

## DENEY NO: 3 GSTM1 ve GSTT1 GEN SİLİNMESİNİN SAPTANMASI

### GENEL BİLGİLER:

#### A) Genetik Polimorfizm

**Polimorfizm**, Latince poli (çoklu) ve morfizmos (form) kelimelerinden oluşmuştur ve çok şekillilik anlamını taşıyan bir sözcüktür. Genetik polimorfizm ise aynı popülasyonda bir bölgedeki (lokusta) bulunan genin iki veya daha fazla alelinin belli frekansta görülmesidir.

Polimorfizmler, mutasyon sonucu oluşurlar. Mutasyonlar bir nükleotidin başka bir nükleotidle değişimi sonucu olabileceği gibi (tek nükleotid değişimi-SNP), DNA dizisine bir nükleotidin eklenmesi ya da çıkması sonucu da oluşabilirler. Proteinlerdeki aminoasitlerin dizilimi, genlerde bulunan bilgiye göre belirlenir. Bir gene ait farklı DNA dizilimleri mevcutsa o gen polimorfiktir. Bu farklı gen formları **alel** adını alır. Aleller, bir proteinin aminoasit diziliminde farklılıklara neden olduğunda, bu alellerin kodladığı protein formlarına da **izozim** denir. Metabolizmada görev alan enzimlerde polimorfizmlere neden olan birçok moleküler genetik mekanizma vardır. Bunlardan bazıları: Biyotransformasyon enzimini kodlayan gen mevcut değildir, bu duruma **gen silinmesi (deletion)** denir. Proteindeki kritik olmayan aminoasitlerin mutasyonu sonucu enzimin aktivitesi değişir. Proteindeki kritik aminoasitlerin mutasyonu sonucu, enzimin aktivitesi ortadan kalkar. Çizelge 1'de metabolik gen mutasyonlarının sonuçları özetlenmiştir.

#### Çizelge 1. Gen mutasyonlarının sonuçları

Polimorfik gen	Sonuç
Gen yoksa	Metabolik aktivite yok
Fonksiyon değişikliğine neden olmuşsa	Substrat seçiciliğinde değişiklik ve artan ya da azalan aktivite
Gen çoğalmışsa (amplifiye olmuşsa)	Artan metabolik aktivite

#### B) Glutasyon ve Glutasyon S-Transferazlar

Glutasyon, glisin, sistein ve glutamik asitten oluşan bir tripeptittir. Glutasyon karaciğerde oluşur, safrayla veya merkaptürik asite dönüşerek böbreklerden atılır. Merkaptürik asit oluşumunun ilk basamağında, glutasyonun nükleofilik sülfidril grubu ile substratın elektrofilik karbon atomu reaksiyona girer. Böylece, polar tiyoeter yapısında bir konjugat oluşur. Bu konjugasyon reaksiyonunu Glutasyon S-Transferazlar (GST) katalizler. GST' ler insanda birçok dokuda bulunup çok işlevli ve geniş substrat seçiciliği olan enzimlerdir. Bu özelliği ile GST' ler potansiyel toksik kimyasallara maruz kalan canlı organizmalarda savunma görevini üstlenirler. GST' ler detoksifikasyon görevini, indirgenmiş glutasyonun (GSH) tiyol (-SH) grupları ile, elektrofilik fonksiyonel gruba sahip olan ksenobiyotiklerin (oksidatif strese neden olan kimyasallar, çevresel kirlenimler ve karsinogenler gibi) büyük bir kısmının elektrofilik bölgelerini nötralize ederek gerçekleştirir. Oluşan ürün suda çözünen merkaptürik asittir (N-asetilsistein) ve vücuttan idrarla atılır.

Sitozolik GST' ler, genetik ve biyokimyasal özelliklerine göre 7 sınıfa ayrılırlar. Bunlar, GSTA, GSTM, GSTP, GSTO, GSTS, GSTT, GSTZ' dir. GST' lerin her bir sınıfının üyeleri arasında aminoasit dizilimi benzerliği % 50'den daha fazladır. Farklı sınıflar arasındaki benzerlik ise % 30' un altındadır.

GST' ler, ilaç ve çevresel kimyasallar dahil birçok ksenobiyotiğin detoksifikasyonunda ayrıca özellikle kemoterapide antineoplastik ilaçların inaktivasyonunda rol oynadıkları için, gelişen ilaç rezistansından önemli ölçüde sorumludurlar.

### C) GST Polimorfizmi

GST' lerin birçoğu genetik polimorfizm gösterir. Bu polimorfizmler çoğunlukla tek nükleotid polimorfizmleri ve daha az olasılıkla da genin silinmesi tarzındadır. Kanser hastalarında kemoterapiye yanıt ve bu polimorfizmler arasındaki ilişki, özellikle de GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genlerindeki polimorfizmler, birçok bilimsel araştırmaya konu olmuştur. Çizelge 2'de önemli GST polimorfizmleri ve bu polimorfizmler sonucunda enzim aktivitesinde olan değişiklikler gösterilmiştir.

**Çizelge 2:** Önemli GST polimorfizmleri ve enzim aktivitesinde olan değişiklikler

Sınıf	Kromozom	Alt ünite	Kodon/nükleotid değişimi	Enzim aktivitesi
M	1q13	GSTM1	Silinme	Yok
T	22q11	GSTT1	Silinme	Yok
P	11q13	GSTP1	İle105Val, Ala114Val	Azalma

GST' ler, kemoterapötik ilaçlar, çevresel karsinojenler ve endojen moleküller olmak üzere ksenobiyotiklerin büyük çoğunluğunu inaktive ederler. GSTM1, GSTP1 ve GSTT1 enzimlerinin önemli substratları Çizelge 3' te gösterilmiştir.

GST genlerindeki polimorfizmler, bireylerin kansere yatkınlığı ve toksik maddelere duyarlılığını etkilediği kadar, bazı ilaçların verimi veya toksisitelerine de etki etmektedir. GSTM1 geni, beyaz ırkta %50 oranında, GSTT1 geni ise %15-20 oranında eksiktir. GSTP1 İle105Val mutant aleli taşıyan bireyler %45-50 oranında, GSTP1 Ala114Val mutant aleli taşıyan bireyler ise %10-15 oranındadır. Çevresel toksinler ve karsinojenlere olan duyarlılıktaki artışla ilgili olarak artan kanser riski ve bu genlerdeki değişiklikler arasında ilişki vardır.

**Çizelge 3:** GSTM1, GSTP1 ve GSTT1 substratları

	İlaçlar	Diğer Ksenobiyotikler
<b>GSTM1</b>	1,3-bis(2-kloroetil)-1-nitrozoüre (BCNU), brostallisin, tiyopürinler, etakrinik asit	PAH' lar, kimyasal epoksitler, aromatik nitro bileşikleri, reaktif oksijen türlerinin yan ürünleri
<b>GSTT1</b>	BCNU	Halometanlar, organik peroksitler, reaktif oksijen türlerinin yan ürünleri
<b>GSTP1</b>	Brostallisin, sisplatin, klorambusil, dosetaksel, doxorubisin, etoposid, siklofosamid, ifosfamid, tiyotepa, etakrinik asit	PAH' lar, kimyasal epoksitler ve diol epoksitler, aromatik nitro bileşikleri

## A) Deneyde Kullanılan Çözeltiler, Malzemeler ve Cihazlar

### PCR için:

- 1) PCR ana karışımı: PCR tamponu, MgCl<sub>2</sub>, nükleotid karışımı, Taq polimeraz enzimi.
- 2) Primerler: Çoğaltılacak gen bölgesine spesifik olacak şekilde sentezlenir.
- 3) DNA çözeltisi
- 4) Thermal Cyclers
- 5) Mikropipet
- 6) Santrifüj
- 7) PCR tüpleri

### Jel için:

- 1) Elektroforez Tankı
- 2) Agaroz jel
- 3) Elektroforez tamponu (TBE)
- 4) DNA markır
- 5) Elektroforez güç kaynağı
- 6) Jel görüntüleme sistemi

## B) Deneyin Yapılışı

Polimeraz zincir reaksiyonu: PCR ana karışımına primerler ve DNA çözeltisi ilave edildikten sonra thermal cyclers (sıcaklık döngü) cihazı, 95°C'de 2 dakikalık ilk denatürasyonu takiben 35 PCR döngüsü erime (94°C, 2 dakika), yapışma (59°C, 1 dakika) ve sentez (72°C, 2 dakika); 72°C' de 10 dakikalık son bir sentez basamağı olacak şekilde programlanır. Program süresinde PCR ürünlerinin uygulanacağı jel hazırlanır. Süre sonunda PCR ürünleri jele uygulanır.

- 1) Jelin hazırlanması: 40ml tampon çözeltide %1.5 olacak şekilde agaroz hesaplanarak tartılır. Tartılan miktar, bir erlen içerisinde konan 40ml TBE tamponuna ilave edilip karıştırılır. Daha sonra ısı uygulaması ile agarozun jelleşmesi sağlanır. Berrak hale gelen agaroz jeli, kalıba dökülür ve üzerine PCR ürünlerinin uygulanacağı kuyucukların oluşmasını sağlayacak olan tarak yerleştirilir. Jel donduktan sonra tanka tampon çözelti doldurulur.
- 2) Elektroforez: PCR ürünlerinin jele uygulamasının ardından tankın kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanır. 65 dakika 100V elektrik uygulandıktan sonra jel zedelenmeden dikkatlice tanktan çıkarılır.
- 3) Nükleik asit jel boyası ile PCR ürünlerinin görünür hale getirilmesi: Tanktan çıkarılan jel, 1/10000 oranında seyreltilmiş SYBR Green nükleik asit jel boyası içeren bir kapta düşük hızdaki çalkalayıcı yardımıyla, 30 dakika inkübe edilerek jeldeki PCR ürünlerine ait bantların UV ışığında görünür hale gelmesi sağlanır.
- 4) Jel görüntüleme: İnkübasyon süresi sonunda jel dikkatlice UV tablaya yerleştirilir ve UV ışıkta görünür hale gelen PCR ürünlerine ait bantların fotoğrafı çekilir. Daha sonra bantlar, DNA markır ile karşılaştırılarak istenen gen bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı anlaşılır.