

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

K.K.T.C. TOPLUMUNDAKİ KANSER HASTALARINDA DNA
TAMİR GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN KANSERLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Feriha GÜNDOST EYYÜPLER

Biyokimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEFKOŞA
2010

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

K.K.T.C. TOPLUMUNDAKİ KANSER HASTALARINDA DNA
TAMİR GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN KANSERLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Feriha GÜNDOST EYYÜPLER

Biyokimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Jale REFİK-ROGERS

LEFKOŞA
2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından **BİYOKİMYA'DA YÜKSEK LİSANS PROGRAMINDA BİLİM UZMANLIĞI TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı :.....
Prof. Dr. Nazmi Özer

Yakın Doğu Üniversitesi

Üye (Danışman) :.....
Yrd. Doç. Dr. Jale Refik-Rogers

Yakın Doğu Üniversitesi

Üye :.....
Doç. Dr. Güldal Mehmetçik

Yakın Doğu Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

.....
Prof.Dr. İhsan Çalış
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2009 – 2010 yılları arasında Yakın Doğu Üniversite’si Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı ve Tıp Fakültesi’nin bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen ve ihtiyacım olan her konuda yol gösteren tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Jale Refik-Rogers’a çok teşekkür ederim. Hasta bilgi ve örneklerini temin eden Dr. Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastanesi, Onkoloji Bölümü doktoru, Sayın Dr. Özlem Gürkut’a çalışmamıza katkıları için teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışma süresince çalışmamın yürütülmesinde bize kapılarını açan Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi dekanı Sayın Prof. Gamze Mocan Kuzey’e, Tıp Fakültesi değerli hocalarından Sayın Prof. Nazmi Özer’e, Yard. Doç. Dr. Özlem Dalmızrak’a ve bizden desteğini esirgemeyen sevgili Tıp Fakültesi çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak tez çalışmam boyunca beni hayatım boyunca destekleyen ve her zaman yanımda olan sevgili anne ve babama, hayatıma girdiği andan itibaren her ihtiyacım olduğunda bana moral veren ve özellikle tez çalışması süresince bana sonsuz anlayış gösteren sevgili eşim Vet. Hek. Burak Eyyüpler’e teşekkür ederim.

ÖZET

GÜNDÖST-EYYÜPLER, F. K.K.T.C. toplumundaki kanser hastalarında DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin kanserle ilişkisinin araştırılması. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Lefkoşa, 2010.

2009-2010 yılları arasında yürütölen bu çalışmanın amacı Dr. Burhan Nalbantođu Devlet Hastahanesi'ne başvurmüş K.K.T.C. doğumlu kanser hastalarında DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin saptanması ve bu polimorfizmlerin kanserle ilişkisinin araştırılmasıdır. K.K.T.C. popölasyonunda K.K.T.C. kökenli akciğer kanseri, mide kanseri ve pankreas kanseri hastalarının kemoterapi tedavisi öncesinde kanları toplanıp DNA izolasyonu, PCR ve restriksiyon enzimleri ile kesim yöntemleri kullanılarak, hastaların nükleotid eksizyon tamir mekanizması (NER) ve baz eksizyon tamir mekanizması (BER) genlerindeki polimorfizmler tesbit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu polimorfizmlerin kansere yatkınlık ile arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda XRCC1 genindeki rs25487 polimorfizminde 10 hastada en sık görölen genotipin Arg/Gln olduğu tespit edilmiştir (%60). Çalışılan kontrol grubu sonuçlarına göre XRCC1 genindeki rs25487 polimorfizminde 10 kişide Arg/Gln 4 hastada tesbit edilmiştir (%40). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda Arg/Gln genotipi çoğunluktadır ama bu farkın anlamlı olup olmadığı bu çalışmadaki hasta sayısının artmasıyla açıklık kazanacaktır. ERCC2 genindeki rs13181 polimorfizminde ise 10 hastada Gln/Gln ve Lys/Gln genotipi eşit sayıda bulunmuştur. Kontrol grubu ile sonuçlar karşılaştırıldığında ise, ERCC2 genindeki rs13181 polimorfizminde ise 10 kişide Gln/Gln 4 hastada görülürken, kontrol grubunda Gln/Gln genotipine hiç rastlanmamıştır. Bu farkın anlamlı olup olmadığı hasta sayısının artışı ile ortaya çıkacaktır. Bu çalışma K.K.T.C. toplumunda bu çerçevede yapılan ilk çalışmadır. Bu pilot çalışmada deney koşulları oturtulmuş, deney koşullarının ve sonuçlarının tekrarlanabilirlikleri gösterilmiş ve daha geniş kapsamlı bir çalışma için ilk adım atılmıştır.

Anahtar kelimeler: DNA tamir mekanizması, kanser, polimorfizm.

Destekleyen kurumlar: BAP Projesi (Proje No: YDÜ/2009-14)

ABSTRACT

GÜNDÖST-EYYÜPLER, F. Study of the DNA repair gene polymorphisms and their relationship to cancer disposition in the Turkish Cypriot community. Near East University Health Science Institute, Biochemistry Program, Master Thesis, Nicosia, 2010.

The aim of this study was to determine the DNA repair gene polymorphisms in T.R.N.C.-born cancer patients that have been admitted to Burhan Nalbantoğlu Government Hospital between 2009-2010. The patient polymorphisms were then compared with age-matched controls to establish whether there is a correlation between the polymorphisms and cancer disposition. Blood samples were collected prior to the start of the chemotherapy treatment from each lung, stomach or pancreas cancer patient of T.R.N.C. origin. Using PCR and restriction fragment length polymorphism methods, nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER) gene polymorphisms were identified in each patient. Any correlation between specific polymorphisms and cancer was then identified. We have shown that four out of ten cancer patients carried Arg/Gln (%60) polymorphism in the XRCC1 gene (rs25487). Compared to the controls, an increased number of patients carry Arg/Gln polymorphism. As the number of patients participating in this study is increased in the future, it will become clear whether this is a significant difference. When ERCC2 gene polymorphism (rs13181) was analyzed in these 10 patients, it was determined that an equal number of patients carried Gln/Gln and Lys/Gln polymorphisms. Interestingly, there were four patients carrying Gln/Gln polymorphisms compared to none in the control group. As the number of patients participating in this study increases, significance of this result will be determined. This is first such study done in the Turkish Cypriot community. With this pilot study, we have established experimental conditions, showed that the experiments and results received were reproducible and laid the groundwork for a more through analysis of DNA repair gene polymorphisms in the Turkish Cypriot community, with a larger group of cancer patients.

Keywords: DNA repair mechanisms, cancer, polymorphism

Supported by BAP Project (Grant No: YDÜ/20

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DNA hasarı.....	3
2.2. DNATamir Mekanizmaları.....	4
2.2.1. Hatalı Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair).....	4
2.2.2. Rekombinasyon Tamiri (Double Strand Break Repair-DSBR).....	4
2.2.3. Baz Ekzizyon Tamiri (Base Excision Repair-BER).....	4
2.2.3.1. ‘Short-patch’ BER mekanizması.....	5
2.2.3.2. ‘Long-patch’ BER mekanizması.....	5
2.2.3.2.1. BER mekanizmasında rol alan genler.....	8
2.2.3.2.2. XRCC1 geni.....	9
2.2.4. Nükleotid Çıkarma Onarımı (NER).....	10
2.2.4.1. Transkripsiyona Bağlı Onarım (Transcription Coupled Repair/TCR).....	12
2.2.4.1.2. Transkripsiyona bağlı onarımda rol alan genler (XPD (ERCC2) ve XPB).....	13
2.2.4.2. Global Genom Onarımı (GG-NER).....	15
2.2.4.3. ERCC2 (XPD) geni.....	17
2.3. DNA onarımı ve Kanser.....	17
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER.....	21
3.1. GEREÇLER.....	21
3.1.1. Örneklerin Tanımı.....	21
3.1.2. Tamponlar, Çözeltiler ve Enzimler.....	21
3.1.2.1. Periferal Kan Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu için Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler.....	21
3.1.2.1.1. Hücre Lizis Tamponu (pH 8.0).....	21
3.1.2.1.2. Hücre Çekirdeği Lizis Tamponu (pH 8.0).....	21
3.1.2.1.3. 7.5 M Amonyum Asetat hazırlanması.....	22
3.1.2.1.4. 1 M Tris.HCL tamponunun hazırlanması.....	22
3.1.2.1.5. TE Tamponu.....	22
3.1.3. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri.....	22
3.1.3.1. 50X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA).....	22
3.1.3.2. % 2’lik AgaroZ Jel Hazırlanması.....	22
3.1.3.3. %0.8’lik AgaroZ Jel Hazırlanması.....	22
3.2. YÖNTEMLER.....	23

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

3.2.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	23
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	23
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	24
3.2.4. PCR Safılaştırma.....	24
3.2.5. Restriksiyon endonükleaz kesimi ve Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (SNP) Tespiti.....	25
4. BULGULAR.....	27
4.1. DNA İzolasyonu ve PCR:.....	28
4.2. Jel Ekstraksiyonu ve restriksiyon enzimleri ile kesim.....	34
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	
EKLER	
EK 1 Hasta Bilgi ve Onay Formu	

KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Amino asit
Arg	Arjinin
BER	Baz eksizyon tamir mekanizması
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamintetraasetik asit
ERCC2	‘Excision Repair cross-complementing gen 2’
Gln	Glutamin
KKTC	Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti
Lys	Lizin
mg	Miligram
ml	Mililitre
NER	Nükleotid eksizyon tamir mekanizması
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	‘Rotation per minute’
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
SNP	‘Single Nucleotide Polymorphism’
TE	Tris-EDTA
T _m	Erime sıcaklığı
U	Ünite
UV	Ultraviyole
XRCC1	‘X-ray repair cross-complementing gen 1’
XPD	‘Xeroderma pigmentosum’ group D
w/v	Ağırlık/hakim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Klasik BER yolağı	7
Şekil 2.2. TC-NER, GG-NER modeli ve TFIIH'ın transkripsiyon ve tamirdeki rolü	16
Şekil 4.1. PCR reaksiyonları için optimal $MgCl_2$ ve DNA konsantrasyonlarının düzenlenmesi (JR1R ve JR1F primerleri kullanılmıştır)	29
Şekil 4.2. PCR reaksiyonları için optimal $MgCl_2$ ve DNA konsantrasyonlarının düzenlenmesi (JR2R ve JR2F primerleri kullanılmıştır)	30
Şekil 4.3. Talasemi ve bizim laboratuvarından PCR komponentlerinin kullanılmasıyla yapılan çalışmanın sonuçlarının %0.8 w/v agaroz jeldeki görüntüsü	31
Şekil 4.4. Yeni Taq Buffer ve $MgCl_2$ kullanarak denenen PCR sonucunda elde edilen ürünlerin %0.8 w/v agaroz jelde görüntülenmesi	32
Şekil 4.5. JR1F, JR1R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonrası elde edilen ürünlerin %0.8 w/v agaroz jeldeki görüntüsü	33

Sayfa

- Şekil 4.6.** JR2R, JR2F primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının %0.8 w/v agaroz jeldeki görüntüsü 34
- Şekil 4.7.** Optimal kesim koşullarını bulabilmek için yapılan Pst restriksiyon enzimi kullanılarak elde edilen kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü 36
- Şekil 4.8.** Farklı restriksiyon enzim markaları kullanılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması 37
- Şekil 4.9.** PCR işleminin hemen ardından yapılan kesim sonucunun %2 w/v agaroz jelde saptanan bantların görüntüsü 38
- Şekil 4.10:** Msp restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim sonuçlarından bir jel görüntüsü örneği 39
- Şekil 4.11:** Pst restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim sonuçlarından bir jel görüntüsü örneği 42

TABLÖLAR DİZİNİ**Sayfa**

Tablo 3.1. Restriksiyon analizi şartları.	26
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının karakteristik özellikleri.	27
Tablo 4.2. Yapılan çalışmada araştırılan gen bölgeleri hakkında genel bilgi.	35
Tablo 4.3. Yapılan çalışma sonucunda hasta grubunda XRCC1 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.	40
Tablo 4.4. Yapılan çalışma sonucunda kontrol grubunda XRCC1 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.	41
Tablo 4.5. Yapılan çalışma sonucunda hasta grubunda ERCC2 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.	43
Tablo 4.6. Yapılan çalışma sonucunda kontrol grubunda ERCC2 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.	44

1. GİRİŞ

DNA tamir mekanizmaları ökaryot hücrelerde genomun bütünlüğünü koruyan, normal metabolik aktiviteler sonucunda veya çevresel etkenler aracılığıyla DNA'ya gelen hasarları tamir eden mekanizmalardır. DNA tamir mekanizmaları DNA'daki hataları tanır ve düzeltir. Hücrelerde günde 1 milyona yakın hata gerçekleşir (Osley ve diğerleri, 2007). Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarlarında hücre apoptoz yolunu aktive ederek kendi kendini ölüme götürür. Hücre, DNA hasarlarını DNA tamir mekanizmaları ile tamir edebilir (Bohr, 1995). DNA tamir mekanizmaları, kemoterapi tedavisi gören kanser vakalarında, tümör hücrelerinde DNA'ya hasar vererek etki gösteren kemoterapötik ajanlara karşı bir direnç yol açabilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin (DNA sekansında bir nükleotidlik varyasyon) kanser oluşumunu tetikleyici etkiye sahip olabileceğini veya kemoterapötik tedavilerde farklı yanıtlara yol açabileceğini göstermektedir. Yapılan birçok hasta, kontrol çalışmasında NER mekanizmasındaki XRCC1 399Gln riskli bir alel olduğunu göstermiş olmasına rağmen, bazı çalışmalarda böyle bir ilişkinin olmadığı ileri sürülmektedir (Duell ve diğerleri, 2000), (Misra ve diğerleri, 2003). DNA onarım kapasitesinin değişmesine neden olan XRCC1 genindeki bu fonksiyonel polimorfizmlerin bilinmesi kanser etiyolojisi, riski ve tedavisine verilen yanıtta önemli olmaktadır (Erdal ve diğerleri, 2004). Chen ve arkadaşlarının Çin popülasyonunda yapmış oldukları çalışmada ERCC2 (XPD) 751 Lys allelinin akciğer kanserini artırabileceğini ortaya koymuşlardır (Chen ve diğerleri, 2002). Yapılan araştırmaların sonuçları kesin değildir. Bu doğrultuda yeni bir araştırma yapmak bu alana katkı koyacaktır.

1.1. Amaç

Bu çalışmada K.K.T.C. popülasyonunda K.K.T.C. kökenli akciğer kanseri, mide kanseri ve pankreas kanseri hastalarında bulunan nükleotid eksizyon tamir mekanizması (NER) ve baz eksizyon tamir mekanizması (BER) genlerindeki polimorfizmler kemoterapi tedavisi öncesinde tespit edilecektir. Yapılan bu çalışmada elde edilen polimorfizmler ve kanser arasındaki ilişki saptanacaktır.

Yapılan bu çalışmanın devamı ve tamamlanmasında ise kemoterapi tedavisi sonrasında hastalarda taşıdıkları polimorfizmler ile tedaviye yanıt, klinik fayda, toksisite, progresyona kadar geçen süre ve toplam sağkalım arasındaki ilişki araştırılacaktır.

Yapmış olduğumuz bu çalışma bir pilot çalışması olup genişletilmesi ve tamamlanması sonucunda, KKTC toplumundaki polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin kanserle ilişkisini belirleyerek bu dala bir katkıda bulunabileceğiz. XRCC1 genindeki ve ERCC2 genindeki bu fonksiyonel polimorfizmlerin araştırılması, kanser etiyolojisi ve riski ile ilişkilendirilmesi tedavi için de yeni yaklaşımların geliştirilmesine imkan sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ve serbest radikaller gibi endojen ajanlar tarafından sürekli tehdit altındadır. Sisplatin ve alkilleyici ajanlar gibi kemoterapötik ilaçlar DNA'da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu 100'den fazla oksidatif DNA hasarı tanımlanmıştır. ROS, genoma zarar veren en dominant gruptur ve içten gelen hasarlara dahil edilir çünkü mitokondride solunum sırasında ortaya çıkar (Dawson ve diğerleri, 1993). Baz hasarı ayrıca, çoğunlukla çeşitli insan kanserlerini tedavi etmekte kullanılan ionize radyasyon ve metillenme ajanlarını içeren eksojen ajanlar tarafından da oluşmaktadır (Donigan ve Sweasy, 2009). Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek kendi kendini ölüme götürür. Hücre, DNA hasarlarını DNA tamir mekanizmaları ile tamir edebilir (Bohr, 1995). DNA tamir mekanizmaları DNA'daki hataları tanır ve düzeltir. Hücrelerde günde 1 milyona yakın hata gerçekleşir (Lindahl, 1993), (Nakamura ve diğerleri, 1998). DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA'da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık, hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir belirtisidir (Bohr, 1995).

2.1. DNA hasarı

Dört çeşit DNA hasar sınıfı vardır. Bunlar; baz hasarları, heliks yapısını bozucu hacimli eklentiler, zincir kırıkları ve mismatch (yanlış baz eşleşmeleri) olarak sınıflandırılır. Bu hasarların çoğu mutajeniktir ve replikasyon ile transkripsiyonu engelleyebilirler (Osley ve diğerleri, 2007).

Hücrede meydana gelen DNA hasarına karşı dört önemli yanıt oluşur:

1. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı),
2. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin tamirine imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,

3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap) ve
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi (programlı hücre ölümü, apoptoz) (Sancar ve diğerleri, 2004).

Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (Sancar ve diğerleri, 2004), (de Bacr J ve Hoeijmakers, 2000).

Hücre, farklı hasarlar için farklı tamir mekanizmaları geliştirmiştir. DNA tamir mekanizmaları DNA'nın kimyasal yapısını düzeltir. DNA tamir yolları hatalı eşleşme onarımı, rekombinasyon tamiri, baz ekzisyon tamiri (BER) ve nükleotid ekzisyon tamiri (NER) olarak 4 sınıfta toplanabilir (Osley ve diğerleri, 2007).

2.2. DNA Tamir Mekanizmaları

2.2.1. Hatalı Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair)

Bu onarım mekanizması, DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda anormal boyutlara neden olan, normal bazların hatalı eşleşmesi şeklindeki hataları düzeltir (Friedberg ve diğerleri, 1995), (Modrich, 1995).

2.2.2. Rekombinasyon Tamiri (Double Strand Break Repair-DSBR)

DNA çift zincir kırıkları, genetik bilgi korunarak, homolog DNA ile rekombinasyon aracılığıyla tamir edilir (Chu, 1997).

2.2.3. Baz Ekzisyon Tamiri (Base Excision Repair-BER)

BER, lezyon spesifitesi olan, DNA glikozilaz ile baz hasarlarını tanıyan ve reaktif oksijen türleri, irradyasyon, genotoksik kimyasallar, spontan deaminasyon veya doğal olarak oluşan abazik (AP) bölgelerdeki baz hasarlarından kaynaklanan tek nükleotid lezyon türlerinin hücreler vasıtası ile tamir eden bir mekanizmadır (Almeida ve diğerleri, 2007), (Osley ve diğerleri, 2007). Baz ekzisyon tamiri genomik stabilitenin sağlanması için gereklidir. Çünkü her gün endojen olarak oluşturulan en az 20,000 DNA lezyonunu tamir eder. BER, genelde reaktif oksijen

radikallerinin okside ettiği veya alkillediği hasarlı bazları düzeltir (Lindahl, 1993), (Sung ve Demple, 2006).

BER oksidayon ve alkilasyon hasarlarından kaynaklanan küçük baz lezyonlarının tamirinde predominant DNA hasar tamir mekanizmasıdır. BER, lezyon-spesifik DNA glikolazlar (mono veya bi-fonksiyonel) tarafından DNA tamirini başlatır ve 2 alt yolakla tamiri sonlandırır. Bu yolaklar, Short-patch BER mekanizması ve 'Long-patch' BER mekanizmasıdır.

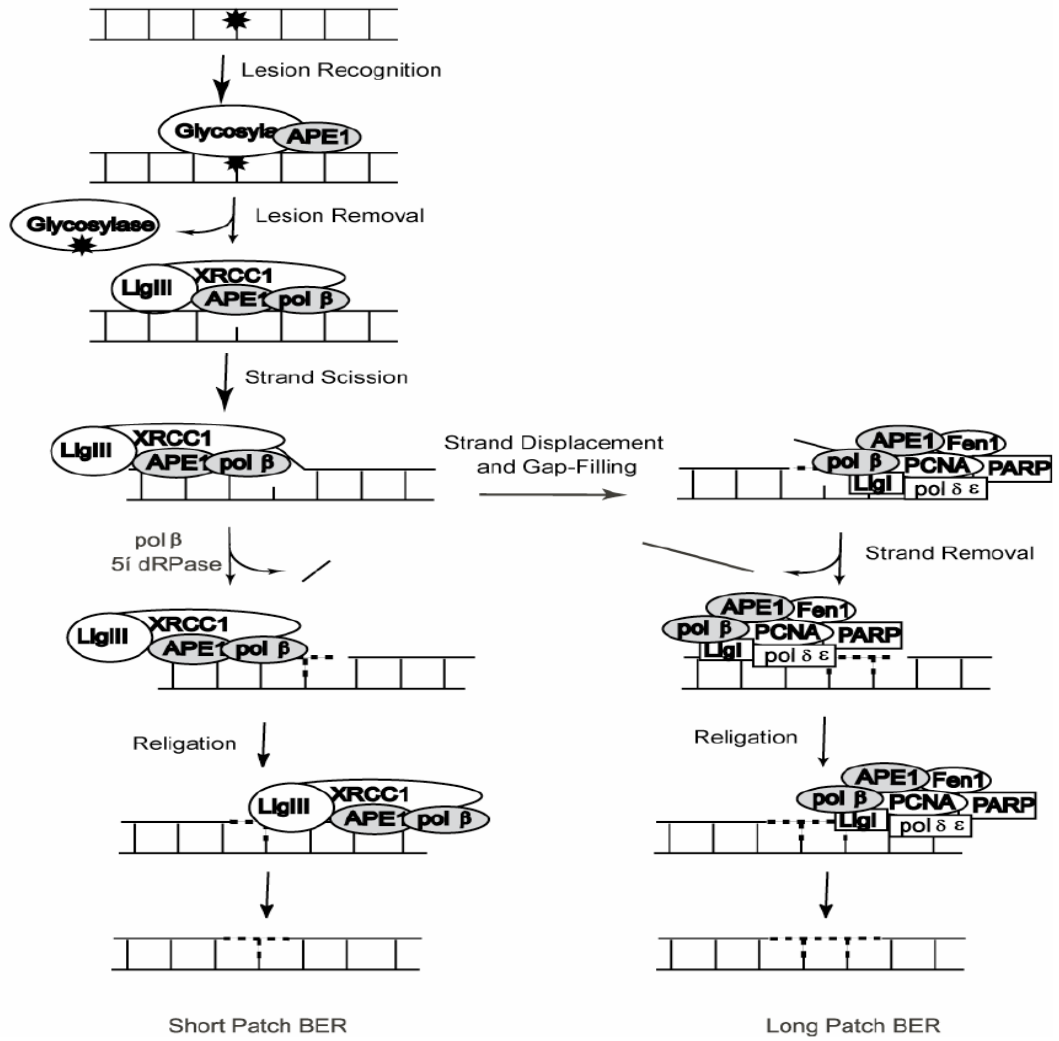
2.2.3.1. 'Short-patch' BER mekanizması

'Short patch' BER mekanizması tarafından bir nükleotidlik değişim olur. Tamirin mono-fonksiyonel ve bi-fonksiyonel glikozlar tarafından 'short-patch' yolağıyla başlatıldığı düşünülmektedir. 'Short patch' BER yolağı monofonksiyonel glikolazlar tarafından başlatılır ve baz lezyon çıkarmasını içerir, daha sonra AP endonükleaz tarafından AP bölge hidrolizi gerçekleşir, hasarlı bölgenin çıkarılması katalize edilir ve uçlarda 3'OH ve 5' deoksiriboz fosfat yarığı oluşur. DNA polimeraz β (pol β) 5' dRP yarığını hidrolize eder ve tek nükleotidlik boşluğu doldurur. DNA Ligaz I (LigI) veya kompleks DNA Ligaz IIIa (LigIIIa) ve XRCC1 tarafından zinciri ligasyona hazırlar (Wood ve diğerleri, 2001) (Şekil 2.1.).

2.2.3.2. 'Long-patch' BER mekanizması

'Long-patch' BER mekanizmasıyla 2-13 nükleotidlik değişim gerçekleşir. 'Long-patch' BER, short-patch BER'e benzer olarak nicked DNA aracısını üretilmesi için başlatılır. Tamir tamamlanması uygun nükleotid transferi ve zincir uzaması için 3'OH ucu gerektirir. 5'ucunun pol β lyase aktivitesine karşı çıktığı durumlarda, polimeraz δ , ϵ or β , prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) ile eşleşir ve çeşitli diğer proteinleri içeren özel yapıdaki flap endonükleaz (Fen1), poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) and LigI DNA'yı boşluğu doldurmak için sentezler. Bunun sonucunda, DNA flapının 2-13 baz uzunluğunda değişimi gerçekleşir. pol β tarafından DNA sentezi ve zincirin yer değiştirmesi Fen1 ve PARP1'in varlığında uyarılır (Leiber, 1997), (Klungland ve Lindahl, 1997), (Kim ve diğerleri, 1998). 'The Werner Syndrome Protein helicase' (WRN)'ın, pol β 'nın zincir değiştirme

aktivitelerini uyardığı gözlemlenmiştir. Fen1 DNA flapın çıkarılmasıyla sonuçlanan durumu katalize eder ve çentik, orijinal hasar bölgesinin 2-13 nükleotid aşağısına transfer edilir. Sonuç olarak, bütün DNA zinciri LigI tarafından onarılır (Almeida ve diğerleri, 2007) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Klasik BER yolağı. ‘Short-patch’ yolağı (sol), glikozilaz aktivitesi tarafından alt yolak başlamasını ve bunu takiben APE1 tarafından zincir kesimini anlatır. Boşluğu doldurma (5’dRP lyase) ve nükleotid birleşimi pol β tarafından gerçekleştirilir. Sonuçta oluşan çentik, yolağı tamamlamak için XRCC1 kompleksi ve LigIII α tarafından tamamlanır. ‘Long-patch’ yolağı (sağ) pol β kesimine dayanıklı 5’ lezyon olma şartıyla BER’in sorumluluğuna giren alt-yolağı tanımlamaktadır. Bu durumda, BER kompleks oluşumu kayar; nükleotit birleştirmesi ya pol β tarafından yapılır ya da pol- δ veya pol- ϵ ’ya transfer edilir. Dayanıklı 5’ uç DNA’nın parçası gibi Fen1 tarafından çıkarılır ve yeniden yapışma Lig I tarafından tamamlanır (Almeida ve diğerleri, 2007).

DNA'da hangi hasarın bağılı olduğuna bağılı olarak sekans spesifik farklı glikozilazlar kullanılır. DNA pol β 'nın aktivitesi o bölgedeki DNA sekansına bağılıdır (Donigan ve Sweasy, 2009). Memeli hücrelerinde bulunan DNA polimeraz β 'nın kendi içinde dRPaz (deoksiriboz fosfataz) aktivitesi vardır. dRP kalıntısı keserek 5' fosfat oluşturur ve DNA ligaz son adımda bu bölgeyi yapıştırır. İnsanda birden fazla glikozilaz bulunur ve hepsi farklı bir substrata özgüdür. DNA glikozilaz zarar görmüş veya uygun olmayan bazıları çıkararak AP bölgesi veya zincir kırıkları yaratırlar. Bütün baz spesifik glikozilazlar zincir kırığı olan yerde 3' fosfat alfa, beta doymuş aldehit veya 3' fosfat ve 5' fosfat oluştururlar. AP bölgeleri ve DNA zincir kırıkları hasar gören bazlara oranla daha toksiktir. Bunları tamir etmek için birçok enzimatik proses mevcuttur fakat APE en çok bilinen ve en yaygın olandır. APE *E.coli*'de keşfedilmiştir ve bir 3' ekzonükleaz/DNA 3' fosfattır. AP bölgesine spesifik bu endonükleaz AP bölgesinde DNA zincirini 5' bölgesinden keserek 3' OH ucu yaratır. Ayrıca 3' ekzonükleaz/fosfataz olarak görev yapar ve zincir kırıklarında 3' kapalı olan yerlerde 3' OH ucu yaratır. Memeli hücrelerinde sadece tek bir APE vardır o da APE1dir. Daha az gelişmiş organizmalarda farklı APE versiyonları mevcuttur (Mitra ve diğerleri, 2001).

2.2.3.2.1. BER mekanizmasında rol alan genler:

DNA onarım genleri; genom bütünlüğünün devamlılığı, kanser ve kalıtsal genetik hastalıkları oluşturan mutasyonlardan korunmada önemli rolü olan genlerdir. Bu genlerin kodladığı proteinler veya enzimler genetik olarak polimorfiktir. Bu genlerdeki fonksiyonel polimorfizmler; oluşan proteinlerin yüksek ya da düşük aktivite göstermesi sonucu DNA onarım kapasitesinin değişmesine, dolayısıyla kişilerin çeşitli kanser tiplerine yakalanma riskini arttırmasına ya da azaltmasına neden olmaktadır (Hu ve diğerleri, 2002). DNA onarım proteinlerindeki genotip farklılıklar; kanser etiyolojisi, riski ve tedavisine verilen yanıtta farklılık göstermesi açısından, sağlıklı ve kanserli hastaların genotiplerinin belirlenmesi son derece önemlidir (Erdal ve diğerleri, 2004).

Tanımlanan DNA onarım genlerinden “The Xeroderma Pigmentosum Complementation Group D (XPD)”, “The Xeroderma Pigmentosum

Complementation Group F (XPF)”, “X-ray Repair Cross Complementing 1 (XRCC1)” ve X-ray Repair Cross Complementing 3 (XRCC3)” en çok çalışılan genler olup, bu genlerin polimorfizmleri ile çeşitli kanser türleri arasındaki ilişkileri araştırılmıştır (Shen ve diğerleri, 1998), (Tomescu ve diğerleri, 2001).

2.2.3.2.2. XRCC1 geni

X-ray repair cross-complementing gen 1(XRCC1), DNA tamir genlerinden çok önemli olanlardan bir tanesidir. XRCC1 geni, serbest oksijen radikallerinin, iyonize radyasyonun, UV ve alkilleyici mutajenlerin yaptığı baz değişimi sonucu oluşan DNA tek zincir kırılmalarının onarılmasında rol alan proteini kodlar (Nash ve diğerleri, 1997), (Masson ve diğerleri, 1998). XRCC1 proteini fiziksel olarak ligaz III ve poli (ADP-riboz) polimeraz ile ilişkiye girerek, tek zincir kırıkları ve baz eksizyon tamirinde ve sisplatin-teşvikli hasarlarda (çift zincir kırıklarını içeren) homolog olmayan uç doldurma yolağı ile addüktlerin çıkarılmasında rol oynar (Jelonek ve diğerleri, 2010).

İnsanlarda XRCC1 geni kromozom 19q13.2’de lokalize olur ve 633 aminoasitlik bir proteini kodlar. Bu protein BER ve tek zincir kırıklarında önemli bir role sahiptir (Duell ve diğerleri, 2000), (Thompson ve West, 2000). XRCC1 geni 17 eksondan oluşup yaklaşık 31.9 kb uzunluğundadır. XRCC1’de amino asit değişimiyle sonuçlanan 3 tane DNA polimorfizmi oluşur. Bu değişiklikler XRCC1’in bağlanma ve düzenleme aktivitelerini değiştirebilir. XRCC1’in BER’in erken ve geç safhalarında BER proteinlerinin (hOGG1, hNTH1, hNEIL2, MPG, PARP-1, DNA Pol β , ve DNA Ligase III) protein ilişkilerine aracılık ederek aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu bulunmuştur (Audebert ve diğerleri, 2004).

XRCC1 genindeki çeşitli polimorfizmler non-sinonim aminoasit değişimlerine neden olur. XRCC1 geninde kodon 194 “Arjinin/Triptofan (Arg/Trp)”, kodon 280 “Arjinin/Histidin (Arg/His)” ve kodon 399 “Arjinin/Glutamin (Arg/Gln)”de tespit edilen üç tip polimorfizm vardır (Lunn ve diğerleri, 1999). XRCC1 geni ekson 6, kodon 194’de 26304. pozisyonda Sitozin_Timin (C_T) değişiminin neden olduğu polimorfizm protein yapısında Arg_Trp aminoasit değişimine neden olmaktadır (Sturgis ve diğerleri, 1999), (Butkiewicz ve diğerleri,

2001). Arg194Trp polimorfizmi, XRCC1'in hidrofobik bölgesinde baz değişimine neden olmaktadır (Hu ve diğerleri, 2001). XRCC1 geni ekson 9, kodon 280 (Arg/His) polimorfizmde; protein yapısında Arg_His aminoasit değişimine neden olmaktadır. XRCC1 geni ekson 10, kodon 399'da 28152. pozisyonda Guanin_Adenin (G_A) dönüşümünün neden olduğu bir başka polimorfizm ise, protein yapısında Arg_Gln aminoasit değişimine neden olmaktadır. Arg399Gln polimorfizminde, poly-ADP-riboz polimeraz (PARP) bağlanma bölgesindeki baz değişiminden dolayı, genin kodladığı proteinde fonksiyonel değişime uğramaktadır (Hu ve diğerleri, 2001), (Duell ve diğerleri, 2000), (Lei ve diğerleri, 2002).

XRCC1 genindeki polimorfizmlerin proteinde fonksiyonel değişime neden olarak proteinin tamir etkinliğini olumsuz yönde etkilediği öne sürülmüştür. İnsanlarda kanser oluşumunu indüklemeye rolüne ait bir çok hasta (baş, boyun, kolon, mide, özefagus, akciğer, mesane, meme ve deri kanserleri) ve kontrol çalışmaları yapılmış ve çeşitli sonuçlar elde edilmiştir (Stern ve diğerleri, 2001), (Sturgis ve diğerleri, 2000), (Duell ve diğerleri, 2001).

2.2.4. Nükleotid Çıkarma Onarımı (NER)

NER, DNA sarmal yapısını bozucu lezyonların ortadan kaldırılmasına yardımcı olan bir multiprotein tamir sistemidir (Fousteri ve Mullenders, 2008). DNA bazları üzerinde büyük eklentiler oluşturan birçok çeşit hasarı tanıyabilen bir onarım mekanizmasıdır. Mikoplazmadan memelilere kadar geniş bir yelpazedeki organizmalar tarafından kullanıldığı belirlenmiştir. Birçok DNA hasarının özellikle de heliks distorsiyonuna neden olanların onarımında etkindir. İnsanlarda güneşten gelen UV ışığının karsinojenik etkilerine (dimerler) ve sisplatin, 4-nitrokuinolin oksit gibi etkenlerle reaksiyon sonucu oluşan büyük eklentili hasarlara karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006).

DNA tamir mekanizmasının ilk adımı tanıma evresidir. Çıplak DNA'da spesifik lezyonları tanıyan proteinler vardır. Tanıma sırasında histonların ve nükleozomların yapısının gevşemesini sağlayan enzimlerin etkileri olsa da lezyonun kendisinin kromatin yapısında yarattığı değişimler de lezyonun tanınmasında etkilidir. Tamir mekanizmasında rol alan faktörlerin; lezyon nedeni ile yapısında değişiklik meydana gelmiş kromatine veya o bölgeye bağlanmış öncü proteinlere

afinitesi vardır. DNA'nın nükleozomlar halinde NER için sınırlandırıcı etkiye sahiptir. 20 yıl önce ortaya koyulmuştur ki NER çıplak DNA'ya oranla kromatin bölgesinde daha az verimli çalışır. DNA hasarı tamirinde tamir ve remodelling aktivitelerinin her ikisinde etkilidir. Remodelling faktörleri NER proteinlerinden önce hasarlı bölgede toplanır. Kromatin değişikliklerinin DNA tamir mekanizmasındaki rolü en çok NER üzerinde çalışılmıştır. Nükleozom katlanmış yapıdadır ve DNA ile ilişkide olan proteinleri büyük ölçüde sınırlandırır. İki protein sınıfı kromatin yapısını düzenleyerek DNA'yı proteinlerin erişimine uygun hale getirir. İlk sınıfta post-translasyonel modifikasyonlarla (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon) kromatin yapısını gevşeten modife edici enzimler vardır (Wu ve Grunstein, 2000). Tam olarak mekanizmasını bilmesek de bu proteinler nükleozom bölgesindeki DNA'yı transkripsiyon, replikasyon, ve tamir ile ilişkili faktörlerin ulaşmasına açık hale getirir. Kromatin bölgesinde meydana gelen hasarları tamir mekanizması için geliştirilen 'access-repair-restore' modeline göre DNA hasarı olan bölgelerde kromatin yapısı değişerek hasar görmüş DNA'yı tamir mekanizmasındaki faktörlere açık hale getirir ve tamir gerçekleştikten sonra kromatin orijinal yapısına geri döner (Smerdon ve Conconi, 1999), (Green ve Almouzni, 2002).

NER mekanizmasının anahtarı;

1. Hasarın tanınması
2. Protein kompleksinin hasarlı bölgeye bağlanması
3. ~24-32 nükleotid uzunluğunda bir fragment içinde bırakacak şekilde lezyonun her iki tarafından hasarlı zincirin kesilmesi (incision)
4. Degradasyon (hasarı içeren oligonükleotidin uzaklaştırılması)
5. DNA sarmalı üzerinde meydana gelen boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması (polimerizasyon)
6. Ligasyon (Lehmann, 1995).

Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında görev alan proteinlerden birinin eksikliği, ender görülen ve resesif olarak kalıtılan üç farklı hastalığa neden olmaktadır: Kseroderma pigmentosum (XP), Cockayne Sendromu (CS) ve Trikotiyodistrofi (TTD). Cockayne Sendromu, XP ve TTD fenotiplerinin en belirgin

ortak özelliği ultraviyole ışığına olan aşırı duyarlılıktır ancak, XP hastalarından farklı olarak, CS ve TTD hastalarında deri tümörleri gelişmez (Müftüoğlu, 2003).

NER mekanizmasının iki alt yolağı vardır. Global genome repair (GGR) ve transcription-coupled repair (TCR) (Osley ve diğerleri, 2007). NER cut and patch mekanizması ile çalışır. Lezyon içeren DNA'yı tanır ve zincirin küçük bir kısmını keserek çıkarır. DNA parçasını ise hasar görmeyen zinciri örnek alarak (template olarak) polimerizasyon/ligasyon ile tamir eder. GG-NER ile TC-NER mekanizması farklı bölgelerde çalışır ve aralarındaki fark DNA hasarını tanıma mekanizmaları ve burada görevli olan proteinlerdir. GG-NER mekanizmasında hasar UV-DDB (DDB1-DDB2-containing E3-ubiquitin ligaz kompleks) ve XPC-RAD23B protein kompleksleri tarafından tanınır. Lezyon tanındıktan sonraki adımlar GG-NER ve TC-ner de aynı faktörleri içerir (Aboussekhra ve diğerleri, 1995).

2.2.4.1. Transkripsiyona Bağlı Onarım (Transcription Coupled Repair/TCR):

Genomun her bölgesi eşit etkinlikte onarılmaz, genin transkripsiyona uğrayan zinciri aynı genin transkripsiyona uğramayan zincirine göre daha etkin olarak onarılır. Transkripsiyona bağlı onarım, RNA polimeraz II (mRNA'yı sentezleyen enzim) bir DNA lezyonu ile karşılaştığında aktive olan DNA onarımıdır. Global genomik onarım (global genomic repair), transkripsiyondan bağımsız olan DNA onarımıdır. Transkripsiyona uğrayan gen bölgelerindeki timin glikollerinin, genomun herhangi bir yerindeki timin glikollerinden daha hızlı tamir edildikleri gösterilmiştir. Transkripsiyona bağımlı bu özellik, baz çıkarma onarımında (TC-BER) ve hatalı eşleşme onarımında da görülür (Bootsma ve Hoeijmakers, 1993), (Chu, 1997).

TC-NER; DNA hasarına karşı oluşan bir savunma mekanizmasıdır. Aktif transkripsiyon ile aynı anda gerçekleşir. Transkribe olmuş zincirdeki DNA lezyonlarını tamir eder. RNA polimeraz II kompleksi (RNAPII_o)'nin bloke olması sonucunda gerçekleşir. Bu lezyonlar tamir edilmezse RNAPII_o hız kaybeder ve zincir üzerindeki ilerlemesi durur. Eğer TC-NER gerçekleşmezse hücre apoptoz yoluna doğru gider. Zarar gören bölgedeki DNA'nın tamir edilmesi için. TC-NER

spesifik faktörleri ve NER proteinlerine ihtiyaç duyulur (Aboussekhra ve diğerleri, 1995).

Bozulmuş transkripsiyon bubble veya zincire takılı kalmış RNAPIIo, TC-NER proteinleri tarafından tanınır. Birçok araştırmada görülmüştür ki DNA hasarı meydana geldiğinde, RNAPIIo DNA üzerinde bloke olur ve TC-NER'i hasarın olduğu bölgeye çeker. Lezyon bölgesindeki hız kaybeden RNAPIIo DNA'nın proteinler tarafından ulaşılır olmasına bir engel değildir. RNAPIIo molekülünde konformasyonel değişiklikler tamir proteinlerinin erişilebilirliğini sağlar ve bu konformasyonel değişiklikler için CSB proteinine ihtiyaç vardır. Ortamda CSB olmadığı durumda Backtracking (RNAPIIonun geriye dönüşü) tamir ve transkripsiyonun sağlanmasında gerekli bir mekanizmadır. Backtracking sırasında, RNAPIIo ve transkripsiyon bubble RNA zinciri üzerinde geriye doğru kayar. Ve transkripsiyonun tekrar başlaması için polimerazın aktif bölgesindeki çıkıntı yapmış mRNA kesilerek 3' ucu yeniden düzenlenir (Aboussekhra ve diğerleri, 1995).

2.2.4.1.2. Transkripsiyona bağlı onarımda rol alan genler (XPD (ERCC2) ve XPB):

NER mekanizmasının çoklu alt ünite faktörü olan TFIIH ihtiyacı vardır. TFIIH, RNA polimeraz II promotörlerinde basal transkripsiyonu başlatmakta ve transkribe olmamış DNA tamiri esnasında bile NER mekanizmasının çekirdek insizyon makinesinin bir parçası olarak rol oynar. TFIIH'ın önemi, NER esnasında TFIIH komponentlerinde meydana gelen mutasyonların 3 genetik hastalıkta ortaya çıkmasıdır. Bu hastalıklar: Kseroderma pigmentosum (XP), Cockayne Sendromu (CS) ve Trikotiyodistrofi (TTD) (Evans ve diğerleri, 1997).

TFIIH alt üniteleri arasında XPB ve XPD DNA helikazlarını içermektedir. Bu alt üniteler DNA'nın hasarlı bölgesinin etrafında bölgesel açılmayı sağlar (Wood, 1997). Bu alt ünitelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan hastalıklarda farklılıklar görülmektedir. Örneğin XP-B hastalarında az sıklıkta ve XP ile CS birlikte görülür. Ancak, XP-D hastaları daha sıktır ve sadece XP veya XP ile CS / TTD birlikte görülür. TFIIH'den izole edilen XP-B ve XP-D alt üniteleri

sırasıyla 3'-5' ve 5'-3' DNA helikaz aktivitesi gösterirler. Fakat hem transkripsiyonda hem de NER'de TFIIH'in bir parçası olarak rol alırlar (Evans ve diğerleri, 1997).

Transkripsiyonda, ATP-bağımlı TFIIH helikaz aktivitesi promoter etrafındaki 10-20 baz-çiftlik bölgenin açılmasını katalize eder. Bu da gelişmemiş RNA'nın kalıp zincir üzerine tutunmasına olanak sağlar. XPB ve XPD, DNA helikaz aktiviteleri onarım sırasında DNA lezyon bölgesinin etrafında benzer bölgesel açılmayı katalizlediği varsayılır. TFIIH'nin açılmada rol aldığı bulunmuştur ve bu rol RNA polimeraz II transkripsiyonunun başlamasındaki görevi ile benzerdir (Evans ve diğerleri, 1997).

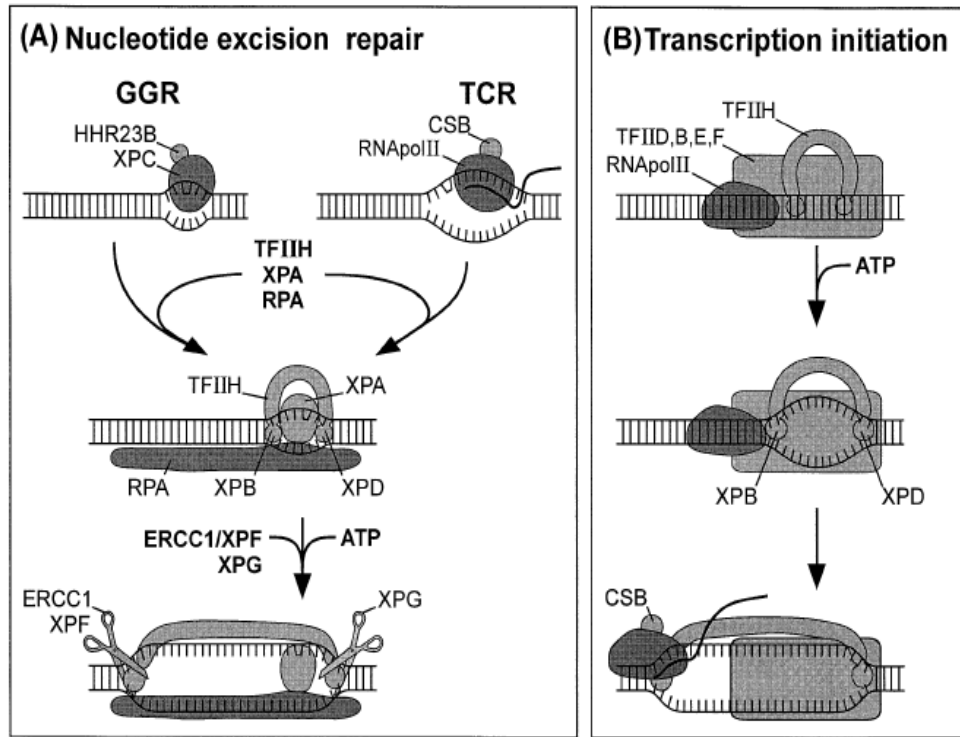
Onarım faktörleri normalde hasarlı olan veya olmayan DNA'ya bağlanma özelliği göstermektedir. Bu nedenle eksizyon onarım mekanizmasının hasarı hissedip tanıyarak hasarlı olan DNA'da onarım gerçekleştirirken, hasarlı olan/olmayan DNA ayırımını da yapabilmesi gereklidir. Kseroderma pigmentozum grup A, RPA ve genellikle TFIIH ile kompleks halde bulunan XPC proteinleri DNA hasarı bölgesine rasgele sırayla bağlanarak hasar olduğu düşünülen bölgede dörtlü bir kapalı kompleks oluştururlar. Bu dört proteinin bağlanması ile oluşan kapalı kompleks, o bölgede DNA hasarı bulunmuyorsa TFIIH'nin alt üniteleri olan helikaz özelliğe sahip kseroderma pigmentozum grup B [XPB]ve D [XPD] proteinler yardımıyla DNA'dan ayrılır. DNA, hasar içeriyorsa bu durumda ATP hidrolizi ile XPB ve XPD çift zincir DNA'daki hasar içeren bölgedeki yaklaşık 20-25 nükleotidlik kısmı çözerek burada bir tamir kabarcığı oluşturur. XPC proteininin bölgeden ayrılmasıyla XPG proteini tamir kompleksine katılır, XPF. ERCC1 proteinlerinin de bu komplekse eklenmesiyle ilk olarak hasarın 3' yönündeki $6. \pm 3$. fosfodiester bağından XPG, daha sonra da 5' yönündeki $12. \pm 5$. fosfodiester bağından XPF.ERCC1 proteinleri kesme işlemini gerçekleştirir. Oluşan 24-32 nükleotidlik oligomer bu şekilde iki yönlü kesilerek bölgeden ayrılırken, oluşan boşluk tamir sentezi proteinleri olan replikasyon proteini C [RPC]/prolifere hücre nükleer antijen [PCNA] ve DNA polimeraz ϵ / δ tarafından doldurulur. Son olarak DNA ligaz 1 ile ligasyon gerçekleşir (Evans ve diğerleri, 1997).

Eksizyon onarım mekanizması, transkribe olan DNA’da daha hızlı çalışır. Buna “transkripsiyona kenetlenmiş onarım mekanizması [Transcription - Coupled Repair, TCR]” denir. Bu yolla, transkribe olan DNA transkribe olmayan DNA’ya göre daha hızlı tamir edilmektedir. Transkripsiyona kenetlenmiş onarım mekanizmasında hasarın tanınması hariç diğer basamakların aynı olduğu belirtilmektedir (Evans ve diğerleri, 1997).

Transkripsiyona kenetlenmiş onarım mekanizmasının, hasarın daha hızlı tamirini sağladığı, böylece hasar nedeniyle durmuş transkripsiyonun hücre için öldürücü etkisinden hücreyi koruduğu düşünülmektedir. Lezyonun daha hızlı onarılması, transkripsiyonun durmasına bağlı zararlı etkileri en aza indirmektedir (de Boer ve diğerleri, 2001).

2.2.4.2. Global Genom Onarımı (GG-NER)

NER yolağının hacimli(bulky) DNA eklentilerini onarabilmesi için yolda görevli olan faktörlerin hasarlı DNAyı geriye kalan hasarsız olanların arasından ayırt etmesi gerekiyor. TC-NERin aksine global genomic repair DNA metabolik proteininin hız kaybetmesi veya zincirden düşmesi ile başlamaz aksine DNA hasarının spesifik proteinler tarafından tanınması ile başlatılır. NER proteinleri hasarlı DNAyı hasarsız olandan ayırabilir çünkü bulky lezyonlar DNA heliks yapısında bozukluk meydana getirirler. GGR tanıma aşamasında görevli üç protein, XPC-hHR23B, XPA ve RPA’dır. Hepsi de hasar görmüş DNAYA bağlanma özelliğine sahiptir. RPA ve XPC-Hhr23B proteinleri tanıma evresinin ilk aşamalarında rol alır. GG-NER’in gerçekleşmesi için birçok proteine ihtiyaç duyulmaktadır. GGR mekanizmasında görevli diğer proteinler, transkripsiyon faktörü IIIH (TFIIH), XPG, ve XPF-ERCC1 dir (Reidl ve diğerleri, 2003) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. TC-NER, GG-NER modeli ve TFIIH’in transkripsiyon ve tamirdeki rolü. (A) TC-NER ve GG-NER modeli. DNA hasarının tanınması, ya XPC/HHR23B kompleksi (GG-NER’e özel) ya da RNA polimeraz ve CSA, CSB proteinleri (özellikle TC-NER’de rol alır) tarafından dolayı görülebilir. Bunu takiben, RPA, XPA ve TFIIH’nin alt üniteleri olan çift yönlü XPB/XPD helikazların birlikte yürüttükleri hareket tarafından DNA etrafındaki lezyon açılır. Bu olay, ERCC1/XPF ve XPG tamir endonükleazları tarafından, hasarın olduğu hasarlı zicirin her iki tarafından yarılmasına olanak sağlar. Lezyon içeren bölge kesilip çıkarılır ve DNA senteziyle boşluk doldurulur. (B) RNA polimeraz II’nin transkripsiyon başlangıcında TFIIH. Başlangıçtan önceki transkripsiyon kompleksini oluşmasından sonra, (beş bazal transkripsiyon faktörü ve RNA polimeraz II’yi içerir), promotör bölge TFIIH’nin XPB ve XPD helikazları tarafından açılır. Bu olay; ilk fosfodiester bağın oluşumuna, RNA polimeraz promotör kaçışına ve transkripsiyonun uzamasına olanak sağlar (Boer ve Hoeijmaker, 2000).

2.2.4.3 ERCC2(XPD) geni:

ERCC2(XPD) geni kromozom 19q13.3 lokalize olur. 23 eksondan oluşur ve yaklaşık 54, 000 baz çifti genişliğindedir (*Weber ve diğerleri, 1990*). XPD gen ürünü, 86.900 moleküler ağırlıklı 760 aminoasitlik protein olup adenozin trifosfat bağımlı 5'–3' DNA helikaz aktivitesine sahiptir. DNA tamirinde XPD, nükleotid ekzisyon tamirinde rol alır (*Schaeffer ve diğerleri, 1994*) NER, DNA sarmal yapısını bozucu lezyonların ortadan kaldırılmasına yardımcı olan bir multiprotein tamir sistemidir (*Fousteri ve Mullenders, 2008*). XPD proteini, DNA etrafındaki hasarlı bölgeyi açıp nükleotid ekzisyon onarımında rol alan Transkripsiyon Faktör IIH'nin bir bileşenidir. Ayrıca XPD proteini, siklin bağımlı kinaz 7 (cdk 7), siklin H ve *MAT1*'den oluşan siklin bağımlı kinaz kompleksini merkez transkripsiyon faktör IIH kompleksine bağlayarak RNA polimeraz II tarafından RNA transkripsiyonunun başlamasında rol oynar (*Tirode ve diğerleri, 1999*).

XPD lokusunda bazı önemli tek nükleotidlik polimorfizmler tanımlanmıştır. Bunlar ekzon 10 kodon 312'de G → A polimorfizmi, bunun sonucunda evrimsel olarak korunmuş bölgede Asp → Asn değişimi meydana gelmektedir. Diğer bir polimorfizm ise, ekzon 23 kodon 751'de C → A polimorfizmidir. Bu polimorfizm sonucunda ise Lys → Gln yer değişimi meydana gelmektedir (*Shen ve diğerleri, 1998*). Bu çeşitli fenotipler popülasyon tabanlı çalışmalarda düşük DNA tamir kapasitesi veya karsinogenez için yüksek risk olarak bağlantılı olduğu kurulmuştur. Diğer yapılan çalışmalarda ise hiçbir ilişki bulunmamıştır. XPD 751 ve 312 polimorfizmlerinin fonksiyonel rolleri açıklık kazanmamıştır (*Ahsan ve diğerleri, 2003*), (*Benhamou ve Sarasin, 2005*). Tamir fenotipinde ve kanser şüphesinde bu polimorfizmlerin etkisi belirli değildir. Yapılan araştırmalar sonucunda XPD 751 Lys/Lys alleli ile karşılaştırıldığına, Lys/Gln ve Gln/Gln allellerinin meme kanseri ile bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir (*Manuguerra ve diğerleri, 2006*).

2.3. DNA onarımı ve Kanser

Genetik değişiklikler ve kanser arasındaki nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile desteklenmektedir. Genetik kararsızlık kanserin karakteristik özelliğidir. Kanserler, genetik kararsızlığa neden olan bir mutasyon

oluştuktan sonra, bu mutasyonların çoğalmasıyla oluşur. Hücre siklusünün düzenlenmesi, apoptoz, hücre farklılaşması ve diğer birçok hücre fonksiyonunu etkileyen birçok spesifik mutasyon sonucunda normal hücreden kanserli bir hücreye geçiş söz konusudur. Kanser, yalnızca bir hücrede birçok farklı gende mutasyon olursa ortaya çıkar (kolon kanserinde 6 veya 7). Bu mutasyonlar genomun bütünlüğünü sağlayan genlerde veya tümör gelişimi süresince somatik hücrelerde meydana gelebilir. Bu değişiklikler, tek bir nükleotide, küçük DNA bölümlerinde (mikrosatelitler), genin tümünde, kromozomun yapısal bileşenlerinde ya da kromozomun tümünde gerçekleşebilir. Tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu, birçok kanser türünün gelişimi ile bağlantılıdır (Chu, 1997), (Lehman, 1997), (Wood, 1997).

DNA onarımındaki hatalar da genetik kararsızlığa neden olurlar. Kanserlerin çoğunluğu tamir edilmemiş DNA hasarından kaynaklanır, onarım sistemindeki bozukluklar da (bu işlemlerde yer alan enzimlerdeki mutasyonlar gibi) kanserin kalıtsal türleriyle ilişkilidir. Örneğin, kalıtsal non-polipozal kolorektal kanser, hatalı eşleşmenin onarımındaki bozukluktan, kolorektal kanser ise baz çıkarma onarımındaki bir bozukluktan kaynaklanır (Chung ve Rustgi, 1995).

DNA hasarı onarım mekanizmaları kanser oluşumu dışında kanser tedavilerinin etkinliğinde de önem taşımaktadır. Cerrahi olmayan tedavi yöntemleri DNA hasarı oluşturarak hücreyi apoptoza götürmektedirler. DNA hasarı ve DNA onarımı arasındaki denge bu tedavilerin etkinliğini belirleyici faktörlerdendir. DNA onarım mekanizmalarının etkinliğinde artış olmasının kemoterapötik ilaçlar ve radyoterapiye direnç gelişiminde rol oynadığı belirtilmektedir. Platin grubu ilaçların oluşturduğu DNA hasarları daha çok NER ile onarılmaktadır. Bu da NER ile bu ilaç grubunun tedavi etkinliği arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli kanser türlerinde eksizyon onarımı proteinlerinden XPA, XPD(ERCC2) ve ERCC1'in mRNA ekspresyonları ile sisplatin duyarlılığı arasında ilişki olduğu belirtilmektedir (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006). Platin bileşikler (ö.r. sisplatin) akciğer kanseri, mide kanseri ve pankreas kanseri gibi çeşitli kanserlerde rutin olarak kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Sisplatin aktivitesi sisplatinin DNA'ya eklenmesi aracılığıyla olur. Bu oluşan sisplatin-DNA kompleksleri DNA tamir mekanizmaları

aracılığıyla DNA zincirinde uzaklaştırılabilir (Reed, 1998). Tamir mekanizmaları normal zamanda dokuları kansere karşı koruyarak pozitif bir etki yaratırken, kemoterapi esnasında tümör hücrelerinde kemoterapiye karşı bir direnç yol açabilir. Hücrelerdeki platin-DNA komplekslerinin tamir mekanizmaları tarafından uzaklaştırılması hastalarda platin-esaslı kemoterapi ilaçlarına karşı direnç yaratmaktadır. Nükleotid eksizyon tamiri (NER) hücrelerde platin-esaslı kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerine karşı savaşılan temel bir savunma mekanizmasıdır (Reed, 1998). NER mekanizmasındaki bozukluklar, güneşe duyarlılığa ve UV kaynaklı cilt kanseri riskinde artışa neden olur (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006). Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) ve Xeroderma pigmentosum group D (XPD) (ERCC2) NER mekanizmasının önemli elemanlarından ikisidir. Bu genlerde bulunan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) bu genlerin tamir kapasitelerini etkileyerek kemoterapiye yanıtta kişiye göre farklılıklar yaratmaktadır. ERCC1 mRNA seviyesinin yükselmesi insanlardaki mide, ovar, rahim ağzı, kolorektal ve akciğer kanserlerinde platin-esaslı kemoterapiye karşı rezistansı artırır (Metzger ve diğerleri, 1998) (Rosell ve diğerleri, 2003)

XPD geninde bulunan iki farklı polimorfizmin de DNA tamirinde farklı etkilere yol açtığı görülmüştür. Bunlardan bir tanesi exon 10'da bulunan Asp 312 Asn substitution mutasyonu ve exon 23'de bulunan Lys 751 Gln mutasyonudur. Homozigot XPD 312 Asn mutasyonu taşıyan hücrelerde DNA tamir kapasitesinin arttığı görülmüştür (Seker ve diğerleri, 2001). Sokak-türü (Wild-type) XPD 312 ve 751 genotipini taşıyan akciğer kanseri hastalarında ise DNA tamirinin azaldığı görülmüştür (Spitz ve diğerleri, 2001). Xeroderma pigmentosum grup D Lys751Gln bireylerde NER kapasitesi daha düşük bulunmuş, cilt melanomları, bazal hücreli kanser, akciğer kanserleri, ağız içinde prekanseröz lezyonları olan bireylerde Lys751Gln polimorfizmi sıklığının sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Kulaksız ve Sancar, 2007).

Hücrelerde bulunan ikinci bir tamir mekanizması baz eksizyon tamir mekanizmasıdır (BER). Bu tip tamir mekanizması DNA'daki tek-zincir kırıklarının ve hasar görmüş bazların tamirinde rol alır. X-ray repair cross-complementing 1 (XRCC1) BER'da görev alan kilit genlerden birisidir. XRCC1 geninde farklı

polimorfizmler tesbit edilmiştir (Shen ve diğerleri, 1998). XRCC1 Arg 399 Gln polimorfizminin birçok kanserle ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Giachino ve diğerleri, 2007), (Duell ve diğerleri, 2002). Genel olarak bakıldığında, XPD (ERCC2), ERCC1 ve XRCC1 gen polimorfizmleri ile sisplatin-içeren kemoterapötik tedaviler arasındaki ilişki gösterilmiş ama sonuçlar tam olarak netlik kazanmamıştır.

Yapacağımız çalışmada K.K.T.C. popülasyonunda K.K.T.C. kökenli akciğer kanseri, mide kanseri ve pankreas kanseri hastalarında bulunan gen polimorfizimleri tesbit edilecektir. Bu polimorfizimlerle kansere yatkınlık arasındaki ilişki araştırılacaktır. Araştırma projesinin bir sonraki aşamasında hastaların sisplatin içeren kemoterapi ajanlarına olan yanıtı arasındaki ilişkiye bakılacaktır. Bu çalışma K.K.T.C’de bu konuda yapılan araştırma projeleri arasında bir ilk olup ileriki çalışmalara yol gösterici olacaktır.

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Örneklerin Tanımı

Bu araştırmadaki hasta grubunu Dr. Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastahanesi Onkoloji Bölümü'ne 2009-2010 yılları arasında başvuran ve kanser tanısı konulan 10 birey oluşturmaktadır. Hastaların yaşı, cinsiyeti, sigara içip içmediği, klinik safha ve tümör histolojisi gibi bilgileri de elde edilmiştir. Kontrol grubu ise kendilerinde ailelerinde kanser hastalığı gözlemlenmeyen 10 gönüllü denekten oluşmaktadır. Her birey ile yapılan anketlerle cinsiyet, yaş, doğum yeri, meslek gibi demografik bilgiler toplanmıştır. Hasta ve kontrol grubuna ait kan örnekleri bireylerin çalışma hakkında bilgilendirilmesi ve yazılı onaylarının alınmasından sonra toplanmıştır (Ek 1).

3.1.2. Tamponlar, Çözeltiler ve Enzimler

3.1.2.1. Periferal Kan Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu için Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

3.1.2.1.1. Hücre Lizis Tamponu (pH 8.0): 8.3 gr NH_4CL ve 1 gr KHCO_3 beher içerisine konuldu. Behere yaklaşık 800 ml su eklendi. Karışımın üzerine final konsantrasyonu 1000 ml olacak şekilde 200 μl 0.5 M Na_2EDTA eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde çözünmesi sağlandı. Çözeltinin pH'sı 1M NaOH solusyonu aracılığıyla 7.4'e ayarlandı. Çözelti mezür içinde 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı. Otoklav işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanan lizis tamponu 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.1.2.1.2. Hücre Çekirdeği Lizis Tamponu (pH 8.0): 0.605 gr Tris-Baz (final konsantrasyonu 10 mM) ve 11.69 gr (final konsantrasyonu 400 mM) NaCl tartılıp beher içerisine konuldu. Behere yaklaşık 300 ml su eklendi. Karışımın üzerine 2 ml 0.5M Na_2EDTA eklendi ve karışım 500 ml'ye tamamlandı. Çözeltinin manyetik karıştırıcı üzerinde çözünmesi sağlandı. Çözelti otoklavlandı ve otoklav işleminden sonra 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.1.2.1.3. 7.5 M Amonyum Asetat hazırlanması: 57.8 gr Amonyum asetat tartıldı. 50 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde çözünmesi sağlandı. Çözelti 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm filtrasyon cihazıyla sterilasyonu yapıldı ve 4 °C'de saklandı.

3.1.2.1.4. 1 M Tris.HCL tamponunun hazırlanması: 60.57 gr Trisma baz tartıldı ve 350 ml distile su içerisinde, manyetik karıştırıcı üzerinde çözünmesi sağlandı. Çözelti 500 ml'e tamamlandı. Çözeltinin pH'sı HCL eklenerek pH 8'e ayarlandı. Çözelti otoklavlandı.

3.1.2.1.5. TE Tamponu: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA 100 ml su içinde hazırlandı.

3.1.3. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri

3.1.3.1. 50X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA): 242 gr Tris-Baz tartıldı ve 300 ml su içinde çözüldü. 57.1 ml Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) eklenerek çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

3.1.3.2. % 2'lik Agaroz Jel Hazırlanması: 2 gr agaroz tartıldı ve 100 ml 1 X TAE Tamponu içinde yüksek sıcaklıkta çözülür. Agaroz tamamen çözüldükten sonra soğuması beklenir ve çözeltiye son derişimi 0.5 µg/ml olacak şekilde Etidyum bromür (EtBr) eklenir.

3.1.3.3. %0.8'lik Agaroz Jel Hazırlanması: 800 mg agaroz tartıldı ve 100 ml 1 X TAE Tamponu içinde yüksek sıcaklıkta çözündürülür. Agaroz tamamen çözüldükten sonra soğuması beklenir ve çözeltiye son derişimi 0.5 µg/ml olacak şekilde Etidyum bromür (EtBr) eklenir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Bu tez çalışmasında hasta ve kontrol grubu kanlarından DNA izolasyonu için yüksek tuz konsantrasyonunda genomik DNA izolasyon metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde, 3 ml EDTA'lı tüplerde toplanmış kan örnekleri 15 ml'lik konik tüplere aktarılır ve üzerine kan miktarının 3 katı kadar hücre lizis tamponu eklenir. Tüp hafifçe çalkalanarak örnek ve tamponun karışması sağlanır ve 4 °C'de 10 dakika bekletilir. Daha sonra 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant atıldıktan sonra pellete tekrar kanın 3 katı kadar hücre lizis tamponu eklenir ve santrifüj edilir. Bu işlem 3 kez tekrarlanır. Daha sonra pellet üzerine eşit hacimde hücre çekirdeği lizis tamponu eklenir ve pelletin çözülmesi sağlanır. Vorteks yapılır. Ve sonra 150 µl %10 SDS ve 150 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenir. 56 °C'de en az 1 saat inkubasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında 1.5 ml 7.5 M Amonyum Asetat eklenir. Yavaşça karıştırılır ve 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Bu aşamanın ardından tüpte iki faz görülür. Üstteki faz mikropipet ile dikkatlice alınarak yeni bir tüpe aktarılır ve üzerine 2 katı hacimde soğuk %100 etanol eklenir. Bu aşamada DNA yoğunlaşarak iplikçikler şeklinde görülmeye başlar. Gözle görülen DNA yavaşça pipet ucu ile alınarak %70 ethanol içeren ependorf tüpüne aktarılır. DNA pipet ucuyla alınamayacak kadar az ise 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır ve oluşan pellet % 70 ethanol içinde ependorf tüpüne aktarılır. Daha sonra 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra pellet üzerine 1 ml %70 ethanol eklenir. Vortekslenir ve tekrar 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır. Süpernantant atılır ve pellet kurumaya bırakılır. Daha sonra kuruyan pellet 50 µl TE içinde çözülür. TE tamponunda çözülen DNA 4°C veya -20°C'de saklanır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Her bir PCR reaksiyonu 50 µl reaksiyonlar halinde yapılmış, 1X Taq Tamponu (Sigma), 0.25 mM dNTP (Sigma), 400 nM her bir primer, 1.5 mM Magnezyum Klorür, 100 nanogram DNA ve 2.5 U Taq Polimeraz (Sigma) dan oluşmuştur.

Bu tez çalışmasında XRCC1 ve XPD (ERCC2) SNP'lerin belirlenmesi amacıyla, önce söz konusu polimorfizm bölgeleri primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PCR şartları XRCC1 için 94 °C-3 dak, 94 °C-1dak, 53 °C, 1 dak, 72 °C, 1 dak, 72 °C, 10 dak olup 30 siklustur ve ERCC2(XPD) için ise 94 °C-3 dk, 94 °C- 30 sn., 60°C-1 dk, 72 °C-30 sn., 72°C-10 dk olup 30 siklustur. XRCC1 Ekson 10 amplifikasyonu için JR1F:5'CAGTGGTGCTAACCTAATC3' ve JR1R:5'AGTAGTCTGCTGGCTCTGG3' primerleri, ERCC2 Ekson 23 için ise JR2F:5'GCCCCGCTCTGGATTATACG3', JR2R:5'CTATCATCTCCTGGCCCCC3' primer seti kullanılmıştır (López-Cima ve diğerleri, 2007). PCR reaksiyonu ürünlerini kontrol etmek amacı ile jel elektroforez yöntemiyle incelenmiştir.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR'ın ardından elde edilen amplifikasyon ürünlerinin değerlendirmesi agaroz jel elektroforez yöntemi ile yapılmaktadır. Örnekler yükleme çözeltisi ile karıştırılıp polimerize olan jele yüklenir ve 100 V elektrik akımında 20-30 dakika yürütülür. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan agaroz konsantrasyonu PCR fragmanlarını görüntülemek için %0,8 restriksiyon enzimi ile kesimden sonraki fragmanları incelemek için %2,0 idi.

50 µl PCR ürünü 10 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak %0.8'lik agaroz jele yüklenmiş ve örnekler 100V'ta 20-30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında jel, DNR marka Minibis Pro jel dökümantasyon cihazında, UV ışığı altında incelenmiş ve cihazın software programı kullanılarak bantlar analiz edilmiştir.

3.2.4. PCR Saflaştırma

DNA dizi analizinden önce, PCR reaksiyonları agaroz jel elektroforez yöntemi ile %0,8 agaroz jel üzerinde 80V'da 30 dakika koşuturulur. Bu tez çalışmasında PCR ürünlerinin saflaştırılması QIA QUICK PURIFICATION KIT kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem amplifikasyonu yapılmış DNA'yı 100 bç'den küçük DNA fragmentlerinden ve primerler, tuzlar, nükleotidler ve proteinler (termotabil enzimler) gibi diğer kontaminantlardan arındırılmasını sağlar. PCR

ürünleri jilet yardımıyla kesilerek ependorf tüplerde tartım işlemi yapılmıştır. Ağırlığının 3 katı olacak şekilde PCR ürünlerinin üzerine QG tamponu eklenmiş ve 50 °C’de 10 dakika jelin erimesi beklenmiştir. Daha sonra PCR ürünü filtreli tüpe aktarılıp maksimum hızda bir dakika santrifüj yapılmış ve alt sıvı atılmıştır. Aynı işlem 2 kez tekrar edilmiştir. Santrifüjden sonra 750 µl yıkama tamponu (Tampon PE) eklenmiş ve santrifüj işlemi yapılmıştır. Yıkama basamağı bir kez daha tekrarlanarak DNA’nın diğer kontaminantlardan ayrılması sağlanmıştır. Filtreye 25.5 µl su eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmış ve bu şekilde DNA’nın filtreden geri kazanılması sağlanmıştır.

3.2.5. Restriksiyon endonükleaz kesimi ve Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (SNP) Tespiti

Sınıf II restriksiyon endonükleazları DNA örneklerini 4-8 nükleotid uzunluğunda özgün palindromik dizilerden tanıyan ve aynı bölgeden kesen enzimlerdir. Böylece bir restriksiyon tanıma ve kesim bölgesini değiştiren, yani bir kesim bölgesi oluşturan ya da varolan kesim bölgesini ortadan kaldıran nokta mutasyonlarını tespit etmek için kullanılabilirler. Mutasyon noktasını çevreleyen primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun ardından tek nokta mutasyon bölgesinden kesen bir enzim seçilerek analiz edilir. Restriksiyon kesimi sonrasında enzimin tanıma ve kesme bölgesinin varlığına göre DNA örnekleri fragmentlere ayrılır. Oluşan DNA fragmentleri uzunluklarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrılır ve UV altında görüntülenir. Mutasyonların varlığı oluşan DNA fragmentlerinin uzunluğuna bakılarak tespit edilir.

Restriksiyon endonükleazlarla kesimden önceki basamak 2 farklı şekilde yapılmıştır. Bu tez çalışmasında PCR ürünlerinin saflaştırılması QIA QUICK PURIFICATION KİT kullanılarak yapılmıştır. (Bakınız: PCR Saflaştırma) Saflaştırılan DNA’nın tümü restriksiyon enzimi ile kesim için kullanılmıştır.

Restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu PCR metoduyla çoğaltılmış DNA, restriksiyon enzimi ve üretici tarafından tavsiye edilen tampon içerir. 25.5 µl DNA, 3 µl tampon ve 1.5 µl restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Daha sonra 16 saatlik sürede restriksiyon enzimi ile 37 °C’de inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyondan sonra reaksiyon karışımı 6 µl yükleme boyası ile karıştırılıp %2.0'lik agaroz jelde 80V'da 15-20 dk yürütülmüş, örnekler jel dökümantasyon cihazında görüntülenmiş ve ilgili polimorfik bölge analiz edilmiştir (Tablo 3.1).

Bir diğer yöntemde ise saflaştırma işleme gerçekleştirilmeden restriksiyon enzimleri direk PCR ürünleri üzerine eklenip inkübasyon yapılmıştır. PCR reaksiyonunun 25 µl'si yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine 1 µl restriksiyon enzimi eklenmiş ve 16 saat 37°C'de su banyosunda inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada yapılan restriksiyon reaksiyonları için kullanılan enzimler, enzimlerin tanıma ve kesme bölgeleri ve inkübasyon şartları Tablo 1'de verilmiştir. 37 °Cde 16 saatlik inkübasyondan sonra reaksiyon karışımı 5 µl yükleme boyası ile karıştırılıp %2.0'lik agaroz jelde 80V'da 15-20 dk yürütülmüş, örnekler jel dökümantasyon cihazında görüntülenmiş ve ilgili polimorfik bölge analiz edilmiştir.

Tablo 3.1. Restriksiyon analizi şartları

Lokus	Enzim	Kesim Bölgesi	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon süresi
XRCC1	MspI	5'-C [^] C G G-3' 3'-G G C [^] C-5'	37°C	16 saat
ERCC2(XPD)	PstI	5'-C T G C A [^] G-3' 3'-G [^] A C G T C-5'	37°C	16 saat

4. BULGULAR:

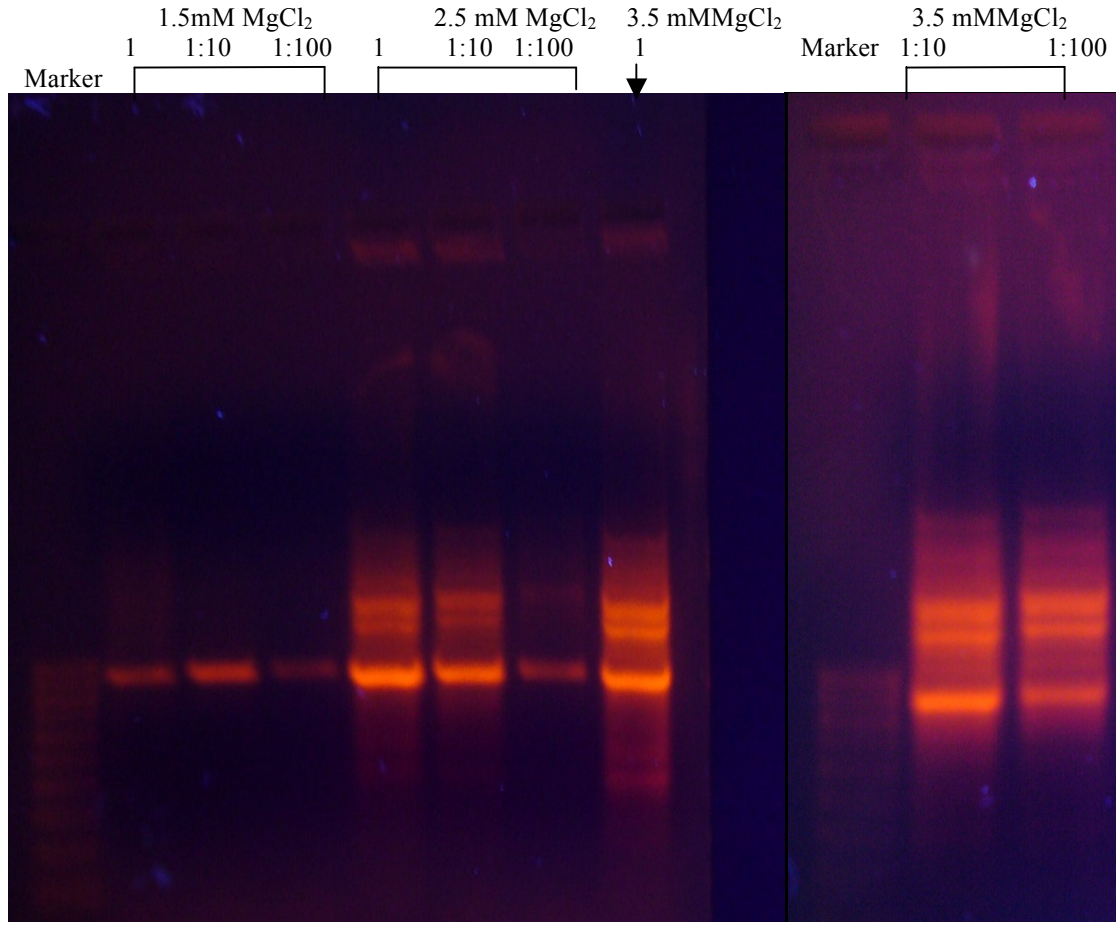
Bu tez çalışması K.K.T.C. toplumundaki 10 tane kanser hastasından kan örnekleri alınarak yürütülmüştür. Bu hastaların 5'i akciğer kanseri, 2'si mide kanseri ve 2'si pankreas, 1 tanesi ise meme kanseridir. Kontrol grubunu ise KKTC toplumunda kendisinde kanser öyküsü bulunmayan 10 gönüllü kişi oluşturmuştur. Hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet, sigara kullanımı ve aile geçmişi tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının karakteristik özellikleri.

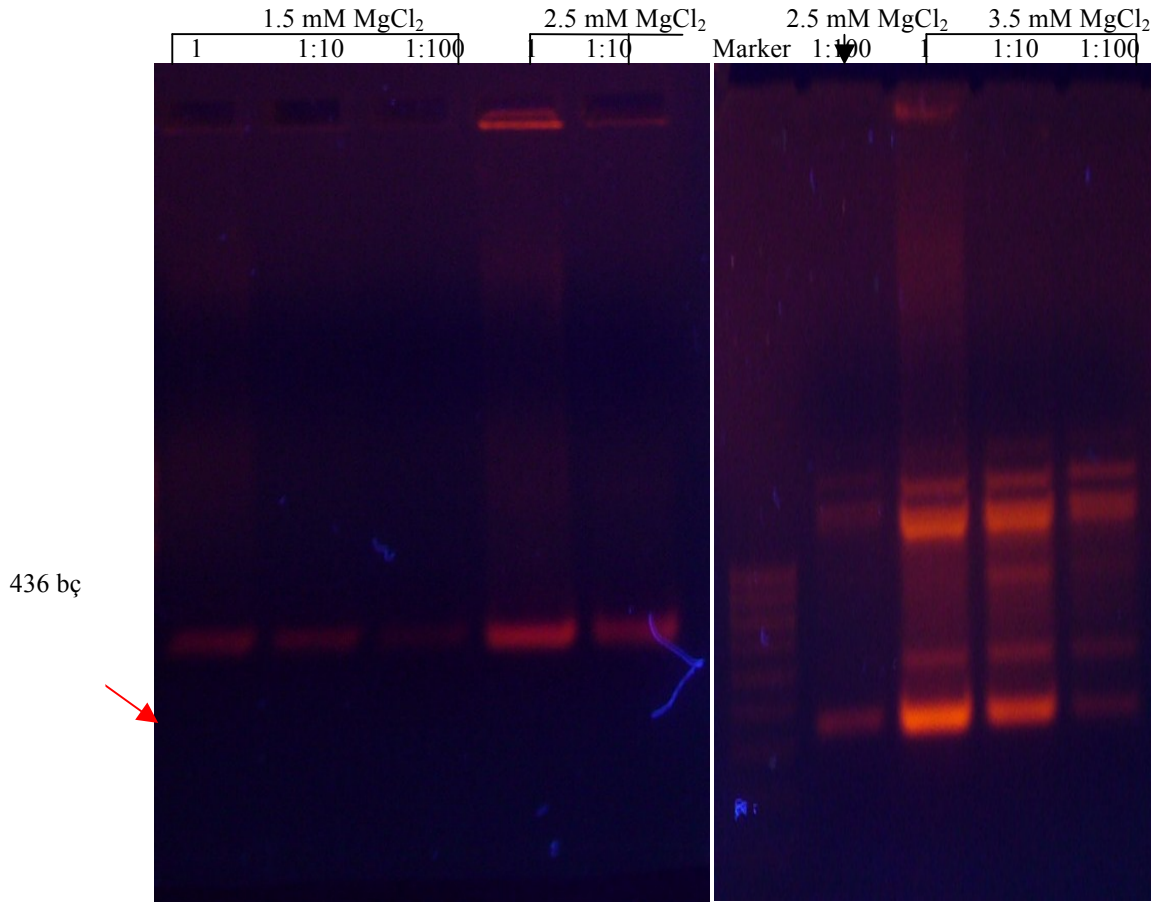
Değişken	Hastalar	Kontrol
Cinsiyet.		
Erkek	9	4
Kadın	1	6
Yaş	55-84	47-72
Sigara:		
Hiç kullanmamış	1	4
Herzaman	9	6
Alkol	% 33.3 (3/10)	%10 (1/10)
Ailede kanser öyküsü	% 33.3 (3/10)	%60 (6/10)
Ailede kanser türü	Endometrium, Hepotoma, Akciğer, Malign melanom	Meme, Mide, Akciğer, Karaciğer

4.1. DNA İzolasyonu ve PCR:

Bireylerden alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplerde toplanmış ve yüksek tuz konsantrasyonu metoduyla DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrasında DNA örnekleri ile PCR yapılmıştır. XRCC1 Ekson 10 amplifikasyonu için JR1F: 5'CAGTGGTGCTAACCTAATC3' ve JR1R: 5'AGTAGTCTGCTGGCTCTGG3' primerleri, ERCC2 Ekson 23 için ise JR2F: 5'GCCCCGCTCTGGATTATACG3' ve JR2R: 5'CTATCATCTCCTGGCCCCC3' primer seti kullanılmıştır (López-Cima ve diğerleri, 2007). PCR analizi yaparken optimal koşulların ayarlanması için Magnezyum klorür konsantrasyonu ve yapışma ısısının ayarlanması önemli bir yer teşkil etmektedir. JR1R, JR1F primerleri kullanarak yaptığımız ilk PCR çalışmamızda 3 farklı Magnezyum klorür konsantrasyonu denendi. 1.5 mM MgCl₂, 2.5 mM MgCl₂ ve 3.5 mM MgCl₂ konsantrasyonlarında 3 farklı PCR yapıldı. Sonuç olarak bu amplifikasyon reaksiyonlarında optimal MgCl₂ konsantrasyonunun 1.5 mM olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca 3 farklı DNA miktarı PCR çalışmamızda denendi. İzole edilen DNA 1, 1:10, 1:100 dilüsyonda 3 farklı miktarda denenmesi sonucunda 1 µl DNA miktarının optimal sonucu verdiği gözlemlendi (Şekil 4.1.). Aynı işlem JR2R ve JR2F primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan deney sonucunda tüm DNA konsantrasyonlarının 1.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunda PCR reaksiyonlarının en iyi sonucu verdiği gözlemlenmiştir. 2.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunda, 1 ve 1:10 dilüsyonundaki DNA miktarı ideal sonuç vermiş, DNA'nın 1:100 dilüsyonunda ise non-spesifik bantlar görülmüştür. Sonuç olarak ise optimal koşul olarak 1.5 mM MgCl₂ ve 1 µl DNA kullanılmasına varılmıştır (Şekil 4.2.).



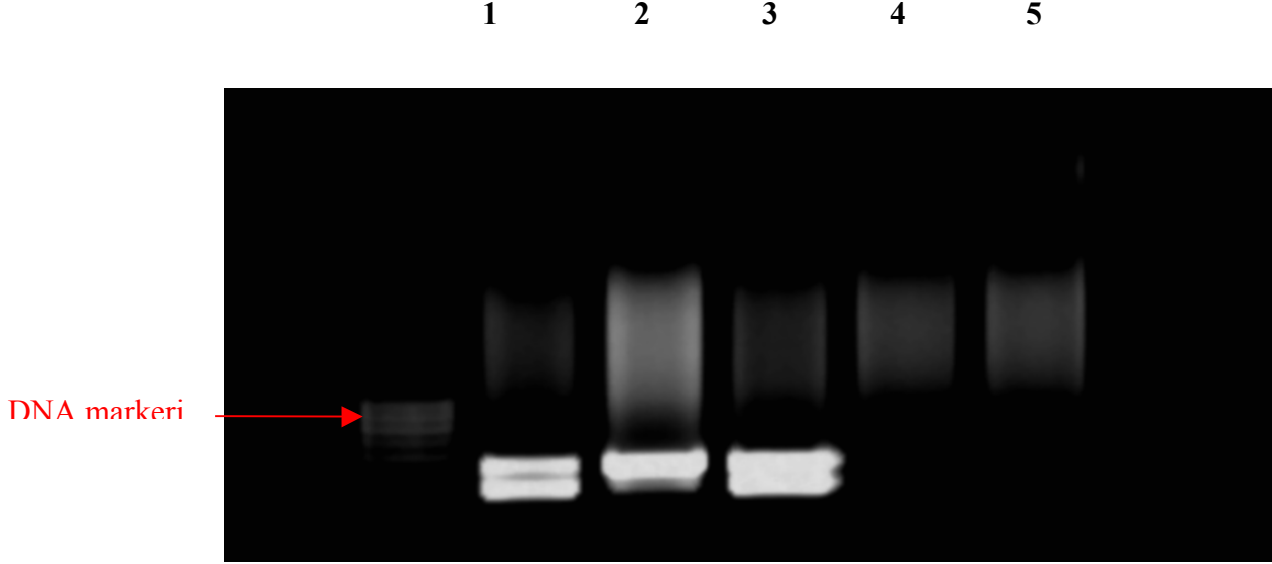
Şekil 4.1. PCR reaksiyonları için optimal MgCl₂ ve DNA konsantrasyonlarının düzenlenmesi (JR1R ve JR1F primerleri kullanılmıştır)



Şekil 4.2. PCR reaksiyonları için optimal MgCl₂ ve DNA konsantrasyonlarının düzenlenmesi (JR2R ve JR2F primerleri kullanılmıştır).

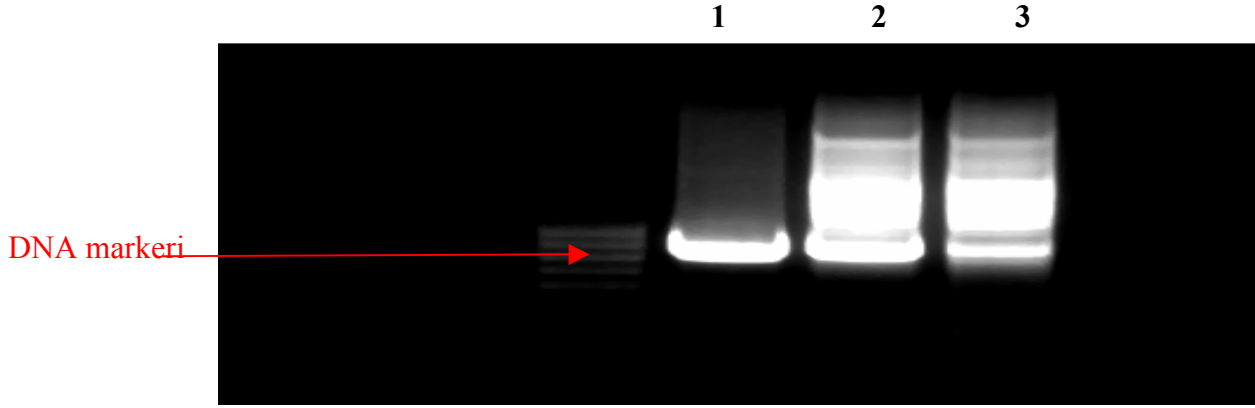
Bir süre sonra tekrarlanan PCR reaksiyonlarında amplifikasyon ürünü tesbit edilmemesinden dolayı Taq polimeraz enziminin çalıştığını bir pozitif kontrol eşliğinde test ettik. Pozitif kontrol olarak başka bir laboratuvarda o laboratuvarın çalışma koşullarında pozitif sonuç veren DNA ve primerler kullandık. Bu amaçla Talasemi Merkezinden (Lefkoşa, K.K.T.C.) alınan DNA, primerler ve deney koşulları kullanarak çalışmalarımızda kullanılan Taq Polimeraz'ın aktivitesi test edildi. Sonuç olarak Taq polimerazımızın düzgün çalıştığını ve bundan dolayı Taq Tamponu, MgCl₂ veya dNTP mix'ten kaynaklanan bir problem olabileceği düşünüldü (Şekil 4.3.). Yeni 10x Taq Tamponu ve MgCl₂ kullanarak PCR

çalışmamız tekrarlandı. Yapılan PCR çalışması sonucunda jele yüklenen PCR ürünlerinin bazılarında non-spesifik bantlar gözlemlendi (Şekil 4.4.).



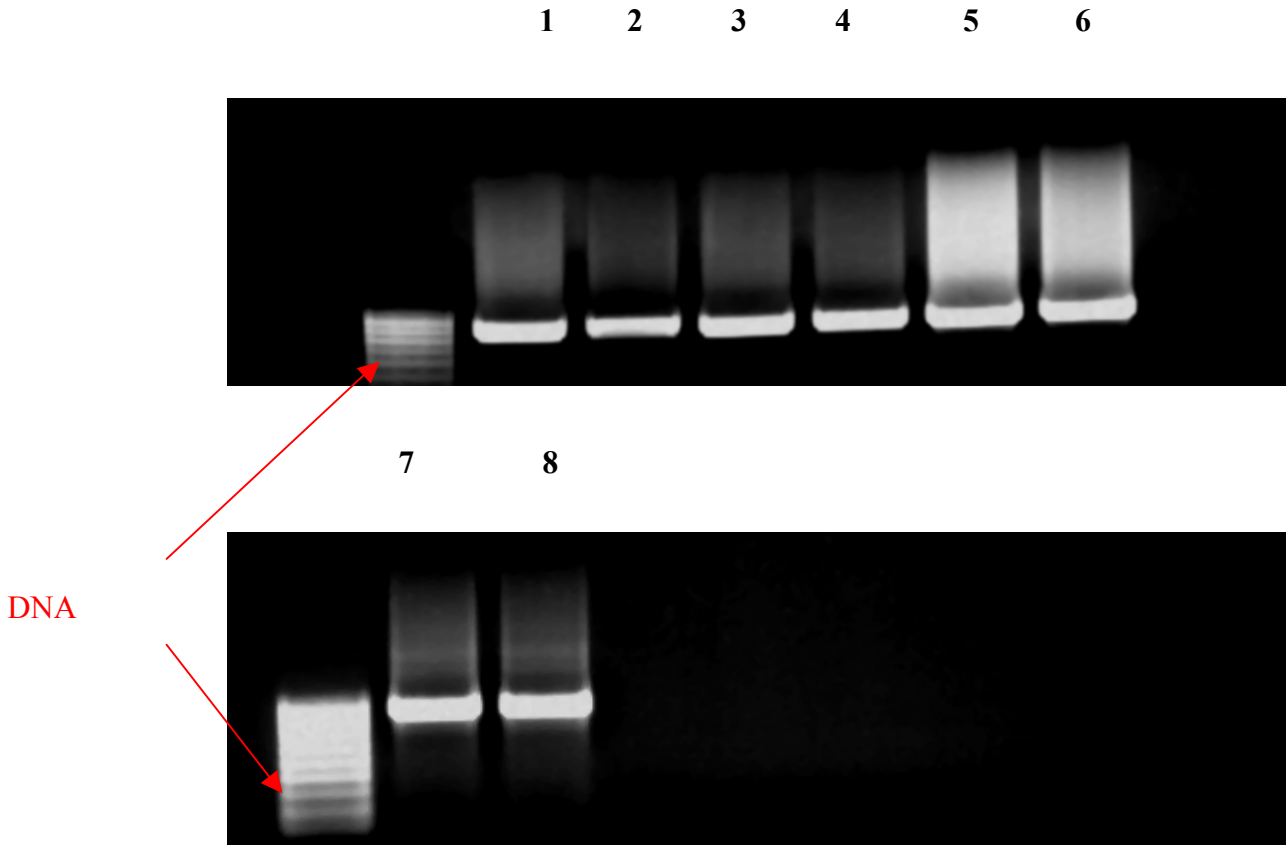
Şekil 4.3. Talasemi ve bizim laboratuvarından PCR komponentlerinin kullanılmasıyla yapılan çalışmanın sonuçlarının %0.8 w/v agaroz jeldeki görüntüsü

1. sütun, talasemiden alınan master mix + talasemiden alınan Taq polimeraz ve talasemiden alınan DNA örneği, 2. sütun, talasemi master mix + talasemi Taq polimeraz ve bizim hasta DNA örneği, 3. sütun, talasemi master mix+ bizim Taq polimeraz ve talasemi DNA örneği, 4. sütun, bizim Taq Tamponu, bizim $MgCl_2$, bizim Taq polimeraz, dH_2O , talasemi primerleri ve bizim DNA örneğimiz, 5. sütun, bizim Taq Tamponu, talasemi Taq polimeraz, talasemi primerleri ve bizim DNA örneğimiz kullanıldı. Elde edilen sonuçlarda 1. 2. ve 3. Reaksiyonun çalıştığı gözlemlendi. 4. ve 5. reaksiyonlar ise çalışmadı.



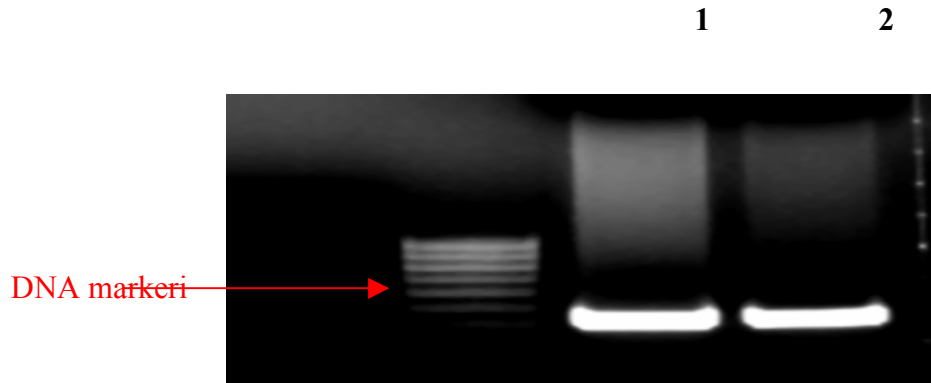
Şekil 4.4. Yeni Taq Tamponu ve $MgCl_2$ kullanarak denenen PCR sonucunda elde edilen ürünlerin %0.8 w/v agaroz jelde görüntülenmesi. Sütun1, hasta 1. ; sütun 2, hasta 2; sütun 3, hasta 3

Yeni Taq Tamponu ve $MgCl_2$ kullandıktan sonra PCR reaksiyonları pozitif sonuç verdi. Fakat bazı hasta örneklerinde spesifik banta ek olarak beklenen üründen daha yüksek moleküler ağırlıkta non-spesifik bantlar gözlemlendi. Genelde non spesifik bantlar yapışma ısısının ideal olmamasından dolayı oluşur. Non-spesifik bantların sebebinin yapışma ısısının optimal olmamasına bağlı olduğunu test etmek için farklı yapışma dereceleri kullanarak PCR reaksiyonlarını tekrarladık. DNA yapışma ısı primerlerin DNA'ya bağlanma ısı T_m 'nin $5^\circ C$ 'nin altında olması gerekmektedir. Farklı yapışma ısıları ($51^\circ C$ - $52^\circ C$) denendiğinde PCR sonuçlarında non-spesifik bantlar gözlemlenmiştir. Denemeler sonucunda optimal yapışma ısısının $53^\circ C$ olduğu sonucuna varıldı. Yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri %0.8 w/v agaroz jelde incelenmiştir ve jel dokümentasyon cihazında görüntülenmiştir (Şekil 4.5.). Sonuç olarak JR1R ve JR1F primerlerini kullanarak yaptığımız PCR koşullarının optimizasyonu sağlandı.



Şekil 4.5. JR1F, JR1R primerleri kullanılarak yapılan PCR sonrası elde edilen ürünlerin %0.8 w/v agaroz jeldeki görüntüsü. 1. ve 2. sütunda hasta 1, 3. ve 4. sütunda hasta 2, 5. ve 6. sütunda hasta 3, 7. ve 8. sütunda hasta 4 gösterilmiştir.

ERCC1 genindeki polimorfizm tespiti için JR2R ve JR2F primerleri kullanılmıştır ve amplifikasyon sonucunda 436 bp boyunda bir ürün elde edilmiştir. Yapılan PCR çalışmamızda istenilen bantlar %0.8 w/v jelde elde edilmiştir (Şekil 4.6.).



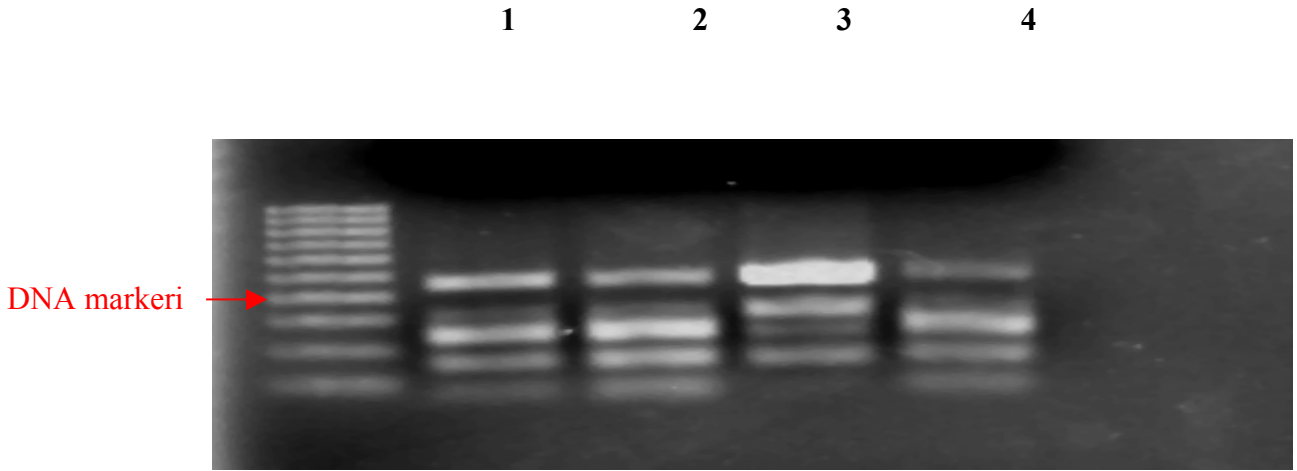
Şekil 4.6. JR2R, JR2F primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının %0.8 w/v agaroz jeldeki görüntüsü. Sütun 1, kontrol DNA, Sütun 2 hasta DNA'sı.

4.2. Jel Ekstraksiyonu ve restriksiyon enzimleri ile kesim:

Elde edilen PCR ürünleri keskin bir jilet aracılığıyla jelden kesilmiştir. Pürifikasyon sonrasında Pst1 (Sigma, ABD) ve Msp (Sigma, ABD) restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Pst1 enzimi, ERCC2 geninde A35931C (rs 13181) polimorfizmini belirlemek için kullanıldı. Msp enzimi, XRCC1 geninde G28152A (rs 25487) polimorfizminin tespiti için kullanıldı. Restriksiyon enzimleri kullanıldıktan sonra elde edilmek istenen polimorfizmler, fragment büyüklükleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Jel ekstraksiyonu sonucunda restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilen ürünler %2'lik w/v agaroz jele yüklenmiştir. Jele yükledikten sonra non-spesifik bantlar gözlemlenmiştir. Non-spesifik bantları ortadan kaldırmak amacıyla farklı inkübasyon süreleri denenmiş (6 saat, 12 saat, 16 saat, 24 saat) denenmiş fakat tüm inkübasyon süreleri aynı sonuçları vermiştir (Şekil 4.7.). Farklı miktarlarda DNA ile enzim kesimleri yapıldıktan sonra non-spesifik bantların DNA miktarı ile ilişkili olduğu görülmüştür (Tablo 4.2.).

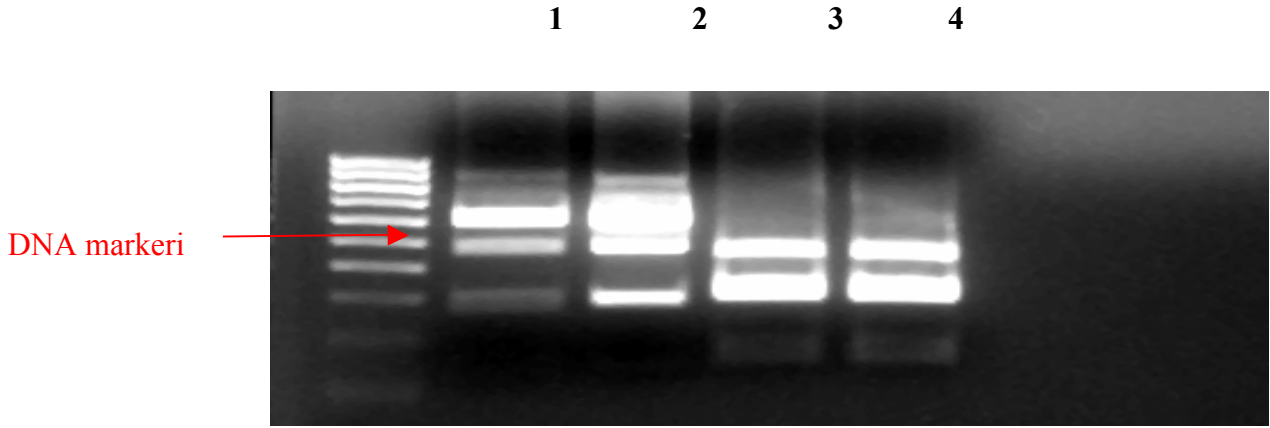
Tablo 4.2. Yapılan çalışmada araştırılan gen bölgeleri hakkında genel bilgi.

Tamir mekanizması	Gen	Ekzon	Enzim	Polimorfizm	Genotip	Fragment büyüklükleri
NER	XPD	Ekzon 23	Pst1	A35931C (rs 13181)	Lys/Lys	146+290
				Lys751Gln	Gln/Gln	63+146 +227
					Lys/Gln	63+146 +227 +290
BER	XRCC1	Ekzon 10	Msp1	G28152A (rs 25487)	Arg/Arg	132+278 +461
				Arg399Gln	Gln/Gln	278+593
					Arg/Gln	132+278 +461 +593



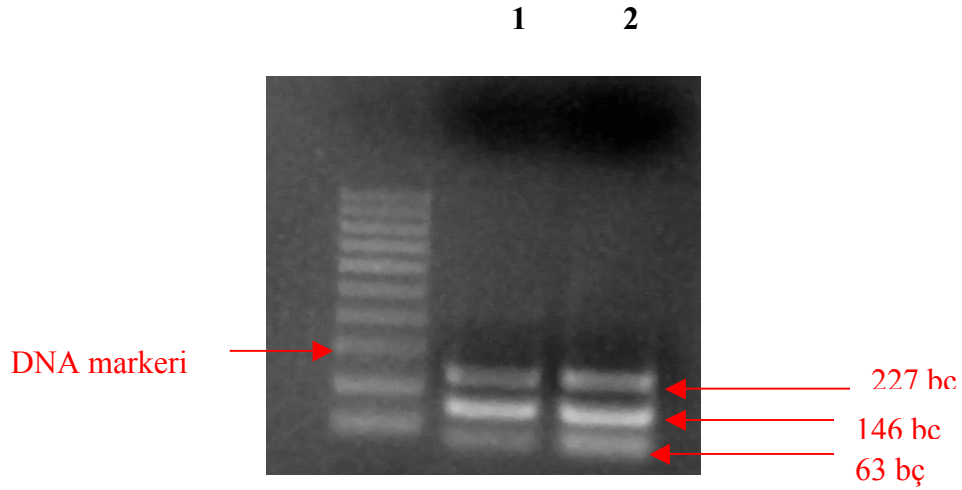
Şekil 4.7. Optimal kesim koşullarını bulabilmek için yapılan Pst restriksiyon enzimi kullanılarak elde edilen kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Sütun 1, hasta 4: 12 saat inkübasyon; Sütun 2, hasta 5, 24 saat inkübasyon; Sütun 3, hasta 6, 3 saat inkübasyon; Sütun 4, hasta 7, 6 saat inkübasyon

Non-spesifik bantların görülmesinde kullandığımız enzimlerin aktivitesinin bir rolü olup olmadığı test edilmesi için kullanılan enzimlerin aktivitesi başka bir firmanın enzimleri ile karşılaştırıldı. Bu çalışma için New England Biolabs enzim aktiviteleri kullanıldı. 12 saat 37 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak iki enzim markası ile yapılan kesim ürünleri arasında fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.8.).



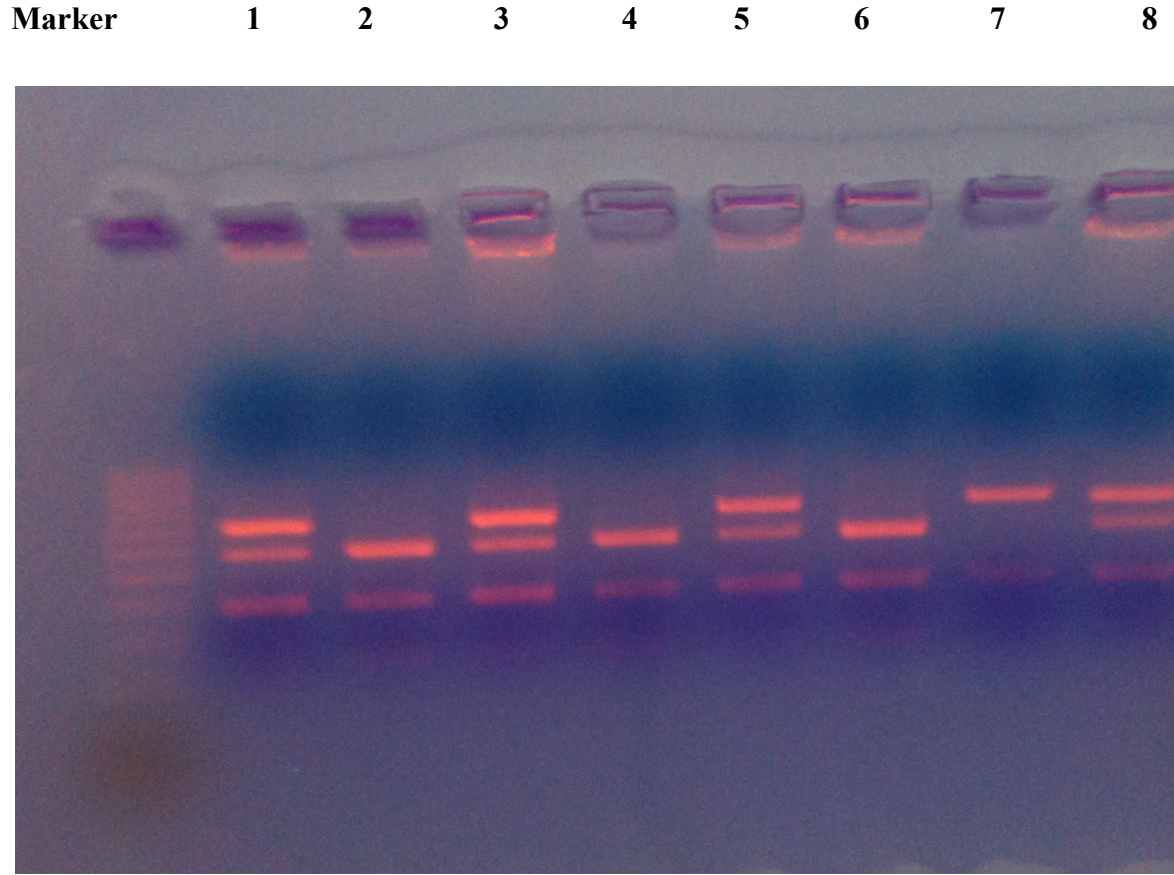
Şekil 4.8. Farklı restriksiyon enzim markaları kullanılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması. Sütun 1, Msp restriksiyon enzimi ile kesim (DNA: 22 μ l, Sigma Tamponu: 3 μ l, Msp enzimi: 1.5 μ l, dH₂O:3.5 μ l: 30 μ l); Sütun 2, Msp restriksiyon enzimi ile kesim (DNA: 22 μ l, NEB Tamponu: 3 μ l, Msp enzimi: 1.5 μ l, dH₂O:3.5 μ l: 30 μ l); Sütun 3, Pst restriksiyon enzimi ile kesim (DNA: 22 μ l, Sigma Tamponu: 3 μ l, Sigma Pst enzimi: 1.5 μ l, dH₂O:3.5 μ l: 30 μ l), Sütun 4: Pst restriksiyon enzimi ile kesim (DNA: 22 μ l, NEB Tamponu: 3 μ l, 10X BSA: 3 μ l, Pst enzimi: 1.5 μ l: 30 μ l)

Daha sonra PCR işleminin hemen ardından saflaştırma işlemi gerçekleştirmeden 25 μ l PCR ürünü üzerine 1 μ l restriksiyon enzimi eklenmiş ve 37 °C’de 16 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Yine iki farklı marka restriksiyon enzimi kullanılarak restriksiyon enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon enzimi ile kesim işleminin sonunda, restriksiyon enzim ile kesim reaksiyonu 5 μ l yükleme boyası ile karıştırılıp %2 w/v agaroz jelde 80V’da 30 dakika örnekler yürütülmüş ve poliformizler saptanmıştır. Sonuç olarak iki farklı marka restriksiyon enziminin aktivitelerinin benzer olduğu gözlenmiştir. PCR sonrası yapılan restriksiyon enzimi ile kesim daha temiz sonuç vermiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9.: PCR işleminin hemen ardından yapılan kesim sonucunun %2w/v agaroz jelde saptanan bantların görüntüsü. Sütun 1, hasta 4 PCR ürünü: 25 µl ve Pst enzimi (Sigma)1 µl; Sütun 2, hasta 4 PCR ürünü: 25 µl ve Pst enzimi (NEB) 1 µl. Sonuç olarak Pst enzimi ile kesim işleminin sonunda hastada Gln/Gln (63,146,227 bp) genotipi gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda hastaların ve kontrol grubunda tespit edilen poliformizlerin bazı örnekleri şekilde ve tümü tabloda gösterilmiştir (Şekil 4.10) (Şekil 4.11) (Tablo 4.3.) (Tablo 4.4.) (Tablo 4.5.) (Tablo 4.6.).



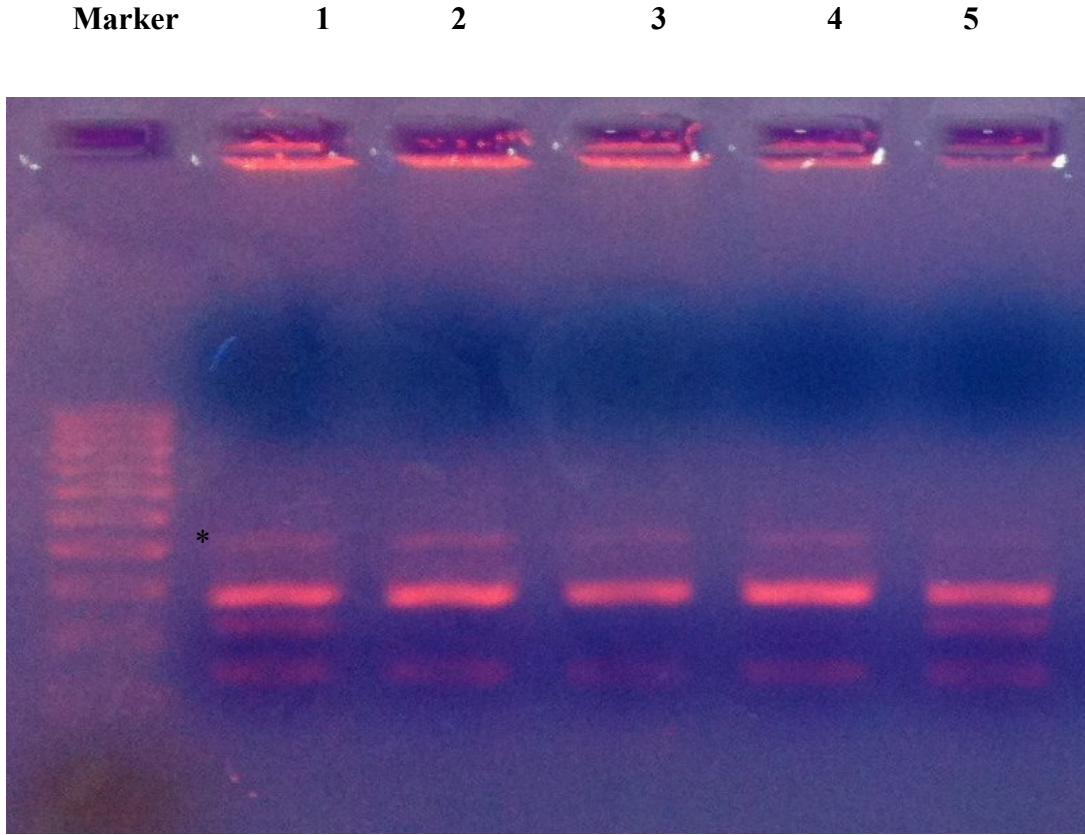
Şekil 4.10: Msp restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim sonuçlarından bir jel görüntüsü örneği. (Sütun 1, hasta 1; Sütun 2, hasta 2; Sütun 3, hasta 3; Sütun 4, hasta 4; Sütun 5, hasta 5; Sütun 6, hasta 6; Sütun 7, hasta 7; Sütun 8, hasta 8)

Tablo 4.3.: Yapılan çalışma sonucunda hasta grubunda XRCC1 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.

Hasta Grubu	Gen	Exon/Intron	Mutasyon	Enzim	Fragment büyüklüğü	Genotip
1	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461 +593	Arg/Gln
2	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461	Arg/Arg
3	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461 +593	Arg/Gln
4	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461	Arg/Arg
5	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461 +593	Arg/Gln
6	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461	Arg/Arg
7	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	278+593	Gln/Gln
8	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461 +593	Arg/Gln
9	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461 +593	Arg/Gln
10	XRCC1 (BER)	Exon 10	G28152 (RS25487)	Msp1	132+278+461 +593	Arg/Gln

Tablo 4.4. Yapılan çalışma sonucunda kontrol grubunda XRCC1 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.

Kontrol Grubu	Gen	Exon/Intron	Mutasyon	Enzim	Genotip	Fragment büyüklüğü
1	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461+593	Arg/Gln
2	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461	Arg/Arg
3	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461	Arg/Arg
4	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461+593	Arg/Gln
5	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461+593	Arg/Gln
6	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	278+593	Gln/Gln
7	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461	Arg/Arg
8	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461+593	Arg/Gln
9	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	132+278 +461	Arg/Arg
10	XRCC1	Exon 10	G28152 (RS25487)	MspI	278+593	Gln/Gln



Şekil 4.11: Pst restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim sonuçlarından bir jel görüntüsü örneği. (Sütun 1, kontrol 1; Sütun 2, kontrol 2; Sütun 3, kontrol 3; Sütun 4, kontrol 4; Sütun 5, kontrol 5)

*Görülen bu gölge bantlar DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş halidir. Restriksiyon enzim kesim koşullarını değiştirmemize rağmen bazı örneklerde bir miktar kesilmemiş bant gözlemlenmiştir. Bunun sebebi kesilen DNA miktarının fazlalığı olabilir.

Tablo 4.5. Yapılan çalışma sonucunda hasta grubunda ERCC2 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.

Hasta Grubu	Gen	Exon/Intron	Mutasyon	Enzim	Fragment büyüklüğü	Genotip
1	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	146+290	Lys/Lys
2	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146 +227	Gln/Gln
3	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146+227 +290	Lys/Gln
4	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146 +227	Gln/Gln
5	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146 +227	Gln/Gln
6	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146 +227+290	Lys/Gln
7	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146 +227	Gln/Gln
8	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146 +227+290	Lys/Gln
9	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	146+290	Lys/Lys
10	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146 +227+290	Lys/Gln

Tablo 4.6. Yapılan çalışma sonucunda kontrol grubunda ERCC2 genindeki polimorfizme göre elde edilen sonuçlar.

Kontrol Grubu	Gen	Exon/Intron	Mutasyon	Enzim	Fragment büyüklüğü	Genotip
1	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146+227+290	Lys/Gln
2	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	146+290	Lys/Lys
3	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	146+290	Lys/Lys
4	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	146+290	Lys/Lys
5	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146+227+290	Lys/Gln
6	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146+227+290	Lys/Gln
7	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	146+290	Lys/Lys
8	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	146+290	Lys/Lys
9	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146+227+290	Lys/Gln
10	ERCC2 (XPD)	Exon 23	A35931C (rs13181)	Pst	63+146+227+290	Lys/Gln

Yapılan araştırma sonucunda XRCC1 genindeki rs25487 polimorfizminde 10 hastada en sık görülen genotipin Arg/Gln olduğu tespit edilmiştir (%60). Çalışılan kontrol grubu sonuçlarına göre XRCC1 genindeki rs25487 polimorfizminde Arg/Gln 10 kişide 4 hastada tesbit edilmiştir (%40). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda Arg/Gln genotipi çoğunluktadır ama bu farkın anlamlı olup olmadığı bu çalışmadaki hasta sayısının artmasıyla açıklık kazanacaktır.

ERCC2 genindeki rs13181 polimorfizminde ise 10 hastada Gln/Gln ve Lys/Gln genotipi eşit sayıda bulunmuştur. Kontrol grubu ile sonuçlar karşılaştırıldığında ise, ERCC2 genindeki rs13181 polimorfizminde ise Gln/Gln 10 kişide 4 hastada görülürken, kontrol grubunda Gln/Gln genotipine hiç rastlanmamıştır. Bu farkın anlamlı olup olmadığı hasta sayısının artışı ile ortaya çıkacaktır.

Hasta ve kontrol gruplarının arasında yaş ve alkol kullanımı arasında büyük farklılıklar bulunmamaktadır. Cinsiyet açısından kontrol grubunda kız bireyler hasta grubundaki kız bireylere oranla daha fazladır. Hasta grubunda sadece bir hastada sigara kullanımı olmamakla birlikte, hasta grubunda sigara kullananların oranı kontrol grubuna göre daha fazladır.

Akciğer kanseri olan hastaları kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda, bu hastaların sigara kullanımının kontrol grubuna oranla çok fazla miktarda olduğu gözlemlenmiştir. Akciğer kanseri hastalarında, BER genlerindeki polimorfizm 5 hastanın 4'ünde aynı tesbit edilmiştir. 4 hastada Arg/Gln genotipi gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda ise Arg/Gln genotipinin daha fazla miktardadır. Bu sonuçlar doğrultusunda Arg/Gln genotipinin kansere yatkınlığı artırdığını söyleyebiliriz. Bu farkın anlamlı olup olmadığı ise hasta sayısının artışı ile ortaya çıkacaktır.

Elde edilen sonuçlara göre 10 tane hasta genotipinde de klinik fayda, tedaviye yanıt olumlu olarak gözlemlenmiştir. Hastalardan sadece 1 tanesinde cisplatin tedavisi sonucunda böbrek toksisitesi gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

DNA devamlı olarak endogenik ve ekzogenik mutajenler ve karsinojenlerle hasarlara uğramaktadırlar. DNA hasarları, hasarın türüne göre baz kesip-çıkarma tamiri, nükleotit kesip-çıkarma tamiri, yanlış eşleşme ve çift iplikli DNA tamiri gibi farklı tamir mekanizmaları ile onarılabilir. DNA hasarı olan hücreler tamir edilmezlerse ya apoptoza ya da kontrolsüz hücre bölünme yoluna giderler. DNA hasar tamirinde herhangi bir sorun kanser gelişiminde önemli rol oynar. Son on yıl içinde DNA tamir genlerindeki bazı yaygın polimorfizmlerin DNA tamir kapasitesi ile, bir kişinin karşılaştığı karsinojenlere karşı hassasiyetini belirlediği öne sürülmüştür (Sever ve Pehlivan, 2007).

XRCC1 proteini baz çifti kesip çıkarma tamirinde oksidasyonlanmış ya da parçalanmış lezyonlar ve önemli olmayan addüktler gibi küçük DNA hasarlarının tamirinde önemli bir role sahiptir. Kodon 399'daki polimorfizminin pek çok epidemiyolojik çalışmalarda çeşitli kanserlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Değişken Gln aleli varlığı; akciğer ve mide kanserinde riskin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Sever ve Pehlivan, 2007).

Bizim çalışmamız sonucunda XRCC1 genindeki rs25487 polimorfizminde 10 hastada en sık görülen genotipin Arg/Gln olduğu tespit edilmiştir (%60). Çalışılan kontrol grubu sonuçlarına göre XRCC1 genindeki rs25487 polimorfizminde 10 kişide Arg/Gln(%40) ve Arg/Arg(%40) genotipi eşit sayıda elde edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda Arg/Gln genotipi çoğunluktadır. Bu farkın anlamlı olup olmadığı bu çalışmadaki hasta sayısının artması ile açıklık kazanacaktır. Diğer çalışmalarda gösterilen Gln alel varlığının kanser ile ilişkisi bu çalışmada gösterilememiştir fakat bunun sebebi yeterli hasta sayısına ulaşmamış olmamız olabilir. Anlamlı sonuçlar gözlemleyebileceğimiz hasta sayısına ulaştığımızda hala kontrol ve hasta grubundaki genotiplerin dağılımı eşit ise, bu sonuçlar kanser gelişiminde dış faktörlerin(sigara, alkol) veya bizim çalışmamıza dahil olmayan diğer genlerin etkili olabileceği sonucunu ortaya koyabilecektir.

Park ve arkadaşlarının Kore popülasyonunda akciğer kanseri hastalarında yapmış oldukları araştırmaya göre XRCC1 kodon 399Gln allelinin az miktarda sigara kullanan hastalarda bile (squamous cell carcinoma) akciğer kanserine yol açtığını saptamışlardır (Park ve arkadaşları, 2002).

Butkiewicz ve arkadaşlarının Polish popülasyonunda yapmış oldukları araştırma sonucunda XRCC1 kodon 399Gln polimorfizmi ile akciğer kanseri arasında hiçbir ilişki bulunmadığını ortaya koymuşlardır (Butkiewicz ve diğerleri, 2001). Bu farklı sonuçların ortaya çıkması farklı popülasyonların farklı genetik ve çevresel farklılık olmasından kaynaklanmış olabilir.

Jelonek ve arkadaşlarının Polonya popülasyonunda yapmış olduğu araştırmaya göre, kolon kanseri hastalarında ve sağlıklı bireylerde XRCC1 genotipinin dağılımında yüksek derecede önemli farklılıklar görülmüştür. XRCC1 399Gln alleli kolon kanser riskini yüksek derecede arttırdığı belirlenmiştir (Jelonek ve diğerleri, 2010).

Hu ve arkadaşları, XRCC1 399Gln allelinin farinks kanserleri ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, 399Gln aleli aile hikayesi ile bağlantılı olarak akciğer kanseri ile ilişki bulmuşlardır (Hu ve diğerleri, 2001).

Duell ve arkadaşları, 399Gln alelini taşıyan bireylerin sigara içme ile pankreas kanserine yakalanma riski arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Duell ve arkadaşları, 2001).

Yapılan birçok hasta, kontrol çalışmasında XRCC1 399Gln riskli bir alel olduğunu göstermiş olmasına rağmen, bazı araştırmalarda böyle bir ilişkinin olmadığı ileri sürülmektedir.

ERCC2 genindeki rs13181 polimorfizminde ise 10 hastada Gln/Gln (%40) ve Lys/Gln(%40) genotipi eşit sayıda bulunmuştur. Kontrol grubunda ise, ERCC2 genindeki rs13181 polimorfizminde ise 10 kişide Lys/Lys(%50) ve Lys/Gln(%50) genotipi eşit sayıda tespit edilmiştir. ERCC2 genindeki rs13181 polimorfizminde hasta grubunda 10 hastadan 4'ünde Gln/Gln genotipi tespit edilmesine rağmen kontrol grubunda Gln/Gln genotipine hiç rastlanmamıştır. Bu sonuç, ERCC2

genindeki rs13181 polimorfizminde Gln/Gln genotipine sahip bireylerin kanser olma riskinin daha yüksek olduğunu bu bulgular ışığında söyleyebiliriz. Bu sonucun anlamlı olup olmadığını göstermek için hasta sayısının yeterli sayıya ulaşması gerekmektedir.

Lopez-Cima ve arkadaşlarının Kuzey İspanya’da yapılan araştırmaların sonucunda ise NER genlerindeki polimorfizmin akciğer kanser riskini artırmadığı gözlemlenmiştir (López-Cima ve diğerleri, 2007).

Chen ve arkadaşlarının Çin popülasyonunda yapmış oldukları çalışmada, XPD 751Lys allelinin akciğer kanserini artırabileceğini ortaya koymuşlardır (Chen ve diğerleri, 2002).

Zhan ve arkadaşlarının Kafkaslar üzerinde yapmış oldukları meta analiz çalışmada, XPD geni Gln allelinin sigara kullanan bireylerde akciğer kanseri ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (Zhan ve diğerleri, 2002).

Yapılan birçok hasta, kontrol çalışmasında ERCC2 geni Gln’in riskli bir alel olduğunu göstermiş olmasına rağmen, bazı araştırmalarda böyle bir ilişkinin olmadığı ileri sürülmektedir. Bizim yaptığımız çalışma sonuçlarına göre ise Gln allelinin kanser ile ilişkili olduğunu söyleyebilmekteyiz.

DNA onarım kapasitesinin değişmesine neden olan XRCC1 ve ERCC2 genindeki bu fonksiyonel polimorfizmlerin bilinmesi kanser etiyolojisi, riski ve tedavisine verilen yanıtta önemli olmaktadır (Erdal ve diğerleri, 2004). Yapmış olduğumuz bu çalışmanın devamı ve tamamlanması sonucunda, KKTC toplumundaki polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin kanserle ilişkisini belirleyerek bu dala bir katkıda bulunabileceğiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, K.K.T.C. toplumundaki kanser hastalarındaki DNA tamir genlerindeki polimorfizimlerin kansere yatkınlıklarıyla ilişkisinin araştırılmasını kapsamaktadır. Bu tez çalışması daha geniş kapsamlı bir çalışmanın başlangıcını teşkil etmektedir. Bu çalışma, ERCC2 ve XRCC1 genlerinin polimorfik bölgelerinin PCR yöntemi ile amplifikasyonunu ve restriksiyon enzim kesimi ile polimorfizimlerin tesbitini içermektedir. Bizim şu anda tamamlamış olduğumuz çalışma 10 hastayı kapsayan bir pilot çalışmadır. Bu çalışmada deney koşulları oturtulmuş ve deneylerin tekrarlanabilirliği gösterilmiştir. ERCC2 geni üzerinde yapılan çalışma Gln/Gln genotipinin kontrol grubunda hiç görülmemesine rağmen hastaların %40'ında görülmesinin Gln aleli ile kansere yatkınlık arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. XRCC1 geni üzerinde yapılan çalışmada kanser hastalarında Arg/Gln polimorfizmi kontrole oranla daha fazla görülmüştür. Projenin ileride daha fazla hasta sayısı ile genişletilmesi ile daha kesin sonuçlar ortaya çıkacaktır. Bu çalışmanın devamında bu hastalardan elde edilen genotiplerin sisplatin tedavisi ile ilişkisine de bakılacaktır. Bu çalışmaya dahil olan hastaların tedavisi sonrasında gerekli zamanın geçmemesinden kaynaklı olarak şu an bu değerlendirmeyi yapmak mümkün değildir.

DNA onarım mekanizmalarında rol alan genler ve kanser riski arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda ve birbiriyle çelişkili sonuçlar veren çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu gibi çalışmaların daha büyük ve farklı genetik altyapıya sahip popülasyonlarda tekrar edilmesi DNA onarım genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi tanımlamak açısından önemlidir.

XRCC1 genindeki ve ERCC2 genindeki bu fonksiyonel polimorfizimlerin araştırılması, kanser etiyolojisi ve riski ile ilişkilendirilmesi tedavi için de yeni yaklaşımların geliştirilmesine imkan sağlayacaktır.

K.K.T.C. hastalarında ilk kez yapılan bu çalışma literatüre katkıda bulunulacaktır. Önümüzdeki yıllarda laboratuvarlarda elde edilen bilginin insanlara uygun klinik tedavilere dönüştürülmesine çalışılmalıdır. Polimorfizimlerin etkileri

kesin olarak belirlendiğinde kişilerin genotipine uygun bireysel tedavi yöntemleri de geliştirilebilecektir.

KAYNAKLAR

Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, 80, 859–868.

Ahsan, H., Chen, Y., Wang, Q., Slavkovich, V., Graziano, J.H., Santella, R.M. (2003). DNA repair gene XPD and susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis. *Toxicol. Lett.*, 143, 123-131.

Almeida, K.H., Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*, 6(6), 695-711.

Audebert, M., Salles, B., Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, 279, 55117-55126.

Benhamou, S., Sarasin, A. (2005). ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.*, 161(1), 1-14.

Boer, J., Hoeijmaker, J.H.J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21(3), 453-460.

Bohr, V.A. (1995). DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis* 16, 2885-2892.

Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. (1993). DNA repair. Engagement with transcription. *Nature*, 363(6425), 114–115.

Butkiewicz, D., Rusin, M., Enewold, L., Shields, P.G., Chorazy, M., Harris, C.C. (2001). Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis (Lond.)*, 22, 593-597.

Chen, S., Tang, D., Xue, K., Xu, L., Ma, G., Hsu, Y., Cho, S.S. (2002). DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*, 23(8), 1321-1325.

Chung D. C., Rustgi A. K., (1995). DNA mismatch repair and cancer, *Gastroenterology*, 109, 1685-1699.

Chu, G., (1997). Double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 272, 24097-24100.

Dawson, T. L., Gores, G.J., Nieminen, A.L., Herman B., Lemasters, J.J., (1993). Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol*, 264, 961–967.

de Bacr, J., Hoeijmakers, J.H.J., (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21(3), 453-460.

de Boer, J., Hoeijmakers, J.H.J., Cleaver, J.E., Kraemer, K.H., (2001). The Metabolic Basis of Inherited Diseases. 3, 28, 690-692.

Debeleç-Bütüner B., Kantarcı G. (2006). Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm*, 35 (2), 149-170.

Donigan, K., Sweasy, J.B. (2009). Sequence context specific mutagenesis and base excision repair. *Molecular Carcinogenetics*, 48(4), 362-368.

Duell, E.J., Wiencke, J.K., Cheng, T.J. (2000). Polymorphism in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*, 21(5), 965-71.

Duell, E.J., Holly, E.A, Bracci, P.M. (2002). A population based study of the Arg 399 Gln polymorphism in XRCC1 and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 62, 4630-4636.

Erdal, N., Erdal, M.E., Savaşoğlu, K., Gökdoğan, T. (2004). DNA Onarım Geni X-Ray Repair Cross-Complementing in Arg194Trp ve Arg399Gln Polimorfizmleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 24, 573-578.

Evans, E., Moggs, J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M. , Wood, R.D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO Journal*, 16 (21), 6559–6573.

Fousteri, M., Mullenders, L.H.F. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Research*, 18, 73-84.

Friedberg, E., Walker, G., Siede, W., (1995). DNA Repair and Mutagenesis. *Washington (DC): ASM Press*

Giachino, D.F., Ghio, P., Regazzoni, S. (2007). Prospective assesment of XPD Lys751Gln and XRCC1 Arg399Gln single nucleotide polymorphisms in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 2876-2881.

Green, C.M., Almouzni, G., (2002). When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*, 3, 28–33.

Hu, J.J., Smith, T.R., Miller, M.S., Mohrenweiser, H.W., Golden, A., Case, L.D. (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensivity. *Carcinogenesis*, 22(6), 917-22.

Hu, J.J., Mohrenweiser, H.W., Bell, D.A., Leadon, S.A., Miller, M.S. (2002). Symposium overview: Genetic polymorphism in DNA repair and cancer risk. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 185(1), 64-73.

Jelonek, K., Gdowicz-Klosok, A., Pietrowska, M., Borkowska, M., Korfanty, J., Rzeszowska-Wolny, J., Widlak, P. (2010). Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. *J Appl Genet.*, 51(3), 343-352.

Kulaksız, G., Sancar, A. (2007). Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, 32 (3), 104–111.

Kim, K., Biade, S., Matsumoto, Y., (1998). Involvement of Flap Endonuclease 1 in Base Excision DNA Repair, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 8842-8848.

Klungland, A., Lindahl, T., (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO Journal*, 16, 3341 – 3348.

Lei, Y.C., Hwang, S.J., Chang C.C., (2002). Effect on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutation Research*, 519(1-2), 93-101.

Lieber, M.R., (1997). The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. *Bioessays*. 19(3):233-40.

Lehmann, A.R., (1995). Nucleotide excision repair and the link with transcription., *Trends Biochem. Sci.* 20(10), 402–405.

Lehman, I.R., (1997). Eukaryotic DNA Repair Minireview Series, *J. Biol Chem.*, 272, 23463.

Lindahl, T., (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422), 709–715.

López-Cima, M.F., González-Arriaga, P., García-Castro, L., Pascual, T., Marrón, M.G., Puente, X.S., Tardón, A. (2007). Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of northern Spain. *BMC Cancer.*, 7, 162.

Lunn, R.M., Langlois, R.G., Hseih, L.L., Thompson, C.L., Bell, D.A., (1999). XRCC1 polymorphism: Effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Research*, 59(11), 2557-2661.

Manuguerra, M., Saletta, F., Karagas, M.R., Berwick, M., Veglia, F., Vineis, P., Matullo, G., (2006). XRCC3 and XPD/ERCC2 Single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, 164, 297-302.

Masson, M., Niendergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menisier-de Murcia, J., de Murcia, G., (1998). XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3563-3571.

Metzger, R., Leichman, C.G., Danenberg, K.D. (1998). ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J clin Oncol* , 16, 309-316.

Mitra, S., Boldogh, I., Izumi, T., Hazra, T.K., (2001). Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. *Environ Mol Mutagen*, 38, 180–190.

Misra, R.R., Ratnasinghe, D., Tangrea, J.A. (2003). Polymorphisms in the DNA repair genes XPD, XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland. *Cancer Letters*, 191(2), 171-178.

Müftüoğlu, M. (2003). DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem)*, 228(1), 20-24.

Modrich, P., (1997). Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272,24727-24730.

Nakamura, J., Walker, V.E., Upton, P.B., Chiang, S.Y., Kow, Y.W., Swenberg, J.A., (1998). Highly sensitive apurinic/ apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Research*, 58, 222–225.

Nash, R.A., Caldecott, K.W., Barnes, D.E., Lindahl, T., (1997). XRCC1 protein interacts with one two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry*, 36, 5207-5211.

Osley, M.A., Nickoloff, J.A., Tsukuda, T (2007). ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair. *Mut. Res.*, 618(1-2), 65-80.

Park, J.H., Kam, S., Kim, I.S., Jung, T.H. (2002). Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 11(1), 23-27.

Reidl, T., Hanaoka, F., Egly, J.M., (2003). The comings and goings of nucleotiden excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J* 22, 5293-5303.

Reed, E. (1998). Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*, 24, 331-344.

Rosell, R., Taron, M., Alberola, V., Massuti, B., Felip, E. (2003). Genetic testing for chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Lunc Cancer*, 41, 97-102.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., Linn, S., (2004). Molecular mechanisms of Mammalian DNA repair and the DMA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 73, 39-85.

Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J*, 13, 2388–92.

Seker, H., Butkiewicz, D., Bowman, E.D. (2001). Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with XPD 312 Asp/Asp genotype. *Cancer Res*, 61, 8654-8658.

Sever, T., Pehlivan, S. (2007). Batı Anadolu populasyonunda XRCC1 DNA tamir genindeki A399Gln polimorfizminin araştırılması. *Gazi Üniversitesi Tıp Dergisi*, 1, 22-25.

Shen, M.R., Jones, I.M., Mohrenweiser, H. (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*, 58(4), 604-608.

Smerdon, M.J., Conconi, A., (1999). Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 62, 227-55.

Spitz, M.R., Wu, X., Wang, Y. (2001). Modulation of nucleotide excision repair capacity of XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res*, 61, 1354-1357.

Stern, M.C., Umbach, D.M., van Gils, C.H., Lunn, R.M., Taylor, J.A. (2001). DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol*, 10(2), 125-131.

Sturgis, E.M., Castillo, E.J., Li, L. (1999). Polymorphism of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, 20(11), 2125-2129.

Sung, J.S., Demple, B., (2006). Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in. 273(8), 1620-1629.

Thompson, L.H., West, M.G., (2000). XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutation Research*, 459, 1-18.

Tirole, F., Busso, D., Coin, F., (1999). Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell*, 3,87–95.

Tomescu, D., Kavanagh, G., Ha, T., Campbell, H., Melton, D.W. (2001). Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis*, 22(3), 403-408.

Weber, C.A., Salazar, E.P., Stewart, S.A., (1990). ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *EMBO J*, 9, 1437–47.

Wood, R.D. (1997). Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23465–23468.

Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., Lindahl, T., (2001). Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284-1289.

Wu, J., Grunstein, M., (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications, (12), 619-623.

Zhan, P., Wang, Q., Wei, S.Z., Wang, J., Qian, Q., Yu, L.K., Song, Y. (2010). ERCC2/XPD Lys751Gln and Asp312Asn gene polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis involving 22 case-control studies. *J Thorac Oncol.*, 5(9), 1337-45.

Numune No:
(YDÜ Eczacılık Fakültesi
tarafından doldurulacaktır)

Hasta Bilgi Formu

Adı, soyadı:

Doğum tarihi ve yeri:

Şu anda yaşadığı adres:

Bu adreste yaşadığı süre:

Uzun süreli (1 yıl veya daha fazla) yaşadığı diğer adres veya adresler:

Tel numarası:

Mesleği (çalışma süresi):

Sigara () (Kullanım süresi) Alkol () (Kullanım sıklığı)

Uzun süreli görülen tedaviler, süreleri ve kullanılan ilaçlar:

Ailede kanser öyküsü:

Konulan Teşhis:

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: " K.K.T.C. toplumundaki kanser hastalarında DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin sisplatin tedavisindeki etkisi "

Bu araştırma Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalında yapılacaktır. Bu çalışma Lefkoşa Dr. Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastanesi, Onkoloji Servisinde mide, akciğer ve pankreas kanseri teşhisi konulmuş vakalarda kemoterapi tedavisi öncesinde yapılacak DNA bazında bir inceleme yöntemidir. Herhangi bir tanı yöntemi değildir.

DNA tamir mekanizmaları ökaryot hücrelerde normal metabolik aktiviteler sonucunda veya çevresel etkenler aracılığıyla DNaya gelen hasarları tamir eden mekanizmalardır. DNA tamir mekanizmaları, DNAdaki hasarları tamir ederek dokulardaki normal hücrelerde genom bütünlüğünü korur ve dolayısıyla kanser oluşumunu önler. Diğer bir yandan da DNA tamir mekanizmaları, kemoterapi tedavisi gören kanser vakalarında, tümör hücrelerinde DNaya hasar vererek etki gösteren kemoterapötik ajanlara karşı bir direnç yol açabilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin (DNA sekansında bir nükleotidlik varyasyon) kansere oluşumunu tetikleyici etkiye sahip olabileceğini veya kemoterapötik tedavilerde farklı yanıtlara yol açabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, Bahar 2009'dan sonraki iki yıl içerisinde Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastanesi'ne tedavi için başvuran akciğer, mide ve pankreas kanseri vakaları tedaviye başlamadan önce kanları alınarak genomik DNA ekstrasyonu ve polimorfizm çalışmaları için Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesine verilecektir. Hastaların teşhis konulma anındaki yaşı, cinsiyeti, sigara içip içmediği, klinik safha ve tümör histolojisi hastahane çalışanları tarafından rapor edilecektir. Genetik polimorfizmlerin tesbiti PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)-RFLP yöntemi ile yapılacaktır. Tedavi öncesi vakalardan alınan kandan genomik DNA elde edilecek ve DNA amplifikasyonu polimorfizm bölgesine özgül primerler kullanarak yapılacaktır. PCR amplifikasyonundan elde edilen DNA ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek polimorfizmlerin türü belirlenecektir. XRCC1 Arg399Gln polimorfizminin tesbitinde MspI restriksiyon enzimi, XPD Lys751Gln polimorfizminin tesbitinde PstI enzimi, XPD Asp312Asn polimorfizminin tesbitinde StyI enzimi, ERCC1 C8092A polimorfizminin tesbitinde MboII enzimleri kullanılacaktır. Sisplatin-esaslı tedavi sonrasında hastaların tedaviye yanıt oranı, oluşan toksisite, progresyona kadar geçen süre ve toplam sağ kalımı ölçülecektir ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenecektir. Çalışmaya yaklaşık yüz kanser hastası ve yüz kontrol grubu bireyi katılacaktır. Çalışmada kullanılacak olan materyal kandır. Kan alma hastalar için yapılan rutin bir işlemdir. Kan alma işleminin hastaya yan etkisi olmayacaktır ve herhangi bir riski bulunmamaktadır.

Bu alışmada K.K.T.C. toplumunda bulunan DNA tamir genlerindeki polimorfizmler belirlenecek ve bu polimorfizmlerin sisplatin-esaslı akciğer, mide ve pankreas kanseri tedavisindeki etkisi ölçülecektir. Bu alışma, K.K.T.C. de bir ilk olup, toplumdaki polimorfizmlerin saptanması ve daha da önemlisi bu polimorfizmlerin sisplatin-esaslı kemoterapi tedavisindeki etkisinin belirlenmesi kanser hastalarına hedefli tedavi sunabilmek açısından büyük önem taşımaktadır.

II-Gönüllü Hakları

- Araştırmaya katılmayı red etme hakkına sahipsiniz.
- İstedığınız anda araştırmacıya haber vererek çalışmadan çekilebilirsiniz ya da araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.
- Araştırmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından ıkartılmanız veya çıkmanız halinde, hastalığınız ile ilgili tedavinizde bir aksama olmayacaktır.
- Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyeceksiniz. Ayrıca, size bir ödeme yapılmayacaktır.
- Gönüllüden alınacak numuneler yalnızca adı geçen çalışmada kullanılacaktır.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Çalışma sonunda elde edilecek bilgiler sizin ve hekiminiz dışındaki üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
- Yapılacak alışma herhangi bir tedavi yöntemi değıldir.

İkinci bölüm: (Katılımcının/Hastanın Beyanı) (bu bölüm hazırlanan gönüllü olur formunun sonuna eklenmelidir)

Sayın Dr. Özlem Gürkut tarafından Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastahanesi Tıbbi Onkoloji Servisi'nde bilimsel bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim.

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Özlem Gürkut'u Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastahanesi Tıbbi Onkoloji Servisi'nde **0392 2285441 x1331** no'lu telefonda arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi, Telefon no., Fax no.

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi, Telefon no., Fax no.

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi