



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-YL-2008-0002

**AYDIN İLİ POPULASYONUNDA NÜKLEER FAKTÖR-
KAPPAB1 (NF- κ B1) VE NF- κ B1A GENLERİNİN
POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ**

Serap ŞENOL

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

AYDIN-2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-YL-2008-0002

**AYDIN İLİ POPULASYONUNDA *NÜKLEER FAKTÖR-
KAPPAB1 (NF- κ B1)* VE *NF- κ B1A* GENLERİNİN
POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ**

Serap ŞENOL

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 Serap ŞENOL tarafından hazırlanan Aydın İli Populasyonunda *Nükleer Faktör-KappaB1 (NF-κB1)* ve *NF-κB1A* Genlerinin Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi başlıklı tez, 28.08.2008 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI	Adnan Menderes Üni.	
Doç. Dr. Pınar OKYAY	Adnan Menderes Üni.	
Doç. Dr. Aslıhan KARUL	Adnan Menderes Üni.	
Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK	Adnan Menderes Üni.	
Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	Adnan Menderes Üni.	

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

Unvanı, Adı Soyadı
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: Serap ŞENOL

İmza:

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AYDIN İLİ POPULASYONUNDA *NÜKLEER FAKTÖR-KAPPABI (NF-κB1)* VE *NF-κB1A* GENLERİNİN POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Serap ŞENOL

Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar: Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

Doç. Dr. Pınar OKYAY

Bu çalışmanın amacı Aydın ili populasyonunda birçok enflamatuvar hastalık ve kanser patogenezi ile ilişkili olduğu bilinen *Nükleer faktör-kappaB1 (NF-κB1)* ve *NF-κB1A* genlerinin polimorfizminin Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile sıklıklarını saptamaktır.

Aydın ilinden 565 sağlıklı bireyin kan örneğinden izole edilen ilgili genom bölgeleri PCR ile spesifik olarak amplifiye edilmiş ve RFLP yöntemi ile polimorfizmler saptanmıştır. Çalışma grubunda, *NF-κB1* -94ins/delATTG polimorfizmindeki genotip sıklıkları del/del: 55 (%10.3), del/ins: 252 (%49.1), ins/ins: 217 (%40.6); *NF-κB1A* 3'UTR A→G polimorfizmindeki genotip sıklıkları A/A: 106 (%19.2), A/G: 233 (%42.3), G/G: 212 (%38.5) olarak bulunmuştur. *NF-κB1* polimorfizmi genotip dağılımı Hardy-Weinberg dengesinde iken ($\chi^2=3.402$, $p>0.05$), *NF-κB1A* polimorfizmi genotip dağılımı Hardy-Weinberg dengesinden sapan bir dağılım sergilemiştir ($\chi^2=8.293$, $p<0.05$).

2008, 65 sayfa

Anahtar Sözcükler:

NF-κB1, *NF-κB1A*, PCR-RFLP, genetik polimorfizm

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

IDENTIFICATION OF NUCLEAR FACTOR-KAPPABI (*NF-κB1*) AND *NF-κBIA* POLYMORPHISMS BY PCR-RFLP TECHNIQUE IN A AYDIN POPULATION

Serap ŞENOL

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

Supervisors: Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

Assoc. Prof. Dr. Pınar OKYAY

The aim of the present study was to determine the frequencies of polymorphisms of *nuclear factor-kappa (NF-κB1)* and *NF-κBIA* genes, which have shown to be related with several inflammatory diseases and cancer pathogenesis, using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length polymorphism (PCR-RFLP) assay in the population of Aydın province.

For this aim, total genomic DNAs were isolated from peripheral blood samples taken from a total of 565 healthy volunteers living in Aydın Province. Genomic regions in questions were amplified by PCR technique and the polymorphisms in these regions were detected by RFLP assay. Results of the analyses showed that the frequency of the *NF-κB1* -94ins/delATTG del/del, del/ins and ins/ins genotypes were 10.3%, 49.1% and 40.6%, respectively. On the other hand, the genotype frequencies of the *NF-κBIA* 3'UTR A→G genotypes were as follows: genotype A/A: 19.2%, genotype A/G: 42.3% and genotype G/G: 38.5%. Distribution of genotype frequencies were tested by Hardy Weinberg test and results showed that while *NF-κB1* gene was in Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=3.402$, $p>0.05$), *NF-κBIA* gene was not ($\chi^2=8.293$, $p<0.05$).

2008, 65 pages**Key Words:***NF-κB1*, *NF-κBIA*, PCR-RFLP, genetic polymorphism

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimin süresince ve tez çalışmamın her aşamasında, benden yol gösterici önerilerini ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI'ya,

Tez çalışmamın yazım aşamasında birikimlerinden yararlandığım ve beni kıymetli tavsiyeleriyle yönlendiren Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalında görev yapan, değerli ikinci danışmanım, Sayın Doç. Dr. Pınar OKYAY'a,

Tez çalışmamdaki kan örneklerinin temininde, donör kanlarının tezimde kullanılmasına izin veren Türkiye Kızılay Derneğine ve bana gösterdikleri ilgi ve çok değerli yardımlarında dolayı Türk Kızılayı Aydın Kan İstasyonunun tüm personeline,

Tezimin yazım aşamasında bana olan yardımlarından dolayı Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden doktora öğrencisi Doğan TUNCAY'a

Son olarak, tüm eğitimim süresince beni destekleyen, benim bu günlere gelmemi sağlayan ve bu çalışmamda bana herkesten çok yardımcı olan değerli annem ve babam, Nebile ve Ramadan ŞENOL'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
SİMGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1. NF-κB-IκB Kompleksi	5
2.2. NF-κB Aktivasyon Yolağı	10
2.3. NF-κB ve Apoptozis	12
2.3.1. Antiapoptotik Rol	12
2.3.2. Proapoptotik Rol	12
2.4. NF-κB ve İlaç Direnci	13
2.5. NF-κB ve Karsinogenez	13
2.6. NF-κB ve Enflamasyon	15
2.7. Moleküler Yöntemler	16
2.7.1. Agaroz Jel Elektroforezi	16
2.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	17
2.7.3. Resriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Çalışma Grubu	22
3.2. Kan Örnekleri	23
3.3. DNA İzolasyonu	23
3.4. DNA'nın Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi	24
3.5. NF-κB1 ve NF-κBIA Lokuslarının PCR-RFLP Yöntemi ile Genotiplenmesi	25

3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
3.5.2. RFLP Reaksiyonu	27
3.5.2.1. NF-κB1 Lokusunun Genotiplenmesi	27
3.5.2.2. NF-κB1A Lokusunun Genotiplenmesi	28
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3.7. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER DİZİNİ

NF- κ B	Nükleer Faktör-Kappa B
I κ B	Nükleer Faktör-Kappa B İnhibitör
NF- κ BIA	Nükleer Faktör-Kappa B İnhibitör Alfa
IKK	I κ B Kinaz
RHD	Rel Homolg Domain
UTR	Untranslated Region
TAD	Transkripsiyonal Aktivasyon Domaini
ANK	Ankirin tekrarlar
NEMO	NF- κ B essential modifier
CC	Coiled-Coil
DD	Ölü Domain Homoloğu
HLH	Helix-Loop-Helix
LZ	Lösin Zipper Motif
NBD	NEMO Bağlanma Domaini
PEST	Prolin (P), glutamat (E), serin (S), treonin (T) amino asitlerince zengin domain
ZF	Zinc-Finger Domain
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyal
NES	Nükleer Eksport Dizisi
κ B	Genoma Bağlanma Bölgesi
TNF	Tümör Nekroz Faktör
IL	İnterlökin
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KSHV	Kaposi's sarcoma ilişkili herpesvirus
EBV-LMP1	Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Gen
HTLVI	Human T-cell lymphotropic virus I
LBS	Lipopolisakkaritler
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antrasen
PMA	Phorbol-myristate acetate
ROI	Reaktif Oksijen Ara Ürünleri
Bcl-xl	Basal Hücre Lenfoma-Extra Büyük
IAP	Apoptizis Kaspaz and İnhibitorü
CFLIP	FLICE İnhibitör Protein
cMyc	Myelocytomatosis Protoonkogen
VEGF	Vasküler endotelial Büyüme Faktörü
ICAM	İntrasellüler Serum Adezyon Molekülü
VCAM	Vasküler adezyon molekülü
ELAM	Endotelial Lökosit Adhezyon Molekülü
COX	Siklooksijenaz
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
MMP	Matriks Metallopeptidaz
uPA	Üriner Plazminojen Aktivatör
LT β R	Lenfotoksin Beta Reseptör
BAFFR	B Hücre Lenfosit Aktive Edici Faktör Reseptörü
CD40R	TNF ailesi üyesi CD40 antijen Reseptörü

NIK	NF- κ B İndükleyen Kinaz
DR	Ölü reseptör
TNFR1/2	Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1/2
TCR	T Hücre Reseptörü
BCR	B Hücre Reseptörü
TLR/IL-1R	Toll-like Reseptör/İnterlökin-1 Reseptörü
Bp	Baz Çifti
Kb	Kilo Baz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
EDTA	Etilendaimin Tetra Asetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
TBE	Tris-Borik asit EDTA
İns	İnsersiyon
Del	Delesyon
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
KCl	Potasyum Klorür
SDS	Soydum Dodesil Sülfat
mA	mili Amper

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 PCR primerleri ve erime sıcaklıkları	25
Çizelge 3.2 <i>NF-κB1</i> Reaksiyon protokolü	26
Çizelge 3.3 <i>NF-κB1A</i> Reaksiyon protokolü	26
Çizelge 3.4 <i>NF-κB1</i> fragmanının restriksiyon kesim reaksiyonu	27
Çizelge 3.5 <i>NF-κB1A</i> fragmanının restriksiyon kesim reaksiyonu	28
Çizelge 4.1 <i>NF-κB1</i> -94ins/delATTG polimorfizmi genotipleri ve bölgelere göre birey dağılımı	31
Çizelge 4.2 <i>NF-κB1A</i> 3' UTR A→G polimorfizmi genotipleri ve bölgelere göre birey dağılımı	32
Çizelge 4.3 <i>NF-κB1</i> ve <i>NF-κB1A</i> lokuslarına ait allellerin sıklıkları	33
Çizelge 4.4 <i>NF-κB1</i> ve <i>NF-κB1A</i> lokuslarına ait genotip sıklıkları ve HW dengesi testi sonuçları	33
Çizelge 4.5 Aydın popülasyonu <i>NF-κB1</i> ve <i>NF-κB1A</i> heterozigotluk sonuçları	34
Çizelge 5.1 Farklı etnik gruplarda <i>NF-κB1</i> -94ins/delATTG genotip ve allel sıklıkları	36
Çizelge 5.2 Farklı etnik gruplarda <i>NF-κB1A</i> 3'UTR A→G polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Memelilere özgü NF- κ B, I κ B ve IKK protein ailelerinin üyeleri ..	5
Şekil 2.2 NF- κ B dimerizasyonu	7
Şekil 2.3 NF- κ B aktive edici sinyaller ve NF- κ B tarafından düzenlenen genler	8
Şekil 2.4 NF- κ B Klasik ve Alternatif Aktivasyon Yolağı	14
Şekil 2.5 Agaroz jel elektroforezi	17
Şekil 2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu	19
Şekil 2.7 Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemini ile <i>NF-κB1A</i> 3'UTR A→G polimorfizminin saptanması	21
Şekil 3.1 Aydın ili ilçelerinde çalışma grubuna katılmış olan erkek (E) ve kadın (K) sayıları	23
Şekil 4.1 <i>NF-κB1</i> geni fragmanının <i>Pf1M</i> I restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant profillerinin agaroz jel elektroforezi (%2) sonrası görünümü	31
Şekil 4.2 <i>NF-κB1A</i> geni fragmanının <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant profillerinin agaroz jel elektroforezi (%2) sonrası görünümü	32

1. GİRİŞ

İlk kez 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından keşfedilen Nükleer faktör-kappaB (NF- κ B) bir transkripsiyon faktörüdür (Baldwin, 2001). NF- κ B başlangıçta, farelerde B lenfositlere özgü immunoglobulin K hafif zincir (light chain) geninin ekspresyonunu düzenleyen bir protein olarak tanımlanmıştır (Sen and Baltimore, 1986). İleriki çalışmalarda ise NF- κ B'nin B ve T lenfositler, fibroblastlar, keratinositler ve monositik makrofaj soyları gibi çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilen ve birçok genin uyarılabilir ekspresyonu için önemli bir düzenleyici protein olduğu saptanmıştır (Baeuerle, 1991; Baeuerle and Henkel, 1994; Blank *et al.*, 1992).

NF- κ B transkripsiyon faktörünün enflamasyon, lenfosit aktivasyonu, hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre yüzey reseptörleri ve de çeşitli sitokinlerin dahil olduğu 150'den fazla gende anlatım düzenlemesi yaparak, hücrede apoptosis ve hayatta kalma başarısına katkıda bulunduğu bilinmektedir (Richmond, 2002). NF- κ B transkripsiyon faktörü, birçok farklı gen üzerindeki alışılmamış düzenleme mekanizması, evrimsel süreçte göze çarpan korunmuş yapı, protein üyeleri arasındaki korunmuş fonksiyon ve de birçok insan hastalığı ile ilişkili olması nedeniyle, geniş ölçüde ilgiyi üzerine toplamıştır (Baldwin, 2001). NF- κ B sinyal yolunun anlaşılabilmesi için günümüze kadar birçok derleme makale yazılmıştır (Ghosh and Karin, 2002; Kucharczak *et al.*, 2003; Ruland and Mak, 2003; Ben-Neriah and Schmitz, 2004; Bonizzi and Karin, 2004; Chen and Greene, 2004; Karin *et al.*, 2004).

NF- κ B ve onun inhibitör protein NF- κ BIA (I κ B α , nükleer faktör-kappa B inhibitör alfa) geninde birçok polimorfik bölge tanımlanmıştır (Campbell and Perkins, 2006; Glavac *et al.*, 1994). Bu polimorfizmlerin NF- κ B'nin işlevini potansiyel olarak etkilediği saptanmıştır (Curran *et al.*, 2002). NF- κ B'nin uygunsuz aktivasyonu, astım, enflamatuvar artrit, septik şok, akciğer fibrozisi, diabet, kanser, AIDS, arterosklerozis ve felç gibi enflamasyon ile ilişkili çeşitli insan hastalıkları ve patolojik durumlarla ilişkili olduğu saptanmıştır (Baldwin, 2001; Chen *et al.*, 1999). Bunun yanı sıra NF- κ B'nin tamamen ve sürekli inaktivasyonu, apoptosis, immün

hücrelerinin gelişimi ve gecikmeli hücre büyümesine yol açmaktadır (Chen *et al.*, 1999; Baldwin, 1996). Birçok enflamatuvar ve anti-kanser ilaçlarının bir bölümü, sadece NF- κ B aktivasyonunu inhibe edecek şekilde tasarlanmışlardır (Baldwin, 2001; Chen *et al.*, 1999). Örneğin aspirin ve glukokortikoidler NF- κ B'yi inhibe ederler (Barnes and Karin, 1997; De Bosscher *et al.*, 2000). NF- κ B'nin immün ve enflamatuvar cevap oluşturan genleri düzenlemesi durumuna uygun olarak, NF- κ B'nin çeşitli altünitelerinin yok edildiği fare deneylerinde, B ve T hücrelerin fonksiyonlarında hata oluştuğu ve bakteriyal enfeksiyonların temizlenmesi konusunda eksik kalındığı saptanmıştır (Gerondakis *et al.*, 1999).

Normalde çoğu hücrede ağırlıklı olarak sitoplazmada inaktif olarak konumlanmış olan NF- κ B faktörünün, B-hücreleri, T-hücreleri, sertoli hücreleri ve bazı nöronlarda genelde çekirdek içinde lokalize olduğu, buna ek olarak da birçok kanser hücresinde de çekirdek içinde ve aktif olduğu saptanmıştır (Richmond, 2002). NF- κ B'nin aktivasyonu ve aşırı ekspresyonu kolorektal kanser gibi çeşitli kanser tiplerinde gözlenmiştir (Aggarwal, 2004; Lind *et al.*, 2001). Göğüs kanseri (Biswas *et al.*, 2000), melanoma (Shattuck-Brandt and Richmond, 1997; Yang and Richmond, 2001), multiple myeloma (Feinman *et al.*, 2004), tümör oluşumu, büyümesi ve metastaz oluşumuyla (Amiri and Richmond, 2005; Dolcet *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2000a, 2000b) ilişkili olduğu bilinmektedir.

NF- κ B1, kromozom üzerinde 4q24 bölgesine lokalize olmuş yirmi dört ekzonlu bir gendir (Heron *et al.*, 1995). İnsan *NF- κ B1* geni iki protein kodlamaktadır: DNA bağlanma bölgesi içermeyen sitoplazmik molekül olan p105 ve onun N-terminaline ilişik olan ve DNA'ya bağlanma bölgesi taşıyan p50 (Heron *et al.*, 1995). *NF- κ B1* geni promotör bölgesinde fonksiyonel polimorfizme yol açan dört nükleotit insersiyon/delesyon (-94ins/delATTG polimorfizmi) tanımlanmış ve bu polimorfizmin potansiyel fonksiyonel rol olarak birçok hastalık ve kanserle ilişkili olduğu saptanmıştır (Karban *et al.*, 2004). Karban *et al.* (2004) tarafından yapılan çalışmada 5' -94ins/delATTG polimorfizminin ülseratif kolit hastalığına yatkınlığı arttırdığını saptamışlardır. 4 bç (baz çifti) delesyon sonucunda nükleer proteinlere bağlanma kaybı ve geçici transfeksiyon deneylerinde *NF- κ B1* promoter-luciferaz reporter oluşumundaki promoter aktivitesinin düştüğü saptanmıştır (Karban *et al.*,

2004). *NF-κB1* nakavt fare deneyleri, B hücrelerinde anormallik oluşumuyla bağışıklık sisteminde kusur oluşumu, nöral dejenerasyon ve uyku düzensizliği fenotipleri oluştuğu saptanmıştır (Jhaveri *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2006). Ayrıca Ishikawa *et al.*, (1998) yaptığı çalışmada p105^{-/-} genotipine sahip farelerde splenomegali, büyümüş lenf düğümleri, barsak ve akciğerlerde infiltrasyon ve patojenlere hassasiyet saptamıştır.

NF-κBIA (*IκBα*) ise *NF-κB* transkripsiyon faktörünün inhibitörüdür. Bu genin düzenlenmesi de yine *NF-κB* tarafından gerçekleştirilmektedir (Chiao *et al.*, 1994). Bu protein *NF-κB* transkripsiyon faktörüne bağlanarak onun çekirdeğe taşınmasını ve DNA'ya bağlanmasını bloke etmektedir (Ito *et al.*, 1995). İnsan *NF-κBIA* geni kromozom üzerinde 14q13 bölgesinde lokalize olmuştur. Altı ekzondan oluşan bu oldukça polimorfik gen, yaklaşık olarak 3,5 kb'lık (kilo baz) bir bölgeyi işgal eder (Kim *et al.*, 2003). Hücrelere gelen hemen hemen tüm sinyaller, serin-spesifik *IκB* kinaz (IKK) enziminin *NF-κBIA*'nın N-terminal ucundaki iki spesifik serin bölgesini fosforile etmesine yol açar. Böylece *NF-κBIA* yıkılımı gerçekleşerek *NF-κB* aktive edilir (Baeuerle, 1998; Jacobs *et al.*, 1998; Malek *et al.*, 1998). *NF-κB* aktif halde çekirdeğe hareket eder ve hedef genlerin ekspresyonunu başlatır (Whiteside *et al.*, 1997). Henüz sentezlenmiş olan *NF-κBIA* proteini, çekirdek içerisinde *NF-κB* kompleksine bağlanarak onu inaktive eder ve sitoplazmaya taşır (Chiao *et al.*, 1994). *NF-κBIA* genindeki polimorfizimlerin çeşitli kanser tipleriyle ilişkili olduğu saptanmıştır (Kim *et al.*, 2003; Curran *et al.*, 2002). Glavac *et al.*, (1994) tarafından tanımlanan 3'UTR A→G polimorfizmi; multiple myeloma (Parker *et al.*, 2002) ve kolorektal kanser (Klein *et al.*, 2004) riskini arttırdığı saptanmıştır. Oluşan varyasyonun büyük ihtimalle *NF-κBIA*'nın ekspresyonunu etkilediği ve bu durumda proteinin yapı ve fonksiyonunu değiştirerek *NF-κB* kompleksine zayıf bağlanmasına neden olduğu ve bunun sonucunda *NF-κB* aktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir (Parker *et al.*, 2002). Yapılan nakavt çalışmalarda ise erken neonatal lethal enflamatuvar dermatitis and granülositozis fenotipi oluşmuştur (Beg *et al.*, 1995; Klement *et al.*, 1996).

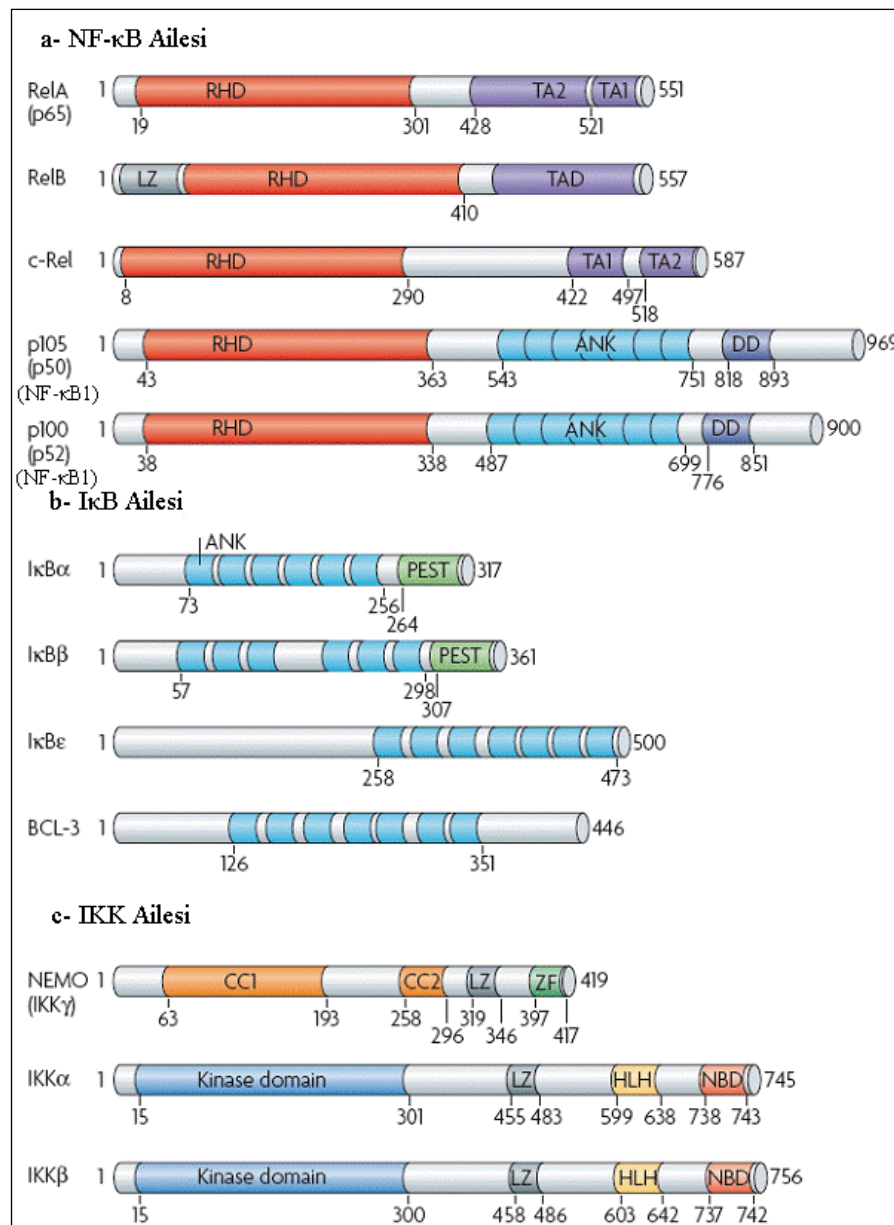
NF-κB1 ve *NF-κBIA* lokuslarında tanımlanan polimorfizimlerin Türkiye'deki sıklığı bilinmemektedir. Sağlıklı bireylerden saptanan genotip ve allel sıklıkları; daha sonra

bu genin çeşitli hastalıklarla ilişkisi araştırıldığında, referans grubu olarak kullanılabilir. Sağlıklı Türk popülasyonunda bu lokustaki genotip dağılımları ve allel sıklıklarının bilinmesi, yukarıda adı geçen hastalıklar için bireylerin risk durumlarının değerlendirilmesinde ve gerekli koruma önlemlerinin alınması için son derece önemli olacaktır. Ayrıca bu genin sıklığının bilinmesi sonucunda, belirtilmiş olan hastalıklar için belirteç olarak kullanımı sağlanabilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. NF- κ B- I κ B KOMPLEKSİ

Memeli hücrelerinde, Rel ailesine ait olan NF- κ B transkripsiyon faktörünün RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) ve p52/p100 (NF- κ B2) olmak üzere 5 üyesi bulunmaktadır (Nomenclature; Nabel and Verma, 1993) (Şekil 2.1).



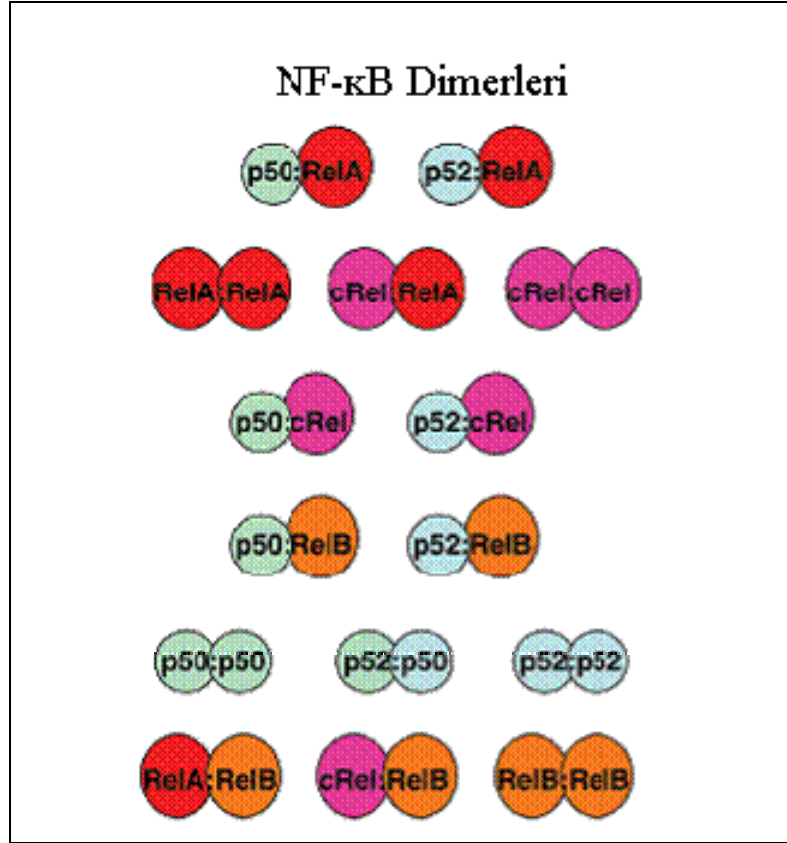
Şekil 2.1 Memelilere özgü NF- κ B, I κ B ve IKK protein ailelerinin üyeleri. **a-** Memeli hücrelerinde 5 adet nükleer faktör (NF)- κ B üyesi bulunmaktadır. RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) ve p52/p100 (NF- κ B2). p50 ve p52 proteinleri (şekilde tam sınırlarıyla gösterilmemiştir), daha uzun precursor proteinler olan sırasıyla p105 ve p100 proteinlerinin

proteolitik yıkılımı neticesinde türemektedirler. Tüm NF- κ B ailesi üyeleri N-Terminal Rel-Homolog Domain (RHD) taşımaktadırlar. Rel subailesi üyeleri olan RelA, RelB ve c-Rel C-terminal transkripsiyonal aktivasyon domaini (TAD) taşımaktadırlar. TA1 ve TA2 Rel transaktivasyon domaininin subdomainleridir. **b-** NF- κ B inhibitör ailesi (I κ B) I κ B α (NF- κ BIA), I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 proteinlerinden oluşur. p100 ve p105 gibi C-terminal anykrin tekrar motifleri (ANK) taşımaktadırlar. **c-** I κ B Kinaz kompleksinin (IKK), 3 ana subünitesi gösterilmiştir: katalitik subüniteler olan IKK α ve IKK β , ve regülör subünite olan IKK γ (NEMO= NF- κ B essential modifier). Her bir proteinin başlıca yapısal özellikleri, amino asit sayıları insan proteinlerine uyumlu şekilde verilmiştir. Fakat, domainlerin başlangıç ve bitiş bölgelerinin tanımı yayımlanan yere göre değişebilir. CC, coiled-coil; DD, ölü domain homoloğu; HLH, helix-loop-helix; LZ, RelB transaktivasyon domainindeki lösün-zipper motif; NBD, NEMO bağlanma domaini; PEST, prolin (P), glutamat (E), serin (S), treonin (T) amino asitlerce zengin domain; ZF, zinc-finger domain (Perkins, 2007)

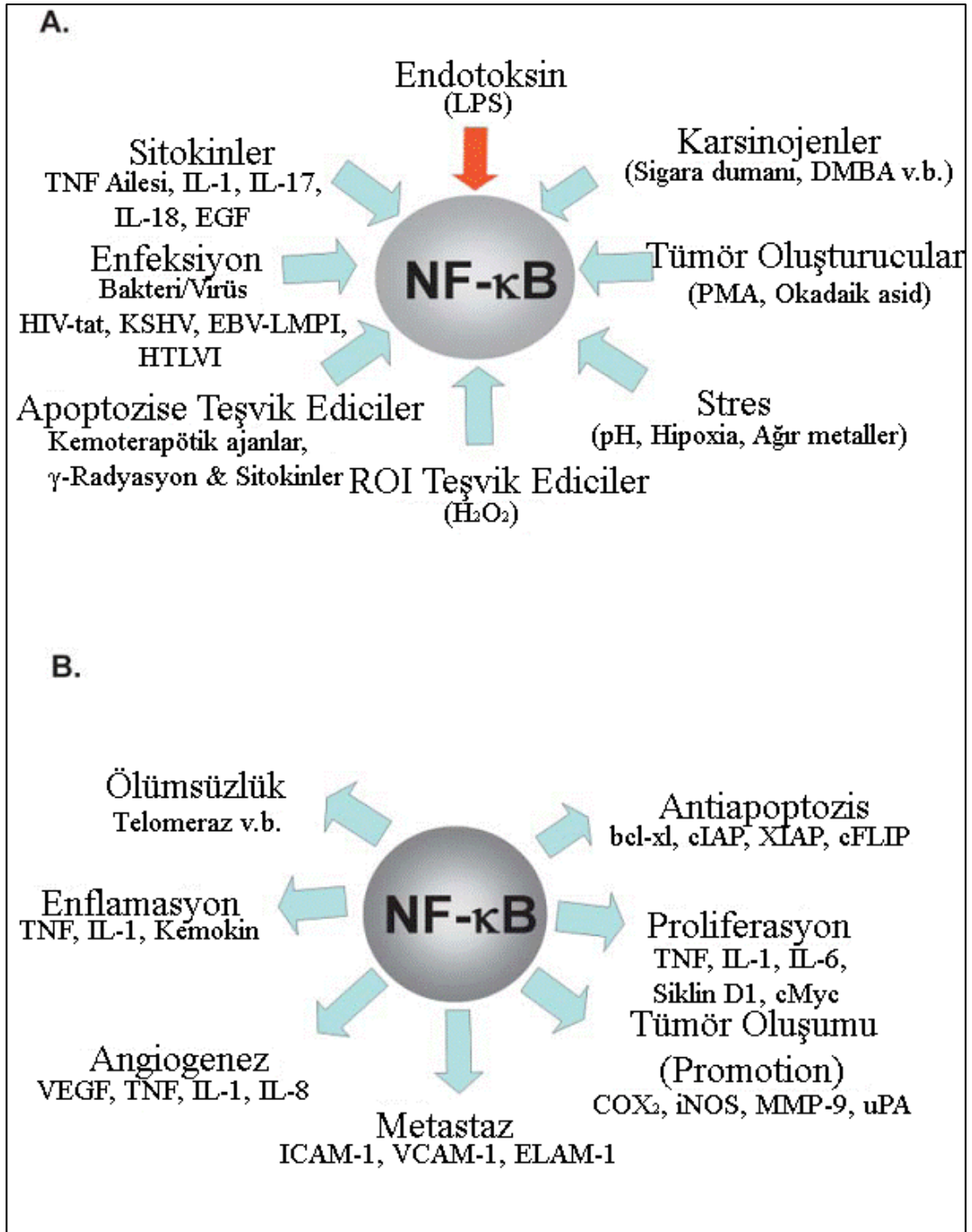
Bu proteinlerin hepsi yaklaşık 300 amino asitlik Rel homolog (RH) adı verilen N-terminal domaine sahiptirler. RH domaini DNA'ya bağlanma, inhibitöre bağlanma, dimerizasyon sağlayan ve nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) gibi korunmuş dizilerine sahiptir (Baldwin, 1996; Kopp and Ghosh, 1995). NF- κ B/Rel proteinleri C terminal dizisine göre 2 sınıfa ayrılabilir. Birincisi; p105 ve p100 precursor proteinleri C-terminali I κ B (NF- κ B inhibitör proteinleri) proteinlerine özgü olan çok kopyalı ankirin tekrarlar taşırlar. Bu tekrarlar proteinleri inhibe eder. Bu sınıf proteinler proteolizis ya da translyasyon sırasında aktive edilirler (Gilmore, 1991; Blank *et al.*, 1992; Baeuerle and Henkel, 1994). İkincisi; RelA, RelB ve c-Rel (homoloğu retroviral v-Rel)'dir. Rel proteinleri C-terminalinde aktivasyon domain taşırlar. Bu domainin dizileri korunmamıştır.

NF- κ B ilk başlarda p50/p65 heterodimeri olarak tanımlanmıştır, fakat daha sonra anlaşılması ki, farklı NF- κ B kompleksleri homodimer ya da heterodimer formda olabilmektedir (Blank *et al.*, 1992; Rayet and Gelinis, 1999) (Şekil 2.2).

NF- κ B, genom üzerinde promotör ve enhancer bölgelerinin kapsadığı κ B (Genom üzerine bağlanma bölgesi) adı verilen bazı özel DNA dizileri aracılığıyla dimerik formda bağlanarak, bazı genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Hayden and Ghosh, 2004). NF- κ B protein ailesinin düzenlediği hedef genler ve NF- κ B aktive edici sinyaller kısaca şekil 2.3'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.2 NF- κ B dimerizasyonu. Beş adet NF- κ B polipeptidi homo- ve hetero-dimerizasyon yoluyla 15 adet transkripsiyon faktörü oluşturabilir. Üstteki dört sıra, transkripsiyonal aktivatör olarak görev alabilen dokuz adet dimer göstermektedir. Beşinci sırada transkripsiyonal aktivasyon domaini bulunmayan dimerleri göstermektedir. Son sırada ise DNA'ya bağlanma kabiliyeti olmayan dimerleri göstermektedir. Bir hücrede bu dimerlerden birkaçı bulunabilir. Fakat bu hücre tipine, hücrenin içinde bulunduğu gelişim basamağına ve de çevresel şartlara bağlıdır (Hoffmann and Baltimore, 2006).



Şekil 2.3 NF- κ B aktive edici sinyaller ve NF- κ B tarafından düzenlenen genler. A. NF- κ B aktive edici sinyaller; enflamatuvar ajanlar, karsinojenler, tümör oluşturucular, viral proteinler, stres, kemoteropotikajanlar ve γ radyasyon. B. NF- κ B aktivasyonu yoluyla hücrede hayatta kalma başarısı, proliferasyon, angiogenez, enflamasyon, invazyon ve metastaz oluşumlarıyla ilişki genleri düzenler. EGF, Epidermal Büyüme Faktörü; HIV, Human Immunodeficiency Virus; KSHV, Kaposi's sarcoma ilişkili herpesvirus; EBV-LMP1, Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Gen; HTLVI, Human T-cell lymphotropic virus I; LBS, Lipopolisakkaritler; DMBA, 7,12-dimetilbenz(a)antrasen; PMA, Phorbol-myristate acetate; ROI, Reaktif Oksijen Ara Ürünleri; Bcl-xl, Basal Hücre Lenfoma-Extra Büyük; IAP, Apoptizis Kaspaz and İnhibitorü; cFLIP, FLICE İnhibitor Protein; cMyc, Myelocytomatosis Protoonkogen; VEGF, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü; ICAM,

İntrasellüler Serum Adezyon Molekülü; VCAM, Vasküler adezyon molekülü; ELAM, Endotelial Lökosit Adhezyon Molekülü; COX, Siklooksijenaz; iNOS, İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz; MMP, Matriks Metallopeptidaz; uPA, Üriner Plazminojen Aktivatör

NF- κ B dimerleri hücrelerde uyarım olmadığı durumlarda, sitoplazmada I κ B inhibitör proteinlerine nonkovalent etkileşim yoluyla bağlanmış halde inaktif formda bulunmaktadır. Şimdiye kadar yedi adet I κ B molekülü tanımlanmıştır: I κ B α (NF- κ BIA), I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100, p105. Bilinen tüm I κ B proteinleri ankirin tekrar bölgeleri içerirler. NF- κ BIA 3 kısımdan oluşmaktadır; N terminal domain, 30-33 aminoasitlik çoklu kopyalardan (6 kopya) oluşan ankirin tekrar domaini ve prolin-glutamat-serin-treonin amino asitlerince zengin C-terminal (PEST) bölgelerinden oluşur (Şekil 2.1). Ankirin tekrarlar ve de RH domaini arasındaki spesifik etkileşim NF- κ B ve I κ B arasındaki bağlantının özelliğini belirlemektedir. Hücresel uyarımın olmadığı durumlarda, I κ B proteininin NF- κ B molekülündeki NLS dizisini maskeleyen sonucunda, NF- κ B proteininin nükleer translokasyonunu önleyerek sitoplazmada kalmasını sağlamaktadır (Baldwin, 1996; Kopp and Ghosh, 1995; Thanos and Maniatis, 1995; Verma *et al.*, 1995). Bunun yanı sıra NF- κ BIA bazı NF- κ B komplekslerinin çekirdekten sitoplazmaya hızlı transferini sağlayan Nükleer Export Dizisi (NES) de taşımaktadır. Sitoplazma ve çekirdek arasındaki dinamik mekik dengesi NF- κ BIA'nın yıkılışına bağlıdır, çünkü NF- κ BIA'daki NES dizisini uzaklaştırır ve maskelenmiş NLS'yi açığa çıkararak, NF- κ B'nin çekirdeğe gitmesini sağlamaktadır (Hayden and Ghosh, 2004). Daha önce de belirtildiği gibi NF- κ B latent olarak, I κ B ile kompleks oluşturmuş şekilde sitoplazmada inaktif olarak bulunur. Ne zaman ki hücrelere dışarıdan bir uyarım geldiğinde NF- κ B aktive olarak çekirdeğe girer ve NF- κ BIA dahil olmak üzere programlı hücre ölümü (apoptosis), hücre adhezyonu, hücre proliferasyonu, doğuştan ve sonradan kazanılan immün yanıtları, enflamasyon ve hücresel stres üzerinde etkili olan birçok genin ekspresyonunu başlatır. (Hayden and Ghosh, 2004; Pahl, 1999). Böylece NF- κ B aktivitesinin kontrolü için başlangıç anahtarı NF- κ B/I κ B kompleksi etkileşiminin düzenlenmesidir. Hemen hemen tüm sinyaller büyük molekül ağırlıklı serin-spesifik I κ B kinaz (IKK) ile NF- κ B/I κ B kompleksinin yakınlaşmasına ve akabinde NF- κ B aktivasyonuna yol açmaktadır. IKK nadir bir kinaz tipidir. IKK birçok hücrede 3 altünite içermektedir. Bunlar; katalitik subüniteler olan IKK α ve IKK β , ve regulator

subünite olan IKK γ (NEMO= NF- κ B essential modifier)'dur (Rothwarf and Karin, 1999; Ghosh and Karin, 2002) (Şekil 2.1).

2.2. NF- κ B AKTİVASYON YOLAĞI

NF- κ B; normal hücrelerde, I-kappa-B proteinleri (I κ B α , β ve γ) adı verilen inhibitör proteinlere bağlı şekilde, sitoplazmada inaktif halde bulunmaktadır (Tak and Firestein, 2001). Ekstrasellüler sinyaller sonucu I κ B kinaz (IKK) enzimlerinin düzenleyici altüniteleri uyarılır ve sinyalleri algılayarak katalitik altünitelerine iletir. Bu durum inhibitör proteinlerin fosforilasyonu ve yıkılmasına yol açmaktadır. I κ B proteininin yıkılımı ile aktif hale gelen NF- κ B çekirdeğe taşınmaktadır (Gilmore, 2003; Pahl, 1999; Karin, 1999). NF- κ BIA (I κ B α) fosforilasyonu ve NF- κ B'nin çekirdekte gözlenmesini takiben yaklaşık 1 saat sonra yeniden sentezlenmiş olan NF- κ BIA proteini ortaya çıkar. NF- κ BIA proteininin yeniden oluşumu, mRNA'sının hızla indüklenabilen ekspresyonu sayesinde protein sentezi ile gerçekleşir. NF- κ BIA promotöründe NF- κ B bağlanma bölgesi bulunduğundan, active edici sinyaller gelir gelmez aktive olan NF- κ B, NF- κ BIA ekspresyonunu başlatır (Chiao *et al.*, 1994; LeBail *et al.*, 1993). Geniş ölçüde hücreleri uyararak ve NF- κ B transkripsiyon faktörünü aktive eden sinyaller; bakteriyel ve viral ürünler, kanserojenler, sitokinler ve antioksidant radikaller olabilmektedir (Baldwin, 2001).

NF- κ B sinyal yolu, klasik ve alternatif olarak iki şekilde olabilmektedir (Bonizzi and Karin 2004) (Şekil 2.4).

Klasik yolda; örneğin proenflamatuvar sitokin tümör nekroz faktör α (TNF α) IKK kompleksinin β altünitesini uyararak aktive eder. IKK kompleksi, NF- κ BIA (I κ B α) molekülünün N-terminal yakınındaki 2 spesifik serin (Ser32 ve Ser34) bölgesini fosforile eder. Böylece hedef I κ B molekülü 26S proteosom aracılığıyla yıkılır (Şekil 2.4 A). 26S proteosom, ökaryotik organizmaların çekirdek ve sitoplazmasında bulunan, esas görevi proteinleri yıkmak olan, büyük (1500-2000 kDa) multikatalitik bir enzim kompleksidir (Ciechanover, 1994; Brooks *et al.*, 2000). Bu enzim çeşitli hücre düzenleyicilerin ve p53, Bcl-2, p21, p27 gibi apoptozisi indükleyici faktörleri ve A, B, D, E siklinlerinin yıkılmasını sağlar (Maki *et al.*, 1996; Chademec *et al.*, 1999;

Cayrol and Ducommun, 1998; Clurman *et al.*, 1996; Diehl *et al.*, 1997; Pagano *et al.*, 1995; Sudakin *et al.*, 1995).

Alternatif yolda; IKK kompleksinin α altünitesi aktive edilir ve p100 veya p105 proteininin C-terminal ucundan fosforile eder. Fosforile edilmiş olan p100 ubiquitin ligaz mekanizması tarafından tanınır. Ubiquitin ligazlarca polibiquitinasyona uğrayan p100 proteinleri bunun sonucunda C-terminalinden proteozomlarca yıkılım meydana gelir (Palombella *et al.*, 1994; Karin and Ben-Neriah, 2000). Bunun sonucunda p105'in amino-terminal yarısından oluşan p50 meydana gelir (Şekil 2.4 B).

Her iki aktivasyon sinyal yolunda da maskelenmiş NLS açığa çıkar. Azad edilmiş NF- κ B dimeri, hedef gende promotör yada enhancer bölgesindeki spesifik dizilere bağlanmak ve ekspresyonu başlatmak için çekirdeğe taşınır. Genom üzerine bağlanma bölgesi (κ B) dizisi Zabel *et al.*, (1991) tarafından 5' GGGRNNYYCC 3' ; R=Pürin, Y=Pirimidin olarak tanımlanmıştır. Bu kombinasyonel farklılık ve bireylere özgü farklı DNA bağlanma bölgeleri (κ B), varyasyona yol açmaktadır. Çekirdeğe geçmiş olan aktif NF- κ B hedef genlerinden biri olan NF- κ BIA'nın da ekspresyonunu başlatır. Henüz sentezlenmiş olan NF- κ BIA proteinin çekirdekte tekrar NF- κ B ile kompleks oluşturarak onu inaktive eder ve sitoplazmaya taşır (Chiao *et al.*, 1994).

NF- κ B aktivasyonu protein sentezinden bağımsızdır (Sen and Baltimore, 1986). Sitoplazmanın deterjanlarla muamelesi sonucunda NF- κ B'nin hücreden bağımsız aktive olduğu gösterilmiştir (Baeuerle and Baltimore, 1988). Bu bulgular, NF- κ B aktivasyonunun sitoplasmik formundan farklı olacak şekilde post-translasyonel mobilizasyon geçirdiğini göstermektedir (Grimm and Baeuerle, 1993).

2.3. NF- κ B ve APOPTOZİS

2.3.1. Antiapoptotik Rol

NF- κ B ailesine ait transkripsiyon faktörleri farklı hücre soylarında apoptotik program düzenlenmesinde rol almaktadırlar (Barkett and Gilmore, 1999). NF- κ B'nin sitoprotektif rolünün ilk kanıtı, 15 günlük fare embriyosunda karaciğer apoptozisinde analizlenmiş olan p65'tir (Beg *et al.*, 1995; Beg and Baltimore, 1996). NF- κ B'nin transkripsiyonal aktivitesi apoptotik basamaklarda doğrudan bloke edici ürün oluşturan birçok antiapoptotik genin ekspresyonuna neden olur. Bu ürünlere; IAPs, c-FLIP (caspase-8/FADD-like-IL-1 β -converting enzyme inhibitory system) ya da Bcl-2 ailesi proteinleri örnek verilebilir (Deveraux and Reed, 1999; Wang *et al.*, 1998; Irmiler *et al.*, 1997; Golstev *et al.*, 1997; Delhalle *et al.*, 2004). NF- κ B aktivasyonu aynı zamanda birçok proapoptotik genin baskılanmasında da rol alır (Delhalle *et al.*, 2004). Örneğin, Forkhead ve büyüme engelleyici proteinler ve de DNA hasar uyarıcı gen 153/C/EBP-homolog proteini (Tran *et al.*, 2003; Nozaki *et al.*, 2001), proapoptotik gen *bax* (Bentires *et al.*, 2001; Webster and Perkins, 1999) NF- κ B aktivasyonu ile baskılanırlar.

2.3.2. Proapoptotik Rol

NF- κ B bazı hücre tiplerinde belirli koşullar altında proapoptotik aktiviteye sahip olabilmektedir. TNF reseptör süper ailesinin üyeleri olan DR4, DR5, DR6, Fas ve Fask ligantları gibi apoptozisi indükleyen ürünler oluşturan genlerin ekspresyonunu düzenlemektedirler (Matsui *et al.*, 1998; Ravi *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001; Kasof *et al.*, 2001). NF- κ B aktivitesi apoptozis ile bağdaştırılmaktadır. NF- κ B serum eksikliği ile indüklenmiş insan embriyonik hücrelerinde aktif durumdadır ve onun inhibisyonu, hücreleri kısmen bu ölümden korumaktadır (Grimm *et al.*, 1996). Glutamat-indüklenen nöral toksisite, NF- κ B inhibitörü olan sodyum salisilat ile muamele edilerek önlenmiştir (Grilli *et al.*, 1996; Lipton, 1997).

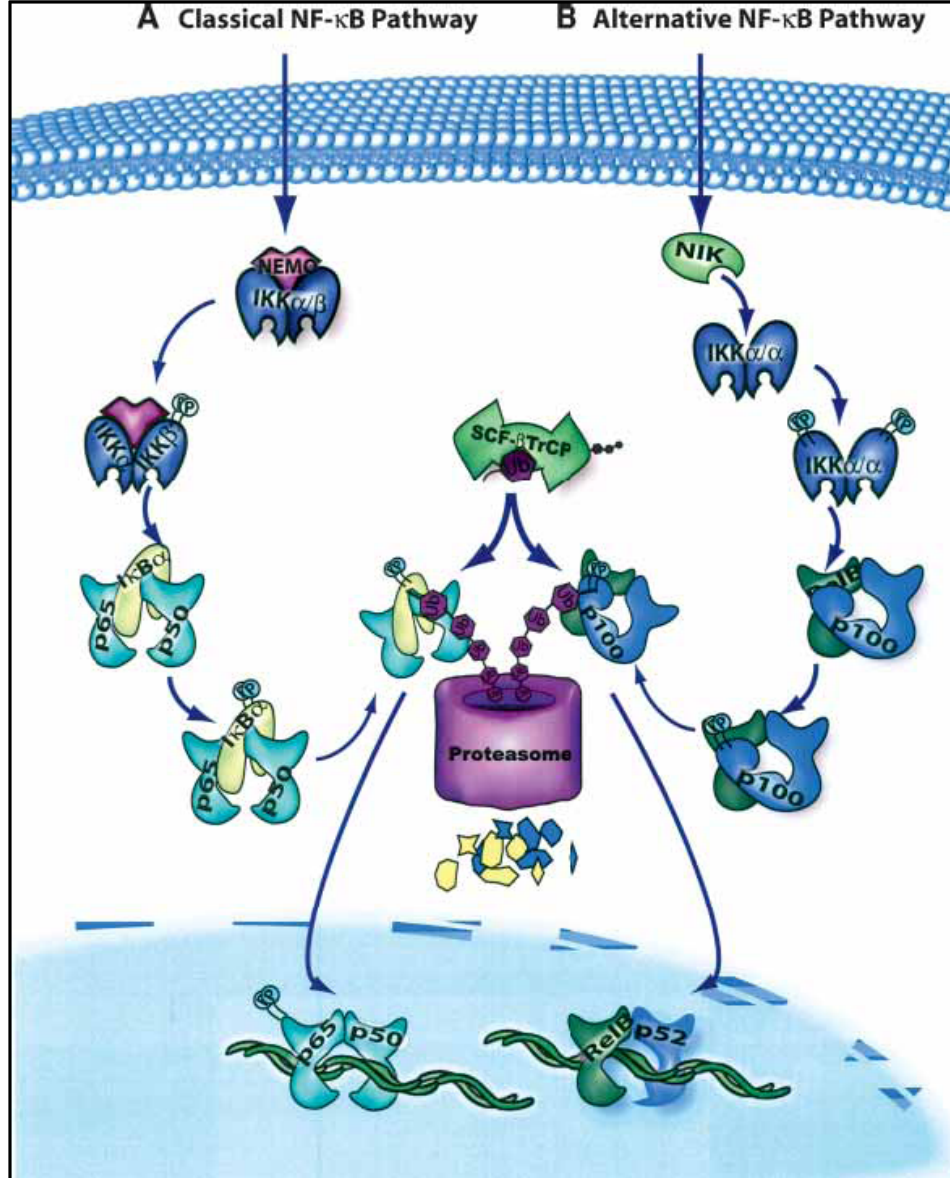
2.4. NF- κ B VE İLAÇ DİRENCİ

NF- κ B aktivitesi kanserli hücrelerin kemoteropatik ilaçlara karşı olan dirençlerinin artmasına yol açmaktadır. Örneğin irinotecan (camptothecin-11), topoizomeraaz I poison ile muamele edilmiş kolorektal LOVO kanser soylarında, mutant NF- κ BIA (I κ B α) sentezinde fazla ekspresyon oluşturduğu ve HT1080 fibrokarsinoma hücrelerinin irinotesan, daunorubisin ya da iyonize radyasyon ile muamelesi sonucunda NF- κ B inhibisyonu yoluyla apoptozisin indüklendiği saptanmıştır (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999). NF- κ B aynı zamanda P-glikoprotein membran transporter kodlayan multidrug resistance-1 (Zhou and Kuo, 1997; Bentires *et al.*, 2003) ve glutatyonin S-transferaz (Morceau *et al.*, 2004) gibi hücrel ilaç alımı veya tasfiyesini düzenleyen genlerin regülasyonunu yapmaktadır.

2.5. NF- κ B VE KARSİNOGENEZ

Birçok çalışma NF- κ B ailesi üyelerinin kanser gelişimi ile yakından ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (Sylla and Temin, 1986; Moore and Bose, 1988; Gilmore *et al.*, 1996). Birçok kanser p65, *c-rel*, NF- κ B1, NF- κ B2, *bcl-3* ve NF- κ BIA gibi genlerdeki amplifikasyon ya da kromozom translokasyonları ile ilişkilendirilmiştir (Neri *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1991; Kitajima *et al.*, 1992; Ohno *et al.*, 1990). NF- κ B'nin temel aktivitesi aynı zamanda çeşitli tümör ve hematolojik malignansilerde de gözlenmiştir. Örneğin Hodgkin's lymphomareed-Sternberg hücrelerinde, NF- κ B yüksek düzeyde aktif halde bulunmuştur ve NF- κ B fonksiyonel inhibisyonunun apoptozisi kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Bargou *et al.*, 1997; Hinz *et al.*, 2001; Izban *et al.*, 2001). Reed-Sternberg hücrelerindeki bu aktivasyon, NF- κ BIA (I κ B α) ve I κ B ϵ inhibitörlerinin kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ilgili olduğu düşünülmektedir (Cabannes *et al.*, 1999; Krappmann *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 1998). Arttırılmış NF- κ B aktivitesi hormon bağımlı ve bağımsız göğüs kanserinde ve kemirgenlerde kimyasal olarak indüklenmiş göğüs kanserini kapsayan çeşitli tümörlerde saptanmıştır (Dejardin *et al.*, 1995; Cogswell *et al.*, 2000; Nakshatri *et al.*, 1997; Rayet and Gelinas 1999; Sovak *et al.*, 1997). Çeşitli viral onkoproteinler (insan T-hücresi leukomia virüs tip 1; hepatitis virüs protein HBx ve Epstein-Barr virüsten

gelen latent membran protein 1) hücre transformasyon süreci boyunca NF- κ B'yi aktive eder (Yamaoka *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2000; Knecht *et al.*, 2001; Kowalik *et al.*, 1993).



Şekil 2.4 NF- κ B Klasik ve Alternatif Aktivasyon Yolağı. Şekilde iki farklı sinyal yolu betimlenmiştir. (A) Klasik yol I κ B α yıkılması ile sonuçlanan IKK β aktivasyonunu kapsamaktadır. Bu yolda TNFR1/2, TCR ve BCR, TLR/IL-1R gibi daha birçok sinyal yer almaktadır. (B) Alternatif yol, IKK α 'nın aktivasyonunu içerir. Bunun sonucunda da p100'ü p52'ye dönüştüren fosforilasyon ile devam eder. Alternatif yolda var olan sinyaller ise LT β R, BAFFR, and CD40R'dir. Alternatif yol uyarımı aynı zamanda klasik yolu da uyarabilir. (Hayden and Ghosh, 2004). NIK, NF- κ B indükleyen kinaz; LT β R, Lenfotoksin Beta Reseptör; BAFFR, B Hücre Lenfosit Aktive Edici Faktör Reseptörü; CD40R, TNF ailesi üyesi CD40 antijen Reseptörü; TNFR1/2, Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1/2; TCR, T Hücre Reseptörü; BCR, B Hücre Reseptörü; TLR/IL-1R, Toll-like Reseptör/İnterlökin-1 Reseptörü

2.6. NF- κ B VE ENFLAMASYON

Daha önce de değinildiği gibi Interlökin (IL)-1 ve Tumor nekroz faktör (TNF) α gibi pek çok enflamatuvar araç NF- κ B'nin aktivasyonun akabinde nükleer translokasyonuna yol açar. Bu durum enflamatuvar yanıt, gelişim (angiogenez) ve hücre adezyonunu içeren gen ürünlerinin transkripsiyonunu sağlar. NF- κ B hücre adezyon moleküllerinin (intercellular adhesion molecule [VCAM]-1, E selectin, tenascin C), vasküler endotelyal büyüme faktör ve matrix metalloproteaz-2 ve -9 (extracellular matrix'in yıkımından sorumlu)'un ekspresyonunu teşvik eder (Pahl, 1999). NF- κ B ayrıca indüklenebilir nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz, (COX)-2, 5- ve 12-lipoiksigenaz, kemokinler ve sitokinler (IL-1 ve TNF α) gibi enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu da kapsamaktadır. COX-2'nin agresif kolorektal kanserlerde upregüle edildiği ve angiogenesisi desteklediği saptanmıştır. Nitrik oksit, prostaglandinler, IL-1 ve TNF α gibi araçlar kan basıncı, trombosit agregasyonu ve vücut ısısı regülasyonunda görev alırlar (Delhalle *et al.*, 2004).

NF- κ B aktivitesinin enflamatuvar barsak hastalığı, Crohn's hastalığı, ülseratif kolit (kalın barsak iltihabı), romatoid artrit ve astım gibi kronik enflamatuvar hastalıklarda rol aldığı saptanmıştır (Delhalle *et al.*, 2004). Kronik enflamasyonda NF- κ B'nin devamlı aktivasyonu tümör başlangıcına katkısı olabilir. Transkripsiyon faktörünce aktive edilen antiapoptotik genler nedeniyle, hücreler apoptozise gidecekken, tam tersi hücrelerin hayatta kalmaları ve o sebeple de prekanseröz lezyonların oluşumuna izin verilmiş olunur. Örneğin, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ya da IL-1 geninin devamlı aktivasyonu (ki; her ikisi de NF- κ B aktivasyonu ile tetiklenir) gastrik kanserin gelişimi için risk oluşturan faktörlerdir (El-Omar *et al.*, 2000; Peek and Blaser, 2002). Devamlı NF- κ B aktivasyonu, enflamatuvar barsak hastalığı, ülseratif kolit ya da Crohn's hastalığından muzdarip olan hastalarda, kolit ilişkili kanser gelişiminden de sorumlu olabilir (Neurath *et al.*, 1996; Rogler *et al.*, 1998; Ekbohm *et al.*, 1990)

2.7. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

2.7.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi moleküler biyolojinin en temel bileşenleri arasında yer almaktadır. 1970 yılında DNA moleküllerinde kullanılabileceğinin belirlenmesi ile birçok kolaylığı ve kullanım alanını da beraberinde getirmiştir.

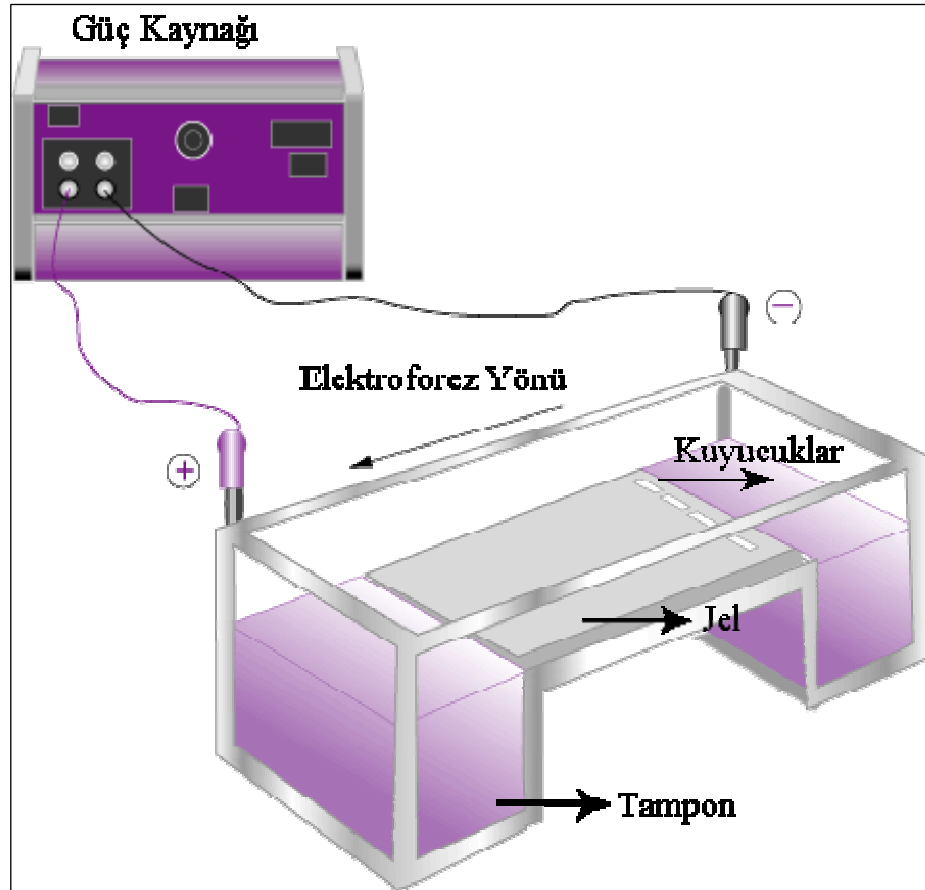
Elektroforez tekniği, bir elektriksel alan içinde moleküllerin sahip oldukları net elektrik yüklerine göre farklı hareket etmeleri prensibine dayanır. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlaması, saflaştırılması ve ayrıştırılması için kullanılan en yaygın yöntemdir. DNA molekülleri genellikle agaroz ya da poliakrilamid jel içinde elektroforez edilir. Agaroz kırmızı bir alg türü olan Agar agar'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür. Elektroforez aşamasında hazırlanan jellerin konsantrasyonları ayırma gücünü etkilemektedir. Jellerin içerisinde, DNA moleküllerinin girip hareket ettiği mikroskobik porlar vardır. Jelin konsantrasyonu arttıkça porların çapı küçülürken, tam tersine konsantrasyon azaldıkça porların çapı artmaktadır. Ayırabildikleri DNA parçalarının uzunlukları 200 baz çifti (bp) ile 50 kilo baz (kb) gibi oldukça geniş aralıkta olabilmektedir. Agaroz konsantrasyonu %0,5-3,0 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece küçük DNA fragmentleri için yüksek büyük DNA fragmentleri için ise düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanır.

DNA molekülleri, proteinler ve diğer pek çok biyomoleküller belirli bir elektriksel yük taşır. DNA molekülü fosfat grubu taşıması nedeniyle negatif yüklüdür ve bu nedenle bir elektrik alanında negatif kutuptan pozitif kutba hareket eder. Bir molekülün hareket hızı şekline, büyüklüğüne, molekül ağırlığına ve net elektriksel yüküne bağlıdır. DNA molekülleri şekilsel olarak benzer ve negatif yüklü olduğundan, bu kriterlere göre elektroforezle ayrılmazlar. Fakat DNA molekülleri büyüklüklerine, yani molekül ağırlıklarına bağlı olarak bir jel içinde ayrılabilirler. Agaroz jeldeki örnekler genellikle yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel

alanda yürütülmektedir. Örnekler, jel içine yerleştirilen tarak vasıtasıyla oluşturulan kuyucuklar içerisine uygulanır. Jel daha sonra içine elektrodlar yerleştirilmiş ayırıcı tampon tankına daldırılır. Elektrodlar arasında bir akım oluşturan bir voltaj uygulanır (Şekil 2.5).

2.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)

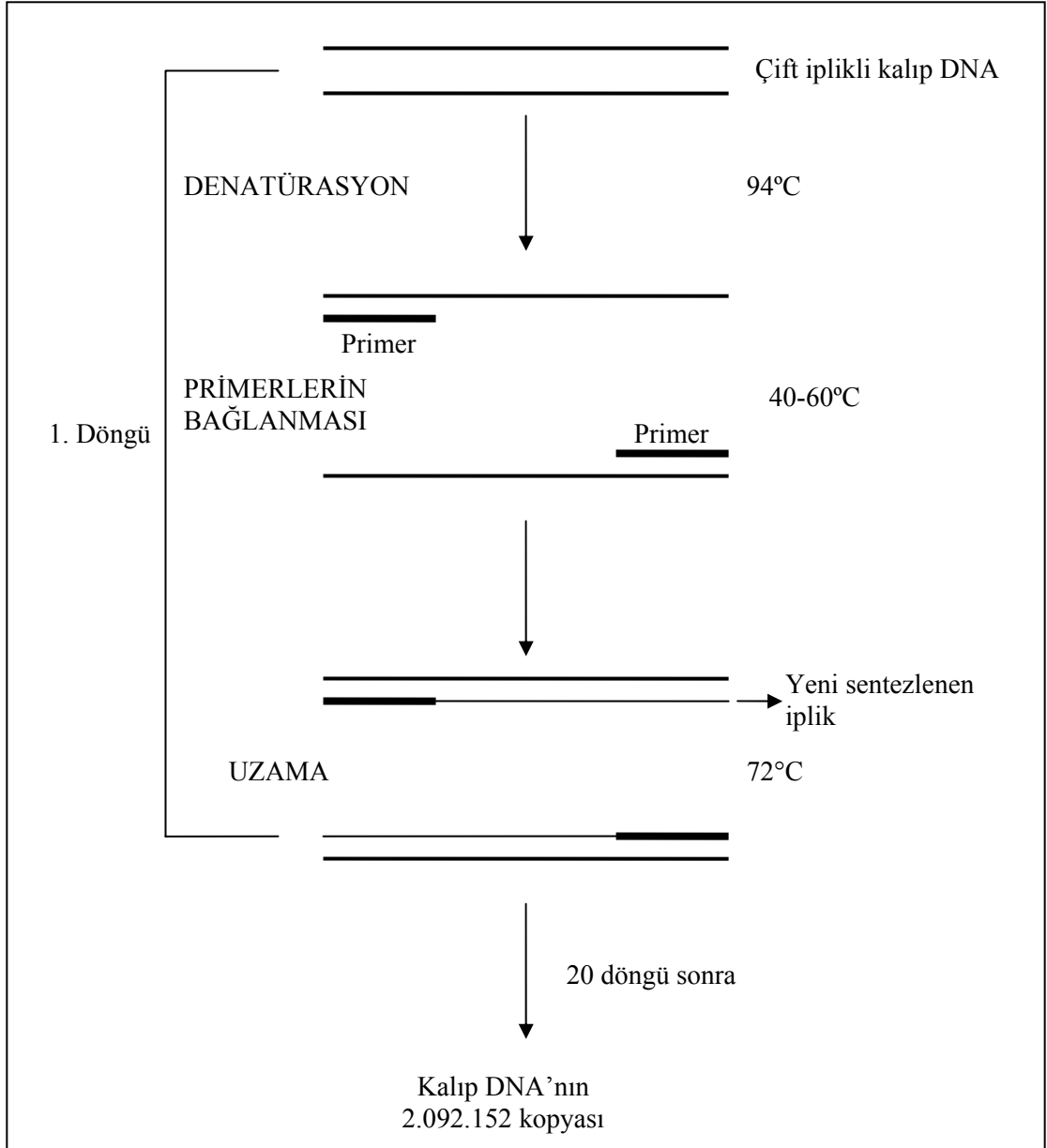
PCR'in keşfi ile (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985, 1988) sadece moleküler biyoloji alanında değil, organizma ve populasyon biyolojisi alanlarında da (Arnheim *et al.*, 1990) genetik marker oluşturmak adına bir çığır açmıştır.



Şekil 2.5 Agaroz jel elektroforezi

PCR kısaca in vitro koşullarda DNA'nın çoğaltılması işlemidir. Bu teknikte DNA çoğaltımının başlamasına olanak sağlayacak olan 3'OH grubunu sağlamak için iki

oligonükleotit (primer) kullanılır. Primerler çoğaltmak istediğimiz gen bölgesinin başlangıç ve sondaki dizilerine komplementerdir. Reaksiyon kalıp DNA, DNA polimeraz I, primerler, dNTP (deoksi-nükleotit trifosfatlar; dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve enzimin optimum koşullarını sağlamak için eklenen kimyasalların oluşturduğu bir ortamda gerçekleştirilir. PCR üç temel adımdan oluşur. İlki, çift zincirli DNA'nın ısıtılarak (94°C) denatüre edilmesi (denatürasyon); ikinci aşama, sıcaklığın düşürülmesi ile (40–60°C) primerlerin tek zincir DNA üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelere bağlanması (annealing); son olarak, hibritleşmeden sonra ısı dayanıklı bir DNA polimeraz (*taq* polimeraz ile (72°C'de) ile yeni zincirin sentezlenmesi (extension) aşamalarıdır. Bu işlemler 20 ya da daha çok kez tekrarlanarak istenilen DNA bölgesi çoğaltılmış olur (~2³⁶ kopya) (Şekil 2.6). Bu artılmış DNA bölgesi; daha sonra çeşitli amaçlara yönelik başka metotlar uygulanarak (RFLP, RAPD vb.) adli tıpta suçluları saptama, hastalıklara neden olan gen mutasyonlarının saptanması, patojen saptama, gen ekspresyonu çalışmaları, populasyon genetiği ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadırlar.



Şekil 2.6 Polimeraz zincir reaksiyonu

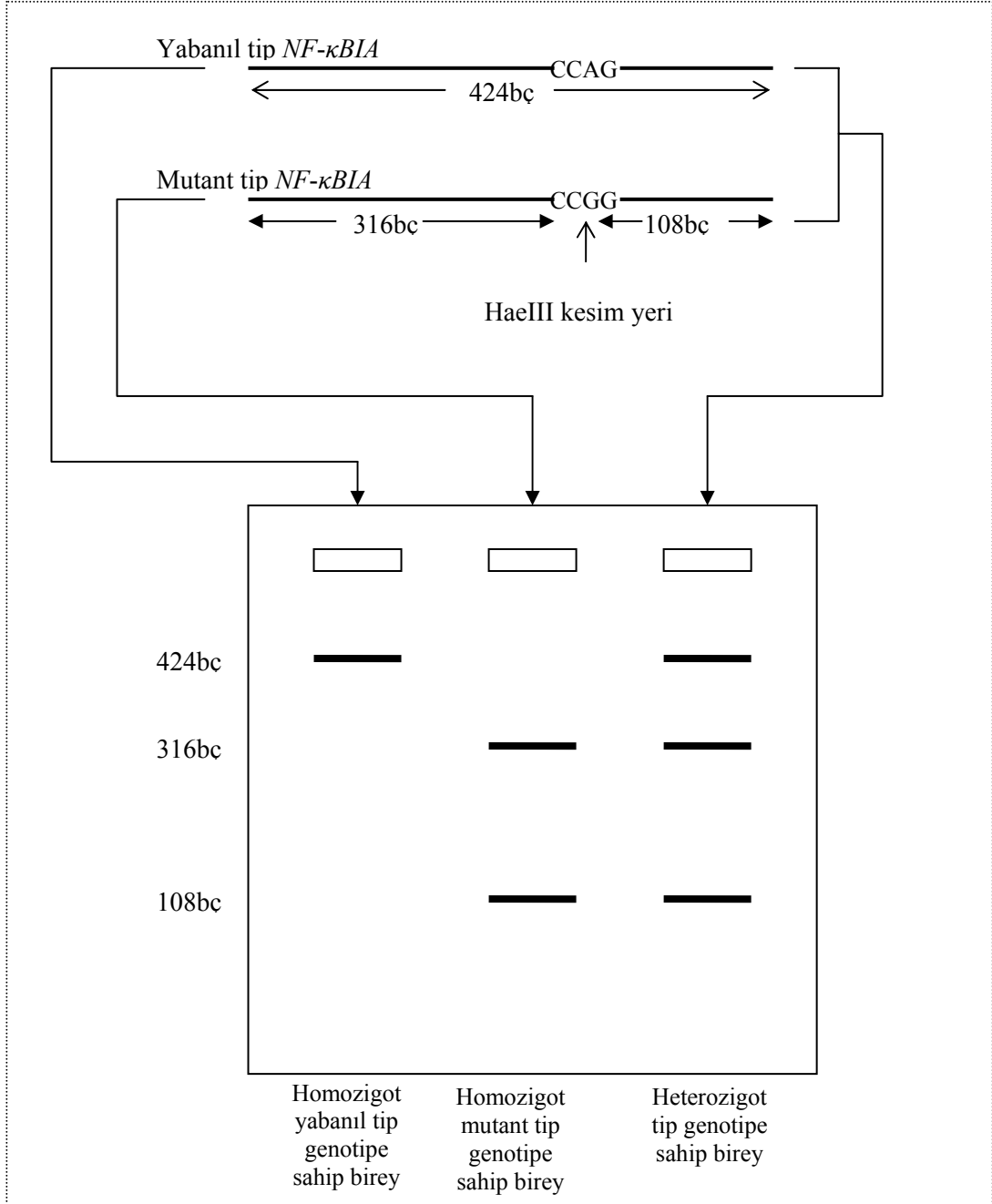
2.7.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu, restriksiyon endonükleazlar kullanılarak DNA'nın sindirimine (kesimine) dayanır. Restriksiyon endonükleazlar 1968 yılında keşfedilmiş bakteri enzimleridir (Linn and Arber, 1968; Meselson and Yuan, 1968). Restriksiyon endonükleazlar DNA üzerindeki bazı özel dizileri tanır ve DNA'yı bu dizilerden keserler. Farklı bakteri suşlarından farklı sayıda bazdan oluşan ve farklı tanıma dizisine sahip, farklı enzimler elde edilebilir. DNA üzerindeki restriksiyon tanıma dizilerinde oluşan herhangi bir nükleotid değişimi (SNP; tek nucleotit

polimorfizm, insersiyon/delesyon, translokasyon vb mutasyon çeşitleri) restriksiyon enziminin o bölgeyi tanıyamaması akabinde, kesimin gerçekleşmemesine yol açar. Bu bilgiye dayanarak; aynı restriksiyon enzim kullanılarak farklı kaynaklı (farklı tür ya da birey vs.) DNA molekülleri sindirildiğinde, farklı uzunlukta DNA parçaları oluşabilir. RFLP sindirim ürünlerinin analizi genellikle agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi yapılır. Sindirim ürünlerinin jel elektroforezinde yürüttüğümüzde ise, bir sindirim profili (görüntüsü) oluşur. Jel profilinde oluşan farklılıklar bize, tanıma bölgelerindeki nükleotid polimorfizmlerinin varlığını belirtir. Bu yöntem bize dolaylı olarak nükleotid değişimi varlığını gösterir (Şekil 2.7).

Jeldeki sindirim ürünlerini görüntülemek için birkaç teknik kullanılabilir. Eğer bir kuyucuğa düşen DNA miktarı 50ng'dan büyükse, etidyum bromür ile boyama her bir bandın açıkça görüntülenmesini sağlar. Gümüş boyama da benzer şekildedir, fakat daha küçük miktarda DNA'nın (<100pg; Guillemette and Lewis, 1983) görüntülenmesi için çok daha hassas ve kullanışlıdır. Radyoaktif işaretleme ise, çok daha hassas bir yöntemdir. Elektroforetik ayırmadan önce RFLP ürünleri radyoaktif ³²P ya da ³⁵S ile işaretlenir. Elektroforez sonrası jel üzerine X-ray filmi konularak bantların filme geçmesi sağlanır. Otoradyografi ile X-ray filminin üzerinde her bir bant leke halinde görüntülenir.

RFLP metodu kullanılarak, PCR ile çoğaltılmış belirli bir gen bölgesi, tanımlanmış özel mutasyonlara karşı uyumlu eşsiz restriksiyon enzimi ile taranabilir. Analiz edilen gen bölgesi, jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilir ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları saptanabilir.



Şekil 2.7 Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemini ile *NF-κBIA* 3'UTR A→G polimorfizminin saptanması A nükleotidinden G nükleotidine değişim sonucunda bir HaeIII kesim yeri olmaktadır. Jel elektroforezi uygulaması ile bu mutasyon açıkça görünmektedir

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

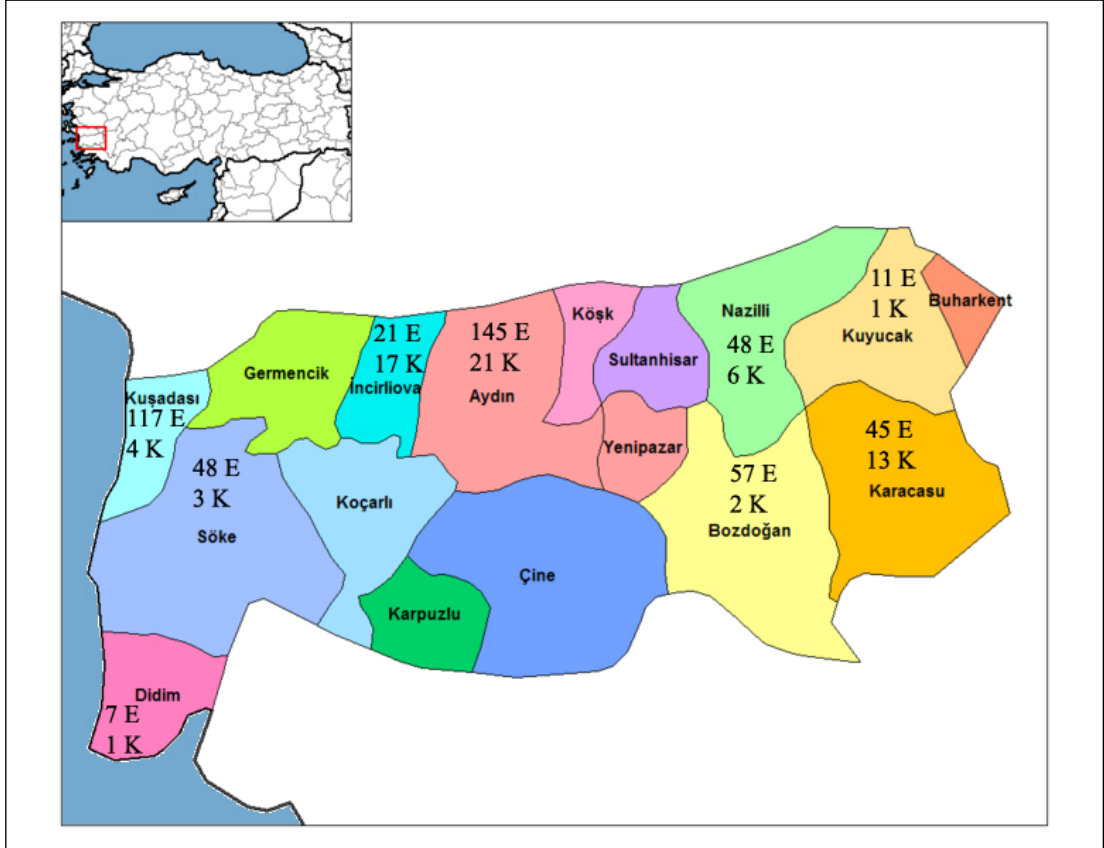
Çalışma, kesitsel analitik bir çalışmadır. Örnek büyüklüğü, %95 Güven aralığında, prevalans = 0.50 ve $d = 0.05$ için 384 kişi olarak belirlenmiştir. Çalışma grubunun seçiminde çok aşamalı örnekleme kullanılmıştır. Aydın İli, merkez, batı, doğu, kuzey, güney olmak üzere beş bölgeye ayrılmış; bu bölgelerdeki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

Sağlıklı popülasyondan 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 bakımları istasyonun görevli hekimi tarafından gerçekleştirildikten sonra, sağlıklı kabul edilen gönüllülerle yüzyüze görüşülmüştür. Dışarda 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.

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 3.1 üzerinde gösterilmiştir.

3.2. KAN ÖRNEKLERİ

Çalışmanın amacı hakkında bilgilendirilmiş 565 Sağlıklı bireyden alınan yaklaşık 2 mL kan örnekleri 0.06 mL EDTA (K3) (Etilen diamin tetra asetat) içeren, 2.5 mL'lik tüplere aktarılmıştır. Kan örnekleri DNA izolasyonu aşamasına kadar 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Aydın ili ilçelerinde çalışma grubuna katılmış olan erkek (E) ve kadın (K) sayıları

3.3. DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu, PUREGENE DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapılmıştır. Üretici firma tarafından belirlenen protokol (Rapid DNA Purification Protocol For 300 µL Whole Blood) değiştirilmeden uygulanmıştır.

İçerisinde 900 µL RBC (Red Blood Cell) lizis solusyonu eklenmiş olan 1.5 mL'lik tüplere, steril pipet uçlarıyla 300 µL kan eklendi. Tüpler oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi, bu süre boyunca nazikçe altüst edilerek homojen olması sağlandı. Tüpler

daha sonra 13000–16000 g'de 20 saniye santrifüj edilerek akyuvarların çökmesi sağlandı. Lizis olmuş alyuvarların bulunduğu süpernatant mümkün olduğunca (yaklaşık 10-20 µL kalıncaya kadar) çökelmiş olan hücre yığından uzaklaştırıldı. Akyuvar hücre pelleti 10 saniye kadar vorteks edilerek dağıtıldı. Üzerlerine 300 µL Hücre Lizis Solusyonu (Cell Lysis Solution) eklenerek pipetaj ya da 10 saniye vorteks edilerek solusyon içinde homojenize olmaları sağlandı. Bu aşamadan sonra örnekler lizis olmaları için 37°C'de 15–60 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücre lizatı oda ısısında soğutulduktan sonra, 100 µL Protein Çöktürme Solusyonu (Protein Precipitation Solution) eklendi 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, DNA içeren süpernatant, daha önceden içlerine 300 µL %100 izopropanol eklenmiş yeni steril tüpe aktarıldı. Örnekleri içeren tüpler nazikçe yaklaşık 50 defa altüst edildikten sonra 13000–16000 g'de santrifüj edildi. Bu aşama sonunda DNA toplu iğne büyüklüğünde beyaz pellet olarak gözlemlendi. Süpernatant, pellet kaybolmaması için dikkatle izlenerek tüpten uzaklaştırıldı ve tüpler kurutma kâğıdı üzerinde kurutuldu. Üzerlerine 300 µL %70 etanol eklenen tüpler birkaç kez altüst edildi. Etanol ile temizlenen DNA son kez 13000–16000 g'de santrifüj edildi. Etanol DNA pelletini gözden kaçırmadan çok dikkatli olarak pipet yardımıyla tüplerden mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Temiz bir kurutma kâğıdı üzerinde yaklaşık 10 dakika beklenerek alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Alkolden arınmış DNA örnekleri üzerine 100 µL TE (Tris-EDTA; 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 7,5) tamponu eklendi. DNA'nın çözünmesi için 37°C'de yaklaşık 20 dakika inkübe edildi. DNA örnekleri genotipleme yapılana kadar 4°C'de saklandı.

3.4. DNA'NIN KALİTE VE KANTİTESİNİN BELİRLENMESİ

Kandan izole edilen genomik DNA, izolasyon sırasında hasar oluşumu ve kontaminasyonu kontrol etmek için 1 µL kadar alınarak %0.8'lik agaroz jel elektroforezinden sonra etidyum bromür ile boyanarak UV altında görüntülendi.

DNA'nın miktarını saptamak için 40 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:

$$\text{DNA } (\mu\text{L/mL}) = 260 \text{ nm'deki Optik Dansite (Absorbans)} \times \text{Seyreltme Katsayısı} \times 50 \text{ mL'de } 50 \mu\text{L çift iplikli DNA, } 1 \text{ Absorbans'a karşılıktır.}$$

Konsantrasyonları saptanan DNA örnekleri, stok kontaminasyonunu önlemek ve daha sonra yapılacak olan genotipleme için uygun değerlerde standardizasyonu sağlayabilmek için 50 ng/ μL olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.5. *NF- κ B1* VE *NF- κ B1A* LOKUSLARININ PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENMESİ

3.5.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Her birey için hazırlanan total genomik DNA'da polimorfizmlerin bulunduğu 285 bp'lik *NF- κ B1* ve 424 bp'lik *NF- κ B1A* bölgeleri, Bu *et al.* (2007) tarafından tanımlanan 2 set spesifik PCR primerleri ile eppendorf marka PCR aleti kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu primer çifti baz dizileri ve Tm değerleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 PCR primerleri ve erime sıcaklıkları

Primer çifti	Gen	Erime Sıcaklığı (Tm)
F: 5'-TGGGCACAAGTCGTTTATGA-3'	<i>NF-κB1</i>	64.0°C
R: 5'-CTGGAGCCGGTAGGGAAG-3'	<i>NF-κB1</i>	64.7°C
F: 5'-GGCTGAAAGAACATGGACTTG-3'	<i>NF-κB1A</i>	63.5°C
R: 5'-GTACACCATTACAGGAGGG-3'	<i>NF-κB1A</i>	58.3°C

PCR optimizasyonu için birçok parametre değiştirilerek denemiştir. En iyi sonuçları veren PCR parametreleri her iki gen için ayrı ayrı çizelge 3.2 ve 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 *NF-κBI* Reaksiyon protokolü

<i>NF-κBI</i> 25μL Reaksiyon Karışımı	Bir reaksiyon için miktar (μL)
Steril Distile Su	9.8
10X Taq Tampon +KCl (Fermentas,)	2.5
MgCl ₂ (25mM) (Fermantas)	2.0
dNTPs (0.5mM) (Fermantas)	5.0
Forward Primer (12.5μM) (Sigma)	0.3
Reverse Primer (12.5μM) (Sigma)	0.3
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (5u/μL) (Fermantas, #EPO402)	0.1
Kalıp DNA (50ng)	5.0
Toplam Hacim	25 μL

***NF-κBI* Reaksiyon koşulları:**

Başlangıç Denatürasyonu → 95°C 1dk

Denatürasyon → 95°C 30sn

Primer Bağlanması → 60°C 30sn

Uzama → 72°C 1dk

Son Uzama → 72°C 5dk

35 DöngüÇizelge 3.3 *NF-κBIA* Reaksiyon protokolü

<i>NF-κBIA</i> 25μL Reaksiyon Karışımı	Bir reaksiyon için miktar (μL)
Steril Distile Su	10.8
10X Taq Tampon +KCl (Fermentas,)	2.5
MgCl ₂ (25mM) (Fermantas)	3.0
dNTPs (0.5mM) (Fermantas)	5.0
Forward Primer (12.5μM) (Sigma)	0.3
Reverse Primer (12.5μM) (Sigma)	0.3
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (5u/μL) (Fermantas, #EPO402)	0.1
Kalıp DNA (50ng)	3.0
Toplam Hacim	25 μL

***NF-κBIA* Reaksiyon koşulları:**

Başlangıç Denatürasyonu	→ 95°C 1dk
Denatürasyon	→ 95°C 30sn
Primer Bağlanması	→ 61°C 30sn
Uzama	→ 72°C 1dk
Son Uzama	→ 72°C 5dk

35 Döngü**3.5.2. RFLP Reaksiyonu****3.5.2.1. *NF-κB1* Lokusunun Genotiplenmesi**

NF-κB1 geni 281/285 bç büyüklüğündeki PCR ürünleri -94ins/delATTG polimorfizminin tanımlanması için, bu bölgelerde tanıma dizisine sahip olan, *Pf*MI I (10 Ünite/μL, Fermentas) restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Toplam 25 μL reaksiyon sistemi protokolü çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 *NF-κB1* fragmanının restriksiyon kesim reaksiyonu

Steril su	17.2 μL
10X Tampon R (Fermentas)	2.5 μL
<i>Pf</i> MI (Van91I) (10Ünite/μL) (Fermentas, #ER0711)	0.3 μL
PCR Ürünü	5 μL

ATTG insersiyonuna sahip allel, genin promotöründe 2 adet ATTG (ATTG₂=ins) dizisi taşımaktadır. Bu durum, bir *Pf*MI I kesim yeri (5'...CCANNNN↓NTGG...3') oluşumuna yol açar. Restriksiyon sindirimi sonucunda ATTG insersiyonuna sahip allellerde (ATTG₂) 45 ve 240 bç büyüklüğünde 2 parça oluşmaktadır. ATTG₁ (del) allelinde kesim gerçekleşmez. Restriksiyon sindirim koşulları çizelge 2.4'de belirtildiği gibi uygulanmış ve enzimin optimum aktivite gösterdiği 37°C'de 8 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Restriksiyon kesim işlemi tamamlandığında kesim ürünlerine %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulanarak ayrıştırılmış ve her bir bireye ait genotipler kaydedilmiştir.

3.5.2.2. NF- κ BIA Lokusunun Genotiplenmesi

NF- κ BIA gen parçasının 424 bç büyüklüğündeki PCR ürünleri ise, 3'UTR A→G polimorfizminin saptanması için *Hae*III (10 Ünite/ μ l, Sigma) restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Toplam 25 μ L reaksiyon sistemi parametreleri çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 NF- κ BIA fragmanının restriksiyon kesim reaksiyonu

Steril su	12.38 μ L
10X Tampon (Sigma)	2.5 μ L
<i>Hae</i> III (10Ünite/ μ L) (Sigma, R 5628)	0.12 μ L
PCR Ürünü	10 μ L

G alleli bir *Hae*III kesim yerine (5'...GG↓CC...3') sahiptir ve kesim sonucunda 108 ve 316 bç büyüklüğünde 2 parça oluşmaktadır. A allelinde ise kesim gerçekleşmez. Restriksiyon kesim koşulları Çizelge 3.5'de belirtildiği gibi uygulanmış ve enzimin optimum aktivite gösterdiği 37°C' de 8 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. PCR-RFLP ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmış ve elde edilen jel profilinde bantların sayısına bakılarak bireylerin genotipleri saptanmıştır.

3.6. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

PCR-RFLP ürünlerinin üzerine 4 μ L 6X Yükleme tamponu (%50 gliserol, 0.1 M EDTA, % 1 SDS, % 0.1 bromfenol mavisi, ksilen siyanol) eklenerek % 2' lik agaroz jelde ayrıştırılmıştır.

2 g agaroz (Sigma) [5X TBE(Tris-Borik asit-EDTA), 1 L: 54 g Tris-base, 27.5 g Borik asit, 3.72 g EDTA(sulu), pH: 8.0] 100 mL 1XTBE içerisinde homojen halde eritilerek 60°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra 4 μ L EtBr (5 mg/mL; 50 mg EtBr, 10 mL Distile su) eklenerek iyice karıştırıldı ve jel kabına döküldü. Hazırlanmış olan jele, her bir kesim ürününden 20 μ L kadar yüklenmiştir. Son olarak ilk kuyucuğa 4 μ L DNA büyüklük belirteci (Gene Ruler Low Range Ladder, Fermentas) yüklenmiş ve elektrik güç kaynağı ile 80 mA'de 2 saat yürütüldükten sonra UV görüntüleme

sisteminde fotoğraflanmıştır. Her bireye indeks numarası verilerek genotipleri kaydedilmiştir.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

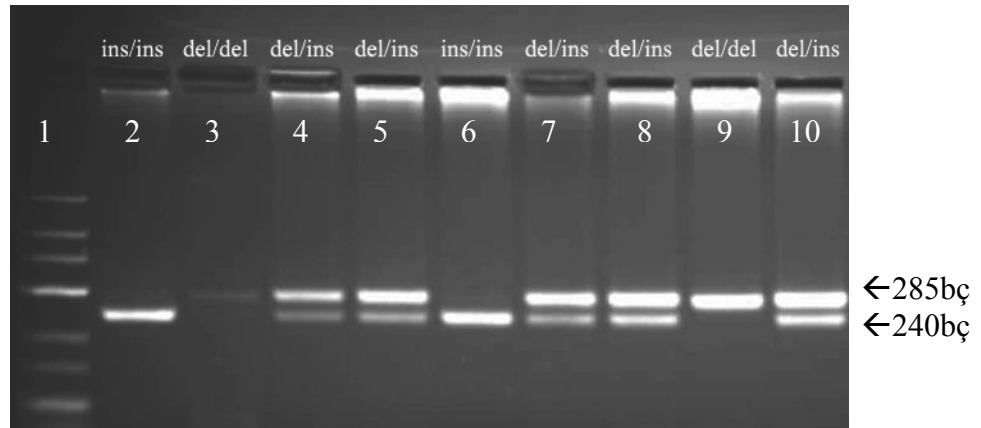
NF-κB1 ve *NF-κB1A* genlerinin istatistiksel analizinde popgene32 (Yeh *et al.*, 1999) kullanılarak allel ve genotip sıklıkları, ki-kare (χ^2) , beklenen ve gözlenen sıklık değerleri hesaplanmıştır. Tip 1 hata (alfa hata) değeri 0.05 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Aydın ili popülasyonunda *NF-κBIA* ve *NF-κBI* polimorfizmlerini saptamak için PCR-RFLP yöntemi kullanılarak toplam 565 bireyde analiz yapılmıştır. Hesaplanan son örneklem büyüklüğü olan 576 bireye erişilememiştir. Genotiplerinin kesinliği kuşkulu olan bireylere analizler yeniden uygulanmıştır. İyi sonuç vermeyen bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir. Sonuçta, *NF-κBI* lokusu analizlerinde 534, *NF-κBIA* lokusu analizlerinde 551 birey çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca bayanların sayısının az olması, donörlerin çoğunlukla erkek olmasından kaynaklanmıştır. Çalışmanın kısıtlılığı, doğu bölgesi hariç (Kuyucak, Karacasu; %70) tüm bölgelerde kadın sayısının geçerli temsiliyet için hedeflenen sayıya ulaşmamasıdır. Hedeflenen sayının, Merkezde %28, batıda % 12, kuzeyde % 26, güneyde % 4.5 oranlarında bir kısmı elde edilebilmiştir.

NF-κBI geni için çalışma grubunu 65 bayan, 469 erkek olarak toplam 534 sağlıklı birey analiz edilmiştir. Hedeflenen erkek ve bayan sayıları 288 iken, bayanlarda ancak hedef sayının %23'ü oranında bir sayıya ulaşılmıştır. PCR ürünleri -94ins/delATTG polimorfizminin tanımlanması için, bu bölgelerde tanıma dizisine sahip olan, *PfM* I restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonucunda homozigot ATTG₂ (ATTG₂/ATTG₂, ins/ins) insersiyonuna sahip bireyler 240 bç büyüklüğünde tek bant, heterozigot (ATTG₁/ATTG₂, del/ins) genotipe sahip bireyler iki bant ve ATTG₁ delesyonuna sahip homozigot (ATTG₁/ATTG₁, del/del) bireyler 285 bç büyüklüğünde tek bant profili oluşturmaktadır (Şekil 4.1).

NF-κBIA için çalışma grubu olarak 484 erkek, 67 bayan olarak toplam 551 birey kullanılmıştır. Hedeflenen erkek ve bayan sayıları 288 iken, bayanlarda ancak hedef sayının % 23'ü oranında bir sayıya ulaşılmıştır. *NF-κBIA* gen parçası, 3' UTR A→G polimorfizminin saptanması için *Hae*III restriksiyon sindirimi ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Jel profilinde yabancıl tip homozigot (A/A) bireyler 484 bç büyüklüğünde tek bant, heterozigot (A/G) bireyler 3 bant ve mutant homozigot bireyler (G/G) 2 bant profili oluşturmaktadır (Şekil 4.2).

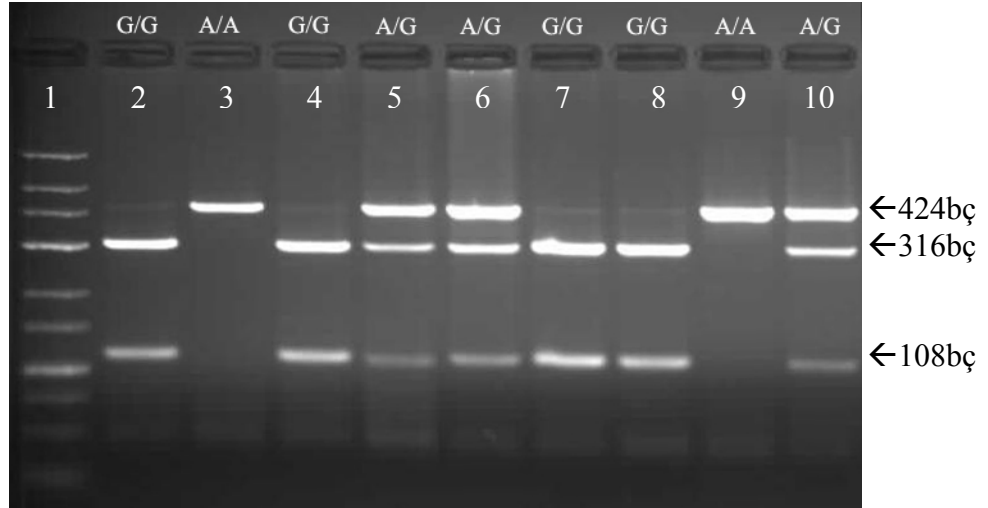


Şekil 4.1 *NF-κB1* geni fragmanının *PflM I* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant profillerinin agaroz jel elektroforezi (% 2) sonrası görünümü. 1. kuyucuk, Gene Ruler Low Range Ladder; 2. ve 6. kuyucuklar, ins/ins (ATTG₂/ATTG₂) genotipi; 3. ve 9. kuyucuklar del/del (ATTG₁/ATTG₁) genotipi; 4. 5. 7. 8. ve 10. kuyucuklar, heterozigot del/ins (ATTG₁/ATTG₂) genotipi

Çizelge 4.1’de jel profili verileri kullanılarak saptanan genotiplerin bölgesel dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.1 *NF-κB1* -94ins/delATTG polimorfizmi genotipleri ve bölgelere göre birey dağılımı

Bölge	ins/del Birey sayısı (Sıklık)	ins/ins Birey sayısı (Sıklık)	del/del Birey sayısı (Sıklık)	Toplam Birey sayısı
Merkez	69 (%46,62)	62 (%41,89)	17 (%11,49)	148
İncirliova	18 (%47,37)	17 (%44,74)	3 (%7,89)	38
Karacasu	24 (%45,28)	25 (%47,17)	4 (%7,55)	53
Söke	24 (%47,06)	20 (%39,22)	7 (%13,72)	51
Didim	3 (%37,50)	3 (%37,50)	2 (%25,00)	8
Kuyucak	8 (% 66,66)	2 (%16,67)	2 (%16,67)	12
Kuşadası	51 (%43,59)	50 (%42,74)	16 (%13,67)	117
Nazilli	33 (%63,46)	16 (%30,77)	3 (%5,77)	52
Bozdoğan	32 (%58,18)	22 (%40,00)	1 (%1,82)	55
Aydın ili	262 (%49,06)	217 (%40,64)	55 (%10,30)	534



Şekil 4.2 *NF-κBIA* geni fragmanının *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant profillerinin agaroz jel elektroforezi (%2) sonrası görünümü 1. kuyucuk, Gene Ruler Low Range Ladder; 2. 4. 7. ve 8. kuyucuklar, *NF-κBIA* mutant homozigot G/G genotipi; 3. ve 9. kuyucuklar, yabancı tip homozigot A/A genotipi; 5. 6. ve 10. kuyucuklar, heterozigot A/G genotipi.

Çizelge 4.2’de jel profili verileri kullanılarak saptanan genotiplerin bölgesel dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.2 *NF-κBIA* 3’ UTR A→G polimorfizmi genotipleri ve bölgelere göre birey dağılımı

Bölge	A/G Birey sayısı (sıklık)	G/G Birey sayısı (sıklık)	A/A Birey sayısı (sıklık)	Toplam Birey sayısı
Merkez	60 (%37,74)	67 (%42,14)	32 (%20,12)	159
İncirliova	16 (%42,11)	16 (%42,11)	6 (%15,78)	38
Karacasu	23 (%41,07)	21 (%37,50)	12 (%21,43)	56
Söke	25 (%49,02)	18 (%35,29)	8 (%15,69)	51
Didim	4 (%57,14)	2 (%28,57)	1 (%14,29)	7
Kuyucak	5 (%41,67)	4 (%33,33)	3 (%25,00)	12
Kuşadası	57 (%48,31)	38 (%32,20)	23 (%19,49)	118
Nazilli	23 (%45,10)	15 (%29,41)	13 (%25,49)	51
Bozdoğan	20 (%33,90)	31 (%52,54)	8 (%13,56)	59
Aydın ili	233 (%42,29)	212 (%37,48)	106 (%20,23)	551

Elde edilen veriler kullanılarak Aydın ili populasyonunun herbir lokus için allel ve genotip sıklıkları saptanmış ve Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı test edilmiştir. *NF-κB1* ve *NF-κB1A* lokuslarına ait allel sıklıkları çizelge 4.3’de ve genotip frekansları çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 *NF-κB1* ve *NF-κB1A* lokuslarına ait allellerin sıklıkları

Lokus	Allel	Sıklık
<i>NF-κB1</i> (534 birey)	Del	0.3483
	İns	0.6517
<i>NF-κB1A</i> (551 birey)	A	0.4038
	G	0.5962

Çizelge 4.4 *NF-κB1* ve *NF-κB1A* lokuslarına ait genotip sıklıkları ve HW dengesi testi sonuçları

Lokus	Genotip	Örneklem büyüklüğü	Sıklık	χ^2	P
<i>NF-κb1</i>	del/del	55 (%10.2)	0.12	3.402	0.065
	del/ins	262 (%49)	0.42		
	ins/ins	217 (%40.6)	0.45		
<i>NF-κB1A</i>	A/A	106 (%19.2)	0.16	8.293	0.004
	A/G	233 (%42.3)	0.48		
	G/G	212 (%38.5)	0.35		

Serbestlik derecesi 1 iken $P=0.05$ seviyesi için verilen kritik χ^2 değeri 3.84 olmalıdır. χ^2 testi analiz sonuçlarına göre *NF-κB1* χ^2 değeri ($3.402 \leq 3.84$) istatistiksel açıdan anlamlı olup, populasyonun bu lokus için Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu göstermektedir. Levene (1949)’e göre hesaplanan gözlenen homozigotluk 0.5094, beklenen ise 0.5456 bulunmuşken, gözlenen heterozigotluk 0.4906, beklenen heterozigotluk 0.4544 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Öte yandan *NF-κB1A* χ^2 değeri ($8.293 \geq 3.84$) kritik değeri aşmıştır. Gözlenen homozigotluk 0.5771, beklenen ise 0.5181; gözlenen heterozigotluk 0.4229, beklenen heterozigotluk ise 0.4819 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.6). Bu durum bize populasyonda bu lokus için Hardy-Weinberg dengesini bozan bir veya birkaç etken olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5 Aydın popülasyonu *NF-κBI* ve *NF-κBIA* heterozigotluk sonuçları

Lokus	n	Göz.Hom.	Göz.Het.	Bek.Hom.*	Bek.Het.*	Ort.Het.
<i>NF-κBI</i>	534	0,5094	0,4906	0,5456	0,4544	0,4540
<i>NF-κBIA</i>	551	0,5771	0,4229	0,5181	0,4819	0,4815

n: Örneklem büyüklüğü

Göz.Hom.: Gözlenen homozigot değeri

Göz.Het.: Gözlenen heterozigotluk değeri

Bek.Hom.: Beklenen homozigotluk değeri

Bek.Het.: Beklenen heterozigotluk değeri

Ort.Het.: Ortalama heterozigot değeri

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

**Nei'nin (1973) beklenen heterozigotluk değeri

Ayrıca veriler her bir lokus için ayrı ayrı bayan-erkek ve de Aydın ili merkez-batı-doğu-kuzey-güney gruplandırmaları yapılarak, Hardy-Weinberg dengesinin de olup olmadıkları test edilmiş ve analiz sonuçları bir fark olup olmadığına dair incelenmiştir. Fakat örneklem büyüklükleri düzenli dağılım göstermediğinden ve yapılan ek analizlerin güvenilirliğinin şüpheli olmasından, burada yer verilmemiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

NF- κ B transkripsiyon faktörünün; immün fonksiyonu ve büyüme fonksiyonu lokuslarını (Glavac *et al.*,1994), hücre bölünmesi, apoptozis ve metataz (Nakshatri *et al.*, 1997) oluşumlarını sağlayan genleri düzenlediği bilinmektedir. Bu nedenle herhangi bir aksaklık ya da eksiklik durumunda birçok sağlıklı ve hasta bireylerin fizyolojilerini etkilemektedir (Hayden and Ghosh, 2004).

NF- κ B1 ve *NF- κ BIA* genlerinde birçok polimorfik bölge tanımlanmıştır (Cambell and Perkins, 2006; Glavac *et al.*, 1994) . Bu oluşumların gen ürünleri üzerinde ne gibi bir etkisinin olduğu hala yapılan çalışmalarla araştırılmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda bu genlerdeki varyasyonların NF- κ B fonksiyonunu etkilediği, buna bağlı olarak doku homeostazında dengesizlik sonucunda çeşitli enflamatuvar hastalık ya da kanser patogenezi olduğu bilinmektedir (Freemerman *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2007). Literatürde hangi varyasyonun NF- κ B'nin fonksiyonunu üzerinde hangi değişimi yaptığı ile ilgili bilgi çok sınırlıdır. Fonksiyonel olarak oluşan varyasyonların önemini ortaya çıkarmak ve hangi allelin hastalık riskini arttırdığını belirleyebilmek için daha çok çalışmanın yapılmasına ihtiyaç vardır. Araştırmacılar hastalıklarla ilişkilendirme çalışmaları yaparak bu konuyu açıklığa kavuşturmaya çalışmaktadırlar.

Şimdiye kadar *NF- κ B1* ve *NF- κ BIA* genlerindeki polimorfizmler birçok hastalık ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Farklı etnik gruplara uygulanan çalışmalarda ve bizim çalışmamızda saptanan, polimorfizm sıklıkları *NF- κ B1* için Çizelge 5.1'de, *NF- κ BIA* için çizelge 5.2'de verilmiştir. Çizelgelerde görüldüğü gibi sağlıklı bireylerden oluşan farklı etnik gruplar arasındaki genotip frekanslarında farklılıklar oluşmaktadır. Çizelge 5.1'de gösterilen *NF- κ B1* -94ins/delATTG polimorfizminde özellikle Çin ve Türkiye genotip sıklıkları göze çarpmaktadır. del/del genotipi diğer gruplarda yakınlık gösterip genelde ~%14 civarında iken, Çin popülasyonunda artarak %28, Türk popülasyonunda ise azalarak %10 oranında bulunmaktadır. del/ins genotip sıklığında ise İspanya (%42) ve İsveç (%58) dışındaki popülasyonlarda %47–50 oranlarında benzerdir. İns/ins genotip sıklıkları, %21 en düşük oranla Çin ve %26

İsveç popülasyonu, en yüksek oranlarla Türkiye %40 ve bu sıklığa yakın olarak %43 olarak sonuçlanmış İspanya popülasyonu göze çarpmaktadır. Diğer gruplarda benzer oranda bulunmaktadır. Ayrıca Türk popülasyonu allel sıklıkları, ABD (Amerika Birleşik Devletleri) ve İspanya popülasyonlarının allel sıklıkları ile benzerlik göstermektedir.

Çizelge 5.1 Farklı etnik gruplarda *NF-κB1* -94ins/delATTG genotip ve allel sıklıkları

Etnik Grup	<i>NF-κB1</i> -94ins/delATTG Genotip Sıklıkları (Birey sayısı)			Allel Sıklıkları (Birey sayısı)	
	del/del	del/ins	ins/ins	Del	İns
İspanya-Yahudi (Orozco <i>et al.</i> , 2005)	%14 (37)	%42,8 (113)	%43,2 (114)	%35 (187)	%65 (341)
Polonya-Varşova (Kurylowicz <i>et al.</i> , 2007)	%14,4 (99)	%48,8 (336)	%36,8 (253)	%38,8 (534)	%61,2 (842)
Polonya-Gliwice (Kurylowicz <i>et al.</i> , 2007)	%13,9 (27)	%50 (97)	%36,1 (70)	%38,9 (151)	%61,1 (237)
Polonya-Pooled (Kurylowicz <i>et al.</i> , 2007)	%14,3 (126)	%49,1 (443)	%36,6 (323)	%39 (695)	%61 (1089)
Japonya-Kurume (Kurylowicz <i>et al.</i> , 2007)	%14,0 (31)	%51,4 (114)	%34,6 (77)	%39,6 (176)	%60,4 (268)
İngiltere (Mirza <i>et al.</i> , 2005)	%14,6 (96)	%50,2 (330)	%35,2 (231)	%39,7 (522)	%60,3 (792)
Çin (Lin <i>et al.</i> , 2007)	%28,9 (58)	%49,7 (100)	%21,4 (43)	%53,7 (216)	%46,3 (186)
İsveç (Bu <i>et al.</i> , 2007)	%15,3 (67)	%58,2 (255)	%26,5 (116)	%44,4 (389)	%55,6 (487)
Almanya (Glas <i>et al.</i> , 2006)	%16,2 (158)	%47 (458)	%36,8 (358)	%39,7 (774)	%60,3 (1174)
ABD –Yahudi (Karban <i>et al.</i> , 2004)	%11,3 (16)	%45,7 (65)	%43 (61)	%34,2 (49)	%62,4 (93)
ABD (Karban <i>et al.</i> , 2004)	%14,1 (21)	%47 (70)	%38,9 (58)	%37,6 (56)	%62,4(93)
Türkiye-Aydın	%10,3 (55)	%49,1 (262)	%40,6 (217)	%34,8 (372)	%65,2 (696)

Çizelge 5.2 Farklı etnik gruplarda *NF-κBIA* 3'UTR A→G polimorfizmi genotip ve allel sıklıkları

Etnik Grup	<i>NF-κBIA</i> 3'UTR A→G Polimorfizmi Genotip Sıklıkları (Birey sayısı)			Allel Sıklıkları (Birey sayısı)	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Almanya Münih (Klein <i>et al.</i> , 2004)	%13 (57)	%49 (216)	%38 (168)	%37 (330)	%63 (552)
İsveç (Bu <i>et al.</i> , 2007)	%16,9 (74)	%50,5 (221)	%32,6 (143)	%42,1 (369)	%57,9 (507)
Çin (Gao <i>et al.</i> , 2007)	%14 (81)	%45 (259)	%41 (237)	%36 (421)	%64 (773)
Avustralya- Yahudi (Curran <i>et al.</i> , 2002)	%6 (7)	%45 (49)	%49 (53)	%29 (63)	%71 (155)
Çek Cumhuriyeti (Romzova <i>et al.</i> , 2006)	%17 (27)	%56 (89)	%27 (43)	%45 (143)	%55 (175)
Türkiye- Aydın	%19,2 (106)	%42,3(233)	%38,5 (212)	%40,4 (445)	%59,6 (657)

Çizelge 5.2'ye bakılırsa *NF-κBIA* 3'UTR A→G polimorfizminde, Avusturalya popülasyonunun genotip sıklık değerleri diğer popülasyonlardan oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Bunun yanı sıra, diğer tüm etnik gruplarda birebir karşılaştırma yapıldığında, genotip dağılımlarının farklılık gösterdiği gözlenmektedir. Türk popülasyonu allel sıklığının İsveç popülasyonu sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Tüm bu sonuçlara bakılarak çalıştığımız polimorfizmlerin genotipik dağılımlarının coğrafi bölge yada etnik gruplar arasında değişebileceği söylenebilir. İleride daha açık ve kesin etnik popülasyonlarla yapılacak çalışmalar ve yeni etnik grupların çalışılmasıyla bu lokusların dünya üzerinde daha kesin bir genotip dağılımını ve sıklık değişimlerinin nedenini, hatta bu genlerin evrimini tanımlamak mümkün olacaktır.

Sonuç olarak bu çalışmada *NF-κBI* lokusunda seçtiğimiz polimorfizme ait sıklıkların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptanmıştır. Fakat *NF-κBIA* genotiplerinin dengede olmadığı görülmektedir. Genotip dağılımının bu uyumsuzluğu, akraba

evliliği ve göç oranları gibi genlerin sıklıklarını etkileyen faktörlerden kaynaklanmış olabilir. Aydın'ın da içinde bulunduğu batı Anadolu bölgesi doğu ve güneydoğu Anadolu bölgesinden yoğun olarak göç almaktadır. Farklı coğrafik bölgelerden gelen bireylerin oluşturduğu gen akışı nedeniyle genotip sıklıklarında değişim oluşmuş olabilir. Ayrıca batı Anadolu bölgesinde yapılan çalışmalara göre akraba evliliğinin oranı %10.18 olarak saptanmıştır (Ulusoy ve Tunçbilek, 1987). Bu oranın belirli bölgelerde birikim yapmasına bağlı olarak, Aydın popülasyonunda *NF-κBIA* lokusunun Hardy-Weinberg yasasından sapma göstermesi mümkün olabilir.

Yapılan çalışmaların sonuçları *NF-κB1* -94ins/delATTG polimorfizminin çekirdek proteinlerinin *NF-κB1* promotörüne bağlanma kabiliyetini etkilediği yönündedir. Elektroforetik mobilite shift assay (EMSA) uygulamaları sonucunda; ins allelini taşıyan oligonükleotitlerin çekirdek proteinlerine sıkıca bağlandığı fakat del allelini taşıyan oligonükleotitlerin ise çekirdek proteinlerine bağlanmadığı saptanmıştır. Bu durum şöyle açıklanmıştır; ya özel bakteriyel hücre duvarı bileşenlerince doğuştan immün sisteminin uyarımı ile *NF-κB1* geni promotör aktivitesi etkilenmektedir, ya da spesifik alleller oluşmuştur ve bunlar özel ve henüz tanımlanmamış bazı proteinlerle ilişki kurmaktadır (Karban *et al.*, 2004). Öyle veya değil, bazı çekirdek proteinlerince düzenlenen *NF-κB1* promotör aktivitesi *in vitro* koşullarda aktivite açısından farklılık göstermiştir ve bu birbirinden bağımsız oluşan fonksiyonel farklılık daha ileri çalışmalarla aydınlığa kavuşturulabilir. Yine aynı çalışmada HeLa ya da HT-29 hücre soylarına transfekte edilen -94delATTG alleli taşıyan promotör/ekzon 1 lusiferaz reporter plasmidinde, -94insATTG taşıyana nazaran daha düşük promotör aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Sonuçta fonksiyonel insersiyon/delesyon polimorfizminde Del allelinin kuzey Amerika yahudi olmayan popülasyonunda ülseratif kolit ile sıkı ilişkili olduğunu saptamışlardır (Karban *et al.*, 2004). Del allelinin gen ekspresyonunu azatlığını ve bu nedenle p50/p105 NF-κB protein ürünü azaldığı ileri sürülmektedir. Araştırmacılar hipotezine göre azalmış p50 homodimeri Rel homo- heterodimerlerin aşırı ekspresyonuna neden oluyor olabilir. Yada düşük seviyedeki p50 zayıf immün yanıt oluşumuna yol açmaktadır (Karban *et al.*, 2004). ins/ins (ATTG₂/ATTG₂) genotipinin genellikle yüksek düzeyde NF-κB1 transkriptine neden olduğu ve böylece ileriki aşamalarda NF-κB

protein ürününü arttırdığı düşünülmektedir (Bu *et al.*, 2007). Bu *et al.*, (2007) yaptığı çalışmasında *NF-κB1* del/del genotipinin ve *NF-κB1A* G/G genotipinin melanoma ile ilişkili olduğunu saptamıştır. del/del genotipinin melanoma için marker olabileceği belirtilmiştir. *NF-κB1* polimorfizmi Graves' hastalığına yatkınlıkla ilişkili olabileceği de düşünülmektedir (Kurylowicz *et al.*, 2007). Ayrıca *NF-κB1* arttırılmış fenotipinin tümör gelişimiyle ilişkili olduğu birçok çalışmada desteklenmiştir (Loercher *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 1999; Sunamura *et al.*, 2003; Bharti and Aggarwal, 2002; Yanagawa *et al.*, 2004).

NF-κB1A 3'UTR tek nükleotit polimorfizminin gen ekspresyonu üzerinde arttırıcı bir etki gösterdiği saptanmıştır (Goto *et al.*, 2001). 3'UTR birçok genin ekspresyonunda önemli olan bir bölgedir ve çekirdeğe taşınım, poliadenilasyon, hücrel alt hedefleme ve mRNA'nın translasyon ve yıkılımı oranlarının kontrolünde rolü vardır (Conne *et al.*, 2000). Bu nedenle *NF-κB1A* genindeki 3'UTR varyasyonunun IκB proteininin fonksiyonunda veya yapısında bir eksiklik oluşturduğu düşünülmektedir (Romzova *et al.*, 2006). Anormal *NF-κB1A* beklide *NF-κB*'ye etkili bir şekilde bağlanamamakta ve *NF-κB*'nin devamlı aktivite göstermesine yada aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır (Romzova *et al.*, 2006). *NF-κB1A* 3'UTR A→G polimorfizminin melanoma riskini arttırdığı saptanmıştır (Bu *et al.*, 2007). *NF-κB1A* AA genotipi tip 2 diyabet gelişiminde risk oluşturduğu saptanmıştır (Romzova *et al.*, 2006). Bu çalışma sonucunda *NF-κB1* ve *NF-κB1A* polimorfizmlerinin tümör oluşumu olan farklı yaş ve cinsiyetteki bireylerde farklı fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Bu *et al.*, 2007). Bu *et al.*, (2007) yaptığı çalışmasında Çin popülasyonunda Crohn's hastalığı riskinin bu polimorfizmle ilişkili olduğunu saptamış fakat İsveç popülasyonunda böyle bir ilişki kuramamıştır. Bu polimorfizmin farklı popülasyonlarda ve farklı tip kanserlerde farklı hassaslık yarattığı söylenebilir. Ayrıca aynı çalışmada Çin popülasyonunun A/A genotipi sıklığının yaş ilerledikçe arttığı A/G genotipi sıklığının azaldığı saptanmıştır. *NF-κB1A* 3'UTR A→G polimorfizmi büyük ihtimalle *NF-κB1A* ekspresyonunu etkilemekte ve bunun sonucunda *NF-κB* transkripsiyon aktivitesi değişmektedir.

Ülkemizde henüz *NF-κB* lokusuna ait polimorfizmlerle ilgili yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışılan bu genlerin genotip dağılımları ve alel

sıklıklarının bilinmesi, yukarıda açıklandığı üzere ilişkili oldukları pek çok hastalığa toplumun duyarlılığını belirlemek açısından önemlidir. Bu ve benzer pek çok lokuslarda yapılacak olan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, toplumların genetik duyarlılıklarının bilinmesi başta koruyucu hekimlik olmak üzere pek çok alanda stratejik öneme sahiptir. Her ne kadar insan genom projesi tamamlandıysa da, etnik gruplar arasında önemli bir genetik varyasyon söz konusudur. Bu nedenle çok sayıda gendeki polimorfizmlerin çeşitli etnik gruplarda tanımlanması ve dağılımlarının saptanması çalışmaları hız kazanmıştır. Özellikle çeşitli hastalıklarla ilişkili olan genler daha da önem kazanmaktadır. Sağlıklı Aydın toplumunda yapılan bu çalışmanın verileri, olası pek çok hastalıkla ilişkilendirme çalışmalarında kullanılabilir. Bu veriler aynı zamanda hastalıkların coğrafik dağılım veri setleriyle de karşılaştırılarak aralarında bir korelasyon kurulabilir. Bu alanda ulaşılması gerek nihai hedef, toplumların ve etnik grupların tüm genlerinin polimorfizm haritalarının belirlenerek, bireysel genetik duyarlılıklarının belirlenmesi sayılabilir.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, B.B. 2004. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.*, 6: 203–208.
- Amiri, K.I., Richmond, A. 2005. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, 24(2): 301–313.
- Arnheim, N., White, T., Rainey, W.E. 1990. Application of PCR: Organismal and population biology. *Bioscience*, 40(3) 174-182.
- Baeuerle, P.A., Baltimore, D. 1988. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell*, 53: 211-217.
- Baeuerle, P.A. 1991. The inducible transcription activator NFkappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1072: 63–80.
- Baeuerle, P.A., Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 141–179.
- Baeuerle, P.A. 1998. IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell*, 95: 729–731.
- Baldwin Jr, A.S., 1996. The NF-kappaB and I kappa B proteins: new discoveries and insight. *Annual Rev. Immunol.*, 14: 643–683
- Baldwin Jr, A.S., 2001. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J. Clin. Invest.*, 107: 3–6.
- Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., Dörken, B. 1997. Constitutive nuclear factor-kB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.*, 100: 2961–2969.
- Barkett, M., Gilmore T.D. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene*, 18: 6910–6924.
- Barnes, P.J., Karin, M. 1997. Nuclear Factor- κ B - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal of Medicine*, 336(15): 1066-1071.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Baltimore, D. 1995. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev.*, 9(22): 2736–2746.

- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., Baltimore, D. 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature*, 376: 167–170.
- Beg, A.A., Baltimore, D. 1996. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science*, 274: 82–784.
- Ben-Neriah, Y., Schmitz, M.L. 2004. Of mice and men. *EMBO Rep.*, 5: 668–673.
- Bentires-Alj, M., Dejardin, E., Viatour, P., Van Lint, C., Froesch, B., Reed, J.C., Merville, M.P., Bours, V. 2001. Inhibition of the NF κ B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene*, 20: 2805–2813.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Filet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.P., Bours, V. 2003. NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*, 22: 90–97.
- Biswas, D.K., Cruz, A.P., Gansberger, E., Pardee, A. B. 2000. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: a major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97 (15): 8542–8547.
- Blank, V., Kourilsky, P., Israel, A. 1992. NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 135–140
- Bharti, A.C., Aggarwal, B.B. 2002. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 883–888.
- Bonizzi, G., Karin, M. 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, 25: 280–288.
- Brooks, P., Fuentes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M.C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J., Rivett, J. 2000. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.*, 346 (1): 155–161.
- Bu, H., Rosdahl, I., Sun, X-F., Zhang, H. 2007. Importance of polymorphism in NF- κ B1 and NF- κ B1 α genes for melanoma risk, clinicopathological features and tumor progression in Swedish melanoma patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 133 (11): 859–866.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F., Hay, R.T. 1999. Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene*, 18: 3063–3070.

- Campbell, I. K., Gerondakis, S., O'Donnell, K., Wicks, I.P. 2000. Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.*,105(12): 1799–1806.
- Campbell, K.J., Perkins, N.D. 2006. Regulation of NF-kappaB function. *Biochem. Soc. Symp.*, 73: 165–180.
- Cayrol, C., Ducommun, B. 1998. Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene*, 17: 2437–2444.
- Chadebech, P., Bricese, L., Baldin, V., Vidal, S., Valette, A. 1999. Phosphorylation and proteasome-dependent degradation of Bcl-2 in mitotic-arrested cells after microtubule damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 262: 823–827.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. 1999. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical Chemistry*, 45(1): 7–17.
- Chen, L.F., Greene, W.C. 2004. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5: 392–401.
- Chiao, P.J., Miyamoto, S., Verma, I.M. 1994. Autoregulation of I κ B α activity. *Biochemistry*, 91: 28–32.
- Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79: 13–21.
- Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M., Roberts, J.M. 1996. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.*, 10: 1979–1990.
- Curran, J.E., Weinstein, S.R., Griffiths, L. R. 2002. Polymorphic variants of NFKB1 and its inhibitory protein NFKBIA, and their involvement in sporadic breast cancer. *Cancer Lett.*, 188 (1–2): 103–107.
- Cogswell, P.C., Guttridge, D.C., Funkhouser, W.K., Baldwin Jr, A.S. 2000. Selective activation of NF-kB subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kB2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*, 19: 1123–1131.
- Conne, B., Stutz, A., Vassalli, J.D. 2000. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nature Medicine*, 6: 637–641.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E., Haegeman, G. 2000. Glucocorticoids repress NF- κ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *PNAS*, 97(8): 3919-3924.

- Dejardin, E., Bonizzi, G., Bellahcène, A., Castronovo, V., Merville, M.P., Bours, V. 1995. Highly-expressed p100/p52 (NF- κ B2) sequesters other NF- κ B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene*, 11: 1835–1841.
- Delhalle, S., Blasius, R., Dicato, M., Diederich, M. 2004. A Beginner's Guide to NF- κ B Signaling Pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1030: 1–13.
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C. 1999. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13: 239–252.
- Diehl, J. A., Zindy, F., Sherr, C.J. 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*, 11: 957–972.
- Doi, K., Akaike, T., Fujii, S., Tanaka, S., Ikebe, N., Beppu, T., Shibahara, S., Ogawa, M., Maeda, H. 1999. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br. J. Cancer.*, 80: 1945–1954.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Matias-Guiu, X. 2005. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.*, 446(5): 475–482.
- Ekobom, A., Helmick, C., Zack, M., Adami, H. O. 1990. Ulcerative colitis and colorectal cancer: a population-based study. *N. Engl. J. Med.*, 323: 1228–1233.
- El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E.L., Breamk, J.H., Youngk, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni Jr, J.F., Rabkin, C.S. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 404: 398–402.
- Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Akuta, T., Sahoo, S.K., Khaled, G., Hamada, A., Maeda, H. 2003. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res.*, 63: 3567–3574.
- Feinman, R., Siegel, D.S., Berenson, J. 2004. Regulation of NF- κ B in multiple myeloma: therapeutic implications. *Clin Adv Hematol Oncol.*, 2(3): 162–166.
- Freemerman, A.J., Gallegos, A., Powis, G. 1999. Nuclear factor kappaB transactivation is increased but is not involved in the proliferative effects of thioredoxin overexpression in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, 59(16): 4090–4094.

- Gao, J., Pfeifer, D., He, L.-J., Qiao, F., Zhang, Z., Arbman, G., Wang, Z.L., Jia, C. R., Carstensen, J., Sun, X.F. 2007. Association of NFKBIA polymorphism with colorectal cancer risk and prognosis in Swedish and Chinese population. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42: 345–350.
- Gerondakis, S., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., Grumont, R. 1999. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF- κ B and I κ B function: transgenics and knockouts. *Oncogene*. 49(18): 6888-6895.
- Ghosh, S., Karin, M. 2002. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 109: 81–96.
- Gilmore, T.D. 1991. Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene*, 49(18): 6925-6937.
- Gilmore, T.D., Koedood, M., Piffat, K.A., White, D.W. 1996. Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene*, 13: 1367–1378.
- Gilmore, T.D. 2003. The Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat. Res.*, 115: 241–265.
- Glas, J., Török, H.P., Tonenchi, L., Müller-Myhsok, B., Mussack, T., Wetzke, M., Klein, W., Epplen, J.T., Griga, T., Schiemann, U., Lohse, P., Seiderer, J., Schnitzler, F., Brand, S., Ochsenkühn, T., Folwaczny, M., Folwaczny, C. 2006. Role of the NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism in IBD and potential interactions with polymorphisms in the CARD15/NOD2, IKBL, and IL-1RN genes. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(7): 606–611.
- Glavac, D., Ravnik-Glavac, M., O'Brien, S.J., Dean, M. 1994. Polymorphisms in the 3' untranslated region of the I κ B/MAD-3 (NFKBI) gene located on chromosome 14. *Hum Genet.*, 93(6): 694–696.
- Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.D., Arnold E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M., Wallach D. 1997. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J. Biol. Chem.*, 272: 19641–19644.
- Goto, Y., Yue, L., Yokoi, A., Nishimura, R., Uehara, T., Koizumi, S., Saikawa, Y. 2001. A novel single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression. *Clin Cancer Res.*, 7(7): 1952–1956.
- Grilli, M., Pizzi, M., Memo, M., Spano, P.F. 1996. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science*, 274: 1383–1385.
- Grimm, S., Baeuerle, P.A. 1993. The inducible transcription factor NF-KB: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.*, 290: 297-308.

- Grimm, S., Bauer, M.K., Baeuerle, P.A., Schulze-Osthoff, K. 1996. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF- κ B induced upon apoptosis. *J. Cell Biol.*, 134: 13–23.
- Guillemette, J.G., Lewis, P.N. 1983. Detection of subnanogram quantities of DNA and RNA on native and denaturing polyacrylamide and agarose gels by silver staining. *Electrophoresis*, 4(1): 92–94.
- Hayden, M.S., Ghosh, S. 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.*, 18: 2195–2224.
- Heron, E., Deloukas, P., Van Loon, A.P. 1995. The complete exon-intron structure of the 150 kb human gene *NFKB1*, which encodes p105 and p50 proteins of transcription factors NF- κ B and I- κ B- γ : implications for NF- κ B-mediated signal transduction, *Genomics*, 30: 493.
- Hinz, M., Löser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dörken, B., Scheidereit, C. 2001. Constitutive NF- κ B maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells *Blood*, 97: 2798–2807.
- Hoffmann, A., Baltimore, D. 2006. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunological Reviews*, 210(1): 171–186.
- Huang, S., DeGuzman, A., Bucana, C.D., Fidler, I.J. 2000a. Level of interleukin-8 expression by metastatic human melanoma cells directly correlates with constitutive NF- κ B activity. *Cytokines Cell Mol. Ther.*, 6(1): 9–17.
- Huang, S., Robinson, J.B., Deguzman, A., Bucana, C.D., Fidler, I.J. 2000b. Blockade of nuclear factor- κ B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res.*, 60(19): 5334–5339.
- Ishikawa, H., Claudio, E., Dambach, D., Raventós-Suárez, C., Ryan, C., Bravo, R. 1998. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF- κ B1) but expressing p50. *J. Exp. Med.*, 187(7): 985–996.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., Tschopp, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388: 190–195.
- Ito, C.Y., Adey, N., Bautch, V.L., Baldwin, A. S., Jr. 1995. Structure and evolution of the human IKBA gene. *Genomics*, 29: 490–495.

- Izban, K.F., Ergin, M., Huang, Q., Qin, J.Z., Martinez, R.L., Schnitzer, B., Ni, H., Nickoloff, B.J., Alkan, S. 2001. Characterization of NF- κ B expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF- κ B results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Mod. Pathol.*, 14: 297–310.
- Jacobs, M.D., Harrison, S.C. 1998. Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell*, 95: 749–758.
- Jhaveri, K.A., Ramkumar, V., Trammell, R.A., Toth, L.A. 2006. Spontaneous, homeostatic, and inflammation-induced sleep in NF- κ B p50 knockout mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291(5): 1516–1526.
- Karban, A.S., Okazaki, T., Panhuysen, C.I.M., Gallegos, T., Potter, J.J., Bailey-Wilson, J.E., Silverberg, M.S., Duerr, R.H., Cho, J.H., Gregersen, P.K., Wu, Y., Achkar, J.P., Dassopoulos, T., Mezey, E., Bayless, T.M., Nouvet, F.J., Brant, S.R. 2004. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum. Mol. Genet.*, 13 (1): 35–45.
- Karin, M. 1999. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18(49): 6867–6874.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annual Review of Immunology*, 18: 621-663.
- Karin, M., Yamamoto, Y., Wang, Q.M. 2004. The IKK NF- κ B system: A treasure trove for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3: 17–26.
- Kasof, G.M., Lu, J.J., Liu, D., Speer, B., Mongan, K.N., Gomes, B.C., Lorenzi, M.V. 2001. Tumor necrosis factor- α induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF- κ B. *Oncogene*, 20: 7965–7975.
- Kim, L.H., Shin, H.D., Park, B.L., Junk, J.H., Kim, J.Y., Kim, Y.J., Lee, H.S. 2003. Identification of variants in *NFKB1A* and association analysis with hepatocellular carcinoma risk among chronic HBV patients. *Hum. Mutat.*, 21(6): 652–653.
- Kitajima, I., Shinohara, T., Bilakovics, J., Brown, D.A., Xu, X., Nerenberg, M. 1992. Ablation of transplanted HTLV-I Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF- κ B. *Science*, 258: 1792–1795.
- Klein, W., Tromm, A., Folwaczny, C., Hagedorn, M., Duerig, N., Epplen, J. T., Schmiegel, W.H., Griga, T. 2004. A polymorphism of the NFKB1A gene is associated with Crohn's disease patients lacking a predisposing allele of the CARD15 gene. *Int. J. Colorectal Dis.*, 19: 153–156.

- Klement, J.F., Rice, N.R., Car, B.D., Abbondanzo, S.J., Powers, G.D., Bhatt, P.H., Chen, C.H., Rosen, C.A., Stewart, C.L. 1996. IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol. Cell. Biol.*, 16(5): 2341–2349.
- Knecht, H., Berger, C., Rothenberger, S., Odermatt, B. F., Brousset, P. 2001. The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology*, 60: 289–302.
- Kopp, E.B., Ghosh, S. 1995. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol.*, 58: 1-27.
- Kowalik, T.F., Wing, B., Haskill, J.S., Azizkhan, J.C., Baldwin Jr, A.S., Huang, E. 1993. Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-k B activity during human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1107–1111.
- Krappmann, D., Emmerich, F., Kordes, U., Scharschmidt, E., Dörken, B., Scheidereit, C. 1999. Molecular mechanisms of constitutive NF-kB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 18: 943–953.
- Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y., Gelinas, C. 2003. To be, or not to be: NF- κ B is the answer—Role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 22: 8961–8982.
- Kurylowicz, A., Hiromatsu, Y., Jurecka-Lubieniecka, B., Kula, D., Kowalska, M., Ichimura, M., Koga, H., Kaku, H., Bar-Andziak, E., Nauman, J., Jarzab, B., Plosk, R., Bednarczuk, T. 2007. Association of NFKB1 -94ins/del ATTG promoter polymorphism with susceptibility to and phenotype of Graves' disease. *Genes and Immunity*, 8: 532–538.
- Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R., Israël, A. 1993. Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *EMBO J.*, 12(13): 5043-5049.
- Levene, H. 1949. On a Matching Problem Arising in Genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*, 20(1): 91-94.
- Lin, C.H., Ou, T.T., Wu, C.C., Tsai, W.C., Liu, H.W., Yen, J.H. 2007. IkB α promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet.*, 34(1): 51–54.
- Lind, D.S., Hochwald, S.N., Malaty, J., Rekkas, S., Hebig, P., Mishra, G., Moldawer, L.L., Copeland, E.M., Mackay, S. 2001. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery*, 130: 363–369.

- Linn, S., Arber, W. 1968. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *PNAS*, 59(4): 1300-1306.
- Lipton, S.A. 1997. Janus faces of NF- κ B: neurodestruction versus neuroprotection. *Nat. Med.*, 3: 20–22.
- Loercher A., Lee, T.L., Ricker, J.L., Howard, A., Geoghegan, J., Chen Z., Sunwoo, J. B., Sitcheran, R., Chuang, E.Y., Mitchell, J.B., Baldwin Jr, A.S., Waes, C. V. 2004. Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 64: 6511–6523.
- Lu, D., Thompson, J.D., Gorski, G.K., Rice, N.R., Mayer, M.G., Yunis, J.J. 1991. Alterations at the *rel* locus in human lymphoma. *Oncogene*, 6: 1235–1241.
- Lu, Z.Y., Yu, S.P., Wei, J.F., Wei, L. 2006. Age-related neural degeneration in nuclear-factor kappaB p50 knockout mice. *Neuroscience*, 139(3): 965–978.
- Maki, C.G., Huibregtse J.M., Howley P.M. 1996. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.*, 56: 2649–2654.
- Malek, S., Huxford, T., Ghosh, G. 1998. Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, 273(25): 427–435.
- Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A., Ju, S.T. 1998. Identification of two NF-kB sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J. Immunol.*, 161: 3469–3473.
- Meselson, M., Yuan, R. 1968. DNA Restriction Enzyme from *E. Coli*. *Nature*, 217: 1110-1114.
- Mirza, M.M., Fisher, S.A., Onnie, C., Lewis, C.M., Mathew, C.G., Sanderson, J., Forbes, A. 2005. No association of the NFKB1 promoter polymorphism with ulcerative colitis in a British case control cohort. *British Medical Journal*, 54: 1205–1206.
- Moore, B.E., Bose Jr, H.R. 1988. Expression of the v-rel oncogene in reticuloendotheliosis virus-transformed fibroblasts. *Virology*, 162: 377–387
- Morceau, F., Duvoix, A., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Dicato, M., Diederich, M. 2004. Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kB in tumor necrosis factor α -treated K562 leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.*, 67: 1227–1238.

- Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- Nabel, G.J., Verma, I.M. 1993. Proposed NF- κ B/I κ B family nomenclature. *Genes & Development*, 7: 2063.
- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D.A., Goulet Jr, R.J., Sledge Jr, G.W. 1997. Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 3629–3639.
- Neri, A., Chang, C.C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A.T., Chaganti, R.S., Dalla-Favera, R. 1991. B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF- κ B p50. *Cell*, 67: 1075–1087.
- Neurath, M.F., Pettersson, S., Meyer, K.H., Büschenfelde, Z., Strober, W. 1996. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat. Med.*, 2: 998–1004.
- Nozaki, S., Sledge, G.W., Nakshatri, H. 2001. Repression of GADD153/CHOP by NF- κ B: a possible cellular defense against endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *Oncogene*, 20: 2178–2185.
- Ohno, H., Takimoto, G., Mckeithan T.W. 1990. The candidate proto-oncogene *bcl-3* is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*, 60: 991–997.
- Orozco, G., Sánchez. E., Collado, M.D., López-Nevot, M.Á., . Paco, L., García, A., Jiménez-Alonso, J., Martín, J. 2005. Analysis of the functional *NFKB1* promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 65(2): 183–186.
- Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F., Rolfe, M. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, 269: 682–685.
- Pahl, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853–6866.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., Maniatis, T. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*, 78: 773-785.

- Parker, K.M., Ma, M.H., Manyak, S., Altamirano, C.V., Tang, Y.M., Frantzen, M., Mikail, A., Roussos, E., Sjak-Shie, N., Vescio, R.A., Berenson, J.R. 2002. Identification of polymorphisms of the IkappaBalpha gene associated with an increased risk of multiple myeloma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 137: 43–48.
- Peek Jr, R.M., Blaser M.J. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer.*, 2: 28–37.
- Perkins, N.D. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(1): 49-62
- Ravi, R., Bedi, G.C., Engstrom, L.W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gélinas, C., Fuchs, E.J., Bedi. A. 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kB. *Nat. Cell Biol.*, 3: 409–416.
- Rayet, B., Gelinias, C. 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18: 6938–6947.
- Richmond, A. 2002. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.*, 2 (9): 664–674.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Schölmerich, J., Gross, V. 1998. Nuclear factor kB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 115: 357–369.
- Romzova, M., Hohenadel, D., Kolostova, K., Pinterova, D., Fojtikova, M., Ruzickova, S., Dostal, C., Bosak, V., Rychlik, I., Cerna, M., 2006. NFκB and Its Inhibitor IκB in Relation to Type 2 Diabetes and Its Microvascular and Atherosclerotic Complications. *Human Immunology*, 67(9): 706–713.
- Rothwarf, D.M., Karin, M. 1999. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE.*, 5 p. re1.
- Ruland, J. & Mak, T.W. 2003. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor κB. *Immunol. Rev.*, 193: 93–100.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350–1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Sen, R., Baltimore, D. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47(6): 921-928.

- Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E.I., Baltimore, D. 1995. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses, 80(2): 321–330.
- Shattuck-Brandt, R.L., Richmond, A. 1997. Enhanced degradation of IkappaB alpha contributes to endogenous activation of NF-kappaB in Hs294T melanoma cells. *Cancer Res.*, 57(14): 3032–3039.
- Sovak, M.A., Bellas, R.E., Kim, D.W., Zanieski, G.J., Rogers, A. E., Traish, A.M., Sonenshein, G.E. 1997. Aberrant nuclear factor-kB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J. Clin. Invest.*, 100: 2952–2960
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heler, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., Hershko, A. 1995. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell.*, 6: 185–197.
- Sunamura, M., Duda, D.G., Ghattas, M.H., Lozonchi, L., Motoi, F., Yamauchi, J., Matsuno, S., Shibahara, S., Abraham, N.G. 2003. Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis*, 6: 15–24.
- Sylla, B.S., Temin, H.M. 1986. Activation of oncogenicity of the c-rel proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 4709–4716.
- Thanos, D., Maniatis, T. 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell*, 80(4): 529-532.
- Tak, P.P., Firestein, G.S. 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.*, 107: 7–11.
- Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., Greenberg, M.E. 2003. The many forks in FOXO's road. *Sci., STKE* 2003 (172): RE5.
- Ulusoy, M., Tunçbilek, E. 1987 Türkiye'de akraba evlilikleri ve çocuk ölümlerine etkisi. *Nüfusbilim Derg.*, 9, 7–26.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development*, 9: 2723-2735.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Baldwin Jr, A.S. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kB. *Science*, 274: 784–787.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin Jr, A.S. 1998. NF-kB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281: 1680–1683.

- Wang, C.Y., Cusack Jr, J.C., Liu, R., Baldwin Jr, A.S. 1999. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kB. *Nat. Med.*, 5: 412–417.
- Webster, G.A., Perkins, N.D. 1999. Transcriptional cross talk between NF-kB and p53. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 3485–3495.
- Whiteside, S.T., Israel, A. 1997. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol.*, 8: 75–82.
- Wood, K.M., Roff, M., Hay, R.T. 1998. Defective I κ B α in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-kB. *Oncogene*, 16: 2131–2139.
- Xiao, G., Harhaj, E.W., Sun, S.C. 2000. Domain-specific interaction with the I κ B kinase (IKK) regulatory subunit IKK γ is an essential step in tax-mediated activation of IKK. *J. Biol. Chem.*, 275: 34060–34067.
- Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T., Hatanaka, M. 1996. Constitutive activation of NF-k B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J.*, 15: 873–887.
- Yanagawa, T., Omura, K., Harada, H., Nakaso, K., Iwasa, S., Koyama, Y., Onizawa, K., Yusa, H., Yoshida, H. 2004. Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.*, 40: 21–27.
- Yang, J., Richmond, A. 2001. Constitutive I κ B kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells. *Cancer Res.*, 61 (12): 4901–4909.
- Yeh, F., Yang, R., Boyle, T. 1999. Popgene version 1.32: A Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. [<http://www.ualberta.ca/~fyeh/info.htm>] Erişim Tarihi: 20.05.2008.
- Zabel, U., Schreck, R., Baeuerle, P.A. 1991. DNA binding of purified transcription factor NF-kB. Affinity, specificity, Zn²⁺ dependence, and differential half-site recognition. *J. Biol. Chem.*, 266: 252–260
- Zheng, Y., Ouaz, F., Bruzzo, P., Singh, V., Gerondakis, S., Beg, A.A. 2001. NF-kB RelA (p65) is essential for TNF- α -induced fas expression but dispensable for both TCR-induced expression and activation-induced cell death. *J. Immunol.*, 166: 4949–4957.
- Zhou, G., Kuo, M.T. 1997. NF-kB-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 15174–15183.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Serap ŞENOL
Doğum yeri ve Tarihi : Torbalı/İZMİR, 21.06.1983

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLER

Bildiriler : Şenol, S. 2005. 2005 yılı Fethiye Kumsalı Deniz Kaplumbağalarını Koruma Çalışmaları. Süleyman Demirel Üniversitesi 12. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi. 5-8 Ekim 2005

Projeler : Deniz Kaplumbağası ve Nil Kaplumbağası Populasyonlarının Araştırılması ve Korunması, Selin İnşaat Turizm Müşavirlik Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. Deniz Kaplumbağası (*Chelonia mydas* ve *Caretta caretta*) ve Yumuşak Kabuklu Nil Kaplumbağası (*Trionyx tringuis*) Populasyonlarının Araştırılması, İzlenmesi ve Korunması Projesi. WWF. Haziran-Eylül 2006.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : serap.senol@hotmail.com
Tarih : 09.09.2008