



**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
BİY – YL – 2008 – 0005**

**TÜRK POPULASYONUNDA KALSİTONİN RESEPTÖR  
(CTR) GENİ POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP  
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**Turgut ÖZTÜRK**

**DANIŞMANLAR  
Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI  
Doç. Dr. Pınar OKYAY**

**AYDIN 2008**

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Turgut ÖZTÜRK tarafından hazırlanan Türk populasyonunda Kalsitonin Reseptör (CTR) Geni Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi İle Belirlenmesi başlıklı tez, 16.12.2008 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmza
1. Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI	ADÜ Fen Edebiyat	
2. Doç. Dr. Pınar OKYAY	ADÜ Tıp Fakültesi	
3. Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	ADÜ Fen Edebiyat	
4. Yrd. Doç. Dr. Halil BIYIK	ADÜ Fen Edebiyat	
5. Yrd. Doç. Dr. Aslıhan KARUL	ADÜ Tıp Fakültesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ  
Enstitü Müdürü

## İNTİHAL VE AŞIRMA BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Adı Soyadı: Turgut ÖZTÜRK

İmza:

**ÖZET**

Yüksek Lisans Tezi

**TÜRK POPULASYONUNDA KALSİTONİN RESEPTÖR (CTR) GENİ  
POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Turgut ÖZTÜRK

Adnan Menderes Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

Kalsitonin osteoklastların yüzeyinde yerleşen kalsitonin reseptörleri (CTR) uyarmakla, kemik resorpsiyonunun inhibe eden 32 aminoasitlik bir peptid hormondur. Bu etki osteoklastların yüzeyinde yer alan bir 7-transmembran reseptör olan CTR'nin aktivasyonunun bir sonucudur. CTR aktivasyonu adenilsiklazı uyarır ve osteoklastik kemik resorpsiyonunda bir düşüşe yol açar. CTR geninin 1340. nükleotid pozisyonunda (447. kodon) yaygın olarak görülen ve osteoporoz, böbrek taşı ile ilişkili olduğu saptanan C/T polimorfizmi, CTR genin aktivasyonunu etkiler. Bu denli önemli olan CTR genindeki bu polimorfizmin Aydın popülasyonundaki bireylerde sıklığının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, Aydın ilinin çeşitli bölgelerinde 489 sağlıklı bireyin ilgili gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yoluyla çoğaltılıp ve polimorfizm restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP) yöntemi ile belirlendi. Çalışılan popülasyonda C/C %16.35, C/T %47.44 ve T/T genotip sıklığının ise %36.21 olduğu gözlenmiştir. C ve T allellerinin sıklıkları ise sırasıyla %44.65 ve %55.35 olarak saptanmış ve bu değerler en fazla İtalyanlarınkiyle yakınlık göstermektedir. Aydın popülasyonda gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasındaki farkın önemli olmadığı ve bu yüzden popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptanmıştır.

**2008, 43 sayfa****Anahtar Sözcükler:** CTR PCR-RFLP, genetik polimorfizm

**ABSTRACT**

M.sc. Thesis

**DETECTION OF THE CALCITONIN RECEPTOR (CTR) GENE  
POLYMORPHISM USING PCR-RFLP ASSAY IN TURKISH POPULATION**

Turgut ÖZTÜRK

Adnan Menderes University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

Calcitonin is a 32 amino acid length peptide hormone inhibiting bone resorption by activating calcitonin receptors located on the surface of the osteoclasts. This effect is a result of CTR activation which is a 7-transmembrane receptor located on the surface of osteoclasts. Activation of CTR induces adenilsiklase and causes a decline in the osteoclastic bone resorption. C/T polymorphism at the nucleotide position 1340 (codon position 447) in the CTR gene, its association has been detected with osteoporosis, and kidney stones, affects CTR activation. In the present study, detection of the frequency of such an important polymorphism in the CTR gene has been aimed. For this aim, the gene in question was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) from 489 healthy blood donors from Aydın province and the polymorphism was detected by Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP) assay. Results obtained from this analysis showed that C/C, C/T and TT genotype frequencies were 16.35%, 47.44% and 36.21%, respectively. The frequency of the mutant T allele was 55.35%. Comparisons these results with those obtained from different populations showed that there was a very close similarity with Italian population. It has been determined that the differences between observed and expected genotype frequencies in Aydın population were not significant, thus the population in question was in the Hardy-Weinberg Equilibrium.

**2008, 43 pages****Key Words:** CTR, PCR-RFLP, genetik polymorphism

## ÖNSÖZ

Akademik kariyerde bir adım olan Yüksek Lisans eğitimimin gerçekleşmesindeki katkısı, tez aşamasında verdiği bilgi ve destek için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI'ya, tezim için donör grubunun oluşturulmasında ve teze yön veren tasfiyelerin den dolayı ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Pınar OKYAY'a, donör kanlarının kullanılmasına izin veren Türkiye Kızılay Derneğine değerli yardımlarında dolayı Türk Kızılayı Aydın Kan İstasyonu çalışanlarına ve tezimde bana göstermiş olduğu ilgi ve yardımlarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden araştırma görevlisi olan Nazan YILMAZ'a, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, her zaman yanımda olan tüm arkadaşlarıma ve son olarak ismini yazamadığım ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde yardımı dokunan herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ .....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	4
2.1. Reseptör Özelliği .....	4
2.2. Genomik Organizasyon.....	7
2.3. Reseptör Splis Varyantları.....	10
2.4. Prokalsitonin.....	13
2.5. Kalsitoninin Etkileri.....	14
2.5.1. Kemik Dokuya Etkileri.....	14
2.5.2. Merkezi Sinir Sistemine Etkileri.....	17
2.5.3. Diğer Etkileri.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Çalışma Grubu.....	20
3.2. Periferel Kandan DNA İzolasyonu.....	21
3.3. DNA'nın Kalite Ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	22
3.4. CTR Lokusunun PCR-RFLP yöntemi ile Genotiplenmesi.....	23
3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	23
3.4.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm(RFLP) Analizi .....	24
3.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	32
KAYNAKLAR .....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	43

**SİMGELER DİZİNİ**

bç	:	Baz çifti
CT	:	Kalsitonin
CTR	:	Kalsitonin reseptörü
CGRP	:	Kalsitonin peptidleriyle ilgili peptidler
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksinükleotittrifosfat
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
kb	:	Kilo baz
kDa	:	Kilo dalton
NMR	:	Nükleer manyetik rezonanz
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRO	:	Prolin
RFLP	:	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RAMPs:	:	Reseptör aktivitesini modifiye eden proteinler
RBC	:	Kırmızı kan hücreleri
SNP	:	Tek Nükleotit Polimorfizmi
TBE	:	Tris-Borik asit-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
cAMP	:	Adenilsiklaz mono fosfat
UTR	:	Untranslated region
<sup>125</sup> I	:	İyot 125



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 2.1. Somon balığı CT amino asit dizisinin şematik diyagramı...	5
Şekil 2.2. Domuz, kemirgen ve insan geni ekzon bölgelerinin intron/ekzon organizasyonu.....	8
Şekil 2.3. CTR genlerinin alternatif bağlanmasını gösteren doğrusal şema.....	11
Şekil 2.4. Kemik mineral yoğunluğunun zamanla azalması.....	16
Şekil 3.1. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemini ile 3'UTR C→T polimorfizminin prototifi.....	25
Şekil 4.1. %2'lik agaroz jelde CTR gen mutasyonu için PCR profili.	27
Şekil 4.2. % 3'lük agaroz jelde CTR gen mutasyonu için <i>Alu 1</i> restriksiyon enzim kesim profili .....	28

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. CTR gen PCR reaksiyon koşulları.....	23
Çizelge 3.2. CTR gen PCR reaksiyon protokolü.....	24
Çizelge 3.3. CTR Restriksiyon protokolü.....	24
Çizelge 4.1. Aydın ili populasyonunda CTR gen mutasyon sıklığını belirlemek için belirlenen bölgeler ve donör sayıları.....	26
Çizelge 4.2. Aydın populasyonunda CTR geninin 1377. nükleotit değişim sıklığı ve dağılımı.....	28
Çizelge 4.3. Aydın populasyonuna özgü CTR gen bölgesine ait değişimlerin alel sıklıklarının dağılımı.....	29
Çizelge 4.4. Erkek populasyonu genotip sıklığı.....	29
Çizelge 4.5. Erkek populasyonu alel sıklığı.....	30
Çizelge 4.6. Bayan populasyonunun genotip sıklığı.....	30
Çizelge 4.7. Bayan populasyonunun alel sıklığı .....	30
Çizelge 4.8. Aydın populasyonu CTR geninin heterozigotluk sonuçları.	31
Çizelge 5.1. Farklı demografik bölgelerde kodon 447 SNP sıklığı...	37

# 1. GİRİŞ

Kan kalsiyumu üzerine paratiroid hormonun aksi yönünde etki eden kalsitonin (CT) hormonu yaklaşık 30 yıl kadar önce bulunmuş ve kan kalsiyum iyon konsantrasyonunu düşürdüğü için bu adı almıştır. CT hormonu insanda tiroit bezinden; balık, kurbağa, sürüngen ve kuşlarda ise ultimobrankial bezlerden salgılanmaktadır. CT insanda tiroit bezinin folikülleri arasındaki parafoliküller ya da C hücreleri adı verilen hücrelerde bulunmaktadır.

Olgun insan CT'si 32 amino asitten oluşan ve sisteine 1. ve 7. pozisyonlarda bir disülfid köprüsü ile bağlı olan, 3418 Da ağırlığındaki bir peptit zinciridir. Karboksil ucunda prolin yer almaktadır. Kalsitoninler türler arasında farklılıklar göstermekle birlikte, yapısal ve biyolojik benzerliklerine bağlı olarak 3 ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; kemikli balık/kuş, çift toynaklı ve kemirgen/insan CT'leridir. Her sınıf kendi içinde yüksek oranda benzerlik göstermesine karşın, aralarında önemli dizi farklılıkları bulunmaktadır. CT, kalsitonin gen- ilgili peptitler (CGRP), amilin ve adrenomedullin gibi peptitlerle homoloji göstermektedir. En yüksek benzerlik oranı, yaklaşık %33'lük bir oranla kemikli balıklar CT'si ve amilin arasındayken, CGRP ile amilin arasında %22'lik ve adrenomedullin ile amilin arasında %16'lık bir benzerlik bulunmaktadır. Memeli CT'leri ile diğer peptitler arasında sınırlı bir benzerlik görülmektedir. Peptit reseptörlerinin bağlantı bölgeleri arasında, peptitler arasındaki benzerlikle uyumlu olarak bölgesel örtüşmeler vardır. Amilin, pankreasın  $\beta$  hücrelerinden insülin ile birlikte elde edilen ve 37 amino asitten oluşan bir peptittir. Amilinin en belirgin aktivitesi iskelet kasında görülmektedir. İskelet kasında glikojen yıkımını düzenlemekte ve glikozun glikojene dönüşümünde insülinin uyarısını bozmaktadır. Amilin ayrıca potansiyel bir anorektik ajan olup, gastrik boşalmayı engellemektedir (Young *et al.*, 1996).

Amilinin etkileri büyük ölçüde incelenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar amilin reseptörlerinin, kalsitonin reseptör gen(CTR) ürünleri ve kendi başına reseptör aktivitesini modifiye eden proteinler (RAMPs) ile oluşturduğu heterodimer yapıda olduğunu göstermekteyse de, amilin fenotipik olarak CTR'lerden farklılık gösteren yüksek afinite reseptörlerine etki etmektedir.

Kalsitonin osteoklastların yüzeyinde yerleşen CTR uyararak, kemik resorpsiyonunu inhibe etmektedir (Copp *et al.*, 1962; Copp, 1992). Bu etki osteoklastların yüzeyinde yer alan bir 7-transmembran reseptörü olan CTR'nin aktivasyonunun bir sonucudur. CTR aktivasyonu adenilsiklazı uyarmakta ve bu osteoklastik kemik resorpsiyonunda bir azalmaya yol açmaktadır (Reynolds, 1968; Kallio *et al.*, 1972, Chambers and Moore, 1983; Feldman *et al.*, 1980, Chambers and Dunn., 1983). İnsan CALCR geninin en az altı splicing varyantı vardır ve bunların ikisi CTR-1 ve CTR-2 olarak bilinen proteinlerle sonuçlanmaktadır (Gorn *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1995; Sexton *et al.*, 1999; Albrandt *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1997). CALCR geninin 8. ekzonunun diferensiyel splicingi CTR-1'de CTR-2'ye oranla ilk intraselüler lupta 16 amino asitlik bir insertle sonuçlanır. Bu kemik resorpsiyonun inhibisyonundan sorumlu olduğu düşünülen CTR-2 ile etkileşimidir. Kalsitoninin kemik resorpsiyonunu inhibe etme yeteneği post-meneposal osteoporosis (Avioli, 1998, Halkin and Reginster,1998; Wallach *et al.*, 1977), Paget's hastalığı (DeRose *et al.*, 1974; Douglas *et al.*, 1971; Shai *et al.*, 1971) hiperkalsemi gibi metabolik kemik hastalıklarında kalsitonin kullanımının onaylanmasını sağlamıştır (Auerbach *et al.* 1985).

Kemik mineral yoğunluğu ile kırılma ve osteoporoz insidansı ile kemik kaybı oranı arasındaki ilişki araştırılmıştır (Moldawer *et al.*, 1965; Huff and Sadler, 1997; Aloia *et al.*, 1996; Luckey *et al.*, 1996; Dennison *et al.*, 1998). Bu çalışmalarda aynı zamanda demografik popülasyonlar arasında gözlenen farklılıkları karakterize etmek için etnik parametreler de ele alınmıştır. Son zamanlarda, CALCR gibi aday genler kullanarak yapılan çalışmalar, osteoporoz gelişiminde bireyin risk durumunu değerlendirmede kullanılmıştır. CALCR genindeki tek nükleotid polimorfizmi kodlama bölgesinde meydana geldiği için büyük ilgi toplamıştır. Bu polimorfizm CTR-2 olarak bilinen, CTR'nin kısa formunun 1340. nükleotid pozisyonunda

meydan gelen timin (T) sitozin (C) baz değişimidir. 447. kodonun üçüncü pozisyonundaki C/T baz değişimi sonucunda lösin yerine prolin kodlanmaktadır. Nükleotid 1340 ve kodon 447, CTR-1 olarak bilinen CTR'nin uzun formundaki 1377. nükleotide ve 463. kodona karşılık gelmektedir.

Bu genin sıklığının bilinmesi osteoporoz başta olmak üzere, böbrek taşı oluşumu riski için bir belirteç olarak kullanılabilmesi, bakımından önem taşımaktadır. CTR lokusunda tanımlanan bu polimorfizmin Aydın ilindeki sıklığı bilinmemektedir. Sağlıklı Aydın populasyonunda bu lokustaki genotip dağılımları ve alel sıklıklarının bilinmesi, yukarıda adı geçen hastalıklar için bireylerin risk durumlarının değerlendirilmesi ve gerekli koruma önlemlerinin alınması için son derece önemli olacaktır. Bu sağlıklı bireylerden saptanan genotip ve alel sıklıkları, daha sonra çeşitli hastalıklarla bu gen ilişkisi araştırılırken, kontrol grubu olarak kullanılacaktır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. RESEPTÖR ÖZELLİĞİ

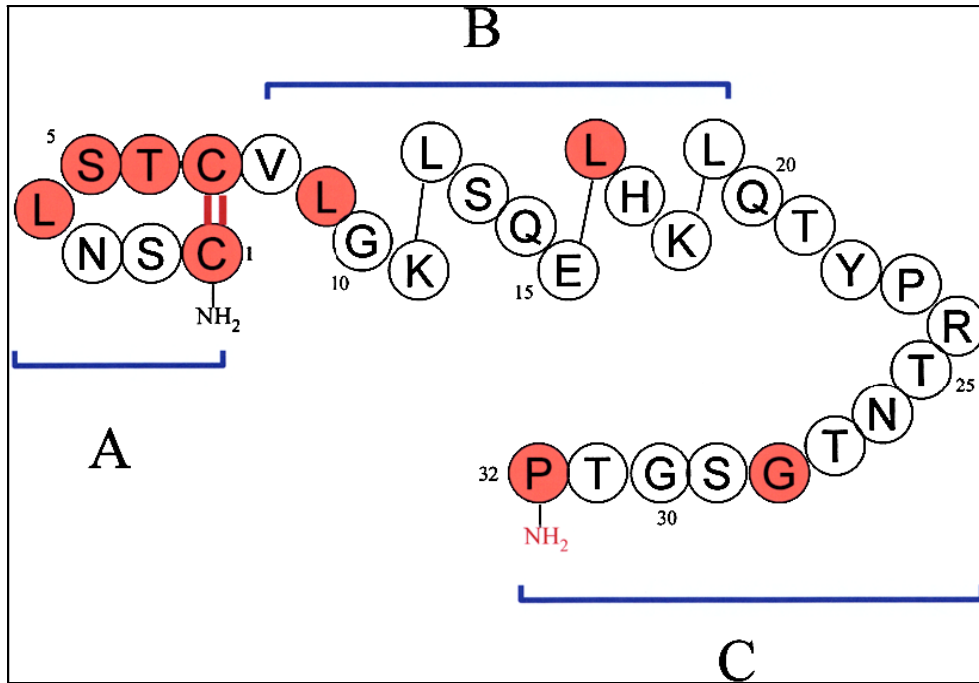
Kalsitonin reseptörleri kalsitonin peptitler için genel olarak somon balığı CT'si (sCT) ≥ domuz CT (pCT)'si ≥ insan CT'si (hCT), şeklinde yüksek derecede benzerlik gösterirken, ilgili peptit amilini CGRP ve adrenomedullin için daha düşük derecede benzerlik göstermektedir (Sexton *et al.*, 1999). Daha önce de anlatıldığı gibi, CTR gen ürünü farklı derecede benzer amilin reseptör tiplerini meydana getirmek için ferdi RAMP'larla da etkileşimde bulunmaktadır (Christopoulos, *et al* 1999; Muff *et al.*, 1999).

En yaygın biçimde tanımlanmış kemirgen kalsitonin reseptör (rCTR) ve insan kalsitonin reseptör (hCTR) izoformları (sırasıyla C1a ve I1) CT peptitlere yanıtta benzer göreceli potansiyellere sahip olmakla birlikte, mutlak potansiyelerde farklar ortaya çıkmaktadır. Klonlanmış hCTR ile etkileşimde, hCT 1-sCT cAMP üretiminde eşit potansiyellere sahipken, hCT <sup>125</sup>I-sCT ile kıyaslandığında 3 ile 10 kat daha zayıf bağlanma göstermektedir (Houssami *et al.*, 1995). Kemirgen reseptöründe ise farklı olarak hCT'nin, cAMP üretimi yaklaşık 10 kat ve bağlanması, <sup>125</sup>I-sCT ile karşılaştırıldığında 100 ila 1000 kat daha zayıftır (Houssami *et al.*, 1995). Bağlanma profilleri ve antagonist etkideki farklılık, muhtemelen alışılmadık dışında <sup>125</sup>I-sCT özelliklerinden dolayıdır ve <sup>125</sup>I-sCT bağlanma profillerine göre esas bir antagonistik –radioligant gibi davranır. Türler arasındaki bu farklılıklar esas olarak yapısal farklılıklardan kaynaklanmakta olup, N terminal (Nt')nin bağlanma bölgesi ile reseptör gövdesindeki büyük ayrışma bu farklılıkta etkili olabilir.

Domuz CTR (pCTR) analizi sonucunda, amilin yüksek afinite ve etkinlik gösterirken, hCT'nin reseptöre daha düşük bir afinite gösterdiği ortaya çıkmıştır (Houssami *et al.*, 1994). Aslında pCTR fenotipi RAMP'la oluşturulmuş amilin reseptörüne çok daha benzerdir. Bu da ya reseptörün asıl yapısının rCTR veya hCTR'nin RAMP'lar ile heterodimerleştirilmiş şekline yakın olduğunu ya da klonlanmış reseptör çalışmasında kullanılan hücre serilerinin genetik olarak

açıklanmış çok düşük seviyeli RAMP'larla kuvvetli bir etkileşim içinde olabileceğini göstermektedir (Houssami *et al.*,1995; Lin *et al.*, 1991).

CT peptit dizileri ve yapısı üzerine yapılan birçok çalışma sCT ve hCT'nin CTR'ler ile (özellikle rCTR veya hCTR ile) kuvvetli bir ilişkinin olduğunu göstermektedir (Şekil 2.1). Otuziki amino asitten oluşan CT peptitinde 1. ve 7. amino asitler arasındaki ilmek ve 8. ile 22. amino asitler arasındaki  $\alpha$ -heliks yapı disülfid bağları ile oluşmaktadır ve 32. pozisyonda tamamen korunmuş prolin amid bulunmaktadır.



Şekil 2.1: Somon balığı CT amino asit dizisinin şematik diyagramı. A; Amino terminal amino asitler 1-7, sistein 1. ve 7. sisteinler arasında bir disülfid bağıyla bağlı bir ilmek oluşturur. Bu bölge CT peptitlerinin antagonist aktivitesi açısından kritiktir. B: amino asit 8 – 22 bir amfipatik  $\alpha$ -sarmalını oluşturur ve yüksek afiniteli bağlanma için  $\alpha$ -heliks sekonder yapısı önemlidir. C; 32. pozisyondaki C-terminal prolin amid peptit aktivitesi için çok önemliken, C-terminal rezidüleri 22-32, somon balığı CT'si tarafından gösterilen yüksek bağlanma affinitesi açısından kritiktir. Gölgeleştirilmiş rezidüleri CT peptitleri arasında çok kuvvetli korunmuş amino asitleri göstermektedir.

hCT çok daha zayıf sekonder bir yapıya sahipken, kemikli balık CT'leri (sCT gibi) lipit varlığında  $\alpha$ -heliks oluşturmak için kuvvetli bir eğilim gösterir (Epanand *et al.*, 1985; Siligardi *et al.*, 1994). Antagonist etki Nt 1-7 amino asitlerine bağlıdır. Bu bölge küçültüldükçe, önce kısmi antagonist daha sonra antagonist peptitlerin oluşmasına neden olur (Feyen *et al.*, 1992; Pozvek *et al.*, 1997). sCTlerde disülfid bağları antagonistlik için gerekli değildir, fakat hCT'de bu bölgenin doğrusallaştırılması, potansiyeli azaltır (Orlowski *et al.*, 1987). hCT'nin zayıf olan sekonder yapısıyla ilişkili 8-16 bölgesindeki heliks oluşumu bu konuda önemli gibi gözükmektedir. 12. konumda alanin ile lösinin yer değiştirmesi, sCT'nin aktivitesini azaltırken, hCT'de bunun tersi bir yer değişikliği afinitiyi arttırmaktadır (Epanand *et al.*, 1990). Simerik hCT/sCT peptit analizleri, 22. ve 32. amino asitlerinin sCT'nin rCTR veya hCTR'ye olan yüksek afinitesi için en kritik bölüm olduğunu göstermiştir (Houssami *et al.*, 1995; Hilton *et al.*, 2000). C-terminal prolinin amidasyonu da peptitlerin kuvvetli bağlanmaları için mutlaka gerekmektedir. 13 – 16. konumundaki amino asitler, sCT'nin yüksek afiniteli bağlanması için gerekli olmamasına karşın, temel olarak sCT'nin kemirgen veya hCTR'lerde geri dönüşümü zayıf olan bağlanmasından sorumludurlar.

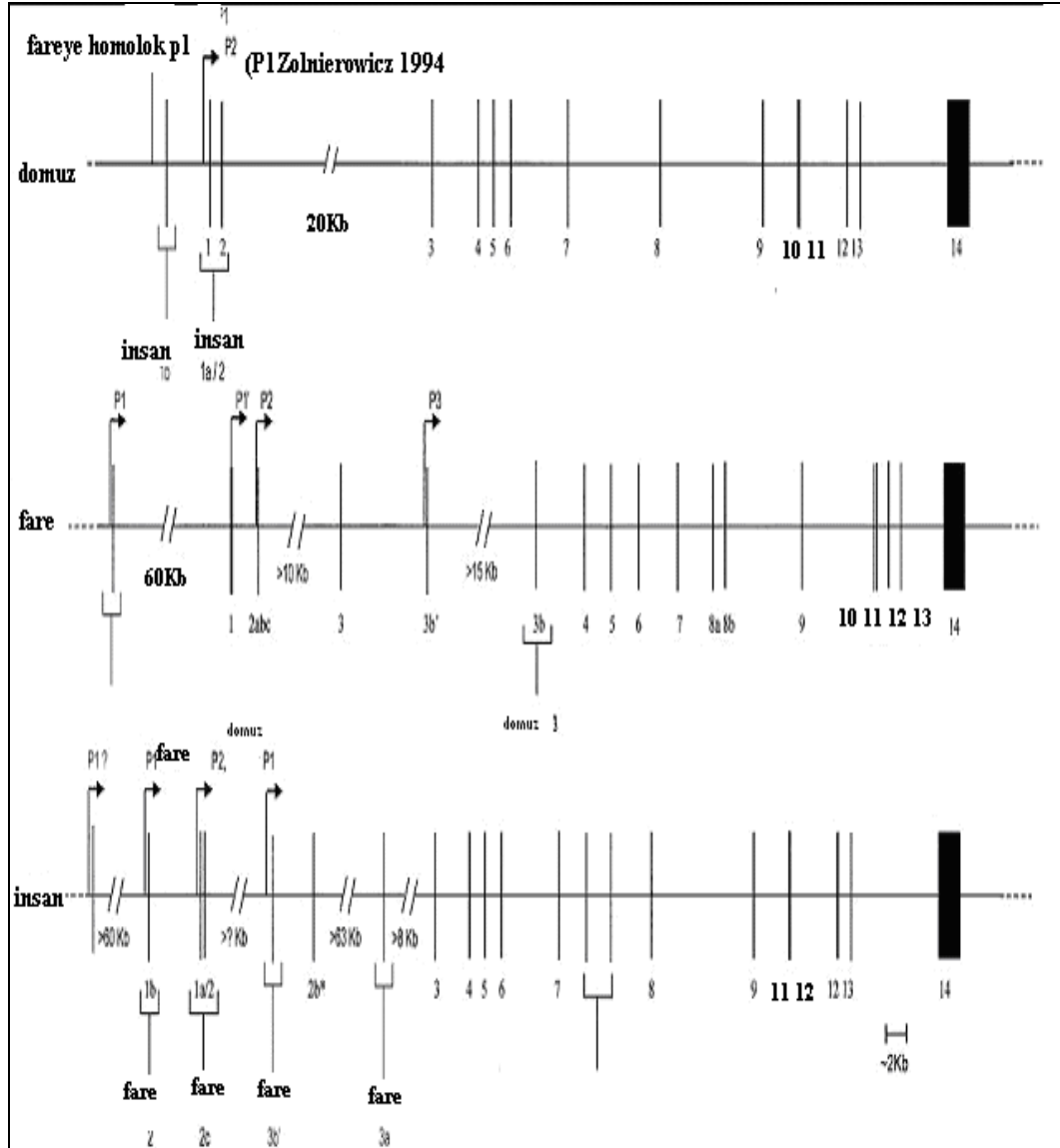
NMR çalışmaları çözücü ortama bağlı olarak farklı modellerin olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Metanol içindeki peptit uzun bir yapı göstermezken, trifloroetanol veya sodyumdodesil sülfat içinde, C-terminalli 10 amino asit peptit merkezine doğru geriye katlanmaktadır. Bu iki yapı CT'nin reseptörlerine bağlanması ile ilgili olabilir. paratiroid hormonu ve PTH1 reseptörü arasındaki etkileşim için sundukları modelde olduğu gibi, sCT'de reseptörüne ilk bağlanması sırasında doğrusal bir yapı göstermiş olabilir (Piserchio *et al.*, 2000). Ancak bunu takiben, reseptör peptit, çok daha katlı bir yapıyı benimseyerek, bağlanmanın geri çözünürlüğünün daha zayıf olmasına yol açacak yapısal bir değişim geçirebilir.



## 2.2. GENOMİK ORGANİZASYON

İlk karakterize edilen CTR geni pCTR'sidir ve 9q11-q12 kromozom bantlarının haritası çıkarılmıştır (Zolnierowicz, *et al.*, 1994). Yaklaşık 70 kb uzunluğunda olan on dört ekzon tanımlanmıştır (Şekil 2.2). Gen, 2 tam ekzon ve ilaveten 30 nükleotitten oluşan üçüncü bir ekzon ve kodlanmayan 5' bölgesini içermektedir. Ekzon 3, geride kalan nükleotitler sinyal peptidi ile hücre dışı Nt bölümünü (4-6) kodlayan diğer üç ekzonu kodlamaktadır. Sonraki yedi ekzon transmembran (7-13) alanlarını ve ilmek bölgelerini, son ekzon (14) hücre içi C-terminal kuyruğunu ve 3' kodlanmayan dizi kısmını kodlamaktadır (Zolnierowicz *et al.*, 1994) pCTR geni tanımlandıktan hemen sonra, rCTR'si klonlandı ve 6. kromozomun yakın bölgesinin haritası çıkarıldı (Yamin *et al.*, 1994) ve bu sırada 7q21.3 kromozomunda bulunan hCTR geni tanımlandı (Albrandt *et al.*, 1995). Bu bölgeler domuz geninin 9q11'i ile syntenictir. Beklenildiği gibi, hCTR geni domuz genine de büyük benzerlik göstermekte, fakat bazı farklılıklar içermektedir. hCTR'de tanımlanmış olan 16 amino asit dizilimiyle kodlanmış 48 nükleotid ekzonu, hCTRİİ-izofomunda da bulunmakta olup, ayrı bir ekzonu kodlamaktadır (Albrandt *et al.*, 1995). Bu, pCTR geninin sekizinci ekzonunda alternatif bir bağlanma alanının kullanımından ortaya çıkan pCTR izoformlarından farklıdır (Zolnierowicz, *et al.*, 1994). hCTR geninde lop 1'de bir durdurma kodonunun birleşimine yol açan ilave bir küçük ekzon da bulunmaktadır (Moore, *et al.*, 1995).

Klonlanmış pCTR geni, gen ekspresyonunda transkripsiyonun düzenlenmesi çalışmalarında ilk model olmuştur. İlk RT-PCR çalışmaları P1 olarak adlandırılan transkripsiyon başlangıç alanında yukarıya doğru yaklaşık 300 bç'lik bir promotor bölgeyi ortaya çıkardı (Zolnierowicz, *et al.*, 1994 ). Sonraki analizler bu bölgenin lusiferaz reseptör geni ekspresyonunu sürdürmek için yeterli, transkripsiyon aktivitesinin büyük kısmından sorumlu 5' ~100 bç'lik bir bölge olduğunu gösterdi. Tahmin edilen domuz promotorlarının *in vivo* konformasyonları, transgenik farelerdeki promotor dizininin 2.1 Kb'lık bölümünün,  $\beta$ -galaktosidaz reseptör genine transkripsiyonu için kullanılmasıyla başarılıdır.



Şekil 2.2: Domuz, kemirgen ve insan geni ekzon bölgelerinin intron/ekzon organizasyonu ölçeklemek için değildir. Kompak olması için, her bir gen seçilen bu bölgelerin yaklaşık uzunluklarıyla birkaç intronik bölgede kırılır (//). Ölçek çubuğu kırılmayan intronik bölgelerin yaklaşık uzunluğunu göstermektedir. Ekzonlar dikey çizgilerle gösterilmekte ve numaralandırılmaktadır. Siyah ekzonlar, griyle çizilen diğer türlere ait karakterize edilen ekzonlara homolog olan dizilerdir. Gösterilen oklar promotor bölgeleri tanımlamaktadır, siyah oklar promotorleri karakterize etmektedir, ve gri oklar diğer türlerde tanımlanan promotorlere homolog olan bölgelerdir (Nishikawa *et al.*, 1999).

Tahmin edilen P1 promoter bölgenin tamamını içeren bu fragman,  $\beta$ -galaktozidaz ekspresyonunu, beyin ve testisler gibi CTR ekspresyonu bilinen bölgelerde olduğu gibi, daha önce karakterize edilmemiş meme bezi ve kıkırdak gelişimindeki CTR gen ekspresyonuna yönlendirmiştir. Bu promotorun gelişimsel düzenlenmesi erişkin hayvanlarda, embriyonik dokularda görüldüğü kadar belirgin bir şekilde görülmemiştir. Bununla birlikte, CTR gen ekspresyonun iyi tanımlandığı kemik ve böbrek gibi diğer dokularda da hiç bir promotör aktivitesi tanımlanmamıştır. O zaman bu fragmanın bu dokularda transkripsiyonunun olması için gerekli olan bütün DNA dizilerini içermesi mümkün değildir. Daha sonraki RT-PCR incelemelerinde yaklaşık olarak 1 Kb olan ve P2 olarak adlandırılan ek bir transkripsiyon başlatıcı ikinci bir promotör tespit edilmiştir (Hebden *et al.*, 2000).

BLAST analizleri domuz ve kemirgen CTR genlerinin ikisinde de homolog P1 bölgelerinin olduğunu göstermiştir. Bu da türler arasında korunmuş bir promotor olduğunu düşündürmektedir (Anusaksathien *et al.*, 2001). hCTR geninin 4.9 Kb'lık fragmanını, transgenik hayvan deneylerinde CTR gen promotor bölgesinin retina kornea arka ganglionları, kol ve bacak kaslarındaki promotor bölgeleri ile yaklaşık %82'lik bir homoloji gösterirken, böbrek ve osteoklastlarda herhangi bir ilişki göstermemiştir (Jagger *et al.*, 1999). Buna ek olarak, dokuya özgü promotorların varlığı kemirgenlerin CTR geninde doğrulanmıştır.

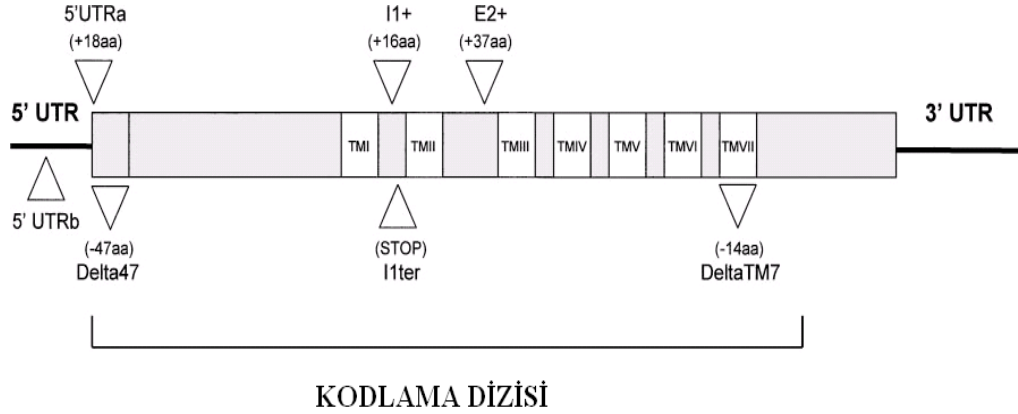
rCTR geninin ekspresyonunda en az 3 promotor görev almaktadır (Anusaksathien *et al.*, 2001). Domuz P1 promotoruna homolog bölgeler mevcut olup, bu bölgeler ekzon E2a'nın transkripsiyonunu sağlamaktadır (Şekil 2.3). Transgenik farelerin böbreklerinde, kemirici promotorların hiç bir aktivitesi saptanmazken, geçici olarak transfekte edilmiş böbrek hücre serilerinde aktivite görülmüştür (Anusaksathien *et al.*, 2001). Daha önce de bahsedildiği gibi, bu domuz promotor fragmanında görülmüştür (Zolnierowicz *et al.*, 1994). Bu yüzden *in vivo* çalışmalarda alınan sonuçlar, bu promotorların *in vitro*'daki gerçek gen ekspresyonuna benzemeyebilir. P3 olarak adlandırılan bir başka kemirgen promotoru transkripsiyon başlangıcını, özellikle E3b<sup>1</sup> fare ekzonunda düzenlemektedir. Daha önce, hCTR/pCTR genlerinde tanımlanmamış olmasına rağmen hCTR geninde hem ekzon 3b hem de promotor bölge yüksek derecede korunmuştur (Şekil 3.1). Bu promotor fare böbrek hücresinde

eksprese edilmezken, tavuk osteoklastlarında aktif olması promotörün osteoklastlara özgün olduğunu düşündürmektedir. Bunun ötesinde, RT-PCR uygulamalarında bu promotörün spesifik olarak fare osteoklastlarında kullanılabileceği gösterilmiştir (Anusaksathien *et al.*, 2001). Son fare promotörünün diğer promotör bölgelerden 65 kb'dan daha büyük olduğu düşünülmektedir. Bu promotörün mevcut genomik klonlardan tanımlanamayan dizileri RNaz koruma deneyi ile gösterilmiştir. Bu yüzden bu son promotörün yeri tam olarak tanımlanamamıştır, fakat büyük olasılıkla çok uzak promotörler ve ileri sekanslar diğer türlerin CTR geninde vardır ve bununla benzerlik göstermektedir. Farelerde yapılan RT-PCR analizleri, bu iki promotörün ve P2 (tanımlanmış porcine promoter'e benzer ) olarak adlandırılan diğer promotörün beyin, böbrek ve osteoklastlarda kullanıldığını göstermiştir.

### **2.3. RESEPTÖR SPLİS VARYANTLARI**

Kemirgen beyni süspansiyonlarındaki ilk çalışmalar çeşitli CTR izoformlarının varlığını göstermiştir (Nakamura *et al.*, 1997). Reseptör klonlama, kemirgen CTR'sinin splis varyantlarını saptayarak, bu reseptör heterojenitesinin moleküler temelini oluşturmuştur. (Albrandt *et al.*, 1993). Bunlar tahmin edilen ikinci hücre dışı bölgedeki 37 aminoasitlik bir eklentinin yokluğu ya da (C1a) varlığına (C1b, E2t) göre farklılaşan iki reseptör izoformunu (C1a, C1b) meydana getirmek için primer RNA kopyasının alternatif bağlanmalarından ortaya çıkmaktadır (Sexton *et al.*, 1993). İnsanlarda bir C1ab eşdeğeri açıklanmamasına rağmen fare reseptörü için eşdeğer izoformlar mevcuttur. rCTR'sinin RT-PCR analizi 5' nakledilmemiş bölgenin (UTRler) değişmesine olanak vererek genin 5' bölgesinde farklı bağlanmalardan ortaya çıkan en az yedi farklı mRNA izoformu olduğunu göstermiştir. Bu karışıklığın bir kısmı yukarıda anlatıldığı gibi en az üç farklı promotörün kullanılmasından kaynaklanmaktadır (Anusaksathien *et al.*, 2001).

Reseptör bağlanması için şimdiye kadar en yaygın olarak hCTR çalışılmıştır ve en az altı splis varyant şekli tanımlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 2.3: CTR genlerinin alternatif bağlanmasını gösteren doğrusal şema

5' UTR (5'UTRa, 5'UTRb) sınırları içinde en az iki splis varyantı mevcuttur (Gorn *et al.*, 1995). Bu şekiller fare reseptöründe görüldüğü gibi alternatif promotor kullanımıyla ilişkili olmasına rağmen, hCTR geni kopyalamasının bu durumu ve mRNA bağlanması ciddi şekilde araştırılmıştır. Ek splis varyantlar reseptör kodlama bölgesinde tanımlanmıştır; ilk 47 amino asitin kaybına sebep olan 125 bç'lik silinmenin olduğu Nt'de (Albrandt *et al.*, 1995) ve tahmin edilen interselüler loop 1'de (I1) (Gorn *et al.* 1992) de iki alternatif splis varyant olayı olabilir. I1'in bağlanma şekillerinin en yaygını, bu alana 16 amino asit eklentisinin sokulmasına sebep olmaktadır (I1+) (Gorn *et al.*, 1992). Fakat reseptör protein sonlanmasına neden olacak alternatif küçük bir ekzon da bu bölge içine bağlanabilir (I1ter) (Moore *et al.* 1995). hCTRI1+ /- varyantları en yaygın şekilde, reseptörleri ekspresse eden tüm dokularda meydana gelen I1'lerle ifade edilir. Ayrıca yaygın olmamakla birlikte I1+ bağlanma şekli plasentada, yumurtalıkta, akciğerde ve kemik iliğinde tanımlanmış yüksek mRNA seviyeleriyle birçok dokuda görülmektedir (Kuestner *et al.*, 1994). Delta 47 varyantının normal ekspresyonu daha az yaygındır (Albrandt *et al.*, 1995). hCTR geninin 5' sonundaki alternatif bağlanmanın I1 alanındaki

bağlanma ile ilişkisinin derecesi ciddi anlamda araştırılmamıştır. II 'de on altı amino asitlik eklenti sonucunu doğuracak alternatif bağlanma pCTR'sinde gerçekleşir, ancak yukarıda tartışıldığı gibi, bu eklentinin meydana getirilmesi genin sekizinci ekzonundaki alternatif bağlanmadan ortaya çıkmaktadır (Zolnierowicz *et al.*, 1994). İnsan dışındaki türlerde II' ter bağlanma şeklinin varlığını ispatlayacak kanıt henüz mevcut değildir.

İlk klonlanan hCTR bir II+ şekli idi (Gorn *et al.*, 1992) ve bu hCTR1 olarak, daha yaygın II varyasyonu ise hCTR2 olarak adlandırıldı. CTR splis varyantlarının fonksiyonel tanımlanması ya veri göndermede (II+) ya ligant bağlamada (E2+, delta47) ya da her ikisinde de reseptör proteininde eklenti ve çıkarma oluşuna göre değişikliklere yol açabilir. Tavşan reseptör izoformunun yedinci geçiş membran alanında 14 amino asit eksik olan bir durumda reseptör yapısındaki değişikliklerin reseptör görevini ne derece etkilediği ciddi anlamda araştırılmamıştır. Fakat bütün önemli izoformlar hücre yüzeyinde ifade edilebilmektedirler. E2+ varyasyonunun analizi zayıf  $\alpha$ -spiral ikincil yapı gösteren kalsitonin peptitleri için bir bağlama benzerliği kaybı göstermektedir. Fakat hem eklenti-pozitif hem de eklenti-negatif hücre içi kalsiyum ve inostol fosfat (IP) hidrolizinin kullanımı ve cAMP üretimi boyunca sinyal verebilirler (Houssami *et al.*,1994). Aksine, II+ varyasyonu, peptitler için II- varyasyonuna eşdeğer bağlanma gösterir, fakat azaltılmış cAMP üretimi ve hücre içi kalsiyum hareketinin kaldırılması ile verimliliği iki katına çıkaran fark edilir şekilde değişmiş G proteini sergiler (Moore *et al.*,1995). Üstelik II+ izoformunun antagonist etkili internazilasyonu yok edilmiştir (Moore *et al.*,1995). Delta47 insan izoformu kalsitonin peptit benzerliğinde çok az bir azalma gösterir ve II-reseptörü verimliliği iki katına çıkaran aynı G proteinine sahiptir (Albrandt *et al.*, 1995). Tavşan delta TM7 reseptör izoformu, iki peptit eşit potansiyele sahip hale geldiği için sCT benzerliğinde daha büyük bir kayıpla sCT ve hCT için azalan bir benzerlik gösterir. Buna ek olarak bu reseptörün kalsiyum hareketine müdahale edebilirliğinde de kayıp vardır (Shyu *et al.*, 1996).

İnsan fizyolojisindeki reseptör splis varyantlarının önemi açıklanmaya devam etmektedir. Bununla birlikte hücre içi kalsiyum hareketliliği mitojen-aktiflenmiş proteinkinaz yolağı (mitogen-activated proteinkinase pathway (MAPK)) üzerinden

hücre çoğalması, kalsitonin aktivasyonu için önemlidir (Chen *et al.*, 1998). Aslında kalsitonin, hCTRI1'li hücredeki etkili antiproliferatif aktiviteden farklılaşarak hCTRI1+'lı HEK-293 hücrelerindeki çoğalmayı değiştirmede başarısız olmuştur (Raggatt *et al.*, 2000). Bu hücre hattında çoğalmanın engellenmesi hCTRI1'li hücrelerde olmayan MAPK aktivasyonu ile paralellik göstermektedir. Benzer şekilde kalsitonin ile embriyo seviyesindeki farklılaşmanın başlaması, hücre içi kalsiyumun serbest bırakılması ile ayarlanır. Bu da hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde CT hareketlerinin CTR bağlamasının kontrolüyle düzenlenebildiğini ifade eder. I1+ izoformunun ekspresyonu sinyal yolu ve reseptör regülasyonu gibi mekanizmalar, üreme dokularında önemli olabileceğinden insan plasentası ve yumurtalıklarında oldukça önemlidir (Raggatt *et al.*, 2000).

#### **2.4. PROKALSİTONİN (PCT)**

Kalsitoninin bir öncüsü olan PCT ise 116 amino asitten oluşan, molekül ağırlığı 13 KDa olan bir proteindir. PCT amino asit dizilimi CT ile aynıdır ve onun bir prohormonudur. PCT'nin nereden salgılandığı kesin olarak bilinmemekle birlikte, büyük bölümünün karaciğerden salgılandığı düşünülmektedir. PCT *in vitro* ve *in vivo* çok stabil bir proteindir ve aktif hormon olan CT'ye dönüşmez.

Sağlıklı insanların serumunda çok düşük bir miktarda PCT(< 0.1ng/ml) vardır. PCT başlangıçta CT ile çok karıştırılmıştır. CT ve PCT sentezi kompleks bir olaydır, öncü bir peptit olan 141 amino asitlik preprokalsitoninin translasyonu ile başlar. Hücre içi proteoliz ile önce 116 amino asitlik PCT, daha sonra da 32 amino asitlik CT üretilir. CT, kalsiyum metabolizmasını düzenlemek üzere dolaşıma salınır, yarılanma ömrü sadece birkaç dakikadır. PCT'in kalsiyum metabolizmasıyla doğrudan bir ilişkisi olmamakla beraber, PCT'nin oldukça yüksek değerlere ulaştığı sepsis ve septik floklu hastaların önemli bir kısmında aynı zamanda hipokalsemininde olması dikkat çekicidir. Tiroid bezinin medüller kanserinde kalsitoninle beraber PCT düzeyi de artar. Fakat ciddi bakteriyel enfeksiyonlarda PCT seviyesi yükselir fakat kalsitonin seviyesinde bir değişme olmamaktadır (Poyrazoğlu *et al.*, 2002).

## 2.5. KALSİTONİNİN ETKİLERİ

Hormonla ilgili *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların çoğu laboratuvarında hayvanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Birçok araştırmacı çalışmalarında somon ve yılan balığı kullanmıştır ve fizyolojik değil farmakolojik dozlar uygulamışlardır. Yüzlerce çalışmaya rağmen CT'nin fizyolojik rolü kesin değildir. Etkileri kanda, kemikte, merkezi sinir sisteminde, solunum sisteminde, gastrointestinal sistemde, üreme sistemi ve böbrekte görülmektedir.

CT laboratuvar hayvanlarında serum kalsiyumunu azaltmaktadır. İnsan CT'si sıçanlara verildiğinde peptit zincirinin kısalmasıyla veya disülfid halkasının açılmasıyla karboksil-terminal amid grubunun delesyonu gözlenmektedir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda serum kalsiyum üzerine CT'nin etkisi kullanılan hormonun türüne, dozuna, veriliş şekline göre değişmektedir. Normal kişilerde bazı çalışmalarda CT hipokalsemiktir. Fakat genellikle serum kalsiyum seviyelerini etkilemez (Alma *et al.*, 1993).

### 2.5.1. Kemik Dokuya Etkileri

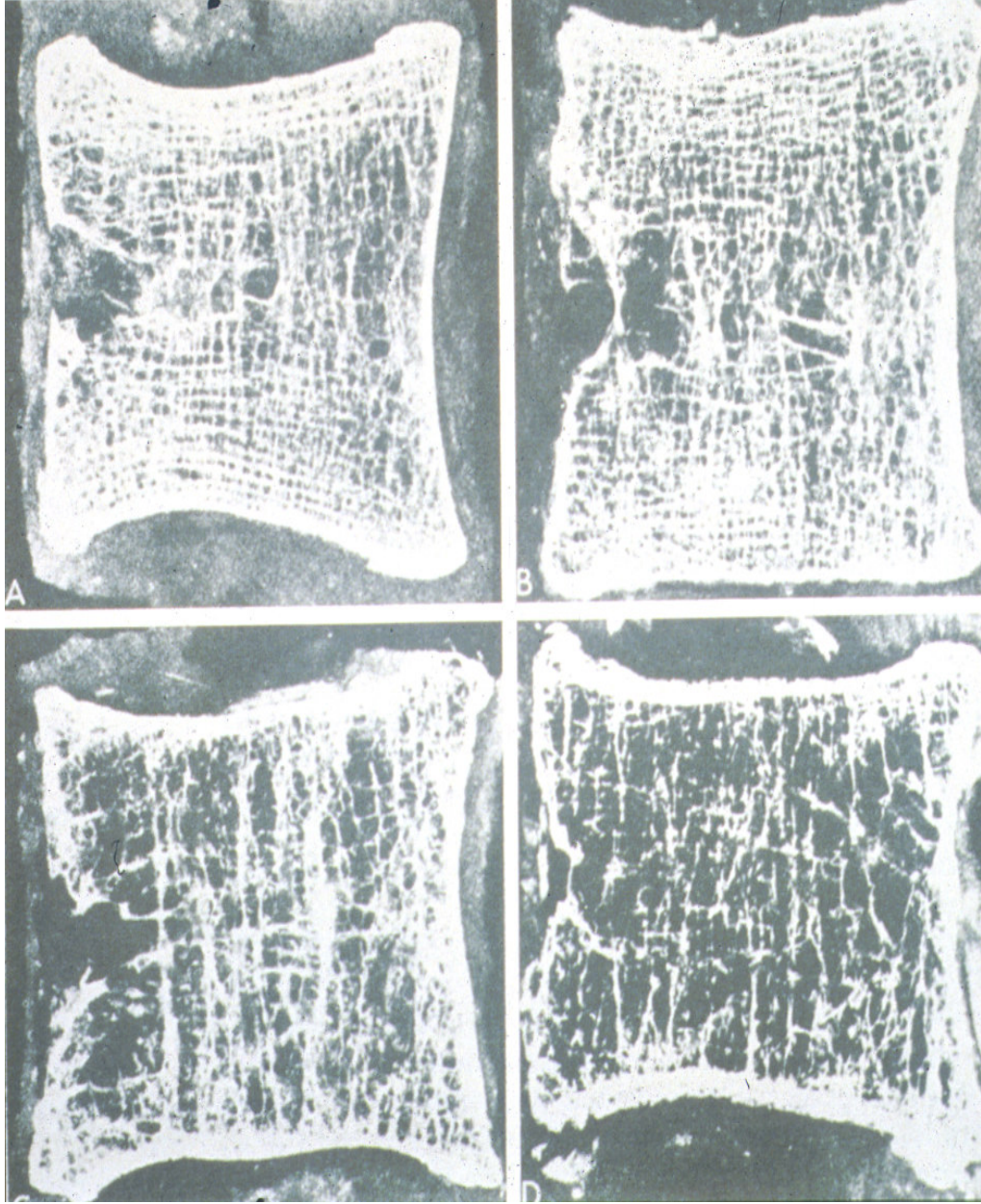
Olgunlaşmamış CT iskelet homeostazisinde önemli rol oynar. Kemik resorpsiyonunda anahtar modülatör rolü çok önemlidir. Hücre motiletisinin hareketsizliğini teşvik ederek kemik resorpsiyonunu engeller (Q etkisi). Bu bir dakika içinde gerçekleşir ve bu olayı osteoklastların geri çekilmesi izler (R etkisi). Psödopodların geri çekilmesi sonucunda küçük, halka şeklinde, yuvarlak hücreler ortaya çıkar. Hem cAMP (siklik adenzin monofosfat) hem de intrasellüler Ca, Q ve R etkilerinde ikinci habercilerdir (Alam *et al.*, 1993).

CT osteoklastların diğer bileşenlerini de engeller (asit fosfatın serbest bırakılması gibi). Karbonik anhidraz 2 osteoklastta yüksek seviyede ekspresyon olur ve osteoklastların kemik resorptif aktivitesinde rol oynar. CT doza bağımlı olarak bu enzimin ekspresyonunu azaltır. Ayrıca osteoklastlar sitosollerinde fokal adhezyon kinazı büyük ölçüde içerirler. Bu tirozin kinaz osteoklastlar ve matriks arasındaki etkileşime yardım ediyor olabilir. Ca, bu kinazı engeller. Tavşanda kemik matriks



proteini olan osteopontinin ekspresyonu (bu proteinin görevi osteoklastların kemik matriksine bağlanmasını sağlamaktır) engelleniyor olabilir. Bu nedenle farklı mekanizmalarla olgun CT osteoklastik aktiviteyi azaltmaktadır. Kemikteki aktivitenin azalmasının yansıması olarak CT üriner hidroksiprolinin salınımını azaltır. Hormon osteoproteogerin-osteoproteogerin bağlantısıyla etkileşimde gibi görünmektedir. Bazı bilgilere göre CT osteoblastlar üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir. Hormon insan osteoblast hücre kültürlerinde IGF-I ve IGF-II'nin konsantrasyonlarını artırır. Ayrıca TNF-alfa üretimini engeller (Alam *et al.*, 1993). D vitamini kemik sistemini etkiler. Bu vitaminle CT arasındaki etkileşimlerin anlaşılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok araştırmaya göre *in vivo* koşullarda insan ve sıçanlarda 1.25 dihidroksi vitamin D üretimini stimüle eder. Ayrıca 24 hidroksilaz enzim sistemi de (bu sistem rat barsağında vitamin D metabolitlerinin deaktivasyonunda etkilidir) CT tarafından etkilenmektedir. Sıçanlarda kalsiyum için artmış tubuler reabsorbtif kapasite, CT tarafından indüklenir. Bu D vitamininin eksik olduğu hayvanlarda körelmiştir (Alam *et al.*, 1993).

Genellikle hormon serum seviyesi erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Bazı araştırmacılar kadınlarda postmesoponal dönemde seviyesi premesoponal döneme göre daha az olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer bazı araştırmacılara göre ise daha yaşlı bayanlarda olgunlaşmış CT daha düşük seviyededir.



Şekil 2.4: Burada kemik mineral yoğunluğunun zamanla azaldığını gösterilmektedir A: Kemikteki yoğunluğun normal olduğu durum B:Mineral yoğunluğunun kenardan iç kısımlara ilerlediği durum C: Kemiğin her yanında yoğunluğun azaldığını gösteren durum D: Kırılma noktasına ulaştığı durum

### 2.5.2. Merkezi Sinir Sistemine Etkiler

CT,merkezi sinir sistemi (MSS) içersinde spesifik bağlanma bölgelerine sahiptir. CT'nin intraserebral enjeksiyonu sıçanlarda besin ve su alımını baskılar. Hormon ayrıca deneysel olarak hipotalamus ve talamusun spesifik bölgelerinde aktivitesini gerçekleştirerek vücut sıcaklığını arttırmaktadır. İnsanda somon CT'sinin yüksek dozları testosteronun, LH ve FSH'ın serum seviyelerini azaltmaktadır. Sıçanlarda CT, beyin serotonerjik sistemi aktive etmektedir. Ayrıca opioid sistemle de etkileşimdedir. Somon CT'nin migrenli insanlara verilmesi sonucunda beta endorfin seviyesi artmaktadır (Alam *et al.*, 1993).

### 2.5.3. Diğer Etkileri

Hormon bazal membranın yanında yer alan pulmoner nöroendokrin hücrelerin (PNE) içinde de bulunmuştur ve sıklıkla lümene doğru uzanmaktadır. Yeni doğanlarda bunlar gruplar halinde bulunur ve nöroepitelyal cisimcikler olarak adlandırılır. Trake ve larinkste benzer hücreler bulunmaktadır. CT, pulmoner olgunlaşmada ve patofizyolojide önemli rol oynamaktadır. CT kalsiyumun hücreler arası hareketlerini etkiler. CT kıkırdak büyümesini arttırabilir ve bronşların kondrogenezisini etkileyebilir. Hormon ayrıca diğer peptitlerle de etkileşimdedir.

İnsanlarda CT farmakolojik olarak gastrik asit ve pepsin sekresyonunu arttırır ve pankreatik amilaz ve de pankreatik polipeptit sekresyonunu azaltır. İnsan CT'si gastrin, insülin ve pankreatik glukagonun serum seviyesini düşürür. Serumdaki somatostatin seviyesini arttırır. Potasyum, sodyumklorit ve suyun ince barsaktan salınımını arttırır. Bu yüzden yüksek konsantrasyonlarda CT insan jejenum ve ileumundan su ve elektrolitlerin salınımını attırır. CT'nin fizyolojik dozları insanlarda kalsiyum ve fosfatın gastrointestinal absorpsiyonunu etkilemez.

Erkeklerde CT seminal plazmada venal plazmaya göre on kat daha yüksektir ki bu da genital sistemde üretildiğini göstermektedir. Seminal sıvıdaki CT yüksek moleküler ağırlıklarda bulunmaktadır.

CT hem uterusunda hem de plasentada meydana gelir. İnsanda plasental dokularda salgılandığı rapor edilmiştir. Sıçanlarda CT mRNA'sı implantasyon zamanında uterusun glandular epitel hücrelerinde bulunmuştur. Bu ekspresyon antiprogesterin drug mifepristone tarafından bloke edilir. Ayrıca progesteron bazı hayvanlarda uterusunda CT mRNA'sını uyarıcı etkiye sahiptir (Backer *et al.*, 1981).

İnsan plasentasında CT reseptörleri, annedeki sinsisyotrofoblastların fırçası kenarlarında ve fetüsün bazal plazma membranında bulunmaktadır. CT insan karyonik gonadotropik sekresyonunda arttırıcı bir etkiye sahiptir. CT reseptörlerinin intraplasental olarak bulunması, CT'nin implantasyonda, plasental fonksiyonunun düzenlenmesinde rolü olabileceğini düşündürür. İnsanda hamilelik döneminde serum CT' nin ölçümü kararsız sonuçları ortaya çıkarmıştır. Bu muhtemelen kullanılan antikorların (antisera) spesifitlerinin farklılığındandır. İnsan meme sütü immünoreaktif CT içermektedir. CT'nin mineral ve elektrolit konsantrasyonlarında modülatör olarak işlev gördüğü çalışmaya değer konulardan biridir (Backer *et al.*, 1981).

Böbrek CT'nin yıkıldığı ana bölgedir. Bu yıkımın çoğu hücre yüzey enzimi olan nötral endopeptidaz tarafından gerçekleştirilir (NEP). CT burada cAMP ve protein kinaz yollarında işlev görür. İnsanlarda CT'nin intravenöz yönetimi diüreyi indükler ve sodyumklorit, magnezyum ve de potasyum boşaltım oranını arttırır. Ürünler kalsiyum ve fosfat boşaltımını arttırır. Bazı türlerde (örneğin sıçan, maymun) CT kalsiyum ve magnezyum renal tübüler absorpsiyonunu uyarır. Fosfatın üriner boşaltımının CT tarafından uyarılması proksimal tübül içerisinde meydana gelir. hCT'nin yüksek oranı (olgun olmayan CT ) idrarla atılır. İdrar hCT seviyesi normal yetişkinlerde ve çocuklarda tespit edilmiştir. Bu oran karaciğer kanseri olan bazı hastalarda artış göstermektedir.

Gen ekspresyonunu ve CT salgılanmasını uyarıcı birçok ajan tanımlanmıştır. İnsanlarda intravenöz kalsiyum infüzyonu genellikle serum hCT'sini arttırır. Normal kişilerde hCT hipokalsimiyi indüklemesine rağmen serum devamlıdır. Hiper magnesemia tiroid bezinden hCT salınımını insanlarda indükler.

Sıçanın malign C hücresi ekstrasellüler kalsiyumda değişiklikler yaratarak sitosolik serbest Ca'nın yükselmesine neden olur. Bu sitosolik değişiklikler CT sekresyonunu artırır. Nonmaligantlarda bu etki daha az görülmektedir. Endojen hiperkalsemi insalarda serum hCT'sinin artışıyla ortaya çıkan bir durumdur (Backer *et al.*, 1981).

Hamsterlerde sigara dumanı serum hCT'yi arttırmaktadır (sigara nikotin içerdiğinden dolayı). Yani hamsterlerde serum hCT'yi arttırmaktadır. PNE hücrelerinde kolinerjiknikotein reseptörleri yer almaktadır. Yeni doğan hamsterların kültüre edilmiş PNE hücreleri nikoteine rağmen CT salgılmaktadır. Bu alkaloid hamsterlerde PNE hücrelerinin büyümesini uyarır. Katekolaminler CT sekresyonunda herhangi bir etkiye sahip değildir.

Dietilnitrozamin (kansere ajanı) hamsterlerde PNE hiperplazisini indükler ve CT'nin serum seviyesi artar, sonuçta hiperkalsitonemia meydana gelir. Hamsterlerin 3 ay süresince %60 oksijene maruz bırakılması akciğerlerde ve serumda CT seviyesini arttırmaktadır (muhtemelen PNE hücre hiperplazisine bağlı olarak) (Backer *et al.*, 1981).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma, kesitsel analitik bir çalışmadır. Örnek büyüklüğü, %95 Güven aralığında, prevalans=0.50 ve  $d= 0.05$  için 384 kişi olarak belirlenmiştir. Çalışma grubunun seçiminde çok aşamalı örnekleme kullanılmıştır. Aydın İli, merkez, batı, doğu, kuzey, güney olmak üzere beş bölgeye ayrılmış; bu bölgelerdeki nüfusların ağırlıkları örnek seçiminde esas alınmıştır. Son örnek büyüklüğü dizayn etkisi 1,5 alınarak 576 kişi olarak belirlenmiştir.

Sağlıklı populyasyondan kan örnekleri toplayabilmek için çalışma, Türk Kızılayı Aydın Kan İstasyonu donör çalışmaları aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Aydın Kan İstasyonu donör çalışmaları sırasında, kan vermek için gönüllü olan kişilerin sağlık bakıları istasyonun görevli hekimi tarafından gerçekleştirildikten sonra, sağlıklı kabul edilen gönüllülerle yüz yüze görüşülmüştür. Dışarıda bırakılma kriterleri, muayeneden sağlıklı olmama, her aileden bir kişinin rasgele seçilmesi olarak karar verilmiştir. Ancak bu kriterlerde başvuru yapan gönüllü olmamıştır. Kabul edenler, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurulu Başkanlığı tarafından XIII nolu karar ile onaylanmış olan, Bilgilendirilmiş Olur Metni ve Bilgilendirilmiş Olur Formu ile bilgilendirilmiş ve kendi rızalarıyla çalışmaya katılmıştır. Açıklanmasından sonra çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden yaklaşık 2.5 cc kan numunesi temim edildi.

Bu grup, aynı zamanda bir başka çalışmanın da örnek grubunu oluşturmuştur. Her iki çalışmanın, aynı kan örneklerinden çalışılabilmesi için hem Türk Kızılayı, hem de ADU Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı ayrı ayrı alınmıştır. Bu çalışmanın Etik Kurul onayı XIII nolu karar ile kabul edilmiştir. Bu çalışmaya dahil olan bireylerin coğrafik dağılımı Şekil 4.1 üzerinde gösterilmiştir.

### 3.2. PERİFERAL KANDAN DNA İZOLASYONU

Aydın Kızılay Kan İstasyonu Birimlerine kan vermeye gelen kişilerden, K<sub>3</sub>EDTA'lı steril tüplere (Venoject) 501 kişiden yaklaşık 2.5 ml periferel kan alındı. Kandan DNA izolasyonu PUREGENE DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı.

1.5 ml mikrofüj tüplerine 900 µl RBC (Red Blood Cell) lizis solusyonu ekleyip, üzerine, steril olan pipet uçlarıyla 300 µl kan eklendi, pipet uçlarını birinden diğerine geçerken kesinlikle karıştırılmamalıdır. Daha sonra oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra, yaklaşık 10-15 saniye altüst edilerek yada pipetaj yapılarak kanın tamamen homojen olması sağlandı. Tüpler daha sonra 13000–16000 g'de 20 saniye santrifüj edilerek akyuvarların çökmesi sağlandı. Lizise uğratıldıktan sonra alyuvarlar tüpün dibimde beyaz bir çökelek kıvamındadır, pellete dokunmadan içinden yaklaşık 10 µl kalıncaya kadar üst kısmı uzaklaştırıldı. Akyuvar hücre pelleti 10 saniye kadar vorteks edilerek parçalanmaları sağlandı. Üzerlerine 300µl Hücre Lizis Solusyonu (Cell Lysis Solution) eklenerek pipetaj ya da 10 saniye vorteks edilerek solusyon içinde homojenize olmaları sağlandı. Bu aşamadan sonra homojenatın tamamen lizis olmaları için 37°C'de 30-60 dakika inkübasyona bırakıldı. Eger tamamen homojenize olmamış ise 30 dakika beklenir. Hücre lizatı oda ısısına geldikten sonra, 100 µl Protein Çöktürme Solusyonu (Protein Precipitation Solution) eklendiğinde iki fazın oluştuğu göze çarpar ve tüpler 20 saniye vorteks edildi. Proteinler 13000-16000 g'de santrifüjleme yapılarak çöktürüldü. Tüpün dibine çökmüş olan koyu kahverengi protein pelletine dokunmamaya dikkat ederek, bu esnada herhangi bir temas DNA'nın proteinle kontamine olmasına neden olur Süpernatant, daha önceden içlerine 300 µl %100 izopropanol eklenmiş yeni steril tüpe aktarıldı. Örnekler dikkatli bir şekilde yaklaşık 50 defa altüst edildikten sonra 13000-16000 g'de santrifüj edildi. Bu aşama sonunda DNA toplu iğne büyüklüğünde lifli bir yapıya benzeyen beyaz pellet olarak gözlemlendi. Süpernatant, pellet kaybolmaması için dikkatle izlenerek tüpten uzaklaştırıldı ve tüpler kurutma kağıt üzerinde izopropanol tamamen uçuruldu. Üzerlerine 300 µl %70 soğuk etanol eklenen tüpler birkaç kez altüst edildi. Etanol ile temizlenen DNA son kez 13000-16000 g'de santrifüj edildi. Etanol DNA pelletinden çok dikkatli

olarak pipet yardımıyla tüplerden mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Temiz bir kurutma kağıt üzerinde yaklaşık 10 dakika beklenecek yada 37°C' etüvde alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Alkolden arınmış DNA örnekleri üzerine 100 µl TE (Tris-EDTA) tamponu ekleyip DNA'nın çözünmesi için 37°C'de bir gece inkübasyon edildi. DNA örnekleri çalışmada kullanılana kadar 4°C'de saklandı.

### **3.3. DNA KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ**

Kandan izole edilen genomik DNA, izolasyon sırasında meydana gelebilecek hasar oluşumu ve kontaminasyonu kontrol etmek için 1 µl kadar alınarak %1'lik agaroz jel elektroforezinden sonra etidyum bromür ile boyanarak UV altında görüntülendi.

DNA'nın miktarını saptamak için 40-50 kat seyreltme yapılarak, distile suya karşı 260 nm'de ve protein kontaminasyonuna bakmak için de 280 nm'de spektrofotometrik absorbans ölçümü yapılmıştır. Bu ölçüm değerleri ile aşağıdaki denklem kullanılarak yaklaşık DNA miktarları saptanmıştır:

DNA (µl/ml) = 260nm'deki Optik Dansite (Absorbans) x Seyreltme Katsayısı x 50  
Her absorbans (OD) 1ml'de 50µl çift iplikli DNA'ya karşılıktır. İzole edilen total genomik DNA'nın saflığını (protein ya da fenol kontaminasyonu olup olmadığı) saptamak için 280 nm'de de absorbans ölçüldü. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> oranı 1.60 ile 1.90 arasında olan DNA izole edildi.

Konsantrasyonları saptanan DNA örnekleri, stok kontaminasyonunu önlemek ve daha sonra yapılacak olan genotipleme ve uygun değerlerde standardizasyonu sağlayabilmek için 100ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir.



### 3.4. CTR LOKUSUNUN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENMESİ

#### 3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Her birey için hazırlanan total genomik DNA'dan CTR geninin C/T polimorfizminin bulunduğu 228 bç'lik bölgesi Masi *et al.*(1998)'de tanımlanan spesifik primerler (F:CTCAGTGATCACGATACTGTG-3', R:5'ATTCAGTGGAACCAGCGTTGG-3') kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Elde edilen PCR ürünlerini RFLP analizi yapmak üzere -20 °C'de saklandı.

Toplam 25 µl hacimde hazırlanan PCR reaksiyonu CTR gen fragmanının amplifikasyonu için optimum bileşenler çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: CTR gen fragmanının PCR reaksiyonunun bileşenleri

<i>Taq</i> polimeraz enzimi(5u/µl) (Fermantas)	0.1µl
10x <i>Taq</i> tamponu+KCl (Fermantas,)	2.5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM) (Fermantas)	1.5µl
dNTP (0.5mM) (Fermantas)	5µl
Forward Primer (10 mM) ( Bio basic)	0.3µl
Reverse Primer(10 mM) ( Bio basic)	0.3µl
DNA(100-150ng/ml)	1µl
Steril enjeksiyonluk su	14.3µl
Toplam hacim	25 µl

Hazırlanan PCR reaksiyonu PCR cihazı (EPENDORF) Çizelge 3.2'de verilen sıcaklık ve zaman profili uygulanarak CTR gen bölgesi amlifiye edildi.

Çizelge 3.2: CTR gen bölgesinin amplifikasyonu için uygulanan PCR programı

94 °C 5 dakika ilkde denaturasyon	1 döngü
95 °C 30 saniye denatürasyon	
55 °C 30 saniye bağlanma	35 döngü
72 °C 30 saniye uzama	
Son uzama 72 °C 10 dakika	1 döngü

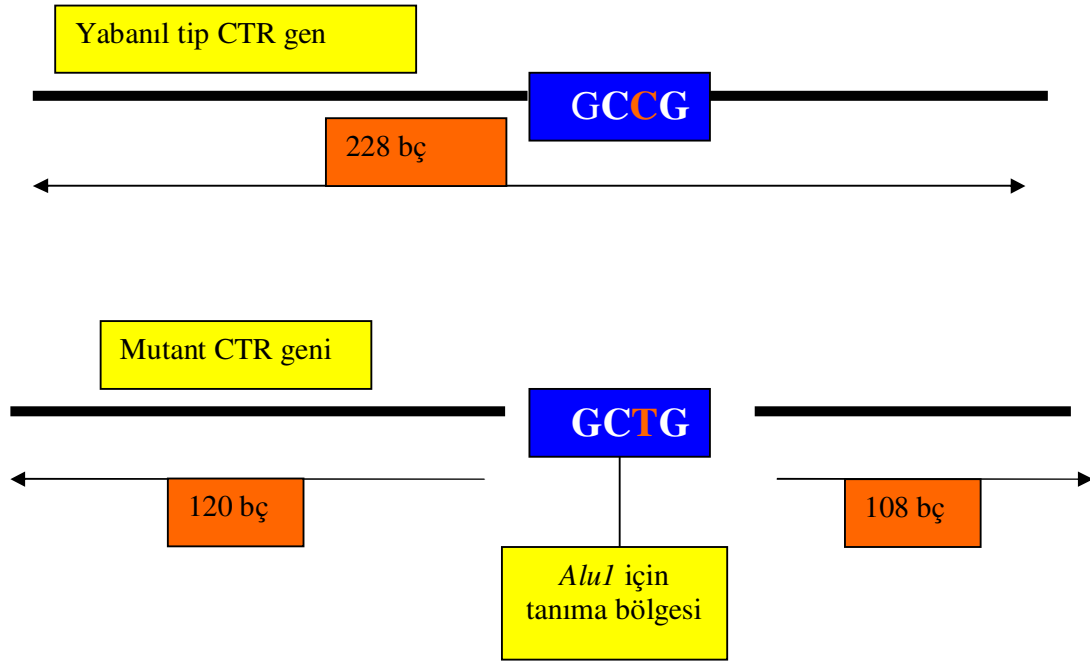
### 3.4.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm(RFLP) Analizi

Aydın popülasyonunda CTR gen mutasyon sıklığını belirlemek için RFLP metodu kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen PCR programı ile çoğaltılmış olan PCR ürünlerinin restriksiyon enzim kesim yerlerini, yani tanıma bölgelerini belirlemek ve genotipleme için Çizelge 3.1’de verilen reaksiyon ortamında restriksiyon sindirim gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3: PCR ile amplifiye edilen CTR gen bölgesinin restriksiyon sindirim reaksiyonu

10 X Tango tampon (Fermentas)	2,5 µl
<i>Alu</i> 1 enzim (10 U/ µl) (Fermentas)	0.1 µl
PCR ürünü	8.0 µl
Distile su	14.4 µl
Toplam	25.0 µl

Restriksiyon enzim kesimi için gerekli olan içeriği yukarıdaki şekilde belirledikten sonra, 1.5 ml’lik mikrofüj tüpüne koyulup ve ağızları parafilmle kapatılıp 37°C’ inkübatörde gece boyunca (en az sekiz saat) inkübe edildi. Restriksiyon sindirim ürünleri %3’lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek restriksiyon sonucu oluşan DNA fragmanları saptanarak bireylerin genotipleri belirlendi. *Alu*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucu mutant ve yabancıl tip alellerinin kesim sonucu oluşan DNA fragmanları Şekil 3.1’de şematik olarak gösterilmiştir. Amplifiye edilen CTR gen bölgesinde yabancıl alelde *Alu*I enziminin tanıma yeri olmadığından kesim olmaz ve bu nedenle yabancıl tip homozigot olan bireylerde 228 bç uzunluğunda tek bir bant edildi. Mutant CTR alelinde ise bir *Alu*I tanıma yeri olduğu için PCR ile çoğaltılan CTR gen bölgesi 108 ve 120 bç uzunluğunda iki parçaya kesilir.



Şekil 3.1: RFLP yöntemi ile 3'UTR C→T polimorfizminin saptanması, *AluI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan yabancı ve mutant DNA fragmanları

### 3.5. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

- 1) %3'lük agaroz jel hazırlanması için 3 gram agaroz (sigma) tartılarak 100 ml 1X TBE(1mM Borik Asit 20mM EDTA 1mM TRIS pH=8.2)'de çözüldü.
- 2) 50-55 °C'ye soğutulduktan sonra, 0.5 µg/ml etidyum bromür'den 5 µl ilave edildi.
- 3) Elektroforez küvetine tarak yerleştirildi ve üzerine sızıntı olmayacak şekilde agaroz jel döküldükten sonra oda ısısında soğumaya bırakıldı.
- 4) Tarak dikkatlice uzaklaştırıldı ve agaroz jel, içerisinde 1XTBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünü, restriksiyon enzim kesim ürünü ve 100 bç'lik marker yükleme tamponu (%0,25 brom fenol mavisi %40 (w/v) sükröz çözeltisi) kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Örnekler elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile 80 voltta 60 dakika yürütüldü. Jeldeki DNA bantları gel görüntüleme sistemi yardımıyla ultraviyole ışığı altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

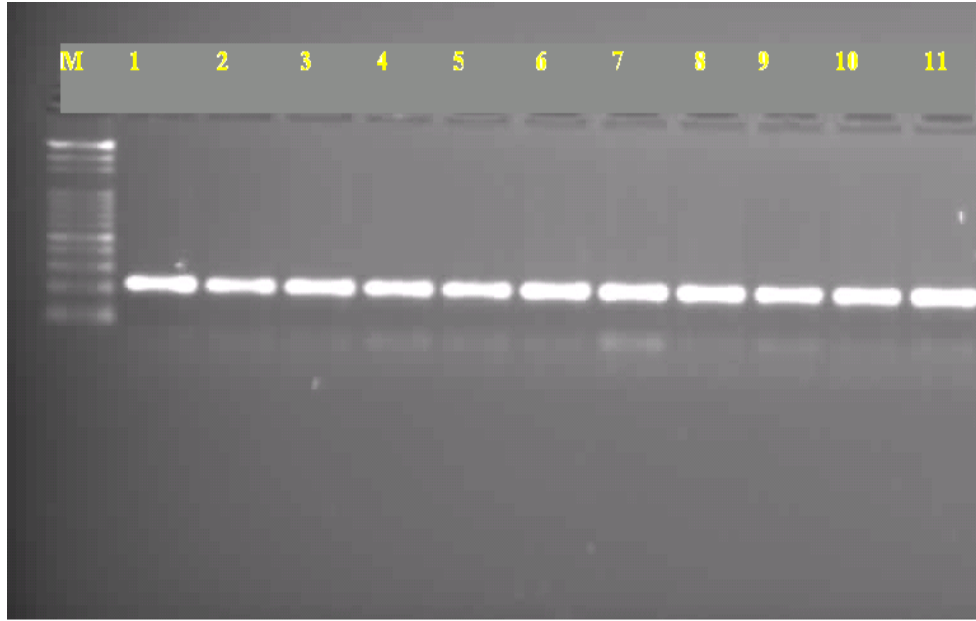
## 4. BULGULAR

Aydın Kızılay Kan İstasyonu Birimlerine kan vermeye gelen kişilerin esas alınarak yapılan Bu çalışma 489 birey üzerinden yapılmıştır, bireylerin 54'ü bayan 435'si erkeklerden oluşmaktadır. Projede hesaplan 576 bireye ulaşılammıştır ve bayan bireylerin kan vermede yetersiz oluşu bayan sayısında sıkıntı yaratmıştır, bunun dışında kitlesel çalışmada örneklerin alındığı bölgeler ve kişi sayıları Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1: Aydın ili popülasyonunda CTR gen polimorfizminin sıklığını saptamak için belirlenen bölgeler ve donör sayıları

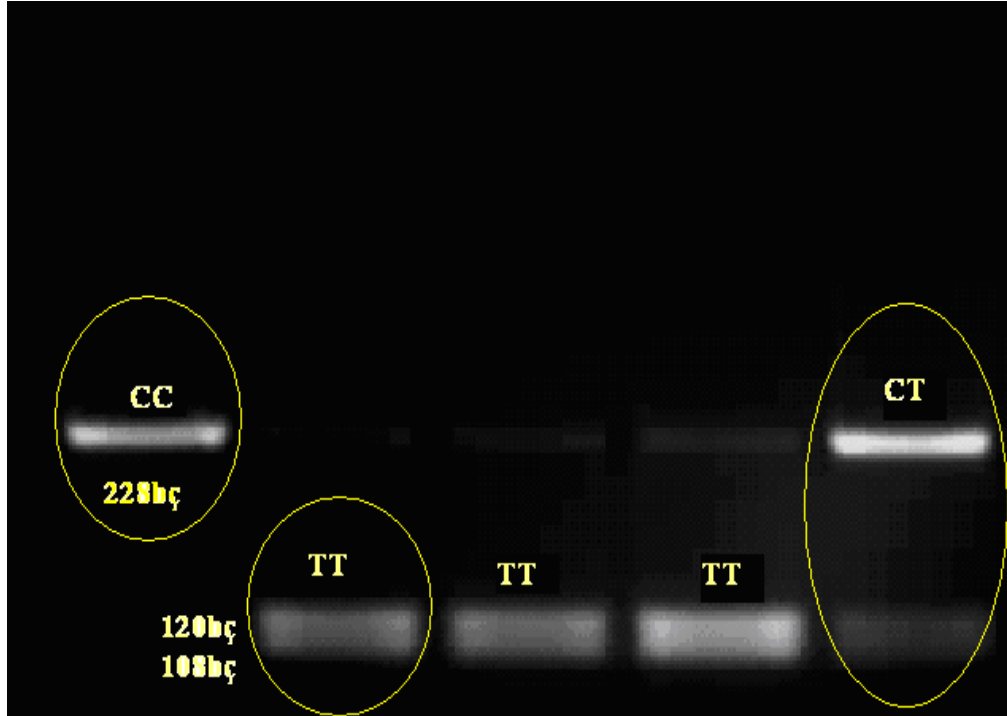
	BAY	BAYAN	TOPLAM
<b>Merkez</b>	108	14	122
<b>İncirliova</b>	19	15	34
<b>Karacasu</b>	36	12	48
<b>Söke</b>	45	2	47
<b>Bozdoğan</b>	55		55
<b>Kuşadası</b>	110	2	112
<b>Kuyucak</b>	10	1	12
<b>Nazilli</b>	46	7	53
<b>Didim</b>	6	1	8
<b>Toplam</b>	435	54	489

Gönüllülerden alınan periferik kandan DNA izole edildikten sonra CTR gen bölgesinin C/T polimorfizmini içeren 228 bç'lik kısmı spesifik primerlerle PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: PCR ile çoğaltılmış olan 228 bç uzunluğundaki CTR lokusunun etidyum bromür ile boyanmış agaroz jeldeki (%2'lik) görünümü. M: 100 bç'lik DNA büyüklük standardı (Prizma) 1'den 11'e kadar 228 bç'lik PCR ürünü

CTR genininin mutatt alelinin sıklığını belirlemek amacıyla yapılan RFLP reaksiyonunda, CTR gen lokusuna ait 228 bç uzunluğundaki fragman *AluI* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra, 1340. nükleotid pozisyonunda timin (T) sitozin (C) baz değişimi olup olmadığı saptanmıştır. Buna göre gen bu pozisyonda C aleline sahipse *AluI* için tanıma bölgesi yoktur ve 228 bç uzunluğunda tek bant saptanır (yabanıl tip). Şayet C→T baz değişimi varsa gen lokusunda *AluI* için tanıma bölgesi olduğundan 108 bç,120 bç uzunluğunda iki (mutant tip) ve heterozigotluk durumunda ise 108 bç,120 bç ve 228 bç uzunluğunda 3 bant şeklinde saptanır. Bu çalışmada saptanan genotipler ve elektroforez sonrası her bir genotip için oluşan bant profilleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: PCR ile çoğaltılan CTR gen bölgesinin *AluI* enzimi ile kesilmesi ve elektroforez sonrası her bir genotip için oluşan bant profilleri

Bireylere ait CTR genlerindeki 1377. nükleotid pozisyonundaki CVT değişimi ile ortaya çıkan Pro/Leu polimorfizminin değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta grubunda Pro\Pro (C\C) genotipi 80 bireyde (%16.35), Pro\Leu (C\T) genotipi 232 bireyde (%47.44) ve Leu/Leu (T\T) genotipi 177 bireyde (%36.21) tespit edilmiştir. Buna göre alel, genotip sıklıkları ve Hardy- Weinberg eşitliğine göre önemi değerlendirildi.

Çizelge 4.2: Aydın populasyonunda CTR geninin 1377. nükleotid pozisyonundaki polimorfizmi ve buna göre saptanan genotiplerin dağılımı

CTR genotipleri	Birey sayısı	CTR genotip oranları (%)	$\chi^2$ değeri	*P
C/C	80	%16.35	0.086285	0.76895
C/T	232	%47.44		
T/T	177	%36.21		

Gözlenen genotip dağılımı Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı tabloda da görüldüğü gibi, bu lokus için popülasyonun dengede olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte Serbestlik derecesi 1 iken  $P=0.05$  seviyesi için verilen kritik  $\chi^2$  değeri 3.84 olmalıdır.  $\chi^2$  testi analiz sonuçlarına CTR için  $0.086285 < 3.84$  olduğundan gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı ortaya çıkmıştır.

Elde edilen genotip verilerinden popülasyondaki C ve T alellerinin sıklıkları hesaplandı. Aydın ili popülasyonunda saptanan C ve T alellerinin sıklıkları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3: Aydın popülasyonunda saptanan C ve T alellerinin sıklığı

CTR alelleri	Alel sıklığı
C Aleli	0.4008
T Aleli	0.5992

Yaptığımız analizlerden Aydındaki sağlıklı bay ve bayan popülasyonundaki C/T baz değişimini ve buna göre alel ve genotip sıklıkları ile Hardy-Weinberg eşitliğine göre önemini değerlendirdik. Erkek popülasyonunda genotip dağılımı 73 (%16.78) C/C, 206 (%47.35) C/T ve 156 (%35.87) T/T iken, bayanlarda ise 7 (%12.96) C/C, 26 (%46.42) C/T ve 21 (%40.62) T/T olduğu saptandı. Erkek ve kadınlarda CTR gen bölgesindeki 1377. nükleotid değişiminin genotip ve alel sıklıkları sırasıyla Çizelge 4.4 ve 4.5’de verilmiştir

Çizelge4.4: Erkeklerde CTR genotip sıklığı

CTR Genotipleri	Erkek birey sayıları	Genotip sıklıkları (%)	$X^2$ değeri	P
C/C	73	%16.78	0.14475	0.703604
C/T	206	%47.35		
T/T	156	%35.87		

Çizelge4.5: Erkeklerde CTR alel sıklığı

<b>CTR aleleri</b>	<b>Alel sıklığı</b>
C aleli	0.4046
T aleli	0.5954

$\chi^2$ analizi sonucunda beklenen ve gözlenen genotip değerleri arasındaki farkın istatistiksel, olarak önemli olmadığı ortaya çıkmıştır ve erkeklerde de populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptanmıştır. Levene (1949)'e göre hesaplanan gözlenen homozigotluk ve beklen heterozigotluk durumları analizi yapılan gruplar için çizelge 4.8'da verilmiştir.

Çalışılan bireyler erkek ve kadın olarak gruplandırıldığında, C/C genotipine sahip bireylerin daha düşük ve T/T genotipine sahip bireylerin sıklıklarının oranı erkek grubuna göre nispeten yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6). Bu durum kadınlarda C alellinin düşük, T alelinin sıklığının daha yüksek olması sonucudur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6: Kadınlarda CTR genotip sıklığı

<b>Genotipler</b>	<b>Bayan bireylerin sayıları</b>	<b>Genotip sıklıklar(%)</b>	<b>X<sup>2</sup> değeri</b>	<b>P</b>
C/C	7	%12.96	0.028665	0.865555
C/T	26	%46.42		
T/T	21	%40.62		

Çizelge 4.7: Kadınlarda CTR alel sıklığı

<b>Aleller</b>	<b>Alel sıklıkları</b>
Alel C	0.3704
Alel T	0.6296



Çizelge 4.8: Aydın popülasyonu CTR geninin heterozigotluk sonuçları

Lokus	n	Göz.Het.	Bek.Het.*	Ort.Het.
CTR (Bayan)	54	0.4815	0.4708	0.4664
CTR (Erkek)	435	0.4736	0.4824	0.4818
CTR (Bütün popülasyon)	489	0.4744	0.4808	0.4803

n: Örneklem büyüklüğü

Göz.Het.: Gözlenen heterozigotluk değeri

Bek.Het.: Beklenen heterozigotluk değeri

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri

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

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

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, özellikle insan Genom Projesi'nin ardından, birçok hastalığın genetik temellerinin aydınlatılmasında önemli adımlar atılmaktadır. Bu konuda yapılan, moleküler genetik çalışmalar, hem hastalığın moleküler patolojisinin anlaşılmasında hem de erken tanı ve tedavide önem kazanmaktadır.

Ortalama insan ömrünün uzatılmasıyla beraber, ilerleyen yaşlarda birçok çevresel ve genetik faktörün etkileşimiyle ortaya çıkan karmaşık yapıli hastalıkların erken teşhis ve tedavisi daha fazla önem kazanmıştır. Bu tür hastalıklarda çağdaş yaklaşım, hastalık henüz ortaya çıkmadan bireyin risk grubunda olup olmadığının belirlenerek hastalığın engellenmesi; ortaya çıktıktan sonra ise bireye özgü tedavi yöntemlerinin uygulanmasıdır. Özellikle karmaşık ve birçok faktörün rol oynadığı hastalıklarda, farklı polimorfizmler taşıyan hastalardaki klinik karşılaştırma ve ilişkilendirme yöntemi günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Genin protein kodlayan ya da promotor bölgelerindeki belirli polimorfizmleri taşıyan bireylerde, hastalığa yatkınlık, hastalık ortaya çıktığında ise hastalığın gelişiminde ve tedaviye cevapta farklılıklar olabileceği düşünülmektedir. Bu polimorfizmlerin ve etkilerinin araştırılması, gerek hastalığın moleküler patolojisi, gerek teşhis ve tedavisinde önemli yararlar sağlayabilir.

Kalsitonin reseptör (CTR) gen polimorfizmi, kalsiyum metabolizmasını içini alan hastalıklar ile CTR ilişkisini açığa çıkarmak için çalışılmaktadır. Yapılan araştırmalar incelendiğinde bu reseptörün böbrek taşı, kemik erimesi gibi hastalıklara etkisinin oldukça yoğun bir şekilde çalışıldığı gözlenmektedir.

Çalışmamızda sağlıklı Aydın ili populasyonunda CTR gen mutasyonu sıklığını belirlemek için 489 bireyden örnek alınmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda populasyondaki 80 bireyin (% 16.35) C\C (Pro\Pro), 232 bireyin ( % 47.44) C\T (Pro\Leu) ve 177 bireyin (%36.21) ise T\T (Leu/Leu) genotipine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda populasyonun Hardy-Weinberg eşitliğini sağladığını daha öncede belirtmiştik. Populasyondaki erkek bireylerin 73'ü (%16.78) C/C, 206'sı (%47.35),156'sı (%35.87) genotip

sıklığına sahipken, bayanların ise 7'si (%12.96) C/C, 26'sı (%46.42) C/T, 21'i (%40.42) T/T genotip sıklığına sahip olduğu saptanmıştır. Çalışılan populasyonda gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasındaki farkın önemli olmadığı ve dolayısıyla popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptanmıştır. Ayrıca, popülasyondaki bireyler kadın ve erkek olarak gruplandırıldığında da sonuç yine değişmemiştir.

İnsan genomundaki SNP'lerin tanımlanması hastalığa karşı duyarlılık çalışmalarında önemlidir. CTR geninde 447. kodondaki SNP'nin özellikle bayanlarda menopozdan sonra kemik minerallerinin kaybına sebep olan osteoporozla ilişkili olduğu bilinmektedir. T/T aleline sahip bireylerin kemik mineral yoğunluğu kaybına daha eğilimli oldukları, heterozigotlarınsa (C/T) osteoporozla karşı koruma sağladıkları daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Mittal *et al.* (2003) bu bilgiler ışığında Kuzey Hindistan popülasyonu ile yaptıkları çalışmalarında C alelinin sıklığının (% 60) T'den (% 40) daha yüksek olduğunu ve dağılımın Hardy-Weinberg dengesinde olmadığını rapor etmişlerdir. Genotip sıklıklarını ise %24.8 C/C, % 69.5 C/T ve %5.7 T/T şeklinde saptamışlardır. Çalışmalarının sonuçlarını diğer etnik gruplarla yapılan araştırmalarla karşılaştırdıklarında alel ve genotip sıklıkları arasında büyük farklılıklar saptamışlar ve bu popülasyonlar arasında bağlantı dengesizliği hesaplamalarının oldukça yararlı olacağını belirtmişlerdir.

CTR bir hormon reseptörüdür ve intraselüler domainlerdeki tek bir değişiklik hastalığa sebep olabilir. CTR geni PCR ürününün heterozigot durumu böbrek taşı hastalığında önemlidir. Bid *et al.* 2005'te Kuzey Hindistan popülasyonunda böbrek taşı hastalığı ile CTR polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Kontrol grubunun alel sıklıkları 0.716 C ve 0.283 T, genotip sıklıkları ise %50 C/C, %43.3 C/T ve %6.7 T/T olarak saptanmıştır. Hasta grubunda ise alel sıklığı 0.560 C ve 0.440 T ve genotip sıklıkları ise %32 C/C, %48 C/T ve %20 T/T olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu sağlıklı ve hasta insanların oluşturduğu deney grubu arasında CTR genotiplerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulmuşlardır (P= 0.048). Ayrıca CTR geninde C/T (lösin aleli) taşıyan bireyler böbrek taşı hastalığının yüksek risk grubundadırlar. Bu gen polimorfizminin dağılımındaki farklılıkların farklı hastalık grupları, cinsiyet ve etnik karakterlere bağlı olarak değişebileceğini ve

CTR geni *AluI* polimorfizminin böbrek taşı hastalığıyla ilişkisinin araştırılması açısından aday bir genetik belirteç olabileceğini belirtmişlerdir.

Yaşları 16 ila 43 arasında değişen 152 sağlıklı Japon kadın popülasyonunun analizi bu bireyde C (0.87) alelinin baskın olduğunu ortaya çıkardı ve düşük bir vücut ağırlığıyla kuvvetli bir bağlantı gösterdi (Nakamura *et al* 2001). Bu popülasyonda BMD (kemik mineral yoğunluğu), vücut boyu ve osteokalsin seviyesiyle hiçbir korelasyon görülmediğini göstermişlerdir.

Mittal *et al.* 2004'te 100 hasta 105 kontrol grubu bireyde yaptıkları çalışmada hastalarda TT alelinin %13 normal bireylerde ise %5.7 olarak saptamışlardır ve T alelli taşıyan bireylerde kalsiyum oksalat taşlarının olma olasılığının yüksek olduğunu, fakat istatistiksel olarak sağlıklı ve hasta grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada hasta ve sağlıklı bireylerin genotiplerinin sıklıkları arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bunun dışında farklı demografik bölgelerin kendine özgü bir genotip ve alel sıklıklarının olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak Kafkaslarda T alelinin sıklığının yüksek olduğunu ve bundan dolayı hastalığında yüksek sıklıkta olması gerektiğini ileri sürülmüş, ancak epidemiyolojik çalışmalar hastalığın yüksek sıklıkta görülmediğini ve bundan dolayı da CTR geninde *Alu1* polimorfizminin Hindistan popülasyonunda bu hastalığın sebebinin araştırılmasında uygun bir genetik belirteç olmadığı sonucuna varılmıştır. Alel sıklığının popülasyonlar arasındaki varyasyonu ve CTR polimorfizminindeki uyumsuzluk, hastalık gruplama cinsiyet ve etnik karaktere bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Chen *et al.* 2001 de yaptıkları çalışmada 105 kontrol 102 oksalat taşı hasta kullanmışlar ve sonuçlar değerlendirildiğinde iki grup arasında anlamlı saptamışlardır ( $P<0.01$ ). Sonuçlar homozigot lösin genotipinde olan bireyler hasta olma olasılıklarının (kalsiyum oksalat taşı taşıyanların) daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. CTR bu hastalık için bir genetik belirteç olarak kullanılabilirliğini ileri sürmüşlerdir.

Masi *et al.*(1998) İtalyada menopoz sonrası dönemlerdeki kadınlarda yaptıkları çalışmada analizi yapılan 307 bireyin 59'unun (%19.2) C/C, 112'sinin (%36.4) TT ve 136'sinin (%44.3) CT genotipine sahip olduğunu saptamışlardır. Masi *et al.*(1998) çalıştıkları popülasyonda C/C genotipine sahip normal kadınların osteoporozlu kadınlara göre daha fazla olmalarına karşın, istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Bununla beraber, yapılan analizler T/T genotipine sahip kadınların lumbar BMD'lerinin C/C genotipine sahip kadınlarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğunu göstermiştir. Masi *et al.*(1998) yaptıkları incelemeler sonucunda CTR genotiplerinin ve bunların diğer polimorfik genlerle ilişkilerinin belirlenmesinin insanlarda kemik kütlesinin genetik temeli ile ilişkili yeni bilgiler sağlayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Taboulet *et al.* (1998) Fransa'daki menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda kalsitonin reseptör polimorfizminin düşük kırılma riskiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları değerlendirmeler sonucunda heterozigot bireylerin homozigot bireylere göre daha yüksek kemik yoğunluğuna sahip olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, bu kadınların kırık riski ve vertebral kırıklarının sıklığının düşük olması dikkat çekicidir. Kırıklara göre genotip verileri heterozigotların avantajıyla uyumludur. Son hipotez hem heterozigot hem de homozigot gruplardaki düşük BMD tarafından desteklenmiştir.

Diğer popülasyonlarla yapılan çalışmaların bulguları CTR geninin alel ve genotip sıklıkları bakımından büyük bir varyasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verileri yapılan diğer araştırmalarla karşılaştırdığımızda (Çizelge 4.9), Aydın ili popülasyonunun alel ve genotip sıklıkları İtalyanlara çok yakın değerlerde olduğu saptanmıştır. Wolfe *et al.* (2003) çeşitli etnik grupların kendine özgü bir genotip sıklığı olduğunu göstermişlerdir. Buna göre beyaz Amerikalılarda T aleli (%77.3) yüksek sıklıktayken, siyahi Amerikalılarda ise T (%50.6) ve C alelleri (%49.4) hemen hemen benzer sıklıktadır. Asya kökenlilerde ise C alelinin (%87.5) T aleline (%12.5) göre daha yüksek sıklıkta olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada CTR gen bölgesinde 9'u kodlama bölgesi dışında ve 1'i kodlama bölgesine olmak üzere 10 polimorfik bölge olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada ve elde ettiğimiz diğer bilgiler ışığında bazı

makalelerdeki sonuçlar birbiriyle çelişmektedir. Bunun giderilmesi için diğer dokuz polimorfizmin de değerlendirip sonuçların tartışılması gerekir. Kemik erimesini, böbrek taşı oluşumunu çeşitli çalışmalarda vitamin D reseptörü, östrojen reseptörü, kollajen-1 $\alpha$ -1, interlökin 6'ı kodlayan genlerdeki polimorfizmlerle BMD veya kırılma riskleri arasındaki ilişkiler gösterilmiştir. Bu yönde ki araştırmaları artırmak ve değerlendirmek sonuçların daha doğru ve tutarlı olabileceği konusunda bize daha iyi yön gösterebilir.

Sonuç olarak SNP'ler kompleks genetik özellikler için genetik belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar özellikle yüksek risk gruplarının tanımlanmasında ve doğru tedavi yöntemlerinin uygulanabilmesinde oldukça büyük öneme sahiptir. Sağlıklı bireyler üzerinde yapılan bu çalışmadan elde edilen bulgular, Aydın ili popülasyonunun yukarıda CTR geni polimorfizmiyle ilişkilendirilmiş olan hastalıklar bakımından bir risk analizinin yapılmasında ve ilişkili olması muhtemel olan diğer bazı hastalıklarla yapılacak olan çalışmalarda kontrol olarak kullanılması mümkündür. Toplumun bu ve benzeri genlerin polimorfizleri taranarak, hastalıklarla olan ilişkileri ortaya konularak pek çok genetik hastalık bakımından risk tayinlerinin yapılması ve koruyucu hekimlik stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

Çizelge 5.1: Farklı demografik bölgelerde CTR gen polimorfizminin (kodon 447 SNP) sıklığı

Populasyon	Birey sayısı	Alel sıklığı (%)		Genotip sıklığı (%)			Kaynaklar
		T	C	T/T (leu/Leu)	T/C (Leu/pro)	C/C (Pro/Pro)	
Beyaz Amerikalı	176	272 (77.3)	80 (22.7)	104 (59.09)	64 (36.36)	8 (4.54)	Wolfe <i>et al.</i> , (2003)
Siyahi Amerikalı	86	87 (50.6)	85 (49.7)	23 (25.06)	41 (47.7)	22 (26.7)	Wolfe <i>et al.</i> , (2003)
Asya kökenli (Japon-Çin)	20	5 (12.5)	35 (87.5)	0 (0)	5 (25)	15 (75)	Wolfe <i>et al.</i> , (2003)
İspanyol	50	46 (46)	54 (54)	10 (20)	26 (52)	14 (28)	Wolfe <i>et al.</i> , (2003)
İtalyan	307	360 (58.6)	254 (41.4)	112 (36.5)	136 (44.3)	59 (19.2)	Masi <i>et al.</i> , (1998)
Fransız	215	306 (71.2)	124 (28.8)	105 (48.8)	96 (44.7)	14 (6.5)	Taboulet <i>et al.</i> , (1998)
Hindu	105	85 (40.5)	125 (59.5)	6 (5.7)	73 (69.5)	26 (24.8)	Mittal <i>et al.</i> , (2003)
Japon	117	24 (10.25)	210 (89.75)	1 (0.9)	22 (18.8)	94 (80.3)	Nakamura <i>et al.</i> , (2001)
Bu çalışma	489	486 (55.35)	392 (44.65)	177 (33.21)	232 (47.44)	80 (16.35)	

**KAYNAKLAR**

- Alam A. S. T., Monga, B.S., Bevis, P., Huanga, H.J.S. and Zaidi, M. 1993. Amylin inhibits bone resorption by a direct effect on the motility of rat osteoclasts. **Exp. Physiol**, **78**: 183-186
- Albrandt, E.M., Brady, C.X., Moore, E. Mull, M.E., Sierzega, K. and Beaumont, K. 1995. Molecular cloning and functional expression of a third isoform of the human calcitonin receptor and partial characterization of the calcitonin receptor gene. **Endocrinology**, **136 (12)**: 5377–5384.
- Albrandt, K., Mull, E., Brady, E. M., Herich, J., Moore, C. X. and Beaumont, K. 1993. Molecular cloning of two receptors from rat brain with high affinity for salmon calcitonin. **FEBS Lett**, **325**: 225–232.
- Aloia, A. Vaswani, J.K. Yeh, E. and Flaster, S. 1996. Risk for osteoporosis in black women. **Calcif. Tissue Int.**, **59 (6)**: 415–423.
- Anusaksathien, O., Laplace, C., Li, X., Ren, Y., Peng, L., Goldring, S. R. and Galson, D. L. 2001. Tissue-specific and ubiquitous promoters direct the expression of alternatively spliced transcripts from the calcitonin receptor gene. **J. Biol. Chem.**, **276**: 22663–22674
- Avioli, L.V. 1998. The role of calcitonin in the prevention of osteoporosis, Osteoporosis. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, **27 (2)**: 411–418.
- Auerbach, N. Klein, A. and Siciliano, R.E. 1985. Isospin composition of giant resonances and asymmetries in  $\pi^+$  compared to  $\pi^-$  inelastic scattering. **Phys. Rev., C 31**: 682 – 685.
- Backer, K. L. Nash, D.R. ,Silva, O. L. , R. H. and Moore, C.F., 1981. Increased serum and urinary calcitonin in pulmonary disease. **Chest**, **79**: 211-216
- Bid, H.K., Chaudhary, H. and Mittal R.D. 2005. Association of vitamin-D and calcitonin receptor gene polymorphism in paediatric nephrolithiasis. **Pediatr Nephrol**, **20**: 773–776
- Chambers, T.J. Moore, A. 1983. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **57 (4)**: 819–824.
- Chambers, T.J. Dunn, C.J. 1983. Pharmacological control of osteoclastic motility. **Calcif. Tissue Int.**, **35**: 566–579.
- Chen, S. Armour, J. Way, G. Chen, C. Watson, P. Irving, J. Cobb, S. Kadwell, K. Beaumont, T. Rimele, T. and Kenakin, A. 1997. Expression cloning and receptor pharmacology of human calcitonin receptors from MCF-7 cells and their relationship to amylin receptors. **Mol. Pharmacol.**, **52**: 1164–1175.



- Chen, Y., Shyu, J. F., Santhanagopal, A., Inoue, D., David, J. P., Dixon, S. J., Horne, W. C., and Ilaron, R. 1998. The calcitonin receptor stimulates Shc tyrosine phosphorylation and Erk1/2 activation. Involvement of Gi, protein kinase C, and calcium. **J. Biol. Chem.**, **273**:19809–19816.
- Chen, W., Wu, H.C., and Lu H.F. 2001. Calcitonin receptor gene polymorphism: A possible genetic marker for patients with calcium oxalate stones. **Eur. Urol.**, **39**: 716-719.
- Christopoulos, G., Perry, K. J., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N. J., Main, M. J., Foord, S. M., and Sexton, P. M. 1999. Novel Receptor Partners and Function of Receptor Activity-modifying Proteins. **Mol. Pharmacol.**, **56**: 235–242.
- Copp, E.C., Cameron, B., Cheney, A.G.F., Davidson, K. and Henze, K. 1962. Evidence for calcitonin—a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. **Endocrinology**, **70**: 638–649.
- Copp, D.H. 1992. Remembrance: calcitonin: discovery and early development. **Endocrinology**, **131** (3): 1007–1008.
- Dennison, N., Yoshimura, T., Hashimoto, C. and Cooper, G. 1998. Bone loss in Great Britain and Japan: a comparative longitudinal study. **Bone**, **23** (4): 379–382.
- DeRose, F.R., Singer, A., Avramides, A. Flores, R., Dziadiw, R.K. Baker, S. and Wallach, S.H. 1974. Response of Paget's disease to porcine and salmon calcitonins. **Am. J. Med.**, **56** (6): 858–866.
- Douglas, J., Duckworth, J.A., Kanis, A.A., Jefferson, T.J., Martin, R.G. and Russell, G. 1971. Spinal cord dysfunction in Paget's disease of bone. **J. Bone Joint Surg.** **63B** (4): 495–503
- Epand, R. M., Epand, R. F., and Orłowski, R. C. 1985. Presence of an amphipathic helical segment and its relationship to biological potency of calcitonin analogs. **Int. J. Pept. Protein Res.** **25**: 105–111
- Epand, R. M., Epand, R. F., and Orłowski, R. C. 1990. Study of a series of analogs of salmon calcitonin in which alanine replaces leucine. **Eur. J. Biochem.**, **188**: 633–635.
- Feldman, N.S., Drieger, A.H. and Tashjian, A.H. 1980. Effects of parathyroid hormone and calcitonin on osteoclast formation in vitro. **Endocrinology** **107**: 1137–1143.
- Feyen, J. H., Cardinaux, F., Gamse, R., Bruns, C., Azria, M. and Trechsel, U. 1992. N-terminal truncation of salmon-calcitonin leads to calcitonin antagonists - structure activity relationship of n-terminally truncated salmon-calcitonin fragments in vitro and in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **187**:8–13.

- Gorn, S.M., Rudolph, M.R., Flannery, C.C., Morton, S., Weremowicz, J., Wang, S.M., Krane, S.R. and Goldring, S.R. 1995. Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone. The first intracellular domain modulates ligand binding and signal transduction. **J. Clin. Invest.**, **95**: 2680–2691.
- Gorn, A.H., Lin, H.Y., Yamin, M., Auron, P. E., Flannery, M. R., Tapp, D. R., Manning, C. A., Lodish, H. F., Krane, S. M., and Goldring, S. R. 1992. The cloning, characterization and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. **J. Clin. Invest.**, **90**:1726–1735.
- Halkin, J.Y., Reginster, S. 1998. Efficacy and tolerability of calcitonin in the prevention and treatment of osteoporosis. **BioDrugs 10 (4)**: 295–300.
- Hebden, C., Smalt, R., Chambers, T. and Pondel, M. D. 2000. Multiple promoters regulate human calcitonin receptor gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **272**: 738–743
- Hilton, J. M., Downton, M., Houssami, S., and Sexton, P. M. 2000. Identification of key components in the irreversibility of salmon calcitonin binding to calcitonin receptors **J. Endocrinol.**, **166**: 213–226.
- Houssami, S. Findlay, D. M. Brady, C. L. Martin, T. J. Epanand, R. M. Moore, E. E. Murayama, E. Tamura, T. Orłowski, R. C. and Sexton, P. M. 1995. Divergent structural requirements exist for calcitonin receptor binding specificity and adenylate cyclase activation. **Mol. Pharmacol.**, **47**: 798–809.
- Houssami, S. Findlay, D. M. Brady, C. L. Myers, D. E. Martin, T. J. and Sexton, P. M. 1994. Isoforms of the rat calcitonin receptor: consequences for ligand binding and signal transduction. **Endocrinology**, **135**: 183–190.
- Huff, C., Sadler, T. 1997. African American women and osteoporosis. **ABNF J.**, **8 (3)**: 48–50.
- Jagger, C., Chambers, T., and Pondel, M. 1999. Transgenic Mice Reveal Novel Sites of Calcitonin Receptor Gene Expression during Development. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **274**: 124–129.
- Kallio, P.R. Garant, C. and Minkin, D. 1972. Ultrastructural effects of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. **J. Ultrastruct. Res.**, **39**: 205–216.
- Kuestner, R.E., Elrod, R.D., Grant, F.J., Hagen, F.S., Kuijper, J.L., Matthewes, S.L., O'Hara, P.J., Sheppard, P.O., Stroop, S.D., Thompson, D.L., Whitmore, T., Findlay, D.M., Houssami, S., Sexton, P. M., and Moore, E. E. 1994. Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor. **Mol. Pharmacol.**, **46**: 246–255.

- Lin, H.Y., Harris, T.L., Flannery, M.S., Aruffo, A. and Kaji, E. H., Gorn, Kolakowski, L., F. Yamin, M. Lodish, H. F. and Goldring, S. R. 1991. Expression cloning and characterization of a porcine renal calcitonin receptor. **Trans. Assoc. Am. Physicians**, **104**: 265–272.
- Luckey, S., Wallenstein, R., Lapinski, D.E. and Meier, N. 1996. A prospective study of bone loss in African–American and white women—a clinical research center study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81 (8)**: 2948–2956.
- Masi, L., Becherini, L., Gennari, E., Colli, R., Mansani, A., Falchetti, C., Cepollaro, S., Gonnelli, A., Tanini, M.L. and Brandi, R. 1998. Allelic variants of human calcitonin receptor: distribution and association with bone mass in postmenopausal Italian women, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**: 622–626.
- Mittal, R.D., Bid H.K., Mittal, B. and Kumar, A. 2004. Is calcitonin receptor gene (CTR) polymorphism an appropriate marker for calcium oxalate urolithiasis? **Int. J. Hum. Genet.**, **4**: 57–60
- Mittal, R.D., Bid, H.K., and Mittal, B. 2003. Polymorphism of Codon 447 Calcitonin Receptor Gene in North Indians. **Int. J. Hum. Genet.**, **3 (3)**: 175-177
- Moldawer, S.J., Zimmerman, L.C., and Collins, L.1965. Incidence of osteoporosis in elderly whites and elderly negroes. **JAMA**, **194 (8)**: 859–862.
- Moore, R.E., Kuestner, S.D., Stroop, F.J., Grant, S.L., Matthewes, C.L., Brady, P.M., Sexton, D.M., Findlay, D. 1995. Functionally different isoforms of the human calcitonin receptor result from alternative splicing of the gene transcript. **Mol. Endocrinol.**, **9**: 959–968.
- Muff, R., Buhlmann, N., Fischer, J. A., and Born, W. 1999. An Amylin Receptor Is Revealed Following Co-Transfection of a Calcitonin Receptor with Receptor Activity Modifying Proteins-1 or -3. **Endocrinology**, **140**: 2924–2927.
- Nakamura, M., Zhang, Z., Shan, L., Hisa, T., Sasaki, M., Tsukion R., Yokoi, T., Kaname, A. and Kakudo, K. 1997. Calcitonin Receptor Gene Polymorphism in Japanese Women: Correlation with Body Mass and Bone Mineral Density. **Nat. Genet.** **9**,38–41.
- Nakamura, M., Morimoto, S., Zhang, Z., Utsunomiya,H. Inagami,H. Ogihara, T., Kakudo, K. 2001. Calcitonin Receptor Gene Polymorphism in Japanese Women: Correlation with Body Mass and Bone Mineral Density. **Cal. Tissue. Int.**, **68**: 211–215.
- Nishikawa, T., Ishikawa, H., Yamamoto, S., and Koshihara, Y. 1999. A novel calcitonin receptor gene in human osteoclasts from normal bone marrow. **FEBS Lett.**, **458**: 409–414.

- Orlowski, R.C., Epand, R. M. and Stafford, A. R. 1987. Biologically potent analogues of salmon calcitonin which do not contain an N-terminal disulfide-bridged ring structure. **Eur. J. Biochem.**, **162**: 399–402.
- Piserchio, A., Bisello, A., Rosenblatt, M., Chorev, M., and Mierke, D. F. 2000. Characterization of parathyroid hormone/receptor interactions: structure of the first extracellular loop. **Biochemistry**, **39**: 8153–8160.
- Poyrazoğlu M. H. , Per H., Öztürk M. Bingöl N., Üzümlü K. 2002. Çocukluk çağı pnömonilerinde serum prokalsitonin düzeyleri. **Ç. Sağ. ve Hast. Derg.** **46**: 169-176.
- Pozvek, G., Hilton, J.M., Quiza, M., Houssami, S. and Sexton, P.M. 1997. Structure/Function Relationships of Calcitonin Analogues as Agonists, Antagonists, or Inverse Agonists in a Constitutively Activated Receptor Cell System. **Mol. Pharmacol.**, **51**:658–665.
- Raggatt, L. J., Evdokiou, A., and Findlay, D.M. 2000. Sustained activation of Erk1/2 MAPK and cell growth suppression by the insert-negative, but not the insert-positive isoform of the human calcitonin receptor. **J. Endocrinol.**, **167**: 93–105.
- Reynolds, J.J., 1968. Inhibition by calcitonin of bone resorption induced in vitro by vitamin A. **Proc. R. Soc.**, **B 170**: 61–69.
- Sexton, D.M. Findlay, T.J. and Martin, K. 1999. Calcitonin. **Curr. Med. Chem.**, **6**: 1067–1093.
- Sexton, P. M., Houssami, S., Hilton, J. M., O’Keeffe, L. M., Center, R. J., Gillespie, M. T., Darcy, P., and Findlay, D.M. 1993. Identification of brain isoforms of the rat calcitonin receptor. **Mol. Endocrinol.**, **7**:815–821.
- Shai, R.K. Baker, S. and Wallach, T. 1971. The clinical and metabolic effects of porcine calcitonin on Paget’s disease of bone. **J. Clin. Invest.**, **50**: 1927–1940.
- Shyu, J. F., Inoue, D., Baron, R., and Horne, W.C. 1996. Protein kinase C antagonizes pertussis-toxin-sensitive coupling of the calcitonin receptor to adenyl cyclase. **J. Biol. Chem.**, **271**: 31127–31134.
- Siligardi, G., Samori, B., Melandri, S., Visconti, M. and Drake, A.F. 1994. Correlations between biological activities and conformational properties for human, salmon, eel, porcine calcitonins and Elcatonin elucidated by CD spectroscopy. **Eur. J. Biochem.**, **221**: 1117–1125.
- Taboulet, J., Frenkian, M., Frenedo, J. L., Feingold, N., Jullienne, A., and De Vernejoul, M.C. 1998. Calcitonin receptor polymorphism is associated with a decreased fracture risk in post-menopausal women. **Hum. Mol. Genet.**, **7**: 2129–2133.

- Wallach, S.H., Cohn, H.L., Atkins, K.J. Ellis, R., Kohberger, J.F., Aloia, I. and Zanzi, T. 1977. Effect of salmon calcitonin on skeletal mass in osteoporosis. **Curr. Theor. Res.**, **22** (4): 556–572.
- Wolfe, L A., Fling, M. E., Xue, Z., Armour, S. Kerner, S. A., Way, J., Rimele, T., Cox, R. F. 2003. In vitro characterization of a human calcitonin receptor gene polymorphism. **Mut. Res.**, **522**: 93–105
- Yamin, M., Gorn, A. H., Flannery, M. R., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Tapp, D. R., Krane, S. M., and Goldring, S. R. 1994. Cloning and Characterization of a Mouse Brain Calcitonin Receptor Complementary Deoxyribonucleic Acid and Mapping of the Calcitonin Receptor Gene. **Endocrinology**, **135**: 2635–26
- Young, R.P., Lau, E.M.C, Birjandi, Z., Critchley, J. and Woo J. 1996. Interethnic differences in hip fracture rate and the vitamin D receptor polymorphism. **Lancet**, **348**: 688–689.
- Zolnierowicz, S., Cron, P., Solinas-Toldo, S., Fries, R., Lin, H.Y., and Hemmings, B.A. 1994. Isolation, characterization, and chromosomal localization of the porcine calcitonin receptor gene. **J. Biol. Chem.**, **269**:19530–19538.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Turgut ÖZTÜRK  
Doğum Yeri ve Tarihi :Tunceli/Hozat 30/07/1982

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi  
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi  
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### Bildiriler:

- 26-30 Haziran Ulusal Biyoloji Kongresi Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Funguslarda lipolitik, amilolitik ve proteolitik enzimlerin taranması
- 26-30 Haziran Ulusal Biyoloji Kongresi aspergillus flavus HBF34' ün ekstarselular glikoamilaz üretimi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi

#### Dinleyici olarak

- 4-5 Aralık 2003 İstanbul Birinci Ulusal Deniz Kaplumbağaları Sempozyumu
- 4-7 Ekim2004 Aydın 11.Ulusal Biyoloji Öğrenci kongresi katılımı ve düzenlenmesi
- 3-5 Mayıs 2007 Malatya Biyoloji eğitiminde evrim sempozyumu
- 26-30 Haziran Aydın Ulusal Biyoloji Kongresi

### İLETİŞİM

E-posta Adresi : [tozturk@adu.edu.tr](mailto:tozturk@adu.edu.tr)