

**NAZAL POLİPLİ HASTALARDA *SCGB1C1*  
(*LIGAND-BINDING PROTEIN RYD5*) GENİNDEKİ  
MOLEKÜLER PATOLOJİLERİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF MOLECULAR PATHOLOGIES IN  
*SCGB1C1 (LIGAND-BINDING PROTEIN RYD5)*  
GENE IN PATIENTS WITH NASAL POLYPOSIS**

**SİBEL UNURLU ÖZDAŞ**

**PROF.DR. AFİFE İZBIRAK**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır

2013



**NAZAL POLİPLİ HASTALARDA *SCGB1C1*  
(*LIGAND-BINDING PROTEIN RYD5*) GENİNDEKİ  
MOLEKÜLER PATOLOJİLERİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF MOLECULAR PATHOLOGIES IN  
*SCGB1C1 (LIGAND-BINDING PROTEIN RYD5)*  
GENE IN PATIENTS WITH NASAL POLYPOSIS**

**SİBEL UNURLU ÖZDAŞ**

**PROF.DR. AFİFE İZBIRAK**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır

2013

**Sibel UNURLU ÖZDAŞ**'ın hazırladığı “Nazal Polipli Hastalarda *SCGB1C1 (Ligand-Binding Protein RYD5)* Genindeki Moleküler Patolojilerin Araştırılması” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr., Erol AKSÖZ)

.....

Danışman

(Prof. Dr., Afife İZBIRAK)

.....

Üye

(Prof. Dr. Hatice MERGEN)

.....

Üye

(Doç. Dr., Rıza Köksal ÖZGÜL)

.....

Üye

(Doç. Dr., Selim Sermed ERBEK)

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr., Fatma Sevin DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Eşim Talih, oğlum Mert*  
*Bilim Dünyasına*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim

...../...../2013

Sibel UNURLU ÖZDAŞ

## ÖZET

### NAZAL POLİPLİ HASTALARDA *SCGB1C1* (LIGAND-BINDING PROTEİN *RYD5*) GENİNDEKİ MOLEKÜLER PATOLOJİLERİN ARAŞTIRILMASI

Sibel UNURLU ÖZDAŞ

Doktora, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Afife İZBIRAK

Ekim 2013, 117 sayfa

Nazal polipozis (NP), nazal kaviteye doğru sarkan iyi huylu mukozal çıkıntılar olup, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. NP, birçok nedeni olan bir hastalık olup, oluşumunda genetik faktörler önemli bir yer tutmaktadır. Patogenezinin, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasında gelişen dengeyle düzenlendiği düşünülmektedir. *RYD5* (*SCGB1C1*) geni yeni tanımlanmış bir gen ailesi olan sekretogloblinlerin (SCGB) bir üyesidir. *RYD5* (ligand-binding protein) dimerik yapıda, biyolojik olarak aktif, fizyolojik ve patofizyolojik olarak önemli bir protein olup, anti-inflamatuvar ve immüno-modülatör fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma, *RYD5* genindeki genotipik varyasyonların ve gen ifadesindeki değişikliklerin, NP oluşum mekanizmasındaki etkilerini araştırmak için yapılmıştır. *RYD5* geninde var olabilecek nükleotit değişiklikleri ve bunların pozisyonlarını (promotor, splizing noktaları ve ekzon dağılımlarını) değerlendirmek için 91 NP'li hasta ve 110 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunun kan örneklerinde gen dizi analizi yapılarak, genotipik varyasyonlar incelenmiştir. Ayrıca, NP'li 13 hastanın polip dokusu ve kendi sağlam nazal mukozasından elde edilen DNA örneklerinde *RYD5* gen dizileri karşılaştırılmıştır. NP'li 13 hastanın polip dokusuyla, 9 hastanın kendi sağlam nazal mukozasından ve sağlıklı 10 bireyin nazal mukozasından alınan doku örneklerinde *RYD5* geninin ifade düzeyleri Kantitatif Ters Transkripsiyon PZR (KTT-PZR) yöntemiyle değerlendirilmiştir. Verilerin karşılaştırılmasında, Pearson ki-kare ve Fisher'in tam testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Hasta ve kontrol gruplarında yapılan dizi analizi sonucunda, on farklı tek nükleotit değişikliği tespit edilmiş olup, bunlardan (c.13C>T) ve (c.152G>T) nükleotit değişiklikleri, *RYD5* gen ürününde amino asit değişikliğine yol açabilecek niteliktedir [sırasıyla (R5C) (G51V)]. (c.13C>T) tolere edilebilir bir protein varyasyonu olup, sadece NP'li hastalarda tespit edilmiş olan *RYD5* (c.152G>T) nükleotit değişikliği daha önce bildirilmemiş ve PROVEAN, PolyPhen-2 programına göre tolere edilemeyen, SIFT programına göre tolere edilebilir bir protein varyasyonuna neden olmaktadır. (c.-264A>G) ve (c.-103G>A) nükleotit değişiklikleri ile NP patogenezinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). NP'li hastaların polip dokusu ile kendi sağlam nazal mukozaları arasında, *RYD5* gen dizisi açısından fark bulunmamıştır. Çalışmamızın gen ifade düzeyi analiz sonucuna göre, NP'li hastanın kendi sağlam mukozasına kıyasla, polip dokusunda *RYD5* gen ifade seviyesi düşük olsa da, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p = 0.367$ ). Kontrol grubuna

kıyasla, nazal polip dokusunda *RYD5* gen ifade seviyesi artmıştır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.121$ ). *RYD5* gen ifade çalışmasında, kontrol grubu ile nazal polip dokusundaki nükleotit değişikliklerinin dağılımı istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Sonuç olarak, *RYD5* genindeki (c.-264A>G) ve (c.-103G>A) nükleotit değişikliklerinin, genin ifade düzeyini etkilediğini ve inflamasyonun şiddetini değiştirerek NP gelişimine katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Nazal Polipozis, Patogenez, *RYD5*, DNA Dizi Analizi, KTT-PZR, Nükleotit Değişikliği



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF MOLECULAR PATHOLOGIES IN *SCGB1C1* (*LIGAND-BINDINGPROTEINRYD5*) GENE IN PATIENTS WITH NASAL POLYPOSİS

Sibel UNURLU ÖZDAŞ

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Afife İZBIRAK

Oktober 2013, 117 pages

Nasal polyposis (NP) is a chronic inflammatory disease consisting of benign mucosal protrusions that can extend towards the nasal cavity. NP is a multifactorial disease in which genetic factors assume an important role in its development. Its pathogenesis is regulated by the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. The *RYD5* (*SCGB1C1*) gene is a member of newly defined gene family of the secretoglobins (SGCB). It is a dimeric, biologically active, physiologically and pathophysiologically important protein with anti-inflammatory and immuno-modulator functions.

This study has been conducted to investigate the effects of genotypic variations and deviations in gene expression in *RYD5* gene on NP formation mechanism. Genotypic variations have been studied by performing DNA Sequencing in blood samples of 91 patients with NP and 110 healthy individuals to evaluate nucleotide changes and their positions that might be in *RYD5* gene (promotor, splicing points and exon distributions). Moreover the polyp tissues of 13 patients with NP and *RYD5* gene sequences in their healthy nasal mucosa have been compared. *RYD5* gene expression levels have been evaluated by Quantitative Reverse Transcription PCR (QRT-PCR) method in tissue samples taken from polyp tissue of 13 patients with NP, healthy nasal mucosa of 9 patients and nasal mucosa of 10 healthy individuals. In comparison of data, Pearson chisquare and Fisher's exact test have been used.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

As a result of sequence array analyze conducted in patients and control group, 10 nucleotide changes have been identified in those (c.13C>T) and (c.152G>T) mutations are such as to cause a residual change in *RYD5* gene product [respectively (R5C) (G51V)]. (c.13C>T) nucleotide change is a tolerable protein variation (MAF=0,27), and (c.152G>T) nucleotide change that was found only in patients with NP can cause a protein variation that has never been reported before and is intolerable according to PROVEAN, PolyPhen-2 program, tolerable according to SIFT program. It has been found a statistically significant relation ship between (c.-264A>G) and (c.-103G>A) nucleotide changes and NP pathogenesis ( $p < 0,05$ ). No difference was found between the polyp tissue of patients with NP and their healthy nasal mucosa in terms of the *RYD5* gene sequence. According to the expression analyze results of our study, *RYD5* gene expression level in polyp tissue of patients with NP was low in

comparison to their healthy mucosa, and no statistically significant difference was found ( $p=0,367$ ). In comparison to the control group, *RYD5* gene expression level has been increased in nasal polyp tissue, however this difference was not statistically significant ( $p=0.121$ ). The relation *RYD5* gene expression, distributions of mutations in control group and nasal polyp tissue could not be evaluated statistically.

In conclusion, we consider that in *RYD5* gene (c.-264A>G) and (c.-103G>A) nucleotide changes alter the severity of chronic inflammatory diseases and contribute to NP development by affecting the level of gene expression.

**Keywords:** Nasal Polyposis, Pathogenesis, *RYD5*, DNA Gene Sequencing, QRT-PCR, Nucleotide Changes

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, hoşgörüsüyle bana destek olan, daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukları aşmam için bana cesaret ve güven veren sayın danışman hocam Prof. Dr. Afife İZBIRAK'a

Doktora çalışmam boyunca bilimsel katkısı ile çalışmama yön veren, mesleki bilgi ve tecrübelerimi kazanmamda katkısı olan değerli Tez izleme komitemde yer alarak, bilimsel tecrübelerinden yararlanmama izin veren sayın hocalarım Prof. Dr. Hatice MERGEN, Doç. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL ve Prof. Dr. Erol AKSÖZ'e ve yine tez dönemimde bilgi ve desteği ile yanımda olan Doç. Dr. Selim Sermed ERBEK'e,

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalındaki hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Doktora çalışmamın gerçekleştirilmesi ve uygulanması aşamasında bütçe ve donanım olanaklarıyla katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne TÜBİTAK ve Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'ne

Sevgisi, sabrı ve sonsuz desteğiyle her zaman yanımda olup, tüm zorlukları aşmam için beni yüreklendiren eşim Talih ÖZDAŞ'a, hayatıma anlam katan canım oğlum Mert ÖZDAŞ'a

Teşekkürü borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

|                                      | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------|--------------|
| ÖZET.....                            | i            |
| ABSTRACT.....                        | iii          |
| TEŞEKKÜR.....                        | v            |
| İÇİNDEKİLER.....                     | vi           |
| ÇİZELGELER.....                      | ix           |
| ŞEKİLLER.....                        | x            |
| SİMGELER ve KISALTMALAR.....         | xii          |
| 1. GİRİŞ.....                        | 1            |
| 2. NAZAL POLİPOZİS.....              | 3            |
| 2.1. Tanım ve Tarihçe.....           | 3            |
| 2.2. Epidemiyolojisi.....            | 4            |
| 2.3. Etiyolojisi.....                | 4            |
| 2.4. Eşlik Eden Hastalıklar.....     | 8            |
| 2.5. Patogenezi.....                 | 8            |
| 2.6. Histopatolojisi.....            | 11           |
| 2.7. Klinik Bulguları ve Tanısı..... | 11           |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.8. Tedavi Yaklaşımları.....                        | 12        |
| 2.9. Önceki Çalışmalar.....                          | 13        |
| <b>3. <i>RYD5 (SCGB1C1)</i> GENİ.....</b>            | <b>15</b> |
| 3.1. Koku Alma.....                                  | 15        |
| 3.2. Sekretoglobinler (SCGBs).....                   | 16        |
| 3.3. Sekretoglobinlerin Sınıflandırılması.....       | 17        |
| 3.4. <i>RYD5 (SCGB1C1)</i> Geni ve Fonksiyonu.....   | 22        |
| <b>4. KANTİTATİF TERS TRANSKRİPSİYON PZR.....</b>    | <b>28</b> |
| 4.1. İnterkalatör Boya Metodu.....                   | 31        |
| 4.2. TaqMan Prob Methodu.....                        | 32        |
| 4.3. FRET Prob Methodu.....                          | 33        |
| 4.4. Moleküler Boncuk (Molecular Beacon)Yöntemi..... | 34        |
| 4.5. Scorpions Prob Yöntemi.....                     | 35        |
| <b>5. MATERYAL ve METOD.....</b>                     | <b>36</b> |
| 5.1. Örneklerin Toplanması.....                      | 36        |
| 5.2. <i>RYD5</i> Geni Dizi Analizi .....             | 37        |
| 5.2.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....  | 37        |
| 5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....        | 39        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.2.3. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi.....                         | 44         |
| 5.2.4. Otomatik DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi).....           | 44         |
| 5.3.RYD5 Geni İfade Düzeyi Analizi.....                          | 48         |
| 5.3.1. mRNA İzolasyonu.....                                      | 48         |
| 5.3.2. RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi..... | 50         |
| 5.3.3. KTT-PZR için Genomik DNA Eliminasyonu .....               | 50         |
| 5.3.4. cDNA Eldesi için Ters Transkripsiyon Reaksiyonu.....      | 51         |
| 5.3.5. Çift-İşaretli Problar Kullanarak KRT-PZR Protokolü.....   | 52         |
| 5.3.6. KTT-PZR ile Elde Edilen Verilerin Analizi .....           | 53         |
| 5.3.7. Karşılaştırmalı CT Methodu.....                           | 53         |
| 5.3. İstatistiksel Analiz.....                                   | 53         |
| <b>6. SONUÇLAR.....</b>  | <b>54</b>  |
| 6.1. DNA Dizi Analiz Sonucu.....                                 | 56         |
| 6.2. KTT-PZR Analiz Sonucu.....                                  | 75         |
| <b>7. TARTIŞMA.....</b>  | <b>79</b>  |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>   | <b>113</b> |

## ÇİZELGELER

### Sayfa

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 3.1. <i>SCGB</i> genlerinin kromozomal lokalizasyonları [29].....   | 19 |
| Çizelge 3.2. <i>RYD5</i> geninde tanımlanmış nükleotit değişiklikleri [175].....  | 26 |
| Çizelge 5.1. PZR ile KTT-PZR yönteminde kullanılan prob ve primer çiftleri, PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri..... | 40 |
| Çizelge 5.2. DNA dizi analizi, Genomik DNA eliminasyonu, Ters-Transkripsiyon ve KTT-PZR reaksiyon bileşenleri.....      | 46 |
| Çizelge 5.3. Dizi analizi ve KTT-PZR reaksiyon programı.....  | 47 |
| Çizelge 6.1. Hasta birey ve kontrol grubunun klinik özellikleri.....  | 55 |
| Çizelge 6.2. Bu çalışmada <i>RYD5</i> geninde bulunan nükleotit değişiklikleri.....                                     | 57 |
| Çizelge 6.3. <i>RYD5</i> geninde bulunan nükleotit değişikliklerinin allel frekansları.....                             | 58 |
| Çizelge 6.4. <i>RYD5</i> geni KTT-PZR analizi.....  | 75 |

## ŞEKİLLER

### Sayfa

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. Nazal polip epitelinde <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoksinlerinin boyanması [71].....    | 6  |
| Şekil 3.1. Olfaktör bölge [39].....   | 15 |
| Şekil 3.2. Sekretoglobulinlerin sınıflandırılması [8].....  | 17 |
| Şekil 3.3. İnsan ve fare sekretoglobulinlerin filogenetik ağacı (h,insan; m,fare) [29].....               | 18 |
| Şekil 3.4. <i>RYD5</i> geninin organizasyonu [173, 174].....  | 22 |
| Şekil 3.5. <i>RYD5</i> geninin yapısı [174].....  | 23 |
| Şekil 3.6. <i>RYD5</i> geni cDNA'sı [35].....   | 23 |
| Şekil 3.7. <i>RYD5</i> proteininin üç boyutlu yapısı [177].....   | 24 |
| Şekil 3.8. <i>RYD5</i> proteini ile homolog farklı proteinlerin sekanslarının karşılaştırılması [35]..... | 25 |
| Şekil 4.1. KTT-PZR cevap eğrisi [193]. ....   | 30 |
| Şekil 4.2. Syber Green I yöntemi [195].....   | 32 |
| Şekil 4.3. TaqMan prob metodu [ 201]. ....  | 33 |
| Şekil 4.4. Moleküler boncuk yöntemi [203].....  | 34 |
| Şekil 5.1. <i>RYD5</i> gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi [207].....                            | 41 |
| Şekil 5.2. <i>RYD5</i> geni cDNA'sı dizisi üzerinde prob ve primerlerin gösterilmesi [208].....           | 42 |
| Şekil 5.3. <i>ACTB</i> geni cDNA'sı dizisi üzerinde prob ve primerlerin gösterilmesi [209].....           | 43 |
| Şekil.5.4. Karşılaştırmalı CT metodunda kullanılan formülü [210].....                                     | 54 |
| Şekil 6.1. <i>RYD5</i> geninin promotor bölgesinde saptanan c.-264A>G nükleotit değişikliği.....          | 61 |
| Şekil 6.2. <i>RYD5</i> geninin promotor bölgesinde saptanan c.-177C>A nükleotit değişikliği.....          | 62 |
| Şekil 6.3. <i>RYD5</i> geninin promotor bölgesinde saptanan c.-103G>A nükleotit değişikliği.....          | 63 |
| Şekil 6.4. <i>RYD5</i> geninin promotor bölgesinde saptanan c.-49G>A nükleotit değişikliği.....           | 64 |
| Şekil 6.5. <i>RYD5</i> geninin promotor bölgesinde saptanan c.-35G>A nükleotit değişikliği.....           | 65 |



|   |    |
|---|----|
| Şekil 6.6. <i>RYD5</i> geninin birinci ekzon bölgesinde saptanan c.13C>T (R5C) nükleotit değişikliği.....   | 66 |
| Şekil 6.7. <i>RYD5</i> geninin birinci intron bölgesinde saptanan IVS1-14C>T nükleotit değişikliği.....   | 67 |
| Şekil 6.8. <i>RYD5</i> geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan c.66A>G nükleotit değişikliği.....  | 68 |
| Şekil 6.9. <i>RYD5</i> proteininin amino asit dizilimi [211].....   | 69 |
| Şekil 6.10. <i>RYD5</i> geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan c.152G>T (G51V) nükleotit değişikliği.....   | 70 |
| Şekil 6.11. <i>RYD5</i> geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisinin PolyPhen-2 programına göre değerlendirilmesi [216]..... | 71 |
| Şekil 6.12. <i>RYD5</i> geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisinin PROVEAN programına göre değerlendirilmesi [217].....    | 72 |
| Şekil 6.13. <i>RYD5</i> geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisinin SIFT programına göre değerlendirilmesi [218].....       | 73 |
| Şekil 6.14. <i>RYD5</i> geninin üçüncü ekzon bölgesinde saptanan c.279C>T nükleotit değişikliği.....  | 74 |
| Şekil 6.15. NP'li hastalar (P), sağlam doku (M) ve kontrol (K) grubunda <i>RYD5</i> gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....   | 75 |
| Şekil 6.16. NP'li hastalar (P) ve kontrol (K) grubunda <i>RYD5</i> gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....  | 76 |
| Şekil 6.17. NP'li hastanın polip (P) ve sağlam dokusundaki (M) <i>RYD5</i> gen ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....  | 77 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

|          |      |
|----------|------|
| $\alpha$ | Alfa |
| $\beta$  | Beta |

### Kısaltmalar

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| A     | Amino asit                         |
| ACTB  | Aktin b geni                       |
| Aİ    | Aspirin intoleransı                |
| AOAH  | Asiklosiasil hidrolaz              |
| ASA   | Asetil salisilik asit              |
| BPD   | Bronko pulmonar displazi           |
| C     | Sitozin                            |
| CC10  | Klarahücre 10-kd proteini          |
| CT    | Eşik-değer döngü (ThresholdCy cle) |
| cDNA  | Kopya deoksiribonükleik asit       |
| COX   | Siklooksigenaz                     |
| CSS   | Churg Straus sendromu              |
| ddNTP | Dideoksinükleotid trifosfat        |
| DMBT1 | Malign beyin tümörü 1 delesyonu    |
| DNA   | Deoksiribonükleik asit             |
| dNTP  | Deoksinükleotit trifosfat          |
| EDTA  | Etilen diamin tetra asetik asit    |
| EGF   | Epidermal büyüme faktörü           |
| EOK   | Epitelial ovarian kanser           |
| ER    | Endoplazmik retikulum              |

|                   |   |
|-------------------|---|
| ESC               | Endoskopik sinüs cerrahisi                          |
| FAM               | Carboxy fluorescein                                 |
| FRET              | Fluorescence resonance energy transfer              |
| G                 | Guanin  |
| gDNA              | Genomik DNA   |
| GM-CSF            | Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör           |
| HCSP              | İnsan klara hücre salgı proteini amino asit sekansı |
| HLA               | İnsan lökosit antijeni                              |
| ICAM-1            | Hücrelerarası yapışma molekülü                      |
| IFN               | İnterferon  |
| IL                | İnterlökin  |
| KF                | Kistik fibrozis                                     |
| KRS               | Kronik rinosinüzit                                  |
| LT                | Lökotrien   |
| M                 | Molar   |
| MCP               | Majör katyonik protein                              |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnezyum klorür                                    |
| ml                | Mililitre   |
| µl                | Mikrolitre  |
| mM                | Mili molar  |
| mRNA              | Mesajcı ribonükleik asit                            |
| MRG               | Manyetik rezonans görüntüleme                       |
| MUC5AC            | Musin geni  |
| NaCl              | Sodyum klorür                                       |
| NARES             | Allerjik olmayan eozinofilik rinit sendromu         |
| NP                | Nazal polipozis                                     |
| NO                | Nitrik oksit  |
| OBP               | Koku molekülü bağlayıcı protein                     |
| OMK               | Ostiomeatal kompleks                                |

|            |  |
|------------|--|
| PNS BT     | Paranasal sinüs bilgisayarlı tomografisi                   |
| PGE2       | Prostaglandin E2   |
| PIP        | Prolaktini indükleyen protein                              |
| pK         | Protein kinaz  |
| PNSBT      | Paranasal sinüs bilgisayarlı tomografisi                   |
| PolyPhen-2 | Polymorphism phenotyping 2                                 |
| PROVEAN    | Protein variation effect analyzer                          |
| PSD        | Primer siliyer diskinezi                                   |
| PZR        | Polimeraz zincir reaksiyonu                                |
| KTT-PZR    | Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu |
| RANTES     | Regulated upon activation T cell expressed and recreated   |
| RCSP       | Sıçan klara hücre salgı proteini amino asit sekansı        |
| RP         | Rat prostatein   |
| rpm        | Rotation per minute (dakikadaki devir)                     |
| RYD5       | Ligand-binding proteini                                    |
| RT         | Reverse transkripsiyon                                     |
| SAP        | Shrimp alkalın fosfataz                                    |
| SCGB       | Sekretoglobın  |
| SDS        | Sodyum dodesil sülfat                                      |
| SEB        | Stafilakok enterotoksin B                                  |
| SIFT       | Sorting intolerant from tolerant                           |
| SNP        | Tek nükleotid polimorfizmi                                 |
| SRP        | Sinyal peptid tanıyan partükül                             |
| T          | Timin  |
| TAMRA      | Carboxy-tetramethyl-rhodamine                              |
| TCN1       | Trans kobalamin 1  |
| TE         | Tris EDTA  |
| TGF        | Transforme edici büyüme faktörü                            |
| Th         | T helper   |

|                |   |
|----------------|---|
| T <sub>m</sub> | DNA'nın erime sıcaklığı                     |
| TNF            | Tümör nekroz faktörü                        |
| TSST-1         | Toksik şok sendrom toksin-1                 |
| TÜBİTAK        | Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu |
| Uniprot        | The Universal Protein Resource              |
| VCAM-1         | Vasküler hücre yapışma molekülü             |
| VEGF           | Vasküler endotelial büyüme faktörü          |

# 1. GİRİŞ

Nazal polipozis (NP), orta meatus ve etmoid bölgedeki epitelden orijin alarak, nazal kaviteye doğru sarkan ve burun boşluğunu kapatabilen iyi huylu mukozal çıkıntılardır. Nazal mukozanın en sık karşılaşılan patolojik değişikliği olup, mukozal inflamasyon ile karakterizedir [1]. Nazal polipozise sıklıkla, alerjik rinit, alerji, aspirin duyarlılığı ve astım eşlik eder [2-6].

NP, içiçe girmiş birçok immünolojik yolak için klinik bir gösterge olup, sistemik bozuklukların lokal olarak ortaya çıkardığı bir sonuçtur [7]. Etiyolojisinin ve patogenezinin tam olarak açıklanamamış olmasına karşın, patofizyolojisinin pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasında gelişen dengeyle düzenlendiğine inanılmaktadır [8-10]. NP patogenezinin aydınlatılmasında bu dengeyi etkileyen faktörlerin belirlenmesi önemli veriler sağlayacaktır.

NP, kistik fibrozis (KF), primer siliyer diskinezi, Young ve Kartegener sendromu gibi genetik hastalıklarla birlikte sık olarak görülür [11, 12]. NP'li hastalarla yapılan çalışmalarda, %13,3-52'sinde pozitif aile öyküsü bildirilirken, tek yumurta ikizlerinin %52,6'sında NP gelişiminin gösterilmesi, hastalık fenotipinin ortaya çıkmasında çevre ile kalıtımın karşılıklı etkileşiminin önemli olduğu sonucuna yol açmıştır [13-17]. Çeşitli epigenetik ve genetik faktörler kronik inflamatuvar hastalıkların şiddetini değiştirerek, hastalık fenotipinin ortaya çıkışını etkilemektedir. İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla, genetik faktörlerle ilgili bilgimiz artmış ve tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) veya mikrosatellit polimorfizmlerin (özellikle düzenleyici bölgelerde yer alan) hastalık fenotipleri ile yakın ilişkide oldukları ve genlerin ifade düzeyini değiştirme yoluyla hastalıkların şiddetini değiştirebildikleri gözlenmiştir [18-20]. NP gelişimi ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda: *Human Lökosit Antijeni (HLA)* [21, 22], *Tümör Nekroz Faktörü (TNF)* [6, 23], *İnterlökin-1A (IL-1A)* [24, 25] ve *Asiloksiasil Hidrolaz (AOAH)* [13, 25] genlerine ait SNP'ler ile NP gelişimi arasında ilişki tespit edilmiştir. NP dokusuna ait gen ifade profilleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, kontrole kıyasla birçok genin ifadesinde farklılık olduğu bildirilmiştir [26, 27]. Gen ifadesindeki değişikliklerden sıklıkla genotipik varyasyonlar sorumludur.

Sekretoglobulinler (SCGB), yeni keşfedilmiş bir protein grubu olup, dimerik yapıda, biyolojik olarak aktif, fizyolojik ve patofizyolojik olarak önemli proteinleri içermektedir [10, 27-30]. Anti-inflamatuvar ve immüno-modülatör fonksiyonlarıyla yeni bir sitokin ailesi olmaya adaydır [26, 29, 31, 32]. SCGB'ler, genellikle akciğer, meme bezi, trakea, prostat, uterus ve tükürük bezi gibi özellikle bol salgı epiteli içeren organlarda ifade edilir [33]. Patofizyolojik fonksiyonları henüz tam olarak anlaşılammış olup, birçok hastalık patogeneziyle ilişkilendirilmiş ve bazı kanserlere ait biyobelirteçleri içeren önemli bir süperailedir [29, 33]. SCGB'lerin astım, kistik fibrozis, bronko pulmonar displazi (BPD), kronik obstrüktif pulmonar hastalıklar gibi kronik solunum yolu hastalıkları ile ilişkili olabilecekleri bildirilmiştir [34]. İnsan genomunda SCGB gen süperalesine ait on bir gen ve beş psödogen bulunmaktadır [29, 32]. SCGB1C1 alt ailesine ait *RYD5* (ligand-binding protein, SCGB1C1) geni, kromozomun 11q15.5 bandında yerleşim göstermektedir [16]. Olfaktör mukoza içerisinde yer alan, mukus salgılayan Bowman bezinde *RYD5* geni mRNA'sının tespit edilmesi ve homoloji çalışmaları neticesinde, koku molekülü bağlayıcı protein (OBP) olarak, belirgin bir özgülük olmaksızın hidrofobik koku moleküllerini bağladığı saptanmıştır [29, 35-38]. NP'li ve NP'siz kronik rinosinüzitli (KRS) hastalarda, yapılan bir çalışmada, NP'siz hastalara kıyasla NP'li hastalarda *RYD5* geninin ifade düzeyinde bir artış saptanmış ve bu durumun polip formasyonuna katkıda bulunabileceği bildirilmiştir [33].

Bu tez çalışmasında nazal polipozisli hastalarda DNA dizi analizi yöntemi ile hastalığın patolojisinde rolü olduğu düşünülen *RYD5* geninde yer alan nükleotit değişiklikleri araştırılmış ve kantitatif ters transkripsiyon PZR ile gen ifade düzeyi değerlendirilmiştir.

## 2. NAZAL POLİPOZİS

### 2.1. Tanım ve Tarihçe

NP'e ilişkin bilgiler, Eski Mısır dönemine kadar dayanmaktadır. NP, hasta ve doktor adının bilindiği (hasta, Kral Sahura; doktor, Ni-Ankh Sekhmet) en eski hastalıktır [38-41]. Yunanca kökenli bir kelime olan polip (poly: çok; pou: ayak) “çok ayaklı” anlamına gelir [42]. Polip kelimesi genel olarak, orta meadan orijinli, soluk renkli, ödemli, pedinküllü, düzgün yüzeyle, jelatinöz, mukozal kese tarzındaki kitleleri tarif eden bir terimdir [39]. Nazal polipozis, birçok nedene bağlı, nazal kaviteyi döşeyen mukozanın en sık karşılaşılan patolojik değişiklikleri olup, mukozal inflamasyon ile karakterizedir [43]. Genetik yatkınlık, immünolojik ve metabolik bozukluk gibi birden fazla faktör nazal polip oluşumunda rol oynar [44].

3000 yıl önce, Hindistan'da polipektomi için küretler üretilmiş, 2500 yıl önce ise Hipokrat (M.Ö.460-370) zamanında ayrıntılı medikal tedavi ve polipektomi teknikleri tanımlanmıştır. Hipokrat, polip kelimesini etmoid sinüslerdeki patolojiyi tanımlamak amacıyla kullanmıştır [45, 46].

Zuckermandl (1882), poliplerin yapıları hakkında bilgi vermiştir [47]. Hajek 1896 yılında nazal polip gelişiminde vasküler konjesyonun ve mukozal eksudanın önemli rol oynadığını savunmuştur [48]. Hirsch 1925 yılında kronik sinüzitin nazal polipozis etiopatogenezinde rolü olduğunu bildirmiştir [49]. Kern ve Schenk (1933) nazal polipozis etiolojisinde alerjinin önemine ilk kez deyinmiştir [50]. Tedavideki önemli gelişmeler, Eski Yunan medeniyetinde ve Avrupa'da Rönesans döneminde gerçekleşmiştir [51]. Mosher (1929), “bir insanı öldürmenin en kolay yolu” diyerek nazal polipozisin cerrahisini tanımlamıştır [52]. Polipektomi oldukça ağırlı ve tehlikeli bir ameliyat şekli iken, zaman içinde rutin bir minör cerrahi girişim olarak uygulanmıştır [53]. İbn-i Sina, bugün kullandığımız aletlere çok benzer araçlarla polipleri çıkarmış ve kızgın demirlerle dağlamıştır. Ayrıca hastaların tedavisinde kokular ve yapraklar da kullanmıştır [54]. Messerklinger'in (1967) modern endoskopik yöntemleri geliştirmesi ve görüntüleme yöntemlerinin ilerlemesiyle, NP cerrahisi daha güvenilir hale gelmiş ve nazal polipozisin tanımı, etiopatogenezini, medikal ve cerrahi tedavisinde belirgin değişiklikler olmuştur [51].



## 2.2. Epidemiyolojisi

Nazal polipozisin toplumda görülme sıklığı yaklaşık %1-4'dir [55, 56]. Tos ve Larsen [1], NP toplumda beklenenden daha sık görüldüğünü, ancak çoğunlukla boyutları küçük olduğundan tanı konulamamaları veya belirti vermemeleri nedeniyle, gerçek insidansı tahmin etmenin zor olduğunu bildirmiştir. Endoskopinin kullanıma girmesiyle, küçük poliplerin saptanmasında artış sağlamıştır [41]. NP prevalansı, Avrupa toplumlarında ortalama olarak %1-4.3 olarak bildirilmiştir [57-59]. Erbek ve arkadaşlarının [6], Türk toplumunda yaptığı bir çalışmada NP prevalansı %2.7 olarak saptanmıştır. NP'lerdeki farklı insidanslar genetik ve irksal faktörler gibi etiyolojik nedenlerden kaynaklanabilir [3-6].

NP iki yaşından sonra her yaşta görülebilirse de, on yaşından önce görülmeleri (%0.1) nadir olup, en çok otuz-kırk yaş arasında daha sık ve erkeklerde kadınlara kıyasla iki kat daha fazla görülür [55, 60, 61]. Yirmi ile altmış yaşları arasında her on yılda bir NP sıklığı artmakla birlikte 60 yaşından sonra görülme sıklığı tekrar azalmaktadır [61].

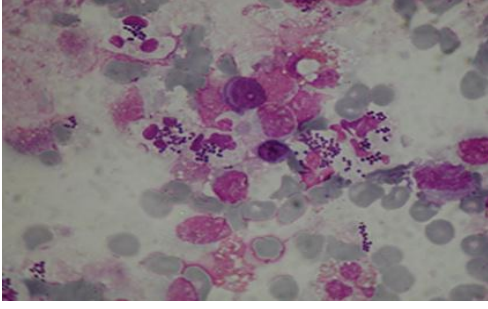
## 2.3. Etiyolojisi

Nazal polipozisin patogenezi ve etiyolojisi çok uzun zamandan beri tartışma konusu olmuş, ancak ileri sürülen görüşlerden hiçbiri henüz genel bir kabul görmemiş ve kesinlik kazanmamıştır. NP etiyopatogenezinde pek çok faktörün birlikte rol oynadığı düşünülmektedir. Nazal polipozis etiyolojisinde kronik lokal enfeksiyon, aspirin duyarlılığı, alerji, aerodinamik faktörler, immünolojik faktörler, metabolik bozukluklar (endokrin), anormal vazomotor cevap, aile öyküsü ve genetik yatkınlık, otonomik fonksiyon bozukluğu gibi birden fazla faktör ve/veya hastalık rol oynar [1-6, 62]. Bu gibi uyaranlar veya hastalıklar, solunum yolunu döşeyen epitel hücrelerin çoğalmasına, kronik inflamasyonuna, epitelyumun altındaki stromanın ödemine, lenfosit ve eozinofilik granülositlerin göçü ile infiltrasyonuna ve polip oluşumuna yol açar. NP oluşumu, değişik etiyolojik ajanlara karşı tek tip bir yanıt olup, sistemik bozuklukların lokal göstergesi olarak tanımlanabilir [41]. NP etiyolojisine dair çeşitli açıklamalar mevcuttur, bunlardan bazıları aşağıda sıralanmaktadır:

**Anatomik bozukluklar** Nazal polipoziste polipler çoğunlukla orta meatustan köken alırlar. Agger nazi hücresi, konka bülloza, paradoks orta konka, aşırı pnömotize bulla, eğri unsinat çıkıntı gibi anatomik varyasyonlar dar olan ostiomeatal kompleks (etmoid labirent) bölgesini oldukça daraltarak, NP oluşumuna zemin hazırlar [39]. Bernoulli fenomeninde, burundaki bir darlık sonucunda, hava basıncı bu bölgenin arkasında düşmekte, mukoza emilerek o bölgeye doğru çıkıntı ouştumaktadır. Bu kısımdaki mukoza zamanla kalınlaşmakta ve polip oluşumuna neden olmaktadır [41].

**Alerji** NP'li hastalarda alerji prevalansının %10-64 arasında olduğu gözlenmektedir [44, 63]. Alerjisi olan hastalarda ise, NP insidansı %5'ten azdır. Nazal polipozisli hastaların nazal mukoza örneklerinde %80-90 oranında eozinofil hâkimiyetinin olması, astım ile birlikte görülmesi, alerjik rinit semptomlarının mevcut olması, NP etiyolojisinde alerjinin yeri olabileceği görüşünü desteklemektedir [2, 44, 50]. Nazal polipozisle, astım ve alerjik rinitlerin ortak özelliği mukozal infiltrasyona bağlı olarak, eozinofil, mast hücreleri ve lokal IgE düzeylerinin artmasıdır [64, 65]. Bazı çalışmalar, alerjisi olan nazal polipozisli kişilerde operasyon sonrası hastalık tekrarının daha yüksek olduğunu bildirmiştir [66, 67]. NP'li hastalarda en sık alerjik ajanlar, *Dermatophagoides pteronyssinus* (%27.7), *Dermatophagoides farinae* (%21.3) ve *Olea europaea* (%21.1)'dir [63]. Fakat alerji ile nazal polip arasında sanıldığı kadar kuvvetli bir ilişkinin olmadığını savunan araştırmalar da vardır [55, 68, 69].

**Kronik lokal enfeksiyonlar** Nazal polipozisli hastalarda, kronik burun enfeksiyonuna sık rastlanmakta olup, vakaların %50'den azında aerobik ya da anaerobik bir bakteri bulunduğu rapor edilmiştir [39, 56, 70]. Bu vakalarda en sık görülen patojenler; *β Hemolytic streptococci*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pnömoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* ve *Bacteroides fragilis*'dir [23, 43, 70]. *Staphylococcus aureus*'a ait Stafilokok enterotoksin B (SEB) ve toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1) süperantijen gibi davranarak, burun duvarında kendilerine karşı antikor oluşturacak lenfositlerin çoğalmasına neden olurlar (Şekil 2.1) [39, 71, 72]. Dolayısıyla serumda bu toksinlere karşı oluşturulan IgE antikorlarının düzeyi artar [7, 72].



**Şekil 2.1.** Nazal polip epitelinde *Staphylococcus aureus* enterotoksinlerinin boyanması [71].

Adenovirüs, Epstein-Barr virüs, Herpes simpleks ve Human papilloma virüs ile yapılan çalışmalar, virüslerin polip oluşumuna katkısının olabileceği fikrini güçlendirmektedir [39, 73, 74]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, alerjik fungal sinüzitlerle nazal polipozis arasında bir ilişki olup, polipli hastalarda özellikle *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* ve *Penicillium* sp. varlığı tespit edilmiştir [5, 75-78].

**Bronşiyal astım ve aspirin duyarlılığı** NP'li hastalarda sıklıkla aspirine (asetilsalisilik asit-ASA) karşı hassasiyet gözlenir [2, 79, 80]. Aspirin duyarlılığı olan hastalarda araşidonik asit metabolizmasındaki farklılık sonucu, aspirine karşı verilen hücresel cevap değişmektedir [71]. Aspirin alımı sonucunda, siklooksijenaz inhibe olur, araşidonik asit metabolizması değişerek, prostoglandin E2'nin azalır, lökotrien üretiminin artması sonucu aspirin duyarlılığı oluştuğu düşünülmektedir [39, 71, 81]. NP'li hastalardaki aspirin duyarlılığı prevalansı [82-84] %15-36 olarak bildirilirken, Türk toplumunda hastane temelli bir çalışmada %0.35 olarak bildirilmiştir [85]. Aynı zamanda, astım ve NP arasında da güçlü bir ilişki vardır. Özellikle astımın eşlik ettiği NP olgularında IL-5 reseptörünü kodlayan genin baskılandığı bildirilmiştir [84]. NP hastalarının 1/3'ü astımlı [86] olup, astım hastalarının ise yaklaşık %7-13'ünde polip tespit edilmiştir [55, 84]. Nazal polipozisin, aspirin (asetilsalisilik asit-ASA) duyarlılığı ve astım ile birlikte seyretmesi Samter sendromu (ASA Triadı veya ASA sensitif astım) olarak adlandırılır [2, 87, 88]. Samter sendromunda başlangıçta bu hastalar kronik sinüzitli olup, beş-on yıl içinde aspirinin tetiklediği astım gelişir ve son olarak NP ortaya çıkar [32]. Aspirin duyarlılığı olan bronşiyal astım hastalarında NP prevalansı %60'dan yüksek iken [56], aspirin duyarlılığı olmayan bronşiyal astım hastalarında NP prevalansı %7'den azdır [55].

**Mukozaal temas** Basınç polip oluşumunu uyaran faktörler arasındadır. Nazal kavitedeki basınç noktalarında mukozanın birbirine temas etmesiyle polip oluşumunun tetiklendiği gözlenmiştir [89]. Özellikle etmoid sinüs gibi zaten dar olan bölgelerdeki mukozada herhangi bir nedenle gelişen ödem arttıkça, buradaki mukozanın karşı mukozaya teması sonucunda tıkanıklık oluşur [43]. Ayrıca, oluşan mukozal hasar ile sinüs drenajı bozularak, siliyer fonksiyon engellenir ve bakteriyel invazyona ve sinüzite zemin oluşur. Sinüzit, venöz stazı ve mukozal ödemi arttırarak, dolaylı olarak polip oluşumuna neden olur [43].

**Bağ dokusu değişiklikleri** Hücre yapışması ve epitel hücrelerinin farklılaşması üzerinde, hücre-dışı matris glikoproteinlerinin, özellikle fibrinonektinin, kollajen ile birlikte etkili olduğu düşünülmektedir [41]. Mukus bezlerinin genişlemesi ve kistik değişiklikler, epitel yapıda bozulmalar ve sonrasında submukozanın çıkıntı yapmasına neden olmaktadır [41, 44].

**Genetik faktörler** Settipane ve Greisner'in [90] 1996 yılında yaptıkları çalışmada, 50 nazal polipozisli hastanın %14'ünün ailesinde birden çok bireyde nazal polip varlığının gösterilmesi, hastalığın genetik temelli olabileceği kanaatini uyandırmasına rağmen, bu konudaki çalışmalar sınırlı kalmış ve halen kesin bir kanıt tespit edilememiştir. Drake-Lee'nin [91] 1992'de yaptığı çalışmada, tek yumurta ikizlerinin %52,6'sında nazal polip olduğu bildirilmiştir. Alexiou ve arkadaşlarının [92], 100 NP'li hasta ile 102 kişiden oluşan kontrol grubunda yaptıkları çalışmada, kontrol bireylerinin aile öyküsünde NP bildirilmezken, NP'li hastaların %13.3'ünde aile öyküsünde NP varlığı bildirilmiştir. Aspirin duyarlılığı olan, astım ve nazal polipozisi olan 44 hastanın birinci dereceden yakınlarının %36'sında NP rapor edilmiştir [44]. Kistik fibrozis (KF, CF, mukovisidozis) [56, 93, 94], Kartagener sendromu (primer siliyer diskinezi, PSD) [95-97] ve Young sendromu (hipervisköz mukus sendromu) ile birlikte görülen NP'lerde genetik yatkınlıktan söz edilmektedir [98, 99]. NP birlikteliğinin genotipik ilişkisi henüz ortaya çıkarılamamış olmasına karşın, nazal polipozisli hastaların KF genotipi açısından değerlendirilmesi gereklidir [44].

## 2.4. Eşlik Eden Hastalıklar

Kistik fibrozis, otozomal resesif olarak kalıtılan bir genetik hastalıktır. Bu gibi kronik hiperplazik mukozal değişikliklere neden olan hastalıklar polip oluşumu için zemin hazırlar. KF'li hastaların %20-48'inde NP gözlenmektedir [56, 93, 94]. Kartagener sendromu, otozomal resesif geçişli genetik bir hastalık olup, sillerin hareket yeteneği az veya hiç yoktur. bu hastalarda, NP prevalansı %40'dan daha yüksek olarak saptanmıştır [95-97]. Young sendromunda, siliyer yapı normal olmasına rağmen, mukus viskozitesinin artmasıyla, polip oluşumuna zemin hazırlar [98-100]. Churg Straus sendromunda (CSS), perennial rinit benzeri bulguları olup, bu hastalarda NP prevalansı %50-69'dır [101, 102]. Allerjik olmayan eozinofilik rinit sendromu (NARES) kronik sinüzit ile karakterize olup, bu hastalarda, NP prevalansı %29 olarak rapor edilmiştir [103-105].

## 2.5. Patogenezi

Mukoza ödemi polip oluşumuna yol açan temel patolojik durumdur. Polip patogenezi açıklamaya çalışan tüm teoriler, ödemin nedenini anlamaya yöneliktir. Enfeksiyon, alerji, astım, aspirin duyarlılığı, kistik fibrozis, inflamasyon yapıcı ve tetikleyici çeşitli etkenler submukozal ödeme neden olarak polip oluşumunda rol oynamaktadır. Nazal polip oluşumunda anahtar bölge olarak kabul edilen ostiomeatal komplekste (OMK) çeşitli nedenlerle meydana gelen darlık, orta meada sekresyonların stazına neden olmaktadır (106). Gevşek endotelial birleşim yerlerinden sıvının damar dışına çıkışı, ödem oluşturur. Ödem ve inflamasyon arttıkça, orta meada da staz ve tıkanıklık artmaktadır. Bu bölgelerdeki mukozal yüzeylerin birbirine teması ile küçük epitelyum nekrozları ve epitel kayıpları oluşmaktadır. Epitel nekrozu olan sahalarda granülasyon dokuları gelişmekte; daha sonra bu dokular, çevre epiteli ile tekrar epitelyalize olmaktadır. Ancak bu epitelyasyon, ödemli dokunun etrafını çevreleyerek oluştuğu için, yer çekiminin etkisiyle lümene doğru bombeleşmektedir [107].

Etiyolojilerinde bir takım farklılıklar olmakla beraber, NP mukozanın bazı hücrelerce istilası ile birlikte salınan mediyatör ve sitokinlere bağlı olarak kronik bir inflamatuvar yanıtın gelişmesi sonucu oluşmaktadır. İnflamatuvar hücreler arasında en belirgin olanı poliplerin %80-90'ında bulunan eozinofildir [60, 80]. Nazal polipozisde, eozinofillere aynı zamanda IL-5 ve granulosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi sitokinlerin artışı da eşlik

etmektedir. Eozinofillerin infiltre ettiği NP dokusunda, nötralizan anti-IL-5 monoklonal antikörlerin eozinofillerde apoptozis ve dokudaki eozinofillerde azalmaya yol açmasından da anlaşılabilir gibi, IL-5 burada anahtar rolü oynamaktadır [108].

Eozinofillerin yanı sıra, mast hücreleri de bu süreçte önemli rol oynamaktadır. Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ), potent bir fibrojen büyüme faktörüdür, ekstrasellüler matriks yapımını uyarır ve fibroblastlar için de bir kemoatraktandır. Ancak, IL-5 sentezini inhibe etmekte ve eozinofiller üzerinde hematopoetinlerin (IL-5, GM-CSF) yaşamını uzatıcı etkisini ortadan kaldırmaktadır [109]. Nazal polipozisli hastalarda, IL-4'ün uyarımı ile birlikte TGF- $\beta$  düzeyinde artış olmaktadır. Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  ise, fibroblastların proliferasyonuna ve yoğun stromal oluşuma öncülük etmektedir. Bu hastalarda tanımlanan inflamasyonun özgül olmayan belirleyicileri arasında ise IL-6, IL-8 ve IL-11 sayılabilmektedir [110, 111].

Nazal polipozisteki epitel hücreleri çeşitli inflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri üretmektedirler ki bu sitokin ve büyüme faktörleri; IL-5, IL-8, GM-CSF, IL-6, IL-1 $\beta$ , tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), Regulated upon activation T cell expressed and recreated (RANTES) ve eotaksin'dir. Bu sitokinler, inflamasyon bölgesine periferik dolaşımdan eozinofil ve lenfositleri toplayabilmekte, hücre aktivasyonunu sağlamak ve hücrelerin yaşam sürelerini uzatmakta, dolayısıyla lokal inflamasyonun gelişimine katkı sağlamaktadır [60, 79, 112].

Nazal polipozisteki eozinofiller, majör bazik protein, eozinofil peroksidaz ve sisteinil LT'ler gibi inflamatuvar mediyatörlerin güçlü bir kaynağını oluşturmaktadır [113, 114]. Bu mediyatörler, damar geçirgenliğini ve plazma eksüdasyonunu uyarıcı etkiyle inflamatuvar süreci başlatmaktadır. Ayrıca, eozinofil sayısının ve TNF- $\beta$ , makrofaj inflamatuvar protein-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 ve TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (esas olarak TGF- $\beta$ 1) ifadesinin normal nazal mukozaya kıyasla NP'de arttığı bulunmuştur ve solunum yolu "remodeling"inde bu sitokinlerin rolleri olduğu varsayılmaktadır. TGF- $\beta$ , epitel hücreleri ve fibroblastlardaki değişime ve VEGF'ün yapımına öncülük ederek, NP patogeneze katkı sağlamaktadır. Bundan başka, IL-4'e cevap olarak, TGF- $\beta$  geninin transkripsiyonu artmaktadır ki bu da stromadaki proliferasyon ve NP oluşumundan Th2 aracılı mekanizmanın sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Nazal polipoziste eozinofillerin %30'u GM-CSF mRNA taşımaktadır ve GM-CSF'yi ifade eden

hücrelerin sayısı, epidermal büyüme faktörü-2 (EGF2) ve IL-3 mRNA taşınmasıyla uyumludur. IL-4, nazal mukozada damarlarında damar hücresi yapışma molekülü (VCAM-1) ifadesini arttırarak eozinofil akışının artışında önemli rol oynar [41, 113].

Nazal poliplerde mast hücrelerinin VEGF ve temel fibroblast büyüme faktörünün esas kaynağı olduğu düşünülmektedir. Vasküler endotel büyüme faktörünün bir diğer önemli kaynağı ise fibroblastlardır. Bu iki büyüme faktörü, damar sayılarını arttırarak ve fibroblast proliferasyonunu indükleyerek nazal polip patogenezine katkı sağlayabilmektedirler [54, 115]. Yapılan çalışmalarda, intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), E-selektin ve P-selektin gibi yapışma moleküllerinin NP endotelinde ifade edildiğini, oysa normal endotelde VCAM-1 ifadesinin zayıf olduğu ya da hiç olmadığı gösterilmiştir [113, 116, 117]. Bazı çalışmalar, NP'in yüksek düzeylerde öncelikle eozinofil kemoatraktanları olarak bilinen RANTES ve eotaksini eksprese ettiğini göstermiştir [117, 118]. Nazal poliposis epitel hücrelerinde ifade edilmekte olan VEGF gibi büyüme faktörleri TGF- $\beta$ 1 ile kontrol edilmektedir [119, 120].

Potent fibrojenik bir sitokin olan TGF- $\beta$ 1, ekstrasellüler matriks oluşumunu uyarmakta ve fibroblastlar için kemoatraktan olarak rol oynamaktadır. Ancak TGF- $\beta$ 1, IL-5 sentezini inhibe etmektedir ve hematoproteinlerin (IL-5 ve GM-CSF) eozinofillerin yaşam süresini uzatma etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Nazal polip dokusunun boyanması sonucunda, TGF- $\beta$ 1'in esas olarak ekstrasellüler matrikse bağlandığı ve burada latent, inaktif formda bulunduğu gösterilmiştir. Bir diğer büyüme faktörü olan EGF reseptörleri de, NP epitelyum hücrelerinde ifade edilmektedir. Nazal fibroblastlar, RANTES, majör katyonik protein-1 (MCP-1) ve GM-CSF gibi mediyatörleri sentezlemekte ve eozinofillerle etkileşimi olan kemokinler için de zengin bir kaynak oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, solunum yolu hastalıklarının patogenezinde nazal fibroblastlar ve üretmiş oldukları mediyatörler de önem arz etmektedirler [117-120].

TNF- $\alpha$ , epitel hücrelerde kodlanan *MUC5AC* geninin ifadesini artırır. Bu durum burun epitelinde mukus sekresyonunu artırır ve goblet hücrelerinde hiperplaziye neden olarak, NP oluşumuna katkı yapar [44]. Gosepath ve arkadaşlarının [121] çalışması, NP'de araşidonik asit metabolizmasının ve siklooksijenaz (*COX-2*) geni mRNA ifade seviyesinin arttığını bildirmiştir. Nazal poliposis patogenezinde oksidatif stresin önemli olabileceği de bildirilmiştir [44]. Doku ve kandaki antioksidan maddeler azalırken, peroksidasyon ürünü

olan oksidatif maddelerin artmasıyla polip oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Ayrıca NP’te nitrik oksit (NO) sentezinin arttığı tespit edilmiştir [122].

## **2.6. Histopatolojisi**

Normal mukoza ile nazal polip mukozası arasında ödem, eozinofili, epitelyal büyümedeki artış ve yeni bez oluşumu açısından farklılıklar vardır [123, 124]. Nazal polipozisde inflamatuvar hücre infiltrasyonu çok belirgin olup, lenfositler, eozinofiller, plazma hücreleri, makrofajlar, mukozal ve bağ dokusu mast hücreleri bolca bulunur. Polip stromasındaki ödemden, kan damarlarındaki endotel bağlantılarının açık olması ve plazma kaçağının artması sorumludur [125]. Polip mukozası, kalınlaşmış bazal membran üzerinde, yalancı çok katlı (psödostratifiye), siliyalı, kolumnar, silindirik epitelle çevrili olup, epitelyal hücre proliferasyonu artmış, stroma ödemli, subepitelyal bölgede eozinofilik inflamasyon, sekretuar hiperplazi belirgindir [123, 124]. Nazal polipozisde, goblet hücre sayısı artmış olup, goblet hücrelerinin polip içindeki yeri ve sayısı çok değişkenlik gösterir [60, 90].

## **2.7. Klinik Bulgular ve Tanısı**

Çoğu NP hastası asemptomatik olsa da, burun tıkanıklığı esas şikâyet olup, bununla birlikte burun tıkanıklığı, burun akıntısı, koku ve tat alma bozukluğu, konuşma bozukluğu, baş ağrısı gibi yakınmalar da mevcuttur [111]. NP’li hastalarda burun tıkanıklığının sonucu olarak ortaya çıkan ağız kokusu, uyku apnesi, uyku bozukluğu, yorgunluk gibi nedenlerden yaşam kalitesi belirgin şekilde düşmüştür [56, 111].

Tanıda ilk aşama hastalık öyküsünün alınmasıdır. Nazal polipozisli hastaların öyküsü alınırken, yakınmaların yanı sıra, buna eşlik edebilecek hastalıklar olan bronşiyal astım ve aspirin duyarlılığı sorgulanmalıdır [36]. Tanıda önemli olan ikinci aşama ise kulak burun boğaz muayenesi sırasında rinoskopi ile burun içindeki poliplerin görülmesidir [126]. Hastalık öyküsü, fiziki ve endoskopik muayene, laboratuvar ve radyoloji (BT, MRG) sonuçları, alerji (cilt testleri, spesifik IgE, nazal sitoloji v.s.) ve histopatolojik değerlendirme tanı konmasında önemlidir [56]. Sadece yaygın mukozal ödemden tek bir kitleye veya tüm paranasal sinüsleri dolduran yaygın polipozise kadar uzanan geniş bir klinik görünüme sahiptir. Bazen, polipler tüm burun boşluğunu doldurarak dışarı çıkabilmektedir. Anterior



rinoskopide polipler, ağrısız, düzgün yüzeyle, gri, parlak, yumuşak, mobil, jelatinöz, saplı veya sapsız üzüm salkımı şeklinde ödemli kitleler görünümündeyken, nazal mukoza ve konkalar soluk, konjeste olarak izlenmektedir [127]. Ayrıca nazal endoskopik muayene, nazal polipozisin tanısı, tedavisi ve postoperatif takibinde önemli bir unsurdur. Polip boyutlarının küçük ve hastaların asemptomatik olmaları nedeniyle, çok sayıda tanı konulamayan nazal polipozis vakaları vardır. Endoskopik muayenenin rutine girmesiyle, tanı konulamayan bu vakaların sayısı azaltılmıştır [111].

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) pahalı bir yöntem olup, mukus ve polip ayırıcı tanısında oldukça etkin bir tekniktir [62]. Paranasal sinüs bilgisayarlı tomografisi (PNS BT) ile yapılan inceleme NP değerlendirmesinde altın standart niteliğinde bir yöntemdir [128, 129]. Nazal polipozin dünyada kabul gören bir sınıflandırılması mevcut değildir. Hastalığın tedavi öncesi ve sonrası seyrinin değerlendirilebilmesi ve standardizasyon sağlanması için, Lund ve Mackay [130] tarafından geliştirilen radyolojik evreleme sistemi ve Lidtholdt ve arkadaşlarının [131] tanımladıkları 0-3 skalası (polipleri endoskopik görünümü) yaygın kullanıma sahiptir.

## **2.8. Tedavi Yaklaşımları**

Nazal polipozisin tedavisi hâlâ tartışmalı olup, zor ve hayal kırıklığına neden olabilen bir süreçtir. Bu hastalığın etiolojisi tam olarak anlaşılamadığından, tedavi için bir algoritma geliştirilememiş ve hastalığın tekrarlama oranı (%29-53) önlenememiştir [67, 132]. Geniş tedavi seçenekleri kapsamında, tıbbi ve cerrahi yöntemler yer almaktadır. Tedavide temel amaç, poliplerin temizlenmesi veya küçültülmesi, nazal havalanmanın ve sinüs ventilasyonunun yeniden sağlanması, poliple birlikte görülen rinit semptomlarının düzeltilmesi, koku almanın sağlanması ve nüksün önlenmesidir. Medikal ve cerrahi tedavi tek başına uygulanabildiği gibi, kombine de uygulanabilmektedir [67, 127, 132].

Medikal tedavide en sık olarak kullanılan ilaçlar steroidler olup, lokal ya da sistemik olarak uygulanmaktadırlar [96, 131]. Uzun dönem sistemik steroid uygulaması ve nükslerin görülmesi bu tedavinin önemli dezavantajlarıdır. “Medikal polipektomi” de denilen bu tedavi yaklaşımı, topikal etkili steroidler kadar güvenli değildir [127]. Alerjik rinosinüzitle birlikte olan nazal poliplerde eozinofil kemoatraktanlarının üretimini baskılayan feksofenadin,

antilökotrienler, eozinofillerin ve mast hücrelerinin aktivasyonunu önleyen desloratadin gibi antihistaminikler, antioksidanlar, makrolid antibiyotikler, antifungal ilaçlar kullanılmaktadır [127].

Medikal tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda, cerrahi tedavi uygulanır [132]. Ancak hastalığın %49 oranında tekrar etmesi, tedavide sadece polipektomi uygulamasının yeterli olmadığını göstermektedir [79]. Sinüslerin drenajını ve ventilasyonunu sağlamak, konjesyon, ödem ve mukoza defektlerini gidermek amacıyla etmoidektomi ve endoskopik sinüs cerrahisi (ESC) uygulanmaktadır [43, 51]. ESC’de iki teknik uygulanmakta olup, ESC uygulanamayan hastalarda, lokal anestezi altında mikrodebrider ile nazal polipektomi de uygulanabilmektedir [43, 125].

## 2.9. Önceki Çalışmalar

Moloney ve Olivier [133], *HLA-A1* (İnsan lökosit antijeni A1) ve B8 doku antijeni ile şiddetli NP ve astım arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Luxenberger ve arkadaşlarının [134] yaptıkları çalışmada ise daha seyrek bir fenotip olan HLA-A74 ile NP arasında bir ilişki tespit edilmiştir. Schubert ve arkadaşları [135], HLA-DQB1\*03’ün alerjik fungal sinüzit için bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir.

Ni ve arkadaşları [136], tekrarlayan nazal polipozisli hastalardan aldıkları polip dokusundan elde ettikleri mRNA’yı RT-PZR ile çoğaltmışlar ve elde edilen ürünleri fragmanlara ayırdıklarında, bunlardan birinin 8. kromozomun uzun kolundaki bir bölgeye homoloji gösterdiğini saptamışlardır. Nazal poliplerin %50’sinde *p53*’ün (onkoprotein) ifade düzeyinin arttığı gösterilmiştir [44]. Erbek ve arkadaşları [6], *IL-1α* (4845 GT ve 4845 TT), *IL-1β* (-511 CC) ve *TNF-α* (-238 AA ve -308 GA) gibi pro-inflamatuvar sitokin genlerinde var olan bazı polimorfizmlerin NP oluşumunda risk faktörü olduğunu göstermiştir.

Fritz ve arkadaşları [27], nazal polipozisli ve polipsiz hastalardan alınan doku örneklerinde farklı seviyede ifade olan 34 gen tespit etmişlerdir. *Mamoglobin 1*, *Triptaz 1 beta*, *Prostaglandin D2 sentaz*, *IL-1β* genlerinin nazal polipozisli hastalardaki ifade düzeylerinin belirgin olarak arttığını gözlemlemiş ve ayrıca mamoglobin geninin haritasını (11q12.3-13.1.3) çıkarmışlardır.

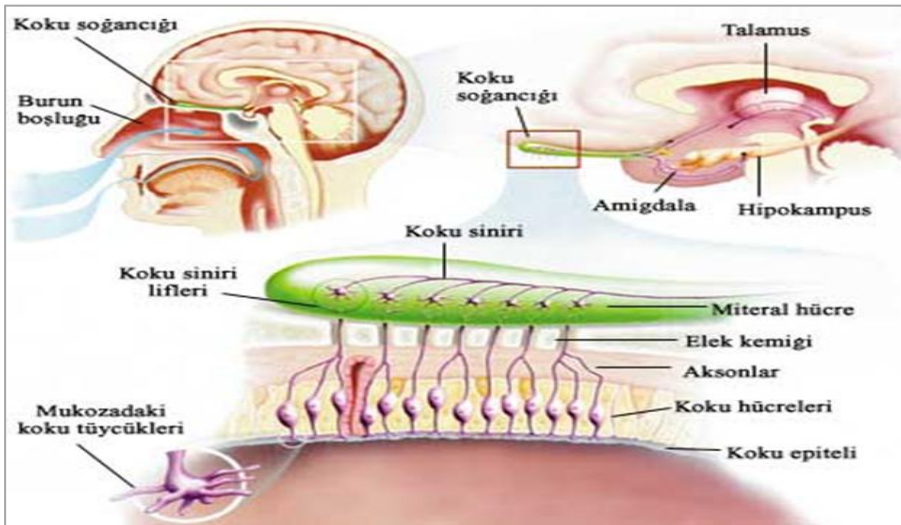
Lu ve arkadaşları [33] kronik rinosinüzitli nazal polipozisli hastalarda kronik rinosinüzitli polipsiz hastalara kıyasla *RYD5 (SCGB1C1)* geninin ifade düzeyinin arttığını, *SCGB3A2 (UGRP1)* geninin ifade düzeyinin ise azaldığını bildirmişlerdir.

Liu ve arkadaşları [28], nazal polipozisli hastalardan alınan doku örneklerini RT-PZR ve “DNA mikrodizin” tekniği ile taramış ve 10.500 genden ifadesi artan ve azalan genleri rapor etmişlerdir. *Statherin* (48 kat), *Prolaktin-indükleyen protein (PIP)* (24.9 kat), *Malign beyin tümörü İdelesyonu (DMBT1)* (30.3 kat), *Laktoferrin* (26.6 kat) genlerinin ifadesi artarken, Klara hücre 10-kd proteinini (CC10) kodlayan genin ifadesinin ise -20.1 kat azaldığı bildirilmiştir.

### 3. *RYD5 (SCGB1C1)* GENİ

#### 3.1. Koku Alma

Olfaktör sistem, memeli filogenesindeki en eski duylardan birisidir. Kokular olfaktör bölgeye solunum havasıyla taşınan uçucu kimyasal maddelerdir. Olfaktör bölge nazal septumun üst kısmını, kribriiform plağı ve üst konkayı içeren bir bölgede yer almaktadır. Bu bölge 2-3 cm<sup>2</sup> genişliğinde olup, 50 milyon primer duyu hücrelerini barındırmaktadır. Olfaktör epitelyum 60 mikron kalınlığında bir mukus ile örtülüdür. Duyu hücrelerinden aşağı doğru uzanan siller bu örtü içerisinde yer almaktadır. Yağ açısından zengin bu mukus örtüsü, olfaktör epitelyumu içerisinde yer alan Bowman bezleri tarafından salgılanmaktadır. Uçucu moleküllerden yalnızca bu mukus örtüsü içinde eriyebilenler olfaktör epiteliyle ilişkiye girmekte ve beynimize koku şeklinde tanınan sinyallerin iletilmesinde mukustaki yağlar yardımcı olmaktadır. Olfaktör duyu hücreleri bir yüzeyleri ile atmosferdeki koku molekülleriyle temas halindeyken, diğer taraflarında 10-100'lük gruplar halinde toplanan nöronlar, aksonal bileşimleri oluşturarak, kribriiform plaktan çıkarlar. Olfaktör bulbusa ulaşan bu aksonlar, burada post sinaptik hücrelerde sonlanarak, glomerul yapıları oluştururlar. Bu glomeruller mitral hücrelerde birleşir. Koku sinyali mitral hücrelerden beynin kortikoamigdal bölgesindeki üst santral sinir sistemi bölgelerine olfaktör sinir aracılığıyla iletilmektedir (Şekil 3.1) [39].



Şekil 3.1. Olfaktör bölge [39].

### 3.2. Sekretoglobınler (SCGBs)

Sekretoglobın süperailisi (SCGB), memeliler ve keselilerde salgılanan bir protein grubudur. Grubun tanımlanmış ilk proteini tavşanlarda bulunmuş ve blastokinin olarak adlandırılmıştır [137]. Bu isim daha sonra uteroglobın (UG, SCGB1A1) olarak değiştirilmiş ve en sonunda tüm aile üyelerinin ortak ismi olarak sekretoglobın ismi kullanılmaya başlanmıştır. Bu ismin başındaki “sekreto” öneki bunların salgı proteini olduğunu belirtir. Bu grubun işlevleri büyük ölçüde belirlenemediği için, “globin” son eki eklenmiştir [138].

Sekretoglobınler, uterus, prostat, pulmoner, gözyaşı ve tükürük bezi salgılarında yüksek oranda bulunur. Aynı doku içinde, birden fazla çeşitte *SCGB* geni ifade olduğu sıkça görülür [29, 33]. Sekretoglobınlerin bilinen görevleri, akciğeri koruma ve onarma, immuno-modülasyon ve kemirgenlerde eş seçimidir. SCGB’ler, biyolojik olarak aktif, anti-inflamatuvar ve immuno-modülatör fonksiyona sahip bir protein süperailisidir [10, 26, 28, 29, 33]. Sekretoglobınleri kodlayan genlerin ifadesi sitokinler tarafından düzenlenmekte olup, fizyolojik ve patofizyolojik öneminin artmasıyla ilgi odağı olmuştur [33].

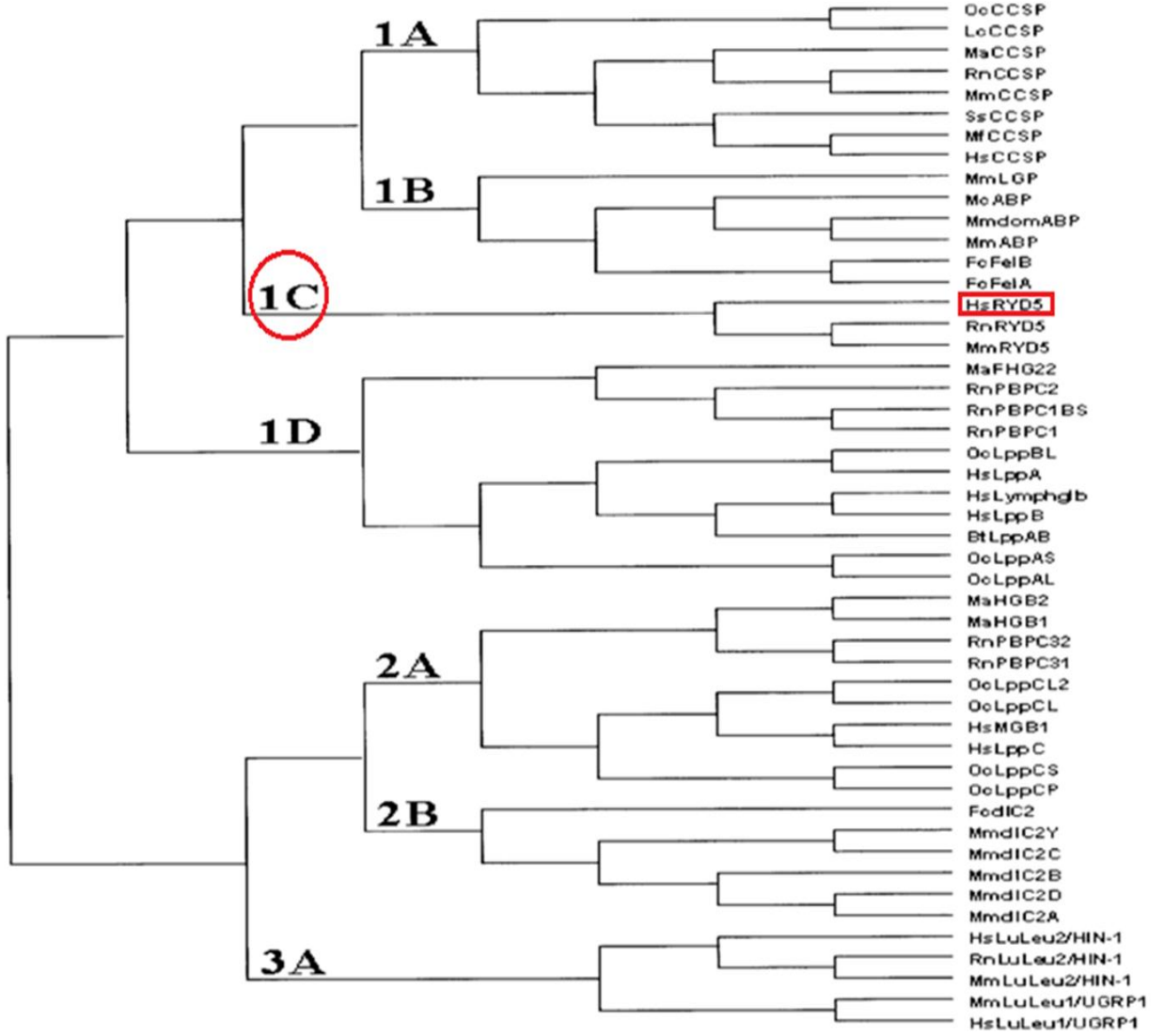
SCGB’ler sekresyondan önce dimerize olan, küçük proteinler olup, (insanda ~10 kDa) dimerik yapı proteaz, ısı ve pH’ya dayanıklıdır [139, 140]. SCGB üyeleri diğer salgı proteinlerinde olduğu gibi sinyal peptide sahiptir. Tavşan ve şıçan uteroglobın, şıçan klara hücre spesifik proteini içeren sekretoglobınlerin üç boyutlu yapısı ortaya çıkarılmıştır [141]. Bu proteinler antiparalel tarzda dört tane  $\alpha$ -helikal yapı içerir ve bu yapı kovalent disülfid bağları ve non-kovalent etkileşimler tarafından bir arada tutulur [142]. Uteroglobın süperailenin prototipik bir üyesi olup, protein dimerinin iki alt birimi arasında, hidrofobik bir kavite bulunur. Bu kavitede 6 tane (Phe6, Leu13, Tyr21, Phe28, Met41 ve Ile63) hidrofobik amino asit yer almaktadır. Bunlardan Phe28 hariç diğerlerine çeşitli ligandlar bağlanabilir. Aromatik amino asitler olan, Phe6 ve Tyr21 bağlanmalar için kritik öneme sahiptir ve alifatik amino asitlerle değiştirilemez [143]. Bu hidrofobik kavitenin ligandları arasında steroid hormonlar, poliklorlu bifenil metabolitler, retinoidler ve değişik eikozonoid mediyatörler bulunur [144, 145].

### 3.3. Sekretoglobinin Sınıflandırılması

Bu süperailenin tüm üyeleri 2000 yılında sekretoglobininler olarak adlandırılmış ve alt ailelere ayrılmıştır [29, 138]. Sekretoglobinin korunmuş sistein sayısına ve pozisyonuna göre gruplandırılır. SCGB1A1 (UG)'de iki korunmuş sistein bulunur ve bunlar +3 ve +69 pozisyonundadır [8]. SCGB1D1 (lipofilin A), SCGB1D2 (lipofilin B), SCGB2A2 (MGB2) ve SCGB2A1 (MGB1)'de bulunan bu iki sisteine ek olarak, +44 pozisyonunda bir sistein daha vardır [8]. Buna karşın, SCGB1C1 (RYD5), SCGB3A2 (UGRP1) ve SCGB3A1 (UGRP2) proteinlerinin merkezinde sadece bir sistein bulunur [8]. SCGB1D4 (IIS), iki sistein içeren şimdiye kadar tanımlanan tek sekretoglobinin üyesi olup, bu sistein amino asitlerinden birincisi molekülün N-terminalinde +3, ikincisi C terminalin merkezinde +44 pozisyonundadır (Şekil 3.2) [8]. İnsan genomunda onbir adet sekretoglobinin geni ve beş adet psödogeni bulunur [29, 32]. İnsan ve sıçan *SCGB* geninin filogenetik ağacı Şekil 3.3'de ve kromozom lokalizasyonları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir [8, 29, 146].

| Adı       | Sinyal peptid          | Olgun peptid<br>+1   |
|-----------|------------------------|--|
| IIS       | MRLSVCLLMVSLALCCYQAHA  | --LVCPAVAS---EITVFLFLSDAA-----VNLQVAKLNP--PPEALAAKLEVKKCTDQISFKKRLSLKKSWWK               |
| UG        | MKLAVTLTLVTLALCCSSASA  | --ETCPSFQR---VIETLLMDTPSS-----YEAAMELFSP--DQDMREAGAQLKLVDTLPQKPRESIKLMKIAQSSICN          |
| YGB       | MRLSVCLLMVSLALCCYQAHA  | --LVCPAVAS---EITVFLFLSDAA-----VNLQVAKLNP--PPEALAAKLEVKKCTDQISFKKRLSLEKVLVEIVKK--CGV      |
| LIP-A     | MRLSVCLLLLTLALCCYRANA  | --VVCQALGS---EITGFLLAGKPV-----FKFLAKFKA--PLEVAAMKMEVKKCTDTMAYEKRVLTITKLGKIAEK--CDR       |
| LIP-B     | MKLSVCLLTLVTLALCCYQANA | --EPCPALVS---ELLDFFFISEPL-----FKLSLAKFDA--PPEVAAKLGVKRCCTDQMSLQKRSLIAEVLVKILKK--CSV      |
| MGB1      | MKLLMVLMLAALSQHCYAGSG  | ---CPLEEN---VISKTINPQVSKTE-----YKELLQEFID--DNATTNAIDELKECFIQAQTDETLSNVEVFMQLIYDSSICDLF   |
| MGB2      | MKLLMVLMLAALLLHCYADSG  | ---CKLEED---MVEKTINSDISIPE-----YKELLQEFID--SDAAAEMGKFKCCFLAQSHRTLKNFGLMMHTVYDSSICMKSXN   |
| RYD5      | MKGRALLLVALTLFCICRMATG | -EDNDEFFMD---FLQTLVGTPEEL-----YEGTLGKYNV--NEDAKAAMTELKSCRDGLQPMHKAELVLLVQVLGSDQGA        |
| UGRP1     | MKLVTIFLLVTISLC        | SYSATAFLIN---KVPLPVDKLAFLP-----LDNLPFMDPLKLLKLTGIVSVEHLVEGLRHC/NELGPEASEAVKLLLEALSHLV    |
| UGRP2     | MKLAALLGLCVALSASSA     | ---AFLVGSAPVAPVAALESAAEAGAGTLANPLGTINPLKLLSSLGIPVNHLEIGSQKCVLAEIQLGQAVGAVKALKALLGALTVPFG |
| consensus |                        | ---CPALAS---EITVFLFASDSA-----YKLLQAKFNP--PPEVAAMKLEVKKCTDQLSPEKRLSVKLLVKIADS--CG---      |

Şekil 3.2. Sekretoglobininlerin sınıflandırılması [8].



Şekil 3.3. İnsan ve sıçan sekretoglobinlerin filogenetik ağacı (h, insan; m, sıçan) [29].

**Çizelge 3.1.** SCGB genlerinin kromozomal lokalizasyonları [29].

| Gen Sembolü     | İnsan Kromozomundaki Lokalizasyonu | Sinonim  | Sıçan Homoloğu    | Sıçan Kromozomundaki Lokalizasyonu |
|-----------------|------------------------------------|--|-------------------|------------------------------------|
| <i>SCGB1A1</i>  | 11q11-qter                         | <i>UGB, blastokinin, CC10, CC16, CCSP, CCPBP, UPI</i>      | SCGB1A1           | 19                                 |
| <i>SCGB1B1P</i> | 19                                 | <i>Abpa1P</i>  | SCGB1B alt ailesi | 7                                  |
| <i>SCGB1B2P</i> | 19                                 | <i>SCGB4A1P</i>  |                   |                                    |
| <i>SCGB1B3</i>  | 19                                 | <i>SCGB4A4</i>   |                   |                                    |
| <i>SCGB1C1</i>  | 11q15. 5                           | <i>RYD5</i>  | SCGB1C1           | 7                                  |
| <i>SCGB1D1</i>  | 11q13                              | <i>Lipofilin A</i>   |                   |                                    |
| <i>SCGB1D5P</i> | 4q32. 3                            | <i>SCGB1D1P1</i>   |                   |                                    |
| <i>SCGB1D2</i>  | 11q13                              | <i>Lipofilin B</i>   |                   |                                    |
| <i>SCGB1D4</i>  | 11q12. 3                           | <i>IFN-<math>\gamma</math> ind. SCGB</i>                   |                   |                                    |
| <i>SCGB2A1</i>  | 11q13                              | <i>Lipofilin C, MGB2, mammoglobin B, UGB3, lakriglobin</i> |                   |                                    |
| <i>SCGB2A2</i>  | 11q13                              | <i>MGB1, mammoglobin A, UGB2</i>                           |                   |                                    |
| <i>SCGB2B1P</i> | 19                                 | <i>Abpbg1P</i>   | SCGB2B            |                                    |
| <i>SCGB2B2</i>  | 19                                 | <i>SCGB4A2, SCGBL</i>                                      |                   |                                    |
| <i>SCGB2B3P</i> | 19                                 | <i>SCGB4A3P, HIN-1, pnömo</i>                              |                   |                                    |
| <i>SCGB3A1</i>  | 5q35-qter                          | <i>PnSP-2, UGRP-2</i>                                      | SCGB3A1           |                                    |
| <i>SCGB3A2</i>  | 5q32                               | <i>PnSP-1, UGRP-1</i>                                      | SCGB3A2           |                                    |



SCGB1A1 alt ailesi, SCGB1A1 (UGB) proteinini içerir. Blastokin ve klara hücre spesifik proteini olarak da bilinen uteroglobin, tavşan uterusunda keşfedilmiş olup, en bol bulunan proteinlerdendir [147]. Aynı zamanda uterus endometriyum ve prostatta da ifade edilir [148]. Solunum yolunda klara hücrelerinde ifade olan bu protein, yaralanma sonrası doku onarımı ve hücre infiltrasyonu yoluyla immuno-modülasyonda rol alır [148]. *SCGB1A1* genin, tümör süpresör özelliği vardır [148, 149]. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, *SCGB1A1* genin susturulması fetal tümörlerin gelişmesine neden olmuştur [150]. Enfeksiyona yanıt olarak, *SCGB1A1* genin ifadesi azalmaktadır [151]. SCGB1A1'in akciğer patolojilerinin tespitinde erken biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [32, 148].

SCGB1C1 alt ailesi, SCGB1C1 (ligand-binding protein RYD5)'yi içerir. Bu alt ailenin üyesi olan RYD5 proteini olfaktör mukozasında bulunan Bowman bezinden salgılanır [35]. Yapılan bir çalışmada, kronik rinosinüzitli NP'siz hastalara kıyasla kronik rinosinüzitli NP'li hastalarda *RYD5* geninin ifade düzeyinde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir [33].

SCGB1D alt ailesi, SCGB1D1 (lipofilin A) ve SCGB1D2 (lipofilin B)'yi içermektedir. Bu alt aileye ait proteinler sıçanların prostatik salgısında, insan ve tavşanın göz yaşında tanımlanmıştır [152]. *SCGB1D4* genellikle lenf düğümlerinde, bademcikte, lenfoblastlarda ve yumurtalıkta ifade olur. Lenfoblast hücrelerinde interferon gama *SCGB1D4*'in ifadesini uyarır. Kemotaktik migrasyon ve invazyonu içeren immunolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol alır [8]. "Kuru göz" hastalarının gözyaşı bezi salgısının proteomik analizi sonucunda, *SCGB1D1*, *SCGB1D2* ve *SCGB2A1* genlerinin ifadesinin azaldığı saptanmıştır. Bu ifade azalmasının, post-translasyonel modifikasyonlarla açıklanabileceği bildirilmiştir [153]. Meme kanserinde SCGB1D2'yi kodlayan genin ifadesinin yüksek olduğu ve geninin bu tip kanserlerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [154]. Hipofiz adenomunda *SCGB1D2* genin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir [155].

SCGB2A alt ailesi, SCGB2A1 (lipofilin C, mammaglobin B) ve SCGB2A2 (mammaglobin A)'yi içermekte olup, büyük oranda meme epitelinde ifade edilirler [156]. Ayrıca yumurtalık ve endometrium kanserlerinde hastalığın takibinde SCGB2A1'in biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [157, 158]. Meme epitel dokusunda salgılanan SCGB2A2'in, meme kanserinin sentinal lenf nodu ve uzak doku metastazlarının belirlenmesinde önemli olabileceği bildirilmiştir [159-161].

SCGB3A alt ailesine ait, SCGB3A1 (UGRP-2) ve SCGB3A2 (UGRP-1) ilk olarak 2002 yılında tanımlanmış ve SCGB1A1 ile yüksek oranda yapısal homolojiye sahip olduğu gösterilmiştir [162]. Akciğer, meme bezi, trake, prostat ve tükürük bezinde ifade edilirler [163]. Bronşiyal epitelde travma meydana geldiğinde *SCGB3A1* ve *SCGB3A2* genlerinin ifadesi azalır [162]. SCGB3A1 proteinini kodlayan gen bir tümör süpresör gen adayı olup, endotelial PAS domain protein 1'i kodlayan genin susturulmasından sorumludur. Akciğer, prostat, pankreas ve nazofarenks kanseri gibi bazı kanser türlerinde *SCGB3A1* genin ifadesi azalır. *SCGB3A1*'in promotor bölgesinin hipermetilasyonu ile bazı kanserler arasında ilişki olabileceği rapor edilmiştir [164]. *SCGB3A1*'in ifadesi sitokinler aracılığıyla düzenlenmektedir. IL-1 $\beta$ , IL-4 ve IL-13 *SCGB3A1* genin ifadesini artırırken, IFN-gama bu genin ifadesini azaltır ve TNF- $\alpha$  ise bu genin ifadesi üzerinde etkisizdir. Kronik rinosinüzitli nazal polipozisli hastalarda *SCGB3A1* geninin ifadesinin azaldığı saptanmıştır [33]. Retinoik asit, *SCGB3A1* genin ifadesini artırarak, bronşiyal epitel hücrelerinin farklılaşmasını uyarır [9]. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve TGF- $\alpha$  ile ilişkili olan AKT sinyal yolağında *SCGB3A1* geninin ifadesi uyarılır [165]. SCGB3A1, AKT sinyal yolağını kullanarak, hücre büyümesinde, göçünde ve invazyonunda potent inhibitör bir protein olarak çalışır [166]. *SCGB3A2* geni ifadesinin, Th1 sitokinleri tarafından uyarıldığı, pro-inflamatuvar ve Th2 sitokinleri tarafından baskılandığı gösterilmiştir. İntranazal olarak uygulanan rekombinant SCGB3A2, alerjenlerle uyarılmış akciğer inflamasyonunun baskılanmasını sağlar [167]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde *SCGB3A1* genin ifadesinin azaldığı ve bu durumun kanserin şiddetini artırdığı saptanmıştır [164, 168]. Japon toplumunda yapılan bir çalışmada, *SCGB3A2* genindeki bir polimorfizmin, artmış astım riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [9, 169]. Kronik rinosinüzitli hastaların sinonazal dokusundaki SCGB3A2'nin ifade düzeyinin hastalığın şiddetiyle ters orantılı olduğu gözlenmiştir [33].

SCGB2B alt ailesi, SCGB2B1P, SCGB2B2 ve SCGB2B3P'yi içerir [29].

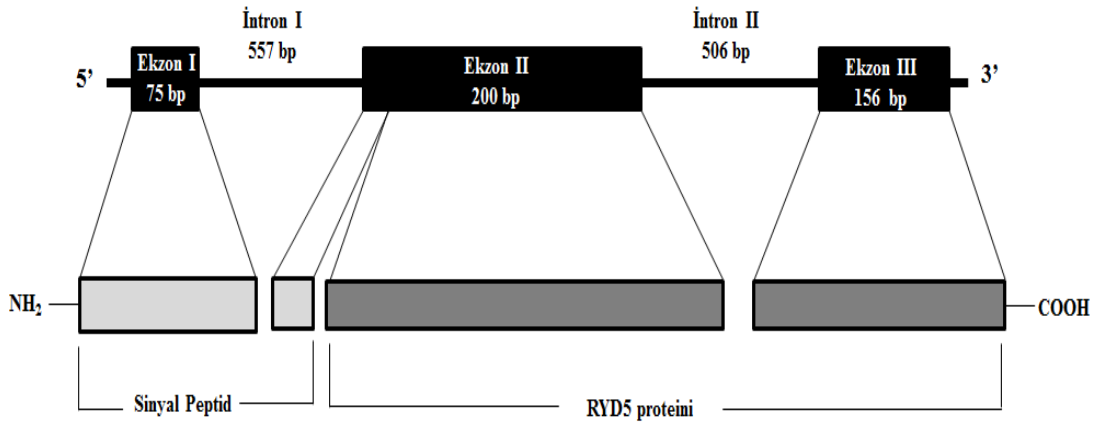
SCGB1B alt ailesi, SCGB1B1P, SCGB1B2P ve SCGB1B3'yi içermektedir [29].

SCGB'ler yüksek oranda farklı amino asit dizilerine sahip olduğu için ayrımları zordur. JackHMMER profili ile yeni keşfedilen proteinlerin SCGB ile ilişkili olup olmadığı değerlendirilmektedir. Bir yazılım programı olan "Homologene" çeşitli türler arasındaki homolog protein gruplarının analiz edilmesini sağlar. Bu programla 21 SCGB alttipi

tanımlanmıştır [170]. SCGB proteinlerinin, amino asit dizilimleri oldukça farklı olmasına rağmen, temel sarmal yapı ve dimerize olma yeteneği hepsinde korunmuştur [143, 146].

### 3.4. *RYD5* (SCGB1C1) Geni ve Fonksiyonu

*RYD5* geni, 11.kromozom (11p15.5) üzerinde lokalize olmuştur; üç ekzon ve iki intron içermekte ve bir salgı proteinini kodlamaktadır (Şekil 3.4, Şekil 3.5) [35, 171-174]. *RYD5* geni ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olup, bugüne kadar yapılan çalışmalar sonunda bulunan nükleotit değişiklikleri Çizelge 3.10'da gösterilmiştir [175]. Sekretoglobulinler SCGB1C1 alt ailesine ait olup, burun mukozasının Bowman bezi epitel hücrelerinde ifade edilir [35].



Şekil 3.4. *RYD5* geninin organizasyonu [173, 174].



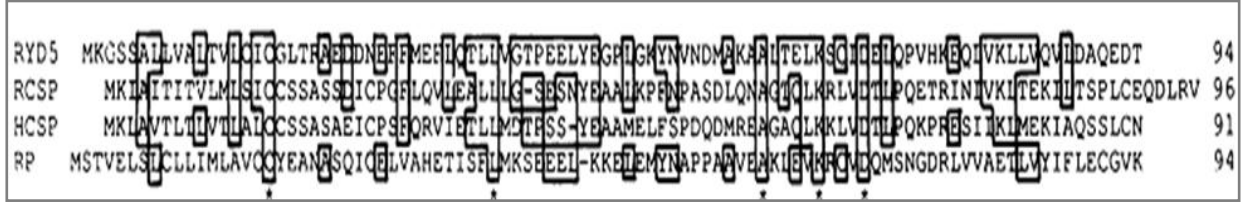
*RYD5* geni mRNA'sının translasyonu sonucu kovalent disülfid bağı ve non-kovalent etkileşimler tarafından bir arada tutulan, antiparalel tarzda dört tane  $\alpha$ -helikal yapı içeren 95 amino asitlik *RYD5* proteini oluşur (Şekil 3.7) [176, 177]. *RYD5* proteinin ortalama amino asit ağırlığı 109.622 g/mol, yükü -5.5, izoelektrik noktası 4.2950 olup, molekül ağırlığı 10,414.08 g/mol'dur [178]. *RYD5* proteini birçok salgı proteininde olduğu gibi sinyal peptide sahiptir. Bu sinyal peptid, proteinin 14 amino asitlik hidrofobik N-terminal bölgesini oluşturur. *RYD5* proteinindeki 25-93 arasındaki amino asitler, sekretogloblin süperailesinde korunmuş ortak bölge olup, bu aminoasit dizisi ailenin diğer üyelerinde de oldukça benzerdir [179]. Proteinin sinonazal mukozadaki selüler lokalizasyonu henüz açıklanmamıştır [33].



**Şekil 3.7.** *RYD5* proteininin üç boyutlu yapısı [177].

*RYD5* proteininin fonksiyonunu açıklamak için yapılan bir çalışmada, bu proteinin amino asit dizileriyle, şıçan klara hücre salgı proteininin (85 amino asitin %29.4 aynı) [180], insan klara hücre salgı proteininin (85 amino asitin %23.5 aynı) [181] ve şıçan prostatein Cl altünitesinin (82 amino asitin %28 aynı) [182] amino asit dizilerinin benzer olduğu ve bu proteinlerle homolog olduğu saptanmıştır (Şekil 3.8). Klara hücre salgı proteinleri, poliklorinat bifenil moleküllerini bağlayabilen proteinlerdir. Şıçan prostateini ise steroidleri bağlayabilme özelliğine sahiptir [37, 180]. Bu çalışma sonucunda, *RYD5* proteininin poliklorinat bifenilleri ve steroidleri bağlayabilme yeteneği olduğu saptanmıştır. Nazal mukozada bulunan Bowman bezinden mukus içine salgılanan *RYD5* proteini, koku molekülü bağlayıcı proteini (OBP) olarak çalışır. Görevi belirli bir özgülük olmaksızın poliklorinat bifenilleri, steroidleri ve lipofilik koku moleküllerini bağlayarak ve zararlı molekülleri uzaklaştırarak akciğer epitelini

korunmaktadır [37, 180]. Ayrıca RYD5 proteini mukus tabakasında aşırı birikmiş koku moleküllerini uzaklaştırılmasına ve koku reseptörlerinin yeni uyarılara açık tutulmasına da yardımcı olmaktadır [35].



**Şekil 3.8.** RYD5 proteini ile homolog farklı proteinlerin dizilerini karşılaştırılması [35]. RYD5 proteini amino asit dizisi, şıçan klara hücre salgı proteini amino asit dizisi (RCSP) [180], insan klara hücre salgı proteini amino asit dizisi (HCSP) [181] ve şıçan prostatein (RP) Cl altünitinin amino asit dizisi [182]. RYD5 ile ortak olan amino asitler kutu içine alınmıştır. Yıldız işaretli amino asitler tamamen korunmuştur.

**Çizelge 3.10.** *RYD5* geninde tanımlanmış nükleotit değişiklikleri [175].

| Nükleotit Değişikliği | SNP Profili | Gendeki Yerleşimi | Amino Asit Değişimi | Nükleotit değişikliği Tipi | Kaynaklar                      | Coğrafik Konum |
|-----------------------|-------------|-------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------|
| c.-264 A>G            | rs113795008 | 5' UTR            | -                   | Polimorfizm                | Kim ve ark., 2009 [183]        | <i>Kore</i>    |
| c.-177 C>A            | rs144170316 | 5' UTR            | -                   | Polimorfizm                | 1000 Genom Projesi, 2012 [184] | -              |
| c.-103 G>A            | rs2280540   | 5' UTR            | -                   | Polimorfizm                | Kim ve ark., 2009 [183]        | <i>Kore</i>    |
| c.-49 G>A             | rs144999256 | 5' UTR            | -                   | Polimorfizm                | 1000 Genom Projesi, 2012 [184] | -              |
| c.-35 G>A             | rs148962288 | 5' UTR            | -                   | Polimorfizm                | 1000 Genom Projesi, 2012 [184] | -              |
| c. 13 C>T             | rs7951297   | Ekzon 1           | R5C                 | Yalnız anlamlı             | Wheeler ve ark., 2008 [185]    | -              |
| c. 14 G>A             | rs200059999 | Ekzon 1           | R5H                 | Yalnız anlamlı             | 1000 Genom Projesi, 2012 [184] | -              |
| c. 47 G>A             | rs61736219  | Ekzon 1           | C16T                | Yalnız anlamlı             | CONWAY Enstitüsü, 2010 [186]   | <i>İrlanda</i> |

**Çizelge 3.10.** *RYD5* geninde tanımlanmış nükleotit değişiklikleri [175].

| Nükleotit Değişikliği | SNP Profili | Gendeki Yerleşimi | Amino Asit Değişimi | Nükleotit Değişikliği Tipi | Kaynaklar                              | Coğrafik Konum        |
|-----------------------|-------------|-------------------|---------------------|----------------------------|--|-----------------------|
| c. 57-14 C>T          | rs2294083   | Intron 1          | -                   | Polimorfizm                | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. 55+40 T>C          | rs2686896   | İntron 1          | -                   | Polimorfizm                | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. 56-14 C>T          | rs2294083   | İntron 1          | -                   | Polimorfizm                | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. 66 A>G             | rs2294082   | Ekzon 2           | -                   | Polimorfizm                | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. 207 T>C            | rs2294081   | Ekzon 2           | Y69C                | Yalnız anlamlı             | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. 209 T>G            | rs2686894   | Ekzon 2           | I70R                | Yalnız anlamlı             | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. 118 G>A            | rs74532193  | Ekzon 2           | G40R                | Yalnız anlamlı             | Drmanac ve ark., 2010 [187]            | -                     |
| c. 255+14 G>A         | rs2294080   | İntron 2          | -                   | Polimorfizm                | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. 279 C>T            | rs61997072  | Ekzon 3           | Y93D                | Yalnız anlamlı             | Kim ve ark., 2009 [183]                | <i>Kore</i>           |
| c. *30 A>C            | rs201084087 | 3' UTR            | -                   | Polimorfizm                | NHLBI Ekzon Sekans Projesi, 2013 [188] | ESP_Cohort_populasyon |



#### 4. KANTİTATİF TERS TRANSKRİPSİYON PZR

Klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizinden farklı olarak, kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (KTT-PZR) hedef nükleik asitlerin miktarı hakkında önemli veriler sağlamaktadır. KTT-PZR reaksiyon süresince oluşan ürünlerin yaydığı flöresan boyalar veya problemlerin sinyalleri sayesinde ürün miktarının monitörden izlenmesine olanak sağlar. Flöresan sinyalinin ilk önemli artışı, hedef DNA'nın başlangıçtaki miktarı ile ilişkilidir (189). Son yıllarda artan cihaz sayısı ve flöresan prob sistemi ile KTT-PZR teknolojisi de sürekli olarak yenilenmekte ve gelişmektedir. KTT-PZR moleküler genetik alanında yapılan çalışmalar başta olmak üzere:

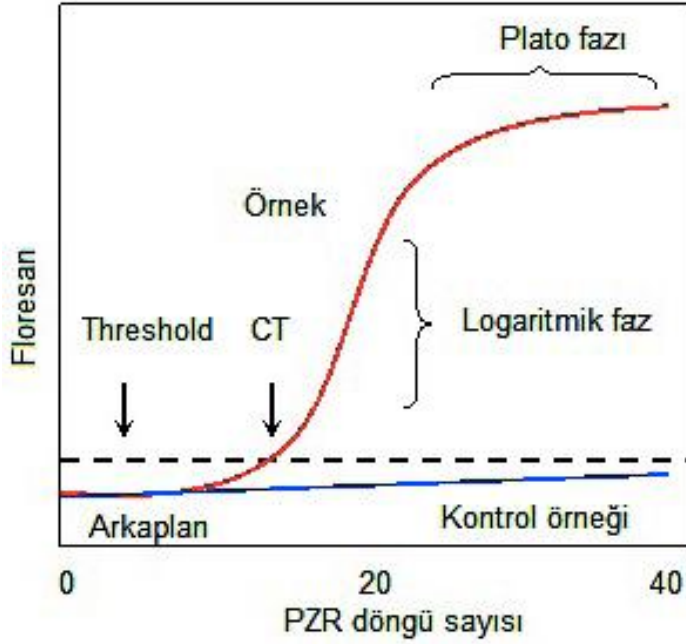
- Biyolojik materyallerden elde edilen DNA'nın kopyalarının ve mRNA'ların sayısal olarak belirlenmesinde,
- Gen ifadesinin belirlenmesinde,
- Kanser araştırmalarında ve tanısında, kanserle bağlantılı özgün gen düzeylerinin saptanmasını içeren onkolojik çalışmalarda,
- DNA hasarının belirlenmesinde,
- Metilasyon araştırmalarında,
- Tek nokta nükleotit değişikliklerinin belirlenmesinde,
- Patojen tespitinde,
- İlaç endüstrisinde,
- Genotiplemede ve adli tıpta,
- Genetiği değiştirilmiş organizmaların tanımlanmasında,

- Doğum öncesi tanı çalışmalarında,
- Kromozomlardaki sayısal-yapısal bozuklukların analizinde
- Biyoterörist saldırıların erken saptanmasında kullanılmaktadır [190-192].

KTT-PZR'da iki kantitasyon tipi vardır. Bunlar relatif (göreceli) ve absolut (mutlak) kantitasyondur. Relatif kantitasyon, hedef genin referans gene göre relatif ifadesine dayanır. En sık kullanılan referanslar sabit ifadelendiği bilinen genler (*house-keeping* genler) ve evrensel ya da yapay kontrol RNA/DNA molekülleridir. Gen ifadesindeki fizyolojik değişiklikleri araştırmak için relatif ifade oranı çoğu durum için uygundur (iç kontrol). Absolut kantitasyon, bilinen konsantrasyonda standart DNA molekülüne (rekombinant plazmid DNA'sı, genomik DNA vs.) dayanan kalibrasyon eğrileri kullanılır (dış kontrol).

KRT-PZR'ın farklı evreleri vardır (Şekil 4.1) [193]. Bu evreler:

- Ürünün oluştuğu ancak flöresan arka plan seviyesinin altında kaldığı başlangıç fazı;
- Ürünün üssel birikimiyle flöresans arkaplan seviyesinin üzerine çıktığı ve flöresan miktarının amplifiye olan ürün miktarıyla doğru orantılı olarak yükseldiği logaritmik faz;
- DNA veya flöresan miktarında reaksiyon bileşenlerinin (primer, taq polimeraz vs. ) tükenmesinden dolayı anlamlı artışın olmadığı plato fazıdır [194].



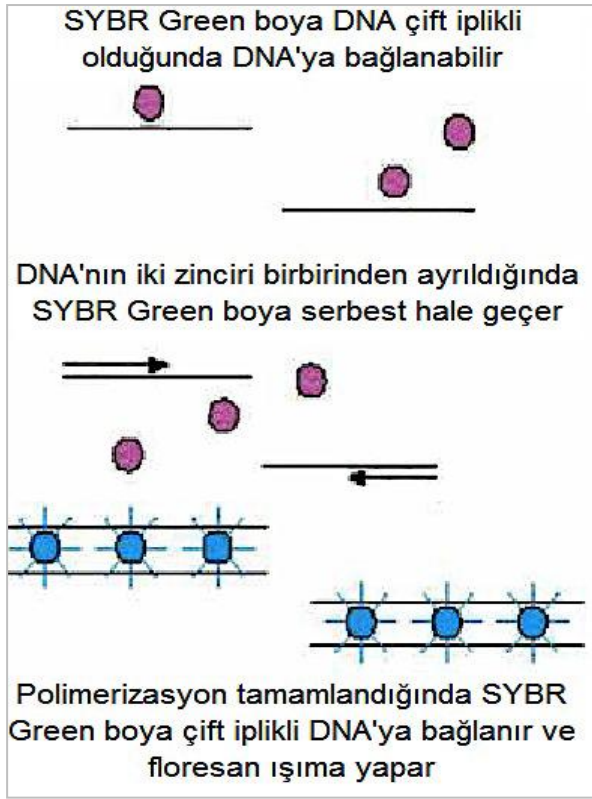
**Şekil 4.1.** KTT-PZR cevap eğrisi [193]. Arkaplanın üzerinde bir eşik seviyesi ve eşike ulaşmak için gereken döngülerin sayıları gösterilmiştir

KTT-PZR ürünündeki ilk anlamlı artışın olduğu nokta eşik-değer döngü (Threshold Cycle= CT) olarak adlandırılır ve istatistiksel olarak arka plan flöresanının önemli ölçüde üstünde flöresan oluşan noktadır [193]. Kantifikasyonda önemli bir parametre olan CT, üssel fazda tespit edilir. Amplifikasyon logaritmik çizildiğinde lineer kısmın ortasına denk gelir. Arka plan flöresanın biriktiği ancak cihazın tespit edebileceği değerin altında kaldığı PZR döngülerinin olduğu kısımdır. “Threshold” eşik değeridir ve eşik değeri üzerindeki sinyaller bir örnek için eşik değeri döngüsü üzerinde düşünülen gerçek sinyaller olarak ifade edilir.

Yöntemin hassasiyeti, amplifikasyon reaksiyonunu oluşturmak ve izlemek için kullanılan kimyasal yöntemlere ve oluşan sinyali gözlemlemek için kullanılan cihaza bağlıdır. Ticari olarak sayısı artan cihazların arasındaki temel fark “eksitasyon” ve “emisyon” dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir [195]. Bu amaç için geliştirilmiş pek çok kimyasal vardır: İnterkalatör boyalar (etidyum bromür, SYBR Green I), hidroliz problemleri (TaqMan Prob), hibridizasyon problemleri (FRET problemleri, moleküler fenerler, scorpions vb.).

#### 4.1. İnterkalatör Boya Metodu

Etidiyum bromüre göre daha az toksik, daha spesifik, ve daha duyarlı flöresan bir dsDNA interkalatör ajanı olan SYBR Green I boyası ilk olarak etidiyum bromür yerine, Higuchi ve arkadaşları tarafından [196, 197] KTT-PZR reaksiyonunda kullanılmıştır [198]. Boya ssDNA'ya bağlanamazken dsDNA'ya bağlanır ve sonuçta flöresan yayımı (eksitasyon 254 ve 488 nm, emisyon 560 nm) ortalama 800 ile 1000 kat artar. Amplifikasyon gerçekleştikçe artan DNA miktarına bağlı olarak flöresan sinyali artmaya başlar. Ancak bu yöntemin dezavantajı SYBR Green I molekülünün spesifik olmayan DNA'yı da tanıma ihtimalidir. Yani, reaksiyonda bulunan spesifik veya spesifik olmayan PZR ürünleri ve primer-dimerleri de dahil olmak üzere tüm dsDNA ürünlerinin miktarı ölçülmektedir. Bu sorunu aşmak için erime eğrisi (melting curve) analizi yapmak mümkündür. Erime eğrisi analizinde, PZR'ın en son aşamasından sonra elde edilen PZR ürünleri, düşük hızda eritilir. dsDNA birbirinden ayrılmaya başladığında flöresan boya serbest kalır ve okunan flöresan miktarı düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı ( $T_m$ ) olduğundan dolayı, spesifik olmayan ürünlerin veya primer dimerlerinin  $T_m$ 'leri farklılık gösterir. Erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Sonuçta, spesifik olmayan dsDNA'ların toplam ölçümden çıkarılması mümkün olur ve istenilen dsDNA'nın flöresan ölçümü tespit edilebilir (Şekil 4.2) [195].

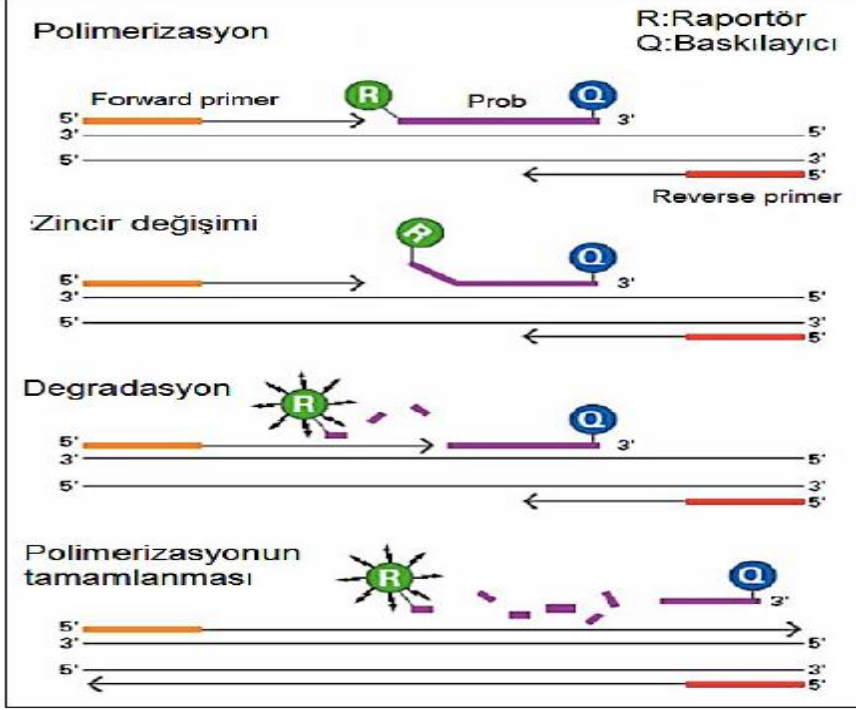


Şekil 4.2. Syber Green I yöntemi [195].

#### 4.2. TaqMan Prob Metodu

TaqMan prensibinde, problemlerin 5' ucunda raportör florokrom (örn. , 6-carboxyfluorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (örn. , 6-carboxy-tet ramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Probun 3' ucu bloke olduğu için prob primer gibi uzamaz. Hedef DNA'nın varlığında prob, PZR reaksiyonu boyunca spesifik olarak sağ ve sol primer bölgeleri arasına bağlanır. Reaksiyon başında raportör boyanın baskılayıcı boyaya yakınlığı sebebiyle, özellikle Forster tipi enerji transferinden dolayı, haberci flöresan baskılanır [199, 200]. Yöntem, Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini probu degrade etmek için kullanma prensibine dayanmaktadır. Şayet prob hedef DNA ile hibridize olmuş ise prob, primerlerin uzaması sırasında yıkıma uğrar. Primerlerin uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece, raportör serbest kalır ve flöresan ışımaya yapar. Flöresan amplifikasyon arttıkça yıkılan problemlerle birlikte artar (Şekil

4.3) [201]. Florejenik proplar için özel gereksinim 5' ucunda G bazının olmamasıdır. Haberci boyaya bitişik G bazı kesimden sonra bile haberci floresanı söndürür.



Şekil 4.3. TaqMan prob metodu [201]. Yöntemde propların 5' ucunda raportör florokrom 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır

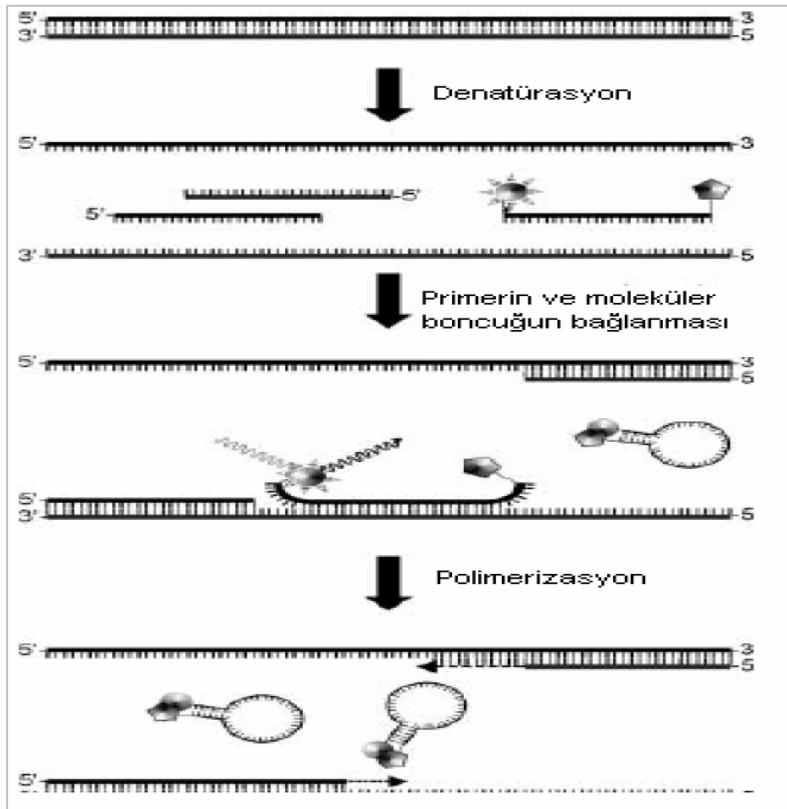
#### 4.3. FRET Prob Metodu

Bu yöntem için kullanılan proplarda 3' ucunda floresan işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. Hibridizasyon proplarını çift olarak tasarlanır ve çiftlerden biri verici boya (3'-Floresin), diğeri ise alıcı boya (5'-Red-640 veya 5'-Red-705) ile işaretlenir. Amplifikasyon sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji "donor" boyadan "acceptor" boyaya transfer edilir. Proplar hedef DNA'nın birbirine yakın bölgelerine hibridize olacak şekilde tasarlanır (genellikle iki bağlanma bölgesinin arasında 1-5 nükleotitlik boşluk olur). Eğer iki prob da hibridize olur ise, iki boya da birbirine yakınlaşır ve FRET alıcı boyası flourometre ile ölçülebilen sinyale neden olur. Bu enerji

transferi sonucunda oluşan flöresan miktarı PZR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artmaktadır [202].

#### 4.4. Moleküler Boncuk (Molecular Beacon) Yöntemi

Moleküler boncuk probları saç tokası yapısındadır. Yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak hedef DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerirken gövde dizisi kendi içinde tamamlayıcıdır. Probun 5' ve 3' uçlarında raportör ve baskılayıcı boyalar bulunur. Saç tokası yapısı kapandığında baskılayıcı boya diğer boyanın flöresanını engeller. Ancak prob hedef DNA dizisine hibridize olduğunda konformasyonu değişir, düz ve çift zincirli hale geçer. Bu yapı termodinamik olarak saç tokası yapısından daha kararlıdır. Baskılayıcı boya raportör boyadan uzaklaşacağı için flöresan sinyal vermeye başlar (Şekil 4.4) [203].



Şekil 4.4. Moleküler boncuk yöntemi [203].

#### **4.5. Scorpions Prob Yöntemi**

Scorpions olarak adlandırılan prob ailesi saç tokası yapısı içeren spesifik probdizilerinden oluşur. Bu yöntemde probun 5' ucuna bağlı flöresan sinyal üreten florofor, saç tokası konfigürasyonunda 3' ucuna bağlı bir boya ile söndürülür. Bu yapı primerin 5' ucuna bağlanmıştır. Primer uzamasını takiben spesifik prob aynı DNA ipliği üzerinde kendi tamamlayıcı dizisine bağlanır ve saç tokası yapısı çözülmüş olur. Bu şekilde flöresan ışımaya meydana gelir. Bu yöntemde primerden ayrı bir proba ihtiyaç yoktur[204].



## 5. MATERYAL ve METOT

### 5.1. Örneklerin Toplanması

Tez çalışmasına dahil edilen örnekler Numune Eğitim Araştırma Hastanesi 2. Kulak Burun Boğaz Kliniği'ne başvuran bireylerden sağlandı. Çalışmaya NP'li 91 hasta birey dahil edildi. Hastalar burun tıkanıklığı, burun akıntısı, koku alma bozukluğu, baş ağrısı ve yaşam kalitesinin düşüklüğü şikayetleri ile kliniğe başvurmuşlardır. Hasta öyküsü alınarak, fizik muayene, endoskopik muayene ve paranazal sinüs bilgisayarlı tomografisi eşliğinde hastalara NP teşhisi konuldu. Serum total IgE değerleri, nefelometrik yöntem ile değerlendirildi. Paranazal sinüsleri değerlendirmek için bilgisayarlı tomografi (PSBT) çekilmiş olup, Lund ve Mackay [130] tarafından önerilen PSBT skorumaya göre evrelendirildi. Astım varlığı ve aspirin duyarlılığı, hasta öyküsünde sorgunlandı ve prick deri testi ile alerji varlığı değerlendirildi. Ayrıca hastalarda tespit edilen poliplerin boyutu, Lidholdt ve arkadaşlarının [131] tanımladıkları 0-3 skalasına göre sınıflandırıldı. Hastaların hiç tedavi almamış ya da son uygulanan tedavinin üzerinden en az 6 ay geçmiş ve son dört hafta içinde akut üst solunum yolu enfeksiyonu geçirmemiş olmasına dikkat edildi. Ayrıca kistik fibrozisli, inverted papillomlu, fungal sinüzitli ve antrokoanal polipli vakalar çalışmaya dahil edilmedi. Kontrol grubunu oluşturan 110 sağlıklı birey ise gönüllülük esasına dayanarak, çalışmaya dahil edildi. Çalışma için gerekli etik kurul izni ve çalışmaya dahil edilen bireylerden bilgilendirilmiş gönüllü onam belgesi alındı, yaklaşık 5-10 ml kan örneği EDTA'lı (disodyum etilendiamin tetraasetik asit) tüplerde toplandı ve tüpler +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Hastalardan fonksiyonel endoskopik sinüs operasyonu (ESC) kararı verilmiş 13 bireyin polip dokusu ve bu hastalardan 9'unun kendi sağlıklı nazal dokusu (histopatolog tarafından normal doku olduğu bildirilen) operasyon sırasında alındı. Kontrol grubundan nazal obstrüksiyon nedeniyle septum operasyonu ve/veya turbinektomi kararı verilmiş 10 bireyin nazal doku örneği de operasyon sırasında alındı. Alınan taze doku örneği RNase-free later (Ambion AM7020, Applied Biosystems, USA) içeren tüplere alınarak -20 °C'de saklandı.

## 5.2. *RYD5* Geni Dizi Analizi

### 5.2.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için Yen ve arkadaşları [205] tarafından geliştirilmiş olan DNA izolasyonu yöntemi değişiklik uygulanarak kullanıldı. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden alınan kan örneklerine aşağıda belirtilen basamakları içeren DNA izolasyon yöntemi uygulandı.

1. 1.5 ml'lik steril mikrofij tübüne, EDTA'lı kan tüpünde bulunan kan örneğinden 400 µl konuldu.
2. Mikrofij tüpü içindeki 400 µl kan örneğine Tris-EDTA (TE) tamponu ilave edilerek hacim 1.5 ml'ye tamamlandı.

#### **TE Tamponu:**

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7,6

3. Tüpler 13000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi.
4. Santrifügasyon sonunda üstteki süpernatant, alttaki pelete dokunulmadan aspire edildi.
5. Yıkama işlemi (2., 3. ve 4. basamaklar) üç kez tekrarlanarak, gerçekleştirildi.
6. Süpernatant aspire edildikten sonra pelet üzerine 180 µl lizis tamponu ilave edildi. TE tamponu ile son hacim 500 µl'ye tamamlandı.

#### **Lizis Tamponu:**

%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) 80 µl

1 M Sodyum klorür (NaCl) 90 µl

10 mg/ml Proteinaz K (pK) 10 µl

7. Örnekler hafifçe karıştırıldıktan sonra 37°C'lik etüvde gece boyu ya da 56 °C'lik etüvde 2 saat inkübasyona bırakıldı.

8. İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine 250 µl fenol, 250 µl kloroform eklendi. Tüpler iyice karıştırılarak 2500 rpm'de 4 dakika santrifüje edildi. Bu işlem ile inkübasyon sonucu oluşan protein atıklarının çöktürülerek, DNA'dan uzaklaştırılması sağlandı.

9. Santrifügasyon sonrası oluşan süpernatant dikkatli bir şekilde başka bir steril mikrofüj tüpüne aktarıldı. Bu aşamada fenolün bir sonraki aşama olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'de kullanılacak olan Taq DNA polimerazın inhibisyonuna neden olmaması için fenol-kloroformun bulunduğu alt fazdan örnek çekmemeye özellikle dikkat edildi.

10. Süpernatantın üzerine 1ml %100'lük etanol ilave edildi. (%100'lük etanol ortamdaki H<sub>2</sub>O moleküllerini kendisine bağlayarak ortamda DNA'nın çözünebileceği serbest H<sub>2</sub>O moleküllerinin kalmamasını ve DNA'nın görünür hale gelmesini sağlar). Tüpler alt üst edilerek, iyice karıştırıldı ve DNA'nın görünür hale gelmesi sağlandı. Tüpler tüplüklere dizilerek 20 dakika -20°C'de bekletildi.

11. Örnekler 13000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek, DNA'nın mikrofüj tüplerinin dibine yapışması sağlandı. Daha sonra %100'lük etanol mikrofüj tüpünün dibinde bulunan DNA'ya dokunulmadan mikropipet vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırıldı.

12. DNA'nın üzerine %70'lik oda ısısındaki etanol ilave edildi. Bu basamakta %70'lik etanol çözeltisindeki %30 oranındaki distile su ile ortamda bulunabilme ihtimali olan iyonların çözünerek ortamdan uzaklaştırılması sağlanırken, %70 oranındaki etanol ile DNA'nın tekrar çözünür hale gelmesi engellendi.

13. Örnekler 13000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilerek DNA'nın mikrofüj tüplerinin dibine yapışması sağlandı. Daha sonra %70'lik etanol mikrofüj tüpünün dibinde bulunan DNA'ya dokunulmadan mikropipet vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırıldı.

14. Elde edilen DNA peleti üzerine peletin miktarına bağlı olarak 200-300 µl steril distile su eklenerek, DNA'nın oda ısısında iyice çözünmesi sağlandı.

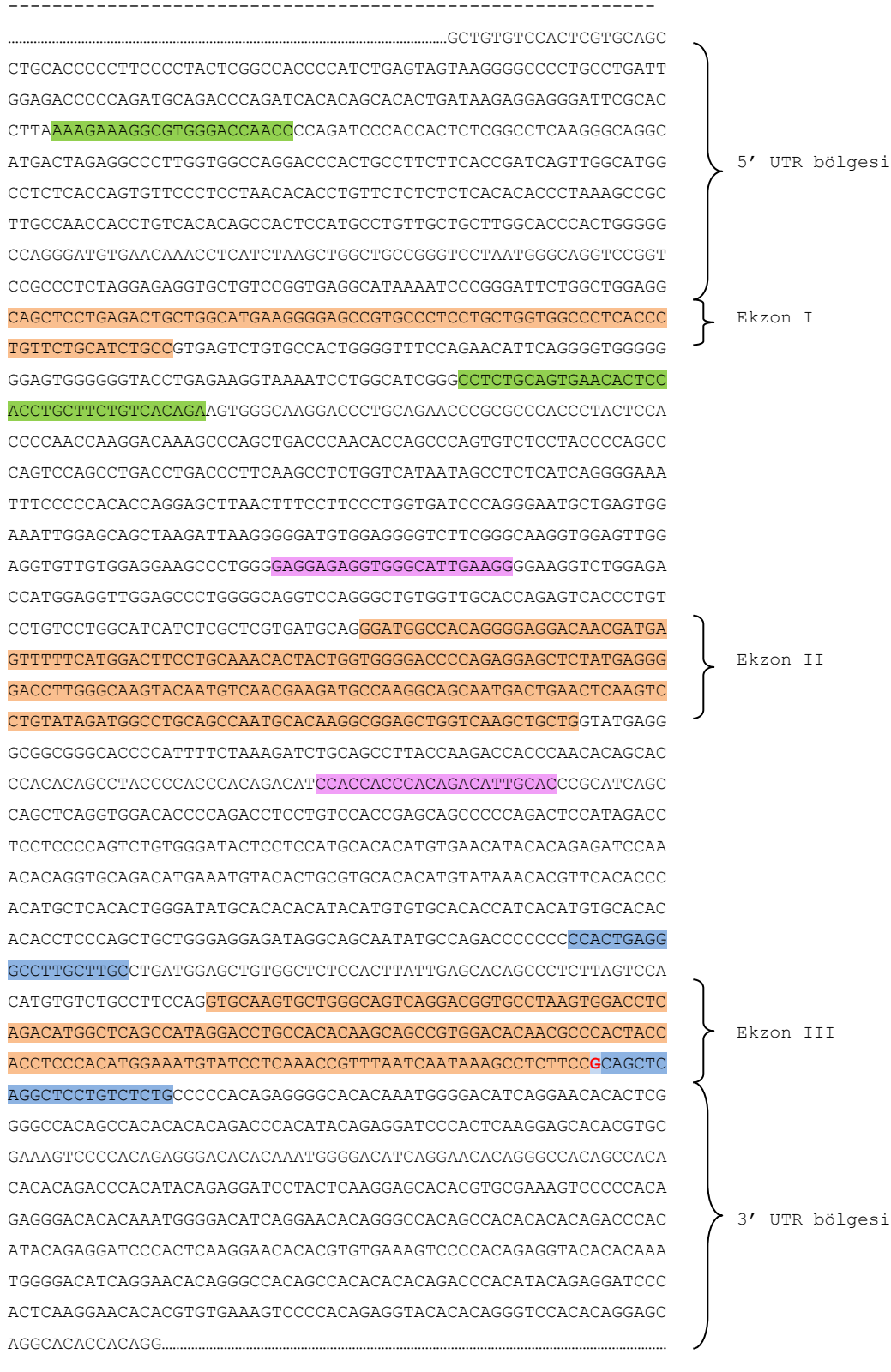
15. Elde edilen genomik DNA -20°C’ de saklandı.

### **5.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

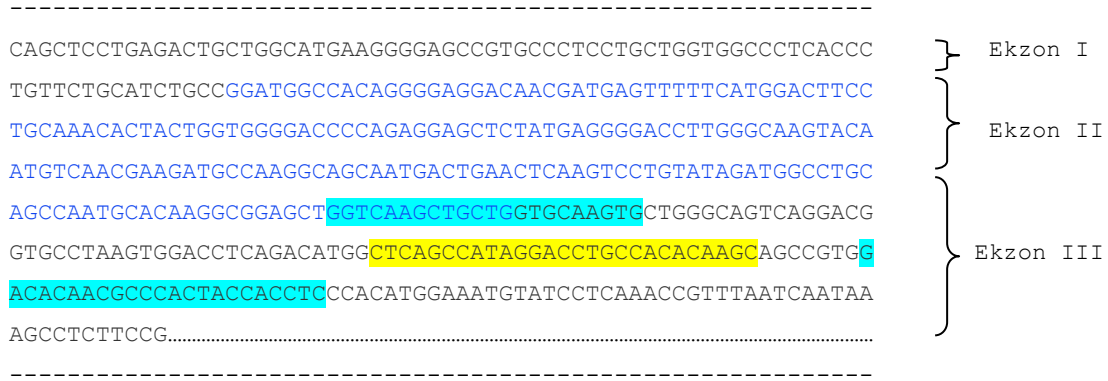
Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmadan izole edilmiş genomik DNA’daki dizisi bilinen özgül bölgelerin uygun primerler yardımıyla çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in-vitro* DNA sentez yöntemidir. Reaksiyon özgüllüğü çok iyi tanımlanmış primer oligonükleotitlerin seçilmesiyle sağlanır. Primerler çoğaltılacak olan DNA bölgesine komplementer yapıda, kısa, tek zincirli, sentetik DNA molekülleridir [202-206]. Her bir gen bölgesi için dizayn edilen primer çiftleri Çizelge 5.1’de verilmiştir. *RYD5* geni üç ekzon içermesine rağmen, her ekzon ayrı çoğaltılacağı için üç çift primer dizayn edildi. *RYD5* gen dizisi, amplifikasyonunda kullanılan primer çiftleri Şekil 5.1, 5.2, 5.3 üzerinde gösterilmiştir [207-209].

**Çizelge 5.1.** PZR ile KTT-PZR yönteminde kullanılan prob ve primer çiftleri, PZR koşulları ve PZR ürün büyüklükleri

| Çoğaltılacak Gen Bölgesi | İleri (F) Primer ve Prob (5'-3')     | Ters (R) Primer (5'-3')  | Tm Derecesi (°C) | PZR Döngü Sayısı | PZR Ürün Büyüklüğü |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|--------------------|
| <i>RYD5</i> 1. Ekzon     | AAAGAAAGGCGTGGGACCAACC               | CAGGTGGAGTGTTCACTGCAGAGG | 60               | 35               | 542 bç             |
| <i>RYD5</i> 2. Ekzon     | GAGGAGAGGTGGGCATTGAAGG               | GTGCAATGTCTGTGGGTGGTGG   | 60               | 35               | 446 bç             |
| <i>RYD5</i> 3. Ekzon     | CCACTGAGGGCCTTGCTTGC                 | CAGAGACAGGAGCCTGAGCTGC   | 60               | 35               | 264 bç             |
| <i>RYD5</i>              | GTGCAAGTG                            | GACACAACGCCCACTACCACCT   | 60               | 45               | 120                |
| <i>RYD5</i>              | HEX+TCAGCCATAGGACCTGCCACACAAGC+BHQ   |                          | 60               | 45               |                    |
| <i>ACTB</i>              | CCTTCCTTCCTGG                        | GCATGGAG                 | 60               | 45               |                    |
| <i>ACTB</i>              | FAM+CCATCATGAAGTGTGACGTGGACATCCG+BHQ |                          | 60               | 45               |                    |



Şekil 5.1. *RYD5* gen dizisi üzerinde primerlerin gösterilmesi [207]. (Primer çiftleri farklı renklerle belirtilmiştir)



**Şekil 5.2.** *RYD5* geni cDNA'sı dizisi üzerinde prob ve primerlerin gösterilmesi (Primer çifleri ve prob farklı renklerle belirtilmiştir) [208].



**Şekil 5.3.** *ACTB* geni cDNA dizisi üzerinde prob ve primerlerin gösterilmesi (Primer çifleri ve prob farklı renklerle belirtilmiştir) [209].



### **5.2.3. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi**

PZR ürününün temizlenmesi genin dizileme başarısını etkilemektedir. PZR reaksiyonu sırasında ortamda amplifikasyon ürünlerinin yanısıra tepkimeye girmemiş primerler, dNTP'ler ve tuzlar bulunur. PZR ürünlerinin temizlenmesiyle bu yan ürünler uzaklaştırılır. DNA dizi analizi için amplifikasyon ürünlerinin temizlenmesinde NucleoFast 96 PZR (Macherey-Nagel, USA) kiti kullanıldı ve üretici firmanın öngördüğü koşullar doğrultusunda aşağıda verildiği şekilde yapıldı.

1. PZR ürünü ependorf tüpe aktarıldı.
2. Örnekler 96 kuyucuklu silika membranlı plağa ilave edildi.
3. Silika membran DNA'yı geçirmeyen fakat primer, tuzlar ve dNTP'lere geçirgen porlara sahip olduğundan, DNA membran üzerinde kalırken istenmeyen ürünler filtreden geçerek uzaklaştırıldı.
4. Üzerine 700 µl yıkama tamponu ilave edildi.
5. Ultra filtrasyon için 10 dakika 0,5 bar'lık basınçlı vakum (Millipore) uygulandı.
6. Kuyucuklara deiyonize su eklenerek 5 dakika 0,5 bar'lık basınçlı vakum uygulanarak, yıkama gerçekleştirildi.
7. Yıkama işlemi (6. basamak) toplamda üç kez tekrarlandı.
8. Kuyucuklara 20 µl deiyonize su eklenerek, çözülmüş ve temizlenmiş PZR ürünü tüplere aktarıldı.

### **5.2.4. Otomatik DNA Dizi Analizi**

Otomatik DNA dizi analizi reaksiyonu, "ABI PRISM Big Dye Terminator V3.1 CycleSequencing Kit" (Applied Biosystems, USA) reaksiyon kiti ile üretici firmanın öngördüğü koşullar doğrultusunda aşağıda verildiği şekilde yapıldı. Bu kitin özelliği, içeriğinde tüm PZR kimyasalları ile beraber, flöresan boyalı ddNTP'ler ve Taq DNA

Polimeraz enziminin tek bir karışım halinde bulunmasıdır. “Big Dye Ready Reaction Mix” olarak adlandırılan bu karışıma sadece primer ve temizlenmiş kalıp DNA (PZR ürünü) eklenir ve reaksiyon başlatılır (Çizelge 5.2). Reaksiyon tüpleri pipetlemlenerek karıştırıldı ve ısı döngüleyiciye yerleştirilerek, aşağıdaki program 50 döngü halinde uygulandı (Çizelge 5.3). PZR için “MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler PCR (Bioneer)” cihazı kullanıldı.

Örneklerin hazırlanması sırasında amplifikasyon ürünü etanol çöktürmesi ile PZR artıklarından temizlendi. Bu aşama özellikle reaksiyona girmemiş flöresan boyalı ddNTP’lerin uzaklaştırılması açısından önem taşımaktadır. İşlem uygun şekilde yapılamazsa kontaminant boyalar lazer tarafından okunmakta ve analizin hassasiyetini bozmaktadır.

Döngüler tamamlandıktan sonra işaretleme reaksiyonundan artan malzemeler, aşağıda belirtilen prosedür takip edilerek ortamdan uzaklaştırıldı.

1. Her bir tüpe 2 µl 3M sodyum asetat ilave edildi.
2. Tüplere 50 µl soğuk % 95-100’lük etil alkol ilave edildi.
3. Karışım 1.5 ml’lik ependorf tüplere aktarıldı. 15 dakika -20 °C’de bekletildi.
4. 20 dakika 13000 rpm’de santrifüje edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
5. 250 µl soğuk %70’lik etil alkol ilave edildi.
6. 5 dakika 13000 rpm’de santrifüje edildi.
7. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
8. Pelet üzerine 20 µl formamid eklenerek çözüldü ve vortekslendi.
9. Tüp 5 dakika 95°C’de bekletilerek DNA denatüre edildi ve 5 dakika -20 °C’de bekletildi.
10. Hazırlanan örnekler kapiller elektroforez sisteminde yürütüldü.

**Çizelge 5.2.** DNA dizi analizi, genomik DNA eliminasyonu, ters-transkripsiyon ve KTT-PZR reaksiyon bileşenleri

| Reaksiyon Adı                   | Bileşen  | Hacim/Reaksiyon           | Son Konsantrasyon |
|---------------------------------|--|---------------------------|-------------------|
| <b>DNA Dizi Analizi</b>         | Big Dye reaksiyon karışımı                           | 3 µl                      | 1x                |
|                                 | Primer   | 0,6 µl                    | 0.5 µM            |
|                                 | Kalıp DNA (PZR ürünü)                                | 1 µl                      |                   |
|                                 | DNase-free su  | 5,4 µl                    |                   |
|                                 | Toplam hacim   | 10 µl                     |                   |
| <b>Genomik DNA Eliminasyonu</b> | 7x gDNA Wipeout tamponu                              | 2 µl                      | 1x                |
|                                 | Kalıp RNA  | Değişebilir (1µg'a kadar) |                   |
|                                 | RNase-free su  | Değişebilir               |                   |
|                                 | Toplam hacim   | 14 µl                     |                   |
| <b>Ters-Transkripsiyon</b>      | RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit-Fermentas | 1 µl                      |                   |
|                                 | 5x RT Tamponu  | 4 µl                      |                   |
|                                 | RT primer karışımı                                   | 1 µl                      | 1x                |
|                                 | Kalıp RNA (genomik DNA eliminasyon reaksiyonu)       | 14 µl                     |                   |
|                                 | Toplam hacim   | 20 µl                     |                   |
| <b>KTT-PZR</b>                  | 2x TaqMan Universal PZR Master Karışımı              | 10 µl                     | 1x                |
|                                 | İleri primer   | 1 µl                      | 0.5 µM            |
|                                 | Geri primer  | 1 µl                      | 0.5 µM            |
|                                 | Prob   | 1 µl                      | 0.5 µM            |
|                                 | Kalıp cDNA   | 2 µl                      | ≤200 ng/reaksiyon |
|                                 | RNase-free su  | 9.5 µl                    |                   |
|                                 | Toplam hacim   | 27.5 µl                   |                   |

**Çizelge 5. 3.** Dizi analizi ve KTT-PZR reaksiyon programı

| Reaksiyon Adı       | Basamak                 | Zaman     | Sıcaklık (°C) | Döngü | Açıklama                                       |
|---------------------|-------------------------|-----------|---------------|-------|--|
| <b>Dizi Analizi</b> | Denatürasyon            | 20 saniye | 95            | 50    |  |
|                     | Bağlanma                | 25 saniye | 55            |       |  |
|                     | Uzama                   | 4 dakika  | 60            |       |  |
| <b>KTT-PZR</b>      | Başlangıç Denatürasyonu | 10 dakika | 95            | 1     | HotStart Taq Plus DNA Polimerazı aktifleştirme |
|                     | Denatürasyon            | 15 saniye | 95            | 45    | Flöresan verilerinin oluşması                  |
|                     | Bağlanma                | 45 saniye | 60            |       |  |
|                     | Uzama                   | 20 saniye | 72            |       |  |

### 5. 3. *RYD5* Geni İfade Düzeyi Analizi

#### 5. 3. 1. mRNA İzolasyonu

RNase-free later (Ambion AM7020, Applied Biosystems, USA) içerisinde saklanan hücrelerden RNeasy Plus Mini Kit ile RNA pürifikasyonu yapıldı. Bu amaçla uygulanan protokol şöyledir:

1. RNase-free later içerisinde bulunan dokular, ucuna RNase-free içermeyen pastle yerleştirilmiş matkap yardımı ile homojenize edildi ve 5 dakika 5000 x g'de santrifüje edildi.
2. Santrifügasyon sonrasında süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
3. Pelet tüpe hafifçe vurularak gevşetildi. Bu işlem peletin 4. basamakta RNA izolasyonundan önce lizisi için kullanılacak olan RLT Plus tamponunda çözülmesini kolaylaştırdı.
4. Peletin üzerine daha önceden içerisine  $\beta$ -ME ilave edilmiş olan 350  $\mu$ l RLT Plus tamponu eklendi. Peletin vortekslenerek tamamen çözülmesi sağlandı ve hızla 5. basamağa geçildi.
5. Elde edilen lizat pipetle çekilip bırakılarak homojenize edilmesi sağlandı.
6. Homojenize edilmiş lizat, 2 ml toplama tüpüne yerleştirilmiş gDNA eliminator spin kolonuna aktarıldı. 30sn  $\geq$  8000 x g ( $\geq$  10,000 rpm)'de santrifüje edildi. Santrifügasyon sonrasında kolon atıldı ve akan sıvı saklandı.
7. Toplanan sıvıya 1 hacim %70 etanol eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. (RNA saflaştırması sırasında, etanol eklenmesinden sonra çökeltilerin görülebilmesi işlemi etkilememektedir).
8. Etanol eklenmesi ile oluşan 700  $\mu$ l'lik sıvı şayet çökelti oluştuysa bu çökeltiyi de içerecek şekilde 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve RNeasy spin kolonuna aktarıldı. Kapağı nazikçe kapatıldı ve 15 sn  $\geq$  8000 x g ( $\geq$  10,000 rpm)'de santrifüje edildi. Toplanan sıvı atıldı.

9. Toplama tüpü 9. basamakta tekrar kullanıldı. Eğer örnek hacmi 700 µl'yi geçiyorsa, ardışık aliquotları aynı RNeasy spin kolonunda santrifüje edildi. Toplanan sıvı her santrifügasyondan sonra atıldı.

10. RNeasy spin kolonuna membrana bağlanmış RNA'nın yıkanması için kullanılan 700 µl RW1 tamponu eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak ve 15 sn  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm)'de santrifüje edilerek spin kolon membranı yıkandı. Toplanan sıvı atıldı.

11. Toplama tüpü 10. basamakta tekrar kullanıldı.

12. RNeasy spin kolonuna önceden içerisine etanol ilave edilmiş olan 500 µl RPE tamponu eklendi. Bu tampon membrana bağlanmış RNA'nın yıkanması için kullanıldı. Kapağı nazikçe kapatıldı ve 15 sn  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm)'de santrifüje edilerek spin kolon membranı yıkandı. Toplanan sıvı atıldı.

13. Toplama tüpü 11. basamakta tekrar kullanıldı.

14. RNeasy spin kolonuna 500 µl RPE tamponu eklendi. Kapağı nazikçe kapatıldı ve spin kolon membranını yıkamak için 2 dak.  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm)'de santrifüje edildi. (Uzun süreli santrifügasyonlar spin kolon membranını kurutur, böylece etanolün RNA elüsyonu sırasında aktarılmadığından emin olunur. Kalıntı etanol sonraki reaksiyonlarda etkileşebilir).

15. RNeasy spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve eski toplama tüpü toplanan sıvı ile birlikte atıldı. Tam hızda 1 dak. santrifüje edildi. Bu basamak olası herhangi RPE tamponu naklini engellemek veya 11. basamaktan sonra RNeasy spin kolonunun etrafındaki kalıntı toplama sıvısını uzaklaştırmak için yapıldı.

16. RNeasy spin kolonu yeni bir 1,5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Doğrudan spin kolon membranına 50 µl RNase-free su eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak 1 dak.  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm)'de RNA'yı elüe etmek için santrifüje edildi.

17. Eğer beklenen RNA eldesi  $>30$  µg ise 13. basamak tekrar 30-50 µl RNase-free su eklenerek veya 13. basamaktaki elüsyon kullanılarak (eğer yüksek RNA konsantrasyonu

gerekiyorsa) tekrarlandı. Onüçüncü basamaktaki toplama tüpü tekrar kullanıldı. (Eğer 13. basamaktaki elüsyon kullanıyorsa, RNA eldesi, ikinci bir hacim RNase-free su kullanılarak elde edilenden %15-30 daha az olacak, ancak son RNA konsantrasyonu daha yüksek olacaktır).

### **5.3.2. RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi**

RNeasy Plus Mini Kit ile izolasyon sonrasında elde edilen RNA örnekleri NanoDrop (ND 1000) spektrofotometre kullanılarak 260 nm’de kuvars küvet ile 1/40 sulandırılarak ölçüldü. 280/260 nm oranına göre saflıkları değerlendirildi. Ölçüm sonrasında her RNA örneğinin konsantrasyonu ters transkripsiyon için 1000 ng/ml olacak şekilde ayarlandı. Örnekler bu basamaktan sonra kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

### **5.3.3. KTT-PZR için Genomik DNA Eliminasyonu**

cDNA eldesi için ters transkripsiyon basamağını uygulamadan önce, mRNA örneklerinde genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için genomik DNA eliminasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

#### Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu:

1. İzolasyondan sonra -20°C’de saklanan kalıp RNA örnekleri buz üstünde eritildi. gDNA Wipeout Tamponu ve RNase-free su oda ısısında (15-25°C) eritildi.
2. Her bir çözelti tüpü yavaşça karıştırıldı. Tüplerin çeperlerinde birikmiş sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüje edildi ve buz üstünde saklandı.
3. Çizelge 5.2’e göre genomik DNA eliminasyon reaksiyonu buz üstünde hazırlandı. Reaksiyon karışımı hazırlanırken her bir RNA örneğinin konsantrasyonunu 1000 ng/ml olacak şekilde ayarlayabilmek için hesaplanan miktarlarda kalıp RNA ve su eklendi. Genomik DNA eliminasyon reaksiyon bileşenleri karıştırıldı ve buz üstünde saklandı.
4. gDNA wipeout reaksiyonu 42°C’de 2 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnek karışımları hemen buz üstüne alındı.

### 5.3.4. cDNA Eldesi için Ters Transkripsiyon Reaksiyonu

Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu sonrasında elde edilen (14 µl) karışım Ters Transkripsiyon Reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı.

#### Ters Transkripsiyon Reaksiyonu:

1. RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit-Fermentas, RT Tamponu, RT Primer Karışımı ve RNase-free su oda ısısında (15-25°C) eritildi.
2. Her bir çözelti tüpü yavaşça karıştırıldı. Tüplerin çeperlerinde birikmiş sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüje edildi ve buz üstünde saklandı.
3. Çizelge 5.2'ye göre ters-transkripsiyon master karışımı buz üstünde hazırlandı. (Ters-transkripsiyon master karışımı, kalıp RNA hariç ilk-zincir cDNA sentezi için gerekli olan tüm bileşenleri içermektedir).
4. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen (14 µl) kalıp RNA, ters-transkripsiyon master karışımı içeren tüpe eklendi.
5. Tüpler 42°C'de 60 dak. inkübe edildi.
6. RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit-Fermentası inaktive etmek için 70°C'de 5 dak. inkübe edildi.



### 5.3.5. Çift-İşaretli Problar Kullanarak KTT-PZR Protokolü

KTT-PZR reaksiyonu için elde edilen cDNA örnekleri spektrofotometrede kuvars küvet kullanılarak 260 nm dalgaboyunda ölçüldü ve konsantrasyonları 200 pg/ml olacak şekilde ayarlandı.

#### KTT-PZR reaksiyonu:

1. 2x TaqMan Universal PZR Master Karışımı, kalıp cDNA, primer ve prob çözeltileri ve RNase-free su eritildi.
2. Her bir çözelti tüpü yavaşça karıştırıldı. Tüplerin çeperlerinde birikmiş sıvıyı toplamak için kısa süreli santrifüje edildi.
3. Çizelge 5.2'e göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Kullanılan polimeraz enziminin Hot start özelliği nedeniyle, reaksiyon hazırlığı veya "KTT" döngüleyicinin programlanması sırasında örneklerin buz üstünde tutulmasına gerek kalmadı.
4. Hazırlanan reaksiyon karışımı iyice karıştırıldı ve uygun hacimlerde PZR tüplerine dağıtıldı.
5. cDNA örnekleri ( $\leq 200$  ng/reaksiyon) reaksiyon karışımını içeren her bir PZR tüpüne eklendi.
6. "KTT" döngüleyici Çizelge 5.3'de verilen programa göre programlandı. Veri eldesi, bağlanma basamağında yapıldı.
7. PZR tüpleri "KTT" döngüleyiciye yerleştirildi ve döngüleme programı başlatıldı.

### 5.3.6. KTT-PZR ile Elde Edilen Verilerin Analizi

KTT-PZR reaksiyonu sonunda elde edilen CT değerleri “**karşılaştırmalı CT metodu**” ile değerlendirildi. Örnekler üç reaksiyonda tekrarlandı.

### 5.3.7. Karşılaştırmalı CT Metodu

Görelî kantifikasyonda, *RYD5* geninin ifade düzeyini inceleyebilmek için dokularda ifadesinin değişmediği varsayılan housekeeping gen olan *ACTB* gen ürünü ile normalizasyon yapıldı. Light Cycler cihazının kendi yazılım programı kullanılarak, *RYD5* geninin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan *ACTB* geninin ifade düzeyine oranlanarak normalize edildi (Şekil 5.4) [210].

$$\frac{X_{\text{test}}}{X_{\text{control}}} = 2^{\Delta\Delta C_T} = 2^{(C_{T,X} - C_{T,R})_{\text{control}} - (C_{T,X} - C_{T,R})_{\text{test}}}$$

**Şekil. 5.4.** Karşılaştırmalı CT metodunda kullanılan formül [210].

## 5. 4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel olarak analizinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences, versiyon 11.0, SSPS Inc, Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Nazal polip ve kontrol grubundaki genotiplerin karşılaştırılmasında, Pearson  $X^2$  ve Fisher'in tam testi kullanıldı. *RYD5* geni ifade düzeyi verilerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi 2. Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde nazal polip tanısı konulmuş toplam 91 (ortalama yaş 44.69; 23-65) hasta bireye ve kontrol grubu olarak 110 (ortalama yaş 43.62; 17-66) sağlıklı bireye ait periferik kan örneklerinden total DNA izolasyonu yapılmıştır. *RYD5* genine özgü primerler kullanılarak, PZR yöntemi ile çoğaltılmış ve DNA dizi analizi yöntemi ile nükleotit değişikliği tarama çalışması yapılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının klinik özellikleri Çizelge 6.1'de verilmiştir.

Nazal polipozisli ESC operasyonu geçirmiş 13 hasta bireyin (9 erkek ve 4 kadın; ortalama yaş 45.2) polip dokusu örneği, bu hastaların 9'unun kendi sağlıklı nazal doku örneği ve kontrol grubu olarak 10 (8 erkek ve 2 kadın; ortalama yaş 43.3) sağlıklı bireyin nazal doku örneklerinden mRNA izolasyonu yapılmış ve ters transkripsiyonla komplementer DNA (cDNA) haline getirildikten sonra, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış ve relatif kantitasyon ile *RYD5* geninin ifade düzeyi değerlendirilmiştir.

**Çizelge 6.1.** Hasta ve kontrol grublarının klinik özellikleri

| Klinik Özellikler              |   | Nazal Polipozisli Hastalar<br>(n: 91) | Kontrol<br>(n: 110) | P      |
|--------------------------------|---|---------------------------------------|---------------------|--------|
| Yaş, ortalama                  |   | 44,69 ± 11,021                        | 43,62 ± 11,515      | P>0.05 |
| Cinsiyet, E/K                  |   | 50/41                                 | 63/47               | P>0.05 |
| IgE seviyesi, µg/L             |   | 15,2943 ± 10,01314 (2,05-49,3)        |                     |        |
| Bilgisayarlı Tomografi skoru** |   | 9,49 ± 4,684 (3-19)                   |                     |        |
| Astım, n (%)                   |   | 33 (36,3)                             |                     |        |
| Aspirin duyarlılığı, n (%)     |   | 19 (20,9)                             |                     |        |
| Alerji varlığı, n (%)          |   | 35 (38,4)                             |                     |        |
| Polip Evre***                  | 1 | 34 (37,4)                             |                     |        |
|                                | 2 | 33 (36,3)                             |                     |        |
|                                | 3 | 24 (26,4)                             |                     |        |

\*Veriler hastaların yüzdesi şeklinde yada ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

\*\*Lund and Mackay [130] sistemine göre

\*\*\*Lidtholdt ve arkadaşlarının [131] evreleme sistemine göre

## **6.1. DNA Dizi Analiz Sonucu**

*RYD5* gen bölgesinin DNA dizi analizi değişikliği taraması sonucunda elde edilen nükleotit değişiklikleri ve allel frekansları Çizelge 6.2 ve 6.3’de verilmiştir.

**Çizelge 6.2.** Bu çalışmada *RYD5* geninde bulunan nükleotit değişiklikle

| Tespit Edilen Nükleotit Değişiklikleri | SNP Numarası | Gendeki Lokalizasyonu | Nükleotit Değişimi | Amino Asit Değişimi | Proteine Etkisi       | MAF (Minör Allel Frekansı) | Kaynaklar  |
|--|--------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|--|
| c.-264 A>G                             | rs113795008  | Promotor              | C[A/G]T            | -                   | Polimorfizm           | 0,11                       | Kim ve ark., 2009 [183]<br><i>Bu çalışma</i>         |
| c.-177 C>A                             | rs144170316  | Promotor              | C[C/A]A            | -                   | Polimorfizm           | -                          | 1000 Genom Projesi, 2012 [184]<br><i>Bu çalışma</i>  |
| c.-103 G>A                             | rs2280540    | Promotor              | C[G/A]G            | -                   | Polimorfizm           | 0,24                       | Kim ve ark. , 2009 [183]<br><i>Bu çalışma</i>        |
| c.-49 G>A                              | rs144999256  | Promotor              | G[G/A]C            | -                   | Polimorfizm           | -                          | 1000 Genom Projesi , 2012 [184]<br><i>Bu çalışma</i> |
| c.-35 G>A                              | rs148962288  | Promotor              | G[G/A]A            | -                   | Polimorfizm           | -                          | 1000 Genom Projesi, 2012 [184]<br><i>Bu çalışma</i>  |
| c.13 C>T                               | rs7951297    | Ekzon 1               | C[C/T]G            | R5C                 | Yanlış anlamlı        | 0,27                       | Wheeler ve ark., 2008 [185]<br><i>Bu çalışma</i>     |
| c.57-14 C>T                            | rs2294083    | Intron 1              | T[C/T]G            | -                   | Polimorfizm           | 0,24                       | Kim ve ark., 2009 [183]<br><i>Bu çalışma</i>         |
| c.66 A>G                               | rs2294082    | Ekzon 2               | C[A/G]G            | -                   | Polimorfizm           | 0,24                       | Kim ve ark., 2009 [183]<br><i>Bu çalışma</i>         |
| <b>c.152 G&gt;T</b>                    | -            | Ekzon 2               | G[G/T]C            | G51V                | <b>Yanlış anlamlı</b> | -                          | <i>Bu çalışma</i>                                    |
| c.279 C>T                              | rs61997072   | Ekzon 3               | A[C/T]G            | -                   | Polimorfizm           | 0,12                       | Kim ve ark., 2009 [183]<br><i>Bu çalışma</i>         |

**Çizelge 6.3. RYD5 geninde bulunan nükleotit değişikliklerinin genotip ve allel frekansları**

| RYD5 Geninde Bulunan Nükleotit Değişiklikleri |                         |    | NP'li Hastalar<br>(n:91) | Kontrol<br>(n:110) | P       |
|---|-------------------------|----|--------------------------|--------------------|---------|
| c.-264 A>G                                    | Genotip frekansı, n (%) | AA | 58 (64)                  | 93 (84)            | 0.002*  |
|   |                         | AG | 28 (31)                  | 12 (11)            |         |
|   |                         | GG | 5 (5)                    | 5 (5)              |         |
|   | Allel frekansı, %       | A  | 79                       | 90                 | P<0.05  |
|   |                         | G  | 21                       | 10                 |         |
| c.-177 C>A                                    | Genotip frekansı, n (%) | CC | 89 (98)                  | 100 (91)           | 0.69**  |
|   |                         | CA | 2 (2)                    | 10 (9)             |         |
|   |                         | AA | 0 (0)                    | 0 (0)              |         |
|   | Allel frekansı, %       | C  | 99                       | 95                 | P>0.05  |
|   |                         | A  | 1                        | 5                  |         |
| c.-103 G>A                                    | Genotip frekansı, n (%) | GG | 45 (49)                  | 66 (60)            | 0.033*  |
|   |                         | GA | 31 (34)                  | 38 (35)            |         |
|   |                         | AA | 15 (16)                  | 6 (5)              |         |
|   | Allel frekansı, %       | G  | 66                       | 77                 | P<0.05  |
|   |                         | A  | 34                       | 23                 |         |
| c.-49 G>A                                     | Genotip frekansı, n (%) | GG | 89 (98)                  | 110 (100)          | 0.204** |
|   |                         | GA | 2 (2)                    | 0 (0)              |         |
|   |                         | AA | 0 (0)                    | 0 (0)              |         |
|   | Allel frekansı, %       | G  | 99                       | 100                | P>0.05  |
|   |                         | A  | 1                        | 0                  |         |

\* Pearson ki-kare testine göre

\*\* Fisher'in tam testine göre,

P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

P değeri, Nazal polipli hastalar ile kontrol grubunda tespit edilen genotipler ve allel frekanslarını açısından karşılaştırılması.

**Çizelge 6.3.** *RYD5* geninde bulunan nükleotit değişikliklerinin genotip ve allel frekansları

| <i>RYD5</i> Geninde Bulunan Nükleotit Değişiklikleri |                         |    | NP'li Hastalar<br>(n:91) | Kontrol<br>(n:110) | P       |
|--|-------------------------|----|--------------------------|--------------------|---------|
| c.-35 G>A  | Genotip frekansı, n (%) | GG | 89 (98)                  | 100 (91)           | 0.069** |
|  |                         | GA | 2 (2)                    | 10 (9)             |         |
|  |                         | AA | 0 (0)                    | 0 (0)              |         |
|  | Allel frekansı, %       | G  | 99                       | 95                 | P>0.05  |
|  |                         | A  | 1                        | 5                  |         |
| c.13 C>T   | Genotip frekansı, n (%) | CC | 32 (36)                  | 28 (25)            | 0.316*  |
|  |                         | CT | 34 (37)                  | 49 (45)            |         |
|  |                         | TT | 25 (27)                  | 33 (30)            |         |
|  | Allel frekansı, %       | C  | 54                       | 48                 | P>0.05  |
|  |                         | T  | 46                       | 52                 |         |
| c.57-14 C>T  | Genotip frekansı, n (%) | CC | 30 (33)                  | 31 (28)            | 0.751*  |
|  |                         | CT | 38 (42)                  | 48 (44)            |         |
|  |                         | TT | 23 (25)                  | 31 (28)            |         |
|  | Allel frekansı, %       | C  | 54                       | 50                 | P>0.05  |
|  |                         | T  | 46                       | 50                 |         |

\* Pearson ki-kare testine göre

\*\* Fisher'in tam testine göre,

P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

P değeri, Nazal polipli hastalar ile kontrol grubunda tespit edilen genotipler ve allel frekanslarını açısından karşılaştırılması.



**Çizelge 6.3.** *RYD5* geninde bulunan nükleotit değişikliklerinin genotip ve allel frekansları

| <i>RYD5</i> Geninde Bulunan Nükleotit Değişiklikleri |                         |    | NP'li Hastalar<br>(n:91) | Kontrol<br>(n:110) | P       |
|--|-------------------------|----|--------------------------|--------------------|---------|
| c.66 A>G   | Genotip frekansı, n (%) | AA | 49 (54)                  | 71 (65)            | 0.077*  |
|  |                         | AG | 29 (32)                  | 33 (30)            |         |
|  |                         | GG | 13 (14)                  | 6 (5)              |         |
|  | Allel frekansı, %       | A  | 70                       | 80                 | P>0.05  |
|  |                         | G  | 30                       | 20                 |         |
| c.152 G>T  | Genotip frekansı, n (%) | GG | 89 (98)                  | 110 (100)          | 0.204** |
|  |                         | GT | 2 (2)                    | 0 (0)              |         |
|  |                         | TT | 0 (0)                    | 0 (0)              |         |
|  | Allel frekansı,%        | G  | 99                       | 100                | P>0.05  |
|  |                         | T  | 1                        | 0                  |         |
| c.279 C>T  | Genotip frekansı, n (%) | CC | 57 (63)                  | 78 (71)            | 0.402*  |
|  |                         | CT | 27 (30)                  | 27 (25)            |         |
|  |                         | TT | 7 (7)                    | 5 (4)              |         |
|  | Allel frekansı,%        | C  | 77                       | 83                 | P>0.05  |
|  |                         | T  | 23                       | 17                 |         |

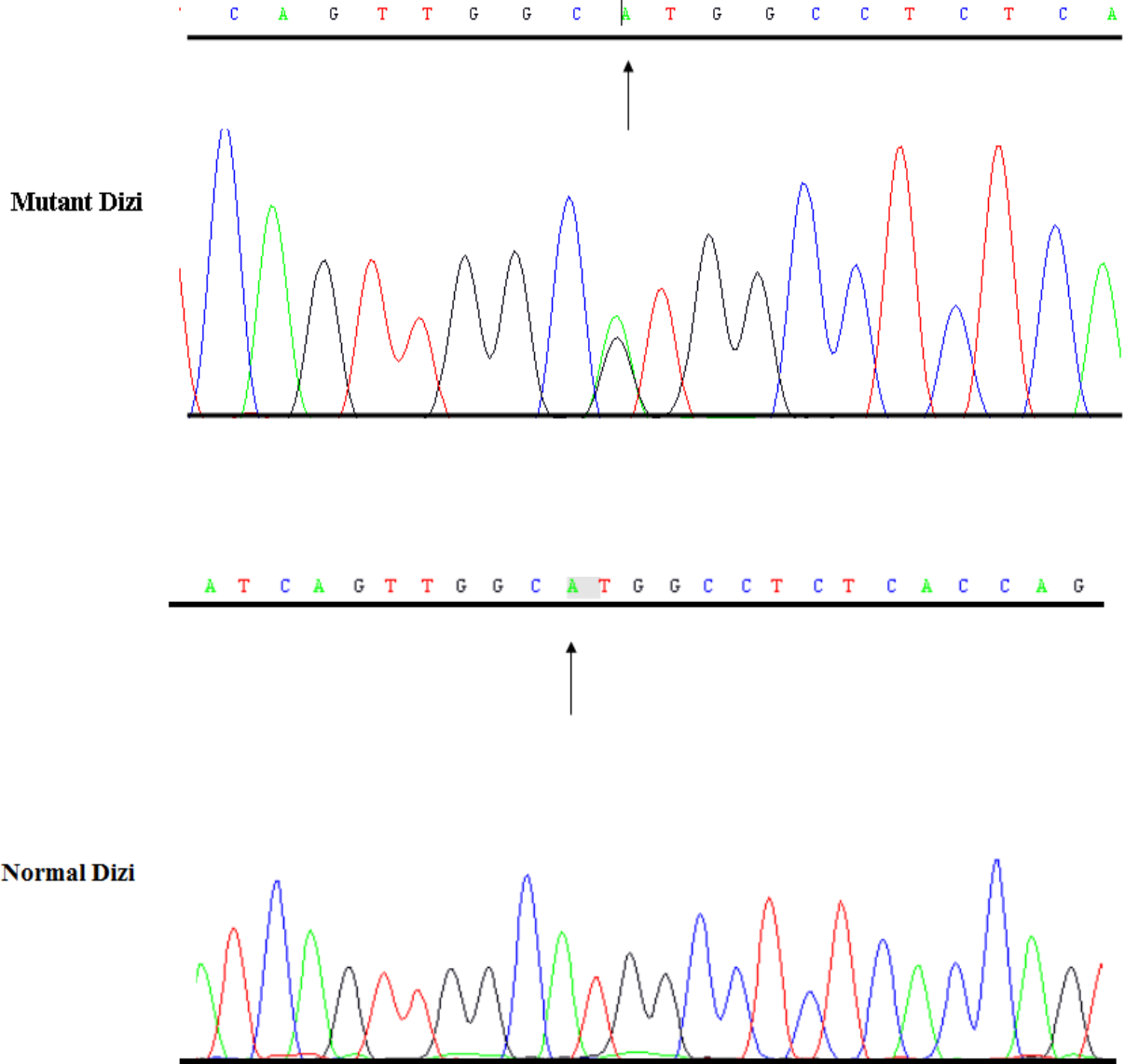
\* Pearson ki-kare testine göre

\*\* Fisher'in tam testine göre,

P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

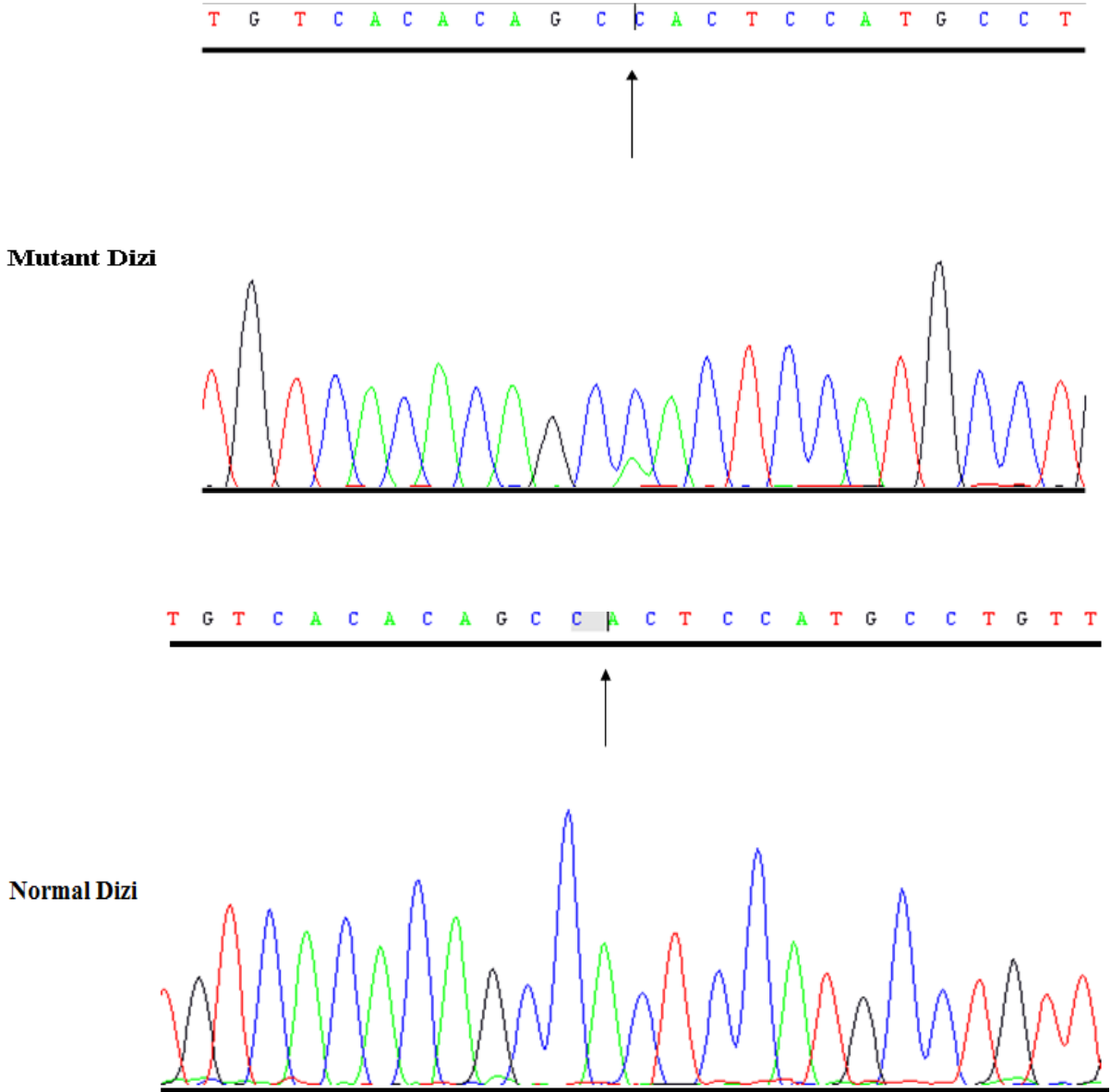
P değeri, Nazal polipli hastalar ile kontrol grubunda tespit edilen genotipler ve allel frekanslarını açısından karşılaştırılması.

*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda genin promotor bölgesinin -264. pozisyonundaki adenin bazının guanin bazı (c.-264 A>G) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.21, kontroldeki allel frekansı ise 0.10'dur. NP'li hastalarda *RYD5* (-264 AG) genotip frekansı kontrol grubuna kıyasla yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.002$ ) (Şekil 6.1).



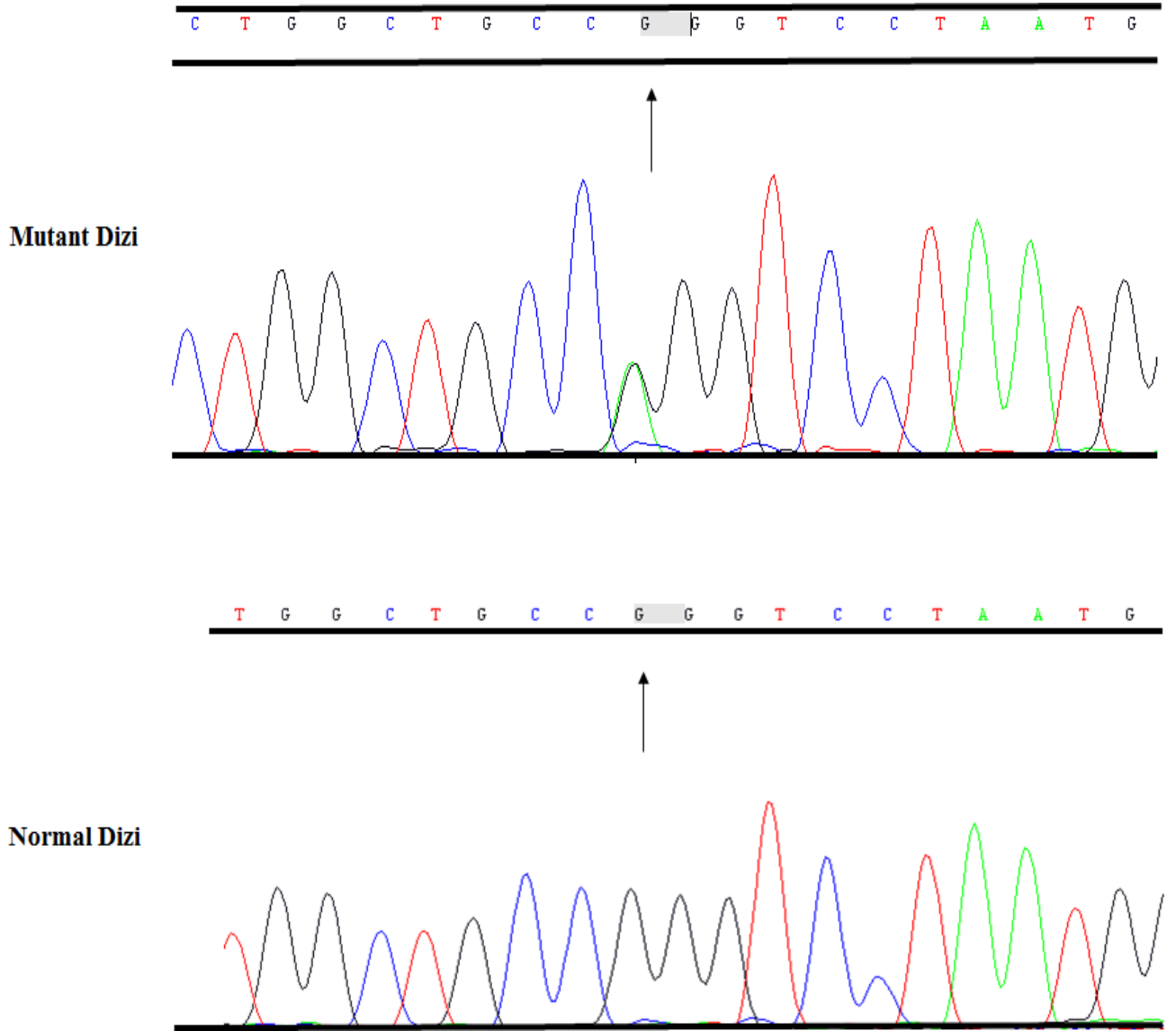
Şekil 6.1. *RYD5* geninin promotor bölgesinde saptanan c.-264 A>G nükleotit değişikliği

*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda genin promotor bölgesinin -177. pozisyonundaki sitozin bazının adenin bazı (c.-177 C>A) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.01, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.05 olup, *RYD5* (-177CC, -177CA, -177AA) genotip frekansı açısından NP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.69) (Şekil 6.2).



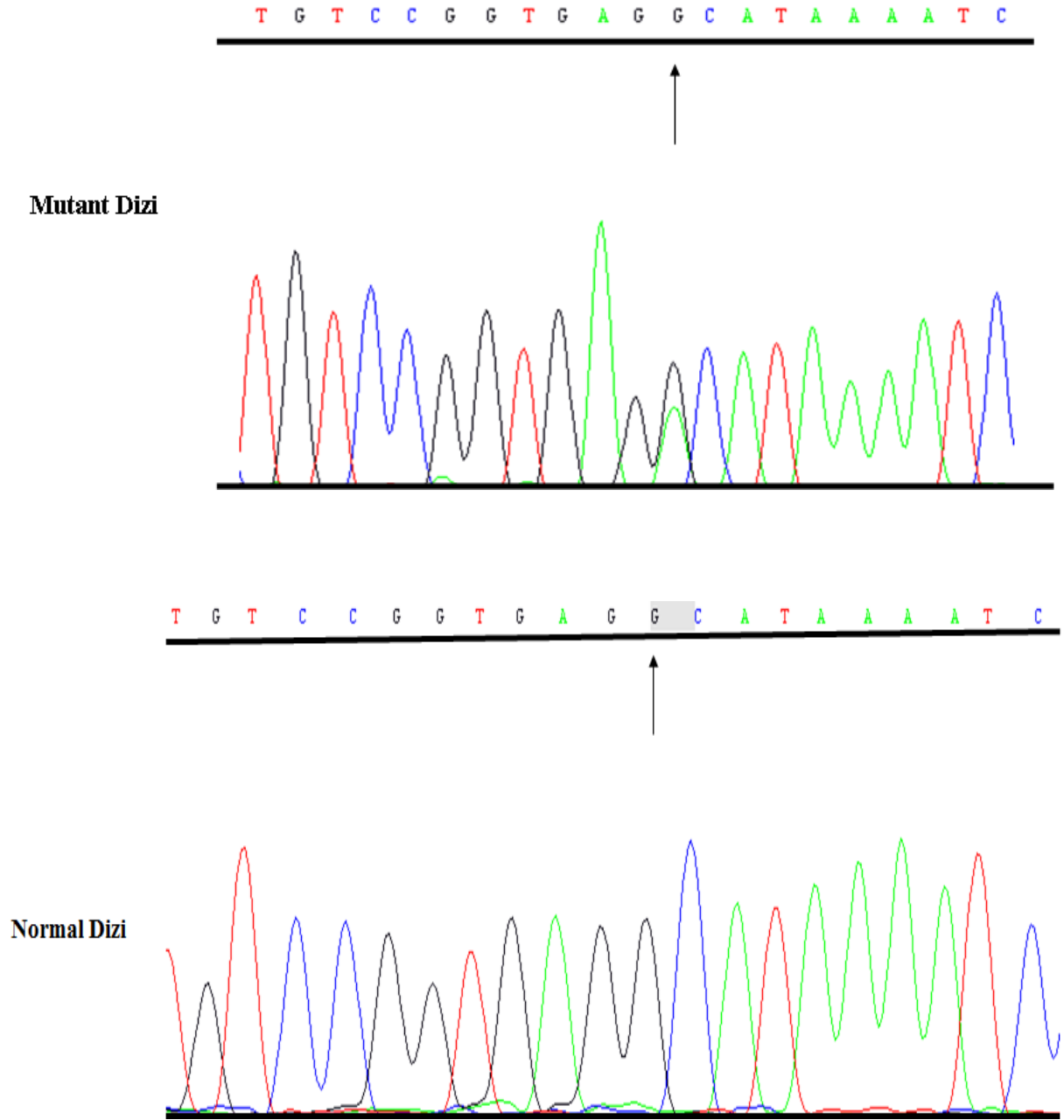
**Şekil 6.2.** *RYD5* geninin promotor bölgesinde saptanan c.-177 C>A nükleotit değişikliği

*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda promotor bölgesinin -103. pozisyonundaki guanin bazının adenin bazı (c.-103 G>A) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.34, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.23 olup, NP'li hastalarda *RYD5* (-103AA) genotip frekansı kontrol grubuna kıyasla yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.033) (Şekil 6.3).



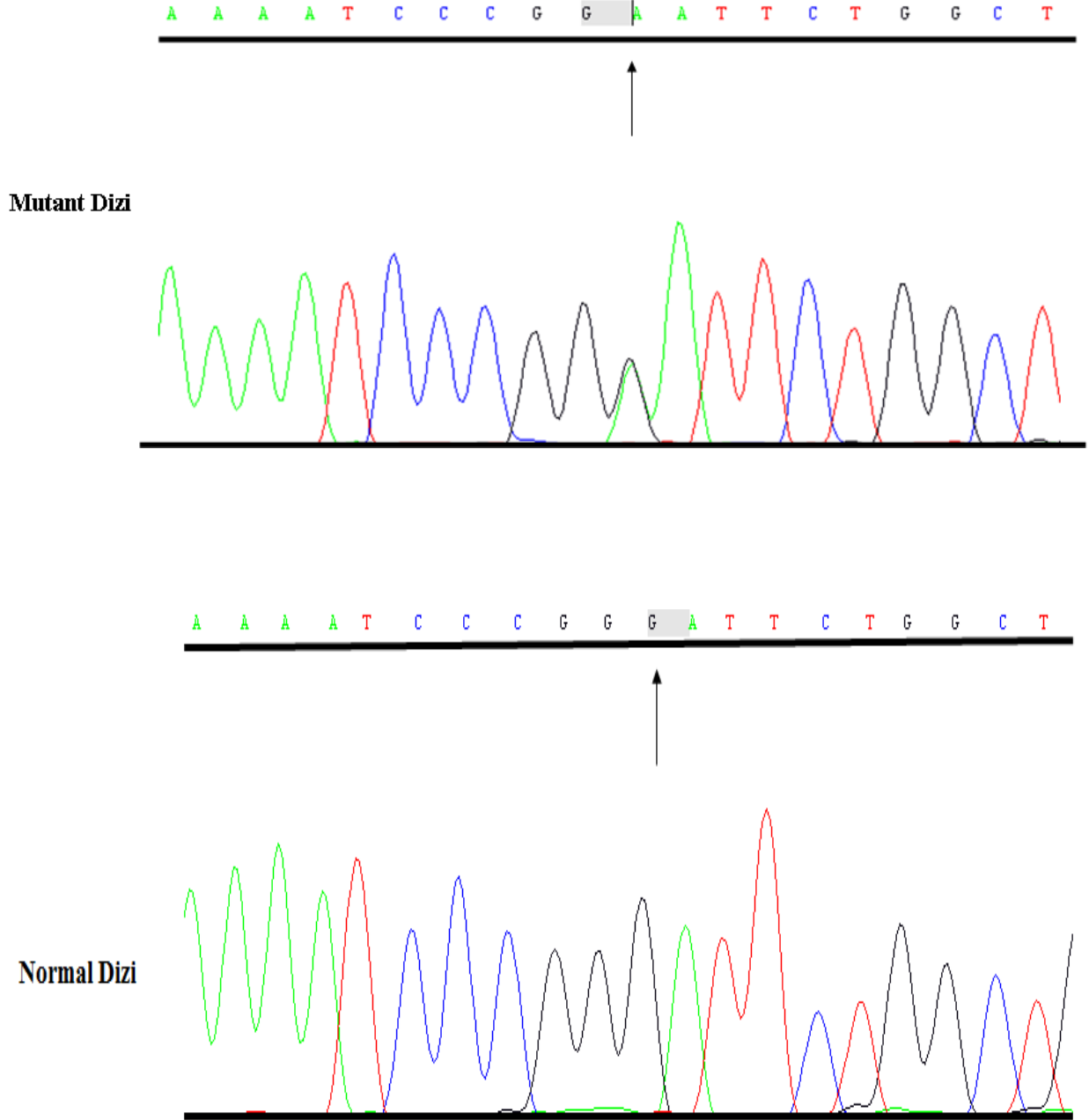
**Şekil 6.3.** *RYD5* geninin promotor bölgesinde saptanan c.-103 G>A nükleotit değişikliği

*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda promotor bölgesinin -49. pozisyonundaki guanin bazının adenin bazı (c.-49 G>A) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.01, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.00 olup, *RYD5* (-49GG, -49GA, -49GAA) genotip frekansı açısından NP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.204) (Şekil 6.4).



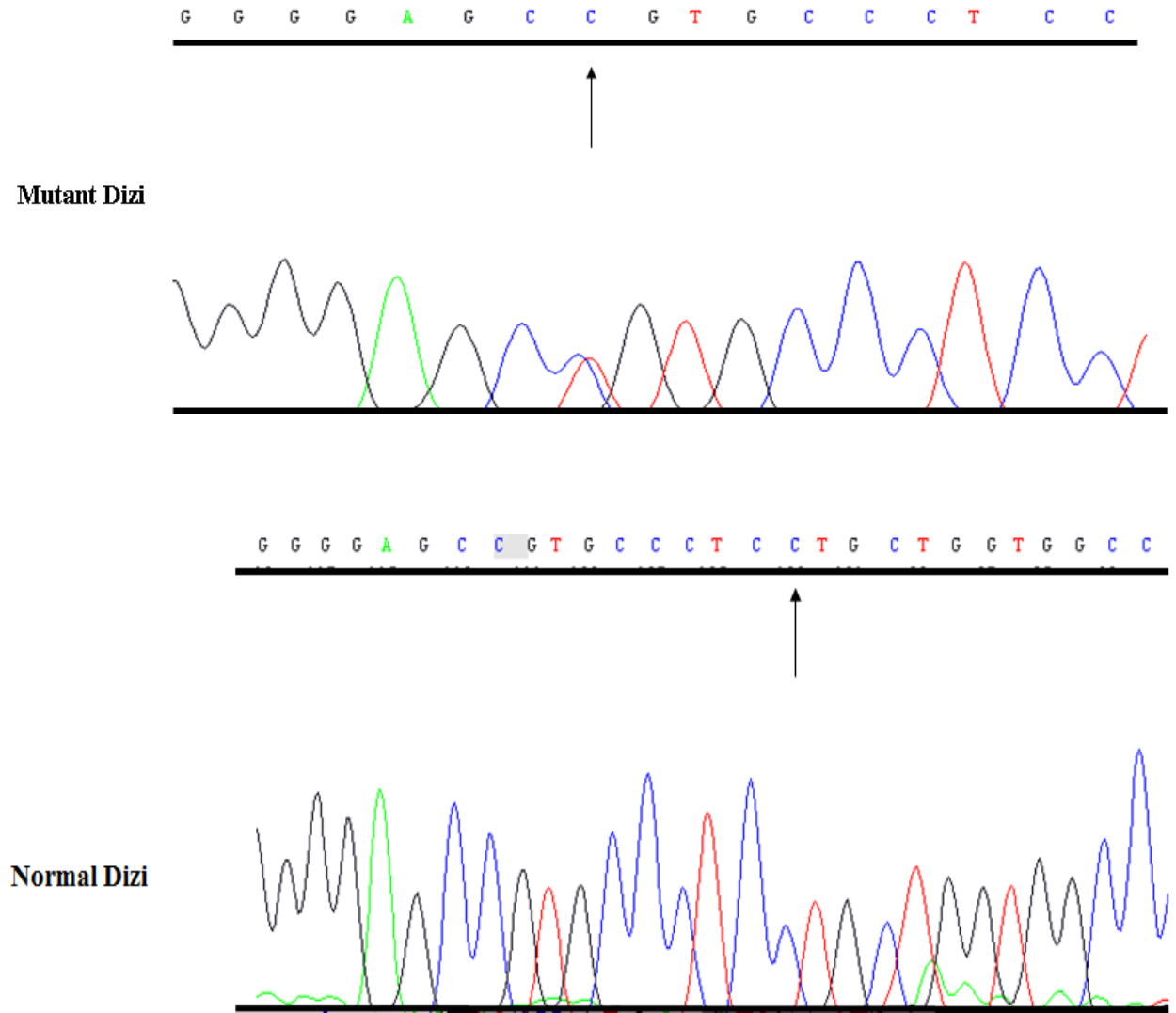
Şekil 6.4. *RYD5* geninin promotor bölgesinde saptanan c.-49 G>A nükleotit değişikliği

*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda promotor bölgesinin -35. pozisyonundaki guanin bazının adenin bazı (c.-35 G>A) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.01, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.05 olup, *RYD5* (-35GG, -35GA, -35AA) genotip frekansı açısından NP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.069) (Şekil 6.5).



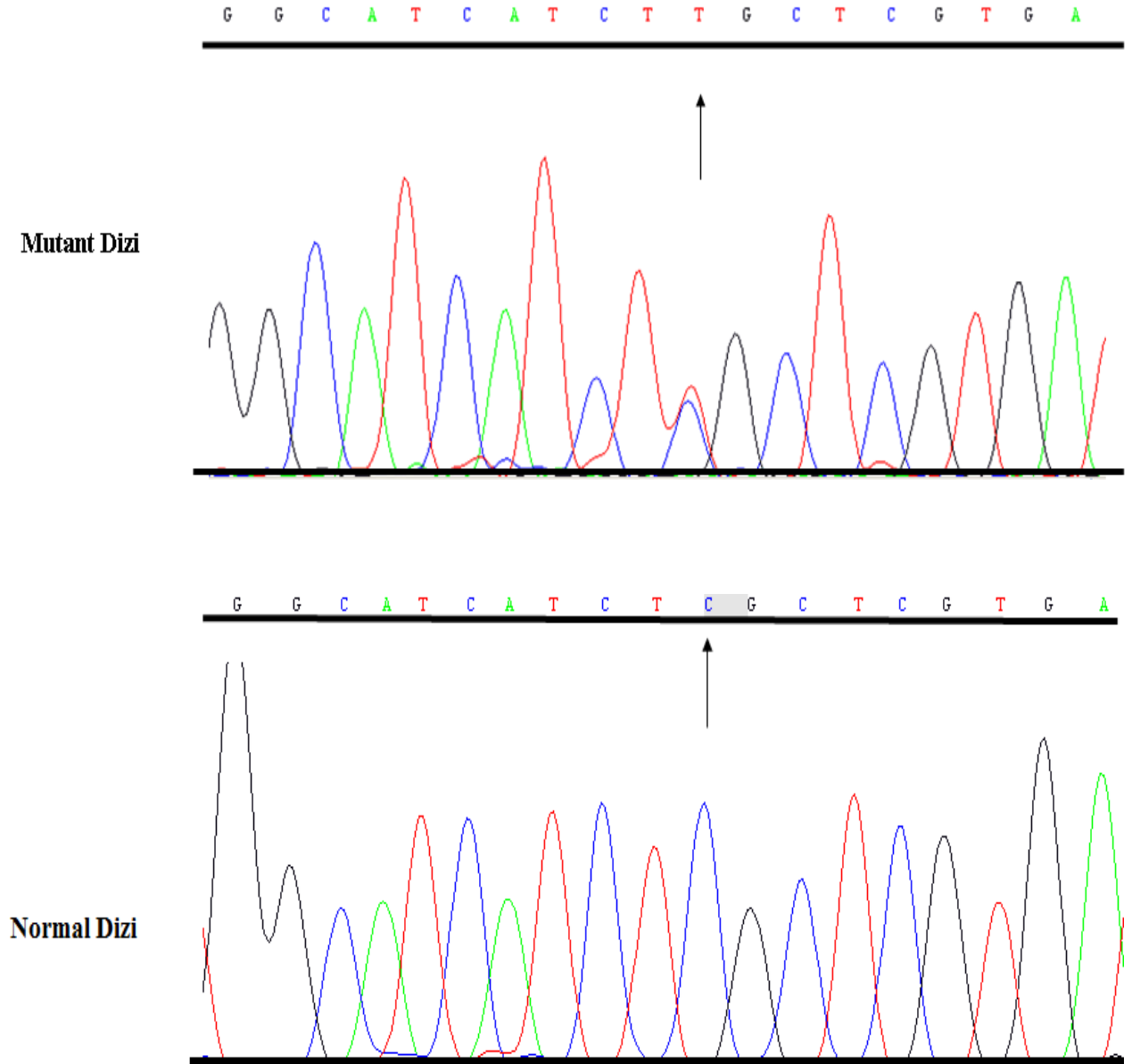
Şekil 6.5. *RYD5* geninin promotor bölgesinde saptanan c.-35 G>A nükleotit değişikliği

*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda birinci ekzon bölgesinin 13. pozisyonunda yer alan sitozin bazının timin bazı (c.13 C>T) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu değişiklik 5. kodonda arjinin amino asidinin sistein amino asidi ile yer değiştirmesine (R5C) neden olmaktadır (Şekil 6.6). 5. pozisyonundaki amino asidin 95 amino aside sahip *RYD5* proteinindeki yeri Şekil 6.9'da gösterilmiştir. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.46, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.52 olup, *RYD5* (13CC, 13 CT, 13TT) genotip frekansı açısından NP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.316$ ).



**Şekil 6.6.** *RYD5* geninin birinci ekzon bölgesinde saptanan c.13 C>T (R5C) nükleotit değişikliği

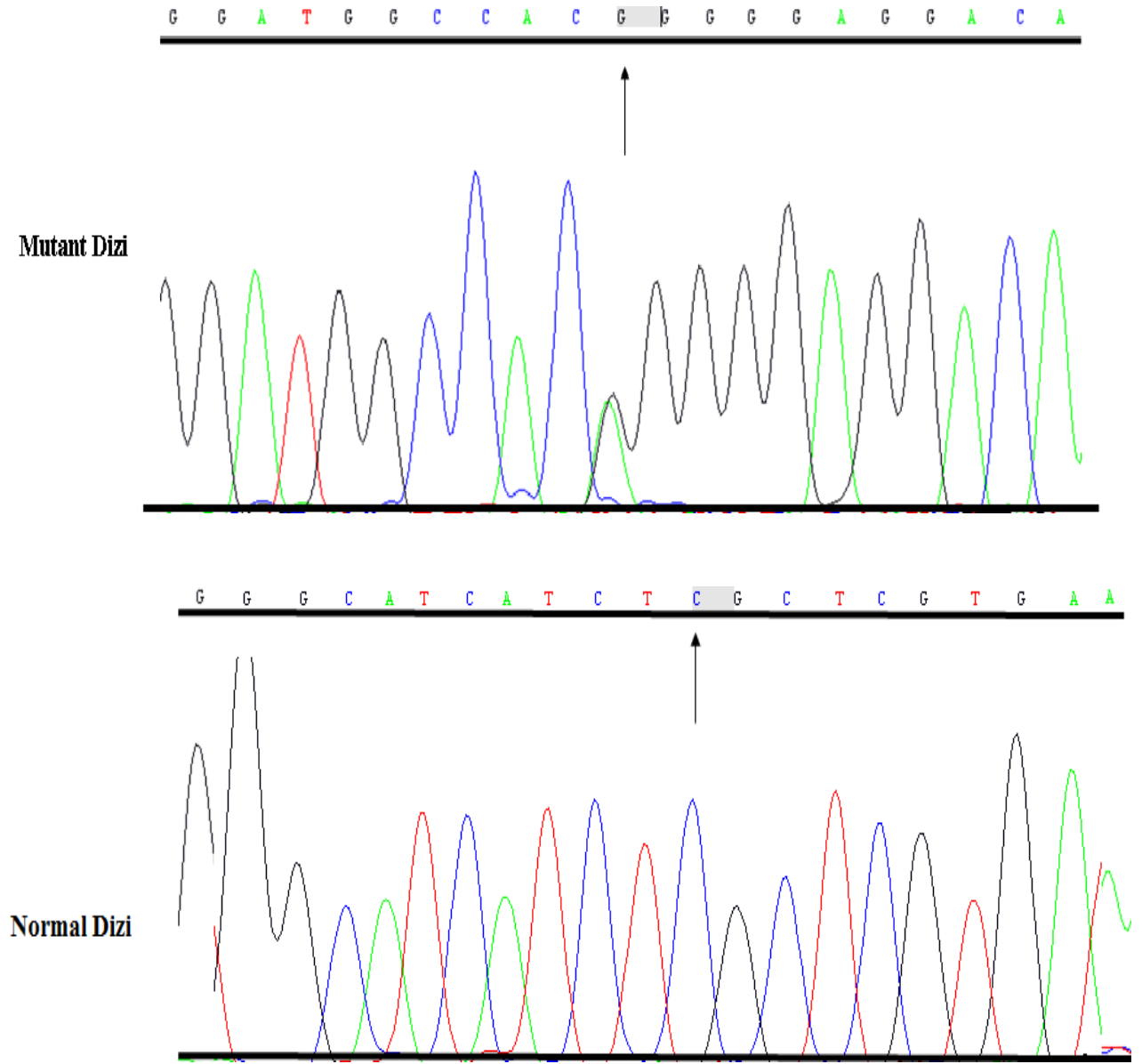
*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda birinci intron bölgesinin -14. pozisyonunda yer alan sitozin bazının timin bazı (c.57-14 C>T) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.46, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.23 olup, *RYD5* (57-14CC, 57-14CT, 57-14TT) genotip frekansı açısından NP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.751) (Şekil 6.7).



**Şekil 6.7.** *RYD5* geninin birinci intron bölgesinde saptanan c.57-14 C>T nükleotit değişikliği

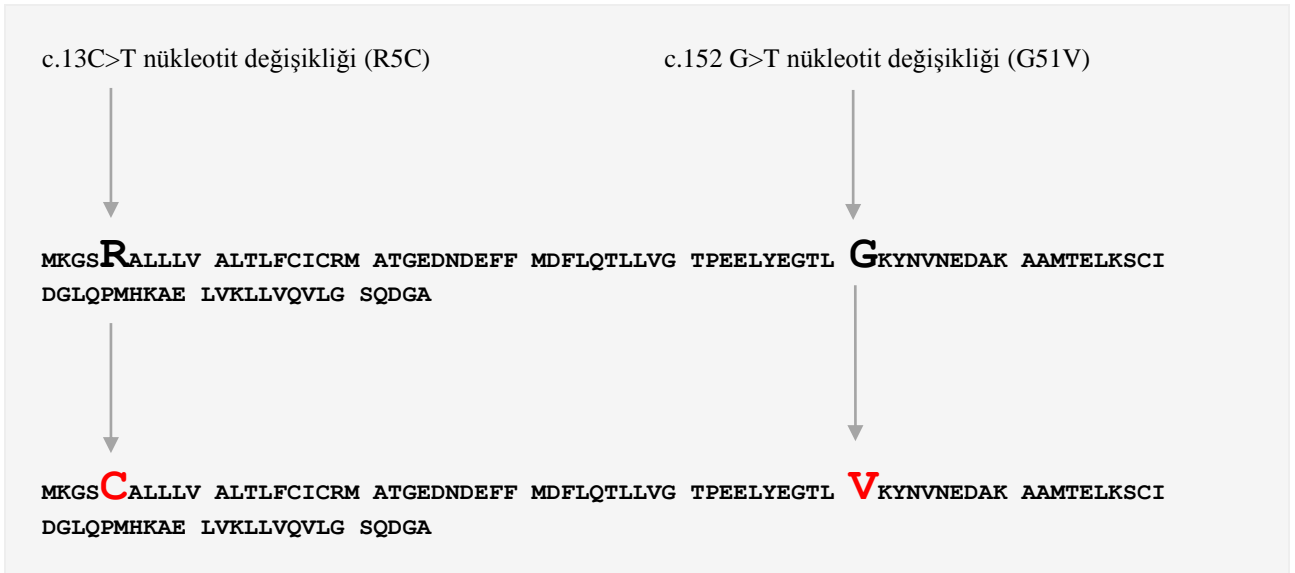


*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda ikinci ekzon bölgesinin 66. pozisyonunda yer alan adenin bazının guanin bazı (c.66 A>G) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.30, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.20 olup, *RYD5* (66AA, 66AG, 66GG) genotip frekansı açısından NP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.077$ ) (Şekil 6. 8).



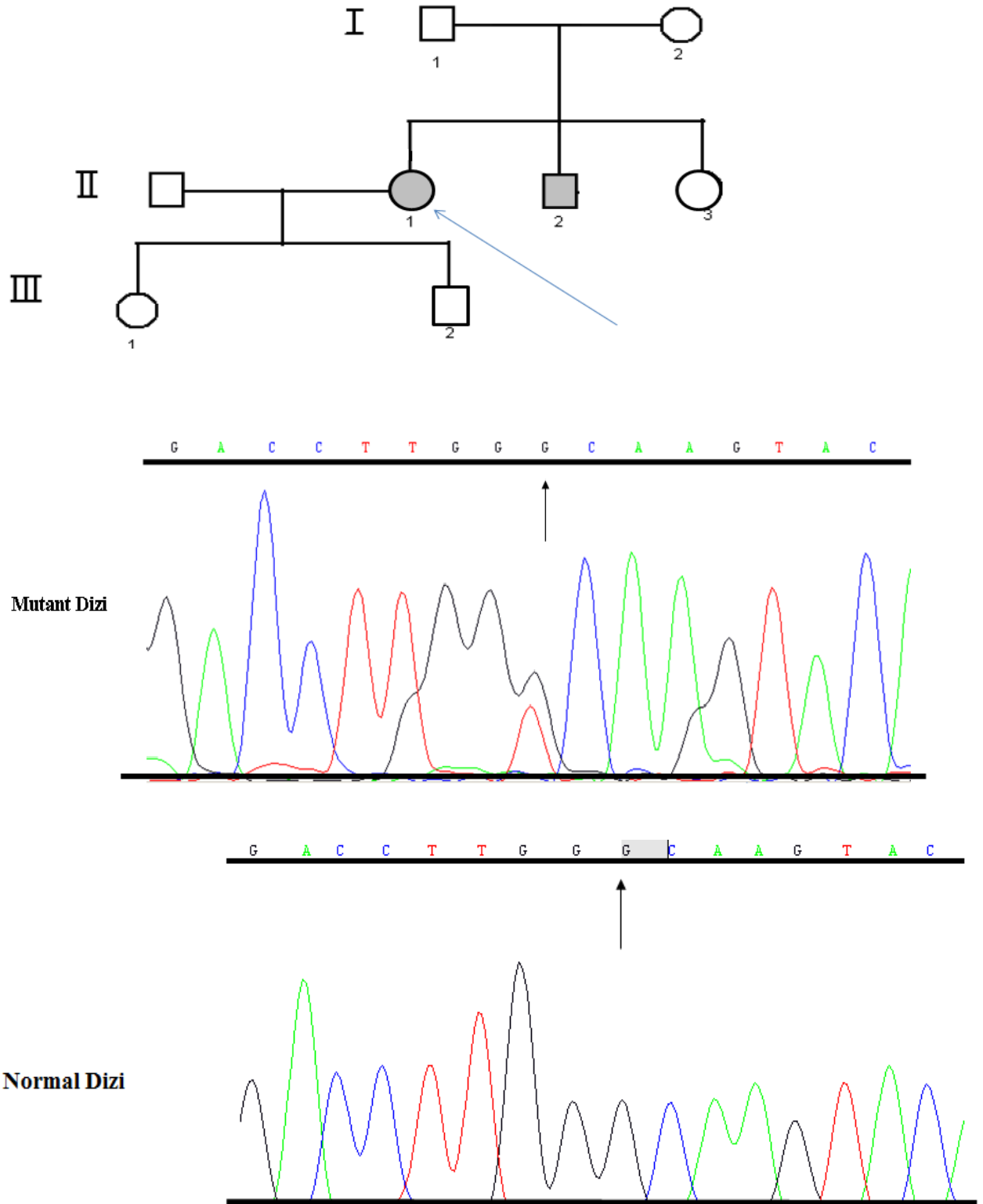
**Şekil 6.8.** *RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan c.66 A>G nükleotit değişikliği

*RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda ikinci ekzon bölgesinin 152. pozisyonunda yer alan guanin bazının timin bazı (c.152 G>T) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu değişiklik 51. kodondaki glisini amino asidinin valin amino asidi ile yer değiştirmesine (G51V) neden olmaktadır (Şekil 6.10). 51. pozisyondaki amino asidin 95 amino aside sahip *RYD5* proteinindeki yeri Şekil 6.9’da gösterilmiştir [211]. Bu nükleotit değişikliğinin NP’li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.01, kontrol grubundaki allel frekansı ise 0.00 olup, *RYD5* (152GG, 152GT, 152TT) genotip frekansı açısından NP’li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.204).



**Şekil 6.9.** RYD5 proteininin amino asit dizilimi [211].

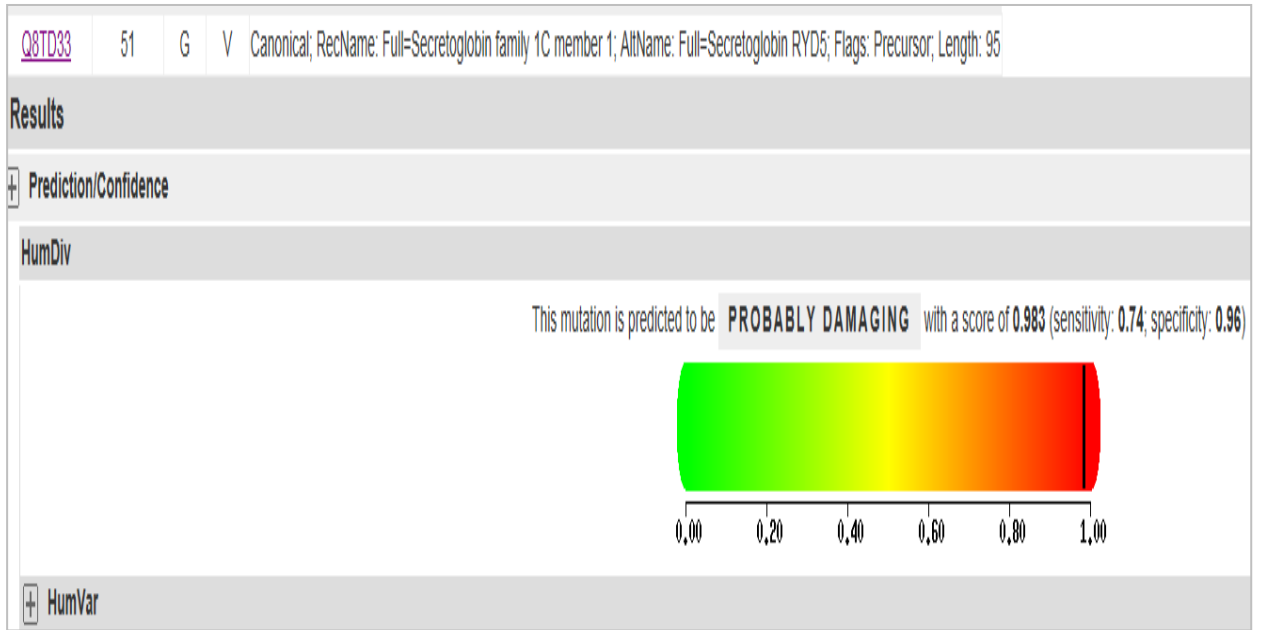
Bu çalışmada saptanan ve amino asit değişimine neden olan nükleotit değişiklikler.



**Şekil 6.10.** *RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan c.152 G>T (G51V) nükleotit değişikliği

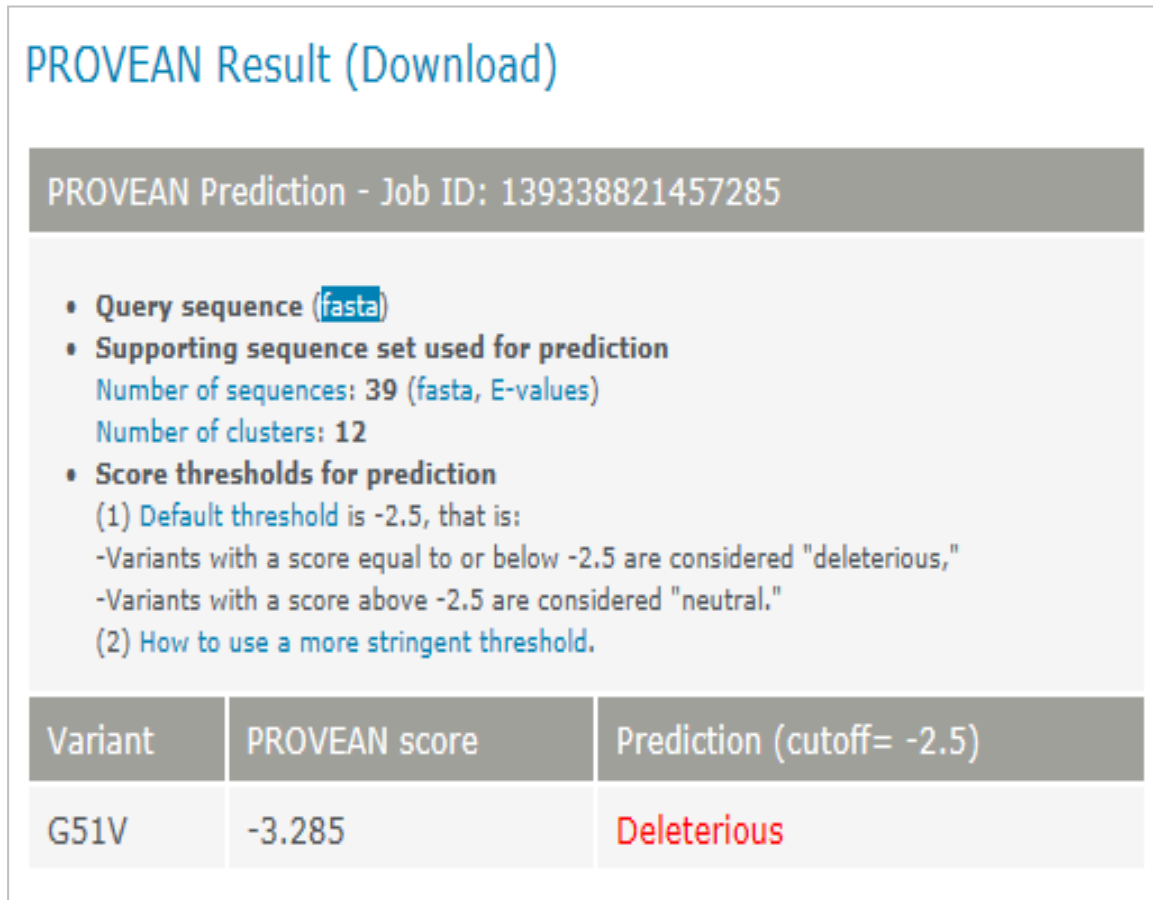
*RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinin 152. pozisyonunda yer alan guanin bazının timin bazı (c.152 G>T) ile yer değiştirmesi, 51.amino asit olan glisin valin amino asidine dönüşümüne (G51V) neden olmaktadır. Bu nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisini değerlendirmek için mutasyon tahmin programları (mutation prediction tools) arasında yer alan ve literatürde sıklıkla kullanılan PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) [212, 213], PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) [214] ve SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) [215] programları kullanılmıştır.

*RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152 G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisi PolyPhen-2 (PolyPhen-2 webserver v2.1.0) programında değerlendirilmiştir. Skor 0.983 olarak hesaplanmış ve zararlı bir varyant olduğu tahmin edilmiştir (Şekil 6.11) [216].



**Şekil 6.11.** *RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152 G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisinin PolyPhen-2 programına göre değerlendirilmesi [216].

*RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152 G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisi PROVEAN (PROVEAN v1.1) programında değerlendirilmiştir. Skor -3.285 olarak hesaplanmış ve zararlı bir varyant olduğu tahmin edilmiştir (eşik skoru: -2.5) (Şekil 6.12) [217].



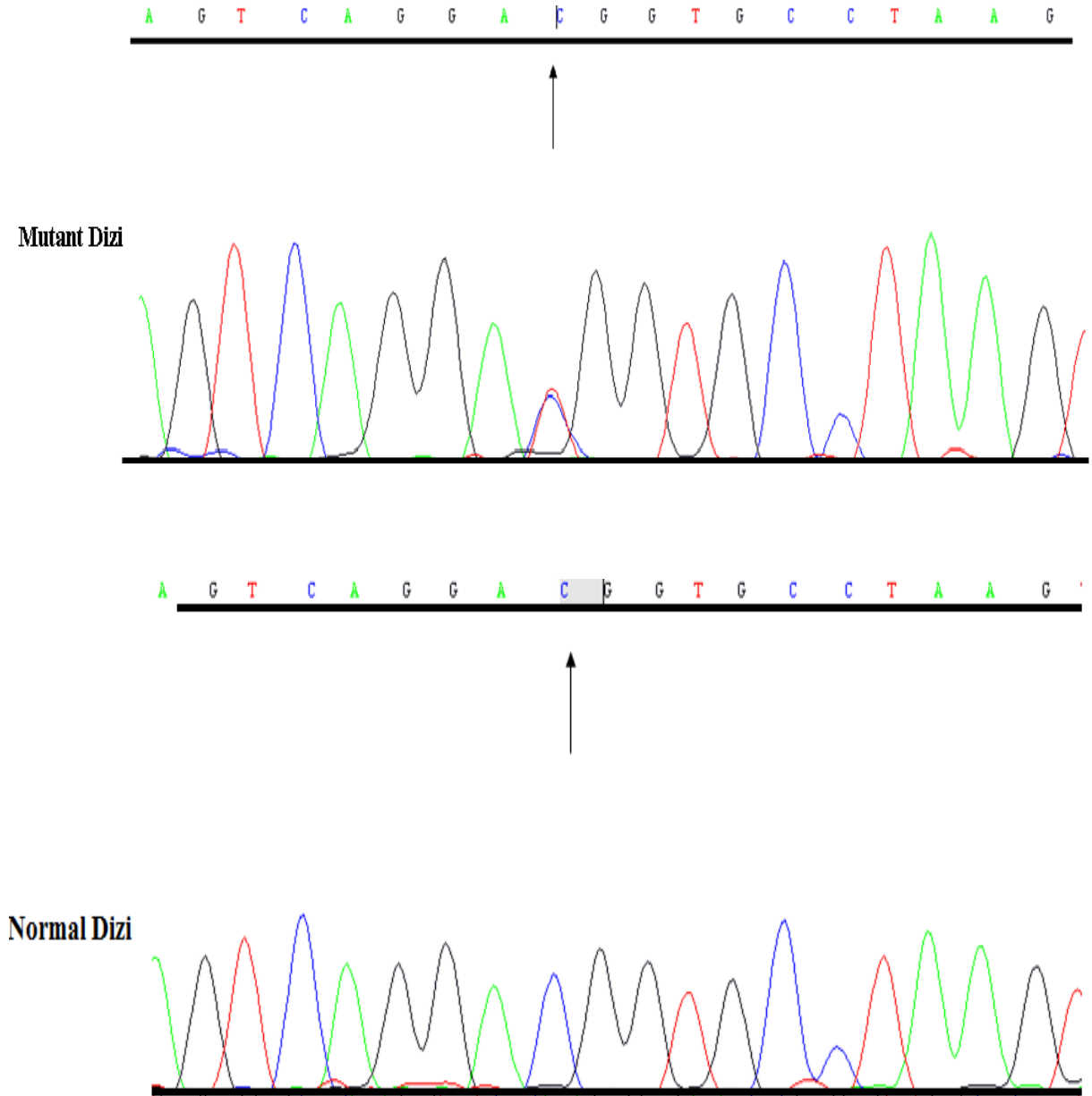
**Şekil 6.12.** *RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152 G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisinin PROVEAN programına göre değerlendirilmesi [217].

*RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152 G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisi SIFT (SIFT v4.0.3) programında değerlendirilmiştir. Skor 0.08 olarak hesaplanmış ve zararlı bir varyant olmadığı tahmin edilmiştir (eşik skoru: 0.05) (Şekil 6.13) [218].

| User Input          | ENSP            | Pos | Ref | Subst | Prediction | SIFT Score | Median Information Content | # Seqs |
|---------------------|-----------------|-----|-----|-------|------------|------------|----------------------------|--------|
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | A     | TOLERATED  | 0.27       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | C     | DAMAGING   | 0.02       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | D     | TOLERATED  | 0.52       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | E     | TOLERATED  | 1          | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | F     | DAMAGING   | 0.02       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | G     | TOLERATED  | 0.28       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | H     | TOLERATED  | 0.08       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | I     | DAMAGING   | 0.05       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | K     | TOLERATED  | 0.37       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | L     | TOLERATED  | 0.08       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | M     | DAMAGING   | 0.03       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | N     | TOLERATED  | 0.23       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | P     | TOLERATED  | 0.14       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | Q     | TOLERATED  | 0.31       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | R     | TOLERATED  | 0.19       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | S     | TOLERATED  | 0.25       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | T     | TOLERATED  | 0.16       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | V     | TOLERATED  | 0.08       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | W     | DAMAGING   | 0.01       | 2.8                        | 42     |
| ENSP00000344545,g51 | ENSP00000344545 | 51  | G   | Y     | DAMAGING   | 0.04       | 2.8                        | 42     |

**Şekil 6.13.** *RYD5* geninin ikinci ekzon bölgesinde saptanan (c.152 G>T) nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisinin SIFT programına göre değerlendirilmesi [218].

*RYD5* gen bölgesinin DNA dizi analizi sonucunda üçüncü ekzon bölgesinde 279. pozisyonunda yer alan sitozin bazının timin bazı (c.279 C>T) ile yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu nükleotit değişikliğinin NP'li hasta bireylerdeki allel frekansı 0.23, kontroldeki allel frekansı ise 0.17 olup, *RYD5* (279CC, 297CT, 279TT) genotipi açısından NP'li hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.402$ ) (Şekil 6.14).



Şekil 6.14. *RYD5* geninin üçüncü ekzon bölgesinde saptanan c.279 C>T nükleotit değişikliği

## 6.2. KTT-PZR Analiz Sonucu

KTT-PZR analizi sonucunda her örnek için kontrol geni olan *ACTB* geni ve *RYD5* genlerine ait CT değerleri belirlendi. Bu değerler LightCycler 2.0 cihazının karşılaştırmalı CT metodu kullanılıp değerlendirilerek, *RYD5* geninin farklı doku örneklerindeki ifade düzeyi saptandı (Çizelge 6.4, Şekil 6.15).

Çizelge 6.4. *RYD5* geni kantitatif KTT-PZR analizi

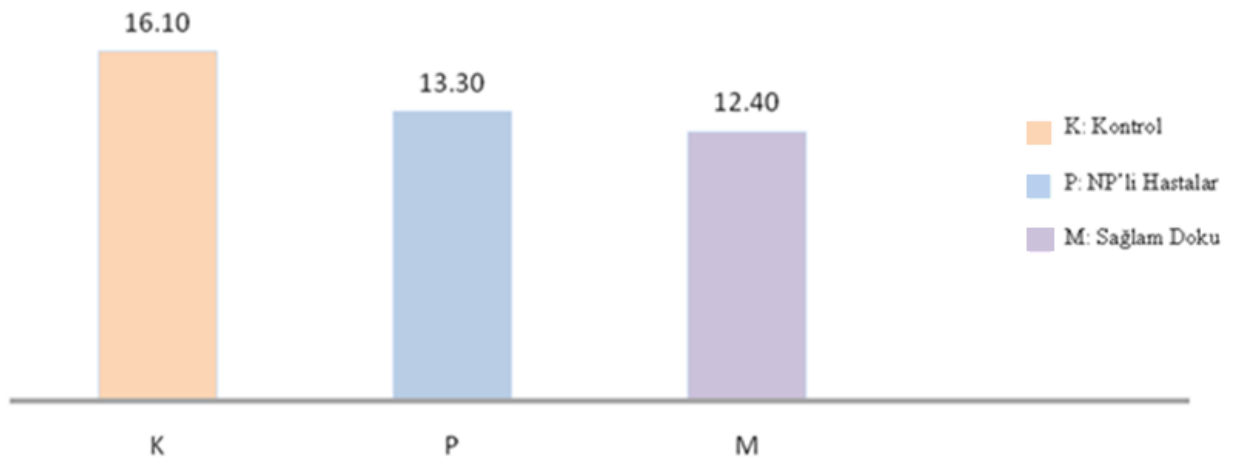
| Örneklerin Alındığı Bireyler | Örnek | Ortalama CT değerleri* | P **  | P *** |
|------------------------------|-------|------------------------|-------|-------|
| Kontrol, n                   | 10    | 16.1540 ± 4.28006      | 0.367 | 0.121 |
| Nazal polip dokusu, n        | 13    | 13.3373 ± 3.87472      |       |       |
| Sağlam mukoza, n             | 9     | 12.4472 ± 2.02930      |       |       |
| Toplam                       | 32    | 13.9672 ± 3.81740      |       |       |

\*Veriler ± SD olarak sunulmuştur.

\*\*P Nazal polip dokusu ile sağlam mukoza kıyaslanmıştır.

\*\*\*P Nazal polip dokusu ile kontrol kıyaslanmıştır.

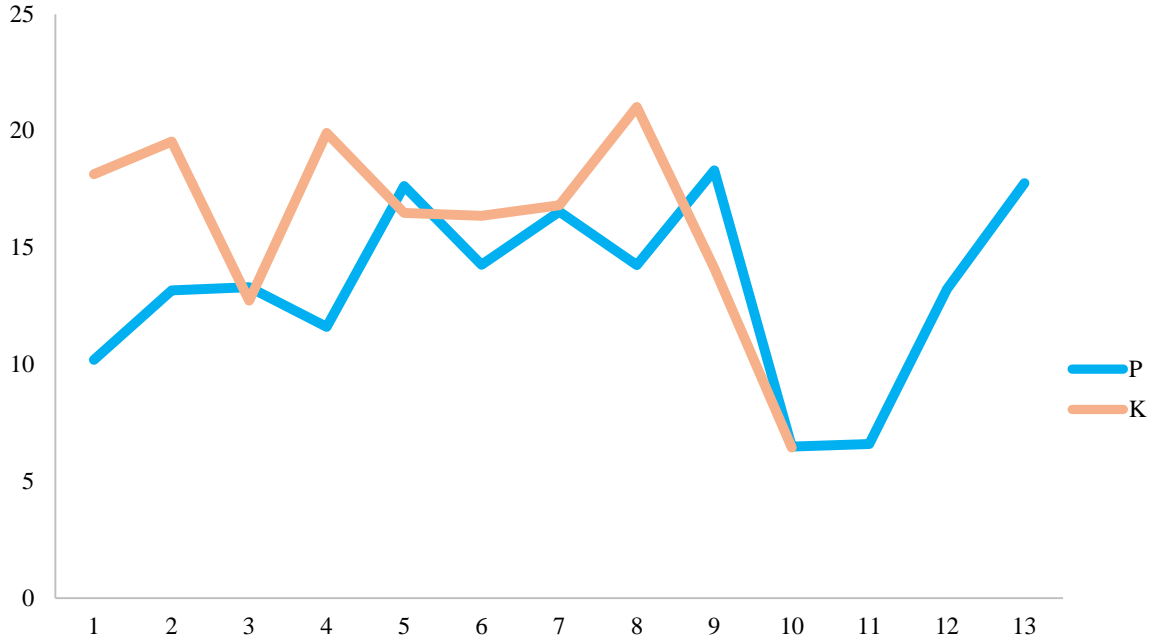
Mann whitney U'ye göre P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 6.15. NP'li hastalar, sağlam doku ve kontrol grubunda *RYD5* gen ifadesi düzeylerinin karşılaştırılması

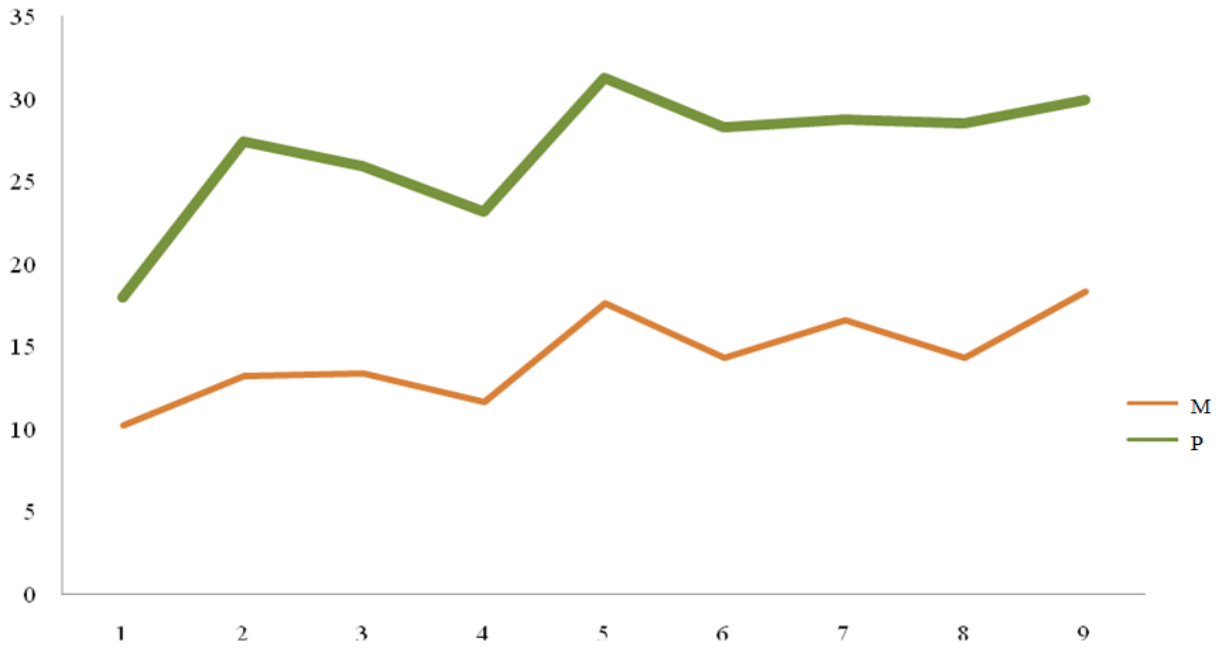


KTT-PZR analizi sonucunda kontrol grubunda belirlenen en düşük CT değeri 6.44, en yüksek CT değeri 21.02 ve ortalama CT değeri 16.15 olarak belirlenmiştir. NP'li hasta grubunda belirlenen en düşük CT değeri 6.48, en yüksek CT değeri 17.64 ve ortalama CT değeri 13.3373 olarak belirlenmiştir. *RYD5* geni ifade düzeyi bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna kıyasla nazal polip dokusunda genel olarak artmış olup, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.121$ ) (Şekil 6.16).



**Şekil 6.16.** NP'li hastalar (P) ve kontrol (K) grubunda *RYD5* geni ifade düzeylerinin karşılaştırılması

KTT-PZR analizi sonucunda NP'li hastanın sađlam dokusunda belirlenen en dűşűk CT deđeri 10.20, en yűksek CT deđeri 14.29 ve ortalama CT deđeri 12.4472 olarak belirlenmiřtir. *RYD5* geni ifade dűzeyi bakımından karřılařtırıldıđında NP'li hastanın sađlam dokusuna kıyasla, polip dokusunda genel olarak dűřműş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıřtır ( $p=0.367$ ) (řekil 6.17).



**şekil 6.17.** NP'li hastanın polip (P) ve sağlam dokusundaki (M) *RYD5* gen ifadesi dűzeylerinin karşılaştırılması

NP'li hastalar ve kontrol grubunda *RYD5* geninin ifade düzeyi ile tespit edilen genotiplerin dağılımı ve allel frekansları arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

## 7. TARTIŞMA

Birçok çalışmaya rağmen nazal polipozis patogenezi halen tam olarak açıklanamamıştır. Çalışmaların çoğu inflamasyona neden olan sitokin dengesine işaret etmektedir [55, 58, 60]. Bu nedenle yeni bir sitokin ailesi olmaya aday sekretoglobinler NP patogenezinde önem kazanmıştır [26, 29, 32]. *RYD5* geni, nazal mukozada bulunan Bowman bezinde ifade olur ve *RYD5* proteini nazal mukus içine salgınır. Koku molekülü bağlayıcı proteini (OBP) *RYD5*, belirli bir özgülük olmaksızın poliklorinat bifenilleri, steroidleri ve lipofilik yapıdaki koku moleküllerini bağlayarak, akciğer epitelinin korunmasından sorumludur [35, 37, 162, 180-182]. Bu proteinin sinonazal mukozadaki selüler yerleşimi henüz açık olmayıp, bu konuda in-situ hibridizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır [33]. Yapılan bir çalışmada, *RYD5* geninin ifade düzeyindeki artış ile polip formasyonu arasında bir ilişkili olabileceği bildirilmiştir [33]. DNA dizi farklılıklarının yaklaşık %90'ından sorumlu olan tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) insanlarda genetik varyasyonların en sık görülen tipidir [219]. Genetik çalışmalarda SNP'ler insan evrimini [220] karakterize ettikleri farklı insan popülasyonlarında farklı dağılımlara sahip olarak tür tarihimizin [221] aydınlanmasını sağladığı ve son olarak bir çok genetik hastalıktan [215, 222] sorumlu oldukları için oldukça önemlidir. *RYD5* genindeki nükleotit değişiklikleri genin transkripsiyon yeteneğini ve/veya protein yapısını değiştirerek, çevresel faktörlerle birlikte hastalık fenotipinin ortaya çıkışını hızlandırarak, yatkınlık nedeni olabilir. Bildiğimiz kadarıyla şimdiye kadar literatürde, *RYD5* genindeki nükleotit değişiklikleri ile NP arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma mevcut değildir.

Tez çalışmamız kapsamında *RYD5* genindeki hastalık nedeni olabilecek nükleotit değişiklikleri, bunların *RYD5* proteini üzerindeki etkileri ve gen ifade düzeyindeki değişiklikler ile NP patogenezi arasındaki ilişki araştırılmış olup, 91 nazal polipozisli hasta ve 110 sağlıklı birey kontrol grubumuza dahil edilmiştir.

Bu çalışmada, *RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda, promotor bölgesinin -177. pozisyonunda yer alan sitidin nükleotidinin adenozin nükleotidiyle (c.-177 C>A), -49. pozisyonunda guanozin nükleotidinin adenozin nükleotidiyle (c.-49 G>A), -35. pozisyonunda guanozin nükleotidinin adenozin nükleotidiyle (c.-35 G>A) yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu tek nükleotit değişiklikleri daha önce literatürde tanımlanmıştır [184]. *RYD5* (-177CC, -177CA -177AA), (-49GG, -49GA -49AA), (-35GG, -35GA, -35AA) genotip frekansları

açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0.69$ ,  $p=0.204$ ,  $p=0.069$ ) (Şekil 6.2, 6.4, 6.5). Promotor bölgede yer alan tek nükleotit değişiklikleri, genin transkripsiyon yeteneği üzerinde etkindir. *RYD5* geninde tespit edilen (c.-177 C>A), (c.-49 G>A), (c.-35 G>A) nükleotit değişiklikleri, genin ifade düzeyini etkilememekte ve kodlayıcı bölgede yer almadıkları için *RYD5* proteininde amino asit değişikliği yapmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, DNA dizi analizi sonucunda promotor bölgesindeki -264. pozisyonunda yer alan adenozin nükleotidinin guanozin nükleotidiyle (c.-264 A>G), -103. pozisyonunda yer alan guanozin nükleotidinin adenozin nükleotidiyle (c.-103 G>A) yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu tek nükleotit değişiklikleri daha önce literatürde tanımlanmıştır [183]. *RYD5* (-264AG), *RYD5* (-103AA) genotip frekansları hastalarda yüksek bulunmuş olup, istatistiksel olarak anlamlıdır (sırasıyla  $p=0.002$ ,  $p=0.033$ ) (Şekil 6.1, 6.3). Kalıtımla geçen hastalıkların %1'inden azında mutasyonlar genlerin düzenleme bölgelerinde yani promotorda meydana gelir. Alzheimer, obezite ve kalp hastalıkları gibi bazı kompleks hastalıklarla ilişkililerin promotor bölgesindeki nükleotit değişikliklerinin hastalığın oluşumuna zemin hazırladığı bilinmektedir [223, 224]. Hastalık tek bir mutasyon veya allellik varyasyonla ilişkili olmayıp, birden fazla SNP veya mutasyonun ortak etkisi ile ortaya çıkabilir. Nadir alleller bir araya geldiğinde hastalık için zemin hazırlayabilir. Bu nadir alleller çevresel faktörlerin de katkısıyla hastalık patogenezinin oluşmasında etkin rol oynayabilir [225-227]. *RYD5* geninde saptanan c.-264A>G ve c.-103G>A nükleotit değişiklikleri, transkripsiyonun başlama bölgesinden önceki promotor bölgesinde yer almaktadır. *RYD5* geninin -264 ve -103 lokasyonlarındaki nükleotidleri sırasıyla A→G ve G→A şeklinde dönüştüren bu nokta mutasyonları, gende artmış transkripsiyonel aktiviteye neden olabilir. Promotor içinde yer alan bağlanma bölgesinin, belirli bir nükleer proteine olan afinitesini artırarak, daha yüksek seviyede ifade olmasına neden olabilir. Sonuç olarak, artmış *RYD5* protein seviyesinden sorumlu olabilecek bu nokta mutasyonları (c.-264 A>G ve c.-103 G>A), hastalık fenotipinin ortaya çıkışını hızlandıran, yatkınlık nedeni olabilirler.

Bu tez kapsamında, *RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda birinci intron bölgesinde -14. pozisyonunda yer alan sitidin nükleotidinin adenozin nükleotidiyle (c.57-14 C>T) yer değiştirdiği saptanmıştır. Bu tek nükleotit değişikliği daha önce literatürde tanımlanmıştır [183]. *RYD5* (57-14CC, 57-14CT, 57-14TT) genotip frekansı açısından hasta ve kontrol

grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p=0.751$ ) (Şekil 6.7). İnsan genomunun yarısından fazlası kodlama yapmayan oldukça korunmuş bölgelerden oluşmaktadır. Kodlayıcı bölgelerdeki nükleotit değişikliklerinin fenotipe yansımalarıyla, bu değişikliklerin etkisi görürünür hale gelebilirken, kodlayıcı olmayan bölgelerdeki nükleotit değişikliklerinin hastalıkla ilişkisini anlamak oldukça zordur. Bu nedenle kodlayıcı olmayan bölgeler hakkındaki bilgimizi artırmak için araştırmacılar kodlayıcı bölgeler üzerinde daha çok çalışmaktadır [228-231]. Birinci intronun 14. nükleotidinde meydana gelen bu nükleotit değişikliği, genin kodlayan bölgesinde yer almadığından amino asit değişimine neden olmamaktadır. İtron-ekzon birleşim bölgesinde meydana gelen bu nükleotit değişikliği (c.57-14 C>T) zayıf bağlantı bölgesinin oluşumuna neden olarak, hastalık patogenezine katkı sağlayabilir.

Bu çalışma kapsamında, *RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda ikinci ekzon bölgesinin 66. pozisyonunda yer alan adenozin nükleotidinin guanozin nükleotidiyle (c.66 A>G), üçüncü ekzon bölgesinin 279. pozisyonunda yer alan sitidin nükleotidinin timidin nükleotidiyle (c.279 C>T) yer değiştirdiği saptanmış olup, bu değişiklikler daha önce literatürde tanımlanmıştır [183]. *RYD5* (66AA, 66AG, 66GG), (279CC, 279CT, 279TT) genotip frekansları açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p=0.077$ ,  $p=0.402$ ) (Şekil 6.8, 6.14). Ekzonlar genlerin fonksiyonel kısımları olup, amino asitleri kodlayan bölgeleri içerirler. Ayrıca ekzonlar fonksiyonel varyasyonlarca zengin olup, bunların çoğunun hastalık fenotipiyle ilişkili olduğu bilinmektedir [232]. *RYD5* geninin ikinci ve üçüncü ekzon bölgesinde tespit edilen (c.66 A>G) ve (c.279 C>T) nükleotit değişikliklerinin bulunduğu kodonlar değişmediği için kodladıkları amino asitler de değişmemektedir. Sonuç olarak, *RYD5* proteinin yapısında yer alan amino asitler değişmediği için proteinin üç boyutlu yapısının korunduğu söylenebilir.

Bu tez çalışmasında, *RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda birinci ekzon bölgesinin 13. pozisyonunda yer alan sitidin nükleotidinin timidin nükleotidiyle (c.13 C>T) yer değiştirdiği saptanmış olup, bu değişiklik daha önce literatürde tanımlanmıştır [185]. Bu değişiklik, *RYD5* proteininde 5. pozisyonunda yer alan polar yüklü bir amino asit olan arjininin polar yüksüz bir amino asit olan sistein ile yer değiştirmesine (R5C) neden olmaktadır (Şekil 6.6, 6.11). *RYD5* (13CC, 13CT, 13TT) genotip frekansı açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p=0.316$ ). *RYD5* proteini, diğer salgı proteinlerinde olduğu gibi,

hedef organelere yönelmek için gerekli bir sinyal peptidinde sahiptir. Yirmi üç amino asitlik bu sinyal peptid, *RYD5* geni cDNA'sının 21-89 arasındaki nükleotidleri tarafından kodlanır [173, 175].

Genel olarak salgı proteinlerinin N-terminal uçlarında yer alan sinyal peptidleri translokasyon için gereklidir. Sinyal peptid, hücre-hücre iletişimine yardım eden hücre yüzeyi reseptörlerinin lokalizasyonu ve ligandların fonksiyonu için çok önemlidir. UniProt (The Universal Protein Resource) veri tabanında yer alan tüm insan proteinlerinin yaklaşık %4'ünün N terminal sinyal peptidi vardır. Yirmibir insan proteininde sinyal peptid domainindeki SNP'lerin bazı hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu hastalıklardaki mutasyonlar sinyal peptid fonksiyonunun veya hücre içi protein taşıma sisteminin bozulmasından sorumludur [233]. Sinyal peptid, sinyal peptid tanıyıcı partikül (SRP) tarafından tanınır ve endoplazmik retikulum (ER) membranındaki SRP-reseptörüne tutunur. Protein ER zarı üzerindeki porlardan lümenine doğru salınır. ER lümeninde sinyal peptid enzimlerle kesilerek, katlanma, oligomerizasyon ve glikozillenme gibi çeşitli değişikliklere uğrayan olgun protein haline dönüşür [234, 235]. *RYD5* geninin birinci ekzon bölgesinde tespit edilen (c.13 C>T) nükleotit değişikliği sonucunda, yan zincirinde proton alıcısı bir gruba sahip arjinin amino asidinin yerine yüksüz ve H-bağı yapabilen bir gruba sahip olan sistein amino asidinin geçmesi ve sinyal peptidin hidrofobik yapısını değiştirerek, daha az kararlı bir yapı kazanmasına neden olabilir. Bu yanlış anlamlı nükleotit değişikliği, sinyal peptidin ER membranındaki SRP-reseptöre bağlanmasını azaltarak, *RYD5* proteininin porlardan lümenine geçmesine engel olabilir [171, 234, 235].

Tez çalışmasında, *RYD5* geninin DNA dizi analizi sonucunda ikinci ekzon bölgesindeki 152. pozisyonunda yer alan guanozin nükleotidinin timidin nükleotidiyle (c.152 G>T) yer değiştirdiği saptanmış olup, bu değişiklik ilk kez bu çalışmada tanımlanmıştır. Bu değişiklik 51. pozisyondaki kodonda apolar bir amino asit olan glisin yerine apolar yüksüz bir amino asit olan valin girmesine (G51V) neden olmaktadır (Şekil 6.10, 6.11). *RYD5* (152GG, 152GT, 152TT) genotip frekansı açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (p=0,204). NP'li hastalarda saptanan nükleotit değişiklikleri arasında yer alan (c.152 G>T) nükleotit değişikliği *RYD5* proteini üzerinde amino asit değişikliği meydana getirmektedir. Glisin apolar özellikte bir amino asit olup, bu değişiklik sonucunda apolar yüksüz bir amino asit olan valin protein (G51V) yapısına girmektedir. Bu tür nükleotit

değişikliklerinin, protein üzerindeki etkisinin patolojik protein katlanmalarına ya da stabil olmayan protein üretimine neden olduğu fonksiyonel çalışmalar yapılmadan ispatlanamaz. Ancak günümüzde araştırmacılar bu tür nükleotit değişikliklerinin protein üzerindeki etkilerini tahmin edebilmek için farklı “in-silico” analiz yöntemleri kullanmaktadır. Bilgisayar tabanlı bu programlar sayesinde farklı mutasyon veri tabanları kullanılarak, bu nükleotit değişiklikleri hakkında değerlendirmeler yapılabilmektedir. Bu mutasyon tahmin programları (mutation prediction tools), farklı algoritmalar kullanarak araştırmacılara mutasyonun etkisi hakkında bir tahmin yapma imkanı sunar.

Bu nükleotit değişikliğinin (c.152 G>T), RYD5 proteini üzerindeki etkisini değerlendirmek için literatürde sıklıkla kullanılan PROVEAN [212, 213], PolyPhen-2 [214] ve SIFT [215] programları kullanılmıştır. SIFT programına göre, bu nükleotit değişikliğinin (c.152 G>T) protein üzerinde patolojik bir etkisi olmayıp, tolere edilebilir bir protein varyasyonuna neden olmaktadır. PROVEAN ve PolyPhen-2 programına göre, bu nükleotit değişikliğinin protein üzerinde zararlı bir etkisi olup, bu değişiklik tolere edilemeyen patolojik bir protein varyasyonuna neden olmaktadır (Şekil 6.11, 6.12, 6.13) [216-218].

Bir nükleotit değişikliğinin polimorfizm mi yoksa patolojik bir mutasyon mu olduğunun değerlendirilmesinde toplum taramaları son derece önemlidir. Nadir polimorfik varyantlar farklı etnik kökene sahip toplumlarda çok farklı çeşitliliğe ve dağılıma sahip olabilir. Bu nedenle nadir alleller değerlendirilirken dünya toplumlarıyla karşılaştırmanın yanı sıra üzerinde çalışılan topluma ait genetik yapının bilinmesi de son derece önemlidir. Mutasyon olarak tanımlanan bazı değişiklikler ya da allel frekansı bir toplum için yüksek bulunarak polimorfizm olarak değerlendirilen nükleotit değişiklikleri, farklı bir popülasyonda hiç saptanmayabilir ya da çok nadir bir allel olarak bulunabilir [227, 236].

Valin gibi apolar amino asitler hidrofobik özellik gösteren yan gruplara sahiptir. Glisinin yan zinciri olmadığından, bu amino asit iki polipeptid ana zincirinin (veya aynı polipeptid segmentinin) birbirlerine yaklaşabilecekleri bölümleri oluşturabilir. Ayrıca glisin, diğer amino asitlerden çok daha esnek olup, bu sayede ana zincirin hareket ettiği ve hatta kırıldığı bölümleri oluşturabilir. En küçük amino asit olması nedeni ile diğer amino asitlerin sığamadığı birçok yere sığabildiğinden protein katlanmasını da etkiler [242, 243]. Bu yanlış anlamlı mutasyona neden olan nükleotit değişikliğinin (c.152 G>T; G51V) RYD5 proteininin



konformasyonunu ve ligand bağlama yüzeyinin etkinliğini değiştirip, fonksiyonel bozukluğa neden olabilir.

Kalıtsal hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalar genlerin protein kodlayan bölgelerindeki genetik varyasyonların önemine dikkat çekmiştir [237]. Proteini kodlayan gen bölgesi olan ekzonların veya ekzomun daha fonksiyonel genetik varyasyonlara sahip olduğu inancı yaygın olup, çalışmalar Mendel tipi kalıtıma tabi hastalıklara neden olan gen mutasyonlarına odaklanmıştır [238]. Kodlama bölgesindeki mutasyonlar protein üzerinde amino asit değişimine neden olmayabilir, fakat hastalıkla ilişkili mutasyonların sıklığı bu tip anlamsız mutasyonların oluşma sıklığından daha yüksektir (~% 60) [237]. Alzheimer, Parkinson ve Creutzfeldt-Jakob gibi birçok hastalığın patofizyolojisinden, protein üzerinde bir amino asit değişimine neden olan nokta mutasyonları sorumludur [238-341]. Bu değerlendirmeler ışığında Türk toplumunda 110 kontrol bireyde yapılan DNA dizi analizi sonucunda *RYD5* geninde c.152 G>T nükleotit değişikliği (G51V) saptanmamıştır. Literatürde de böyle bir mutasyon olmadığı bilgisinden yola çıkılarak, bu nükleotit değişikliğinin patolojik bir mutasyon olabileceği ileri sürebilir.

Bir diğer önemli konu mutasyonun yer aldığı polipeptit dizisinin türler arasındaki korunmuşluğunun değerlendirilmesidir. Korunmuş bölgede meydana gelen değişiklikler protein üzerinde sıklıkla yıkıcı etkilere sahip olabilmektedir. *RYD5* proteini 95 amino asite sahip olup, bunun 25-93 arasındaki amino asitleri sekretoglobinde korunmuş ortak dizilerdir. Bu amino asit dizisi sekretoglobinde ortak olan protein fonksiyonu ve konformasyonu için gereklidir [173, 175]. Korunmuş bölgede yer alan glisin amino asiti sahip olduğu özellikler açısından oldukça kritik bir öneme sahiptir.

Bu nükleotit değişikliği (c.152 G>T) sadece bir hastada (1/91) tespit edilmiş olup, hasta NP tedavisine cevap vermemiş ve cerrahi operasyon kararı verilmiştir. Ayrıca hastanın polip 3.evre, alerji ve astım olması dikkat çekicidir. Hastanın her iki çocuğunda alerji ve sık geçirilen ÜS YE (üst solunum yolu enfeksiyonu) öyküsü vardır. Hastanın babası alerji ve astım hastası olup, bir kardeşinde alerji, bir kardeşinde ise alerji ve NP vardır.

c.152 G>T nükleotit değişikliği sekretoglobinin korunmuş amino asit dizisinde değişikliğe neden olduğundan, hasta ile ailesinin bu nükleotit değişikliği, diğer sekretoglobiner ve

inflamatuvar hastalıklar açısından değerlendirilmesi, sekretoglobinin patofizyolojik fonksiyonlarına ilişkin yeni veriler sağlayacaktır.

Nazal polipozisli hastalarda yapılan bir çalışmada, sekretoglobinin diğer bir üyesi olan *SGB2A2* geninin ifade düzeyinde artış olduğu bildirilmiştir [33]. Yayınlanan raporlarda, *SGB2A2* geninin, kromozom 11q12.3-13.1.3'te, *SCGB1A1* geninin kromozom 11q12.2-13.1'de ve *RYD5* geninin kromozom 11p15.5'te lokalize olduğu tespit edilmiştir [244]. Ayrıca, süper ailenin diğer üyelerinden *SCGB1D1* geni kromozom 11q13, *SCGB1D2* geni kromozom 11q13, *SCGB1D4* geni kromozom 11q12.3, *SCGB2A1* geni kromozom 11q13'te lokalize olmuştur [29]. Farklı çalışmalarda, kromozom 11q13.1 yer alan CD20 ve TCN1 arasında bulunan yüksek afiniteli IgE (FceR1) reseptörünün beta alt ünitesini kodlayan gen bölgesinin alerji gelişimine neden olan aday genlerden olabileceği bildirmiştir [245, 46]. Bir diğer çalışma kromozom 11q13.1 gen lokasyonu ile astım arasında bir ilişki olduğunu saptamıştır. Sekretoglobini astım ve alerji ile ilişkilendiren birçok çalışma yapılmıştır [10, 26, 27, 32]. *RYD5* geninin astım, alerji ve NP ile ilişkili bu genetik lokuslara olan fiziksel yakınlığının evrim açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca (c.15 G>T) nükleotit değişikliği saptanan hastanın öyküsünde alerji, ailesinde astım, alerji ve sık geçirilen üst solunum yolu enfeksiyonları olması nedeniyle, *RYD5* geninin solunum yolu enfeksiyonları, astım ve alerji ile ilişkisini araştırarak ileri çalışmalar gereklidir.

*SCGB1A1*, anti-inflamatuvar ve immüno-modülatör etkileri bakımından sekretoglobinin prototipik bir üyesidir. Önceki çalışmalar, astım ve kronik sinüziti içeren üst ve alt solunum yolu inflamatuvar hastalıklarında *SCGB1A1* genin ifadesinde azalma bildirmişlerdir [26, 28, 32, 244]. *SCGB3A2* proteini, önemli amino asit dizilimleri açısından *SCGB1A1* proteinine büyük benzerlik göstermekte olup, kronik rinosinüzitli NP'li hastalarda *SCGB3A2* geninin ifadesinde azalma olduğu ve polip formasyonuna katkısı olabileceği bildirilmiştir [9, 32, 33, 167, 244]. *RYD5* proteininin merkezinde, aynı alt aileden gelen *SCGB3A2* ve *SCGB3A1* proteininde olduğu gibi aynı pozisyonunda korunmuş bir sistein molekülü bulunur ve protein yapısı kısmen diğerler ile benzer konformasyondadır [8]. Japon popülasyonunda yapılan bir çalışmada, *SCGB3A2* geninin promotör bölgesindeki SNP (-112 G/A) ile artmış astım riski arasında ilişkili bulunmuştur [9, 169]. Çin popülasyonunda yapılan bir diğer çalışmada, *SCGB1A1* genindeki G+38A nükleotit değişikliğinin, astım şiddeti ve düşük seviyede steroid cevabıyla ilişkili olduğu saptanmıştır [247].

*RYD5* geni ifade seviyesi, kontrol grubuna kıyasla nazal polip dokusunda genel olarak artmış olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. *RYD5* geni ifade seviyesi, NP'li hastanın sağlam mukozasına kıyasla, polip dokusunda genel olarak düşmüş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Lu ve arkadaşlarının [33] yaptıkları bir çalışmada, kronik rinosinüzitli NP'siz hastalara kıyasla kronik rinosinüzitli NP'li hastalarda *RYD5* gen ifade düzeyinde anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışma sonucumuzda bu verilerle uygunluk göstermektedir. Ancak yüksek sayıda örnek içeren gen ifade düzeyi çalışmalarında bu fark istatistiksel olarak anlamlı olabilecektir. Bignotti ve arkadaşları, *RYD5* geninin epiteliyal ovarian kanserde (EOK) ifade düzeyinin arttığını, hastalığın teşhis ve tedavisinin takibinde ailenin diğer üyelerinde olan mammaglobin A, lipofilin A, lipofilin B'nin biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [248].

NP'li hastanın polip dokusu ile kendi sağlam mukozası *RYD5* geni ifade seviyesi açısından daha önce kıyaslanmamış olup, ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık 10 kDa ve glikoprotein yapıdaki *RYD5* proteini ile şıçan prostatein C1 altunitinin (RP) amino asit dizilerinin benzerliği *RYD5*'in steroidleri bağlayabilme yeteneğini göstermektedir [35, 37]. *RYD5* proteini üyesi olduğu ailedeki birçok küçük epitelyal salgı proteinleri gibi steroid ligandları bağlayarak inflamasyon sürecini modüle edebilir. Nazal polipoziste, poliplerin büyümesini önlemede kullanılan kortikosteroidlerin etkisi, *RYD5* proteinin fonksiyonu ile ilgili olabilir [35, 37, 180-182]. Dear ve arkadaşları [35], *RYD5* proteininin nazal mukustaki zararlı koku moleküllerinin bağlanmasında, patojenik mikroorganizmaların tanınmasında ve uzaklaştırılmasında görev alarak savunma mekanizmasına katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Bu açıdan nazal polipozisli hastaların koku alamamasının *RYD5* geni ifade düzeyi ile ilişkisinin araştırılması gereklidir.

Tespit ettiğimiz nükleotit değişikliklerine sahip NP'li hastaların klinik özelliklerinin bilinmesi, hastalığın seyri ve hastanın tedavisinin takibi için önemli bir klinik veri sağlayabilir. *RYD5* geni ile ilgili literatür bilgisi oldukça sınırlı olup, genotipik varyasyonların nazal polipozisle ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız NP'li hastalarda *RYD5* geni ile ilgili yapılan ilk toplum-temelli çalışma olmasına karşın, sonuçlarımız örnek sayısının azlığı ve maddi yetersizlik nedeniyle kısıtlanmıştır. Toplum-temelli çalışmalarda örnek sayısı önemli bir kısıt olup, daha fazla örnek içeren ileri

Çalışmalarda verilerin güvenirliliği artabilir veya sonuçlar değişebilir. Bu nedenle çalışma sonuçlarımız, ileri çalışmalar için n veri niteliğindedir.

Sonuç olarak, tez alışmamızda NP'li hastalarda *RYD5* geninin genotipik varyasyonları ve gen ifade düzeyi incelenmiş olup, *RYD5* (-264AG ve -103AA) genotiplerinin NP'e yatkınlıkla ilişkili olduğu, bu nükleotit değişikliklerinin genin ifade düzeyini etkilediğini ve inflamasyonun şiddetini değiştirerek, NP gelişimine katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca ilk kez bu çalışmada rapor edilen *RYD5* c.152 G>T nükleotit değişikliğinin protein üzerindeki etkisini değerlendirecek fonksiyonel çalışmalara ve bu değişikliğin inflamatuvar hastalıkların patogenezi ile ilişkisini araştıracak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- [1] Larsen, K., Tos, M., The estimated incidence of symptomatic Nazal polyps, *Acta Otolaryngol*, 122, 2, 179-182, **2002**.
- [2] Stankovic K., M, Goldsztejn, H., Reh D.D., Platt M.P., Metson R., Gene expression profiling of nasal polyps associated with chronic sinusitis and aspirin-sensitive asthma. *The Laryngoscope*, 118, 5, 881-9, **2008**.
- [3] Bunnag, C., Pacharee, P., Vipulakom, P., A study of allergic factor in nasal polyp patients. *Annals Allergy*, 50, 126–132, **1983**.
- [4] Calenoff, E., McMahan J.T., Herzon G.D., et al., Bacterial allergy in nasal polyposis, *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 119, 830-836, **1993**.
- [5] Cody, D., Neel, H., Ferreiro, J., Roberts, G.D., Allergic fungal sinusitis: The Mayo Clinic Experience, *The Laryngoscope*, 104, 1076-79, **1994**.
- [6] Erbek, S.S., Yurtcu, E., Erbek, S., Atac, F.B., Sahin, F.I., Cakmak, O., Proinflammatory Cytokine Single Nucleotide Polymorphisms in Nazal Polyposis, *Archives of Otolaryngolog -Head and Neck Surgery*, 133, 705-9, **2007**.
- [7] Van, Zele, T., Gevaert, P., Watelet, J. B., Claeys, G., Holtappels, G., Claeys, C., Bachert, C., *Staphylococcus aureus* colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in Nazal polyposis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 4, 981-3, **2004**.
- [8] Choi, M.S., Ray, R., Zhang, Z., Mukherjee, A.B., INF-gamma stimulates the expression of a novel secretoglobin that regulates chemotactic cell migration and invasion, *Journal Immunology*, 172, 4245-4252, **2004**.
- [9] Niimi, T., Munakata, M., Keck-Waggoner, C.L., et al., A polymorphism in the human UGRP1 gene promoter that regulates transcription is associated with an increased risk of asthma, *The American Journal of Human Genetics*, 70, 718-725, **2002**.

- [10] Liu, Z., Lu, X., Zhang, X., H., Bochner et al., Clara cell 10-kDa protein expression in chronic rhinosinusitis and its cytokine-driven regulation in sinoNasal mucosa, *Allergy*, 64, 149-157, **2009**.
- [11] Vento, S., Nazal Polypoid Rhinosinusitis, Clinical Course And Etiological Investigations, Academic Dissertation, *Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery*, Helsinki, **2001**.
- [12] Pinto, J., M., Hayes M.G., Schneider, D., Naclerio, R.M., Ober, C.A., Genomewide screen for chronic rhinosinusitis genes identifies a locus on chromosome 7q, *The Laryngoscope*, 118, 11, 2067-72, **2008**.
- [13] Mfuna-Endam, L., Zhang, Y., Desrosiers, MY., Genetics of rhinosinusitis, *Current Allergy And Asthma Reports*, 11, 3, 236-46, **2011**.
- [14] Alexiou, A., Sourtzi, P., Dimakopoulou, K., Manolis, E., Velonakis, E., Nasal polyps: heredity, allergies, and environmental and occupational exposure, *Journal of Otolaryngology Head & Neck Surgery: Le Journal d'otorhino laryngologie et de chirurgie cervico faciale*, 40, 1, 58-63, **2011**.
- [15] Drake-Lee, A., Nazal polyps in identical twins, *The Journal of Laryngology & Otology*, 106, 12, 1084-5, **1992**.
- [16] Lockey, R.F., Rucknagel, D.L., Vanselow, N., A., Familial occurrence of asthma, nasal polyps and aspirin intolerance, *Annals of Internal Medicine*, 78, 1, 57-63, **1973**.
- [17] Settupane, G.A., Benefit/risk ratio of aspirin, *Allergy and Asthma Proceedings*, 2, 96-102, **1981**.
- [18] Nachman, M.W., Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans, *Trends in genetics*, 17, 9, 481-485, **2001**
- [19] Altshuler, D.M., Gibbs, R.A., Peltonen, L., Dermitzakis, E., Schaffner, S.F., et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations, *Nature*, 467, 52-58, **2010**.
- [20] Haukim, N., Bidwell, J.L., Keen, L., et al., Cytokine gene polymorphism in human disease online databases, supplement 2, *Genes & Immunity*, 3, 6, 313-330, **2002**.

- [21] Maloney, J., Oliver, R., HLA antigens, nasal polyps and asthma, *Clinical Otolaryngology*, 5, 183–189, **1980**.
- [22] Ramirez-Anguiano, J., Yamamoto-Fursho, J.K., Barquera, R., Beltran, O., Granados, J., Association of HLA-DR3 and HLA-DR4 with sinonasal polyposis in Mexican Mestizos. *Otolaryngology- Head & Neck Surgery*, 135, 1, 90-3, **2006**.
- [23] Bernstein, J.M., Anon, J.B., Rontal, M., Conroy, J., Wang, C., Sucheston, L., Genetic polymorphisms in chronic hyperplastic sinusitis with Nasal polyposis, *The Laryngoscope*, 119, 7, 1258-64, **2009**.
- [24] Karjalainen, J., Joki-Erkkila V.P., Hulkkonen, J., Pessi, T., Nieminen, M.M., Aromaa, A., et al., The IL1A genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults, *Allergy*, 58, 5, 393-6, **2003**.
- [25] Mfuno Endam, L., Cormier, C., Bosse, Y., Filali-Mouhim, A., Desrosiers, M., Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 136, 2, 187-92, **2010**.
- [26] Wang, X., Dong, Z., Zhu, D.D., Guan, B., Expression profile of immune-associated genes in nasal polyps, *Annals of Otology, Rhinology&Laryngology*, 115, 6, 450-6, **2006**.
- [27] Fritz, S.B., Terrell, J.E., Conner, E.R., Kukowska-Latallo J.F., Baker, J.R., et al., Nasal mucosal gene expression in patients with allergic rhinitis with and without Nasalpolyps, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 6, 1057-63, **2003**.
- [28] Liu, Z., Kim, J., Sypek, J.P., Wang, I.M., Horton, H., Oppenheim, F.G., Bochner, B.S., Gene expression profiles in human Nasal polyp tissues studied by means of DNA microarray. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 783-790, **2004**.
- [29] Jackson, B.C., Thompson, D.C., Wright, M.W., McAndrews, M., Bernard, A., Nebert, D., W., Vasiliou, V., Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of 'evolutionary bloom' of androgen-binding protein genes within the mouse Scgb gene superfamily, *Humman Genomics*, 5, 6, 691-702, **2011**.

- [30] the Human Gene Nomenclature Database, [www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/scgb.html](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/scgb.html) (Eylül, 2013).
- [31] Mukherjee, A.B., Kundu, G.C., Mantile-Selvaggi, G. et al., Uteroglobin: a novel cytokine? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 5, 771-87, 1999.
- [32] Shijubo, N., Kawabata, I., Sato, N., Itoh, Y., Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/uteroglobin, secretoglobin 1A1, *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1139-1149, 2003.
- [33] Lu, X., Wang, N, Long, X., You, X., Cui, Y., Liu, Z., The cytokine-driven regulation of secretoglobins in normal human upper airway and their expression, particularly that of uteroglobin-related protein 1, in chronic rhinosinusitis, *Respiratory Research*, 1, 28, 1-10, 2011.
- [34] Reynolds, S.D., Reynolds, P.R., Pryhuber, G.S., et al., Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166, 1498-1509, 2002.
- [35] Dear, T.N., Boehm, T., Keverne, E.B., Rabbitts, T.H., Novel genes for potential ligand-binding proteins in subregions of the olfactory mucosa, *The EMBO Journal*, 10, 10, 2813-2819, 1991.
- [36] Nordlund-Muller, L., Andersson, O., Ahlgren, R., Schilling, J., Gillner, M., Gustafsson, J., A., and Lund, J., Cloning, Structure, and Expression of a Rat Ligand Binding Protein for Polychlorinated Biphenyls, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 12690-12693, 1990.
- [37] Lea, O.A., Petrusz, P., and French, F.S., Prostatein A Major Secretory Protein of The Rat Ventral Prostate, *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 6196-6202, 1979.
- [38] Forsgren, B., Bjork, P., Carlstrom, K., et al., Gustafsson, J.A., Pousette, A., And Hogberg, B., Purification and distribution of a major protein in rat prostate that binds estramustine, a nitrogen mustard derivative of estradiol-17 beta, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 7, 3149-3153, 1979.



- [39] Önerci, M., *Nazal Polipozis (Nasal Polyposis)*, Altıncı Baskı, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, Ankara, 66-70, **2006**.
- [40] Larsen, K., Tos, M., Clinical course of patients with primary nazal polyps, *Acta Otolaryngol*, Stockh, 114, 556-9, **1994**.
- [41] Çelik, O., *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi*, (çev: Çelik O.), İkinci Baskı, Asya Tıp Kitabevi, İzmir, 511-520, **2007**.
- [42] Dursun, E., Samim, E., Korkmaz, H., Bayız, Ü., Uygur, K., Akmansu, H., Özeri, C., Nazal polipozisli olgularda endoskopik sinüs cerrahisi, *KBB Baş ve Boyun Cerrahisi Dergisi*, 6, 2, 71-80, **1998**.
- [43] Koç, C., Arıkan, O.K., Atasoy, P., Aksoy, A., Prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with Nazal polyps, a preliminary report, *The Laryngoscope*, 114, 11, 1941-4, **2004**.
- [44] Önerci, T.M., *Nazal Polyposis, Pathogenesis, Medical and Surgical Treatment*, (eds: Önerci T.M., Ferguson B.J.), Birinci Baskı, Springer Kitabevi, New York, 1-27, **2010**.
- [45] Yonge, E.S., Polypus of the nose, Sherratt & Hughes, London, **1906**.
- [46] Stevenson, R.S., Guthrie, D., A history of otolaryngology, Living Stone, Edinburgh, 70-71, 17, **1949**.
- [47] Zuckerkandl, E., Normale und pathologische Anatomie der Nasenhöhle und ihrer pneumatischen Anhänge, *Bd I Braumüller, Wien*, **1882**.
- [48] Hajek, M., Über die pathologischen Veränderungen der Schleimhauthypertrophie und der Nasenpolypen, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 4:277-300, **1896**.
- [49] Hirschman, A., Über, Endoskopie der Nase und deren Nebenhöhlen. Eine neue Untersuchungsmethode, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 143, 195-202, **1903**.
- [50] Kern, R., Schenck, H., Allergy: a constant factor in the etiology of so-called mucosal nasal polyps, *Journal of Allergy*, 4, 485-49, **1933**.

- [51] Stammberger, H., *Rhinoscopic Surgery*, in: “*Nazal Polyps, Epidemiology, Pathogenesis and Treatment*”, (eds: Settipane G.A., Lund V.J., Bernstein J.M., Tos, M.), Rhode Island, Ocean Side Pub, 7-15, **1997**.
- [52] Mosher, H.P., Symposium on the ethmoid. The surgical anatomy of the ethmoidal labyrinth, *The Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 38, 869-901, **1929**.
- [53] Brain, D.J., *Historical Background*, in: “*Nazal Polyps, Epidemiology, Pathogenesis and Treatment*”, (ed: Settipane, G.A.), Providence, RI, Ocean Side Publications, 6-16, **1997**.
- [54] Vancil, M.E., A Historical Survey of Treatments for Nazal Polyposis, *The Laryngoscope*, 435-445, **1979**.
- [55] Settipane, G.A., Chafee, F.H., Nasal polyps in asthma and rhinitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 59, 17-21, **1977**.
- [56] Maran, A.G.D., Lund, V.J., *Infections and Nonneoplastic Disease*, in: “*Clinical rhinology*”, Thieme Medical Publishers, New York, 94-8, **1990**.
- [57] Hosemann, W., Göde, U., Wagner, W., Epidemiology, pathophysiology of nazal polyposis, and spectrum of endo nazal sinus surgery, *American Journal of Otolaryngology*, 15, 85-98, **1994**.
- [58] Hedman, J., Kaprio, J., Poussa T., Nieminen, M., Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nazal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study, *International Journal of Epidemiology*, 28, 717-22, **1999**.
- [59] Johansson, L., Akerlund, A., Holmberg, K., Melen, I., Bende, M., Prevalence of nasal polyps in adults: The Skovde population-based study, *The Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 112:625-629, **2003**.
- [60] Drake-Lee, A.B., *Nazal Polyps*, in: “*Scott-Brown’s Otolaryngology*”, (eds: Kerr, A.G., Groves, J., ), Butterworths, London, 147-53, **1987**.
- [61] Drake-Lee, A.B., Medical Treatment of Nazal Polyps, *Rhinology Internation Journal*, 32, 1-4, **1994**.

- [62] Güngör, A., Corey, J.P., Pediatric sinusitis, A literature review with emphasis on the role of allergy, *Journal of Otolaryngology-Head And Neck Surgery*, 116, 4-15, **1997**.
- [63] Castillo, F., Jurado-Ramos, M., Fernández-Conde, B.L., et al., Allergenic Profile of Nazal Polyposis, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 19, 2, 110-116, **2009**.
- [64] Sin, A., Terzioglu, E., Kokulugdag, A., et al., Allergy as an etiologic factor in nasal polyposis, *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 7, 234-7, **1997**.
- [65] Benson, M., Pathophysiological effects of glucocorticoids on nazal polyps, an update, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5, 1, 31-35, **2005**.
- [66] Acar, A., Anadolu, Y., Saatçi, M., et al., Allerjik ve Non-allerjik Sinonazal polipozisli hastalarda Allerjik Parametreler ve Fonksiyonel Endoskopik Sinüs Cerrahisi Sonuçları, *KBB Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, 4, 49-54, **1996**.
- [67] Blumstein, G.I., Tuft, L., Allergy treatment in recurrent nasal polyposis: its importance and value, *American Journal of Medicine*, 234, 269-80, **1957**.
- [68] Caplin, I., Haynes, J.T., Spahn, J., Are nasal polyps an allergic phenomenon? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 29, 631-4, **1971**.
- [69] Perkins, J.A., Blakeslee, D.B., Andrade, P., Nasal polyps: a manifestation of allergy? *Journal of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 101, 641-5, **1989**.
- [70] Drake-Lee, A.B., *Nazal Polyyps*, in: "Scott-Brown's Otolaryngology", (eds: Kerr, A.G., Stephens, D.), Sixth ed., Butterworth&Co. Ltd, Great Britain, **1997**.
- [71] Kirtsreesakul, V., Update on Nazal Polyyps, Etiopathogenesis, *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88, 12, 1966-1972, **2005**.
- [72] Bachert, C., Gevaert, P., Holtappels, G., van Cauwenberge, P., Nasal polyposis: is there a link between eosinophils and IgE?, *International Archives of Allergy & Applied Immunology*, 124, 3, 315-317, **200**.

- [73] Weille, F.L., Further experiments in the viral theory of nasal polyp etiology, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 24, 549-51, **1966**.
- [74] Kozak, F.K., Mahony J.B., Chernesky, M.A., et al., Nasal polyposis: in search of a viral etiology using DNA hybridisation. *Journal Otolaryngol*, 20,: 404-7, **1991**.
- [75] McCarthy, D.S., Pepys, J., Allergic broncho-pulmonary aspergillosis, *Clinical Allergy*, 1, 261-86, **1971**.
- [76] Weschta, M., Rimek, D., Formanek, M., Polzehl, D., Podbielski, A., Riechelmann, H., Topical antifungal treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps, a randomized, double-blind clinical trial, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 6, 1122-8, **2004**.
- [77] Benoliel, P., Treatment of sino-nasal polyposis by *Candida albicans* immunotherapy, aprobos of 4 cases, *Allergy Immunology*, 33, 10, 388-94, **2001**.
- [78] Ponikau, J.U., Sherris, D.A., Kern, E.B., et al., The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis, *Mayo Clinic Proceedings*, 74, 9, 877-84, **1999**.
- [79] Holopainen, E., Mäkinen, J., Paavolainen, M., et al., Nasal Polyposis, Relationships to allergy and acetylsalicylic acid intolerance, *Acta Otolaryngologica (Stockh)*, 87,330-4, **1979**.
- [80] Settupane, G.A., Epidemiology of nasal polyps, *Allergy and Asthma Proceedings*, 17, 231-6, **1996**.
- [81] Szczeklik, A., The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma, *European Respiratory Journal*, 3, 588-93, **1990**.
- [82] Chafee, F.H., Settupane, G.A., Aspirin intolerance: I. Frequency in an allergic population, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 53, 193-9, **1974**.
- [83] Schapowal, A.G., Simon, H.U., Schmitz, S.M., Phemenology, pathogenesis, diagnosis and treatment of aspirin-sensitive rhinosinusitis, *Acta Otorhino Laryngologica Belgica*, 149, 235-50, **1995**.

- [84] Newton, J.R., Ah-See, K.W., A review of nazal polyposis, *Clinical Risk Management*, 4, 2, 507–512, **2008**.
- [85] Karakaya, G., Kalyoncu, A.F., Analjezik İntoleransı, *Toraks Dergisi*, 1, 82-86, **2000**.
- [86] Drake-Lee, A.B., Lowe, D., Swanston, A., Grace, A., Clinical profile and recurrence of nasal polyps, *The Journal of Laryngology & Otology*, 98, 783-93, **1984**.
- [87] Widal, M.F., Abrami, P., Lermoyez, J., Anaphylaxie et idiosyncrasie, *Presse Med*, 30, 189–193, **1922**.
- [88] Samter, M., Beers, R.F., Concerning the nature of intolerance to aspirin, *Journal of Allergy*, 40, 281-93, 1967.
- [89] Stammberger, H., *Functional Endoscopic Sinus Surgery*, in: " *The Messerklinger Technique*", BC Decker, Philadelphia, **1991**.
- [90] Settipane, G.A., Greisner, W.A., Hereditary factor for nazal polyps, *Allergy and Asthma Proceedings*, 17, 5, 283-6, **1996**.
- [91] Drake-Lee, A., Nazal polyps in identical twins, *The Journal of Laryngology & Otology*, 106, 12, 1084-5, **1992**.
- [92] Alexiou, A., Sourtzi, P, Dimakopoulou, K, Manolis, E, Velonakis, E. Nasal polyps: heredity, allergies, and environmental and occupational exposure, *Journal of Otolaryngology Head & Neck Surgery: Le Journal d'otorhino laryngologie et de chirurgie cervico faciale*, 40, 1, 58-63, **2011**.
- [93] di Sant', Agnese, P.A., Davis, P.B., Cystic fibrosis in adults: 75 cases and a review of 232 cases in literature, *American Journal of Medicine*, 66, 121-32, **1979**.
- [94] Aitken, M.L., Fiel, S.B., Cystic fibrosis, *Disease a Month*, 39, 1, 1-52, **1993**.
- [95] McDonald, T.J., *Nasal Manifestations of Systemic Diseases*, in: " *Otolaryngology Head and Neck Surgery*", (ed: Cummings, C.W.), , 4th ed., Mosby, Philadelphia, **2005**.

- [96] Pedersen, C.B., Mygind, N., Srensen, H., Prytz, S., Long-term treatment of nasal polyps with beclomethasone diprionate aerosol, II. Clinical results, *Acta Otolaryngol (Stockh)* 82, 256-9, **1976**.
- [97] Afzelius, B.A., Disorders of ciliary motility, *Hospital Practice*, 21, 3, 73-80, **1986**.
- [98] Schanker, H.M., Rajfer, J., Saxon, A., Recurrent respiratory disease, azoospermia, and nasal polyposis. A syndrome that mimics cystic fibrosis and immotile cilia syndrome, *Archives of Internal Medicine*, 145, 2201-3, **1985**.
- [99] Hughes, T.M., Skolnick, J.L., Belker, A.M., Young's syndrome: an often unrecognized correctable cause of obstructive azoospermia, *The Journal of Urology*, 137, 1238-40, **1987**.
- [100] Young, D., Surgical treatment of male infertility, *Journal Reprod Fertil*, 23, 541-542, **1970**.
- [101] Churg, J., Strauss, L., Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa, *The American Journal of Pathology*, 27: 277-301, **1951**.
- [102] Olsen, K.D., Neel, H.B., DeRemee, R.A., Nazal manifestations of allergic granulomatosis and angiitis, Churg-Strauss syndrome, *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 88, 85-9, **1980**.
- [103] Mullarkey, M.F., Hill, J.S., Webb, D.R., Allergic and nonallergic rhinitis: their characterization with attention to the meaning of nasal eosinophilia, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 65, 122-6, **1980**.
- [104] Jacobs, R.L., Freedman, P.M., Boswell, R.N., Nonallergic rhinitis with Nazal eosinophilia, Clinical characterization of 52 patients, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 63, 202-208, **1979**.
- [105] Monoret-Vautrin, D.A., Hsieh, V., Wayoff, M., Nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome a precursor of the triad, nazal polyposis, intrinsic asthma, and intolerance to aspirin, *Annals of Allergy*, 1990, 64, 513-518, **1990**.
- [106] Tos M., Mogensen C., Mucous gland in nasal polyps, *Archives Otolaryngol*, 103, 407-13, **1977**.

- [107] Tos, M., Mogensen, C., Pathogenesis of nasal polyps, *Rhinology*, 15, 87-95, **1977**.
- [108] Migita, M., Yamaguchi, N., Mita, S., et al., Characterization of the human IL-5 receptors on eosinophils, *Cellular Immunology*, 133, 484-97, **1991**.
- [109] Norlander, T., Westermark, A., Setten, G., et al., Basic fibroblast growth factor in nasal polyps immunohistochemical and quantitative findings, *Rhinology*, 39, 88-92, **2001**.
- [110] Simon, H.U., Dysregulierte Apoptose bei chronisch-eosinophilen Erkrankungen–Neue Therapiestrategien für Allergien und Asthma bronchiale, *Pneumologie*, 50, 790-6, **1996**.
- [111] Bachert, C., Wagenmann, M., Hauser, U., Rudack, C., IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99, 837-42, **1997**.
- [112] Settipane, G.A., Nasal polyps: epidemiology, pathology, immunology, and treatment, *The American Journal of Rhinology & Allergy*, 1, 119-26, **1987**.
- [113] Gleich, G.J., Flavahan, N.A., Fujisawa, T, Vanhoutte, P.M., The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity (Aspen Allergy Conference), *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 81, 776-81, **1988**.
- [114] Harlin, S.L., Ansel, D.G., Lane, S.L., et al., Clinical and pathological study of chronic sinusitis: the role of the eosinophil, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 81, 867-75, **1988**.
- [115] Wittekindt, C., Hess, A., Bloch, W., et al. , Immunohistochemical expression of VEGF and VEGF receptors in nasal polyps as compared to normal turbinate mucosa. *European Archives of Otorhino Laryngology*, 259, 294-298, **2002**.
- [116] Beck, L.A., Stellato, C., Beall, L.D., et al., Detection of the chemokine RANTES and endothelial adhesion molecules in nasal polyps *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98, 766-80, **1996**.

- [117] Hamilos, D.L., Leung, D.Y., Wood, R., et al., Eosinophil infiltration in nonallergic chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (CHS/NP) is associated with endothelial VCAM-1 upregulation and expression of TNF-alpha, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 15, 443-50, **1996**.
- [118] Hamilos, D.L., Plout, M., Leung, D.Y., et al., GM-CSF, IL-5 and RANTES messenger RNA expression and protein levels in chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99, S130, **1997**.
- [119] Nonaka, M., Nonaka, R., Wolley, K., et al., Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues, IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils, *Journal Immunology*, 155, 3234–3244, **1995**.
- [120] Bartels, J., Maune, S., Meyer, J., E., Increased eotaxin-mRNA expression in nonatopic and atopic nasal polyps, comparison to RANTES and MCP-3 expression, *Rhinology*, 35, 171–174, **1997**.
- [121] Gosepath, J., Brieger, J., Gletsou, E., Mann, W.J., Expression and localization of COX-1 and COX-2 in Nasal respiratory mucosa. Does COX-2 play a key role in the immunology of nasal polyps? *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 14, 2, 114-8, **2004**.
- [122] Prieto, L., Seijas, T., Gutierrez, V., et al., Exhaled nitric oxide levels and airway responsiveness to adenosine 5-monophosphate in subjects with Nasal polyposis, *International Archives of Allergy and Immunology*, 134, 4, 303-9, **2004**.
- [123] Frenkiel, S., Small, P., *Pathogenesis and Treatment of Nasal Polyps*, in: *Surgery of the Paranasal Sinuses*, (eds: Blitzer, A., Lawson, W., Friedman, W.H.), WB Saunders, Philadelphia, 41-9, **1991**,
- [124] Cauna, N., Hinderer, K., Manzetti, G., Swanson, E., Fine structure of nasal polyps. *Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*, 81, 41-58, **1972**.
- [125] Bateman, N.D., Fahy, C., Woolford, T.J., Nasal polyps, still more questions than answers, *The Journal of Laryngology & Otolaryngology*, 117, 1, 1-9, **2003**.



- [126] Penttilä, M., Pukander, J., Karma, P., *Clinical and endoscopic findings in chronic maxillary sinusitis analysis of 75 patients*, in: “Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery”, Proceedings of the XIV World Congress of Otorhinolaryngology, Madrid, Spain, September 10-15, **1989**.
- [127] Kitapçı, F., Bayar, M.N., Atasoy, P., Koç, C., Nazal Poliple, *Van Tıp Dergisi*, 12, 3, 212-222, **2005**.
- [128] Zinreich, S., Imaging of chronic sinusitis in adults: X-ray, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 90, 3/2, 445-51, **1992**.
- [129] Zinreich, S., Paranasal sinus imaging, *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 103, 5/2, 863-8, **1990**.
- [130] Lund, V.J., Mackay, I.S., Staging in rhinosinusitis, *Rhinology*, 31, 183-184, **1993**.
- [131] Lildholdt, T., Rundcrantz, H., Bende, M., Larsen, K., Glucocorticoid treatment for nasal polyps. The use of topical budesonide powder, intramuscular betamethasone, and surgical treatment, *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery*, 123, 595-600, **1997**.
- [132] Jäntti-Alanko, S., Holopainen, E., Malmberg, H., Recurrence of nasal polyps after surgical treatment, *Rhinology*, 8, 59-64, **1985**.
- [133] Moloney, J.R., Oliver, R.T., HLA antigens, nasal polyps and asthma, *Clinical Otolaryngol*, 5, 3, 183-9, **1980**.
- [134] Luxenberger, W., Posch, U., Berghold, A., et al., HLA patterns in patients with nazal polyposis, *European Archives of Otorhino Laryngology*, 257, 3, 137-139, **2000**.
- [135] Schubert, M.S., Hutcheson, P.S., Graff, R.J., et al., HLA-DQB1\*03 in allergic fungal sinusitis and other chronic hypertrophic rhinosinusitis disorders, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 1376-1383, **2004**.
- [136] Ni, G., Chen, W., Zhu, Y., Zhao, H., The recurrent nazal polyp analysed by mRNA difference to demonstrate, *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 18, 10, 602-3, **2004**.

- [137] Daniel, J.C., Discovery and perspectives from the blastokinin era, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, 1-8, **2000**.
- [138] Klug, J., Beier, H.M., Bernard, A. et al. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins, nomenclature committee report, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, 348-354, **2000**.
- [139] Pilon, A.L., Rationale for the development of recombinant human CC10 as a therapeutic for inflammatory and fibrotic disease, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, 280-299, **2000**.
- [140] Karn, R.C., Laukaitis, C.M., Characterization of two forms of mouse salivary androgen-binding protein (ABP), implications for evolutionary relationships and ligand-binding function. *Biochemistry*, 42, 7162-7170, **2003**.
- [141] Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., et al., The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242, **2000**.
- [142] Bally, R., Delettre, J., Structure and refinement of the oxidized P21 form of uteroglobin at 1.64 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 206, 153-170, **1989**.
- [143] Callebaut, I., Poupon, A., Bally, R., et al., The uteroglobin fold, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, 90-112, **2000**.
- [144] Stripp, B.R., Lund, J., Mango G.W., et al., Clara cell secretory protein, a determinant of PCB bioaccumulation in mammals, *American Journal of Physiology*, 271, 656-664, **1996**.
- [145] Mukherjee, A.B., Zhan, Z., Chilton, B.S., Uteroglobin, a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily, *Endocrine Reviews*, 28, 707-725, **2007**.
- [146] Ni, J., Kalf-Suske, M., Gentz, R., et al., All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, 25-42, **2000**.

- [147] Beier, H.M., The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, 9-24, **2000**.
- [148] Wong, A.P., Keating, A., Waddell, T.K., Airway regeneration, The role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it, *Cytotherapy*, 11, 676-687, **2009**.
- [149] Parker, M., Needham, M., White, R., Prostatic steroid binding protein, gene duplication and steroid binding, *Nature*, 298, 92-94, **1982**.
- [150] Zhang, Z., Kundu, G.C., Yuan, C.J., et al., Severe fibronectin-deposit renal glomerular disease in mice lacking uteroglobin, *Science*, 276, 1408-1412, **1997**.
- [151] Hayashida, S., Harrod, K., S., Whitsett, J.A., Regulation and function of CCSP during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in vivo, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, 452-459, **2000**.
- [152] Lehrer, R.I., Nguyen, T., Zhao, C., et al., Secretory lipophilins, a tale of two species, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, 59-67, **2000**.
- [153] Versura, P., Nanni, P., Bavelloni, A., et al., Tear proteomics in evaporative dry eye disease, *Eye (Lond)*, 24, 1396-1402, **2010**.
- [154] Culleton, J., O'Brien, N., Ryan, B.M., et al., Lipophilin B, A gene preferentially expressed in breast tissue and upregulated in breast cancer, *International Journal of Cancer*, 120, 1087-1092, **2007**.
- [155] Sjodin, A., Guo, D., Lund-Johansen M., et al., Secretoglobins in the human pituitary, high expression of lipophilin B and its down-regulation in pituitary adenomas, *Acta Neuropathol*, 109, 381-386, **2005**.
- [156] Goedegebuure, P.S., Watson, M.A., Vieh, C.T., Fleming, T.P., Mamaglobin-based strategies for treatment of breast cancer, *Curr Cancer Drug Targets*, 4, 531-542, **2004**.
- [157] Tassi, R.A., Calza, S., Ravaggi, A., et al., Mamaglobin B is an independent prognostic marker in epithelial ovarian cancer and its expression is associated with reduced risk of disease recurrence, *BMC Cancer*, 9, 253, **2009**.

- [158] Tassi, R.A., Bignotti, E., Rossi, E., et al., Overexpression of mamaglobin B in epithelial ovarian carcinomas, *Gynecologic Oncology*, 105, 578-585, **2007**.
- [159] Janku, F., Kleibl, Z., Novotny, J., et al., Mamaglobin A, a novel marker of minimal residual disease in early stages breast cancer, *Neoplasma*, 51, 204-208, **2004**.
- [160] Aihara, T., Fujiwara, Y., Miyake, Y., et al., Mamaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers, *Cancer Letters*, 150, 79-84, **2000**.
- [161] Douglas-Jones, A.G., Woods, V., Molecular assessment of sentinel lymph node in breast cancer management, *Histopathology*, 55, 107-113, **2009**.
- [162] Reynolds, S.D., Reynolds, P.R., Pryhuber, G.S., et al., Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166, 1498-1509, **2002**.
- [163] Porter, D., Lahti-Domenici, J., Torres-Arzayus, M., et al., Expression of high in normal-1 (HIN-1) and uteroglobin related protein-1 (UGRP-1) in adult and developing tissues, *Mechanisms of Development*, 114, 201-204, **2002**.
- [164] Mazumdar, J., Hickey, M.M., Pant, D.K., et al., HIF-2alpha deletion promotes Kras-driven lung tumor development, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 14182-14187, **2010**.
- [165] Yamada, A., Kimura, S., Induction of uteroglobin-related protein 2 (Ugrp2) expression by EGF and TGF $\alpha$ , *FEBS Lett*, 579, 2221-2225, **2005**.
- [166] Krop, I., Parker, M.T., Bloushtain-Qimron, N., et al. HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation, *Cancer Research*, 65, 9659-9669, **2005**.
- [167] Chiba, Y., Kurotani, R., Kusakabe, T., et al., Uteroglobin-related protein 1 expression suppresses allergic airway inflammation in mice, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173, 958-964, **2006**.
- [168] Beane, J., Vick, J., Schembri, F., et al., Characterizing the impact of smoking and lung cancer on the airway transcriptome using RNA-Seq, *Cancer Prevention Research (Phila)*, 4, 803-817, **2011**.

- [169] Inoue, K., Wang, X., Saito, J., et al., Plasma UGRP1 levels associate with promoter G-112A polymorphism and the severity of asthma, *Allergy International*, 57, 57-64, **2008**.
- [170] Sayers, E., W., Barrett, T., Benson, D., A., et al., Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucleic Acids Research*, 38, D5-16, **2010**.
- [171] Perlman, D., Halvorson, H., O., A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides, *Journal of Molecular Biology*, 167, 391-409, **1983**.
- [172] Gerhard, D., S., Wagner, L., Feingold, E., A., et al., The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC), *Genome Research*, 14, 10B, 2121-7, **2004**.
- [173] The GeneCards Human Gene Database, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SCGB1C1> (Eylül, **2013**).
- [174] European Bioinformatics Institute (EBI), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878) (Eylül, **2013**).
- [175] The National Center for Biotechnology Information, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=147199&mrna=NM\\_145651.2&ctg=NT\\_009237.18&prot=NP\\_663626.2&orien=forward&refresh=efresh](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=147199&mrna=NM_145651.2&ctg=NT_009237.18&prot=NP_663626.2&orien=forward&refresh=efresh) (Eylül, **2013**).
- [176] Bally, R., Delettre, J., Structure and refinement of the oxidized P21 form of uteroglobin at 1.64 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 206, 153-170, **1989**.
- [177] PSI The Protein Model Portal, [http://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=SWISSMODEL&template=1utrB&pmpuid=1000000687962&range\\_from=1&range\\_to=95&ref\\_ac=Q8TD33&zid=async](http://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=SWISSMODEL&template=1utrB&pmpuid=1000000687962&range_from=1&range_to=95&ref_ac=Q8TD33&zid=async) (Eylül, **2013**).
- [178] European Bioinformatics Institute (EBI), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878) (Eylül, **2013**).

- [179] European Bioinformatics Institute (EBI), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Domains?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Domains?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878) (Eylül, 2013).
- [180] Nordlund-Muller, L., Andersson, O., Ahlgren, R., Schilling, J., et al., Structure, and Expression of a Rat Binding Protein for Polychlorinated Biphenyls, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 12690-12693, 1990.
- [181] Singh, G., Katyal, S.L., Brown, W.E., Phillips, S., Kennedy, A.L., Anthony, J., Squeglia, N., Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein, *Biochimica et Biophysica Acta*, 950, 329-337, 1988.
- [182] Parker, M., Needham, M., White, R., Prostatic steroid binding protein, gene duplication and steroid binding, *Nature*, 298, 92-94, 1982.
- [183] Kim, J.I., Ju, Y.S., Park, H., Kim, S., Lee, S., Yi, J.H., Mudge, J., Miller, N.A, Hong, D., Bell, C.J., Kim, H.S., Chung, I.S., Lee, W.C., Lee, J.S, Seo, S.H., Yun, J.Y., Woo, H.N., Lee, H., Suh, D., Lee, S., Kim, H.J., Yavartanoo, M., Kwak, M., Zheng, Y., Lee, M.K., Park, H., Kim, J.Y, Gokcumen, O, Mills, R.E., Zaranek, A.W., Thakuria, J., Wu, X., Kim, R.W., Huntley, J.J., Luo, S., Schroth, G.P., Wu, T.D., Kim, H., Yang, K.S., Park, W.Y., Kim, H., Church, G.M., Lee, C., Kingsmore, S.F., Seo, J.S.,. A highly annotated whole-genome sequence of a Korean individual, *Nature*, 20, 460, 7258, 1011-5, 2009.
- [184] The 1000 Genome Consortium, A map of human genome variation from population-scale sequencing, *Nature*, 467, 1061–1073, 2010.
- [185] Wheeler, D.A., The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing, *Nature*, 452, 872–876, 2008.
- [186] The National Center for Biotechnology Information, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_retrieve.cgi?subsnp\\_id=254803959](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_retrieve.cgi?subsnp_id=254803959) (Eylül, 2013).

- [187] Drmanac, R., Sparks, A.B., Callow, M.J., Halpern, A.L., Burns, N.L., Kermani, B.G., Carnevali, P., Nazarenko, I., Nilsen, G.B., Yeung, G., Dahl, F., Fernandez, A., Staker, B., Pant, K.P., Baccash, J., Borcharding, A.P., Brownley, A., Cedeno, R., Chen, L., Chernikoff, D., Cheung, A., Chirita, R., Curson, B., Ebert, J.C., Hacker, C.R., Hartlage, R., Hauser, B., Huang, S., Jiang, Y., Karpinchyk, V., Koenig, M., Kong, C., Landers, T., Le C., Liu, J., McBride, C.E., Morenzoni, M., Morey, R.E., Mutch, K., Perazich, H., Perry, K., Peters B.A., Peterson, J., Pethiyagoda, C.L., Pothuraju, K., Richter C., Rosenbaum AM, Roy S, Shafto J, Sharanhovich U, Shannon KW, Sheppy ,C.G., Sun M., Thakuria J.V., Tran A., Vu, D., Zaranek, A.W., Wu, X., Drmanac,, S., Oliphant, A.R., Banyai, W.C., Martin, B., Ballinger, D.G., Church, G.M., Reid, C.A., Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays, *Science*, 1, 327, 5961, 78-81, **2010**.
- [188] The National Center for Biotechnology Information, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_viewTable.cgi?handle=NHLBI-ESP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_viewTable.cgi?handle=NHLBI-ESP) (Eylül, **2013**).
- [189] Ahmed, F.E., Detection of genetically modified organisms in foods, *Trends in Biotechnology*, 5, 215-23, **2002**.
- [190] Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al., The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125, **2006**.
- [191] Midilli, K., ve Türkoğlu, S., Moleküler mikrobiyolojide çoklu ve hızlı saptama yöntemlerinde gelişmeler, *ANKEM Dergisi*, 22(4), 213-216, **2008**.
- [192] Günel, T., ve Aydınli, K., Real-Time PCR” ve Uygulama Alanları, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2, 2, 43-45, **2009**.
- [193] The National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml) (Eylül, **2013**).
- [194] Ginzinger, D.G., Gene Quantification using real-time quantative PCR: an emerging technology hits the mainstream, *Experimental Hematology*, 30, 503–512, **2002**.
- [195] Günel, T., Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”, Search Results Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi , 27, 763-767, **2007**.

- [196] Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R., Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology*, 10, 413-417, **1992**.
- [197] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R., Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11, 1026–1030, **1993**.
- [198] Haugland, R.P., *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Ninth Edition, *Molecular Probes*, Inc., **2002**.
- [199] Forster, T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Annals of Physics* (Leipzig), 2, 55-75, **1948**.
- [200] Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, in: “Chapter 2”, Plenum Press, New York, **1983**.
- [201] Asuragen, Inc.  
[www.asuragen.com/Services/services/gene\\_expression/ab\\_taqman.aspx](http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx) (Eylül, **2013**).
- [202] Durmaz, R., *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 50-55, **2001**.
- [203] Park, S., Wong, M., Marras, S.A., et al., Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2829-36, **2000**.
- [204] Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., and Brown, T., Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection, *Nucleic Acids Research*, 28, 3752-3761, **2000**.
- [205] Yen, M.Y., Yen, T.C., Pang, C.Y., et al., Mitochondrial DNA mutation in Leber’s hereditary optic neuropathy, *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 33, 2561-2566, **1992**.
- [206] Lüleyap, Ü., *Moleküler Genetiğin Esasları*, Nobel Tıp Kitabevi, Adana, 192-198, **2008**.



- [207] European Bioinformatics Institute (EBI), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878) (Eylül, **2013**).
- [208] European Bioinformatics Institute (EBI), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Sequence\\_cDNA?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000188076;r=11:193080-194573;t=ENST00000342878) (Eylül, **2013**).
- [209] European Bioinformatics Institute (EBI), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), and the Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Sequence\\_cDNA?db=core;g=ENSG00000075624;r=7:5566782-5603415;t=ENST00000331789](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000075624;r=7:5566782-5603415;t=ENST00000331789)
- [210] Schmittgen, T.D., Livak, K.J., Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nature Protocols*, 3, 1101 – 1108, **2008**.
- [211] Universal Protein Resource, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8TD33> (Eylül, **2013**).
- [212] Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R., Chan, A.P., Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels, *PLoS ONE*, 7, 10, **2012**.
- [213] Choi, Y., *A Fast Computation of Pairwise Sequence Alignment Scores Between a Protein and a Set of Single-Locus Variants of Another Protein*, in: “*Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine (BCB12)*”, ACM, New York, NY, USA, 414-417, **2012**.
- [214] Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., et al., A method and server for predicting damaging missense mutations, *Nature Methods*, 7, 4, 248-9, **2010**.
- [215] Ng, P.C, Henikoff, S., SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function, *Nucleic Acids Research*, 31, 13, 3812-4, **2003**.
- [216] Polymorphism Phenotyping v2, <G:\PolyPhen-2 report for Q8TD33 G51V.mh> (Eylül, **2013**)

- [217] Protein Variation Effect Analyzer, [http://provean.jcvi.org/provean\\_seq\\_report.php?jobid=203314967271610](http://provean.jcvi.org/provean_seq_report.php?jobid=203314967271610) (Eylül, 2013)
- [218] [http://sift.jcvi.org/sift-bin/retrieve\\_enst.pl](http://sift.jcvi.org/sift-bin/retrieve_enst.pl) (Eylül, 2013)
- [219] Collins, F.S., et al., A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation, *Genome Research*, 8, 1229-1231, **1998**.
- [220] Goldstein, D.B., Cavalleri, G.L., Genomics: understanding human diversity, *Nature*, 437, 1241-1242, **2005**.
- [221] Edmonds, C.A., et al., Mutations arising in the wave front of an expanding population, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 975-979, **2004**.
- [222] Bell, J., Predicting disease using genomics, *Nature*, 429, 453-456, **2004**.
- [223] Chakravarti, A., Population genetics—making sense out of sequence, *Nature Genetics*, 21, 56–60, **1999**.
- [224] Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., Genome-wide association studies for common diseases and complex traits, *Nature Reviews Genetics*, 6, 95–108, **2005**.
- [225] Altshuler, D.M., Gibbs R.A., Peltonen, L., Dermitzakis, E., Schaffner, S.F., et al., Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations, *Nature*, 467, 52–58, **2010**.
- [226] Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., et al., A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs, *Nature*, 449: 851–861, **2007**.
- [227] International Hap Map Consortium, A haplotype map of the human genome, *Nature* 437, 1299–1320, **2005**.
- [228] Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers J., Abril, J.F., et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature*, 420, 520–562, **2002**.

- [229] Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., et al., Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution, *Nature*, 428, 493–521, **2004**.
- [230] Cooper, G.M, Brudno, M., Stone, E.A., Dubchak, I., Batzoglou, S., et al. Characterization of evolutionary rates and constraints in three Mammalian genomes, *Genome Research*, 14, 539–548, **2004**.
- [231] Margulies, E.H., Cooper, G.M., Asimenos, G., Thomas, D.J., Dewey, C.N., et al. Analyses of deep mammalian sequence alignments and constraint predictions for 1% of the human genome, *Genome Research*, 17, 760–774, **2007**.
- [232] Olson, M., Enrichment of super-sized resequencing targets from the human genome, *Nature Methods*, 4, 891–892, **2007**.
- [233] Jarjanazi, H, Savas, S, Pabalan, N, Dennis, JW, Ozcelik, H., Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins, *Proteins*, 1, 70, 2, 394-403, **2008**.
- [234] Blobel, G., Dobberstein, B., Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma, *The Journal of Cell Biology*, 67, 3, 835–51, **1975**.
- [235] von Heijne, G., Gavel, Y., Topogenic signals in integral membrane proteins, *European Journal of Biochemistry*, 174, 4, 671–8, **1988**.
- [236] Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., et al., A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs, *Nature*, 449, 851–861. **2007**.
- [237] Botstein, D., Risch, N, Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease, *Nature Genetics*, 33, 1228–237, **2003**.
- [238] Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update, *Human Mutation* , 21, 577–581, **2003**.

- [239] Prusiner, S.B., Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions, *The New England Journal of Medicine*, 344, 20, 1516-1526, **2001**.
- [240] Beyer, K., Ariza, A., Protein aggregation mechanisms in synucleinopathies: commonalities and differences, *Journal of Neuropathology&Experimental Neurology*, 66, 11, 965-974, **2007**.
- [241] Wisniewski, T., Aucouturier, P., Soto, C., Frangione, B., The prionoses and other conformational disorders, *Amyloid*, 5, 3, 212-224, **1998**.
- [242] Nelson, D.L., and Cox M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, in: "Chapter 5: Protein Function", Fourth Edition, W. H. Freeman & Company, **2004**.
- [243] Kreil, G., D-Amino acids in animal peptides, *The Annual Review of Biochemistry*, 66, 337-345, **1997**.
- [244] Watson, M.A., Darrow, C., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Fleming, T.P., Structure and transcriptional regulation of the human mamaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13, *Oncogene*, 16, 817-24, **1998**.
- [245] Sandford, A., Shirakawa, T., Moffatt, M., Daniels, S., Ra C., Faux, J., et al., Localization of atopy and beta subunit of the high affinity IgE receptor FcεRI beta, on chromosome 11q, *The Lancet*, 341, 332-4, **1993**.
- [246] Szeptewski, P., Gaudray, P., FcεRI beta, a candidate gene for atopy, is located in 11q13 between CD20 and TCN1, *Genomics*, 19, 399-400, **1994**.
- [247] Chen, L.C., Tseng, H.M., Wu, C.J., Kuo, M.L., Wu, C.J., Gao, P.S., Yeh, K.W., Yao, T.C., Lee W.I., Ou L.S., Huang, J.L., Huang, S.K.. Evaluation of a common variant of the gene encoding clara cell 10 kd protein (CC10) as a candidate determinant for asthma severity and steroid responsiveness among Chinese children, *Journal Asthma*, 49, 7, 665-72, **2012**.
- [248] Bignotti, E., Tassi, R.A., Calza, S., Ravaggi, A., Rossi, E., Donzelli, C., Todeschini, P., Romani, C., Bandiera, E., Zanotti, L., Carnazza, M., Quadraro, F., Tognon, G., Sartori E., Pecorelli, S., Roque, D.M., Santin, A. D., Secretoglobin expression in

ovarian carcinoma: lipophilin B gene upregulation as an independent marker of better prognosis, *Journal of Translational Medicine*, 2, 11, 162, **2013**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sibel ÖZDAŞ

Doğum Yeri : Adana

Doğum Tarihi : 09/03/1981

Medeni Hali : Evli, bir çocuk

E-posta : s\_unurlu@yahoo. com

Adresi : Turgut Özal Bulvarı Yuva Mh. Batıyerleşim Sitesi 9/35 Batıkent/ANKARA

## Eğitim

Lise : 70. Yıl Sağlık Meslek Lisesi

Lisans : Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Çukurova Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Sosyal Bilimler ABD  
Tezsiz Yüksek Lisans (2004-2006)

Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Mikrobiyoloji AD'da "Kolposkopi Uygulanan Hastalarda Real-Time  
PZR ile Human Papillomavirus ve *Human Papillomavirus* Tip 16 Tanısı ve  
Önemi" adlı tez konusuyla Yüksek Lisans (2005-2007).

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji AD'da,  
"Nazal Polipli Hastalarda *SCGB1C1 (Ligand Binding Protein, RYD5)*  
Genindeki Moleküler Patolojilerin Araştırılması" adlı tez konusuyla  
Doktora öğrenimi (2009-2013)

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : KPDS, 86

## İş Deneyimi

2009-2011 arasında, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı, Prof. Dr. Rıza Durmaz danışmanlığında, “*Stafilococ pneumonia* Türkiye sürvelans” (Multipleks PZR).

2010 yılı, Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi 2. KBB Kliniğinin Bilimsel Projeleri Destekleme Birimi tarafından destekli projesi “Nazal Polipli Hastalığının Etyolojisinde Otoinflamatuvar Hastalığa Yol Açan *MEFV* ve *CIAS1* Genlerinin Rolünün Araştırılması”

2011 yılı, Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi 2. KBB Kliniğinin Bilimsel Projeleri Destekleme Birimi tarafından destekli projesi “Sekretogloblin Süper Ailesinden *UGRP 2* geni ile Nazal Polip Arasındaki Moleküler İlişkinin Araştırılması”

2013 yılı, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen 013D04601005 Numaralı proje “OSAS (Obstrüktif Uyku Apne Sendromu) Hastalarında *IL-10* Genindeki Moleküler Patolojilerinin Araştırılması“

## Sunumlar ve Yayınlar

9-13 Aralık 2007, 3. Ulusal Viroloji Kongresi, “Kolposkopi Uyulanan Hastalarda Real-Time PZR ile *Human Papillomavirus* ve *Human Papillomavirus* Tip 16 Tanısı ve Önemi”, (p38)

27-30 Eylül 2009, Uluslararası 12th Annual ESCV Meeting "Diagnosing *Human Papillomavirus* and *Human Papillomavirus* Type 16 by Real-Time PZR in Patient Undergone to Colposcopy and Significance of The Diagnosis" (p)

2013 yılı, Türkiye Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi “Kolposkopi Uyulanan Hastalarda Real-Time PZR ile *Human Papillomavirus* ve *Human Papillomavirus* Tip 16, Tip 18 Tanısı ve Önemi” (doi, 10. 5505/tjod. 2013. 40316, TJOD 2013, 10 - 2 | Sayfalar 79 – 89).

26-28 Nisan 2012, 10. Uluslararası Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, "Nazal Poliposis Hastalığının Etyolojisinde Otoinflamatuvar Hastalığa Yol Açan *MEFV* ve *CIAS1* Genlerinin Rolünün Araştırılması", (SS-065)

## Deneyim Alanları

Moleküler tekniklerde deneyimliyim; Real-Time PZR, Multipleks PZR, Klasik PZR, Dizi Analizi, Ekspresyon Analizi

### **Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi**

2012 yılında, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 11.400.00 TL'lik bütçeyle ile desteklenen 012D06601008 Numaralı “Nazal Polipli Hastalarda *SCGB1C1* (*ligand-binding protein, RYD5*) Genindeki Moleküler Patolojilerin Araştırılması“ isimli proje

### **Tezden Üretilmiş Yayınlar**

### **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

23–26 Mayıs 2013, 9. Türk Rinoloji Kongresi, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen 013D04601005 Numaralı “Nazal Polipli Hastalarda *SCGB1C1* (*ligand-binding protein, RYD5*) Genindeki Moleküler Patolojilerin Araştırılması”, (S-10).





**NAZAL POLİPLİ HASTALARDA *SCGB1C1*  
(*LIGAND-BINDING PROTEIN RYD5*) GENİNDEKİ  
MOLEKÜLER PATOLOJİLERİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF MOLECULAR PATHOLOGIES IN  
*SCGB1C1 (LIGAND-BINDING PROTEIN RYD5)*  
GENE IN PATIENTS WITH NASAL POLYPOSIS**

**SİBEL UNURLU ÖZDAŞ**

**PROF. DR. AFİFE İZBIRAK**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**DOKTORA TEZİ**

olarak hazırlanmıştır

2013