



Research Article / Araştırma Makalesi

GENOTYPING AND ANALYSIS OF rs911271 POLYMORPHISM FOR INTRACRANIAL ANEURYSM

Ayşegül ERDEMİR¹, Ebru ÖZKAN¹, Nurten TURAN GÜNER², Hakan H. SELÇUK²,
Batuhan KARA², Yasemin BASKIN³, Hülya ELLİDOKUZ³, Hasan H. BALIK⁴, Dilek
TURGUT BALIK*¹

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

²Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyoloji Bölümü, İSTANBUL

³Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İZMİR

⁴İstanbul Aydın Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Yazılım Mühendisliği Bölümü, İSTANBUL

Received/Geliş: 17.10.2014 Accepted/Kabul: 03.11.2015

ABSTRACT

Intracranial aneurysms (IA) are balloon like dilation of the intracranial arterial wall in the brain. It affects %2-5 of the general population and arise from the action of multiple genetic and environmental risk factors. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are variations at a single position in a DNA sequence among individuals and they are associated with certain diseases to evaluate an individual's genetic predisposition to develop a disease. Recently, several SNPs associated with IA have been identified in genome-wide association studies. To our knowledge, the effects of these SNP's in Turkish population has not been studied and this arises great necessity to study them. In this study it is aimed to genotype and analyze rs911271 polymorphism, known to be associated with IA in different populations, to determine genetic risk predisposition of this SNP in Turkish population. Genotyping of rs911271 polymorphism was conducted by using the iPLEX assay in study group which consists of 105 intracranial aneurysm patients and 102 healthy controls. Findings of this study showed that there is a lack of association between rs911271 and intracranial aneurysm in Turkish population. Despite the odds ratio was determined as 1,03 (95% CI=0,70-1,51) for carriers of any A allele, this result was not associated with IA in our population because of having a p value of 0,890.

Keywords: Intracranial aneurysm, single nucleotide polymorphism (SNP), SNP genotyping.

İNTRAKRANİYAL ANEVİZMA İÇİN rs911271 POLİMORFİZMİNİN GENOTİPLENMESİ VE ANALİZİ

ÖZ

İntrakranial anevrizmalar (IA) beyindeki intrakranial arter duvarının baloncuk şeklinde genişlemesidir. Birçok genetik ve çevresel risk faktörlerinden kaynaklanan sebepler ile toplumun %2-5'ini etkilemektedirler. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) DNA dizilimindeki bir pozisyonda görülen varyasyonlardır ve bireylerin belirli hastalıkları geliştirme durumlarına karşı genetik yatkınlığını belirleme ile ilişkilendirilmektedirler. Son zamanlarda, genom boyu araştırma çalışmaları ile birkaç tek nükleotid polimorfizmi intrakranial anevrizma ile ilişkilendirilmiştir. Bilgimiz dahilinde, Türk popülasyonundaki etkileri henüz değerlendirilmemiş olan bu SNP'lerin çalışılmasına büyük ihtiyaç doğmaktadır. Bu çalışmada farklı toplumlarda IA ile ilişkilendirilen rs911271 polimorfizminin Türk toplumunda genetik risk yatkınlığını belirlemek amacıyla genotipleme ve analizi gerçekleştirilmiştir. 105 intrakranial anevrizma hastası ve 102 kontrol bireyinden oluşan çalışma grubunda rs911271 polimorfizminin genotipleme iPLEX® yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın bulguları Türk toplumunda IA ile rs911271 polimorfizmi arasında ilişki bulunmadığını göstermiştir. A alleli taşıyan bireylerde OR değeri 1,03 (95% CI=0,70-1,51) olarak belirlenmesine karşın, bu sonuç p değerinin 0,890 olarak bulunmasından dolayı toplumumuzda IA ile ilişkilendirilememiştir.

Anahtar Sözcükler: İntrakranial anevrizma, tek nükleotid polimorfizmi (SNP), SNP genotipleme.

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

1. GİRİŞ

Intrakranial anevrizmalar (IA) genel toplumun %2-5'ini etkileyen ve arter duvarında internal elastik lamina tabakasındaki kollajen fiberlerin dejenerasyonu ve zayıflaması sonucunda oluşan bir hastalıktır [1]. Anevrizmalar baş ağrısından kitle etkisine, tromboemboliye ve subaraknoid kanamaya (SAK) uzanan klinik tablolara yol açabilir. IA'ların en istenmeyen komplikasyon olasılığı değiştiremeyen bir takım risk faktörlerine bağlı olarak oluşan kanamadır. SAK, anevrizmaların en sık görülen ve genç erişkinlerde çoğunlukla ölümlü sonuçlanan bir formudur [2]. Tüm tıbbi ve nöroşirürjik gelişmelere karşın intrakraniyal anevrizmaya bağlı gelişen SAK olgularında bireylerin %40-50'si tedaviye rağmen kaybedilir. Buna ilave olarak %10-20'si çoğunlukla felç geçirir ve tüm vakaların yaklaşık %40'ı iyileşme göstermektedir. [3]. İntrakranial anevrizma oluşumunun etiyojisi tam olarak kesinleşmemiş olmakla beraber, IA oluşumu ve gelişiminde rol oynayan faktörleri anevrizma ve çevre vasküler yapılarından bağımsız olanlar, anevrizma ve serebral sirkülasyon ile ilgili olanlar ve genetik faktörler olarak gruplandırmak mümkündür. Yaş, cinsiyet, hipertansiyon, sigara kullanımı, alkol kullanımı, özgeçmişte diyabet, geçirilmiş SAK varlığı ve etnisite gibi faktörler anevrizma risk faktörleri arasında yer almaktadır. Bunlardan en çok incelenenler genetik faktörler ile yaş, cinsiyet ve özgeçmişte intrakraniyal sirkülasyonda başka bir anevrizmaya bağlı ikincil gelişmiş SAK varlığıdır [4], [5].

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) genomun herhangi bir bölgesinde bulunan tek nükleotid dizilim farklılıkları olup popülasyondaki örnek bireyler arasında yüksek yer değiştirme (substitüsyon) oranı gösteren, nükleotitler olarak da tanımlanabilir [6]. SNP'ler bazı durumlarda hastalığa yatkınlık nedeni olabilmektedirler [7]. Bu nedenle, SNP'ler hastalıkla ilişkilendirme çalışmalarında ideal belirteçler olarak önerilmektedir. Farklı toplumlarda risk allellerinin de farklı olduğu bilinmektedir, bu nedenle her toplumun SNP profilleri ayrı ayrı tanımlanmalıdır [8]. Çeşitli popülasyonlardan hasta ve kontrol gruplarında yapılan araştırmalar sonucu, intrakranial anevrizma ile ilişkili olan bazı SNP'ler tanımlanmıştır [9], [10], [11], [12] [13],[14]. rs911271 polimorfimi genom boyu ilişkilendirme çalışmaları ile çeşitli doğrulama çalışmalarında farklı toplumlarda intrakranial anevrizma ile ilişkilendirilmiştir [9]. Türk toplumunda SNP'lerin intrakranial anevrizma ile ilişkileri büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı toplumumuzda rs911271 polimorfizminin ile intrakranial anevrizma ilişkisinin araştırılmasıdır.

2. DENEYSSEL ÇALIŞMA

2.1. Kimyasal Maddeler ve Primerler

Çalışmaya başlangıç materyali olan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapmak amacıyla DNA izolasyon kiti (Invisorb Spin Blood Mini Kit) Invitex'ten temin edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan dNTP'ler (100 mM) Applied Biosystems'den, HotStarTaq Plus DNA polimeraz (5 U/µl) , 10 x PCR tampon çözeltisi ve MgCl₂ (25 mM) QIAGEN'den ve tüm aşamalarda kullanılan ultrasaf PCR-seviyesi distile su Invitrogen'den temin edilmiştir. PCR sonrası temizleme reaksiyonunda kullanılan shrimp alkaline fosfatase enzimi (1.7 U/µl) ve tampon çözeltisi; tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılan iPLEX enzim, 10 x iPLEX tampon çözeltisi, iPLEX Extension Mix ve rezin ile muamele aşamasında kullanılan SpectroCLEAN rezin Sequenom Inc.'den temin edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda ve genotipleme analizinde kullanılan primerler Sequenom Inc. tarafından sentezlenmiştir.

Amplifikasyon primerleri ve tek baz spesifik uzama reaksiyonunda kullanılan uzama problemleri Sequenom'un Assay Designer yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır [15]. rs911271 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 popülasyonu dijital substraksiyon anjiyografi (DSA) ve bilgisayarlı tomografi anjiyografi (BTA) ve manyetik rezonans anjiyografi (MRA) yöntemlerinden en az biri kullanılarak kesin tanısı konulmuş 105 adet intrakraniyal anevrizmalı hasta ve yine aynı tanı yöntemleri ile intrakraniyal anevrizma olmadığı belirlenen 102 adet kontrol örneği olmak üzere 207 örnekten oluşmaktadır. Bakırköy Dr. Sadı Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin 2012/03/02 Karar No'lu Etik Kurul Onayı ile, yine aynı hastanenin Girişimsel Nöroradyoloji ve Radyoloji Kliniğine başvuran hastalardan periferik kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır. Hastalardan örnek alınmadan önce kişiler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve asgari bilgilendirilmiş olur formu ile hastaların onamı alınmıştır. Ayrıca örnek alınan hastalardan IA ile ilişkili olabilecek diğer durumların belirlenmesi amacıyla hasta bilgi formu örneği doldurtularak bilgi 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 ($A_{260}/A_{280}=1.7-2.0$) [16].

2.3. SNP Genotipleme

Bu çalışmada SNP genotipleme analizi için iPLEX® yöntemi uygulanmıştır. iPLEX® yönteminde öncelikle SNP'yi içeren genom bölgeleri spesifik primerler yardımıyla PCR ile çoğaltılır ve ürünler kalıp olarak kullanılarak daha sonra tek baz uzama reaksiyonu (iPLEX reaksiyonu) gerçekleştirilir. Uzama probu adı verilen bir tespit edici primer 3' ucundaki nükleik asit dizisine yapışarak bu primer ddNTP içeren tek bir baz tarafından uzatılır [17]. Primerin 3' ucu allelik bazdan meydana gelmektedir ve polimorfik bölgeyi içeren PCR ürünü kalıp görevini görmektedir. Bu sebeple sadece 3' bazın hedef DNA'da bulunan allele komplementer olması durumunda primer uzatılır. Primer uzama olayının izlenmesi DNA örneğinde bulunan allelin anlaşılmasına izin verir [18], [19]. Allellerin kütle esaslı tespit edilmesi işlemi Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanlı (MALDI-TOF) kütle spektrometrisi (MS: Mass Spectrometry) aracılığı ile gerçekleştirilir.

Genotipleme analizinin başlangıç basamağında nükleik asit değişimlerinin belirlenebilmesi için öncelikle genomik DNA'daki hedef bölge, tasarım sonucu elde edilen forward ve reverse primer çiftleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon şeklinde Roche PCR enzimi kullanılarak 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 gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonrası ürünlerdeki bağlanmamış dNTP'ler, serbest dNTP'den bir fosfat grubunu keserek geri dönüşümsüz olarak dNDP'ye çeviren shrimp alkalen fosfotaz (SAP) enzimi ile nötralize edilmiştir. Bu reaksiyonda 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 eklenerek örnek plakası 1000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. SAP reaksiyonu 37 °C' de 40 dakika süreyle gerçekleştirilmiş, reaksiyon karışımı enzimin inaktive edilmesi için 85 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. SAP reaksiyonu sonucu elde edilen ürünler ile tek baz spesifik uzama reaksiyonu gerçekleştirilerek dizayn edilen problemlerin hedef bölge ile hibridizasyonu ve tek kütle-modifiye nükleotid uzaması gerçekleştirilmiştir. 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 enzimden oluşan reaksiyon karışımı hazırlanarak 1000 rpm hızında 1 dakika santrifüj edilmiştir ve örnek plakası üzerindeki her kuyuya 2 µl eklenmiştir. Örnek plakası yavaşça karıştırılmıştır ve termal döngüleyici aşaması öncesinde 1000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir [20], [21]. 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 spektroskopisi ile analizde Na⁺, K⁺ ve Mg²⁺ gibi iyonları uzaklaştırarak arka plan kirliliğini minimuma indirmek gerekmektedir. Bu amaçla katyonşk değişim sağlayan rezin tek baz spesifik uzama reaksiyonu ürünleri üzerine eklemiştir [22], [20]. Son olarak elde edilen modifiye ürünün analizi için ortalama 15 nl PCR ürünü 384-element SpectroCHIP® II üzerine Nanodispenser kullanılarak aktarılmıştır. Daha sonra çip genotipleme analizi için kütle spektroskopisi (MassARRAY® Analyser 4) cihazına yüklenmiştir. Lazer atımı sonrası kütle spektroskopisi cihazından elde edilen verilerin analizi, spektro görüntüsünün ve allel spesifik piklerin elde edilmesi için (iPLEX SpectroCHIP® II analizi) MassARRAY® TYPER 4.0 genotipleme yazılımı kullanılmıştır [20], [21].

2.4. İstatistiksel Analizler

Genotipleme analizi sonucu elde edilen verilen istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 20.0, Chicago, IC, USA) paket programı kullanılmıştır ve tüm testlerde $p \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. rs911271 polimorfizminin Hardy Weinberg dengesini değerlendirmek amacıyla ki-kare testi uygulanmıştır. İntrakranial anevrizma ile SNP allellerinin ilişkilendirilmesinde çalışma popülasyonunda kontrol grubuna göre yaygın (majör) olan allel belirlenerek referans olarak alınmıştır [23]. Hastalık ile ilişkili olabileceği öngörülen minör allelin referans allele göre odds ratio (OR) değeri ve % 95 güven aralıkları (GA) hesaplanmıştır. Çalışma popülasyonunda kontrol grubuna göre yaygın olan homozigot genotip belirlenip referans olarak alınarak intrakranial anevrizma ile SNP genotiplerinin ilişkilendirilmesi gerçekleştirilmiştir. OR değerleri ve % 95 güven aralıkları homozigot karşılaştırma modeline (Örneğin TT ile CC) ve dominant modele (Örneğin TT+TC ile CC) göre hesaplanmıştır [23], [24].

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Çalışma Grubundaki Örneklerin DNA Safılık ve Miktar Analizi

Genotipleme analizinin başlangıç materyali olarak izole edilen DNA örneklerinin çalışmada kullanılabilmesi amacıyla 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı 1.7 ile 2.0 arasında olmalıdır [16]. İzole edilen 207 DNA örneğinin tamamına ait A_{260}/A_{280} değerleri 1.7-2.0 arasında bulunmuştur. Ayrıca DNA örneklerinin tamamının konsantrasyonu belirlenerek PCR ile amplifikasyon için uygun değer olan minimum 20 ng/µl olarak elde edilmiştir.

3.2. Biyoinformatik Araçlar ile rs911271 Polimorfizminin Genomdaki Konumunun Belirlenmesi

rs911271 polimorfizminin genomdaki fiziksel konumunu belirlemek amacıyla NCBI SNP veritabanı ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları kataloğu kullanılmıştır. İlgili polimorfizmin

genomdaki fiziksel pozisyonu 236,310,024 olup kromozom 1'de bulunmaktadır. Bulunduğu pozisyondaki gen *GPR137B* ve allel değişimi A/C olarak belirlenmiştir [25], [26]. Sequenom Assay Designer yazılımı kullanılarak belirlenen ve 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. rs911271 polimorfizminin bulunduğu DNA dizisi (Forward PCR primeri kırmızı olan diziye, reverse PCR primeri mavi ile gösterilen diziye göre tasarlanmıştır, uzama probunun dizisi altı çizili kalın olarak gösterilmiştir, bç:baz çifti)

SNP'nin bulunduğu DNA dizisi	bç
5' TCCGTGCAATGCACACGATGCTGCAGTACGCAGCCCCGGCTGCCCTTG GGTACACATCTGAGGGTAATGCGATCATGAGCAAGCTCAA TTTGATT AACTT [A/C]CCCCTAAATCACTGCTTTTAAATTCTGCCATGTTAAGTCTC TTCC ACCCTAATGACCTCTCAGGCAGATCCTATGGCTTTCTAGTCAT ACTCGGTAAT 3'	100 bç [A/C] 100 bç

Multipleks reaksiyon sonrası tek baz spesifik uzama reaksiyonunda muhtemel hatalı bağlanmaları önlemek amacıyla tasarımda her bir amplifikasyon primerinin 5' ucuna genel bir 10-mer etiketi (5'-ACGTTGGATG-3') eklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle forward ve reverse PCR primerleri tasarlanırken her iki primer dizisinin 5' ucuna 10-mer etiketi eklenerek Çizelge 2'de forward primer için kırmızı ile gösterilen 5' ACGTTGGATGGCGATCATGAGCAAGCTCAA 3' dizisi ve reverse primer için mavi ile gösterilen 5' ACGTTGGATGGGAAAGAGACTTAACATGGC 3' dizisi elde edilmiştir. Uzama probu tasarlanırken Çizelge 2'de altı çizili olarak gösterildiği gibi probun 3' ucu polimorfik bölgenin hemen yanında seçilmiştir.

3.3. İstatistik Analiz Sonuçları

rs911271 polimorfizmi 105 hasta ve 102 kontrol örneği olmak üzere toplam 207 örnekte genotiplenerek örneklerin tamamına ait sonuçlar elde edilmiştir. İlgili polimorfizmin Hardy Weinberg dengesini test etmek için ki-kare testi uygulanmıştır ve $p=0,44$ değeri ile dengeden sapma göstermediği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$). İntrakranial anevrizma ile SNP allellerinin ilişkilendirilmesinde odds ratio değerleri hesaplanmıştır. rs911271 polimorfizminde C allelinin toplumumuzda yaygın olarak bulunduğu saptanmıştır. Odds ratio değeri nadir olan A alleli için 1,03 (%95 GA= 0,70-1,51) ve p değeri ise 0,890 olarak hesaplanmıştır. Odds ratio değeri 1'den büyük olarak tespit edilip hastalık ile ilişki olabileceğini öngörmesine rağmen p değerinin 0,890 olarak hesaplanması ile istatistik olarak anlamlı bir sonuç elde edilemediği için rs911271 polimorfizmi intrakranial anevrizma riski ile ilişkilendirilememiştir (Çizelge 3). Genotipe göre yapılan analiz sonucu toplumumuzda yaygın olarak bulunan CC genotipi referans alınarak odds ratio ve p değerleri hesaplanmış ancak $p > 0,05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Çizelge 3).

Bilguvar ve arkadaşları 2008 yılında intrakranial anevrizma ile belirli lokusları ilişkilendirmek üzere bir genom boyu ilişkilendirme çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada başlangıç popülasyonu olarak Avrupa atasal kökenli 1,580 hasta ve 6,276 kontrol grubu ve tekrar çalışması olarak Japon atasal kökenli 495 hasta ve 676 kontrol grubunun incelenmesi sonucu Avrupa ve Japon popülasyonunda $p=4 \times 10^{-8}$, OR=1,24 (%95 G.A.=1,15-1,34) değerleri ile rs700651-G polimorfizmini ve rs9298506-A, rs1333040-T, rs10958409-A polimorfizmlerini bu

populasyonlarda intrakranial anevrizma ile ilişkili olarak tanımlanmışlardır [9]. Aynı çalışmada rs911271 polimorfizmi için Finlandiya, Hollanda, Japonya, Avrupa (genel) ve tüm bu dört populasyona ait genotiplerin ortak değerlendirilmesi de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre rs911271 polimorfizmi OR= 1,19 (1,10-1,28) ve $p=1 \times 10^{-5}$ değerleri ile Avrupa genelinde intrakranial anevrizma ile ilişkili bulunurken, Japon populasyonunda ise OR=0,98 (0,83-1,16) ve $p=8,2 \times 10^{-1}$ değerleri ile intrakranial anevrizma ile ilişkilendirilememiştir.

Bu çalışma ile rs911271 polimorfizminin Türk toplumunda intrakranial anevrizma ile ilişkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Ancak OR değerinin 1'den büyük olarak tespit edilmesine karşın p değerinin istatistiki olarak anlamlı bulunamaması nedeniyle, örneklem sayısı artırılarak çalışmanın tekrar değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir.

Çizelge 3. rs911271 polimorfizminin allel ve genotip frekansları

rs7501939	Hasta (n=105)	Kontrol (n=102)	OR (% 95 GA)	p değeri
C	0,565	0,572	referans	
A	0,435	0,428	1,03 (0,70-1,51)	0,890
CC	39 (0,364)	32 (0,308)	referans	
CA	43 (0,402)	53 (0,529)	0.666 (0.359-1.234)	0,292
AA	23 (0,234)	17 (0,163)	1.110 (0.508-2.427)	0,284
CA+AA	66 (0,636)	70 (0,692)	0.774 (0.435-1.376)	0,218

Acknowledgments / Teşekkür

Bu çalışmanın yürütülmesine 2012-07-04-KAP01 no'lu proje ile mali destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Brisman, J.L. Song, J.K. ve Newell, D.W., (2006). "Cerebral aneurysms", *New England Journal of Medicine*, 355: 928-939.
- [2] Edlow, J.A., (2005). "Diagnosis of subarachnoid hemorrhage", *Neurocritical care*, 2: 99-109.
- [3] Juvela, S. Poussa, K. ve Porras, M., (2001). "Factors Affecting Formation and Growth of Intracranial Aneurysms A Long-Term Follow-Up Study", *Stroke*, 32: 485-491.
- [4] Evliyaoğlu, Ç., (2012). "İntrakraniyal Anevrizma Patofizyolojisi ve Genetiği", *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 22: 189-196.
- [5] Özpeynirci, Y., (2011). *İntrakraniyal Anevrizmalarda 3D Rotasyonel Anjiyografi ile Duvar Modellemesi*, ed^eds. Radyoloji. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 8-10.
- [6] Wang, D.G. Fan, J.-B. Siao, C.-J. Berno, A. Young, P. Sapolsky, R. Ghandour, G. Perkins, N. Winchester, E. ve Spencer, J., (1998). "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome", *Science*, 280: 1077-1082.

- [7] Harley, I. ve Narod, S., (2009). "Single nucleotide polymorphisms–variation on a theme", *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 116: 1556-1557.
- [8] Angaji, S.A. Akashi, K. Darvishani, S. ve Azad, M.S., (2011). "SNP and its Applications in Treating Human Diseases", *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*, 5.
- [9] Bilguvar, K. Yasuno, K. Niemelä, M. Ruigrok, Y.M. Von Und Zu Fraunberg, M. van Duijn, C.M. van den Berg, L.H. Mane, S. Mason, C.E. ve Choi, M., (2008). "Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations", *Nature genetics*, 40: 1472-1477.
- [10] Hashikata, H. Liu, W. Inoue, K. Mineharu, Y. Yamada, S. Nanayakkara, S. Matsuura, N. Hitomi, T. Takagi, Y. ve Hashimoto, N., (2010). "Confirmation of an association of single-nucleotide polymorphism rs1333040 on 9p21 with familial and sporadic intracranial aneurysms in Japanese patients", *Stroke*, 41: 1138-1144.
- [11] Deka, R. Koller, D.L. Lai, D. Indugula, S.R. Sun, G. Woo, D. Sauerbeck, L. Moomaw, C.J. Hornung, R. ve Connolly, E.S., (2010). "The relationship between smoking and replicated sequence variants on chromosomes 8 and 9 with familial intracranial aneurysm", *Stroke*, 41: 1132-1137.
- [12] Yasuno, K. Bilguvar, K. Bijlenga, P. Low, S.-K. Kirschke, B. Auburger, G. Simon, M. Krex, D. Arlier, Z. ve Nayak, N., (2010). "Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci", *Nature genetics*, 42: 420-425.
- [13] Yasuno, K. Bakırcioğlu, M. Low, S.-K. Bilgüvar, K. Gaál, E. Ruigrok, Y.M. Niemelä, M. Hata, A. Bijlenga, P. ve Kasuya, H., (2011). "Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 19707-19712.
- [14] Low, S.-K. Takahashi, A. Cha, P.-C. Zembutsu, H. Kamatani, N. Kubo, M. ve Nakamura, Y., (2012). "Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA", *Human molecular genetics*, 21: 2102-2110.
- [15] Sequenom, Available at: <https://www.mysequenom.com/Home>. [Accessed 20 Nisan 2012].
- [16] Sambrook, J. Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press New York*.
- [17] Ateş Sönmezöğlü, Ö. Yıldırım, A. ve Eserkaya Güleç, T., (2010). "Tek nükleotid farklılıkları (Snp) ve buğdayda kullanımı", *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3: 55-66.
- [18] Pastinen, T. Raitio, M. Lindroos, K. Tainola, P. Peltonen, L. ve Syvänen, A.-C., (2000). "A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays", *Genome Research*, 10: 1031-1042.
- [19] Kwok, P.-Y. ve Chen, X., (2003). "Detection of single nucleotide polymorphisms", *Current issues in molecular biology*, 5: 43-60.
- [20] Sequenom, (2009). *iPLEX Gold Application Guide*, ed^eds.
- [21] Sequenom, (2009). *iPLEX® Gold SNP Genotyping Training Protocol*, ed^eds.
- [22] Gabriel, S. Ziaugra, L. ve Tabbaa, D., (2009). "SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform", *Current protocols in human genetics*: 2.12. 11-12.12. 16.
- [23] Mittal, R.D. Mittal, T. Singh, A.K. ve Mandal, R.K., (2012). "Association of caspases with an increased prostate cancer risk in north Indian population", *DNA and cell biology*, 31: 67-73.
- [24] Hui, J. XU, Y. Yang, K. Liu, M. Wei, D. Zhang, Y. Shi, X.H. Yang, F. Wang, N. ve Zhang, Y., (2014). "Study of Genetic Variants of 8q21 and 8q24 Associated with Prostate Cancer in Jing-Jin Residents in Northern China", *Clin. Lab*, 5: 1.
- [25] "Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları kataloğu", Available at: <http://www.genome.gov/gwastudies/>. [Accessed 2014].

[26] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. [Accessed 2014].