



Paper Produced from PhD Thesis Presented at
Graduate School of Natural and Applied Sciences, Yıldız Technical University
Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi Kapsamında Hazırlanan Yayın



Research Article / Araştırma Makalesi

GENOTYPING AND ANALYSIS OF rs7501939 POLYMORPHISM FOR PROSTATE CANCER

Ebru ÖZKAN¹, Ayşegül ERDEMİR¹, Buğra Doğukan TÖRER², Ali İhsan TAŞCI³, Yasemin BASKIN⁴, Hülya ELLİDOKUZ⁴, Dilek TURGUT BALIK*¹

¹Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Davutpaşa-İSTANBUL

²Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, İSTANBUL

³Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İSTANBUL

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İZMİR

Received/Geliş: 17.10.2014 Accepted/Kabul: 03.11.2015

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common cause of death from cancer among men in Turkey. It is known that genetics plays a critical role in prostate cancer susceptibility. Several genome wide association studies reported that rs7501939 polymorphism was significantly associated with prostate cancer. To confirm association of rs7501939 alleles with prostate cancer in our population, genotyping was conducted by using the iPLEX assay in study group which consists of 85 prostate cancer patients and 90 healthy controls. In this study, previous reports of rs7501939 variant association with prostate cancer was not confirmed for our population. The odds ratio for prostate cancer was 0,75 (95% CI=0,48-1,18) for carriers of any T allele compared with noncarriers (p=0,211). Chi square and Fisher's exact test results showed that rs7501939 variant was not statistically associated with clinico-pathological variables of prostate cancer patients in our population.

Keywords: Prostate cancer, single nucleotide polymorphism (SNP), SNP genotyping.

PROSTAT KANSERİ İÇİN rs7501939 POLİMORFİZMİNİN GENOTİPLENMESİ VE ANALİZİ

ÖZ

Prostat kanseri Türkiye'de erkekler arasında kanserden ölümlerin ikinci en yaygın sebebidir. Prostat kanserine yatkınlıkta genetiğin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Farklı genom boyu ilişkilendirme çalışmaları rs7501939 polimorfizminin prostat kanseri ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu rapor etmiştir. rs7501939 allellerinin bizim toplumumuzda prostat kanseri ile ilişkisini doğrulamak için, iPLEX yöntemi ile 85 prostat kanseri hastası ve 90 sağlıklı kontrolden oluşan çalışma grubunda genotipleme yapılmıştır. Bu çalışmada, rs7501939 polimorfizminin prostat kanseri ile ilişkili olduğuna dair daha önceki raporlar doğrulanmamıştır. Prostat kanseri için T alleli taşıyanlarda bu alleli taşımayanlara göre odds ratio değerinin 0,75 (%95 GA=0,48-1,18) olduğu hesaplanmıştır (p=0,211). Ki kare ve Fisher kesinlik testi sonuçları rs7501939 polimorfizminin toplumumuzdaki prostat kanseri hastalarının kliniko-patolojik değişkenleriyle istatistiksel olarak ilişkili olmadığını göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Prostat kanseri, tek nükleotid polimorfizmi (SNP), SNP genotipleme.

* Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: dilekbalik@gmail.com, tel: (212) 383 46 29

1. GİRİŞ

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması ve organ hacminin malign büyümesi olarak tanımlanmaktadır [1]. Prostat kanseri insidansı ırklara göre oldukça farklılık göstermesine rağmen, dünya genelindeki erkekleri etkileyen en ciddi hastalıklardan biridir [2]. Prostat kanserinin doğrudan sebebi henüz tanımlanmamış olmakla beraber prostat kanserine neden olan yaş, kalıtsal yatkınlık, beslenme biçimi, ırk ve genetik faktörler gibi birkaç risk faktörü tespit edilmiştir [3].

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), genomun herhangi bir bölgesinde bulunan tek nükleotid dizilim farklılıklarıdır [4]. SNP'lerin biyolojik etkisi bazı durumlarda bir ya da daha fazla hastalığa yatkınlığı artırabilmektedir. Hastalığa yatkınlık ve hastalığın ortaya çıkması üzerinde etkili olan SNP'lerin tanımlanması hasta ve kontrollerde SNP'lerin genotiplenmesi ve frekans farklılıklarının araştırılması ile başarılmaktadır [5]. İnsan popülasyonları arasında farklılıklar bulunmaktadır, bu nedenle bir coğrafik ya da etnik grupta yaygın olan bir SNP alleli bir diğerinde daha nadir olabilmektedir. Bazı SNP'ler belirli bir popülasyona özgüdür [6]. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar ile farklı toplumlarda rs7501939 polimorfizminin prostat kanseri ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir [7], [8], [9], [10]. Toplumumuzda SNP'lerin prostat kanseri ile ilişkisi büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı toplumumuzda rs7501939 polimorfizminin prostat kanseri ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

2. DENEYSSEL ÇALIŞMA

2.1. Kimyasal Maddeler ve Primerler

Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapmak amacıyla kullanılan kandan DNA izolasyon kiti (Invisorb Spin Blood Mini Kit, Katalog No:1031100300) Invitex'ten temin edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan ve içerisinde dNTP karışımı, 10X PCR Tamponu ve MgCl₂ içeren PCR seti Sequenom firmasından, bu reaksiyonda kullanılan PCR enzimi ise Roche'dan temin edilmiştir. PCR sonrası temizleme reaksiyonunda (SAP reaksiyonu) kullanılan shrimp alkalen fosfataz enzimi ve tampon çözeltisi, tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılan iPLEX enzim, 10X iPLEX tampon çözeltisi, iPLEX terminasyon karışımı ve rezin ile temizleme aşamasında kullanılan rezin Sequenom firmasından temin edilmiştir.

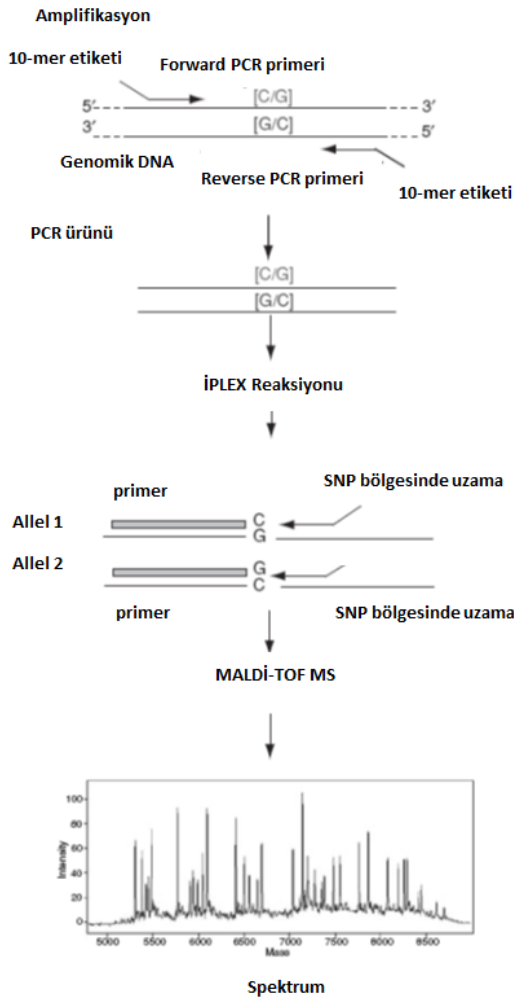
PCR'da kullanılan amplifikasyon primerleri ve tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılan uzama problemleri (primerleri) Sequenom'un Assay Designer yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır [11]. rs7501939 polimorfizminin genomdaki konumu ve polimorfik bölgenin yer aldığı yaklaşık 200 baz çiftlik DNA dizileri elde edilerek primerlerin ve uzama problemlerinin genomdaki konumu doğrulanmıştır.

2.2. Çalışma Grubu ve DNA İzolasyonu

Çalışma grubu 85 prostat kanseri hastası ve 90 kontrol olmak üzere 175 bireyden oluşmaktadır. Periferik kan örnekleri, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin 2012/13/10 nolu kararı ile 24.09.2012 tarihinde alınan etik kurul onayı ile EDTA'lı tüplere alınmıştır. Temin edilen kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu ticari kit (Invisorb Spin Blood Mini Kit, Katalog No:1031100300) kullanılarak üretici talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. DNA miktar ve saflık tayini 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki UV spektrofotometrede ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'nın saf olarak elde edilebilmesi için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değeri oranının 1.7 ile 2.0 arasında olması gerekmektedir ($A_{260}/A_{280}=1.7-2.0$) [12].

2.3. SNP Genotipleme

Bu çalışmada rs7501939 polimorfizminin genotipleme için iPLEX yöntemi uygulanmıştır. Bu teknikte SNP içeren genom bölgeleri spesifik primerler kullanılarak PCR aracılığıyla çoğaltılır. Ürünler kalıp olarak kullanılarak daha sonra tek baz uzama reaksiyonuna (iPLEX reaksiyonu) maruz bırakılır. Bir tespit edici primer 3' ucundaki nükleik asit sekansına yapışır. Daha sonra bu primer ddNTP içeren tek bir baz tarafından uzatılır [13]. Burada, polimorfik bölgeyi içeren PCR ürünü kalıp görevini görmektedir ve primerin 3' ucu allelik bazdan meydana gelmektedir. Sadece 3' bazın hedef DNA'da bulunan allele komplementer olması durumunda primer uzama olayının izlenmesi DNA örneğinde bulunan allelin anlaşılmasına izin verir [14], [15]. Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanlı (MALDI-TOF) kütle spektrometrisi (MS: Mass Spectrometry) ile allellerin kütle esaslı tespit edilmesi gerçekleştirilir (Şekil 1).



Şekil 1. iPLEX reaksiyon basamakları şeması [16]

Nükleik asit değişimlerinin belirlenebilmesi ve tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılabilmesi için genomik DNA'daki hedef bölge, tasarım sonucu elde edilen forward ve reverse primer çiftleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon 92 °C' de 2 dakika ön denatürasyon, 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 56 °C'de 30 saniye bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzama ile 45 döngü ve 72 °C'de 3 dakika son uzama olacak şekilde Roche PCR enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünlerindeki bağlanmamış dNTP'ler shrimp alkalin fosfat (SAP) ile nötralize edilmiştir. SAP, serbest dNTP'den bir fosfat grubunu keserek geri dönüşümsüz olarak dNDP'ye çevirmektedir. 0,30 µl SAP enzimi (1,7 U/µl), 0,17 µl TS Tamponu (10X) ve 1,53 µl dH₂O ile hazırlanan 2µl SAP karışımı multipleks PCR ürünlerine eklenmiştir. Örnek plakası yavaşça karıştırılıp 1000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. SAP reaksiyonu 37 °C' de 40 dakika süreyle gerçekleştirilerek, reaksiyon karışımı enzimin inaktive edilmesi için 85 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. SAP reaksiyonu ürünleri, daha sonra tek baz spesifik uzama reaksiyonuna tabi edilmiş, dizayn edilen problemlerin hedef bölge ile hibridizasyonu ve tek kütle-modifiye nükleotid uzaması gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 0,619 µl dH₂O, 0,2 µl iPLEX tamponu (10X), 0,2 µl iPLEX terminasyon karışımı, 0,940 µl iPLEX uzama primeri karışımı ve 0,041 µl iPLEX enzim kullanılarak hazırlandıktan sonra 1000 rpm hızında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Örnek plakası üzerindeki her kuyuya 2 µl tek baz spesifik uzama reaksiyon karışımı eklenmiştir. Örnek plakası yavaşça karıştırılmış ve termal döngüleyici aşaması öncesinde 1000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir [17], [18]. Tek baz spesifik uzama reaksiyonu koşulları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Tek baz spesifik uzama reaksiyonu koşulları

Basamaklar	İşlem	Sıcaklık ve Süre
1	Ön denatürasyon	94 °C'de 30 saniye
2	Denatürasyon	94 °C'de 5 saniye
3	Bağlanma	52 °C'de 5 saniye
4	Uzama	80 °C'de 5 saniye
5	Son uzama	72 °C'de 3 dakika
Döngü sayıları		3-4 basamaklar 5 döngü; 2-4 basamaklar 40 döngü

Kütle spektrometrik analiz optimizasyonu için tek baz spesifik uzama reaksiyonu ürünleri Na⁺, K⁺ ve Mg²⁺ gibi iyonları uzaklaştırarak arka plan kirliliğini minimuma indirmek için katyonik değişim sağlayan rezin ile muamele edilmiştir [16], [17]. Elde edilen modifiye ürünü, nano litre (nl) hacminde ortalama 15 nl PCR ürünü 384-element SpectroCHIP® II üzerine dağıtmak için nanodispenser kullanılmıştır. Nanodispenser ile üzerine PCR ürünü dağıtılan 384-element SpectroCHIP® II analizi için kütle spektroskopisi (MassARRAY® Analyser 4) cihazına yüklenmiştir. Cihaza yükleme aşamasından sonra sonuç alımı maksimum 40 dakika sürmüştür. Lazer atımı sonrası elde edilen verilerin analizi, spektro görüntüsünün ve allel spesifik piklerin elde edilmesi için (iPLEX SpectroCHIP® II analizi) cihazda bulunan MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımı kullanılmıştır [17], [18].

2.4. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 20.0, Chicago, IC, USA) paket programı kullanılmıştır. Tüm testlerde p≤0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. rs7501939 için Hardy Weinberg dengesini değerlendirmek amacıyla ki-kare testi uygulanmıştır. SNP allellerinin prostat kanseri ile ilişkilendirilebilmesi için çalışma popülasyonunda kontrol grubuna göre yaygın (majör) olan allel belirlenerek referans olarak alınmıştır [19]. Hastalık ile ilişkili olabileceği öngörülen minör

allelin referans allele göre odds ratio (OR) değeri ve % 95 güven aralıkları (GA) hesaplanmıştır. SNP genotiplerinin prostat kanseri ile ilişkilendirilmesi için çalışma popülasyonunda kontrol grubuna göre yaygın olan homozigot genotip belirlenerek referans olarak alınmıştır. OR değerleri ve % 95 güven aralıkları homozigot karşılaştırma modeline (Örneğin AA ile CC) ve dominant modele (Örneğin AA+AC ile CC) göre hesaplanmıştır [19], [20]. Hasta grubunda rs7501939 genotiplerinin ailede kanser öyküsü, ailede prostat kanseri öyküsü, sigara kullanımı, alkol kullanımı, hastalık tanısının konulduğu dönemdeki yaş, Gleason skoru ve PSA değerleri gibi kliniko-patolojik değişkenlerin SNP'lerle ilişkisinin belirlenebilmesi için ki-kare testi ve Fisher kesinlik testi (Fisher's exact test) kullanılmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Hasta ve Kontrol Örneklerinden İzole Edilen DNA'ların Safılık ve Miktar Analizi

DNA örneklerinden 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değeri oranı 1.7 ile 2.0 arasında olanların çalışmaya uygun olması öngörülmektedir [12]. Çalışmamızda izolasyonu tamamlanan örneklerin çoğunluğuna ait A_{260}/A_{280} değerleri 1.7-2.0 arasında olduğundan DNA izolasyonu yapılan her bir örnek (175 örnek) daha sonraki deneysel basamakların gerçekleştirilmesi için çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. rs7501939 Polimorfizminin ve Primerlerin Genomdaki Konumu

Bu çalışmada genotiplenen rs7501939 polimorfizminin genomdaki fiziksel pozisyonunun 36,101,156, kromozom lokasyonunun 17q12, bulunduğu genin HNF1B ve allellerinin C/T olduğu belirlenmiştir [21], [22]. PCR'da kullanılan forward ve reverse primerler ile tek baz spesifik uzama problemlerinin genom dizisi üzerindeki konumları manuel olarak tespit edilmiştir. Böylece yazılımlar kullanılarak tasarlanan primer ve problemlerin SNP'nin bulunduğu genom dizisi üzerindeki konumları doğrulanmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. rs7501939 polimorfizminin bulunduğu DNA dizisi (Forward PCR primeri altı çizili olan diziyeye, reverse PCR primeri mavi ile gösterilen diziyeye göre tasarlanmıştır, uzama problemlerinin dizisi kırmızı ile gösterilmiştir, bç:baz çifti)

SNP'nin bulunduğu DNA dizisi	bç
5'TATATATATTAGCTTGATAGAACAAGAAAAAACGGAAGGGAAAA CTAGTTTCAGGTGAAACAAAAAGAAACGGTGTAGAGGCTGAAATA GATACAG[C/T]ATTGCAACATAATAAGCAATTTATTTCTAAATGGCGC CTTTAAATATGTCAATAAAATTAATTCTGTTTAATGAATAAAAAATCC AGTAATCGAACATA 3'	100 bç [C/T] 100 bç

PCR primerleri tasarlanırken her bir amplifikasyon primerinin 5' ucuna genel bir 10-mer etiketi (5'-ACGTTGGATG-3') eklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle forward PCR primeri tasarlanırken Çizelge 2'de altı çizili olan dizinin 5' ucuna 10-mer etiketi eklenerek primerin dizisi 5'ACGTTGGATGCGGTGTAGAGGCTGAAATAG 3' olarak elde edilmiştir. Çizelge 2'de mavi ile gösterilen dizinin reverse ve komplementeri alınarak 5' ucuna 10-mer etiketi eklenmiş ve reverse PCR primerinin dizisi 5' ACGTTGGATGGACATATTTAAAGCGCCAT' olarak elde edilmiştir. Çizelge 2'de görüldüğü gibi kırmızı ile gösterilen uzama problemlerinin dizisinin 3' ucu SNP'nin bulunduğu bölgenin yanındadır.

3.3. İstatistik Sonuçları

rs7501939 polimorfizmi 175 örnekte genotiplenmiştir. Bunlardan 80 hasta ve 87 kontrol için genotipleme sonuçları elde edilmiştir. Yapılan ki kare testi sonucu rs7501939 genotiplerinin Hardy Weinberg dengesinde olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,05$). rs7501939 allellerinden, C allelinin toplumumuzda yaygın olarak bulunduğu saptanmıştır. T alleli için odds ratio değeri 0,75 (%95 GA= 0,48-1,18) ve p değeri 0,211 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak prostat kanseri ile rs7501939 allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 3). rs7501939 için toplumumuzda yaygın olarak bulunan CC genotipi referans alınarak odds ratio ve p değerleri hesaplanmış ancak p değeri 0,05'ten büyük olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Çizelge 3).

2008 yılında Avrupalı toplumda 1,854 prostat kanseri hastası ve 1,894 kontrol ile yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasında rs7501939 polimorfizmini prostat kanseri ile ilişkilendirmiştir (OR=1,41; $p=9 \times 10^{-12}$) [7]. rs7501939 polimorfizmi Eeles ve arkadaşlarının (2009) Avrupalı toplumda yapmış oldukları bir diğer genom boyu ilişkilendirme çalışmasında prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir [8]. 1,583 hasta ve 3,386 kontrolden oluşan Japon populasyonu ile yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasında rs7501939 polimorfizminin prostat kanseri ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir [9]. 2011 yılında Avrupa toplumundan 2,782 hasta ve 4,458 kontrolden oluşan çalışma grubu ile yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasında rs7501939 polimorfizmi prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (OR=1,19; %95 GA=1,11-1,28; $p=2 \times 10^{-6}$) [10].

Hasta grubunda rs7501939 genotiplerinin ailede kanser öyküsü, ailede prostat kanseri öyküsü, sigara kullanımı, alkol kullanımı, hastalık tanısının konulduğu dönemdeki yaş, Gleason skoru ve PSA değerleri gibi kliniko-patolojik değişkenlerle ilişkisi araştırılmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p > 0,05$).

Çizelge 3. rs7501939 polimorfizminin allel ve genotip frekansları

rs7501939	Hasta (n=80)	Kontrol (n=87)	OR (% 95 GA)	p değeri
C	0,675	0,609	referans	
T	0,325	0,391	0,75 (0,48-1,18)	0,211
CC	36 (0,450)	31 (0,356)	referans	
TC	36 (0,450)	44 (0,506)	0,70 (0,37-1,35)	0,292
TT	8 (0,100)	12 (0,138)	0,57 (0,21-1,58)	0,284
TC+TT	44 (0,550)	56 (0,644)	0,68 (0,36-1,26)	0,218

Acknowledgments / Teşekkür

Bu çalışmanın yürütülmesine 2012-07-04-DOP02 Nolu proje ile mali destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] İzmirli, M., “Prostat Kanserinin Elac2 Ve Srd5a2 Genlerindeki Polimorfizmler ile İlişkisinin Araştırılması”, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010.
- [2] Chang, C.H. Chiu, C.F. Wu, H.C. ve diğerleri, “Significant association of XRCC4 single nucleotide polymorphisms with prostate cancer susceptibility in Taiwanese males”, *Molecular medicine reports*, 1: 525-530, 2008.
- [3] Kirby, R., Madhavan, S.G., . “Prostate cancer”, *Surgery, Renal and Urology II*, 28: 594-598, 2010.
- [4] Wang, D.G. Fan, J.B. Siao, C.J. ve diğerleri, “Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome”, *Science*, 280: 1077-1082, 1998.
- [5] Harley, I., Narod, S., “Single nucleotide polymorphisms—variation on a theme”, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 116: 1556-1557, 2009.
- [6] Angaji, S.A. Akashi, K. Darvishani, S. ve diğerleri, “SNP and its Applications in Treating Human Diseases”, *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*, 5, 2011.
- [7] Eeles, R.A. Kote-Jarai, Z. Giles, G.G. ve diğerleri, “Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility”, *Nature genetics*, 40: 316-321, 2008.
- [8] Eeles, R.A. Kote-Jarai, Z. Al Olama, A.A. ve diğerleri, “Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study”, *Nature genetics*, 41: 1116-1121, 2009.
- [9] Takata, R. Akamatsu, S. Kubo, M. ve diğerleri, “Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population”, *Nature genetics*, 42: 751-754, 2010.
- [10] Schumacher, F.R. Berndt, S.I. Siddiq, A. ve diğerleri, “Genome-wide association study identifies new prostate cancer susceptibility loci”, *Human molecular genetics*, 20: 3867-3875, 2011.
- [11] Sequenom, Available from: <https://www.mysequenom.com/Home>. [Accessed 20 Nisan 2012].
- [12] Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press New York*, 1989.
- [13] Ateş Sönmezoglu, Ö. Yıldırım, A. Eserkaya Güleç, T., “Tek nükleotid farklılıkları (SNP) ve buğdayda kullanımı”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3: 55-66, 2010.
- [14] Pastinen, T. Raitio, M. Lindroos, K. ve diğerleri, “A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays”, *Genome Research*, 10: 1031-1042, 2000.
- [15] Kwok, P.-Y., Chen, X., “Detection of single nucleotide polymorphisms”, *Current issues in molecular biology*, 5: 43-60, 2003.
- [16] Gabriel, S. Ziaugra, L., Tabbaa, D., “SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform”, *Current protocols in human genetics*: 2.12. 11-12.12. 16, 2009.
- [17] Sequenom, *iPLEX Gold Application Guide*, 2009.
- [18] Sequenom, *iPLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol*, 2009.
- [19] Mittal, R.D. Mittal, T. Singh, A.K. “Association of caspases with an increased prostate cancer risk in north Indian population”, *DNA and cell biology*, 31: 67-73, 2012.
- [20] Hui, J. Xu, Y. Yang, K. ve diğerleri, “Study of Genetic Variants of 8q21 and 8q24 Associated with Prostate Cancer in Jing-Jin Residents in Northern China”, *Clin. Lab*, 5: 1, 2014.
- [21] Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları kataloğu, <http://www.genome.gov/gwastudies/>, [Accessed 20 Mart 2014].
- [22] SNP veri tabanı, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, [Accessed 25 Nisan 2013].