda bulunabilmektedir. Bu durum, hayatın temel özelliği gibi görünmektedir.

b. Herbir proto-onkogen, hücre siklusu sürecinde veya belli bir dokunun gelişiminin spesifik bir döneminde farklı olarak eksprese edilen protein ürünlerini yaparlar.

5. c-onc ve proviral v-onc arasındaki farklılıklar vardır. Hücresel onkogenler hem intronlara hem de ekzonlara sahipken, viral onkogenler sadece ekzonlara sahiptir. Viral DNA, güçlü promotor genler olan uzun uç tekrar dizileri (LTR)'ne sahiptir. Fakat bunlar c-onc'larda bulunmaz. LTR'ler c-onc yakınlarında bir yere sokulduklarında c-onc'un regülasyonunu bozarlar ve hücreyi malign fenotipe dönüştürürler (Perantoni, 2006).

Onkogen Biyolojisi

1. Hem proto-onkogen hem de nonproto-onkogen kaynaklı büyüme faktörleri, hedef hücrelerdeki spesifik büyüme faktörü reseptörlere (GFR) bağlanırlar. Böylece, bu reseptörler üzerindeki tirozin kinaz aktivitesi aktifleşir. Büyüme faktörü-GFR kompleksi hücreler tarafından alınır ve inaktifleştirilir. Büyüme faktörlerinin bazıları ve ilişkili proto-onkogenleri şunlardır: fibroblast büyüme faktörü için **"Int-2"** ve diğerleri, trombositlerden salınan büyüme faktörleri için **"sis"** (Lowitz ve Casciato, 2007).

2. GFR'ler ve bazı hormon reseptörleri hücre membranında bulunan ve bir kısmı membran içinde bir kısmı membran dışında olan proto-onkogen proteinlerdir.

Proteinin hücre yüzeyindeki parçasında spesifik ekstrasellüler büyüme faktörleri için bölgeler bulunur. GFR'ler kendilerine özgü büyüme faktörleri ile aktive edildiklerinde, bu reseptörlerin sitoplazmik bölgeleri aktif tirozin kinaz haline gelir. Bazı GFR'ler ve onların proto-onkogeni, koloni uyarıcı faktör reseptörü tip 1 (fms) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (erb-B)'dür (Lowitz ve Casciato, 2007).

Aktifleşen tirozin kinazlar ekstrasellüler sinyali bazı mekanizmalarla sitoplazmik proteinlere ve nükleusa aktarırlar. Örneğin, sitoplazmik proto-onkogen proteinleri aktive ederler. Ayrıca, diaçilgliserol düzeylerini artırırlar, bu daha sonra protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonuna neden olur. PKC ise, DNA sentezini uyaran bir grup proteini aktive eder. Aktif tirozin kinazların başka bir fonksiyonu, guanozin-5-difosfatı (GDP), guanozin trifosfat (GTP)'a çevirmek üzere fosforile etmeleridir. GTP, p21'i (bir c-ras proteinidir) aktive eder: aktifleşmiş GTP-p21 kompleksi ise nükleusda DNA transkripsiyonunu uyarır. Örnek: erb-B onkogeni (Lowitz ve Casciato, .2007)

3. Anahtar hücresel enzimlerin aktivitesini düzenleyen sitoplazmik kinazlar, membran reseptör kinazlar tarafından aktifleştirilirler. Bu proteinler tipik olarak serin veya treonin kinaz fosforile edici aktiviteye sahiptir ve bazıları ise GTPaz aktivitesine sahiptir. Bu kinazlar nükleus proteinlerini ve DNA promotor bölgelerini aktive etmede geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Örneğin, hücre bölünme fazı kinaz (cdc)'ları tüm ökaryotik hücrelerde bulunur ve hücrelerin G_2 fazından M fazına geçişi için şarttır. Siklinler ve fosforilasyon, bu kinazların aktivitelerini düzenler: bunların ayrıca mitozise hazırlık safhasında hücre iskeletinin destabilizasyonunda rol aldıkları görülmektedir. Örnek: ras onkogeni (Lowitz ve Casciato, 2007).

- c-ras proteinlerinin proto-onkogen prekürsörleri sinyalleri hücre yüzeyinden nukleusa iletirler. Bu proteinler GDP ve GTP ile birleşirler. Protein-GTP kompleksi (örn. p21-GTP) kimyasal olarak aktif formdur ve bu form nukleusdaki çeşitli promotor proteinleri aktive eder. Bu proteinler GTPaz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite, GAP olarak isimlendirilen bir sitoplazmik protein tarafından arttırılır. GTPaz GTP'yi GDP'ye dönüştürür, böylece yukarıda söz edilen kompleks (Protein-GTP) inaktifleşir. Bu fenomenin, bu proteinlerin kendilerini düzenledikleri bir aktivite olduğu düşünülmektedir. Ras proteini ayrıca diaçilgliserol düzeylerini de

arttırır, bu da PKC'yi aktifleştirir. PKC ise bilindiği gibi önemli bir DNA transkripsiyon başlatıcısıdır (Lowitz ve Casciato, 2007).

- Ras onkogenleri birbirleriyle ilişkili beş onkogenden oluşan bir gruptur. Aktivitelerinin çoğu kendilerinin proto-onkogenlerinin normal aktiviteleridir. Birkaç defekt saptanmıştır. Bunlardan biri bozuk GTPaz'dır. Bu anormallik molekülün GTP formunun devamlı olarak aktif kalmasına yol açtığından nukleus proteinleri ve DNA transkripsiyonu devamlı olarak aktive edilir (Lowitz ve Casciato, 2007).

4. Gen ekspresyonunu doğrudan kontrol eden proteinlere transkripsiyon faktörleri denilmektedir. Bu faktörler sinyal iletiminin son safhasında yer alırlar. Bunların bazıları kısa ömürlüdür ve asla nukleusdan dışarı çıkmazlar. Örneğin, c-jun ve c-fos proteinleri G_0-S interfazında transkripsiyonu yapılan ilk proteinlerdendir ve hücre siklusunu başlattıkları görülmektedir. Siklinlerin, hücrenin hücre siklusuna ve ayrıca c-myc ve c-mos'un transkripsiyonunu aktifleştirerek de mitozise girmesini başlattığı düşünülmektedir. c-myc ve c-mos'dan transkripsiyonu yapılan proteinler (c-myc ve c-mos proteinleri) ayrıca nukleusda da daimi olarak bulunurlar ve burada DNA sentezini uyaran kompleksler oluştururlar. Sitoplazmadan nukleusa giren diğer faktörler (örn. ras, myc): bunların transkripsiyonu ve aktifleştirilmesi sitoplazmik kinazlar tarafından yapılır. Proto-onkogen kinazların sitoplazmadaki birkaç normal ürünü ayrıca gen transkripsiyonunu da aktive eder. Özellikle PKC aktifleştirilir. PKC, direkt olarak bir DNA promotoru olarak etki ederek c-jun ve c-fos proteinlerinin üretimini uyarır. Jun-Fos kompleksi, DNA'nın spesifik promotor bölgelerine bağlanır ve DNA transkripsiyonunu uyarır. Örnek: c-myc onkogeni (Lowitz ve Casciato, 2007).

- c-myc onkogenleri direkt nukleus düzenleyici aktivitesi olan bir protein ailesidir. myc'nin varlığı hücre bölünmesi için gerekli gibi görünmektedir. Dimetilsulfoksid (DMSO) myc'nin transkripsiyonunu inhibe eder, hücre bölünmesini durdurur ve kültür edilmiş lösemik blast hücrelerinin diferansiye olmasına neden olur. Yüksek c-myc düzeyleri immatür kan hücrelerinde ve gastrointestinal hücrelerde bulunur. Hem c-myc hem de c-jun/c-fos protein ürünleri dimerler oluştururlar. Bu dimerler, promotor genlere bağlanma bölgesine yakın bir yerdeki

"leucine zipper" adı verilen lösinden zengin bir bölgede birbirine bağlanırlar (Lowitz ve Casciato, 2007).

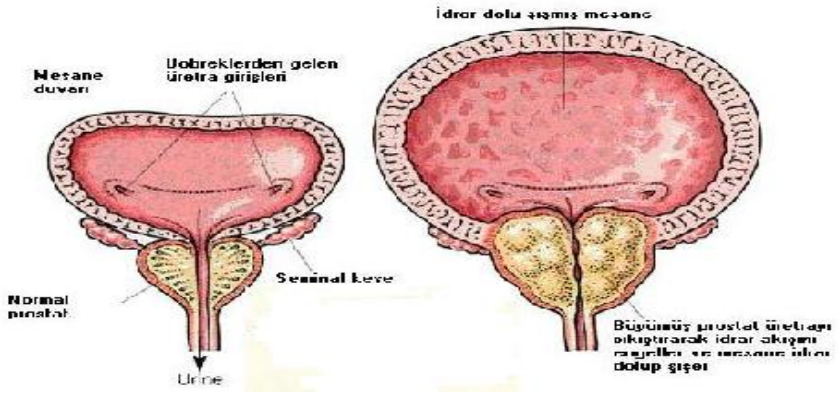
- c-myc geninin amplifikasyonu öyle verimlidir ki birçok kopya bazen kromozom üzerinde kalır (Lowitz ve Casciato, 2007).

5. Büyümeyi inhibe edici genlerin ürünleri, büyümeyi hızlandırıcı onkogen ürünlerini inhibe eden ve hücre proliferasyonunu durduran maddelerdir. Tipik olarak fosfatazlardır. Bu genlerin inaktivasyonuna yol açan mutasyonlar kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve malignensilere yol açar. Bu mutasyonlara ve ilişkili tümörlere örnek olarak retinoblastoma ve bazı osteosarkomlar, Wilm's tümörü (WT1), Multipl endokrin neoplazi (MEN1), ve Familyal adenomatozis polipozis Coli (FAPC) (Lowitz ve Casciato, 2007).

1.2. Prostat Kanseri

Prostat, mesanenin hemen alt bölümünde bulunan fibromusküler ve glandüler yapıda, 18-20 gr ağırlığında sekretuar bir organdır. Erkek üretrasını saran ve mesane boynu ile devam eden prostat bezi, 2.5 cm uzunluğunda, sıkıştırılmış ve ters yüz edilmiş konik bir yapı şeklindedir (Şekil 1.1) (Anafarta, 2007).

Prostat kanseri ise, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin malign büyümesi olarak tanımlanabilir. İstatistiksel açıdan tüm kanserlerin %32'sini oluşturur. Prostat kanseri bir yaşlılık hastalığı olup 40 yaş altı erkeklerde nadiren oluşur. İnsidansı 40 yaşlarından 80'li yaşlara gidene kadar giderek artar (Emil ve ark, 2004). Amerika'da erkeklerde en sık görülen kanser, prostat kanseridir. Japonya'da erkek ölümleri içerisinde 7. sırada iken Avrupada erkek ölümlerinin %9'unu oluşturmaktadır. Türkiye'de sağlıklı bir istatistik yoktur. Fakat Sağlık Bakanlığının bildirilen vakalar çerçevesinde yaptığı değerlendirmelerde prostat kanseri 6-7. sıralarda yer almaktadır (Baltacı, 2007).



Şekil 1.1. Normal ve büyümüş prostat bezinin şematize edilmiş hali (http://www.prostathapi.com/prostat-belirtileri.html)

Prostat kanserleri prostat açiner hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlardır. Prostat kanserlerinin %70'i prostatın periferik, %15-20'si santral, %10-15'i transizyonel zondan çıkar. Prostat kanserlerinin çoğu çok merkezlidir ve birçok derecelendirme yöntemi (greyd) vardır. Tümü glandüler farklılaşma, hücresel atipi ve hücre çekirdeğindeki anormalliklere dayanır. En yaygın kullanılanı olasılıkla majör ve minör glandüler farklılaşma kalıplarına göre her prostat kanseri alanına iki derece veren Gleason derecelendirme sistemidir. Gleason sistemine göre 2-4 iyi, 5-7 orta, 8-10 kötü derecede farklılaşmış kanseri gösterir (Emil ve ark, 2004).

İyi farklılaşmış prostat adenokarsinomları sırt sırta vermiş aralarında çok az stroma bulunan glandüler hücreler çevresinde normal miyoepitelyal hücre tabakasının kaybolduğu küçük bez gruplarıdır. Kanserli prostat dokusunda primer veya hakim greyd ve ikincil greyd olmak üzere en azından iki kanser greydi vardır. Tümör greydi prostat kanser büyüme ve ilerlemesinin klinik açıdan en yararlı göstergelerinden biridir (Emil ve ark, 2004).

Prostat kanserleri pek çok tip göstermektedir. Bunlar; adenokarsinoma, musinöz adenokarsinoma, prostatik duktal adenokarsinoma, saf küçük hücreli adenokarsinoma, skuamoz ve adenoskuamoz kanserler, sarkomatid karsinoma (karsinosarkom), transizyonel hücreli kanserler, malign mezenşimal tümörler,

prostatik epitelyal neoplazi (PIN), atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP)'dır. Bunlardan en sık görüleni %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlardır (Baltacı, 2007).

Epidemiyolojik gözlemlere dayanarak prostat kanserinde en azından 3 etiyolojik faktörden söz edilmektedir. Bunlar;

- Hormonal etkiler,
- Diyet ve çevresel faktörler,
- Genetik faktörler

Yapılan bazı çalışmalardaki gözlemlerde, erkek hormonlarının etkisi olduğu düşünülmektedir. Kastre edilen hastalarda prostat kanseri oluşmaz. Prostat kanseri hücrelerinin çoğu hormonlara karşı duyarlıdır ve erkek hormonlarının bulunduğu ortamda hızla çoğalır. Kastrasyon kanser büyümesini dramatik bir şekilde geriletir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada testesteron hormonunun kanser oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Emil ve ark, 2004).

Diyet ve çevresel faktörlerin prostat kanserindeki önemi, farklı çevrelerde yaşayan ırkdaş gruplardaki farklı kanser insidansları ile belirlenmiştir. Örneğin ikinci ve üçüncü kuşak Japon asıllı Amerikalılar'da prostat kanseri insidansı diğer Kuzey Amerikalılarda olduğu gibidir. Fakat buna karşın Japonya'da klinik prostat kanseri insidansı ABD'nin ancak %10'u kadardır. Diyet ve çevresel faktörlere ek olarak bakterisel ve viral ajanlarında etiyolojik rolü olduğu öne sürülmüştür (Emil ve ark., 2004).

1.2.1. Hormonal Etkiler

1.2.1.1. Androjen

Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi androjenler tarafından etkilenmektedir. Androjenler; testesteron, androstenedion, dihidrotestesteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi erkek cinsiyet hormon topluluğudur (Menteş, 2002).

Testesteron (T), testislerden sentezlendikten sonra pasif difüzyon yolu ile hedef doku hücresine girer. Hücre içindeki testesteron, steroid 5α-redüktaz enzimi ile ya DHT'ye dönüşür ya da ekstradiole aromatize olur. Ortamdaki testesteron ve DHT hücre çekirdeğindeki transkripsiyon regülatör faktörlerinden steroid-tiroid-retinoid ailesinin üyesi olan reseptöre bağlanmak için bir yarışa girerler ve bunların reseptöre olan ilgisi aynıdır. Bu reseptör hormon kompleksi genin regülatör bölgesine bağlanarak transkripsiyonun düzenlenmesini sağlamaktadır. Testesteron ve DHT aynı reseptöre bağlanmasına rağmen bunların fizyolojik etkileri farklıdır (Wilson ve ark., 1993).

Ross ve arkadaşları Afrikalı Amerikalılarda prostat kanseri insidansının yüksek olmasının, dolaşımdaki androjen seviyesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca genç Afrikalı Amerikalılarda Japon erkeklere göre 3α, 17β-androstenoidol glukuronide ve androstenidol glukuronide (A-diol-g) gibi androjen metabolitlerinin serumda daha yüksek düzeyde olduğunu göstermişlerdir. Bu metabolitlerin, testesteronun 5α-redüktaz ile dihidrotestesteron (DHT)'a dönüşüm düzeyini yansıttığını inanılır ve total testesterona göre intraprostatik androjen aktivitesini göstermede daha iyi bir markır olabilecekleri düşünülmektedir (Ross ve ark., 1986).

Yüksek androjen seviyesinin, prostat kanseri riskini artırıp artırmadığını belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Guess ve arkadaşları ve Barrett-Connor ve arkadaşları prostat kanser riski ile androjen seviyeleri üzerine prospektif çalışmalar düzenlemişler ve testesteron, seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) yada 5α-redüktaz ile prostat kanseri arasında bir ilişki bulamamışlardır (Guess ve ark., 1997; Barrett-Cannor ve ark., 1990). Bunun aksine, Gann ve arkadaşları testesteron seviyesindeki artış ile prostat kanserinde anlamlı bir artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, prostat kanser riski ile SHBG arasında ciddi bir ters ilişki bulmuşlardır. Yine aynı çalışmacılar testesteron/DHT oranı ve androstenodiol glukuronide düzeyleri ile artmış 5α-redüktaz aktivitesine sahip erkeklerde, prostat kanseri riskinde ciddi bir artış eğilimi olduğunu bildirilmişlerdir (Gann, 1996). Prostat kanserinin hormonal habercileri hakkında önceden yayınlanmış çalışmaların meta-analizi, total testesteron seviyesinin yüksek olduğu

erkeklerde prostat kanseri gelişme olasılığının 2.34 misli yüksek olduğu sonucuna varmıştır (Reiter ve Dekernion, 2005).

Açıkçası, androjen ve androjen metabolitlerinin prostat kanser riskine katkısının derecesi halen tartışmalıdır. Bu çalışmalar, çok sayıda teknik ve teorik sorulardan etkilenmektedir. Birincil olarak, tüm androjen düzeyinin ölçümü, dolaşımda olan testesteron düzeyindeki ciddi diurnal değişikliklerle etkilenmektedir. İkincil olarak, prostatın karşı karşıya kaldığı androjen hormonların güvenilir şekilde ölçülmesi güçtür. Üçüncül olarak, bir erkeğin hayatı boyunca androjenlere erken ya da geç maruz kalmasının kritik olup olmadığı ya da konsantrasyonunda zamanla oluşan değişikliklerin önemi bilinmemektedir (Reiter ve Dekernion, 2005). Prehn ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada prostat kanseri, düşük androjen seviyesi nedeni ile yaşlanmaya bağlı androjen seviyesinde azalma sonucu ortaya çıkabilmektedir. Diğer çalışmacılar, androjen östojen dengesinin prostat karsinogenezi için önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir (Prehn, 1999).

1.2.1.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)

PSA prostat hücreleri tarafından salgılanan 33.000 Dalton molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Bir serin proteazdır ve semenin sıvılaşmasına yardımcı olur. Genç yetişkinlerde PSA'nın normal değerleri 0-4 ng/ml arasındadır. Yapılan çalışmalarda bening prostat hiperplazisi (BPH)'da PSA yükselmesinin transizyonel zonun boyutu ile orantılı olduğu hesaplanmıştır. Bir gram BPH'ın PSA'yı 0.3 ng/ml yükselttiği düşünülmektedir. Prostat kanserinde PSA üretimi değişkendir ve farklılaşmanın derecesine bağlıdır. İyi farklılaşmış kanser dokusu daha fazla ve farklılaşmamış kanser dokusu ise daha az miktarlarda PSA üretir (Emil ve ark., 1995).

1.2.2. Diyet ve Çevresel Faktörler

Diyet ile yüksek oranda yağ alımının prostat kanseri insidansını artırdığı düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu bulunmuştur. Likopen, selenyum ve E vitamininin antioksidan etkileriyle kanserde potansiyel bir negatif faktör olduklarına dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Schald, 2004; Gann 1999).

Yağ: Prostat kanserinin mortalite oranları, tüm dünyada, ortalama yağ tüketimi ile sıkı korelasyon göstermektedir. Yüksek yağ tüketimi hem in vitro hem de in vivo olarak prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu uyarabilmektedir. Clinton ve arkadaşları, prostat kanserinde, yağsız diyetin androjene bağımlı tümör hücrelerinin büyümesini azaltabileceğini göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise yüksek yağ içeren diyetin prostat kanser hücrelerinin büyümesine neden olduğunu ortaya koymuştur (Clinton ve ark., 2002).

Yağ, prostat kanseri riskini alternatif bir takım mekanizmalarla artırabilmektedir. İlk olarak diyetle alınan yağın, androjen düzeyini değiştirebileceğine dair kanıt bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda total kalori alımı normal düzeyde tutularak, daha az yağ tüketen hastaların, daha az testesteron düzeyine sahip olduğu bulunmuştur. İkinci olarak, yağ serbest radikal kaynağı olabilmektedir. Üçüncüsü, pro-enflamatuvar yağ asidi metabolitleri karsinojenik olabilmektedir. Örneğin, araşidonik asit, invitro olarak prostat kanseri hücrelerinin büyümesine yol açabilen bir omega-6 çoklu doymamış yağ asididir. Araşidonik asit, 5-hidrosieikosatetraenoik aside (5-HETE) dönüşür. 5-HETE'nin inhibisyonu özellikle prostat kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebilmektedir. Bu da bu metabolitin, prostat kanserinin oluşumu ya da büyümesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Her ne kadar birçok çalışmada, prostat kanseri ile yağ tüketimi arasında bir ilişki bulunsa da, bu ilişki üzerinde henüz bir görüş birliği bulunmamaktadır. Birçok olgu kontrollü çalışma, yağ alımı ile prostat kanseri arasındaki ilişkiyi doğrulayamamıştır. Bir derlemede, Kolonel ve arkadaşları, yağ tüketiminin prostat kanserine yol açtığı hipotezinin tam olarak kanıtlanmamış bir desteğe sahip olduğunu

bildirmiştir (Kolonel ve ark., 1999). Her ne kadar hayvansal yağlar ve prostat kanseri arasında belirli bir ilişki olsa da, yağın kansere yol açan asıl ajan olduğu kesin değildir. Yüksek et içeren diyetlerde genellikle sebzeler düşük oranda tüketilmektedir. Etler ve diğer süt ürünleri, çinko ve kalsiyum gibi prostat kanserini etkileyebilecek diğer maddeleri de içermektedirler. Prospektif ve olgu kontrollü çalışmalarda, çinko ve kalsiyum, prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu saptansa da bu maddelerin tam rolü bilinmemektedir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Kalsiyum: Belirtildiği gibi bazı çalışmalarda yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu bulunmuştur. Chan ve arkadaşları, İsveç'te prostat kanseri olan ve olmayan erkekler ile olgu kontrollü çalışma yapmışlardır. Kalsiyum alımının, prostat kanserinde bağımsız bir risk faktörü olduğunu bulmuşlardır. Kalsiyumun prostat kanserine nasıl yol açtığı bilinmemekle beraber, yüksek kalsiyumun, vitamin-D üretimini azaltabileceği ve böylece hücre proliferasyonunu uyarabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (Chan ve ark., 1998)

Likopen: Likopen, domateste yüksek oranda bulunan bir karatenoiddir. Likopen kuvvetli bir antioksidandır ve kanserde potansiyel bir negatif faktör olduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Dört kohort çalışmasında, likopen tüketimi ve prostat kanseri ile ilişkisi hakkında sonuçlar bildirmişlerdir. Bir çalışmada yüksek likopen tüketiminin, prostat kanseri gelişme riskini %21 azalttığını bildirirken, prostat kanseri insidansının, domates sosunu çok tüketenlerde, az tüketenlere oranla %36 daha az olduğu tespit edilmiştir. İlginç olarak, domates suyu tüketiminin koruyucu etkisi bulunmamaktadır; buda likopenin biyo yararlanımının pişme ile arttığını göstermektedir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Likopenin hangi mekanizma ile prostat kanseri riskini azalttığı bilinmemektedir. Likopenin, yaşlı epitelyum hücrelerini, prostat inflamasyonu sırasında oluşan reaktif oksijen radikallerinden koruması, olası bir mekanizmadır. De-Marzo ve arkadaşları, prostat kanserinin, kronik inflamasyon ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (De-Marzo ve ark., 1999). İkinci bir mekanizma ise, likopenin IGF'ye bağlı hücresel proliferasyonu bloke edebilmesidir. Karas ve arkadaşları meme kanseri hücrelerinde likopenin, IGF reseptörünün tirozin fosforilasyonunu bloke edebildiğini gözlemlemişlerdir (Karas ve ark., 2000).

Selenyum: Selenyum, bir antioksidan olan glutatyon peroksidazın eser mineral komponentidir. Selenyuma olan ilgi, topraklarında yüksek selenyum konsantrasyonu bulunan yerlerde, belli kanserlerden ölüm oranının daha az gözlemlenmesiyle başlamıştır. Selenyum ile prostat kanseri riski arasındaki ilişki açısından en provakatif kanıt, selenyumun deri kanseri riskini azaltabileceğine yönelik yapılan prospektif randomize bir çalışmadan gelmektedir. Her ne kadar çalışmada selenyumun deri kanseri üzerine etkisi saptanmasa da, rastlantısal olarak prostat kanseri insidansında dramatik bir azalma bulunmuştur (Clark ve ark., 1996). Başka bir çalışmada ayak tırnaklarında yüksek selenyum bulunan erkeklerde prostat kanseri gelişme riskinin, az olanlara oranla yarı yarıya daha az olduğu saptanmıştır (Reiter and Dekernion, 2005).

Vitamin E: Vitamin E (α-tokoferol), hücre membranlarını, serbest radikal hasarına karşı koruyan bir antioksidandır. İn vitro çalışmalarda, vitamin E'nin, prostat kanseri hücreleri üzerinde pro-apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Finlandiya'da yapılan ve vitamin E'nin, sigara içenlerdeki kanser insidansına olan etkisini inceleyen bir çalışmada, plasebo (yalancı ilaç) ile karşılaştırıldığında, prostat kanseri insidansında %32 ve mortalitesinde ise %41'lik bir azalma gösterilmiştir (Heinonen ve ark., 1998).

Vazektomi: Prostat kanseri ve vazektomi arasındaki ilişki tartışmalıdır ve henüz çözülmemiştir. Bir çalışmada vazektomili erkeklerde prostat kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir. Risk zamanla artmaktadır ve erken yaşta vazektomi yapılan erkeklerde risk daha fazladır. Bir takım mekanizmalar öne sürülse de, vazektominin hangi yolla prostat kanserine yol açabileceği bilinmemektedir. Antisperm antikorlarının varlığı seminal androjen konsantrasyonlarında azalma ve prostatın salgı işlevinde azalma öne sürülen mekanizmalardır (Reiter and Dekernion, 2005).

Seksüel Aktivite, Sigara, Kilo, Boy ve Alkol Kullanımı: Bir takım genetik (boy ve kilo) ve çevresel (seksüel aktivite, sigara ve alkol kullanımı) faktörlerin prostat kanseri riskini etkilediği öne sürülmüştür. Genel olarak bu faktörler ve prostat kanseri arasındaki ilişki tam olarak doğrulanmamıştır. Örneğin seksüel aktivitenin prostatı enfeksiyöz ajanlara maruz bıraktığı ve bu durumda, kadınların serviks kanseri ve human papillomavirüs ilişkisine benzer bir şekilde prostat kanserini

artırabileceği öne sürülmüştür. Her ne kadar bazı çalışmalar erken cinsel ilişki, cinsel partner sayısı ve prostat kanseri arasında bir ilişki bulsa da bu sonuçlar tutarlı olmamıştır (Reiter ve Dekernion, 2005).

Sigara kullanımı akciğer, mesane ve epitelyal kanserler için bilinen bir risk faktörüdür. Sigaranın prostat kanseri üzerindeki etkisi açısından tam bir görüş birliği bulunmamaktadır. Ancak sigaranın tüm kanserler ile doğrudan %80 ilişkisinin olduğu bilinmektedir. Bu konu ile ilgili pozitif ve negatif etkilerini bildiren prospektif çalışmalar bulunmaktadır (Reiter ve Dekernion, 2005).

Fazla alkol tüketiminin östrojen üretimini artırdığı ve testesteron düzeyini azalttığı bilinmektedir ve alkolün prostat kanseri riskini azaltabileceği öne sürülmektedir (Breslow ve ark., 1999).

IGF-1 düzeyleri ile boy arasında bilinen bir korelasyon bulunduğu için, uzun boylu erkeklerin prostat kanseri açısından daha fazla risk taşıyabilecekleri öne sürülmüştür. Boy ve prostat kanseri arasındaki ilişki ile ilgili bilgiler karışıktır ve pozitif ve negatif sonuç bildiren çalışmalar vardır. Bir çalışmada ise uzun boy ile ileri evre prostat kanseri arasında korelasyon gösterilmiştir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3. Genetik Faktörler

Prostat kanserinin, iki formunun bulunması nedeniyle solid tümörler arasındaki yeri farklıdır. Amerikan toplumunda histolojik ya da latent formu, 50 yaş üstü erkeklerin %30'unda, 80 yaş üstü erkeklerin %60-67'inde bulunur, klinik formu ise yaklaşık her 6 erkekten birini etkiler. Latent prostat kanserinin tüm dünyada ve etnik gruplarda benzer prevelansa sahip olduğuna inanılmaktadır. Bununla beraber, klinik prostat kanserinin insidansı, farklı ülkeler arasında ve içinde dramatik olarak farklılık gösterir. Bu nedenle prostat kanserinin etiyolojisinin anlaşılması için hem histolojik kanserin başlamasına, hem de klinik invaziv prostat kanseri progresyonuna yol açan basamakların bilinmesi gerekmektedir (Gsur ve ark., 2003).

Prostat kanserinin ailevi olarak arttığı gösterilmiştir. Babalarında ya da erkek kardeşlerinde prostat kanseri olan erkeklerin bu kansere yakalanma risklerinin oldukça fazla olduğu, meme ya da kolon kanserine yakalanmış olan kişilerin aile

yakınlarında da prostat kanseri riskinin yine daha fazla olduğu belirlenmiştir (Gsur ve ark., 2003).

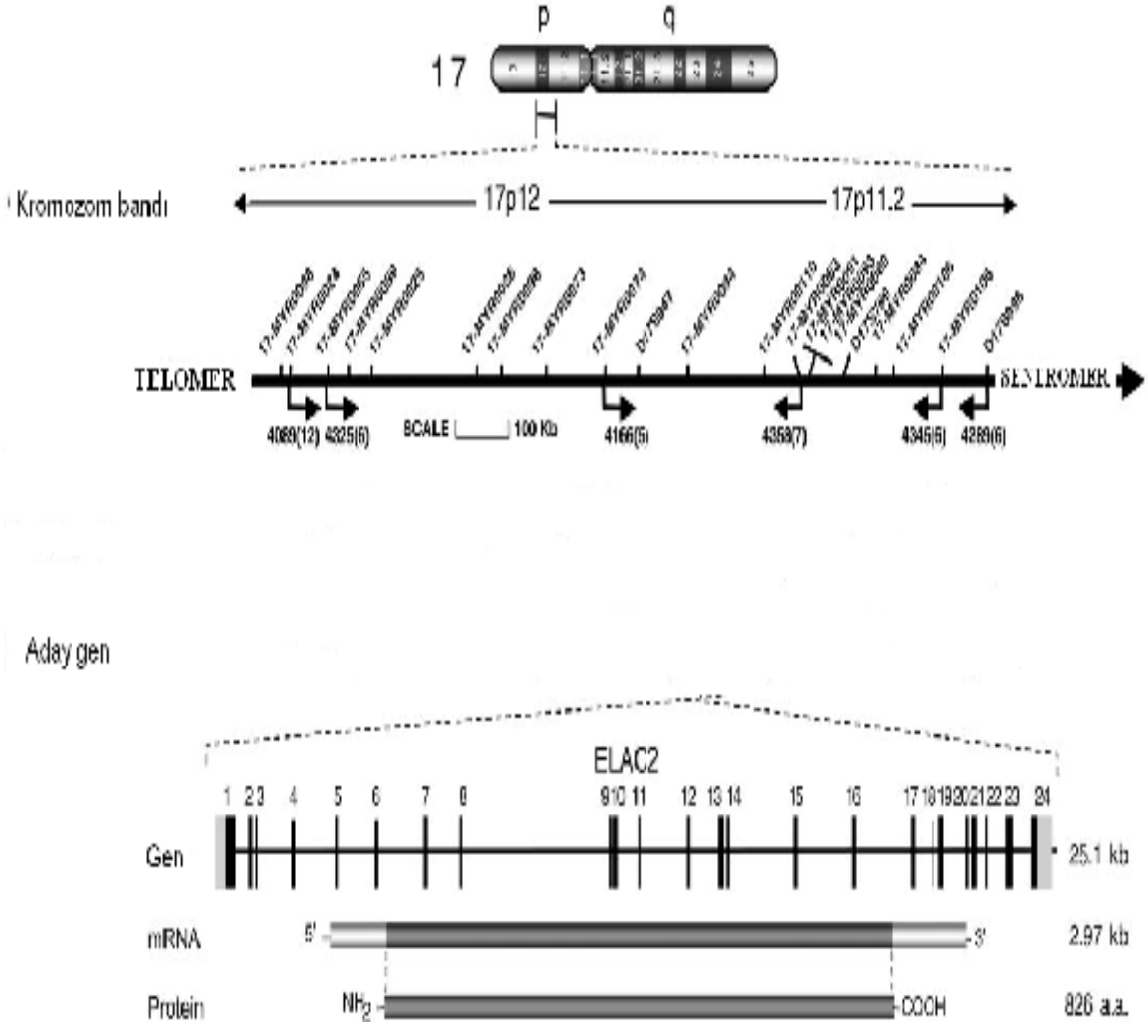
Yapılan bazı çalışmalarda, bazı ailelerde prostat kanseri vakalarının daha fazla görüldüğü bilinmektedir. Bu çalışmada prostat kanserine neden olan kuvvetli aday gen ya da genlerin, hastalığın görülmesini %63-89 oranında artırdığı fakat bu allel genlerin içindeki oranının %0.3-0.6 olduğu tespit edilmiştir. Bu analizlerden çıkan sonuçlardan yapılan tahminlere göre (prostat kanserinin allellerinin populasyon içindeki oranının küçük, hastalığın görülme oranının fazla olması) hastalığın taşıyıcı tek bir allele bağlı olduğu, otozomal dominant kalıtım gösterdiği şeklinde bir görüşün oluşmasına neden olmuştur (Gsur ve ark., 2003).

1.2.3.1. Kalıtsal Prostat Kanseri

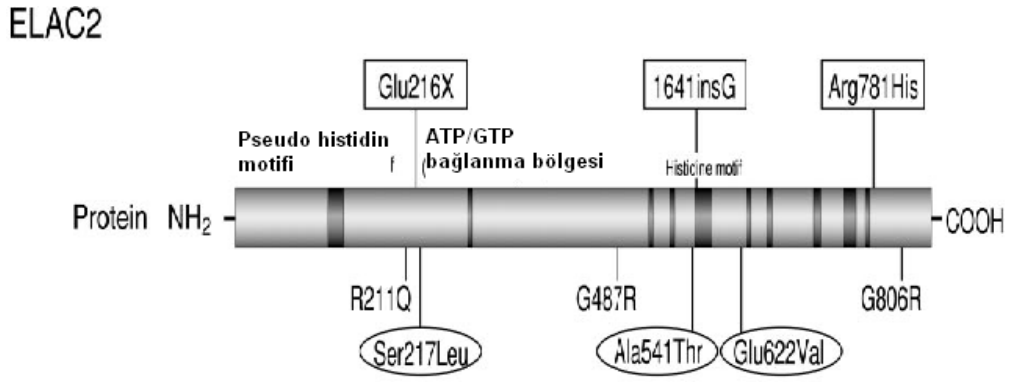
Kalıtsal prostat kanseri, bir çekirdek aile içinde 3 etkilenmiş akrabanın, 3 kuşakta ve 55 yaşından genç 2 akraba kişide görülmeleri ile tanımlanmıştır. Kalıtsal prostat kanseri taşıyan ailelerin ayırıcı analizleri ile otozomal dominant geçişli, yüksek riskli allellerde taşıyıcı olarak bulunup, erken yaşta prostat kanserine yatkınlık gösterdiği saptanmıştır. Tüm prostat kanserlerinin sadece %9'u kalıtsal geçişli olmakla birlikte 55 yaşın altında görülenlerin %43'ünden sorumludur (Carter ve ark, 1992). Bu epidemiyolojik bulgular, prostat kanseri hikayesi olan ailelerin etkilenen fertlerinde, sorumlu olan geni tanımlamak için, geniş tabanlı birtakım çalışmaların yapılmasına yol açmıştır. Bu çalışmalardaki hipotezlerden biri, prostat kanserinin kalıtsal formunda bulunan genlerin sporadik prostat kanseri gelişiminde de rol oynayabilmesidir (Kibel ve Nelson, 2005; Nwosu ve ark., 2001).

1.2.3.1.(1). ELAC2 Geni

İlk olarak bu gen, Utah'da prostat kanserli hastalarda yapılan bir genom taraması sırasında keşfedilmiştir. Bu çalışmada, ELAC2 geninin de prostat kanseri ile ilişkili bir gen olduğu ve 17. kromozomun kısa kolu üzerinde (17p11.2) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.2) (Tavtigian ve ark., 2001).



Şekil 1.2. ELAC 2 geninin 17. kromozom üzerindeki yeri ve yapısı (Simard ve ark, 2003).



Şekil 1.3. ELAC 2 proteinin yapısı (Simard ve ark, 2003).

HPC2/ELAC2 geninin ürünü ve fonksiyonları henüz tamamen aydınlatılmamıştır. Bu genin şifrelediği protein metal bağımlı hidrolaz enzimidir ve evrim sırasında korunmuş bir proteindir (Şekil 1.3).

Bu enzimin mitotik sürecin bir elemanı olan γ tubulin ile etkileşim içinde olduğu ve bu nedenden dolayı ELAC2 geninin hücre döngüsü kontrolünden sorumlu bir gen olduğu düşünülmektedir. Bu durum genin kısmende olsa prostat epitel hücrelerindeki artışını açıklamaktadır. Bu proteini kodlayan DNA'nın sekans analizleri sırasında DNA iplikçikleri arasındaki çapraz bağların tamirinde görev alan proteinlere (PSO2, SNM1) benzer homolojide olduğu ortaya çıkmıştır. ELAC2 proteininin PSO2/SNM1 DNA tamir proteinlerine benzer olması ELAC2 geninin DNA'nın tamir metabolizmasında görev aldığına işaret ediyor olabilir. Ayrıca ATP/GTP bağlı olması, bu proteinin ATPaz/GTPaz aktivitesinin de olduğunu gösterir. Son yapılan çalışmalarda ELAC2 geninin ürünü olan proteinin tRNA 3' endoribonükleaz (tRNAaz) olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca bu çalışmada enzimin molekül kütlesinin 85 kDa olduğu ve 826 amino asitten oluştuğu bildirilmiştir. Bu enzim öncü tRNA'ların 3' kuyruk kısımlarını sentezlemektedir. Domuz karaciğerinden saflaştırılan 3'tRNAaz'ın gen sekans analizleri ile BLAST çalışmaları yapıldığında ELAC2 geni ile aynı homolojide olduğu gösterilmiştir. Gen 24 ekzondan meydana gelip 25.1 kb büyüklüğündedir. (Şekil 1.2) (Takaku ve ark., 2003; Wu ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalar neticesinde ELAC2 geninden sonra, 3'tRNAaz enziminin C-terminal bölgesini kodladığı düşünülen bir gen daha keşfedilmiştir ve bu gene de ELAC1 adı verilmiştir (Takaku ve ark., 2003).

ELAC2 geninde 2 missense mutasyon vardır. Bunlar; 217. amino asit olan serinin lösine dönüştüğü (Ser217Leu) ve 541. amino asit olan alaninin treonine dönüştüğü (Ala541Thr) polimorfizmlerdir. HPC2/ELAC2 geni 24 ekzondan, 23 introndan meydana gelmektedir. Ala541Thr varyantı 17. ekzonda olup 1621. nükleotidin G'den A'ya (G1621A) dönüşümü sonucu meydana gelir. Ser217Leu varyantı ise 7. ekzondaki 650. C nükleotidinin T'ye dönüşümü (C650T) sonucu oluşur (Wang ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalarda prostat kanseri ile bu polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur. Tavtigian ve arkadaşlarının kalıtsal prostat kanseri taşıyan ailelerin erkeklerinde her iki varyant durumunda hastalık riskini artırdığını bildirmişlerdir. Leu217/Thr541 allelleri yalnızca Leu217 allelini taşıma durumuna göre daha hastalık yapıcıdır (Tavtigian ve ark., 2001). Ayrıca iki varyant arsında kuvvetli bir ilişki olduğu ve Leu217 genotipine sahip bireylerde Thr541 polimorfizminin görüldüğü bulunmuştur (Rebbeck ve ark., 2000). Populasyon tabanlı yapılan çalışmalarda homozigot Ala541 genotipli bireylerde homozigot Leu217 olması durumunun prostat kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir (Tavtigian ve ark., 2001).

Tüm bu çalışmaların aksine yapılan bazı çalışmalarda ise ELAC2 geninin prostat kanseri ile olan ilişkisinin anlamlı olmadığı bildirilmiştir. Meitz ve arkadaşları yapılan yedi çalışmayı toparlamış ve bu çalışmaların sonuçlarına göre Thr541 polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişkinin OR değeri 1.27 olarak yayınlamışlardır (Meitz ve ark., 2002). Severi ve arkadaşları da prostat kanseri ile bu iki polimorfizm arasındaki ilişkinin anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (OR: 1.557) (Severi ve ark., 2003).

Özet olarak ELAC2 geninin bu iki polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişkinin bazı çalışmalarda kodominant etkili olduğu Thr541 allelinin taşıyıcı etki gösterdiği şeklindedir. Fakat bu çalışmalarda bu polimorfizmler ile prostat kanseri arasındaki ilişkinin anlamlı olması seçilen hasta grubundan kaynaklandığı

genişletilmiş vaka kontrol çalışmalarında ise bu ilişkinin azaldığı gözlenmiştir (Gsur ve ark., 2003).

1.2.3.1.(2). Kalıtsal Prostat Kanseri 1 Geni (HPC1)

Kalıtsal prostat kanseri üzerine İsveç ve Amerika da yapılan bir çalışmada prostat kanseri açısından yüksek risk taşıyan 91 ailede 1. kromozomun uzun kolunda (1q24-25) majör hassas bir alan tanımlanmıştır. Bu alana sahip kişilerde prostat kanseri daha erken çıkma eğilimindedir. Ciddi prostat kanseri hikayesi olan İsveçli aileler arasında yapılan çalışmada, 65 yaşından önce prostat kanseri olan tüm bireylerde Kalıtsal Prostat Kanseri 1 (HPC1) geninin prostat kanseri ile bağlantılı olduğu kanıtlanmıştır (Gronberg ve ark., 1997; Ribeiro ve ark., 2002).

1.2.3.1.(3). PCAP (Putative Cancer of Prostate) ve CAPB (Capping Protein Beta) Geni

Yüksek riskli ailelerin incelenmesi, multipl hassas alanların tanımlanmasına yol açmıştır. Bu da birden fazla kalıtsal prostat kanseri geninin olabileceğini düşündürmektedir (genetik alan heterojenitesi). Berthon ve arkadaşları, prostat kanseri insidansı yüksek olan 47 Fransız ve Alman ailesini incelemişler ve ailelerin %50'sinin kromozom 1q42.2-43 (PCAP) ile bağlantılı olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar, HPC1 geninde olduğu gibi, bu alan ile bağlantının da hastalığın erken ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bir grup araştırmacı da 1p36'da (CAPB) nadir bir hassas alanı olduğunu bildirmişlerdir. İlginç olan, CAPB geni hem prostat kanseri hem de beyin kanseri ile ilişkilidir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.1.(4). HPCX Geni

Kalıtsal Prostat Kanseri X Populasyon çalışmaları, bazı ailelerde prostat kanserinin X'e bağlı geçiş gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Bu tahmin, erkek kardeşi

hasta olanlarda prostat kanserinin, babası kanserli hastalara oranla daha sık olabileceği gözlemine dayanmaktadır. Bu hipotezle uyumlu olarak, Xu ve arkadaşları, Kuzey Amerika, İsveç ve Finlandiya'dan prostat kanserli 360 aileyi inceledikleri çalışmalarında, kromozom Xq27-28 alanında hassas bir alanı tanımlamışlardır. HPCX geninin ailesel kanserlerin %16'sından sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Xu ve ark., 2001).

Özet olarak Herediter Prostat Kanseri (HPC) kompleks bir problemdir. Genetik alanda herediter prostat kanserine neden olan birden fazla genin varlığı prostat kanseri ile ilişkili hassas genlerin tanımlanmasını güçleştirmektedir. Prostat kanseri genlerinin bulunmasında diğer bir zorluk, yüksek riskli ailelerin tam sınıflamasındaki güçlüktür. PSA taraması erken tanıya olanak sağlar; bu da erken ortaya çıkan hastalık tanımını karıştırmaktadır. Benzer şekilde prostat kanserinin prevalansının yüksek olması, aileler arasında kalıtsal kanserlerin, sporadik hastalıktan ayrılmasını zorlaştırmaktadır (Reiter ve Dekernion, 2005).

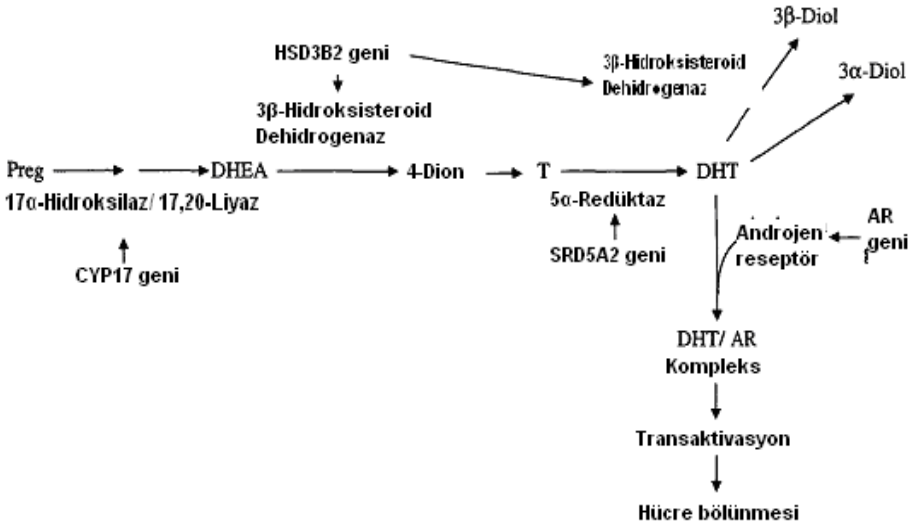
1.2.3.2. Sporadik Prostat Kanseri

1.2.3.2.(1). 5α-Redüktaz Tip II Geni (SRD5A2)

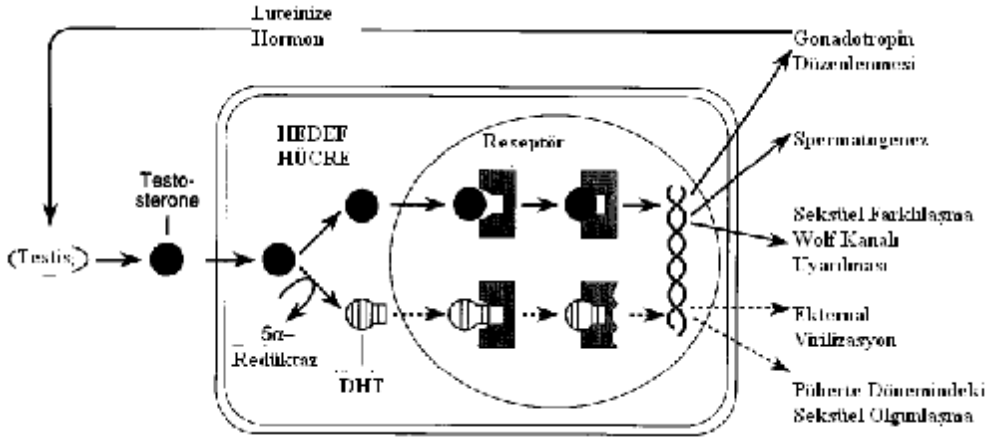
Androjenler, prostat gelişiminde önemli role sahip hormonlardır. Sıçanlar ile yapılan deneylerde birer androjen olan testesteron (T) ve dihidrotestesteron (DHT)'un, prostat adenokarsinomunun oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) de androjen metabolizmasının bozulması neticesinde oluşan bir hastalıktır. Ayrıca androjen metabolizmasının bozulması neticesinde pseudohermofroditizm denilen bir hastalığın da meydana geldiği tespit edilmiştir. Androjen hassas hastalıklar denilen akne, seborhea, hirsutizm ve androjenik allopecia gibi hastalıkların da androjen metabolizması ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Labrie ve Sun,1992).

Steroid 5α-redüktaz enzimi, membran üzerinde yer alan bir enzimdir ve testesteronu (T) dihidrotestesterona (DHT) geri dönüşümsüz olarak metabolize eder

(Şekil 1.4). Bu reaksiyonda kofaktör olarak nikotin amid dinükleotid fosfat (NADP) kullanılır (Makridakis ve Reichardt, 2001). Reaksiyon esnasında enzim testesterona C_{19} ve C_{21} noktalarında çift bağ yaparak bağlanır ve testesteronu redükte ederek DHT oluşumunu sağlar (Zhu ve Sun, 2005). Oluşan DHT, nükleer steroid-tiroid hormon reseptör süper ailesinin bir üyesi olan DHT androjen reseptörleri tarafından bağlanır ve reseptör hormon kompleksini oluşturur. Bu kompleks sonra hücre çekirdeğine geçerek, çekirdekte androjenden sorumlu genlerin promotırlarını aktive ederek, burada bir kısım genin transkripsiyonunun başlamasını sağlar. Sonuç olarak, DNA sentezindeki artış ve prostat dokusunun kendini yenilemesi ile ilgili süreç başlamış olur (Şekil 1.5) (Makridakis ve Reichardt, 2001). Buna göre, DHT seviyesinin anormal şekilde artışına neden olabilecek faktörler, prostat kanserine neden olabilir. Bir başka ifadeyle, androjen hormonlarının metabolik döngüsünü etkileyen genler, prostat kanseri için aday genlerdir.



Şekil 1.4. 5α-redüktaz enziminin rol oynadığı androjen metabolizması biyokimyasal yolağı (Simard ve ark, 2003)



Şekil 1.5. Androjen metabolizması (Simard ve ark, 2003)

Tavşan, sıçan ve insan fetüsü ile ilgili yapılan çalışmalarda da, prostat ve eksternal genital organların farklılaşmasında steroid 5α-redüktaz enzim aktivitesinin rol aldığı gösterilmiştir. Bu bilgilere göre steroid 5α-redüktaz enziminin erkek seksüel organlarının farklılaşmasında da rol aldığı belirtilmiştir. Sonuç olarak; DHT erkek eksternal genital organlarının ve prostatın farklılaşmasında görev alırken, testesteron ise wolf kanalının farklılaşmasında görev almaktadır (Reiter ve Dekernion, 2005).

Steroid 5α-redüktaz tip II enziminin eksik olduğu durumlarda, redüktaz aktivitesinin azalmasından dolayı, prostattaki ve dolaşımdaki DHT konsantrasyonunda bir düşüş gözlenir. Bu durumdan etkilenmiş erkekler, rektal muayene edildiğinde prostatın elle hissedilmeyecek kadar küçüldüğü gözlenmiştir. Ayrıca transrektal ultrasonografide ve manyetik rözenans (MR) görüntüleme yönteminde de gelişmemiş bir prostat görünümü söz konusudur. Normal enzim aktivitesine sahip bireylerile enzim aktivitesi dişük olan bireyler karşılaştırıldığında, enzim aktivitesi düşük olan hastaların prostat hacminin kontrollerin prostat hacminin %10'u kadar olduğu gösterilmiştir. Bu hastaların biyopsilerinin histolojik sonucunda, prostat dokusunun fibröz konnektif bir yapıda, pürüzsüz kas yapısında ve tanımlanamayan bir epitel doku görünümünde olduğu bildirilmiştir. Bu durum, **atrofik epitel** ya da **epitel farklılaşma eksikliği** olarak tanımlanmaktadır. Bu

hastalarda plazma PSA seviyesi düşüktür. Tersi durum olan prostat kanserinde ise enzim aktivitesinin artması ve prostatta ve dolaşımdaki DHT yükselişi söz konusudur. Bu hastalarda ise plazma PSA seviyesi yüksektir (Zhu ve Sun, 2005).

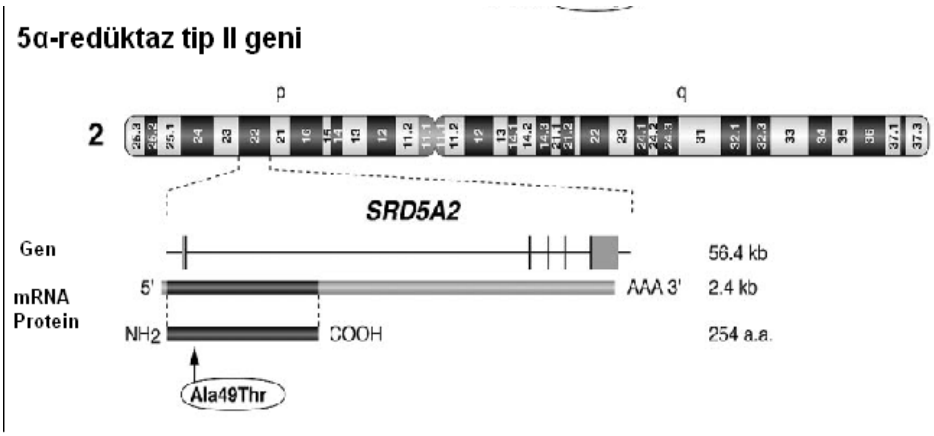
İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde, bu enzimin iki izozimi olduğu bulunmuştur. Steroid 5α-redüktaz Tip I ve steroid 5α-redüktaz Tip II olarak adlandırılan bu enzimler ile yapılan karakterizasyon çalışmaları neticesinde enzimleri özellikleri şu şekilde belirtilmiştir (Makridakis ve Reichardt, 2001; Viger ve ark., 1996; Thigpen ve ark., 1992).

Steroid 5α-redüktaz Tip I enzimi; 259 aminoasitten meydana gelen, 29.462kDa moleküler ağırlıkta olan bir enzimdir. Genel olarak, karaciğer, genital olmayan deri dokusunda, prostatta ve beyin dokusunda sentezlenmektedir. Optimum aktive olduğu pH aralığı nötral ya da bazik pH'dır ve prostattaki seviyesi tip II enzimine göre daha düşüktür. Bu enzimden sorumlu olan gen SRD5A1 olarak isimlendirilmekte olup, 5. kromozomun kısa kolunun 15. bölgesinde (5p15) yer almaktadır. Tip II enzimi geninde olduğu gibi SRD5A1 geni de 5 ekzon ve 4 introndan oluşmaktadır. Steroid 5α-redüktaz eksikliği görülen bireylerde bu enzimde herhangi bir mutasyon olmadığı gözlenmiştir (Makridakis ve Reichardt., 2001; Zhu ve Sun, 2005).

Tip I steroid 5α-redüktaz geni, enzim aktivitesinin herhangi bir değişimine neden olamamaktadır. Ayrıca bu gen insan prostatından primer olarak eksprese olmamaktadır. Yapılan bir çalışmada sıçan karaciğerinden klonlanan tip I 5α-redüktaz geni ile, insandan klonlanan tip I 5α-redüktaz geninin %60 oranında homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Labrie ve ark., 1992).

Steroid 5α-redüktaz Tip II enzimi; 254 aminoasitten meydana gelmiş olup, 28.398kDa moleküler ağırlıkta olan bir enzimdir. Bu enzimin sentezlendiği dokular; prostat, epididimis, seminal vezikül, genital deri, uterus, karaciğer, göğüs, saç folikülleri, plasenta ve beyindir. Steroid 5α-redüktaz Tip I enziminin aksine nötral ya da asidik pH'da optimum aktivite göstermekte olup prostattaki seviyesi de yüksektir. Sorumlu olan gen ise SRD5A2 olarak isimlendirilmekte olup 5 ekzon ve 4 introndan meydana gelmektedir. Bu genin lokalize olduğu kromozom bölgesi 2. kromozomun kısa koludur (2p22-23) (Şekil 1.6). Gen büyüklüğü 56.4 kb olup, bu gende oluşan

mutasyonlar neticesinde, steroid 5α-redüktaz enziminin aktivitesinde düşüş olduğu bildirilmiştir (Makridakis ve Reichardt., 2001; Zhu ve ark., 2005).



Şekil 1.6. 5α-redüktaz tip II geninin 2. kromozom üzerindeki yeri, yapısı ve proteini (Simard ve ark, 2003).

SRD5A2 polimorfizmi 5α redüktaz varyantlarının farklı enzim aktivitelerinde olmasına neden olur. Dinükleotit tekrar polimorfizmi $(TA)_n$ SRD5A2'nin 3' ucundaki translasyon olmayan bölgesinde (UTR) bulunmaktadır. Bu polimorfizm protein yapısını etkilememekte, aynı zamanda mRNA'nın stabilitesinde değişikliğe neden olmakta ve böylece enzim aktivitesine etki etmektedir. 3 farklı dinükleotid tekrarı tanımlanmıştır. $A(TA)_0$ aleli allelin %96'sı ile ilgilidir. Diğer varyantlar ise $(TA)_9$ ve $(TA)_{18}$'dir. $(TA)_{18}$ alleli özellikle Afrikan Amerikalılarda görülmektedir. Afrikan Amerikalılar, prostat kanseri insidansının diğer etnik gruplara göre en yüksek görüldüğü etnik gruptur (Ntais ve ark., 2003; Seenundun ve Robaire, 2005).

SRD5A2 geninde 1. ekzon üzerinde yaygın olarak iki tane missens mutasyon tanımlanmıştır. Kodon 89'da valin yerine lösin geçmekte (Val89Leu), kodon 49'da alanin yerine treonin (Ala49Thr) geçmektedir. Bu polimorfizmler DHT seviyesini değiştirebilmekte ve dolayısı ile PK riskini etkilemektedir. Ala49Thr varyantı, en sık Afrikalı Amerikalılarda bulunmuştur. Önemli olarak, Ala49Thr alleli vahşi tip enzimden 5 misli daha yüksek aktiviteye sahiptir. Bu da allelin nasıl Afrikalı Amerikalı erkeklerde artmış riske neden olduğunu açıklayabilecek bir mekanizmayı gözler önüne sermektedir. Val89Leu varyantı Afrikalı Amerikalılardan çok, Asyalı Amerikalılarda bulunur. Bu allel, testesteronu daha düşük bir verimlilikle DHT'ye

çevirir ve bazı kişilerdeki daha düşük olasılıkla bir prostat kanseri gelişme riskini açıklayabilir.

Reichardt ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 4 farklı etnik gruba Val89Leu polimorfizmi açısından bakılmış ve sonuç olarak bu polimorfizmin enzim aktivitesini değiştirdiği bulunmuştur. Bu polimorfizm, Afrika kökenli Amerikalılarda yaygın olarak bulunmakta ve enzim aktivitesini yükselterek prostat kanseri riskini artırmaktadır (Reichardt ve ark., 1995). Nam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Val89Leu polimorfizminin prostat kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir (Nam ve ark., 2001). Fakat Soderstrom ve grubu yaptığı çalışmada, metastaz yapan hastalarda Leu homozigot genotipinin prostat kanseri riskini 6.67 kez düşürdüğü konusunda rapor vermişlerdir (Soderstrom ve ark., 2002). Bu gruba benzer olarak Shibata ve arkadaşları da Val89Leu polimorfizminde homozigot Leu genotipinin hastalığın prognozunu hafiflettiği yönünde bulgu sunmuşlardır (Shibata ve ark., 2002).

Makridakis ve arkadaşlarının çalışmasında Ala49Thr polimorfizminin Afrika kökenli Amerikalı erkeklerde prostat kanseri riskini 7.2 kez artırdığını bulmuşlardır. İspanyol erkeklerinde ise hastalık riskini 3.6 kez artırdığını bildirmişlerdir. Ala49Thr polimorfizmi tüm populasyonlarda yaygın olarak bulunur. Bu çalışmada Treonin varyantı Afrika kökenli Amerikalılarda %1, İspanyollarda %2, Kafkaslarda ise %5-6 sıklığında görülmektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Ala49Thr polimorfizminin, Asyalılarda prostat kanseri riskini belirgin şekilde artırmadığı yönündedir (Makridakis ve Reichardt, 2001). Allen ve arkadaşlarının çalışmasında, en azından Treonin alleli taşıyan erkeklerde steroid 5α-redüktaz aktivitesi ve intraprostatik DHT'nin serum markırı olan androstenoidol glukuronid konsantrasyonunu belirgin bir şekilde düşürdüğü bulunmuştur (Allen ve ark., 2001).

1.2.3.2.(2). Androjen Reseptör (AR) Geni

Androjen reseptörü biyolojik olaylardan embriyogeneziste rol alan reseptörlerdendir. Bu dönemde Wolf kanalının ve eksternal genital yapının erkek özelliği kazanmasından sorumludur. Erişkin dönemde de spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynar. Androjenin nükleus içi etkisine androjen reseptörü (AR) aracılık eder. Yapılan çalışmalar neticesinde androjen reseptörünü şifreleyen genin X kromozomu üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Bu gen steroid reseptör gen ailesinin bir üyesidir ve çok sayıda farklı mutasyon içerir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Androjen reseptörü defekti çeşitli klinik fenotiplerle sonuçlanabilmektedir. Androjen reseptörünün tamamen yok olması durumunda hem eksternal hem de internel erkek yapı gelişimi başarısızlığa uğrar. Bunun sonucunda tamamen androjen hassasiyetsizliği ya da testiküler feminizasyon oluşur. Bazı hastaların dış görünüşü normal bir kadın gibi gelişir. Göğüsler oluşur ve dış genital sisteme sahiptir. Bazı hastalarda aksiler ve pubik bölgede kıllanmada azalma olabilir (McPaul, 1999).

Androjen reseptörü steroid hormon–tiroid hormon-retinoik asit reseptör ailesinin özelliklerine benzer bir reseptördür. Bu ailenin diğer üyeleri gibi androjen reseptörü de spesifik segmentlere ayrılırlar. Bu segmentler spesifik DNA sekansının bağlanmasına vesile olur. Androjenin bağlanması okuma çerçevesini başlatır ve büyük amino terminal segmentini de şifreler. Androjen reseptörü bu üç motifi nadiren de olsa içerir ve bu motifler amino asit rezidülerinin tekrarlarından meydana gelirler. Bunlardan biri 20-25 adet glutamin rezidüsü tekrarından, ikincisi 8 prolin tekrarından oluşur. Üçüncüsü ise 23 adet glisin tekrarı içerir. Bu tekrarların bazıları aynı anda aynı androjen reseptöründe görülebilmektedir (Gsur ve ark., 2003).

AR geni Xq11.2-q12 lokalizedir ve ligand aktivatörü transkripsiyon faktörünü şifreler. AR geni N-terminal transkripsiyon aktivasyon bölgesini içerir ve bu bölge ekzon 1'de bulunmaktadır. Bu ekzon ilaveten korunmuş DNA bağlama bölgesini ve C terminal androjen bağlanma bölgesini de içermektedir. Ekzon 1 iki polimorfik satalit içerir. Bu mikrosatalit yaklaşık 1.1 kb büyüklüğündedir ve yüksek oranda CAG tekrarı ve düşük oranda GGC tekrarı içerir. AR aktivasyonundaki artışı bu

polimorfik tekrarlar sağlar ve buna bağlı olarak da prostat kanseri riskini de değiştirebilir (Gsur ve ark., 2003).

Glutamin zincirini kodlayan CAG tekrarı sayısı, normal populasyonda 8-35 arasında değişen tekrar sayısı içerir. AR geninin genişlemesine neden olan CAG tekrarının, X'e bağlı nörodejeneratif hastalıkta, spinal bulbar musküler atrofi yada Kenedy hastalığında 40'ın üzerinde olduğu tanımlanmıştır. Polimorfik CAG tekrarının uzunluğu, AR'nin transaktivasyon fonksiyonu ile ters ilişkilidir. CAG tekrarının kısa olması yani daha az CAG tekrarı içermesi erkeklerde prostat kanseri riskini artıran bir etkendir. Glisin zincirini kodlayan GGC tekrarı, 10-30 arasında değişiklik göstermektedir. Şu anki bilgilere göre GGC'nin uzunluğu ile AR fonksiyonu arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmamıştır. Fakat yapılan çalışmalar sonucunda CAG tekrarının prostat kanseri ile ilişkisinin, GGC tekrarına oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Gsur ve ark., 2003).

1.2.3.2.(3). Prostat-Spesifik Antijen (PSA) Geni

PSA, prostat bezinin salgılayıcı epitel hücrelerinden salgılanan, androjen düzenleyici bir serin proteazdır. PSA'nın 1979'daki keşfinden bu yana, kanser gelişimi ve prostat kanserinin erken teşhisi için PSA serum düzeyi tümör markırı olarak kullanılmaktadır (Gsur ve ark., 2003).

AR'nin önemli fonksiyonlarından biri, hedef genlerin promotör bölgesinde, androjen bağlı cevap elementi ile diğer genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Androjen düzenleyici hedef genlerden bir tanesi PSA genidir. Bu gen üç ARE'nin proksimalindedir ve bu gende tek nükleotid polimorfizmi görülmektedir. ARE I'de iki allelik varyant tanımlanmıştır. Bunlar AGAACAnnnAGTACT ve AGAACAnnnAGTGCT'dir. AR'nin bu iki allelik varyanta, A ve G, farklı afiniteler ile bağlandığı sanılmaktadır. Bu da PSA ekspresyonunun farklı olmasına neden olmaktadır (Gsur ve ark., 2003).

Kallikrein gen ailesi 19. kromozomda lokalizedir. Bu gen ailesi 15 tane gen içerir ve bu genler serin proteinazları şifreler. Bu proteinlerin bir çoğu prostattan

eksprese olmaktadır. PSA, prostatın epitel hücrelerinin glandüler lümeninden salınır ve 10 ile 50 μmol/L seviyesinde gözlenir (Gsur ve ark., 2003).

PSA'nın Ekspresyonuna Etki Eden Faktörler; PSA ekspresyonu ligant bağımlı yada bağımsız olabilir. Ekstraselüler PSA seviyesinin yükselmesi PSA ekspresyonu ile prostatik salgı bezi sistemi arasındaki ilişkinin bozulması sonucu oluşur. PSA formunun ekstraselüler seviyesi bunun metabolize olmasına ve vücuttan temizlenme şekline de bağlıdır. Serbest PSA (fPSA) kandan böbrekler yolu ile glomerüler filtrasyon ile yaklaşık 6 saatte temizlenir. Böbrek fonksiyonların şiddetli bozukluğunda fPSA seviyesi ciddi oranda artar. Bu yüzden prostat kanseri vakalarında dikkate alınmalıdır. İleri dönem prostat kanserlerinde özellikle yetişkinlerde ekstraselüler PSA salınımı sağlıklı kişilere göre 10 bin kez daha artmış durumdadır. fPSA'nın kompleks PSA formuna oranı hastalık tipine göre değişmektedir (Emil ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalar sonucunda total PSA seviyesi 4-10ng/ml aralığında olduğu saptanmıştır. Heterojen olan fPSA üç majör kompanent kapsar. Latent pro-PSA, olgun tek zincirli PSA ve çok zincirli aktif olmayan PSA'dır. Latent pro-PSA'nın birkaç farklı varyantı da vardır. Bunlar pro-PSA'nın aktif bölgedeki peptidlerinin az ya da çok kesilmesi sonucunda oluşur (Emil ve ark., 2004).

1.2.3.2.(4). Sitokrom p450c17α Geni (CYP17)

CYP17 geni ürünü, sitokrom p450 süper ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin üyesi olan 17α hidroksilaz ve 17,20-liyaz steroid biyosentezinde iki kilit reaksiyonu katalize etmektedir. Bu reaksiyon döngüleri adrenal korteks ve testisin endoplazmik retikulum ve mitokondrisinde gerçekleşmektedir. Buralarda farklı p450 izoformlarına da rastlanmaktadır. Testesteron biyosentezinin 1. aşamasında kolesterol mitokondriye girer ve burada pregnenolona dönüşür. 17α hidroksilaz prognenolon da 17 hidroksi progesterona dönüşür (Reiter ve Dekernion, 2005).

CYP17 geninin 5' promotır bölgesinde translasyon başlangıç bölgesinin 34 bç önünde T'nin C'ye dönüşümü gözlenmektedir. Polimorfik allel A_2 de dizayn edilmiş

ve bu bölgenin Sp1 bağlanma bölgesini oluşturarak gen ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.2.(5). Sitokrom p450 3A4 Geni (CYP3A4)

CYP3A4, sitokrom p450 süpergen ailesinin bir üyesidir. Testesteronu okside ederek 2,6 ve 15 hidroksitestesterona dönüştürür. Bu moleküller hormonun fonksiyonunu kaybetmesine neden olur. 5' regülatör elementinde değişikliğe neden olan A'nın G'ye değişim polimorfizmi CYP3A4 geninin önünde yer almaktadır. Bu bölge CYP3A4 geninin transkripsiyon başlama bölgesine denk gelmekte ve 287 ile 296 bç aralığında (AGGGCAAGAG'nın AGGGCAGGAG'ye değişikliği) bulunmaktadır (Reiter ve Dekernion, 2005).

$P450_{NF}$–spesifik element (NFSE), insan karaciğer hücre hattı HepG2 hücrelerinde CYP3A4 geni transkripsiyonu için gerekli olan nükleer proteinler tarafından bağlanmış CYP3A4 spesifik elementine benzer bir elementtir. Rebbeck ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CYP3A4 varyantlı erkeklerde CYP3A4 protein aktivasyonunun azaldığını bulmuşlardır (CYP3A4-V ya da CYP3A4*1B). Bu protein aktivasyonunun azalması ile de 2,6 ve 15 testesteronun oksidasyonu azalmıştır. Bu oksidasyon azalması, testesteronun intraselüler mediatör olan DHT'ye dönüşümü için gereklidir. Androjenik hormon olan DHT, prostat hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonun düzenlenmesini sağlamaktadır (Reiter ve Dekernion, 2005).

Geç yaş ve aile öyküsünde prostat kanseri olmayan kişilerde CYP3A4*1B genotipi yüksek derecede tümör markırı olarak bulunmuştur. Yaşlı erkeklerde yüksek bazal testesteron seviyesi ile CYP3A4*1B genotipi arasında ilişki vardır. Bu polimorfizmi taşıyan erkekler ile sağlıklı kontrol grubundaki erkekler karşılaştırıldığında varyant genotipe sahip erkeklerde testesteron seviyesinin yüksek olduğu saptanmıştır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.2.(6). Kromozom 8p'de Heterozigozitenin Kaybolması

Knudson ve arkadaşları kanser hastalığının, hücre replikasyonu ve ölümü gibi önemli hücresel olayları kontrol eden genlerin kaybedilmesi ya da bu genlerde oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir. Kromozom 8p'de lokalize olan bir takım potansiyel tümör süpresör alanların, sporadik prostat kanseri ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.2.(7). Tip 2, 3 β-Hidroksisteroid Dehidrogenaz Geni (HSD3B2)

DHT'nin inaktivasyonunu başlatır ve prostat kanser riskini belirleyebilecek diğer bir gen adayıdır. Devgan ve arkadaşları, bu gende, spesifik etnik gruplarda ayrılan, bir polimorfik dinükleotid tekrarı saptamışlardır (Devgan ve ark., 1997).

1.2.3.2.(8). Sitokrom P459C17α ve Sitokrom P450 3A4 Geni

Sitokrom P459C17α (CYP17), testesteron sentezinin önemli noktalarında, 17 α-hidroksilaz/ 17-20 liyaz aktiviteleri için katalizör görevi yapar. CYP17'nin 5' UTR'si iki allelik değişken –A1 ve A2'yi ayırt eden tek baz polimorfizmi ihtiva eder. İki A2 alleli taşıyan kadınların, göğüs kanseri olma riskinin çok yüksek olduğu bildirilmiştir. A1 alleli için erkek homozigotlar, İsveçli bir prostat kanserli grupta, kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu allelin, prostat kanseri gelişme riskini artırabildiği düşünüldü. A1 allelin, artmış androjen üretiminin prostat kanseri riskini artırdığı tezini destekleyen bir şekilde, A2'den çok daha aktif bir enzimi kodladığı saptanmıştır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.2.(9). Sitokrom P450 3A4 Geni (CYP3A4)

Testetsteronun oksidatif degredasyonunda yer alan CYP3A4 geninin 5' UTR bölgesinde bir polimorfizm tanımlanmıştır. CYP3A4-V, kötü diferansiye ve lokal

ileri evre prostat kanserli beyaz erkeklerde daha çok bulunmaktadır. Bu değişken allel, beyazlar, Japonlar, Çinliler ya da Latin erkeklerle karşılaştırıldığında Afrikalı Amerikalılarda çok daha sıklıkla bulunmaktadır. Ayrıca, prostat kanseri olmayanlara göre prostat kanserli Afrikalı Amerikalılarda çok daha sıktır ve çok daha agresif tümörle birlikte bulunmaktadır (Paris ve ark., 1999).

1.2.3.2.(10). Vitamin D Reseptörü

Vitamin D [1.25 (OH)2D], prostat kanser hücrelerinin diferansiyasyonuna neden olabilen ve proliferasyonunu engelleyebilen bir steroid hormondur. Vitamin D analogları, prostat kanseri ksenogreftinin büyümesini durdurabilmektedir. Pilot klinik çalışmalarda anti-tümör aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Bazı epidemiyolojik çalışmalar, vitamin D'nin düşük plazma seviyelerinin, prostat kanseri riskinde artışa neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Schwardz ve Hulka İsveç ve Danimarka gibi kuzey ülkelerinde görülen prostat kanseri insidansındaki yüksekliğin, ultraviyole ışınlarının az alınmasının bir sonucu olarak, düşük vitamin D seviyesi ile ilgili olduğunu ileri sürmüşlerdir (Schwardz ve Hulka, 1990).

Vitamin D'nin etkileri, vitamin D'den sorumlu genlerin transkripsiyonunu aktive eden vitamin D reseptörü (VDR) tarafından oluşturulur. Morrison ve arkadaşları tarafından, kemik yoğunluğu ve osteoporoz ile alakalı bir dizi VDR gen polimorfizmi bildirilmiştir. *Taq 1* restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) ekzon 9'da yerleşmiştir (T ve t olarak gösterilmiştir). Poliadenozin polimorfizmi, kısa (S) (14-17) ya da uzun (L) (18-22) sayıda adenozin tekrarları ile karakterize VDR'nin 3' tarnslasyon olmayan bölgesinde bulunan, tek bir nükleotid mikrosatalittir. *Bsm1* varyantı, intron içinde ikinci bir RFLP bölgesidir (B ve b olarak gösterilmiştir). Üç polimorfizmde, spesifik allellerin birbirine (örneğin TL ve tS) bağlanmaya eğilimleri olduğu anlamına gelen, disequlibriyum bağlantısındadır. Önemli olarak bu genetik değişkenler, VDR'de arka arkaya gelen değişikliklere neden olmamalarına rağmen, hem vitamin D seviyeleri ile hem de VDR sorumlu gen ekspresyonunun invitro ölçümleri ile korelasyon içindedirler. Örnek olarak poli A

polimorfizmin S alleli ve *Taq 1* RFLP'nin t alleli, sırasıyla T ve L allellerinden daha yüksek aktiviteye sahiptir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Prostat kanseri riskinin spesifik VDR polimorfizmleri ile ilgili olup olmadığını belirlemek için çok sayıda olgu kontrollü çalışma yapılmıştır. Igles ve arkadaşları Latin olmayan beyaz prostat kanserli hasta ve hasta olmayan kontrol grubu ile çalışma yapmışlardır. Tek "uzun" poli A allelinin varlığının, prostat kanser riskini 4.6 misli artırdığını bulmuşlardır (Reiter ve Dekernion, 2005).

VDR polimorfizmi ve prostat kanseri arasında ilişki bütün çalışmalarda bulunamamıştır. Kibel ve arkadaşları, prostat kanserinden ölen 41 hastanın ve 41 kontrol grubunun VDR genotiplerini incelemişlerdir. *Taq 1* poli A polimorfizmlerinin arasında güçlü bir bağlantı olduğunu saptamalarına rağmen, iki populasyon arasında spesifik VDR polimorfizmi prevalansında farklılık bulamamışlardır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.2.(11). İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü

İnsulin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) normal ve transforme prostat epiteli üzerinde hem mitojenik, hem de apopitotik etkiye sahiptir. Bazı veriler IGF 1'in prostat kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde yer aldığını göstermektedir. IGF 1 aktivitesi, IGF 1'i bağlayan ve üzerinde tutan bir grup IGF- bağlayıcı protein (IGFBP) tarafından düzenlenir. Artmış prostat kanseri riski ile plazma IGF-1 seviyesi arasında bir ilişkinin olduğunu doğrulayan çalışmalarda, en yüksek IGF düzeylerine sahip erkeklerde, düşük seviyelere sahip erkekler ile karşılaştırıldığında, prostat kanseri gelişme riskinin 4.3 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3. Diğer Genetik Değişiklikler

1.2.3.3.(1). Telomeraz

Normal hücresel yaşlanma, telomerlerde ya da kromozom uçlarında genetik materyalin progresif kaybı ile karakterizedir. Sürekli kendini yenileyebilme ve proliferasyon özelliği olması ile tanımlanan kök hücrelerinde telomerlerde kısalma olmaz ve tanım olarak bu hücreler ölümsüzdürler. Kök hücreleri, bir reverse-transkriptaz olan ve kaybolan telomerik ünitelerin yenileyen telomerazı üreterek telomerlerdeki kısalmayı engellerler. Telomeraz ekspresyonu, kastrasyon sonrasında sıçan prostatında yeniden düzenleme olur ve muhtemelen androjen eksikliğinde rezidüel dokuların devamlılıklarını sağlamalarında rol oynar. Çoğu prostat kanserinin de telomeraz ürettiği bildirilmiştir. PIN lezyonlarında da telomeraz ekspresyonu bulunmaktadır. Bu da bu lezyonların prostat karsinogenezisinde erken bir dönem olduğunu ve kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Hipotezlerden biri, prostat kanserinin kendisinin, normal olarak bu enzimi üreten prostat kök ya da progenitör hücrelerinden ortaya çıktığıdır. Örneğin kromozom 8p üzerinde lokalize bir tümör süpressör genin kaybı sonucu bu hücrelerin transformasyona uğraması, kök hücrelerinin anormal proliferasyonuna neden olabilir ve böylece hücrenin kanser fenotipine dönüşmesine neden olabilecek ek genetik değişiklikler meydana gelir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(2). Glutatyon-S-Transferaz Pi

Normal metabolizma sırasında ya da çevresel ya da diğer etkenler sonucu oluşan reaktif oksijen türleri (örn, serbest radikaller) oldukça mutajenik ve karsinojenik olabilirler. Reaktif oksijen türleri, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi konaktaki koruyucu enzimler tarafından inaktive edilirler. Bu enzimlerden biri olan GST-pi'nin ekspresyonunun, hemen hemen tüm PIN ve prostat kanseri olguların kaybolduğu bildirilmiştir. Bu ekspresyon kaybı, GST-pi'nin regülatör sekanslarının hipermetilasyonuna bağlı

gelişir. Ancak bu hipermetilasyonunun nedeni bilinmemektedir. GST-pi kaybı yeni mutasyonların gelişmesine neden olurken, bu da kanser gelişimine neden olabilir. Bu prostat kanserinde şimdiye kadar tanımlanmış en sık genomik değişikliktir ve muhtemelen hastalıktaki başlatıcı olaylardan biridir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(3). PTEN/AKT Geni

Kromozom 10q'da heterozigozite kaybı, prostat kanserinde sıklıkla gözlemlenen bir genetik değişikliktir. Kromozom 8p'deki heterozigizitenin kaybının aksine, 10q'daki kayıp ileri evre hastalıkla ilişkilidir; bu da bu bölgede lokalize genlerin prostat kanserinin ilerlemesinde rol oynadığını düşündürmektedir (Reiter ve Dekernion, 2005).

PTEN/MMAC tümör süprösör genleri, kromozom 10q23'te saptanmış ve haritalanmıştır. PTEN, glioblastoma ve endometrial kanserler gibi birçok kanserde mutasyona uğrayan ya da silinen bir protein/lipid fosfotazı kodlarlar (Reiter ve Dekernion, 2005).

PTEN'deki değişiklikler hem lokalize, hem de metastatik prostat kanserinde saptanmıştır. Heterozigozite kaybı ile uyumlu olarak, organa sınırlı tümörlerin %10-20'sinde ve ileri evre tümörlerin yaklaşık yarısında PTEN allellerinde kayıp ya da mutasyon bulunmaktadır. PTEN fonksiyonunun kaybının, ekspresyonunun kaybı yolu ile de olduğu bildirilmiştir. Whang ve arkadaşları, ileri evre prostat kanseri ksenogreftlerinin %50'sinde, inaktive edici mutasyonların ya da allel kaybının olmamasına rağmen PTEN ekspresyonunun azaldığını ya da olmadığını bildirmişlerdir. Demetilasyon PTEN ekspresyonunu iyileştirmiştir, bu da PTEN'in regülatör sekanslarının hipermetilasyonunun bu geni inaktive edebileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, PTEN ekspresyonunu immünhistokimyasal olarak inceleyen çalışmalar, PTEN ekspresyonunun kaybının, mutasyon ya da heterozigozite kaybından daha fazla olabileceğini öne sürmektedir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Bazı çalışmalar, PTEN'in, P13 kinaz/AKT sinyal yolunda negatif bir düzenleyici olduğunu göstermiştir. P13 kinaz, epidermal büyüme faktörü

düzenleyicisi (EGFR), IGF reseptörü ve her-2/neu gibi prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan bazı büyüme faktörlerinin "downstream" hedefidir. P13 kinazın bu ve diğer sinyal yollar ile aktivasyonu, bilinen bir onkogen olan ve proliferasyona ve apopitozun inhibisyonuna yol açan AKT aktivasyonuna neden olur. PTEN'in normal fonksiyonu P13 kinazı defosforile ve inaktive etmektir. Prostat kanserinde, PTEN'in kaybı, P13 kinaz ve sonrasında Akt ve onun "downstream" sinyallerinin aktivasyonuna yol açar. Bu modelle uyumlu olarak, Wu ve arkadaşları, bir prostat kanseri ksenogreftleri serisinde, PTEN kaybı ve AKT aktivasyonu arasında mükemmel bir negatif ilişki göstermişlerdir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(4). p27 Geni

p27, kromozom 12p12'de lokalize olan bir tümör süpresör geni adayıdır. Bazı prostat kanseri ksenogreftlerinde de bu bölgede genetik materyal kaybı gösterilmiştir. Radikal prostetaktomi yapılan hastalardaki çalışmalar, p27 ekspresyonu kaybı ve biyokimyasal rekürens riski artışı arasında bir ilişki bulmuşlardır (Reiter ve Dekernion, 2005).

p27 ekspresyonunun hangi mekanizma ile kaybolduğu ve bunun tümörlere nasıl malign bir potansiyel kazandırdığı tam olarak anlaşılamamıştır. p27, sikline bağımlı kinaz (sbk) inhibitörlerinden Cip/Kip ailesine aittir. Siklin E/cdk2 kompleksine bağlanıp inhibe ederek hücre siklusun G_1 fazından S fazına progresyonunu düzenler. Böylelikle, p27 kaybı, hücrelerin, hücre siklusunda ilerlemelerini sağlayarak tümör oluşumunu hızlandırabilir. p27 ekspresyonu kaybı, heterozigozite datalarında öne sürüldüğü gibi, genetik kayıp sonucu oluşabilir. Ancak, p27 ekspresyonu kaybı, kromozom 12p12'de heterozigozite kaybından çok daha sıktır ve immunohistokimyasal çalışmalarda gösterildiği gibi, invaziv kanserlerin çok erken evresinde oluşur. Loda ve arkadaşları, p27 proteininin, ubiquitin-proteazom yoluyla çok hızlı bir şekilde ve özellikle tümör hücreleri tarafından yıkılabileceğini göstermişlerdir. Bu hızlı protein yıkımının nedeni tam olarak bilinmemekle beraber prostat kanserinde yer aldığı öne sürülen ras-mitojen-

aktive protein (MAP) kinaz yolu ile düzenlenebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. p27 ekspresyonu, daha önce bahsedilen Akt yolu ile negatif olarak regüle edilebilir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(5). MYC Geni

Prostat kanserinde en sık rastlanılan kromozomal değişiklik, kromozom 8q'nun duplikasyonudur. Prostat karsinogenezisinin erken safhasında ortaya çıkan kromozom 8p'deki değişikliklerin aksine, 8q'nun duplikasyonu, sıklıkla lokal, ileri ve metastatik tümörlerde bulunur. Kromozom 8q'daki genlerin duplikasyonu ya da amplifikasyonu, metastaz riskinde artış ve daha kısa süre ile ilişkilidir (Reiter ve Dekernion, 2005).

MYC onkogeni kromozom 8q24'de bulunur ve muhtemelen prostat kanserinin ilerlemesinde yer alan genlerden biridir. Bu durumu destekleyen bir takım bulgular mevcuttur. İlki, MYC, bir çok lokal ileri ve metastatik tümörde amplifiye olmaktadır ve fazla eksprese edilmektedir. MYC'nin lokal ileri tümörde amplifikasyonu sistemik progresyonu ve prostat kanserine sekonder ölümü öngörebilmektedir. MYC geni, sıçan modellerinde prostat kanserini oluşturmak için diğer onkogenlerle beraber fonksiyon görebilmektedir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Her ne kadar MYC, kromozom 8q24 üzerindeki hedef onkogen olsa da, diğer bir takım aday genler de tanımlanmıştır. PSCA (Prostat Stem Cell Antijen), esas olarak prostatta eksprese olan bir hücre yüzeyi antijenidir ve kromozom 8q24.2'de, MYC'nin distalinde yer alır. Lokal ileri tümörde MYC ile beraber amplifiye olur ve fazla eksprese edilir. EIF3-p40, hücrenin protein translasyonunda yer alan bir gendir ve bu da aynı alanda lokalizedir. İleri evre tümörlerin bazılarında amplifiye olur (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(6). bcl2 Geni

Kanser, hem hücresel proliferasyonda artma, hem de hücre ölümünde azalma (apopitoz) ile karakterizedir. bcl2, apopitozu önleyen bir onkogendir. bcl2 normal prostat da bazal hücreler (kök/progenitör hücreler) tarafından eksprese edilir. Aynı zamanda, özellikle androjen bağımsız tümörlerde olmak üzere, prostat tümörlerinin ciddi bir kısmında da eksprese edilir. bcl2'nin inhibisyonu, prostat kanserinin potansiyel bir tedavisi olarak araştırılmaktadır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(7). p53 Geni

p53, kanserde en önemli tümör süpresör genlerinden biridir. p53 kaybı, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve apopitozda azalmaya yol açmaktadır. p53 mutasyonunun, prostat kanserinin erken dönemindeki rolü tartışmalıdır. Ancak, p53 mutasyonu ve kaybı, lokal ileri ve metastatik tümörlerde açıkça gösterilmiştir ve tümör progresyonunda da rol aldığı düşünülmektedir. Tespit edilen p53 protein ekspresyonu ile tanımlanan p53 mutasyonu, radikal prostatektomi ve radyoterapi gören hastalarda da kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(8). Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Neoplastik büyüme aktif bir kan dolaşımına ihtiyaç duyar. Pro-anjiogenik proteinleri kodlayan genler, prostat kanserinin latent evreden klinik forma dönüşümü için gereklidir. VEGF, kanserlerde en iyi tanımlanmış en aktif proanjiogenik genlerdendir. VEGF prostat kanserlerinin çoğunda eksprese edilir ve ekspresyonunda artış, tümörün klinik yaygınlığı ile korelasyon gösterir. VEGF, androjen tarafından düzenlenmektedir; bu da androjenlerin prostat kanserinin etkilemeleri açısından potansiyel bir yoldur (Latil ve rak., 2001).

1.2.3.3.(9). Metalloproteinazlar

Prostat kanserinin PIN'den invaziv tümöre dönüşümü büyük ölçüde, hücresel matriksi parçalayan ve anjiogenezisi uyaran metalloproteinazlar tarafından düzenlenebilmektedir. Fang ve arkadaşları, metalloproteinazların bir grubu olan MMP-2'nin bir tümörün anjiogenik tipe dönüşümü için gerekliolduğunu göstermiştir. Upadhay ve arkadaşları insan prostat kanseri örneklerinde birçok metalloproteinaz tipinin eksprese edildiğini saptamışlardır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.3.3.(10). E-Kaderin Geni

Kanser hücrelerinde aynı zamanda, hücre-hücre arası ilişki de kaybolur. Adhezyon moleküllerinden biri olan E-kaderin, prostat kanserinde allel kaybının olduğu kromozom 16q23'te lokalizedir. E-kaderin ekspresyonu, özellikle kötü diferansiye tümörlerde olmak üzere prostat kanserlerinin ciddi bir bölümünde azalmıştır. E-kaderin kaybı, heterozigozite kaybı ve promotorunun hipermetilasyonu sonucu oluşur. E-kaderin ekspresyonunun düzeltilmesi, tümör oluşumunun engellenmesi ile ilişkili bulunmuştur (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.4. Prostat Kanserinin İlerlemesi

Prostat kanseri hem latent, hem de klinik formunun bulunması ile kendine özgü bir kanserdir. Her ne kadar prostat kanserinin başlamasına yol açan çalışmalar oldukça önem taşısa da, daha önemlisi histolojik olarak bening olan tümörün klinik malign tümöre dönüşümüne yol açan biyolojik olayların daha iyi anlaşılmasıdır ve bu hastalık için yeni önleyici ve tedavi edici stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Prostat kanserini ilerlemesinde ve metastazında rol oynadığı düşünülen birçok gen, kromozomal anomaliler ve sinyal yolları vardır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.5. Yeni Gelişmeler: Genomik ve Postgenomik Dönemler

Prostat kanserinin moleküler etiyolojisi karmaşıktır. Öyle görünüyor ki çok sayıda farklı mekanizma prostat kanseri ortak sonunda noktalanmaktadır. Genetik biliminde kaydedilen gelişmeler ile prostat kanseri hakkında görüşlerimiz değişmektedir. Deneysel olarak bir tümörde 20-40.000 genin açılımını eş zamanlı olarak analiz etmemizi sağlayan tamamlayıcı DNA dizileri sayesinde prostat tümörlerinin moleküler yapılarına göre sınıflamamız mümkün olacaktır. Ayrıca, araştırmacılar yüzlerce doku örneğinde aynı anda mikro-dizilim yöntemi ile tek bir gen ya da proteinin ekspresyonunu aynı anda inceleyebilmektedirler (Reiter ve Dekernion, 2005).

İnsan genomunun tamamının dizilimi açıklanmıştır. Bu dizilimin daha detaylı incelenmesi prostat kanseri ile ilgili anormal kromozom bölgelerinde yer alan onkogen ve tümör süpresör genlerin keşfini hızlandıracaktır. Araştırmanın bundan sonraki dönemi (post-genomik dönem) DNA'da kodlanmış olan genlerin fonksiyonlarını ve birbirleriyle olan etkileşimlerini açığa çıkartacaktır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.6. Stratejiler

Prostat kanserinin latent ve klinik olarak agresif seyir gösteren formları bulunmaktadır. Histolojik prostat kanseri oldukça sık görünür ve 30'lu yaşlardaki erkeklerde %27'ye varan oranlarda bulunmaktadır. Bunun tersine, invaziv prostat kanseri daha seyrek görülür ve genç erkeklerde nadiren saptanır. İnvaziv kanserlerin, latent tümörler veya PIN'den geliştiği düşünülmesine rağmen bu patolojik kavramlar arasındaki ilişki henüz aydınlığa kavuşmamıştır. Prostat kanseri yavaş ilerleyen bir hastalıktır. Orta derecede diferansiyasyon gösteren bir tümörü olan hastanın tanı almasından ölümüne kadar geçen süre 20 yılı aşabilir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Prostat kanseri bu özellikleri ile önleyici stratejiler geliştirmeye aday bir hastalıktır. Yaklaşımlardan bir tanesi, PIN ya da latent tümör gibi pre-invaziv lezyonların oluşmasını önlemektir. Diğer bir yaklaşım ise, pre-invaziv lezyonların

klinik olarak belirgin lezyonlara dönüşümünü önlemektir. Üçüncü olasılık da, bir çok erken evre tümörün uzun ikiye katlanma süresine sahip olduğu bilgisi ışığında, erken evre prostat kanserinin ilerleyişini yavaşlatmaktır (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.7. Yüksek Risk Altındaki Bireylerin Taranması

Prostat kanserinin %10'u kalıtsaldır. Ek olarak, sporadik olguların büyük bir kısmında kalıtsal polimorfizm prostat kanseri riskini artıran bir faktördür. Yüksek IGF düzeyleri artmış prostat kanseri riski anlamına gelebilirler. Bu bilgiler ışığında, genetik testler ve kan tetkikleri prostat kanseri önleme stratejilerinde yer alabilir. Prostat kanseri gen mutasyonu ya da prostat kanseri görülme sıklığını artıran polimorfizmler taşıyan kişiler prostat kanseri riskini azaltan diyetsel ve medikal yöntemlere aday olabilir. Genetik mutasyonu hedefleyen özgül müdahaleler de kullanılabilir. Yüksek risk altındaki bazı bireyler, prostat kanserini önlemek için profilaktik olarak prostatlarını aldırmayı ya da radyoterapiyi seçebilirler. Meme ve kolon kanserinde uygulanan benzer stratejiler faydalı olmuştur. Aile bireylerinde ailesel adenomatöz polipozis olan kişiler antijen sunan hücre-gen mutasyonu açısından tarama programına alınabilir (Reiter ve Dekernion, 2005).

Prostat kanserinin moleküler temeli ve risk faktörlerini anlamanın uzun soluklu amacı, akılcı stratejiler geliştirmek ve bu hastalığı önleyip, tedavi etmektir (Reiter ve Dekernion, 2005).

1.2.8. Onkolojide Moleküler Tanı

Kanserin teşhis ve tedavisinde patolojik inceleme bir köşe taşıdır. Belirgin ve mikroskopik histopatoloji ile elde edilen bilgiler hekime sadece tümörün tipinin tespitini yapma imkanını vermekle kalmaz aynı zamanda ilave ilaç tedavisinin tespitini ve hastanın vereceği yanıtında da tahmini olanaklı kılar. Patoloji yöntemleri durağan bir şekilde kalmamış, sitogenetik ve immunohistokimya gibi özel ilave teknikler ile geliştirilmiştir. Gelecekte moleküler teknoloji tümör alt tiplerinin

tanınması ve prognozun tayininde daha çok imkanlar getirecektir (Jones ve Fletcher, 1999).

Karyotipik ya da sitogenetik bilgiler, hematopoetik tümörlerde yaygın olarak kullanılmıştır. Fakat konvansiyonel karyotiplemenin bazı dezavantajları vardır. Sitogenetik analizlerin aktif olarak bölünen hücrelerde yapılması gerektiğinden çabuk bölünme olmayan tümörlerde bu araştırmaları yapmak daha zordur. Ayrıca karyotipik değerlendirme sadece taze dokularda yapılabildiğinden doku tespiti yapılmadan karyotipi tayini yapılmalıdır. Teknik ilerlemeler bu problemleri bir dereceye kadar ortadan kaldırmıştır. Revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve fluoresan in situ hibridizasyon (FISH), formalinle fikse edilmiş, parafine yerleştirilmiş hücrelerde genetik araştırma yapmayı mümkün kılmıştır. Ürolojik kanserlerin pek çoğunda olduğu gibi prostat kanserinde de karyotipik anomaliler ortaya çıkarılmıştır (Kibel ve Nelson, 2005).

Bu çalışmanın amacı, prostat kanseri ile ELAC2 geni Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri ile SRD5A2 geninin Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Androjen metabolizmasının ara basamaklarındaki ürünler ile ilgili genlerdeki polimorfizmler, prostat kanseri oluşumu için aday genlerdir. Dihidrotestesteron (DHT) ve testesteron (T) androjen metabolizmasında yer alan hormonlardır. Testesteron (T) prostat bezinde geri dönüşümsüz olarak dihidrotestesterona (DHT), steroid 5α-redüktaz enzimi aracılığı ile metabolize olur. Bu nedenle bu enzimin aktivitesini etkileyen polimorfizmler, prostat kanseri oluşumu için risk faktörü olarak görülmektedir. Steroid 5α-redüktaz enziminin izozimlerinden biri olan steroid 5α-redükta tip II enzimini kodlayan gen, Steroid 5α-redüktaz tip II geni (SRD5A2) olarak adlandırılmakta olup (Makridakis ve Reichardt, 2001), bu gen üzerinde meydana gelen polimorfizmler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar vardır.

Prostat kanseri etiyolojisine bakıldığında etnik durumun önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir. Bu durum farklı etnik gruplar arasında prostat kanseri insidansının da farklı olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca hayat stilleri ve ailesel faktörler dediğimiz kalıtsal nedenler de prostat kanseri insidansını etkilemektedir (Schald, 2004; Gann, 2002). Bu genle ilgili yapılan çalışmalar, genin farklı polimorfizmleri ile ilgili olduğu gibi, etnik gruplar arasındaki değişiklikler, farklı coğrafi bölgelerdeki populasyonlar üzerindeki değişiklikler ve aynı zamanda farklı genler ile arasındaki etkileşimlerde göz önünde bulundurularak çeşitli kombinasyonlar oluşturulmuş çalışmalardır. Mutasyon sonucundaki enzim aktivitesinin değişimine bağlı olarak hormon konsantrasyonlarının değişimini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Farklı canlı deney modellerinde de gen ürününün ekspresyonu ve oluşan polimorfizm neticesinde enzim aktivitesinin nasıl etkilendiğine dair çalışmalar da bildirilmiştir.

Makridakis ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 4 farklı etnik gruba Val89Leu polimorfizmi açısından bakılmış ve sonuç olarak bu polimorfizmin enzim aktivitesini değiştirdiği bulunmuştur. Bu polimorfizm, yaygın olarak bulunmakta ve enzim aktivitesini yükselterek prostat kanseri riskini artırmaktadır. Fakat, istatistiki olarak Asyalı prostat kanseri erkekler ile Val89Leu polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. SRD5A2 geni Ala49Thr

polimorfizmi Afrika kökenli Amerikalılarda prostat kanseri olan erkekler üzerinde tanımlanmış ve bu polimorfizmin prostat kanseri riskini 7.2 kez artırdığı tespit edilmiştir (p=0.001) (Makridakis ve Reichardt, 2001).

Latin erkekleri (İspanyol) üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise Ala49Thr polimorfizminin prostat kanseri riskini 3.6 kez artırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada Treonin varyantı Afrika kökenli Amerikalılarda %1, İspanyollarda %2, Kafkaslarda ise %5-6 sıklığında görülmektedir. Bu çalışmada ayrıca polimorfizm neticesinde steroid 5α-redüktaz aktivitesinin 5 kat arttığı tespit edilmiştir. SRD5A2 gen lokusu üzerindeki değişikliklerin, steroid 5α-redüktaz enziminin inhibitörü olan finesterid ile enzim arasındaki ilişkinin değişimine neden olduğu tespit edilmiştir. Ala49Thr polimorfizmi olan bireylerin finesteride olan ilgisinin normal enzime göre 11.7 kez daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu durum prostat kanserinin ilaçla olan tedavisinde hangi steroid 5α-redüktaz inhibitörünün kullanılması gerektiğini, tedavi öncesi seçimde dikkat edilmesi gereken bir durum olarak bildirmişlerdir (Makridakis ve Reichardt, 2001).

Nam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Val89Leu polimorfizminin prostat kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir (Nam ve ark., 2001).

Fransa populasyonunda Androjen Reseptörü (AR), CYP17, CYP19 ve SRD5A2 genleri analiz edilmiştir. 226 prostat kanser ve 156 kontrol (yaşları etnik kökenleri eşleştirilmiş) Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri açısından araştırılmıştır. Çalışılan bu Fransız populasyonu için Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir. Populasyonda T alleli frekansı %96 bulunmuş olup, Ala49Thr polimorfizminde istatistiki olarak yetersiz bilgi olduğu belirtilmiştir. Fakat bu çalışmada AR genindeki CAG tekrarı ve SRD5A2 genindeki TA tekrarı birlikte değerlendirilmiş ve bu kombinasyonun prostat kanseri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Latil ve ark., 2001).

Soderstrom ve arkadaşları yaptığı çalışmada, metastaz yapan hastalarda Leu homozigot genotipinin prostat kanseri riskini 6.67 kez düşürdüğü konusunda rapor vermişlerdir (Soderstrom ve ark., 2002).

Febbo ve arkadaşları, çalışma gruplarını 592 Kafkas prostat kanseri hastası ve 799 Kafkas sağlıklı kontrolden oluşturmuşlardır. SRD5A2 geni üzerindeki

polimorfizmle birlikte serum A-diol-g seviyesine de bakmışlar ve prostat kanseri ile olan ilişkisini araştırmışlardır. Ser217Leu polimorfizmi için yapılan taramada bireylerin tamamının Leu alleli taşıdığı gösterilmiştir. Kafkas ırkı için, Ser/Leu ve Leu/Leu varyantlarının ve A-diol-g konsantrasyonunun prostat kanseri ile ilişkisi saptanamamıştır (Febbo ve ark., 1999).

Prostat kanseri insidansı düşük olan Çin'de yapılan bir çalışmada Ala49Thr, Val89Leu, $(TA)_n$ ve R227Q (Glutamin→Arjinin) varyantları prostat kanserli hastalarda araştırılmıştır. 191 prostat kanseri hastası ve 304 sağlıklı kontrol bu polimorfizmler ve serum androjen seviyesi açısından araştırılmıştır. Populasyondaki bireylerin tamamı AA genotipinde, %99'u da RR genotipinde bulunmuştur. VV, VL, LLgenotiplerinin görülme frekansı sırası ile %21, %45 ve %35 olarak tespit edilmiştir. LL genotipli erkeklerde serum testesteron seviyesi yüksek bulunmuştur. Ayrıca 5α-redüktaz aktivitesinin düşük olduğu bireylerde prostat kanseri riskininde düşük olduğu gözlendi. Rakamsal olarak SRD5A2 genindeki polimorfizmler ile prostat kanseri arsında bir fark varmış gibi görünsede bu fark, istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Hsing ve ark., 2001).

Prostatektomi yapılmış 265 Kafkas prostat kanseri hastasında SRD5A2 Ala49Thr polimorfizmi ile ekstrakapsüler prostat kanseri ve patolojik tümör lenf nodu arasında anlamlı bir ilişki olduğu açıklanmıştır. Fakat Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasında hiçbir ilişki saptanmamıştır. Bu çalışmada hastalar iki grup halinde incelenmiştir. Grup1'de tümör evresi T3 olanlar, PSA'sı 10'dan yüksek olanlar ve Gleason skoru 7 ile 10 arasında olanlar ile kontroller değerlendirilmiş ve burada OR (odd ratio) değeri 3.46 bulunarak Ala49Thr polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Grup 2'de ise daha yüksek Gleson skorlu olanlar alınmış ve daha anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (OR=6.28) (Jaffe ve ark., 2000) .

SRD5A2 geni üzerindeki Ala49Thr, Val89Leu ve $(TA)_n$ dinükleotid polimorfizmleri ile Beta-karoten ve retinol verilmiş prostat kanserli hastalar arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı belirtilmiştir (Lamharzi ve ark., 2003).

Göğüs, endometriyum ve over kanserleri de prostat kanseri gibi androjen hormon bağımlı kanser türleridir. Göğüs kanseri olan Japon kadınları ile yapılan bir çalışmada Ala49Thr, Val89Leu ve $(TA)_n$ tekrar polimorfizmi incelenmiştir. Buna göre, çalışılan bu grupta Ala49Thr varyantı için T alleli hiç bulunmamıştır. Bütün vakalar AA genotipinde olduğu belirtilmiştir. Val89Leu polimorfizmi için ise; VV genotipli vakalar LL genotipli vakalar ile karşılaştırıldığında LL genotipinin göğüs kanseri riskini azalttığı tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2002).

Bir kısım çalışmada ise steroid 5α-redüktaz enzimininin izolasyonu ve cDNA'sının klonlanması gerçekleştirilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae türünde, SRD5A1 ve SRD5A2 genleri klonlanmış ve 5α-redüktaz tip I ve 5α-redüktaz tip II enzimleri eksprese edilerek hücre içi dağılımları ve optimizasyon şartları değerlendirilmiştir (Poletti ve ark.,1996).

Bir başka çalışmada, önce steroid 5α-redüktaz enziminin cDNA'sı klonlanmış ve prostat hücre kültüründeki hücrelerde bu sentezlenen enzimin optimum çalışma şartları değerlendirilmiştir. Ayrıca bir inhibitör olan finesteride karşı davranışına da bakılmıştır. Moleküler klonlama, genetik, biyokimyasal ve farmakolojik yaklaşımlar ile prostattan sentezlenen enzimin cDNA'sı ile arasındaki ilişki, enzimin kinetik özellikleri belirtilmiştir. Sonuçta insanda steroid 5α-redüktaz enziminin iki izozimi bulunduğu ve farklı kinetik özelliklere sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Jenkins ve ark., 1992).

Sıçan steroid 5α-redüktaz cDNA'ları *Xenopus* oositleri kullanılarak klonları izole edilmiş ve DNA sekans analizleri yapılmıştır. Karaciğer ve ventral prostattan sentezlenen steroid 5α-redüktazın 29 kDa'luk hidrofobik bölümü tespit edilmiştir. Kastre edilen sıçanların karaciğer steroid 5α-redüktaz miktarının arttığı bildirilmiştir. Androjen bağımlı organlar ve androjen bağımlı olmayan organlar karşılaştırılmış ve testesteronun steroid 5α-redüktazı farklı şekillerde düzenlediği bildirilmiştir. Bu çalışmada sıçan karaciğer mRNA'sı 9.5 kb olarak tespit edilmiştir. Klonlanan cDNA 2465 baz çifti (bç), 3' translasyonu olmayan bölgesinin büyüklüğü ise 1691 bç olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada değerlendirilen bir diğer nokta ise translasyon için okuma çerçevesinin 765 bç olduğu ve poliadenilasyon bölgesinin genin 3' ucunun 2466 upstreaminde olduğu olmuştur. İlk 19 amino asitin metiyonin olduğu ve enzim

proteininin 255 amino asitten oluştuğu, bu amino asitlerinde %50'sinden fazlasının hidrofobik karakterli olup, enzime de hidrofobik özellik kazandırdığı tespit edilmiştir (Andersson ve ark., 1989).

Steroid 5α-redüktaz enzimi prostat kanseri hücre hatlarında eksprese edilerek, steroid 5α-redüktaz tip I enziminin 7-8 pH aralığında, tip II enzimininin ise 3.5-5 pH aralığında optimum çalıştığı bildirilmiştir (Smith ve ark., 1995).

Bir başka çalışma ise İngiliz populasyonu üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada 621 prostat kanseri hastası üzerinde, SRD5A2 genindeki A49T ve V89L polimorfizmleri, CYP17 geni ile serum seks hormonları konsantrasyonları da değerlendirilmiştir. SRD5A2 geni ile androsteneidol glukoronid (A-diol-g) serum testesteron konsantrasyonu birlikte araştırılmıştır. L aleli A-diol-g konsantrasyonunu %10 oranında düşürücü etki göstermiştir. Aynı zamanda LL genotipinin serum testesteron ve free testesteron miktarını belirgin bir şekilde (%12-16) düşürmektedir. CYP17'deki A2 alleli ise serum testesteron konsantrasyonunu artırmıştır (Allen ve ark., 2001).

Allen ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışma ise, SRD5A2 genindeki $(TA)_n$ dinükleotid tekrarı ve Ala49Thr polimorfizmi üzerinedir. 604 İngiliz prostat kanseri vakası araştırılmış ve A-diol-g konsantrasyonlarıda değerlendirilmiştir. $(TA)_n$ tekrar polimorfizmi ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir. Ala49Thr polimorfizminde T allelini heterezigot ve homozigot taşıyan bireylerin A-diol-g konsantrasyonlarında %24 oranında bir düşüklük olduğu tespit edilmiştir ($p=0.0003$). T varyantı nadir görülmesinden dolayı bu çalışmadaki anlamlılık gerçekle örtüşmeyebilir. Daha çok sayıda vaka kullanılan çalışmaların yapılması konuyu daha iyi aydınlatacaktır (Allen ve ark., 2003).

Bu gruba benzer olarak Shibata ve arkadaşları da Val89Leu polimorfizminde homozigot Leu genotipinin hastalığın prognozunu hafiflettiği yönünde bulgu sunmuşlardır (Shibata ve ark., 2002).

2826 prostat kanseri ve 1703 kontrolden oluşan İsveçli bir populasyon üzerinde yapılan çalışmada AR, CYP17 ve SRD5A2 genlerini içeren beş adet mutasyon taraması yapılmıştır. Burada prostat kanseri ile ilgili olarak 27 gen aday olarak gösterilmiştir (Lindström ve ark., 2006).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir başka çalışmada SRD5A2 geni ve 3 Beta-Hidroksi steroid dehidrogenaz tip II (HSD3B2) geni üzerindeki polimorfizmlerin birlikte ve ayrı olarak prostat kanseri riski üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 637 prostat kanseri hastası ile yaşları ve ırkları eşleştirilmiş 244 kontrol üzerinde ilgili genler değerlendirilmiştir. SRD5A2 geninin Val89Leu polimorfizmi tek başına bakıldığında prostat kanseri ile ilişkili olmadığını fakat HSD3B2 genindeki $(TG)_n$,$(TA)_n$ ve $(CA)_n$ dinükleotid tekrarının kısa olması ile birlikte değerlendirildiğinde bu iki polimorfizmin birlikte, hastalığın şiddetini artırdığı gösterilmiştir (Nesland-Dudas ve ark., 2007).

Androjen metabolizması ile ilgili olan bir diğer hastalık polikistik over (PCOS) ve pseudohermafroditizm hastalığıdır. Bu yüzden SRD5A2 geni ile yapılan çalışmaların bir kısmı da PCOS ve pseudohermafroditizmle ilgilidir.

287 PCOS'li beyaz kadınlar ile ilgili yapılan çalışmada SRD5A2 geni Val89Leu ve A49T varyantı ile ilişkili bulunmuştur. 5α-redüktaz enziminin her iki formunun da PCOS patogenezinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir. İlgili gendeki polimorfizmler nedeni ile 5α-redüktaz aktivitesindeki değişiklik bu kadınlarda hirsutizm derecesinide etkilediği belirtilmiştir (Goodarzi ve ark., 2006).

Pseudohermofrodit olan bir grup Türk akrabalar üzerinde yapılan bir çalışmada SRD5A2 geninin 5. ekzonunda ilk defa gözlenen bir delesyon tespit edilmiştir ve bu delesyonun hem testesteronun hem de DHT'nin serum seviyelerini değiştirdiği saptanmıştır (Can ve ark., 1998).

Kalıtsal prostat kanseri için aday gösterilen genlerden biri olan HPC2/ELAC2 geni üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Bu genle ilgili yapılan moleküler çalışmalar, gen üzerinde pek çok polimorfizmler olduğunu göstermiştir. Bu polimorfizmler ile etnik gruplar arasındaki değişiklikler, farklı coğrafi bölgelerdeki populasyonlar üzerindeki değişiklikler ve aynı zamanda farklı genler ile arasındaki etkileşimlerde göz önünde bulundurularak çeşitli kombinasyonlar oluşturulmuş çalışmalar bulunmaktadır.

HPC2/ELAC2 geni üzerinde ki çalışmalardan biri, en az üç bireyi prostat kanseri olan 150 aileden iki birey alınarak toplam 300 vaka üzerinde yapılan bir çalışmadır. Yapılan bu çalışmada HPC2/ELAC2 geni üzerinde 13 intron bölgesinde,

10'da ekzon bölgesinde olmak üzere toplam 23 polimorfizm tespit edilmiştir. Ekzon bölgesindeki mutasyonlardan biri nonsense mutasyon olup Glu216stop mutasyonu, beşi missense mutasyon ve üçü sessiz mutasyon ve geriye kalan bir tanesi de genin 3' tarnslasyon olmayan bölgesindeki mutasyondur. Bireylerde en yaygın görülen mutasyon türü Ser217Leu ve Ala541Thr mutasyonudur ve mutasyonlar aynı populasyondan seçilen 446 prostat kanseri vakasında ve 502 sağlıklı kontrollerde araştırılmıştır. Leu217 varyantı prostat kanserli vakalarda %32.3 oranında, kontrollerde ise %31.8 oranında gözlenmiştir. Thr541 varyantı da Leu217 varyantında olduğu gibi vaka ve kontroller de görülen polimorfizm frekansı benzer bulunmuştur (Vaka; %5.4, Kontrol; %5.2). Burada her iki polimorfizmin prostat kanseri ile olan ilişkisi birlikte de değerlendirilmiş ve hem Leu hem de Thr allellerinin birlikte prostat kanseri riski üzerine bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2001).

HPC2/ELAC2 genindeki Ser217Leu polimorfizmi ve Ala541Thr polimorfizmi ile ilgili olarak bir meta-analiz çalışması yapılmış ve bu çalışmada toplam yedi farklı çalışma sonuçları karşılaştırılarak bir sonuca varılmıştır. Bu çalışmanlardan 4 tanesinde bu polimorfizmler ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamış fakat 5 çalışmada bahsedilen polimorfizmlerin hastalardaki PSA düzeyini etkilediği bildirilmiştir. Toplamda bakıldığında, Leu217 homozigot varyantı diğer varyantlar ile karşılaştırıldığında, prostat kanseri vakaları ve kontroller arasındaki ilişki anlamsızdır (OR: 0.74). Ayrıca Thr 541 homozigot varyantı da diğer varyantlar ile karşılaştırıldığında, prostat kanseri vakaları ve kontroller arasındaki ilişki anlamsızdır (OR: 1.01) (Severi ve ark., 2003).

300 prostat kanseri beyaz ve 250 sağlıklı kontrolden (etnik köken ve yaş olarak eşleştirilmiş) oluşan bir çalışmada Ser217Leu polimorfizmi için, hastalardaki SS genotipi %48, SL genotipi %46.3 ve LL genotipi %5.7 olarak bulunmuştur. Kontrollerdeki varyantların dağılım durumu ise SS genotipi %47.2, SL genotipi %44.4 ve LL genotipi ise %9.2 bulunmuştur. 290 prostat kanseri beyaz ve 240 sağlıklı kontrolden oluşan çalışmada ise hastalarda Ala541Thr polimorfizmi için, AA genotipi %92.5, AT ve TT genotipi birlikte %7.5 ve kontrollerde AA genotipi %96.6, AT ve TT genotipi birlikte %3.4 tespit edilmiştir. Sonuç olarak, iki varyant arasında

kuvvetli bir ilişki olduğu ve Leu217 genotipine sahip bireylerde Thr541 polimorfizminin görüldüğü belirlenmiştir (Rebbeck ve ark.,2000).

HPC2/ELAC2 geni üzerindeki Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmler ile ilgili olarak Finlandiya populasyonunda da bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada önce prostat kanseri ile ilişkili olan genler, prostat kanseri vakalarının ailesel geçiş gösterdiği bireylerde belirlenmiştir. Çalışmada 107 ailesel geçişli prostat kanseri hastası, 467 sporadik prostat kanseri hastası ve 222 bening prostat hiperplazi hastası değerlendirilmiştir. Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizminin hem ailesel prostat kanseri ile hem de sporadik prostat kanseri ile ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Fakat, bening prostat hiperplazisi ile bu polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Rökman ve ark., 2001).

İngiltere'de 432 prostat kanseri 469 sağlıklı kontrol ile yapılan çalışmada HPC2/ELAC2 geninin Ala541Thr ve Ser217Leu varyantları analiz edilmiştir. Ser/Ser ve Ala/Ala homozigot varyantları ile Thr541 taşıyıcı olanlar karşılaştırıldığında OR değeri 1.56 saptanmıştır. Varyantlar arasındaki kombinasyonlar değerlendirildiğinde ELAC2 varyantlarının prostat kanseri riskini azda olsa artırdığı tespit edilmiştir. Özellikle Thr541 allelinin kanser riskini 1.5 kez artırdığı belirtilmiştir (Meitz ve ark., 2002).

Ayrıca, Meitz ve arkadaşları yapılan yedi çalışmayı toparlamış ve bir meta-analiz sonucu çıkarmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre Thr541 polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişkinin OR değeri 1.27 olarak yayınlamışlardır (Meitz ve ark., 2002).

591 prostat kanseri hastası ve 538 sağlıklı kontrol grubu ile yapılan çalışmada Kafkas ve Afrikalı Amerikalı bir vaka-kontrol çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada vakaların %32'si Leu alleli, kontrollerinde %29'u Leu alleli taşıdığı tespit edilmiştir. Thr alleli homozigot olarak bulunmamıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, Ala/Ala genotipine sahip bireylerde homozigot Leu genotipinin prostat kanseri riskini artırdığı (OR=1.84) tespit edilmiştir. Farklı genotiplerdeki bireyler arasında hastalığın şiddetinin de değiştiği gözlenmiştir. Leu allelini heterozigot olarak taşıyan erkek hastalarda, hastalığın şiddetinin azaldığı (OR=1.34), Gleson skorlarının ≤ 7 olduğu belirlenmiştir (Stanford ve ark., 2003).

Takaku ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ELAC2 geni üzerindeki 8 tane varyant çalışılmış ve bu varyantların prostat kanseri ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Takaku ve ark., 2003).

257 prostat kanseri ve 355 kontrolün araştırıldığı bir çalışmada hastalar ile kontroller karşılaştırıldığında Ala541Thr polimorfizmi için T allelinin hastalarda kontrollere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Fakat bu fark istatistiki olarak anlamlı değildir ve hastalığın şiddetinde de herhangi bir değişiklik oluşturmamaktadır (Suarez ve ark., 2001).

Tavtigian ve arkadaşlarının kalıtsal prostat kanseri taşıyan ailelerin erkeklerinde her iki varyant durumunda hastalık riskini artırdığını bildirmişlerdir. Leu217/Thr541 allelleri yalnızca Leu217 allelini taşıma durumuna göre daha hastalık yapıcıdır. Özetle, populasyon tabanlı yapılan çalışmalarda homozigot Ala541 genotipli bireylerde homozigot Leu217 olması durumunun prostat kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir (Tavtigian ve ark., 2001).

Xu ve arkadaşları hasta grubunu kalıtasal (ailesel) prostat kanseri (n: 134) ve sporadik prostat kanseri (n: 228) olarak ikiye ayırarak inceleme yapmışlar ve HPC2/ELAC2 genini prostat kanseri için risk faktörü olarak değerlendirmemişlerdir (Xu ve ark., 2001).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmaya alınan bireyler, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı'nda prostat kanseri tanısı ile tedavi olan hastalar arasından seçilmiştir. Seçilen hastalara son altı ay içerisinde kan transfüzyonu yapılmamış olmasına dikkat edilmiştir. Hastaların yaşları 49-87 arasındadır. Çalışmanın kontrol grubu, prostat kanseri olmayan, yaşları 38-67 arasında değişen bireylerden oluşturulmuştur. Çalışmamıza 67 prostat kanseri (patoloji sonucu: adenokarsinom), 39 benign prostat hiperplazi (BPH) hastası ve 34 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Bunlara ilave olarak 22 hastanın da akrabası araştırmaya dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol grubundan alınan venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplerde, 4 ^{0}C'de saklanmıştır.

3.1.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir.

1. Taq polimeraz (Fermentas)
2. Magnezyum klorür ($MgCl_2$) (Fermentas)
3. Sukroz (Fermentas)
4. Trismabase (Fermentas)
5. Sodyum klorür (NaCl) (Fermentas)
6. EDTA (Fermentas)
7. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Fermentas)
8. Proteinaz K (Fermentas)
9. Borik asit (Fermentas)
10. Brom fenol mavisi (Fermentas)
11. Etidyum bromür (Fermentas)
12. N, N, N, N'-tetra metilen diamin (TEMED) (Fermentas)
13. N,N'-metilen –bis-akrilamid (Sigma)

14. PCR tamponu (Fermentas)
15. Restriksiyon enzimleri (Takara, Fermentas)
16. Msp I ile kesilmiş pUC 18 marker DNA (Fermentas)
17. Hae III ile kesilmiş pUC marker DNA (Fermentas)
18. Primerler
19. Deoksinükleosit trifosfat seti (Roche)
20. Agaroz (Promega)
21. Akrilamid (Sigma)
22. Amonyum persulfat (APS) (Sigma)
23. Saf etanol (Riedel-de Haen)
24. DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez ile ilgili diğer kimyasal maddeler (Sigma ve Merck)

3.1.2. Kullanılan Başlıca Cihazlar ve Teknik Malzemeler

1. "Thermal cycler" (Eppendorf Mastercycler)
2. Spektrofotometre (Pharmacia-Biotech, Gene Quant)
3. Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
4. Yatay ve dikey elektroforez tankları (Biogen ve Biolab)
5. Santrifüjler (Soğutmalı, Universal 16R ve Soğutmasız Techne force 16)
6. Su banyoları (Grant)
7. Hassas terazi (Sartorius)
8. pH metre (İnolab)
9. Buzdolabı (Arçelik)
10. Otoklav (Trans)
11. Etüv (Dedeoğlu, Memert)
12. Vorteks (Nüve NM 110)
13. Steril kabin (Kojair KR- 125 Safety)
14. Otomatik pipetler (Gilson, Biohit ve Socorex)
15. Deepfreez (Siemens, Bosch)
16. Mezür

3.2. Metod

Bu çalışmaya dahil edilen bireyler için yerel etik kurul onayı alındı. Her hasta için hasta rıza onam formu doldurularak venöz kanları alındı. Hastalardan toplanan kan örnekleri numaralandırılıp listelendi ve +4 ^{0}C'de saklandı. Daha sonra bu örneklerin DNA izolasyonu yapılarak (Doymuş tuz çözeltisi ile çöktürme yöntemi kullanıldı), konvansiyonel PCR ve nested PCR yöntemleri ile gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri, agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edildi. PCR ürünleri kesim (RFLP) reaksiyonuna tabi tutularak poliakrilamid jelde yürütüldü. Jel üzerindeki bantlara göre mutasyon olup olmadığı değerlendirildi.

3.2.1. DNA İzolasyonu

3.2.1.1. Doymuş Tuz Çözeltisi ile Çöktürme Yöntemi

1. 700 µl tam kan 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisine alındı. Üzerine 700 µl eritrosit lizis tamponu eklendi (EK-1.1). Bir iki kez karıştırılıp 3 dk beklendi. Bu süre içerisinde eritrosit patlayıp hemoglobin serbest kalınca, kan berrak kırmızı renk almaktadır. Uygun hale gelen kan, santrifüj edilerek süpernatant pipet yardımı ile atıldı. Bu aşama 2 kez tekrarlanabilir.
2. Eğer pellet yeterince temiz değilse 1 ml fizyolojik tamponla (EK-1.2) yıkandı. Bunun için pellet üzerine fizyolojik tampon eklendi, santrifüj edilerek süpernatant pipetle alındı ve atıldı.
3. Pellet üzerine 300 µl TE-9 (pH:9) tamponu (EK-1.3) ilave edilerek pellet çözdürüldü. Sonra, üzerine 100 µl %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (EK-1.4) ve 20 µl Proteinaz K (0.5 mg/ml) ilave edildi. Tüp iyice karıştırılarak 65 ^{0}C'de 1.5-2 saat inkübe edildi. Bu süre içerisinde karışım için tüp ara sıra karıştırıldı.

4. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl doymuş (6M) tuz çözeltisinden ilave edildi. Burada amaç DNA dışındaki protein, lipid gibi moleküllerin DNA'dan uzaklaştırılmasıdır. Daha sonra bu karışım santrifüj edildi ve böylece DNA diğer moleküllerden ayrıştırıldı.
5. Bu kez süpernatan steril ependorf tüplerine alındı ve üzerine 1 ml saf alkol ilave edilerek DNA oluşumu gözlendi ve DNA'nın tüpün dibinde çökelmesi için santrifüj edildi.
6. Süpernatant döküldü ve pellet üzerine %75'lik etanolden 1 ml ilave edilerek iyice karıştırıldı ve tekrar santrifüj edildi. Pellet halinde kalan DNA'nın üzerindeki süpernatant döküldü ve DNA kurutuldu.
7. Etanolü tamamen uçmuş DNA üzerine 100-200µl arasında TE (EK-1.5) ilave edilerek 75 ^{0}C'de 10-15 dk bekletildi ve DNA'nın çözülmesi sağlandı.

3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

PCR reaksiyonunun hazırlanması aşamasında DNA konsantrasyonunun ve saflık derecesinin bilinmesi önemlidir. Bunun belirlenmesi UV (Ultra Viyole) spektrofotometresi ile gerçekleştirilir. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml, tek iplikli DNA (ssDNA) için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml' lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir (Sambrook ve ark., 1989).

UV absorbansı DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı A_{260nm}/ A_{280nm}=1.8'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1.8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir. RNA için A_{260nm}/ A_{280nm}= 1.8-2.0'dır (Sambrook ve ark., 1989).

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR ilk kez, Kaliforniya'da Berkeley yakınlarında Cetus firmasında çalışan Kary Mullis tarafından 1985 yılında bulunmuştur (İşcan, 2003). PCR, kalıp DNA üzerindeki belirli bir gen bölgesinin ısıya dayalı olarak tekrar eden reaksiyon döngüleriyle ve enzimler aracılığı ile *in vitro* koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Her bir PCR döngüsü, reaksiyon karışımının, reaksiyonun gerçekleşmesi için daha önceden belirlenmiş olan en uygun üç sıcaklık derecesi arasında transfer edilmesi ile tamamlanır. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve istenildiği kadar tekrar edilir. 25-30 döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1 000 000 kez artış olur (İşcan, 2003). Reaksiyon boyunca gereken sıcaklık, süre, döngü sayılarını kontrolü ve otomasyonu Thermal Cycler olarak bilinen cihazlarla yapılır (Sambrook ve ark., 1989). Bu yöntem ile, klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere, bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir (İşcan, 2003).

DNA çift sarmalı üzerinde bulunan karşılıklı bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak, primerlerin yapışabileceği tek iplikli DNA moleküllerinin oluşumunu sağlayan sıcaklık denatürasyon sıcaklığıdır (genellikle 94 ^{0}C). Burada kullanılacak DNA temiz olmak zorunda değildir. Kurumuş kan veya semen gibi adli tıp örnekleri, tek bir saç teli, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan genomik DNA elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır. Bu süreç yaklaşık 5 dakikadır ve bu süreçte enzimler çalışmaz (İşcan, 2003).

Primerlerin tek iplikli DNA molekülü üzerinde komplementer olduğu bölgelere hibridize olduğu sıcaklık annealing (yapışma) sıcaklığıdır. Annealing sıcaklığı primer uzunluğuna ve baz içeriğine göre değişir. Reaksiyonun özgüllüğü için son derece önemlidir. Primer-kalıp DNA hibridizasyonu sıcaklığa bağlı bir olay olduğundan annealing sıcaklığı hibridizasyonun oluşumunu sağlayacak kadar düşük ve yanlış

bağlanmalara izin vermeyecek kadar da yüksek olmalıdır. Bu sıcaklık 50-70 ^{0}C arasındadır (Sambrook ve ark., 1989).

DNA polimeraz için optimum olan sıcaklık ise uzama (sentez) sıcaklığı olarak belirtilir. Bu sıcaklık kullanılan DNA polimerazlara göre farklılık gösterebilir. Örneğin *Taq DNA polimeraz* için 72 ^{0}C iken *Pwo* için 68 ^{0}C'dir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5'→3' yönünde ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli bir kopyasını oluşturur. Doğru pozisyon almamış primerler ve kalıp DNA arasındaki bağlar bu ısıda ayrılırlar (Sambrook ve ark., 1989).

PCR klonlama, genetik tiplendirme, dizileme vb. amaçlar ile kullanılabilmektedir. Bu amaçlara yönelik olarak kullanılan PCR çeşitleri; "nested" PCR, "anchored" demirlenmiş PCR, revers transkripsiyon PCR (RT-PCR), asimetrik PCR, "inverse" PCR (IPCR), *in situ* PCR, multipleks PCR, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve immuno PCR olarak sayılabilir (EK-2).

"Nested" PCR: "Nested" PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgünlükte bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde, ardarda iki PCR yapılır. İlk PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır. İkinci PCR ise ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren "nested" primerler ile yapılır. İlk PCR ürünleri ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilir (Arı, 2004).

3.2.3.1. Bir PCR Reaksiyonu İçin Gerekli olan Bileşenler ve Fonksiyonları

Kalıp Genomik DNA

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölge için kalıp görevi yapar. Yapılacak olan çalışmaya göre herhangi bir canlının kanından veya dokusundan izole edilebilir (Sambrook ve ark., 1989).

Primerler

PCR reaksiyonunda amplifiye edilecek bölgenin sınırlarını belirleyen sentetik oligonükleotidlerdir. Ayrıca, polimerizasyon reaksiyonları için DNA polimeraz enzimine primer görevi yaparlar. Primerler sadece amplifiye edilecek olan hedef bölgenin kanat bölgelerine komplementer olmalıdır. Aksi takdirde non-spesifik amplifikasyonlar gözlenebilir. Bu nedenle, reaksiyonun istenilen yönde gerçekleşmesini sağlayan en temel faktörlerden biridir ve seçiminde şu hususlara dikkat edilmelidir (Sambrook ve ark., 1989).

1) Primer dizisi 1-2 pürin bazı ile başlayıp bitmeli.

2) Kullanılan primerlerin kendi aralarında ve dizileri içerisinde komplementer bölgeler olmamalı.

3) Timin nükleotidi yanlış eşleşmeye daha toleranslı olduğundan 3' uçlarında bulunmamalı.

4) Primer dizisinin erime sıcaklığı olarak bilinen Tm (Temperature melting) sıcaklığı aynı veya çok yakın olmalı.

5) GC (Guanin-Sitozin) oranı %40-60 arasında olmalı

6) Herhangi bir baz 4'den fazla arka arkaya tekrar etmemelidir (Sambrook ve ark., 1989).

Reaksiyon Tamponu

PCR reaksiyonunda, reaksiyon koşullarının optimum şartlara getirilmesini sağlayan (iyonik direnci, pH, Mg^{+2} gibi) karışımdır (Sambrook ve ark., 1989).

DNA Polimeraz

PCR reaksiyonunda polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan enzimdir. Isıya dayanıklı termofilik bakterilerden izole edildiğinden ötürü yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır (Sambrook ve ark., 1989).

Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs)

PCR reaksiyonunda, polimerizasyon için gerekli olan enerji ve nükleotid kaynağını oluştururlar (Sambrook ve ark., 1989).

3.2.3.2. PCR Reaksiyonun Hazırlanması

Roche protokolünde PCR reaksiyonundaki bileşenlerinin miktarları 25 µl'lik reaksiyon hacmi için şu şekilde önerilmektedir:

1) 5 µl 10X reksiyon tamponlarının birinden
2) 0.6 µl 10 mM dNTP karışımı
3) Her bir primerden 200 ng
4) 150 ng Kalıp DNA
5) 2 U Termostabil DNA Polimeraz
6) 25 µl'ye tamamlayacak kadar deiyonize su

PCR'da tampon bileşimi ve ortam pH'sı reaksiyon verimini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Öncelikle, reaksiyon sonunda kalitatif ve kantitatif olarak en iyi sonucu verecek ve daha sonraki PCR reaksiyonlarında da kullanılacak olan tampon bileşiminin belirlenmesi için optimizasyon kitindeki bütün tamponların kullanıldığı bir optimizasyon reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyonlar mümkün olduğu kadar steril şartlarda, buz üzerinde ve en son enzim ilave edilecek şekilde hazırlandı (Sambrook ve ark., 1989).

ELAC2 Geninin Ser217Leu ve Ala541Thr Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu

Kullanılan Primerler:

Çalışmamızda ELAC2 genine ait iki değişik polimorfizme bakılmıştır. Bu polimorfizmlerin saptanması için, dizi analizi üzerinde ekzonların bulunduğu bölgeleri içerecek şekilde ve primer tasarım kriterleri dikkate alınarak seçilen primerler kullanılmıştır. İnternet taraması sonucu elde edilen dizi analizi ile Ser217Leu polimorfizminin bulunduğu 7. ekzonun 276 baz çiftlik bölgesi gerekli primerler oluşturularak "nested" PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Aynı şekilde Ala541Thr polimorfizminin bulunduğu 17. ekzonun 419 baz çiftlik bölgesi de gerekli primerler oluşturularak "nested" PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır.
Ser217Leu polimorfizminin primerleri:

1. PCR primerleri;
Forward primer (sense): m5A 5' CAT TCC CAT GTA TGA ACG TCT 3'
Reverse primer (antisense): m5P 5' ATA GTA AGC CCA GGA AGA AGG A 3'

"Nested" PCR primerleri;
Forward primer (sense): m5B 5' GTT TTC CCA GTC ACG ACG CAT TCC CAT GTA TGA ACG TCT 3'
Reverse primer (antisense): m5Q 5' AGG AAA CAG CTA TGA CCA TCT ACA AGC ATT ACA AGG CAG AG 3'

Primer dizilerinin seçildiği 7. ekzon bölgesi çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Altı çizili olan bazlar 1. PCR için primer bölgesini, kalın yazılmış olan bazlar ise "nested" PCR için primer bölgesini oluşturmaktadır. "Nested" PCR'ın forward primerleri 1. PCR'ın ki ile ortak olduğundan ikinci kez belirtilmemiştir. Amplifiye edilen bölgenin özgün olabilmesi için ise forward ve revers primerlere ek baz dizilimleri eklenmiştir. Gri renk ile renklendirilmiş olan nükleotitler ise restriksiyon enziminin tanıyıp kestiği

bölgedir. Kullanılan bu primerler ile 2 kez PCR yapılmış olan alandan 276 baz çiftlik bir bölge amplifiye edilmiştir (Rebbeck ve ark., 2000).

Çizelge 3.1. ELAC2 geni 7. ekzonu

5'.....

1 TTTTAGCGGG AGTGATGATA ATAAATAAGC ATGTCTACAA CCCACATGCT GTTTAGATAA
61 CACGTTGTTG AGTTGGTACT GTGGCCGAGG CTGTGAGCTA AGCAGAAACA TAAACATTAA
121 TAGGACATAG GTGCAGCCCA GAAACCAGGT AGGAAGTTAA CTAACTAGTT ATTTCCTACT
181 GTATAGTAAA AGGTGTGCTG ATTTAATTGG CGTTCTGG**CA TTCCCATGTA TGAACGTCT**G
241 GGCCTTGGCT GTCAGCTCAC CTTGTGCAGT GTGTAATTTG GTGGTATCTG TACTGACCAG
301 GTGAACAGAG GAGGGGAAAG CACCAACCAT GGCAGAGTCC AGAAAGGCCT CTCAGCAGGC
361 TCAGTCCAGA GCGATCTTCA GACTCCGAGT CGAATGAAAA TGAGCCACAC CTTCCACATG
421 GTAATAGTAT AAACAAAACA GAGCAGCAGA AAGGCTTGCG TTTTCTTAAT T**CTCTGCCTT**
481 GTAATGCTTG TAGAGAGTCA TTATTGTAAG AAAGCCAGGT GTGTAAACAG ATCCTTCTTC
541 CTGGGCTTAC TATAACTTGG CCCGTTGGGG GAATGAGAAG GGTTGTTGTA AAGGTGGCAG
601 CCTGCAACTT TAATAATGAC CAGTCCACAG TTTTGGCCAC CCAGGGTCTG GGTAGGCCCA
661 AAACTGTGTT CTGTTTTCCC AGAGGAGAAC AGGGCCTGAC AAACGGATTC ATTTTGTATT
.....**3'**

Ala541Thr polimorfizminin primerleri:

1. PCR primerleri;

Forward primer (sense): m15A 5' CCA GCC TTT GTG TAA GTC TAC 3'

Reverse primer (antisense): m15P 5' TCT GGG CAA GTT TGG AAG C 3'

"Nested" primerleri;

Forward primer (sense): m15A 5' CCA GCC TTT GTG TAA GTC TAC 3'

Reverse primer (antisense): m15RFLP. R' 5' AAT TCT TGA TAG GAA ACA GCT ATG ACC ATC AGC TTT GTG GTC CAG CCC AAC 3'

Primer dizilerinin seçildiği 17. ekzon bölgesi çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Altı çizili olan bazlar 1. PCR için primer bölgesini, kalın yazılmış olan bazlar ise "nested" PCR için primer bölgesini oluşturmaktadır. "Nested" PCR'ın forward primerleri 1. PCR'ın ki ile ortak olduğundan ikinci kez belirtilmemiştir. Amplifiye edilen bölgenin özgün olabilmesi için ise revers primerlere ek baz dizilimleri eklenmiştir. Gri renk ile renklendirilmiş olan nükleotitler ise restriksiyon enziminin tanıyıp kestiği bölgedir. Kullanılan bu primerler ile 2 kez PCR yapılmış olan alandan 419 baz çiftlik bir bölge amplifiye edilmiştir.

Kullandığımız bu primerleri seçerken, primerde bazların dengeli dağılmasına, primerin kendi içerisinde bağlanmaya neden olacak dizi bulunmamasına, Tm ısısının 70-75 ^{0}C olmasına ve kalıp DNA içinde yanlışlıkla tanıyacak baz dizisine sahip olmamasına (İşcan, 2003) dikkat edilmiştir.

Çizelge 3.2. ELAC2 geni 17. ekzonu

5'.....

1 CTAAATGCTT TAAGCCTCCT ATAAACTTTT TTTTTTTTTT TTTGATGC**CC AGCCTTTGTG**

61 TAAGTCTACT TGAAAGGGTT TCAGGGTTCC ATGGATACTT CTTTGCTATA AAGAGGATGA

121 CACATGTAAA ATCACCTTTA TGGTTAAATT AATTGGCTTT TATATTAGCT CCTCAAAGCA

181 AAGCAGGAGA GACAGAAATT TCTGCAGTTG CTTCTTGGTC CTGTCCAAAG CAGACATCAG

241 CCTCTGAACC ATCAGCAGTC TTCCTAGTGG CAGTGACTCT CTTCCTCTTC TCTTCTGCAG

301 CCCCGACACG TCTCTGCTAC TGGACTGTGG TGAGGGCACA TTTGGGCAGC TGTGCCGTCA

361 TTACGGAGAC CAGGTGGACA GGGTCCTGGG CACCCTGGCT GCTGTGTTTG TGTCCCACCT

421 GCACGCAGAT CACCACACGG TGAGT**GTTGG GCTGGACCAC AAAGCTG**GAG CCTGGAGGAG

481 GCACTGCCAC GTTGAGTTGG CCCTTTGGCT GCGTCTTTTC CTCCGCTTCC AAACTTGCCC

541 AGAGCTTTTG TTACTCATCT CTGGCTAGGA AATGGTTTTT TGCAAAACTC AACATAGTCC

.....**3'**

ELAC2 Geninin Ser217Leu ve Ala541Thr Polimorfizmleri İçin Kullanılan PCR Amplifikasyonu

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşullarının saptanması çeşitli denemelerle belirlendi. Primerlerin ve Taq polimerazın farklı konsantrasyonları yanında PCR programında farklı ısı döngüleri ve yapışma ısıları denendi. Her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar, bütün PCR reaksiyonları için kullanıldı. Çizelge 3.3'de Ser217Leu polimorfizmi için, Çizelge 3.4'de ise Ala541Thr polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonları verildi (Rebbeck ve ark., 2000).

Çizelge 3.3. Ser217Leu polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Tamponu (10X)	2.5 µl
dNTP (25mM)	0.2 µl
Primer 1 (25pmol/µl)	1.0 µl
Primer 2 (25pmol/µl)	1.0 µl
Taq polimeraz (5U/µl)	1.0 µl
$MgCl_2$ (2mM)	2.0 µl
Genomik DNA (0.5µg/µl)	1.0 µl
Su	16.3 µl
Toplam	25 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri;

Ön denatürasyon:	95 ^{0}C	0:03:00
Denatürasyon:	96 ^{0}C	0:00:30
Yapışma:	55 ^{0}C	0:00:35
Sentez:	72 ^{0}C	0:00:45
Toplam döngü:	25	
Son sentez:	72 ^{0}C	0:10:00 sn

Çizelge 3.4. Ala549Thr polimorfizmi için optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonu

PCR Tamponu (10X)	2.5 µl
dNTP (25mM)	0.2 µl
Primer 1 (25pmol/µl)	1.0 µl
Primer 2 (25pmol/µl)	1.0 µl
Taq polimeraz (5U/µl)	1.0 µl
$MgCl_2$ (2mM)	2.0 µl
Genomik DNA (0.5µg/µl)	1.0 µl
Su	16.3 µl
Toplam	25 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri;

Ön denatürasyon:	95 ^{0}C	0:03:00 sn
Denatürasyon:	96 ^{0}C	0:00:30 sn
Yapışma:	55 ^{0}C	0:00:35 sn
Sentez:	72 ^{0}C	0:00:45 sn
Toplam döngü:	25	
Son sentez:	72 ^{0}C	0:10:00 sn

PCR reaksiyonunun hazırlanmasında izlenilen basamaklar;

1. %70'lik alkolle temizlenmiş laminar flow kabini içinde üzerlerine örnek kodu yazılarak 200 µl'lik PCR tüpleri hazırlandı.
2. Tüm DNA örnekleri ve çözeltiler önce vorteks ile karıştırıldı, sonra santrifüj edildi.
3. PCR karışımı hazırlamak için daha önceden belirlenmiş olan miktarlardaki PCR tamponu, primerler (Ala541Thr ve Ser217Leu polimorfizmleri için kendilerine özgü olan primerler kullanıldı), dNTP, Taq polimeraz, $MgCl_2$ çizelge 3.3' e 3.4'te verilen oranlara göre tüp içine eklendi.
4. İyice karışması için tüp, önce vorteksle karıştırıldı, daha sonra santrifüj edildi.
5. Kodlanmış her bir PCR tüpüne hazırlanan karışım dağıtıldı ve her tüpe kodunu taşıyan genomik DNA daha önceden belirlendiği miktarda eklendi.
6. Yine önceden belirlenen miktarda her tüpe deiyonize su ilave edildi.
7. Her tüp ayrı ayrı vorteks ile karıştırıldı, santrifüj edildi ve thermal cycler'a (her bir polimorfizm için ayrı olan PCR programlarına) yerleştirildi.

Elde edilen PCR ürünleri 4 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.

SRD5A2 Geninin Ala49Thr ve Val89Leu Polimorfizmleri İçin PCR Amplifikasyonu

Kullanılan Primerler:

Çalışmamızda SRD5A2 genine ait iki değişik polimorfizme bakılmıştır. Bu polimorfizmlerin saptanması için, dizi analizi üzerinde ekzonların bulunduğu bölgeleri içerecek şekilde ve primer dizaynı kriterleri dikkate alınarak seçilen primerler kullanılmıştır. İnternet taraması sonucu elde edilen dizi analizi ile Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmlerinin bulunduğu 1. ekzonun 261 baz çiftlik bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır ve bunun için primerler oluşturulmuştur.

Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizminin PCR primerleri:
Forward primer (sense): 5' TGG CCT TGT ACG TCG CGA AG 3'
Reverse primer (antisense): 5' AGC AGG GCA GTG CGC TGC ACT 3'

Primer dizilerinin seçildiği 1. ekzon bölgesi çizelge 3.5'de gösterilmiştir. Kalın karakterler ile yazılmış olan bazlar primer bölgelerini göstermektedir. Altı çizili olan nükleotitler *Mwo I* restriksiyon enziminin, gri ile renklendirilmiş olan nükleotitler ise *Rsa I* restriksiyon enziminin tanıyıp kestiği bölgedir. Kullanılan bu primerler ile konvansiyonel PCR yöntemi kullanılarak 261 baz çiftlik bir bölge amplifiye edilmiştir.

Çizelge 3.5. SRD5A2 geni 1. ekzonu

5'.....

5101 GCTGGCAGGC AGCGCCACTT TGGTCGCCCT TGGGGCAC**TG GCCTTGTACG TCGCGAAG**CC
5161 CTCCGGCTAC GGGAAGCACA CGGAGAGCCT GAAGCCGGCG GCTACCCGCC TGCCAGCCCG
5221 CGCCGCCTGG TTCCTGCAGG AGCTGCCTTC CTTCGCGGTG CCCGCGGGGA TCCTCGCCCG
5281 GCAGCCCCTC TCCCTCTTCG GGCCACCTGG GACGGTACTT CTGGGCCTCT TCTGCCTACA
5341 TTACTTCCAC AGGTAGCGTT TTTCCCTTGC GGGCGCCC**AG TGCAGCGCAC TGCCCTGCT**C
5401 CCGGCGTCCA GGAGCGCAGC GTAGAGCGCG CACCGAGGAA CGCCAAGGAG GCAGCGTGGG

.....3'

5α-redüktaz tip II (SRD5A2) Geni Ala49Thr ve Val89Leu Polimorfizmleri İçin Kullanılan PCR Amplifikasyonu

Örneklerimiz için uygun amplifikasyon koşullarının saptanması çeşitli denemelerle belirlendi. Primerlerin ve Taq polimerazın farklı konsantrasyonları yanında PCR programında farklı ısı döngüleri ve yapışma ısıları denendi. Her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar, bütün PCR reaksiyonları için kullanıldı. Çizelge 3.6'da Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmi için, optimal reaksiyonun gerçekleştiği PCR reaksiyonları verildi (Çiçek ve ark., 2004).

Çizelge 3.6. SRD5A2 geni polimorfizmleri için PCR reaksiyonu

PCR Tamponu (10X)	2.5 µl
dNTP (25mM)	0.2 µl
Primer 1 (25pmol/µl)	1.0 µl
Primer 2 (25pmol/µl)	1.0 µl
Taq polimeraz (5U/ µl)	1.0 µl
$MgCl_2$ (2mM)	2.0 µl
Genomik DNA (0.5 µg/ µl)	1.0 µl
Su	16.3 µl
Toplam	25 µl

Optimal amplifikasyonun elde edildiği PCR reaksiyonundaki ısı döngüleri;

Ön denatürasyon:	94 ^{0}C	0:05:00
Denatürasyon:	94 ^{0}C	0:00:45
Yapışma:	62^{0}C	0:01:00
Sentez:	72 ^{0}C	0:01:00
Toplam döngü:	35	
Son sentez:	72 ^{0}C	0:10:00 sn

PCR reaksiyonunun hazırlanmasında izlenilen basamaklar; ELAC2 geninde belirtildiği gibidir.

3.2.4. PCR Ürününün Elektroforezi

PCR bazen çeşitli nedenlerden dolayı başarılı olmayabilir. Örneğin, kullanılan DNA tam saf olmayabilir, seçilen primerler uygun olmayabilir ya da birden fazla tanıma dizisi bulunabilir. Elde edilen PCR ürünü doğru boyutlarda elde edilememiş olabilir. Bu yüzden, PCR tamamlandıktan sonra, ürünler RFLP aşamasında kullanılmadan önce ürün kalitesini kontrol etmek amacı ile agaroz jel elektroforezine tabi tutularak kontrol edildi (EK-4). Agaroz jel elktroferezinde (%1.5'luk), her bir reaksiyon için oluşan bantın parlaklığına, nonspesifik bant olup olmadığına bakılarak değerlendirildi. Bunun için, PCR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan (EK-4.1) 1/5 oranında ilave edildi, pipetlenerek karıştırıldı. Örnekler %1.5'luk agaroz jel kuyularına dikkatli bir şekilde yüklendi ve 70 V, 100 mA de 20 dk süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Elde edilen PCR ürününün varlığı uygun markerlar kullanılarak Uvitec jel görüntüleme cihazında doğrulandı.

3.2.5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi ile PCR Ürünlerinin Kesimi

PCR ürünü içinde literatür taraması sonucu elde edilen mutasyon noktaları için tanıma dizisi olan endonükleazlar Gene Runner programının 3.05 versiyonu kullanılarak belirlendi.

ELAC2 geni ekzon 7 üzerindeki Ser217Leu polimorfizmi için kesim bölgesi T CGA olan *Taq I α* enzimi ve ekzon 17 üzerindeki Ala541Thr polimorfizmi için ise kesim bölgesi GC NGC olan *Ita I (FnU4HI)* restriksiyon enzimi kullanılmıştır.

SRD5A2 geni ekzon 1 üzerindeki Ala49Thr polimorfizmi için kesim bölgesi GCNNNNN NNGC olan *MwoI* enzimi, Val89Leu polimorfizmi için ise kesim bölgesi GT AC olan *RsaI* restriksiyon enzimi kullanılmıştır.

3.2.5.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamit Jel Elektroferezi (EK-6) ve Yorumlanması

%10'luk poliakrilamit jeli hazırlamak için yapılan ön hazırlıklar:

1. %40'lık stok akrilamit çözeltisi hazırlandı (EK-6.1).
2. %25'lik Amonium Per Sülfat (APS) çözeltisi taze olarak hazırlandı (EK-6.3).
3. 5X TBE stok tamponu hazırlanıp otoklavda steril edildi (EK-6.3).
4. Dikey elektroforez cihazı temizlenip saf sudan geçirildikten sonra, elektroforez camları %70'lik alkolle silinip kurulandı.
5. Camların arasına sızdırmayı önlemek için özel bantları yerleştirildi.
6. Arasına özel bantları yerleştirilmiş olan camlar elektroforez aparatına yerleştirildi.
7. %10 olarak hazırlanmış jel enjektöre çekilerek, hava kabarcığı kalmayacak şekilde cam arasına enjekte edildi.
8. Polimerizasyonun gerçekleşmesi için 20-30 dk beklendi.
9. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra aparat tankın içine yerleştirildi.
10. Jelin alt ve üst sınırlarına temas edecek şekilde 1X TBE tamponu eklendi.
11. Tampon eklendikten sonra tarak, herhangi bir deformasyona sebep olmayacak şekilde, yavaşça çekildi.
12. Her bir kuyuya 5 µl yükleme tamponu ile karıştırılmış kesim ürünü yerleştirildi.
13. Kuyulardan birine karşılaştırma yapabilmek için marker, birine de PCR ürünü yüklendi.
14. 70V, 100A ve 7 Watta 1.5 saat elektroforeze tabi tutuldu.
15. Süre sonunda jel, camların arasından alınarak 1XTBE'de 0.5 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış EtBr çözeltisinde 10 dk boyandı (EK-6.4).
16. Boya artıklarından temizlemek için jel saf su içerisine alındı.
17. Sonunda jel, Uvitec görüntüleme cihazında değerlendirildi.

ELAC2 Geni Ser217Leu ve Ala541Thr Polimorfizmleri İçin Jel Değerlendirmesi

Jelin değerlendirmesi örneklerin oluşturduğu bantlar ile marker bantları kıyaslanarak yapılır. Kesim enzimleri kendilerine spesifik bölgeleri tanıyıp kesen ve bu sayede bölgedeki bazın değişip değişmediği hakkında değerlendirme yapmamıza olanak veren enzimlerdir. Restriksiyon enzimlerinin bu özelliklerinden faydalanarak polimorfizmler hakkında karara varılabilir.

ELAC2 geni ekzon 7 üzerindeki Ser217Leu polimorfizmi için kullanılan *TaqI α* enzimi bölge üzerinde bu mutasyon yokken, yani sağlam genotipi kesmektedir. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Ser/Ser genotipi için, 172 ve104 bç'lik iki bant; homozigot mutasyonlu Leu/Leu genotipi için, 276 bç'lik tek bant ve heterozigot Ser/Leu genotipi için ise, 276, 172 ve 104 bç'lik üç bant meydana gelmektedir.

ELAC2 geni ekzon 17 üzerindeki Ala541Thr polimorfizmi için kullanılan *Ita I (FnU4HI)* enzimi de bölge üzerinde bu mutasyon yokken, yani sağlam genotipi kesmektedir. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Ala/Ala genotipi için, 49, 52, 68 ve 250 bç'lik dört bant; homozigot mutasyonlu Thr/Thr genotipi için, 49, 120 ve 250 bç'lik üç bant ve heterozigot Ala/Thr genotipi için ise, 49, 52, 68, 120 ve 250 bç'lik beş bant meydana gelmektedir.

5α-redüktaz tip II (SRD5A2) Geni Ala49Thr ve Val89Leu Polimorfizmleri İçin Jel Değerlendirmesi

Jelin değerlendirmesi örneklerin oluşturduğu bantlar ile marker bantları kıyaslanarak yapılır.

5α-redüktaz tip II (SRD5A2) geni Ala49Thr polimorfizmi için kullanılan *MwoI* enzimi bölge üzerinde bu mutasyon yokken, yani sağlam genotipi kesmektedir. Bölge üzerinde *MwoI* enzimine ait dört adet kesim bölgesi vardır. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Ala/Ala genotipi için, 19, 20, 68, 70, 84 bç'lik beş bant; homozigot mutasyonlu Thr/Thr genotipi için, 19, 68, 70, 104 bç'lik dört bant ve heterozigot Ala/Thr genotipi için ise, 19, 20, 68, 70, 84 ve 104 bç'lik altı bant meydana gelmektedir.

5α-redüktaz tip II (SRD5A2) geni Val89Leu polimorfizmi için kullanılan *RsaI* enzimi bölge üzerinde bu mutasyon varsa PCR ürününü kesmektedir. Sağlıklı genotiplerde bölge üzerinde *RsaI* enzimine ait iki adet, mutasyonlu genotiplerde ise üç adet kesim bölgesi vardır. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Val/Val genotipi için, 9, 83 ve 169 bç'lik üç bant; homozigot mutasyonlu Leu/Leu genotipi için, 9, 21, 62 ve 169 bç'lik dört bant ve heterozigot Val/Leu genotipi için ise, 9, 21, 62, 83 ve 169 bç'lik beş bant oluşmaktadır.

3.2.6. İstatistik Analiz

Verilerin analizinde SPSS PC (15 versiyon) programı kullanıldı. Oranların karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı ve $p<0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

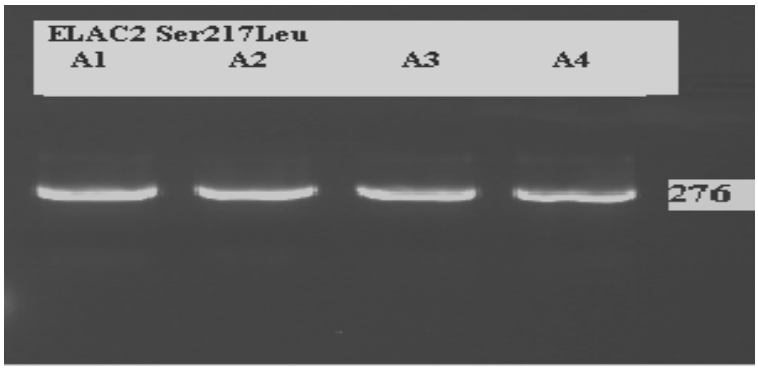
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Çalışmamızda prostat kanseri teşhisi ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı'na gelen 67 prostat kanseri (patoloji sonucu: adenokarsinom), 39 benign prostat hiperplazi (BPH) hastası ve 34 sağlıklı kontrol araştırmaya dahil edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilmiştir. Bunlara ilave olarak 22 hastanın da akrabası araştırmaya dahil edilmiştir. Araştırmaya katılan bireylerin venöz kanından elde edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ise prostat kanseri olmayan kanlarından izole edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. Kan alınan bireyler numaralandırılırken "A", "B" ve "K" harfleri kullanılmıştır. "A" harfi ile numaralandırılmış bireyler adenokarsinom hastalarını, "B" harfi ile numaralandırılmış bireyler benign prostat hiperplazi hastalarını, "K" harfi ile numaralandırılmış bireyler ise kontrolleri göstermektedir.

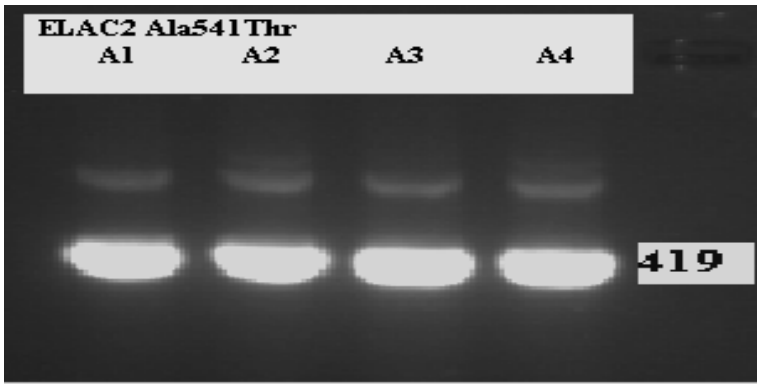
Çalışmamıza başlarken; bireylerin yaşı, cinsiyeti, sigara kullanımı ve aile öyküsü kaydedilmiştir. Kontrol grubunun da aynı bilgileri alınmıştır.

ELAC2 Geni Ser217Leu Polimorfizmi İçin; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 276 bç'lik DNA alanı çoğaltılmıştır. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde 276 bç'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütülmüş ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

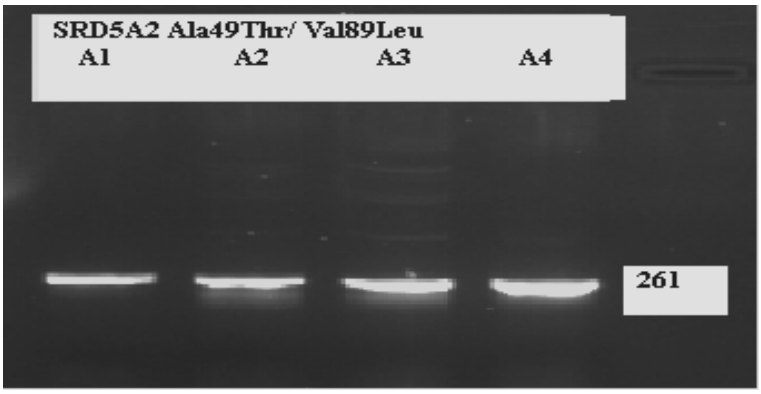
ELAC2 Geni Ala541Thr Polimorfizmi İçin; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 419 bç'lik DNA alanı çoğaltılmıştır. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde 419 bç'lik fragmanı belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütülmüş ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır. (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. ELAC2 Ala541Thr polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

5α-redüktaz tip II (SRD5A2) Geni Ala49Thr ve Val89Leu Polimorfizmleri İçin; uygun primerler ile optimizasyon denemeleri yapıldıktan sonra 261 bç'lik DNA alanı çoğaltılmıştır. Tüm örneklerden elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde 261 bç'lik fragmanı

belirlemeye olanak verecek bantları içeren marker ile beraber yürütülmüş ve jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır. (Şekil 4.3)

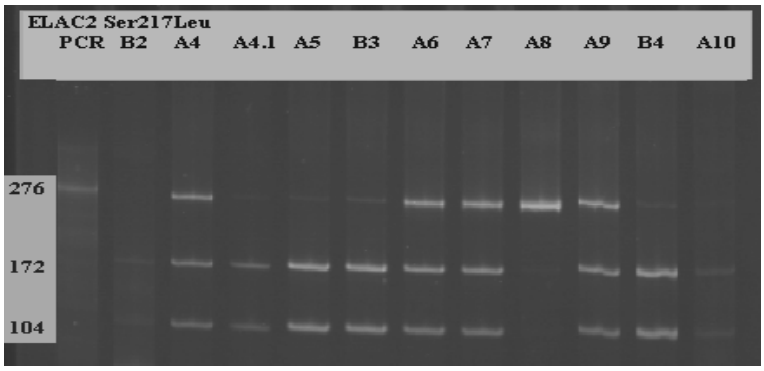


Şekil 4.3. SRD5A2 Geni Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmi için çalışılan örneklerin agaroz jel elektroforezindeki PCR ürünü görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

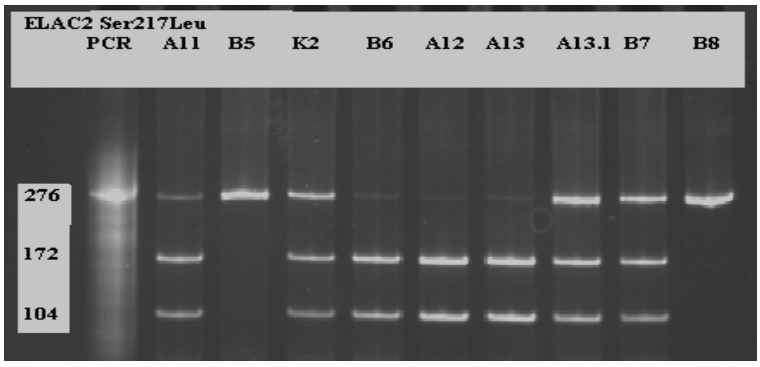
Restriksiyon Enzimi Kesimleri

ELAC2 geni Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri için; PCR ürünlerinin uygun olduğu belirlendikten sonra tüm örnekler, ürünleri belli noktalarda kesme özelliğine sahip restriksiyon endonüklezlar ile kesilmiştir. Ser217Leu polimorfizmi için, *Taq I α* ve Ala541Thr polimorfizmi için ise *Ita* I *(FnU4HI)* ile muamele edilerek RFLP işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesim ürünleri %10'luk poliakrilamit jel elektroforezinde (PAGE) görüntülenerek değerlendirilmiştir. ELAC2 geni, Ser217Leu polimorfizminin PAGE görüntüleri Şekil 4.4-4.17'de ve Ala541Thr polimorfizminin PAGE görüntüleri ise Şekil 4.18-4.34'de verilmiştir.

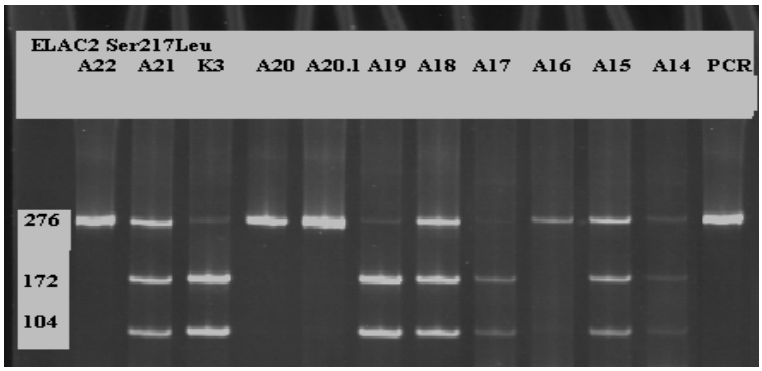
Jel elektroforezinin değerlendirmesi, örneklerin oluşturduğu bantlar ile marker bantları kıyaslanarak yapılır. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için, 276 bç'lik alan çoğaltılmış DNA bölgesi *TaqI α* enzimi kullanılarak kesim yapılmıştır. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Ser/Ser genotipi için, 172 ve104 bç'lik iki bant; homozigot mutasyonlu Leu/Leu genotipi için, 276 bç'lik tek bant ve heterozigot Ser/Leu genotipi için ise, 276, 172 ve 104 bç'lik üç bant meydana gelmiştir. Şekil 4.4-4.17'de Ser217Leu polimorfizmine ait %10'luk PAGE görüntüleri verilmiştir.



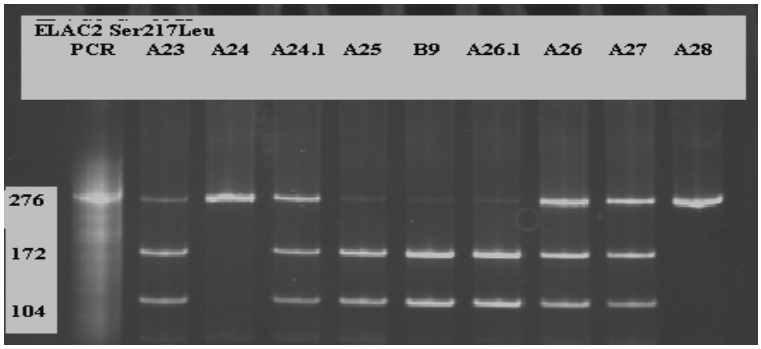
Şekil 4.4. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B2, A4, A4.1, A5, B3, A6, A7, A8, A9 ve B4 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



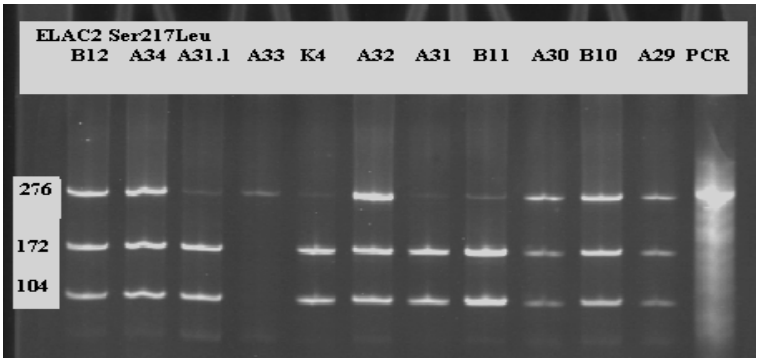
Şekil 4.5. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A11, B5, K2, B6, A12, A13, A13.1, B7 ve B8 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



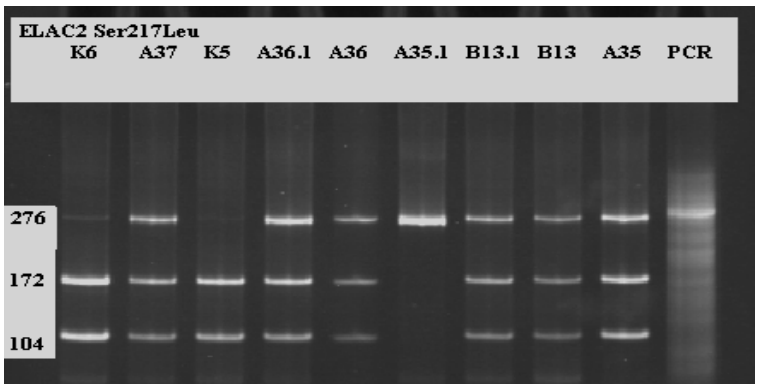
Şekil 4.6. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A20.1 K3, A21 ve A22 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



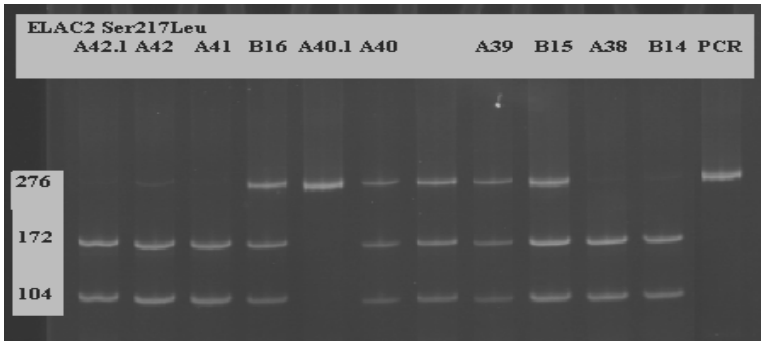
Şekil 4.7. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A23, A24, A24.1, A25, B9, A26.1, A26, A27 ve A28 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



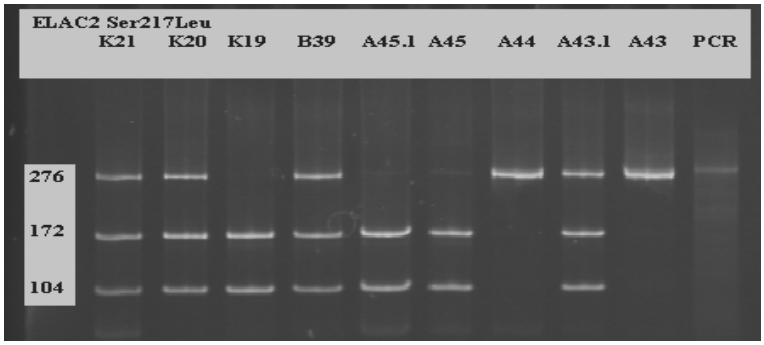
Şekil 4.8. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A29, B10, A30, B11, A31, A32, K4, A33, A31.1, A34 ve B12 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



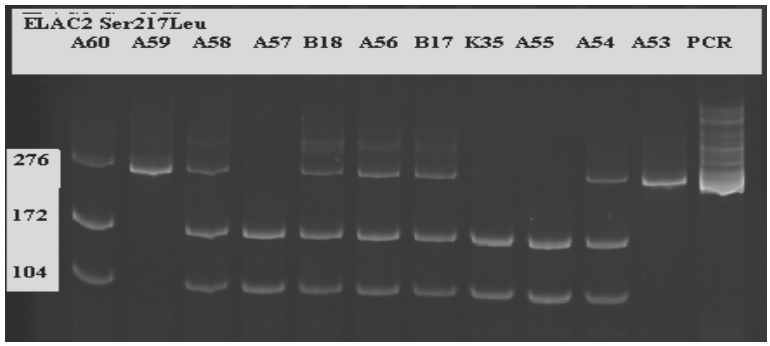
Şekil 4.9. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A35, B13, B13.1, A35.1, A36, A36.1, K5, A37 ve K6 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



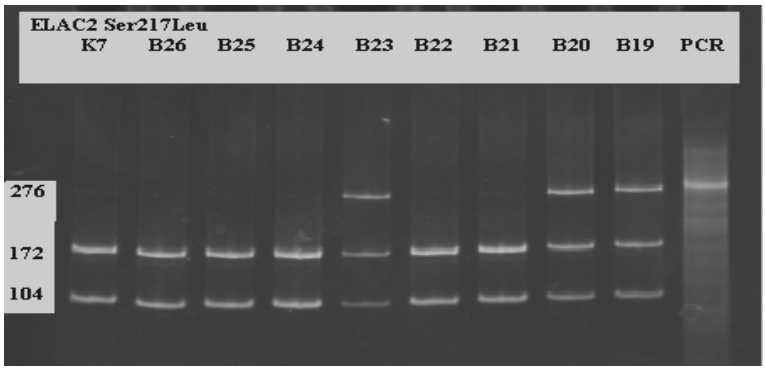
Şekil 4.10. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B14, A38, B15, A39, A40, A40.1, B16, A41, A42 ve A42.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



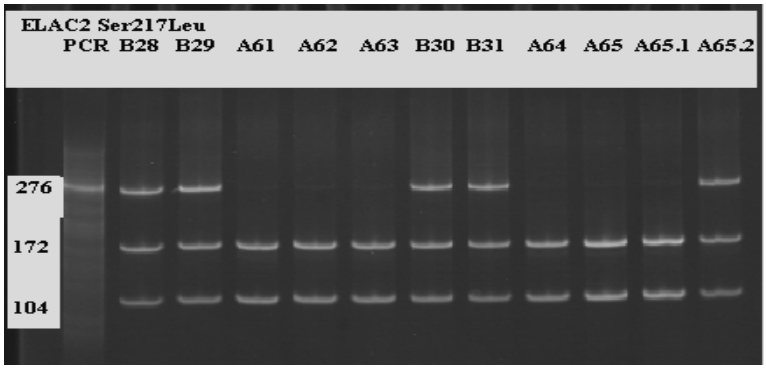
Şekil 4.11. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A43, A43.1 A44, A45, A45.1, B39, K19, K20 ve K21 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



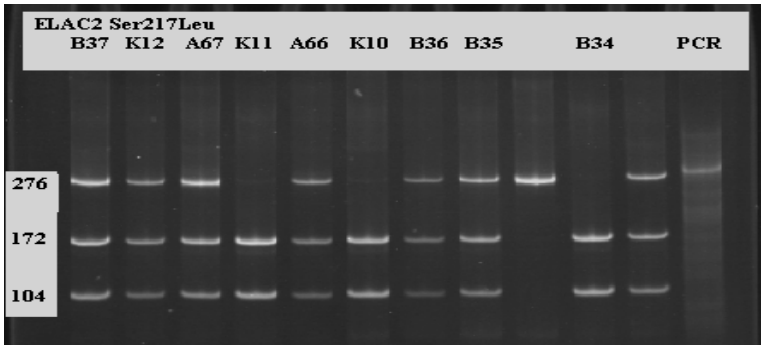
Şekil 4.12. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; A53, A54, A55, K35, B17, A56, B18, A57, A58, A59 ve A60 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



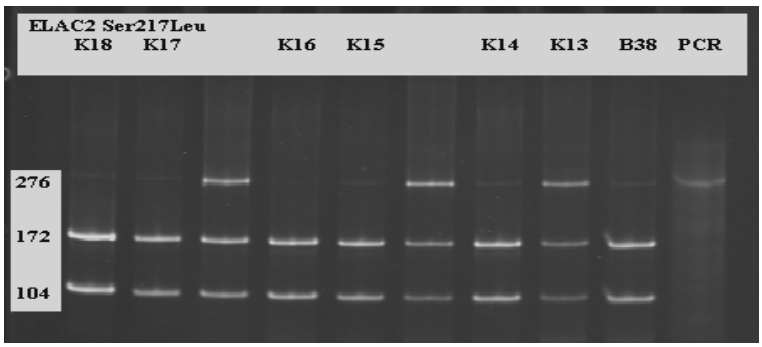
Şekil 4.13. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25, B26, K7 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



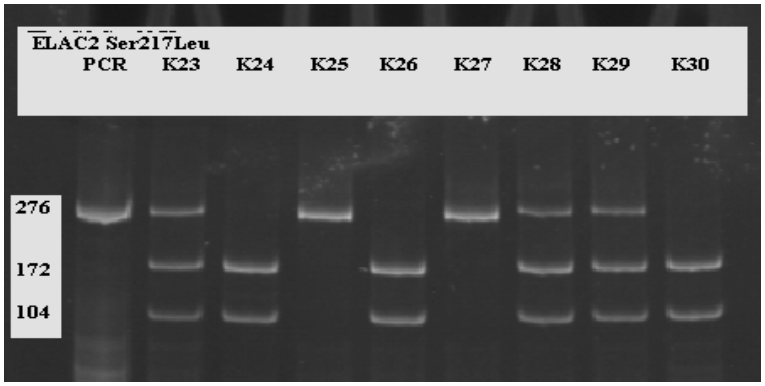
Şekil 4.14. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B28, B29, A61, A62, A63, B30, B31, A64, A65, A65.1 ve A65.2 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



Şekil 4.15. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B34, B35, B36, K10, A66, K11, A67, K12 ve B37 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

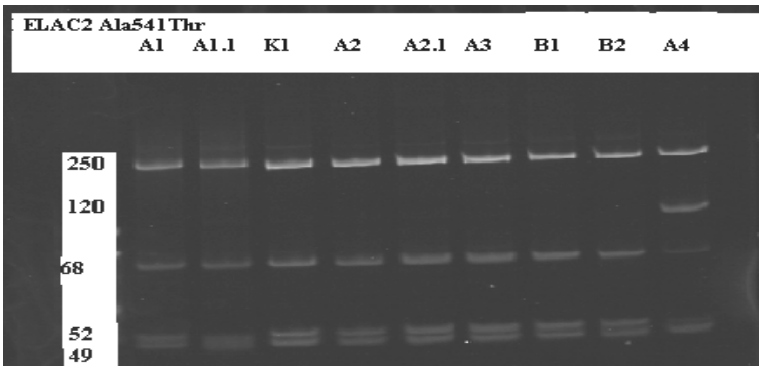


Şekil 4.16. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; B38, K13, K14, K15, K16, K17 ve K18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

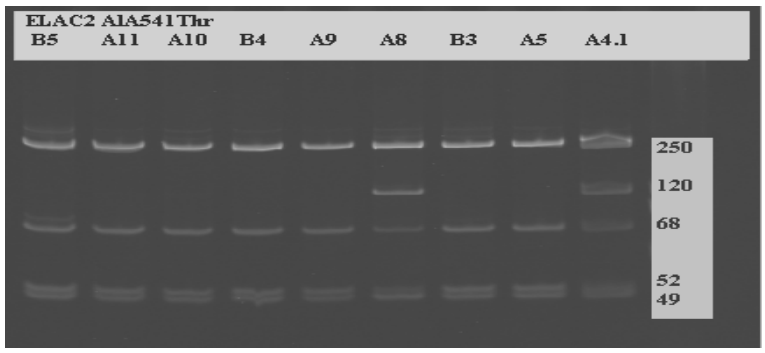


Şekil 4.17. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; K23, K24, K25, K26, K27, K28, K29 ve K30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

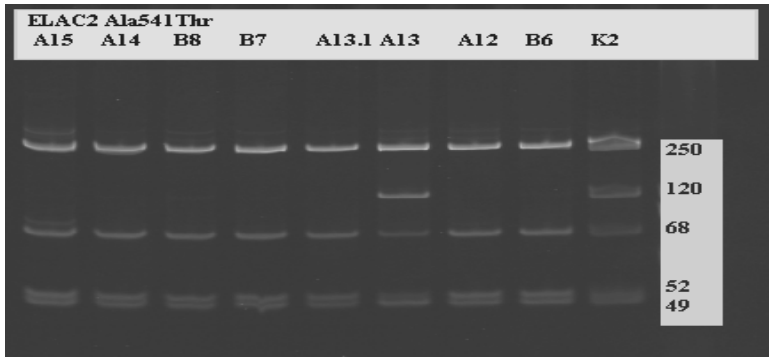
ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için, 419 bç'lik alan çoğaltılmış DNA bölgesi *Ita I (FnU4HI)* enzimi kullanılarak kesim yapılmıştır. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Ala/Ala genotipi için, 49, 52, 68 ve 250 bç'lik dört bant; homozigot mutasyonlu Thr/Thr genotipi için, 49, 120 ve 250 bç'lik üç bant ve heterozigot Ala/Thr genotipi için ise, 49, 52, 68, 120 ve 250 bç'lik beş bant meydana gelmiştir. Şekil 4.18-4.34'de Ala541Thr polimorfizmine ait %10'luk PAGE görüntüleri verilmiştir.



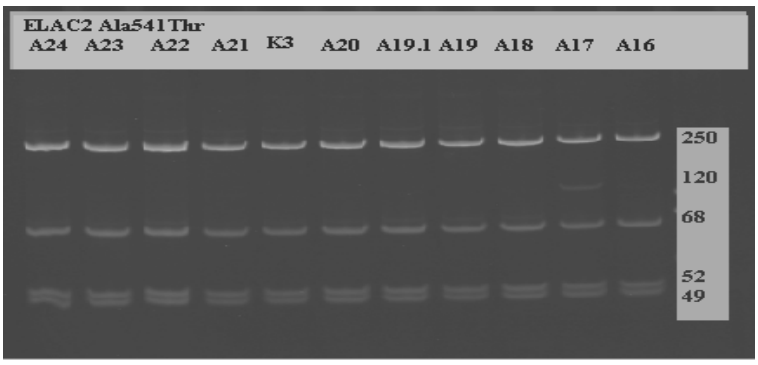
Şekil 4.18. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A1, A1.1, K1, A2, A2.1, A3, B1, B2 ve A4 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



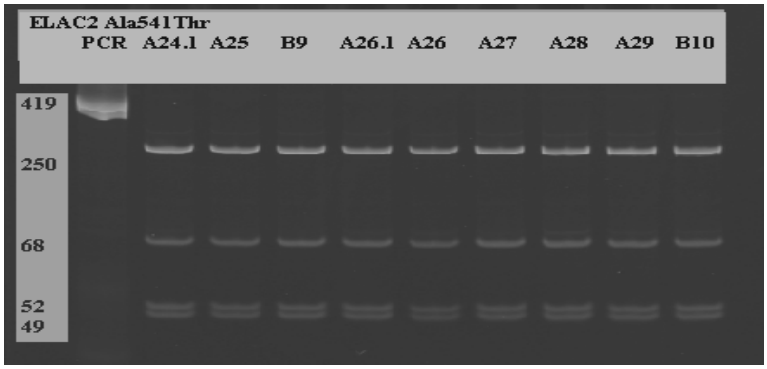
Şekil 4.19. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A4.1, A5, B3, A8, A9, B4, A10, A11 ve B5 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



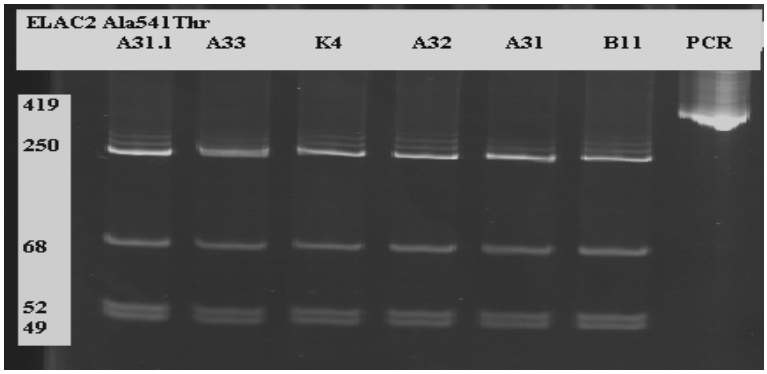
Şekil 4.20. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B6, A12, A13, A13.1, B7, B8, A14 ve A15 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



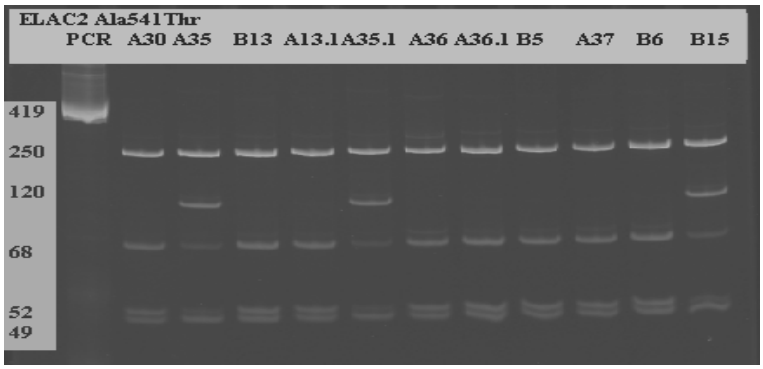
Şekil 4.21. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A16, A17, A18, A19, A19.1, A20, K3, A21, A22, A23 ve A24 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



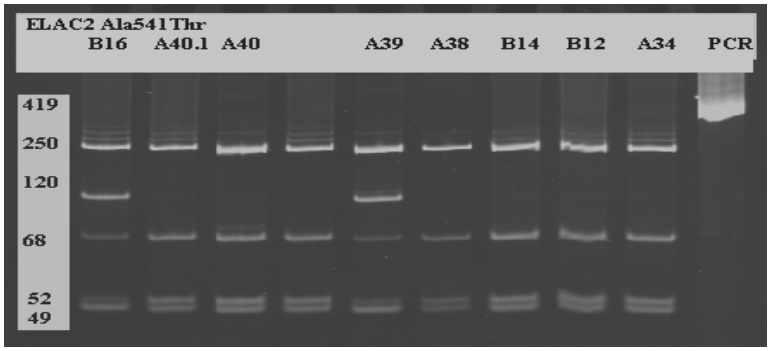
Şekil 4.22. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A24.1, A25, B9, A26.1, A27, A28, A29 ve B10 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



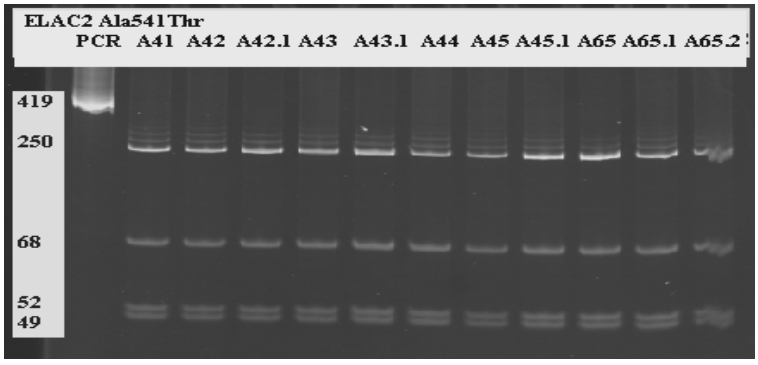
Şekil 4.23. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B11, A31, A32, K4, A33 ve A31.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



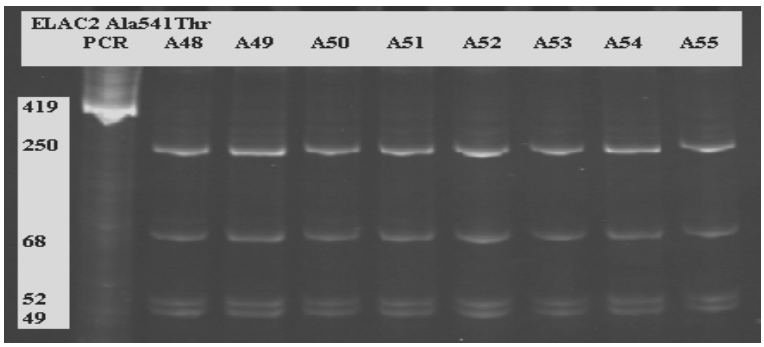
Şekil 4.24. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A30, A35, B13, A13.1, A35.1, A36, A36.1, B5, B6 ve B15 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



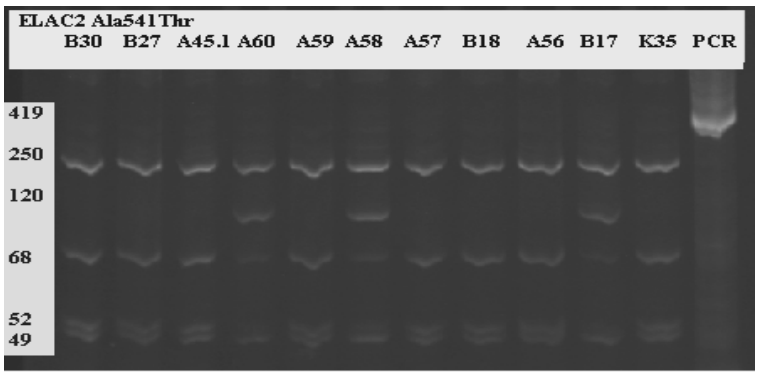
Şekil 4.25. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A34, B12, B14 A38, A39, A40, A40.1 ve B16 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



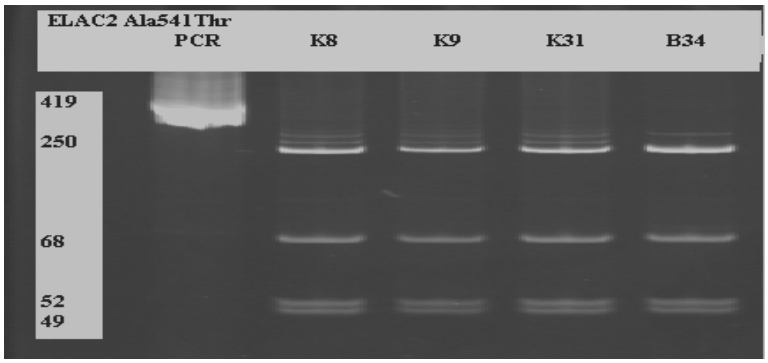
Şekil 4.26. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A41, A42, A42.1, A43, A44, A45, A45.1, A65, A65.1 ve A65.2 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



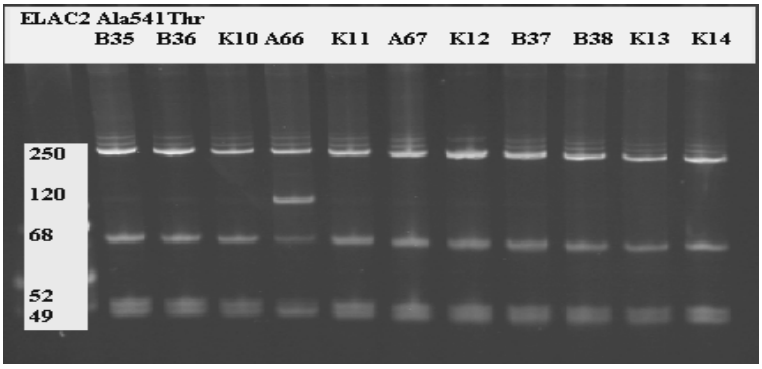
Şekil 4.27. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; A48, A49, A50, A51, A52, A53, A54 ve A55 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



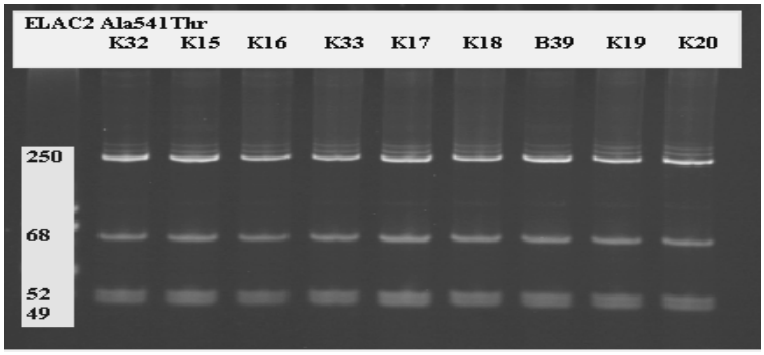
Şekil 4.28. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K35, B17, A56, B18, A57, A58, A59, A60, A45.1 B27 ve B30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



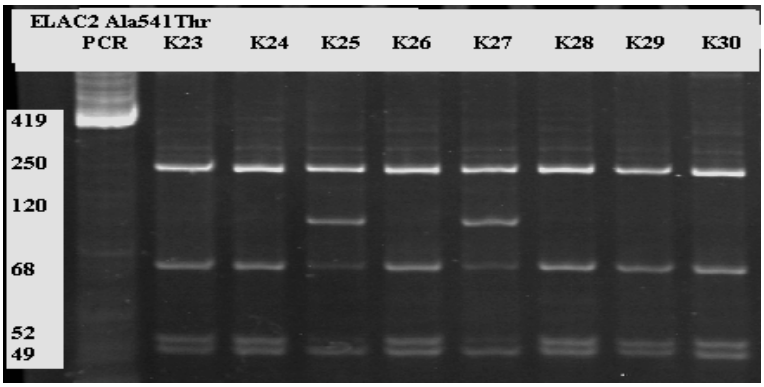
Şekil 4.29. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K8, K9, K31 ve K34 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



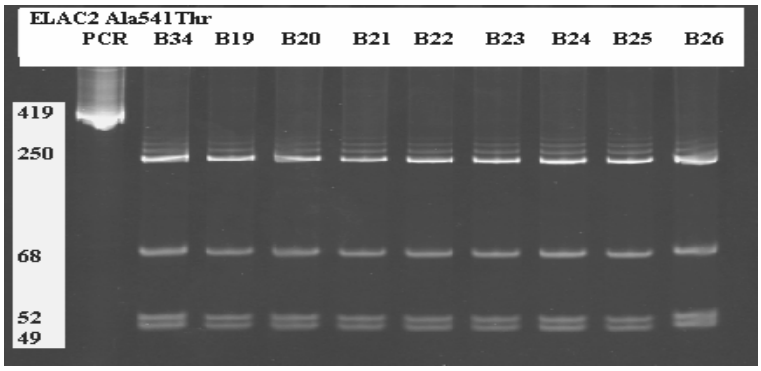
Şekil 4.30. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B35, B36, K10, A66, K11, A67, K12, B37, B38, K13 ve K14 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



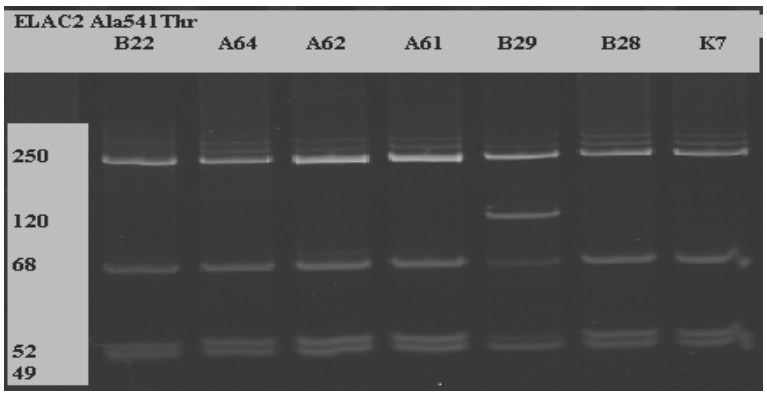
Şekil 4.31. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K32, K15, K16, K33, K17, K18, B39, K19 ve K20 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



Şekil 4.32. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K23, K24, K25, K26, K27, K28, K29 ve K30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



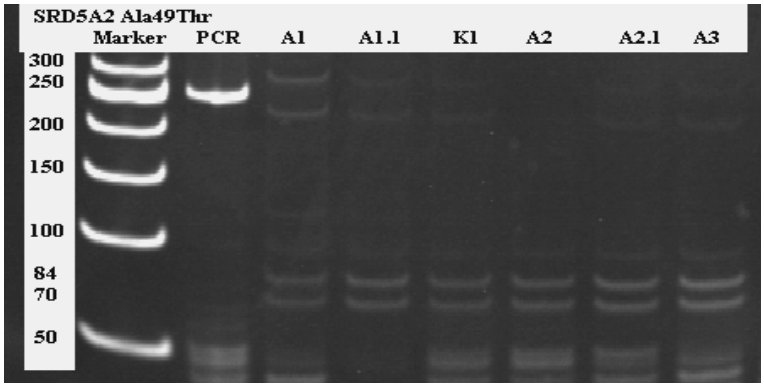
Şekil 4.33. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; B34, B19, B20, B21, B22, B23, B24, B25 ve B26 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



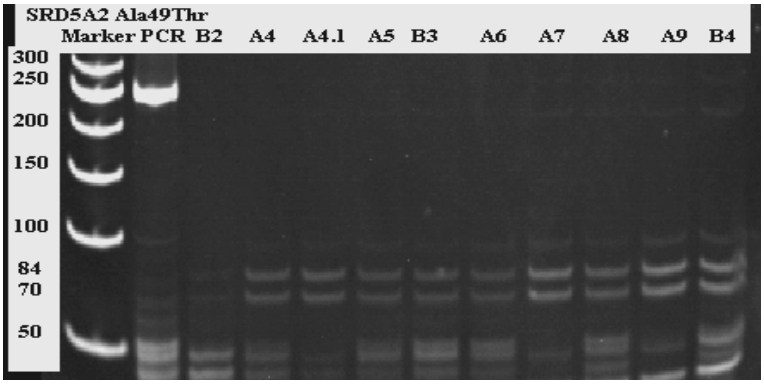
Şekil 4.34. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; K7, B28, B29, A61, A62, A64 ve B22 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

5α-redüktaz tip II (SRD5A2) Geni Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri için; PCR ürünlerinin uygun olduğu belirlendikten sonra (Şekil 4.3) tüm örneklerin 261 bç'lik PCR ürünlerini belli noktalarda kesme özelliğine sahip restriksiyon endonüklezlar ile kesilmiştir. Ala49Thr polimorfizmi için, *MwoI* enzimi ve Val89Leu polimorfizmi için ise *RsaI enzimi* ile muamele edilerek RFLP işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesim ürünleri %10'luk poliakrilamit jel elektroforezinde (PAGE) görüntülenerek değerlendirilmiştir. 5α-redüktaz tip II (SRD5A2) Geni Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmlerinin PAGE görüntüleri şekil 4.35-4.67'de verilmiştir.

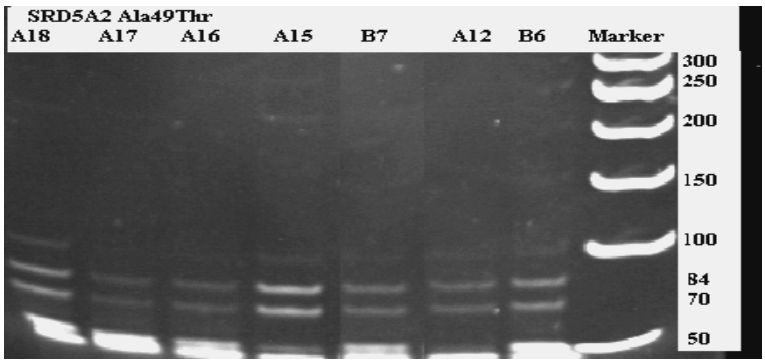
5α-redüktaz tip II (SRD5A2) Geni Ala49Thr polimorfizmi için, 261 bç'lik alan çoğaltılmış DNA bölgesi *MwoI* enzimi kullanılarak kesim yapılmıştır. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Ala/Ala genotipi için, 19, 20, 68, 70, 84 bç'lik beş bant; homozigot mutasyonlu Thr/Thr genotipi için, 19, 68, 70, 104 bç'lik dört bant ve heterozigot Ala/Thr genotipi için ise, 19, 20, 68, 70, 84 ve 104 bç'lik altı bant meydana gelmiştir. Şekil 4.35-4.51,'de Ala49Thr polimorfizmine ait %10'luk PAGE görüntüleri verilmiştir.



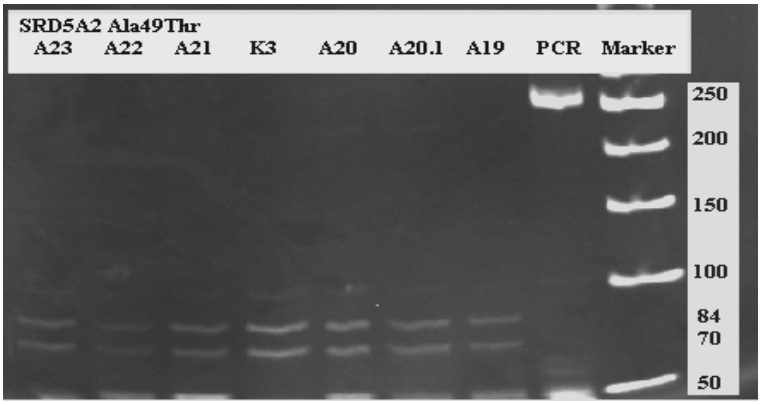
Şekil 4.35. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A1, A1.1, K1, A2, A2.1 ve A3 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



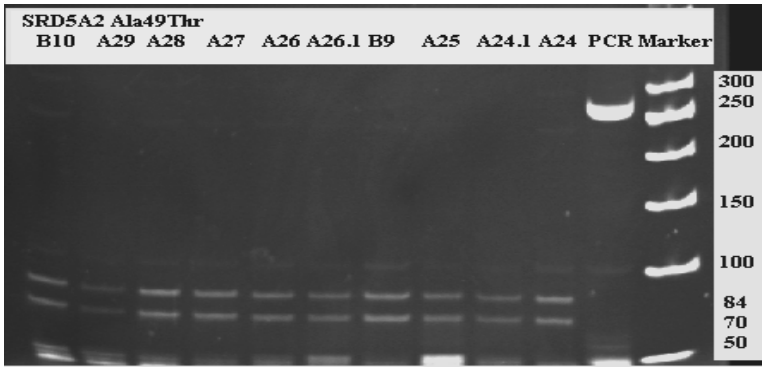
Şekil 4.36. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B2, A4, A4.1, A5, B3, A6, A7, A8, A9 ve B4 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



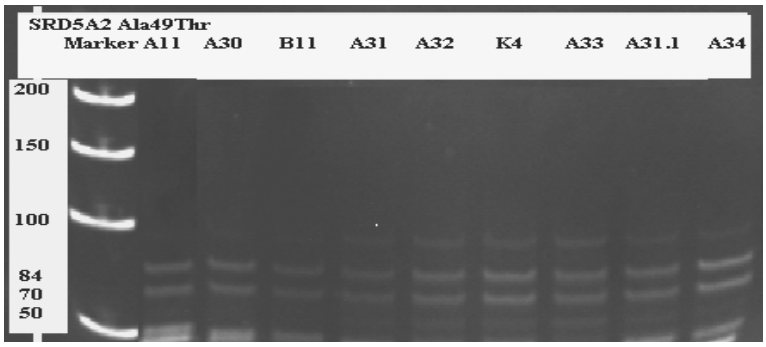
Şekil 4.37. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B6, A12, B7, A15, A16, A17 ve A18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



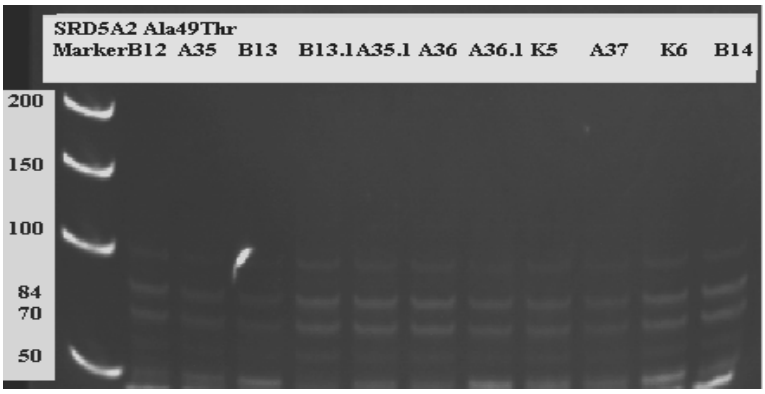
Şekil 4.38. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A19, A20.1, A20, K3, A21, A22 ve A23 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



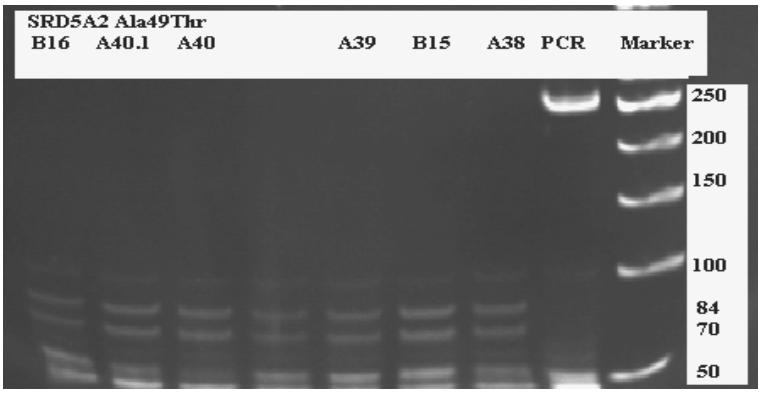
Şekil 4.39. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A24, A24.1, A25, B9, A26.1, A26, A27, A28, A29 ve B10 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



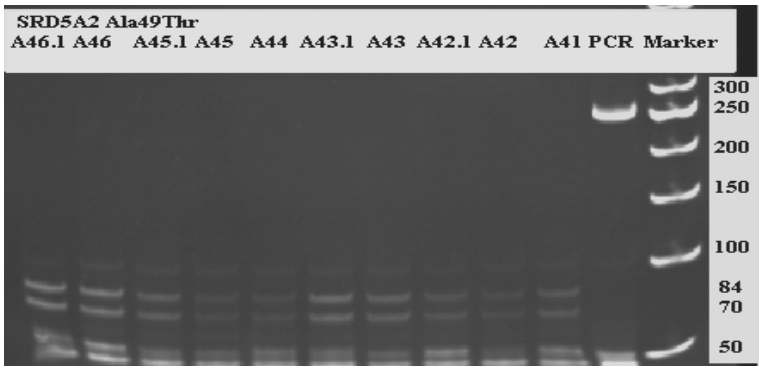
Şekil 4.40. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A11, A30, B11, A31, A32, K4, A33, A31.1 ve A34 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



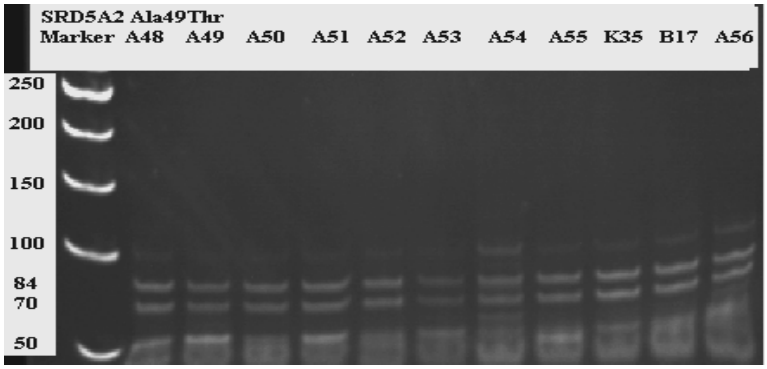
Şekil 4.41. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B12, A35, B13, B13.1, A35.1, A36, A36.1, K5, A37, K6 ve B14 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



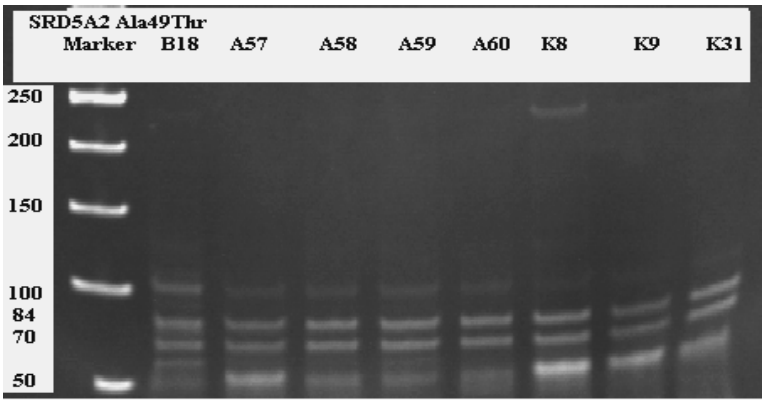
Şekil 4.42. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A38, B15, A39, A40, A40.1 ve B16 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



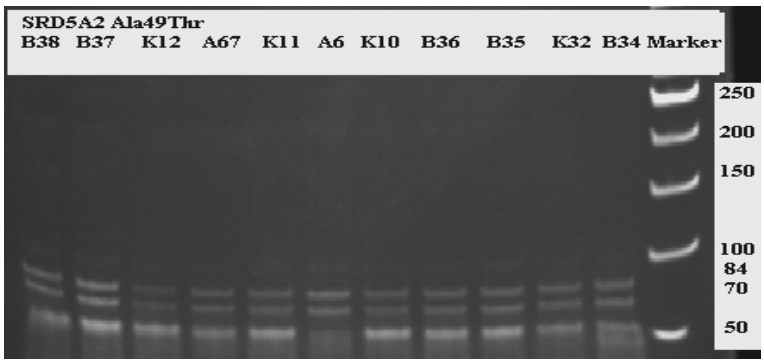
Şekil 4.43. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A41, A42, A42.1, A43, A43.1, A44, A45,A45.1, A46 ve A46.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



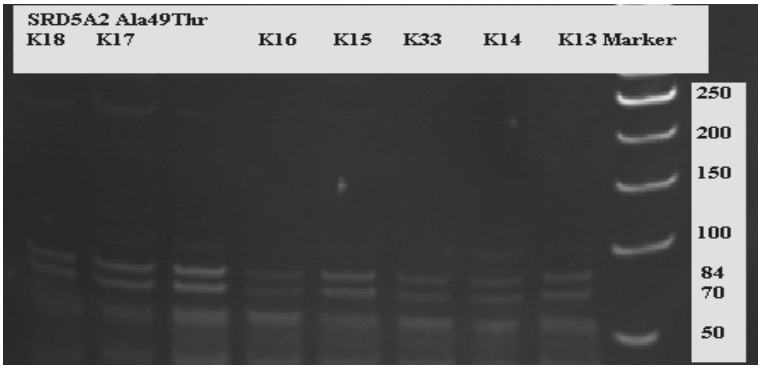
Şekil 4.44. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A48, A49, A50, A51, A52, A53, A54, A55, K35, B17 ve A56 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



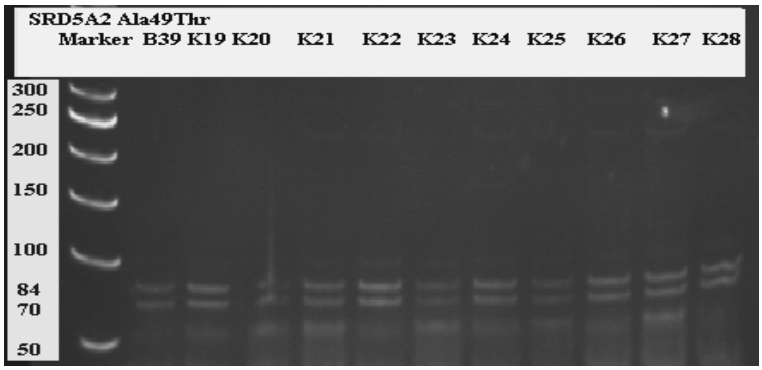
Şekil 4.45. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B18, A57, A58, A59, A60, K8, K9 ve K31 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



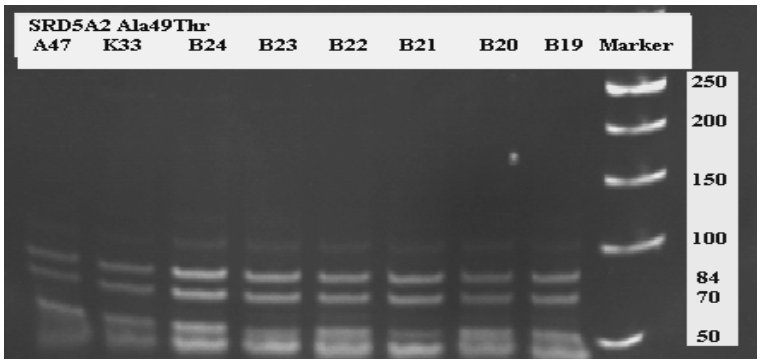
Şekil 4.46. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B34, K32, B35, B36, K10, A6, K11, A67,K12, B37 ve B38 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



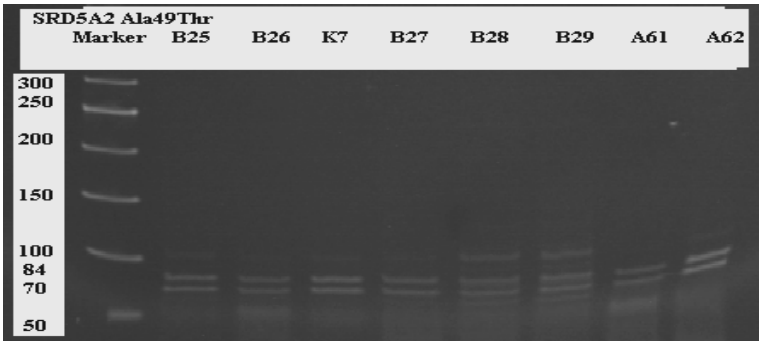
Şekil 4.47. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; K13, K14, K33, K15, K16, K17 ve K18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



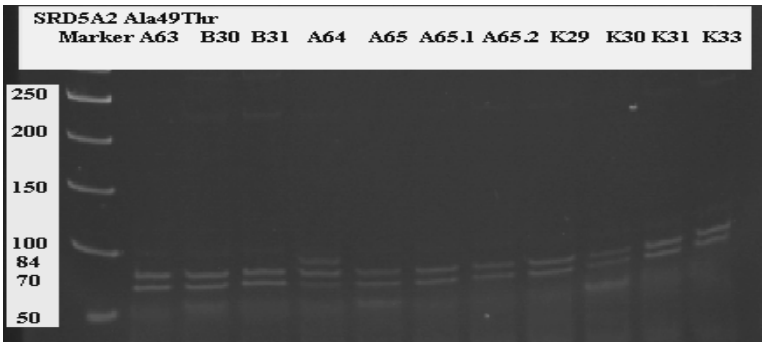
Şekil 4.48. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B39, K19, K20, K21, K22, K23, K24, K25, K26, K27 ve K28 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



Şekil 4.49. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B19, B20, B21, B22, B23, B24, K33 ve A47 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

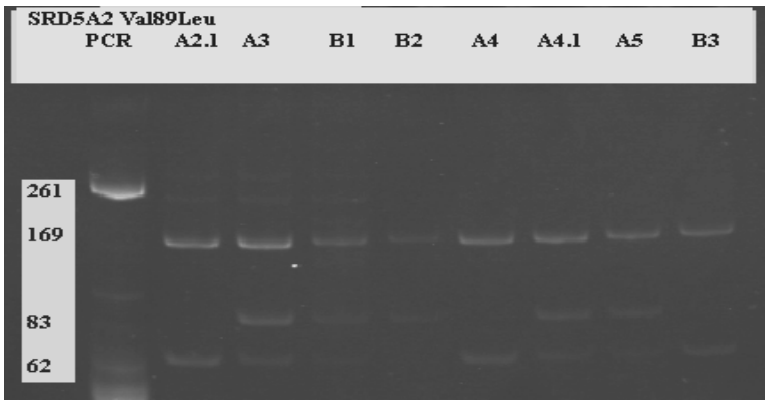


Şekil 4.50. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; B25, B26, K7, B27,B28, B29, A61 ve A62 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

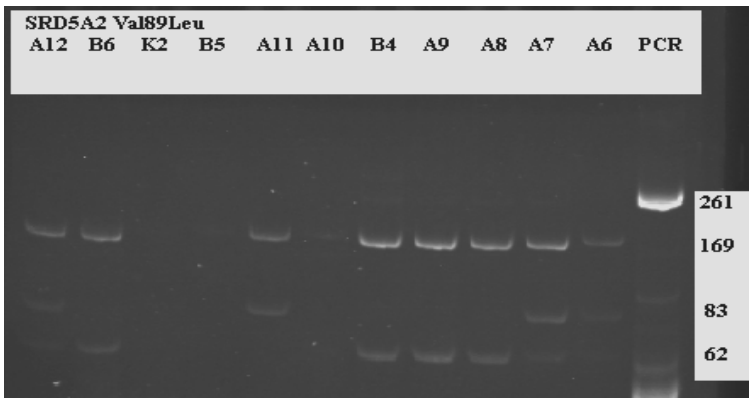


Şekil 4.51. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; A63, B30, B31, A64, A65, A65.1, A65.2, K29, K30, K31 ve K33 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

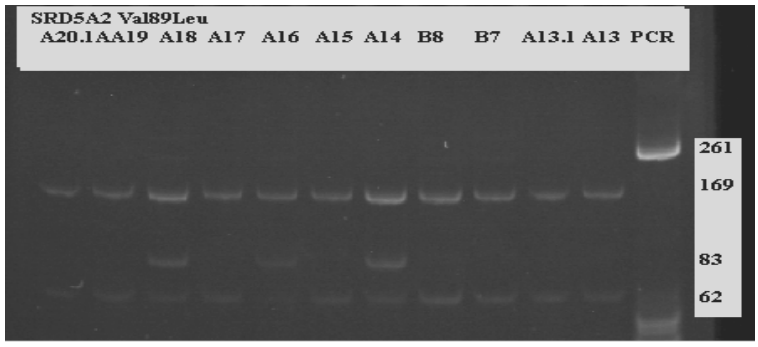
5α-redüktaz tip II (SRD5A2) Geni Val89Leu polimorfizmi için, 261 bç'lik alan çoğaltılmış DNA bölgesi *RsaI* enzimi kullanılarak kesim yapılmıştır. Kesim reaksiyonu sonunda homozigot sağlam Val/Val genotipi için, 9, 83 ve 169 bç'lik üç bant; homozigot mutasyonlu Leu/Leu genotipi için, 9, 21, 62, 169 bç'lik dört bant ve heterozigot Val/Leu genotipi için ise, 9, 21, 62, 83 ve 169 bç'lik beş bant meydana gelmiştir. Şekil 4.52-4.67, 'de Val89Leu polimorfizmine ait %10'luk PAGE görüntüleri verilmiştir.



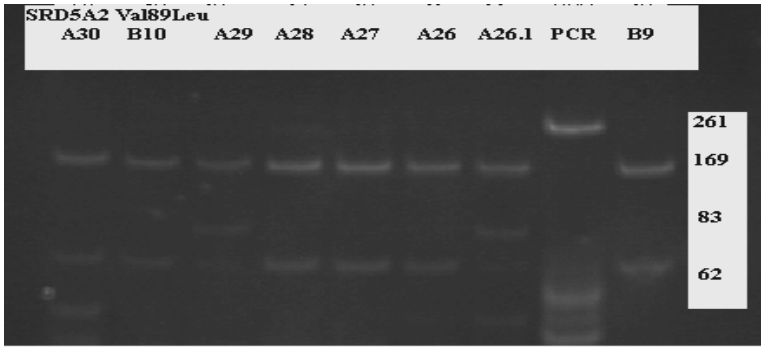
Şekil 4.52. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A2.1, A3, B1, B2, A4, A4.1, A5 ve B3 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



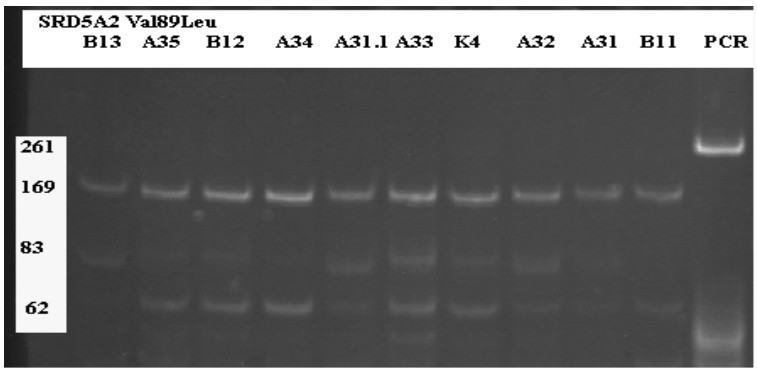
Şekil 4.53. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A6, A7, A8, A9, B4, A10, A11, B5, K2, B6 ve A12 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



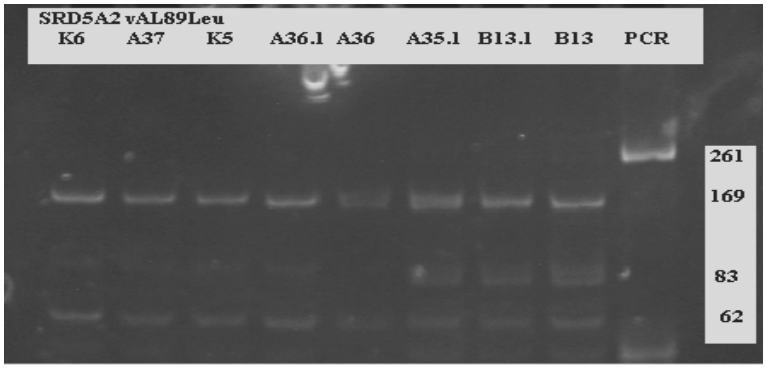
Şekil 4.54. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A13, A13.1, B7, B8, A14, A15, A16, A17, A18, A19 ve A20.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



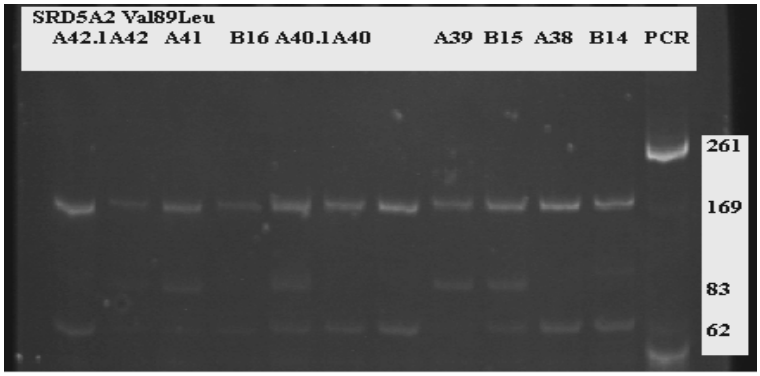
Şekil 4.55. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B9, A26.1, A26, A27, A28, A29, B10 ve B30 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



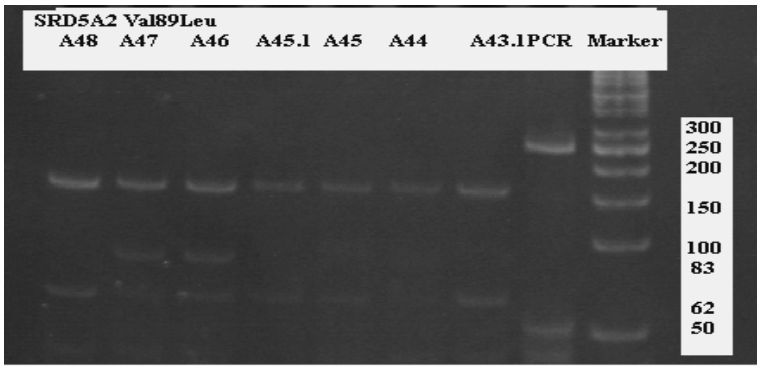
Şekil 4.56. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B11, A31, A32, K4, A33, A31.1, A34, B12, A35 ve B13 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



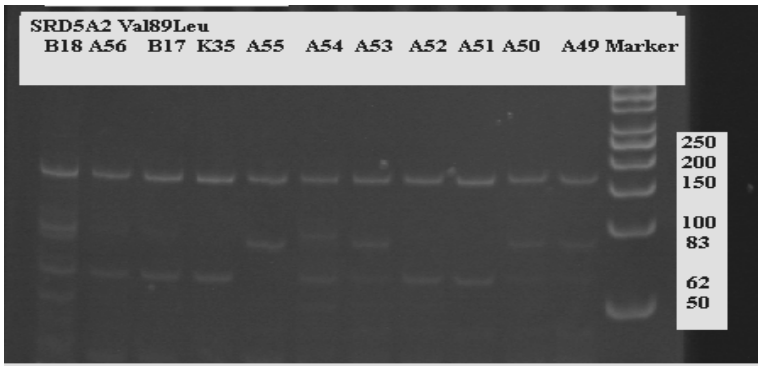
Şekil 4.57. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B13, B13.1, A35.1, A36, A36.1, K5, A37 ve K6 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



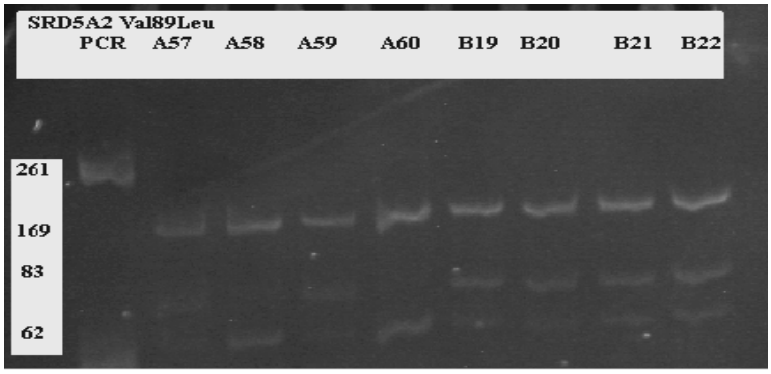
Şekil 4.58. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B14, A38, B15, A39, A40, A40.1, B16, A41, A42 ve A42.1 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



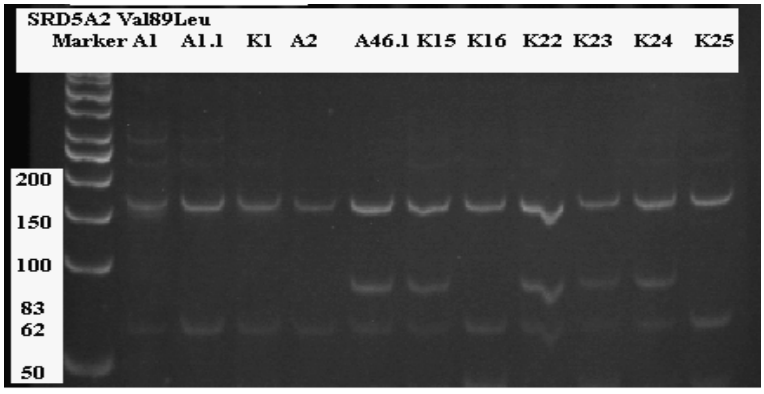
Şekil 4.59. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A43.1, A44, A45, A45.1, A46, A47 ve A48 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



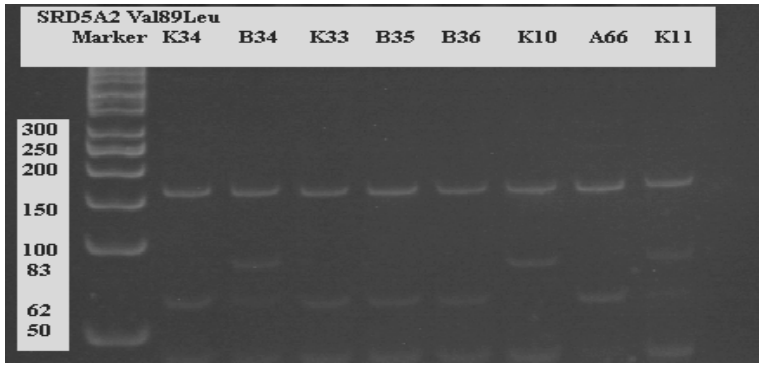
Şekil 4.60. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A49, A50, A51, A52, A53, A54, A55, K35, B17, A56 ve B18 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



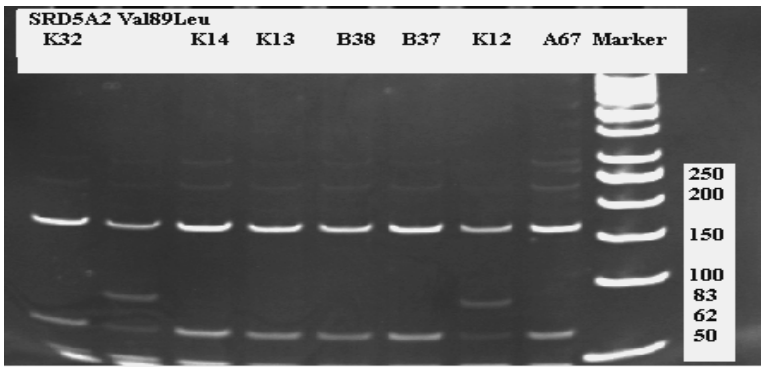
Şekil 4.61. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A57, A58, A59, A60, B19, B20, B21 ve B22 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



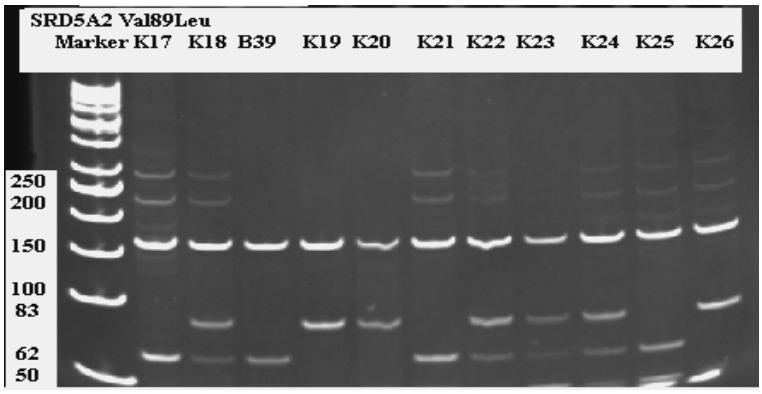
Şekil 4.62. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A1, A1.1, K1, A2, A46.1, K15, K16, K22, K23, K24 ve K25 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



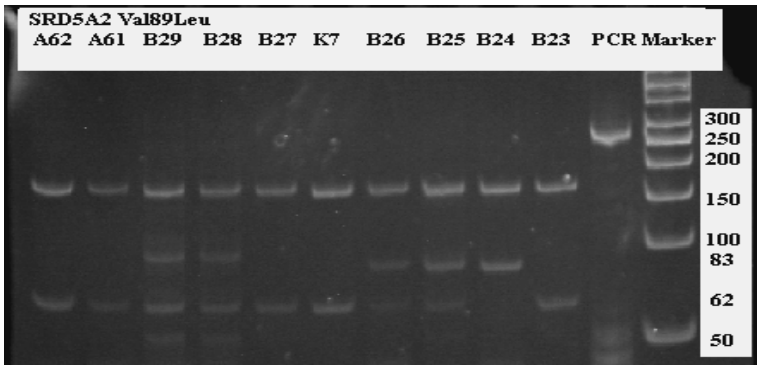
Şekil 4.63. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; K34, B34, K33, B35, B36, K10, A66 ve K11 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



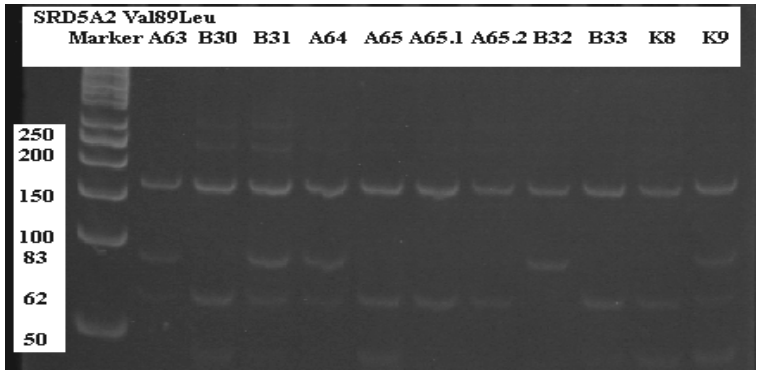
Şekil 4.64. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A67, K12, B37, B38, K13, K14 ve K32 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



Şekil 4.65. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; K17, K18, B39, K20, K21, K22, K23, K24, K25 ve K26 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



Şekil 4.66. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; B23, B24, B25, B26, K7, B27, B28, B29, A61 ve A62 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)



Şekil 4.67. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; A63, B30, B31, A64, A65, A65.1, A65.2, B32, B33, K8 ve K9 numaralı örneklerin PAGE görüntüsü (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası, K: Kontrol)

Patoloji sonuçları adenokarsinom olan hastaların ELAC2 geni (Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri) ve SRD5A2 geni (Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri) polimorfik genotipleri Çizelge 4.1'de, patoloji sonuçları BPH olan hastaların ELAC2 geni (Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri) ve SRD5A2 geni (Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri) polimorfik genotipleri Çizelge 4.2'de, kontrol grubunun ELAC2 geni (Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri) ve SRD5A2 geni (Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri) polimorfik genotipleri ise Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. Adenokarsinom prostat kanserlerinin ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili

Hasta No	Adenokarsinom (AK)	ELAC2 Ser217Leu	ELAC2 Ala541Thr	SRD5A2 Ala49Thr	SRD5A2 Val89Leu
A1	AK	SS	AA	AT	LL
A2	AK	SL	AA	AT	LL
A3	AK	SS	AA	AT	VL
A4	AK	SL	AT	AA	LL
A5	AK	SL	AA	AA	VL
A6	AK+Metastaz	SL	AA	AA	VV
A7	AK	SL	AA	AT	VL
A8	AK	LL	AA	AT	LL
A9	AK	SL	AA	AT	LL
A10	AK	SS	AA		
A11	AK	SL	AA	AA	VV
A12	AK	SS	AA	AT	VL
A12	AK	SS	AT		LL
A14	AK	SL	AA		VL
A15	AK	SL	AA	AT	LL
A16	AK	LL	AA	AA	VL
A17	AK+Metastaz	SS	AT	AA	LL
A18	AK	SL	AA	AT	VL
A19	AK	SS	AA	AA	LL
A20	AK	LL	AA	AT	LL
A21	AK	SL	AA	AA	VL
A22	AK+Metastaz	LL	AA	AA	VL
A23	AK	SL	AA	AT	LL
A24	AK	LL	AA	AT	LL
A25	AK+Metastaz	SL	AA	AA	LL
A26	AK	SL	AA	AA	LL
A27	AK	SL	AA	AA	LL
A28	AK	LL	AA	AA	LL
A29	AK+Metastaz	SL	AA	AA	VL
A30	AK	SL	AA	AA	LL
A31	AK	SS	AA	AT	VL
A32	AK	SL	AA	AT	VL
A33	AK	LL	AA	AT	VL
A34	AK	SL	AA	AT	LL
A35	AK	SL	AT	AT	LL
A36	AK	SL	AA	AA	VV
A37	AK	SL	AA	AA	VL
A38	AK	SS	AA	AA	LL
A39	AK	SL	AT	AT	VV
A40	AK	SL	AA	AA	LL
A41	AK +Metastaz	SS	AA	AA	VL
A42	AK	SS	AA	AA	VL
A43	AK	LL	AA	AA	VL
A44	AK	LL	AA	AA	LL
A45	AK	SS	AA	AA	LL
A46	AK	LL	AA	AA	VL
A47	AK	LL	AT	AT	VL

A48	AK+Metastaz	LL	AA	AA	LL
A49	AK	LL	AA	AA	VL
A50	AK+Metastaz	SS	AA	AA	VL
A51	AK	SS	AA	AA	LL
A52	AK	LL	AA	AA	LL
A53	AK	LL	AA	AA	VL
A54	AK+Metastaz	SL	AA	AA	VL
A55	AK	SS	AA	AA	VV
A56	AK	SL	AA	AA	LL
A57	AK	SS	AA	AA	VV
A58	AK	SL	AT	AT	LL
A59	AK+Metastaz	LL	AA	AA	VL
A60	AK	SL	AT	AT	LL
A61	AK	SS	AA	AA	LL
A62	AK	SS	AA	AA	LL
A63	AK	SS	AA	AA	VL
A64	AK	SS	AA	AT	VL
A65	AK+Metastaz	SS	AA	AA	LL
A66	AK	SL	AT	AT	LL
A67	AK	SL	AA	AA	LL

Çizelge 4.2. BPH hastalarının ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili

Hasta No	BPH	ELAC2	ELAC2	SRD5A2	SRD5A2
		Ser217Leu	Ala541Thr	Ala49Thr	Val89Leu
B1	BPH	SS	AA	AA	VL
B2	BPH	SS	AA	AA	VV
B3	BPH	SS	AA	AA	LL
B4	BPH	SS	AA	AT	LL
B5	BPH	LL	AA		
B6	BPH	SS	AA	AT	LL
B7	BPH	SL	AA	AA	LL
B8	BPH	LL	AA		LL
B9	BPH	SL	AA	AT	LL
B10	BPH	SL	AA	AA	LL
B11	BPH	SS	AA	AA	LL
B12	BPH	SL	AA	AT	LL
B13	BPH	SL	AA	AA	VL
B14	BPH	SS	AA	AA	LL
B15	BPH	SL	AT	AT	VL
B16	BPH	SL	AT	AT	LL
B17	BPH	SL	AT	AT	LL
B18	BPH	SL	AA	AA	VL
B19	BPH	SL	AA	AT	VL
B20	BPH	SL	AA	AT	VL
B21	BPH	SS	AA	AT	VL
B22	BPH	SS	AA	AT	VL
B23	BPH	SL	AA	AT	LL
B24	BPH	SS	AA	AT	VV
B25	BPH	SS	AA	AA	VL
B26	BPH	SS	AA	AA	VL
B27	BPH	SL	AA	AA	LL
B28	BPH	SL	AA	AT	VL
B29	BPH	SL	AT	AT	VL
B30	BPH	SL	AA	AA	VV
B31	BPH	SL	AA	AA	VL
B32	BPH	SS	AA	AA	VV
B33	BPH	SL	AA	AA	LL
B34	BPH	SS	AA	AA	LL
B35	BPH	SL	AA	AT	LL
B36	BPH	SL	AA	AA	LL
B37	BPH	SL	AA	AT	LL
B38	BPH	SS	AA	AA	LL
B39	BPH	SL	AA	AA	LL

Çizelge 4.3. Sağlıklı kontrol bireylerin ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili

Hasta No	KONTROL	ELAC2	ELAC2	SRD5A2	SRD5A2
		Ser217Leu	Ala541Thr	Ala49Thr	Val89Leu
K1	Kontrol	SS	AA	AA	LL
K2	Kontrol	SL	AT		
K3	Kontrol	SS	AA	AT	VL
K4	Kontrol	SS	AA	AT	VL
K5	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K6	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K7	Kontrol	SS	AA	AA	LL
K8	Kontrol	SS	AA	AA	LL
K9	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K10	Kontrol	SS	AA	AA	VV
K11	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K12	Kontrol	SL	AA	AA	VL
K13	Kontrol	SL	AA	AA	LL
K14	Kontrol	SS	AA	AT	LL
K15	Kontrol	SS	AA	AT	VL
K16	Kontrol	SS	AA	AA	LL
K17	Kontrol	SS	AA	AA	LL
K18	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K19	Kontrol	SS	AA	AA	VV
K20	Kontrol	SL	AA	AA	VV
K21	Kontrol	SL	AA	AA	LL
K22	Kontrol	SL	AT	AA	VL
K23	Kontrol	SL	AA	AA	VL
K24	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K25	Kontrol	LL	AT	AA	LL
K26	Kontrol	SS	AA	AA	VV
K27	Kontrol	LL	AT	AA	VL
K28	Kontrol	SL	AA	AA	LL
K29	Kontrol	SL	AA	AA	LL
K30	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K31	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K32	Kontrol	SS	AA	AA	LL
K33	Kontrol	SS	AA	AA	VL
K34	Kontrol	SS	AA	AA	LL

Hasta grubunun bir kısmının akrabaları da çalışmaya dahil edilmiştir. Bazı hastaların oğul ya da oğulları, bazı hastaların da kardeşleri araştırmamıza katılmıştır. Bu çalışma grubunun ELAC2 geni (Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri) ve SRD5A2 geni (Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri) polimorfik genotipleri Çizelge 4. 4'te verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü, akrabalar birbirine en az bir allel bakımından benzerlik göstermektedir.

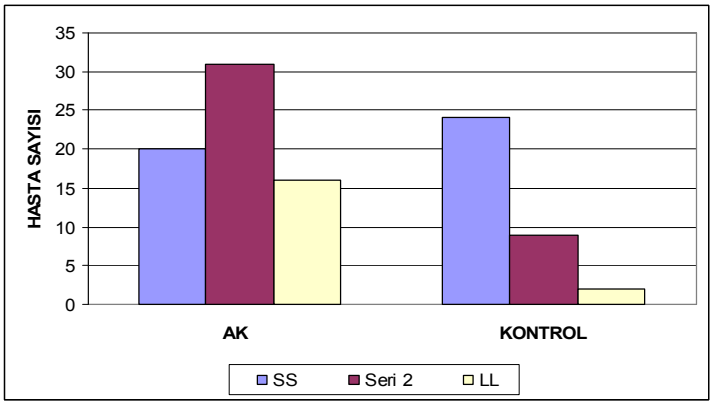
Çizelge 4.4. Hastaların ve akrabalarının ELAC2; Ser217Leu ve Ala541Thr ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu profili (A: Adenokarsinom hastası, B: BPH hastası)

Hasta No	Patoloji	ELAC2	ELAC2	SRD5A2	SRD5A2
		Ser217Leu	Ala541Thr	Ala49Thr	Val89Leu
A1	AK	SS	AA	AT	LL
A1.1		SS	AA	AA	LL
A2	AK	SL	AA	AT	LL
A2.1		LL	AA	AT	LL
B1	BPH	SS	AA	AA	VL
B1.1	BPH	SS	AA	AA	VV
A4	AK	SL	AT	AA	LL
A4.1		SS	AA	AA	VL
A8	AK	LL	AA	AT	LL
A8.1	AK	SL	AA	AT	LL
A13	AK	SS	AT		LL
A13.1		SL	AA		LL
A19	AK	LL	AA	AT	LL
A19.1		LL	AA	AA	LL
A22	AK+Metastaz	LL	AA	AA	VL
A22.1	BPH	LL	AA		LL
A24	AK	LL	AA	AT	LL
A24.1		SL	AA	AA	LL
A26	AK	SL	AA	AA	LL
A26.1		SL	AA	AA	VL
A28	AK	LL	AA	AA	LL
A28.1	BPH	SL	AA	AA	LL
A31	AK	SS	AA	AT	VL
A31.1		SS	AA	AT	VL
A35	AK	SL	AT	AT	LL
A35.1		LL	AT	AT	VL
B13	BPH	SL	AA	AA	VL
B13.1		SL	AA	AA	VL
A36	AK	SL	AA	AA	VV
A36.1		SL	AA	AA	VL
B15	BPH	SL	AT	AT	VL
B15.1	BPH	SL	AT	AT	LL
A40	AK	SL	AA	AA	LL
A401		LL	AA	AA	VL
A42	AK	SS	AA	AA	VL
A42.1		SS	AA	AA	LL
A43	AK	LL	AA	AA	VL
A43.1		SL	AA	AA	LL
A45	AK	SS	AA	AA	LL
A45.1		SS	AA	AA	LL
A46	AK	LL	AA	AA	VL
A46.1		LL	AA	AA	VL
A65	AK+Metastaz	SS	AA	AA	LL
A65.1		SS	AA	AA	LL
A65.2		SL	AA	AA	LL

Çalışmamızda, ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; Adenokarsinom olan prostat kanseri hasta grubunun 20'si Ser/Ser genotipli (%29,9), 31'i Ser/Leu genotipli (%46,3), 16'sı Leu/Leu genotipli (%23,9); kontrol grubunun ise 24'ü Ser/Ser genotipli (%68,6), 9'u Ser/Leu genotipli (%25,7), 2'si ise Leu/Leu genotiplidir (%5,7). ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin genotipleri ile adenokarsinom olan prostat kanseri hastalığı arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmuştur (p=0,001<0,05) (Çizelge 4.5, Şekil 4.68).

Çizelge 4.5. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	ELAC2			Toplam
	S/S	S/L	L/L	
Adenokarsinom	20 %29,9	31 %46,3	16 %23,9	67 %100
Kontrol	24 %68,6	9 %25,7	2 %5,7	35 %100
p değeri	0.001<0,05			

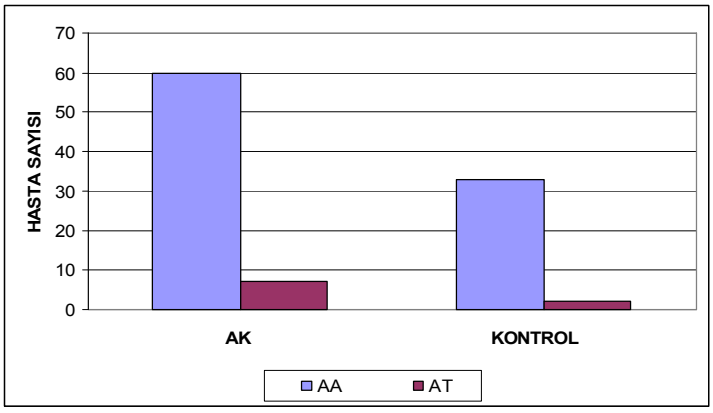


Şekil 4.68. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; Adenokarsinom olan prostat kanseri hasta grubunun 60'ı Ala/Ala genotipli (%89,6), 7'si Ala/Thr genotipli (%10,4); kontrol grubunun ise 33'ü Ala/Ala genotipli (%94,3), 2'si ise Ala/Thr genotiplidir (%5,7). ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin genotipleri ile adenokarsinom olan prostat kanseri hastalığı arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmamıştır (p=0,424>0,05) (Çizelge 4.6, Şekil 4.69).

Çizelge 4.6. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	ELAC2		Toplam
	A/A	A/T	
Adenokarsinom	60 %89,6	7 %10,4	67 %100
Kontrol	33 %94,3	2 %5,7	35 %100
p değeri	0,424>0,05		

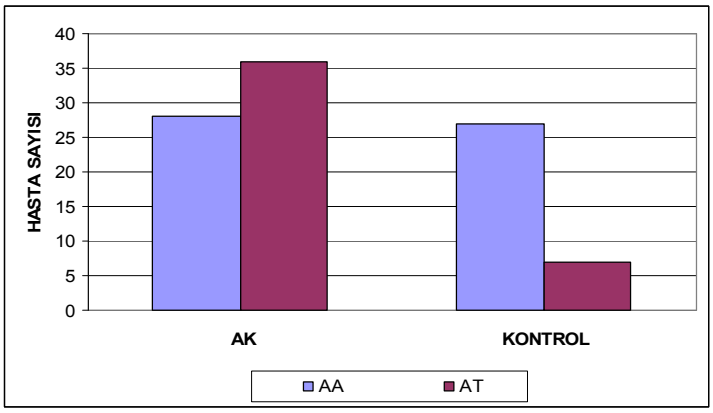


Şekil 4.69. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; Adenokarsinom olan prostat kanseri hasta grubunun 28'i Ala/Ala genotipli (%43,8), 36'sı Ala/Thr genotipli (%56,3); kontrol grubunun ise 27'si Ala/Ala genotipli (%79,4), 7'si ise Ala/Thr genotiplidir (%20,6). SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin genotipleri ile adenokarsinom olan prostat kanseri hastalığı arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmuştur (p=0,001<0,05) (Çizelge 4.7, Şekil 4.70).

Çizelge 4.7. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	SRD5A2		Toplam
	A/A	A/T	
Adenokarsinom	28 %43,8	36 %56,3	64 %100
Kontrol	27 %79,4	7 %20,6	34 %100
p değeri	0,001<0,05		

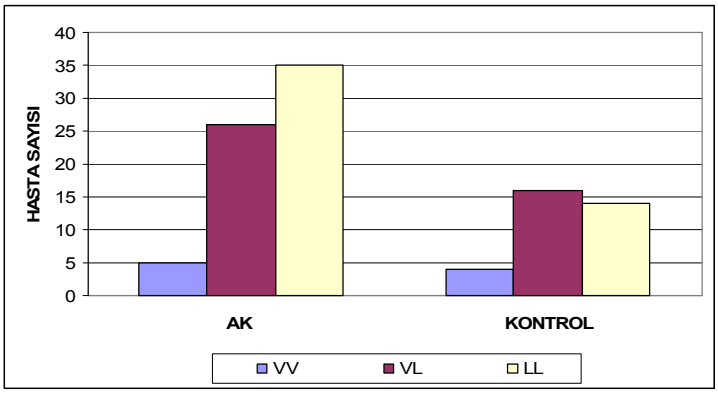


Şekil 4.70. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Dördüncü olarak; SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; Adenokarsinom olan prostat kanseri hasta grubunun 5'i Val/Val genotipli (%7,6), 26'sı Val/Leu genotipli (%39,4), 35'i Leu/Leu genotipli (%53); kontrol grubunun ise 4'ü Val/Val genotipli (%11,8), 16'sı Val/Leu genotipli (%47,1), 14'ü ise Leu/Leu genotiplidir (%41,2). SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin genotipleri ile adenokarsinom olan prostat kanseri hastalığı arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmamıştır (p=0,498>0,05) (Çizelge 4.8, Şekil 4.71).

Çizelge 4.8. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	SRD5A2			Toplam
	V/V	V/L	L/L	
Adenokarsinom	5 %7,6	26 %39,4	35 %53	66 %100
Kontrol	4 %11,8	16 %47,1	14 %41,2	34 %100
p değeri	0,498>0,05			

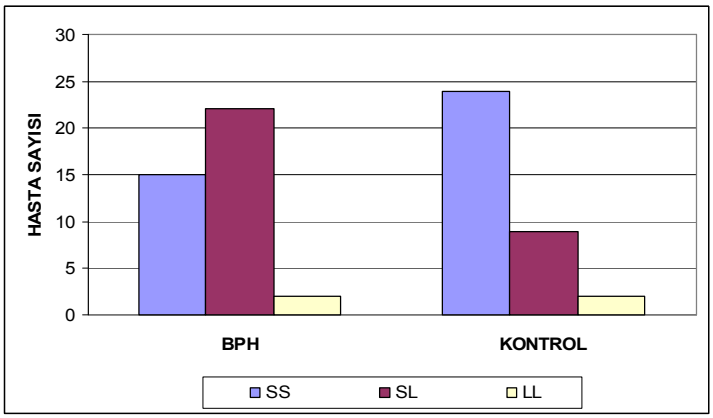


Şekil 4.71. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin adenokarsinom hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Çalışmamızda aynı polimorfizmleri bening prostat hiperplazisi hastaları için de değerlendirdik. Buna göre ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; bening prostat hiperplazisi olan hasta grubunun 15'i Ser/Ser genotipli (%38,5), 22'si Ser/Leu genotipli (%56,4), 2'si Leu/Leu genotipli (%5,1); kontrol grubunun ise 24'ü Ser/Ser genotipli (%68,6), 9'u Ser/Leu genotipli (%25,7), 2'si ise Leu/Leu genotiplidir (%5,7). ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin genotipleri ile BPH hastalığı arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmuştur (p=0,026<0,05) (Çizelge 4.9, Şekil 4.72).

Çizelge 4.9. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	ELAC2			Toplam
	S/S	S/L	L/L	
BPH	15 %38,5	22 %56,4	2 %5,1	39 %100
Kontrol	24 %68,6	9 %25,7	2 %5,7	35 %100
p değeri	0.026<0,05			

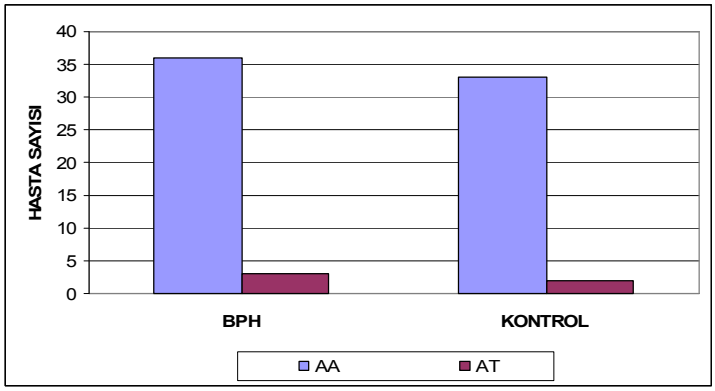


Şekil 4.72. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; bening prostat hiperplazisi olan hasta grubunun 36'sı Ala/Ala genotipli (%92,3), 3'ü Ala/Thr genotipli (%7,7); kontrol grubunun ise 33'ü Ala/Ala genotipli (%94,3), 2'si Ala/Thr genotiplidir (%5,7). ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin genotipleri ile BPH arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmamıştır (p=0,735>0,05) (Çizelge 4.10, Şekil 4.73).

Çizelge 4.10. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	ELAC2		Toplam
	AA	AT	
BPH	36 %92,3	3 %7,7	39 %100
Kontrol	33 %94,3	2 %5,7	35 %100
p değeri	0,735>0,05		

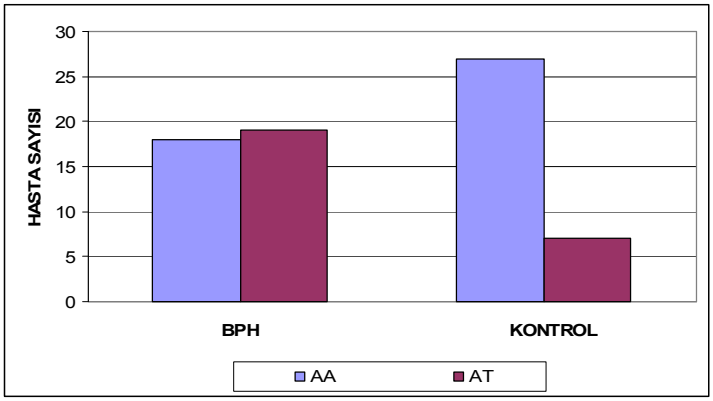


Şekil 4.73. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; bening prostat hiperplazisi olan hasta grubunun 18'i Ala/Ala genotipli (%48,6), 19'u Ala/Thr genotipli (%51,4); kontrol grubunun ise 27'si Ala/Ala genotipli (%79,4), 7'si ise Ala/Thr genotiplidir (%20,6). SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin genotipleri ile BPH hastalığı arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmuştur (p=0,007<0,05) (Çizelge 4.11 Şekil 4.74).

Çizelge 4.11. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	SRD5A2		Toplam
	AA	AT	
BPH	18 %48,6	19 %51,4	37 %100
Kontrol	27 %79,4	7 %20,6	34 %100
p değeri	0,007<0,05		

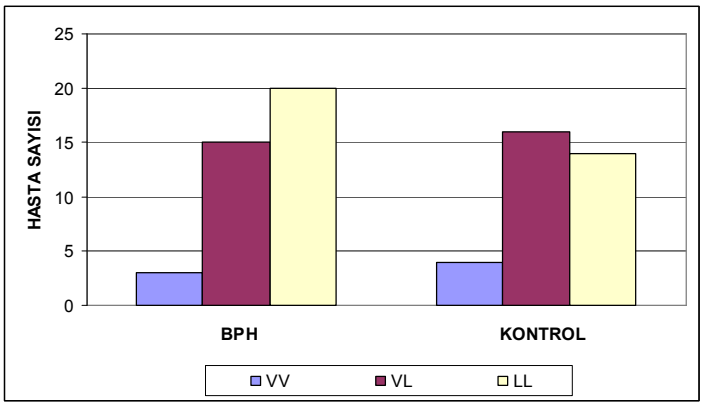


Şekil 4.74. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; bening prostat hiperplazisi olan hasta grubunun 3'ü Val/Val genotipli (%7,9), 15'i Val/Leu genotipli (%39,5), 20'si Leu/Leu genotipli (%52,6); kontrol grubunun ise 4'ü Val/Val genotipli (%11,8), 16'sı Val/Leu genotipli (%47,1), 14'ü ise Leu/Leu genotiplidir (%41,2). SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin genotipleri ile BPH hastalığı arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmamıştır (p=0,602>0,05) (Çizelge 4.12, Şekil 4.75).

Çizelge 4.12. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	SRD5A2			Toplam
	VV	VL	LL	
BPH	3 %7,9	15 %39,5	20 %52,6	38 %100
Kontrol	4 %11,8	16 %47,1	14 %41,2	34 %100
p değeri	0,602>0,05			

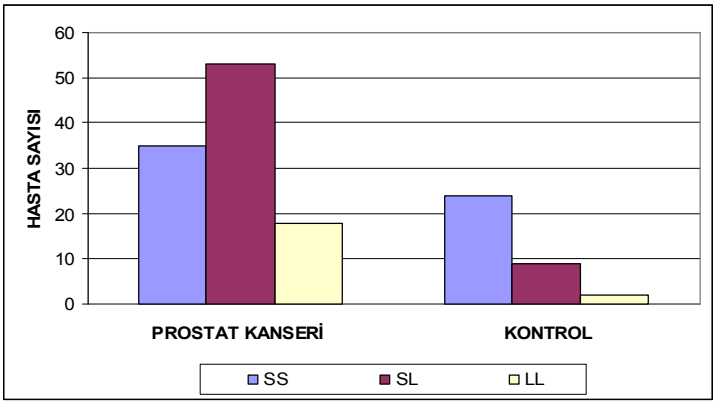


Şekil 4.75. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin BPH hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Çalışmamızda ayrıca, tüm prostat kanserleri (Adenokarsinom+BPH) aynı polimorfizm parametreleri ile değerlendirmeye alınmıştır. Buna göre ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi için; prostat kanseri hasta grubunun 35'i Ser/Ser genotipli (%33), 53'ü Ser/Leu genotipli (%50), 18'i Leu/Leu genotipli (%17); kontrol grubunun ise 24'ü Ser/Ser genotipli (%68,6), 9'u Ser/Leu genotipli (%25,7), 2'si ise Leu/Leu genotiplidir (%5,7). ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin genotipleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmuştur (p=0,001<0,05) (Çizelge 4.13, Şekil 4.76).

Çizelge 4.13. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	ELAC2			Toplam
	SS	SL	LL	
Prostat Kanseri	35 %33	53 %50	18 %17	106 %100
Kontrol	24 %68,6	9 %25,7	2 %5,7	35 %100
p değeri	0.001<0,05			

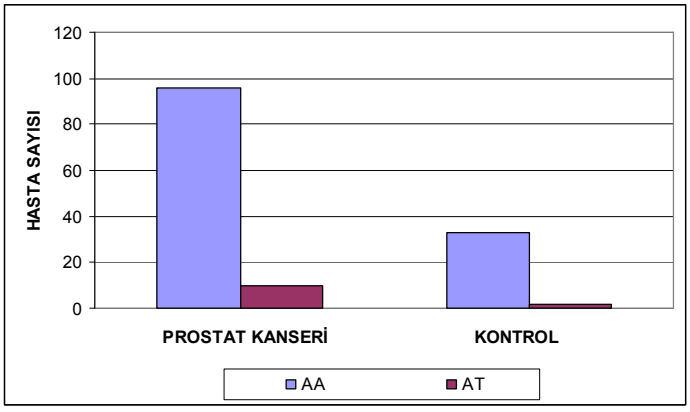


Şekil 4.76. ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi için; prostat kanseri olan hasta grubunun 96'sı Ala/Ala genotipli (%90,6), 10'u Ala/Thr genotipli (%9,4); kontrol grubunun ise 33'ü Ala/Ala genotipli (%94,3), 2'si Ala/Thr genotiplidir (%5,7). ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin genotipleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmamıştır (p=0,494>0,05) (Çizelge 4.14, Şekil 4.77).

Çizelge 4.14. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	ELAC2		Toplam
	AA	AT	
Prostat Kanseri	96 %90,6	10 %9,4	106 %100
Kontrol	33 %94,3	2 %5,7	35 %100
p değeri	0,494>0,05		

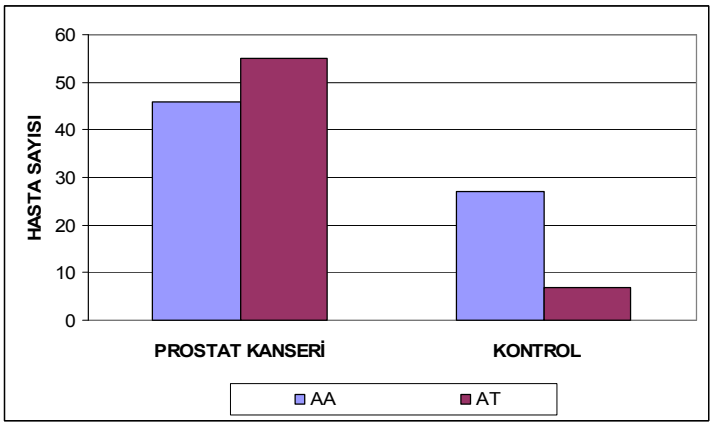


Şekil 4.77. ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi için; prostat kanseri olan hasta grubunun 46'sı Ala/Ala genotipli (%45,5), 55'i Ala/Thr genotipli (%54,5); kontrol grubunun ise 27'si Ala/Ala genotipli (%79,4), 7'si ise Ala/Thr genotiplidir (%20,6). SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin genotipleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmuştur (p=0,001<0,05) (Çizelge 4.15, Şekil 4.78).

Çizelge 4.15. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	SRD5A2		Toplam
	AA	AT	
Prostat Kanseri	46 %45,5	55 %54,5	101 %100
Kontrol	27 %79,4	7 %20,6	34 %100
p değeri	0,001<0,05		

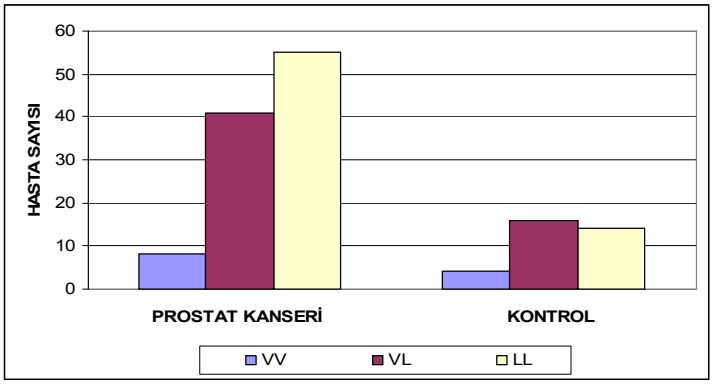


Şekil 4.78. SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi için; prostat kanseri olan hasta grubunun 8'i Val/Val genotipli (%7,7), 41'i Val/Leu genotipli (%39,4), 55'i Leu/Leu genotipli (%52,9); kontrol grubunun ise 4'ü Val/Val genotipli (%11,8), 16'sı Val/Leu genotipli (%47,1), 14'ü ise Leu/Leu genotiplidir (%41,2). SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin genotipleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki Ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve istatistiki fark anlamlı bulunmamıştır (p=0,460>0,05) (Çizelge 4.16, Şekil 4.79).

Çizelge 4.16. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Gruplar	SRD5A2			Toplam
	VV	VL	LL	
Prostat Kanseri	8 %7,7	41 %39,4	55 %52,9	104 %100
Kontrol	4 %11,8	16 %47,1	14 %41,2	34 %100
p değeri	0,460>0,05			



Şekil 4.79. SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizminin prostat kanseri hastaları ve kontrol grubu içindeki dağılımı

Hastaların Çukurova Üniversitesi Hastanesine geldiklerinde adlarına oluşturulan dosyalarından alınan PSA değerleri normal (<4ng/µl) ve normalin üstü olarak gruplandırılmış ve ELAC2 Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmleri ile SRD5A2 Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri ile değerlendirilmiştir. Buna göre istatistiksel olarak değerler sırası ile şöyle bulunmuştur; ELAC2 Ser217Leu polimorfizmi için p değeri=0,418>0,05, ELAC2 Ala541Thr polimorfizmi için p değeri=0,023<0,05, SRD5A2 Ala49Thr polimorfizmi için p değeri=0,002<0,05, SRD5A2 Val89Leu polimorfizmi için p değeri=0,723>0,05 (Çizelge 4.17-4.20). Bu verilere göre, PSA grupları ile ELAC2 Ser217Leu polimorfizmi ve SRD5A2 Val89Leu polimorfizmi arasındaki ilişki istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. PSA grupları ile ELAC2 Ala541Thr polimorfizmi ve SRD5A2 Ala49Thr polimorfizmi arasındaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.17. PSA gruplarının ELAC2 Ser217Leu polimorfizmi üzerindeki dağılımı

PSA ng/µl	ELAC2 Ser217Leu			Toplam
	SS	SL	LL	
Normal	17 %47,2	15 %41,7	4 %11,1	36 %100
Yüksek	24 %34,8	33 %47,8	12 %17,4	69 %100
p değeri	0,418>0,05			

Çizelge 4.18. PSA gruplarının ELAC2 Ala541Thr polimorfizmi üzerindeki dağılımı

PSA ng/µl	ELAC2 Ala541Thr		Toplam
	AA	AT	
Normal	36 %100	0 %0	36 %100
Yüksek	60 %87	9 %13	69 %100
p değeri	0,023<0,05		

Çizelge 4.19. PSA gruplarının SRD5A2 Ala49Thr polimorfizmi üzerindeki dağılımı

PSA ng/µl	SRD5A2 Ala49Thr		Toplam
	AA	AT	
Normal	26 %74,3	9 %25,7	35 %100
Yüksek	28 %42,4	38 %57,6	66 %100
p değeri	0,002<0,05		

Çizelge 4.20. PSA gruplarının SRD5A2 Val89Leu polimorfizmi üzerindeki dağılımı

PSA ng/µl	SRD5A2 Val89Leu			Toplam
	VV	VL	LL	
Normal	4 %11,1	13 %36,1	19 %52,8	36 %100
Yüksek	6 %8,8	30 %44,1	32 %47,1	68 %100
p değeri	0,723>0,05			

Çalışmamızda son olarak, hastaların PSA değeri ile patoloji sonucu adenokarsinom olan prostat kanserleri, BPH hastaları ve tüm prostat kanserleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Buna göre; PSA değeri ile adenokarsinom arasındaki ilişki; PSA değeri ile BPH arasındaki ilişki ve PSA değeri ile tüm prostat kanserleri (adenokarsinom+BPH) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,000<0,05$) (Çizelge 4.21-4.23, Şekil 4.80).

Çizelge 4.21. PSA grupları ile adenokarsinom prostat kanseri ve kontrol grupları arasındaki ilişki

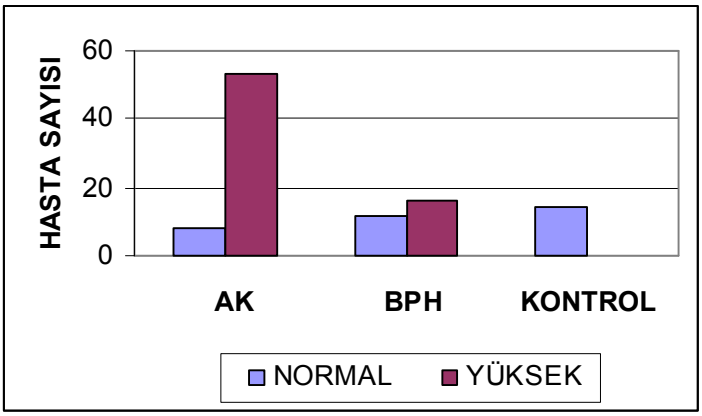
Hasta Grupları	PSA (ng/µl)		Toplam
	Normal	Yüksek	
Adenokarsinom	8 %13,1	53 %86,9	61 %100
Kontrol	14 %100	0 %0	14 %100
p değeri	0,000<0,05		

Çizelge 4.22. PSA grupları ile BPH hastaları ve kontrol grupları arasındaki ilişki

Hasta Grupları	PSA (ng/µl)		Toplam
	Normal	Yüksek	
BPH	12 %42,9	16 %57,1	28 %100
Kontrol	14 %100	0 %0	14 %100
p değeri	0,000<0,05		

Çizelge 4.23. PSA grupları ile prostat kanseri ve kontrol grupları arasındaki ilişki

Hasta Grupları	PSA (ng/µl)		Toplam
	Normal	Yüksek	
Prostat Kanseri	20 %22,5	69 %77,5	89 %100
Kontrol	14 %100	0 %0	14 %100
p değeri	0,000<0,05		



Şekil 4.80. PSA değerleri ile hasta grupları arasındaki ilişki

4.2. Tartışma

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin malign büyümesi olarak tanımlanabilir. Prostat kanserleri prostat açiner hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlar olup, tüm kanserlerin %32'sini oluşturur. Prostat kanseri bir yaşlılık hastalığı olup 40 yaş altı erkeklerde nadiren oluşur. İnsidansı 40 yaşlarından 80'li yaşlara doğru giderek artar. Prostat kanseri hastalığına neden olan epidemiyolojik faktörler, hormonal faktörler, diyet, çevresel faktörler ve genetik faktörler olarak sıralanabilir.

Prostat kanserine neden olduğu düşünülen pek çok gen vardır. Bunlar ELAC2 geni, 5α-redüktaz tip II (SRD5A2) geni, HPC1, PCAP ve CAPB genleri, HPCX, AR geni, PSA geni vb. genler sayılabilir. Kalıtsal prostat kanseri için aday gösterilen genlerden biri olan HPC2/ELAC2 geninin ürünü ve fonksiyonları henüz tamamen aydınlatılmamıştır. Bu genin şifrelediği protein metal bağımlı hidrolaz enzimidir ve evrim sırasında korunmuş bir proteindir. Enzimin molekül kütlesinin 85 kDa olduğu ve 826 amino asitten oluştuğu bildirilmiştir. ELAC2 geni 24 ekzondan meydana gelip 25.1 kb büyüklüğündedir. (Takaku ve ark., 2003). ELAC2 geninde 2 missense mutasyon vardır. Bunlar; 217. amino asit olan serinin lösine dönüştüğü (Ser217Leu) ve 541. amino asit olan alaninin treonine dönüştüğü (Ala541Thr) polimorfizmlerdir. Ser217Leu varyantı 7. ekzondaki 650. C nükleotidinin T'ye dönüşümü (C650T) sonucu oluşur. Burada; TCG kodonu TTG'ye dönüşerek serin aminoasitinin yerini leusinin almasına neden olur. Burada serin aminoasiti polar ve suyu seven bir yapıda iken, leusin aminoasiti tam tersi bir şekilde nonpolar ve hidrofobik bir yapıdadır. Ala541Thr varyantı 17. ekzonda olup 1621. nükleotid olan G'nin A'ya (G1621A) dönüşümü sonucu meydana gelir. Burada ise GCA kodonu ACA'ya dönüşerek alanin aminoasiti yerine treonini kodlar. Alanin aminoasiti nonpolar ve hidrofobik yapıda iken, threonin aminoasiti tam tersi bir şekilde polar ve hidrofiliktir (Wang ve ark., 2001; Pollard ve Earnshaw, 2004). Oluşan bu değişiklikler neticesinde proteinlerin üç boyutlu yapıları bozularak etkisiz hale yada daha az etkili hale gelmişlerdir.

Stanford ve arkadaşları (2003), ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi ve Ala541Thr polimorfizmini Kafkas ve Afrikalı Amerikalı bir grup üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada, prostat kanserli hastaların %32'si Leu alleli, kontrollerin de %29'u Leu alleli taşıdığı tespit edilmiştir. Thr alleli homozigot olarak bulunmamıştır. Çalışma sonucunda, Ala/Ala genotipi ve Leu/Leu genotipinin aynı anda taşınması durumunda, prostat kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir (OR=1.84) (Stanford ve ark., 2003). Bizim çalışmamız ve Stanford ve arkadaşlarının çalışmasının değerlendirdiği etnik gruplar ve genotip frekansları benzerlik göstermemektedir. Fakat bizim yaptığımız çalışmada da Ser217Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p=0,001<0.05$). Ayrıca her iki çalışmada da Ala541Thr polimorfizminin prostat kanseri ile ilişkisi istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Stanford ve arkadaşlarının çalışmasında ilave olarak farklı genotiplerdeki bireyler arasında hastalığın şiddetinin de değiştiğini bildirmişlerdir. Leu allelini heterozigot Ser/Leu olarak taşıyan erkek hastalarda, hastalığın şiddetinin azaldığını tespit etmişlerdir (Stanford ve ark., 2003). Bizim yaptığımız çalışmada, hastalığın şiddeti ile ilgili olarak herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır, fakat Ser/Ser genotipinin kontrol grubunda yüksek, Ser/Leu genotipinin ise adenokarsinom ve BPH hastalarında yüksek olduğu gözlenmiştir. Burada hasta grubunda saptanan Ser/Ser genotipinin kontrol grubuna göre düşük olması kanser hastalığı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Rebbeck ve arkadaşları (2000); Ser217Leu polimorfizmi ve Ala541Thr polimorfizmi ile ilgili Amerika'da bir çalışma yapmışlardır. Buna göre etnik kökeni ve yaşı eşleştirilmiş 300 prostat kanseri ve 250 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan değerlendirmelerde, Ser217Leu polimorfizmi için; Ser/Ser genotipi %48, Ser/Leu genotipi %46.3 ve Leu/Leu genotipi %5.7 oranlarında tespit edilmiştir. Kontrollerdeki varyantların dağılım durumu ise Ser/Ser genotipi %47.2, Ser/Leu genotipi %44.4 ve Leu/Leu genotipi %9.2 bulunmuştur (Rebbeck ve ark., 2000). Yapılan bu çalışmada bulunan sonuçlar yüzde oranları açısından, bizim sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir. Rebbeck ve arkadaşları (2002); sadece beyaz ırktan oluşan 290 prostat kanseri ve 240 sağlıklı kontrol üzerinde de bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, Ala541Thr polimorfizmi için, Ala/Ala genotipi %92.5,

Ala/Thr ve Thr/Thr genotipi birlikte %7.5 ve kontrollerde Ala/Ala genotipi %96.6, Ala/Thr ve Thr/Thr genotipi birlikte %3.4 tespit edilmiştir (Rebbeck ve ark., 2002). Bizim bulgularımıza göre ise, Ser217Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişki anlamlı (p=0,001), Ala541Thr polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişki ise anlamsız bulunmuştur (p=0,494).

Amerika'da yapılan bir diğer çalışmada; 446 prostat kanseri hastası ve 502 sağlıklı kontrol değerlendirmeye alınmıştır. HPC2/ELAC2 genindeki Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmlerine bakılan çalışmada, Leu217 varyantı prostat kanserli hastalarda %32.3, kontrollerde ise %31.8 oranında gözlenmiştir. Thr541 varyantı da hastalarda %5.4, kontrol; %5.2 oranında gözlenmiştir. Burada her iki polimorfizmin prostat kanseri ile olan ilişkisi birlikte de değerlendirilmiş ve hem Leu hem de Thr allellerinin birlikte prostat kanseri riski ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2001). Bu çalışma grubu ile de sonuçlarımız Ala541Thr polimorfizmi için benzer olmakla birlikte Ser217Leu polimorfizmi için farklıdır. Bu farklılığın nedeni etnik kökendeki farlılık ya da çalışma grubu sayısının farklı olasından kaynaklanabilir. Ayrıca, seçilen hasta ve kontrol gruplarının hayat şartlarının ve çevre faktörlerinin farklı olmasından da kaynaklandığı söylenebilir.

HPC2/ELAC2 geni üzerindeki Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmler ile ilgili olarak Finlandiya populasyonunda; ailesinde prostat kanseri olan 107 prostat kanseri hastası, 467 sporadik prostat kanseri hastası ve 222 benign prostat hiperplazi hastası değerlendirilmiştir. Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmlerinin hem ailesel prostat kanseri ile hem de sporadik prostat kanseri ile ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Fakat, bening prostat hiperplazisi ile bu polimorfizmler arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Rökman ve ark., 2001). Rökman ve arkadaşlarının bu çalışmadaki prostat kanserli hasta ile ilgili olan sonuçları ile bizim prostat kanserli hastalar ile ilgili olan sonuçlarımız Ser217Leu polimorfizmi için benzer değildir. Fakat, Ala541Thr polimorfizmi için benzerdir. BPH hastaları ile yapılan çalışma bizim BPH hasta grubu ile yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermektedir.

İngiltere'de 432 prostat kanseri ve 469 sağlıklı kontrol ile yapılan çalışmada; HPC2/ELAC2 geninin Ala541Thr ve Ser217Leu varyantları analiz edilmiştir. Ser/Ser ve Ala/Ala homozigot varyantları ile Thr541 taşıyıcı olanlar

karşılaştırıldığında OR değeri 1.56 saptanmıştır. Varyantlar arasındaki kombinasyonlar değerlendirildiğinde ELAC2 varyantlarının prostat kanseri riskini azda olsa artırdığı tespit edilmiştir. Özellikle Thr541 allelinin kanser riskini 1.5 kez artırdığı belirtilmiştir (Meitz ve ark., 2002). İngiltere'de yapılan bu çalışmada Ser217Leu ile prostat kanseri arasındaki istatistiki ilişki bizim çalışmamız ile benzer bulunsa da Ala541Thr polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişki bizim çalışmamızdan farklı olarak anlamlı bulunmuştur.

257 prostat kanseri ve 355 kontrolün araştırıldığı bir çalışmada; Ala541Thr polimorfizmi için Thr allelinin hastalarda kontrollere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Suarez ve ark., 2001). Fakat bu fark bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiki olarak anlamlı değildir. Hastalığın şiddetinde de herhangi bir değişiklik oluşturmamaktadır.

Tavtigian ve arkadaşları; kalıtsal prostat kanseri taşıyan ailelerin erkeklerinin Leu ve Thr allellerini taşımalarının, hastalık riskini artırdığını bildirmişlerdir. Leu217/Thr541 allelleri yalnızca Leu allelini taşıma durumunda kanser riski daha fazladır. Özetle, populasyon tabanlı yapılan çalışmalarda homozigot Ala/Ala genotipli bireylerde homozigot Leu/Leu olması durumunun prostat kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir (Tavtigian ve ark., 2001).

Severi ve arkadaşları ise HPC2/ELAC2 genindeki Ser217Leu polimorfizmi ve Ala541Thr polimorfizmi ile ilgili olarak bir meta-analiz çalışması yapmış ve bu çalışmada toplam yedi farklı çalışma grubunun sonuçları karşılaştırılarak bir değerlendirme yapılmıştır. Bu meta-analizin dört grubunda, bu polimorfizmler ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamış fakat diğer üç grupta bahsedilen polimorfizmlerin hastalardaki PSA düzeyini etkilediği bildirilmiştir (Severi ve ark., 2003). Çalışma gruplarının yedisine birden bakıldığında, Leu217 homozigot varyantı diğer varyantlar ile karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve kontroller arasındaki ilişki çalışmamızdan farklı olarak anlamsız bulunmuştur (OR: 0.74). Ayrıca Thr 541 homozigot varyantı da diğer varyantlar ile karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve kontroller arasındaki ilişki bizim çalışmamızda da olduğu gibi anlamsız bulunmuştur (OR: 1.01) (Severi ve ark., 2003).

Androjenler, prostat gelişiminde önemli role sahip hormonlardır. Sıçanlar ile yapılan deneylerde birer androjen olan testesteron ve dihidrotestesteron metabolizmasında görülen bozuklukların prostat adenokarsinomunun oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Steroid 5α-redüktaz enzimi, membran üzerinde yer alan bir enzimdir ve testesteronu dihidrotestesterona geri dönüşümsüz olarak metabolize eder. Steroid 5α-redüktaz tip II enzimi; 254 aminoasitten meydana gelmiş olup, 28.398kDa moleküler ağırlıkta olan bir enzimdir. Bu enzimin sentezlendiği dokular; prostat, epididimis, seminal vezikül, genital deri, uterus, karaciğer, göğüs, saç folikülleri, plasenta ve beyindir. Steroid 5α-redüktaz tip I enziminin aksine nötral ya da asidik pH'da optimum aktivite göstermektedir ve prostattaki seviyesi yüksektir. Sorumlu olan gen SRD5A2 olarak isimlendirilmekte olup 5 ekzon ve 4 introndan meydana gelmektedir. Bu genin lokalize olduğu kromozom bölgesi 2. kromozomun kısa koludur (2p22-23). Gen büyüklüğü 56.4 kb olup, bu gende oluşan mutasyonlar neticesinde, steroid 5α-redüktaz enziminin aktivitesinde düşüş olduğu bildirilmiştir (Makridakis ve Reichardt, 2001; Zhu ve Sun, 2005). Ala49Thr polimorfizminde GTA kodonundaki G'nin A'ya dönüşümü neticesinde nonpolar hidrofobik bir aminoasit olan alanin yerine ATA'nın kodladığı polar ve hidrofilik bir aminoasit olan threonin meydana gelir. Val89Leu polimorfizminde ise GCT kodonundaki G'nin A'ya dönüşümü neticesinde, nonpolar hidrofobik bir aminoasit olan valin yerine ACT'nin kodladığı yine nonpolar ve hidrofobik olan leusin aminoasiti meydana gelir (Pollard ve Earnshaw, 2004).

Makridakis ve Reichardt (2001) tarafından Asyalı prostat kanseri hastalar ile yapılan çalışmada çalışmamız ile paralel olarak SRD5A2 geni üzerindeki Val89Leu polimorfizmi arasında istatistiki bir ilişki bulunmamıştır. Ala49Thr polimorfizminin ise prostat kanseri riskini 7.2 kez artırdığını bildirmişlerdir (Makridakis ve Reichardt, 2001). Çalışmamızda da Ala49Thr polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (p=0,001). Her iki polimorfizm için de çalışma grupları arasında etnik köken, genotip frekans ve çevre şartları bakımından fark olmasına rağmen istatistiksel sonuç bakımından benzer sonuçlar elde edilmiştir.

İspanyollar populasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada, Ala49Thr polimorfizminin prostat kanseri riskini 3.6 kez, steroid 5α-redüktaz aktivitesinin 5 kez arttığı tespit edilmiştir (Makridakis ve Reichardt, 2001).

Fransa populasyonu üzerinde de SRD5A2 genleri analiz edilmiştir. Yaşları ve etnik kökenleri eşleştirilmiş 226 prostat kanseri ve 156 kontrol üzerinde Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri araştırılmıştır. Çalışılan bu Fransız populasyonu için Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir. Populasyonda Thr alleli frekansı %96 bulunmuş olup, Ala49Thr polimorfizminde istatistiki olarak yetersiz bilgi olduğu belirtilmiştir (Latil ve ark., 2001). Çalışmamız Val89Leu polimorfizmi açısından Latil ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da Va89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişkinin anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (p=0,460).

Nam ve arkadaşları (2001), çalışmamızdan farklı olarak Val89Leu polimorfizminin prostat kanseri riskini artırdığını bildirmişlerdir. (Nam ve ark., 2001). Soderstrom ve arkadaşları (2002) ise yaptıkları çalışmada metastaz yapan hastaların Leu/Leu homozigot genotipinin prostat kanseri riskini 6.67 kez azalttığını bildirmişlerdir (Soderstrom ve ark., 2002).

Prostat kanseri insidansı düşük olan Çin populasyonunda yapılan bir çalışmada Ala49Thr ve Val89Leu varyantları, 191 prostat kanseri hastası ve 304 sağlıklı kontrol üzerinde değerlendirilmiştir. Populasyondaki bireylerin tamamının Ala/Ala genotipinde olduğu bildirilmiştir. Val/Val, Val/Leu, Leu/Leu genotiplerinin görülme frekansı ise, sırası ile %21, %45 ve %35 olarak tespit edilmiştir. Leu/Leu genotipli erkeklerde serum testesteron seviyesi yüksek bulunmuştur. Ayrıca 5α-redüktaz aktivitesinin düşük olduğu bireylerde prostat kanseri riskinin de düşük olduğu gözlenmiştir. Rakamsal olarak SRD5A2 genindeki polimorfizmler ile prostat kanseri arasında bir fark varmış gibi görünse de bu fark, istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Hsing ve ark., 2001).

Prostatektomi yapılmış 265 Kafkas prostat kanseri hastasında, SRD5A2 Ala49Thr polimorfizmi ile arasında anlamlı bir ilişki olduğu, fakat Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasında hiçbir ilişki olmadığı bildirilmiştir (Jaffe ve ark., 2000). Bu çalışmada hastalar iki grup halinde incelenmiştir. Grup1'de tümör

evresi T3 olanlar, PSA'sı 10'dan yüksek olanlar ve Gleason skoru 7 ile 10 arasında olanlar Grup 2'de ise daha yüksek Gleason skorlu olanlar ele alınmıştır. Grup 1 ve grup 2 ayrı ayrı kontrol grubu ile değerlendirilmiş ve her iki grup ile Ala49Thr polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Jaffe ve ark., 2000). Bizim çalıştığımız hasta grubunun tümör evresi sınıflandırılmamıştır. Sadece patoloji sonuçları; adenokarsinom ve BPH olarak ikiye ayrılmıştır. Hasta grubumuzun Gleason skorları 2 ile 10 arasında, greydleri de 0.5 ile 4 arasında değişkenlik gösteriyordu. Hasta ve kontrol gruplarımız, etnik köken, çevre şartları ve hastalığın şiddeti bakımından farklılık göstermesine rağmen, Jaffe ve arkadaşlarının çalışma grubu ile sonuçlarımız benzerlik göstermektedir. Her iki çalışmada da Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki istatistiki ilişki anlamsız ve Ala49Thr polimorfizmi için de istatistiki ilişki anlamlı bulunmuştur.

Beta-karoten ve retinol verilmiş prostat kanserli hastalarda, SRD5A2 geni üzerindeki Ala49Thr, Val89Leu ve $(TA)_n$ dinükleotid polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı belirtilmiştir (Lamharzi ve ark., 2003). Lamharzi ve arkadaşları, Val89Leu polimorfizmi için bulduğu sonuç ile bizim çalışmamızın sonucu benzer olmasına rağmen Ala49Thr polimorfizmi için benzer değildir. Bu farklılığı Lamharzi'nin hasta grubunun Beta-karoten ve retinol kullanmış olmasına verebiliriz.

İngiliz populasyonu üzerine yapılmış bir başka çalışmada, 621 prostat kanseri hastası değerlendirilmiştir. Bu çalışmada SRD5A2 geni üzerindeki Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri ile serum seks hormonları konsantrasyonları dikkate alınmıştır. SRD5A2 geni ile androsteneidiol glukoronid (A-diol-g) serum testesteron konsantrasyonu birlikte araştırılmış ve Leu aleli A-diol-g konsantrasyonunu %10 oranında düşürücü etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda Leu/Leu genotipinin serum testesteron ve serbest testesteron miktarını belirgin bir şekilde (%12-16) düşürdüğü bildirilmiştir (Allen ve ark., 2001). Allen ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir diğer çalışmada ise, 604 İngiliz prostat kanseri hastası üzerinde SRD5A2 genindeki $(TA)_n$ dinükleotid tekrarı ve Ala49Thr polimorfizmi araştırılmıştır. Bu çalışmada A-diol-g konsantrasyonları da değerlendirilmiştir. $(TA)_n$ tekrar

polimorfizmi ile prostat kanseri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir. Ala49Thr polimorfizminde Thr allelini heterezigot ve homozigot taşıyan bireylerin A-diol-g konsantrasyonlarında %24 oranında bir düşüklük olduğu tespit edilmiştir (Allen ve ark., 2003).

Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan çalışmada; SRD5A2 geni ve 3 Beta-Hidroksi steroid dehidrogenaz tip II (HSD3B2) geni üzerindeki polimorfizmlerin birlikte ve ayrı ayrı prostat kanseri riski üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada; 637 prostat kanseri hastası ile yaşları ve ırkları eşleştirilmiş 244 kontrol üzerinde ilgili genler değerlendirilmiştir. SRD5A2 geninin Val89Leu polimorfizmi tek başına bakıldığında prostat kanseri ile ilişkili olmadığı, fakat HSD3B2 genindeki $(TG)_n$, $(TA)_n$ ve $(CA)_n$ dinükleotid tekrarının kısa olması ile birlikte değerlendirildiğinde bu iki polimorfizmin birlikte, hastalığın şiddetini artırdığı gösterilmiştir (Nesland-Dudas ve ark., 2007).

Prostat kanseri etiyolojisine bakıldığında, etnik durumun önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir. Yapılan araştırmalarda farklı etnik gruplar arasında prostat kanseri insidansının da farklı olduğu görülmektedir. Ayrıca, hayat stilleri ve ailesel faktörler dediğimiz kalıtsal nedenler de prostat kanseri insidansını etkilemektedir. Prostat kanserine neden olan genlerle ilgili yapılan çalışmalar, genin farklı polimorfizmleri ile ilgili olduğu gibi, etnik gruplar arasındaki değişiklikler, farklı coğrafi bölgelerdeki populasyonlar üzerindeki değişiklikler ve aynı zamanda, farklı genler ile arasındaki etkileşimler de göz önünde bulundurularak çeşitli kombinasyonlar oluşturulmuş çalışmalardır. Mutasyon sonucunda enzim aktivitesinin değişimine bağlı olarak hormon konsantrasyonlarının değişimini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda; çalışma sonuçlarımızın bazı çalışmalar ile benzer, bazıları ile de benzer olmaması beklediğimiz bir sonuçtur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında prostat kanseri tanısı ile tedavi planlanan hastaların kanlarında, ELAC2 geni Ser217Leu ve Ala541Thr polimorfizmi ile SRD5A2 geni Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri araştırılmıştır. Polimorfizmlerin hepsi bu bölge de ilk kez çalışılmıştır. Çalışmaya katılan prostat kanserli hasta sayısı 58, BPH hasta sayısı 44 olup kontrol ise 59'dur. Çalışmamız sonucunda elde edilen sonuçlar şu şekildedir.

1) ELAC2 geni Ser217Leu polimorfizmi ile prostat kanseri ve BPH hasta grubundaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Prostat kanseri ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

2) ELAC2 geni Ala541Thr polimorfizmi ile prostat kanseri ve BPH hasta grubundaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Prostat kanseri ile ilişkili olmadığını düşünmekteyiz.

3) SRD5A2 geni Ala49Thr polimorfizmi ile prostat kanseri ve BPH hasta grubundaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Prostat kanseri ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

4) SRD5A2 geni Val89Leu polimorfizmi ile prostat kanseri ve BPH hasta grubundaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Prostat kanseri ile ilişkili olmadığını düşünmekteyiz.

5) PSA grupları ile ELAC2 Ser217Leu polimorfizmi ve SRD5A2 Val89Leu polimorfizmi arasındaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

6) PSA grupları ile ELAC2 Ala541Thr polimorfizmi ve SRD5A2 Ala49Thr polimorfizmi arasındaki ilişki istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Prostat kanseri, ELAC2 geni Ser217Leu, Ala541Thr, SRD5A2 geni Ala49Thr ve Val89Leu polimorfizmleri ile ilgili yayınlara bakıldığında elde edilen sonuçlar, populasyonlara göre farklılık göstermektedir. Her bir polimorfizm ile prostat kanseri arasındaki ilişki istatistiksel olarak bazı populasyonlarda anlamlı iken bazılarında anlamsızdır. Farklı etnik gruplar arasında prostat kanseri insidansının da farklı olduğu görülmektedir. Ayrıca hayat stilleri ve çevre faktörleri ile kalıtsal faktörler prostat kanseri insidansını etkilemektedir. Bu genle ilgili yapılan çalışmalar, genin

farklı polimorfizmleri ile ilgili olduğu gibi, etnik gruplar arasındaki değişiklikler, farklı coğrafi bölgelerdeki populasyonlar üzerindeki değişiklikler ve aynı zamanda farklı genler ile arasındaki etkileşimlerde göz önünde bulundurularak çeşitli kombinasyonlar oluşturulmuş çalışmalardır. Mutasyon sonucundaki enzim aktivitesinin değişimine bağlı olarak hormon konsantrasyonlarının değişimini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Ayrıca çalışılan hasta sayılarıda farklılık göstermektedir. Tüm bu şartlar göz önünde bulundurulacak olursa, hasta sayısının artırılarak daha geniş kapsamlı bir tarama yapılması ile bölge populasyonunun allel insidanslarını ve polimorfizmlerin prostat kanseri ile olan ilişkisi daha anlamlı hale gelecektir.

KAYNAKLAR

ALLEN, N.E., FORREST, M.S., ve KEY T.J., 2001. The association between polymorphisms in the CYP17 and 5α-reductase (SRD5A2) genes and serum androgen concentrations in men. Cancer Epidemiology, Biomarkers and prevention, 10: 185-189.

ALLEN, N.E., REICHARDT, J.K.V., NGUYEN, H., ve KEY, T.J., 2003. Association between two polymorphisms in the SRD5A2 gene and serum androgen concentrations in british men. Cancer Epidemiology, Biomarkers and prevention, 12: 578-581.

ANAFARTA, K., 2007, Üregenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı, K. ANAFARTA, Y. BEDÜK, N. ARIKAN, Temel Üroloji, 3. baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 14.

ANDERSSON, S., BISHOP, R.W., ve RUSSELL, D.W., 1989. Expression cloning and regulation of steroid 5α-reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. The Journal of Biological Chemistry, 264: 16249-16255.

ARI, Ş., 2004, DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, TEMİZKAN, G., ARDA, N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 101-119.

BALTACI, S., 2007, Prostat Kanseri, K. ANAFARTA, Y. BEDÜK, N. ARIKAN, Temel Üroloji, 3. baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 740-766.

BARRETT-CONNOR, E., GARLAND, C., MCPHİLLİPS, J.B., KHAW, K.T., ve WINGARD, D.L., 1990, A prospective, population-based study of androstenedione, estrogens, and prostatic cancer. Cancer Research, 1;50:169-173.

BRESLOW, R.A., WIDEROFF, L., GRAUBARD, B.L., ERWIN, D., REICHMAN, M.E., ZIEGLER, R.G., ve BALLARD-BARBASH, R., 1999, Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study. Ann Epidemiol., 9: 254-261.

CAN, S., ZHU, Y.S., CAJ, L.Q., LING, Q., KATZ, M.D., AKGUN, S., SHACKLETON, C.H.L., ve IMPERATO-MCGINLEY, J., 1998. The

identification of 5α-reductase-2 and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase-3 gene defects in male pseudohermaphrodites from a turkish kindered. Journal of Clinical Endecrinology and Metabolism, 83: 560-569.

CARTER, B.S., BEATY T.H., STEINBERG, G.D., CHILDS, B., ve WALSH, P.C., 1992. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Genetics, 89: 3367-3371.

CHAN, J.M., GIOVANNUCCI, E., ANDERSSON, S.O., YUEN, J., ADAMI, H.O., ve WOLK, A., 1998, Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer (Sweden). Cancer Causes Control, 9: 559-566.

CLARK, L.C., COMBS, G.F., TURNBULL, B.W., SLATE, E.H., CHALKER, D.K., CHOW, J., DAVIS, L.S., GLOVER, R.A., GRAHAM, G.F., GROSS, E.G., KRONGRAD, A., LESHER, J.L., PARK, H.K., SANDERS, B.B., SMITH, C.L., ve TAYLOR, J.R., 1996, Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. JAMA., 25;276: 1957-1963.

CLINTON, S.K., PALMER, S.S., SPRIGGS, C.E., ve VISEK, W.J., 1988, Growth of Dunning transplantable prostate adenocarcinomas in rats fed diets with various fat contents. J. Nutr., 118: 908-914.

CUMMINGS, M.R., ve KLUG, W.S., 2002, Genetik, 6. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 816.

ÇICEK, M.S., CONTI, D.V., CURRAN, A., NEVILLE, P.J., PARIS, P.L., CASEY, G., ve WITTE, J.S., 2004. Association of prostate cancer risk and androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR. The Prostate, 59: 69-76.

DE MARZO, A.M., MARCHI, V.L., EPSTEIN, J.I., ve NELSON, W.G., 1999, Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. American Journal of Pathology, 155:1985-1992.

DEVGAN, S.A., HENDERSON, B.E., YU, M.C., SHI, C.Y., PIKE, M.C., ROSS, R.K., ve REICHARDT, J.K., 1997, Genetic variation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. Prostate, 15;33: 9-12.

EMIL, A., TANOGHO, J., ve MCANINCH, J.W., 2004, Prostat Kanseri ve Benign Prostat Hiperplazisi, G. KAZANCI, Smith Genel Üroloji, 16. baskı, Nobel Kitabevleri, İstanbul, 410-418.

FEBBO, P.G., KANTOFF, P.W., PLATZ, E.A., CASEY, D., BATTER, S., GIOVANNUCCI, E., HENNEKENS, C.H., ve STAMPFER, M.J., 1999. The V89L polymorphism in the 5α-reductase type 2 gene and risk of prostate cancer. Cancer Research, 59: 5878-5881.

GANN, P.H., 2002. Risk factors for prostate cancer. Reviews in Urology, 4: 3-10.

GOODARZI, M.O., SHAH, N.A., ANTOINE, H.J., PALL, M., GUO, X., ve AZZIZ, R., 2006. Variants in the 5α-reductase type 1 and type 2 genes are associated with polycisitic ovary syndrome and the severity of hirsutism in affected women. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 91(10): 4085-4091.

GRONBERG, H., XU, J., SMITH, J.R., CARPTEN, J.D., ISAACS, S.D., FREIJE, D., BOVA, G.S., DANBER, J.E., BERGH, A., WALSH, P.C., COLLINS, F.S., TRENT, J.M., MEYERS, D.A., ve ISAACS W.B., 1997, Early age at diagnosis in families providing evience of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. Cancer Research, 1;57: 4707-4709.

GSUR, A., FEIK, E., ve MADERSBACHER, S., 2003. Genetic pollymorphisms and prostate cancer risk. World Journal of Urology , 10: 345-378.

GUESS, H.A., FRIEDMAN, G.D., SADLER, M.C., STANCZYK, F.Z., VOGELMAN, J.H., IMPERATO-MCGINLEY, J., LOBO, R.A., ve ORENTREICH, N., 1997, 5 alpha-reductase activity and prostate cancer: a case-control study using stored sera, Cancer Epidemiology, Biomakers and Prevention, 6: 21-24.

HEINONEN, O.P., ALBANES, D., VIRTAMO, J., TAYLOR, P.R., HUTTUNEN, J.K., HARTMAN, A.M., HAAPAKOSKI, J., MALILA, N., RAUTALAHTI, M., RIPATTI, S., MAENPAA, H., TEERENHOVI, L., KOSS, L., VIROLAINEN, M., ve EDWARDS, B.K., 1998, Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. J. Natl. Cancer Institute, 18;90: 440-446.

HSING, A.W., CHEN, C., CHOKKALINGAM, A.P., GAO, Y.T., DIGHTMAN, D.A., NGUYEN, H.T., DENG, J., CHENG, J., SESTERHENN, I.A., MOSTOFI, F.K., STANCZYK, F.Z., ve REICHARDT, J.K.V., 2001. Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: a population-based case control study. Cancer Epidemiology, Biomakers and Prevention, 10: 1077-1082.

http://www.prostathapi.com/prostat-belirtileri.html

Ulaşım tarihi: 11/08/09

İŞCAN, M., 2003, Moleküler Genetikte Modern Teknikler. A., TELEFONCU, Ö.İ:, KÜFREVİOĞLU, N., PAZARLIOĞLU, Biyoinformatik-I, 1. baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 71-82.

JAFFE, J.M., MALKOWICZ, S.B., WALKER, A.H., MACBRIDE, S., PESCHEL, R., TOMASZEWSKI, J., ARSDALEN, K.V., WEIN, A.J., ve REBBECK, R., 2000. Association os SRD5A2 genotype and pathological charasteristics of prostate tumors. Cancer Research, 60: 1626-1630.

JENKINS, E.P., ANDERSSON, S., MCGINLEY, J.I., WILSON, J.D., ve RUSSELL, W., 1992. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5α-reductase. Journal Clinical Investigation, 89: 293-300.

JONES, D., ve FLETCHER, C.D., 1999. How shall we apply the new biology to diognostics in surgical pathology? Journal of Pathology, 87: 147-154.

KARAS, M., AMIR, H., FISHMAN, D., DANILENKO, M., SEGAL, S., NAHUM, A., KOIFMANN, A., GIAT, Y., LEVY, J., ve SHARONI, Y., 2000, Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. Nutr. Cancer, 36: 101-111.

KIBEL, A.S., ve NELSON, J.B., 2005, Moleküler Genetik ve Kanser Biyolojisi, PATRICK, C., WALSH, M.D., Campbell's Urology, 8. baskı Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2625-2671.

KOLONEL, L.N., NOMURA, A.M., ve COONEY, R.V., 1999, Dietary fat and prostate cancer: current status. J. Nat. Cancer Institute, 3; 91: 414-428.

LABRIE, F., SUGIMOTO, Y., LUU-THE, V., SİMARD, J., LAEHANCE, Y., BACHVAROV, D., LABLANE, G., DUROCHER, F., ve PAQUET, N.,

1992. Stracture of human type II 5α-reductase gene. Endecrinology, 131: 1571-1574.

LAMHARZI, N., JOHNSON, M.M., GOODMAN, G., ETZIONI, R., WEISS, N.S., DIGHTMAN, D.A., BARNETT, M., DITOMMASO, D., ve CHEN, C., 2003. Polymorphic markers in the 5α-reductase type II gene and the incidence of prostate cancer. International Journal Cancer, 105: 480-483.

LATIL, A.G., AZZOUZI, R., CANCEL, G.S., GUILLAUME, E.C., COCHAN-PRIOLLET, B., BERTHON, P.L., ve CUSSENOT, O., 2001. Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways. American Cancer Society, 92: 1130-1137.

LINDSTROM, S., WIKLUND, F., ADAMİ, H.O., BALTER, K.A., ADOLFSSON, J., ve GRONBERG, H., 2006. Germ-line genetic variation in the key androgen-regulating genes androgen receptor, cytochrome P450, and steroid 5α-reductase type 2 is important for prostate cancer development. Cancer Research, 66: 11077-11083.

LOWITZ, B.B., ve CASCIATO, D.A., 2007, Klinik Onkoloji El Kitabı, Palme Yayıncılık, Ankara, 762.

LÜLEYAP, H.Ü., 2008, Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, İzmir, 437s.

MAKRIDAKIS, N.M., ve REICHARDT, J.K.V., 2001. Moleculer epidemiology of hormone-metabolic loci in prostate cancer. Epidemiologic Reviews, 23:24-29.

MCPHAUL, M.J., 1999. Moleculer defects of the androgen receptor. Journal of Steroid Biochemistry and Moleculer Biology, 69: 315-322.

MEITZ, J.C., EDWARDS, S.M., EASTON, D.F., MURKIN, A., ARDERN-JONES, A., JACKSON, R.A., WILLIAMS, S., DEARNALEY, D.P., STRATTON, M.R., HOULSTON, R.S., ve EELES, R.A., 2002. HPC2/ELAC2 polymorphisms and prostate cancer risk: analysis by age of onset of disease. British Journal of Cancer, 87: 905-908.

MENTEŞ, G., 2002, Gonadlar ve Steroid Hormonlar, T. ONAT, K. EMERK, E.Y. SÖZMEN, İnsan Biyokimyası, 1. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 491-501.

NAM, RK., TOIB, A., VESPRINI, D., HO, M., CHU, W., HARVIE, S., SWEET, J., TRACHTENBERGA, J., JEWETTA, M.A.S., ve NAROD, S.A., 2001. V89L polymorphism of type-2, 5 alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. Urology, 57:199-204.

NESLUND-DUDAS, C., BOCK, C.H., MONAGHAN, K., NOCK, N.L., YANG, J.J., RUNDLE, A., TANG, D., ve RYBICKI, B.A., 2007. SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness. Prostete, 67(15): 1654-1663.

NTAIS, C., POLYCARPOU, A., ve IONNIDIS, J.P.A., 2003. SRD5A2 gene polmorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. Cancer Epidemiology, Biomakers and Prevention, 12: 618-624.

NWOSU, V., CARPTEN, J., TRENT, J.M., ve SHERIDAN, R., 2001. Heterogenity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. Human Moleculer Genetics, 10: 2313-2318.

PARIS, P.L., KUPELIAN, P. A., HALL, J.M., WILLIAMS, T.L., LEVIN, H., KLEIN,E.A., CASEY, G., ve WITTE, J.S., 1999, Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presantation in African-American prostate cancer patients. Cancer Epidemiol Biomakers Prev., 8: 901-905.

PERANTONI, A. O., 2006, Cancer associated genes, MCKINNELL, R.G., PARCHMENT, A.O., PERANTONI, A.O., DAMJANOV, I., PIERCE, G.B., The Biological Basis of Cancer, 2. baskı, Cambridge Unıversity Pres, New York, 145-195.

POLARD, T.D., ve EARNSHAW, W.C., 2004. Cell Biology, An Imprint of Elseiver, Pennsylvania, 813s.

POLETTI, A., CELOTTI, F., MOTTA., ve MARTINI, L., 1996. Characterization of rat 5α-reductase type 1 and type 2 expressed in Saccoromyces cerevisiae. Biochemistry Journal, 314: 1047-1052.

PREHN, R.T., 1999, On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. Cancer Research, 1;59: 4161-4164.

REBBECK, T.R., WALKER, A.H., ZEIGLER-JOHNSON, C., ve WEISBURG, S., 2000. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. American Journal Human Genetics, 67: 1014-1019.

REBBECK, T.R., 2002. Inherited genotype and prostate cancer outcomes. Cancer Epidemiology, 11: 945-952.

REICHARDT, J.K.V., MAKRIDAKIS, N., HENDERSON, B.E., YU, M.C., PIKE, M.C., ve ROSS, R.K., 1995. Genetic variability of the human SRD5A2 gene: implications for prostate cancer risk. CAncer Rsearch, 55: 3973-3975.

REITER R.E., ve DEKERNION, J.B., 2005, Epidemiology of prostate cancer, etiology and prevention, PATRICK, C., WALSH, M.D., Campbell's Urology, 8. baskı, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 3003-3019.

RIBEIRO, M.L., SANTOS, A., CARVALHO-SALLES, A.B., ve HACKEL, C., 2002. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. Braz. J. Med. Biol. Res, 35(2): 205-213.

ROKMAN, A., IKONEN, T., MONONEN, N., AUTIO, V., MATIKAINEN, M.P., KOIVISTO, P.A., TAMMELA, T.L.J., KALLIONIEMI, O.P., ve SCHLEUTKER, J., 2001. ELAC2/HPC2 involvement in hereditary and sporadic prostate cancer. Cancer Research, 61: 6038-6041.

ROSS, R., BERNSTEİN, L., JUDD, H., HANISCH, R., PIKE, M., ve HENDERSON, B., 1986, Serum testosterone levels in helthy young and white men, J. Natl. Cancer Institute, 76: 45-48.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., ve MANIATIS, T., 1989. Moleculer Cloning. A Laboratory Manuel, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 4000.

SCHALD, D.J., 2004. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. Human Moleculer Genetics, 13: 103-121.

SCHWARTZ, G.G. ve HULKA, B.S., 1990, Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? Anticancer Research, 10: 1307-1311.

SEENUNDUN, S., ve ROBAIRE, B., 2005. Cloning and characterization of the 5α-reductase type 2 promoter in the rat epididymis. Biology of Reproduction, 72: 851-861.

SEVERI, G., GILES, G.G., SOUTHEY, M.C., TESORIERO, A., TILLEY, W., NEUFING, P., MORRIS, H., ENGLISH, D.R., MCCREDIE, M.R.E., BOYLE, P., ve HOPPER, J.L., 2003. ELAC2/HPC2 polymorphisms, prostate-spesific antigen levels, and prostate cencer. Journal of the National Cancer Instıtute, 95: 818-8824.

SHIBATA, A., GARCIA, M.I., CHENG, I., STAMEY, T.A., MCNEAL, J.E., BROOKS, J.D., HENDERSON, S., YEMOTO, C.E., ve PEEHL, D.M., 2002. Polymorphisms in the androgen receptor and type II 5 alpha reductase genes and prostate ccancer prognosis. Prostate, 52(4): 269-278.

SIMARD, J., DUMONT, M., LABUDA D., SINNETT, D., MELOCHE, C., EL-ALFY, M., BERGER, L., LEES, E., LABRIE, F., ve TAVTIGIAN, S.V., 2003. Prostate cancer susceptibility genes:lessons learned and challenges posed. Endocrine-Related Cancer, 10: 225-259.

SMITH, C.M., BALLARD, S.A., WORMAN, N., BUETTNER, R., ve MASTERS, J.R.W., 1995. 5α-Reductase expression by prostate cancer cell lines and benign prostatic hyperplasia in-vitro. Journal of Clinical Endecrinology and Metabolism, 81: 1361-1366.

SODERSTROM, T., WADELIUS, M., ANDERSSON, S.O., JOHANSSON, J.E., JOHANSSON, S., GRANATH, F., ve RANE, A., 2002. 5 alpha-reductase 2 polymorphisms as risk factors in prostate cancer. Pharmacogenetics, 12(4): 307-312.

STANFORD, J.L., SABACAN, L.P., NOONAN, E.A., IWASAKI, L., SHU, J., FENG, Z., ve OSTRANDER, E.A., 2003. Association of HPC2/ELAC2 Polymorphisms with risk of prostate cancer in a population-based study. Cancer Epidemiology, Biomarkers, 12: 876-881.

SUAREZ, B.K., GERHARD, D.S., LIN, J., HABERER, B., NGUYEN, L., KESTERSON, N.K., ve CATALONA W.J., 2001. Polymorphism in the prostate cancer susceptibility gene HPC2/ELAC2 in multiplex families and helthy controls. Cancer Research, 61: 4982-4984.

TAKAKU, H., MINAGAWA, A., TAKAGI, M., ve NASHIMOTO, M., 2003. A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. Nucleic Asids Research, 31: 2272-2278.

THIGPEN, A.E., DAVİS, D.L., MILATOVICH, A., MENDONCA, B.B., IMPERATO-MCGINLEY, J., GRIFFIN, J.E., FRANCKE, U., WILSON, J.D., ve RUSSELL D.W., 1992. Moleculer genetics of steroid 5α-reductase 2 deficieny. Journal Clinical Investigation, 90: 799-809.

TAVTIGIAN, S.V., VESPRINI, D., NAM, R.K., TRACHTENBERG, J., JEWETT, M.A.S., EMAMI, M., HO, M., TOI, A., ve NAROD, S.A., 2001. HPC2 varyants and screen-detected prostate cancer. American Journal Human Genetic, 68: 912-917.

VIGER, R.S., ve ROBAIRE, B., 1996. The mRNAs fort he steroid 5α-reductase isozymes, types 1 and 2, are differentially regulated in the rat epididymis. Journal of Andrology, 17: 27-34.

WANG, L., MCDONNELL, S.K., ELKINS, D.A., SLAGER, S.L., CHRISTENSEN, E., MARKS, A.F., CUNNIGHAM, J.M., PETERSON B.J., JACOBSEN S.J., CERHAN, J.R., BLUTE, M.L., SCHALD, D.J., ve THIBODEAU, S.N., 2001. Role of HPC2/ELAC2 in hereditary prostate cancer. Cancer Research, 61: 6494-6499.

WILSON, J.D., GRIFFIN, J.E., ve RUSSELL, D.W., 1993. Steroid 5α-reductase 2 deficieny. Endocrine Reviews, 14: 577-592.

WU, Y.Q., CHEN, H., RUBIN, M.A., WOJNO, K.J., ve COONEY, K.A., 2001. Loss of heterozygosity of the putative prostat cancer susceptibility gene HPC2/ELAC2 is uncommon in sporadic and familial prostate cancer. Cancer Research, 61: 8651-8653.

XU, J., ZHENG, S.L., CARPTEN, J.D., NUPPONEN, N.N., ROBBINS, C.M., MESTRE, J., MOSES, T.Y., FAITH, D.A., KELLY, B.D., ISAACS, S.D., WILEY, K.E., EWING, C.M., BUJNOVSZKY, P., CHANG, B., BAILEY-WILSON, J., BLEECKER, E.R., WALSH, P.C., TRENT, J.M., MEYERS, D.A., ve ISAACS, W.B., 2001. Evaluation of linkage and association of

HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic cancer. American Journal Human Genetic, 68: 901-911.

YANG, C., HAMAJIMA, N., IWATA, H., SAITO, T., MATSUO, K., HIROSE, K., INOUE, M., TAKEZAKI, T., ve TAJIMA, K., 2002. A49T, V89L and TA repeat polymorphisms of steroid 5α-reductase type II and breast cancer risk in Japanese women. Breast Cancer Research, 4: 1-7.

ZHU, Y.S., ve SUN, G.H., 2005. 5α-Reductase isozymes in the prostate. Journal of Medical Science, 25(1): 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

1973'te Kahramanmaraş'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini; sırası ile Sergentepe İlkokulu, Cumhuruyet Ortaokulu ve Kahramanmaraş Lisesinde tamamladı. 1992 yılında Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri M.Y.O. Radyoloji bölümünden mezun oldu. 1996-2000 yılları arasında K.S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde öğrenimini tamamladı. Üniversiteden bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2001-2005 yılları arasında Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2006 yılında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Moleküler Biyoloji konusunda doktora eğitimine başladı.

EKLER

EK-1. Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanışı

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak "Molecular Cloning Kataloğu" esas alınmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarına ulaştırmak için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde $M_1xV_1=M_2xV_2$ formülünden yararlanılmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (V)

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V) (Sambrook ve ark., 1989).

1.1. Lizis Tamponu

0.32 M sukroz

10 mM Tris HCl

5 mM $MgCl_2$

%1 TritonX100

Hazırlanacak hacim için sukroz, Tris HCl, $MgCl_2$ ve TritonX100 hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.2. Fizyolojik Tampon

0.075 M NaCl

0.025 M EDTA

Hazırlanacak hacim için NaCl ve EDTA hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, pH 7.5-7.4'e ayarlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.3. TE-9

500 mM Tris baz

20 mM EDTA pH 9.0

10 mM NaCl

Hazırlanacak hacim için kulanılacak olan Tris, EDTA ve NaCl hesaplanarak tartılır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

1.4. SDS (Sodyum Dedosil Sülfat) Solüsyonu

%10 SDS

20 ml için 2 gr SDS tartılır, 20 ml saf su ile bir şişe içerisinde iyice karıştırılır. Kullanıncaya kadar buzdolabında veya oda ısısında tutulabilir.

1.5. TE Tamponu (pH 7.0 ve 8.0)

10 mM Tris pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

Hazırlanacak hacim için kulanılacak olan Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

EK-2. PCR ÇEŞİTLERİ

2.1. Demirlenmiş "Anchored" PCR

Demirlenmiş "Anchored" PCR çoğaltılacak olan DNA'nın sadece bir bölgesinin (yani bir primer bölgesinin) bilindiği durumda uygulanır. Amaç, bilinen bölgeden yararlanılarak ilgilenilen DNA parçasının çoğaltılmasıdır. Bu amaçla çoğaltılacak DNA bilinen bir diziye bağlanır ve bu bilinen dizi 2. primer bölgesi olarak kullanılır.

"Anchored" PCR için kullanılan temel yöntemlerden biri çoğaltılacak DNA'nın bir vektöre klonlanmasını içerir. İkinci primer bağlanma dizisini sağlamak üzere "anchor" dizi ligasyonla standart bir vektöre bağlanır. Böylece biri bilinen dizi, diğeri hemen yanında çoğaltılacak DNA'nın yerleştirildiği vektöre ait dizi olmak üzere iki primerle PCR gerçekleştirilir (Arı, 2004).

2.2. Geri "Revers" Transkripsiyon PCR (RT-PCR)

RNA PCR olarak da adlandırılan RT-PCR iki aşamalı olup, RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. RT-PCR tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleştirilebilir. *T. thermophilus* DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar mangan varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapılabilmektedir.

RT-PCR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında oldukça duyarlı bir yöntemdir. Aynı zamanda "Message amplification phenotyping- MAPPing" olarak da bilinen bu yöntem az sayıdaki hücreden aynı anda fazla miktarda RNA'nın analizinide mümkün kılar. Ayrıca RNA PCR, hücresel bir RNA örneğindeki tüm RNA'lardan PCR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması içinde yararlı bir yöntemdir (Arı, 2004).

2.3. Asimetrik PCR

Bu PCR çeşidinde, kullanılan iki çeşit primerden biri miktarca diğerinden çok daha fazla kullanılır. Bu nedenle asimetrik PCR sonucu ipliklerden biri diğerinden çok daha fazla miktarda çoğaltılır. Asimetrik PCR yöntemi, fazla miktarda çoğaltılan tek iplikli ürünün dizilenmesi için kullanılır.

Asimetrik PCR, herhangi bir kalıp ipliğe uygulanabilir, ancak tek iplikli ürünün fazla miktarda elde edilememesi gibi bir sorunla karşılaşmak da olasıdır. Bu nedenle çoğunlukla klasik PCR ile önceki çift iplikli hedef çoğaltılır, ardından asimetrik PCR uygulaması ile, kalıp yeniden çoğaltılarak tek iplikli ürün yeterli miktarda üretilir. Tek iplikli ürünün çift iplikli üründen kolayca ayırt edilebilmesi için iki yol izlenebilir. İlkinde P^{32} ile işaretli dNTP kullanılıp, oluşan PCR ürününün Sothern blotting'den sonra tek iplikli ürünün tamamlayıcısı olan bir oligo-nükleotid prob ile melezlenmesi yoluyla tek iplikli ürünler belirlenir. İkinci yol ise EtBr ile boyanmış ürünlerin agaroz ya da poliakrilamid jeller kullanılarak elektroforetik ayırımıdır (Arı, 2004).

2.4. Ters "Inverse" PCR (IPCR)

IPCR bilinen bir DNA dizisinden yararlanılarak bu DNA'nın her iki ucundaki bilinmeyen bölgelerin çoğaltılması için kullanılır. Bu yöntemde bilinen diziyi içeren DNA önce restriksiyon enzim kesimi ile doğrusal ve sonra bilinen DNA'yı içerecek şekilde halkasal hale getirilir. Ardından bilinen DNA dizilerine ikinci bir restriksiyon enzim kesimi uygulanmasıyla tekrar doğrusal olarak elde edilen DNA molekülü bilinen dizilere uygun olarak tasarlanan primerler yardımı ile çoğaltılır. Böylece dizisi bilinmeyen DNA parçası çoğaltılmış olur.

Ters PCR özellikle transpozonlar ile gen yakalanması yöntemi (gene tagging) ile birlikte kullanıldığında bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılması için kullanılır (Arı, 2004).

2.5. In Situ PCR

Lam üzerindeki hücre, doku ya da doku parçaları içindeki kalıp DNA'nın PCR ile çoğaltılması işlemine *in situ* PCR adı verilir. Bu yöntem viral DNA'nın ve tek kopyalı genlerin saptanmasında veya RT-PCR ile birlikte viral RNA ve transkriptlerin belirlenmesinde kullanılır.

In situ PCR, hücre içine PCR bileşenlerinin girişine izin vermek üzere hücre membranları yarı geçirgen hale getirildikten sonra fiske edilmiş hücre veya dokularla yapılır (Arı, 2004).

2.6. Multipleks PCR

Bir PCR ile birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması multipleks PCR olarak adlandırılır. Multipleks PCR, birden fazla bölgeye bağlanan multipleks primerler ile gerçekleştirilir. Bu PCR gen delesyonlarının haritalanması, küçük delesyonların, çerçeve kayması ve nokta mutasyonlarının analizinde kullanılan bir yöntemdir (Arı, 2004).

2.7. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan PCR olup, nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar.

Polimorfizmin belirlenmesi genetik işaretlerin (marker) elde edilmesinde ve genetik harita yapımında kullanılır. RAPD'nin temeli yaklaşık 10 nükleotidlik ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanır. Farklı bireylerde nükleotid dizilimi de değişik olduğundan, bireylerden birinde bir primer bağlanma yerinin kaybı ya da değişmesi çoğalan PCR ürünleri arasında özgün bant ya da bantların kaybına yol açar. PCR ile elde edilen ürünlerin jelelektroforezi ile analiz sonucu meydana gelen bantların profillerinin benzerlik ya da benzemezlik dereceleri belirlenerek polimorfizm hakkında bilgi edinilir. **DNA parmak izi** olarak

da adlandırılan bu yöntem tıp da adli olayların incelenmesinde, kalıtsal hastalıklar ile infeksiyon hastalıklarının tanısında, tarımda tohum saflığının ve seçilmiş genotiplerin belirlenmesinde, tür tanısında yine benzer amaçlar için hayvancılıkta, evrim ve arkeoloji gibi çeşitli temel ve uygulamalı çalışma alanlarında her geçen gün artan bir şekilde kullanılmaktadır (Arı, 2004).

2.8. İmmuno PCR

PCR ile birantijen saptama sistemi olan immuno PCR, özgül olarak antijen-antikor kompleksine bağlanmış bir işaret DNA parçasının çoğaltılması için kullanılır. PCR'ın özgül olarak hedef DNA'yı çok fazla miktarda çoğaltabilmesi özelliği nedeni ile, immuno PCR, ELISA ve "radioımmunassay" gibi klasik antijen belirleme yöntemlerine göre çok daha yüksek duyarlılıkta antijen saptanmasına olanak verir.

İmmuno PCR'da hem antikora hem de DNA'ya bağlanabilme özelliği taşıyan bağlayıcı moleküller (linker) kullanılır. Bağlayıcı molekül aracılığı ile antijen-antikor kompleksine bağlı haldeki DNA, uygun primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu çoğaltılır ve PCR ürünleri analizlenir. Özgün PCR ürünlerinin çoğaltılmış olması, antijenin varlığını gösterir. Bu nedenle immuno PCR temel biyolojik ve biyomedikal çalışmaların yanı sıra, klinikte tanı ve adli tıpta da genetik tiplendirme amacı ile geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (Arı, 2004).

EK-3. Jel Elektroforezi

Bir su yosunundan elde edilen agaroz, D-Galaktoz ve 3,6-anhidro L-Galaktoz birimlerinin lineer polimerleridir (Sambrook ve ark., 1989).

Agaroz jeller, uygun tamponla berrak bir çözelti elde edene kadar ısıtılıp kaynatma yolu ile hazırlanır. İçine 0.5µl/ml oranında ethidium bromide (EtBr) eklenerek jel dökme kabına dökülür ve polimerize olması için beklenir. Polimerize olan jel, yoğunluğu agarozun konsantrasyonu ile belirlenen bir matriks oluşturur. Jel boyunca elektrik akımı uygulandığı zaman, nötral pH'da negatif yüklü olan DNA, anoda doğru göç eder. Göç oranı pek çok parametre ile belirlenir (Sambrook ve ark., 1989).

3.1. DNA'nın moleküler büyüklüğü

Lineer çift iplikli DNA molekülleri bir elektrik alanında bir bütün halinde hareket etme eğilimindedir. Jel matriksi boyunca baz çifti sayısının 10 tabanına göre logaritması (log_{10}) ile ters orantılı bir oranda göç eder. Büyük moleküller sürtünme direncinden ötürü daha yavaş hareket ederler ve porlar boyunca kat ettikleri yolu küçük moleküllere oranla daha fazla ısıtırlar (Çizelge 3.1) (Sambrook ve ark., 1989).

Çizelge 3.1. Agoroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri

Agaroz mik. (%)	DNA (kb)	Akrilamid mik. (%)	DNA (bç)
0.3	5-60	3.5	100- 1000
0.6	1-20	5.0	80- 500
0.7	0.8-10	8.0	60- 400
0.9	0.5-7	12.0	40- 200
1.2	0.4-6	20.0	10- 100
1.5	0.2-4		
2.0	0.1-3		

3.2. Agaroz konsantrasyonu

Bilinen büyüklükte lineer bir DNA parçası farklı agaroz konsantrasyonlarındaki jellerde farklı oranda göç eder. Jel konsantrasyonu (ϒ) ile DNA'nın elektroforetik hareketinin (μ) logaritması arasında aşağıdaki eşitlikle tanımlanan lineer bir ilişki mevcutur:

$\text{Log}\mu = \text{Log}\mu_0 . Kr\ \Upsilon$

μ_0: DNA'nın serbest elektroforetik hareketi ve

Kr: Gecikme sabitesi (Jelin özelliklerine, büyüklüğüne ve göç eden molekülün göç şekline bağlı sabit bir sayıdır) (Sambrook ve ark., 1989).

3.3. DNA'nın Konformasyonu

Aynı moleküler ağırlıktaki süperhelikal sirküler (form I), çentikli sirküler (form II) ve lineer DNA (form III), agaroz jellerde farklı oranlarda göç eder. Üç formun rölatif hareketi primer olarak jeldeki agaroz konsantrasyonuna bağlıdır. Fakat uygulanan akımın gücü, tamponun iyonik gücü ve form I DNA'nın süperhelikal kıvrımlarının yoğunluğu da bu hareketi etkilemektedir. Aynı şartlar altında form I DNA, form II DNA'dan daha hızlı göç eder; farklı şartlar altında ise durum tam tersidir (Sambrook ve ark., 1989).

3.4. Uygulanan Voltaj

Düşük voltajlarda, lineer DNA parçalarının göç oranı uygulanan voltajla orantılıdır. Yani agaroz jellerde etkili ayırma oranı voltaj arttıkça azalmaktadır. 2 kb'dan daha büyük DNA parçalarını maksimum oranda ayrıştırmak için agaroz jellere 5V/cm'den daha fazla voltaj uygulanmamalıdır. Mesafe jelin uzunluğu olarak değil, elektrodlar arasındaki en kısa yol olarak ölçülmelidir (Sambrook ve ark., 1989).

3.5. Elektrik Akımının Yönü

50-100 kb'dan daha büyük DNA molekülleri elektrik akımının yönü sabit kalırsa agaroz jelde aynı yönde göç ederler. Bununla birlikte elektrik akımının yönü periyodik olarak değiştirilerek DNA moleküllerinin zorunlu olarak yönlerini değiştirmesi sağlanır. Daha büyük olan DNA moleküllerinin yeni akım yönüne uyum sağlamaları daha uzun zaman alır. Pulsed-field jel elektroforezi ekstrem büyüklükteki DNA molekülü populasyonunu ayırmak için kullanılabilir (Sambrook ve ark., 1989).

3.6. Baz Kompozisyonu ve Isı

Poliakrilamid jellerin tersine agaroz jellerde DNA'nın elektroforetik davranışı, DNA'nın baz kompozisyonu veya elektroforez esnasındaki ısıdan pek etkilenmez. Yani agaroz jellerde, farklı büyüklükteki DNA fragmanlarının elektroforetik hareketi 4-30 ^{0}C arasında değişmez. Agaroz jel elektroforezi genelde oda ısısında yapılır. %0.5'ten daha az agaroz içeren jeller ve düşük kaynama ısılı agaroz jeller daha narindir ve zarar görmemeleri için elektroforezlerinin 4 ^{0}C'de gerçekleştirilmesi daha iyi sonuç verir (Sambrook ve ark., 1989).

3.7. Boyaların Etkisi

Ethidium bromid, agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'yı gözlemek için kullanılan floresan bir boyadır ve lineer DNA'nın elektroforetik hareketini %15 oranında azaltır. Boya, baz çiftlerinin arasına girerek lineer ve çentikli sirküler DNA moleküllerinin boyuna uzatarak onları daha rijit hale getirir (Sambrook ve ark., 1989).

3.8. Eletroforez Tamponunun Kompozisyonu

Elektroforez tamponunun iyonik gücü ve kompozisyonu DNA'nın elektroforetik hareketini etkiler. Ortamda iyonlar olmazsa elektriksel iletkenlik minimal düzeydedir ve DNA oldukça yavaş hareket eder. Yüksek iyonik güce sahip tamponlarda (10X elektroforez tamponu yanlışlıkla kullanılırsa) elektriksel iletkenlik oldukça etkili olur ve önemli oranda ısı ortaya çıkar. Daha da kötüsü jel kaynar ve DNA denatüre olur. Çift iplikli DNA'nın elektroforezi için kullanılabilen çeşitli tamponlar mevcuttur. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeliler halinde hazırlanırlar ve oda ısısında saklanırlar (Sambrook ve ark., 1989).

Agaroz jeller yatay kalıplara yaklaşık 0.5 cm kalınlıkta, poliakrilamid jeller ise dikey kalıplara 0.3 mm kalınlıkta dökülür. Oluşan DNA bantlarını jelde UV altında görebilmek için EtBr ile boyanması gerekmektedir. Boyama işleminde jel ya yürütme işleminden sonra EtBr içeren bir solüsyonda bekletilir ya da hazırlanma aşamasında içerisinde daha önceden hazırlanmış olan EtBr solüsyonu ilave edilir. Bu yöntemler ile 25 ng'dan az DNA içeren bantların gözlenmesi zordur. Bu nedenle DNA miktarı az olan DNA bantlarının incelenmesinde direk problama, southern blot ve otoradyografi gibi yöntemler kullanılır (Sambrook ve ark., 1989).

Jel elektroforezi ile PCR reaksiyonunun sonucu amplifikasyonunu gerçekleştirdiğimiz bölge pozitif kutba doğru hareket ederek bantları meydana getirir. Bantların büyüklüklerini tahmin etmede kullanılan kontrollerin yanında kesim reaksiyon ürünleri belli olan markerlar kullanılmaktadır. Örneğin, pUC 18 plazmid DNA'sının Hae III ile kesiminden büyüklükleri 587 bç ile 11 bç arasında değişen, 11 parça oluşur. Bu şekilde bir marker kullanarak düşük bir yanılma olasılığı ile fragmanların büyüklüğü tahmin edilebilir (Sambrook ve ark., 1989).

EK-4. Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz hazırlanmasında jel kalınlığı dikkate alınarak jel döküm tablasının boyutları ölçülür ve jel hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gerekli olan agaroz tartılır ve erlen içine koyulur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu ilave edilir ve mikrodalga fırında eritilir. Çok kısa süreli bir kaynama yeterlidir. Daha sonra jel üzerine son konsantrasyon 0.5 μg/ml olacak şekilde stok EtBr solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50 ^{0}C'ye geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür ve yaklaşık 30 dk beklenerek polimerize olması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzerini kapatacak şekilde 1X TBE tamponu eklenir.

4.1. Yükleme Tamponu (6X)

100 ml hazırlamak için;

40 gr Sukroz

0.25 gr Bromfenol mavisi

Belirtilen miktarlarda sukroz ve bromfenol mavisi tartılır, üzerine 100 ml distile su ilave edilerek vorteksle iyice karıştırılır. Daha sonra ependorf tüplere paylaştırılarak 4^{0}C'de saklanır. PCR ürünü DNA solüsyonu ile 1/5 oranında karıştırılır.

EK-5. Kullanılan Enzimler ve Tampon Sistemleri

5.1. Restriksiyon Endonükleazlar

Kullanılan restrüksiyon endonükleazlar Fermentas firmasından satın alındığından enzimlerin özelliklerinde ve tampon sistemlerinin sınıflandırılmasında bu firmanın katalog bilgileri esas alınmıştır (Çizelge 5.1).

Nükleotidler için kullanılan kısaltmalar:

A: Adenin, Y: C veya T, B: C veya G veya T,
T: Timin , M: A veya C, D: CA veya G veya T,
G: Guanin, K: G veya T, H: A veya C veya T,
C: Sitozin, S: G veya C, V: A veya C veya G,
R: G veya A, W: A veya T, N: A veya C veya G veya T

Çizelge 5.1. Restriksiyon endonükleazlar

	RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ			
	***Ita* I**	***Taq I α***	***MwoI***	***RsaI***
Tanıma Dizisi (5'→3')	GC NGC	T CGA	GCNNNNN NNGC	*GT AC*
İzoşizomeri	*Fnu4HI SatI Fsp4HI*	Yok	*BstMWI HpyF10VI*	*AfaI*
Çalışma sıcaklığı	37 ^{0}C	65 ^{0}C	37 ^{0}C	*37 ^{0}C*
Saklama sıcaklığı	–20 ^{0}C	–20 ^{0}C	–20 ^{0}C	*–20 ^{0}C*
Kaynağı	*Ilyobycter tartaricus*	*Thermus aquaticus*	*Methanotherm obacter wolfeii*	*Rhadobacter sphaeroides*
İnaktivasyonu	65 ^{0}C'de 10 dk	80 ^{0}C'de 20 dk	80 ^{0}C'de 20 dk	*65 ^{0}C'de 20 dk*
İnkübasyon tamponu ve konsantrasyonu	10X H	10X H	10X H	*10X H*
Hacim aktivitesi (U/μl)	*10*	*10*	*10*	*10*

EK-6. Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Genellikle amonyum persülfattan sağlanan serbest radikallerin varlığında ve TEMED (N,N,N',N', tetrametilen-diamin) in instabilize edici etkisi altında akrilamit monomerlerin uzun zincirler halinde polimerize olması sağlanır. İki fonksiyonlu bir ajan olan N, N'-metilenbisakrilamit polimerizasyon reaksiyonuna katıldığı zaman lineer akrilamit zincirlerini çapraz bağlayarak jeli oluşturur. Reaksiyon N,N'-metilenbisakrilamiti, akrilamit konsantrasyonunun 1/30'u oranında içermelidir. Jelin gözenekliliğini zincirlerin uzunluğu ve çapraz bağlanma oranı belirler. Zincirlerin boyunu belirleyen, polimerizasyon reaksiyonundaki akrilamidin konsantrasyonudur (%3.5-20). Reaksiyon, her 29 akrilamit monomeri için 1 molekül çapraz bağlayıcı yani bisakrilamit içermektedir. Nondenatüre jellerde farklı poliakrilamit konsantrasyonlardaki etkili ayrıştırma aralığı çizelge 6.1'de gösterilmiştir (Sambrook ve ark., 1989).

Çizelge 6.1. Akrilamit

AKRİLAMİT[a] (%w/v)	ETKİLİ AYIRMA ARALIĞI (bç)
3.5	1000-2000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
15.0	25-150
20.0	6-100

Poliakrilamit jellerin hazırlanması ve elektroforezi agaroz jele oranla oldukça zahmetlidir. Karışım, speysırlarla ayrılmış, ve alttan akması önlenmiş iki cam arasına dökülür. Poliakrilamit jeller, gerekli olan ayrıma bağlı olarak 10-100 cm arasında değişen uzunluklarda olabilir. Poliakrilamit jeller istisnasız olarak dikey çalışırlar. Agaroz jellerle kıyaslamada üç temel avantaja sahiptirler:

1) Ayırma güçleri o kadar büyüktür ki uzunlukları sadece % 0.2 oranında değişen (örneğin 500 bç'de 1 bç) DNA moleküllerini bile ayırabilir.

2) Tek bir poliakrilamit kuyusuna uygulanabilen DNA miktarı hem agaroza göre daha fazladır ve hem de rezolüsyonda bir fark yoktur.
3) DNA jelden daha saf ve çeşitli amaçlara uygun olarak izole edilebilir (Sambrook ve ark., 1989).

Çift iplikli DNA fragmanlarının purifikasyonu ve ayrımı için kullanılan nondenatüran poliakrilamit jeller: Bu jeller, polimerize olduktan ve örnekler uygulandıktan sonra 1X TBE'de ve düşük voltajda (1-8 V/cm) elektroforeze tabi tutulurlar. Elektrik akımı nedeni ile oluşan ısının küçük DNA fragmanlarını denatüre etmesini önlemek amacıyla düşük voltaj uygulanır (Sambrook ve ark., 1989)..

20 cmX40 cm'lik cam plakları tutmak üzere dizayn edilmiş bir çok vertikal elektroforez tankı, ticari kaynaklardan sağlanabilir. Uygun tanklarla daha büyük veya daha küçük jellerinde kullanımı mümkündür. Speysırlar 0.5-2 mm arasında değişebilen inceliktedir. Jel ne kadar kalın ise elektroforez esnasında o kadar fazla ısınır. Fazla ısınma kuyruklu DNA bantlarına ve daha başka problemlere sebep olur. Bu yüzden daha keskin ve yassı DNA bantlarına imkan tanıdığından ince jeller tercih edilir. Ayrıca büyük miktarlarda DNA hazırlamak gerektiğinde (1 μg/bant) daha kalın jeller kullanmak gereklidir (Sambrook ve ark., 1989).

6.1. %30 Poliakrilamit

29 gr akrilamit

1 gr N,N'-metilenbisakrilamit

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

100 ml %30'luk poliakrilamit solüsyonu hazırlamak için yukarıda verilen miktarlarda kimyasallar tartılır ve toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür. Kimyasal çözününce saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlanır. Kimyasalların iyice çözünmesi için solüsyon 37 ^{0}C'de su banyosunda bir süre bekletilir. 0.22 μm por çapına sahip steril filtreden süzülüp steril edilir ve oda ısısında saklanır.

6.2. %25 Amonyum Per Sulfat (APS)

0.125 gr APS

Saf su ile 0.5 ml'ye tamamlanır.

1.5 ml'lik temiz bir ependorf tüpüne yukarıda belirtilen miktarda APS tartılır ve üzerine saf su eklenir. Karışım iyice karıştırılır ve iyice çözülmesi için 37 ^{0}C'de su banyosunda bir süre bekletilir. 4 ^{0}C'de 1-2 hafta saklanabilir.

6.3. 5X TBE Tamponu (pH 8.0)

1 litre için;

54 gr Tris baz

27.5 gr Borik asit

0.01 M EDTA (pH 8.0)

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre oranlanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülür, NaOH ile pH 8.0'a ayarlanır ve otoklavlanır.

1 hacim 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek 1X TBE tamponu elde edilir.

6.4. Ethidium Bromid (EtBr= 10mg/ml)

Hazırlanacak hacim uyarınca gereken miktar Ethidium Bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve suda iyice karıştırılarak çözülür. Işığa hassas olduğu için renkli bir cam şişede veya alüminyum folyo sarılarak +4 C'de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5 μg/ml olacak şekilde ilave edilir.

EtBr, floresan bir boyadır ve DNA ve RNA'ya bazları arasından girerek kuvvetlice bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerinin belirlenmesini sağlar.