T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

LARİNKS KANSERLİ HASTALARDA DNA LİGAZ ENZİM GENİ POLİMORFİZMİNİN PZR-RFLP TEKNİĞİ İLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATİH SARI

Danışman

Prof. Dr. Hasan ACAR

KONYA-2007

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ 1

2. LİTERATÜR BİLGİ 2

2.1. Larinksin Yeri, Görevleri ve Anatomik Yapısı 2
2.2. Larinks Kanseri 4
2.3. Larinks Kanserinin Yayılması 5
2.3.1. Subraglottik kanserler 5
2.3.2. Glottik kanserler 6
2.3.3. Subglottik kanserler 6
2.4. Larinks Kanserinin Sınıflandırılması 7
2.5. Larinks Kanserinin Nedenleri 7
2.5.1. Yaş ve cinsiyet 7
2.5.2. Sigara 8
2.5.3. Alkol 8
2.5.4. Meslek 8
2.5.5. Kronik larenjit 8
2.5.6. Radyasyon 9
2.5.7. İmmünolojik etkenler 9
2.6. Hücre Döngüsü ve DNA'nın Replikasyonu 9
2.6.1. Hücre döngüsü 9
2.6.2. Replikasyon mekanizması 10
2.7. DNA'nın Yapısındaki Değişiklikler (Polimorfizm ve Mutasyon) 11
2.8. DNA'nın Replikasyonu ve Mutasyon Arasındaki İlişki 12
2.9. Mutasyonlar ve DNA Tamir Mekanizmaları Arasındaki İlişki 12
2.10. DNA Ligaz, Yapı, Sınıflandırma ve Fonksiyonları 14
2.10.1. DNA ligaz I 15
2.10.2. DNA ligaz II ve III 16
2.10.3. DNA ligaz IV 16
2.10.4. DNA ligaz V 16
2.11. DNA Ligaz I Geni 17
2.12. Mutasyon ve Polimorfizmlerin Belirlenmesinde PZR'nin Rolü 17
2.13. Kanserin Genetik Temeli 18

2.13.1. Larinks kanserinin genetik temeli..... 18

3. MATERYAL ve METOD 20

3.1. Hasta Seçimi ve Kontrol Grubu..... 20
3.2. DNA İzolasyonu 20
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 21
3.4. Jel Elektroforezi..... 22
3.5. Restriksiyon Enzim Kesimi 22
3.6. İstatistik Analizler 23

4. BULGULAR 24

4.1. Yaş ile DNA Ligaz Genotipleri Arasındaki İlişki 25
4.2. Sigara Kullanımı ile DNA Ligaz Genotipleri Arasındaki İlişki 25
4.3. Tümör Lokalizasyonu ile DNA Ligaz Genotipleri Arasındaki İlişki 26
4.4. TNM Sınıflaması ile DNA Ligaz Genotipleri Arasındaki İlişki 26

5. TARTIŞMA..... 28

6. ÖZET 31

7. SUMMARY 32

8. LİTERATÜR LİSTESİ..... 33

9. ÖZGEÇMİŞ 38

10.TEŞEKKÜR..... 39

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. DNA ligaz enzimlerinin genel özellikleri..... 15

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarındaki DNA ligaz (*LIGI) genotipleri dağılımı* 27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Larinksin yapısı ve kısımları 2

Şekil 2.2. Larinks boşluğu; subraglottik, glottik ve subglottik bölgelere ayrılır 3

Şekil 2.3. Larinks kanserlerinin görüntüleri 4

Şekil 2.4. Preepiglottik bölge. Hiyoepiglottik membran, hiyoid, tirohiyoid, tirohiyoid membran, tiroid, arkada epiglot petiolusu 5

Şekil.2.5. True vokal kord da bulunan tümör görüntüsü 6

Şekil.2.6. Subraglottik tümör görüntüsü 7

Şekil 4.1. *LIG1* gen polimorfizmi için PZR-RFLP jel elektroforez görüntüsü 24

1. GİRİŞ

Larinks kanserleri tüm dünyada sık görülen malign hastalıklardan biridir. Hastalığın ortaya çıkmasında, sigara ve alkol kullanımı, çalışma şartları gibi çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmekle birlikte, kanser gelişiminde metabolizma ürünlerinin, genetik yatkınlık ve polimorfizmlerin de etkili olabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmaktadır. Özellikle DNA sentezi ve tamir yollarında meydana gelebilecek bozuklukların kanser gelişimine önemli katkısı olabilir. Bu bozukluklar bu işlemlerde rol alan gen ve gen ürünlerinin anomalilerine bağlı olarak ortaya çıkabilir.

DNA ligaz enzimleri DNA sentez ve tamirinde rol alan kritik enzimlerdendir. Bu enzimi kodlayan gen bölgelerindeki polimorfizmler kanserlerin ortaya çıkması ve gelişiminde etkili olabilir. *DNA ligaz I* enzimini kodlayan *LIG1* genindeki polimorfizm ve mutasyonlar önemlidir.

DNA yapısında meydana gelen değişiklerin belirlenmesinde PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği oldukça yaygın kullanılmaktadır. Spesifik endonükleazlar yardımıyla bireyler arasındaki genetik farklılıklar ortaya konulmaktadır. Bu teknik PZR-RFLP (restriksiyon enzim kesim parça uzunluğu polimorfizmi)'dir

Bu çalışmada, kansere sebep olabilecek faktörlerin başında gelen DNA sentez ve tamir yollarında etkili olan *DNA ligaz I* enzimini kodlayan gendeki polimorfik değişiklikler, PCR-RFLP tekniği ile vaka-kontrol karşılaştırmaları ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

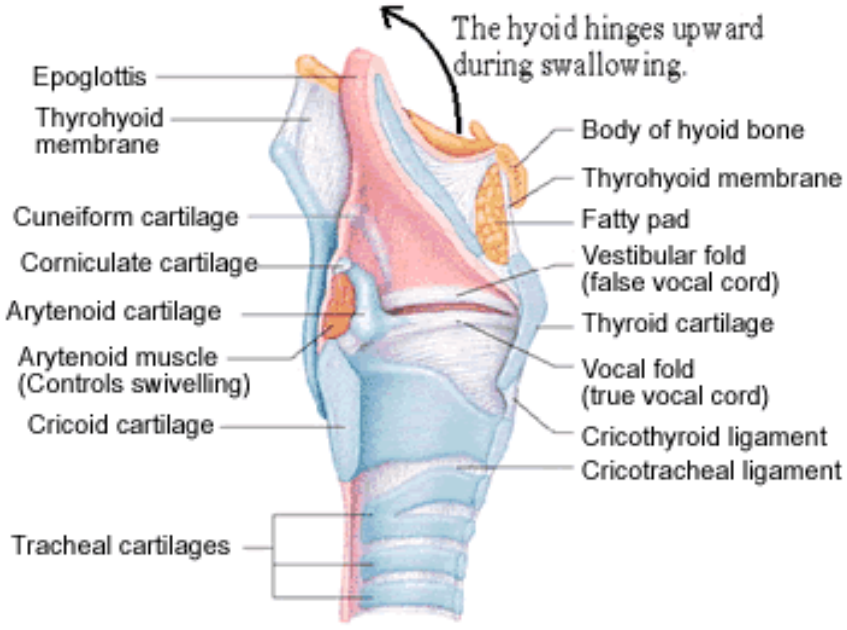
2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Larinksin Yeri, Görevleri ve Anatomik Yapısı

Larinksin, solunum ve sindirim sistemlerinin geçiş bölgesinde yer alan nöromuskuler bir yapı olduğu belirtilmiştir (Anthony ve ark 1996, Merati ve Rieder 2003). Larinksin boynun ön orta bölümünde hiyoidin altında yer alır ve dil kökünün arkasında epiglot ile başlayıp trakeanın ilk halkası ile anastomoz yapan krikoid kıkırdak ile sonlanmaktadır (Kaya 2002).

Larinksin; boyun bölgesinde solunum yolunun bir parçası olarak görev yapma ve solunum yolunu koruma, konuşma, yutkunma, öksürük ve balgamı dışarı atma, dolaşıma yardımcı olma gibi fonksiyonları yerine getirmektedir (Anthony ve ark1996, Kaya 2002). Büyüklüğünün ve boyundaki yerinin yaşa ve cinsiyete göre değiştiği; yutkunma ve ses çıkarma işlemlerinde alçalma ve yükselme hareketlerinin olduğu gözlenmiştir (Kaya 2002).

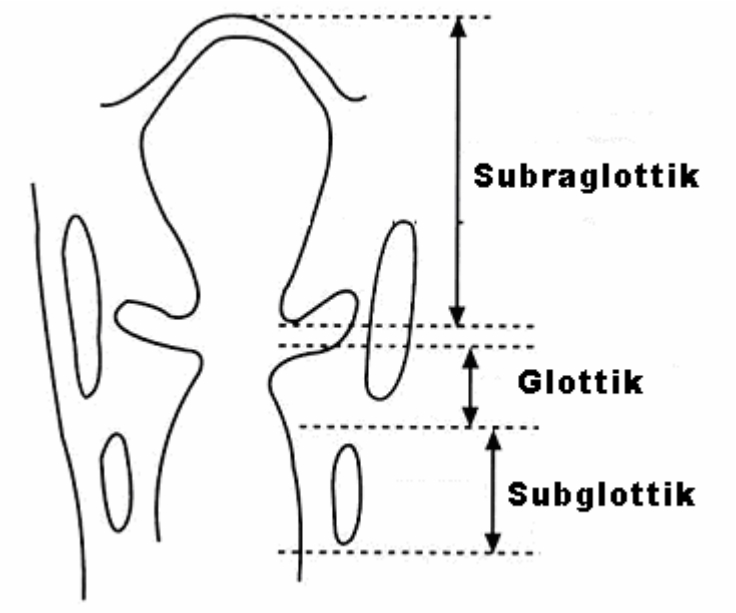
Anatomik olarak; supraglottik, glottik ve subglottik olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır (Kaya 2002, Merati ve Rieder 2003, Filho 2004).



Şekil 2.1. Larinksin yapısı ve kısımları (Kaya 2002)

Larinks şekil olarak; yukarıdan aşağıya piramide benzemektedir. Kıkırdak çatısını; epiglot, tiroid, krikoid, aritenoid, kornikulat ve kuneiform kıkırdaklar oluşturmaktadır. Çevresindeki yapılara ligament, membran ve adalelerle tutunmakta, ön ve yanlarda tiroid ve krikoid kıkırdaklar aracılığı ile tiroid bezinin üst kutbu ile yakın komşu olmakta, arka ve yanlarda ise karotis kılıfı ile bağlantı oluşturmaktadır (Şekil 2.1). Larinkse giren damarlar, sinirler ve kıkırdaklar larinks çatısının oluşumunu sağlar. Larinks kıkırdakları hava yolunun açık kalması, sesin oluşturulması gibi görevleri yerine getirmektir (Shaha ve ark 1998, Kaya 2002).

Larinksin iç yüzeyinde sağlı sollu ve birbiri üzerine yerleşmiş iki çift plika yer alıp üstteki plikalara ventriküler bandlar (plieae ventrieularis) alttakilere ise vokal kordlar (plieae voeales) adı verilmektedir. Ayrıca plikalar larinks boşluğunu üç bölüme ayırıp üst bölüm vestibulum larengis olup ventriküler bandların üstünde kaldığı, orta bölüm ventriküler band ve vokal kordlar arasındaki ventrikül (ventrieulus laryngis) olduğu, alt bölüm ise vokal kordların altındaki subglottik bölge (Cavum infragloticum) olarak tanımlanmıştır (Kaya 2002, Merati ve Rieder 2003).



Şekil 2.2. Larinks boşluğu; supraglottik, glottik ve subglottik bölgelere ayrılır (Kaya 2002).

Larinksin iç yüzeyinde bulunan ve supraglottik, glottik, subglottik bölgelere ayrılan yere larinks boşluğu denir (Şekil 2.2.). Larinks boşluğu gerek organ fonksiyonlarının yerine getirilmesinde, gerek organ yapısının oluşumu ve gerekse kanser gelişiminde etkili olması bakımından önemlidir. Ayrıca larinks kanserlerinin sınıflandırılması da bu

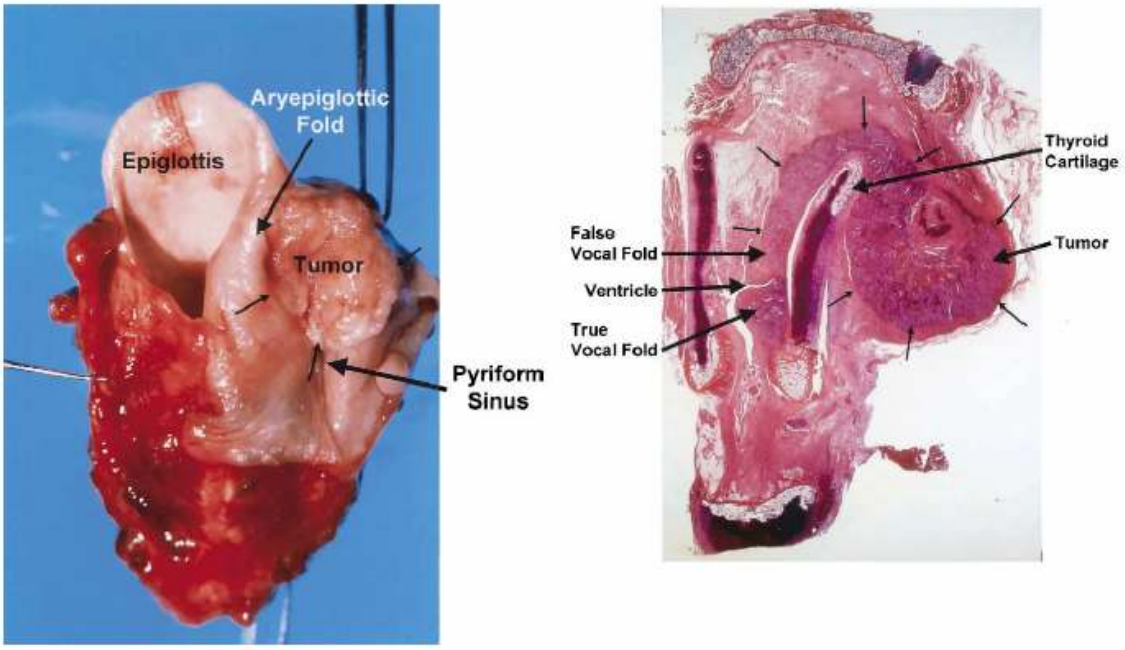
boşluklardaki lokalizasyona göre yapılmaktadır (Fleming ve ark 1998, Merati ve Rieder 2003, Kaya 2002).

2.2. Larinks Kanseri

Larinks kanserlerinin Dünya'da ve Avrupa'da baş boyun kanserleri içerisinde en sık görülen kanser tiplerinden biri olduğu bildirilmiştir (Shaha ve ark 1997, Licitra ve ark 2003, Filho 2004, Jaiswal ve ark 2004). Baş ve boyun bölgesinde görülen kanserlerin yaklaşık %25'inin larinks kanseri olduğu, organizmadaki tüm malign tümörlerin %2-3'ünü oluşturduğu belirtilmiştir (Shaha ve ark 1997, Rizos ve ark 1999, Öktem ve ark 2000, Kaya 2002, Monterio ve ark 2004, Ünal ve ark 2004).

Larinks kanserleri; baş ve boyun bölgesinde görülen, laringeal hücrelerin anormal çoğalmasıyla karakterize bir hastalık olduğu ve larinks kanserlerinin bu bölgede bulunan yassı epitel hücrelerin farklı derecelerde histolojik olarak farklılaşması ile ortaya çıktığı bilinmektedir (Kaya 2002, Filho 2004, Jaiswal ve ark 2004). Larinks kanserlerinin %98'i yassı epitel karsinoma, %1-2'si ise yassı epitel dışı tümörleri olarak bildirilmektedir (Öktem ve ark 2000, Sasaki ve Jassin 2001, Kaya 2002, Filho 2004, Jaiswal ve ark 2004).

Larinks kanser prognozu anatomik yayılım, histolojik farklılaşma ve tümör lokalizasyonuna göre değerlendirilmektedir (Fleming ve ark 1998, Licitra ve ark 2003, Vielba ve ark 2003).



Şekil 2.3. Larinks kanserlerinin görüntüleri (Sasaki ve Jassin 2001)

2.3. Larinks Kanserinin Yayılması

Larinks kanserlerinin lokalizasyonu anatomik olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3.1. Supraglottik kanserler

Bu bölge tümörleri başlıca üç alt bölgeye ayrılarak incelenmiştir (Şekil 2.6.).

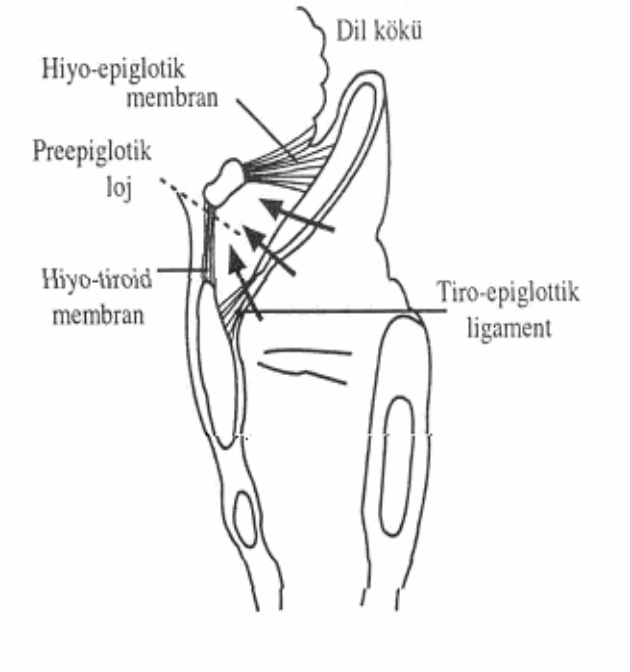
1. *Vestibulum kanserleri:* En sık görülen larinks kanserleri olup hyoid altı epiglotun larengeal yüzü tümörlerin vestibulum kanserleri olduğu belirtilmiştir.

2. *Ventriküler band kanserleri:* Tek başına daha nadir olup bu kanserler bandın serbest kenarından doğmuştur.

3. *Ventrikül kanserleri:* Çok latent seyredip her 3 seviyenin de tutulmasıyla çok geç ortaya çıkmaktadırlar.

Supraglottik kanserlerin en sık görülen yayılma bölgesi preepiglottik alan olup (Şekil 2.4.) bu alana yayılım üç şekilde olmuştur.

1. Epiglottaki deliklerden doğrudan,
2. Epiglot kıkırdağın parçalanmasıyla,
3. Tiroepiglottik ligamentin parçalanmasıyla (Ömür 1992, Licitra ve ark 2003).



Şekil 2.4. Preepiglottik bölge. Hiyoepiglottik membran, hiyoid, tirohiyoid, tirohiyoid membran, tiroid, arkada epiglot petiolusu yer alır (Ömür 1992).

2.3.2. Glottik kanserler

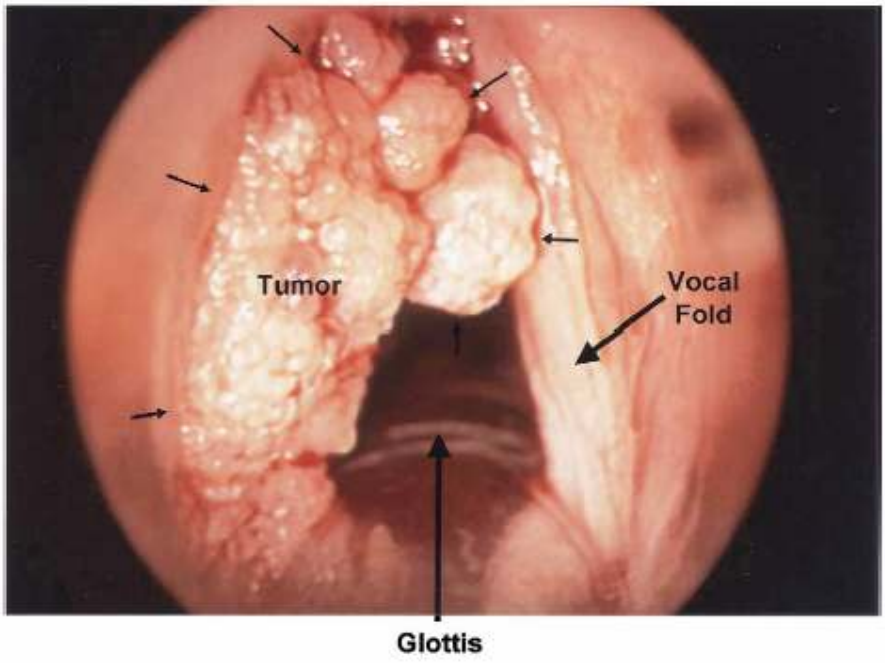
Bu kanserler başlıca vokal kord ve ön komisür kanserleri olup bunlardan vokal kord kanserleri iyi prognozlu, ön komisür kanserleri ise kötü prognozlu olduğu bilinmektedir (Şekil 2.5.).

1. *Vokal kord kanseri:* Genellikle serbest kenardan, kimi zaman da alt yüzden başlamıştır. Yayılması ise karşı vokal korda ön komisür üzerinden yüzeysel bir şekilde olduğu belirtilmiştir.

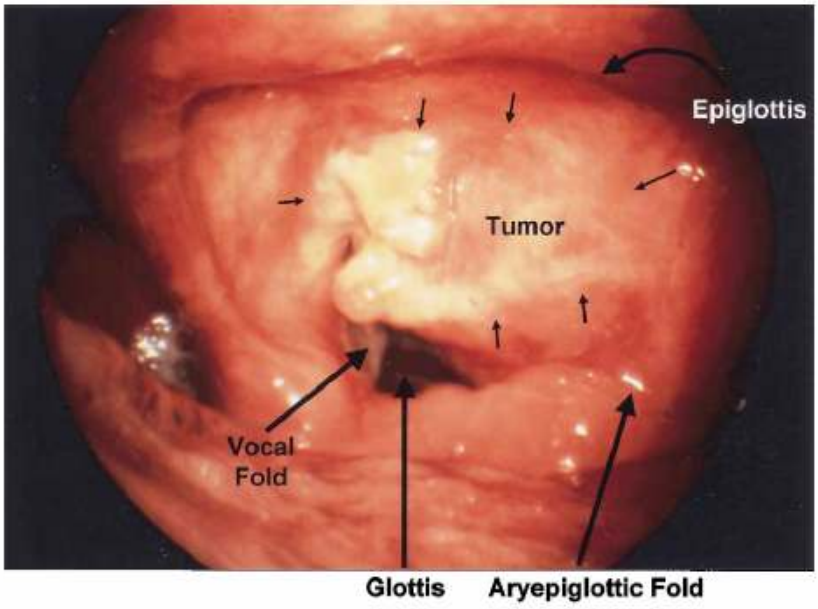
2. *Ön komisür kanserleri:* Ön komisür ile yüzeysel olarak ön komisüre yayılmış kanserler birbirine karıştırılmaması gerekir. Ön komisür kanserlerinin prognozu kötü olup süratle tiroid kıkırdağa doğru yayılmaktadır (Ömür 1992, Licitra ve ark 2003).

2.3.3. Subglottik kanserler

Bunlar, vokal kordun alt yüzünün kanserleri ile krikoid kıkırdağın iç yüzü kanserlerini oluşturur ve ender görülür. Subglottik bölge yukarıda konus elastikus ile sınırlı olup subglottik tümörlerin %75'i her iki tarafı da tutmaktadır. Olguların %75'inde krikotiroid membran parçalanarak prelarengeal duvar ve tiroid bez invazyona uğramıştır. Krikoid ve tiroid kıkırdağa yayılma oranı %50'nin üzerinde olup aritenoid kıkırdak invazyonundan daha sık görüldüğü belirtilmiştir (Ömür 1992).



Şekil.2.5. Vokal kord da bulunan tümör görüntüsü (Sasaki ve Jassin 2001)



Şekil.2.6. Supraglottik tümör görüntüsü (Sasaki ve Jassin 2001)

2.4. Larinks Kanserinin Sınıflandırılması

Larinks kanserinin sınıflandırılmasında TNM (tümör büyüklüğü, nodüler metastaz ve uzak metastaz) sistemi kullanılmaktadır. Bu sınıflamada; bir bölgedeki en küçük tümörden başlayıp tümörleri büyüklüklerine göre, T_1'den T_4'e kadar sınıflanır. Tümörün sayısı, büyüklüğü ve yerine göre boyuna metastatik nodüller 'N' ile belirlenir ve N_0'dan N_3'e kadar sınıflanmaktadır. Tümörün uzak metastazları ise son evrelerde ortaya çıkıp 'M' ile gösterilmektedir (Ömür 1992, Fleming ve ark 1998, Goldman ve Ausiello 2004).

Tedavi için klinik TNM sınıflandırması çok önemlidir ve TNM sistemi, cerrahların ve onkologların birbirlerini anlayabilmeleri için ortak bir dildir. Günümüzde, çeşitli TNM sistemleri arasında en çok kabul görenleri Amerika' da ortaya konulan AJC (The American Joint Committee)'nin sistemi ile tüm dünya ülkelerinin ortaklaşa hazırladıkları UJCC (Universal Joint Committe on Cancer)'nin TNM sistemi olduğu belirtilmiştir (Ömür 1992, Fleming ve ark 1998, Goldman ve Ausiello 2004). TNM sisteminin yetersiz yanı sadece anatomik bir sınıflandırma sistemi olmasıdır.

2.5. Larinks Kanserinin Nedenleri

2.5.1. Yaş ve cinsiyet

Larinks kanseri görülme sıklığının yaşla birilikte arttığı, özellikle 50'li ve 70'li yaşlarda oldukça fazla görüldüğü belirtilmiştir (Licitra ve ark 2003, Filho 2004).

Erkeklerde kadınlara göre daha yaygın olduğu, yaklaşık 7'de 1 oranında erkeklerde sık gözlendiği bildirilmiştir (Szyfter ve ark 1999, Filho 2004).

2.5.2. Sigara

Sigara larinks, akciğer ve özafagus başı kanserinde en önemli etiyolojik etken olduğu bildirilmiştir (Öktem ve ark 2000, Kaya 2002). Sigaranın birçok mutajen ve toksik madde içermesi yanısıra neoplastik transformasyona öncülük edebilecek irritan bir etkisinin olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar larinks kanserli hastaların %97'sinin sigara içtiği belirtilmiştir (Szyfter ve ark 1999, Kaya 2002, Licitra ve ark 2003, Filho 2004, Stefani ve ark 2004). Bununla birlikte ağır sigara içenlerde hafif sigara içenlere göre 2,5 kat daha fazla kanser riski arttığı ve sigaraya 15 yaşından sonra başlayanlarda riskin daha çok olduğu belirtilmiştir. Sigaranın gaz ve partikül komponentlerinde benzopiren ve N-nitroso bileşikleri fazla miktarda bulunduğu ve filtresiz sigaranın ise daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir. Buna karşılık sigara içmeyenlerde larinks kanserinin ortaya çıkması %5'den az olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan sigara miktarı ve içme süresinin önemli olduğu ve sigara ile birlikte alkol alımının kanser insidansını arttırdığı belirtilmiştir (Kaya 2002, Licitra ve ark 2003, Filho 2004, Ünal ve ark 2004).

2.5.3. Alkol

Alkol kullanımının larinks kanserlerinin etiyolojisinde rol aldığı ve beslenme bozukluklarına yol açarak kanserojenik etki yaptığı bilinmektedir. Alkol alımı; supraglottik ve hipofarenks kanserlerinde daha fazla risk faktörü olmakta, üst solunum ve sindirim yolunda kanser riskini arttırmaktadır (Öktem ve ark 2000, McWilliams ve ark 2000, Kaya 2002, Filho 2004).

2.5.4. Meslek

Mutajenik ve toksik sanayi maddelerinin üretildiği ortamlarda risk artmaktadır. Asit ve izopropil alkol üretiminde çalışanlarda, marangozlarda, dietilsülfat kullanarak etil alkol üretimi ile uğraşanlarda, berilyum, biklorometil, kaynak dumanı, deri sanayinde çalışanlarda larenks kanseri insidansı fazla olduğu belirtilmiştir (Szyfter ve ark 1999, Kaya 2002, Filho 2004).

2.5.5. Kronik larenjit

Yaygın keratinizasyon, yassı epitel metaplazisi, ödem, kronik enflamasyonların maligniteye dönüşebildiği bildirilmiştir (Kaya 2002).

2.5.6. Radyasyon

Radyasyonun karsinojenik etkisinin olduğu, boyun ve çevresine herhangi bir nedenle radyoterapi yapılanlarda larinks kanserinin gelişme riskinin yüksek olduğu ayrıca kullanılan ışınların DNA üzerine de etkili olduğu bilinmektedir (Kaya 2002).

2.5.7. İmmünolojik etkenler

Sistemik veya lokal immün mekanizmaların bozulması kanser gelişiminde rol alabilmektedir. Hücresel ve hümoral immünitenin ayrı ayrı öneminin olduğu ve tümöre karşı hücresel immünite esas olarak T hücre sisteminin fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Kanser, normal hücre büyümesi ve bölünmesini kontrol eden hücresel mekanizmaların çeşitli etkenler tarafından ortadan kaldırılmasıyla oluşmaktadır. Normalde hücre büyümesi ve çoğalması; intrasellüler, ekstrasellüler uyaranlar ve bu uyaranların biyokimyasal yollarda kontrol edilmesidir. Biyokimyasal kontrol büyümeyi düzenleyen genlerin yapısı, viral enfeksiyonlar, artmış büyüme faktörleri veya bunların kombinasyonları sonucu bozulmaktadır (Kaya 2002).

2.6. Hücre Döngüsü ve DNA'nın Replikasyonu

2.6.1. Hücre döngüsü

Hücre döngüsü, bir takım makromoleküler olayların içinde yer aldığı hücre bölünmesini ve sonuçta iki yeni birbirinin aynısı olan hücrelerin oluştuğu olaylar zinciri olarak tarif edilmiştir. Ökaryotik organizmaların normal gelişimi için hücre siklusunun kontrolü kritik önem taşımaktadır (Qu ve ark 2003, Lodish 2004). Hücre döngüsü çok dikkatli kontrol edilmektedir. Normal olarak yetişkin vücudunda hücre ölümü (programlı hücre ölümü veya apoptozis) ile hücre çoğalması (hücre bölünmesi) kararlı durumu korumak için dengelenmiştir. Bu dengenin, hücre döngüsü kontrolünün kaybı ile bozulması tümör oluşumuna sebep olabildiği gibi yüksek derecede organize olmuş ve kontrol edilen hücre döngüsünün hücre bölünmesinden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Sıkı kontrol ve zamanlama DNA'nın S fazında (hatasız olarak) bir kez replike olmasını ve homolog kromozomların M fazında eşit olarak dağıtılmasını sağlamaktadır (Sandal 2002). Bu işlemlerin tam olarak yerine getirilmesi için pek çok molekül ve sinyal yollarının işe karıştığı ve hücre döngüsünün kontrol noktaları adını aldığı belirtilmiştir. Hücre döngüsü iki işlemin döngüsel değişimi olup bunların DNA'nın sentezlendiği replikasyon işlemi (S=sentez fazı) ve hücre içeriğinin eşit olarak yeni hücrelere dağıtıldığı bölünme

(yarılama) işlemi olduğu (M=mitoz fazı) ve bu iki işlem arasındaki işlemler ise aralık periyodu olarak (G=gap fazı) adlandırılmaktadır. DNA'nın replikasyonu, canlılığın devamı için temel mekanizmalardan birisidir (Sandal 2002, Qu ve ark 2003, Wu ve ark 2005).

2.6.2. Replikasyon mekanizması

Replikasyon DNA zincirinin birbirinin kopyası olan iki zincirin oluşturulması işlemidir. Prokaryot ve ökaryotlarda replikasyonun başlayabilmesi için DNA çift sarmalının birbirinden ayrıldığı özel nükleotid dizileri vardır. DNA replikasyonunun başladığı spesifik noktalara ise replikasyon orijini denilmekte ve replikasyon orijinlerinde replikasyon için iki DNA ipliğinin birbirinden ayrılmasıyla o bölgede bir genişleme olmakta ve bu bölgelere de replikasyon çatalı denilmektedir. DNA çift sarmalında hidrojen bağlarını açan enzimler helikazlardır. Helikaz iki ipliği birbirinden ayırmaktadır. İlerleyen helikazların gerisinde birbirinden ayrılmış olan DNA ipliklerinin tekrar çift sarmal yapması için SSB (Single Strand Binding protein (tek zincire bağlanabilen proteinler)) denen proteinler her bir DNA ipliğine bağlanır (Watson ve ark 2004, Albert 2004).

Replikasyonu katalizleyen esas enzim olan DNA polimerazlar doğrudan replikasyonu başlatmadığı için primazlar RNA primerleri yapar ve DNA polimerazlar senteze başlar. Sentez iki zincirde yapılır. Biri kesintili diğeri ise kesintisiz olarak sentezlenir. Kesintisiz zincirde RNA primerinin replikasyonun başlangıcında bir kez sentezlendiği ve kesintili zincirde ise yeni ipliğin sentezi Okazaki parçacıkları şeklinde kesintili sentezlendiği için her Okazaki parçacığı sentezinin başlayabilmesi için RNA primerine ihtiyaç olur. Her Okazaki parçasının sentezinde ise bir önceki RNA primerine ulaşıldığında durur. RNA primerleri daha sonra *DNA polimeraz I* enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesiyle uzaklaştırılır. Oluşan boşluk aynı polimerazın 5'-3' polimeraz aktivitesiyle deoksiribonükleotidlerle doldurulur ve *DNA ligaz* ise son bağlantıyı yapar (Watson ve ark 2004, Albert 2004). DNA replikasyonunda ve tamirinde görev yapan *DNA ligaz*lar çentiği iki nükleotid arasında fosfodiester bağı kurarak kapatarak gerçekleştirir (Timson ve ark 2000, Cherepanov ve Vries 2002, Öztaş ve ark 2005).

DNA replikasyonunda sentez yapılırken hasarlı DNA'da DNA polimerazın önce lezyonda durakladığı ve sonra yeni sentezlenen zincir boyunca bir boşluk bırakarak onun üzerinden atladığı, tek zincir boşluklarına bir yanıt olarak ise RecA proteini rekombinasyonel bir değiş-tokuş işlemi yürüterek başlangıçta hasarsız komplementer zincirde bulunan bir segmenti (parçayı) bu boşluğa sokup onu tamamladığı, bu işlemin hasarsız komplementer zincirde bir boşluk bıraktığı ve bu boşluğun daha sonra replikasyon

ilerlerken onarım sentezince doldurulduğu belirtilmiştir (Gennery ve Jeggo 2001, Wood ve ark 2001, Wu ve ark 2005).

2.7. DNA'nın Yapısındaki Değişiklikler (Polimorfizm ve Mutasyon)

İnsanlar arasındaki fenotipik farklılıklar DNA'nın yapısındaki değişikliklere veya çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkar. İki farklı bireyin genom yapısı yaklaşık %99.9 oranında birbirinin aynıdır. Bu DNA dizisindeki küçük farklılıklar fertler arasındaki fenotipik değişikliklere sebep olur. Buna bağlı olarak genomdaki bu değişiklikler bazen çok büyük farklılıklara sebep olur ve bazen de etkisi görülmeyebilir. Bu değişikliklerin bazıları hastalıklara yol açabildiği bilinmektedir. Genlerin gerek intron bölgelerinde gerekse ekzon bölgelerinde nükleotid seviyede ve tekrarlayan dizilerde çeşitli farklılıklar görülmüştür. Bu durum bireyler arası farklılıkların ortaya çıkmasına sebep olurken aynı zamanda hastalıkların ve çeşitli kanser tiplerinin oluşumunda etkili olabildiği bilinmektedir (Housman 1995, Lewin 2004, Nussbaum ve ark 2005, Öztaş ve ark 2005).

DNA yapısında bulunan değişiklikler polimorfizm veya mutasyon olarak adlandırılır. Toplumda görülme oranının %1'in altında ve bir patolojik etkisi varsa buna mutasyon denir. Genetik yapıdaki değişiklik populasyonda %1'in üzerinde görülüyor ve hastalıkla direk sonuçlanmıyorsa polimorfizm olarak değerlendirilmektedir (Gelehrter ve ark 1998, Nussbaum ve ark 2005).

Polimorfizmler bütün insan genetiği araştırmalarında anahtar teşkil etmektedir. Polimorfik yapılar genetik markırlar olarakta kullanılır ve genetik markırlar tıbbi genetikte devasa kullanıma sahiptir. Bunlar genetik hastalıkların tespiti, genetik hastalıkların taşıyıcılarının araştırılması, kansere yatkınlık, kalp hastalıkları, diabet ve tedaviye cevap gibi bireylerin yatkınlıklarının ve direncinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Housman 1995, Gelehrter ve ark 1998, Nussbaum ve ark 2005).

Mutasyon ise nükleotid dizisindeki herhangi bir değişiklik veya DNA'nın yeniden düzenlenmesi olarak tarif edilmektedir. Mutasyonların farklı kaynaklarda farklı şekillerde sınıflandırılsa da temel olarak DNA seviyesinde (nokta), kromozom seviyesinde olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Nussbaum ve ark 2005).

2.8. DNA'nın Replikasyonu ve Mutasyonlar ile İlişki

Genetik materyalin nesilden nesile hatasız olarak aktarılması mutasyon oranının düşük olmasına bağlıdır. DNA replikasyonu mekanizmasında ki en temel kuralın kopyalama yapılırken kalıp DNA'nın aynen korunmasıdır. Mutasyonların iki önemli kaynağının biri DNA replikasyonundaki hatalar ve diğerleri ise genetik materyalin maruz kaldığı fiziksel ve kimyasal ajanların oluşturduğu hasarlardır (Watson ve ark 2004). DNA polimerazların çalışması ve diğer enzimlerin işlevlerini tam olarak yerine getirmesine bağlıdır. Ayrıca DNA sentezi sırasında veya DNA hasarında son çentiklerin kapatılmasında görevli olan *DNA ligaz*ların görevlerini tam olarak yerine getirmelerine bağlıdır. Bunların dışında DNA replikasyonunun doğru işlemesi için gerekli kontrol sistemlerinin de fonksiyonel ve hatasız çalışması gerekmektedir. DNA sentezi sırasında meydana gelen hatalar ve değişiklikler yakalanamıyorsa, DNA tamir mekanizmaları ve enzimler dolayısıyla bunları kodlayan genler işin içerisine girmektedir. Replikasyonda meydana gelen hataların fark edilip düzeltilmesi zorunludur. Bu yerine getirilmezse canlı organizma ya hayatiyetini kaybetmekte ya da çok ağır genetik anomaliler ortaya çıkmaktadır (Watson ve ark 2004, Sakiyama ve ark 2005).

Replikasyon sırasında DNA'da oluşan hasarın iki şekilde sonuçlandığı bilinmektedir. Bunlar; kalıcı değişiklikler yani bir genin veya bu gene ait regülatör bölgesinin değiştiği mutasyonlar ve diğeri ise DNA replikasyon veya transkripsiyonunu engelleyen bazı kimyasal değişiklikler olduğu belirtilmiştir. İlk değişiklikler sonraki hücrelere aktarılabilmekte, ikinci değişiklikler ise o hücrenin ölümü ile sonlanmaktadır. Hücrelerin bu değişikliklere DNA tamir mekanizmaları ile cevap verdikleri ve bu mekanizmalardan birincisinde genomun baştan sona taranması, ikincisinde ise lezyonların belirlenip uygun şekilde tamir edilmesi gerekmektedir (Gennery ve Jeggo 2000, Sakiyama ve ark 2005).

2.9. Mutasyonlar ve DNA Tamir Mekanizmaları Arasındaki İlişki

DNA'da her gün ısı enerjisi, metabolik ürünler ve hatalar ile oluşan binlerce rasgele değişime rağmen ortalama bir hücrede yılda sadece birkaç kalıcı değişim (mutasyon) oluşur. DNA'daki baz değişimlerinin binde birinden azı bir mutasyona yol açmakta, geri kalanların ise DNA onarımı ile belirgin şekilde giderildiği belirtilmektedir (Alberts 2004).

DNA hasarı radyasyon ve kimyasallar gibi çevredeki (eksojen) ajanların etkisi sonucu ortaya çıkar. Aynı zamanda hücresel metabolizma ürünlerinin etkisiyle (endojen) DNA hasar verici ajanlar da etkili olduğu bilinmektedir. Endojen hasar; DNA replikasyonu esnasında ve nükleotidlerin depürinasyon ve deaminasyon gibi spontan olayları sonrasında meydana gelebilmektedir (Gennery ve Jeggo 2000, Kanaar ve ark 1998). DNA'da meydana gelen hasarlar zincir kırıkları, bir bazın hasarı veya modifikasyonu, dimer oluşumu veya komşu karşı bazlar arasındaki karşılıklı bağlantılar ve fosfodiester omurganın hasarı olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Günümüzde DNA tamir sistemlerindeki çok sayıda gen rol aldığı gösterilmiştir. Bazı genler DNA hasarlarını by-pass eden DNA polimerazları kodlarken, bu genlerden bazıları ise baz ekzisyon tamiri (BER=base excision repair), nükleotid ekzisyon tamiri (NER= nucleotid excision repair), yanlış eşleşme tamiri (MMR=miss match repair), DNA kırık tamiri (DSBR=double strand breaks repair) veya diğer tamir yollarında bulunan elemanları kodlamaktadır (Sakiyama ve ark 2005).

Her biri değişik enzimler tarafından katalizlenen çeşitli onarım mekanizmaları genetik bilginin iki kopyasının DNA çifte sarmalının her bir sarmalında bir tane bulunmasını gerektirir. Bir sarmaldaki dizilim değişecek olursa bilgi geri dönülmez olarak kaybedilmez. Çünkü değişen sarmalın komplementleri diğer koldaki nükleotid dizisinde bulunmaktadır. DNA onarım sistemlerinde izlenen temel mekanizma şu adımlardan oluşmuştur:

1. Hasarlı DNA sarmalının değişmiş kısmı *DNA onarım nükleazları* adı verilen enzimler tarafından belirlenir ve sarmaldan çıkarılır. Bu enzimler hasarlı nükleotidleri DNA'nın kalanına bağlayan fosfodiester bağlarını hidrolize ederek DNA sarmalının bu bölgesinde küçük bir boşluk oluşturur.

2. Diğer bir enzim olan ***DNA polimeraz*****,** kesilmiş DNA sarmalının 3'-OH ucuna bağlanır ve "iyi" (*kalıp*) sarmalda bulunan kodun bütünleyici kopyasını çıkararak boşluğu doldurur.

3. DNA polimeraz boşluğu doldurduğunda ortaya çıkan kesinti veya "çentik", ***DNA ligaz*** adı verilen üçüncü bir enzim tarafından kapatılır ve böylece onarım süreci tamamlanır.

DNA polimeraz ve *DNA ligaz*'ın her ikisi hem DNA onarımında hemde DNA replikasyonunda görevlidir (Gennery ve Jeggo 2000, Alberts 2004, Sakiyama ve ark 2005).

2.10. *DNA Ligaz*, Yapı, Sınıflandırma ve Fonksiyonları

*DNA ligaz*lar, DNA zincir kırıklarının DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamiri esnasında birleştirilmesinde rol alan önemli enzimlerdir (Tomkinson ve ark 1991, Mossi ve ark 1998, Doherty ve Suh 2000, Wilkinson ve ark 2003). Yüksek organizmalarda farklı tipte *DNA ligaz*lar tespit edilmiştir (Gennery ve Jeggo 2000, Wilkinson ve ark 2003). *DNA ligaz*lar iki iplikli DNA'da tek zincir kırıklarındaki fosfodiester bağların oluşumunu katalizlemektedir (Tomkinson ve Mackey 1998, Mossi ve ark 1998, Gennery ve Jeggo 2000, Timson ve ark 2000). Tüm organizmalarda bulunmalarına rağmen amino asit dizileri, moleküler büyüklük ve özellikleri bakımından organizmalar arasında farklılıklar göstermektedirler. Bu enzimler, kofaktör özelliklerine göre aktivasyon için NAD gerektiren ve ATP gerektiren olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Ökaryotik organizmalardaki *DNA ligaz*lar ATP gerektiren enzimlerdir (Tomkinson ve Mackey 1998, Timson ve ark 2000, Liu ve ark 2004, Martin ve MacNeill 2002). NAD gerektiren *DNA ligaz*lar ise sadece prokaryotik organizmalarda gözlenmiştir (Doherty ve Suh 2000, Martin ve MacNeill 2002, Wilkinson ve ark 2005).

Memeli doku ve hücrelerinde 5 farklı *DNA ligaz* enzimi bulunmuştur ve *DNA ligaz*ları kodlayan 3 farklı *DNA ligaz* geni (*lig1, lig3, lig4*) tespit edilmiştir (Tomkinson ve Mackey 1998, Timson ve ark 2000). Yapılan çalışmalarda *DNA ligaz*ların DNA metabolizmasında farklı rollere sahip olduğu gösterilmiştir (Tomkinson ve Mackey 1998, Mossi ve ark 1998, Timson ve ark 2000,). Ligazlar DNA tamir ve replikasyon yollarında farklı fonksiyonlar için özelleşmişlerdir. *DNA ligaz*ların büyüklük ve nükleotid dizilerinde geniş farklılıklar bulunmuştur. *DNA ligaz* enziminin merkez bölgesi nicked DNA'nın kapatılmasında katalitik fonksiyon göstermesine rağmen ek diziler ligazların farklı fonksiyonları, örneğin nükleusun farklı bölgelerini hedef almaları veya farklı proteinler ile etkileşimlere aracılık etmeleri gibi görevleri yerine getirmektedirler (Tomkinson ve Mackey 1998, Timson ve ark 2000). Tablo 2.1.'de *DNA ligaz* enzimlerinin kodlandığı genler, ilişkili olduğu yardımcı proteinler ve görevleri özetlenmiştir.

Tablo 2.1. *DNA ligaz* enzimlerinin genel özellikleri (Tomkinson ve Mackey 1998, Mossi ve ark 1998, Timson ve ark 2000,).

	Gen	Kromozom bölgesi	Moleküler ağırlık (kDa)	İlgili proteinler	Hücresel fonksiyon
Ligaz I	*Lig1*	19q13.2-13.3	125	PCNA, DNA polimeraz β	Replikasyon, Okazaki fragmentlerinin birleştirilmesi, BER, NER
LigazII	*Lig3*	17q11.2-12	70	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Ligaz III	*Lig3*	17q11.2-12	103	XRCC1	BER, mayotik rekombinasyon, DNA tamiri
Mitokondriyal ligaz	*Lig3*	17q11.2–12	100	-	Tamir
Ligaz IV	*Lig4*	13q33–34	96	XRCC4	V(D)J rekombinasyon
Ligaz V	Bilinmiyor		44	REP1	-

2.10.1. *DNA ligaz I*

DNA ligaz I enzimi 125 kDa molekül ağırlığındadır ve replikasyon sırasında iş gören en önemli enzimlerdendir (Tomkinson ve Mackey 1998, Gennery ve Jeggo 2000, Timson ve ark 2000). *DNA ligaz*ın spesifik olarak okazaki fragmentlerinin birleştirilmesinde etkili olduğu ve replikasyon için başka proteinlerle etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir (Tomkinson ve ark 1991, Tomkinson ve Mackey 1998).

DNA ligaz I aynı zamanda baz ekzisyon tamiri (BER) için de gerekli olup bu tamir mekanizmasında hasarlı baz DNA ikili sarmalından uzaklaştırılır ve abazik bir bölge oluşturulur. Sonra fosfodiester omurgada bir boşluk oluşturularak yaklaşık 30 bp'lık kısım

çıkarılır. Daha sonra bu bölge diğer hasar görmemiş iplik kalıp olarak kullanılarak tamir edilir. Tekrar sentezlenen ve doldurulan boşluk *DNA ligaz* ile iki DNA parçası arasında fosfodiester bağı oluşturulur. Ligaz I'in BER'den sorumlu polimeraz olan *DNA polimeraz* β ile direkt olarak etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir (Petrini ve ark 1995, Timson ve ark 2000).

2.10.2. *DNA ligaz II ve III*

DNA ligaz I'in keşfinden sonra moleküler çalışmalar ile *DNA ligaz II ve III* tanımlanmıştır. Bu iki enzim oldukça büyük moleküler ağırlığa sahiptir. *Ligaz II ve III* 160'dan fazla rezidü ile birbirine mükemmel bir eşleşme göstermiştir ve bu durum *ligaz II*'nin aslında *ligaz III*'ün bir parçası olduğu fikrini vermiştir. Memeli *ligIII* geni tarafından transkribe edilen mRNA'nın alternatif splicing işlemleri ile *ligaz IIIα* (103 kDa) ve *ligaz IIIβ* (96 kDa) olmak üzere iki ürünün olduğu belirlenmiştir. *Lig IIIα* hemen her dokuda eşit oranda bulunurken, *ligaz IIIβ* sadece testislerde olduğu görülmüş ve mayotik profaz esnasındaki homolog rekombinasyonda önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır (Tomkinson ve ark 1991, Timson ve ark 2000).

Memeli mitokondrilerinde yeni bir *DNA ligaz* tespit edilmiştir. Bu enzim mtDNA tamir yollarında fonksiyon göstermektedir. Enzim ve immunoloji çalışmaları bu enzimin *ligaz III*'e benzediğini göstermiştir. mtDNA'da çalışan bu enzimi kodlayan genin alternatif başlama bölgesi bulunduğu bilinmekle birlikte yapı ve mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Timson ve ark 2000).

2.10.3. *DNA ligaz IV*

DNA ligaz IV enzimi 96 kDa molekül ağırlığındadır. *DNA ligaz IV* enziminin ekzisyon tamir mekanizmaları, tek zincir kırıkları ve bazların kovalent değişimlerinin düzeltilmesi işlemlerinde görev aldığı bildirilmiştir (Timson ve ark 2000).

2.10.4. *DNA ligaz V*

DNA ligaz V yeni bulunan bir enzim olup yaklaşık 44 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu ve iki zincir kırıklarının kapatılmasında aktivite gösterdiği, bu enzim aktivitesinin REP1 (rejoin enhancement protein) tarafından stimule edildiği belirtilmiştir (Timson ve ark 2000).

2.11. *DNA Ligaz I* Geni

DNA ligaz I enzimini kodlayan gen, prolifere olan memeli hücrelerindeki major *DNA ligaz* aktivitesini gösteren, insan kromozomu 19q13.2-13.3 üzerinde haritalanmıştır. Bu genin 28 ekzondan oluştuğu ve 53 kb büyüklüğünde olduğu, 5' ucu bölgesi bir TATA kutusu ile sınırlandığı ve GC bakımından zengin olduğu belirtilmiştir. Diğer DNA replikasyon enzimlerini kodlayan genlerin promotorlarında olduğu gibi 5' ucu bölgesi pek çok tanıma elementi içerdiği ve bunların çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına aracılık ettiği belirtilmiştir. Bu genin ekspresyonunun artması büyümeye cevapta rol oynamıştır (Noguiez ve ark 1992, Livak ve ark 1998).

2.12. Mutasyonların ve Polimorfizmlerin Belirlenmesinde PZR'nin Rolü

Polimeraz zincir reaksiyonu PZR ("Polymerase Chain Reaction", PCR), spesifik bir DNA parçasının *in vitro* şartlarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. 1980'li yılların ortalarında geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda ve birçok hastalığın DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde PZR, allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayini) gibi tıbbın birçok alanında, tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), hayvancılıkta ve endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Arı 2004).

PZR çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Bu PZR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması ("annealing") ve uzaması ("extension") olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçalarının milyonlarca kopyası yapılır. Her PZR döngüsünde istenilen DNA bölgesi geometrik artışla çoğaltılır. Bu şekilde genomda istenilen bir bölgenin milyarlarca kopyası elde edilir. Çoğaltılan DNA bölgesi bu bölgedeki genetik değişiklikleri analiz etme işlemlerinde kullanılır (Housman 1995, Arı 2004, Nussbaum ve ark 2005).

PZR ile elde edilen spesifik DNA bölgelerinin belirli bölgelerindeki değişiklikleri tespit etmek için restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılır (Sarıkaya 2004).

Restriksiyon enzimleri DNA'yı spesifik bir bölgeden keser. Bu kesim bölgesindeki nükleotid değişimi kesimi engeller veya yeni bir enzimin tanıdığı kesim bölgesi oluşturabilir. Böylece; genomik DNA'da oluşan dizi değişiklikleri restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerini değiştirir ve kesim sonucu oluşan parçaların boyutları değişir. Bu yöntem ile DNA seviyesindeki değişiklikler hızlı ve ucuz bir şekilde belirlenmekte ve moleküler genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Housman 1995, Sarıkaya 2004, Nussbaum ve ark 2005).

2.13. Kanserin Genetik Temeli

Kanser oluşumunda, gelişiminde, prognozunda ve metastazında birçok gen işe karışmaktadır. Bu genler, farklı sınıflandırmalar yapılmasına karşılık temel olarak şu şekilde sınıflandırılır;

1. Onkogenler
2. Tümör supresör genler
3. DNA tamir mekanizması genleri
4. Apoptozis genleri
5. İmmun sistemden sorumlu bazı genler
6. Metastaz genleridir.

Bu genlerin ürünleri hücre döngüsünün bir aşamasında etkili olup direk hücre döngüsü ile ilişkilidir.

Bu genlerden hücre döngüsünde rol alan ve DNA tamirinde etkili olan DNA tamir mekanizması genleri vardır. Bu genlerin her biri faklı tamir mekanizmaları ile çalışırlar.

2.13.1. Larinks kanserinin genetik temeli

Larinks kanserlerinin oluşumunda genetik ve çevresel faktörlerin beraber etkin olduğu bilinmektedir. Larinks kanserli hastaların ortalama %50'sinde ailesel yatkınlık bulunmuştur (Kaya 2002). Kanser hastalarının birinci derece yakınlarında kanser görülme riskinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Filho 2004). Karsinojen metabolizma enzimlerini, DNA tamir sistemleri ile hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki değişikliklerin larinks kanseri riskini arttırabileceği belirtilmiştir (Blons ve Laurent-Puig 2003, Filho 2004, Monteiro ve ark 2004). Brezilya'da yapılan bir çalışmada, baş ve boyun kanserinin gelişiminde ailesel kalıtım incelendiğinde, baş ve boyun kanserine sahip birinci

dereceden akrabaları olanların kansere yakalanma riskinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak larinks kanserinin genetik temelini çevresel faktörlerden ayırt etmenin zor olduğu görülmüştür. Ailesel kanserlerin açıklanmasında, hem genetik yatkınlığın hem de aile bireylerinin alkol ve sigara kullanımı, beslenme ve meslek gibi çevresel etkenlerin beraber incelenmesi ile ortaya konabileceği belirtilmiştir (Filho 2004). Türkiye'deki sigara, alkol kullanımının larinks ve akciğer kanserlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise larinks kanserli hastalarda sigara kullanımının kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir. Özellikle supraglottik kanserlerinde en yüksek riskin olduğu görülmüş ve alkol kullanımı ile ilgili olarak ise Türkiye'de az kullanıldığı belirtilmiştir (Döşemeci ve ark 1997).

Genetik değişikliklerden polimorfik yapıların larinks kanseri riski üzerine etkisini belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunluğu koruyucu enzim sistemlerinden olan sitokrom P–450 (CYP) ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi metabolizma enzimlerini kodlayan genlerin genotiplerinin belirlenmesine yöneliktir (McWilliams ve ark 2000, Licitra ve ark 2003, Filho 2004, Ünal ve ark 2004, Gajecka ve ark 2005). Bununla birlikte DNA tamir sistemi genlerindeki polimorfizmlerinin etkiside araştırılmıştır (Filho 2004, Gajecka ve ark 2005). Çalışmalar bazı genlerin polimorfizmlerin larinks kanseri riskini arttırırken, bazılarında ise alkol ve sigara kullanımı ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Szyfter ve ark 1999, Filho 2004).

DNA ligaz I ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bu gende meydana gelen bozukluğun immün yetmezlik ile sonuçlandığı öne sürülmüş fakat DNA replikasyonunda görev alan helikazlar gibi enzimlerinde etkili olabileceği görülmüştür (Prigent ve ark 1994). *LIG I* geninde; 6. ekzonundaki A-C baz değişikliği ve GT tekrar polimorfizmi olmak üzere iki polimorfizm belirlenmiştir (Livak ve ark 1998). Akciğer kanseri olan hastalarda histolojik tipler göz önüne alınarak yapılan bir çalışmada ise *DNA ligaz I* gen polimorfizmi bakımından bir ilişki görülmemiştir (Shen ve ark 2002).

Larinks kanseri hastalarında *DNA ligaz I* enzimini kodlayan gendeki polimorfizm sıklığının belirlenmesi, hastalığın prognozunun anlaşılması ve tedavisi ile ilgili yararlı bilgiler vereceğinden bu çalışmada PZR-RFLP tekniği ile larinks kanserli hastalar ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu arasında diğer parametreler de kullanılarak bu polimorfizm sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Hasta Seçimi ve Kontrol Grubu

Çalışmaya Kulak Burun Boğaz (KBB) kliniğine müracaat eden ve larinks kanseri tanısı alan yaş aralığı 38-77 olan 94 erkek hasta dahil edildi. Hastaların seçimi KBB kliniğinde yapılan muayene ve operasyon sonuçlarına göre gerçekleştirildi.

Kontrol grubunda larinks kanser tanısı almayan ve aile hikayesinde bu hastalıkla ilişkisi olmayan 140 sağlıklı bireyin periferik kan örnekleri kullanıldı.

DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon enzim kesimi çalışmaları Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Araştırma Laboratuarında yapıldı.

3.2. DNA İzolasyonu

Larinksli hastalardan ve kontrol grubundan alınan 2 ml'lik periferik kan örneği EDTA'lı tüplere steril olarak alındı. Yoğun tuz konsantrasyonu metodu kullanılarak total DNA izole edildi. Bu işlemde;

- Falkon tüplerinin içerisine 10 ml soğuk steril distile su konuldu.
- Bunun üzerine EDTA'lı tüp içerisindeki periferik kandan 1 ml eklendi ve pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışım sağlandı.
- 4500 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Oluşan süpernatan kısmı dökülerek pelletin falkon tüpün dip kısmında kalması sağlandı.
- Pellet'in üzerine 850 µl nuclei lyzis buffer eklendi ve pipetaj yapılarak pelletin homojen hale gelmesi sağlandı.
- 37ºC'de 10 dakika bekletildi ve tekrar pipetaj yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- Homojen hale gelmiş olan materyalin üzerine 850 µl kloroform eklendi ve vorteks ile karıştırılıp 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
- 13000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi ve sonucunda faz oluşumu sağlandı.
- Üst tabakadaki şeffaf kısım alınarak ayrı bir ependorf içerisindeki 1 ml %96'lık alkolün üzerine eklendi ve alt üst edildikten sonra DNA yumak halinde gözle görülür hale getirildi.

- 12000 RPM'de 4 dakika santrifüj edilip alkol döküldü ve DNA ependorfun dibine çöktürüldü.
- Üzerine 200-500 µl %70'lik alkol (etil alkol) eklenip 12000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi.
- %70'lik alkol dökülüp dip kısımdaki DNA'nın kuruması için ependorf ters çevrilip havada kurumaya bırakıldı.
- Havada kurutulan DNA steril distile su (150-300 µl) ile homojen hale getirildi.
- DNA, PZR analizinde kullanana kadar -20ºC'de depolandı.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA ligaz I gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde 6. ekzondaki A-C baz değişimi analizi için PZR-restriksiyon enzim kesim tekniği kullanıldı. Bunun için *Hae III* enzim kesim bölgesi (GGCC) içeren bölge 5'-ATG CCC TGT AGG TTC AAT GG-3' ve 5'-TGG AGG TCT TTA GGG GCT TG-3' primerleri (Shen ve ark 2002) kullanılarak çoğaltıldı. Bunun PZR reaksiyonu 20 µl'de gerçekleştirildi. Reaksiyon;

- 1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)
- 2 µl 10xPZR tamponu
- 1 µl $MgCl_2$ (25 mM $MgCl_2$)
- 1,2 µl 10 pmol primer (*LIG I*; *DNA ligaz I*)
- 11,8 µl steril dH_2O
- 0,4 µl DNA Taq polimeraz enzimi
- 2 µl genomik DNA

içeren karışım ile gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da;

- 94ºC'de 3 dakika bir döngü
- 94ºC'de 0,15 dakika,
- 59ºC'de 0,15 dakika, } 10 döngü
- 72ºC'de 0,15 dakika,
- 94ºC'de 0,15 dakika,
- 58ºC'de 0,15 dakika, } 25 döngü
- 72ºC'de 0,15 dakika,
- 72ºC'de 3 dakika ve

- 4ºC'de bir döngü

programı uygulanarak gerçekleştirildi.

3.4. Jel Elektroforezi

Elde edilen PZR ürününün olup olmadığını değerlendirmek için %1,5-2'lik agaroz (A 5093, Sigma) TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) solüsyonu ile karıştırılıp kaynatılarak agaroz jel hazırlandı. Agaroz TAE içinde eritilip 50-60ºC'ye soğutulduktan sonra EtBr (10µg/ml Ethidium bromür) ilave edildi. Jelde kuyucuklar oluşturmak için jel kabına dökülerek uygun taraklar yerleştirildi. Elde edilen PZR ürününden 5 µl alınıp yükleme boyası (6 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 45 dakika 120 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100 bp'lik ladder kullanıldı. Jel UV illüminator altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda 165 bp büyüklüğünde bant görüldü.

3.5. Restriksiyon Enzim Kesimi

Değerlendirme sonucunda geriye kalan 15 µl'lik PZR ürününde Restriksiyon Enzim kesimi yapıldı. Restriksiyon Enzim kesimi için 6 µl'lik karışım hazırlandı. 6 µl'lik karışım içinde;

- 3,5 µl steril dH_2O
- 2 µl Restriksiyon Enzim Buffer
- 0,5 µl Restriksiyon Enzimi (*Hae III*)

içeren karışım ile gerçekleştrildi. Bu 6 µl'lik karışımlar PZR ürününün içerisine eklendi ve su banyosunda 37ºC'de 12-16 saat bekletildi.

İşlem sonrasında %3'lük agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünü jele yüklendi. Jel 45 dakika 120 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu ve gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100 bp'lık ladder kullanıldı. UV illüminator altında değerlendirildi.

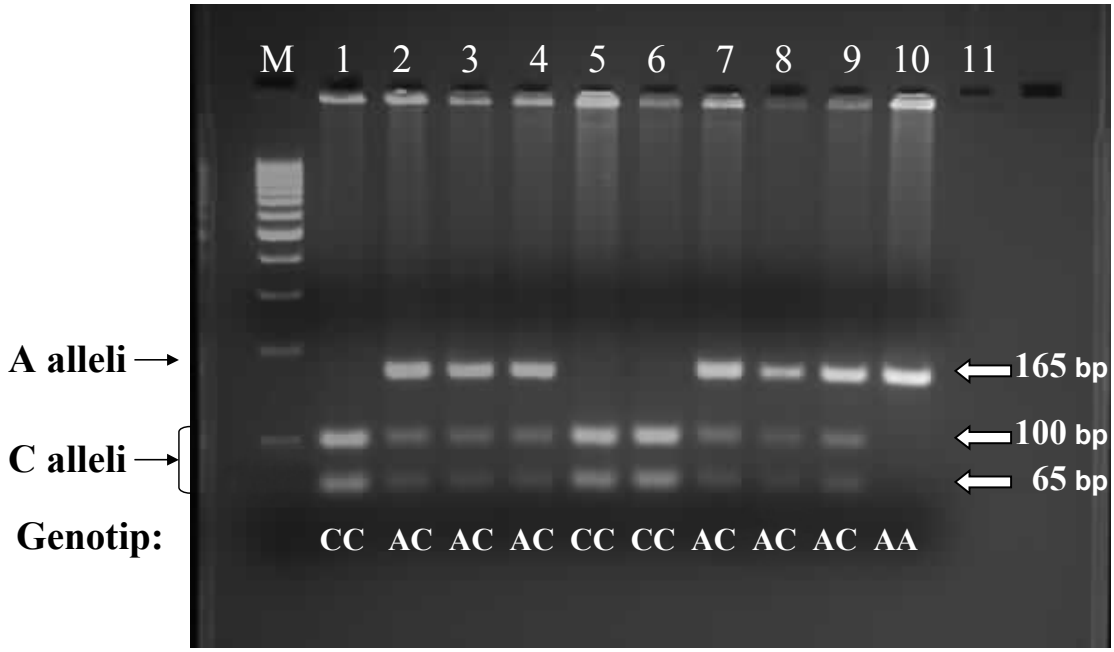
Değerlendirme sonucunda 165, 100 ve 65 bp büyüklüğünde bantlar gözlendi. Genotipleme yapılırken; sadece 165 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde *DNA ligaz I* geni için AA homozigot, 165-100-65 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde *DNA ligaz I* geni için AC heterozigot, 100 ve 65 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde ise *DNA ligaz I* geni için CC homozigot şeklinde değerlendirildi.

3.6. İstatistik Analizler

Hasta ve kontrol grubuna ait özellikler ve PCR-RFLP tekniği ile elde edilen değerler SPSS programı kullanılarak istatistiksel değerlendirmesi için Ki-kare analizi yapıldı. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 değeri alındı.

4. BULGULAR

Çalışmada 94 larinks hastası ve 140 bireyden oluşan kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden izole edilen genomik DNA kullanıldı. Larinks hastalarının tamamı erkek olup olguların yaşları 38–78 arasında değişmektedir (yaş ortalaması 59,287±9,101). Hasta grubunda klinik muayene ve operasyon sonucuna göre TNM sınıflandırması yapıldı. Hastalar içerisinde "primer tümör (T)" ve "nodüler metastaz (N)" sınıflandırması yapıldı. Ancak hastaların hiçbirinde "uzak metastaz (M)" bulunmadığından istatistiksel analizlerde bu parametre alınmadı.



Şekil 4.1. *LIG1 gen polimorfizmi için PZR-RFLP jel elektroforez görüntüsü. M: 100 bp ladder, AA homozigot, AC heterozigot, CC homozigot, bp: baz çifti.*

Hasta ve kontrol gruplarındaki *DNA ligaz* genotiplerinin sıklığı Tablo 4.1'de verilmiştir. Yapılan PZR analizi ve restriksiyon enzim kesimi sonucunda hastaların; 16'sının (17%) AA homozigot, 45'inin AC heterozigot (47,9%), 33'ünün (35,1%) CC homozigot genotipe sahip olduğu görüldü (Şekil 4.1.). Kontrol grubunun ise 31'inin (22,1%) AA homozigot, 55'inin (39,3%) AC heterozigot, 54'ünün (38,6%) CC homozigot genotipe sahip olduğu görüldü. Hasta grubu (%17) ile kontrol grubu (%22,1) arasında DNA ligazın AA genotipleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit

edildi (x^2=0.919, p=0,338). AA genotipli bireylerde larinks kanseri gelişme riski, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış olmadığı tespit edildi (OR=1.39, 95% GA: 0.71-2.70). Hasta grubu (%47,9) ile kontrol grubu (%39,3) arasında *DNA ligaz*ın AC genotipleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (x^2=1.694, p=0.193). AC genotipli bireylerde larinks kanseri gelişme riski, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış olmadığı tespit edildi (OR=0.70, 95% GA: 0.41-1.19). Ayrıca *DNA ligaz*ın CC genotipleri göz önüne alındığında hasta grubu (%35,1) ile kontrol grubu (%38,6) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (x^2=0.289, p=0.591). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise CC genotipli bireylerde larinks kanseri gelişme riskinde bir artış tespit edilmedi (OR=1.16, 95% GA: 0.67-1.99).

4.1. Yaş ile *DNA Ligaz* Genotipleri Arasındaki İlişki

Larinks kanserli hastaların ortalama yaşı 59,287±9,101 (38-78 yaş) (mediyan: 59 yaş) idi. Bu hastalar mediyan yaş göz önüne alınarak 59 ve 59 yaşından küçükler (≤59) (n=48) ve 59 yaşından büyükler (>59) (n=46) olarak iki gruba ayrılarak istatistiksel analiz yapıldı. *DNA ligaz*ın AA genotiplerinin sıklığı, 59 yaşından küçükler (%18.8) ile 59 yaşından büyükler (%15.2) arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (X^2=0.072, p=0.788; OR=1.08, 95% GA: 0.59-1.98 ve OR=0.93, 95% GA: 0.58-1.51). Elli dokuz yaşından küçük hastalarda *DNA ligaz*ın AC genotipi %52.1, *DNA ligaz*ın CC genotipi ise %29.2 olarak tespit edildi. 59 yaşından küçük hastalardaki *DNA ligaz*ın AC genotipi ve *DNA ligaz*ın CC genotipleri ile 59 yaşından büyük hastalardaki *DNA ligaz*ın AC genotipi ve *DNA ligaz*ın CC genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (X^2=1.476, p=0.224) (X^2=1.123, p=0.289). 59 yaşından daha genç *DNA ligaz* CC genotipli bireylerde larinks kanser gelişme riski 1.29 kat artmış olarak (OR=1.29, 95% GA: 0.79-2.10) bulunmuşken, *DNA ligaz* AC genotipli 59 yaşından büyük bireylerde de bu risk 1.27 kat artmış olarak bulundu (OR=1.27, 95% GA: 0.86-1.87).

4.2. Sigara Kullanımı ile *DNA Ligaz* Genotipleri Arasındaki İlişki

Sigara alışkanlığı göz önüne alındığında bir hasta dışında hastaların hepsi sigara içmişti. Ortalama sigara kullanma oranı %39.74±20.40 PY (13-125 PY, mediyan=40 PY) idi. Mediyan sigara içim süresine göre hastalar hafif-orta sigara bağımlıları (<40) ve ağır sigara bağımlıları (≥40) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hafif orta sigara bağımlılarında *DNA ligaz*ın AA (%17.1), *DNA ligaz*ın AC (%62.9) ve *DNA ligaz*ın CC (%20.0) genotipleri ile ağır sigara bağımlılarında *DNA ligaz*ın AA (%15.5), *DNA ligaz*ın AC

(%39.7) ve *DNA ligaz*ın CC (%44.8) genotipleri karşılaştırıldığında hafif orta sigara bağımlıları ile ağır sigara bağımlıları arasında *DNA ligaz*ın AA genotipi bakımından anlamlı bir fark tespit edilmedi (X^2=0.043, p=0.836). Fakat *DNA ligaz* AC ve *DNA ligaz* CC genotipleri bakımından karşılaştırıldığında hafif orta sigara bağımlıları ile ağır sigara bağımlıları arasında anlamlı bir fark tespit edildi (X^2=4.705, p=0.030 ve X^2=5.877, p=0.015). Bizim grubumuza göre, *DNA ligaz* CC genotipli ağır sigara bağımlısı bireylerde larinks kanser gelişme riski artmış (OR=2.20, 95% GA: 1.08-4.48) ve *DNA ligaz* AC genotipli ağır sigara bağımlısı bireylerde larinks kanser gelişme riski azalmıştır (OR=0.55, 95% GA: 1.02-1.99).

4.3. Tümör Lokalizasyonu ile *DNA Ligaz* Genotipleri Arasındaki İlişki

Larinks alt alanlarındaki tümörün gelişme yerine göre, tümör lokalizasyonları 45 supraglottik (%48) ve 49 glottik (%52) olarak ayrıldı. Supraglottik tümörlü hasta grubunda, *DNA ligaz*ın AA (%13.3), *DNA ligaz*ın AC (%53.3) ve *DNA ligaz*ın CC (%33.3) genotipleri ile glottik tümörlü hasta grubunda *DNA ligaz*ın AA (%20.4), *DNA ligaz*ın AC (%42.9) ve *DNA ligaz*ın CC (%36.7) genotipleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Sırası ile X^2=0.831, p=0.362; x^2=1.032, p=0.310 ve X^2=0.119, p=0.730). *DNA ligaz*ın AA, *DNA ligaz*ın AC ve *DNA ligaz*ın CC genotipi olan bireylerde supraglottik ve glottik larinks kanserleri riskinde artış olmadığı tespit edildi (Sırası ile, supraglottik; OR=1.33, 95% GA: 0.68-2.61; OR=0.80, 95% GA: 0.53-1.23; OR=1.08, 95% GA: 0.69-1.7 ve glottik; OR=0.80, 95% GA: 0.52-1.24; OR=1.22, 95% GA: 0.83-1.82; OR=0.93, 95% GA: 0.63-1.39).

4.4. TNM Sınıflaması ile *DNA Ligaz* Genotipleri Arasındaki İlişki

Tümör sınıflamasına göre larinks kanserleri T1 de %16, T2 de %19, T3 de %51 ve T4 de %14 olarak, boyun durumuna göre %54,3 hasta N0, %22,3 hasta N1, %20,2 hasta N2 ve %3,2 hasta N3 olarak sınıflandırıldı. Uzak metastaz hastaların hiç birinde bulunmadığından sınıflama yapılamadı. Tümör klassifikasyonları ile *DNA ligaz* genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (p>0.05).

Tablo 4.1. *Hasta ve kontrol gruplarındaki DNA ligaz (LIGI) genotipleri dağılımı.*

	Genotip (*LIGI*)		
	AA	**AC**	**CC**
Hasta Grubu	17%	47.9%	35.1%
Kontrol Grubu	22.1%	39.3%	38.6%
Odds ratio (95%GA)	*1.39, (95% GA: 0.71-2.70)*	*0.70, (95% GA: 0.41-1.19)*	*1.16, (95% GA: 0.67-1.99)*
x^2ve p değerleri	*x^2=0.919, p=0.338*	*x^2=1.694, p=0.193*	*x^2=0.289, p=0.591*
Yaş ile ilişkisi			
≤59	18.8%	52.1%	29.2%
Odds ratio (95%GA)	*1.08, (95% GA: 0.59-1.98)*	*0.77, (95% GA: 0.50-1.18)*	*1.29, (95% GA: 0.79-2.10)*
x^2 ve p değerleri	*x^2=0.072, p=0.788*	*x^2=1.476, p=0.224*	*x^2=1.123, p=0.289*
>59	15.2%	43.5%	41.3%
Odds ratio (95%GA)	*0.93, (95% GA: 0.58-1.51)*	*1.27, (95% GA: 0.86-1.87)*	*0.81, (95% GA: 0.56-1.18)*
x^2 ve p değerleri	*x^2=0.072, p=0.788*	*x^2=1.476, p=0.224*	*x^2=1.123, p=0.289*
Sigara içimi ile ilişkisi			
<40 PY	17.1%	62.9%	20.0%
Odds ratio (95%GA)	*0.93, (95% GA: 0.47-1.84)*	*0.55, (95% GA: 0.32-0.96)*	*2.20, (95% GA: 1.08-4.48)*
x^2 ve p değerleri	*x^2=0.043, p=0.836*	*x^2=4.705, p=0.030*	*x^2=5.877, p=0.015*
≥40 PY	15.5%	39.7%	44.8%
Odds ratio (95%GA)	*1.05, (95% GA: 0.67-1.64)*	*1.43, (95% GA: 1.02-1.99)*	*0.68, (95% GA: 0.50-0.91)*
x^2 ve p değerleri	*x^2=0.043, p=0.836*	*x^2=4.705, p=0.030*	*x^2=5.877, p=0.015*
Tümör lokalizasyonu ile ilişkisi			
Supraglottik	13.3%	53.3%	33.3%
Odds ratio (95%GA)	*1.33, (95% GA: 0.68-2.61)*	*0.80, (95% GA: 0.53-1.23)*	*1.08, (95% GA: 0.69-1.7)*
x^2 ve p değerleri	*x^2=0.831, p=0.362*	*x^2=1.032, p=0.310*	*x^2=0.119, p=0.730*
Glottik	20.4%	42..9%	36.7%
Odds ratio (95%GA)	*0.80, (95% GA: 0.52-1.24)*	*1.22, (95% GA: 0.83-1.82)*	*0.93, (95% GA: 0.63-1.39)*
x^2 ve p değerleri	*x^2=0.831, p=0.362*	*x^2=1.032, p=0.310*	*x^2=0.119, p=0.730*
Primer tümör büyüklüğü			
T_1	33.3%	40.0%	26.7%
T_2	27.8%	38.9%	33.3%
T_3	10.4%	52.1%	37.5%
T_4	7.7%	53.8%	38.5%
x^2 ve p değerleri	*x^2=6.676, p=0.352*		
Boyuna nodüler metastaz			
N_0	23.5%	43.1%	33.3%
N_1	9.5%	38.1%	52.4%
N_2	10.5%	73.7%	15.8%
x^2 ve p değerleri	*x^2=11.080, p=0.086*		

5. TARTIŞMA

Larinks kanserlerinin dünyada baş boyun kanserleri içerisinde en sık görülen kanser tipilerinden biri olduğu ve bu kanserin ortaya çıkmasında çevresel faktörler, alkol ve sigara kullanımı gibi etkenlerin etkili olduğu epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (Shaha ve ark 1997, Licitra ve ark 2003, Filho 2004, Jaiswal ve ark 2004,). Bu kanser tipinin sınıflandırılmasında, prognozun izlenmesinde ve tedavi seçiminde tümör oluşumu, oluşma bölgesi ve yayılımı gibi parametreler kullanılmaktadır (Szyfter ve ark 1999, Almadori ve ark 2005). Bununla birlikte pek çok çalışmada kanser oluşumunda hücresel seviyede meydana gelen bozuklukların etkili olabileceği gösterilmiştir. Larinks kanserlerinin ortaya çıkmasında metabolik olaylarla ilgili CYP ve GST gibi enzimleri kodlayan genlerin (MacWilliams ve ark 2000, Kim ve Califona 2004), *p53*, *p21* gibi tümör supresör veya onkogenlerde meydana gelen mutasyonların (Blons ve Puig 2003, Gleich ve Salamone 2002) ayrıca DNA sentez ve tamir yollarında görevli olan *TP53*, *POLI*, *REV1* ve *XRCC1* gibi genlerdeki değişiklikler ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Berwick ve Vineis 2000, Gennery ve Jeggo 2002, Goode ve ark 2002, Chin ve ark 2005, Almodori ve ark 2005, Sakiyama ve ark 2005).

DNA ligaz I DNA replikasyonunda Okazaki fragmetlerinin birleştirilmesi ve tamir yollarında fonksiyon gösteren, 102 kDa ağırlığında bir enzimdir (Tomkinson ve ark 1991, Mossi ve ark 1998, Doherty ve Suh 2000, Wilkinson ve ark 2003). Bu enzimi, kromozom 19q12.2-13.3 bölgesinde bulunan *LIG I* geni kodlar. Bu gen 2,6 kb büyüklüğünde olup 28 ekzondan oluşmaktadır (Noguiez ve ark 1992). Yapılan çalışmalarda *LIG I* geninde meydana gelen mutasyonların immün yetmezlik ve replikasyon mekanizmasındaki bozukluklara sebep olabileceği bildirilmiştir (Livak ve ark 1998, Shen ve ark 2002). *DNA ligaz I* ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bu gende meydana gelen bozukluğun immün yetmezlik ile sonuçlandığı öne sürülmüş, fakat DNA replikasyonunda görev alan helikazlar gibi enzimlerinde etkili olabileceği görülmüştür. Livak ve ark (1998) tarafından *LIG I* geninde; 6. ekzonundaki A-C baz değişikliği ve GT tekrar polimorfizmi olmak üzere iki polimorfizm belirlenmiştir (Prigent ve ark 1994, Livak ve ark 1998, Shen ve ark 2002). 6. ekzonundaki A-C baz değişikliğinin herhangi bir aminoasit değişikliğine sebep olmadığı belirlenmiş olup biyolojik etkileri bilinmemektedir. A-C baz değişim polimorfizmi ile ilgili ilk prospektif çalışma Shen ve ark (2002) tarafından akciğer kanserli hastalarda yapılmış

olup mevcut çalışma ikinci çalışmadır. Bununla birlikte larinks kanseri ile *DNA ligaz* gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 94 hasta ve 140 kontrol bireyinde *DNA ligaz I* gen polimorfizmi ile larinks kanseri arasındaki ilişki araştırılmış istatistiksel olarak fark görülmemiştir (bkz Tablo 4.1.). Shen ve ark. (2002)'nın akciğer kanserli hastalarda yaptığı çalışmada da benzer şekilde bulgular rapor edilmiştir.

Çalışmamızda; primer tümör oluşumu (T parametresi), nodüler metastaz, tümör lokalizasyonu, sigara kullanımı ve yaş gibi parametreler öncelikli olarak hasta ve kontrol grubu arasında, sonrasında ise hasta grubu kendi içerisinde kıyaslandı. Bunlar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, bununla birlikte sigara kullanımında polimorfizmin anlamlı olduğu tespit edildi (sigara kullanımı için P:0,044). Ayrıca ağır sigara içenlerde gen polimorfizmi bakımından heterozigot (AC) bireylerde larinks kanseri gelişme riskinde azalma, homozigot (CC) bireylerde ise larinks kanseri gelişme riskinde artma olması dikkat çekicidir.

Acar ve ark (2006)'nın metabolizma enzimlerinden GST ile yaptığı çalışmada, larinks kanserlerinin tümör lokalizasyonu ve TNM sınıflandırılması ile bu enzimin polimorfizmi arasında fark bulunamamıştır. Ancak her iki GST'lerin null genotiplerinin aynı bireyde olması bakımından anlamlı olduğu rapor edilmiştir. Sigaranın GST polimorfizmi ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır.

Monteiro ve ark. (2004)'nın hücre döngüsü enzimlerinden *siklin D1* geninin polimorfizmi ve tümör lokalizasyonu ile ilgili yaptığı çalışmada bu gen polimorfizmi ve tümör lokalizasyonu arasında fark rapor etmemişlerdir.

Larinks kanseri ile yapılan diğer çalışmalarda sigara ve alkol kullanımının kanser gelişiminde etkili olabileceği hemen hemen tüm çalışmalarda vurgulanmıştır. Döşemeci ve ark (1997) Türkiye'deki sigara, alkol kullanımı ve larinks ve akciğer kanserlerinin karşılaştırıldıkları çalışmada, larinks kanserli hastalarda sigara kullanımının kanser riskini arttırdığını bildirmişlerdir (Döşemeci ve ark 1999).

Larinksin supraglottik alanında gelişen tümörler, glottik bölge tümörlerinden farklı özellik göstermektedirler. Ayrıca, aynı histolojik özelliğe sahip, aynı aşamada supraglottik veya glottik tümörlü her bir bireyin tümörü, aynı tedavi uygulamasına rağmen tamamen farklı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Supraglottik tümörler glottik tümörlere göre daha agresif ve daha erken metastaz yapmaya meyillidirler (Jin ve ark 2000). Döşemeci ve ark

(1999) supraglottik kanserlerinde kanser oluşum ve gelişim riskinin en fazla olduğunu görmüşlerdir. Buna benzer şekilde Stefani ve ark (2004)'da supraglottik kanserlerinde kanser oluşum ve gelişim riskini daha fazla görmüşlerdir.

Yapılan çalışmalarda larinks kanserinde yaş faktörününde önemli olduğu bildirilmiştir. 60'lı yaşlardan sonra görülme sıklığının farklı ülkelerde farklı oranlarda arttığı gözlenmiştir (Szyfter ve ark 1999, Licitra ve ark 2003, Filho 2004). Mevcut çalışmamızda ise yaş ve *LIG I* gen polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Larinks kanserlerinin belirlenmesi ve korunmasında bu kanserin genetik temellerinin ve mekanizmalarının anlaşılması ile sağlanabilecektir. Bu, klinisyenlerin yüksek riskli bireyleri belirlemesinde, tanı konması ve tedavi edilmelerinde faydalı olacaktır. Larinks kanserine yatkınlıkla ilgili olabilecek metabolizma enzimlerini kodlayan genler ile DNA sentez ve tamirinde görevli olan genlerin polimorfik yapılarının belirlenmesi, kanserin ortaya çıkması ve prognozundaki etkisinin belirlenmesi bakımından önemlidir (Berwick ve Vineis 2000).

Sonuç olarak; DNA *LIG I* geni DNA'nın yapısının korunmasında ve DNA'da oluşan harabiyetin tamirinde önemli bir enzim kodlamaktadır. Bu gendeki yapısal değişiklikler enzimin fonksiyonunu değiştirebileceğinden dolayı kanser oluşumunda ve gelişiminde önemi büyüktür. Mevcut çalışmada DNA *LIG I* genindeki polimorfik değişikliklerin larinks kanserinin etiyolojisi ile direk bir ilişkisi olmadığı tespit edildi. Ancak bu değişiklikler ekspresyon seviyesinde de değişiklikler oluşturabileceğinden dolayı bu genin bu kanserde fonksiyonlarına yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA 2007

Fatih SARI

Larinks Kanserli Hastalarda *DNA Ligaz* Gen Polimorfizminin PZR-RFLP Tekniği İle Araştırılması

Larinks kanserleri dünyada en sık görülen baş boyun kanser tiplerinden biridir. Bu hastalığın orataya çıkmasında sigara, çalışma şartları ve hayat tarzı gibi çevresel faktörler etkili olmasına rağmen, özellikle DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve tamir sistemleri gibi bazı hücresel mekanizmalar da katkıda bulunmaktadır. *DNA ligaz*, DNA replikasyonu, rekombinasyon ve tamir işlemlerinde rol alan önemli bir enzimdir. *DNA ligaz I* geninin 6. ekzonunda (A→C) tek temel değişimi polimorfik bir yapı oldugu bildirilmiştir. Buna bağlı olarak bu enzimi kodlayan gen polimorfizminin kanserin orataya çıkmasında etkili olabileceği bildirilmistir. Ancak literatürde bu konu ile ilgili herhangi bir çalışmaya raslanmamıştır. Larinks kanserlerinde genetik faktörlerin ortaya konması amacıyla onemli bir gen olan DNA ligaz genindeki polimorfik yapının önemli hipotezi ortaya konmuştur. Bu amaçla, 94 larinks kanseri hasta ve 140 sağlıklı bireyden elde edilen, toplam 234 DNA bireyden elde edilen DNA örneklerine PCR-RFLP tekniği ile DNA ligaz geni polimorfik yapısı incelenmiştir. *DNA ligaz* genotip sıklığını AA, AC ve CC için; hastalarda sırasıyla %17, %47.9 ve %35.1 ve kontrol grbunda %22.1, %39.3 ve %38.6 olarak belirlendi. Larinks kanseri ve *DNA ligaz I* geni polmorfizmleri bakımından istatistiksel bir fark bulunamadı (χ^2=1.886, P =0.389). Bununla birlikte sigara alışkanlığı (χ^2=6.256 and P=0.044) ve *DNA ligaz I* genotipi arasında farklılık tespit edildi. Literatürde Larinks kanseri ve *DNA ligaz I* gen polmorfizmi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

7. SUMMARY

Selcuk University
Health Science Institute
Department of Medical Genetics

Master thesis / KONYA 2007

Fatih SARI

Investigation of *DNA Ligase* Gene Polymorphism in Patients with Laryngeal Carcinoma by PCR-RFLP Technique

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is the most common of all head and neck cancer types on the worldwide. Although in the arising of this disease environmental factors like as smoking, work situation, life styles are effective on occurance and progresssing of LSCC, many cellular mechanisms especially DNA replication, recombination and repair systems may have contribution to the development of disease. DNA ligase I is an essential enzyme that required for DNA replication, recombination and repair processes. A single base exchange (A→C) in exon 6 of gene were well known. There has been no study on this polymorphism and relation to the LSCC. Therefore, we hypothesised that DNA ligase I polymorhism which encodes this enzyme can impress the cancer development. In our study, we examined that total 234 genomic DNA of 94 patient with LSCC and 140 control individual as control group by using PCR-RFLP analysis. DNA ligase genotype frequencies were 17%, 47.9%, 35.1% in patients and 22.1%, 39.3%, 38.6% in controls for AA, AC and CC, respectively. We did not find any significance differencies for *DNA ligase I* gene polymorphism between patient and control group (χ^2=1.886, P =0.389). However, a significant difference were found between smoking habits (χ^2= 6,256 and P= 0,044) and *DNA ligase I* gene polymorphism. As a conclusion, our results indicate that there is a asssociation the polymorphism and smoking habits to the development of LSCC risk.

8. LİTERATÜR LİSTESİ

Acar H, Öztürk K, Müslümanoglu M, Yıldırım M, Cora T et al (2006) *Relation of glutathione S-transferase genotypes (GSTM1 and GSTT1) to laryngeal squamous cell carcinoma risk, 169(2):89-93.*

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *"DNA replication and repair"* Molecular Biology of The Cell, pp 191-235, the USA.

Anthony JP, Argenta P, Trabulsy PP, Lin RY, Mathes SJ (1996) *The Arterial Anatomy of Larynx Transplantation: Microsurgical Revascularization of the Larynx***,** Clinical Anatomy, 9:155-59.

Arı Ş (2004) *"DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması"* Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Ed Temizkan G, Arda N, pp 101-120, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul

Berwick M and Vineis P (2000) *Markers of DNA Repair and Susceptibility to Cancer in Humans: an Epidemiologic Review***,** Journal of the National Cancer Institute, 92(11):874–97.

Blons H and Puig PL (2003) *TP53 and Head and Neck Neoplasms,* Human Mutation 21:252-57

Cherepanov AV and Vries S (2002) *Dynamic mechanism of nick recognition by DNA ligase,* Eur. J. Biochem, 269:5993-9.

Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB (2004) *Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis,* The British Association of Plastic Surgeons, 57:595–602.

Doherty AJ and Suh SW (2000) *Structural and mechanistic conservation in DNA ligases*, Nucleic Acids Res, 1;28(21):4051-8.

Döşemeci M, Gökmen I, Unsal M, Hayes RB, Blair A (1997) *Tobacco, alcohol use, and risks of laryngeal and lung cancer by subsite and histologic type in Turkey, Cancer Causes and Control*, 8:729-37.

Filho VW (2004) *The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil,* Sao Paulo Med J, 122(5):188-94

Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RVP et al (1998) "*Larnyx"* AJCC Cancer Staging Handbook, the USA, pp.45-49.

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Kujawski M, Szyfter W, Szyfter K (2005) *CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma.* Mutat Res. 1;574(1-2):112-23. Epub 2005 Apr 15.

Gelehrter TD, Collins FS and Ginsburg D (1998) *Principles of Medical Genetics*, 2nd ed., pp 43-61, Williams&Wilkins, the USA.

Gennery AR, Cant AJ, Jeggo PA (2000) *Immunodeficiency associated with DNA repair defects,* Clin Exp Immunol, 121(1):1-7.

Gleich LL and Salamone FN (2002) *Molecular genetics of head and neck cancer*, Cancer Control, 9(5):369-78.

Goode EL, Ulrich CM and Potter JD (2002) *Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk,* Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 11:1513-30.

Housman D (1995) *Molecular Medicine Human DNA Polymorpism,* The New England Journal Of Medicine, 332(5):318-20.

Jaiswall VR, Hoang MP (2004) *Primary Combined Squamous and Small Cell Carcinoma of the Larynx,* Arch Pathol Lab Med, 128: 1279-82

Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Dictor M, Mertens F (2000) *Nonrandom pattern of cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx,* Genes Chromosomes Cancer, 28:66-76.

Kanaar R, Hoeijmakers JHJ and Gent DC (1998) *Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair,* Trends in Cell Biology, 8:483-89.

Kaya S (2002) *Larenks Hastalıkları,* Ed Çevik İ, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.

Kim MM and Califano JA (2004) *Molecular Pathology of Head and Neck Cancer,* Int.J.Cancer, 112:545–53.

Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M et al (2003) *Cancer of the larynx,* Critical Reviews in Oncology/Hematology, 47:65-80.

Liu P, Burdzy A and Sowers LC (2004) *DNA ligases ensure fidelity by interrogating minor groove contacts,* Nucleic Acids Res, 32(15):4503-11.

Livak KJ, Little WA, Stack SL, Patterson TA (1998) *Polymorphisms in the human DNA ligase I gene (LIG1) including a complex GT repeat,* Mutation Research Genomics, 406:1–8.

Lodish H, Berk A, Matsudaire P, Kaiser CA, Krieger M et al (2004) *Molecular Cell Biology,* Fifth edition, pp 853-898, W.H.Freeman and Company, New York.

Martin IV and MacNeill SA (2002) *ATP-dependent DNA ligases,* Genom Biology, 3(4)Reviews:3005.1-7.

McWilliams JE, Evans AJ, Beer TM, Andersen PE, Cohen JI, Everts EC, Henner WD (2000) *Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk,* Head Neck, 22(6):609-17.

Merati AL and Rieder AA (2003*) Normal Endoscopic Anatomy of the Pharynx and Larynx* Am J Med, 115(3A):10S–14S.

Monteiro E, Varzim G, Pires AM, Teixeira M, Lopes C (2004) *Cyclin D1 A870G polymorphism and amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: implications of tumor localization and tobacco exposure,* Cancer Detect Prev, 28(4):237-43.

Mossi R, Ferrari E and Hübscher U (1998) *DNA ligase I Selectively affects DNA synthesis by DNA polymerases δ and ε suggesting differential functions in DNA replication and repair,* The Journal of Biological Chemistry, 273(23): 14322-30

Noguiez P, Barnes DE, Mohrenweiser HW, Lindahl T (1992) *Structure of the human DNA ligase I gene*, Nucleic Acids Res. 11;20(15):3845-50.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF and Boerkoel CF (2005) "*İnsanlarda Genetik Varyasyon: Mutasyon ve Polimorfizm", Thompson & Thompson Tıbbi Genetik,* 6. Baskı, pp 79-89, Güneş Kitabevi, Turkey.

Öktem F, Toprak M, Ada M, Öztürk Ö (2000) *Larinks Kanseri Etyolojisinde Laringofaringeal Reflünün Yeri,* Turk Arch ORL, 38(1):28-32.

Ömür M, Doğan Ö, Kaleli EÇ (1992) *Larenks Kanseri ve Boyun,* Haseki Hastenesi Vakfı Yayını, pp 15-73, İstanbul.

Öztaş S, Gül D, Tatar A (2005) *İnsan Genomu: Genler ve DNA,* Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci, 1(2):18-23.

Petrini JH, Xiao Y and Weaver DT (1995) *DNA Ligase I Mediates Essential Functions in Mammalian Cells,* Molecular and Cellular Biology, 15(8):4303-8.

Prigent C, Satoh MS, Daly G, Barnes DE and Lindahl T (1994) *Aberrant DNA Repair and DNA Replication Due to an Inherited Enzymatic Defect in Human DNA Ligase I,* Molecular And Cellular Biology, 14(1):310-17.

Qu Z, MacLellan WR and Weis JN (2003) *Dynamics of the Cell Cycle: Checkpoints, Sizers, and Timers,* Biophysical Journal, 85:3600-11.

Sakiyama T, Kohno T, Mimaki S, Ohta T, Yanagitani N, Sobue T et al (2005) *Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes TP53, POLI, REV1 and LIG4 with lung cancer risk,* Int J Cancer, 1;114(5):730-7.

Sandal T (2002) *Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer,* The Oncologist, 7:73-81

Sarıkaya AT (2004) "*DNA'nın İzolasyonu ve Analizi"* Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Ed Temizkan G, Arda N, pp 54-80, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul

Sasaki CT and Jassin B (2001) *Cancer of the Pharynx and Larynx,* Am J Med, 111(8A):118-123

Shaha AR, Patel S, Shasha D, Harrison LB (2001) "*Head and Neck Cancer",* Clinical Oncology, Ed. by Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T, 1st ed., Blacwell Science, the USA, pp 298-322.

Shen H, Spitz MR, Qiao Y, Zheng Y, Hong WK, Wei Q (2002) *Polymorphism of DNA ligase I and risk of lung cancer--a case-control analysis,* Lung Cancer, 36(3):243-7.

Stefani ED, Boffetta P, Pellegrini HD, Brennan P, Correa P et al (2004) *Supraglottic and glottic carcinomas: epidermiologically distinct entities,* Int. J. Cancer, 112:1065-71.

Szyfter K, Szmeja Z, Szyfter W, Hemminki K, Banaszewski J et al (1999) *Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer,* Mutation Research 445:259–74.

Timson DJ, Singleton MR, Wigley DB (2000) *DNA ligases in the repair and replication of DNA,* Mutat Res. 30;460(3-4):301-18.

Tomkinson AE and Mackey ZB (1998) *Structure and function of mammalian DNA ligases,* Mutat Res, 407(1):1-9.

Tomkinson AE, Roberts E, Daly G, Totty NF and Lindahl T (1991) *Three Distinct DNA Ligases in Mammalian Cells,* The Journal of Biological Chemistry, 266(32):21728-35.

Ünal M, Tamer L, Ateş NA, Akbaş Y, Pata YS et al (2004) *Glutathione S-Transferase M1, T1, and P1 Gene Polymorphism in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma,* Am J Otolaryngol, 25:318-22.

Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R et al (2003) *p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx,* Laryngoscope, 113(1):167-172.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A et al (2004) *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed., pp 181-258, CSHLL Press, the USA

Wilkinson A, Sayer H, Bullard D, Smith A, Day J et al (2003) *NAD^+-dependent DNA Ligases of Mycobacterium tuberculosis and Streptomyces coelicolor,* Proteins, 51:321-26.

Wilkinson A, Smith A, Bullard D, Curto ML, Sayer H et al (2005) *Analysis of ligation and DNA binding by Escherichia coli DNA ligase (LigA),* Biochimica et Biophysica Acta, 1749:113–122.

Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001) *Human DNA Repair Genes,* Analysis of Genomic Information, 291:1284-89.

Wu X, Roth JA, Zhao H, Luo S, Zheng YL et al (2005) *Cell Cycle Checkpoints, DNA Damage/Repair, and Lung Cancer Risk,* Cancer Research, 65(1):349-52.

9. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Aksaray'da doğdu. İlkokul öğrenimini 1986–1991 yılları arasında Aksaray Cumhuriyet İlkokulunda yaptı. Ortaokul öğrenimini 1991–1994 yılları arasında Aksaray Kılıçaslan Ortaokulu'nda tamamladıktan sonra lise öğrenimini 1994–1998 yılları arasında Aksaray Yabancı Dil Ağırlıklı Osman Gazi Lisesi'nde yaptı. Lisans öğrenimini Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü 2003 yılında bitirdi. Ardından 2004–2005 yılı bahar döneminde Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı.

10. TEŞEKKÜR

Yardımlarını esirgemeyen Dr. Kayhan ÖZTÜRK'e, Dr. Tülin ÇORA'ya, Dr. Said BODUR'a,

Ayrıca tüm tahsil hayatım boyunca maddi ve manevi katkılarıyla bana her zaman destek olan aileme,

En içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.