ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahaddin ARI

p53 YOLAĞINDA YER ALAN MDM2 VE p53 GENLERİNDE GÖRÜLEN TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZİMLERİNİN MEME KANSERLİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

ÇUKUROVA ÜNİVERİSTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

p53 YOLAĞINDA YER ALAN MDM2 VE p53 GENLERİNDE GÖRÜLEN TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZİMLERİNİN MEME KANSERLİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI

Bahaddin ARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ İle Kabul Edilmiştir.

İmza:.....	İmza:.....	İmza:.....
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ	Prof.Dr.Hikmet AKKIZ	Prof.Dr.Burhan ARIKAN
DANIŞMAN	İKİNCİ DANIŞMAN	ÜYE

İmza:.....	İmza:.....
Prof. Dr. Sadık DİNÇER	Doç. Dr. İ. Oğuz KARA
ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod no:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF2006YL61

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

p53 YOLAĞINDA YER ALAN MDM2 ve p53 GENLERİNDE GÖRÜLEN TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZİMLERİNİN MEME KANSERLİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI

Bahaddin ARI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Hatice KORKMAZ
: Prof. Dr. Hikmet AKKIZ
Yıl : 2008, **Sayfa**:**73**
Jüri : Doç. Dr. Hatice KORKMAZ
Prof. Dr. Hikmet AKKIZ
Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Doç. Dr. İsmail Oğuz KARA

Kadınlarda meme kanseri dünya çapında en yaygın malignansidir. Sporadik insidansın yüksek olmasına karşın ailesel oran düşüktür. TP53 tümör suppressor geni kromozom 17 üzerinde lokalize olmuştur ve muhtelif malignansilerle ilişkilidir. Yeni ortaya çıkarılmış bir polimorfizm olan MDM2 promotor bölgesi polimorfizmi de yine bir çok kanserle ilişkilidir. Bu çalışmada; meme kanserli hastalarda, kodon 72 TP53 ve MDM2 SNP309 polimorfizmi araştırılmıştır. Polimorfizm ve allel frekansları için 75 meme kanserli hastadan ve kontrol için 75 sağlıklı kan vericisinden kan alındı. Periferal mononüklear kan hücrelerinden DNA ekstrakte edilerek PCR tabanlı RFLP işlemi uygulandı. Meme kanserli hastalar ve Kontrol grupları arasında sırayla kodon 72 için frekans; homozigot arjinin %38,7 ve %45,3, homozigot prolin %13,3 ve %12, heterezigot Arg/Pro %48 ve %42,7 şeklinde bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arasında allel frekansları açısından anlamlı bir farklılık yoktur. Buna göre TP53 kodon 72 polimorfizminin Türk popülasyonu açısından meme kanseriyle ilişkisi gösterilememiştir. Meme kanserli hastalar ve Kontrol grupları arasında sırayla SNP309 için frekans; homozigot GG %28 ve %20, homozigot TT %20 ve %26,7 heterezigot T/G %52 ve %53,3 şeklinde bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arasında allel frekansları açısından anlamlı bir farklılık yoktur. Buna gore MDM2 SNP309 polimorfiziminin türk popülasyonu açısından meme kanseriyle ilişkisi gösterilememiştir.

Anahtar kelimeler: Meme Kanseri, Polimorfizim, TP53, Kodon 72, MDM2, SNP309, PCR, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).

ABSTRACT

MSc THESIS

RESEARCH OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS FOUND IN MDM2 and p53 GENES IN p53 PATHWAY ON PATIENTS WITH BREAST CANCER

Bahaddin ARI

DEPARTMENT OF BIOLOGY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Doç. Dr. Hatice KORKMAZ

: Prof. Dr. Hikmet AKKIZ

Year :2008, **Page**:**73**

Jury : Doç. Dr. Hatice KORKMAZ

Prof. Dr. Hikmet AKKIZ

Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Prof. Dr. Sadık DİNÇER

Doç. Dr. İsmail Oğuz KARA

Breast cancer is the most common female malignancy worldwide. Despite the high incidence of sporadic cases, the rate of familial breast cancer is low. The tumor suppressor gene TP53 (alias p53), located on chromosome 17, has been involved in various malignancies. A novel polymorphism in the promoter region of MDM2 was associated with cancers. Polymorphisms in codon 72 of TP53 and MDM2 SNP 309 have been studied in breast cancer. For study of polymorphisms and allele frequency, 75 female patients with breast cancer and 75 healthy blood donors as control group were recruited. DNA from peripheral blood mononuclear cells was extracted and amplified using RFLP based polymerase chain reaction. Frequency of homozygotic arginine at codon 72 was %38,7 in patients and %45,3 in controls, for homozygotic proline it was %13,3 and %12, and for heterozygotic Arg/Pro it was %48 and % 42,7, respectively. No significant difference was found between patients and controls regarding allele frequencies. Polymorphism in codon 72 of TP53 gene was not associated with breast cancer in Turkish patients. Frequency of homozygotic GG at SNP309 was %28 in patients and %20 in controls, for homozygotic TT it was %20 and %26,7, and for heterozygotic T/G it was %52 and %53,3, respectively. No significant difference was found between patients and controls regarding allele frequencies. Polymorphism in SNP309 MDM2 gene and was not associated with breast cancer in Turkish patients.

Key words: Breast cancer, Polymorphism,TP53, Codon 72, MDM2, SNP309, Restriction, PCR, Fragment length polymorphism (RFLP).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her türlü konuda yardımcı olan ve yön gösteren Sayın Hocalarım, **DOÇ. DR. HATİCE KORKMAZ** ve **PROF. DR. HİKMET AKKIZ'**a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca teknik konulardaki yardımları için Ç.Ü. Fen- Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü Araş. Gör. **Süleyman BAYRAM,** Ç.Ü. Tıp Fak. İç Hastalıkları Gastroenteroloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuarı Sorumlusu **Sağlık Teknikeri Aynur BEKAR** ve ADANA Numene Hastanesi Sağlık Çalışanı **Rukiye GELİŞKEN**'e teşekkürlerimi sunarım.

Projemizi maddi yönden destekleyen Ç.Ü. araştırma fonu yöneticilerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
KISALTMALAR VII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
1.GİRİŞ 1
1.1. Meme Kanserinin Epidemiyolijisi 1
1.1.1. Coğrafi Çeşitlilik 3
1.1.2. Yaş 3
1.1.3. Genetik ve ailesel öykü 3
1.2. Benign ve Malign Neoplazmlar 6
1.3. Kanserin Moleküler Temeli 7
1.3.1. Hücre Döngüsü 7
1.3.2. Siklin Alt Üniteleri ve CDK-Siklin Kompleksleri 7
1.3.3. Büyüme Faktörleri ve D Siklinler 10
1.3.4. CDK İnhibitörleri 10
1.3.5. Kontrol Noktaları 11
1.3.6. Protonkogen-Onkogen aktivitesi 13
1.3.7. Büyüme Faktörleri İle İlgili Aktiviteye Bağlı Olarak Gözlenenler 14
1.3.8. Nüklear Onkogenler 16
1.3.9. Tümör Süpressörler ve Bazı önemli Kanser yolaklar veya ağları 16
1.3.10. P53 Tümör Süpressör Yolağı 20

1.4. Tek Nükleotid Polimorfizimlerin Önemi 23
1.5. MDM2 SNP 309 polimorfizimi 24
1.6. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizimi 29
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....30
2.1. p53 kodon 72 genetik Polimorfizmi ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....30
2.2. MDM2 SN309 Genetik Polimorfizmi ile İlgili Yapılan Çalışmalar 31
3.MATERYAL VE METOD 33
3.1. Materyal.....33
3.2. Periferik Venöz Kandan DNA İzolasyonu 34
3.3. Primerler, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi İçin Kullanılan Enzimler.....35
3.3.1. MDM2 SNP309 T/G Polimorfizminin Yer Aldığı Genomik İnsan DNA'sının Amplifikasyonu İçin Gerekli Primer Çifti (İontek).....35
3.3.2. MDM2 SNP309 T/G polimorfizminin tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....36
3.3.3. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizminin Yer Aldığı Genomik İnsan DNA'sının Amplifikasyonu için gerekli Primer Çifti (İonntek).....36
3.3.4. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizminin tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....37
3.3.5. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile MSPA1I (New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon Enzimi Kullanılarak MDM2 Geninin Genotiplendirilmesi 38
3.3.6. MSPA1I (New England Biolabs, Beverly, MA) RestriksiyonEnzimi.....39
3.3.7. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly,) Restriksiyon Enzimi Kullanılarak p53 Genin Genotiplendirilmesi....40
3.3.8. *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon Enzimi 41
3.4. Agaroz Jel Elekroforezleri.....43

3.4.1 %2'lik Agaroz Jel Elekroforezi 43
3.4.2. %3'lük Agaroz Jel Elekroforezi 44
3.5. Jelin Görüntülenmesi 46
4. BULGULAR 47
4.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasındaki P53 Kodon72 RFLP Sonuçlarının Genotip ve Allel İnsidansları 47
4.2. Hasta ve Kontrol Grupları Arasındaki MDM2 SNP 309 T/G RFLP Sonuçlarının Genotip ve Allel İnsidansları 52
5. TARTIŞMA 58
5.1. p53 kodon 72 Arg/Pro polimorfizminin Meme Kanseriyle ilişkisi 58
5.2. MDM2 SNP 309 polimorfizminin Meme Kanseriyle ilişkisi 61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 64
KAYNAKLAR 66
ÖZGEÇMİŞ 73

KISALTMALAR

A	: Adenin
Abl	: Retrovirüs ilişkili DNA sekansı, Abelson murin lösemi, p-onc
AP1	: Adaptör-ilişkili protein kompleksi 1
APC	: Adenomatous poliposis koli proteini
ARG	: Arjinin
ATM	: Ataxia telangiectasia mutantı
BAX	: BCL2 ilişkili X proteini
Bcl2	: B-hücre lösemi/lymphoma 2
Bç	: Baz çifti
BRCA1	: Meme kanseri 1 geni (Breast cancer 1)
BRCA2	: Meme kanseri 2 geni (Breast cancer 2)
BstUI	: *Bacillus stearothermophilus*
C	: Sitozin
CAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CDC	: Hücre bölünme döngüsü
Cdc25C	: Hücre bölünme döngüsü 25 homoloğu
Cdh1	: Cadherin 1, tip 1, E-cadherin
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CSF1	: Koloni sitümüle edici faktör 1
DBD	: DNA bağlanma bölgesi
DNA	: Dezoksiribonukleik Asit
erbA	: Hormon reseptör, alfa
ERBB2	: v-erb-b2 eritroblastik lösemi viral onkojen homoloğu 2
FMS	: CSF1 reseptörü, felin sarkoma viral (v-fms) onkojen homoloğu
Fos	: v-fos FBJ mürin osteosarkoma viral onkojen homoloğu
G	: Guanin
GADD45	: Büyümeyi durdurucu ve DNA hasar-arrtırıcı protein 45
GDP	: Guanozin difosfat

GTP : Guanozin trifosfat

JAK : Janus tirozin kinaz

Jun : Jun onkojeni

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

$MgCl_2$: Magnezyum klorür

Myc : v-myc myelocytomatosis viral onkojen homoloğu

NFκB : Nüklear faktör kappa B

p14ARF : CDKN2A, Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A

p15 : CDKN2B, CDK inhibitör proteini

p16 : CDK4 inhibitörü

p21CIP : Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A (P21)

p27 : Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B

p53 : Tümör proteini

PCNA : Prolifere edici hücre çekirdek antijeni

PI3K : Fosfotidil-inositol 3-kinaz

Pmol : Pikomol

PP : Prolince zengin domein

PRO : Prolin

PTCH1 : Patched homolog 1

PTCH2 : Patched homolog 1

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

R : Restriksiyon noktası

Rad51 : RAD51 homoloğu (RecA homolog, E. coli) [H. sapiens]

RB1 : Retinoblastoma 1

REL : v-rel retiküloendotelyus viral onkojen homoloğu [H. sapiens]

RFLP : Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

SNP : Tek Nükleotid Poliformizmi

SP1 : Belirlilik proteini 1

STAT : Sinyal iletme ve transkripsiyon aktivatörü

SUFU : Erime baskılayıcı homolog

T : Timin

TET : Tetramerizasyon domeyni

TGF-β : Transforme edici büyüme faktörü, beta 1

TM : Erime Sıcaklığı

TP53 : Tümör proteini p53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Meme kanserinde faktörlere göre göreceli risk **2**

Çizelge 1.2. Hücre Döngüsü evrelerine göre siklinler ve CDK..... **8**

Çizelge 1.3. CDK/Siklin kompleksleri ve inhibitörleri **11**

Çizelge 1.4. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümü **14**

Çizelge 1.5. Önemli kanser türleri ve onlarla ilişkili tümör süpressör genler, onkogenler ve yolakları **19**

Çizelge 3.1. Kullanılan primerlerin uzunlukları, TM sıcaklıkları, G-C oranları **35**

Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin DNA amplifikasyonu sırasındaki konumları **35**

Çizelge 3.3. Kullanılan primerlerin uzunlukları, TM sıcaklıkları, G-C oranı **36**

Çizelge 3.4. Kullanılan primerlerin DNA amplifikasyonu sırasındaki konumları **37**

Çizelge 4.1. p53 kodon 72 bölgesi genotiplerinin kanser ve kontrol gruplarınagöre karşılaştırılması ve % dağılımları **50**

Çizelge 4.2. p53 kodon 72 Meme kanserli hastalar ile kontrol grubu arasındaki Ki kare testi anlamlılık sonuçları **50**

Çizelge 4.3. Genotipler açısından kanser riskininin lojistik regresyon analizi **51**

Çizelge 4.4. Genotipler açısından kanser riskininin lojistik regresyon analizi **51**

Çizelge 4.5. p53 kodon 72 bölgesi genotiplerinin kanser ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması ve % dağılımları **55**

Çizelge 4.6. MDM2 SNP309 Meme kanserli hastalar ile kontrol grubu arasındaki Ki kare testi anlamlılık sonuçları **56**

Çizelge 4.7. Genotipler açısından kanser riskininin
lojistik regresyon analizi **57**
Çizelge 4.8. Aleller açısından kanser riskininin
lojistik regresyon analizi **57**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. DNA'nın onarılması **5**
Şekil 1.2. CDK aktivasyonu ve hedef proteinin fosforilasyonu **8**
Şekil 1.3. CDK aktivitesinin moleküler organizasyonu **9**
Şekil 1.4. Hücre Dögüsü ve Kontrol Noktaları **12**
Şekil 1.5. CSF1 reseptörü ve fms onkogen ürünü **15**
Şekil 1.6. Normal G proteini ve ras onkogeni **15**
Şekil 1.7. Sporadik retinoblastoma **17**
Şekil 1.8. Ailesel retinoblastoma **18**
Şekil 1.9. p53 tümör süpressör yolağı **21**
Şekil 1.10. DNA hasarı ve p53 aktivasyonu **22**
Şekil 1.11. Kanserin genel yolakları **23**
Şekil 1.12. Mdm2 SNP309 polimorfizmi ve p53 baskılanması..... **28**
Şekil 1.13. p53 proteinin domein organizasyonu. TA, transaktivasyon domeini**…..29**
Şekil 3.1. Çalışmaya katılan meme kanserli hastaların coğrafi dağılımı**…….....33**
Şekil 3.2. MB Advanced DNA Analysis.
Version 6.71 programı sümülasyon resmi **38**
Şekil 3.3. MB Advanced DNA Analysis. Version 6.71
programı nükleotid kesim noktaları **38**
Şekil 3.4. MB Advanced DNA Analysis. Version 6.71
programı nükleotid kesim noktaları **41**
Şekil 3.5. p53 ve Mdm2 agaroz jel simülasyon **45**
Şekil 4.1. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizminin
tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunun %2'lik
agaroz jeldeki görüntüsü **47**
Şekil 4.2. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile *Bst*UI
(New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon
Enzimi Kullanılarak p53 Genin analizi **48**

Şekil 4.3. p53 kodon 72 bölgesinde Arg/Arg, Arg/Pro ve Pro/Pro genotipli olguların Kontrol Grubu ve Meme kanserli hastalar arasındaki dağılımının grafiksel karşılaştırılması **51**

Şekil 4.4. MDM2 SNP309 T/G Polimorfizminin Tespiti için Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunun %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü **53**

Şekil 4.5. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile MSPA1I (New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon Enzimi Kullanılarak p53 Genin analizi **54**

Şekil 4.6. MDM2 SNP309 bölgesinde GG, TG ve TT genotipli olguların Kontrol Grubu ve Meme kanserli hastalar arasındaki dağılımının grafiksel karşılaştırması **56**

1.GİRİŞ

1.1. Meme Kanserinin Epidemiyolijisi

Amerikan Kanser Derneği 2001 yılında 192.000 yeni meme kanser olgusu ve bunlara bağlı 40.860 ölüm bildirmiştir. Kanserlere bağlı ölümlerde, akciğer kanserinden sonra meme kanseri ikinci sırada yer almaktadır. Tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen meme kanserli kadınların yaklaşık dörtte birinin hastalığa bağlı olarak ölümleri beklenmektedir. Bununla birlikte, Amerika Birleşik Devletlerinde, her sekiz kadından biri hayatı boyunca risk altındadır ve meme kanserli kadınların %75'i 50 yaşın üzerindedir. Kırk yaşından daha gençlerde meme kanseri görülme oranı sadece %5'dir. Bilinmeyen nedenler ile meme kanser insidansı tüm dünyada artmıştır. Birleşik Devletlerde 1980'li yıllarda bu artış %3-4 oranında iken günümüzde yüzde bir civarındadır. Günümüzde her 100.000 kadının 111'inde meme kanseri izlenmekte ve yükselme ivmesi bir plato çizmektedir. Meme kanserinden sorumlu muhtemel etkenlerin saptanması ve tedaviyi mümkün kılacak erken tanıya ulaşılması için çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Kumar ve ark., 2004).

Çizelge 1.1. Meme kanserinde faktörlere göre göreceli risk.

FAKTÖR	GÖRECELİ RİSK
Coğrafik Faktörler	Değişik bölgelerde faklılık göstermekte
Yaş	30 yaşın üzerinde risk artmakta
Aile öyküsü	
1. derece yakınında meme kanseri	1.2-3.0
Premenopozal dönem	3.1
Premenopozal dönem ve bilateral	8.5-9.0
Postmenopozal dönem	1.5
Postmenopozal dönem	4.0-54
Menstruel öykü	
Menarş yaşı < 12 yaş	1.3
Menopoz yaşı >55	1.5-2.0
Gebelik	
25-29 yaşlarında ilk canlı doğum	1.5
30 yaşın üzerinde ilk canlı doğum	1.9
35 yaşın üzerinde ilk canlı doğum	2.0-3.0
Doğum yapmamış kadınlarda	3.0
Benign meme hastalıkları	
Proliferatif hastalık	1.9
Atipik hiperplazili proliferatif hastalık	4.4
Lobüler karsinoma insitu	6.9-12.0

1.1.1. Coğrafi Çeşitlilik

Meme kanserinin insidansı ve mortalite oranları, ülkeler arasında şaşırtıcı farklılıklar göstermekle beraber meme kanseri görülme riski Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da, Asya ve Afrika'ya göre daha yüksektir. Birleşik devletlerdeki risk ve Japonya'ya göre ölüm oranı 5 misli daha fazladır. Bu farklılıkların genetik orijinden ziyade çevresel faktörlere bağlı oldukları sanılmaktadır. Çünkü düşük insidanslı bir bölgeden yüksek insidanslı bir bölgeye göç edenlerde (veya tam tersi), göç ettikleri bölgenin kanser oranlarına adaptasyon sağlanmaktadır. Diyet reprodüktif patern ve beslenme alışkanlıklarının da etkilediği düşünülmektedir (Kumar ve ark., 2004).

1.1.2. Yaş

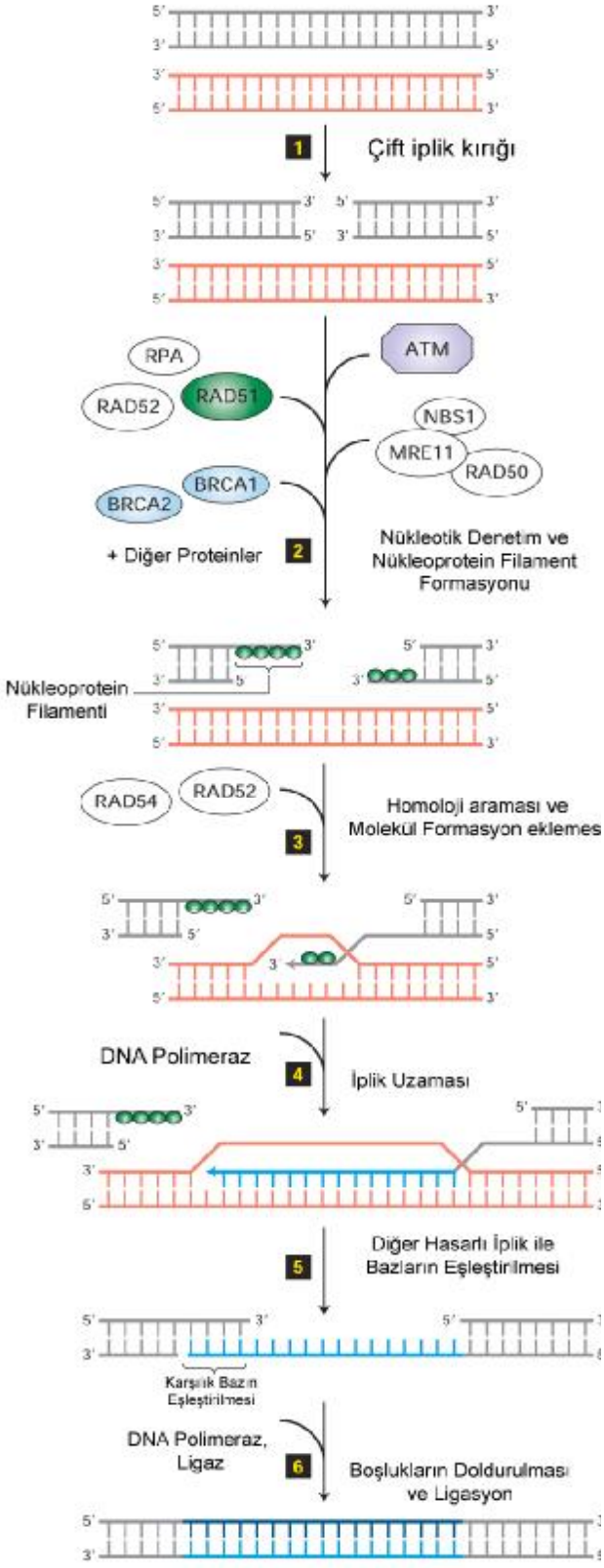
30 yaşın altındaki meme kanserleri nadirdir. Bu yaştan sonra yaşam boyu risk giderek daha artar. Menopozdan sonra ise bu yüksek ivme plato çizer.

1.1.3. Genetik ve ailesel öykü

Meme kanserlerinin ortalama %5-10'nun spesifik kalıtsal mutasyonlarla ilgili olduğu kabul edilmektedir. Meme kanserine duyarlı bir gen taşıyan kadında şayet bir kanser gelişimi söz konusu ise bu menopozdan önce ortaya çıkar, bilateral kanser niteliğindedir, diğer kanserlerle birlikteliklere sahiptir (örneğin over kanseri), anlamlı bir ailesel öyküye sahiptir (akrabalarından birçoğu menopoz öncesi hastalığa yakalanmıştır), ya da bazı etnik gruplara aittir. Ailesel meme kanserli kadınların ortalama yarısı BRCA1 geninde (kromozom 17q21.3'de lokalize) mutasyonlara sahiptir ve ayrıca 1/3'ünde BRCA2'de mutasyonlar (kromozom 13q12-13'te) söz konusudur. Bunlar büyük kompleks genlerdir ve biri diğeri ile yada diğer bilinen genlerle yakın bir benzerlik içinde değillerdir. Söz konusu genlerin karsinogenezisteki kesin rolü ve meme kanserine ilişkin rölatif spesifitesi hala tam olarak açıklığa kavuşmuş olmamakla birlikte, bu genlerin ikisinin de DNA tamirinde

kritik rol oynadığı düşünülmektedir. Bu genler tümör baskılayıcı gen özelliğindedir. Penetrans derecesi, kanser başlangıç yaşı, diğer kanser tiplerine yatkınlık ve mutasyon tipi ile değişir. Bunun yanında çoğu taşıyıcıda meme kanseri 70 yaş civarında gelişirken, mutasyon taşımayan kadınlarda kanser gelişimi sadece %7'dir. Bu genlerin ailesel olmayan sporadik meme kanserlerindeki rolü açık değildir, çünkü bu tümörlerde mutasyonlar nadiren görülür. Sporadik kanserlerde gen aktivasyonunda işlev gören düzenleyici genlerdeki metilasyonlar gibi diğer mekanizmaların rol oynadığı olasılığı söz konusudur. Meme kanseri ile birliktelik gösteren daha az alışılagelmiş genetik hastalıklar içersinde Li-Fraumeni sendromu Cowden hastalığı ve ataksia-telanjiektezia gen taşıyıcılarıdır (Kumar ve ark., 2004).

İyi tanımlanmış familyal sendromlar malignitelerin oluşumunu sağlamakla birlikte sporadik meme kanserlerde de genetik değişikliklerin rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer kanserlerde olduğu gibi çoğu protoonkogeni ve tümör süpressör genleri etkileyen mutasyonlar meme epitelinde onkogenik transformasyon prosesine yardım ederler. Bunların arasında en karekteristik olan ve meme kanserlerinin %30'unda izlenen ERBB2 (HER/NEU) protoonkogeninin ifadesinin artmasıdır. Bu gen epidermal büyüme faktör reseptör ailesindendir ve bunun over ekspresyonu kötü prognozla birliktedir. Aynı şekilde, bazı meme kanserlerinde RAS ve MYC genlerinin amplifikasyonu gösterilmiştir. Tümör süpressör genlerden RB1 ve TP53'te de mutasyonlar olabilir. Çok muhtemeldir ki normal epitelyum hücresinin kanseröz hücreye dönüşmesinde multipl kazanılmış mutasyonlar etkili olmaktadır.



Şekil 1.1. DNA'nın onarılması

S fazı sırasında hücreler her bir kromozomunu kopyalayarak özdeş iki sister kromatid oluştururlar. Şekildeki Siyah ve kırmızı olarak gösterilen DNA'lar homolog sekanslara sahip kardeş kromatidlerdir. **1. adım**: Kromatid içinde bir çift zincirli DNA kırık formdadır. **2. adım**: kırık çift zincir ATM kinazı aktive eder. Ekzonükleaz setinin aktivasyonuna liderlik eden ATM kinaz oluşan bu kompleksle beraber her iki kırık zincirden nükleotidleri 3'-5' yönünde kaldırılmasında rol oynar. Sonunda 3' ile sonlanan tek iplikli bir yapı oluşurulur. Bu proseste BRCA1 ve BRCA2 proteinleri ve diğer proteinler (örneğin Rad51) tek iplikli DNA ile bir serbest 3' ile sonlanan nükleoprotein filament oluşumu için polimerizasyon ile lişkilidir. **3. Adım**: Bir Rad51 nükleoprotein flament, kardeş kromatid üzerinde homolog çift iplikli DNA sekansı için tarama yapar. Ondan sonra ortak molekül formasyonunun yaratılması için çift iplikli formu istila eder ve homolog DNA ipliği üzerinden 3' ile sonlanan tek iplikli DNA yapısının eksik olan bazları komplomenteriyle eşlenir. **Adım 4**: Replikatif DNA Polimeraz hasarlı DNA ipliğini, kalıp olarak kullandığı hasarlı olmayan DNA segmentinin komplementar sekansları ile uzatır. **Adım 5**: bundan sonra bu onarılmış 3' ile sonlanan DNA ipliği hasarlı diğer 3' ile sonlanan DNA ipliğine kalıplık görevini yaparak eşleşmesini sağlar. **Adım 6**: geride kalan herhangi bir boşluk DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimleriyle doldurulur.

1.2. Benign ve Malign Neoplazmlar

Neoplazi'nin sözcük anlamı yeni büyümedir. Willis neoplazmı, normal dokuyu aşan ve onunla koordine olamayan, değişme yol açan, uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal doku kitlesi olarak tanımlamıştır. Esas olarak bütün neoplazmların kökeni, normal büyüme kontrollerine cevabın kaybıdır. Neoplastik hücreler belirgin derecede normal hücre büyümesini kontrol eden düzenleyici etkilerden bağımsız çoğalma devam ettiğinden, değişime uğradığı söylenir. Ayrıca neoplazmlar parazit gibi davranarak metabolik ihtiyaçları için normal hücreler ile yarışırlar. Neoplazmlar belirli derecede otonomiden hoşlanır ve lokal çevreleri ile konakçının beslenme durumuna bakmaksızın az veya çok büyüklüğünü arttırırlar. Buna karşın otonomileri tam değildir. Bazı neoplazmlar endokrin desteğe gerek duyar ve böyle bağımlılıklar neoplazm için dezavantaj oluşturabilirler. Genel tıp kullanımında neoplazm sıklıkla tümör olarak ve tümör konusu da onkoloji olarak anılır. Onkolojide neoplazmların benign ve malign kategorilere ayrılması çok önemlidir. Bu sınıflandırma neoplazmın potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesine dayanır. Bir tümörün mikroskobik ve makroskobik özellikleri ile göz önünde bulundurularak nispeten sessiz kabul edildiğinde yani lokalize kalacağı, diğer bölgelere yayılmayacağı ve bu nedenle lokal cerrahi çıkarılma ile hastanın sağ kalacağı düşünülürse benign olduğu söylenir. Ama unutulmaması gereken başka bir ayrıntı ise benign tümörlerin lokalize şişliklerden daha fazla sorun yaratacağı bazen ciddi hastalıklara yol açabileceğidir.

Malign tümörler topluca kanser olarak adlandırılır. Latince yengeç denmesi bu açıdan manidardır. Malign olarak değerlendirilen neoplazm komşu yapılara yayılan onları harap eden ve uzak bölgelere yayılarak yani metastaz yaparak ölümlere yol açabilen bir lezyondur.

Birçok kanser türünün yüksek mortalite oranına sahip olması yüzünden kanser, dünya çapında tüm hastalıklar arasında kardiovasküler hastalıklardan sonra ölüme yol açan en önemli etkendir. İşte tüm bu nedenlerden ötürü kanserin moleküler patogenezinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

1.3. Kanserin Moleküler Temeli

Kanserin moleküler temelinin anlaşılabilmesi için öncelikle hücrede gerçekleşen bazı temel olayların detaylı bir şekilde irdelenmesinde fayda vardır. Bunlar sırasıyla: Hücre Döngüsü, Protonkojen-Onkojen aktivitesi ve tümör süpressör yolaklarıdır. Tüm dünyada bilim insanları yoğun bir şekilde bu birbirlerinden ayrılamayan mekanizmalar üzerinde çalışmaktadır.

1.3.1. Hücre Döngüsü

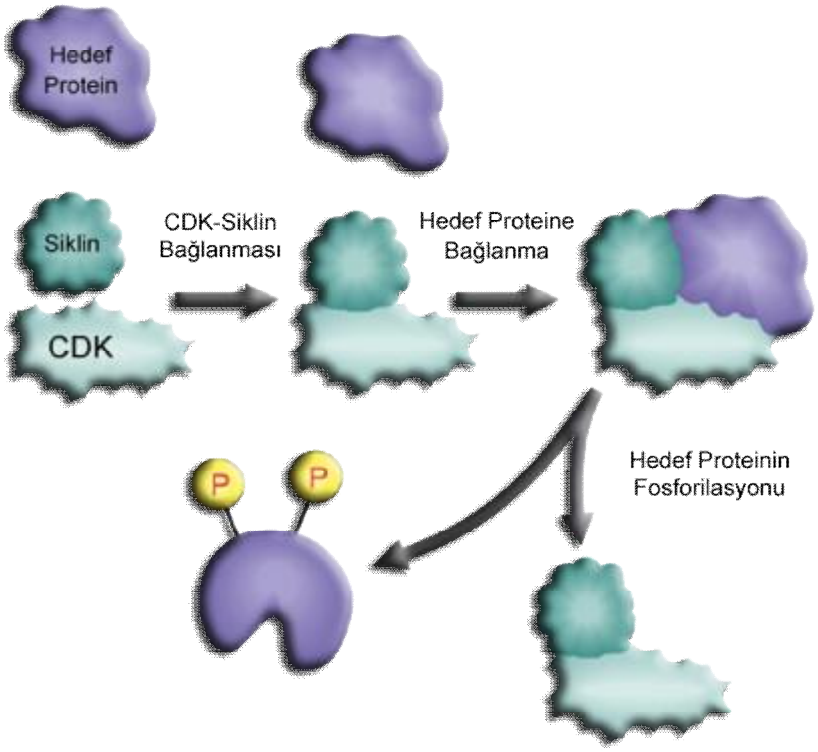
Hücre Döngüsü prolifere olmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Hücre döngüsü, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku yenilenmeleri ile yakın ilişki içinde bulunmaktadır. İşte tüm bu düzenleme fonksiyonlarının hücre döngüsü içinde yer alışı organizmadaki hemen her tür fizyolojik veya patolojik durumda hücre döngüsünün nedenli kritik bir öneme sahip olduğunu gösterir (El-Deiry ve ark., 1993).

Hücre döngüsünün tümü belirgin bir evreler dizisi olmaktan çok bir süreklilik durumudur fakat kolaylık açısından döngünün alt kategorizasyonunun yapılması bir nevi adet haline gelmiştir. Kısaca hücre döngüsü İnterfaz ve mitoz olarak ikiye ayrılabilir. İnterfaz sırasıyla G1, G0, S ve G2 evresine ayrılabileceği gibi mitos da Profaz, Metazfaz, Anafaz ve Telofazdan şeklinde alt kategorize edilebilir. (Klug ve ark., 2002).

1.3.2. Siklin Alt Üniteleri ve CDK-Siklin Kompleksleri

Hücre döngüsü, çoklu protein kinaz kompleksleri tarafından katalizlenen protein fosforilasyonu aracılığıyla kontrol edilir (Klug ve ark., 2002). Bir CDC *(cell cycle division = hücre bölünme döngüsü)* kinaz, bir siklinle çalıştığında buna cdk

protein *(cylic dependent kinase = siklin bağımlı kinaz proteini)* denir. CDK'lar kendi başlarına bulunduklarında inaktiftirler ancak siklinlerle etkileşime girerek aktifleşirler ve böylece aktif SİKLİN-CDK kompleksleri meydana getirebilirler. Bu aktif kompleks hedef proteinleri fosforile ederek döngünün devamlılığını sağlar CDK-SİKLİN protein kompleksinde CDK'lar katalitik alt üniteler iken siklinler regüle edici alt üniteler şeklinde görev yapar (Alberts ve ark., 2002).

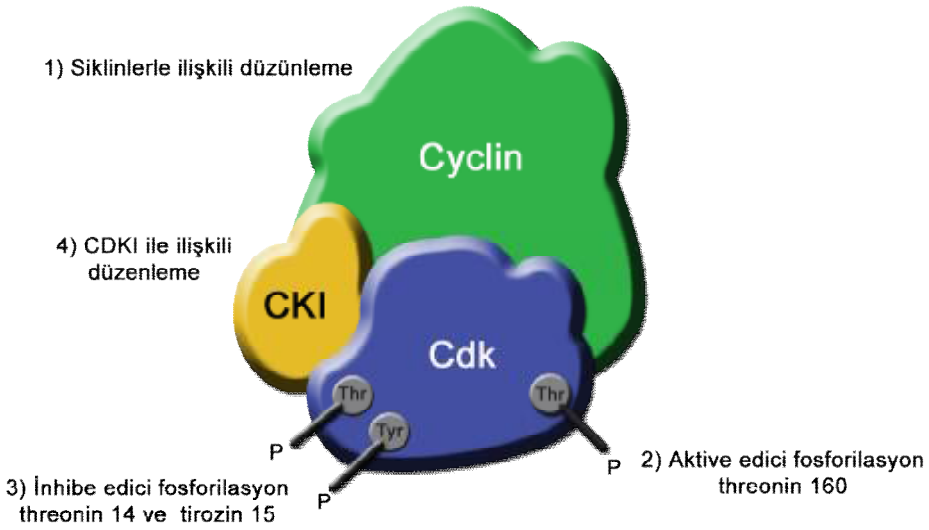


Şekil 1.2. CDK aktivasyonu ve hedef proteinin fosforilasyonu

Çizelge 1.2**.** Hücre Döngüsü evrelerine göre siklinler ve CDK partnerleri.

Siklin-CDK Kompleks	**Siklin**	**CDK Partner**
G1-Cdk	Siklin D	Cdk4, Cdk6
G1/S-Cdk	Siklin E	Cdk2
S-Cdk	Siklin A	Cdk2
M-Cdk	Sklin B	Cdk1

Hücre döngüsünün ilerlemesi esnasında CDK aktivitesi en az 4 moleküler mekanizmayla düzenlenir. Düzenlemenin ilk basamağı CDK'ların kendi siklinleriyle eşleşmesidir. İkinci regülasyon CDK/SİKLİN kompleksinde CDK'nın 160. pozisyonu civarında fosforile edilmesidir. CDK'ların fosforilasyonla aktivasyonu "CAK" (CDK aktive edici kinaz) ile katalizlenir. Bu katalizörün esası da yine bir CDK kompleksidir (CDK7/SİKLİN-H). CDK7/SİKLİN-H kompleksi aynı zamanda RNA polimeraz II ile yapılan transkripsiyonda ve DNA tamirinde de görev yapar. Üçüncü regülasyon ise CDK proteinlerinin amino ucundaki threonin ve tirozin ile gerçekleşen inhibisyondur. Özellikle CDK1 ve CDK2, threonin 14 ve tirozin 15'in fosforlanması ile inhibe edilir. Daha sonra CDK25 fosfataz ile defosforile edildiğinde aktif hale gelir. Son regülasyon ise CDK/SİKLİN komplekslerine inhibitör proteinlerinin bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Ayrıca inhibitörlerde bir CDK inhibitör ailesi oluşturur. Örneğin p16 CDK inhibitör proteini CDK4-CDK6/SİKLİN D kompleksine bağlanarak hücreyi özellikle G1 evresinde inhibe eder. (Alberts ve ark., 2002).



Şekil 1.3. CDK aktivitesinin moleküler organizasyonu

1.3.3. Büyüme Faktörleri ve D Siklinler

Dinlenme fazındaki (G0) bir hücre, büyüme faktörleri tarafından tekrar hücre siklusuna dahil edilebilir. Büyüme faktörü sinyalleri ile hücre döngüsü arasındaki kritik ilişki D-Siklinler ile düzenlenir. D tipi siklinler çabuk yıkılabildiğinden, büyüme faktörleri ortamdan uzaklaştığında hücre içi derişimleri hızla düşer böylece büyüme faktörleri G1 evresinde olduğu müddetçe Cdk4/Siklin-D kompleksi, hücre döngüsünün, G1-S kontrol noktasından geçmesini sağlar. Eğer bu kısıtlama noktasından önce büyüme faktörleri ortadan kalkarsa hücrede Siklin D düzeyi birden düşer ve hücre siklusu G0'da sessiz, stabil kalır. Siklin-D'nin düzensiz ekspresyonu lenfoma ve göğüs kanserleri gibi çeşitli kanserlerin gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca Cdk4/siklin D kompleksine bağlanan Cdk inhibitörlerine ait mutasyonlar, kanser hücrelerinde çokça rastlanmaktadır.

1.3.4. CDK İnhibitörleri

Hücre döngüsü, sadece büyüme faktörleri değil; döngünün devamını engelleyen çeşitli sinyallerle de düzenlenir. Örneğin hücre temasları ve çeşitli ekstraselüler faktörler hedef hücre proliferasyonunu uyarmak yerine inhibe ederler. Bu gibi inhibitör sinyallerin etkileri çoğunlukla Cdk inhibitörlerinin uyarısı ile harekete geçen hücre döngüsü regülatörleriyle desteklenir. p53 tümör süpressör geninin bir DNA hasarına verdiği cevap siklus inhibitörlerine, örnek olarak gösterilebilir. p53 proteini bir transkripsiyon faktörüne benzer şekilde DNA'ya bağlanarak p21 genin ekspresyonuna neden olur. Bu ifade sonrasında sentezlenen p21 proteini bir Cdk/Siklin inhibitörüdür. p21 proteini hücre siklusunun ilerlemesini iki şekilde inhibe eder. Bunlardan birincisi: Cdk/siklin kompleksinin inaktivasyonu, ikincisi ise doğrudan replikasyonun inhibisyonudur. Direkt olarak replikasyonun inhibisyonu, p21 proteinin PCNA'ya (prolifreting cell nuclear antigen) bağlanmasıyla gerçekleşir. PCNA, DNA Polimeraz δ'nın bir alt birimidir. TGF-β polipeptid faktörü hayvan hücrelerinin çoğalmasını kontrol eden iyi karekterize

edilmiş ekstraselüler bir inhibitördür. Bu faktör çeşitli epitel hücrelerin siklusunda işlev göstererek G1 evresinde döngüyü durdurur. Bu aktivite Cdk4/Siklin-D kompleksinin p15 ve p27 inhibitör proteinlerinin uyarısıyla gerçekleşir. Ayrıca bazı memelilerin hücrelerinde ikinci haberci olarak işlev yapan CAMP, bir Cdk inhibitörü olan p27 proteinini harekete geçirerek hücre çoğalmasını G1 noktasında inhibe eder.

Çizelge 1.3. CDK/Siklin kompleksleri ve inhibitörleri.

İNHİBİTÖR	CDK/SİKLİN KOMPLEKSİ
p15, p16	Cdk4/cyclin D
	Cdk6/cyclin D
p21, p27	Cdk4/cyclin D
	Cdk6/cyclin D
	Cdk2/cyclin A
	Cdk2/cyclin E

1.3.5. Kontrol Noktaları

Oluşan herhangi bir kusur halinde hücre döngüsünü dolayısıyla bölünmesin durduran noktalardır.G1 fazındaki hücre bulunduğu çevre ile ilgili verileri değerlendirerek siklusun başka bir evresine girilip girilmeyeceğine karar verir. İşte bu noktaya restriksiyon noktası veya "R" noktası denir. Hücre döngüsünün R noktası gibi parçaları kontrol noktaları (cehckpoints) olarak adlandırılır (Alberts ve ark., 2002).

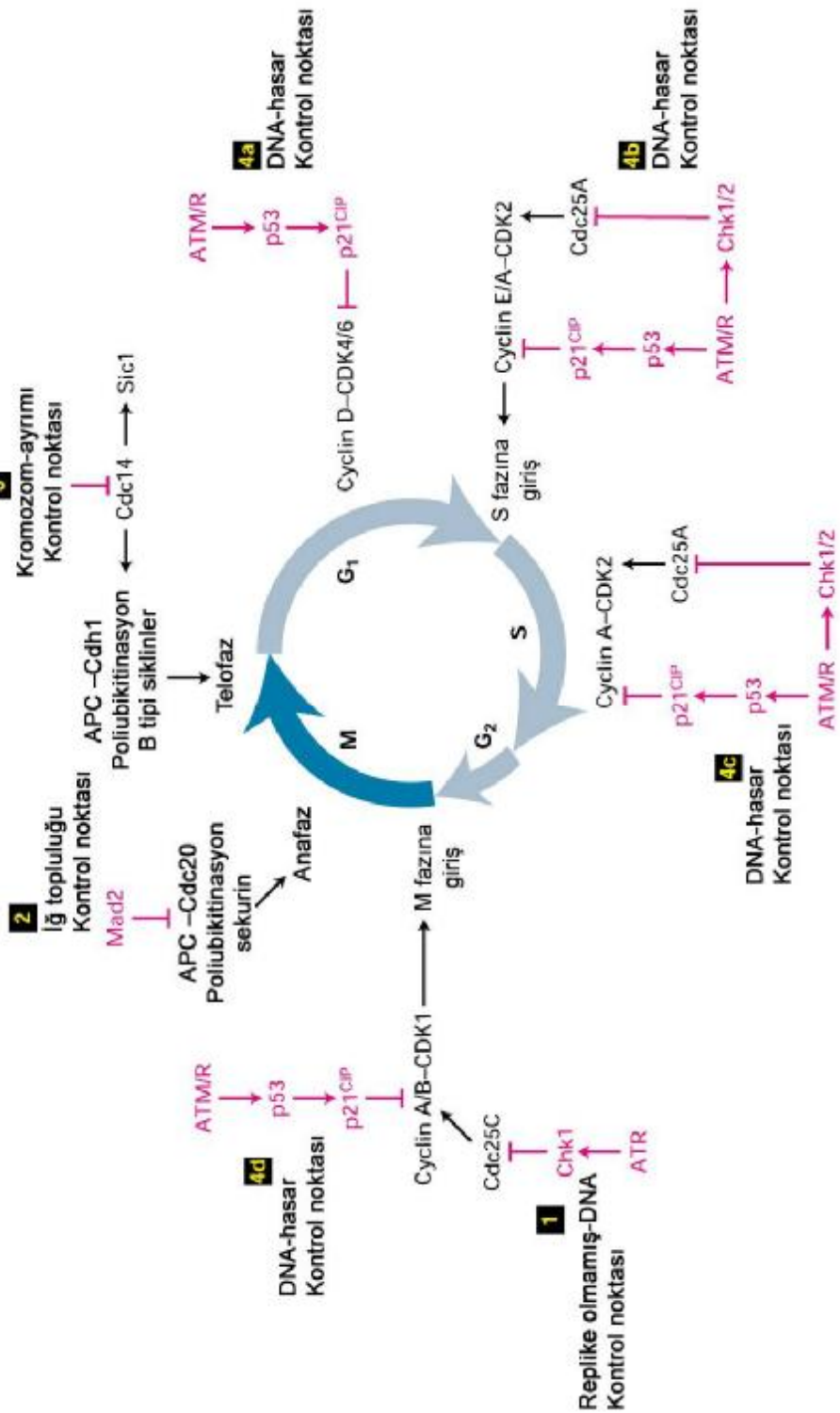
I-Replike Olmamış-DNA Kontrol Noktası

II-İğ topluluğu Kontrol Noktası

III-Kromozom-ayrımı Kontrol Noktası

IV-DNA hasarı Kontrol Nokası

a) G1 Kontrol Noktası (Siklin D-CDK4/6)
b) S Fazına Giriş Kontrol Noktası (Siklin E/A-CDK2)
c) S Fazı Kontrol Noktası (Siklin A-CDK2)
d) Mitoz Giriş Kontrol Noktası (Siklin A/B-CDK1)



Şekil 1.4. Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları (Lodish ve ark., 2002).

Replike olmamış DNA kontrol noktasında (1) siklin A-CDK1 ve Siklin B-CDK1 aktivasyonunu sağlayan Cdc25C proteinini fosforile ederek inaktif hale getiren ATR-Chk1 protein kinaz kaskadı sayesinde engellenme gerçekleştirilir. Böylece mitoza giriş inhibe edilir. İğ topluluğu içindeki kontrol noktası (2) Mad 2 ve diğer proteinler sekürinin poliübikütasyonu için gerekli APC spesifik faktörün aktivasyonu inhibe eder. Böylece anafaza giriş engellenir. Kromozom-ayrımı kontrol noktasında (3), nükleoli den serbest kalan Cdc14 fosfataz, APC spesifik faktörün (Cdh1) aktivasyonunu engelleyerek döngüyü durdurur. APC spesifik faktör (Cdh1) hem B tipi siklinlerin poliubikitasyonu için hem de Sic1'in indüksiyonu için gereklidir. DNA-hasarı kontrol noktasında (4) ATM veya ATR protein kinazlar aktive edilir. Aktif kinazlar iki yolağı tetikler. Bunlar: Chk-Cdc25A yolağı (4b ve 4c) S fazı girişinde yada geçişinde engellenir ve P53-$P21^{CIP}$ yolağı G1, S ve G2'nin (4a-4b) durdurulmasında öncü rölü oynar (Şekil 1.4.).

1.3.6. Protoonkogen-Onkogen aktivitesi

Büyüme faktörlerinin farklı komponentlerini kodlayan genlerin mutasyonları hücrede bölünme kontrolünün kaybına neden olarak bir tümör gelişimine yol açabilir. Bu nedenle bu genlere proto-onkogenler veya hücresel onkogenler denir. Önemli işlevleri nedeniyle hücresel onkogenler evrimsel olarak korunmuşlardır. Yapı ve işlevsel olarak birbirleriyle uzak akraba metazoalarda ya çok benzerdir ya da aynıdır. Normal hücrelerde, hücresel onkogenler üremenin kotnrolüyle ilişkili olduğundan; bunların kodladığı proteinleri dört sınıf içersinde toplayabiliriz (Turner ve ark., 2003).

1- Büyüme faktörleri
2- Büyüme faktörü reseptörleri
3- İntrasellüler sinyal ileticiler
4- Nüklear transkripsiyon faktörleri

Çizelge1.4. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümü.

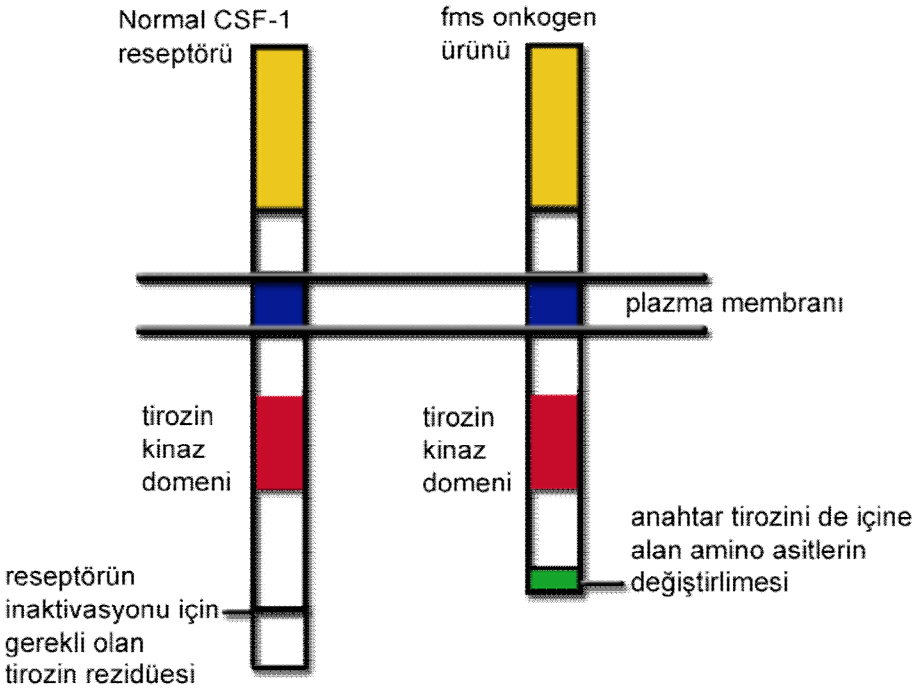
MEKANİZMA	***c-onc***
Nokta mutasyon	*ras*
Tranlokasyon	*abl*
Gen ürününün aşırı ifade edilmesi	*c-onc*
**Viral katılım (insersiyon) ile yeni promotor	*mos,myb*
**Viral katılım ile yeni etki art tırıcı (enhancer)	*myc*
**Proto-onkogenlerin arttırımı (amplifikasyon)	*myc*

1.3.7. Büyüme Faktörleri İle İlgili Aktiviteye Bağlı Olarak Gözlenenler

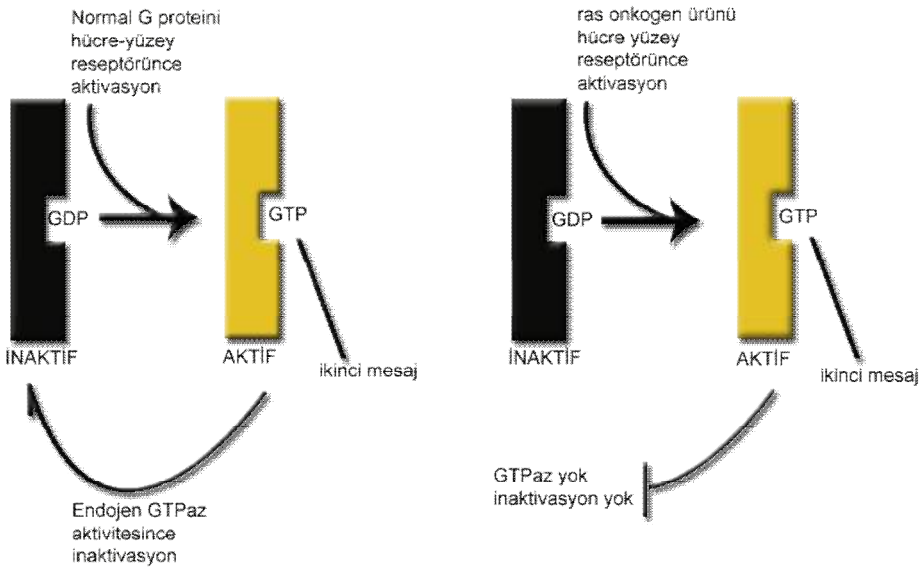
a) SİS onkogeni: Trombosit kökenli büyüme faktörünün (PDGF) bir alt ünitesini kodlar. Bir hücre PDGF reseptörüne sahipse, bu büyüme faktörünün fazla üretimi kanserleşmeyi uyarır.

b) FMS onkogeni: Kan hücresi oluşturması için kemik iliği hücrelerini uyaran koloni-stimüle eden faktör-1 (CSF-1) reseptörünün mutasyonlu bir versiyonunu kodlar. Normal CSF-1 reseptörünün karboksil ucunda 40 amino asit, FMS proteininde alakasız 11 amino asitle yer değiştirmiştir. Sonuçta FMS proteini CSF-1'in varlığında yada yokluğunda devamlı olarak aktiftir.

c) RAS onkogenleri: Birçok hücre yüzeyi reseptörlerinden enzimlere uyarının geçmesini sağlayan ve ikinci mesajları üreten plazma membran proteinlerinin **G-protien** ailesi üyelerini kodlar. G-proteinleri aktive olduklarında, GTP'ye bağlanırlar ve kendi GTPaz aktivitleri ile inaktive olurlar. Ras onkogenleri kendi GTPaz aktivitelerini engelleyen nokta mutasyonlarına sahiptir. bu nedenle aktif formlarını normalden çok uzun süre korurlar.



Şekil 1.5. CSF1 reseptörü ve fms onkogen ürünü (Turner ve ark., 2003)



Şekil 1.6. Normal G proteini ve ras onkogeni (Turner ve ark., 2003)

1.3.8. Nüklear Onkogenler

myc Onkogeni: Normal hücrelerde myc geninin ifadesi, PDGF'yi de içeren değişik mitojenler tarafından uyarılır. myc tarafından kodlanmış protein, özel DNA sekanslarına bağlanır ve muhtemelen hücre bölünmesi için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu uyarır. Kanser hücrelerinde myc geninin aşırı ifadesi farklı mekanizmalarla gerçekleşebilir. Bunlar viral güçlendiriciyle veya çeşitli lokasyonlarla olabilir.

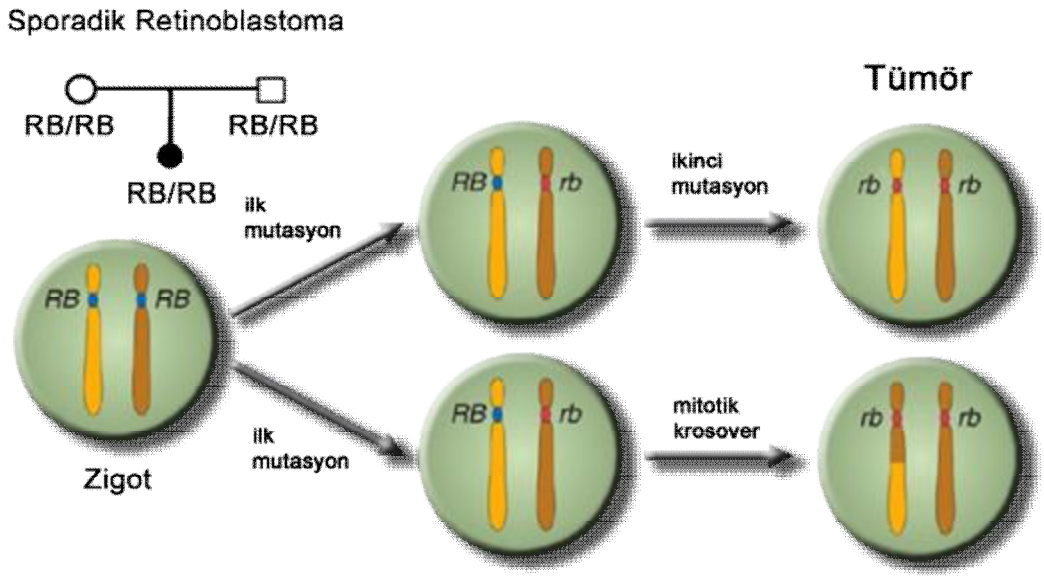
fos ve jun onkogenleri: Normal bir transkripsiyon faktörü olan AP-1'in alt ünitelerini kodlar. Normal hücrelerde fos ve jun'un ifadesi mitojenik bir uyarıdan hemen sonra geçici olarak gerçekleşir. Bunların gen ürünleri sadece transkripsiyonun oranı ile regüle edilmez ve mRNA kararlılığı da önemlidir. Kanserleşmiş bir hücrede her iki işlemde artmış olabilir.

erbA onkogeni: Bu gen tiroit hormonu için olan nükleer reseptörün uçları kırpık bir versiyonunu kodlar. Bu hormon bağlandığında tiroit hormon reseptörleri, spesifik genlerin ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörleri şeklinde işlev görür. erbA proteinin, normal reseptöre göre karboksil-uç bölgesinde eksiklikleri vardır, dolayısı ile hormona bağlanamaz ve gen transkripsiyonunu uyaramaz. Bununla beraber, DNA üzerindeki aynı yerlere hala bağlanabilir ve normal tiroit reseptörünün bir muhalifi olarak iş görür.

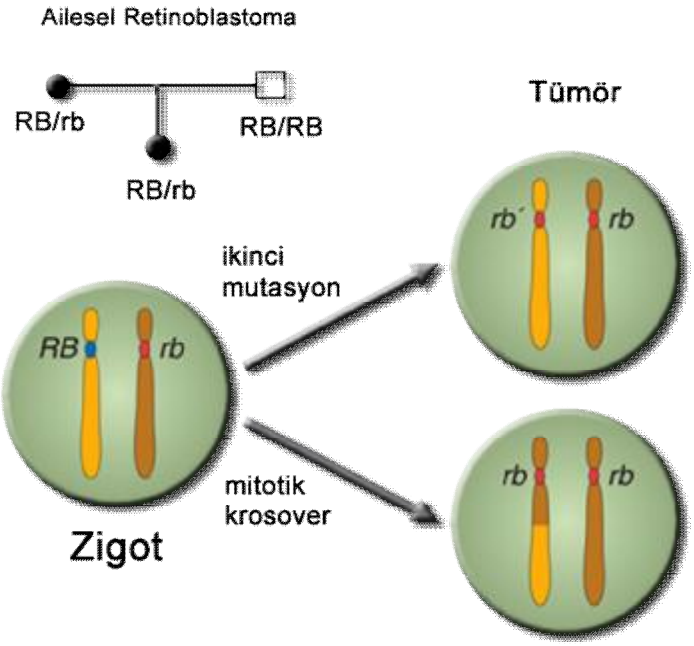
1.3.9. Tümör Süpressörler ve Bazı önemli Kanser yolaklar veya ağları

Hücre döngüsünün kritik sayılabilecek kontrol noktalarında işlev gösteren ve hücrenin bölünmesini baskılayan bir grup gendir. Tek alleldeki değişikliğin normal işlevi değiştirdiği hücresel onkogenlerin aksine tümör süpressör genlerin ancak her iki allelindeki normal işlevin kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör gelişimine neden olur. Yani tümör süpressör genlerin mutasyonları hücresel düzeyde

resesiftir. Tümör süpressör genlerin birinci allelindeki kayıp genellikle baz değişikliği veya delesyon gibi bir mutasyondur. Diğer alleli (allel 2) etkileyen ikinci olay da bir mutasyon olabilir, fakat hatalı hücre bölünmesi (mitozda nondisjuction) veya başka mekanizmalarla kromozom kaybı (mitotik rekombinasyon) sonucu işlevsizlik daha sıklıkla görülür. Süpressör gendeki ilk mutasyon ya zigotta var olabilir (germinal mutasyon) ya da ilgili dokudaki tek bir hücrede (somatik) oluşabilir. Sonuçta bir alleldeki kayıp hücreyi tümör gelişimine yatkınlaştırır. Germinal mutasyon sonucunda tüm hücreler etkilenir. Somatik mutasyonda ise sadece mutasyona uğrayan hücre etkilendiği için germinal mutasyonların organizmadaki kanser geliştirme ihtimali somatik mutasyonlara göre daha yüksektir.



Şekil 1.7. Sporadik retinoblastoma



Şekil 1.8. Ailesel retinoblastoma

Normal hücrelerde proliferasyon, farklılaşma ve hayatta kalım, birbirleriyle kısmen ilişik sınırlı sayıdaki yolaklar aracılığıyla düzenlenir. Bu yolaklar büyüme faktörleri, hormonlar, hücre-hücre ve hücre matriks etkileşiminin iletim ve bütünleyim sinyalleridir. Yolaklar deregülasyon ile kanser yolakları haline dönüşürler. Kanser yolaklarının uygunsuz aktivasyonu ve bazı durumlarda inaktivasyonu insan kanserlerinin progresyonu ve gelişimi için oldukça kritiktir. Belirli birçok proto-onkogen ve tümör süpressör, kanser yolaklarının ya içinde bulunur ya da onları etkileyecek derecede yakın bulunurlar (Schulz., 2002)

Çizelge 1.5. Önemli kanser türleri ve onlarla ilişkili tümör süpressör genler, onkogenler ve yolakları (Schulz., 2002).

Yolak	İçerdiği kanserler	Onkojen proteinler	Tümör süpressörler	Kritik nokta
MAPK Yolağı	Birçok	RAS,BRAF,(MYC)		Onkojenik reseptör tirozin kinazın efektörlüğü
PI3K Yolağı	Birçok	PI3K, AKT	PTEN,CTMP	Onkojenik reseptör tirozin kinazın efektörlüğü
TP53 ağı	Birçok	MDM2/HDM2	TP53, ATM, BAX	
RB1 ağı	Birçok	Siklin D1, CDK4, (MYC)	RB1, $p16^{INK4A}$, $p15^{INK4B}$,$P57^{KIP2}$	
TGFβ yolağı	Karsinomalar, bazı yumuşak doku kanserleri, bazı lösemiler		TGFβRII, SMAD2, SMAD4, RUNX	Tipik olarak karsinomalarda inakiftir fakat yumuşak doku kanserlerinde aktiftir.
JAK/STAT Yolağı	Bazı karsinoma, bir çok lösemi ve lenfoma	STAT3, STAT5(?)	STAT1(?), SOCS1	Onkoenik sitokin reseptörleri ve füzyon proteinlerinin efektörlüğü
NFκB Yolağı	Bazı lösemiler ve bir çok karsinoma	REL proteinleri	CYLD	Güçlü etkisi hücre tipine ve içeriğine bağlıdır
WNT yolağı	Kolon, karaciğer, meme, mide ve diğer karsinomalar	WNT1,β-Katenin	APC, AXIN	E-Kadherin ve SFRPs tarafından modüle edilir
SHH Yolağı	Spesifik cilt, beyin ve akciğer kanserlerinde	SHH(?), SMO,GL1(?)	PTCH1, PTCH2, SUFU	
NOTCH Yolağı	T-Hücre lenfomaları, Karsinomalar	NOTCH1	NOTCH1	Güçlü etkisi hücre tipi konteksi ve gen dozajı ile ilişkilidir.

1.3.10. P53 Tümör Süpressör Yolağı

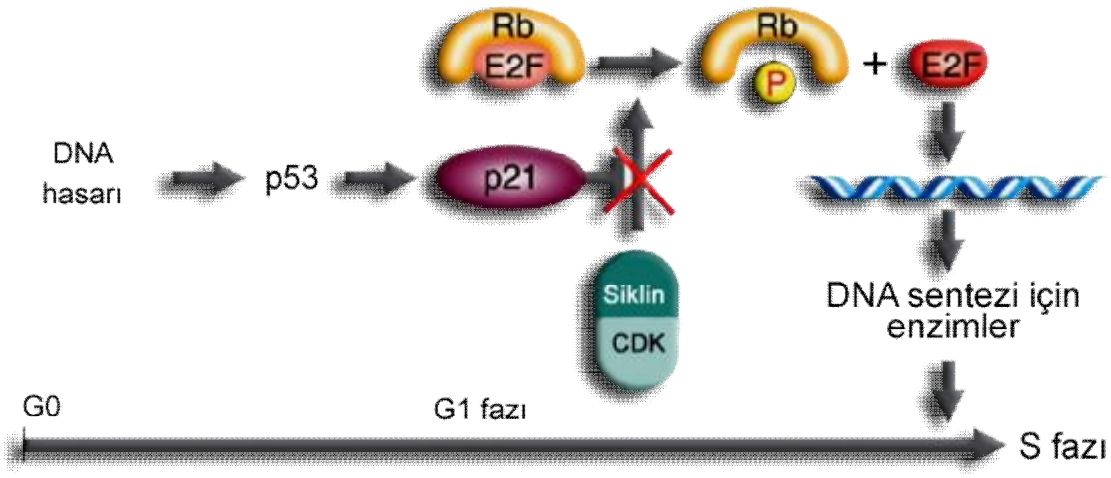
p53 geni, kromozom 17p13 bölgesinde bulunur ve toplam 11 ekson içerir. Tetramer forma sahip olan p53 proteini, toplam 392 amino asitten oluşur ve 53 kDa ağırlığına sahiptir (MALKIN, 1998). p53 proteini bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür ve p21, MDM2, siklin G, Bax gibi birçok genin ifadesinin kontrolünde rol alır. p53 geninin sahip olduğu 11 ekson içinde 4. ve 8. eksonun kanser genetiği yönünden ayrı bir yeri vardır. Çünkü bu eksonlar bir transkripsiyon faktörü kimliğine sahip p53 proteinin, spesifik DNA dizilerine bağlanmasını sağlayan bölümlerini kodlarlar (Levine A.J. 1997). p53 tümör süpressör genindeki mutasyonlar, kanser vakalarının yarısında saptanmış ve bu mutasyonların kanser oluşumuyla yakın ilişki içinde olduğu bildirilmiştir. (Alberts ve ark., 2002)

Normal fonksiyonel duruşunu koruyan hücrelerde p53 proteini, düşük yoğunlukta ve kısa yarı ömre sahip olarak bulunur. Bu durum p53 proteinin düzenleyicisi olan MDM2 proteini ile sağlanır. MDM2 proteini bu regülasyonu p53 proteinin amino ucuna bağlandıktan sonra hem p53 proteinin transkripsiyonel etkinliğini baskılayarak hem de proteozom aracılıklı parçalanmasını sağlayarak gerçekleştirir (Giaccia A.J. ve ark, 1998). Unutulmaması gereken ilginç bir nokta ise p53 proteini MDM2 genin de transkripsiyonunu aktive etmesidir. Ayrıca herhangi bir artmış onkogenik aktivitenin uyardığı $p14^{ARF}$ adlı başka bir tümör süpressör ise MDM2'ye bağlanarak p53 proteinin aktivasyonuna katkıda bulunur. Bu da $p14^{ARF}$ kaybının doğrudan p53 proteinin hücre döngüsü üzerinde etkisini yitirmesine neden olabileceğini göstermektedir. (Rocco ve Sidarnsky., 2001)

p53 yolağı çok sayıdaki ve çeşitlilikteki stres sinyallerine yanıt vermektedir. Bu stresler arasında DNA hasarı, telomer kısalması, hipoksi, ribozom biyogenezinin düşük seviyesi, düşük düzeydeki ribonükleozid trifosfatlar, inflamasyon ve nitrik oksit sinyali, soğuk ve sıcak sok, mitotik iğ hasarı, ve hatta seçilmiş onkojenlerin (Rb-E2F-1, myc, ras, ve β-katenin) mutasyonel aktivasyonu bulunmaktadır (Appella ve Anderson., 2001). Bu stres sinyallerinden bir veya birkaç tanesinin görülmesi p53

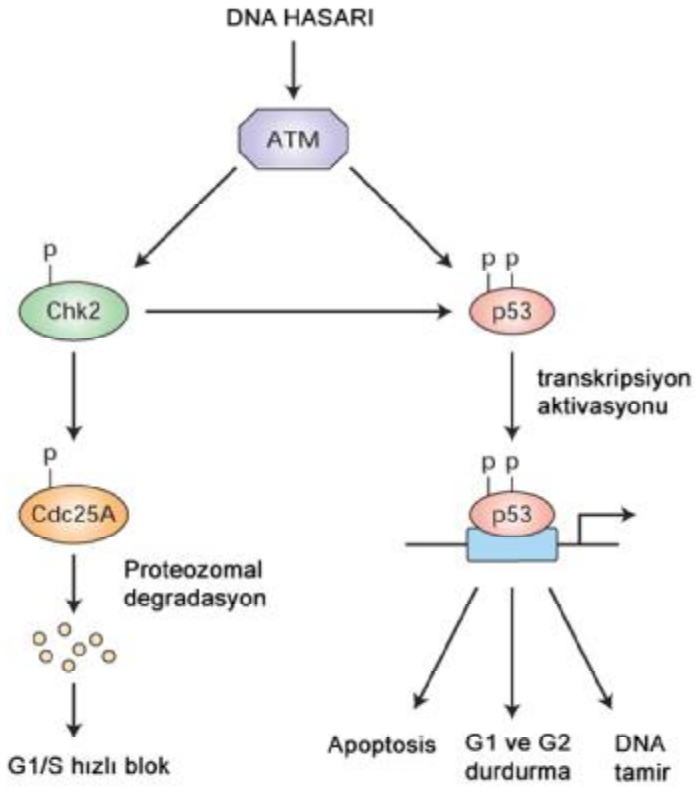
proteininin kimyasal modifikasyonunu (fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon vb) ve bu proteinin yarılanma ömrünün uzaması ile ilişkilidir. Hücre içerisinde p53 proteinin konsantrasyonu artar ve bu protein aktif bir transkripsyon faktörüne dönüşür. Bu olay en azından p53 proteinin negatif düzenleyicisinin (örn. MDM2) inaktivasyonuna bağımlıdır. MDM2, p53 proteinin aktivitesini inhibe eden ve bu proteinin parçalanmasını (degredasyon) ilerleten major p53 proteini ubiquitin ligaz sorumlusudur. (Michael ve ark., 2003)

DNA hasarı sonrasında p53 proteinin transkripsiyonu ve dolayısıyla translasyonu artar. Oluşan p53 proteini, bir CDKI (siklin bağımlı kinaz inhinbitörü) olan p21 proteinin sentezini sitümüle ederek hücre döngüsünü p21 proteini aracılığıyla G1 evresinde durdurur. p21 proteini bu fonksiyonunu siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak gerçekleştirir. p21 proteini CDK-C (siklin-siklin bağımlı kinaz) kompleksine bağlandığında CDK-C kompleksi, Rb (Retinoblastoma) proteinini fosforile edemez. Bunun sonucunda Rb-E2F kompleksinden E2F transkripsiyon faktörü ayrılamaz ve DNA sentezi için gerekli olan enzimlerin ve bazı proteinlerin ekspresyonu gerçekleşmez. Böylece hücre döngüsü S fazına geçemeden durdurulur (El-Deiry ve ark., 1993).



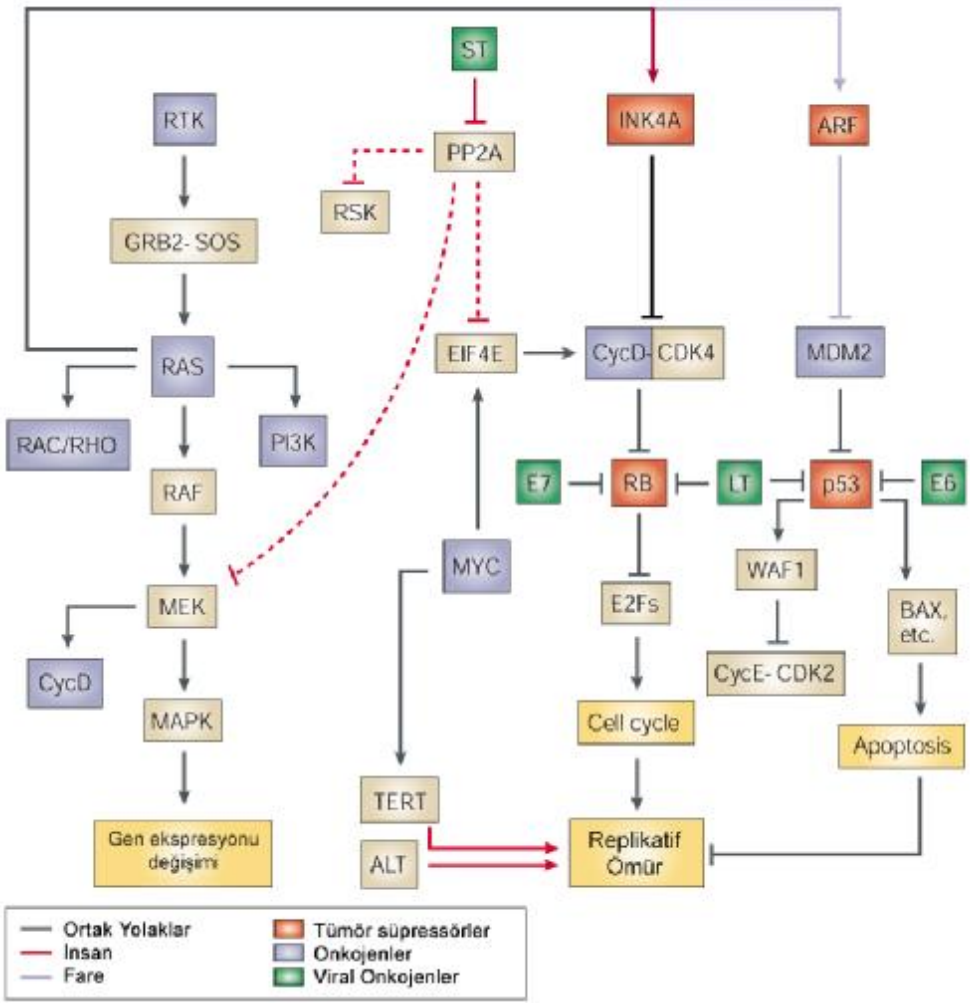
Şekil 1.9. p53 tümör süpressör yolağı (El-Deiry, 1993)

p53 proteinin hücre döngüsü üzerindeki regülatif rolünün yanında, iki önemli rolü daha vardır. Bunlar GADD45 aracılıklı DNA tamir mekanizmasının başlatılması ve programlı hücre ölümü olarak adlandırabileceğimiz apopitozdur. Kısaca p53 proteini DNA hasarı oluştuğunda bir yandan p21 proteini aracılığıyla hücre döngüsünü G1 evresinde durdururken, diğer yandan GADD45 geninin transkripsiyonunu arttırarak, DNA tamirinin başlatılmasına dolaylı olarak katılır (Chin ve ark., 1997). Eğer DNA hasarı, hücrenin tamir mekanizmasının onarabileceği kapasitenin üzerinde gerçekleşmiş ise bu kez onkogenik sürecin engellenmesi için apopitozis devreye sokulur(Woods ve Vousden., 2001). Hem hücre yüzeyindeki Tümör Nekroz Faktörü Reseptör ailesinin bir üyesi olan Fas (CD95) reseptörlerinin uyarılmasıyla hem de mitokondrial membran aralığından sitokrom c salınımıyla gerçekleşen apopitoz proseslerinin her ikisinde de p53 proteinin önemli rol üstlendiği düşünülmektedir (Zornig ve ark., 2001; Dumont ve ark., 2003).



Şekil 1.10. DNA hasarı ve p53 aktivasyonu (Alberts, 2002)

Kanser genel yolakları



Şekil 1.11. Kanserin genel yolakları (Hahn, 2002)

1.4. Tek Nükleotid Polimorfizimlerin Önemi

2001 yılında insan genom projesinin tamamlanmasından sonra birbirinden farklı bireylerin genomları arasındaki benzerliğin %99'dan fazla olduğu anlaşılmıştır (Venter ve ark., 2001; Sachidanandam ve ark., 2001). Bu farklılık genom içersinde kodlanan ve kodlanmayan bölgelere dağılmış yaklaşık 4,5 milyon tek nükleotid polimorfizimden (Single Nucleotide Polymorphism = SNP) kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu farklılıklar insanların birçok yönden farklı özelliklere sahip benzersiz

bireyler olmasında belirleyici rol oynamaktadır. Bunun yanında yine bu farklılıklar, hastalıklara yatkınlık derecesi, ilaçlara veya tedaviye olası yanıt ve bilinen mutasyonlar ile etkileşim gibi birçok hayati faktör üzerinde etkilidir. Fakat olası birçok farklı tek nükleotid polimorfizim içerisinden hangisinin ilgili hastalık ile ilişki içersinde olabileceğinin belirlenmesi yapılan tüm bu çalışmalardaki en büyük güçlüğü meydana getirmektedir (Gareth ve ark., 2005).

Kanser araştırmaları alanındaki geçen 30 yıl, tümör baskılayıcı ve onkojen genlerin kimliklendirilmesine ve ayrıca onların bulunduğu sinyal aktarım yollarının tarif edilmesine izin vermiştir. Bu sinyal aktarım yollarındaki seçilmiş genler farklı kanserlerde sıklıkla kalıtsal ve somatik olarak mutasyonlar bulundurmaktadır. Bu mutasyonlar hücrelerin homeostatik mekanizmasını değiştirmekte ve uygun olmayan hücre bölünmesine izin vermektedir. Bunun yanında bu mutasyonlar programlı hücre ölümünü (apopitozis) inhibe etmektedirler. Bu mutasyonlar aracılığı ile hangi sinyal iletim yolağının insan kanserlerinin oluşmasında rol oynadığı tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarının kanser oluşumundaki fonksiyonlarını yapılan çalışmalar moleküler ve hücresel açıklamaları ile açıklamıştır. Bu yolaklardaki tek nükleotid polimorfizimlerinin kanserleşmiş hücrelerde sıklıkla değişmesi açık bir sonuca varmamızı sağlamaktadır. Bu tek nükleotid polimorfizimleri populasyondaki kanser sıklığının belirlenmesinde, bireylerin kansere yakalanma yaşında veya kanser tedavisine yanıtta iyi adaylar olabilir. Kanserleri etkileyen tek nükleotid polimorfizminlerini kimliklendirme, tek nükleotid polimorfizmi yolağı yaklaşımı olarak terimlendirilebilir.

1.5. MDM2 SNP 309 polimorfizimi

MDM2 proteininin hücre içerisindeki veya organizmadaki düzeyi p53 yanıtı ve kanser formasyonu üzerinde geniş bir etkiye sahiptir. MDM2 proteini üretim düzeyi düşürülmüş farelerin, yavruları küçük, lenfopenik, lenfositlerinde ve epitelyal hücrelerinde radiyosensitivitesi artmış apopitozis oranı vardır. Bu fenotip p53 fonksiyonlarına bağımlıdır. Bu farelerin lenfoma geliştirmeye eğilimli transgenik

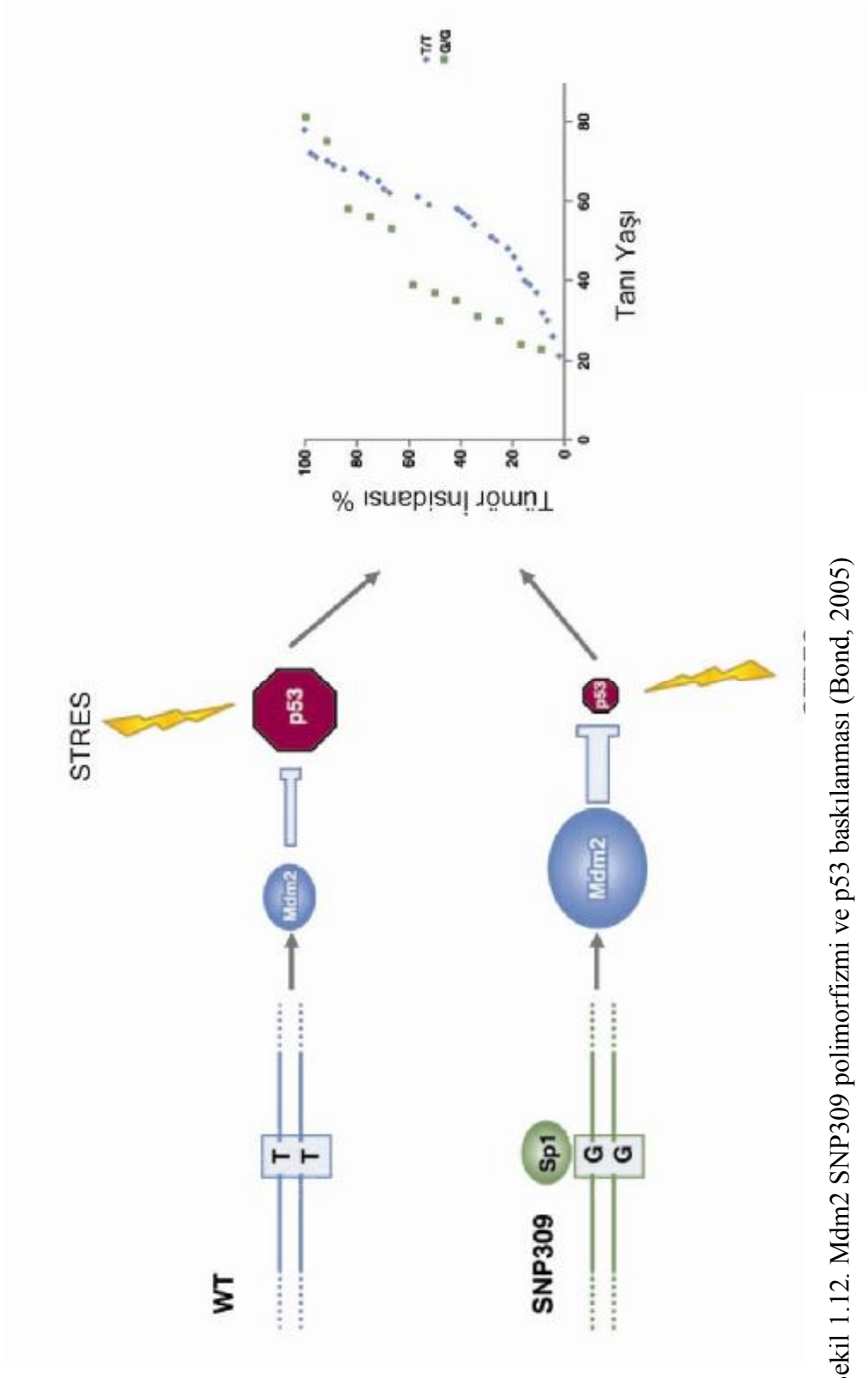
farelerle çaprazlanması lenfoma insidansını düşürmesi hayvanlardaki bu kanserde p53 ve MDM2 rolünü göstermektedir. Benzer şekilde farelerde MDM2 proteininin overekspresyonu kanser oluşumunu 4 kat kadar artırmıştır. İnsanlarda MDM2 geni osteosarkomada ve yumuşak doku sarkomada yaklaşık olarak %30 oranında amplifiye olmuştur. Momand ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 28 farklı tümör tipinden 3000 tümörün %7'sinde MDM2 amplifikasyonu bulunduğu gösterilmiştir. Bu tümörlerde hem p53 hem de MDM2 mutasyonları çalışılmıştır. %65'inde p53 mutasyonu, %35'inde MDM2 mutasyonu ve sadece %4'ünde her iki gen mutasyonu bulunmaktadır. Bu çalışma MDM2 gen amplifikasyonunun p53 inaktivasyonu fonksiyonuna sahip olduğunu ileri sürmektedir. Bu yüzden hem fareden hem de insandan gelen çok sayıdaki kanıtlar MDM2 proteinin düzeyindeki küçük artış p53 fonksiyonunu azaltmakta ve kanser formasyonuna neden olmaktadır.

MDM2 geninin iki tane promoter-enhanser bölgesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu promotor-enhanser bölgeleri MDM2 mRNA düzeyini düzenlerler. Birinci promoter 5' ucundan birinci ekzona kadardır ve stres durumunda olmayan hücrelerde uygun taban (hücre içinde bulunması gereken minimum miktar) MDM2 düzeyini düzenler. İkinci promoter bölgesi birinci intronun içindedir (MDM2 geninde üçüncü ekson birinci kodlanan eksondur) ve bu bölge hem AP1-Ets ve p53-hassas DNA sekans bölgeleri içerir. p53-hassas DNA sekans bölge aracılığı ile p53 yanıtından sonra MDM2 düzeyi azaltmaktadır. İnsanda bu birinci intron 524 nükleotid'ten oluşmaktadır. Tek nükleotid polimorfizmleri bu sekans içinde iki pozisyonda bulunmuştur. 309. nükleotid'te T (timin)'in G (guanin)'e değişimi şeklindedir. 344. nükleotid'te T (Timin)'in A (Adenin)'e dönüşümü biçimindedir. Birçok bilgisayar alogritması 309. pozisyonundaki tek nükleotid polimorfizminin bulunduğu bölgeyi transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olarak kimliklendirmiştir. 309. pozisyonundaki T (timin)'in G (guanin)'e değişimi SP1 (transkripsiyon faktörü) bağlanma bölgesinin farz edilen bölgesinin uzunluğunu artırmaktadır. Bu in vitro olarak pürifiye edilmiş SP1 proteini ve oligonükleotidler [bu oligonüklotidler hem temel allel (T/T) hem de SNP309 (G/G) taşımaktadırlar] ile jel shift deneyleri ile doğrulanmıştır. SP1 transkripsiyon faktörü major allele (T/T) göre SNP309'a (G/G) 4 kat daha iyi bir şekilde bağlanmaktadır. Bu yüzden SNP309

(G/G) SP1 transkripsiyon faktörünün değerini artırmış görülebilir. SP1'e direkt karşıt küçük saldırgan RNA'lar (RNAi) hücre içinde SP1 düzeyini düşürür. Bu düşüş ile SP1 ile düzenlenen genlerin [örneğin siklin D1 (hücre döngüsünü G_1 evresinde S evresine ilerletir)] düzeyleri ve MDM2'nin düzeyi azalır. MDM2'deki bu düşüş sadece SNP309 pozisyonunda homozigot G/G olan hücrelerde gerçekleşmiştir. Böyle bir değişim 309 pozisyonunda T/T olan hücrelerde gözlenmemiştir. Mithramycin A ilacı sıkı bir şekilde SP1'in bağlandığı bölgelere bağlanır ve SP1 tarafından transkripsiyonları düzenlenen genlerin transkripsiyonlarını inhibe eder. Mithramycin A öncelikli olarak MDM2 proteininin sentezini SNP309 pozisyonunda T/T olan hücrelerle kıyaslandığı zaman G/G olan hücrelerde bloklar. Bu yüzden SNP309 G/G değeri artmış SP1 bağlanma bölgesi yaratır. SP1 transkripsiyon faktörünün kazanmış olduğu bu özellik SNP309 G/G hücrelerde taban MDM2 gen transkripsiyon düzeyini düzenler fakat bu transkripsiyon faktörü T/T genotipine sahip hücrelerde bu düzenlemeyi gerçekleştiremez. SNP309 G/G genotipine sahip hücre hatları ile ve temel allel olan T/T genotipine sahip hücrelerle yapılan incelemeler SNP309 G/G genotipli hücrelerde MDM2'nin RNA ve protein taban düzeyinin artırmış olduğunu göstermiştir. SNP309 G/G genotipli hücrelerdeki yüksek düzeydeki MDM2'nin işlevsel bir sonucu vardır. SNP309 G/G genotipli ve yüksek düzeyde MDM2 içeren hücreler T/T genotipli hücrelere oranla daha düşük apopitozis yanıtına sahiptirler. Benzer şekilde SNP309 G/G genotipli hücrelerde DNA hasarından sonra p53 tarafından transkripsiyonu düzenlenen genlerin mRNA düzeyi, T/T genotipli hücrelerdeki bu genlerin mRNA düzeyinden oldukça düşüktür. Çok ilginçtir ki; SNP309 G/G genotipine sahip hücreleri mithramycin A ile muamele ederek p53 bağımlı apopitozisin (SNP309 G/G inhibisyonu aracılı) 2-3 kat geri dönüştürülebilir. Mithramycin A ile muamele SP1'in fonksiyonunu bu hücrelerde inhibe eder ve MDM2 düzeyini düşürür. SNP309 G/G hücresi içindeki yüksek seviyedeki MDM2 DNA'sı hasar görmüş hücrelerde p53 proteininin artışını hafifletir. T/T genotipine sahip hücrelerde p53 protein düzeyi stres sinyalinden sonra 5–14 kat artabilir. Bunun yanında SNP309 G/G hücrelerinde p53 protein artışı 2–3 kattır. Açık bir şekilde görülmektedir ki; yüksek taban seviyesinde MDM2 bulunan hücrelerde p53 düzeyinin azalmasının, transkripsiyonu p53 bağımlı düzenlenen genlerin

ekspresyonunun azalmasında ve DNA hasarı sonrasında apopitozisin azalmasında işlevsel bir sonuca sahiptir. Bu yüzden stres altındaki hücreler SNP309 G/G genotipinde iseler bu hücrelerin yüksek bir yüzdesi yaşayacak ve yayılacaktır (Gareth ve ark., 2005) .

SNP309'un G alleli hücre içindeki MDM2 temel düzeyini artırır. MDM2 temel düzeyinin artması bu lokusta SP1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasının artırmasının meydana gelmesi yüzündendir. Çünkü SP1'in düzeyi ve aktivitesi insanlardaki tüm hücreler ve doku tipleri içinde yüksek düzeyde eşit değildir. Hücreler içindeki yüksek düzeydeki MDM2 p53'ün apopitotik yanıtını zayıflatmaktadır. Bu durum DNA hasarı ve diğer çevresel kirleticilere tepki veren insanlarda görülür. Bu yüzden bazı bireylerde (SNP309'da G/G alleli bulunan), apopitozise giden hücre yüzdesi veya genotoksik strese yanıt olarak hücre döngüsünün durdurulması düşüktür. Yaşam boyunca kanserli hücrelerin dağılması genç yaşlarda kanserin oluşmasına izin vermektedir. G/G ve T/T olan bireylerde mutasyon oranı aynı, fakat hücre klonlarında mutasyonun fiksasyonu SNP309 lokusunda G/G olan bireylerde belki de daha fazladır. Bu makul bir açıklama olduğu için, bir yolaktaki bu tek bir nükleotid polimorfizminin çalışılmasının önemi artmaktadır.



Şekil 1.12. Mdm2 SNP309 polimorfizmi ve p53 baskılanması (Bond, 2005)

1.6. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizimi

Kromozom 17p13 üzerinde yer alan p53 geni bütün kanser türleri arasında çoğunlukla mutasyona uğrayan gendir (Fan ve ark., 2000, Hollstein ve ark., 1991). Günümüzde bir çok polimorfizim wild tip p53 gen lokusunda belirlenmiştir. p53 geni dördüncü ekzonunda yer alan kodon 72 polimorfizminin ürünü protein varyantlarından olan arjininin (CGC) veya prolinin (CCC) akciğer kanseriyle ve mesane kanseriyle ilişkisi rapor edilmiştir.(Oka ve ark. 1991, Weston ve ark. 1992). Arjinin (CGC) büyük polar, prolin (CCC) ise küçük polar amino asit rezidüsüdür. Bu gen motifindeki değişiklik sonucunda oluşan p53 proteinin fonksiyonel ve kimyasal özellikleri değişir. p53 prolin güçlü bir transkripsiyonel aktivatör olmasına karşın apopitozisi indüklenmesi açısından p53 arjininden daha azdır. (Matlasheski ve ark. 1987) Bu durum prolince zengin bölgede bulunan SH3-bağlantı motiflerinden kaynaklanmaktadır (Walker ve ark. 1996).



Şekil 1.13. p53 proteinin domein organizasyonu. TA, transaktivasyon domeini (aa1-50). PP, prolince zengin domeyni (aa61-94). DBD sekansa spesifik DNA bağlanma domeini (aa97-300). TET, tetramerizasyon domeyni (aa324-352). BD, temel C terminal domeyni (aa-363-393) 115 (Matlashewski, 1987)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

p53 tümör süpressör yolağında yer alan p53 geni kodon 72 ve MDM2 geni SNP309 polimorfizimlerinin bazı hastalıklar meme kanseri ve diğer kanserler ile olan ilişkilerini içeren çalışmaları şu şekilde özetlenebilir.

2.1. p53 kodon 72 genetik Polimorfizmi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Fan ve ark., 2000 yılında sigara kullanan akciğer kanserli hastalar üzerinde yapmış oldukları p53 kodon 72 polimorfizminin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada 482 akciğer kanserli hasta 510 kişilik kontrol grubu kullanılmış ve polimorfizimler PZR tabanlı RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada sigara kullananlar için adenokarsinoma riskinin p53 genotipi bakımından riski arttırdığı net bir şekilde belirtilmiştir (Fan ve ark., 2000).

Sotamaa ve ark., Lynch sendromlu (ailesel nonpoliposis kolerektal kanser sendromu) ve sporadik kolerektal kanserli hastalar üzerine yapmış oldukları polmorfizim çalışmalarında p53 kodon 72 polimorfizminin kansere yakalanma yaşı ile herhangi bir ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışma 193 Lynch sendromlu ve 121 kolerektal kanserli hasta üzerinde yapılmıştır (Sotamaa ve ark., 2005).

Baharak ve ark. 2007 yılında kuzey İran popülasyonuna tabii meme kanserli hastalar üzerinde yapmış oldukları çalışmada p53 kodon 72 polimorfizminin herhangi bir etkisinin bulunmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada 221 meme kanserli hasta ve 205 kişilik kontrol grubu kullanılmıştır (Baharak ve ark., 2007).

Nadji ve ark., 2007 yılında HPV ile enfekte akciğer kanserli hastalar üzerinde yapmış oldukları çalışmada p53 kodon 72 polimorfizminde arjinin allenin aktif sigara içicileri için risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma 141 kanserli hasta ve 92 kontrol grubu arasında yapılmıştır (Nadji ve ark., 2007).

Andrea ve ark. 2006 yılında meme kanserli hastalar üzerinde yapmış oldukları araştırmada arjinin/arjinin polimorfiziminin malignasiyle ilişkili olduğunu

bulmuşlardır. 118 meme kanserli hasta ve 202 kontrol grubu çalışma konusu olmuştur. (Andreave ark., 2006)

Yi ve ark., 2006 yılında mide kanserli hastalar üzerinde yapmış oldukları çalışmada p53 kodon 72 polimorfizmi prolin/prolin genotipi taşıyanlarda mide kanseri riskini arttırdığını bildirmişlerdir. 292 mide kanserli hasta 216 kişilik kontrol grubu çalışma konusu olmuştur (Yi ve ark., 2006).

Papadakis ve ark., 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada p53 homozigot arjinin meme tümorgenesisi için bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir (Papadakis ve arkd., 2000).

Khandang ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları iran populasyonundaki çalışmada p53 kodon72 Arg/Pro polimorfizmininin meme kanseri ile ilişkisiz olduğunu bildirmişlerdir (Khandang ve ark., 2006).

Damin ve ark. p53 homozigot arjininin meme karsinogenezine kuvvetlice karıştığını, Arg/Arg genotipinin malignasiyi etkilediğini ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Damin ve ark., 2006).

Huang ve ark., 2003 yılında yaptığı çalışmada p53 kodon 72 Arg/Pro polimorfizminin meme kanseri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Huang ve ark., 2003).

Mabrouk ve ark., 2003 yılında yapmış oldukları araştırma sonucunda P53 kodon 72 polimorfizmi ile meme kanseri ve mesane kanseri arasında tutarlı bir ilişkiyi bulamadıklarını bildirmişlerdir (Mabrouk ve ark., 2003).

Xu ve ark., 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada p53 kodon 72 polimorfizminin meme kanserli hastlarda anthracycline tabanlı neoadjuvant kemoterapi için prediktif markır olabileceğini belirtmişlerdir (Xu ve ark., 2005).

2.2. MDM2 SN309 Genetik Polimorfizmi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Bond ve ark., 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada kansere yakalanma yaşı ile MDM2 SNP309 polimorfizminin yakın ilişki içinde olduğu belirtilmiştir. Gelen tüm klinik sonuçlar kansere yakalanma yaşının karşılaştırılmasına veya

kanserli grupta görülen bağımsız tümör sayısına denk gelir ve kontrol grubu ile karşılaştırma yapmak gerekmemiştir. Bu çalışmada belirli allel frekansındaki bazı bireylerde neden kanserin erken yaşlarda geliştiği veya öteki allel frekansındaki bireylerde kanserin görülmesinin neden geç yaşlarda olduğunu açıklayan birçok veri mevcuttur. SNP309'un G alleli hücre içindeki MDM2 temel düzeyini artırır. MDM2 temel düzeyinin artması bu lokusta SP1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasının artırmasının meydana gelmesi yüzündendir. Çünkü SP1'in düzeyi ve aktivitesi insanlardaki tüm hücreler ve doku tipleri içinde yüksek düzeyde eşit değildir. Hücreler içindeki yüksek düzeydeki MDM2 p53'ün apopitotik yanıtını zayıflatmaktadır (Bond ve ark., 2004).

Boersma ve ark. 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada MDM2 SNP309 ile meme kanserli hastaların hayatta kalımları arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir (Boersma ve ark., 2006) .

Schmidt ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları geniş ölçekteki çalışmalarında MDM2 SNP309 ve P53 kodon 72 polimorfizmleri ile meme kanserli hastalar arasında ayrı ayrı veya birlikte herhangi bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir. (Schmidt ve ark., 2007)

Ma ve ark. 2006 yılında yapmış oldukları çalışma sonucunda MDM2 SNP309 polimorfizminin meme kanserinin etyolojisi içinde önemli bir role sahip olmadığını bildirmişlerdir (Ma ve ark., 2006).

Petenkaya ve ark. 2006 yılında yapmış olduğu çalışmada MDM2 SNP309 polimorfizmi ile meme kanseri arasında bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir (Petenkaya ve ark., 2006).

Millikan ve ark. 2006 yılında olduğu çalışmada MDM2 SNP309 polimorfizmi ile meme kanserli afro amerikan hasta grubu arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı bildirilmişir (Millikan ve ark., 2006).

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak Ç.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Onkoloji Bölümü ile Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Polikliniği bölümünde tedavi gören ve ilgili Hastanelerin Patoloji Bölümlerinde meme kanser teşhisi konulmuş 75 kadın meme kanserli hastadan ve Ç.Ü. Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Gastroenteroloji Polikliniğine kontrol amaçlı başvuran ve bu çalışmaya gönüllü olarak katılan sağlıklı 75 kadından alınan periferik venöz kan kullanılmıştır.

Çalışma grubunun, meme kanseri tanı tarihleri, ilgili hastanelerin Patoloji Bölümünden alınmış ve hastaların çalışma sırasındaki yaşları ile kıyaslanarak hastalığa yakalanma yaşları tespit edilmiştir. Çalışma grubundaki hastaların yaş dağılımları 81–30 yaş arasında belirlenmiş ve bu hastaların büyük bir çoğunluğunun Sosyo-Ekonomik açıdan alt gelir seviyesinde yer aldığı gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışma grubunda yer alan meme Kanserli hastaların büyük bir çoğunluğunun nüfusa kayıtlı olduğu bölgeler sırayla: Doğu Akdeniz, Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu bölgeleridir.

Bu çalışma için çalışma grubunda yer alan her bir hastadan ve kontrol grubunda yer alan her bir sağlıklı bireyden 3 ml periferik venöz kan EDTA'lı tüplere alınarak -70 ^{o}C saklanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmaya katılan meme kanserli hastaların coğrafik dağılımı.

Ayrıca bu çalışmada yüksek devirli soğutmalı santrifüj, thermalcycler, konsantratör, transimlüminatör, agaroz jel sistemleri, derin dorucu, vorteks, thermal blok, ve pH metre gibi bir çok deney ekipmanı kullanılmıştır.

3.2. Periferik Venöz Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpte bulunan 3 ml periferik kan herhangi bir kontaminasyonu önleyecek özenle 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4^{o}C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atılır. Pellet süspanse edilir ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatan atıldı. Hazırlanan lizis solüsyonundan hücre peletinin üzerine 2 ml kadar eklendi ve 37 °C de bir gece bekletildi. Ertesi gün üzerine 1 ml doygun NaCl konularak örnekler 55°C 10 dakika bekletildi. 30 dakika 500 *g*'de santrifüj edildikten sonra alttaki protein bölümüne dokunmadan süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Süpernatantın 2 katı hacimde soğuk %96'lık etanol eklendi. Tüp defalarca alt üst edilerek DNA'nın çökmesi sağlandıktan sonra 10.000 g'de 10 dakika kadar santrifüj edilerek üstteki alkol fazı atıldı. 1ml %70'lik alkol ile DNA bir kez daha yıkandı. Tüp tekrardan alt üst edilerek 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki alkol fazı atıldı. Bundan sonra konsantratörde 2 dakika süre ile DNA'lar kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti distüle suda çözülerek PCR işleminde kullanılacak miktarı belirlemek amacıyla spektrofotometrede ölçümlendi.

Lizis Solüsyonun hazırlanışı: 0.5 M Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS ve 0.5 mg/mL proteinase K 2 ml'lik ependorf tüpünün içine konuldu. Karıştırmak amacıyla 10–15 saniye kadar vortekslendi.

3.3. Primerler, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi İçin Kullanılan Enzimler

3.3.1. MDM2 SNP309 T/G Polimorfizminin Yer Aldığı Genomik İnsan DNA'sının Amplifikasyonu İçin Gerekli Primer Çifti (İontek)

İçerisinde MDM2 SNP309 T/G polirmofizminin bulunduğu 158 bç'lik genomik insan DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu için kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Kullanılan primerlerin uzunlukları, TM sıcaklıkları, G-C oranları

PRİMER	Uzunuk (bç)	TM	GC%	DNA sekansı
LEFT PRİMER	20	64,12	60.00	5′-CGCGGGAGTTCAGGGTAAAG-3′
RIGHT PRİMER	20	61,88	60.00	5′-CTGAGTCAACCTGCCCACTG-3′

Tm: Melting temperature bç : baz çifti

NCBI Nükleotid veri tabanından alınan AF527840 rapor numaralı insan genomik sekansı kullanılmış ve primerlerin uygunluğunun testi için online Primer3 Output programından yararlanılmıştır.

Çizelg 3.2. Kullanılan primerlerin DNA amplifikasyonu sırasındaki konumları

```
2461 cgccagggaggagggcgggatttcggacggctctcgcggcggtgggggtgggggtggttc

2521 ggaggtctc cgcgggagttcagggtaaag gtcacgggggccgggggctgcggggccgctt
                >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
2581 cggcgcgggaggtccggatgatcgcaggtgcctgtcgggtcactagtgtgaacgctgcgc

2641 gtagtctgggcgggattgggccggtt cagtgggcaggttgactcag cttttcctcttgag
                                  <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
2701 ctggtcaagttcagacacgttccgaaactgcagtaaaaggagttaagtcctgacttgtct
```

3.3.2. MDM2 SNP309 T/G polimorfizminin tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu

100–300 ng genomik DNA, 10 pmol primerler (İontek), 200µM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100), 50 mM KCl, 10 mM Tris-Hcl, 2 mM $MgCl_2$ ve 1 ünite Taq Polimeraz enzimi (Takara taq) toplam 50 µl hacim içinde karıştırılarak üzeri mineral yağı (Sigma, M5904) ile kaplandı ve thermocyclerda (Applied Biosytems, GeneAmp PCR System 9700) 94^{o}C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonundan sonra 94^{o}C'de 30 saniye, 60^{o}C'de 1 dakika ve 72^{o}C'de 1 dakika olmak üzere toplam 30 döngü uygulanıp son olarak 72^{o}C'de 5 dakika inkübe edilerek amplifikasyon yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda oluşacak olan 158 baz çiftlik DNA fragmenti %3'lük agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi (Sotamaa ve Liyanarachchi., 2005).

3.3.3. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizminin Yer Aldığı Genomik İnsan DNA'sının Amplifikasyonu için gerekli Primer Çifti (İonntek)

İçerisinde p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizminin bulunan 199 bç'lik genomik insan DNA'sının polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu için kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Kullanılan primerlerin uzunlukları, TM sıcaklıkları, G-C oranı

PRİMER	Uzunluk (bç)	TM	GC%	DNA sekansı
LEFT PRİMER	23	72,52	52,17	5′-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3′
RIGHT PRİMER	23	63,97	52,17	5′-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3′

NCBI Nükleotid veri tabanından alınan AY838896 rapor numaralı insan genomik sekansı kullanılmış ve primerlerin uygunluğunun testi için online Primer3 Output programından yararlanılmıştır.

Çizelge 3.4. Kullanılan primerlerin DNA amplifikasyonu sırasındaki konumları

```
   1 aaggacaagggttgggctggggacctggagggctggggacctggagggctgggggctgg

  61 ggggctgaggacctggtcctctgactgctcttttcacccatctacagtccccc ttgccgt
                                                          >>>>>>>
 121 cccaagcaatggatga tttgatgctgtccccggacgatattgaacaatggttcactgaag
     >>>>>>>>>>>>>>>>
 181 acccaggtccagatgaagctcccagaatgccagaggctgctccccgcgtggcccctgcac

 241 cagcagctcctacaccggcggcccctgcaccagccccctcctggcccct gtcatcttctg
                                                      <<<<<<<<<<<
 301 tcccttcccaga aaacctaccagggcagctacggtttccgtctgggcttcttgcattctg
     <<<<<<<<<<<<
 361 ggacagccaagtctgtgacttgcacggtcagttgccctgaggggctggcttccatgagac
```

3.3.4. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizminin tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu

100–300 ng genomik DNA, 10 pmol primerler (İontek), 200µM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100), 50 mM KCl, 10 mM Tris-Hcl, 2 mM $MgCl_2$ ve 1 ünite Taq Polimeraz enzimi (Takara taq) toplam 50 µl hacim içinde karıştırılarak üzeri mineral yağı (Sigma, M5904) ile kaplandı ve thermocycler'da (Applied Biosytems, GeneAmp PCR System 9700) 94^{o}C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonundan sonra 94^{o}C'de 30 saniye, 55^{o}C'de 1 dakika ve 72^{o}C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngü uygulanıp son olarak 72^{o}C'de 5 dakika inkübe edilerek amplifikasyon yapıldı (Ong Fan ve ark., 2000).

3.3.5. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile MSPA1I (New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon Enzimi Kullanılarak MDM2 Geninin Genotiplendirilmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunda oluşan 158 bç'lik DNA fragmentleri agoroz jel elektroforezi ile belirlendikten sonra MMD2 SNP 309 T/G polimorfozmi PCR tabanlı RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. Bu işlem MSPA1I'nın (New England Biolabs, MA) restriksiyon etkisi kullanılarak yapılmış ve tüm bu işlemlerden önce MB Advanced DNA Analysis. Version 6,71 programından yararlanılarak restriksiyon işlemi simüle edilmiştir.



Şekil 3.2. MB Advanced DNA Analysis. Version 6,71 programı sümülasyon resmi

```
1       ---------+---------+---------+---------+---------+--------60
        gcgggagttcagggtaaaggtcacgggggccgggggctgcggggccgctgcggcgcggga
                                                  MspA1I
61      ---------+---------+---------+---------+---------+--------120
        ggtccggatgatcgcaggtgcctgtcgggtcactagtgtgaacgctgcgcgtagtctggg
121     ---------+---------+---------+---------+---------+-------180
        cgggattgggccggttcagtgggcaggttgactcag
```

Şekil 3.3. MB Advanced DNA Analysis. Version 6.71 programı nükleotid kesim noktaları

10 µl PCR ürünü, 7 µl dd-H_20, 2,5 µl buffer ve 0,5 µl MSPA1I (5 ünite) enzimi 0,5 ml'lik ependorf tüpüne konulduktan sonra vortekslenerek homojenizasyon sağlandı. Üzeri mineral yağ ile kaplandıktan sonra 4 saat 37 °C'de termal blokta inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra 2 µl stop solüsyonu kullanılarak reaksiyon durduruldu. Oluşan ürünler %3'lük agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi (Sotamaa ve ark., 2005).

3.3.6. MSPA1I (New England Biolabs, Beverly, MA) RestriksiyonEnzimi

New England Biolabs tarafından üretilen MSPA1I endonükleazı *Morexella* speciesleri̇nden elde edilmiştir. Bu enzim restriksiyon etkisini küt uç oluşturarak gösterir.

MSPA1I Restriksiyon Enzimi Tanımlama Bölgesi

▼

5′……CMGCKG……3′

3′……GKCGMC……5′

▲

NEBufferların içinde aktiviteleri

NEBuffer 1: %50

NEBuffer 2: %100

NEBuffer 3: %50

NEBuffer 4: %100

Methilasyon Duyarlılığı

dam metilasyon:	Duyarsız
dcm metilasyon:	Duyarsız
CpG metilasyon:	Bloklar veya overlap yapar
Saklama sıcaklığı:	-20 ^{o}C

Sıcaklıkla inaktivasyonu: 65 ^{o}C'de 20 dak.
Kullanılan Buffer :1X NEBuffer 4
İnkübasyon sıcaklığı : 37 ^{o}C

1X NEBuffer 4:

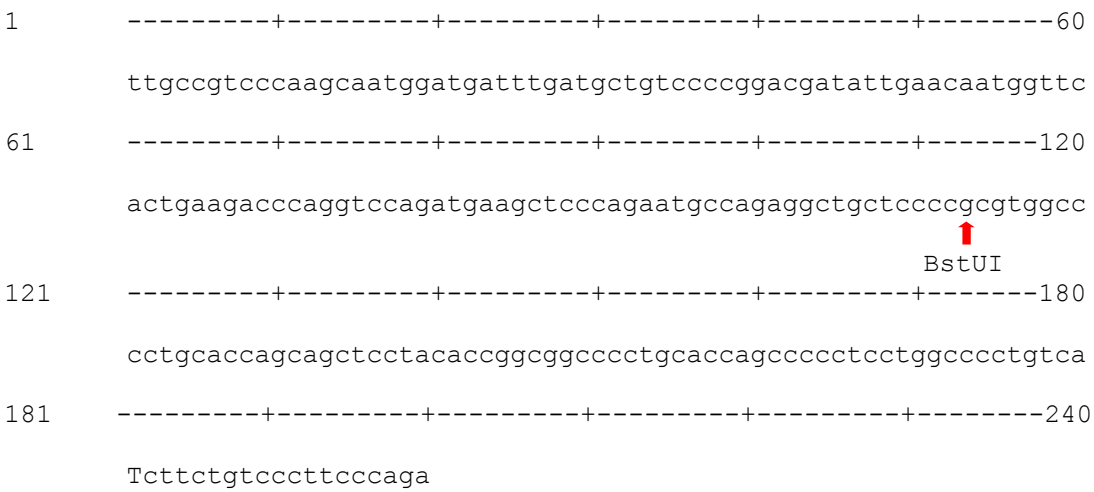
20 mM Tris-asetat
50 mM Potasyum asetat
10 mM Magnezyum asetat
1 mM Dithiothreitol

Ünite Tanımlılığı: 1 µg λ DNA'sının 1 saat içinde 37 oC'de 1 ünite enzim tarafından toplam hacmin 50µl olduğu bir reaksiyonda kestiği tanımlanmıştır.
Konsantrasyon: 10,000 ünite/ml

1 µg substrat DNA'nın kesimi için gerekli olan minumum enzim miktarı16 saatte 0,25 ünitedir.

3.3.7. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly,) Restriksiyon Enzimi Kullanılarak p53 Genin Genotiplendirilmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunda oluşan 199 bç'lik DNA fragmentleri agoroz jel elektroforezi ile belirlendikten sonra p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizmi PCR tabanlı RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. Bu işlem *Bst*UI'nın (New England Biolabs, MA) restriksiyon etkisi kullanılarak yapılmış ve tüm bu işlemlerden önce MB Advanced DNA Analysis. Version 6,71 programından yararlanılarak restriksiyon işlemi simüle edilmiştir.



Şekil 3.4 MB Advanced DNA Analysis. Version 6.71 programı nükleotid kesim noktaları

12 µl PCR ürünü, 3 µl dd-H_20, 1,5 µl buffer ve 0,5 µl *Bst*UI enzimi 0,5 ml ependorf tüpüne konulduktan sonra vortekslenerek homojenizasyon sağlandı. Üzeri mineral yağ ile kaplandıktan sonra 16 saat 60 °C'de termal blokta inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra 2 µl stop solüsyonu kullanılarak reaksiyon durduruldu. Oluşan ürünler %3'lük agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi (Ong Fan ve ark., 2000).

3.3.8. *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon Enzimi

New England Biolabs tarafından üretilen BstUI endonükleazı *Bacillus stearothermophilus*'tan elde edilmiştir. Bu enzim restriksiyon etkisini küt uç oluşturarak gösterir.

*Bst*UI Restriksiyon Enzimi Tanımlama Bölgesi

5′……CGCG……3′
3′……GCGC……5′

NEBufferların içinde aktiviteleri

NEBuffer 1: %100
NEBuffer 2: %100
NEBuffer 3: %50
NEBuffer 4: %100

Metilasyon Duyarlılığı

dam metilasyon:	Duyarsız
dcm metilasyon:	Duyarsız
CpG metilasyon:	Bloklar

37 ^{o}C aktivite:	%20
Saklama sıcaklığı:	-20 ^{o}C

İzoşizomeri:	FnDII
Sıcaklıkla inaktivasyonu:	Yok

Kullanılan Buffer	:1X NEBuffer2
İnkübasyon sıcaklığı	: 60 ^{o}C

1X NEBuffer 2:
10 mM Tris-HCl
50 mM NaCl
10 mM MgCl2
1 mM Dithiothreitol

Ünite Tanımlılığı: 1 µg λ DNA'sının enzim tarafından sindirilebilmesi için 60 ^{o}C'de 50µl tampon içinde 1 ünite enzim gereklidir.

Konsantrasyon: 10,000 units/ml

1 µg substrat DNA'nın kesimi için gerekli olan minimum enzim miktarı 16 saatte 0,13 ünitedir.

3.4. Agaroz Jel Elekroforezleri

3.4.1 %2'lik Agaroz Jel Elekroforezi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında, PCR ürünlerinin doğruluğunun tespiti amacıyla uygulandı.

%2'lik 50 mL Agaroz Jel'in Hazırlanması**:** 1 gr agaroz hassas terazide tartıldıktan sonra erlene konuldu. Üzerine 50 ml 0,5X TBE (AppliChem, TBE Buffer 10X) eklenerek hafifçe çalkalandı. İçinde agaroz ve TBE bulunan erlen yüksek sıcaklığa ayarlı mikro dalga fırına konuldu. Kaynadıktan sonra çıkartılan agaroz TBE karışımı mikro dalga fırından çıkarıldı. Hafifçe birkaç kez çalkalanarak homojenizasyon sağlandıktan sonra tekrar bu kez daha düşük sıcaklığa ayarlanmış mikro dalga fırına konuldu. Böylece agarozun iyice erimesi sağlandı. İyice eriyen agaroz TBE çözeltisi Mikro dalga fırından çıkarılarak biraz soğuması için bekletildi. Biraz soğuduktan sonra üzerine 2 µl EtBr eklendi. EtBr'nin homojen bir şekilde eriyiğin içinde karışması sağlandı. Tüm bu işlemler bittikten sonra Agaroz eriyiği yükleme kabına dikkatli bir şekilde döküldü. Agaroz moleküllerinin polimerizasyon işleminin gerçekleştirilmesi için 15 dakika kadar bekletildi.

Yükleme Tamponunun Hazırlanışı: 1 ml TBE (AppliChem, TBE Buffer 10X), 2,5 mg Brofenol Mavisi, 0,33 ml 150 mM Tris pH 7,6, 0,6 ml Gliserol ve 0,07ml dH_2O 2 ml ependorf tüpünün içine konuldu. Vorteks işlemi yapılarak karıştırıldıktan sonra 10 saniye kadar düşük devirde santrifüj edildi.

Örneklerin Agaroz Jel'e Yüklenmesi: Agaroz jel tanka yerleştirildi. Üstünü kaplayacak kadar 1X TBE konuldu. Yüklemenin yapılacağı slotları oluşturan tarak dikkatlice jelden çıkarıldı. Bir parça parafilm alınarak üzerlerine her bir örnek için ayrı yerlere 1 µl yükle tamponu konuldu. Her bir PCR ürününden ayrı ayrı 5 µl alınarak parafilm üzerindeki yükleme tamponu üzerine eklendi. Birkaç kez pipetleme yapıldıktan sonra jel üzerindeki slotlara yükleme işlemi sırasıyla gerçekleştirildi. En son Slot ise markırın yüklenmesi için boş bırakıldı.

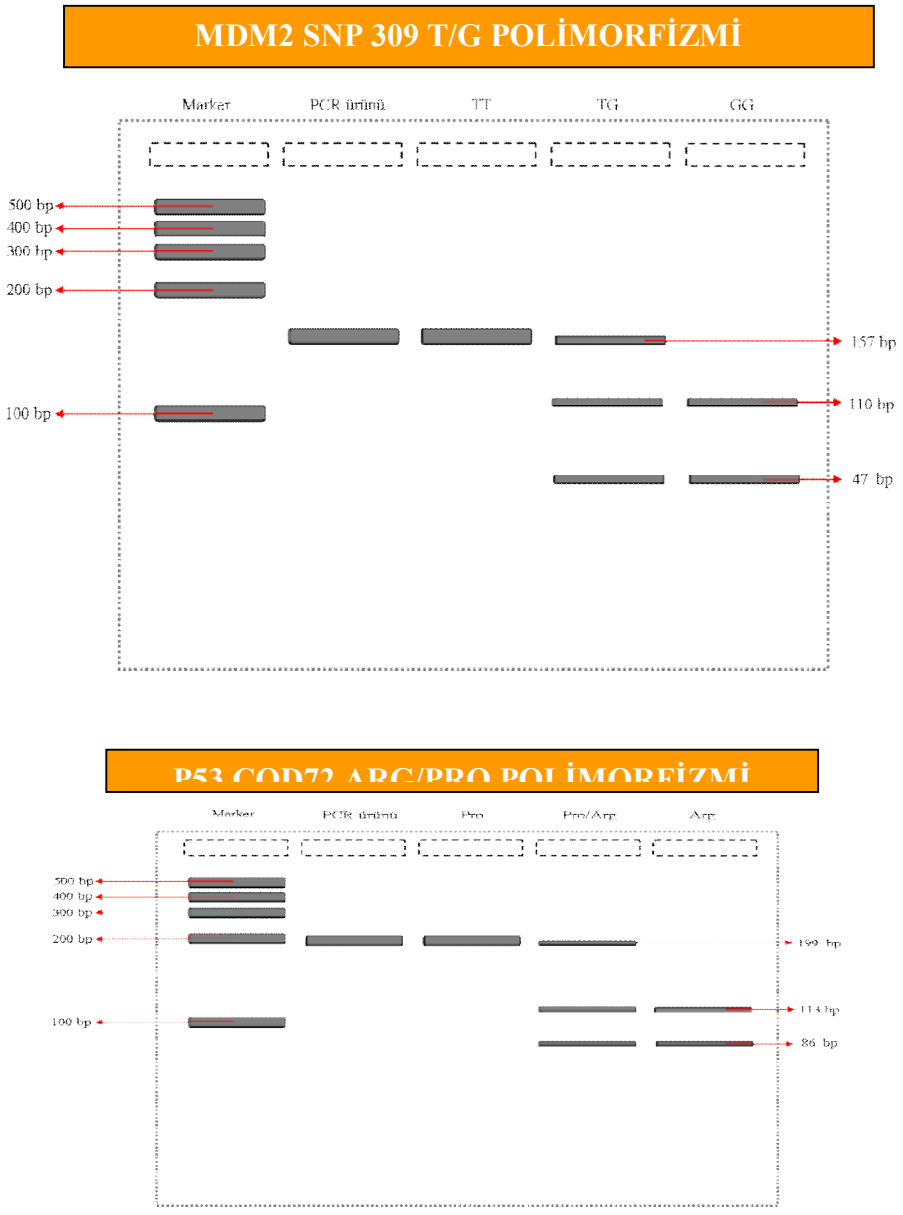
3.4.2. %3'lük Agaroz Jel Elekroforezi

PCR Tabanlı RFLP işlemi sonucunda oluşan kesim ürünlerinin incelenmesi amacıyla uygulandı.

%3'lük 50 ml Agaroz Jel'in Hazırlanması: 1,5 gr agaroz hassas terazide tartıldıktan sonra erlene konuldu. Üzerine 50 ml 0,5X TBE (AppliChem, TBE Buffer 10X) eklenerek hafifçe çalkalandı. İçinde agaroz ve TBE bulunan erlen yüksek sıcaklığa ayarlı mikro dalga fırına konuldu. Kaynadıktan sonra çıkartılan agaroz TBE karışımı mikro dalga fırından çıkarıldı. Hafifçe birkaç kez çalkalanarak homojenizasyon sağlandıktan sonra tekrar bu kez daha düşük sıcaklığa ayarlanmış mikro dalga fırına konuldu. Böylece agarozun iyice erimesi sağlandı. İyice eriyen agaroz TBE çözeltisi Mikro dalga fırından çıkarılarak biraz soğuması için bekletildi. Biraz soğuduktan sonra üzerine 2 µl EtBr eklendi. EtBr'nin homojen bir şekilde eriyiğin içinde karışması sağlandı. Tüm bu işlemler bittikten sonra Agaroz eriyiği yükleme kabına dikkatli bir şekilde döküldü. Agaroz moleküllerinin polimerizasyon işleminin gerçekleştirilmesi için 15 dakika kadar bekletildi.

Yükleme Tamponunun Hazırlanışı: 1 ml TBE (AppliChem, TBE Buffer 10X), 2,5 mg Brofenol Mavisi, 0,33 ml 150 mM Tris pH 7,6, 0,6 ml Gliserol ve 0,07ml dH_2O 2 ml ependorf tüpünün içine konuldu. Vorteks işlemi yapılarak karıştırıldıktan sonra 10 saniye kadar düşük devirde santrifüj edildi.

Örneklerin Agaroz Jel'e Yüklenmesi: Agaroz jel tanka yerleştirildi. Üstünü kaplayacak kadar 1X TBE konuldu. Yüklemenin yapılacağı slotları oluşturan tarak dikkatlice jelden çıkarıldı. Bir parça parafilm alınarak üzerlerine her bir örnek için ayrı yerlere 1 µl yükleme tamponu konuldu. Her bir PCR ürününden ayrı ayrı 5 µl alınarak parafilm üzerindeki yükleme tamponu üzerine eklendi. Birkaç kez pipetleme yapıldıktan sonra jel üzerindeki slotlara yükleme işlemi sırasıyla gerçekleştirildi. En son Slot ise markırın yüklenmesi için boş bırakıldı.



Şekil 3.5. p53 ve MDM2 agaroz jel simülasyonu

3.5. Jelin Görüntülenmesi

Biometra BioDoc II marka translüminatörde 302 nm dalga boylu UV kullanılarak jel görüntülendi. Entegre bilgisayar sistemi ile jelde yürütülmüş DNA'ların fotoğrafları alındı.

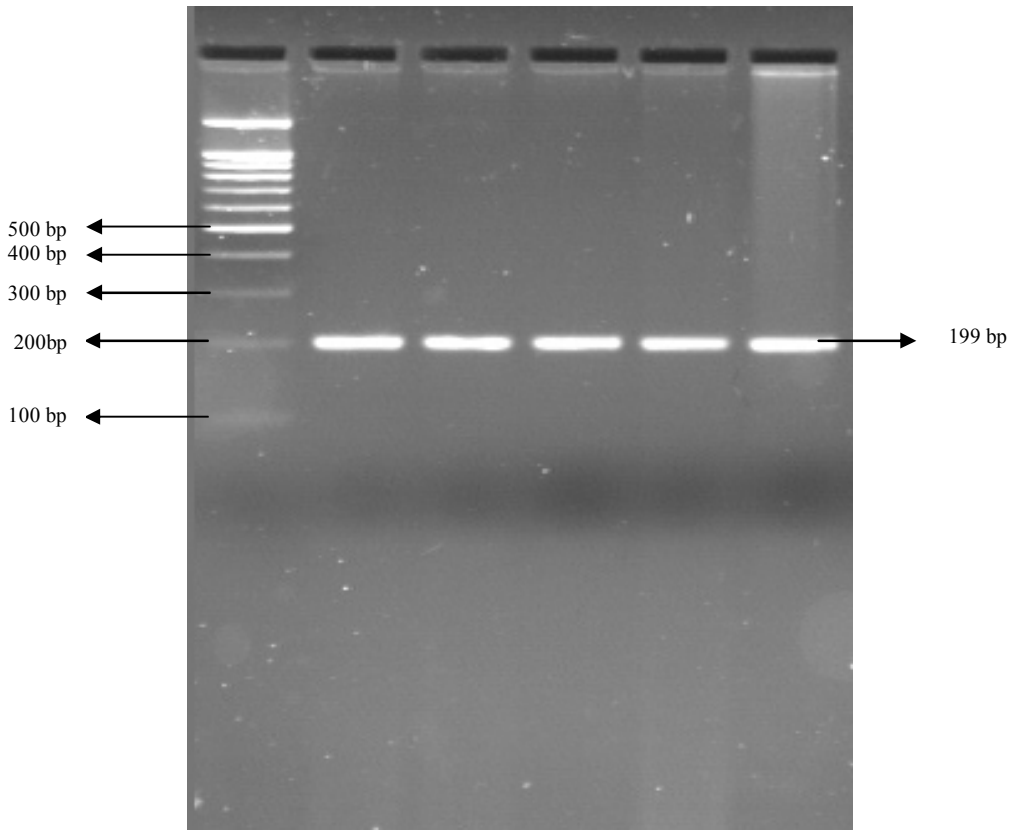
3.9. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Meme kanserli ve kontrol grubu arasındaki p53 ARG/PRO ve MDM2 SNP 309 T/G genotip dağılımındaki farklılıklar Ki-Kare (X^2) testi ile yapıldı. Bütün istatistiksel yöntemler, SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 11.5, Chicago, IC, USA) istatistiksel paket programı kullanılarak yapıldı.

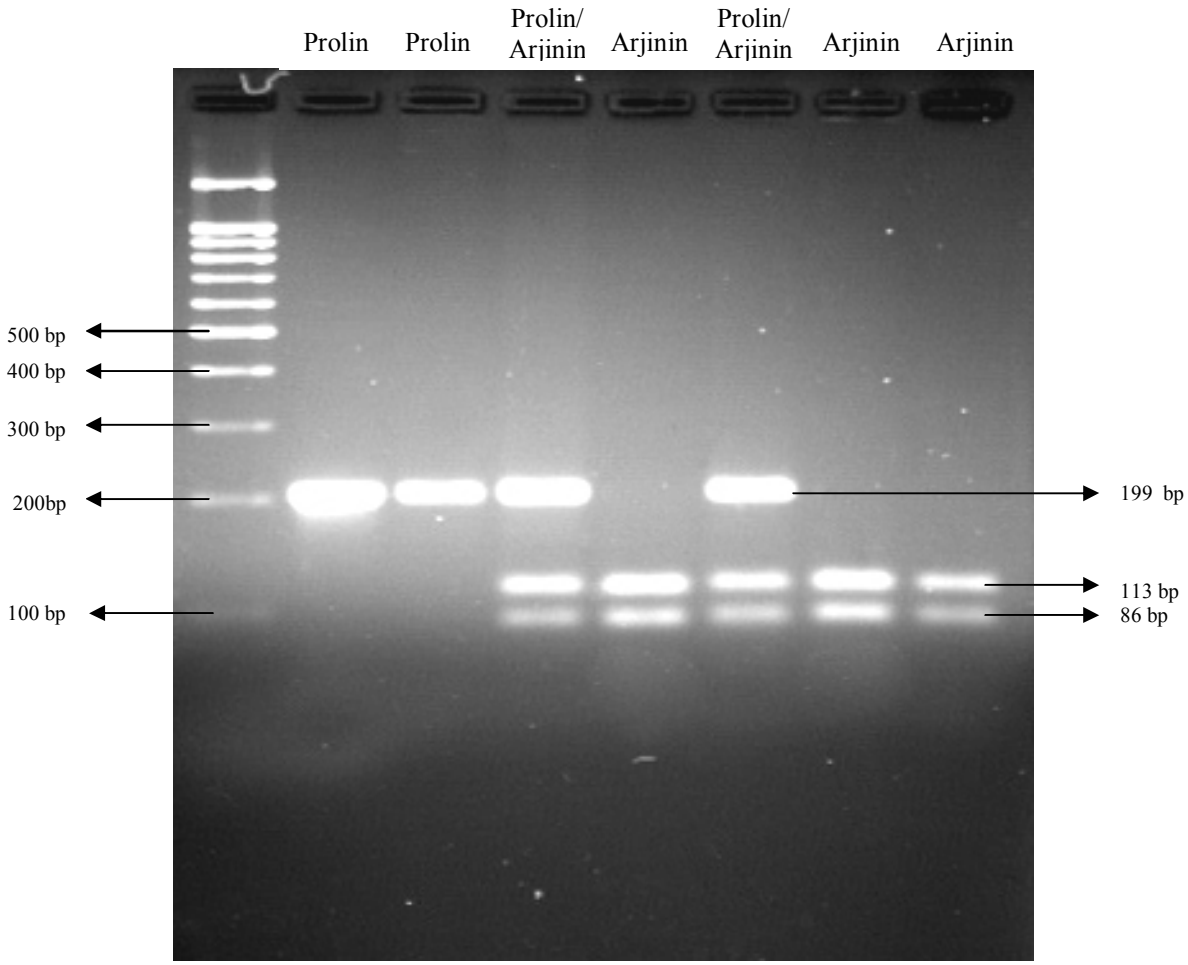
4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasındaki P53 Kodon72 RFLP Sonuçlarının Genotip ve Allel İnsidansları

Bu çalışmada p53 codon 72'deki polimorfik yapı incelendi. Bunun için polimorfik bölgeyi içine alan bölge polimeraz zincir yöntemiyle çoğaltıldı ve sonra görüntüler translüminatör aracılığıyla elde edilmiştir (şekil 4.1.). Oluşan 199 bp'lik PCR ürünleri p53 codon 72 deki CCC prolin ve CGC arjinin polimorfizminin tanımlanması için *BstUI* enzimiyle muamele edilerek RFLP işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. p53 geni Kodon 72 Arg/Pro Polimorfizminin tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunun %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.



Şekil 4.2. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile *Bst*UI (New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon Enzimi Kullanılarak p53 Genin analizi.

199 bp'lik PCR ürünü uygun şartlar altında BstUI restriksiyon enzimi ile muamele edilir ve çoğaltılan DNA fragmentinde BstUI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi olan "CGCG" bölgesi yer alırsa DNA fragmenti restriksiyon enzimi tarafından kesilir. Şekil 4.2 de görüldüğü üzere restriksiyon enzimi tarafından kesilmiş 199 bp'lik DNA fragmenti 113 bp'lik ve 86 bp'lik iki alt üniteye dönüşmüştür.

p53 kodon 72 sırasıyla 199 bp, 113 bp ve 86 bp'lik fragmentlere göre analiz edilmiştir. Buna göre 199 bp'lik tek bir fragmentin üzerinde BstUI enzimsel bir

tanıma bölgesi ve restriksiyona tabii olmadığından Prolin olarak değerlendirilmiştir. 113 bp ve 86 bp iki ayrı fragment ise BstUI enzimsel bir tanıma bölgesine sahip olan ve restriksiyona tabii olan Arjinin olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca allelerden birinin Prolin diğerinin Arjinin olmasıyla ortaya 3 farklı uzunlukta 199 bp, 113 bp ve 86 bp'lik üç farklı uzunlukta fragment oluşmuştur. Bunlarda heterezigot olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.2

P53 kodon 72 polimorfizmi çalışılan meme kanserli hasta ve kontrol grupları arasında toplam 63 (%42) Arg/Arg homozigot, 68 (%45,3) Arg/Pro heterezigot ve 19 (%12,7) Pro/Pro olarak belirlendi. Meme kanserli 75 hasta grubunda 29 (%38,7) Arg/Arg homozigot, 36 (%48) Arg/Pro heterezigot ve 10 (%13,3) Pro/Pro olarak belirlendi. Ayrıca 75 kişinin yer aldığı kontrol grubunda ise 34 (%45,3) Arg/Arg homozigot, 32 (%42,7) Arg/Pro heterezigot ve 9 (%12) Pro/Pro olarak belirlendi.

Buna göre meme kanserli hastalar ve kontrol grubu genotipleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu (p=0.710).

Çizelge 4.1. p53 kodon 72 bölgesi genotiplerinin kanser ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması ve % dağılımları.

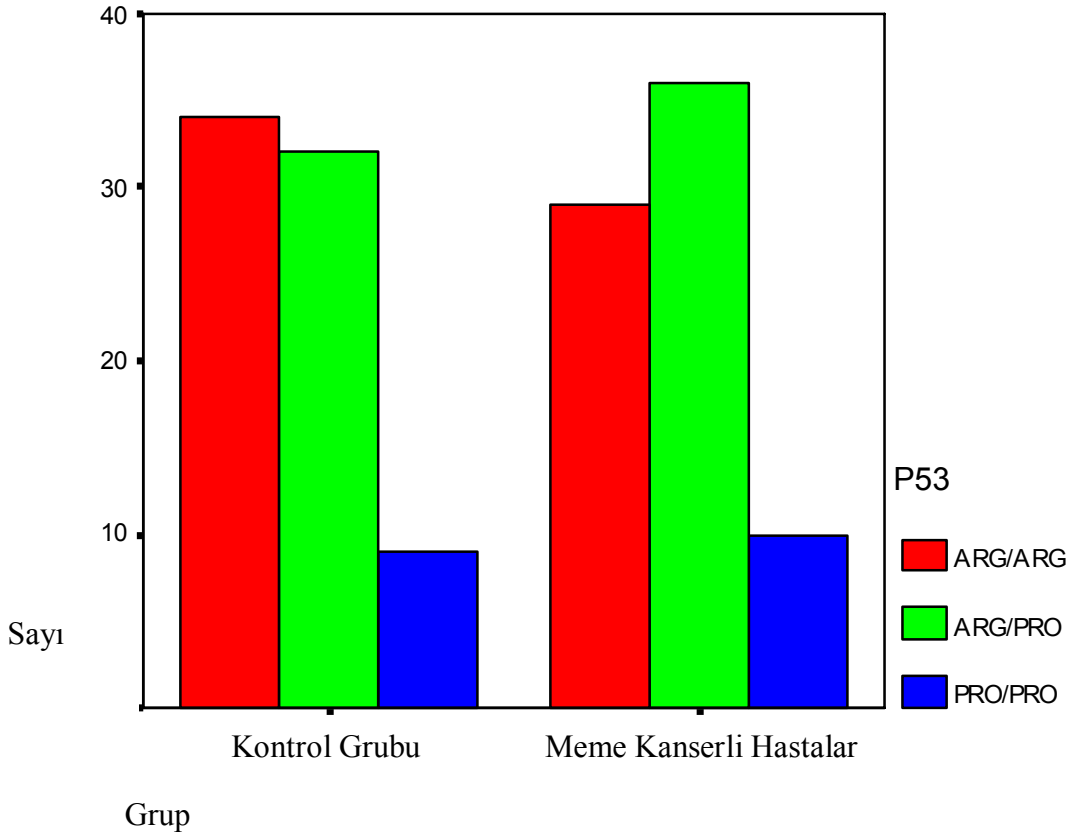
			P53 kodon 72			Toplam
			ARG/ARG	ARG/PRO	PRO/PRO	
Grup	Kontrol	N	34,0	32,0	9,0	75
		Beklenen Değer	31,5	34,0	9,5	75
		% Grup içinde	45,3	42,7	12,0	100
		% P53 içinde	54,0	47,1	47,4	50
		% Toplam	22,7	21,3	6,0	50
	Meme kanseri	N	29,0	36,0	10,0	75
		Beklenen Değer	31,5	34,0	9,5	75
		% Grup içinde	38,7	48,0	13,3	100
		% P53 içinde	46,0	52,9	52,6	50
		% Toplam	19,3	24,0	6,7	50
Toplam		N	63,0	68,0	19,0	150
		Beklenen Değer	63,0	68,0	19,0	150
		% Grup içinde	42,0	45,3	12,7	100
		% P53 içinde	100,0	100,0	100,0	100
		% Toplam	42,0	45,3	12,7	100

Çizelge 4.2. p53 Kodon 72 Meme kanserli hastalar ile kontrol grubu arasındaki Ki kare testi anlamlılık sonuçları

Ki-kare test	Value	df	P
Pearson Chi-Square	0,685	2	0,710
Likelihood Ratio	0,685	2	0,710
Linear-by-Linear Association	0,518	1	0,472
N of Valid Cases	150,000		

Boş hücrelerin beklenen sayısı 5'ten az

Minimum beklenen sayı 9,50



Şekil 4.3. p53 kodon 72 bölgesinde Arg/Arg, Arg/Pro ve Pro/Pro genotipli olguların Kontrol Grubu ve Meme kanserli hastalar arasındaki dağılımının grafiksel karşılaştırması.

Genotipler açısından meme kanser riski lojistik regresyon yöntemi ile hesaplandı. Arg/Arg genotipine göre Arg/Pro genotipi meme kanseri riskini 1.319 kat arttırmış olmasına rağmen istatistiksel olarak önemsizdir p=0.430. Arg/Arg genotipine göre Pro/Pro genotipi meme kanseri riskini 1.303 kat artırmış ama bu artış istatistiksel olarak önemsizdir (p=0.614).

Çizelge 4.3. Genotipler açısından kanser riskininin lojistik regresyon analizi

	B	S.E.	Wald	df	P<0,05	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
							Alt	Üst
P53			0,684	2	0,710			
P53(1)	0,277	0,351	0,624	1	0,430	1,319	0,663	2,622
P53(2)	0,264	0,524	0,254	1	0,614	1,303	0,466	3,641
sabit	-0,159	0,253	0,396	1	0,529	0,853		

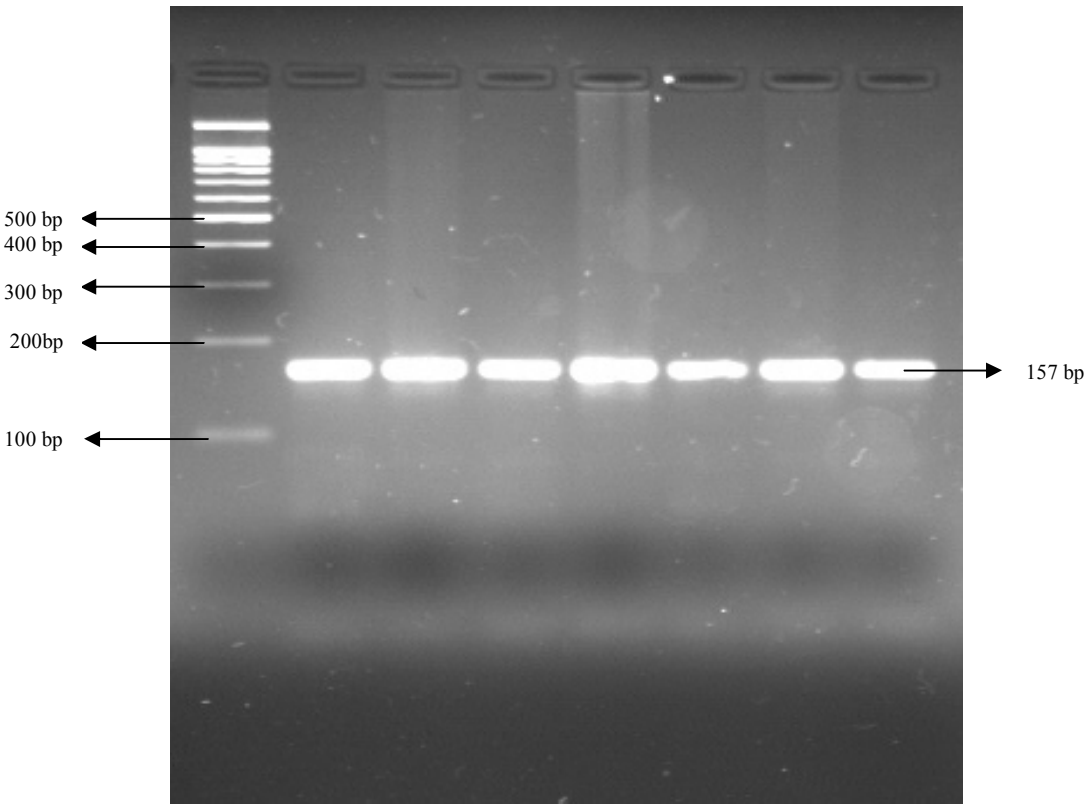
Alleller açısından meme kanser riski lojistik regresyon yöntemi ile hesaplandı. Arg/Pro, Pro/Pro yani Prolin allelli taşıyanlarda meme kanseri riski Arg/Arg yani Arjinin alleli taşıyanlara göre 1.315 kat artmıştır ama istatistiksel olarak önemli değildir (p=0.409).

Çizelge 4.4. Genotipler açısından kanser riskininin lojistik regresyon analizi.

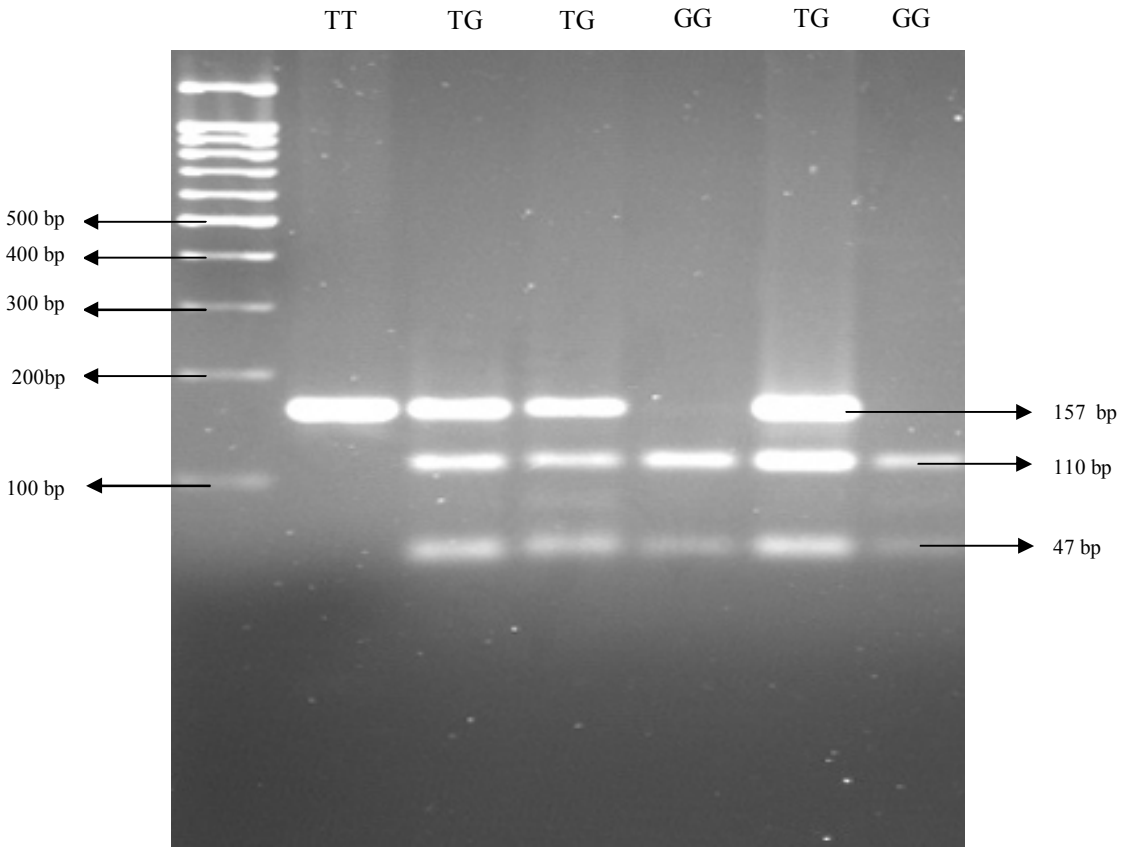
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
							Alt	Üst
P53_ALEL(1)	0,274	0,332	0,683	1	0,409	1,315	0,687	2,520
Sabit	-0,159	0,253	0,396	1	0,529	0,853		

4.2. Hasta ve Kontrol Grupları Arasındaki MDM2 SNP 309 T/G RFLP Sonuçlarının Genotip ve Allel İnsidansları

Bu çalışmada MDM2 geni içinde yer alan SNP309 T/G polimorfik yapısı PCR tabanlı RFLP yöntemi ile yapıldı. Bunun için polimeraz zincir yöntemiyle istenilen bölge çoğaltıldı ve görüntüler translüminatör aracılığıyla alınmıitır (şekil 4.2.).



Şekil 4.4. MDM2 SNP309 T/G Polimorfizminin Tespiti için Yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonucunun %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.5. PCR Tabanlı RFLP yöntemi ile MSPA1I (New England Biolabs, Beverly, MA) Restriksiyon Enzimi Kullanılarak p53 Genin analizi

157 bç'lik PCR ürünü uygun şartlar altında MSPA1I restriksiyon enzimi ile muamele edildi. MSPA1I restriksiyon enzimi MDM2 geni SNP309 noktasında Guanin nükleotidi bulunan PCR ürünü DNA fragmentlerini kesilerek 110 bç'lik ve 47 bç'lik iki ayrı DNA fragmenti oluşturdu. Buna göre bant dizileri arasında, 157 bç'lik tek bir DNA fragmenti TT homozigot, 110 ve 47 bç'lik iki DNA fragmenti GG homozigot ve 157, 110 ve 47 bç'lik üç DNA fragmenti T/G heterizigot olarak kabul edildi.

Çizelge 4.5. p53 kodon 72 bölgesi genotiplerinin kanser ve kontrol gruplarına göre karşılaştırılması ve % dağılımları

			MDM2			Toplam
			GG	TG	TT	
Grup	Kontrol	n	15,0	40,0	20,0	75
		Beklenen Değer	18,0	39,5	17,5	75
		% Grup içinde	20,0	53,3	26,7	100
		% MDM2 içinde	41,7	50,6	57,1	50
		% Toplam	10,0	26,7	13,3	50
	Meme kanseri	n	21,0	39,0	15,0	75
		Beklenen Değer	18,0	39,5	17,5	75
		% Grup içinde	28,0	52,0	20,0	100
		% MDM2 içinde	58,3	49,4	42,9	50
		% Toplam	14,0	26,0	10,0	50
Toplam		n	36,0	79,0	35,0	150
		Beklenen Değer	36,0	79,0	35,0	150
		% Grup içinde	24,0	52,7	23,3	100
		% MDM2 içinde	100,0	100,0	100,0	100
		% Toplam	24,0	52,7	23,3	100

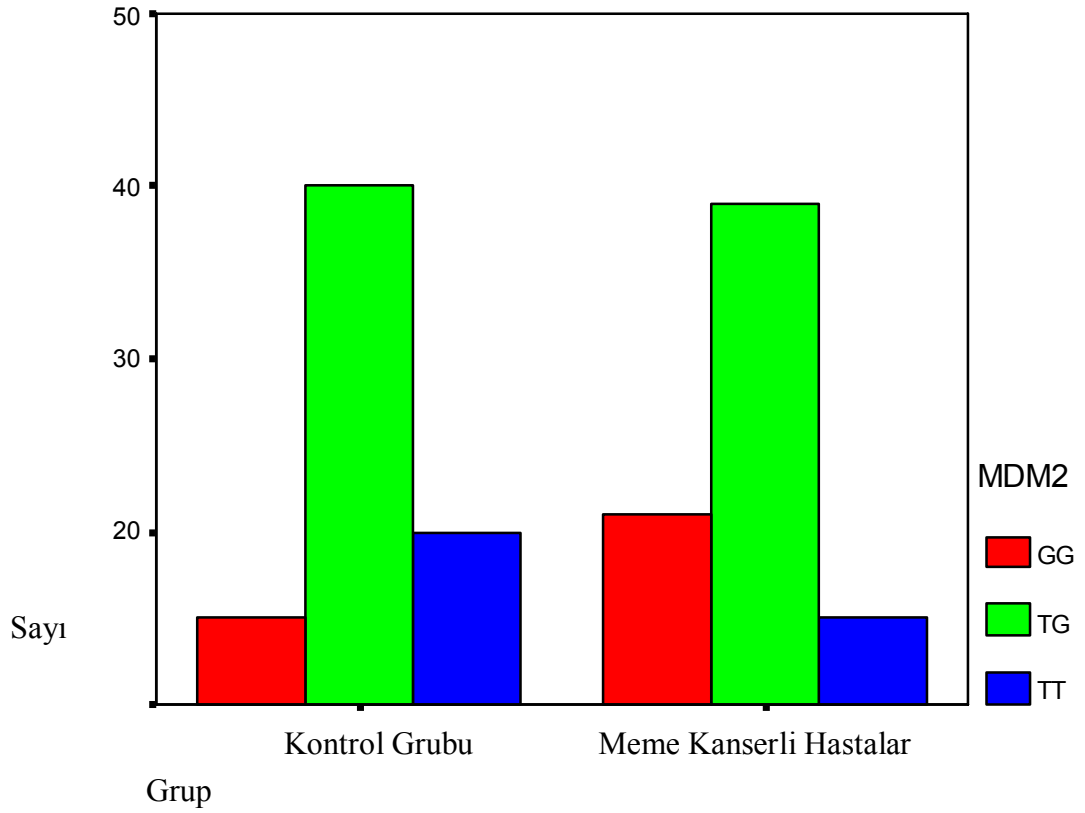
MDM2 SNP309 T/G polimorfizmi çalışılan meme kanserli hasta ve kontrol grupları arasında toplam 36 (%24) GG homozigot, 79 (%52,7) TG heterezigot ve 35 (%23,3) TT olarak belirlendi. Meme kanserli 75 hasta grubunda 21 (%28) GG homozigot, 39 (%52) TG heterezigot ve 15 (%20) TT olarak belirlendi. Ayrıca 75 kişinin yer aldığı kontrol grubunda ise 15 (%20) GG homozigot, 40 (%53,3) TG heterezigot ve 20 (%26,7) TT olarak belirlendi (çizelge 4.5.).

Buna göre meme kanserli hastalar ve kontrol grubu genotipleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0.422$).

Çizelge 4.6. MDM2 SNP309 Meme kanserli hastalar ile kontrol grubu arasındaki Ki kare testi anlamlılık sonuçları

Ki-kare test	Value	df	P
Pearson Chi-Square	1,727	2	0,422
Likelihood Ratio	1,734	2	0,420
Linear-by-Linear Association	1,693	1	0,193
N of Valid Cases	150,000		

Boş hücrelerin beklenen sayısı 5'ten az, Minimum beklenen sayı 17,50



Şekil 4.6. MDM2 SNP309 bölgesinde GG, TG ve TT genotipli olguların Kontrol Grubu ve Meme kanserli hastalar arasındaki dağılımının grafiksel karşılaştırması.

Genotipler açısından meme kanser riski lojistik regresyon yöntemi ile hesaplandı. TT genotipine göre GG genotipi meme kanseri riskini 1.867 kat arttırmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır (p=0.194). TT genotipine göre GT

genotipi meme kanseri riskini 1.300 kat artırmış ama bu artış istatistiksel olarak önemsizdir p=0.614.

Çizelge 4.7. Genotipler açısından kanser riskininin lojistik regresyon analizi

		B	S.E.	Wald	df	P<0,05	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
								Alt	Üst
Step 1(a)	MDM2			1,713	2	0,425			
	MDM2(1)	0,624	0,481	1,687	1	0,194	1,867	0,728	4,788
	MDM2(2)	0,262	0,409	0,411	1	0,521	1,300	0,583	2,898
	Sabit	-0,288	0,342	0,709	1	0,400	0,750		

Alleller açısından meme kanser riski lojistik regresyon yöntemi ile hesaplandı. GG, GT yani G alelli taşıyanlarda meme kanseri riski TT yani T alleli taşıyanlara göre 1.455 kat artmıştır ama istatistiksel olarak önemli değildir (p=0.336).

Çizelge 4.8. Alleller açısından kanser riskininin lojistik regresyon analizi

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I.for EXP(B)	
							Alt	Üst
MDM_ALEL(1)	0,375	0,389	0,927	1	0,336	1,455	0,678	3,119
Sabit	-0,288	0,342	0,709	1	0,400	0,750		

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, P53 kodon 72 Arg/Pro ve MDM2 SNP309 T/G polimirfizimlerinin meme kanseriyle ilişkilerinin olup olamadığı ve meme kanserine yakalanma riskini arttırıp arttırmadığı araştırılmıştır. Bunun için kontrol grubundan ve meme kanserli hastalardan alınan kan örneklerinden DNA ektraksiyonu yapılmış ve PZR tabanlı RFLP yöntemiyle hem p53 kodon 72 Arg/Pro hem de MDM2 SNP309 T/G polimorfizimleri saptanmıştır. Ayrıca çalışma neticesinde elde edilen bulgular diğer araştırmacıların sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Tek nükleotid polimorfizimleri, kanser sıklığının belirlenmesinde ve kanser tedavisine olası yanıtın nasıl şekillenebileceği konusunda önemli ipuçları verebilirler. Ancak birçok farklı tek nükleotid polimorfizminin içerisinden hangisinin ilgili hastalık ile ilişki içersinde olabileceğinin belirlenmesi şu ana kadar yapılan tüm bu çalışmalardaki en büyük güçlüklerdir (Gareth ve ark., 2005). Kişiye özgü tedavi olanaklarının gerçekleştirilebilmesi bilim insanlarının yeteri kadar güvenilir ve polimorfik bölgeleri hastalıklarla ilişkilendirebilen bir veri tabanı oluşturmasına bağlıdır. Son yıllarda genetik polimorfizimlerin herhangi bir hastalığa yatkınlık derecesinin tespiti ve tedavi şeklinin belirlenmesi açısından önemli olduğunun anlaşılması, bu alandaki bilimsel çalışmaları ivmelendirmiştir (Shen ve ark., 2002)

5.1. p53 kodon 72 Arg/Pro polimorfizminin Meme Kanseriyle ilişkisi

Kromozom 17p13 üzerinde yer alan p53 geni bütün kanser türleri arasında çoğunlukla mutasyona uğrayan gendir (Fan ve ark., 2000; Hollstein ve ark., 1991) Günümüzde bir çok polimorfizim wild tip p53 gen lokusunda belirlenmiştir. p53 geni dördüncü ekzonunda yer alan kodon 72 polimorfizminin ürünü protein varyantlarından olan arjininin (CGC) veya prolinin (CCC) akciğer kanseriyle ve mesane kanseriyle ilişkisi rapor edilmiştir (Oka ve ark., 1991; Weston ve ark., 1992). Arjinin (CGC) büyük polar, prolin (CCC) ise küçük polar amino asit rezidüsüdür. Bu

gen motifindeki değişiklik sonucunda oluşan p53 proteinin fonksiyonel ve kimyasal özellikleri değişir. p53 prolin güçlü bir transkripsiyonel aktivatör olmasına karşın apoptozisi indüklemesi açısından p53 arjininden daha azdır. (Matlasheski ve ark., 1987) Bu durum prolince zengin bölgede bulunan SH3-bağlantı motiflerinden kaynaklanmaktadır (Walker ve ark., 1996).

Papadakis ve ark., 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada p53 homozigot arjinin meme tümorgenesisi için bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir.

Khandang ve ark., 2007 yılında yapmış oldukları iran populasyonundaki çalışmada p53 kodon 72 Arg/Pro polimorfizmininin meme kanseri ile ilişkisiz olduğunu bildirmişlerdir.

Damin ve ark., p53 homozigot arjininin meme karsinogenezine kuvvetlice karıştığını, Arg/Arg genotipinin malignasi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Huang ve ark., 2003 yılında yaptığı çalışmada p53 kodon 72 Arg/Pro polimorfizminin meme kanseri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Mabrouk ve ark., 2003 yılında yapmış oldukları araştırma sonucunda P53 kodon 72 polimorfizmi ile meme kanseri ve mesane kanseri arasında tutarlı bir ilişkiyi bulamadıklarını bildirmişlerdir.

Xu ve ark., 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada p53 kodon 72 polimorfizminin meme kanserli hastlarda anthracycline tabanlı neoadjuvant kemoterapi için prediktif markır olabileceğini belirtmişlerdir.

Bir çok grup p53 Kodon 72 Arjinin polimorfiziminin bazı epitelyal kanserlerde riski arttırdığını rapor etmişlerdir. Bunlar: Gastrik kanserde (Shen ve ark. 20004), Meme kanserinde (Langerod ve ark., 2002., Bonafe ve ark., 2003., Buyru ve ark., 2003), Yumurtalık kanserinde (Pegoraro ve ark., 2002), Özefagus kanserinde (Kawaguchi ve ark., 2000), Deri kanserinde (Dokianakis ve ark. 2000., Bastiaens ve ark. 2001., Shen ve ark., 2003), Akciğer kanserinde (Wu ve ark., 2002), Mesane kanserinde (Soulitzis ve ark., 2002), Prostat kanserinde (Henner ve ark., 2001) ve Gırtlak kanserinde (Sourvinos ve ark., 2001) yapılan çalışmalardır.

Bununlar beraber yapılan bazı çalışmalarda diğer kanser tipleri için p53 Kodon 72 Prolinin kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir. Bunlar: Tiroit kanserinde (Granja ve ark., 2004), Nazofarenks kanserinde (Tsai ve ark., 2002., Tiwawech ve

ark., 2003), Prostat kanserinde (Suzuki ve ark., 2003), Deri kanserinde (Chen ve ark., 2003), Üregenital bölge (Kuroda ve ark., 2003) ve Akciğer kanserinde (Wang ve ark., 1999) yapılan çalışmalardır.

Yine bazı gruplar da, p53 kodon 72 polimorfizimi ile kanser riski arasında ilişki bulamamışlardır. Tüm bu farklılıkların nedeninde belki tümörde p53 mutasyonel durum belirleniminin yapılmayışı bir etken olabilir. Bu farklılıkların nedeni olarak, kontrol gruplarının doğru seçilememesine veya analiz yöntemlerinin hatalı oluşları gibi durumlarda söz konusu olabilir.

Sonuç olarak şu an için p53 kodon 72 polimorfik varyantları ve kanser riski arasındaki korelasyon net değildir. Kanser progresyonu, hayatta kalım, kansere yakalanma yaşı gibi konular için daha tutarlı sonuçlar gerekmektedir (Pietsch ve ark., 2006).

Bu çalışmada p53 kodon 72 polimorfizminin meme kanseri üzerine etkisi PZR tabanlı RFLP yöntemi ile yapıldı. Araştırma sonucunda p53 kodon 72 polimorfizmi ile meme kanseri arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Ayrıca p53 kodon 72 için Pro/Pro genotipi Arg/Arg genotipine göre meme kanseri riskini belirli derecede arttırmış olduğu bulundu. Fakat bu artışın önemli olmadığı istatiksel olarak saptanmadı. Arg/Pro genotipi Arg/Arg genotipine oranla belirli derecede meme kanseri riskini arttırmış olduğu gözlensede istatiki olarak önemli bir fark oluşmadığından meme kanserine etkisi saptanmadı. Prolin alleli taşıyanlar ile prolin alleli taşımayanlar arasında alleller açısından meme kanseri riski kısmen artmış olarak bulunsada anlamlı bir artış olmadığından alleller açısından meme kanseri ile ilişki saptanmadı.

Bu çalışmada p53 kodon 72 gen polimorfizminin meme kanseri üzerine etkisinin bulunmadığı görüşündeyiz. Bizden önce yapılan bazı çalışmalarda bizim bulduğumuz bu sonucu desteklemektedir.

5.2. MDM2 SNP 309 polimorfizminin Meme Kanseriyle ilişkisi

MDM2 proteininin hücre içerisindeki veya organizmadaki düzeyi p53 yanıtı ve kanser formasyonu üzerinde geniş bir etkiye sahiptir. MDM2 geninin iki tane promoter-enhanser bölgesine sahip olduğu gösterilmiş bunlardan birincisi 5' ucundan birinci ekzona kadardır ve stres durumunda olmayan hücrelerde uygun taban (hücre içinde bulunması gereken minimum miktar) MDM2 düzeyini düzenler. İkinci promoter bölge ise birinci intronun içinde olup (MDM2 geninde üçüncü ekson birinci kodlanan eksondur). 309. pozisyonundaki tek nükleotid polimorfizminin bulunduğu bölgeyi kapsar. Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olarak kimliklendirmiş olan bu bölgenin 309. pozisyonundaki T (timin)'in G (guanin)'e değişimi SP1'in (transkripsiyon faktörü) bağlanma bölgesinin uzunluğunu artırarak MDM2 genin trankripsiyonu fazlalaştırır. Böylece hücre içinde MDM2 konsantrasyon artışına istinaden p53 protein konsantrasyonu dramatik bir şekilde düşer.

Boersma ve ark., 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada MDM2 SNP309 ile meme kanserli hastaların hayatta kalımları arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir.

Schmidt ve ark., 2007 yılında yapmış oldukları geniş ölçekteki çalışmalarında MDM2 SNP309 ve P53 kodon 72 polimorfizmleri ile meme kanserli hastalar arasında ayrı ayrı veya birlikte herhangi bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir.

Ma ve ark., 2006 yılında yapmış oldukları çalışma sonucunda MDM2 SNP309 polimorfizminin meme kanserinin etyolojisi içinde önemli bir role sahip olmadığını bildirmişlerdir.

Petenkaya ve ark., 2006 yılında yapmış olduğu çalışmada MDM2 SNP309 polimorfizmi ile meme kanseri arasında bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir.

Millikan ve ark., 2006 yılında olduğu çalışmada MDM2 SNP309 polimorfizmi ile meme kanserli afro amerikan hasta grubu arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir.

Schmidt ve arkadaşlarının 2007 yılında BCAC (Breast Cancer Association Consortium) çatısı altında yaptıkları ve geniş ölçekte sınıflandırılan çalışmalarına

Finlandiya: HeBCS, Almanya: HaBCS, Hollanda: ABCS, Birleşik Krallık, Cambridge: SEARCH ve Birleşik Krallık, London :BBC. Konsorsiyumları katılmıştır. Bu çalışma, 5.194 hasta ve 3.834 kontrol grupları üzerinde yapılmıştır. Çalışmaların üçü (HaBCS, ABCS ve BBC) özellikle bilateral tabanlıdır. Ailesel öykü bilgisi hastaların %11 haricinde mevcuttur. Tümör grade ilişkileri, HaBCS, ABCS ve SEARCH gruplarında verilmiştir. Östrojen reseptör ilişkisi (pozitif veya negatif) HeBCS, HaBCS, ABCS ve SEARCH çalışmalarında sunulmuştur. Tüm bu çalışmalar Etik Araştırma komitesi tarafından uygun bulunmuştur.

Schmidt ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışma sonucunda MDM2 SNP309'un kansere yakalanma riskini arttırmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca MDM2 SNP309'un kansere daha erken yakalanma ile ilişkisinin bulunmadığını da bildirmişlerdir. Yine kombinasyon olarak MDM2 SNP309 ve TP53 R72P'nin kanser riskini arttırmadığını aynı zamanda daha erken yaşta kansere yakalanmayı da sağlamadığı bildirilmiştir.

North Carolina'da Afrikalı Amerikalılarda ve Beyazlarda 2.037 (Millikan ve ark., 2006), Çin'de 366 (Ma ve ark., 2006), Almanya'da non-BRCA1-2 549 (Wilkening ve ark., 2006), İngiltere'de 351 (Campbell ve ark., 2006), Baltimore'da 293 (Boersma ve ark., 2006) meme kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda, ilişki ortaya konamamıştır. Bununla beraber SNP309'un hormonların etkisini değiştirebileceği (örneğin östrojen hormonu gibi) böylece meme tümörgenesisinin davranışı üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca spesifik olarak östrojen reseptörü pozitif tümörlerde kansere yakalanma yaşı ile ilişkili olabileceği de belirtilmiştir.

Bu çalışmada MDM2 SNP309 polimorfizminin meme kanseri üzerine etkisi PZR tabanlı RFLP yöntemi ile yapıldı. Araştırma sonucunda MDM2 SNP309 polimorfizmi ile meme kanseri arasında istatiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Ayrıca MDM2 SNP 309 için GG genotipi TT genotipine meme kanseri riskini belirli derecede arttırmış olduğu bulundu. Fakat bu artışın önemli olmadığı istatiksel olarak saptandı. GT genotipi TT genotipine oranla belirli derecede meme kanseri riskini arttırmış olduğu gözlensede istatiki olarak önemli bir fark

oluşmadığından meme kanserine etkisi saptanmadı. G alleli taşıyanlar ile G alleli taşımayanlar arasında aller açısından meme kanseri riski kısmen artmış olarak bulunsada anlamlı bir artış olmadığından aller açısından meme kanseri ile ilişki saptanmadı.

Bu çalışmada MDM2 SNP 309 gen polimorfizminin meme kanseri üzerine etkisinin bulunmadığı görüşündeyiz. Bizden önce yapılan bazı çalışmalarda bizim bulduğumuz bu sonucu desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Onkoloji alanında yapılan genetik polimorfizim çalışmaları kanserli hastaların nasıl bir tedaviye tabii tutulmasını, kişinin kansere yakalanma riskinin tespiti gibi temel konulara cevap aramak için yapılmaktadır. Kanser genetiğinin en önemli konularından biri olan p53 tümör süpressör yolağı hücre döngüsü içinde oldukça kritik bir role sahiptir.

Bu çalışmada p53 tümör süpressör yolağında yer alan iki önemli gendeki bazı polimorfizimlerin Türk populasyonu dahilinde meme kanserli hastalar üzerinde inceledik. Yaptığımız çalışma sonucunda p53 tümör süpressör geni içinde yer alan kodon 72 polimorfizimlerinin meme kanseri ile ilişkisinin olmadığı sonucuna vardık. Yine p53 tümör süpressör yolağında yer alan MDM2 geninin -309 bölgesinde yer alan T-G polimorfizmi de Türk populasyonu dahilinde meme kanserli hastalar üzerinde çalışıldı. Bu çalışma sonucunda MDM2 SNP309'un meme kanseri ile ilişkisinin olmadığı sonucuna vardık.

Bu çalışmadan elde edile sonuçlar göz önünde bulundurulacak olursa MDM2 SNP 309 ve p53 kodon 72 polimorfizimlerinin türk populasyonunda meme kanseri ile ilişkisi olmadığını söyleyebiliriz. Fakat bu konuda kesin yargıya varabilmemiz için daha geniş tabanlı daha büyük hasta ve kontrol gruplarını içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca önceki konu başlıklarında değinildiği gibi birçok farklı tek nükleotid polimorfizminin içerisinden hangisinin ilgili hastalık ile ilişki içersinde olabileceğinin belirlenmesi şu ana kadar yapılan tüm bu çalışmalardaki en büyük güçlüğü meydana getirmektedir. Bu alanda biriken bütün sonuçların ilintili veri tabanlarına aktarılması ve yüzlerce parametre içersinden istenilen varyasyonları yorumlayabilecek algoritmalara ihtiyacımız olacaktır. Bu algoritmaların kurgulanması son yıllarda gerek moleküler biyoloji gerek programlama alanındaki gelişmeler neticesinde hızlı bir ivme kazanan biyoenformatik çerçevesinde beklenmelidir. Özellikle klinik alanda microarray analizleri gibi bir çok analizin yaygınlaştırılması multi disiplinsel bir bilim dalı olan biyoenformatiğin önemini daha

da arttırmaktadır. Şüphesiz gelecek yıllarda önemini daha da arttırması beklenen biyoenformatik alanının Türkiye'de de belirli bir gelişim içersinde oluşu sevindirici bir gelişme olarak görülmelidir.

KAYNAKLAR

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2002. Molecular biology of the cell, Gerlande science Newyork.

APPELLA, E., ANDERSON, CW., 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. Eur. J. Biochem;268:2764–72.

BASTIAENS, MT., STRUYK, L., TJONG-A-HUNG, SP., GRUIS, N., TER, HUURNE, J., WESTENDORP, RG., VERMEER, BJ., BAVINCK, JN., SCHEGGET, J., 2001. Utaneous squamous cell carcinoma and p53 codon 72 polymorphism: a need for screening? Mol. Carcinog 30:56–61.

BECKMAN, G., BIRGANDER, R., SJALANDER, A., 1994. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? Hum Hered;44:266–70.

BOERSMA, BJ., HOWE, TM., GOODMAN, JE., YFANTIS, HG., LEE, DH., CHANOCK, SJ., AMBS, S., 2006. Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309, J Natl Cancer Inst. 5;98(13):911-9.

BONAFE, M., CECCARELLI, C., FARABEGOLI, F., SANTINI, D., TAFFURELLI, M., BARBI, C., MARZI, E., TRAPASSI, C., STORCI, G., OLIVIERI, F., FRANCESCHI, C. 2003. Clin Cancer Res 9:4860–4864.

BOND, G.L., HU, W., LEVINE, A., 2005. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene: From a Molecular and Cellular Explanation to Clinical Effect. Cancer Res ; 65(13): 5481-4.

BOND, GL., HU, W., BOND, EE., 2004. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. Cell ;119: 591–602.

BUYRU, N., TIGLI, H., DALAY, N., 2003. p53 codon 72 polymorphism in breast cancer, Oncol Rep. 10(3):711-4.

CAMPBELL, IG., ECCLES, DM., CHOONG, DY., 2006. No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer. Cancer Lett ;240:195–7.

CHEN, YC., XU, L., GUO, YL., SU, HJ., HSUEH, YM., SMITH, TJ., RYAN, LM., LEE, MS., CHAOR, SC., LEE, JY., CHRISTIANI, DC., 2003. Genetic polymorphism in p53 codon 72 and skin cancer in southwestern Taiwan. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 38:201–211.

CHIN, PL., MOMAND, J., PFEIFER, GP,. 1997. In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. Oncogene 15:87.

DOKIANAKIS, DN., KOUMANTAKI, E., BILLIRI, K., SPANDIDOS, DA., 2000. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. Int J Mol Med 5:405–409.

DUMONT, P., LEU, JI., DELLA PIETRA, AC., III, GEORGE DL, MURPHY M., 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. Nat Genet 33:357–65.

EL-DEIRY, WS., TOKINO, T., VELCULESCU, PE., LEVY, DB., PARSONS, R., TRENT, JM., LIN, D., MERCEWR ,WE., KINZLER, KW., VOGELSTEIN, B., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75:817.

GARETH. L. BOND., WENWEI. HU., ARNOLD. LEVINE., A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene: From a Molecular and Cellular Explanation to Clinical Effect . 1;65(13):5481-4.

GIACCIA, AJ., KASTAN, MB., 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. Gene Dev 12:2973.

GRANJA, F., MORARI, J., MORARI., EC., CORREA, LA., ASSUMPCAO, LV., WARD, LS., 2004. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. Cancer Lett 210:151–157.

HAHN, W, C., WEINBERG. R. A., 2002. Modelling The Molecular Circuitry Of Cancer Nature Reviews, 2: 331-341.

HENNER, WD., EVANS, AJ., HOUGH, KM., HARRIS, EL., LOWE, BA., BEER, TM., 2001. Association of codon 72 polymorphism of p53 with lower prostate cancer risk. Prostate 49:263–266.

KAMIJO, T., WEBER, JD., ZAMBETTI, G., ZINDY, F., ROUSSEL, MF., SHERR CJ., 1998. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 AND Mdm2. Proc Natl Acad Sci USA 95:8292.

KAWAGUCHI, H., OHNO, S., ARAKI, K., MIYAZAKI, M., SAEKI, H., WATANABE, M., TANAKA, S., SUGIMACHI, K., 2000. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. Cancer Res. 60:2753–2755.

KURODA, Y., TSUKINO, H., NAKAO, H., IMAI, H., KATOH, T., 2003. p53 Codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk. Cancer Lett 189:77–83.

WILLIAM S. KLUG , MICHAEL R. CUMMINGS Genetics: A Molecular Perspective

KUMAR, V., et. al., 2004. Robins Basic Pathology 7th edition, Newyork.

LANGEROD, A., BUKHOLM, IR., BREGARD, A., LONNING, PE., ANDERSEN, TI., ROGNUM, TO., MELING, GI., LOTHE, RA., BORRESEN,-DALE, AL. 2002. The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11:1684–1688.

LEVINE, AJ., 1997. P53: The cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88:323

LODISH, H., BERK A., KAISER, A., KRIEGER, M., SCOTT, P., BRETSCHER, A., PLOEGH, H., MATSUDAIRA, P., 2002. Molecular Cell Biology.

MA, H., HU, Z., ZHAI, X., WANG, S., WANG, X., QIN, J., JIN, G., LIU, J., WANG, X., WEI, Q., SHEN, H., 2006. Polymorphisms in the MDM2 promoter and risk of breast cancer: a case-control analysis in a Chinese population, Cancer Lett. Aug 28;240(2):261-7. Epub Nov 8.

MALKIN, D., 1998. The Li-Fraumeni Syndrome, The Genetic Basis of Human Cancer, New York, p: 393.

MARIN, MC., JOST, CA., BROOKS, LA., 2000. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. Nat Genet ;25:47–54.

MICHAEL, D., OREN, M., 2003. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. Semin Cancer Biol. 13:49–58.

MILLIKAN, RC., HEARD, K., WINKEL, S., HILL, EJ., HEARD, K., MASSA, B., MAYES, L., WILLIAMS, P., HOLSTON, R., CONWAY K., EDMISTON, S., COTRET AD. 2006. No association between the MDM2 -309 T/G promoter polymorphism and breast cancer in African-Americans or Whites Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 15:175–7.

ONAT, OE., TEZ, M., OZÇELİK, T., TÖRÜNER, GA., 2006. MDM2 T309G polymorphism is associated with bladder cancer, Anticancer Res; 26 (5A) Sep-Oct.

ONAT, OE., TEZ, M., OZÇELİK, T., TÖRÜNER, GA., 2006. The p53 Arg72Pro and MDM2 -309 polymorphisms and risk of breast cancer in the nurses' health studies, Anticancer Res. Sep-Oct;26(5A):3473-5.

PAPADAKIS, EN., DOKIANAKIS, DN., SPANDIDOS, DA., 2000. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer, Mol Cell Biol Res Commun. Jun;3(6):389-92.

PEGORARO, RJ., ROM, L., LANNING, PA., MOODLEY, M., NAIKER, S., MOODLEY, J. 2002. P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus type in relation to cervical cancer in South African women. Int. J. Gynecol Cancer 12:383–388.

PETENKAYA, A,. BOZKURT, B., AKİLLİ-OZTURK, O., KAYA, HS., GUR-DEDEOGLU, B,. YULUG, IG., 2006. Lack of association between the MDM2-SNP309 polymorphism and breast cancer risk. Anticancer Res; 26 (6C) Nov-Dec.

PIETSCH, EC., HUMBEY, O., MURPHY, ME. 2006. Polymorphisms in the p53 pathway. Oncogene 25, 1602–1611. doi:10.1038/sj.onc.1209367.

ROCCO, JW., SIDRANSKY, D., 2001. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. Exp Cell Res 264:42.

RONG FAN, MING-TSANG WU., 2000. The p53 Codon 72 Polymorphism and Lung Cancer Risk, Vol. 9, 1037–1042.

SACHIDANANDAM, R., WEISSMAN, D., SCHMIDT, SC., KAKOL, JM,. STEIN, L, D., MARTH, G,. SHERRY. S., MULLIKIN, J, C., MORTIMORE, B, J., WILLEY, D, L., HUNT. S. E., COLE, C, G., COGGILL, P, C., RICE, C, M., NING, Z., ROGERS, J., BENTLEY, D, R., KWOK, P, Y., MARDIS, E, R., YEH, R, T., SCHULTZ, B., COOK, L., DAVENPORT, R., DANTE, M., FULTON, L., HILLIER, L., WATERSTON, R, H., MCPHERSON, J, D., GILMAN, B., SCHAFFNER, S., VAN, ETTEN, W, J., REICH, D., HIGGINS, J., DALY, M, J., BLUMENSTIEL, B., BALDWIN, J., STANGE-THOMANN, N., ZODY, M, C., LINTON, L., LANDER, E, S., ALTSHULER, D,. 2001. International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature; 409:928–33.

SAMBROOK, J., RUSSEL D.W., 2001. Molecular cloning third edition, cold spring harbor laboratory pres cold spring harbor, Newyok.

SCHMIDT, M. K., REINCKE, S., BROEKS, A., BRAAF, LM., HOGERVORST, FB., TOLLENAAR, RA., JOHNSON, N., FLETCHER, O., PETO, J., TOMMISKA, J., BLOMQVIST, C., NEVANLINNA, HA., HEALEY, CS., DUNNING, AM., PHAROAH, PD., EASTON, DF., DORK, T., VAN'T, VEER LJ., 2007. Breast Cancer Association Consortium. Do MDM2 SNP309 and TP53 R72P interact in breast cancer susceptibility? A large pooled series from the breast cancer association consortium, Cancer Res. Oct 1;67(19):9584-90.

SCHULZ, WOLFGANG, ARTHUR,. 2005. Molecular Biology of Human Cancers.

SHEN, H., LIU, Z., STROM, SS., SPITZ, MR., LEE, JE., GERSHENWALD, JE., ROSS, MI., MANSFIELD, PF., DUVIC, M., ANANTHASWAMY, HN., WEI, Q., 2003. p53 codon 72 Arg homozygotes are associated with an increased risk of cutaneous melanoma. Invest Dermatol 121:1510–1514.

SHEN, P., BUCHHOLZ, M., SUNG, R., ROXAS, A., FRANCO, C., YANG, W, H., JAGADEESAN, R., DAVIS, K., OEFNER, P,J,. 2002. Population genetic implications from DNA polymorphism in random human genomic sequences. Hum Mutat. Sep;20(3):209-17.

SHEN, H., SOLARI, A., WANG, X., ZHANG, Z., XU, Y., WANG, L., HU, X., GUO, J., WEİ, Q. 2004. P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. Oncol Rep 11:1115–1120.

SOURVINOS, G., RIZOS, E., SPANDIDOS, DA., 2001. p53 Codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. Oral Oncol 37: 572–578.

SOULITZIS, N., SOURVINOS, G., DOKIANAKIS, DN., SPANDIDOS, DA., 2002. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. Cancer Lett 179:175–183.

SOTAMAA, K., LIYANARACHCHI S., 2005. p53 Codon 72 and MDM2 SNP309 Polymorphisms and Age of Colorectal Cancer Onset in Lynch Syndrome, Clin Cancer Res 2005;11(19) October 1.

SUZUKI, K., MATSUI, H., OHTAKE, N., NAKATA, S., TAKEI, T., NAKAZATO, H., OKUGI, H., KOIKE, H., ONO, Y., ITO, K., KUROKAWA, K., YAMANAKA, H., 2003. A p53 codon 72 polymorphism associated with prostate cancer development and progression in Japanese. J Biomed Sci 10:430–435.

TIWAWECH, D., SRIVATANAKUL, P., KARALUK, A., ISHIDA, T., 2003. The p53 codon 72 polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett 198:69–75.

TSAI, MH., LIN, CD., HSIEH, YY., CHANG, FC., TSAI, FJ., CHEN, WC., TSAI, CH., 2002. Prognostic significance of the proline form of p53 codon 72 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma. J Clin Lab Anal 16:146–1.

TURNER, P.C., MCLENNAN, A.G., BATES, A.D., WHITE, M. R. H. 2003. Instant Notes in Molecular Biology Paperback.

VENTER, J, C., ADAMS, M, D., MYERS, E, W., 2001. The sequenceof the human genome. Science ;291:1304–51.

WANG, YC., CHEN, CY., CHEN, SK., CHANG, YY., LIN, P., 1999. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. Clin. Cancer Res. 5:129–134.

WEILL, D., MACK, M., ROTH, J., SWISHER, S., PROKSCH, S., MERRITT, J., NEMUNAITIS, J., 2000. Adenoviral-mediated p53 gene transfer to non-small cell lung cancer through endobronchial injection. Chest 118:966.

WILKENING S, BERMEJO J, BURWINKEL B., KLAES, R., BARTRAM, CR., MEINDL, A.,BUGERT, P., SCHMUTZLER, RK., WAPPENSCHMIDT, B., UNTCH, M., HEMMINKI, K., FÖRSTI, A. 2006. The single nucleotide polymorphism IVS1+309 in mouse double minute 2 does not affect risk of familial breast cancer. Cancer Res;66:646–8.

WOODS, DB., VOUSDEN, KH., 2001. Regulation of p53 function. Exp Cell Res 264:56.

ZORNIG, M., HUEBER, A-O., BAUM, W., EVAN, G., 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. Biochimica et Biophysica Acta 1551: F1-F37.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimime başladım ve 2003 yılında buradan mezun oldum. 2005 yılında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimime başladım. Şu an özel bir şirkette "kurumsal kaynak planlaması" kapsamında kalite yönetimi ve materyal yönetimi üzerine danışmanlık yapıyorum.